635.8
L293ㅅ

GOVP1200100827

최 종
연구보고서

생물공학을 이용한 아가리쿠스 버섯의 대량생산 기술 및 가공제품 개발

Dvelopement of Mass Production Technology and Manufactured Goods from *Agaricus blazei* Using Biotechnology

주관연구기관 : 강원대학교
협동연구기관 : 서강대학교
위탁연구기관 : (주) 아 탑

농 림 부

대한민국
기증등록
2001. 2. 12
855195
국회도서관

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 **"생물공학을 이용한 아가리쿠스 버섯의 대량생산기술 및 가공제품 개발"** 의 최종보고서로 제출합니다.

2000. 10. 29.

주관연구기관명 : 강원대학교
총괄연구책임자 : 홍 억 기
연 구 원 : 권 명 상
협동연구기관명 : 서강대학교
협동연구책임자 : 오 세 용
위탁연구기관명 : (주) 아 탑
위탁연구책임자 : 이 문 찬

요 약 문

Ⅰ. 제 목

생물공학을 이용한 아가리쿠스 버섯의 대량생산 기술 및 가공제품 개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 중요성

최근 새로운 식량자량의 개발 및 유용물질 생산을 위해 버섯류의 이용에 대한 연구가 관심의 대상이 되고 있다. 버섯류는유전자원으로서의 중요성이 클 뿐만 아니라 오랜 세월동안 민간 전통한약으로 전래되어 왔으며 각종 질병에 대한 민간 요법제로 이용되어 왔다. 최근들어 버섯은 기능성 식품소재 및 각종 생리활성을 나타내는 신약개발 소재로서 큰 관심을 받고 있다. 이러한 버섯은 일반적으로 고분자 다당체, 단백질, 아미노산, 효소 비타민, 미네랄 등과 같이 인체에 중요한 각종 성분을 함유하고 있다.

인공재배를 통하여 매우 중요한 고부가가치 농산물로서 자리잡고 있는 버섯은 식용 및 약용으로 활용되고 있다. 항암효과가 탁월하다는 영지 및 운지버섯은 인공재배에 성공하였으며 상황버섯의 경우는 인공재배에는 어려움이 많지만 균사체 배양은 성공하여 항암 면역증강제로서 판매중에 있다.

최근에 아가리쿠스 버섯(*Agaricus blazei*)은 항암, 제암, 혈당 및 혈

압강하 작용 뿐아니라 각종 염증에 탁월한 면역기능 약화 억제효과를 보이는 특성으로 인해 많은 관심을 받고 있다. 구체적으로 아가리쿠스 버섯의 고분자 다당체는 생체 세포조직을 활성화시켜 인터페론의 효과와 바이러스 침입억제 효과가 높아 고형암은 물론 각종 암에 대한 효과가 보고되었으며, 천연물질에 의한 암 면역요법으로 각광을 받고 있다.

최근들어 일본으로부터 완제품을 수입하기 시작하면서 수입증가 추세는 급증하여 왔다. 따라서 본 연구를 통해 국내기술을 개발하여 막대한 수입대체 효과는 물론 농가의 소득증대를 야기시키며, 기능성 가공제품을 상업화하여 국제 시장의 진출을 꾀할 수 있을 것으로 판단된다. 아직까지 아가리쿠스 버섯의 가공제품은 제대로 개발되어 있지 않았다. 버섯 자실체를 열풍건조한 제품의 경우 다른 종류의 제품과 비교할 때 소비자들의 관심을 끌기에는 어려움이 있다고 판단된다.

따라서 본 연구과제에서 시도하고 있는 동결건조 제품의 경우 시장성이 있다고 판단되어 생물 원형 그대로 동결건조시키거나 또는 동결건조된 자실체를 분말화하여 포장 또는 추출농축액을 가공하여 식품첨가물에 응용하므로써 가공제품의 부가가치를 높일 수 있다고 판단된다. 또한 균사체를 동결건조한 분말을 이용하므로써 가공제품의 부가가치를 높일 수 있다고 판단된다. 또한 균사체를 동결건조한 분말을 이용하는 가공제품 개발을 검토하여 시장 경제성을 향상시킬 필요가 있다. 그러므로 이러한 가공제품 개발을 통하여 시장확보 및 확대할 수 있는 기반을 마련할 수 있다. 분리정제 기술개발을 통하여 추출공정을 최적화하므로써 시간과 경비를 경감하게 되며 추출물의 대량생산을 가능케하여 가공제품관련 마케팅 전략 수립에 기여할 수 있다. 더욱이 국내의 업체들과 가공제품관련 마케팅을 검토하는 과정에서 효능검색에 대한 국내 자체개발 기술을 토대로 한 실험결과들이 절실히 요구되므로 생리활성물질의 효능검색을 자체적으로 검증하여

아가리쿠스 버섯의 인지도 및 신뢰도를 구축하여 마케팅 전략에 활용할 필요가 있다. 따라서 본 연구과제 수행을 통하여 개발된 기술을 농가에 보급하고 가공제품관련 마케팅을 확립하므로써 농가소득을 증대시킬 수 있다. 또한 개발된 가공제품을 국내는 물론 국외로 수출할 수 있도록 효능검색에 대한 연구결과를 확보하여 가공제품 개발을 촉진시키고자 하였다.

따라서 본 연구에서는 아가리쿠스 버섯의 자실체 대량생산기술을 개발하고 액체배양공정 및 분리정제공정을 최적화하여 추출물로부터 생리활성물질(다당체)을 생산하고자 하였다. 생리활성물질의 효능검색을 통한 마케팅을 수립하여 대량생산을 이용한 상용화 기술에 응용하므로써 가공제품을 개발하고자 하였다.

Ⅲ. 연구 개발 내용 및 범위

1. 아가리쿠스 버섯의 가공제품 개발 및 시장경제성 평가 (연구책임자 : (주) 아탑 이문찬)

가. 종균제조 최적화

1) 종균제조시간 최소화

2) 고상종균의 안정화

나. 고체배양기술 개발

1) 버섯 생산배지 조성 검토

2) 버섯 생산배지 국산화 검토

다. 버섯 자실체 가공제품 개발

1) 가공제품 적용을 위한 가공기술 개발

2) 동결건조를 통한 가공제품의 고부가가치화

라. 버섯 및 배양여액 추출물 가공제품 개발

1) 가공제형에 따른 마케팅 전략 수립

2) 가공과정에 따른 기능성 물질 특성변화 검토

마. 버섯자실체 및 추출물 가공제품 개발

1) 가공제품화 촉진 및 다양화

2) 가공제품 시제품 생산

바. 가공제품의 마켓팅 전략 확립

1) 가공제형에 따른 시장 경제성 평가

2) 유통업체를 통한 마케팅 및 시장확보

2. 생물반응기를 이용한 종균 및 생리활성물질 생산공정 개발 (연구책임자 : 강원대 홍억기)

가. 액체배양기술 개발

1) 종균 개발 및 안정화

2) 최적 배지조성 검토

3) 최적 성장조건 확립

나. 액체배양공정 개발

1) 목적산물생산 촉진 및 저해요인 검토

2) 배양여액 추출물 대량생산공정 개발

다. 최적 액체배양공정 개발

1) 고농도 배양공정 개발

2) 생리활성물질 생산성 최대화

3) 생산성 극대화를 위한 생산공정 최적화

3. 생리활성물질 분리정제공정 개발

(연구책임자 : 서강대 오세용)

가. 분리정제기술 개발

1) 자실체로부터 생리활성물질 분리정제기술 개발

2) 균사체/배양여액으로부터 생리활성물질 분리정제기술 개발

나. 분리정제공정 개발

1) 생산성을 높이기 위한 추출공정 모색

2) 분리수율 향상을 위한 최적조건 확립

다. 추출물 분리정제공정 최적화

1) 초임계 유체 추출(SFE) 공정 최적화

2) Microwave Assisted Extraction(MAE) 공정 최적화

3) open 및 closed system의 추출 수율 비교

4. 아가리쿠스 버섯 추출물의 가공과정에 따른 효능검색

(연구책임자 : 강원대 권명상)

가. 자실체 추출 생리활성물질의 항암/항염 및 면역학적 작용 평가

1) in vitro내에서 종양세포주에 대한 항암작용 검색

2) in vitro내에서 면역세포에 미치는 항암/항염효과 탐색

3) 주요 질병원인균에 대한 in vitro 항균효과 검증

나. 자실체 추출 생리활성물질의 항암/항염에 대한 병리조직학적 검색

1) in vivo mice 급여에 미치는 단기복용효과 검색

2) in vivo mice 급여에 미치는 장기복용효과 검색

다. 가공과정에 따른 효능검색

1) 가공과정에 따른 추출물의 효능 검색

2) 추출물의 독성학적 평가

라. 가공제품의 생리활성물질 효능 검색

1) 급성독성 검색

2) 이식암 성장저해 평가

3) 항간암효과 검색

Ⅳ. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

가. 아가리쿠스 버섯의 가공제품 개발 및 시장경제성 평가

본 연구에서는 아가리쿠스 버섯의 자실체의 안정적 대량생산을 위한 종균제조의 최적화와 생산배지의 국산화 및 조성을 검토였고, 버섯 자실체 가공기술 및 가공제품 개발과 그에 따른 시장 경제성 평가를 수행하였다. 자실체 대량생산을 위해서 종균제조 기간을 단축 및 안정화 시킬수 있는 방법을 제시하였고, 생산배지 조성검토에서 수행된 연구과정에서 쓰인 모든 재료는 국산제품이어서 생산배지에 대한 국산화를 이룰 수 있었다. 단

지 대규모로 배지를 생산할 수 있는 곳이 국내 몇군데 밖에 없다. 더욱이 배지 제조시설이 다소 낙후되어 있어 1차 및 2차 중금속 오염에 노출될 가능성이 크다. 따라서 생산배지를 대량생산하고자 할 때 좀더 생산시설에 대한 철저한 관리 및 규격화에 비중을 두어야 할 것이다

버섯 자실체의 가공제품으로 열풍건조와 동결건조 방식을 검토한 결과 열풍건조는 건조물의 형태 보존이 어렵고, 버섯 자체가 가지고 있는 맛과 향에 변형이 이루어지기 쉽기 때문에 버섯 본래의 가지고 있는 맛과 향 및 영양소의 파괴를 최소화할 수 있는 동결건조 방식을 택하는 것이 좋을 것으로 판단된다. 동결건조시 열풍건조보다는 비용이 더 많이 드나 아가리쿠스 버섯은 송이 버섯과 마찬가지로 그 향이 매우 진하고 특이하다는 장점이 있으므로 버섯의 상품성을 높이고 맛과 향을 보존하기 위해서는 동결건조에 의한 방법을 선택하는 것이 올바른 선택이라 생각한다. 또한 버섯의 상품성과 부가가치를 높이기 위한 방법으로 정제된 버섯 추출물을 과립형태나 캅셀형태로 상품화하여 식품 및 의약품으로서도 그 이용가치가 높을 것으로 판단된다.

가공기술 개발과정에서 비교된 열풍건조와 현격한 차이는 대규모 냉동보관시설이 필요하며 동결건조장치로 이동시 해빙을 피할 수 있는 전달장치가 필요하다. 또한 자실체를 제품화할 경우 동결건조시 대와 갓이 분리되는 경우가 발생될 수 있다. 그러나 제품화되었을 경우 소비자의 선호도가 급격히 상승할 수 있기 때문에 고려되는 제형에 맞추어 동결건조방식을 이용하여 개발된 가공기술을 통하여 가공제품의 부가가치를 높일 수 있다. 각 종류의 가공원료를 이용하여 가공제형에 따른 시제품 생산을 시도하였다. 그 결과 자실체 분말을 이용한 tea-bag의 경우 과립형태로 제조하므로써 용출을 용이하게 할 수 있어 선호도를 높일 수 있을 것으로 판단되며, 자실체 열수추출물 및 배양여액 농축액을 이용한 캡슐평태의 경우 가

공처리에 따른 문제점 즉, 가공시간이 오래 걸리며 고점도로 인한 가공효율이 매우 떨어진다는 단점있다. 반면에 Spray dry를 이용하여 분말화한 후 tablet으로 가공할 경우 가공처리가 쉽고 대량생산시 큰 어려움이 없었다. 기능성음료(bottle)의 경우는 맛과 향을 고려하여 부형제를 첨가하므로써 기호도를 높이고자 하였다. 또한 자실체 열수추출액 및 배양여액 원액을 이용한 기능성 음료(pack)의 경우 원액 그 자체를 이용하므로써 맛 및 향은 다소 기호도가 떨어질 수 있으나 효능기대 효과를 촉진시켜 소비자의 선호도를 극대화시키고자 하였다.

나. 생물반응기를 이용한 종균 및 생리활성물질 생산공정 개발

본 실험에서는 *Agaricus blazei*를 이용한 액체배양을 위해 버섯 균체의 최적 생육조건 및 다당체 생성 조건을 검토하기 위하여 최적 균체성장 및 다당체 생산을 위한 탄소원, 질소원, 무기염류, 아미노산 등을 선별 및 최적농도를 검토하였고, C/N ratio를 검토하여 최적의 배지조성을 확립하였다. 또한 액체배양에 커다란 영향을 주는 온도, pH, 접종비 및 배양시간을 검토하여 최적 성장조건을 확립하였으며, 생물반응기를 이용한 회분배양을 통하여 통기량과 교반속도에 따른 균체성장 및 다당체 생산에 대한 촉진 및 저해요인을 검토하였다. 이상의 연구결과를 토대로 산업화에 맞는 경제성있는 배지에 대한 검토와 균체당 다당체 생성량을 기준으로 상업성에 맞는 최적 C/N ratio를 재검토하여 새로운 조성의 최적배지를 사용하여 생물반응기내에서의 균체성장과 다당체 생산을 위한 최적의 생물반응기 운전전략을 확립하였다. 그리고 균체량 및 다당체 생산을 향상시키기 위해 교반속도, 통기량 및 용존산소에 따른 균체량 및 다당체 생산성에 대한 연구를 기초로 회분배양에서의 비증식속도와 균체수율 값으로 기질 소모속도

를 예측하여 균체증식에 따라 공급배지의 조성과 공급속도에 변화를 주어 균체량과 다당체 생산의 극대화를 위한 유가배양을 수행하였다.

그 결과 플라스크배양의 경우 균체 및 다당체 생성을 위한 최적조건은 접종량을 5%로 하여 27℃, 150 rpm, 초기 pH 5.5에서 배양을 행하는 것이 최적임을 알 수 있었고, 플라스크 배양결과 glucose 80 g/L, yeast extract 20 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 2 g/L, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 2 g/L의 최적 배지조성인 modified medium을 조성하였다. 그 결과 균체량은 9.7 g/L, polysaccharide 생성량은 7.9 g/L를 나타내었다.

다당체 생성을 증가시키고자 아미노산의 영향을 비교·검토하였고, 그 결과 glutamic acid가 가장 좋은 결과를 나타내었으며, 2 g/L의 glutamic acid를 배양 4일째인 대수증식기에 첨가하여 다당체 생성을 유도한 경우 배양 7일에 12.9 g/L의 균체량과 9.1 g/L의 다당체를 생성하였다. 그러나 이러한 결과는 아미노산을 배양초기에 첨가하였을 경우와 비교하여 볼 때 균체량은 다소 증가하였으나 다당체 생성량에 있어서는 거의 유사한 결과를 나타내었다.

생물반응기를 사용한 회분배양에서 다당체 생산을 위한 최적의 교반속도와 통기량은 균체량과 다당체 생성량에 있어서 각각 13.2 g/L와 9.2 g/L를 나타낸 200 rpm과 0.5 vvm 이었다. 또한 pH를 5.5로 일정하게 조절하여 배양할 경우 균체량과 다당체 생성에 있어서 12.9 g/L와 8.7 g/L를 나타내어 오히려 pH를 조절하지 않은 경우에 비해 상대적으로 낮은 값을 나타내었다. 플라스크 배양에서 얻은 결과인 2 g/L의 glutamic acid를 대수증식기인 배양 4일째에 첨가한 경우 균체량은 13.5 g/L, 다당체 생성량은 9.9 g/L의 생산량을 나타내었다.

또한 산업화에 경제성을 고려하여 yeast extract와 무기염류의 최적농도를 결정하여 glucose 60 g/L, yeast extract 15 g/L, KH_2PO_4 2 g/L,

대한민국국회도서관장서

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/L, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.05 g/L의 optimum modified medium을 조성하였고 생물반응기를 이용한 회분배양에서 교반속도, 통기량, 용존산소 등의 물리적 요인을 검토하여 균사체와 다당체 생성을 위한 최적의 운전전략을 확립하였다. 이러한 결과를 토대로 고농도 세포배양을 위한 유가배양을 실시한 결과 최대 균체량과 다당체 생성량은 각각 21.4 g/L와 11.8 g/L로 가장 좋은 결과를 얻었다.

다. 생리활성물질 분리정제공정 개발

본 연구과제는 *Agaricus blazei* Murill 버섯(아가리쿠스버섯)에서 생리활성물질을 분리, 정제하기 위한 최적화된 공정을 개발하기 위한 것으로 추출공정을 열수추출, 마이크로웨이브를 이용한 추출, 초임계유체를 이용한 추출공정에 대한 최적화가 수행되었다.

생리활성물질의 추출 및 정제는 동결건조된 아가리쿠스 버섯 자실체 50 g을 열수추출한 후 에탄올에 의한 침전과 저분자 불순물 제거를 위한 투석공정을 거쳐 동결건조하여 조다당체(CR.PS) 1.5 g을 생성하여 3.0%의 수율을 나타내었다. 이것을 ion chromatography법을 이용하여 중성다당체(IN) 0.51 g과 산성다당체(IA) 0.75 g으로 분리하였다. 또한 분자량 측정과 고분자량 다당체(GH)와 저분자량 다당체(GL)를 분리하기 위하여 gel filtration chromatography법을 이용하였다. IN 0.8 g에서 고분자량 다당체 0.20 g과 더불어 저분자량 다당체 0.31 g을 분리하였다.

분리된 다당체 IN은 gel chromatography column을 이용하여 GH와 GL을 분리하였고 분리된 GH와 GL의 분자량은 3.90×10^6 g과 1.50×10^4 g으로 측정되었다. IN 100 mg을 적용해 분리된 GH와 GL의 양은 24 mg과 53 mg이었다. 따라서 분자량이 적은 GL이 IN에 많이 포함되어 있는 것을 확인하였

다. 생리활성물질의 분석결과 탄수화물량은 GH가 63%로 가장 많은 탄수화물을 함유하고 있었고, IN이 44%로 가장 적은 탄수화물을 함유하고 있는 것을 알 수 있었다. 또한 단백질의 함유량이 가장 많은 것은 22.96%를 함유한 IA이었고, 가장 적은 것은 1.82%를 함유한 GH임을 알 수 있었다.

HPLC를 이용하여 탄수화물의 단당 성분분석을 하였고 특히 CR.PS와 IN에 많이 포함되어 있으며, galactose와 mannose는 GH에 가장 많이 함유되어 있고, fructose와 glucosamine은 각 추출물질에 조금씩 고루 함유되어 있음을 확인하였다. 추출 및 분리된 다당체에 대한 ^{1}H, ^{13}C-NMR과 FT-IR 분석을 통하여 standard로 구입한 느타리버섯에서 추출한 β-glucan과 비교한 결과 대부분의 피크가 일치함을 확인할 수 있어 분리된 다당체는 β-glucan임을 확인하였다.

최적의 분리공정 조건을 결정하기 위하여 동결건조된 아가리쿠스 버섯 10 g을 사용하여 열수추출 온도를 달리한 결과 65℃에서 추출된 CR.PS양에 비해 95℃에서 추출된 것은 3배 이상이었으므로 최적 추출온도를 추출수율이 가장 높은 95℃로 결정하였다. 최적온도로 결정된 95℃에서 열수추출 시간을 달리하였을 때 생성된 CR.PS의 수율을 나타낸 것으로, 추출시간이 길어질수록 CR.PS양은 생성량이 증가하나, 10시간 이후에는 거의 일정한 값을 보이므로 최적 추출시간을 10시간으로 결정하였다. 최적 침전용매량을 결정하기 위하여 침전용매인 ethanol의 양을 열수추출 액량의 2배, 3배, 4배, 5배로 변화시켰을 때의 CR.PS양은 ethanol의 양이 증가함에 따라 CR.PS의 수율이 증가하지만, 4배 이상의 양에서는 더 이상 수율의 증가가 이루어지지 않아 최적 침전 용매량을 추출액의 4배에 해당하는 ethanol량으로 결정하였다. 알려진 생리활성물질들은 분자량이 2만 이상이므로 저분자의 불순물들을 제거하기 위한 투석공정이 필요함에 따라 최적 투석시간은 생성물에서 저분자 불순물들이 검출되지 않는 최소의 시간으로

결정하였으며, 7일 동안 투석한 이후에는 저분자 불순물의 투석이 완료되어 CR.PS의 양의 변화가 거의 없었으므로 고분자량 다당체를 얻기 위한 최적 투석시간을 7일로 결정하였다. 그러나 CR.PS와 7일간 투석한 것을 비교해보면 70%이상 감소함을 알 수 있었다. 이는 투석되는 분자량이 12,000 이하인 불순물이 침전액 전체의 70% 이상에 해당함을 알 수 있었다.

분리 수율을 높일 수 있는 새로운 공정으로 마이크로웨이브를 이용한 추출, 초임계유체를 이용한 추출공정에 대한 최적화가 수행되었고 마이크로웨이브를 이용한 개방형 추출실험과 밀폐형 추출실험에서 추출시간과 마이크로웨이브 출력 등 운전조건을 달리하여 얻은 결과 모든 실험조건에서 개방형의 경우보다 밀폐형 추출실험의 수율이 약 5%정도 높게 나타났으며, 수율향상을 위해서는 밀폐형 추출공정이 적절함을 알 수 있었다.

추출시간과 마이크로웨이브 출력에 따른 수율의 변화를 살펴보면, 추출시간과 마이크로웨이브 출력의 증가는 모두 수율을 향상시키는 결과를 보였다. 수율을 향상시키는 정도는 마이크로웨이브의 출력증가가 훨씬 효과적이었다. 추출시간의 증가에 따른 수율의 증가는 추출시간이 50분까지 증가함에 따라서 선형적 수율 증가가 이루어지지만 50분 이후의 추출시간 증가가 유도하는 수율의 증가는 매우 낮았다. 반면에 마이크로웨이브 출력의 증가에 따라서는 실험한 조건내에서 추출 수율의 선형적 증가가 유지되는 것으로 나타났다. 따라서, 다당류 추출 수율의 향상을 위한 최적 운전조건으로 50분의 추출시간과 실험조건내에서는 650 watt의 마이크로웨이브 출력으로 밀폐형 추출방법을 이용하는 것으로 결정하였다.

본 연구자들에 의해 수행되었던 열수추출방법과 본 연구의 다당류 추출 수율을 비교해 보면 열수추출의 경우 10시간의 추출시간, 추출액대비 4배의 유기용매량, 3일의 투석시간의 최적조건하에서 0.0301 g/g의 다당류를 얻을 수 있었으며, 마이크로웨이브를 이용한 밀폐형 추출의 경우에는

50분의 추출시간, 추출액대비 2배의 유기용매량, 2일의 투석시간과 마이크로웨이브 출력 650 watt의 최적조건하에서 0.0411 g/g의 다당류를 얻음으로써 추출수율이 열수추출에 비해 36.5% 증가하였다. 수율의 증가뿐아니라, 마이크로웨이브를 이용한 추출은 기존의 열수추출에 비하여 추출시간은 1/10 이하로, 사용되는 용매의 양은 1/2로, 투석에 소요되는 시간은 2/3를 줄일 수 있어 추출공정의 집적화와 소형화가 가능하였다. 또한 초임계 유체 추출법을 이용하여 비극성 생리활성물질을 분리하였으며 추출물질은 linoleic acid(cis-9, cis-12-octadecadienoic acid)인 것으로 분석되었다. 따라서 아가리쿠스 버섯 자실체는 기존의 극성 물질 추출방법을 통하여 극성 생리활성물질로 β-glucan을 가지고 있으며 초임계 추출을 통하여 비극성 생리활성물질로 linoleic acid를 포함하고 있음을 알 수 있었다.

라. 아가리쿠스 버섯 추출물의 가공과정에 따른 효능검색

*Agaricus blazei*의 열수추출물은 농도에 의존한 강력한 종양억제작용을 나타내었다. 특히 사람의 위암 세포주인 KATOIII의 경우 1×10^7 /well의 군에서 65.9%, 간암 세포주인 Hep3B의 경우는 1×10^6/well의 군에서 78.2% 그리고 폐암세포주인 A549의 경우는 고농도인 1,000 ppm에서 세포의 농도에 관계없이 공히 70%가 넘는 발육억제효과를 나타내었다. 또한 호중구나 단핵구 모두 3 ppm부터 100 ppm의 농도까지는 농도에 비례한 증가된 탐식작용을 나타내었으며 특히 인체 monocyte의 탐식작용은 100 ppm 처리군의 경우 7.9배나 증가하여 강력한 탐식작용의 증가를 나타내었다. 이는 향후 *Agaricus blazei* 추출물의 가공 고부가가치의 상품화를 위한 준임상자료로서 매우 의미가 있다고 하겠다. 주요 질병 원

인균에 대한 in vitro내 항균효과는 각종 질병의 원인균으로서 문제시 되는 중요한 세균들은 모두 버섯 자실체의 농도에 관계없이 감수성이 없는 것으로 판명되었다. 대조군으로 사용된 quinolone계의 norfloxacin은 각각의 세균에 모두 항균효과를 나타내었다. 따라서 아가리쿠스 버섯의 주요성분이 세균들에 직접 작용한다기보다는 주된 작용이 면역기능에 깊은 관련이 있음을 추정케 하였다.

열수추출 *Agaricus blazei*의 단기복용효과에서 *Agaricus blazei* 투여는 종양이 발생한 KSN-nu Mice에서 면역계의 초기 반응에서 T cell의 활성을 유도했으며 CD3+와 CD25+세포군의 증가와 항원제시 세포로부터 signal을 받아 면역 반응을 증진시키는 MHC class II를 발현하는 세포군의 증가는 *Agaricus blazei*의 투여가 면역계를 증진시킴을 확인할 수 있었다. 특히 helper T cell의 유의성있는 증가는 signal transduction을 통해 B cell과 cytotoxic T cell의 항원 특이적인 cellular immunity를 증대시킴으로써 antitumor activity를 나타냄을 확인할 수 있었다. 또한 *Agaricus blazei*투여 nude mice 경우 면역계의 초기반응에 T-림파구의 활성화에 관여하고 아울러 T-helper 세포의 증가를 유발하여 B-림파구와 cytotoxic T-cell의 세포면역반응의 증가를 유도하여 항암작용이 있음을 알 수 있었다. 장기복용효과는 *Agaricus blazei* 100 ㎎을 함께 처리한 군은 종양세포 단독투여군에 비하여 Mn-SOD 활성도와 TNF-α receptor의 발현도가 유의차 있게 높았다. *Agaricus blazei* 100 ㎎을 함께 처리한 군은 종양세포 단독투여군에 비하여 조직의 산화적 손상을 방지하고 free radical의 해독작용을 하는 catalase의 양이 증가되었다.

가공과정에 따른 추출물의 효능검색에서 ethanol 추출 *Agaricus blazei*의 종양세포주에 대한 억제 효과는 추출물의 농도에 의존한 강력한 종양세포 생육저해효과가 있었다. 특히 100 ppm 이상의 농도에서 처리군의

경우 마우스의 Sarcoma 180, T-lymphoma인 Yac-1, 사람의 유방암에 대한 생육저해효과가 있었고 30 ppm이상의 농도에서는 위암, 간암 및 폐암세포주에 대한 강력한 생육 저해효과가 있음을 밝혀낼 수 있었다. 또한 추출물의 독성학적 검토결과 in vitro내에서 급성염증시 작용하는 인체 neutrophil의 탐식작용을 10 ppm 이상의 농도에서 20%이상 증가시켰고 만성염증시 작용하는 인체 monocyte의 탐식작용은 10 ppm 이상 처리군의 경우 2배나 증가됨을 알 수 있었다.

가공제품의 생리활성물질의 급성독성 검사결과 *Agaricus blazei*의 열수 및 ethanol추출물은 공히 10,000 mg/kg 이상에서도 아무런 해가 없어 치사량에 해당되지 않는 안전한 것으로 사료되어 가공 제품으로의 개발에 아무런 문제가 없음을 알 수 있었다. 또한 가공물의 이식암 저해 효과는 투여 16일째부터 300 mg/kg 자실체 투여군의 경우 암의 용적이 대조군의 133.6 mm^3 에 비하여 93.5 mm^3 의 현저한 저해작용을 하였으며 이를 저해율로 환산하면 30%에 해당한다. 한편 600 mg/kg 투여군의 경우는 73.1 mm^3 로 더욱 더 억제되어 저해율은 45.5%이었다. 투여 29일째의 경우는 대조군의 경우 108.7 mm^3 인데 반하여 300 mg/kg 투여군은 59.1 mm^3 로 저해율은 45.6%였으며 특히 600 mg/kg 자실체 투여군은 더욱 억제 작용을 하여 38.9 mm^3 의 64.2%의 강력한 저해율을 나타내었다. Diethyl nitrosamine(DEN) 랫드 모델을 이용한 *Agaricus blazei*의 항간암효과 역시 부분 간절제술과 DEN투여에 의한 간손상으로 인하여 간세포 핵의 이형성이나 호산성병소 혹은 호염기성 병소 같은 간세포의 변성 소견이 양성 대조군에서 두드러지게 관찰되었으나 *Agaricus blazei*를 투여한 모든 군에서는 이러한 병소의 간세포 회복 소견이 관찰되었다. 즉, 조직의 재생정도가 *Agaricus blazei* 처치군에서 고르게 대조군과 비교하여 높았다.

2. 활용에 대한 건의사항

본 연구과제에서의 연구결과로 아가리쿠스 버섯의 자실체 생산배지를 국산원료로 대체하여 배지 규격화 및 종균개발을 통해 버섯의 대량생산 기술을 개발할 수 있었으며, 액체배양공정의 최적화를 통해 생리활성물질의 생산성을 극대화할 수 있었다. 또한 분리정제공정을 최적화하므로써 시간과 비용을 경감하여 생리활성물질의 생산을 위한 산업화의 토대를 마련하였고 생리활성물질의 효능검색을 자체적으로 검증하여 아가리쿠스 버섯의 인지도 및 신뢰도를 구축하였다. 따라서 본 연구결과의 활용방안으로 아래와 같이 제시할 수 있다.

가. 본 연구결과를 활용할 수 있는 분야로는 버섯생산의 안정적 대량생산 분야 및 생리활성물질을 이용한 기능성 가공식품개발 분야 등에 활용.

나. 본 연구결과를 통한 기술 및 제품의 현장보급 방안으로는 버섯의 생산배지 규격화를 통해 농가에 보급하므로써 대량생산이 가능해지므로 농가의 고소득을 증진시킬 수 있으며 고부가치의 기능성 가공제품 원료의 원활한 공급에 활용.

다. 가공제품의 시제품 제작을 시도하여 고부가치의 가공제품 개발 가능성을 제시하며 마케팅 전략 수립에 필요한 연구자료를 제시하므로써 가공제품 개발 촉진에 활용.

라. 최적 액체배양공정기술을 개발하므로써 가공제품 판매망 확보시 수요증대에 따른 식품첨가물 원료를 원활히 공급하는데 활용.

마. 약효효능검색에 대한 연구결과를 토대로 하여 지속적인 생산 및 판매망 확보에 활용.

바. 일반인은 물론 암질환자의 치료식 또는 예방식으로 섭취가능한 기능성 식품 개발을 통하여 새로운 제품시장 창출에 활용.

사. 다양한 기능성 식품소재 생산공정에 응용하여 관련 가공제품 생산성 향상 및 국제 경쟁력 강화.

아. 본 연구결과를 통한 제품의 기업화 방안으로 시제품 제작을 통한 항암 기능성 식품의 개발 가능성을 제시하여 식품 및 제약업계를 통한 실제 제품의 대량생산 유도에 활용.

SUMMARY

Numerous effort has been made to treat cancer and tumor. There are three kinds of method for the treatmemt of cancer and tumor. Chemotherapy, radiotheraphy, and surgical operation has been main trend. Those methods, however, have some undesirable side effects. Recently, anti-tumor polysaccharides have been isolated from natural sources such as higher plants, fungi, yeast, bacteria. These polysaccharides used biological therapy to overcome these side effects and to enhance the immune system, especially, behaving as an immunomodulators.

The antitumor polysaccharides widely vary each other from the viewpoint of the sugar composition and the chemical structure. Generally, the common structure of the active polysaccharides is the (1-3)-linked β-D-glucopyranosyl units. These units are randomly branched by β-D-glucopyranosyl units attached with 1-6 linkage. According to the extent of degree of branch, molecular size or structure conformation, the activity was greatly varied.

part 1. Development of manufactured goods from *Agaricus blazei* and economic evaluation

Agaricus blazei murill is an edible mushroom belong to Basidiomycete. this mushroom has recently been attractive as a health-oriented food and as a material for the development of drugs.

In this studies, optimization of seed culture conditions and development of solid culture techniques was investigated for mass production of *Agaricus blazei* fruiting body. As well as economic evaluations of marketing, development of fruiting body's manufactured techniques and goods was carried out.

It was elucidated how to shorten cultivation time of seed and to maintain the stability in mass production of fruiting body. The materials of solid medium compositions was able to obtain through domestic resources.

Freeze drying and heated air drying methods were investigated for the development of fruiting body's manufactured technique, In case of freeze drying method, fruiting body's taste, flavor and shape were stably preserved. Therefore, freeze drying method was better manufactured technique than heated air drying method. Although freeze drying method is more expensive than heated air drying method, this method was necessary to preserve the advantage of special flavor's from *Agaricus blazei* like a *Tricholoma matsutake*. One of the methods to produce a high quality of manufactured goods is a granule or a capsule from with hot water extract of fruiting body to commercialize in a food and drugs.

Because of the ease in dissolving in water, tea-bag with *Agaricus blazei* powder will be attractive for customer. Since hot-water extract of fruiting body and culture broth was high viscosity, it was difficult to manufacture capsule. However, it was not difficult to manufacture tablet formulation being able to mass

production. Manufactured goods using extracts of culture broth and fruiting body were expected to enlarge market size because customers expect an anti-tumor effect.

Part 2. Process development for seed and bioactive materials production with *Agaricus blazei* using bioreactor

The polysaccharides having antitumor activities were reported, which were extracted from the fruiting bodies, mycelia, and cultured broths of *Agaricus blazei*. In order to maximize the polysaccharide production, this work had concentrated on elucidating the characteristics of cell cultivation and polysaccharide production through the liquid cultivation. The effects of the culture conditions and the medium compositions such like carbon, nitrogen, trace metal, and mineral sources were examined to increase the polysaccharide production.

The culture conditions for the polysaccharide production were 27℃, 150 rpm, and the initial pH 5.5. A new modified medium was developed for the polysaccharide production. The optimum glucose and yeast extract concentrations were determined as 80 g/L and 20 g/L, respectively. The addition of 2 g/L $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ and 2 g/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ increased the polysaccharide production.

Amino acids were examined to increase the polysaccharide production in the liquid culture. The effects of amino acids on polysaccharide production were studied in the YMK medium and the

modified medium. When 2 g/L of glutamic acid was applied at 4 days of the cultivation, the biomass concentration was 12.9 g/L and the polysaccharide production was 9.1 g/L in the modified medium.

In batch culture without pH control, the maximum biomass concentration was 13.2 g/L and the maximum polysaccharide production was 9.2 g/L with the culture conditions of 200 rpm and 0.5 vvm. On the other hand, when the biomass concentration and polysaccharide production were lower with pH control than those without pH control. When 2 g/L of glutamic acid was provided at 4 days, the biomass concentration was 13.5 g/L and the polysaccharide production was 9.9 g/L.

The optimal modified medium contained 60 g/L glucose, 15 g/L yeast extract, 2 g/L KH_2PO_4, 1 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05 g/L $MnSO_4 \cdot 5H_2O$. In flask culture, the maximum cell growth was 7.1 g/L and the polysaccharide production was 4.1 g/L.

The effects of agitation and aeration were investigated for the polysaccharide production and cell growth in batch culture. Agitation was varied from 50 to 300 rpm and aeration was from 0.5 to 1.5 vvm. The polysaccharide and biomass concentrations were 6.5 g/L and 12 g/L, respectively, at 100 rpm and 1 vvm. In order to increase the cell growth and the polysaccharide production, the relationship between dissolved oxygen concentration and polysaccharide production were examined. When dissoved oxygen concentration maintained at the level of 10-20%, the biomasss concentration was 13.8 g/L and the polysaccharide production was 8 g/L.

In order to maximize the cell growth and the polysaccharide production, two kinds of fed-batch fermentation process were performed with varying the feeding medium compositions and the feeding rate. The relationship between dissolved oxygen concentration and polysaccharide production in batch fermentation was applied to fed-batch fermentation. The biomasss concentration was 21.4 g/L and the polysaccharide production was 11.8 g/L by the constant feeding rate of 6 mL/hr with 80 g/L glucose and the modified linear-increase feeding rate with 20 g/L yeast extract.

Part 3. Process development for isolation and purification of bioactive materials from *Agaricus blazei* fruiting bodies

β-Glucan, a kind of polysaccharide which is a particularly abundant in *Agaricus blazei*, is known as the bioactive materials, especially anticancer agents. The process development of the isolation and purification process of water soluble β-glucans from *Agaricus blazei* was achieved and the process operation variables were optimized.

Crude polysaccharides(CR.PS) were obtained from *Agaricus blazei* fruiting bodies by hot water extraction, filtration, solvent precipitation, dialysis, and freeze drying. Neutral and acidic fractions of polysaccharides were separated from crude polysaccharides by ion chromatography and then high molecular

weight(GH) and low molecular weight(GL) fractions were separated from neutral fraction by gel chromatography. The high molecular weight was about 3.9×10^6 and the low molecular weight was 1.5×10^4. The chemical analysis of the extract from each fraction compounds showed 44-63% of polysaccharide and 2-23% of protein. The polysaccharide consisted of five kinds of monosaccharides, glucose, galactose, mannose, fructose, and glucosamine. The optimal conditions of temperatures, operating time, organic solvent volume for precipitation and dialysis time were investigated to optimize the process of isolation. The optimal temperature and operating time were 95 ℃ and 10 hours, respectively. Optimal ethanol volume for precipitation and dialysis time were determined 4 times and 7 day, respectively.

To maximize the β-glucan extraction, applied microwave assisted extraction method was applied. Optimal extraction conditions were obtained under various extraction time and applied power, which was examined as 200, 500 and 650 watt. It was also examined for open system and closed system. The structure and concentrations of the raffinates were analyzed by nuclear magnetic resonance spectroscopy(NMR) and infrared spectroscopy (IR).

In case of conventional solvent extraction method, the polysaccharide was obtained 0.0301 g/g under the condition of 10 hours extraction, 4 times solvent volume and 3 days dialysis time. Whereas, microwave assisted extraction method allowed to obtain 0.0411 g/g of polysaccharide under the condition of 50 minutes

extraction, 2 times solvent volume, 2 days dialysis time and applied power 650 watt.

From these results, it was proved that the extraction yield of microwave assisted extraction method was higher than that of conventional solvent extraction method. It was also observed that microwave assisted extraction method requires less amounts of solvents and extraction time compared with the conventional solvent extraction method.

The supercritical fluid extraction(SFE) technique was applied for the isolation and purification of nonpolar physiologically active materials from *Agaricus blazei* fruiting bodies. The qualitative analysis of extract was accomplished by gas chromatography-mass spectrometer(GC-MS), and the extract was determined as a linoleic acid(cic-9, cis-12-octadecadienoic acid). In order to obtain the optimum operating conditions for supercritical fluid extraction process, the various temperatures and pressures were applied for process operation. From the comparison of extraction efficiency, 50 ℃ and 200 Kg_f/cm^2 were determined as optimum conditions

Parts 4. Determination of various functional effects of *Agaricus blazei* following different manufacturing process

The antitumor activity of water extracted *Agaricus blazei* was examined against five kinds of established tumor cell lines. For the test, we prepared human gastric carcinoma (KATO III), human lung

carcinoma (A549), human breast adenocarcinoma (MCF-7), Hep-3B (Human hepatocellular carcinoma), mouse lymphoma (Sarcoma 180), and mouse lymphoma (Yac-1). *Agaricus blazei* was effective at 3 ppm, 10 ppm, 30 ppm, 100 ppm, and 1,000 ppm, respectively. These results suggested *Agaricus blazei* may have tumoricidal activity.

In order to determine the effect of *Agaricus blazei* on the phagocytic activity, we prepared human neutrophils and monocytes. And the phagocytic cells were cultured with doses of 3 ppm, 10 ppm, 30 ppm, 100 ppm and 1,000 ppm, respectively. In all phagocytes treated with different doses of *Agaricus blazei*, there was moderately enhanced phagocytic activity. And the enhanced phagocytic activity was fully doses dependent. To determine the bactericidal and bacteriostatic effect of water extracted *Agaricus blazei*, we used disc assay with various kinds of bacterial strains. The results proved that *Agaricus blazei* has pronounced non antibacterial effect.

In order to determine the influence of *Agaricus blazei* on immune function, various concentrations of *Agaricus blazei* were administered to mice for 10 weeks. And the functions of various immune cells are analyzed by monoclonal antibodies. The *Agaricus blazei* administered group showed an enhanced immune function to compared with untreated control group. *Agaricus blazei* induced the activation of T-cell in the early immune reaction. The expression of MHC-class II was also increased in the *Agaricus blazei* administered group. And the increase of helper T cell by *Agaricus blazei* affected the B-cell and cytotoxic T-cell activation by signal transduction.

These results suggested that long term administration of *Agaricus blazei* modulated the immune function in vivo. The aims of this study was to elucidate the anti-oxidative effect of *Agaricus blazei* in the tumor bearing mice. Mn-SOD activity, the expression of TNF-α receptor, catalase activity and glutathione peroxidase activity in the water extracted *Agaricus blazei* 100 mg/kg treated gorup were significantly increased, respectively.

The antitumor activity of ethanol extracted *Agaricus blazei* was examined against various kinds of established tumor cell lines. For the test, we prepared human gastric carcinoma (KATO III), human lung carcinoma (A549), human breast adenocarcinoma (MCF-7), mouse lymphoma (Sarcoma 180), Hep-3B (Human hepatocellular carcinoma), and mouse lymphoma (Yac-1). Ethanol extracted *Agaricus blazei* showed an inhibitory effect in all tested tumor cell lines at 100ppm. These results suggested *Agaricus blazei* might have an tumoricidal activity.

To determine the effect of ethanol extracted *Agaricus blazei* on the phagocytic activity, we prepared human neutrophils and monocytes. And the phagocytic cells were cultured with doses of 3 ppm, 10 ppm, 30 ppm, 100 ppm and 1,000 ppm, respectively. In all phagocytes treated with different doses of *Agaricus blazei*, there was the moderately enhanced chemiluminsescence activity neutrophils. And the phagocytic activity of ethanol extracted *Agaricus blazei* against monocytes was much higher(2 to 7 fold) in comparison with that of neutrophils. To study the effect of ethanol extracted *Agaricus blazei* on the natural killer(N-K) cell cytotoxicity, we prepared mice N-K

cell treated with Yac-1. And the N-K cells were cultured with doses of 4 mg, 8 mg, and 16 mg, respectively. In all N-K cells treated with different doses of *Agaricus blazei*, there was the moderately enhanced N-K cell cytotoxicity. And the enhanced N-K cell cytotoxicity was fully doses dependent.

Acute oral toxicity of *Agaricus blazei* was performed in ICR mices. ICR mice were administered with dose of 10,000 ppm of ethanol and water extracted *Agaricus blazei*, respectively. And clinical signs, mortality and body weight changes were observed for 2 weeks. In all animals administered with ethanol and water extracted *Agaricus blazei*, there was neither dead animals nor significant changes of body weights. In addition, no differences were found between control and treated groups in clinical signs and autopsy findings. Therefore, LD50 of *Agaricus blazei* was considered to be higher than 10,000 ppm in ICR mices. In order to investigate the curative activity of per oral administration of *Agaricus blazei* on tumor, ICR mice was subcutaneously implanted Sarcoma 180. In the 300 mg/kg and 600 mg/kg *Agaricus blazei* administered groups on 29th day, the development of implanted tumors was severely inhibited by 45.6% and 64.2%, respectively. The regression rate of tumor was dose dependent. These data indicated that *Agaricus blazei* showed an anti-tumor effect.

In order to investigate the curative activity of per oral administration of *Agaricus blazei* (300 mg/kg) on hepatic carcinogenesis promotion, ICR mice were treated by partial hepatectomy(PH) and also diethyl nitorsamine(DEN), a

hepatocarcinogenesis promotor. In all *Agaricus blazei* administered groups compared to PH and DEN, PCNA positive cells, which was a marker for tissue regeneration, were significantly reduced. These data indicated that *Agaricus blazei* showed an immune-modulating effect.

CONTENTS

Dvelopement of Mass Production Technology and Manufactured Goods from *Agaricus blazei* Using Biotechnology

Chapter I. Introduction ---------- 40

1. Purpose and scope of study ---------- 40

2. Objectives and content of research and application of research results ---------- 44

3. Expected effects of research results ---------- 48

Chapter II. Development of Manufactured Goods from *Agaricus blazei* and Economic Evaluation ---------- 49

2.1. Introduction ---------- 49

2.2. Method of Research ---------- 50

2.2.1. Optimization of seed culture ---------- 50

2.2.2. Development of solid culture technique ---------- 51

2.2.3. Development of fruiting body's manufactured goods ---- 52

2.2.4. Development of manufactured goods from fruiting body and culture broth ---------- 52

2.2.5. Development of manufactured goods from fruiting body and extracts ---------- 53

2.2.6. Marketting strategy of manufactured goods ---------- 53

2.3. Results and Discussion ---------- 54

2.3.1. Optimization of seed culture ---------- 54

2.3.2. Development of soild culture technique ---------- 56

2.3.3. Development of fruiting body's manufactured goods ---- 66

2.2.4. Development of manufactured goods from fruiting body and culture broth ---------- 73

2.2.5. Development of manufactured goods from fruiting body and extracts ---------- 75

2.2.6. Marketting strategy of manufactured goods ---------- 78

2.4. Conclusions ---------- 90

Chapter III. Process Development for Seed and Bioactive Materials Production with *Agaricus blazei* Using Bioreactor ---------- 92

3.1. Introduction ---------- 92

3.2. Materials and Methods ---------- 96

3.2.1. Experimental materials ---------- 96

3.2.2. Culture conditions ---------- 96

3.3.3. Analysis ---------- 97

3.3. Results and Discussion ---------- 100

3.3.1. Development of fermentation technique ---------- 100

3.3.2. Process development for fermentation ---------- 105

3.3.3. Optimization of fermentation process ---------- 114

3.4. Conclusions ---------- 157

3.5. References ---------- 159

Chapter Ⅳ. Process Development for Isolation and Purification of Bioactive Materials from *Agaricus blazei* Fruiting Bodies ---------- 168

4.1. Introduction ---------- 168

4.2. Materials and Methods ---------- 172

4.2.1. Hot-water extraction ---------- 172

4.2.2. Microwave assisted extraction method ---------- 175

4.2.3. Supercritical fluid extraction method ---------- 176

4.3. Results and Discussion ---------- 178

4.3.1. Develpment of isolation and purification technique ---- 178

4.3.2. Process development of isolation and purification ---- 183

4.3.3. Optimization of isolation and purification process --- 187

4.4. Conclusions ---------- 213

4.5. References ---------- 217

Chapter Ⅴ. Determination of Various Functional Effects of *Agaricus blazei* Following Different Manufacturing Process ---------- 223

5.1. Evaluation of immunological activity from extracts ---------- 223

5.2. Evaluation of histopathological activity from extracts ---------- 235

5.3. Functional evaluation of Manufactured goods --------- 253

5.4. Functional evaluation of extracts from

Manufactured goods ---------- 263

5.5. Conclusions ---------- 279

5.6. References ---------- 283

목 차

제 1 장 서 론 ---------- 40

제 1 절 연구개발의 목적과 범위 ---------- 40

1. 연구개발의 필요성 ---------- 40

가. 기술적 측면 ---------- 41

나. 경제·산업적 측면 ---------- 41

다. 사회·문화적 측면 ---------- 42

2. 국내·외 관련기술의 현황과 문제점 ---------- 42

3. 앞으로의 전망 ---------- 43

제 2 절 연구개발의 목표 및 내용 ---------- 44

1. 연구개발 목표 ---------- 44

가. 연구개발 최종목표 ---------- 44

나. 구체적인 정량적 목표 ---------- 44

2. 연구개발 내용 및 범위 ---------- 45

제 3 절 기대효과 ---------- 48

1. 기술적 측면 ---------- 48

2. 경제·산업적 측면 ---------- 48

제 2 장 아가리쿠스 버섯의 가공제품 개발 및 시장경제성 평가 ---------- 49

제 1 절 서 론 ---------- 49

제 2 절 연구수행 방법 ---------- 50

1. 종균제조 최적화 ---------- 50

2. 고체배양기술 개발 ---------- 51
3. 버섯 자실체 가공제품 개발 ---------- 52
4. 버섯 및 배양여액 추출물 가공제품 개발 ---------- 52
5. 버섯 자실체 및 추출물 가공제품 개발 ---------- 53
6. 가공제품의 마케팅 전략 수립 ---------- 53
제 3 절 결과 및 고찰 ---------- 54
1. 종균제조 최적화 ---------- 54
가. 배지재료 및 종균제조 방법 ---------- 54
나. 고상곡립종균의 안정화 ---------- 55
다. 종균의 보존 ---------- 55
2. 고체배양기술 개발 ---------- 56
가. 버섯 생산배지 조성 검토 ---------- 56
나. 버섯배지의 국산화 검토 ---------- 63
3. 버섯 자실체 가공제품 개발 ---------- 66
가. 가공제품 적용을 위한 가공기술 개발 ---------- 66
나. 동결건조를 통한 가공제품의 고부가치화 ---------- 72
4. 버섯 및 배양여액 추출물 가공제품 개발 ---------- 73
가. 가공제형에 따른 기능성물질 특성 검토 ---------- 73
나. 가공과정에 따른 기능성물질 특성 검토 ---------- 73
5. 버섯 자실체 및 추출물 가공제품 개발 ---------- 75
가. 가공제품화 촉진 및 다양화 ---------- 75
나. 가공제품 시제품 생산 ---------- 76
6. 가공제품의 마케팅 전략 수립 ---------- 78
가. 가공제형에 따른 시장 경제성 평가 ---------- 78
나. 유통업체를 통한 마케팅 및 시장확보 ---------- 78

제 4 절 결 론 ---------- 90

제 3 장 생물반응기를 이용한 종균 및 생리활성물질
생산공정 개발 ---------- 92

제 1 절 서 론 ---------- 92

1. 배 경 ---------- 92

2. 배양전략 ---------- 95

제 2 절 재료 및 방법 ---------- 96

1. 실험재료 ---------- 96

2. 배양조건 ---------- 96

3. 분석방법 ---------- 97

제 3 절 결과 및 고찰 ---------- 100

1. 액체배양기술 개발 ---------- 100

가. 종균개발 및 안정화 ---------- 100

나. 최적 성장조건 확립 ---------- 100

다. 최적 배지조성 검토 ---------- 102

2. 액체배양공정 개발 ---------- 105

가. 목적산물생산 및 저해요인 검토 ---------- 105

나. 배양여액 추출물 대량생산공정 개발 ---------- 111

3. 최적 액체배양공정개발 ---------- 114

가. 고농도 액체배양공정 개발 ---------- 114

나. 생산성 최대화 ---------- 116

다. 생산공정 최적화 ---------- 118

제 4 절 결 론 ---------- 157

제 5 절 참고문헌 ---------- 159

제 4 장 생리활성물질 분리정제기술 개발 ---------- 168

제 1 절 서 론 ---------- 168

1. 배 경 ---------- 168

2. 분리·정제 전략 ---------- 169

제 2 절 재료 및 방법 ---------- 172

1. 열수추출 ---------- 172

가. 조다당체의 추출 및 분리 ---------- 172

나. 중성다당체의 산성다당체의 분리 ---------- 172

다. 고분자다당체와 저분자다당체의 분리 및
분자량 결정 ---------- 173

라. 탄수화물과 단백질 양 측정 ---------- 174

마. 단당류 분석의 전처리 및 분리장치 ---------- 174

바. ^{1}H, ^{13}C-NMR 및 FT-IR분석 ---------- 174

사. 공정 최적화 ---------- 175

2. 마이크로웨이브를 이용한 추출 ---------- 175

3. 초임계 유체추 출법을 이용한 분리 ---------- 176

가. 초임계 유체 추출공정의 운전조건 ---------- 176

나. 추출물질의 성분 분석 ---------- 177

제 3 절 결과 및 고찰 ---------- 178

1. 분리정제기술 개발 ---------- 178

가. 자실체로부터 생리활성물질 분리정제 기술 개발 -------- 178

나. 균사체/배양여액으로부터 생리활성물질
분리정제기술 개발 ---------- 182

2. 분리정제공정 개발 ---------- 183

가. 추출공정 모색 ---------- 183

나. 최적조건 확립 ---------- 185
다. 생리활성물질 분석 ---------- 185
3. 분리정제공정 최적화 ---------- 187
가. 추출수율 비교 ---------- 187
나. MAE(Microwave Assisted Extraction) 공정 최적화 ----- 188
다. 초임계 유체 추출(SFE) 공정 최적화 ---------- 190
제 4 절 결 론 ---------- 213
제 5 절 참고문헌 ---------- 217

제 5 장 아가리쿠스 버섯 추출물의 가공과정에 따른 효능검색 ---------- 223
제 1 절 자실체 추출물의 면역학적 작용평가 ---------- 223
1. In vitro내에서 종양세포주에 대한 항암작용 검색 -------- 223
가. 연구수행 방법 ---------- 223
나. 연구수행 내용 및 결과 ---------- 225
2. In vitro내에서 면역세포주에 미치는 항암/항염효과 탐색-- 226
가. 연구수행 방법 ---------- 226
나. 연구수행 내용 및 결과 ---------- 227
3. 주요 질병원인균에 대한 in vitro 항균효과 검증 --------- 228
가. 연구수행 방법 ---------- 228
나. 연구수행 내용 및 결과 ---------- 228
제 2 절 자실체 추출물의 병리조직학적 검색 ---------- 235
1. In vivo mice 급여에 미치는 단기복용효과 검색 ---------- 235
가. 연구수행 방법 ---------- 235
나. 연구수행 내용 및 결과 ---------- 236

2. In vivo mice 급여에 미치는 장기복용효과 검색 ---------- 239
가. 연구수행 방법 ---------- 239
나. 연구수행 내용 및 결과 ---------- 242
제 3 절 가공제품에 따른 효능 검색 ---------- 253
1. 가공과정에 따른 추출물의 효능 검색 ---------- 253
가. 종양세포에 대한 억제 효과 ---------- 253
나. 사람의 탐식세포에 미치는 효과 ---------- 256
2. 추출물의 독성학적 평가 ---------- 257
가. 연구수행 방법 ---------- 258
나. 연구수행 내용 및 결과 ---------- 259
제 4 절 가공제품의 생리활성물질 효능 검색 ---------- 263
1. 급성독성 검색 ---------- 263
가. 연구수행 방법 ---------- 263
나. 연구수행 내용 및 결과 ---------- 266
2. 이식암의 성장저해 평가 ---------- 267
가. 연구수행 방법 ---------- 267
나. 연구수행 내용 및 결과 ---------- 269
3. 항간암 효과 검색 ---------- 269
가. 연구수행 방법 ---------- 270
나. 연구수행 내용 및 결과 ---------- 272
제 5 절 결 론 ---------- 279
제 6 절 참고문헌 ---------- 283

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적과 범위

1. 연구개발의 필요성

최근 새로운 식량자량의 개발 및 유용물질 생산을 위해 버섯류의 이용에 대한 연구가 관심의 대상이 되고 있다. 버섯류는 유전자원으로서의 중요성이 클 뿐만 아니라 오랜 세월동안 민간 전통한약으로 전래되어 왔으며 각종 질병에 대한 민간 요법제로 이용되어 왔다. 최근들어 버섯은 기능성 식품소재 및 각종 생리활성을 나타내는 신약개발 소재로서 큰 관심을 받고 있다. 이러한 버섯은 일반적으로 고분자 다당체, 단백질, 아미노산, 효소, 비타민, 미네랄 등과 같이 인체에 중요한 각종 성분을 함유하고 있다.

인공재배를 통하여 매우 중요한 고부가가치 농산물로서 자리잡고 있는 버섯은 식용 및 약용으로 활용되고 있다. 항암효과가 탁월하다는 영지 및 운지버섯은 인공재배에 성공하였으며 상황버섯의 경우는 인공재배에는 어려움이 많지만 균사체 배양은 성공하여 항암면역증강제로서 판매중에 있다.

최근에 아가리쿠스 버섯(*Agaricus blazei*)은 항암, 제암, 혈당 및 혈압강하 작용 뿐아니라 각종 염증에 탁월한 면역기능 강화 효과를 보이는 특성으로 인해 많은 관심을 받고 있다. 구체적으로 아가리쿠스 버섯의 고분자 다당체는 생체 세포조직을 활성화시켜 인터페론의 효과와 바이러스 침입억제 효과가 높아 고형암은 물론 각종 암에 대한 효과가 보고되었으

며, 천연물질에 의한 암 면역요법으로 각광을 받고 있다.

최근들어 일본으로부터 완제품을 수입하기 시작하면서 1997년 들어와 수입증가 추세는 급증할 것으로 예상되고 있다. 따라서 본 연구를 통해 국내기술을 개발하여 막대한 수입대체 효과는 물론 농가의 소득증대를 야기시키며, 기능성 가공제품을 상업화하여 국제시장의 진출을 꾀할 수 있을 것으로 판단된다.

본 연구에서는 아가리쿠스 버섯의 자실체 대량생산기술을 개발하고 액체배양 공정을 최적화하여 추출물로부터 생리활성물질(다당체)을 생산하고자 한다. 아울러 생리활성물질의 항암/항균/항염효과에 대한 면역학적, 병리조직학적 작용 검색을 통하여 상용화 기술에 응용하므로써 가공제품을 개발하고자 한다.

가. 기술적 측면

1) 아가리쿠스 버섯의 자실체 생산배지를 국산원료로 대체하여 배지 규격화 및 종균개발을 통해 버섯 대량생산 기술을 개발한다.

2) 액체배양공정을 최적화하여 생리활성물질의 생산성을 극대화한다.

3) 분리정제공정을 최적화하여 생리활성물질 생산을 산업화시킨다.

4) 생리활성물질의 항암/항균/항염효과를 검색하여 생리활성물질 생산체계구축에 도움을 준다.

나. 경제·산업적 측면

1) 아가리쿠스 버섯의 대량생산기술을 개발하므로써 농가의 고부가가치성 소득증대를 증진시킨다.

2) 최적 액체배양공정을 확립하므로써 기능성 천연물질 함유 가공제품을

개발한다.

3) 생산성 극대화를 통해 수입대체는 물론 기능성 식품산업의 활성에 기여한다.

다. 사회·문화적 측면

1) 대표적인 질병인 암 또는 염증은 전 세계적으로 급증하고 있으며 국내에서도 그 질환자의 규모는 대단히 크다. 특히 암의 경우 항암치료 과정에서 발생되는 부작용으로 인한 피해는 매우 크다. 따라서 부작용을 최소화하고 간편한 복용이 가능한 항암 기능성 식품의 개발이 필요하다.

2) 아가리쿠스 버섯의 가공제품 개발을 통하여 환자의 환자식, 경증환자의 치료식 또는 발병을 예방하는데 기여할 수 있다.

3) 사회·문화적 환경의 변화에 따른 소비자의 요구에 맞는 다양한 기능의 가공제품을 개발할 필요가 있다.

2. 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

가. 일본의 경우 시즈오카 대학의 미즈노 다카시 박사를 선두로하여 동경대학 및 국립암연구센터에서 매우 높은 암치료율 및 저지율을 보이는 연구결과를 여러 차례 발표하였다. 이후부터 아가리쿠스 버섯에 대한 연구가 매우 활발히 진행되고 있으나 연구결과는 아직 초기단계인 것으로 판단된다. 또한 미국에서도 펜실베니아 주립대학과 램버트 연구소에서 항암효과에 대한 연구결과를 발표했으나 그 이후 커다란 진전은 없는 것으로 판단된다.

나. 현재 아가리쿠스 버섯에 관한 연구는 국내에서는 전무한 실정이다.

반면에 영지 또는 상황버섯에 대해서는 연구가 미약하나마 진행되고 있다. 주로 식음료 가공제품으로 개발되어 생산·판매되고 있다. 상황버섯의 경우 (주)한국신약에서 상황균사 배양추출물로부터 다당체를 제품화하여 항암면역증강제로 시판중에 있다. 그러나 아가리쿠스 버섯의 경우 1997년 3월경 인공재배에 성공했다는 보도가 있었으나 그 생산량은 매우 미미한 상태이었다. 지금까지 일본에서 생산·판매 하는 제품이 전량 수입되어 판매되고 있는 실정이다. 현재 국내기술에 의한 아가리쿠스 버섯의 대량생산기술 및 가공제품 개발에 대한 필요성이 절실하다.

다. 따라서 본 연구과제를 통해 국내기술을 개발하여 자실체 생산배지를 국산원료로 대체하여 이미 밝혀진 생리활성 검토는 물론 새로운 생리활성 역가의 가능성을 검토할 필요가 있다.

라. 일본에서 연구된 선행결과 및 특허를 검토하여 물질구조 및 형태학적인 차이, 국산원료를 이용한 생산배지 및 첨가물 등의 차이를 밝혀내어 독자적인 국내기술을 개발할 필요가 있다.

3. 앞으로 전망

향후 암예방 및 건강증진에 대한 관심이 고조되고 이에따라 각종 기능성 식품에 대한 수요는 급증할 것으로 예상된다. 따라서 치료 및 예방효과를 얻을 수 있는 다양한 생리활성물질의 생산성을 향상시킬 수 있는 기술이 개발되어야 할 것으로 전망된다.

제 2 절 연구개발의 목표 및 내용

1. 연구개발 목표 및 내용

가. 연구개발 최종목표

아가리쿠스 버섯의 자실체 대량생산기술을 개발하고 액체배양 공정을 최적화하여 추출물로부터 생리활성물질(다당체)을 생산하고자 한다. 아울러 생리활성물질의 항암/항균/항염효과에 대한 면역학적, 병리조직학적 작용 검색을 통하여 상용화 기술에 응용하므로써 가공제품을 개발하고자 한다.

나. 구체적인 정량적 목표

1) 아가리쿠스 버섯의 종균제조 최적화
2) 아가리쿠스 버섯의 대량생산을 위한 배지 규격화
3) 최적 액체배양기술 개발
4) 최적 분리정제 공정기술 개발
5) 아가리쿠스 버섯 추출 생리활성물질의 면역계에 미치는 효과 규명
6) 아가리쿠스 버섯 추출 생리활성물질의 항암/항염/항균 작용효과 규명
7) 항암 기능성 식품 개발

2. 연구개발 내용 및 범위

구 분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (1997)	▶ 액체배양기술 개발	o 종균 개발 및 안정화 o 최적배지조성 검토 o 최적성장조건 확립
	▶ 자실체 추출생리활성물질의 항암/항균 및 면역학적작용 평가	o in vitro내에서 종양세포주에 대한 항암작용 검색 o in vitro내에서 면역세포에 미치는 항암/항염 효과 탐색 o 주요 질병원인균에 대한 in vitro 항균효과 검증
	▶ 종균제조 최적화	o 종균 제조시간 최소화 o 고상 종균의 안정화
	▶ 고체배양기술 개발	o 버섯 생산배지 조성 검토 o 버섯 생산배지 국산화 검토
	▶ 분리정제기술 개발	o 자실체로부터 생리활성물질 분리정제기술 개발 o 균사체/배양여액으로부터 생리활성물질 분리 정제기술 개발
	▶ 자실체 추출생리활성물질의 항암/항염에 대한 병리조직학적 검색	o in vivo mice 급여에 미치는 단기복용효과 검색 o in vivo mice 급여에 미치는 장기복용효과 검색

구 분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
2차년도 (1998)	▶ 버섯 자실체 가공제품 개발	○ 가공제품 적용을 위한 가공기술 개발 ○ 동결건조를 통한 가공제품의 고부가가치화
	▶ 버섯 및 배양여액 추출물 가공제품 개발	○ 가공제형에 따른 마켓팅 전략 수립 ○ 가공과정에 따른 기능성 물질 특성변화 검토
	▶ 최적 액체배양공정 개발	○ 목적산물생산 촉진 및 저해요인 검토 ○ 배양여액 추출물 대량생산공정 개발
	▶ 추출물 최적 분리정제공정 개발	○ 생산성을 높이기 위한 추출공정 모색 ○ 분리수율 향상을 위한 최적조건 확립
	▶ 가공과정에 따른 효능검색	○ 가공과정에 따른 추출물의 효능 검색 ○ 추출물의 독성학적 평가

구 분	연구개발목표	연구개발 내용 및 연구
3차년도 (1999)	▶ 버섯자실체 및 추출물 가공 제품 개발	○ 가공제품화 촉진 및 다양화 ○ 가공제품 시제품 생산
	▶ 가공제품의 마켓팅 전략 확립	○ 가공제형에 따른 시장 경제성 평가 ○ 유통업체를 통한 마케팅 및 시장확보
	▶ 최적 액체배양공정 개발	○ 고농도 배양공정 개발 ○ 생리활성물질 생산성 최대화 ○ 생산성 극대화를 위한 생산공정 최적화
	▶ 추출물 분리정제공정 최적화	○ 초임계 유체 추출(SFE) 공정 최적화 ○ Microwave Assisted Extraction(MAE) 공정 최적화 ○ open 및 closed system의 추출 수율 비교
	▶ 가공제품의 생리활성물질효능 검색	○ 급성독성 검색 ○ 이식암 성장저해 평가 ○ 항간암효과 검색

제 3 절 기대효과

1. 기술적 측면

가. 액체배양공정을 확립하므로써 아가리쿠스 버섯이 나타내는 기능성의 생산성을 향상시켜 산업화를 이루는데 커다란 기여를 할 수 있다.

나. 항암/항균/항염 효과를 보이는 생리활성물질을 규명하므로써 기능성 가공제품의 생산을 촉진시킬 수 있다.

다. 개발된 생산공정을 다양한 생물 산업제품 생산에 확대 적용하므로써 생물 산업 제품의 국제 경쟁력을 강화시킬 수 있다.

라. 국내기술개발을 통하여 자실체 생산배지를 국산원료로 대체하므로써 수입대체효과는 물론 기존 밝혀진 생리활성 검토와 면역계 및 in vivo 항암·항염·항균에 대한 새로운 생리활성 역가를 검토하여 제품개발 및 응용을 확대시킬 수 있다.

2. 경제 · 사회적 측면

가. 본 연구가 성공적으로 수행된다면 외국의 항암 기능성 가공제품의 수입대체 효과를 이룸과 동시에 국내시장 뿐 아니라 국제시장에 수출할 수 있는 경쟁력을 갖출 것으로 기대된다.

나. 암 질환자의 치료식 또는 예방식으로 섭취가능한 기능성 식품의 개발을 통하여 새로운 제품시장을 창출할 수 있다.

다. 항암 치료 과정에 따르는 부작용을 최소화하여 암 질환자의 긍정적 관리가 가능할 것으로 기대된다.

제 2 장 아가리쿠스 버섯의 가공제품 개발 및 시장경제성 평가

제 1 절 서 론

20세기 이후의 산업과 의학의 눈부신 발전은 인류의 삶을 풍요롭게 함과 동시에 급격한 고령화 사회로의 변화를 수반하고 있다. 그러나 의학의 발전에도 불구하고 최근 심장질환, 암질환과 같은 각종 질병의 발생률 및 이로 인한 사망률은 오히려 증가하는 경향을 나타내고 있어, 국내외적으로 채소, 과일, 곡류 등 천연물을 이용한 약품 및 기능성 식품의 개발에 많은 관심을 가지고 있다.

식품의 품질은 오랫동안 전통적으로 영양에 관한 1차 기능과 기호에 관한 2차 기능에 의해 주로 평가되어 왔다. 그러나 최근 과학기술이 발달됨에 따라 식품에는 1차 및 2차 기능외에 생체방어, 생체리듬 조절 등의 생리조절 능력과 노화억제 등을 나타내는 3차 기능을 가지고 있다는 사실이 밝혀지고 있다. 그리하여 식품의 3차 기능을 강조한 많은 제품들이 출현되어 소비자들의 관심을 끌고 있다. 한편 근래에 와서 특정질병에 대한 여러 영양소의 기능이 새롭게 인식되고 생명공학등을 응용하는 생물산업 신기술이 빠르게 발전하면서, 새로운 건강증진 기능을 갖는 식품소재에 관한 연구가 진행되어 이들을 이용한 건강 기능성식품 개발이나 대량생산이 여러 나라에서 활발하게 이루어지고 있다. 건강기능성 식품을 개발하기 위한 식품신소재는 대부분 생명공학등의 첨단기술을 응용하게 되며 생물산업중 비중이 큰 식품이나 제약산업과 직접 연계가 가능하므로 앞으로

더욱 크게 발전될 것으로 예상된다.

식품에 의한 건강증진 및 유지의 중요성을 고려할 때 생체조절기능을 기대할 수 있는 기능성식품을 사회적 수요에 따라 적극적으로 활용하여 나가는 것이 필요하리라 생각되며, 이러한 기능성식품을 성인병을 중심으로 한 만성질환의 예방 및 치료에 활용함으로써 국민보건 향상에 기여하는 효과도 기대할 수 있으리라 생각된다.

따라서 본 연구에서는 최근에 항암, 제암, 혈당 및 혈압강하 작용 뿐 아니라 각종 질환에 탁월한 면역기능 강화 효과를 보이는 특성으로 인해 많은 관심을 받고 있는 아가리쿠스 버섯(*Agaricus blazei*)에 대한 자실체 대량생산기술을 개발하고 자실체 가공제품 개발을 추진하여 시장확보 및 확대할 수 있는 기반을 마련하고자 하였다.

제 2 절 연구수행 방법

1. 종균제조 최적화

가. 종균제조시간 최소화

종균제조 시간을 단축하는 방법에는 균의 생육환경과 배지조성 검토가 있으며 생육환경으로 온도의 영향을 검토한다. 배지조성 검토에서는 기본재료의 선택과 첨가되는 $CaCO_3$와 $CaSO_4$농도의 영향을 고려한다. 또한 기본재료에 설탕과 같은 보조재료 첨가에 의한 제조시간 및 종균의 활성도 함께 고려한다.

나. 고상종균의 안정화

종균의 안정화는 종균제조 완료시 종균의 높은 활력을 접종할 때 까

지 유지하기 위하여 실시한다. 종균의 노화가 진행되면 균사에 의해 덩어리가 형성되고 용기 내부 표면에 투명하게 응축된 수분이 점차 갈색을 띄게 되어 점차적으로 균이 활력을 잃게된다. 활력을 잃은 종균은 고체배지에 접종하여도 잘 뻗어나가지 못하고 균덩어리를 형성하거나 사멸하게 된다. 종균의 안정화 방법으로 종균덩어리 형성을 막는 것과 종균의 노화를 막는 방법을 생각할 수 있다. 따라서 종균덩어리가 형성되지 않도록 하는 것이 우선되므로 흔들어 주기와 환충제로서 톱밥첨가를 연구한다.

2. 고체배양기술 개발

가. 버섯 생산배지 조성 검토

버섯의 구성 성분 및 생산량은 생육환경에 따라서도 차이가 나지만 배지의 조성은 버섯의 함유성분과 향에 직접적인 영향을 준다. 볏짚과 옥수수대와 같은 농업 부산물은 농가에서 구입하여 사용하였으며 설탕은 시중에서 판매하는 흑설탕을 사용하였다. 또한 미량 첨가되는 비료 성분과 과인산석회와 석고를 사용하였을 때의 버섯의 특성도 검토한다.

최적 배지조성은 상품성과 생산량을 기준으로 판단하며, 배지 재료로 들어가는 주재료의 구입이 용이한 것을 그 다음순위로 하여 결정한다. 생산조건에서 가장 중요시되는 것은 온도와 습도이며 생육 최적온도와 생육가능 온도범위 연구가 필요하다. 습도는 버섯 개체중과 생산량에 영향을 주므로 최적 습도 범위에 대해 사계절 재배시 조절방법을 연구한다.

나. 버섯 생산배지 국산화 검토

세계적으로 버섯생산은 주로 그 지역에서 생산되는 구하기 쉬운 재료를 바탕으로 연구가 진행되어 왔으며, 일본의 아가리쿠스 재배 또한 주재

료로 사탕수수를 사용하고 있어 본 연구수행은 국산화가 가능한 우리나라의 농업 부산물을 중심으로 연구하고자 한다.

3. 버섯 자실체 가공제품 개발

가. 가공제품 적용을 위한 가공기술 개발

1) 버섯 자실체의 열풍 건조물 및 건조물 분말제조

2) 버섯 자실체 생물로부터 열수추출을 하여 추출물을 농축시킨 농축액 및 동결건조분말 가공기술 개발

나. 동결건조를 통한 가공제품의 고부가가치화

1) 버섯 자실체를 동결건조하여 고품질의 가공제품에 대한 고부가가치화

2) 버섯 자실체를 동결건조하여 여러 크기의 입자로 분말화한 가공제품 개발

4. 버섯 및 배양여액 추출물 가공제품 개발

가. 가공제형에 따른 마케팅 전략 수립

1) 동결건조한 버섯 자실체 포장 방법 및 가공제형 검토

2) 배양여액 농축액 가공제품 검토

3) 배양여액 및 추출물 동결건조 분말의 가공제형에 따른 고부가가치화

4) 균사체 동결건조 분말의 용도개발 검토

나. 가공과정에 따른 기능성 물질 특성변화 검토

1) 건조물 및 분말 가공과정에 따른 생리활성물질 특성변화 검토

2) 농축액 가공과정에 따른 생리활성물질 특성변화 검토

5. 버섯 자실체 및 추출물 가공제품 개발

가. 가공제품 촉진 및 다양화

1) 가공제품 적용을 위한 가공원료 제조

2) 버섯 자실체, 배양여액 및 균사체 가공원료 제조과정 검토

3) 분말화 및 추출물 제형에 따른 제품 다양화

나. 가공제품 시제품 생산

1) 가공원료의 특성에 따른 시제품 생산

2) 시제품 생산과정 검토

6. 가공제품의 마케팅 전략 수립

가. 가공제형에 따른 시장경제성 평가

1) 생산된 시제품중에서 시장경제성 평가

2) 대량생산이 가능한 시제품 선정

나. 유통업체를 통한 마케팅 및 시장확보

1) 대기업에 공급될 가공원료 공급 및 마케팅

2) 자체상품 개발 및 마케팅

3) 각 제품에 따른 마케팅 및 시장확보 검토

제 3 절 결과 및 고찰

1. 종균제조 최적화

가. 배지재료 및 종균제조 방법

배지의 재료로 보리와 밀을 비교한 결과 밀이 보리보다 전처리 과정이 쉽고 균의 활착 속도도 빨랐으며 종균의 활성도 높았다. 밀을 전처리할 때 삶는 것과 증기로 찌는 것중 삶은 것은 종균배양중 수분고갈이 적었으나 증기로 찐 것은 배양기간중 수분 부족으로 곡립내로 균의 침투가 어려워 종균의 활성이 떨어졌다. 종균 제조 기간은 3-4주가 소요된다.

1차 종균 제조(배양기간 : 3주)

삶은밀 ---> $CaCO_3$(1.5%)첨가 ---> 500, 850ml 종균병에 담기(70-80%/V) ---> 121℃에서 60분간 멸균 ---> 접종(PDA Plate) ---> 완전히 활착후 1차 흔들기 ---> 3-5일마다 흔들어준다.

2차 종균 제조(배양기간 : 3-4주)

많은 양의 종균제조를 위하여 1차로 배양한 종균을 새로운 종균 배지로 접종하는 과정으로서 1차종균 1병(850 mL)으로 20-25병 접종이 가능하다. 접종량은 잡균에 의한 오염을 줄이고 균의 활착속도를 높이기 위해 새로운 배지의 상부가 보이지 않을 정도로 한다.

나. 고상곡립종균의 안정화

종균제조를 위하여 밀에 균을 접종한 후 균사가 종균병의 밑부분까지 도달하면 흔들어 곡립과 곡립을 떨어지도록 하는데 이것은 산소의 공급과 균의 활성을 자극하며 균사에 의한 곡립의 결착으로 인한 균의 노화를 억제하는 작용을 한다. 또한 발효배지에 접종시 종균 덩어리를 부수는 과정에서 갑작스런 균사의 절단으로 인한 충격으로 종균의 활성저하를 사전에 예방하는 과정이라 할 수 있다. 그러나 너무 강하게 흔들면 균사가 과도한 충격으로 오히려 종균의 활성을 저하시키게 되므로 2-3개의 곡립이 균사에 의해 붙어있을 정도로 흔드는 것이 적당하다. 배양이 끝난 종균은 접종때까지 균의 활성 유지와 안정화를 위해 주기적으로 흔들어 준다.

다. 종균의 보존

배양이 끝난 종균을 배양온도에서 그대로 일정기간 두면 균의 노화가 진행된다. 종균의 노화가 진행되면 배양병의 내벽에 연한 갈색의 응축수가 생기고 종균은 균사에 의해 결착이 심하여 종균의 활력이 급격히 떨어진다. 따라서 배양이 완료된 종균은 4℃정도의 저온에 보관을 하며 응축수가 생기면 가볍게 흔들어 준다. 이 방법으로 보존된 종균은 4-5주정도 종균의 활력 유지가 가능하다.

2. 고체배양기술 개발 (Fig. 1과 Fig. 2)

가. 버섯 생산배지 조성 검토

	볏짚설탕배지	옥수수대 볏짚 배지	Control(양송이배지)
옥수수대		77.5	
볏짚	91.5	15	81.5
계분			10
설탕	1		
쌀겨	3	3	5
과인산석회	2	2	
유안	1	1	
요소	0.5	0.5	1.5
석회($CaCO_3$)	1	1	1

배지조성은 양송이 재배용 배지를 기본배지로 하였고 외국에서 재배되고 있는 배지조성을 기초로 국내에서 배지재료 구입이 용이하며 버섯이 고유의 향기와 약효를 유지할 수 있는 방향으로의 배지 조성을 검토하였다.

1) 배지발효과정

배지의 야외 발효기간은 외부 온도의 영향이 크다. 즉 봄과 여름에는 외부 온도가 높아 4주 정도면 발효가 완전히 되지만 겨울에는 6-8주 정도의 시간이 소요되며 발효퇴비의 품질도 떨어진다. 따라서 겨울에 퇴비를 발효시킬 때는 실내가 유리하며 가온이 필요하다. 배지 발효에서 뒤집기를 하게 되는데 이것은 배지의 균질화, 충분한 산소공급, 배지의 결착방지, 발효 온도조절을 위해서이다. 배지 발효순서는 다음과 같다.

볏짚(10-15Cm)절단

↓←*수분공급*

방치(24-48시간)

↓← *배지재료 혼합*

쌓기(180×150Cm)

↓← *1차 뒤집기*

쌓기(180×150Cm)

↓← *2차 뒤집기 ($CaCO_3$ 또는 $CaSO_4$첨가)*

쌓기(180×150Cm)

↓← *3차 뒤집기*

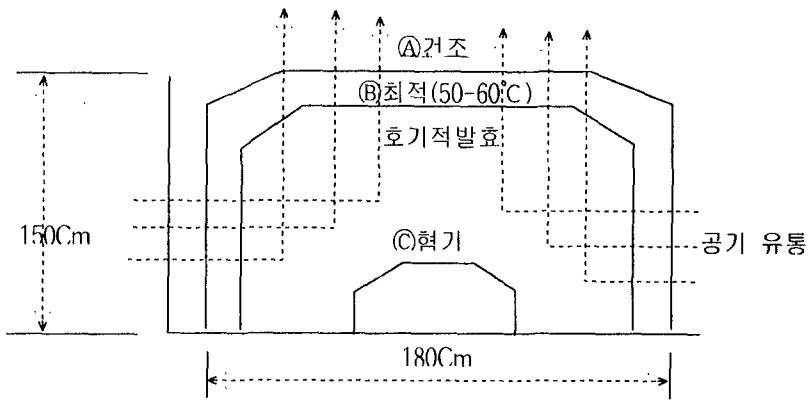
쌓기(180×150Cm)

↓← *4차 뒤집기*

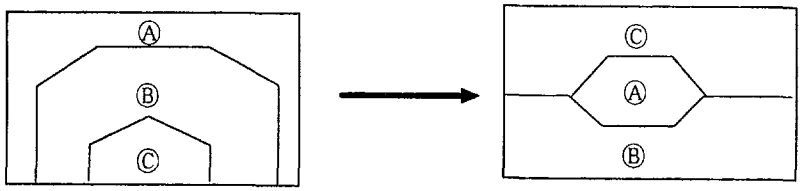
발효종료 *(최종 수분조절:60-65%)*

↓

입상 및 후발효(60℃ 12시간)



퇴비의 발효과정중 수분이 과다하고 공기의 유통이 불량하면 혐기적 발효가 일어나 암모니아가스가 발생하게 되며 종균접종시 균사생장을 저해한다. 또한 퇴적층내부의 혐기적 발효가 진행되는 부분이 증가하게 되며 배지내에 암모니아가스 발생이 증가하여 배지의 물리적 변화 및 화학적 변화가 버섯생육에 좋지 않은 방향으로 진행된다. 발효는 퇴비내 중온성 미생물들의 성장에 따라 버섯생장에 필요한 영양분의 축적과 중온성균이 생산하는 여러 가지 항생물질에 의해 다른 잡균의 생육을 저해시키는 즉 선택적 배지를 만드는 과정이라 할 수 있다. 발효퇴비내의 온도가 60℃정도가 되면 뒤집기를 하여준다. 뒤집기는 아래의 그림과 같이 내부와 외부의 배지위치를 바꾸어 쌓는다.



따라서 배지발효 과정중 수시로 배지내 수분함량을 측정하여 뒤집기 작업시 수분이 많은 부분은 바깥쪽에 쌓으며 수분이 적을 때는 물을 첨가하여 준다. 뒤집기 작업시 고려할 점은 배지의 결착을 막기 위해 수분이 과다한 부분이나 배지무게에 눌려서 결착이 일어난 부분을 잘 털어서 쌓아야 한다는 점이다. 발효가 완전히 끝난 배지는 육안으로 보면 조금 마른 듯한 정도로 짚의 원형을 유지하고 있으며 만졌을 때 탄력성이 있는 것이 좋은 배지이다.

2) 발효 퇴비배지 입상 및 종균접종

접종은 층별재식법을 적용하여 전체 배지두께가 20-25㎝가 되도록 하였다. 1평당 850 ㎖ 2차종균 5-6병이 들어가며 접종량은 하층에서 상층으로 갈수록 증가

시킨다. 이방법은 표층의 종균 접종량을 많이 하므로써 초기 균사활착 속도를 증가시켜 잡균에 의한 오염을 방지할 수 있는 장점이 있다. 종균접종후 배지내의 품온유지와 수분의 증발을 막기 위해서 신문지 또는 비닐을 덮어주며 신문지 위에는 물을 충분히 뿌려준다.

< 층별 퇴비량에 따른 종균접종비 >

층 별	퇴비 비율(%)	종균 접종 비율(%)
표 층	10	35
상 층	30	30
중 층	40	20
하 층	20	15
계	100	100

3) 복토

가) 복토재료

복토는 부여에서 판매하고 있는 살균처리된 양송이용 흙을 구입하여 사용하였으며 토탄이 버섯발생에 어떤 영향이 있는가를 함께 검토하였다.

나) 복토방법

발효배지에서의 균사활착이 끝나면 균상을 고르게 다져준 다음 복토를 하게 된다. 복토를 균상에 올려 편평하게 고른 다음 복토 표면이 굴곡지도록 긁어 굴곡의 낮은 부분은 2-2.5Cm, 높은 부분은 3.5-4Cm가 되도록 한다.

다) 복토후 관리

복토가 끝나면 복토 표면에 신문지를 피복하여 복토의 건조를 막기위해 그 위에 물을 충분히 뿌려준다. 신문지의 피복은 복토의 건조를 막는 것과 동

시에 복토의 품온을 유지시켜 균사가 표면으로 빠르게 부상하게 되어 버섯의 발생량을 증가시키는 효과가 있다. 균상에 복토를 하면 퇴비중의 균사가 복토층을 따라 표면으로 부상하게 되며 표면에서 균사가 서로 엉기어 원기가 형성되고 버섯이 발생한다. 따라서 균사가 복토표면으로 빠르게 부상하도록 하기위해서 온도는 25℃를 유지하고 습도는 80-90%를 유지한다. 버섯의 수량은 복토층의 균사량과 밀접한 관계가 있어 균사량이 적으면 초기 버섯발생이 적고 생산량이 적으며 균사량이 너무 많으면 초기 버섯발생수는 많으나 품질이 다소 떨어지며 후기의 버섯수량이 감소한다.

4) 버섯의 발생과 관리

가) 복토표면으로 균사가 성장하게 되면 영양생장기에서 버섯이 형성되는 생식생장기로 전환을 시켜야하며 이때 작용하는 주요 요소는 온도, 습도 그리고 탄산가스 농도이다.

나) 버섯의 다량 발생과 균상 전체에 고르게 발생하도록 하기 위해서 온도는 25±2℃를 유지하고 관수와 실내습도를 90%이상으로 유지하여주며 외부의 신선한 공기가 유입되어 재배사내 공기가 시간당 3-4회 교체되도록 한다. 또한 유입된 공기의 원활한 흐름을 위해서 재배사 내부에 공기를 순환시킬 수 있는 장치가 필요하다.

다) 재배사내의 탄산가스 농도는 버섯의 수량 및 품질과 밀접한 관계가 있다. 즉 탄산가스의 농도가 높게 되면 버섯 갓에 주름이 많은 기형버섯이 발생하거 나 버섯대의 굵기가 가늘어져 상품성이 떨어지게 된다.

5) 버섯 수확기간중의 관리

가) 버섯 발생을 촉진하기 위해 관수를 하게되는데 버섯이 아주 어릴 때는 적게

하고 버섯이 커감에 따라 증가시킨다. 과도한 관수는 어린 버섯의 질식사를 유발할 수도 있으나 버섯이 생육할수록 그피해는 감소한다. 관수량이 충분치않아 복토와 퇴비층의 수분고갈이 발생하면 다음 버섯발생주기때 그 피해가 나타나 어린 버섯은 발생하나 성장하지 못해 생산량이 크게 감소한다.

나) 버섯이 발생함에 따라 실내의 탄산가스 농도는 크게 증가하게 되어 충분한 환기가 필요하며 환기에 따른 실내 온도와 습도의 변화를 고려하여 계속적으로 실시한다.

다) 버섯을 수확할 때는 어린 버섯의 균사 뿌리가 상하지 않도록 주의하여야 하며 버섯을 수확한 자리에는 살균된 복토를 덮어주어 다음 발생을 유도한다.

6) 버섯 생산량 및 특성(Table 1-7)

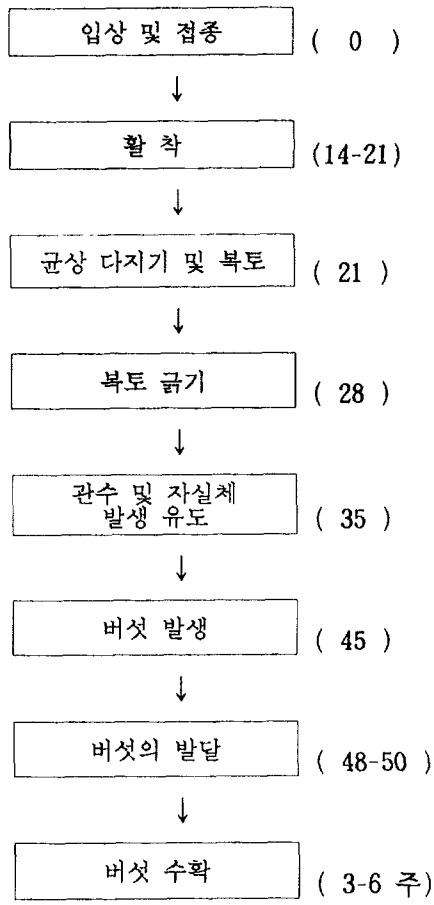
가) 밀폐된 상자에서 배지두께 25Cm, 복토 3Cm의 환경으로 재배하였을 경우 1평당 10-11Kg (3주기 생산)의 생버섯을 생산하였다. 그러나 밀폐된 상자는 공기유통이 불량하며 수분이 과다할 경우 배수가 어려워 수량이 급격히 감소함을 보였다. 구멍이 뚤린 상자에서 재배할 경우에는 위의 문제들이 해결되어 더 많은 량의 버섯을 생산할 수 있었다. 따라서 아가리쿠스의 상자재배에 서는 밑면 또는 옆면으로의 공기유통이 가능한 상자가 적당하다.

나) 생산된 버섯의 형태는 갓의 윗쪽 반경이 아래쪽 반경보다 크며 표면이 깨끗하였고 갓과 대부분이 단단하였다. 갓의 지름은 3-5Cm, 대의 지름은 2.5-3.5Cm 였으며 버섯의 길이는 6-9Cm 정도였다. 이때 대의 지름은 재배사내 CO_2 농도가 낮고 온도가 낮을수록 굵어진다.

다) 버섯은 고유의 독특한 강한 향기가 나며 배지의 조성이 다를수록 향기의 강도차를 보였다. 따라서 버섯 고유의 향을 많이 내는 버섯생산을 위하여 첨가 되는 배지성분 검토가 필요하다.

7) 버섯재배 소요일수

경과일수(일)



8) 버섯의 건조와 보관

가) 생버섯 상태의 자실체는 수분(생버섯 무게의 90%)과 버섯 자체 효소에 의해서 쉽게 분해가 되므로 생버섯의 장기보존은 사실상 어렵다. 즉 4℃ 냉장보관에서의 신선한 버섯유지는 4-5일 정도였으며 실온에서 밀봉하여 보관하였을 때 2-3일 정도 경과하면 갓이 펴져서 상품성이 떨어졌다.

나) 열풍건조 : 고온건조시의 자실체 성분 변화를 최소로 하기위하여 55-60℃에서 12시간 건조하였으며 건조된 버섯은 밀봉하여 보관하였다. 열풍건조는 버섯 형태의 유지가 어려운 단점이 있으나 많은량의 처리시에는 유리하다.

다) 동결건조 : 동결건조는 -50℃, 진공도 9㎜Torr조건에서 하였으며 생버섯의 완전건조에는 48시간 정도 소요되었다. 건조가 완료된 버섯은 생버섯의 형태를 그대로 유지하고 있으며 유용성분의 소실과 화학적변이가 적으므로 부가가치 를 높인 상품 생산이 가능하다. 그러나 건조 버섯의 수분 흡수도가 높기 때문에 완전히 밀봉하여 보관하여야 한다.

나. 버섯 생산배지 국산화 검토

생산배지 조성검토에서 수행된 연구과정에서 쓰인 모든 재료는 국산 제품이어서 생산배지에 대한 국산화를 진행하는데에는 어려움이 없었다. 단지 대규모로 배지를 생산할 수 있는 곳이 국내 몇군데 밖에 없다. 더욱이 배지제조 시설이 다소 낙후되어 있어 1차 및 2차 중금속 오염에 노출될 가능성이 크다. 따라서 생산배지를 대량 생산하고자 할 때 좀더 생산시설에 대한 철저한 관리 및 규격화에 비중을 두어야 할 것이다.

Table 1. 복토 재료별 초발이 일수 및 생산량 비교

복토재료	초발이 일수(일)	생산량(Kg/평)
식양토(100%)	45	13
식양토(80%) + 토탄(20%)	42	15

* 균주: H1, 재배방법: 일반 균상재배, 배지두께: 20Cm, 복토두께: 3Cm

Table 2. 균주에 따른 생산량비교

단위(Kg/평)

수확주기	H1	K
1 - 3	11	12
4 - 5	4	4
합 계	15	16

* H1 : 본 연구실이 보유하고 있는 균주. K : 농가에 보급된 균주

Table 3. 후발효 시간에따른 중온성균의 생육정도와 생산량

후발효시간 (60℃, hr)	중온성 미생물 생육률 (%)	생산량(kg/평)	
		H1	K
24	30	13	14
48	80	15	16
60	90	14	14

Table 4. 후발효시 배지두께에 따른 발효정도와 종균 활착 기간

배지두께(Cm)	발효정도	종균활착기간(일)
20	★★★	17
30	★★★	15
40	★★★	15
50	★★(내부 혐기발효)	20

단. 48시간 후발효의 경우임. 발효정도: ★표가 많을수록 우수.

Table 5. 환기량에 따른 버섯 생산량 및 버섯의 특성

환기량(시간/1일)	생산량(kg/평)	버섯의 특성
0	10	버섯대가 가늘다, 갓이 빨리펴짐
2	12	버섯대가 가늘다
6	15	대가 굵고 단단하다
24(연속)	15	대가 굵고 단단하다, 복토표면이 다소건조하다.

Table 6. 종균접종 방법에 따른 균사 활착소요시간

종균접종방법	활착소요시간(일)
층별접종	14-16
상부표층접존	23-28

Table 7. 버섯 외형적특성 비교(참고 Fig. 3.)

	균	주
	H1	K
갓의 직경(Cm)	3-5	2-5
대의 직경(Cm)	2.5-3.5	1.5-2.5
버섯의 길이(Cm)	6-9	7-10
개체중(g)	45-60	30-50

* Table 1-7에서의 data는 수확 3주기까지의 결과를 기준으로 나타낸 표임.

3. 버섯 자실체 가공제품 개발

가. 가공제품 적용을 위한 가공기술 개발

버섯 가공이라 함은 버섯 자실체의 건조물을 분말로 한 것, 또는 자실체나 이들의 균사체 배양물을 물 또는 물과 에탄올의 혼합액으로 추출하여 얻은 성분을 식용에 적합하도록 가공한 것을 주원료로 하여 섭취가 용이하도록 액상, 페이스트상, 분말, 과립, 정제, 캡슐 등으로 가공한 것을 말한다. 그러나 액체배양에 의한 균사체 배양물은 배양시 배지내에 함유된 독성물질 및 세포가 생산하는 여러 가지 인간에게 해로운 물질에 의하여 직접 섭취가 어려움으로 독성물질 제거를 위한 정제과정이 특별히 필요하다. 그러나 현재 이러한 정제과정의 어려움을 극복하기 위하여 인간에게 해가 되지 않는 물질을 배지로 직접 이용하여 균사체를 배양하고자 하는

노력이 많이 진행되고 있다. 이러한 경우 자실체의 열수추출 및 용매에 의한 방법보다 비용을 절감할 수 있다. 또한 균사체는 동결건조 및 열풍건조에 의하여 분말형태로 상품화가 가능하며, 배양여액은 여액 자체로서 식품에 가미하여 사용할 수 있다는 장점이 있다.

1) 버섯 자실체 건조

버섯 자실체를 열풍건조 및 동결건조하여 제품의 부가가치를 높이고자 하였다. Fig. 4과 Fig. 5에서 보듯이 열풍건조품의 경우보다는 동결건조품이 훨씬 고품질상품으로 판단된다. 단지 동결건조 가공과정에서의 경비부담이 있으나 제품의 질 및 포장기술을 향상시켜 부가가치를 높이므로써 경비부담을 극복할 수 있다고 판단된다. 포장단위를 소포장 및 대포장으로 구별하여 구매욕구 및 선호도를 향상시킬 수 있다. 또한 자실체 건조물을 분말화하여 가공시 용도에 맞는 입자크기를 검토하였다 (Fig. 6).

열풍건조분말의 경우 가공과정이 단순하고 경비를 경감할 수 있어 대량생산시 경제성을 갖출 수는 있으나 성분 및 맛, 향에서 다소 품질이 떨어질 수 있다. 반면에 동결건조분말의 경우 동결건조 가공과정에 따른 경비부담이 있으나 제품의 질 및 맛, 향에서 품질을 향상시킬 수 있으므로 경제성을 유지할 수 있다. 이러한 동결건조분말을 tea-bag으로 가공하여 차 형태로 용출시켜 용출속도 및 맛, 향을 분 말입자크기에 따른 경시변화를 검토하였다 (Fig. 7).

Fig. 7에서 각 경우 왼쪽 컵의 경우는 미세한 분말이며 오른쪽 컵쪽으로 갈수록 입자크기가 크다. 또한 (a), (b) 및 (c)의 경우 tea-bag을 용출시킨후 1분, 3분 및 5분 경과후 용출된 결과 사진이다. tea-bag 가공시 사용된 종이의 다공도에 비해 분말입자가 상대적으로 작은 경우는 빠른 속도로 용출되고 입자크기가 비교적 큰 경우는 느렸다. 그러나 입자

크기가 작은 경우 용출 속도가 빠른 반면 5분 경과후 분말이 tea-bag 밖으로까지 흘러나와 tea의 선명도를 흐리게 하였다. 반면에 입자크기 3번째의 경우 3분 경과시 이미 충분한 용출이 되었으며 5분 경과후에도 분말이 빠져나오지 않아 tea의 선명도가 매우좋은 결과를 얻었다. 이 경우 맛과 향을 비교하였을 때 단순히 버섯 분말로만 제조한 경우와 맛 및 향을 부드럽게 하기 위해 시중에 유통되고 있는 녹차와 둥글레차를 약간씩 첨가해 제조한 경우를 비교하였다(Fig. 8). 종류에 따라 맛 및 향이 다소 변화가 일어나 수요자의 기호에 따라 선호도가 변할 수 있다. 따라서 좀 더 구체적인 검토를 하여 보다 나은 선호도를 갖춘 제품을 개발할 필요가 있다.

2) 버섯 자실체 열수추출물

열수추출물을 동결건조시켜 분말화하거나 추출물을 농축시켜 농축액으로 가공하여 가공적성 및 용도를 검토하였다 (Fig. 9). 열수추출물 동결건조분말의 경우 흡습현상이 커 가공과정에 어려움이 있다. 이러한 문제를 해결하면 다양한 용도를 개발할 수 있다고 판단된다.

또한 농축액의 경우 저농축액(1/10)과 중농축액(1/50)의 경우보다는 고농축액(1/100)의 경우 실온에서는 보다 엑기스화하기가 좋으나 실온에서 내용물이 변질될 가능성이 크다. 또는 저온 보관시 농도가 너무 높아 내용물이 너무 굳어지는 현상이 일어난다. 따라서 보다 최적의 농축 비율을 찾아내어 사용시 편리함과 변질 가능성을 배제시켜 가공할 필요가 있다.

3) 배양여액

균사체 액체배양을 통해 고액분리한 배양여액을 가공처리할 수 있도록 농축시켜 spray dryer를 이용한 분말화 가공과정에 적절한 농도를 검토하였다. 배지성분에 따라 배양여액에 존재하는 고형물의 농도가 달라 농축

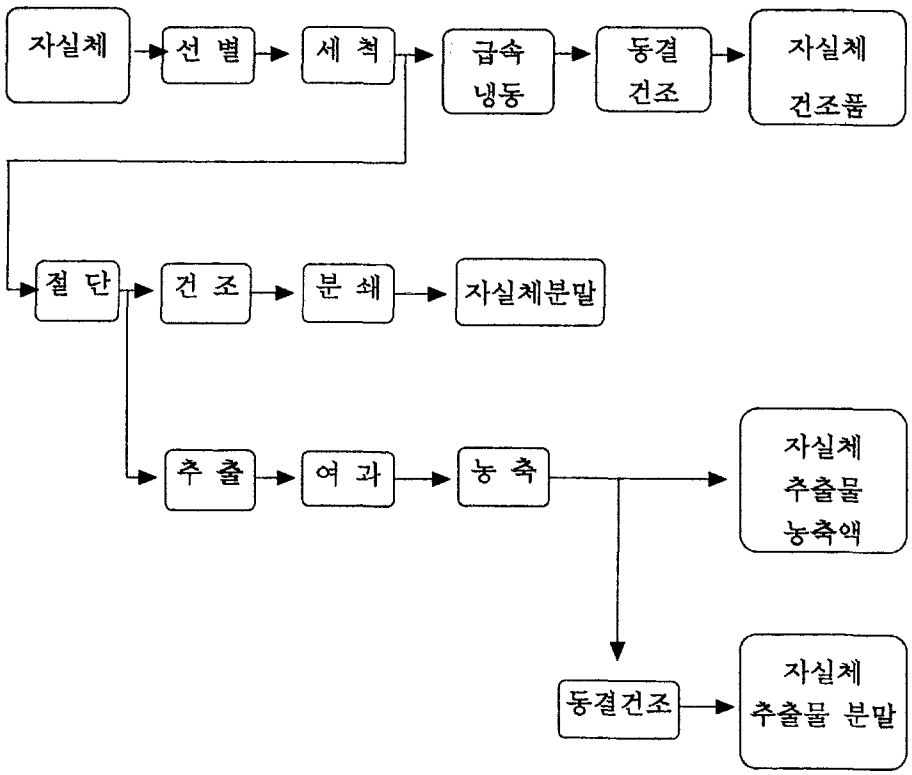
정도가 달라지게 된다. 배지성분중 탄소원으로서 starch, glucose를 비교하였다 (Fig. 10).

Starch를 사용한 배양의 경우 농축과정이 별도로 필요하지 않을 정도로 고형물의 농도가 매우 높았다. 반면에 glucose를 사용한 배양의 경우는 2~3배 정도의 농축과정이 필요하였다. 이러한 배양여액 농축물을 동결건조시켜 분말화한 경우와 에탄올을 이용한 추출물을 동결건조시켜 분말화한 경우를 구별하여 가공적성을 검토하였다.

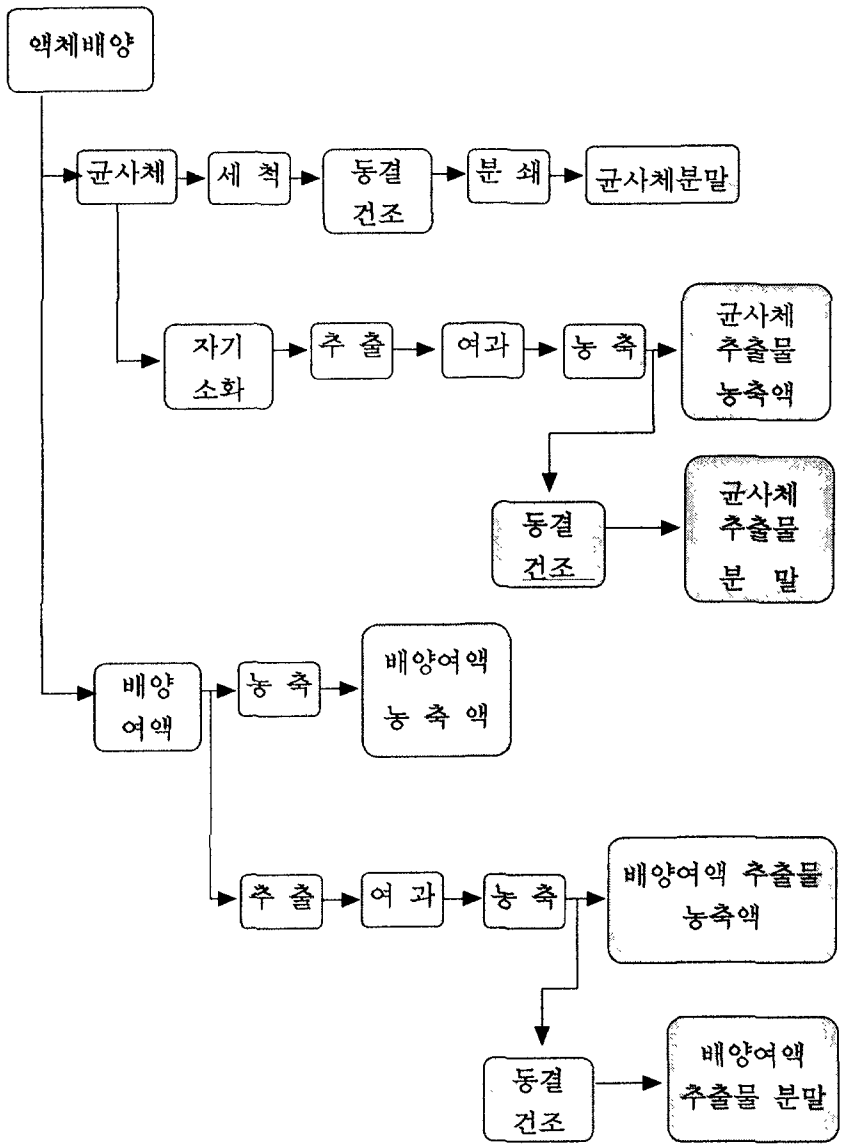
4) 균사체

균사체 액체배양을 통해 고액분리한 균사체를 동결건조시켜 분말화하였다 (Fig. 11). 분말의 입자크기를 달리하여 가공적성 및 용도를 검토하였다. 또한 고액분리를 하지 않고 균사체와 배양여액을 함께 혼합한 배양액을 직접 가공처리할 수 있는 방안을 검토하였다. 즉 가공과정을 단순화시켜 경제성을 높일 수 있는 가공제품 개발을 검토하였다.

Ⅰ. 버섯자실체 가공기술 개발



II. 배양여액 추출 가공기술 개발



나. 동결건조를 통한 가공제품의 고부가가치화

버섯 자실체의 건조물을 분말 형태로 만들기 위해서는 열풍건조와 동결건조 방식이 사용된다. 열풍건조는 건조물의 형태 보존이 어렵고, 버섯 자체가 가지고 있는 맛과 향에 변형이 이루어지기 쉽다. 그러나 동결건조 방식은 자실체의 형태를 그대로 보존할 수 있으며 버섯이 본래 가지고 있는 맛과 향 및 영양소의 파괴를 최소화할 수 있다는 장점이 있다. 하지만 동결건조에 의한 방법은 열풍건조에 의한 방법에 비해 비용이 많이 소요된다는 단점이 있다. 아가리쿠스 버섯은 특히 송이 버섯과 마찬가지로 그 향이 매우 진하고 특이하다는 장점이 있으므로 버섯의 상품성을 높이고 맛과 향을 보존하기 위해서는 동결건조에 의한 방법을 선택하는 것이 올바른 선택이라 생각한다. 또한 버섯의 상품성과 부가가치를 높이기 위한 방법으로 정제된 버섯 추출물을 과립형태나 캡슐 형태로 상품화하여 식품 및 의약품으로서도 그 이용가치가 높다.

가공기술 개발과정에서 비교된 열풍건조와 현격한 차이는 대규모 냉동보관시설이 필요하며 동결건조장치로 이동시 해빙을 피할 수 있는 전달장치가 필요하다. 또한 자실체를 제품화할 경우 동결건조시 대와 갓이 분리되는 경우가 발생될 수 있다. 그러나 제품화되었을 경우 소비자의 선호도가 급격히 상승할 수 있기 때문에 고려되는 제형에 맞추어 동결건조방식을 이용하여 개발된 가공기술을 통하여 가공제품의 부가가치를 높일 수 있다.

4. 버섯 및 배양여액 추출물 가공제품 개발

가. 가공제형에 따른 마케팅 전략 수립

각종 가공제형에 따른 가공과정 및 소비자 선호에 따른 마케팅을 조사하였다. 자실체 건조품에서는 열풍 및 동결건조제품 모두 선호도가 높았다. 단지 제품포장에 따른 가격 선정이 마케팅 전략에 주된 요인으로 판단된다. 이러한 건조물을 분말화 하였을 경우 tea-bag의 선호도가 제일 좋았다. 기호도에 따라 첨가물과의 배합비를 달리 할 필요가 있었다. 자실체 열수추출물의 경우는 분말화하여 기능성 음료의 원료로 공급하거나 자체 제품을 개발하여 생산하는 경우가 경제성을 유지할 수 있을 뿐아니라 시장 확보면에서도 우위를 갖게 될 것으로 판단된다.

또한 균사체 액체배양을 통한 배양여액의 경우 분말화하여 음료화하는 것이 제일 좋다고 판단되었다. Tablet 또는 Capsule 형태의 경우 흡습성향으로 형태유지에 어려움이 있다. 균사체의 경우 분말화하여 포장하거나 전통발효식품에 첨가물로서의 용도로 공급될 수 있다.

나. 가공과정에 따른 기능성물질 특성변화 검토

다른 버섯과의 성분비교를 하면 아가리쿠스 버섯은 특히 단백질 함량이 풍부하다. 그러나 생버섯 상태에서는 수분과 단백질 효소가 많기 때문에 보존기간이 매우 짧다. 따라서 유통기간 확대 및 고품질유지를 위하여 급속냉동을 통한 동결건조 및 열풍건조에 의해 제품의 상품성을 높게 유지할 수 있다. 가공과정에 따른 기능성 물질의 함량 및 특성변화 특히 효능에 큰 변화는 없었다. 그러나 가공과정에 따른 물리적인 변화 특히 흡습성향이 매우 커 가공시 주의해야 할 필요가 있다.

《가공제품 가능성 검토》

가공원료	가공기술형태	가공제형	비고
● 자실체 건조품	◇ 동결건조 ◇ 열풍건조	◆ 버섯 자실체 제품화	▷ 소/대 포장단위 구별 ▷ 고부가가치화
● 자실체 분 말	◇ 동결건조 ◇ 열풍건조	◆ tea-bag ◆ tablet ◆ capsule	▷ 맛 및 향 검토
● 자실체 열 수 추추물	◇ 농축 - 고 농축액, paste	◆ 엑기스화	▷ 변성가능 검토
	◇ 분말 - 동결건조	◆ tablet ◆ capsule ◆ 기능성 음료	▷ 흡습성향으로 형태 유지 어려움 ▷ 동결건조시 경제성 감소
● 배양여액	◇ 농축액 분말 - spray dry	◆ 기능성 음료	▷ spray dry로인한 경제성 향상
	◇ 동결건조분말 - 여액 동결건조 - 에탄올 추출물 동결건조	◆ tablet ◆ capsule ◆ 기능성 음료	▷ 흡습성향으로 형태 유지 ▷ 동결건조로 인한 경제성 감소
● 균사체	◇ 분말 - 동결건조분말	◆ 전통식품 첨가물	▷ 용도개발 검토

5. 버섯 자실체 및 추출물 가공제품 개발

가. 가공제품화 촉진 및 다양화

가공원료로서 자실체를 이용하여 분말 및 열수추출물을 가공하였으며 액체배양을 통한 배양여액 및 균사체를 이용하여 분말, 배양여액 및 농축액에 대한 가공을 하여 제품의 다양화를 시도하였다.

1) 버섯 자실체 분말

가) 자실체 동결건조 분말 포장 제품

나) 동결건조 분말을 적정 입자크기의 과립형태로 tea-bag 가공제품

다) 다른 종류의 차(녹차와 둥글레차)와 혼합된 tea-bag 가공제품

2) 버섯 자실체 열수추출물

가) 추출물 농축액을 이용한 capsule 가공제품

나) 분말(spray dry)을 이용한 가공제품(tablet과 기능성음료-bottle형)

다) 열수추출액을 이용한 가공제품(기능성음료-pack형)

3) 배양여액

가) 배양여액 농축액을 이용한 capsule 가공제품

나) 배양여액 분말(spray dry)을 이용한 가공제품(tablet과 기능성음료-bottle형)

다) 배양여액 원액을 이용한 가공제품(기능성음료-pack형)

4) 균사체

가) 액체배양을 통한 균사체 동결건조 분말 포장 제품

나) 균사체 동결건조분말을 이용한 식품첨가물 원료 개발

다) 균사체와 배양여액을 함께 혼합된 배양액의 spray dry 분말을 이용한 가공제품 개발

나. 가공제품 시제품 생산

각 종류의 가공원료를 이용하여 가공제형에 따른 시제품 생산을 시도하였다. 자실체 분말을 이용한 tea-bag의 경우 과립형태로 제조하므로써 용출을 용이하게 할 수 있어 선호도를 높이고자 하였다. 자실체 열수추출물 및 배양여액 농축액을 이용한 capsule의 경우 가공처리에 따른 문제점 즉, 가공시간이 오래 걸리며 고점도로 인한 가공효율이 매우 떨어진다. 반면에 spray dry를 이용하여 분말화한 후 tablet으로 가공할 경우 가공처리가 쉽고 대량생산시 큰 어려움이 없다. 기능성음료(bottle)의 경우는 맛과 향을 고려하여 부형제를 첨가하므로써 기호도를 높이고자 하였다. 또한 자실체 열수추출액 및 배양여액 원액을 이용한 기능성 음료(pack)의 경우 원액 그 자체를 이용하므로써 맛 및 향은 다소 기호도가 떨어질 수 있으나 효능기대 효과를 촉진시켜 소비자의 선호도를 극대화 시키고자 하였다.

《가공 시제품 개발》

가공원료	가공기술 형 태	가공제형	함 량	비 고
◆ 자실체분말	◇ 동결건조	▶ 분말포장(100g)	▶ 자실체기준 ▶ 추출물기준 : 15g	▷ 제습제별도 포장
		▶ tea-bag(1g/포) · 아가리쿠스 버섯 · 아가리쿠스버섯 + 녹차잎 · 아가기쿠스버섯 + 둥굴레차잎	(추출물기준: 300mg/포) · 100% 버섯분말 · 혼합비율 - 4:1 · 혼합비율 - 4:1	▷ 20포/pack
◆ 자실체 열수추출물	◇ 농축액	▶ capsule(soft)	· 10정/pad · 추출물기준:300mg	▷ 유통기간 검토
	◇ 분말 - spray dry	▶ tablet	· 200정/병 · 추출물기준:200mg/정	▷ 분말화 과정에서 동결건조 방법과 비교
		▶ 기능성 음료(bottle : 100 mL)	· 추출물기준:500mg/병	
	◇ 열수추출액	▶ 기능성 음료(pack : 100 mL)	· 추출물기준:500mg/팩	
◆ 배양여액	◇ 농축액	▶ capsule	· 10정/pad · 추출물기준:300mg/정	▷ 유통기간 검토
	◇ 분말 - spray dry	▶ tablet	· 200정/병 · 추출물기준:200mg/정	▷ 분말화 과정에서 동결건조 방법과 비교
		▶ 기능성 음료(bottle : 100 mL)	· 추출물기준:500mg/병	▷ 자실체 열수추출물과 경제성 비교
	◇ 원 액	▶ 기능성 음료(pack : 100 mL)	· 추출물기준:500mg/팩	
◆ 균사체	◇ 동결건조분말	▶ 분말포장(100g)	· 균사체 기준:50%	▷ 제습제별도 포장
		▶ 식품 첨가물 원료	· 양조식품 · 육가공 · 조미료	▷ 마케팅 전략 검토

6. 가공제품의 마케팅 전략 확립

가. 가공제형에 따른 시장 경제성 평가

여러 가지의 가공체형에 따라 경제성 및 시장확보를 고려하여 검토한 결과 주된 가공형태는 tea-bag형과 기능성 음료로서 bottle과 pack형으로 판단되었다.

Tea-bag형은 일반소비자들의 선호도가 매우 높아 시장확보는 매우 용이할 것으로 판단된다. 더욱이 가공과정이 매우 단순하여 경제성이 높다. 기능성 음료의 경우 bottle형은 일반소비자들을 대상으로 하였고, pack형은 효능에 대한 기대가 큰 소비자들을 대상으로 마케팅을 하였다. 이러한 가공제형들은 시장확보 및 증대에 따른 대량생산이 충분히 가능하며 이에 따른 경제성이 매우 높은 것으로 판단되었다.

나. 유통업체를 통한 마케팅 및 시장확보

Tea-bag의 경우 아가리쿠스 버섯만을 이용한 가공제형의 경우 자체 생산하여 시장확보를 할 예정이며 녹차잎 또는 둥글레차잎과 혼합된 가공제형의 경우는 관련시장을 이미 확보한 기존 제조 및 판매회사와 협력하고자 한다.

Bottle형의 경우 음료 및 제약회사와 같은 대기업과 협력하여 대규모 시장을 확보하고자 하며 pack형은 자체 생산하여 마케팅을 통한 시장확보를 시도하고자 한다. 또한 균사체 및 배양액 분말의 경우 전통 발효식품 첨가물로 제조하여 전통 발효식품 시장을 활용하고자 한다. 한편 병원관련 기관과 협력하여 예방 및 환자식으로서 제품을 공급하고자 한다.

(a)

(b)

(c)

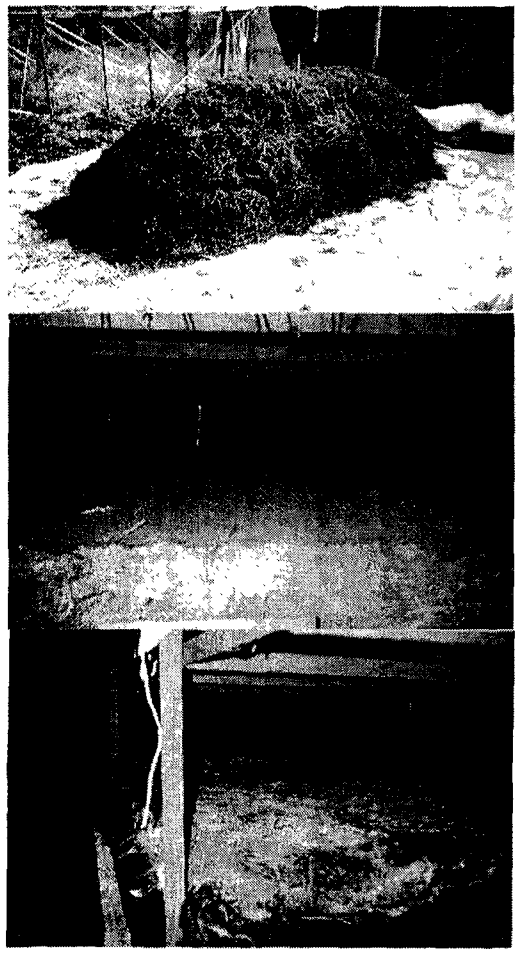


Figure 1. 버섯 자실체 재배과정

(a) 고체배지발효
(b) 입상 및 접종
(c) 균사 활착

(d)

(e)

(f)

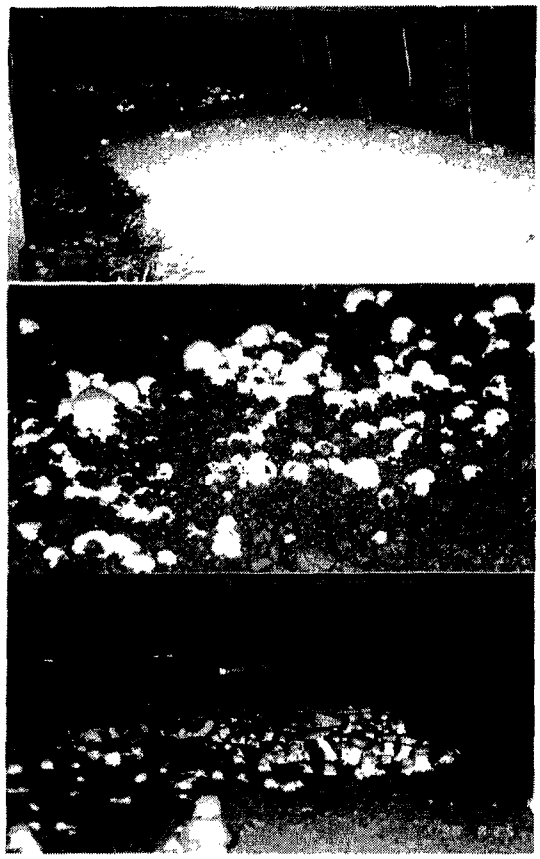


Figure 1. 버섯 자실체 재배과정

(d) 버섯 발생
(e) 버섯 발달
(f) 버섯 수확

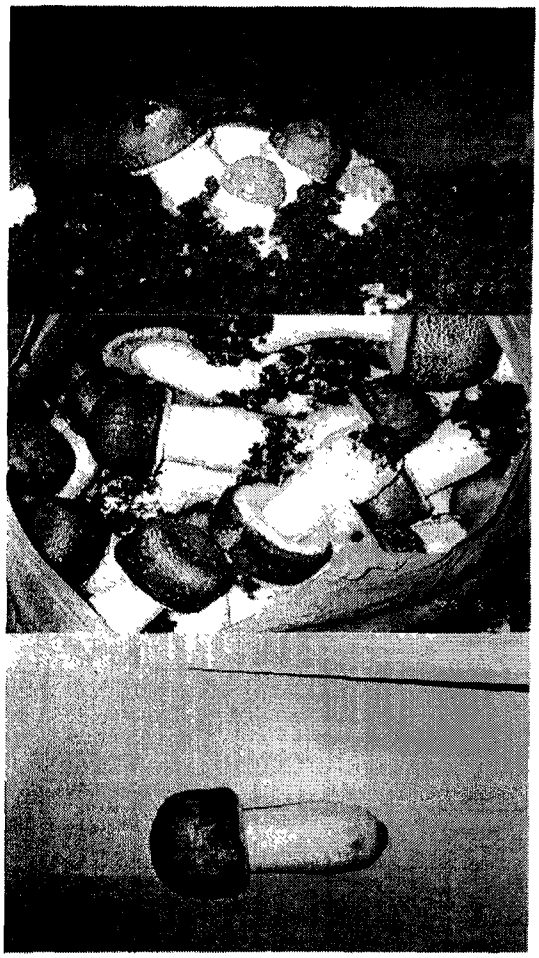
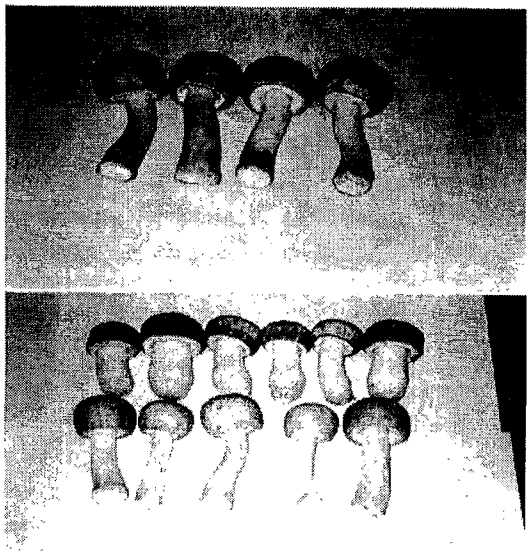


Figure 2. 수확된 버섯 자실체

(a)



(b)

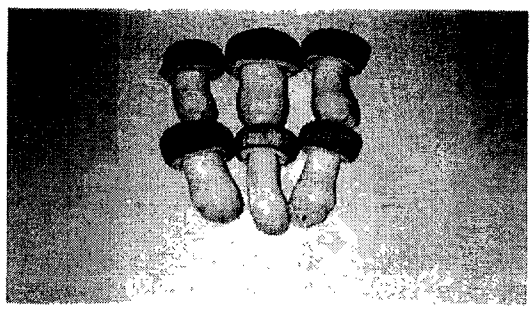


Figure 3. 본 과제를 통해 개발된 종균과 국내 일반 종균을 같은 조건에서 재배한 버섯 자실체의 비교

(a) 일반종균을 종균을 이용한 버섯 자실체

(b) 개발된 종균을 이용한 버섯 자실체

a

b

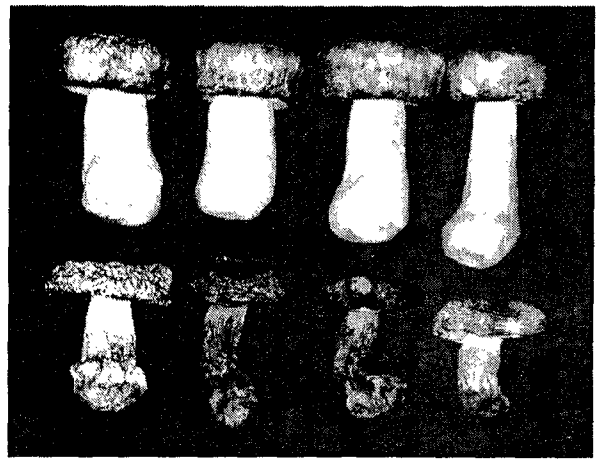
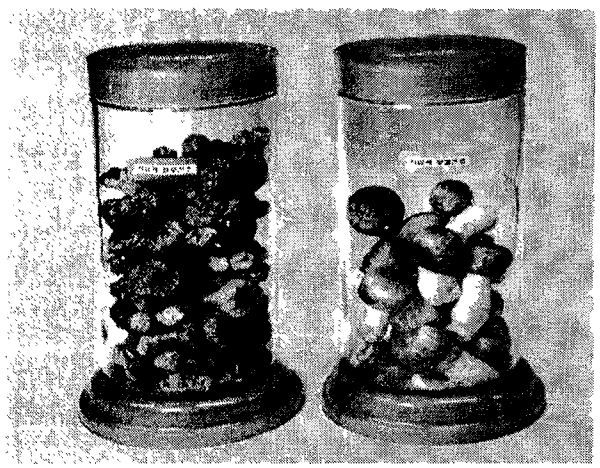


Figure 4. 버섯자실체 건조품 비교

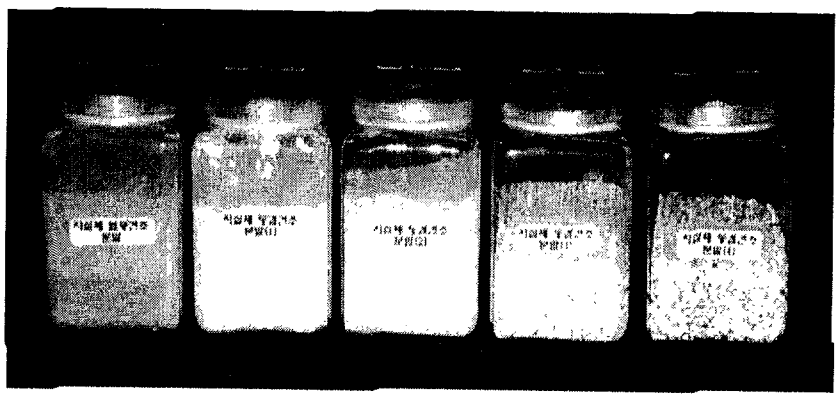
(a) 동결건조 (b) 열풍건조



(a) (b)

Figure 5. 버섯 자실체 건조품 제품화 비교

(a) 열풍건조 (b) 동결건조



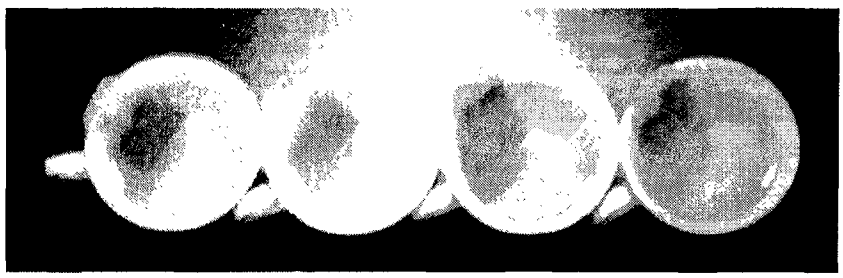
(a) (b) (c) (d) (e)

Figure 6. 버섯 자실체 건조 분말

(a) : 열풍건조

(b)~(e) : 동결건조

(a)



(b)

(c)

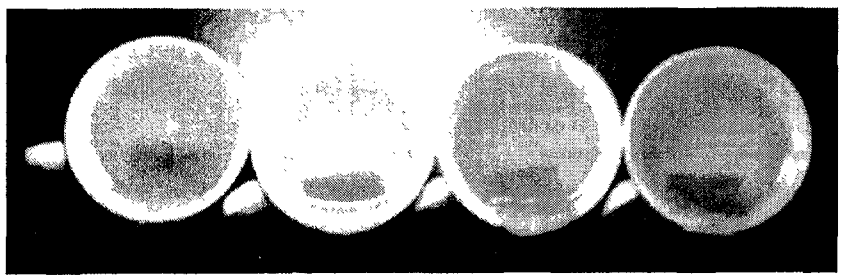
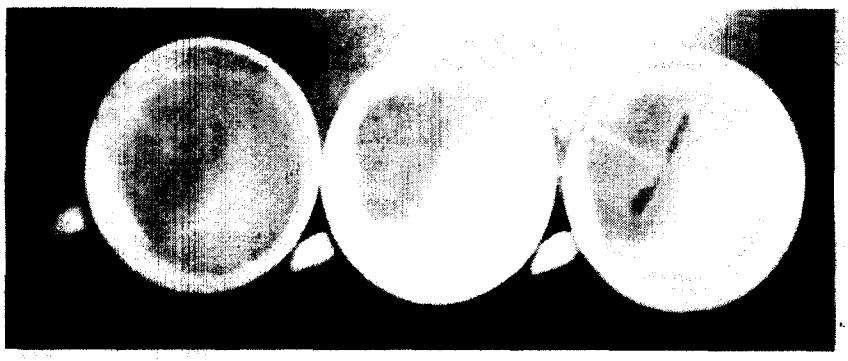


Figure 7. 버섯 자실체 동결건조 분말 tea-bag 가공시
입자크기에 따른 경시 변화비교
(a) 1 min (b) 3 min (c) 5min



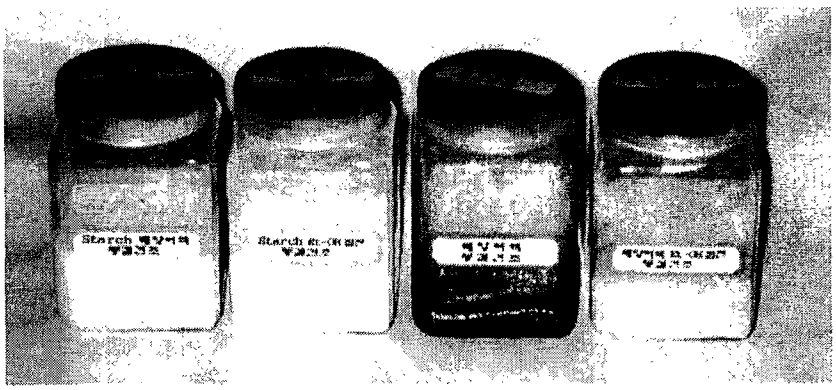
(a) (b) (c)

Figure 8. 순수버섯 분말과 타 종류의 차와 혼합된 분말의 tea-bag 비교
(a) 아가리쿠스 분말
(b) 아가리쿠스 분말 + 녹차
(c) 아가리쿠스 분말 + 둥글레차

(a) (b) (c) (d)

Figure 9. 버섯 자실체 열수추출물

(a) 동결건조 분말
(b) 저농축액 (1/10)
(c) 중농축액 (1/50)
(d) 고농축액 (1/100)



(a) (b) (c) (d)

Figure 10. 배양여액 및 추출물의 동결건조 분말

(a) starch를 이용한 배양여액 동결건조 분말
(b) starch를 이용한 배양여액 에탄올 추출물 동결건조분말
(c) glucose를 이용한 배양여액 동결건조분말
(d) glucose를 이용한 배양여액 에탄올 추출물 동결건조분말

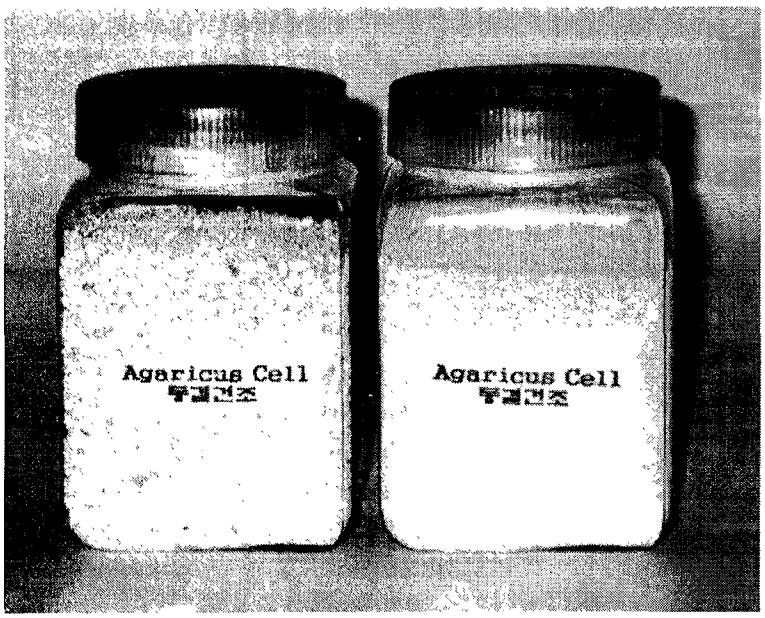


Figure 11. 균사체 동결건조 분말

제 4 절 결 론

본 연구에서는 아가리쿠스 버섯 자실체의 안정적 대량생산을 위한 종균제조의 최적화와 생산배지의 국산화 및 조성을 검토하였고, 버섯 자실체 가공기술 및 가공제품 개발과 그에 따른 시장 경제성 평가를 수행하였다.

자실체 대량생산을 위해서 종균제조 기간을 단축 및 안정화시킬 수 있는 방법을 제시하였고, 생산배지 조성검토에서 수행된 연구과정에서 쓰인 모든 재료는 국산제품이어서 생산배지에 대한 국산화를 이룰 수 있었다. 단지 대규모로 배지를 생산할 수 있는 곳이 국내 몇군데 밖에 없다. 더욱이 배지제조 시설이 다소 낙후되어 있어 1차 및 2차 중금속 오염에 노출될 가능성이 크다. 따라서 생산배지를 대량 생산하고자 할 때 좀더 생산시설에 대한 철저한 관리 및 규격화에 비중을 두어야 할 것이다

버섯 자실체의 가공제품으로 열풍건조와 동결건조 방식을 검토한 결과 열풍건조는 건조물의 형태 보존이 어렵고, 버섯 자체가 가지고 있는 맛과 향에 변형이 이루어지기 쉽기 때문에 버섯 본래의 가지고 있는 맛과 향 및 영양소의 파괴를 최소화할 수 있는 동결건조 방식을 택하는 것이 좋을 것으로 판단된다. 동결건조시 열풍건조보다는 비용이 더 많이 드나 아가리쿠스 버섯은 송이 버섯과 마찬가지로 그 향이 매우 진하고 특이하다는 장점이 있으므로 버섯의 상품성을 높이고 맛과 향을 보존하기 위해서는 동결건조에 의한 방법을 선택하는 것이 올바른 선택이라 생각한다. 또한 버섯의 상품성과 부가가치를 높이기 위한 방법으로 정제된 버섯 추출물을 과립형태나 캡슐 형태로 상품화하여 식품 및 의약품으로서도 그 이용가치가 높을 것으로 판단된다.

가공기술 개발과정에서 비교된 열풍건조와 현격한 차이는 대규모 냉

동보관시설이 필요하며 동결건조장치로 이동시 해빙을 피할 수 있는 전달 장치가 필요하다. 또한 자실체를 제품화할 경우 동결건조시 대와 갓이 분리되는 경우가 발생될 수 있다. 그러나 제품화되었을 경우 소비자의 선호도가 급격히 상승할 수 있기 때문에 고려되는 제형에 맞추어 동결건조방식을 이용하여 개발된 가공기술을 통하여 가공제품의 부가가치를 높일 수 있다.

각 종류의 가공원료를 이용하여 가공제형에 따른 시제품 생산을 시도하였다. 그 결과 자실체 분말을 이용한 tea-bag의 경우 과립형태로 제조하므로써 용출을 용이하게 할 수 있어 선호도를 높일 수 있을 것으로 판단되며, 자실체 열수추출물 및 배양여액 농축액을 이용한 capsule의 경우 가공처리에 따른 문제점 즉, 가공시간이 오래 걸리며 고점도로 인한 가공효율이 매우 떨어진다는 단점이 있다. 반면에 spray dry를 이용하여 분말화한 후 tablet으로 가공할 경우 가공처리가 쉽고 대량생산시 큰 어려움이 없었다. 기능성음료(bottle)의 경우는 맛과 향을 고려하여 부형제를 첨가하므로써 기호도를 높이고자 하였다. 또한 자실체 열수추출액 및 배양여액 원액을 이용한 기능성 음료(pack)의 경우 원액 그 자체를 이용하므로써 맛 및 향은 다소 기호도가 떨어질 수 있으나 효능기대 효과를 촉진시켜 소비자의 선호도를 극대화 시키고자 하였다.

제 3 장 생물반응기를 이용한 종균 및 생리활성물질 생산공정 개발

제 1 절 서 론

1. 배 경

지구상에는 수천종의 버섯류가 자생하고 있어 유전자원으로서의 중요성이 지대할 뿐만 아니라 기능성 식품소재 및 각종 약리 활성을 나타내는 신약개발 소재로도 크게 주목을 받고 있다. 이들 버섯은 균사체의 영양대사로 얻어지는 대사산물이 축적된 자실체의 형태로 나타나는데, 최근에 와서 자실체 및 균사체의 추출물이나 균사체 배양물이 체질개선이나 각종 병의 예방과 치료에 효과가 있는 것으로 밝혀져 건강식품이나 의약품으로서의 용도가 크게 증가하고 있는 실정이다. 특히, 담자균이 생산하는 특정 구조를 갖는 다당류는 오래전부터 종래의 화학요법제와는 달리 숙주내의 면역 기능을 부활하여 소위 면역요법제로서의 항암효과를 나타냄이 알려져 왔었다. 현재까지 제약 및 의학적인 방법이 질병의 주된 치료방법으로 이용되어 왔지만 최근에 특정식품의 섭취가 만성질환의 발생을 억제 또는 지연시킨다는 연구보고가 나오면서부터 만성질환의 치료방법으로서 식이요법을 중요하게 생각하게 되었다. 따라서 새로운 식품소재 및 가공식품의 개발을 통한 성인병 등의 각종 질병예방이 국민보건문제 해결에 필수적이다.

현재 일본 등에서는 표고버섯, 구름버섯 및 치마버섯 유래의 다당체 또는 단백다당체인 lentinan, krestin 또는 PS-K, schizophyllan 및 PSP

등이 실용화되어 높은 가격에 판매되고 있다. 국내에서도 야생 구름버섯 자실체로부터 추출한 단백 다당체인 Copolang(광동제약)이 개발되어 PS-K와 유사하게 암의 치료에 병행 사용되고 있고, 또 강력한 항암활성이 보고된 상황버섯의 균사체 추출물인 단백 다당체가 Mesima-Ex FK(한국신약)라는 상품명으로 암의 치료에 병행 사용되고 있는 것으로 알려지고 있다.

담자균류와 아울러 미생물 유래 다당체는 그 구조와 특성에 있어서 매우 다양함을 지니고 있다. 이러한 미생물 유래 다당류의 공업적 생산과 이용에 대한 연구로서는 *Leuconostoc mesenteroides*가 생산하는 dextran이 혈장증량제로 개발된 이래 *Xanthomonas campestris*가 생산하는 pullulan, *Zoogloea ramigera*가 생산하는 zooglan 등이 대표적인 예로 보고되고 있다.한편, 미생물 유래 다당류는 구성당, 분자량, 화학적 구조 등과 같은 특성의 차이에 의해 많은 종류가 존재하고 있으며, 다양한 물성 및 유화제, 응고제, gel 형성제, 필름 형성제, 흡착제, 안정제, 접착제 등과 같은 용도로 광범위하게 이용되고 있다. 또한 근래에 들어서는 미생물 유래 다당체가 지니는 항암활성이 확인되어 새로운 의약품으로서의 개발 가능성이 기대된다. 그 밖에도 기존에 알려져 있는 식물 및 해조류 유래의 다당체와는 달리, 발효조를 이용한 연속배양에 의해 공업적 대량 생산이 가능하며, 더욱이 생산된 다당체의 분리 및 회수가 용이하다는 이점을 지니고 있다. 최근에 들어서는 유전공학적 기법을 이용한 고생산성 변이균주 및 새로운 기능을 지닌 다당체의 개발에 관한 연구가 보고되고 있는 등 고부가가치를 지닌 새로운 바이오 소재로서의 기능 및 용도 개발에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

이러한 항암 활성을 나타내는 여러 가지 담자균류중 *Agaricus blazei*로부터 생산되는 다당체는 고형암 이외에 S형 결장암, 난소암, 유방암, 폐암, 간암 등에 효과가 입증되었고, 천연물질에 의한 암 면역요법으로 각광

을 받고 있으며, 항암 및 항 virus의 완치율과 저지율에서 현재 여러가지 약효가 있는 버섯중에서도 탁월한 효과가 있는 것으로 증명되고 있다. 이들 다당체는 사이토카인을 생산시켜서 T임파구와 B임파구의 항원 특이적인 면역반응을 활성화시키고, 세포장해성 T세포와 활성화 대식세포의 세포장해 기능을 충진시켜서 암세포를 파괴시킨다. 또한 콜로니 자극인자인 사이토카인을 생산시켜서 면역담당세포의 신생을 촉진시키기도 하며, 암의 화학요법과 방사선 요법으로 저하된 백혈구를 회복시키는 역할을 한다. 따라서 최근의 연구동향은 생산된 다당체의 항암활성을 향상시키고자 하여 배양기간중에 interleukin을 의도적으로 첨가하는 경향이 있다. 이러한 항암활성을 나타내는 담자균체 유래 다당체는 버섯의 기원에 따라 그 형태에 약간의 차이를 나타내기는 하나 그 기본 형태는 β-(1,6)-glucosyl 분지를 가진 β-(1,3)-glucan이며, 평균 분자량은 50~200만 정도이다.

*Agaricus blazei*의 원산지인 브라질의 피에다데(Piedade) 지방의 환경조건(산지의 습도는 80%, 낮 기온 35℃, 밤 기온 20~25℃로 대단히 높으며, 정기적으로 열대지방 특유의 소나기가 내리는 지역)에서 볼 수 있듯이 *Agaricus blazei*의 성장 환경은 매우 까다로운 편이며, 날것으로는 보관이 잘 안되기 때문에 그 재배에 큰 어려움이 있다. 또한, 고체배양에 의해 생산된 버섯 자실체로부터 유기용매 및 열수추출 방법으로 다당체를 생산하는 방법은 균일한 형태의 버섯자실체를 공급받기가 어렵기 때문에 다당체의 생산 수율이 낮고, 많은 노동력이 요구되는 어려움이 있다. 그러나 액체배양에 의한 다당체 생산의 경우는 고체배양에 의한 다당체 생산에 비해 일정한 조건하에서 배양이 가능하다는 장점이 있으며, 항상 균일한 균사체 및 배양액을 얻을 수 있다. 따라서 원하는 유용물질을 쉽게 획득할 수 있는 장점이 있다.

2. 배양전략

Flask 배양을 통하여 아가리쿠스 버섯 균체의 최적 생육조건 및 다당체 생성 조건을 검토하기 위하여 fungi의 기본배지로 사용되고 있는 YMK media를 기본배지로 하여 최적 균체성장 및 다당체 생산을 위한 탄소원, 질소원, 무기염류, 아미노산 등을 선별 및 최적농도를 검토하였고, C/N ratio를 검토하여 최적의 배지조성을 확립하였다. 또한 액체배양에 커다란 영향을 주는 온도, pH, 접종비 및 배양시간을 검토하여 최적 성장조건을 확립하였으며, 생물반응기를 이용한 회분배양을 통하여 통기량과 교반속도에 따른 균체성장 및 다당체 생산에 대한 촉진 및 저해요인을 검토하였다. 이상의 연구결과를 토대로 산업화에 맞는 경제성있는 배지에 대한 검토와 균체당 다당체 생성량을 기준으로 상업성에 맞는 최적 C/N ratio를 재검토하여 새로운 조성의 최적배지를 사용하여 생물반응기내에서의 균체성장과 다당체 생산을 위한 최적의 생물반응기 운전전략을 확립하였다. 그리고 균체량 및 다당체 생산을 향상시키기 위해 교반속도, 통기량 및 용존산소에 따른 균체량 및 다당체 생산성에 대한 연구를 기초로 회분배양에서의 비증식속도와 균체수율 값으로 기질 소모속도를 예측하여 균체증식에 따라 공급배지의 조성과 공급속도에 변화를 주어 균체량과 다당체 생산의 극대화를 위한 유가배양을 수행하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 실험 재료.

가. 균주 및 보존

본 실험에 사용된 균주는 담자균류의 일종인 *Agaricus blazei*을 사용하였다. 보관용 배지로는 PDA (potato dextrose agar)를 사용하였으며 4주마다 계대배양하였다. 전배양에서 사용된 접종원은 YMK 배지 (Table 1)에서 5일간 배양한 후 7 mL을 취하여 멸균된 glycerol 2.5 mL과 증류수 2.5 mL을 혼합하여 20 mL vial에서 잘 혼합한 후 -75℃에서 냉동 보관하였다.

나. 배 지

배양에 사용된 배지들은 전배양에서는 YMK 배지 (Table 1)를 기본배지로 사용하였다. 본배양의 플라스크배양에서는 YMK 배지와 modified medium (Table 2)을 사용하여 실험을 수행하였으며, 생물반응기를 이용한 회분배양 및 유가배양에서는 modified medium과 optimum modified medium(Table 3)을 사용하여 실험을 수행하였다.

2. 배양 조건

가. 플라스크 배양

전배양에서는 12 mL의 활성화된 stock를 접종하여 진탕배양기에서 27℃, 150 rpm으로 7일간 배양하였으며 초기 pH를 5.5로 조절하였다. 본배양에서는 250 mL 삼각플라스크를 사용하여 50 mL의 배지에 접종비 5%인

2.5 mL의 전배양액을 접종하였다.

나. 회분배양

회분배양은 5 L 생물반응기 (Korea Fermentor Co., KF-5L)에서 전배양을 5% 로 접종하여 온도 27℃, working volume 3 L로 하였고, 공기의 주입속도는 0.5~1.5 vvm 및 교반속도는 100~400 rpm으로 8일간 배양을 실시하였다. pH는 2N HCl과 2N NaOH를 사용하여 조절하였다.

다. 유가배양

유가배양에서는 working volume 2 L로 시작하였고, 공기의 주입속도는 1 vvm으로 유지하고, 발효조의 용존산소 농도를 20% 이상으로 유지하기 위해 교반속도의 증가(100~200 rpm)와 혼합공기(공기+pure oxygen)를 1 vvm으로 맞추어 주입하였다. 배지의 공급은 회분배양에서의 비증식속도(μ_{sp})와 균체수율($Y_{X/S}$) 값으로 기질 소모속도를 예측하여 균체증식에 따라 공급배지의 조성과 공급속도에 변화를 주어 공급배지를 공급하였다.

3. 분석방법

가. 균체량 및 다당체 생성량 분석

본 균주가 생산하는 다당체 생산량을 정량하기 위하여 배양후 filter paper를 사용하여 진공하에서 균체와 배양여액을 분리한 후 배양여액을 2배의 acetone을 가하여 4℃에서 24시간 방치하였다. 침전된 침전물을 다시 원심분리하여 상등액과 분리하였다. 이렇게 분리된 침전물을 60℃ dry oven에서 24시간 동안 충분히 건조시킨 후 그 항량을 측정하였다. 또한 균체량은 세포외 다당체 분리후 얻은 균체를 증류수로 세정한 후 85℃에서

항량이 될 때까지 24시간 건조한 후 건조중량을 측정하였다.

나. Glucose 분석

배양액중의 glucose 농도는 glucose kit를 사용하여 측정하였다. 분석범위는 0.25~3.0 g/L로 하여 배양여액을 이 범위안에 들어가도록 희석하여 사용하였고 낮은 농도 (0.25 g/L이하)에 대해서는 분석 절차상 20배 희석을 생략하였다. 반응은 37℃에서 30분간 행하였으며 반응이 끝난 후 440 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Glucose (g/L)} = \frac{OD_{sample}}{OD_{standard}} \times 100$$

Table 1. Compositions of the YMK medium.

Components	Concentration (g/L)
Glucose	20.0
Yeast extract	5.0
KH_2PO_4	2.0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1.0

Table 2. Compositions of the modified medium.

Components	Concentration (g/L)
Glucose	80.0
Yeast extract	20.0
KH_2PO_4	2.0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1.0
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	2.0
$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	2.0

Table 3. Compositions of the optimum modified medium.

Components	Concentration (g/L)
Glucose	60.0
Yeast extract(bulK)	15.0
KH_2PO_4	2.0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1.0
$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	0.05

제 3 절 결과 및 고찰

1. 액체배양기술 개발

가. 종균개발 및 안정화

여러 균주를 확보하여 생육상태와 다당체 생성능을 검토하여 보다 활성이 높은 균주를 선별하였다. 선별된 균주를 여러 차례 돌연변이시켜 활성이 높아보이는 3-4종류의 균주를 다시 선별하였다. 이 균주들을 여러 차례에 걸친 계대배양을 하여 균체의 안정성을 검토하였다. Stock cell solution으로 준비한 후 급속 냉동시킨 후 -75℃에서 1-2개월 냉동보관한 후 다시 활성화시켜 균체의 생육상태와 안정성을 검토하였다. 그 중 활성 및 안정성이 제일 좋은 균주를 선별하여 활성을 촉진시킨 후 실험에 쓰일 종균 및 접종원으로서 stock cell solution을 준비하여 -75℃로 냉동보관하였다.

나. 최적성장조건 확립

1) 온도 와 pH의 영향

온도 변화에 따른 균체의 생육과 다당체 생성을 비교·검토하기 위하여 Fig. 1과 같이 온도의 변화를 23-32℃까지 변화를 주어 실험을 실시하였다. 결과를 살펴보면 균체량은 27℃에서 3.5 g/L로 가장 높게 나타났으며, 다당체 생성량은 온도의 차이에 의한 큰 변화량은 없었으나 균체량과 같이 27℃에서 가장 높은 1.1 g/L로 가장 좋은 결과를 나타냈다. 이러한 결과는 일반적인 fungi의 생육 온도범위와 유사한 결과를 나타내는 결과이나 균체량의 경우 온도의 변화에 따라 생육에 큰 영향을 받는다는 것을 결

과에서 알 수 있었다. 온도의 경우와 마찬가지로 초기 pH의 변화가 균체 생육과 다당체 생성에 미치는 영향을 조사하였다. Fig. 2에서 알 수 있듯이 낮은 pH 범위인 4 와 5에서는 다당체 생성도 높지 않았으며 균체 생육 시 심한 aggregation이 발생하여 균체생육에도 좋지 않은 영향을 미쳤다. 약산성 범위인 pH 5.5에서는 균체량이 4.18 g/L, 다당체 생성량이 1.46 g/L로 산성 및 중성 pH 범위에서보다도 높은 결과를 나타냈다. 이러한 결과는 일반적으로 fungi의 종류에 따라 차이는 있으나 대개 생육 최적 pH는 약산성 및 중성인 4.0-5.5 범위와 일치하는 결과를 나타내는 것이다.

2) 접종비 및 배지액량의 영향

접종비 및 배지액량은 생산량 증가를 위한 중요한 인자로 작용한다. 또한 일반적으로 세포외 다당류의 생산균주는 충분한 산소공급하에서 다당류의 생산량이 높은 것으로 알려져 있다. Fig. 3-4에서는 접종비 및 배지액량의 영향을 나타낸 결과이다. Fig. 3에서 알 수 있듯이 접종량이 증가할수록 균체량은 증가하였다. 그러나 다당체 생성량은 접종량이 5% 일 때 가장 좋은 1.6 g/L를 나타내었으며, 접종량이 증가할수록 서서히 감소하는 경향을 나타냈다. 이러한 이유는 과다한 균체량은 물질전달 및 산소공급을 방해하여 오히려 다당체 생성량을 감소시키는 원인으로 작용하는 것으로 생각된다. 따라서 다당체 생성량이 가장 좋은 접종비를 5%으로 결정하였다. Fig. 4는 250 mL 용량의 삼각플라스크에 배지액량을 50 mL 에서 150 mL 까지 변화를 주어 배양한 결과를 나타낸 결과이다. 배지내의 통기량이 좋을수록 즉, 배지액량이 50 mL일 때 균체량 및 다당체 생성량은 가장 좋은 4.1 g/L와 1.8 g/L를 나타내었으며 통기량이 감소할수록 균체량과 다당체 생성량은 서서히 감소하는 경향을 나타내고 있다.

3) 최적 성장조건에서의 경시변화

Fig. 5는 배양시간에 따른 균체량과 다당체 생성에 대한 경시변화를 검토한 결과이다. 균체량은 배양 3일째부터 exponential phage에 접어들었으며 배양 7일째 stationary phage에 이르렀다. 균체량은 배양 8일째 4.9 g/L로 가장 높은 결과를 나타내었으나, 다당체 생성량은 배양 7일째 1.2 g/L로 가장 높은 값을 나타냈다.

다. 최적배지조성 검토

1) 탄소원의 영향

앞에서 이루어진 다당체 생성에 영향을 미치는 주요 인자들에 의한 다당체 생성 최적조건을 검토한 결과 아직도 다당체 생성량이 미약하였으며 균체량 또한 낮은 수준에 머물렀다. 이러한 결과는 최적 배지조성 검토를 통하여 균체량 및 다당체 생산 수율을 높이기 위한 실험을 병행하도록 한 원인이 되었다. 이러한 원인을 바탕으로 Fig. 6은 균체의 생육, 그리고 energy와 미생물 다당류로의 생산에 아주 중요한 영향을 미치는 탄소원의 영향을 검토한 것이다. 따라서 이 균주의 균사 생육에 미치는 탄소원의 영향을 조사하기 위해서 12종류의 탄소원을 사용하였으며, 농도는 2%로 하여 균체 생육과정과 세포외 다당체 생성량을 비교 검토하였다. 결과에서 보는 바와 같이 균체의 생육은 mannose를 사용하였을 경우 지금까지 균체생성량의 3배에 가까운 12 g/L로 아주 높은 값을 나타냈으나 다당체 생성량은 0.2 g/L로 12 종류의 탄소원중 가장 낮은 값을 나타냈다. 반면 glucose, fructose, 그리고 glucose 와 starch를 혼합한 배지조성에서는 비교적 높은 균체량과 다당체 생성량을 나타냈다. 따라서 산업적인 경제성과 세포외 다당체 생성 효율을 고려한다면 균체량은 좋으나 다당체 생성효율이 떨어

지는 mannose나 경제성이 낮은 fructose 보다는 탄소원중에서 가장 높은 다당체 생성과 비교적 높은 균체생육을 나타낸 glucose를 탄소원으로 선택하는 것이 바람직하다고 판단하여 glucose를 탄소원으로 결정하였다.

Fig. 7은 탄소원으로 결정된 glucose를 이용하여 그 농도를 0-100 g/L로 변화를 주어 균체의 생육과 다당체 생성량을 비교·검토한 결과이다. 실험 결과를 분석하여 보면 균체량은 glucose의 농도가 증가할수록 증가하여 glucose의 농도가 80 g/L 일 때 최대값인 4.59 g/L을 나타냈으며 그 이후 서서히 감소하였다. 또한 다당체 생성량은 glucose 농도가 60 g/L 일 때까지 변화가 거의 없었으나 80 g/L 일 때 급격히 증가하여 2.32 g/L로 최대값을 나타냈다. 이러한 결과를 바탕으로 최적 탄소원은 glucose로, 탄소원의 최적 농도는 비교적 많은 량으로 생각되나 80 g/L로 결정하였다.

2) 질소원의 영향

Fig. 8은 질소원의 영향을 검토하기 위하여 탄소원인 glucose를 1% 첨가한 기본 배지에 16종류의 질소원을 각각 0.5%씩 첨가하여 균체의 생육과 세포외 다당체 생성량을 비교한 결과이다. 결과에서 보는 바와 같이 유기질소원인 yeast extract와 soybean에서 각각 3.5 g/L와 6.2 g/L로 높은 균체생육을 나타내었으며, yeast extract와 malt extract, yeast extract와 $(NH_4)_2NO_3$를 같은 양으로 혼합한 배지조성에서도 3.6 g/L와 3.2 g/L로 좋은 결과를 나타내었다. 그러나 무기질소원을 배지조성으로 사용한 경우에서는 유기질소원을 사용한 경우보다 아주 낮은 균체량을 나타내었다. 이러한 결과는 유기질소원에 함유된 nitrogen source 이외에 또 다른 요소가 작용하였을 것으로 판단된다. 한편, 세포외 다당체 생성에 있어서는 무기질소원인 NH_4NO_3에서 0.51 g/L로 가장 높은 값을 나타내었으며, yeast extract에서도 0.43 g/L로 다른 질소원에 비해 높은 결과를 나타내었다.

하지만 그림에서와 같이 전체적으로 극히 낮은 세포외 다당체 생성량을 나타내었는데, 이러한 결과는 탄소원으로 사용된 glucose의 농도가 1%로 균체량 및 다당체 생성 증가를 최대로 유도할 수 있는 배지내 성분이 부족한 것으로 판단된다. Fig. 9는 위와 같은 결과를 바탕으로 탄소원의 농도를 8%로 고정한 후 질소원으로 사용된 yeast extract의 농도에 변화를 주어 균체의 생육과 다당체 생성량을 검토한 결과이다. 그림에서와 같이 균체량 생성을 위한 최적 C/N ratio 는 8:1이지만 다당체 생성을 위한 최적 C/N ratio는 4:1일때 가장 높은 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 다당체 생성을 위한 효소의 생합성과 미생물 증식에 중요한 인자로 작용하는 질소원이 풍부할 때 다당체 생성량 또한 증가하는 것으로 판단된다.

3) 무기염류 및 금속이온의 영향

미생물 증식을 위한 탄소원과 질소원의 농도를 최적 조건으로 선택하였으나 아직도 균체량 및 다당체 생성량은 극히 미약하였다. 따라서 몇몇 인자에 대한 검토가 앞으로 더 이루어져야 할 필요성에 의해 Fig. 10 과 Fig. 11을 검토하였다. Fig. 11은 몇몇 무기염류를 선택하여 그 다당체 생성에 미치는 영향을 검토한 결과이다. 균체생육에 있어서는 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 4 g/L, KH_2PO_4가 4.06 g/L로 가장 좋은 값을 나타내었고, 다당체 생성에 있어서는 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, KH_2PO_4 및 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$가 좋은 결과를 나타내었다. Fig. 11에 나타난 결과에서는 균체량에 있어서는 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$가 8.36 g/L로 가장 좋은 값을 나타내었고, 다당체 생성량에 있어서는 $MnSO_4 \cdot 5H_2O$가 균체량은 비록 낮았지만 다당체 생성량은 2.03 g/L로 비교적 높은 값을 나타내었다. 위와 같은 결과로부터 Fig. 12와 Fig. 13에서는 균체성장과 다당체 생성에 좋았던 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$와 $MnSO_4 \cdot 5H_2O$를 선택하여 농도에 따른 균체성장과 다당체 생성량을 검토한 결과이다. 그림에서와 같이 균체량은 두

조성이 첨가되지 않았을 경우가 4.4 g/L와 5 g/L로 좋았으나 반면에, 다당체 생성에 있어서는 두 조성이 2 g/L로 첨가될 경우 2.9 g/L와 3.6 g/L를 나타내어 가장 좋은 결과를 나타내었다. 따라서 다당체 생성에 좋았던 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$와 $MnSO_4 \cdot 5H_2O$를 각각 2 g/L씩 YMK media(Table 1)에 첨가하도록 하였다.

4) 최적 배지조성에서의 경시변화

Fig. 6-13에서의 결과를 바탕으로 고농도 균체량 및 다당체 생성 증가를 유도할 수 있는 배지를 Table 2와 같이 제조하였다. Table 2에 나타나 있는 배지조성은 앞서 이루어진 실험들을 바탕으로 구성하였으며 제조되어진 modified medium을 이용한 플라스크배양은 Fig. 14에 나타내었다. 그림에서와 같이 기질의 소비량은 배양 2일째부터 급격히 소비되어 배양 4일째 완전히 소비되었으며, 균체량과 다당체 생성도 비례하여 증가하였다. 균체량은 배양 2일째부터 급격히 증가하여 배양 7일째에서는 최대값인 11.8 g/L를 나타내었으며, 다당체 생성량은 배양 8일째 최대값인 8.1 g/L로 초기 YMK media를 이용한 배양에서보다 균체량은 약 3배, 다당체 생성량은 약 8배 가까이 상승하는 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 modified된 배지내의 여러 무기염류와 금속이온 및 적절한 C/N ratio로 인한 균체량의 증가와 그와 아울러 다당체 생성량이 증가한 것으로 판단된다.

2. 액체배양공정 개발

가. 목적산물생산 촉진 및 저해요인 검토

1) 아미노산의 영향

가) YMK media 상에서의 amino acid의 영향

아미노산은 이차대사산물의 생산을 위한 중요한 인자이다. 아미노산의 역할은 생산균주 및 생산물에 따라 다양하지만 이차대사산물의 전구물질로 작용하며, 질소원으로도 이용될 수 있다. 이를 바탕으로 YMK media (Table 1) 상에서 아미노산이 균체 생육과 다당체 생성에 미치는 영향을 비교·검토하여 그 결과를 Fig. 15-16에 나타내었다.

Fig. 16-17에서 알 수 있듯이 균체 생육에 가장 큰 영향을 미치는 것은 균체량 6.5 g/L를 나타낸 phenylalanine이였으며, tyroine과 arginine 또한 각각 6.2 g/L와 5.9 g/L로서 20종류의 아미노산중 가장 높은 값을 나타냈다. 다당체 생성에 있어서는 aspartic acid가 가장 높은 약 1.8 g/L를 나타내었지만 이와 유사한 양의 다당체 생성을 보인 histidine, isoleucine, proline, valine, tryptophan등을 선택하여 농도 변화에 따른 균체량 및 다당체 생성에 미치는 영향을 비교·검토하였다(Fig. 17-18). 각각의 아미노산 농도를 0.5 g에서 3 g까지 0.5 g 단위로 변화를 주어 실험을 실시하였으며, 그 결과 균체량은 histidine의 농도가 1 g/L 일 때 최대값 7 g/L를 나타내었으며, histidine의 농도가 증가할수록 점점 감소하는 경향을 나타내었다. 다당체 생성에 있어서는 aspartic acid의 농도가 2.5 g/L 일 때 최대값 1.7 g/L를 나타냈다. 그러나 YMK media상에서 아미노산의 영향을 modified된 배지조성(Table 2)에 그대로 적용하기에는 modified된 배지조성내의 높은 탄소원 및 질소원의 농도와 새로이 첨가된 영양인자와의 상관관계를 예측할 수 없다고 판단되어 modified된 배지조성내에서의 아미노산이 균체량 및 다당체 생성에 미치는 영향을 재검토할 필요성이 재기되었다.

나) Modified media 상에서의 amino acid의 영향

앞선 실험에서 제기되었던 문제점을 검토하기 위하여 modified된 배

지조성에서 amino acid의 영향을 검토하여 Fig. 19-20에 나타내었다. 균체량에 있어서는 대체적으로 modified된 배지조성에서보다 낮은 경향을 나타내었다. 다당체 생성에 있어서도 같은 경향을 나타내었으나 arginine 이나 tryptophan의 경우는 각각 8.32 g/L와 7.78 g/L로 modified된 배지조성에서보다 약간 향상된 결과를 나타내었다. 따라서 이러한 결과를 바탕으로 다당체 생성량에 있어서 우수한 결과를 나타내는 것으로 판단되는 arginine, tryptophan, tyrosine, glutamate, histidine의 5가지 아미노산을 농도 변화를 주어 균체량 및 다당체 생성에 미치는 영향을 비교·검토하였다(Fig. 21-22).

균체량은 tyrosine의 농도가 2 g/L 일 때 가장 높은 11.56 g/L로 modified된 배지조성에서 보다 약간 높은 결과를 나타내었으나 나머지 아미노산의 경우에는 대체적으로 낮은 균체량을 나타내었다. 다당체 생성에 있어서는 arginine, histidine, gluatmate가 각각 1 g/L, 1 g/L, 2 g/L의 농도에서 8.1 g/L, 8.7 g/L, 8.97 g/L의 다당체 생성량을 나타내었다. 이러한 결과는 modified된 배지조성에서보다 약간 향상된 결과이다. YMK media에서 나타난 결과에서 알 수 있듯이 균체량의 경우 대부분의 아미노산에서 향상되었으나 다당체 생성량은 오히려 감소하는 결과를 나타내었다. 또한 modified된 배지조성에서는 균체량의 경우 lysine과 tyrosine에서만 증가하였을뿐 대부분의 아미노산에서는 균체량이 감소하였고, 다당체 생성에 있어서도 대체적으로 그 생성량이 감소하는 경향을 볼 수 있었다. 이러한 결과로 아미노산은 일정한 범위의 농도에서는 다당체 생성량을 증가시키는 역할을 하지만 그 일정범위 이상이나 이하에서는 다당체 생성을 오히려 저해할 수도 있다는 결과를 확인하였다. 또한 modified된 배지조성에서 일부 아미노산에 의한 다당체 생성량이 증가한 것은 전적으로 아미노산만의 영향이라고는 판단할 수 없으며, 함께 가하여진 무기염류 및 금속

이온과 같은 영양원의 상관관계에 의한 영향이라고 할 수 있다.

Fig. 23에서는 선택된 5종류의 아미노산을 서로 같은 조성비로 혼합하여 modified된 배지조성에 첨가하였을 경우 균체성장 및 다당체 생성에 미치는 영향을 나타낸 결과이다. 균체량에 있어서는 glutamate와 tryptophan, histidine과 tyrosine을 혼합한 경우에서 각각 10.8 g/L, 10.9 g/L로 최대값을 나타내었으며, 다당체 생성에 있어서는 tryptophan과 tyrosine을 혼합한 경우에서 최대 생성량인 8.2 g/L를 나타내었다. 그러나 이러한 결과는 아미노산을 첨가하지 않은 modified된 배지조성에서의 균체량과 다당체 생성량과 큰 차이를 나타내지 않은 결과이며, Fig.21-22에 나타낸 결과에 나타난 결과에도 미치지 못하는 값이었다.

다) 아미노산 첨가시기 결정

본 연구는 최적의 아미노산을 배양중에 첨가하므로써 다당체의 생산을 증진시키고자 하였고 본 배양에 사용된 배지는 다당체 생산을 위한 최적 배지인 modified media(Table 2)를 사용하였다. 다당체 생산에 가장 좋은 영향을 미친 glutamic acid 2 g/L를 배양초기와 exponential 단계에 각각 첨가하였고 이에 대한 결과는 Fig. 24-28에 나타내었다. 균체성장은 배양 7일 정도에서 stationary에 도달하였고 약 13 g/L 정도의 균체량을 얻을 수 있었다. 다당체 생산은 배양 4일째 glutamic acid를 첨가한 경우 9.1 g/L로 가장 많은 다당체를 생산하였는데 이는 균체 성장이 가장 활발한 시기로서 아미노산이 균체생산 및 2차 대사산물 생산에 기여한 것으로 판단된다. 그러나 결과적으로 배양초기에 glutamic acid를 첨가하였을 경우와 다당체 생산에 있어서는 큰 차이를 보이지 않았다. 이는 glutamic acid가 다당체 생산에 영향을 미치나 큰 영향을 미치지는 못하는 것으로 판단된다.

2) 배양조건의 영향

가) 교반속도 및 통기량의 영향

Fungi를 생물반응기에서 배양할 경우 높은 agitation과 aeration은 심한 wall growth를 유발하는 것으로 보고되고 있다. 따라서 이러한 wall growth를 방지하기 위하여 fungi의 경우 일반적으로 낮은 rpm에서 배양하는 것으로 보고되고 있다. Fig. 29-32에서는 0.5 vvm의 통기량 조건에서 100 rpm 단위로 교반속도를 달리하여 실험을 실시한 결과이다. Fig. 29은 100 rpm과 0.5 vvm으로 배양한 경우로서 플라스크배양보다 느린 glucose 소비속도를 보여주고 있으며, 배양결과 균체량과 다당체 생산량은 각각 11.6 g/L와 7.7 g/L로 나타내었다. Fig. 30은 200 rpm과 0.5 vvm의 조건에서 배양을 실시한 경우로 균체량 및 다당체 생성량은 13.2 g/L와 9.2 g/L로 가장좋은 결과를 나타내었다. Fig. 31와 32는 교반속도를 증가시켜 균체량 및 다당체 증가에 따른 물질전달을 원활히 유지하고자 하였으나 교반속도를 400 rpm 까지 증가시켰을 경우 오히려 심한 wall growth가 발생함으로써 낮은 균체량을 나타내었으며, 이로 인하여 다당체 생산량 또한 낮게 나타난 것을 알 수 있었다. 그러나 낮은 agitation과 aeration은 배양말기에 발생하는 배양액의 점성의 증가시 일정한 agitation 및 aeration과 물질전달이 원활히 이루어지지 않는 문제점을 야기시킨다. 따라서 이러한 문제점을 해결하는 것이 중요한 과제로 주어졌다.

Fig. 33은 200 rpm, 0.5 vvm의 통기량이 균체성장 및 다당체 생성에 미치는 영향을 나탄낸 결과이다. 균체량과 다당체의 생성량은 각각 12.9 g/L와 9 g/L를 나타내었으나 0.5 vvm의 낮은 통기량은 배양말기의 균체량 증가와 다당체 생성에 따른 점도 증가로 인한 균체내로의 물질전달이 원활이 이루어지지 않을 것으로 판단되었다. 따라서 Fig. 34에서는 1 vvm으로

공기주입량을 증가시켜 배양말기에 발생하는 점도 증가에 따른 산소공급의 문제를 최소화하기 위하여 배양을 실시하였다. 그러나 그림에서와 같이 배양 7일째 균체량은 12 g/L를 나타내었으며 다당체 생성량은 7.3 g/L로 통기량이 0.5 vvm일 때 보다 낮은 결과를 나타내었다. 따라서 위와 같은 결과를 바탕으로 균체배양을 위한 최적 교반속도와 통기량은 200 rpm과 0.5 vvm으로 결정하였다.

나) pH의 영향

Fig. 35은 플라스크 배양조건인 pH를 5.5로 일정하게 유지하여 주므로써 다당체 생성량을 효율적으로 유도하고자 하였다. 그림에서와 같이 균체성장은 배양 7일째 최대 균체량인 12.9 g/L를 나타냈으며 다당체 생성량 또한 최대값인 8.7 g/L를 나타냈다. glucose 소비량은 배양초기부터 서서히 감소하였으며 배양말기에는 29 g/L까지 감소하였지만 완전히 소비되지는 않았다. 이러한 결과는 pH를 조절하지 않고 배양을 행하였을 경우와 유사한 결과를 나타내는 것이며 균체량과 다당체 생성량에 있어서는 pH를 조절하지 않고 배양한 결과인 균체량 13.2 g/L와 다당체 9.2 g/L에는 다소 미치지 못하는 결과를 나타냈다. 지금까지 이루어진 플라스크 배양과 생물반응기를 이용한 결과에서 알 수 있듯이 이 균주의 배양중 pH 변화는 급격히 이루어지지 않으며 약산성 조건인 pH 5-6에서는 별다른 변화를 보이지 않는다. 따라서 배양중 pH를 조절하지 않고 배양을 행하는 것이 보다 효율적일 것으로 판단된다.

다) 아미노산 첨가시기의 영향

Fig. 36은 플라스크배양에서 밝혀진 최적 다당체 형성시기이며 중간 대수증식기인 배양 4일째 2 g/L의 glutamic acid를 첨가하였을 경우 균체

량 및 다당체 생성량에 미치는 영향을 검토한 결과이다. 배양결과 균체성장은 급진적으로 증가하여 배양 7일에 13.5 g/L의 최대균체량을 얻을 수 있었으며, 동시에 다당체 생성량 또한 최대값인 9.9 g/L를 나타냈다. 플라스크 배양결과인 Fig. 26과 비교하여 보았을 경우 균체량과 다당체 생성량 모두 다소 증가된 결과를 나타내고 있다. 회분배양과 플라스크배양의 경우 pH의 변화 및 glucose 소비경향이 유사한 형태를 나타내고 있다. 그러나 균체량 및 다당체 생성량이 플라스크 배양에서보다 회분배양에서 증가하는 결과를 나타내고 있음을 알 수 있다. 이러한 결과는 생물반응기를 이용한 회분배양의 경우 플라스크 배양에서보다 산소를 원활히 공급할 수 있기 때문에 균체성장 및 다당체 생성을 보다 안정적으로 유지할 수 있는 것으로 판단된다.

나. 배양여액 추출물 대량생산공정 개발

이상의 결과에서 액체배양을 위한 최적의 배양조건을 검토하였으나, 높은 C/N ratio와 과량의 무기염류의 첨가로 인한 경제성과 멸균후 배지의 탁도, 침전문제로 인해 산업화에 맞는 최적의 배지조성을 재검토하였다. 또한 그동안 사용된 정제된 yeast extract를 산업용 yeast extract로 대체함으로써 산업화를 위한 경제적인 최적 배지조성을 검토하였다.

1) 산업용 yeast extract의 사용에 따른 경시변화

본 배양에 사용된 배지는 YMK(Table 1)의 조성에서 yeast extract를 산업용으로 대체하였다. 배양조건은 Fig. 5와 같은 조건으로 배양을 실시하였으며, 그 결과는 Fig. 37에 나타내었다. 배양 3일째부터 exponential phage에 접어들었으며 배양 6일째 stationary phage에 이르렀다. 균체량과

다당체 생성량은 배양 6일째 4.3 g/L과 1.5 g/L로 가장 높은 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 Fig. 5의 결과와 비교해서 균사체와 다당체 생성에 있어 별다른 차이가 없는 것으로 경제성있는 산업용 yeast extract 사용을 결정하였다.

2) 무기염류의 최적 농도 결정

일반적으로 무기염류는 균사체의 증식과 2차 대사산물을 생산하기 위한 중요한 인자이나 그 농도가 높을 경우에는 오히려 균사체와 2차 대사산물생산을 억제하게 된다. 또한 멸균후 과량의 무기염류는 각각의 무기염류와 unknown complex을 형성함으로써 배지의 침전과 탁도의 변화를 야기시킨다. 따라서 앞선 실험에서 균사체 성장과 다당체 생성에 좋았던 8가지의 무기염류에 대한 최적 농도를 재검토하였다. Fig. 38은 YMK조성에 각각의 무기염류를 50 mg/L를 첨가한 후 균체량과 다당체 생성량을 비교·검토한 결과이다. 균체생육과 다당체 생산에 있어서는 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$와 $ZnCl_2$를 제외하고 나머지 무기염류들의 첨가는 첨가되지 않았을 때보다도 균체량과 다당체 생성에 좋았으며, 그 중에서도 $MnSO_4 \cdot 5H_2O$가 균체량과 다당체 생성량이 각각 5.4 g/L와 1.69 g/L로 가장 좋았다. Fig. 39는 균체 증식과 다당체 생성에 좋은 영향을 주었던 $MnSO_4 \cdot 5H_2O$, K_2HPO_4, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 그리고 $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 등에 대해 멸균후 침전이 되지 않는 범위의 농도까지 변화를 주어 실험을 실시한 결과이다. 그림에서와 같이 균체량과 다당체 생성에 있어 100 mg/L이하의 농도로 첨가될 경우 좋은 영향을 미쳤으나 그 이상의 농도에는 오히려 균체량과 다당체 생성량이 낮은 값을 나타내고 있음을 알 수 있었다. 균체증식과 다당체 생성에 있어 가장 좋은 결과를 나타낸 것은 $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 50 mg/L를 첨가했을 경우로 5.3 g/L와 1.9 g/L를 나타내었다.

3) 최적의 C/N ratio

산업용 yeast extract의 대체에 따라 최적의 C/N ratio를 재검토하였다. 또한, 균체당 다당체 생성량을 기준으로 경제성 있는 최적 C/N비를 결정하였다. Fig. 40과 41에서는 여러 경우의 C/N ratio에 따른 균체량과 다당체 생성량의 차이를 비교·검토한 결과이다. C/N ratio의 농도별 균체량 및 다당체량의 차이를 살펴보면 C/N ratio가 10:1 이하의 낮은 비율에서 균체성장 및 다당체 생성이 좋았으며 C/N ratio 가 높아질수록 균체량과 다당체 생성량은 낮아지는 경향을 알 수 있었다. 또한 같은 C/N ratio에서도 glucose 및 yeast extract의 농도가 높을수록 균체량 및 다당체 생산량이 좋음을 알 수 있었다. Fig. 40과 41에서와 같이 최대 균체량과 다당체 생산량을 나타낸 C/N ratio는 100:15로서 8.1 g/L와 3 g/L를 각각 나타내었다. 그러나 Table 4.에서와 같이 균체량당 다당체 생성량이 가장 좋았던 C/N ratio는 60:15로써 $Y_{P/X}$가 0.48 이었다. 따라서 균체량과 다당체 생성량이 약간 낮지만 균체당 다당체 생성량의 수율이 좋은 glucose 60 g/L와 yeast extract 15 g/L를 최적의 C/N ratio로 결정하였다. 그림에서와 같이 최적 C/N ratio의 차이는 고농도 균체 배양공정 및 다당체 생산공정에 적용되어 효율적인 다당체 생산을 가능하게 할 것으로 판단된다.

Table 4. Effect of various C/N ratios on cell growth and polysaccharide production

Glucose (g/L)	Yeast extract (g/L)	DCW (g/L)	Polysaccharide (g/L)	$Y_{P/X}$
2	1.5	4.08	1.49	0.37
4	1.5	4.61	1.78	0.39
6	1.5	5.42	2.58	0.48
8	1.5	7.80	2.89	0.38
10	1.5	8.06	2.95	0.37

4) 최적 배지조성에서의 경시변화

Fig. 38-41에서의 결과를 바탕으로 고농도 균체량 및 다당체 생성 증가를 유도할 수 있는 배지를 Table 3과 같이 조성하였다. Table 3에서 나타나 있는 배지조성은 앞서 이루어진 실험들을 바탕으로 구성하였으며 조성된 optimum modified medium을 이용한 플라스크배양은 Fig. 42에 그 결과를 나타내었다. 기질의 소비량은 배양 말기까지 일정한 속도로 소비되어 배양 8일째의 잔존당이 29 g/L정도가 남았으며, 균체량과 다당체 생성도 비례하여 증가하였다. 균체량은 배양 2일째부터 급격히 증가하여 배양 7일째에서는 최대값인 7.1 g/L를 나타내었으며, 다당체 생성량 또한 배양 7일째 최대값인 4.2 g/L를 나타내었다. 이러한 결과는 앞선 Table 2의 modified medium에서의 결과보다 좋지는 않으나 들어간 조성의 농도와 성분의 차이라고 판단되며 앞선 Fig. 38의 결과와 비교해 볼 때 균체량과 다당체 생성량은 각각 1.5배와 3배 정도의 증가한 결과를 보였다.

3. 최적 액체배양공정 개발

가. 고농도 배양공정 개발

앞선 회분배양(Fig. 29-32)의 실험결과에서 알 수 있듯이 교반속도가 300 rpm 이상에서는 심한 wall growth로 인하여 균체 성장이 제대로 이루어지지 않아 균사체와 다당체의 생성량이 낮아지는 결과를 나타내었다. 따라서 Fig. 43-49는 생물반응기내에서의 교반속도와 통기량에 따른 균체량과 다당체 생성량에 미치는 영향을 검토하기 위하여 교반속도를 100-200 rpm까지, 통기량은 0.5-1.5 vvm까지 변화를 주어 실험하였다. Fig. 43-44는 교반속도를 50 rpm으로 고정하고 통기량을 1 vvm과 1.5 vvm으로 변화를 주어 실험한 결과이다. 그림에서와 같이 glucose의 소비속도는 통기량이 낮은 1 vvm보다 통기량이 높은 1.5 vvm에서 소비속도가 빨랐으며, 균체량과 다당체 생성량에 있어서도 통기량이 1.5 vvm인 경우에 균체량과 다당체가 각각 10.1 g/L와 5.8 g/L로 통기량이 1 vvm일 때보다 좋은 결과를 나타내었다.

Fig. 45-47은 100 rpm을 고정하고 통기량을 0.5-1.5 vvm까지 변화를 주었을 때의 결과이다. 배양결과 통기속도가 1 vvm까지는 통기량의 증가에 따라 glucose의 소모속도도 증가하였으나 1.5 vvm에서는 1 vvm일 때보다 다소 낮아지는 경향을 보였다. 또한 균사체와 다당체의 생성에 있어서도 1 vvm에서 가장 좋은 12 g/L와 6.5 g/L를 나타내었다. Fig. 48-49는 교반속도를 200 rpm으로 고정하고 0.5-1 vvm까지 변화를 주어 실험한 결과이다. 앞선 결과와 마찬가지로 통기량의 증가에 따라 glucose의 소모속도는 증가하였으며, 균사체와 다당체 생성량도 증가하였다. 최대 균체량과 다당체 생성량은 1 vvm에서 10.2 g/L와 7.3 g/L를 나타내었다.

이상의 결과를 검토하면 균체량은 교반속도와 통기량은 100 rpm 및 1 vvm에서 12 g/L로 가장 좋은 결과를 나타내었고, 다당체 생성량은 200 rpm 및 1 vvm의 조건에서 7.3 g/L로 가장 좋은 결과를 나타내었다. 기질의 소모속도는 통기량과 교반속도가 증가함에 따라 기질의 소모속도는 증가하는

경향을 보였고, 통기량보다는 교반속도에 의한 기질소모의 변화가 더 큰 것으로 나타났다. 이는 통기보다는 교반에 의한 물질전달의 효과가 더 크기때문이라고 생각된다. 균체성장에 있어서는 교반속도의 증가보다는 통기량의 증가가 균체증식에 더 안정적이라 생각되며 다당체 생성에 있어서는 교반속도의 증가가 다당체 생성에 더 효과적임을 알 수 있었다. 또한 잔존당은 20-30 g/L정도가 배양말기에 잔존하였는데, 잔존당의 정도에 따라 배양말기의 균체량과 다당체 생성량이 유지되거나 감소하는 경향을 보였다. 즉, 배양말기의 잔존당이 30 g/L이상에서는 균체량과 다당체 생성량이 배양말기까지 안정하게 유지되나 25 g/L이하로 배양말기에 균체와 다당체가 감소하는 경향을 보였다. 이는 일반적으로 다당체를 생성하는 fungi의 경우 과잉의 탄소원 존재하에 다당체가 생성이 이루어진다는 보고와 일치하며 충분한 잔존당의 존재하에 생성된 다당체가 안정적이라는 보고와 일치한다.

나. 생산성 최대화

앞선 교반속도와 통기량의 영향에서 알 수 있듯이 균체증식과 다당체 생성을 위해서는 원활한 물질전달이 필요함을 알 수 있었다. 그러나 이러한 원활한 물질전달을 위해 과도한 교반속도와 통기량의 증가는 강한 전단력에 의한 mycellium form과 pellet form에 단편화가 이루어져 균사증식이 억제되거나 일정한 형태의 pellet size를 유지하기 곤란하게 된다. 또한 높은 교반속도와 통기량에 의한 foam 발생으로 배양기내의 각종 sensor와 벽면에 심한 wall growth가 생기게 됨으로써 균체증식과 다당체 생성을 억제하게 된다. 따라서 Fig. 50에서는 원활한 물질전달을 통하여 균체량과 다당체생성을 증가시키고자 배양기간중에 교반속도를 100 rpm에서 300 rpm까지 증가시킨 결과이다. 또한 교반속도의 증가에 따른 용존산소농도의 변

화도 검토하였다. 그림에서와 같이 배양 2일째부터 균체증식이 급격히 이루어졌고 배양 4일째까지 균체성장은 지속적으로 이루어졌으나 배양 4일째 교반속도를 300 rpm까지 증가시킴에 따라 강한 전단력에 의해 wall growth가 발생함에 따라 균체성장이 잘 이루어지지 않았다. 배양 5일째 이후로 균체성장은 다시 이루어졌으나 4일째의 충격으로 균체의 활성이 저하되면서 7일 이후로 급격히 감소하였다. 또한 다당체 생성량은 3일째부터 급격히 증가하여 6일째까지 증가하다 이후로 일정하게 유지되는 경향을 보였다.

최대 균체량과 다당체 생성량은 각각 9.4 g/L와 5.4 g/L를 나타내었다. 기질의 소모는 배양 3일째까지 일정한 비율로 감소하였으나 4일째 이후부터는 낮은 소비속도를 보이며 기질이 소모되었다. 용존산소농도의 변화는 균체증식과 rpm의 변화에 따라 증가와 감소를 보이다 4일째 이후부터 증가하여 배양 6일째 부터는 급격히 증가하였다. 실험결과 rpm의 증가로 생물반응기내에 충분한 용존산소농도를 유지할 수는 있으나 과도한 rpm 증가로 인해 균체증식이 잘 이루어지지 않았고 그에 따라서 다당체 생성량도 증가되지 않은 것으로 판단된다.

Fig. 51은 앞선 실험결과 교반속도를 300 rpm까지 증가시킬 경우 강한 전단력에 의해 wall growth가 생김으로써 균사생육이 저해된 것으로 판단하여 교반속도는 100-200 rpm까지 변화를 주었고 통기량은 1-1.5 vvm까지 변화를 주어 용존산소농도가 15-20% 이상을 유지할 수 있도록 하였다. 그림에서와 같이 최대 균체량과 다당체 생성량은 배양 7일째 11.4 g/L와 8 g/L를 나타내었다. 교반속도와 통기량의 증가에도 균체증식과 다당체 생성은 원활이 이루어졌으며 기질의 소모량은 3일째 이후로 급격히 증가하여 배양말기의 잔존당은 20 g/L 잔존하였다. 또한 배양 7일후 더 이상의 균체증식은 없었으며 기질의 소모는 서서히 감소된 반면, 다당의 분해가 다소

빠르게 진행되었는데, 이는 배양말기까지 균체량이 일정 수준 유지됨에 따라 분해된 다당을 기질로 소모한 것으로 생각된다.

Fig. 52는 앞선 회분배양 결과 균체량이 가장 좋았던 100 rpm, 1 vvm의 조건에서 배양기내의 용존산소의 농도를 15-20% 이상 유지할 수 있도록 교반속도의 증가없이 air와 pure oxygen의 혼합비를 조절하여 1 vvm으로 주입하였다. 배양결과 균체증식은 배양 2일이후부터 빠르게 이루어졌으며 다당체 생성도 균체증식과 더불어 생성되었다. 최대 균체량과 다당체 생성량은 배양 7일째 13.8 g/L와 6 g/L를 나타내었다. 기질의 소모는 균체증식에 따라 배양말기까지 소모되어 최종 잔존당은 27 g/L이었다. 균체량에 비하여 다당체 생성량은 적게 생성되었는데, 이는 100 rpm의 낮은 교반속도에서도 pure oxygen과 air를 혼합하여 공급함에 따라 용존산소를 일정수준 유지할 수 있어 균체증식이 원활히 이루어졌고, 낮은 교반속도로 인해 전단력 없이 균체가 안정적으로 증식할 수 있었으나 다당체 생성은 원활이 이루어지지 않았다. 따라서 이러한 배양조건은 다당체 생성보다는 균체증식에 유리한 조건이라 판단된다.

다. 생산공정 최적화

앞선 회분배양을 통하여 교반속도와 통기량의 영향을 검토하였고, 용존산소의 농도에 따른 균체증식과 다당체 생성의 영향을 검토한 결과 균체증식과 다당체 생성을 위해서는 적정 수준의 용존산소를 유지하는 것이 균체증식과 다당체 생성을 위해 효과적이라 판단되었다. 따라서 본 배양에서는 앞선 회분배양 결과를 토대로 통기량은 배양부피의 증가에 따라 수조작으로 1 vvm에 맞추어 주었으며, 교반속도는 20% 이상의 용존산소농도 유지를 위해 100-200 rpm까지 용존산소의 농도에 따라 증가시켰다. 또한 공기의 공급과 교반속도의 증가만으로는 용존산소 농도를 20 %이상으로 유지하

기 힘든 경우는 공기와 pure O_2를 혼합하여 1 vvm에 맞추어 공급하였다.

Fig. 53와 54는 공급기질을 2%의 yeast extract를 사용하여 2.5일째까지 회분 배양을 한 후 배지의 공급을 12시간마다 21.6 mL씩 선형증가적 방법으로 공급하였으며, Fig. 52의 경우는 100 rpm, 1 vvm으로 배양한 결과이며, Fig. 53의 경우는 용존산소농도를 20%이상으로 유지하기 위하여 100-200 rpm까지 교반속도를 증가 시킨결과이다. Fig. 53에서는 최대 균체량과 다당체 생성량은 12.9 g/L와 6.3 g/L이었으며, 배양 5일째부터 용존산소농도가 10% 이하로 떨어져 7일째 0%가 되었고 배양말기 균체가 감소하면서 용존산소농도가 증가하였다. 기질의 소모도 배양 5일째까지 빠른 속도로 소비되었으나, 이후로 소비속도는 감소하여 잔존당은 29 g/L가 남았다. Fig. 53에서는 최대 균체량과 다당체 생성량이 각각 17.2 g/L와 7.1 g/L를 나타냈으며, 배지공급이 끝난 6일째 이후에도 균체 및 다당체 생성량은 계속 증가하여 유지되었으나, 7.5일째 이후부터 다소 감소하였다. Fig. 53-54의 결과에서 균체증식과 다당체 생성을 위해서는 적정 수준의 용존산소가 유지되어야 함을 알 수 있었다. 그러나 질소원인 yeast extract의 공급은 균체증식에 비하여 다당체 생성에는 큰 효과가 없음을 알 수 있었다.

따라서 Fig. 55에서는 공급배지를 8% glucose로 하여 배양 2.5일째부터 7일까지 균체증식에 맞추어 선형증가적으로 배지를 공급하였다. 최대 균체량은 13.3 g/L이었고 최대 다당체 생성량은 7.3 g/L이었다. 배지공급이 끝난 후에도 균체증식과 다당체 생성은 계속 유지되었으나 균체증식은 공급배지로서 yeast extract를 사용했을 때보다 감소하였다. 지금까지의 공급배지의 차이에 의한 균체량과 다당체 생성량의 결과로 균체증식을 위한 배지로 yeast extract가 효과적이며, 다당체 생성에는 glucose가 효과적이라 판단하였다. 따라서 Fig. 56-59까지는 공급기질의 조성과 공급속도

에 변화를 주어 균체량과 다당체 생성량에 미치는 영향을 검토하였다.

Fig. 56에서는 8% glucose와 2% yeast extract를 혼합하여 배양 2.5일째부터 Fig. 55와 같은 방법으로 배지를 공급하였다. 최대 균체량과 다당체 생성량은 각각 17 g/L와 9.4 g/L이었으며, 배지공급이 끝난 후에도 균체증식은 지속적으로 증가하였고, 다당체 생성량은 8일째까지 증가하는 경향을 보였다. Fig. 57에서는 2% yeast extract를 2.5일째부터 먼저 공급하여 배양 4.5일째 까지 Fig. 54에서와 같은 방법으로 배지공급을 하고, 배양 4일째부터 8% glucose를 균체 증식에 맞추어 12시간 마다 7.2 mL씩 선형증가적으로 공급하였다. 최대 균체량과 다당체 생성량은 각각 18.2 g/L 및 10.4 g/L이었으며, 배지공급이 끝난 후에도 균체량과 다당체 생성량은 지속적으로 증가 하였다.

Fig. 58에서는 2% yeast extract를 배양 2.5일째부터 6 mL/hr의 일정한 속도로 6일까지 공급하였고 배양 4일째부터 8% glucose를 균체증식에 맞추어 7.2 mL씩 12시간 마다 선형증가적으로 공급하였다. 배지공급이 끝난 후에도 균체증식과 다당체 생성은 배양말기까지 지속되었으나 최대 균체량과 다당체 생성량은 14.8 g/L와 9.8 g/L로 Fig. 57의 결과에 비해 균체량이 다소 감소하였다. 이는 균체증식에 효과적이라고 판단된 yeast extract 공급의 차이에 의한 결과라 판단되며, yeast extract의 일정한 속도로 공급하기보다는 선형증가적으로 공급하는 것이 균체 증식과 다당체 생성에 더욱 효과적이라 판단된다. 이상의 결과로 Fig. 59에서는 배양 2.5일째부터 8% glucose를 6 mL/hr의 일정한 속도로 공급을 하고 2% yeast extract를 2.5일째부터 변형된 선형증가적 방법으로 5.75일까지 공급하였다. 그림에서와 같이 균체증식과 다당체 생성은 배지공급이 끝난 후에도 지속적으로 증가하였으며, 최대 균체량과 다당체 생성량은 각각 21.4 g/L와 11.8 g/L로 가장 좋은 결과를 얻었다.

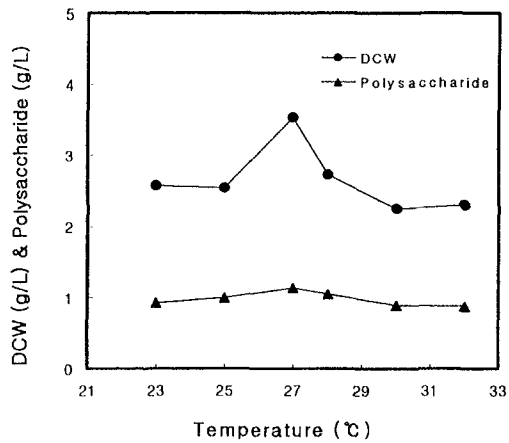


Fig. 1. The effects of the culture temperature on the cell growth and polysaccharide production in the flask culture.

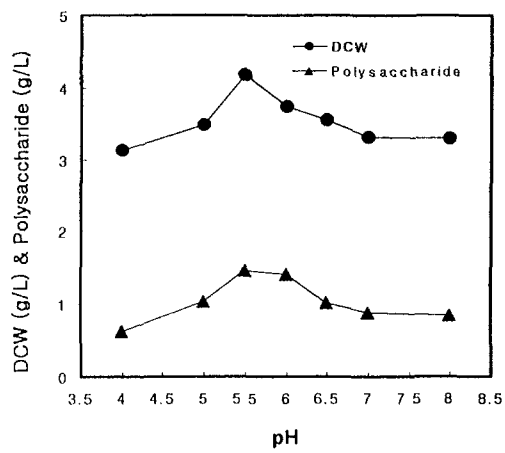


Fig. 2. The effects of pH on the cell growth and polysaccharide production in the flask culture.

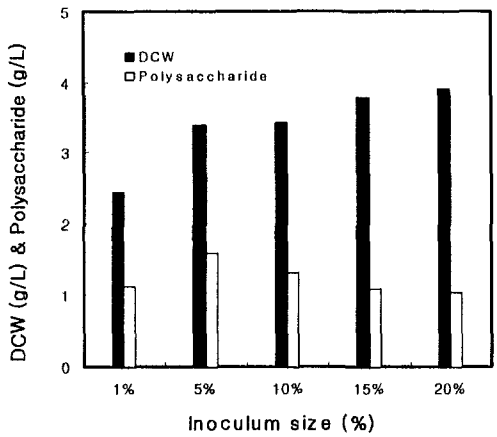


Fig. 3. The effects of the inoculum size on the cell growth and polysaccharide production in the flask culture.

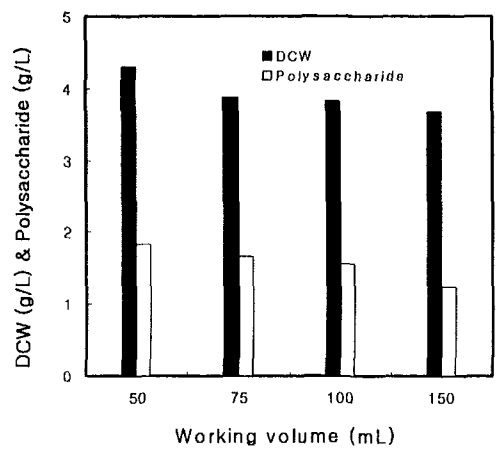


Fig. 4. The effect of working volume on the cell growth and polysaccharide production in the flask culture.

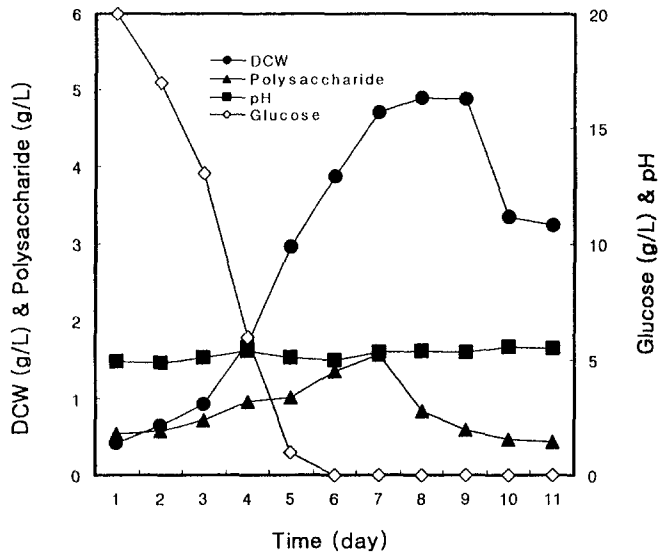


Fig. 5. The profiles of cell growth, glucose, pH and polysaccharide production on YMK medium in the flask culture. (27℃, 150 rpm, pH 5.5)

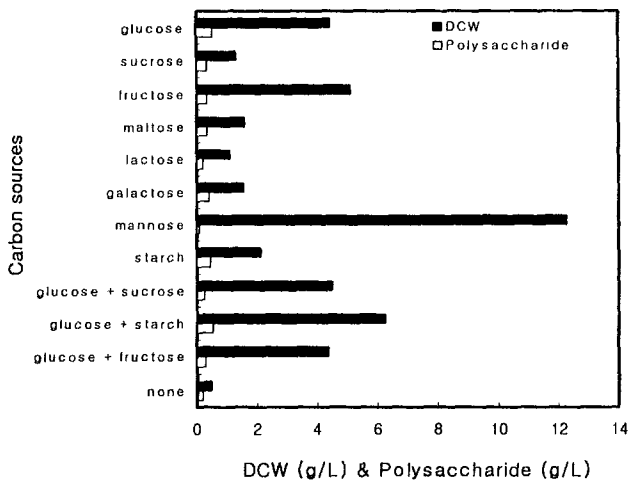


Fig. 6. The effects of carbon sources on the cell growth and polysaccharide production in the flask culture.

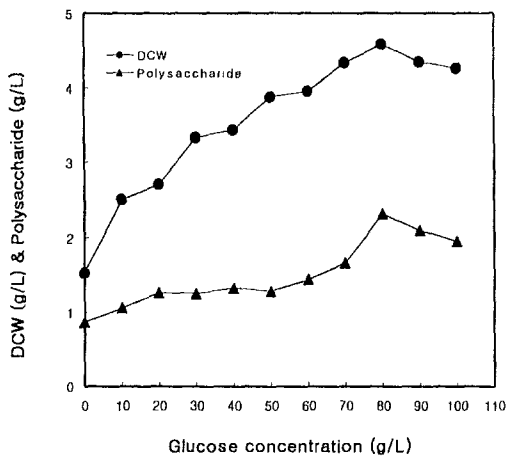


Fig. 7. The effect of glucose concentration on the cell growth and polysaccharide production in the flask culture.

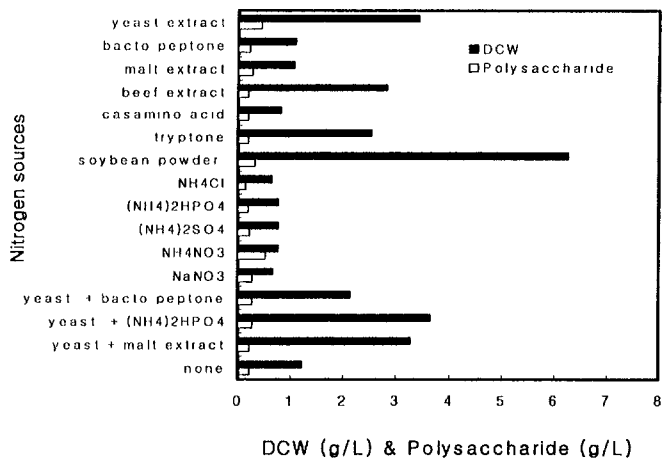


Fig. 8. The effects of nitrogen sources on the cell growth and polysacchride production in the flask culture.

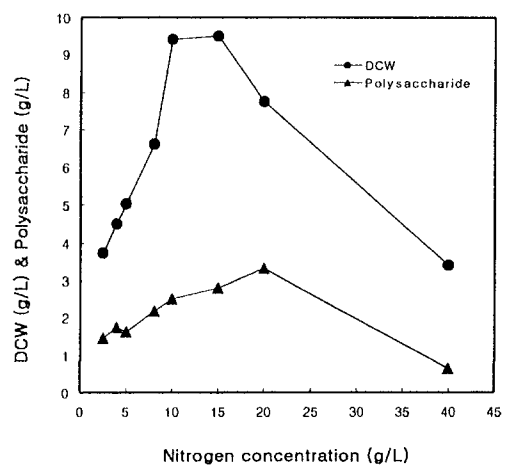


Fig. 9. The effect of nitrogen concentration on the cell growth and polysacchride production in the flask culture.

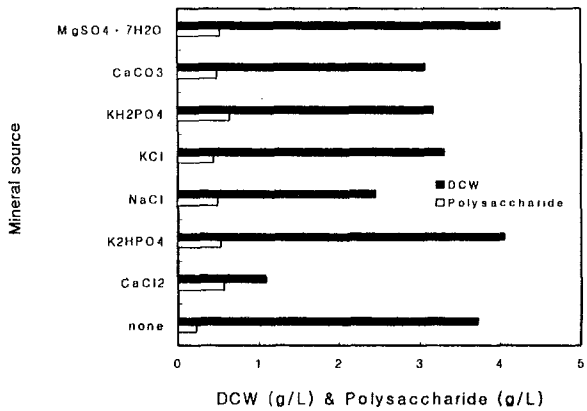


Fig. 10. The effects of mineral sources on the cell growth and polysaccharide production in the flask culture

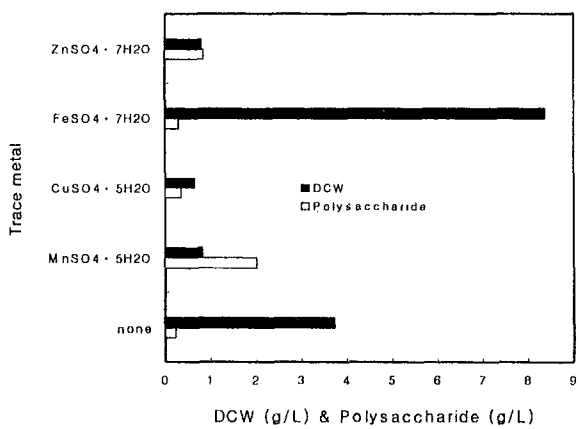


Fig. 11. The effects of trace metals on the cell growth and polysaccharide production in the flask culture.

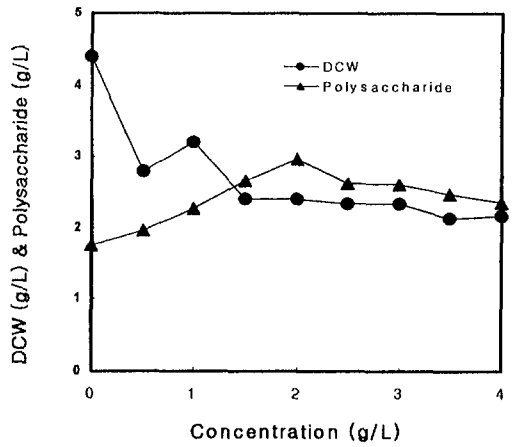


Fig. 12. The effect of $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ concentration on the cell growth and the polysaccharide production in YMK medium.

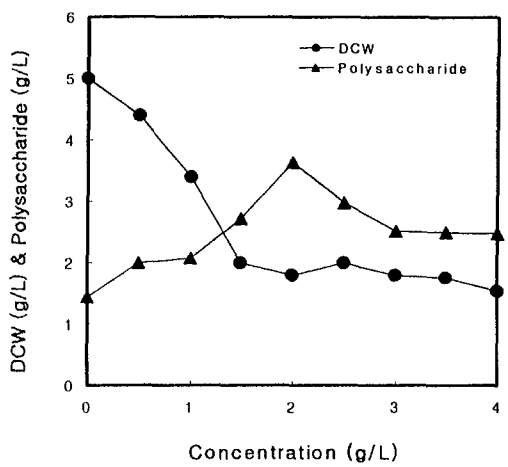


Fig 13. The effect of $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ concentration on the cell growth and the polysaccharide production in YMK medium.

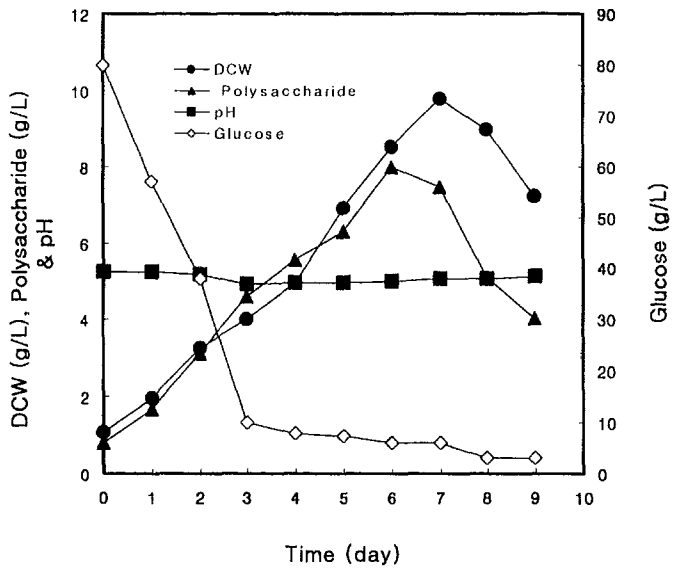


Fig. 14. The profiles of cell growth, glucose, pH and polysaccharide production in flask culture.

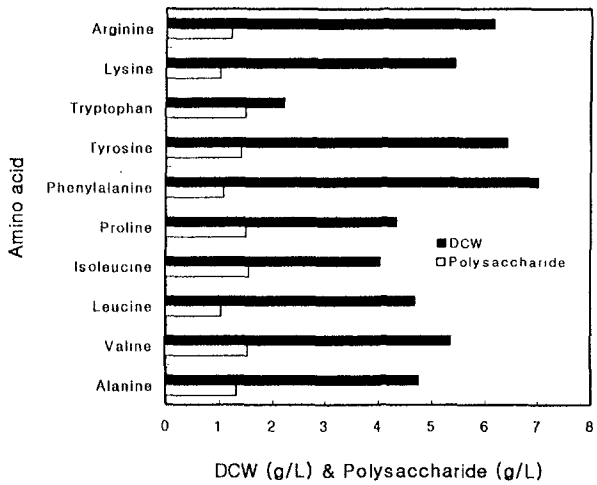


Fig. 15. The effects of amino acids on the cell growth and the polysaccharide production in YMK medium.

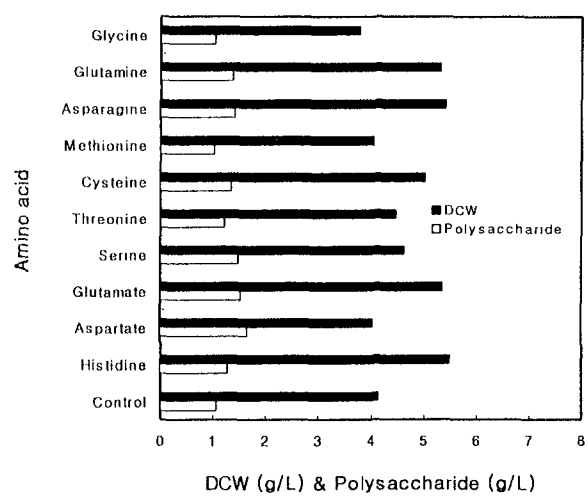


Fig. 16. The effects of amino acids on the cell growth and the polysaccharide production in YMK medium.

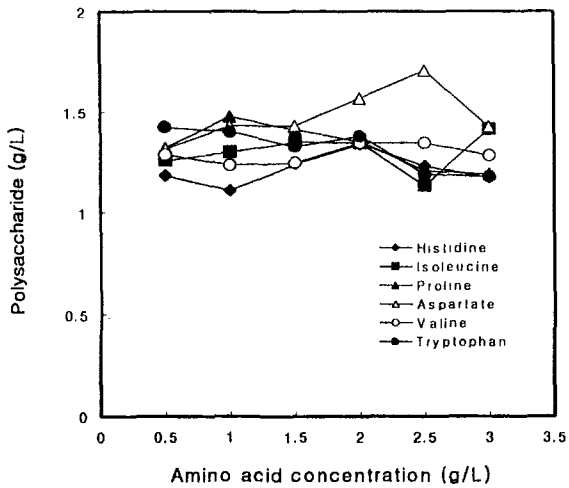


Fig. 17. The effects of amino acids concentration on the polysaccharide production in YMK medium.

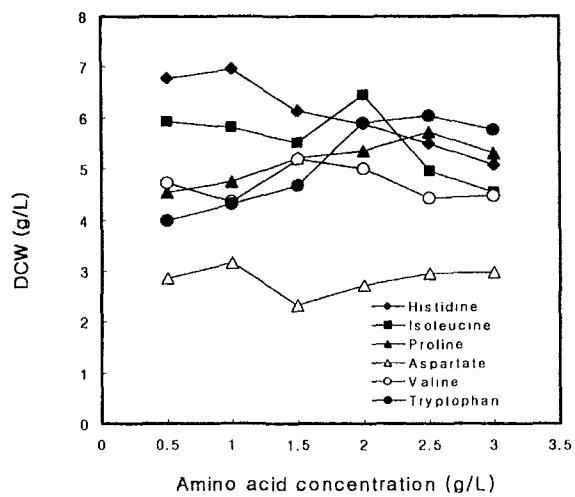


Fig. 18. The effects of amino acids concentration on the cell growth in YMK medium.

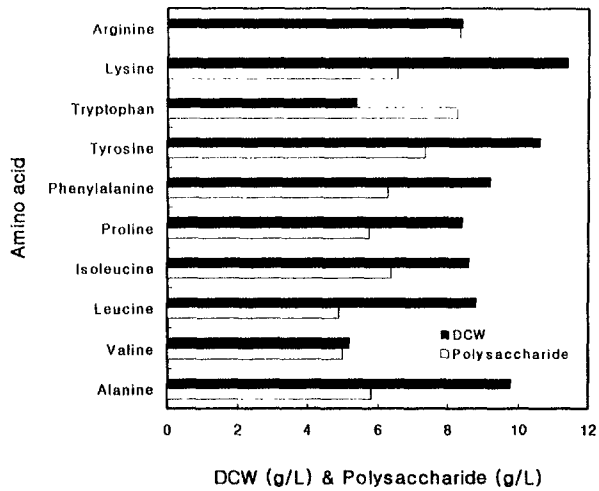


Fig. 19. The effects of amino acids concentration on the cell growth in modified medium.

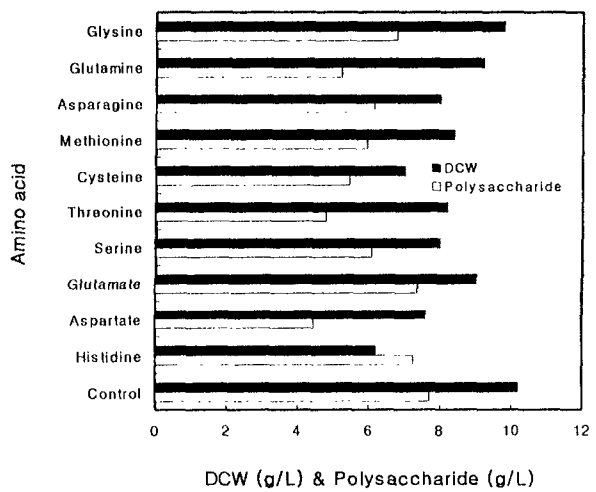


Fig. 20. The effect of amino acids concentration on the cell growth in modified medium.

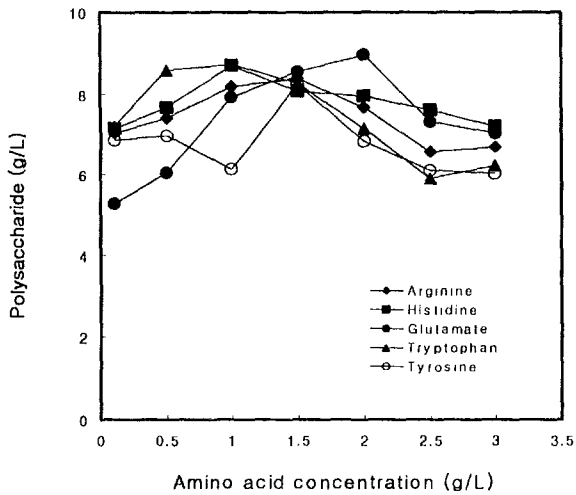


Fig. 21. The effects of amino acids concentration on the polysaccharide production in modified medium.

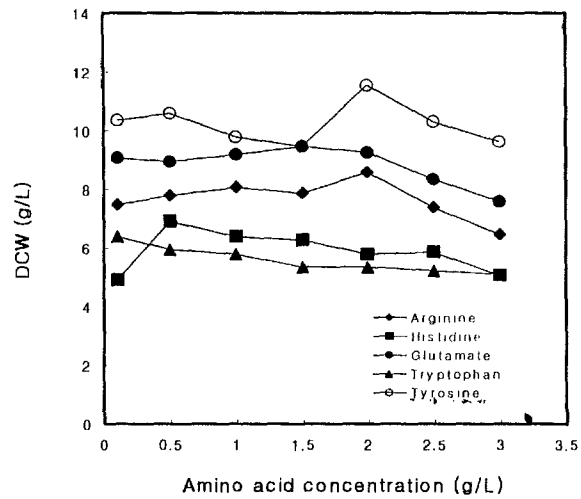


Fig. 22. The effects of amino acids concentration on the cell growth in modified medium.

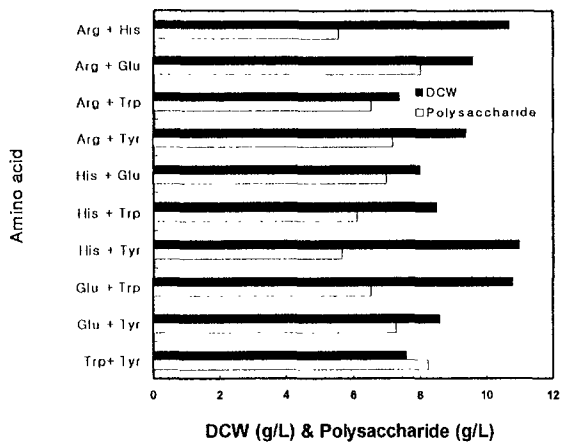


Fig. 23. The effects of amino acids on the cell growth and the polysaccharide production in modified medium.

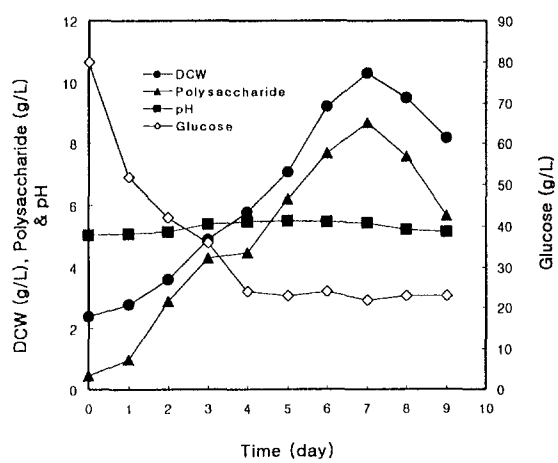


Fig. 24. Profiles of cell growth, glucose, pH and polysaccharide production with adding 2 g/L glutamic acid (GA) at the start of the cultivation.

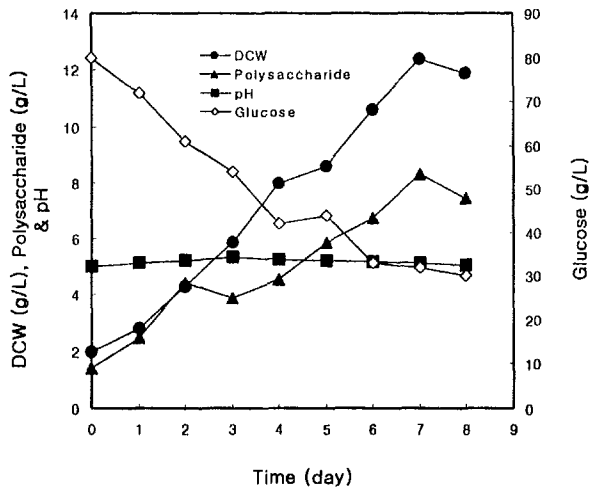


Fig. 25. Profiles of cell growth, glucose, pH and polysaccharide production with adding 2 g/L glutamic acid (GA) at 3days

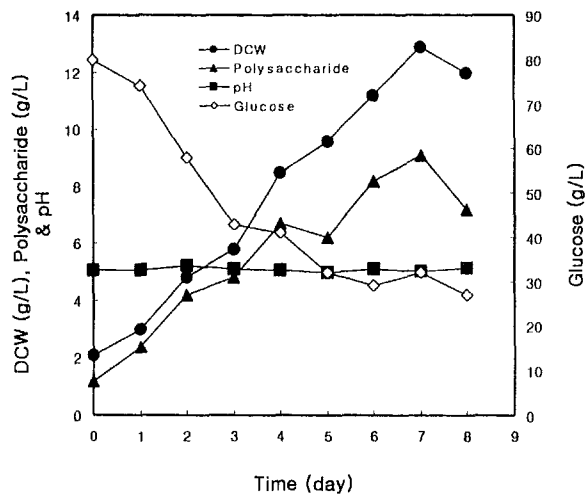


Fig. 26. Profiles of cell growth, glucose, pH and polysaccharide production with adding 2 g/L glutamic acid (GA) at 4days

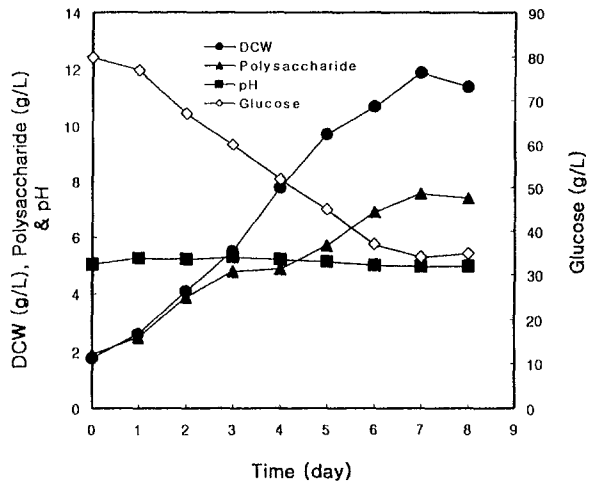


Fig. 27. Profiles of cell growth, glucose, pH and polysaccharide production with adding 2 g/L glutamic acid (GA) at 5days

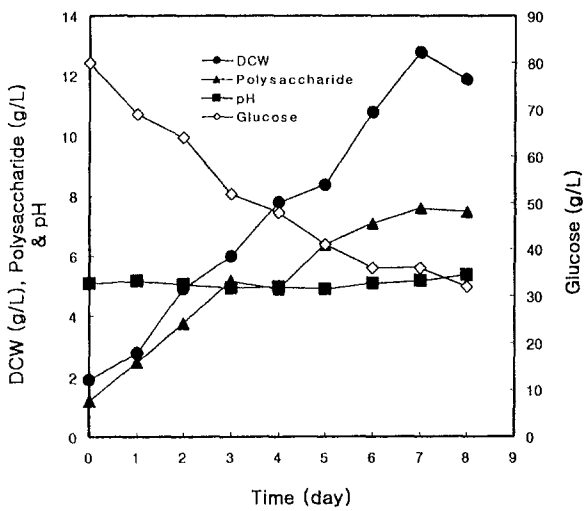


Fig. 28. Profiles of cell growth, glucose, pH and polysaccharide production with adding 2 g/L glutamic acid (GA) at 6days

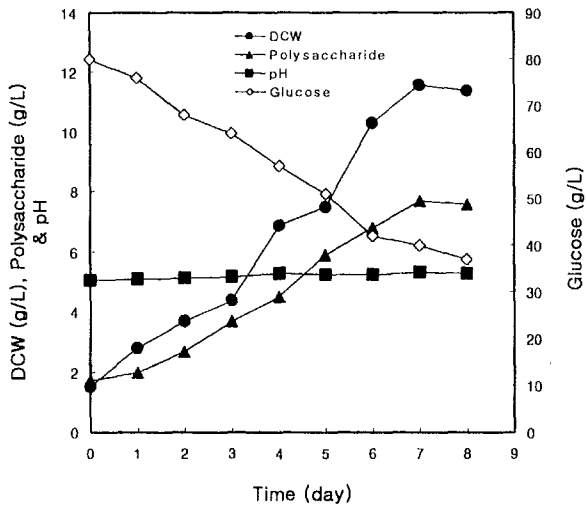


Fig. 29. Profiles of cell growth, glucose, pH and polysaccharide production with 100 rpm and 0.5 vvm.

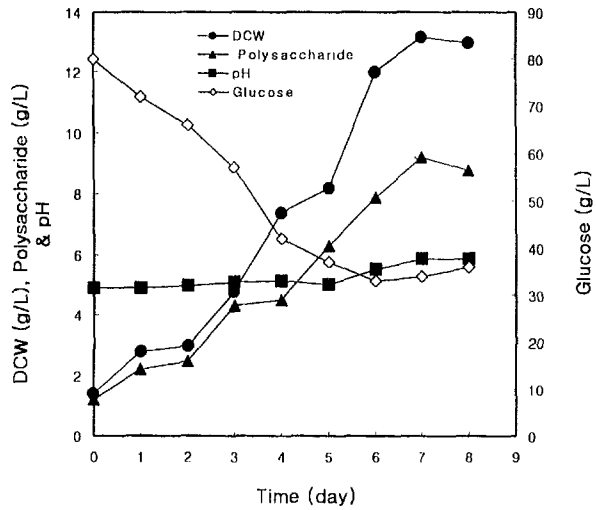


Fig. 30. Profiles of cell growth, glucose, pH and polysaccharide production with 200 rpm and 0.5 vvm.

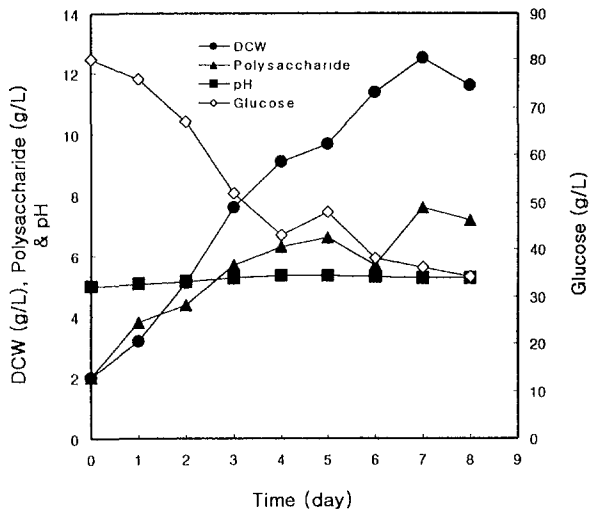


Fig. 31. Profiles of cell growth, glucose, pH and polysaccharide production with 300 rpm and 0.5 vvm.

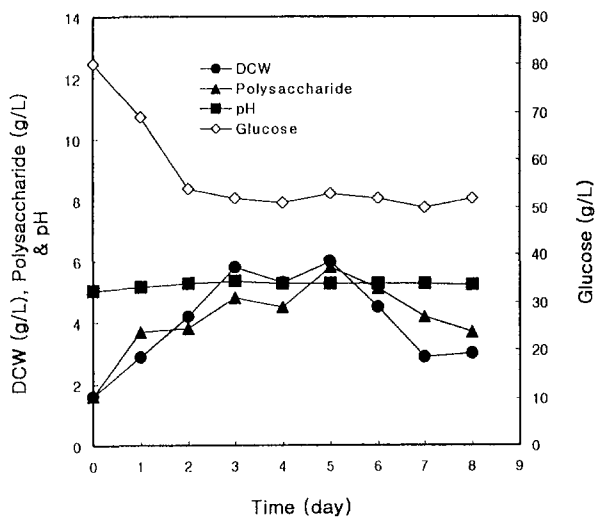


Fig. 32. Profiles of cell growth, glucose, pH and polysaccharide production with 400 rpm and 0.5 vvm.

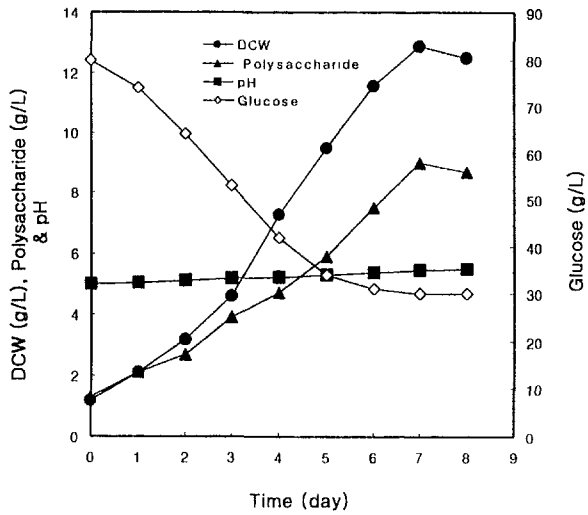


Fig. 33. Profiles of cell growth, glucose, pH and polysaccharide production with 200 rpm and 0.5 vvm.

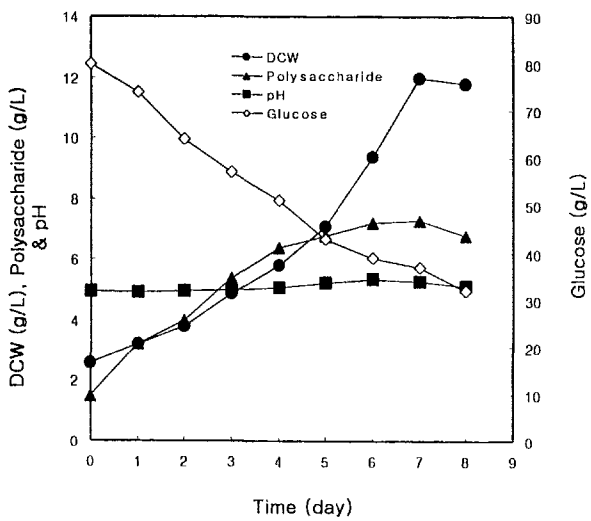


Fig. 34. Profiles of cell growth, glucose, pH and polysaccharide production with 200 rpm and 1 vvm.

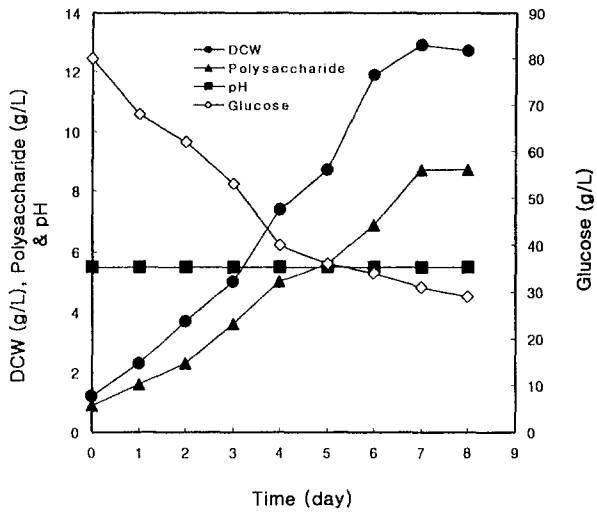


Fig. 35. Profiles of cell growth, glucose and polysaccharide production with controlling at pH 5.5.

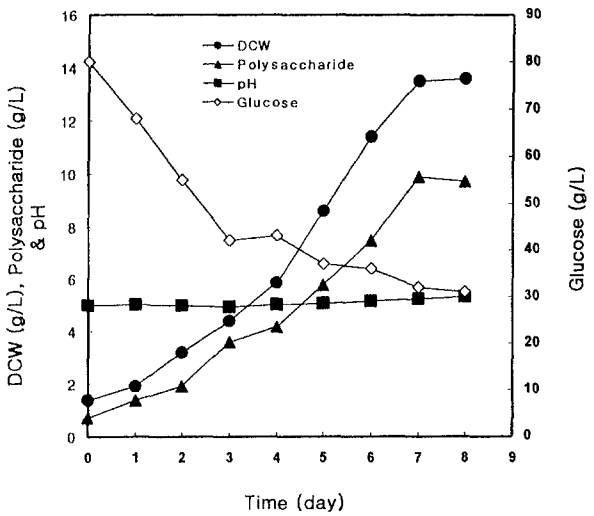


Fig. 36. Profiles of cell growth, glucose, pH and polysaccharide production with adding 2 g/L of glutamic acid(GA) at 4days in batch culture.

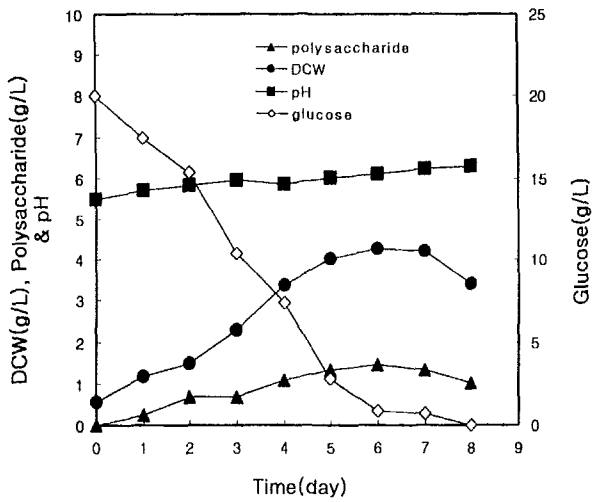


Fig. 37. Profiles of cell growth, glucose, pH and polysaccharide production on YMK medium in flask culture.

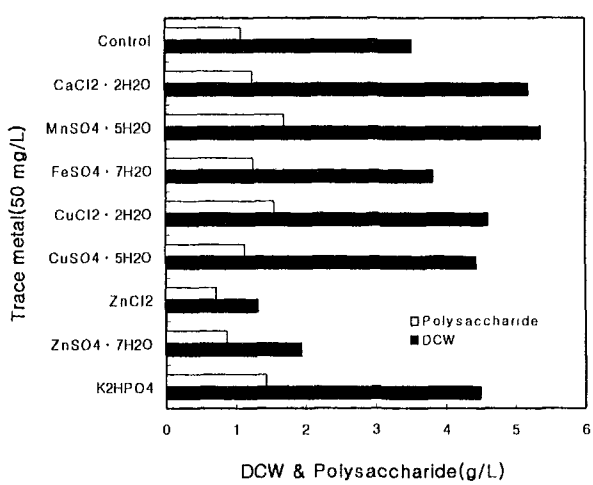


Fig. 38. Effects of trace metals (50 mg/L) on the cell growth and the polysaccharide production in YMK medium.

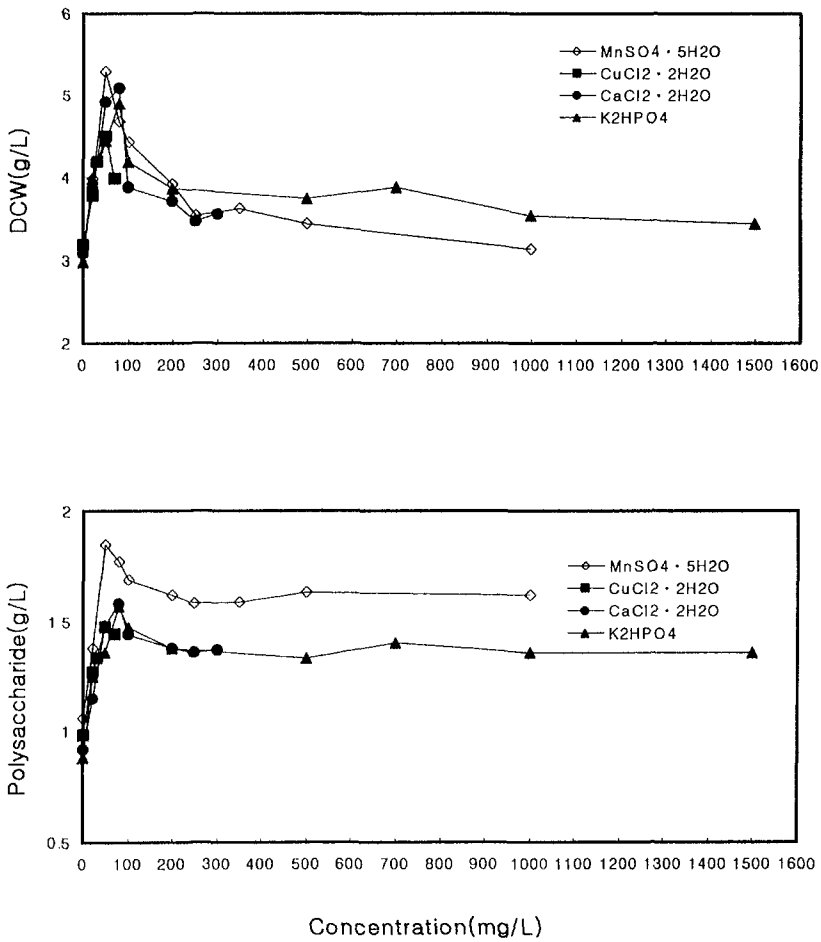


Fig. 39. Effects of trace metals on cell growth and polysaccharide production in YMK Medium.

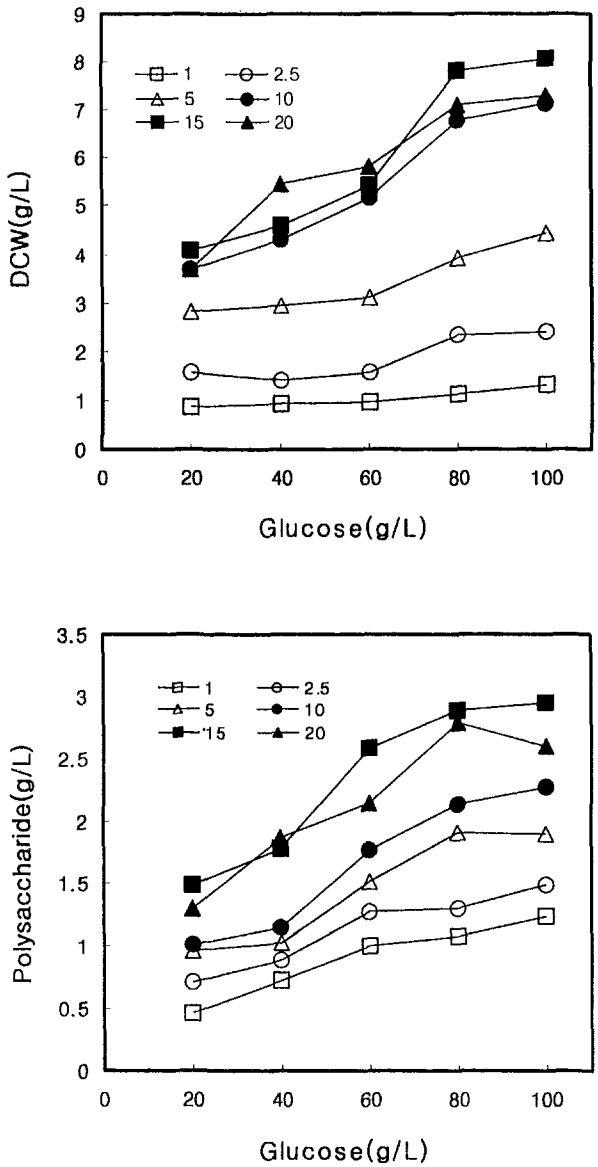


Fig. 40. Effects of glucose and yeast extract concentrations on cell growth and polysaccharide production in YMK medium

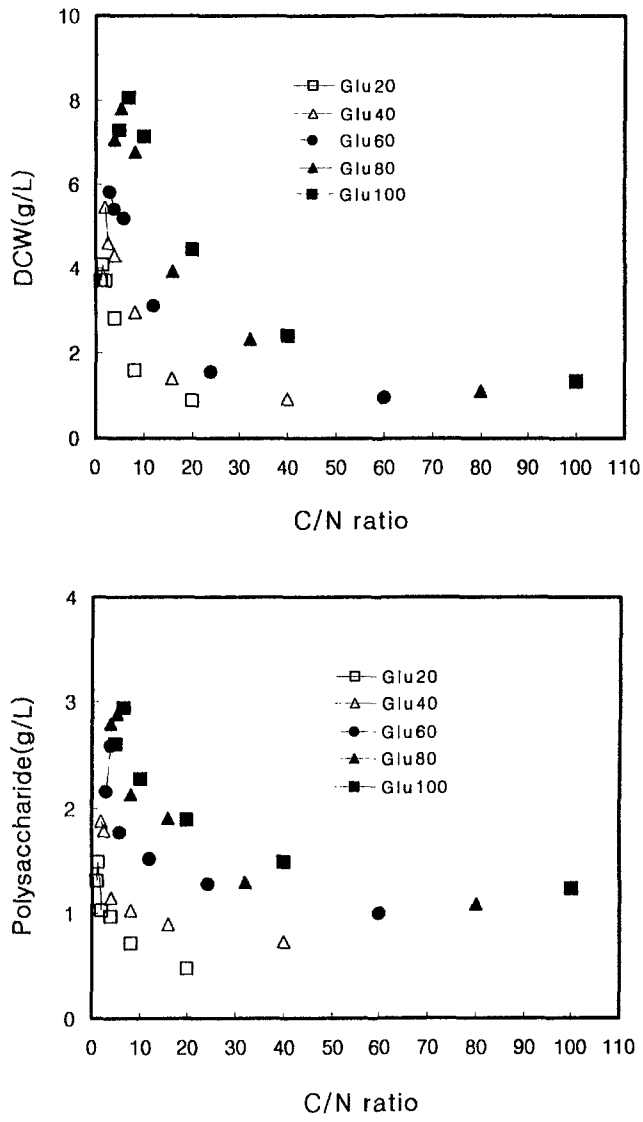


Fig. 41. Effects of C/N ratio on cell growth and polysaccharide production in YMK medium.

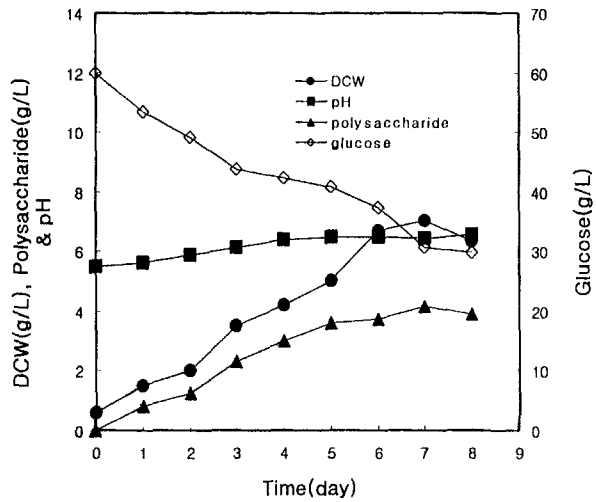


Fig. 42. The profiles of cell growth, glucose, pH and polysaccharide production with modified medium in flask culture.

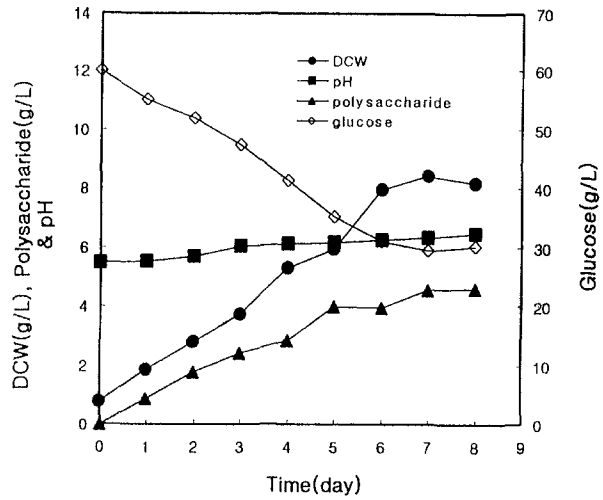


Fig. 43. The profiles of cell growth, glucose, pH and polysaccharide production with 50 rpm and 1.0 vvm

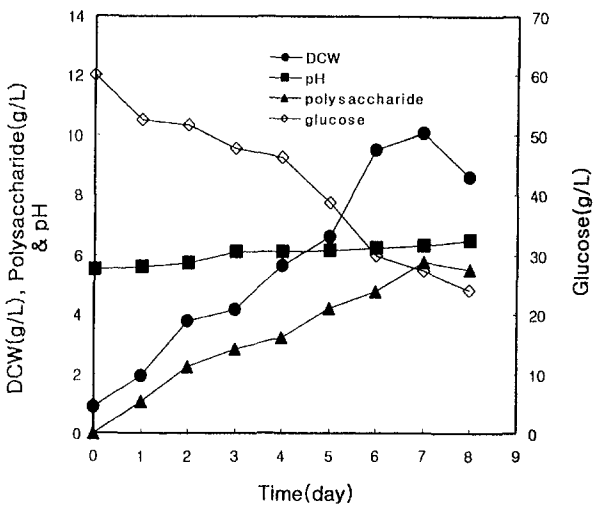


Fig. 44. The profiles of cell growth, glucose, pH and polysaccharide production with 50 rpm and 1.5vvm.

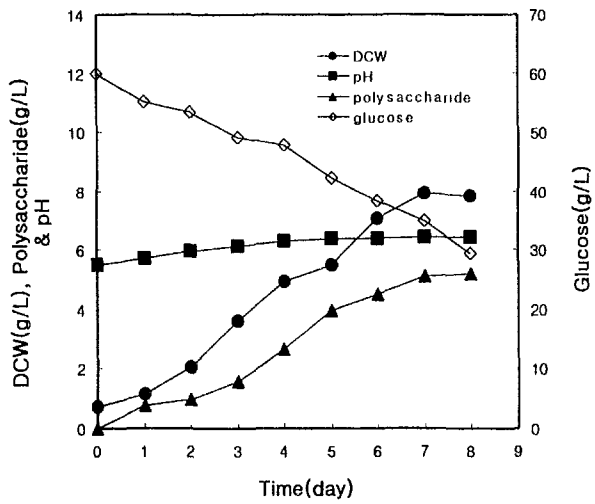


Fig. 45. The profiles of cell growth, glucose, pH and polysaccharide production with 100 rpm and 0.5 vvm

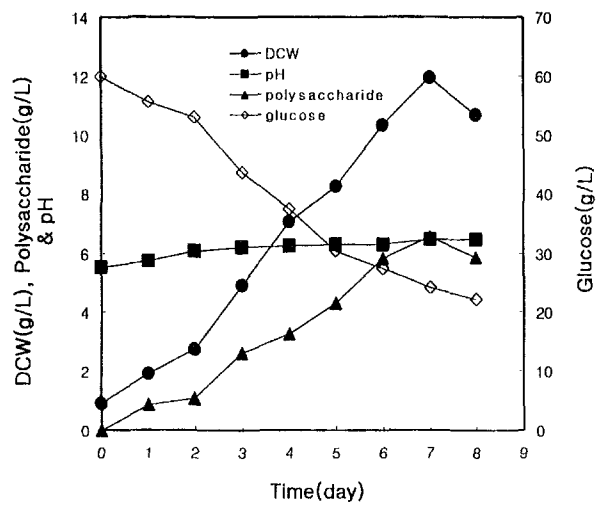


Fig. 46. The profiles of cell growth, glucose, pH and polysaccharide production with 100 rpm and 1.0 vvm

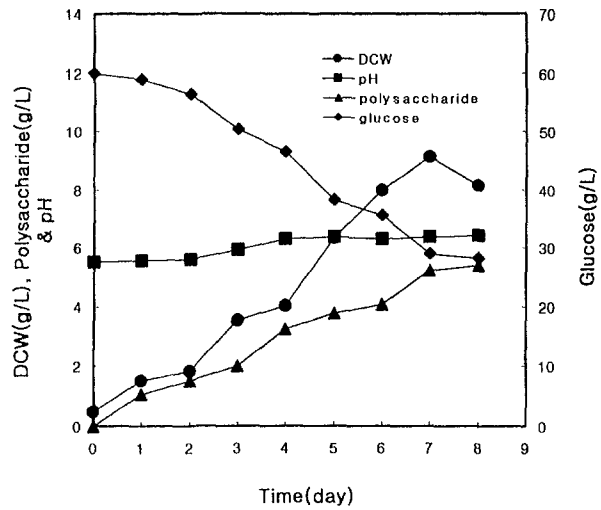


Fig. 47. The profiles of cell growth, glucose, pH and polysaccharide production with 100 rpm and 0.5 vvm.

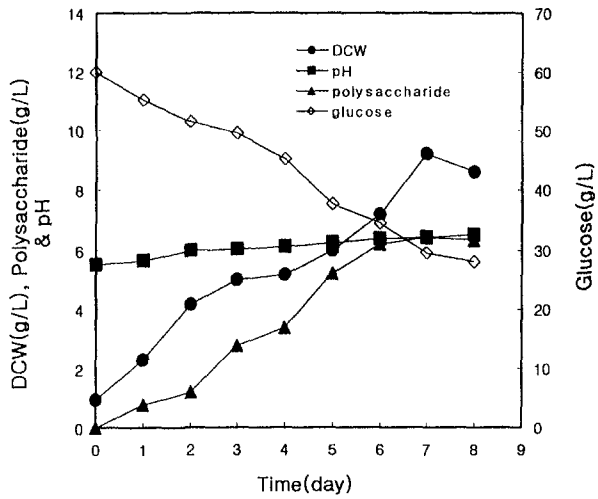


Fig. 48. The profiles of cell growth, glucose, pH and polysaccharide production with 200 rpm and 0.5 vvm

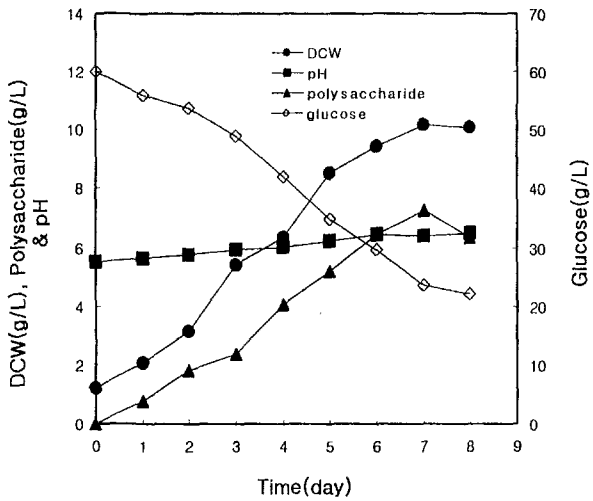


Fig. 49. The profiles of cell growth, glucose, pH and polysaccharide production with 200 rpm and 1 vvm

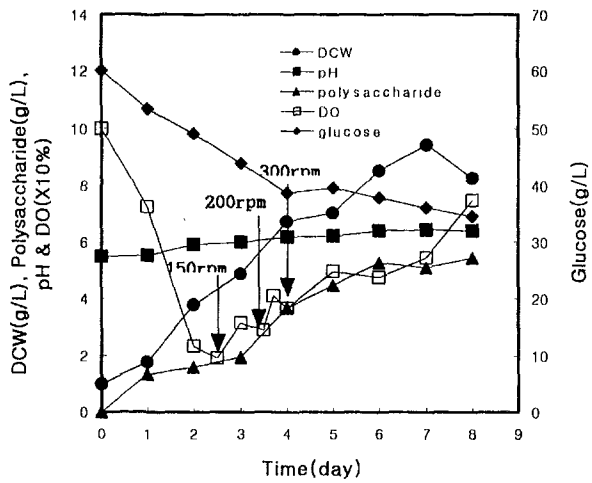


Fig. 50. The profiles of cell growth, glucose, pH and polysaccharide production under variation of agitation(100-300 rpm), and 1.0 vvm.

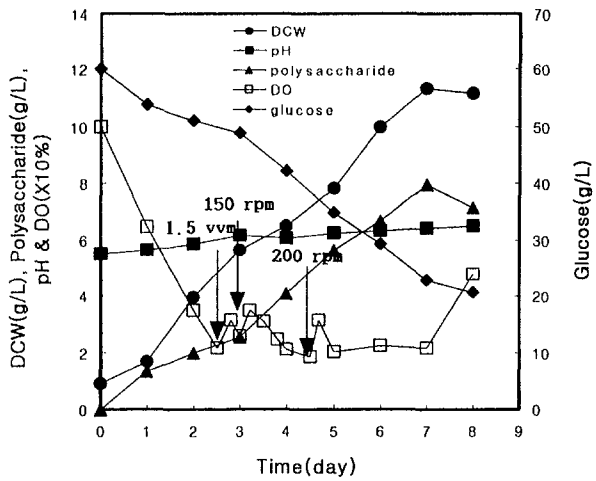


Fig. 51. The profiles of cell growth, glucose, pH and polysaccharide production under variation of agitation(100-200 rpm) and aeration(1-1.5 vvm)

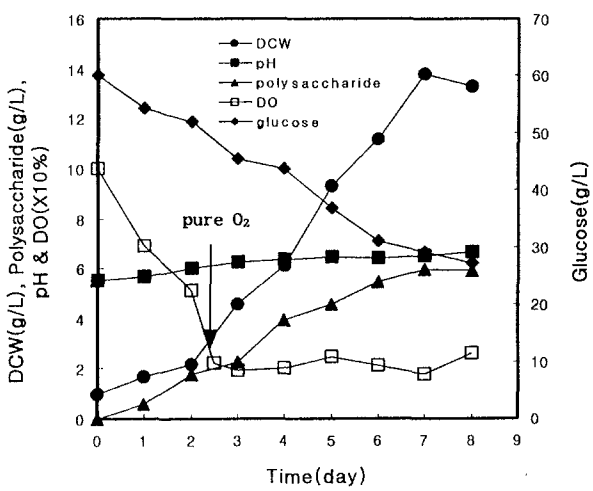


Fig. 52. The profiles of cell growth, glucose, pH and polysaccharide production with 100 rpm, 1 vvm (adding pure O_2).

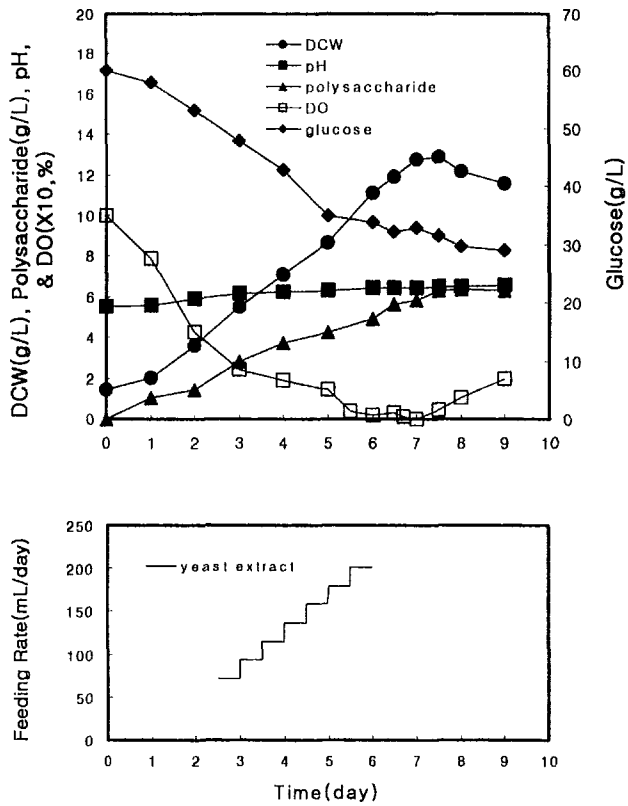


Fig. 53. The profiles of cell growth, glucose, pH, DO and polysaccharide production with linear-increase feeding rate(feeding medium : 20 g/L yeast extract)

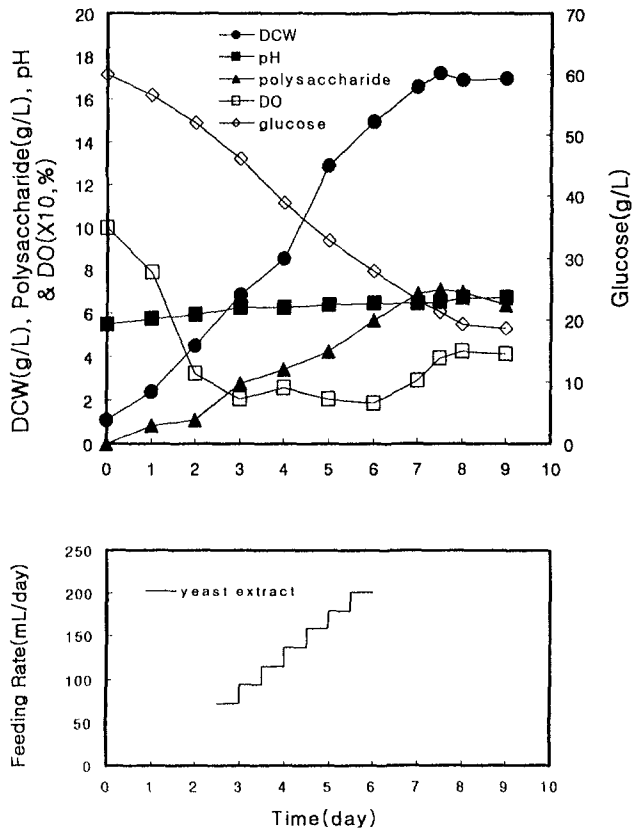


Fig. 54. The profiles of cell growth, glucose, pH, DO and polysaccharide production under the DO control (over 20%) with linear-increase feeding rate (feeding medium : 20 g/L yeast extract).

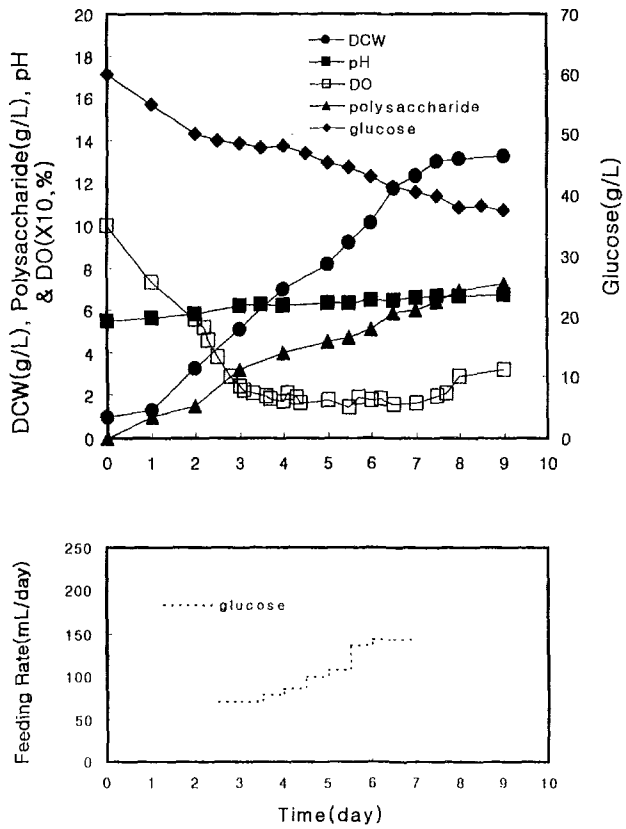


Fig. 55. The profiles of cell growth, glucose, pH, DO and polysaccharide production under the DO control (over 20%) with medium feeding (feeding medium: 80 g/L glucose).

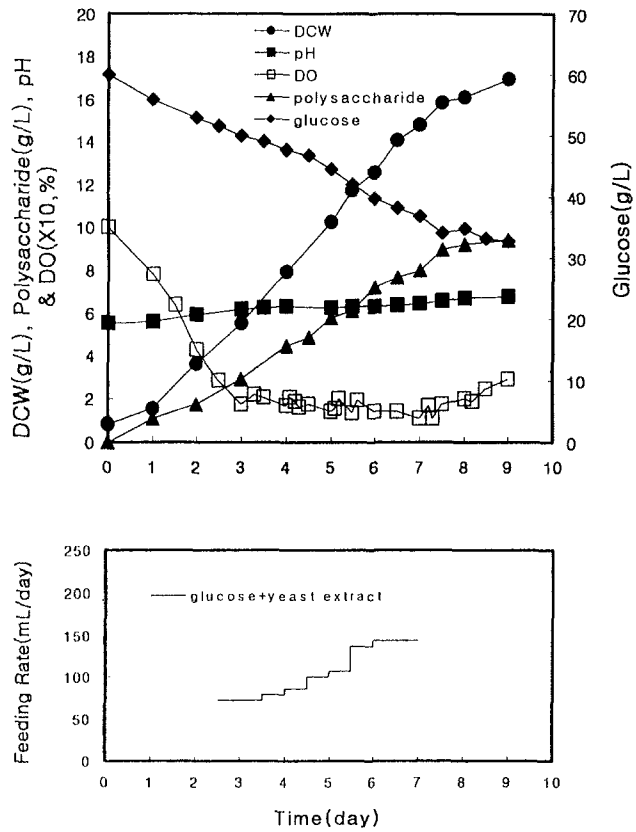


Fig. 56. The profiles of cell growth, glucose, pH, DO and polysaccharide production under the DO control (over 20%) with medium feeding (feeding medium : 80 g/L glucose and 20 g/L yeast extract)

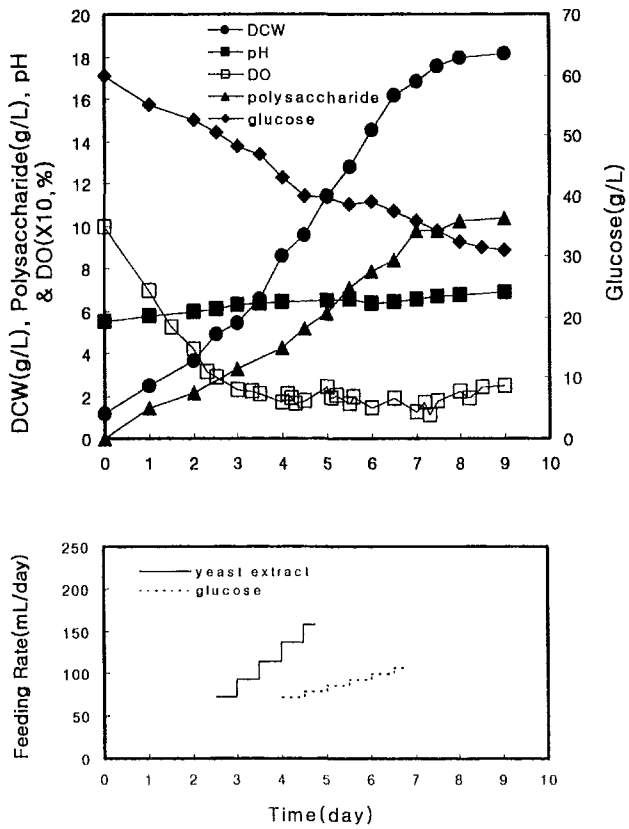


Fig. 57. The profiles of cell growth, glucose, pH, DO and polysaccharide production under the DO control (over 20 %) with linear-increase feeding rate (feeding medium : 500 mL of 80g/L glucose and 500 mL of 20 g/L yeast extract).

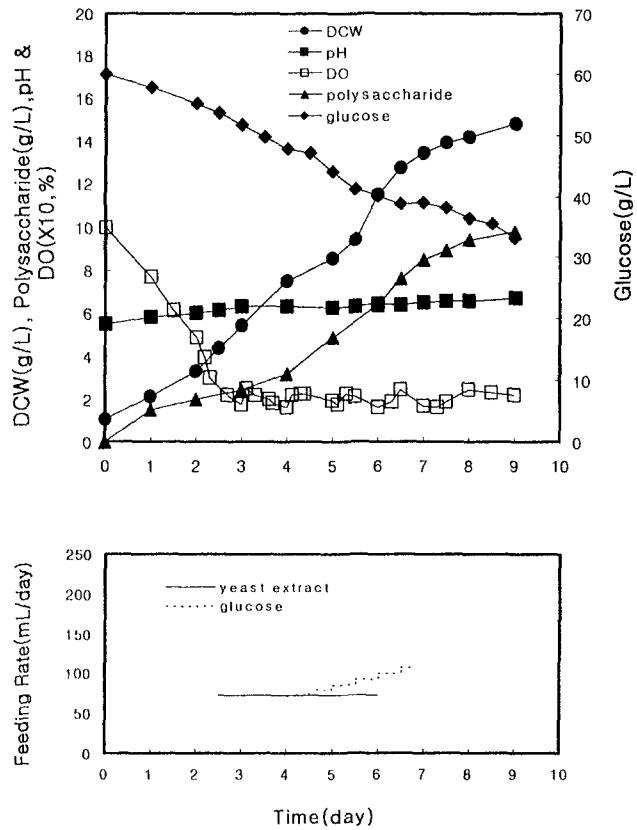


Fig. 58. The profiles of cell growth, glucose, pH, DO and polysaccharide production under the DO control (over 20%) with linear-increase feeding rate (feeding medium : 500 mL of 80 g/L glucose) and constant feeding rate(500 mL of 20 g/L yeast extract)

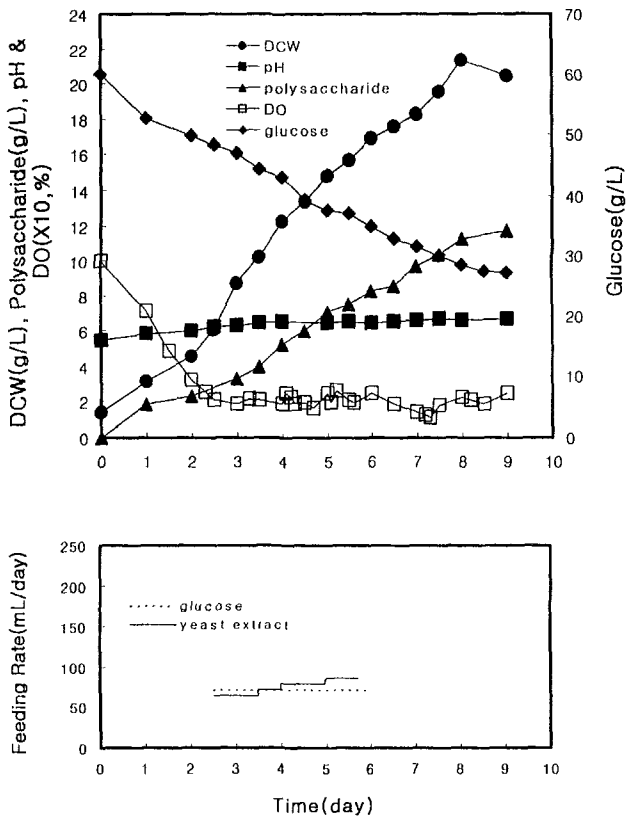


Fig. 59. The profiles of cell growth, glucose, pH, DO and polysaccharide production under the DO control (over 20%) with linear-increase feeding rate (feeding medium : 500 mL of 20 g/L yeast extract) and constant feeding rate(500 mL of 80 g/L glucose)

제 4 절 결 론

본 실험에서는 *Agaricus blazei*를 이용한 액체배양을 위해 버섯 균체의 최적 생육조건 및 다당체 생성 조건을 검토하기 위하여 최적 균체성장 및 다당체 생산을 위한 탄소원, 질소원, 무기염류, 아미노산등을 선별·최적농도를 검토하였고, C/N ratio를 검토하여 최적의 배지조성을 확립하였다. 또한 액체배양에 커다란 영향을 주는 온도, pH, 접종비 및 배양시간을 검토하여 최적 성장조건을 확립하였으며, 생물반응기를 이용한 회분배양을 통하여 통기량과 교반속도에 따른 균체성장 및 다당체 생산에 대한 촉진 및 저해요인을 검토하였다. 이상의 연구결과를 토대로 산업화에 맞는 경제성있는 배지에 대한 검토와 균체당 다당체 생성량을 기준으로 상업성에 맞는 최적 C/N ratio를 재검토하여 새로운 조성의 최적배지를 사용하여 생물반응기내에서의 균체성장과 다당체 생산을 위한 최적의 생물반응기 운전전략을 확립하였다. 그리고 균체량 및 다당체 생산을 향상 시키기 위해 교반속도, 통기량 및 용존산소에 따른 균체량 및 다당체 생산성에 대한 연구를 기초로 회분배양에서의 비증식속도와 균체수율 값으로 기질 소모속도를 예측하여 균체증식에 따라 공급배지의 조성과 공급속도에 변화를 주어 균체량과 다당체 생산의 극대화를 위한 유가배양을 수행하였다. 그 결과 flask배양에 있어 균체 및 다당체 생성을 위한 최적조건은 접종량을 5%로 하여 27℃, 150 rpm, 초기 pH 5.5에서 배양을 행하는 것이 최적임을 알 수 있었고 플라스크 배양결과 glucose 80 g/L, yeast extract 20 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 2 g/L, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 2 g/L의 최적 배지조성인 modified medium을 조성하였다. 그 결과 균체량은 9.7 g/L, polysaccharide 생성량은 7.9 g/L를 나타내었다.

다당체 생성을 증가시키고자 아미노산의 영향을 비교·검토하였고 그 결과 glutamic acid가 가장 좋은 결과를 나타내었으며 2 g/L의 glutamic acid를 배양 4일째인 대수증식기에 첨가하여 다당체 생성을 유도한 경우 배양 7일에 12.9 g/L의 균체량과 9.1 g/L의 다당체를 생성하였다. 그러나 이러한 결과는 아미노산을 배양초기에 첨가하였을 경우와 비교하여 볼 때 균체량은 다소 증가하였으나 다당체 생성량에 있어서는 거의 유사한 결과를 나타내었다.

생물반응기를 사용한 회분배양에서 다당체 생산을 위한 최적의 교반속도와 통기량은 균체량과 다당체 생성량에 있어서 각각 13.2 g/L, 9.2 g/L를 나타낸 200 rpm과 0.5 vvm 이었다. 또한 pH를 5.5로 일정하게 조절하여 배양할 경우 균체량과 다당체 생성에 있어서 12.9 g/L와 8.7 g/L를 나타내어 오히려 pH를 조절하지 않은 경우에 비해 상대적으로 낮은 값을 나타냈다. 플라스크 배양에서 얻은 결과인 2 g/L의 glutamic acid를 대수증식기인 배양 4일째에 첨가한 경우 균체량은 13.5 g/L, 다당체 생성량은 9.9 g/L를 생산량을 나타내었다.

또한 산업화에 경제성을 고려하여 yeast extract와 무기염류의 최적농도 결정하여 glucose 60 g/L, yeast extract 15 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/L, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.05 g/L의 optimum modified medium을 조성하였고 생물반응기를 이용한 회분배양에서 교반속도, 통기량, 용존산소 등의 물리적 요인을 검토하여 균사체와 다당체 생성을 위한 최적의 운전전략을 확립하였고, 이러한 결과를 토대로 고농도 세포배양을 위한 유가배양을 실시하여 유가배양 결과 최대 균체량과 다당체 생성량은 각각 21.4 g/L와 11.8 g/L로 가장 좋은 결과를 얻었다.

제 5 절 참고 문헌

1. Bae, M.-J., M.-H. Park, and J.-S. Lee (1996), Studies on immunomodulating function of components separated from higher fungi, *Kor. J. Mycol.*, 24(2), 142-148

2. Cho, S.-M., J.-H. Lee, S.-B. Han, H.-M. Kim, S.-H. Yu, and I.-D. Yoo (1995), Immuno-stimulating polysaccharides from the fruiting bodies of *Fomitella fraxinea*(I), *Kor. J. Mycol.*, 23(4), 332-339

3. Ahn, D.-K (1992), Medicinal fungi in korea, *Kor. J. Mycol.*, 20, 154-166

4. Lee, J.-W., C.-H. Chung, H. Jeong, and K.-H. Lee (1990), Anticomplementory and Antitumor Activities of the Alkali Extract from the mycelia of *Lentinus edodes* IY105, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.*, 18(6), 571-577

5. Sone, Y., R. Okuda, N. Wada, E. Kishida, and A. Misaki (1985), Structures and antitumor activities of the polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*, *Agric. Biol. Chem.*, 49, 2641-2653

6. Shin, M.-J. (1981), Studies on constituents and culture of the higher fungi of korea, *Kor. J. Mycol.*, 9(2), 49-66

7. Jung, I.-C., S.-H. Kim, Y.-I. Kwon, and J.-S. Lee (1996), Cultural condition for the mycelial growth of *Ganoderma lucidum* on cereals, *Kor. J. Mycol.*, 24(1), 81-88

8. Hwang, J.-S., J.-H. Ryu, G.-C. Gu, J.-Y. Kwak, S.-I. Kim, I.-C. Yoo, and K.-S. Song (1998), Structure elucidation of minor organic constituents from *Polyozellus multiflex*, *Kor. J. Mycol.*, 26(4), 519-524

9. Kraus, J., W. Blascheck, M. Schutz, and G. Franz (1992), Antitumor activity of cell wall β-1,3/1,6-glucans from *Phytophthora* species, *Planta Med.*, 58, 214-218

10. Sasaki, T. and N. Takasuka (1976), Further study of the structure of lentinan, an anti-tumor polysaccharide from *Lentinus edodes*, *Carbohydr. Res.*, 47, 99-104

11. Lee, J.-W., S.-K. Lee, and J.-H. Do (1995), Nutritional components of Korean *Auricularia polytricha*(Mont.) sacc. mushroom and changes in characteristics during rehydration, *Kor. J. Food Sci. Technol.*, **27**, 724-728

12. Jin, E.-H., D.-W. Lee, J.-M. Kim, and H.-M. Park (1995), Cloning of a gene involved in biosynthesis of β-1,3-glucan in *Saccharomyces cerevisiae*, *Kor. J. Mycol.*, 23(2), 129-138

13. Martinez, A.-T., A. Prieto, and A. Gutierrez (1996), Structural characterization of extracellullar polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*, *Carbohydr. Res.* 281, 143-154

14. Kitamura, S., T. Hori, K. Kurita, K. Takeo, C. Hara, W. Itoh, K. Tabata, and A. Elgsaeter (1994), An antitumor, branched (1-3)-β-D-glucan from a water extract of fruiting bodies of *Cryptoporus volvatus*, *Carbohydr. Res.* 263, 111-121

15. Kishida, E., Y. Sone, and A. Misaki (1992), Effects of branch distribution and chemical modifications of antitumor (1-3)-β-D-glucans, *Carbohydr. Polymers*, 17, 89-95

16. Perret, J., M. Bruneteau, and G. Michel (1992), Effect of growth conditions on the structure of (1-3)-β-D-glucans from *Phytophthora parastica* dastur, a phytopathogenic fungus, *Carbohydr. Polymers*, 17, 89-95

17. Ohno, N., Y. Adachi, I. Suzuki, K. Sato, S. Oikawa, and T. Yadomae (1986), Characterization of antitumor glucan obtained from liquid-cultured *Grifola frodosa*, *Chem. Pharm. Bull.*, 34(4),

1709-1715

18. Mizuno, T., K. Ohsawa, N. Hagiwara and R. Kuboyama (1986), Fractionation and Characterization of antitumor polysaccharides from *Maitake, Grifola frondosa, Chem. Pharm. Bull.*, 34(4), 1709-1715

18. Ueno, Y., M. Abe, R. Yamauchi, and, K. Kato (1980), Structure analysis of the alkali-soluble polysaccharide from the sclerotia of *Grifola umbellata*(Fr.) PILAT, *Carbohydr. Res.* 87, 257-264

19. Misaki, A., M. Nasu, Y. sone, E. Kishida, and C. Kinoshita (1986), Comparison of structure and antitumor activity of polysaccharides from *Fukurotake*, Fruiting body of *Volvariella volvacea, Agri. Biol. Chem.*, 50(9), 2171-2183

20. Yoshioka, Y., R. Tabeta, H. Saito, N. Uehara, and F. Fukuoka (1985), Antitumour polysaccharide from *P. ostreatus*(FR.) QUEL.: isolation and structure of a β-glucans, *Carbohydr. Res.*, 140, 93-100

21. Yamada, H., N. Kawaguchi, T. Ohmori, Y. Takeshita, S. Taneya, and T. Miyazaki (1984), Structure and antitumor activity of an alkali-soluble polysaccharide from *Cordyceps ophiolossoides*, *Carbohydr. Res.*, 125, 107-115

22. Lee, J.-H. (1994), Anti-tumor and immuno-stimulating activity of fungal polysaccharides, *The Microorganisms and Indusrtry*, 20, 14-21

23. Bohn, J. A. and N. J. Bemiller (1995), (1-3)-β-D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships, *Carbohydr. Polymers*, 28, 3-14

24. Misaki, A., K. Kawaguchi, H. Miyaji, H. Nagae, and T. Sasaki (1984), Structure of pestalotan, a highly branched (1-3)-β-D-glucan elaborated by *Pestalotia* sp. 815, and the enhancement of its antitumor activity by polyol modification of the side chains, *Carbohydr. Res.*, 129, 209-227

25. Misaki, A., M. Kakuta, T. Sasaki, M. Tanaka and H. Miyaji (1981), Studies on interrelation of structure and antitumor effects of polysaccharides : antitumor action of periodate modified, branched (1-3)-β-D-glucan of *Auricularia auricula-judae*, and other polysaccharides containing (1-3)-glucosidic linkages, *Carbohydr. Res.*, 92, 115-129

26. Misaki, A., Y. Sone, and M. Kakuta, (1978), Isolation and characterization of polysaccharides of "Kikurage," fruit body of *Auricularia auricula-judae*, *Agric. Biol. Chem.*, 42(2), 417-425

27. Chihara, G., T. Y. Maeda, and J. Hamuro (1982), Current status and perspectives of immunomodulators of microbial origin, *Int. J. Tiss. Reac.*, 4(3), 207-225

28. Tabata K., W. Ito, T. Kojima, S. Kawabata, and A. Misaki (1981), Ultrasonic degradation of Schizophyllan, an antitumor polysaccharide produced by *Schizophyllum commune* fries, *Carbohydr. Res.*, 89, 121-135

29. Yanaki, T., T. Norisuye, and H. Fujita (1980), Triple helix of a *Schizophyllum commune* polysaccharide in aqueous solution, *J. polymer Sci.*, 18, 547-557

30. Kojima, T., K. Tabata, W. Itoh, and T. Yanaki (1986), Molecular weight dependence of the antitumor activity of Schizophyllan, *Agri. Biol. Chem.*, 50(1), 231-232

31. Sasaki, T., N. Takasuka, G. Chihara, and Y. Y. Maeda (1976), Antitumor activity of degraded products of lentinan : its correlation with molecular weight, *Gann*, 67, 191-195

32. Hashimoto, T., N. Ohno, Y. Adachi, and T. Yadomae (1997), Nitric oxide synthesis in murine peritoneal macrophages by fungal β -glucans, *Biol. Pharm. Bull.*, 20(9), 1006-1009

33. Ohno, N., Y. Egawa, T. Hashimoto, Y. Adachi, and T. Yadamea (1996), Effect of β-glucans on the nitric oxide synthesis by peritoneal macrophage in mice, *Biol. Pharm. Bull.*, 19(4), 608-612

34. Konopski, Z., J. Fandrem, R. Seljelid, and T. Eskeland (1995), Interferon-γ inhibits endocytosis of soluble aminated β -1,3-D-glucan and neutral red in mouse peritoneal macrophage, *J. Interferon and Cytokine Reaserch*, 15. 597-603

35. Mizuno, T., H. Saito, T. Nishitoba, and H. Kawagishi (1995), Antitumor-active substances from mushrooms, *Food Rev. International*, 11(1), 23-26

36. Galli-Stampino, L., E. Meinjohanns, K. Frische, M. Meldal, T. Jensen, O. Werdelin, and S. Mouritsen (1997), T-cell recognition of Tumor associated cabohydrate : the nature of the glycan moiety a decisive role in determining glycopeptide immunogenicity, *Cancer Res.*, 57, 3214-3222

37. Ito, H., K. Shimura, H. Itoh, and M. Kawade (1997), Antitumor effects of a new polysaccharide-protein complex(ATOM) prepared from *Agaricus blazei* (Iwade Strain 101) "Himematsutake" and its mechanisms in tumor-bearing mice, *Anticancer Res.*, 17, 277-284

38. Itoh, H., H. Ito, H. Amano, and H. Noda (1994), Inhibitory action of a (1→6)-β-D-glucan-protein complex(FIII-2-b) isolated from *Agaricus blazei* Murill ("Himematsutake") on meth a fibrosarcoma-bearing mice and its antitumor mechanism, *Jpn. J. Pharmacol.*, 66, 265-271

39. Amanullash, A., B. Tuttiett, and A. W. Nienow (1997), Agitator speed and dissolved oxygen effect in xanthan fermentations, *Biotechnol. Bioeng.*, 57(2), 198-210

40. Lee, J.-H., H.-C. Lim, and Y.-H. Park (1998), Fed-batch cultures : basic theory and applications, *J. Biochem. eng.*, 12(2), 36-57

41. Shin, C.-S., C.-S. Bae, D.-S. Yang, and J.-W. Lee (1998), High-level production of recombinant therapeutic proteins in fed-batch culture at high cell concentration of *Saccharomyces cervisiae* and *Escherichia coli*, *J. Biochem. eng.*, 12(2), 14-35

42. Wang, I. C. and L. Xie. (1994), Fed-batch cultivation of animal cells using different medium design concepts and feeding strategies, *Biotechnol. Bioeng.*, 43, 892-898

43. Kim, J.-H., J.-H. Choi, S.-Y. Kim, and D.-K. Oh (1998), Optimization of culture conditions for production of a high viscosity polysaccharide, methylan, by *Methylobacterium*

organophilum from methanol, *Kor. J. Appl. Microbiol.* Biotechnol., 26(3), 244-249

44. Lo, Y.-M., S.-T. Yang, and D.-B. Min (1997), Effects of yeast extract and glucose on xanthan production and cell growth in batch culture of *Xanthomonas campestris*, *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 47, 689-694

제 4 장 생리활성물질 분리정제기술 개발

제 1 절 서 론

1. 배 경

질병의 치료 및 예방에 효과가 있는 천연물중 가장 주목받고 있는 버섯은 분류학상 균류(Fungi)중 진균류(Eumycetes)에 속하며 대부분은 담자균류(Basidiomycetes)의 일종으로, 일반적으로 단백질, 아미노산, 효소, 비타민, 무기염류, 지방질 및 당 등과 같이 인체에 중요한 각종 영양성분을 함유하고 있고, 광범위한 약리작용을 가지고 있어 전통적으로 민간의약제제로 널리 활용되어 왔다. 최근에는 여러 종류의 버섯들이 항암효과가 있음이 과학적으로 검증되었는데 항암효능을 나타내는 주요 성분은 버섯속에 함유되어 있는 다당체라고 밝혀져 있다. 이들은 기존의 합성 항암제와는 달리 직접 암세포에 작용하기보다는 숙주 매개성 면역활성화 기능을 보유하고 있어, 면역계와 관계있는 보체(complement) 및 macrophage를 활성화하여 암세포의 생물학적 반응을 변화시켜서 치료효과를 나타내므로 독성 및 부작용이 거의 없는 장점을 갖고 있다.

아가리쿠스버섯은 기존에 알려진 다른 버섯들과 비교하여 탁월한 항암효과를 가지고 있는 것으로 보고되어 있다. 일본의 동경대학교 약학대학에서 guinea pig를 대상으로 아가리쿠스 버섯의 항암효과를 실험한 결과가 보고되어 있는데, 실험결과 암완치율이 90%이고 항암효과를 나타낸 경우가 99.4%라는 놀라운 결과를 나타내었다. 이밖에도 많은 연구결과들이 아가리쿠스 버섯이 생체내에서 암세포의 변형, 증식, 재발생을 억제하는 역할을

하는 것을 보여주고 있다. 실제로 일본에서는 암환자들이 아가리쿠스버섯을 복용한 후에 치료효과를 보았다는 사례들이 많이 보고되어 있다. 이에 아가리쿠스 버섯에서 항암효과를 가지는 성분에 대한 연구가 이루어져 그 주요성분이 β-glucan인 것으로 밝혀졌는데 β-glucan은 glucose의 동종다당류로 분자량이 500,000~2,000,000 Dalton으로 알려져 있다. β-glucan의 여러 가지 효능에 대한 다양한 연구도 이루어져 있으며 연구결과 면역활성체, 항산화제, 생체조직 재생과 치유기능, 항균 및 항생제, 항바이러스 및 항기생충제의 기능 등을 가지고 있으며 대식세포를 만들어 돌연변이 세포를 인식하고 공격하여 파괴하는 항종양의 효과가 있는 것으로 보고되어 있다. 이와 같이 아가리쿠스 버섯의 성분 분석 및 항암 효과를 갖는 다당체에 대한 광범위한 연구가 이루어졌음에도 불구하고, 자실체로부터 다당체의 효과적 분리, 정제를 위한 연구는 전무한 형편이어서 분리, 정제는 고전적인 열수추출방법에 의존하고 있다. 따라서 본 연구에서는 아가리쿠스 버섯에서 생리활성물질을 추출, 정제하는 보편적 방법인 열수추출법을 이용한 분리, 정제 공정을 제안하고, 제안된 공정의 여러 가지 운전변수를 이용하여 분리, 정제 효율을 최대화함으로써 최적화된 분리, 정제 공정을 개발하고자 한다.

2. 분리·정제 전략

본 연구에서는 버섯에서 생리활성물질을 추출 분리하는 공정과 정제 공정을 결합하여 생리활성물질 추출, 분리, 정제 공정을 Fig. 1과 같이 수립하였다. 아가리쿠스 버섯에서 엑기스를 추출하기 위하여 건조된 버섯을 증류수에서 가열하여 환류추출을 수행하고, 여과법을 이용하여 추출액을 고형분과 분리했고, 투석법으로 저분자 불순물을 제거하였고, 원심분리법

으로 추출액의 미세크기의 고형분을 분리하였다. 추출액의 3배 부피의 에틸알코올을 넣어서 알코올에 용해되지않는 침전물을 생성시키고 분리정제된 추출액을 건조하여 분말형태의 생성물을 얻었다. 이온크로마토그래피법으로 산성분획물과 중성분획물을 분리하고 젤크로마토그래피법을 이용하여 분자량별로 분리하였다. 분리 생성된 각각의 생성물들을 NMR, IR, UV spectrophotometer를 이용하여 정성적으로 분석하였다.

제안된 열수추출 분리, 정제 공정을 최소비용과 시간으로 최대의 수율을 얻을 수 있도록 최적화함으로써 경제성의 향상을 도모하였다. 분리수율 변화요인으로는 추출온도, 추출용매, 추출시간, 침전용매선택, 침전용매량, 투석시간 등을 선택하였다. 모든 실험에서 동결건조된 아가리쿠스버섯 자실체는 10 g, 증류수는 500 mL를 사용하였고, 각 공정변수를 최적화하기 위해 다른 공정변수들을 일정하게 한 후 실험을 수행하였다. 최적 추출온도를 결정하기 위하여 65℃, 80℃, 95℃에서 6시간동안 열수추출하여 수율을 비교하였다. 추출시간은 95℃에서 4, 6, 8, 10, 12시간의 가열을 수행하였으며 침전용매량은 에탄올(95%)을 추출액의 2, 3, 4, 5배량으로 변화시켰으며 이중에서 최적 추출시간과 침전용매량을 결정하였다. 또한 투석시간의 최적화를 위하여 0, 1, 3, 5, 7, 9일의 투석시간 중에서 최적시간을 결정하였다. 버섯의 갓과 대의 생리활성물질 함유량을 비교하기 위해서 갓과 대를 분리하여 각각 추출, 정제하여 수율을 비교하였다. 열수추출과 다른 추출방법과의 추출수율 및 추출물질의 특성 분석을 위하여 마이크로웨이브를 이용한 추출과 초임계 유체를 이용한 추출공정을 수행하였다. 마이크로 웨이브를 이용한 추출방법은 마이크로웨이브 발생장치로 일본 Zorirushi사의 ES-D105를 사용하였으며, 출력값으로는 200, 500, 650 Watt를 이용하였다. 이물질이 제거되어 분쇄된 아가리쿠스 버섯 시료는 Teflon vessel (MARS X, CEM사, USA) 반응기에 넣어 마이크로웨이브를 이

용한 추출을 하였으며 추출공정의 변수로 추출시간과 출력세기를 이용하였다. 증기가 출력관을 통해 대기로 발산하는 상태인 개방상태와 출력관을 밀폐시켜 증기가 발산되지 않도록한 밀폐상태에서 각각 실험하여 비교하였다. 열린 상태와 닫힌 상태에서 마이크로웨이브 조사시간을 30, 40, 50, 60, 70 분으로 하여 최적 추출시간을 결정하였으며 최적 applied power는 200, 500, 650 watt로 선정하였다.

초임계 유체추출공정은 아가리쿠스 버섯에서 비극성 유용물질을 분리하기위해 본 연구에서 이용되었다. 열수추출이나 마이크로웨이브를 이용한 추출에 의해 생산된 성분은 극성을 가지는 탄수화물이 대부분을 이루고 있다. 하지만 생리활성을 가지는 비극성 유용물질도 아가리쿠스 버섯에는 포함되어 있을 가능성이 있으므로 초임계 유체추출법을 이용하여 이를 분리하여 정성 및 정량 분석을 수행하고자 한다. 초임계 유체추출법은 온도와 압력의 운전변수에 의하여 추출수율이 달라지므로 40℃, 50℃, 60℃의 온도와 150, 200, 250 Kg/cm^2의 압력에서 최적 운전조건을 결정하였다. 온도와 압력은 CO_2 유체의 초임계 온도와 압력인 32.2℃와 73.8 Kg/cm^2 이상을 이용하였다. 초임계 유체추출공정은 아가리쿠스 버섯 10 g을 분쇄한 후 불순물을 제거하고 다양한 온도와 압력하에서 추출수율을 비교하였다. 추출시간은 6시간으로 통일하였으며 추출된 성분은 에탄올에 용해시켜 냉장보관시킨 후 GC-MS를 이용하여 정성 및 정량 분석을 수행하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 열수추출

가. 조다당체(crude polysaccharide)의 추출, 분리

동결 건조한 아가리쿠스 버섯 50 g은 막자사발을 이용하여 3-5 mm의 균일한 크기를 갖도록 분쇄한 후 증류수에 넣어 500 mL로 만든 후 65, 80, 95℃에서 4~10시간 동안 열수추출을 수행하였다. 추출액의 분리를 위하여 여과지(Whatman No. 1 filter paper,USA)를 이용하여 여과후 여과액을 evaporator로 50 mL까지 농축한 후 2-5배량의 에탄올(순도 95%이상)을 넣고 4℃에서 24시간동안 침전 대기하였다. 원심분리를 통하여 상등액을 제거하고 침전물을 분리하여 소량의 증류수로 침전물을 녹인 후 dialysis tube(MWCO: 12,000 Da)에 넣고 3일간 투석을 실시하였다. 투석후 침전물을 여과하여 제거하고 동결건조하여 조다당체(CR.PS)를 최종적으로 분리하였다.

나. 중성다당체와 산성다당체의 분리

1.5 g의 조다당체(CR.PS)를 20 mL의 deionized distilled water(DDW)에 용해시켜 원심분리하여 고형분을 DEAE cellulose resin이 충진된 ion chromatography column에 적용시켜 DDW를 전개용매로 하여 용출하였다. 흡착되지 않는 용출액을 동결건조하여 중성다당체(ion chromatography neutral fraction; IN)를 분리하였다. Column에 흡착된 성분을 분리하기 위하여 0-2M NaCl수용액을 전개용매로 사용하여 용출하였고 용출액에 포함된 NaCl을 제거하기 위하여 용출액을 dialysis tube(MWCO: 12,000 Da)에

넣고 4일간 투석한 후 동결건조하여 산성다당체(ion chromatography acidic fraction; IA)를 분리하였다.

다. 고분자다당체와 저분자다당체의 분리 및 분자량 결정

고분자량의 다당체(gel chromatography high molecular weight fraction; GH)와 저분자량의 다당체(gel chromatography low molecular weight fraction; GL)를 분리하고 분자량을 결정하기 위해서 gel filtration법을 이용하였다. Gel filtration 충진물로는 Sepharose CL-4B(detection range of molecular weight: $10^4 \sim 10^7$)를 사용하였다. 측정은 분자량을 알고 있는 standard dextran인 D-375(MW 3.75×10^4), D-4650(MW 4.65×10^5), blue dextran(MW 2.00×10^6)을 각각 500 mg씩 0.01M sodium phosphate buffer solution(pH 6.4)에 용해시켜 gel filtration column에 전개하였다. 용출 유속은 2 mL/min이고, 5 mL/fraction으로 auto fraction collector를 setting하여 용출하였다. 각 fraction은 sulfuric acid로 가수분해하여 phenol을 발색시약으로 하는 phenol-sulfuric acid법으로 처리한 후, 각 fraction을 490 nm에서 흡광도를 측정하였고, 측정된 흡광도를 이용하여 표준 분자량 측정곡선을 작성하였다. 조다당체에서 ion chromatography column을 통해 분리된 중성다당체(IN) 500 mg을 0.01M sodium phosphate buffer solution(pH 6.4)에 용해시켜서 gel filtration column에 standard dextran과 같은 방법으로 전개하였다. 용출된 각 fraction은 phenol-sulfuric acid 법으로 490nm에서 흡광도를 측정하여 다당류의 농도를 정량화하였다. 분리된 GH와 GL의 체류시간을 표준 dextran의 체류시간과 비교하여 GH, GL의 분자량을 계산하였다.

라. 탄수화물과 단백질 양 측정

아가리쿠스 버섯은 건조질량기준으로 탄수화물 38-45%, 단백질 40-45%, 섬유질 6-8%, 재 5-7%, 지방 3-4%로 이루어져 있다고 알려져 있다. 탄수화물과 단백질이 80% 이상으로 대부분으로 추출, 분리공정으로 얻은 물질(CR.PS, IN, IA, GH, GL)에 함유된 탄수화물과 단백질의 양을 정량분석을 통하여 확인하였다. 탄수화물은 glucose를 표준 탄수화물로 사용하여 phenol-sulfuric acid법으로 정량적으로 분석하였고, 단백질은 bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 Bradford 시약으로 발색 반응하는 Bradford법으로 정량 분석하였다.

마. 단당류 분석의 전처리 및 분석장치

추출된 물질의 단당류 분석을 위하여 추출물질(CR.PS, IN, IA, GH, GL) 1 mg을 2M TFA(Trifluore acetic acid)에 넣고 100℃에서 2시간동안 가수분해시킨다. Evaporator를 이용하여 TFA를 제거하고, 다시 증류수로 녹인 후 evaporator를 이용하여 TFA를 완전히 제거한다. 처리된 추출물질에 1 mL의 증류수를 넣고 15,000 rpm 에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 10배 희석하여 10 ㎕를 HPLC system를 이용하여 주입하여 분석하였다. HPLC system은 Bio-LC DX-300 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA)에 검출기로 PED2 with integrated amperometer를 이용하여, AI-450 on-line software로 데이터 분석을 수행하였다. 칼럼은 CarboPac PA1(4.5×250mm, Dionex, Sunnyvale, CA, USA)을 사용하였다.

바. ^{1}H, ^{13}C-NMR 및 FT-IR 분석

추출물질(CR.PS, IN, IA, GH, GL)의 구조 분석을 위하여 D_2O를 용매로 사용하여 ^{1}H, ^{13}C-NMR(Varian, Unity-inova 500) 분석을 수행하였다. 또

한 작용기의 확인을 위하여 KBr disc method로 FT-IR(Magna-IR 560) 분석을 하였다. 느타리버섯에서 추출한 β-glucan을 Sigma Chemical Co.(USA)에서 구입하여 FT-IR spectrum을 확인하고 추출한 물질의 FT-IR spectrum과 비교하였다.

사. 공정 최적화

본 연구에서는 아가리쿠스 버섯 자실체에서 생리활성물질을 분리, 정제하는 방법으로 열수추출, 여과, 용매침전, 투석, 건조 등의 공정으로 조다당체(CR.PS)를 추출하였고, CR.PS를 이온크로마토그래피법으로 중성다당체(IN)와 산성다당체(IA)로 분리하였으며, 겔크로마토그래피법으로 고분자다당체(GH)와 저분자다당체(GL)로 분리하였다. 이상의 연속적 공정중에서 분리, 정제 수율의 향상을 위하여 유용한 추출공정의 최적화를 통하여 분리수율의 향상을 도모하였다. 분리 수율 향상을 위하여 추출공정의 운전변수인 추출온도, 추출용매량, 추출시간, 침전용매선택, 침전용매량, 투석시간 등의 최적화 실험을 수행하였다. 각 공정운전변수를 최적화하기 위하여 다른 공정변수들을 일정하게 유지한 상태에서 특정 공정변수만을 최적화하는 방법을 사용하였으며 기본 운전조건으로는 추출온도 80℃, 추출시간 6시간, 추출대상의 2배의 추출용매량, 투석시간 3일을 사용하였다.

2. 마이크로웨이브를 이용한 추출

아가리쿠스 버섯 자실체는 이물질 제거를 위하여 메탄올로 세척한 후 막자사발을 이용하여 3~5 ㎜의 크기로 분쇄하여 사용하였다. 각각의 다당류 추출실험은 자실체 10 g을 증류수에 넣어 총부피를 500 mL로 하여 수행하였다. 마이크로웨이브 조사를 위한 반응기의 부피는 100 mL 정도이므로

각각의 실험은 50 mL씩 10번에 나누어 동일 조건하에서 수행하였다.

마이크로웨이브 조사는 반응기를 개방한 상태와 밀폐한 상태로 각각 수행하였으며, 이로부터 개방된 상태와 밀폐된 상태의 추출실험에서의 추출 수율과 추출 성분의 차이를 분석하였다. 개방된 상태란 반응기에서 rupture membrane을 통하여 나오는 vent tube를 개방하여 증기가 외부로 발산되는 상태를 말하며, 밀폐된 상태란 rupture membrane을 통해서 나오는 vent tube를 밀폐시켜 외부로 증기가 발산되지 않는 상태를 말한다.

마이크로웨이브를 이용한 추출 조작후, 여과지(Whatman No. 1 filter paper, USA)를 이용하여 여과하여, 여액을 상온에서 6시간 냉각시킨 후 여액부피 두배의 아세톤과 혼합하여 4℃에서 24시간동안 방치하였다. 방치후 침전물의 형성을 육안으로 확인하였으며, 침전물의 분리를 위해 증발기를 이용하여 액체성분을 증발시켰다. 얻어진 침전물은 약간의 증류수와 혼합하여 삼투압필터를 이용하여 48시간동안 투석시켰으며, 투석으로 얻은 생성물을 7일간 동결 건조하여 최종 생성물을 얻었다.

추출실험으로부터 얻은 최종생성물의 수율을 계산하였으며, infrared spectroscopy(IR) 분석을 통하여 나타난 피크값으로부터 각 성분의 농도를 측정하였으며, nuclear magnetic resonance spectroscopy(NMR) 분석을 통하여 최종생성물의 구조를 분석하였다.

3. 초임계유체추출법을 이용한 분리

가. 초임계 유체 추출공정의 운전조건

아가리쿠스 버섯 10 g을 1~3cm정도로 분쇄한 후 불순물의 제거를 위하여 메탄올 또는 아세톤으로 세척하였다. 세척된 자실체를 vessel속에 넣고 vessel내의 온도를 40℃에서 60℃까지 10℃간격으로 조절하였다. 정해

진 온도범위내에서 압력을 변화시키며 추출되는 성분의 추출 효율을 비교하였다. 모든 실험에서 추출시간은 6시간으로 동일하게 유지하였다. 추출된 성분은 에탄올에 용해시켜 분석전까지 냉장 보관하였다.

초임계 유체추출법은 운전조건인 온도와 압력의 변화에 의하여 추출되는 성분의 변화나 추출 효율의 변화가 일어나므로 추출 효율을 최대화할 수 있는 최적 운전조건의 결정이 필요하다. 따라서, 초임계 유체추출공정의 운전변수로 온도와 압력을 이용하여 최적 운전조건을 결정하였으며, 이산화탄소의 초임계 온도가 31.1℃이므로 온도를 40℃, 50℃, 60℃에서 변화시키며 추출물질의 추출 효율을 비교하였다. 또한 이산화탄소의 초임계 압력은 73.8 Kg_f/cm^2이므로 추출 압력을 150 Kg_f/cm^2, 200 Kg_f/cm^2, 250 Kg_f/cm^2으로 변화시키며 생성된 추출물질의 추출 효율을 비교하였다.

나. 추출물질의 성분 분석

추출물질은 기초과학지원연구소의 gas chromatography-mass spectrometer (HP 6890 GC/HP 5973 MSD, Hewlett Packard, USA)를 이용하여 정성적으로 분석하였다. 분석결과 얻어진 추정 물질인 linoleic acid를 Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA)에서 구입하여 표준검량곡선을 작성하여 추출물질의 정량적 분석을 하였으며 이를 통해 추출 효율을 분석하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

본 연구과제는 *Agaricus blazei* Murill 버섯(아가리쿠스버섯)에서 생리활성물질을 분리, 정제하기 위한 최적화된 공정을 개발하기 위한 것으로 추출공정을 열수추출, 마이크로웨이브를 이용한 추출, 초임계유체를 이용한 추출공정에 대한 최적화가 수행되었다.

1. 분리정제기술 개발

가. 자실체로부터 생리활성물질 분리정제 기술 개발

아가리쿠스 버섯에서 생리활성물질의 분리, 정제에 관한 연구는 유사 물질로부터 생리활성물질을 분리정제하는 연구 논문들과 관련 서적들을 참고로 하여 분리정제 공정을 수립하였다. 버섯에서 항암활성 다당류를 얻는 방법에는 고체배양에 의해 생산된 버섯 자실체로부터 유기용매를 이용하여 추출하여 얻는 방법과 액체배양에 의해 배양된 균사체나 배양여액으로부터 유용물질을 추출, 분리하여 얻는 방법의 두가지가 알려지고 있다. 액체 배양에 의한 경우에 있어서는 항상 일정한 조건하에서 배양이 가능하여 균일한 균사체 및 배양액을 얻을 수 있으며 원하는 유용물질의 획득이 매우 간단하다는 장점을 갖고 있다. 분리, 정제에 실험적으로 이용될 수 있는 공정은 용매추출, 여과법, 원심분리법, 투석법, 침전법, 동결건조, 이온 크로마토그래피법, 겔 크로마토그래피법 등이 있다.

수립된 분리, 정제 공정의 개괄은 다음과 같다. 본 실험에서는 기존의 버섯에서 활성물질 추출공정과 각종 분리, 정제공정을 결합하여 아가리쿠스 버섯에서 생리활성물질의 분리정제공정을 수립하였다. 엑기스를 추출

하기 위하여 건조된 버섯을 증류수에서 가열하여 환류추출을 수행하고, 여과법을 이용하여 추출액을 고형분과 분리했고, 투석법으로 저분자 불순물을 제거하였고, 원심분리법으로 추출액의 미세크기의 고형분을 분리했고, 추출액의 3배 부피의 에틸알코올을 넣어서 알코올에 녹지 않는 침전물을 생성시켰으며, 동결건조법으로 생성된 분리정제한 추출액을 건조하여서 분말형태의 products를 만들었으며, 이온 크로마토그래피법을 이용하여 산성 분획물과 중성 분획물을 얻었으며, 겔 크로마토그래피법을 이용하여 분자크기별로 분리하였다. 분리하여 생산된 각각의 product들을 NMR, IR, UV spectrum으로 분자구조를 분석했다.

동결건조된 아가리쿠스 버섯 자실체 50 g을 열수추출한 후 에탄올에 의한 침전과 저분자 불순물 제거를 위한 투석공정을 거쳐 동결건조하여 조다당체(CR.PS) 1.5 g을 생성하여 3%의 수율을 나타내었다. 이것은 ion chromatography법을 이용하여 중성다당체(IN) 0.51 g과 산성다당체(IA) 0.75 g으로 분리되었다. 또한 분자량 측정과 고분자량 다당체(GH)와 저분자량 다당체(GL)를 분리하기 위하여 gel filtration chromatography법을 이용하였다. IN 0.8 g에서 고분자량 다당체 0.20 g과 저분자량 다당체 0.31 g을 분리하였다(Fig. 1).

1) Extraction and separation of CR.PS

- 건조된 버섯 50g을 에틸알콜(EtOH)로 깨끗이 씻은 후 건조기에 건조한다.
- 버섯을 잘게 자른 후 2000mL의 둥근 플라스크에 1000mL의 증류수와 함께 넣고 90℃ 수조에 둥근 플라스크를 넣어 8시간 동안 교반하면서 환류 추출을 하였다.
- 추출액을 filtrate한 후에 800mL 증류수를 넣고 다시 4시간 동안 환

류 추출하고 추출액을 filtrate 했다.

- 추출액을 2500rpm으로 원심분리하여 고형분을 완전히 제거했다.
- 원심분리한 추출액을 증발기로 1/2정도의 water 성분을 제거하여 농축한다.
- 농축액에 3배양의 95% EtOH을 넣고 4℃에서 48시간 동안 침전을 기다렸다.
- 용액중에 황색 침전물이 생성되었고, 상등액을 제거하고 남은 침전물에서 EtOH을 제거하기 위해서 evaporator를 사용했다.
- 침전물을 증류수로 녹인 후에 침전물내에 있는 저분자 불순물을 제거하기 위해서 molecular cut off가 12,000인 dialysis tube에 넣고 dialysis를 2일동안 했다.
- Dialysis tube 내에 침전이 생기는데 이 침전물은 버리고 상등액을 취하여 3일동안 동결건조를 한다.
- 동결건조하여서 생성된 crude polysaccharide (CR.PS)는 1.5 g의 진한 갈색 분말을 생성했다.

2) Purification of the water soluble fraction(CR.PS).

- CR.PS 1.5 g을 50 mL의 증류수에 녹인 후 2500 rpm에서 원심분리하여 고형분을 제거하였다.
- 한편 sigma에서 구입한 ion chromatography 충진물인 DEAE (Diethyl aminoethylene) cellulose resin을 Cl^-로 처리한다.

  * 충진물의 Cl^-처리.

    ⓐ 0.4N HCl 400 mL을 넣고 10분 동안 교반하고 액을 버린다.

    ⓑ 2차 증류수 400 mL을 넣고 10분 동안 교반하고 액을 버린다.

    ⓒ 0.4N NaOH 400 mL을 넣고 10분 동안 교반하고 액을 버린다.

ⓐ → ⓑ →ⓒ → ⓑ → ⓐ → ⓑ → ⓒ → ⓑ → ⓐ 의 순서대로 해서 충진물 처리를 한다.

- Cl^- 로 처리한 DEAE cellulose resin을 column(2.5X100cm)에 충진한다.
- 원심분리한 상등액을 column에 용출한 후 용리액인 DDW(deionized distilled water) 500 mL를 70 mL/hr 유속으로 충진물에 흡착되지 않는 중성분획물(IN)을 받았다.
- Auto sampler fraction collector를 5 min/fraction으로 작동시켜 각 fraction을 받았다.
- 흡착된 산성분획물(IA)을 얻기 위해서 2M NaCl 수용액 500 mL를 65 mL/hr 유속으로 용출했다.
- 중성분획물(IN)과 산성분획물(IA)의 각 fractions을 UV(625nm) spectrum의 absorbance를 측정했다.
- 산성분획물(IA)에 포함된 NaCl을 제거하기 위해서 dialysis를 3일 동안 했다.
- 중성분획물(IN)과 산성분획물(IA)을 동결 건조하여 각각 0.51g과 0.75 g의 분말 products를 얻었다(Fig.2).

3) Molecular weight determination of the antitumor fractions

- 생성된 분획물의 분자량을 결정하기 위해서 gel chromatography 법을 이용했다.
- 분자량이 이미 알려진 dextran(MW 464,000) 0.8 g을 sodium phosphate buffer(pH 6.8) 20 mL에 녹인다.
- gel filtration의 충진물인 sepharose CL-4B(fraction range(MW) 10^4 - 10^7)을 sodium phosphate buffer solution에 씻은 후 column(2.5X100cm)에 충진한다.

- buffer solution에 녹인 dextran(MW464,000)을 column에 60 mL/hr 유속으로 용출한다.
- 5 min/fraction로 auto fraction collector를 작동시켜서 각 fractions을 UV(625nm)로 조사하여 absorbance를 측정한다.
- 중성분획물(IN) 0.8 g을 buffer solution 20 mL에 녹여서 gel filtration column에 dextran과 같은 방법으로 용출한다.
- 각 fractions을 UV(625nm)로 absorbance를 측정한다.
- dextran에 의해 얻어진 UV absorbance를 기준으로 해서 dextran 보다 먼저 용출된 IN은 분자량이 dextran(MW464,000)보다 큰 것(GH)으로 분리했고, 나중에 용출된 것은 분자량이 작은 것(GL)으로 분리했다.
- 분자량이 큰 것(GH)과 작은 것(GL)을 각각 동결 건조하여 각각 0.31 g과 0.20 g의 분말 products를 얻었다.

각 분획물의 UV spectrum과 IR spectrum을 측정한 data이다. UV의 최대 흡수 파장은 260nm 부근에서 있고 최소 흡수 파장은 230nm 부근에 있음을 알 수 있다. 이는 전형적인 핵산의 pattern 이라고 할 수 있다. FT-IR의 투광도에 대한 각 peak의 주파수는 O-H : 3300-3400cm^{-1} C-H : 2900cm^{-1} C-O : 1630cm^{-1} C-H & C-O : 1000-1100cm^{-1} 임을 알 수 있다. 여기서 900-1100cm^{-1}의 peak가 β-glucan라는 것이 밝혀져 있다(Fig.3).

나. 균사체/배양여액으로부터 생리활성물질 분리정제기술 개발

자실체를 이용하여 개발된 분리정제기술을 이용하여 생리활성물질을 분리정제 하였다. 액체배양을 통해 배양된 배양액을 고속원심분리기를 이용하여 균사체 및 배양여액을 분리하였다. 균사체의 경우 ultrasonicator를 이용하여 세포파쇄후 buffer solution을 다시 원심분리하여 상등액을

취한 후 생리활성물질을 위에서와 같은 방법으로 분리정제하였다. 또한 배양여액의 경우 에탄올 또는 아세톤을 가하는 단계에서부터 같은 방법으로 생리활성물질을 분리정제하였다.

2. 분리정제공정 개발

가. 추출공정 모색

추출공정 확립을 위해서 분리수율을 변화시킬 수 있는 실험조건을 조사하였다. 분리수율 변화 요인으로는 추출용매, 추출온도, 추출시간, 침전용매선택, 침전용매량, 투석시간 등에 의해서 수율이 변화된다. 추출용매는 수용성 product를 추출하기 위해서 물을 사용하였다. 추출온도는 열수추출시에 물의 온도로서 각각 낮은 온도에서 높은 온도로 추출하였을 때 생산된 CR.PS의 수율을 비교하였을 때 가장 높은 수율이 되는 온도를 최적 추출온도로 결정하였다. 추출시간은 열수추출하는 시간으로 추출시간을 각각 늘렸을 때 생산된 CR.PS의 수율을 비교하여 최대 수율이 되는 최소시간을 최적시간으로 결정하였다. 침전용매는 열수 추출액에서 당과 단백질을 선택적으로 침전시키는 용매로서 에탄올과 아세톤을 각각의 침전용매로 하여 생산된 CR.PS의 수율을 비교하여 높은 수율이 되는 용매를 최적용매로 결정하였다. 침전용매량은 침전용매가 사용되는 량으로 침전용매량을 각각 늘렸을 때 생산된 CR.PS의 수율을 비교하여 최대 수율이 되는 최소용매량을 최적 침전용매량으로 결정하였다. 투석시간은 저분자 불순물을 제거하는 시간으로 투석시간을 각각 늘렸을 때 생산된 CR.PS가 줄어들지 않는 시간을 최적 투석시간으로 결정하였다. 이러한 비교 실험 과정을 통해서 아가리쿠스 버섯에서 분리시간을 단축시키고 분리효율을 향상시킬 수 있는 생리활성물질의 분리를 위한 최적조건을 결정하고자 하였다.

Fig. 4 (a)는 동결건조된 아가리쿠스 버섯 10 g을 사용하여 열수 추출온도를 달리 했을 때 생성된 CR.PS의 수율을 나타낸 것이다. 분리수율은 사용된 자실체 건조중량에 대해 생성된 CR.PS의 양을 백분율로 표시하였다. 65℃에서 추출된 CR.PS 양에 비해 95℃에서 추출된 것은 3배 이상이었으며 최적 추출 온도는 추출 수율이 가장 높은 95℃로 결정하였다. Fig. 4 (b)는 최적온도로 결정된 95℃에서 열수추출 시간을 달리하였을 때 생성된 CR.PS의 수율을 나타낸 것으로, 추출 시간이 길어질수록 CR.PS의 생성량이 증가하나, 10시간 이후에는 거의 일정한 값을 보이므로 최적 추출시간을 10시간으로 결정하였다. Fig. 4 (c)는 최적 침전용매량을 결정하기 위하여 침전용매인 ethanol의 양을 열수추출 액량의 2배, 3배, 4배, 5배로 변화시켰을 때의 CR.PS의 수율을 비교한 것이다. Ethanol의 양이 증가함에 따라 CR.PS의 수율이 증가하지만, 4배 이상의 양에서는 더 이상 수율의 증가가 이루어지지 않아 최적침전 용매량을 추출액의 4배에 해당하는 ethanol량으로 결정하였다. 알려진 생리활성물질들은 분자량이 2만 이상이므로 저분자의 불순물들을 제거하기 위한 투석공정이 필요하다. 최적 투석시간은 생성물에서 저분자 불순물들이 검출되지 않는 최소의 시간으로 결정하였으며, Fig. 4 (d)에 투석시간 변화에 따른 CR.PS의 수율을 비교하였다. 7일 동안 투석한 이후에는 저분자 불순물의 투석이 완료되어 CR.PS의 양의 변화가 거의 없으므로 고분자량 다당체를 얻기위한 최적 투석시간을 7일로 결정하였다. 투석을 하지 않은 CR.PS와 7일간 투석한 것을 비교해보면 70%이상 감소함을 알 수 있었다. 이는 투석되는 분자량이 12,000 이하인 불순물이 침전액 전체의 의 70% 이상에 해당함을 알 수 있게 하였다.

Fig. 5은 아가리쿠스 버섯에서 갓과 대의 조다당류 함유량을 비교하기 위한 실험의 결과이다. CR.PS가 버섯의 갓에서보다 대에서 2배 이상 추출됨을 나타내어, 아가리쿠스 버섯의 생리활성물질은 주로 대에 존재함을

확인할 수 있었다.

나. 최적조건 확립

생리활성물질의 분리, 정제 최적화 공정 개발을 위하여 분리 수율을 향상시키기 위한 최적 조건을 확립하는 것과 기존의 공정을 대체할 수 있는 새로운 추출 공정을 모색하는 것을 목표로 하였다. 최소 비용과 시간으로 최대의 수율을 얻는 기술과 조건을 개발함으로써 경제성을 향상시키는데 있다(Fig.6).

다. 생리활성물질 분석

1) 분자량 측정

Dextran과 IN을 gel chromatography coloumn에 적용하고 용출되는 fraction을 페놀-황산법으로 발색시켜 투광도를 측정하여 Fig. 7에 도시하였다. Blue dextran의 elution volume은 160 mL, D-4640의 elution volume은 210 mL, D-375의 elution volume은 280 mL, GH의 elution volume은 140 mL, GL의 elution volume은 310 mL로 측정되었다. Fig. 8은 분자량을 알고 있는 표준 dextran의 elution volume을 결정하여 분자량 측정 표준곡선을 그린 그림이다. IN을 column에 적용해 분리된 GH와 GL의 분자량은 3.90×10^{6}, 1.50×10^{4} g으로 측정되었다. IN 100 mg을 적용해 분리된 GH, GL의 양은 24 mg, 53 mg으로 분자량이 적은 GL이 IN에 많이 포함되어 있는 것을 확인하였다.

2) 총탄수화물량 측정

탄수화물은 페놀-황산법으로 glucose를 표분물질로 하여 측정하였다. Table 1은 분리, 정제된 각각의 생성물에 함유된 탄수화물량을 glucose로

환산하여 백분율로 나타낸 것이다. GH가 63%로 가장 많은 탄수화물을 함유하고 있고, IN이 44%로 가장 적은 탄수화물을 함유하고 있는 것을 알 수 있다.

3) 총단백질량 측정

단백질량은 bovine serum albumin (BSA)를 표준물질로 하여 흡광도 차이를 이용하는 Bradford법을 이용하여 측정하였다. 이 방법을 이용하여 각각의 공정단계의 생성물들의 단백질 농도와 함량을 Table 2에 표시하였다. 단백질의 함유량이 가장 많은 것은 22.96%를 함유한 IA이고, 가장 적은 것은 1.82%를 함유한 GH이다.

각 단계의 생성물들이 가지고 있는 탄수화물과 단백질의 양을 측정한 값을 표시하면 Fig. 9와 같다. 측정결과 탄수화물의 양은 GH가 63%, IN이 61%, CR.PS가 56%, GL이 54%, IA가 45% 순으로 나타났으며 단백질의 양은 IA가 23%, CR.PS가 8%, GL이 5%, IN이 3%, GH가 3% 순으로 측정되었다. GH와 IN이 많은 양의 탄수화물을 가지고 있고 IA가 많은 양의 단백질을 포함하고 있는데, 이는 DEAE cellulose resin이 충진된 ion chromatography column에서 양전하를 띤 단백질이 resin에 흡착되었기 때문으로 여겨진다.

4) 탄수화물의 단당 성분 분석

Table 3은 각단계 추출물질들에 함유된 탄수화물의 단당성분과 함량을 HPLC를 이용하여 측정한 값이다. Glucose는 특히 CR.PS와 IN에 많이 포함되어 있으며, galactose와 mannose는 GH에 가장 많이 함유되어 있고, fructose와 glucosamine은 각 추출물질에 조금씩 고루 함유되어 있음을 확인하였다.

5) ^{1}H, ^{13}C-NMR과 FT-IR분석

KBr disc method에 의한 β-glucan과 조다당체(CR.PS)의 FT-IR spectrum을 Fig. 10의 (a)와 (b)에 각각 표시하였다. 구입한 β-glucan은 느타리버섯에서 추출한 것으로 본 실험에서 추출한 CR.PS의 FT-IR spectrum과 비교한 결과, 3300-3400cm^{-1}에서 당고리의 전형적인 O-H의 stretching 흡수피크가 수소결합에 의해 이동되어 나타나고, 2900cm^{-1}부근에서 C-H stretching 진동이 일어나고, 1630cm^{-1}에서 C-O stretching 진동이 일어나며, 1000-1100cm^{-1} 에서는 C-H와 C-O bending 진동이 일어나는 대부분의 피크가 일치함을 확인할 수 있어 분리된 CR.PS는 β-glucan임을 확인하였다.

Fig. 11 (a)와 (b)는 각각 CR.PS의 ^{1}H, ^{13}C-NMR을 측정한 결과이다. Fig. 11 (a)의 ^{1}H-NMR의 signal은 4.42, 4.18, 3.80, 3.60, 3.41, 3.29ppm이고 이에 해당되는 수소는 C-1, C-6, C-5, C-4, C-3, C-2 위치에 있는 수소임을 알 수 있었다. 또한, Fig. 11 (b)의 ^{13}C-NMR의 signal은 102.8, 86.1, 74.8, 73.2, 68.3, 60.7ppm이고 이에 해당되는 탄소는 C-1, C-3, C-5, C-2, C-4, C-6 위치에 해당되는 탄소임을 알 수 있었다. 이상의 FT-IR과 ^{13}C, ^{1}H-NMR 분석을 통해서 분리된 CR.PS는 전형적인 β-glucan임을 알 수 있었다.

3. 분리정제공정 최적화

가. 추출 수율 비교

개방형 추출실험과 밀폐형 추출실험에서 추출시간과 마이크로웨이브 출력 등 운전조건을 달리하여 얻은 결과를 Table 4과 Table 5에 각각 표시하였다. 실험결과를 보면, 모든 실험조건에서 개방형의 경우보다 밀폐형

추출실험의 수율이 약 5%정도 높게 나타났으며, 수율향상을 위해서는 밀폐형 추출공정이 적절함을 알 수 있었다.

추출시간과 마이크로웨이브 출력에 따른 수율의 변화를 살펴보면, 추출시간과 마이크로웨이브 출력의 증가는 모두 수율을 향상시키는 결과를 보였다. 수율을 향상시키는 정도는 마이크로웨이브의 출력증가가 훨씬 효과적이었다. 추출시간의 증가에 따른 수율의 증가는 추출시간이 50분까지 증가함에 따라서 선형적 수율 증가가 이루어지지만 50분 이후의 추출시간 증가가 유도하는 수율의 증가는 매우 낮았다. 반면에 마이크로웨이브 출력의 증가에 따라서는 실험한 조건 내에서 추출 수율의 선형적 증가가 유지되는 것으로 나타났다. 따라서, 다당류 추출 수율의 향상을 위한 최적 운전조건으로 50분의 추출시간과 실험조건내에서는 650 watt의 마이크로웨이브 출력으로 밀폐형 추출방법을 이용하는 것으로 결정하였다.

본 연구자들에 의해 수행되었던 열수추출방법과 본 연구의 다당류 추출 수율을 비교해 보면 열수추출의 경우 10시간의 추출시간, 추출액대비 4배의 유기용매량, 3일의 투석시간의 최적조건하에서 0.0301 g/g의 다당류를 얻을 수 있었으며, 마이크로웨이브를 이용한 밀폐형 추출의 경우에는 50분의 추출시간, 추출액대비 2배의 유기용매량, 2일의 투석시간과 마이크로웨이브 출력 650 watt의 최적 조건하에서 0.0411 g/g의 다당류를 얻음으로써 추출수율이 열수추출에 비해 36.5% 증가하였다. 수율의 증가뿐아니라, 마이크로웨이브를 이용한 추출은 기존의 열수추출에 비하여 추출시간은 1/10 이하로, 사용되는 용매의 양은 1/2로, 투석에 소요되는 시간은 2/3를 줄일 수 있어 추출공정의 집적화와 소형화가 가능하다.

나. MAE(Microwave Assisted Extraction) 공정 최적화

아가리쿠스버섯 항암 특성을 가지고 있는 생리활성물질을 분리하기

위하여 마이크로웨이브를 이용한 추출공정을 적용하고 공정 운전변수를 최적화하여 기존 열수추출방법에 비하여 높은 분리효율과 경제성을 가지는 분리공정 개발에 대한 것이다. 마이크로웨이브를 이용한 추출공정의 최적화를 위한 운전변수로는 추출시간과 마이크로웨이브의 출력을 선정하여 이들 조건의 최적화에 대한 연구를 수행하였다.

1) IR 분석

Fig. 12에 나타낸 IR 분석결과를 보면 wave number 3000~3600 cm^{-1} 부근에 O-H 신축진동을 하는 피크가 나타나며, 2960~2820 cm^{-1}부근에 -CH- 지방족이 신축진동을 하는 것이 나타난다. 그리고, 1730~1620 cm^{-1} 부근에는 C=O 결합이 나타나며, 1000~1300 cm^{-1}부근에서 C-O 결합을 하는 두 개 혹은 그 이상의 피크를 볼 수 있다. Fig. 12을 전체적으로 보면 마이크로웨이브 출력이 높은 영역에서는 추출시간의 차이가 피크의 크기에 큰 영향을 주지 않음을 볼 수 있으며, watt수가 클수록 피크의 크기가 증가함을 알 수 있다. 추출시간은 50분까지의 증가가 피크 크기의 상당한 증가를 보이고 있어 50분의 최적추출 시간 설정이 타당함을 알 수 있었다.

2) ^{13}C-NMR 분석

^{13}C-NMR로 최종 생성물을 분석한 결과, 다른 연구자들에 의한 β-glucan 분석결과와 같은 위치에서 피크를 나타내었으며, 탄소의 위치에 따른 성분을 분석하면 Table 6과 같이 같은 탄소위치에 여러 개의 값이 나타남을 알 수 있었다. 그 이유는 가지로 연결된 당과 주 체인인 당사이의 수소이온이 서로 자리이동을 하면서 영향을 미치는 것으로 추정하였다. Fig. 13-15는 마이크로웨이브의 출력세기에 따른 탄소원자 하나 하나의 세기를 대략적인 값으로 표시한 것이다. Fig. 13-15는 각각 200 watt, 500

watt, 650 watt의 마이크로웨이브 출력에서 생성된 물질의 탄소 위치에 따른 세기를 표시한 것으로 추출시간이 50분 이상에서는 거의 비슷한 세기를 나타내었다. 또한, Fig. 12-15와 Table 6의 데이터를 통하여 Fig. 16에 표시한 구조를 갖는 물질이 *A. blazei*에서 추출되었음을 확인할 수 있었으며, Fig. 16에 나타낸 구조의 물질은 (b)부분의 $-CH_2-$와 (d)부분의 -O-가 연결되어져 있는 형태로, (b)-(c)구조가 n개 연속적으로 연결되어져 있으며 이 부분의 (1→6) 가지를 수만개 가지는 것으로 알려져 있다. 따라서, 분자량은 대략 2만~200만 정도가 될 수 있으며, *A. blazei*에서 추출한 성분은 본 연구자들의 이전 연구에 의해 분자량이 2만~100만 정도인 것으로 추정되었다. 이상의 실험방법을 개략적으로 정리하여 Fig. 17에 표현하였다.

다. 초임계 유체추출(SFE)공정 최적화

아가리쿠스 버섯의 비극성 생리활성물질을 분리하여 그 성분을 밝히고자 한다. 또한, 비극성 생리활성물질의 분리 효율의 극대화를 위하여 초임계 공정의 온도와 압력을 변화시키며 정성, 정량분석을 수행하여 분리효율을 분석함으로써 초임계 유체 추출공정의 최적화를 시도하였다.

1) 초임계 유체 추출법을 이용한 비극성 생리활성물질 추출

이산화탄소의 초임계 영역은 온도 31.1℃와 압력 73.8 Kg_f/cm^2 이상에서 형성되므로 40℃의 온도와 150 Kg_f/cm^2의 압력에서 추출을 수행하여 추출된 물질을 GC-MS를 이용하여 정성분석을 수행하였다. Fig. 18 (a)에 표시된 GC-MS 정성분석 결과로 추출물질은 linoleic acid(cis-9, cis-12-octadecadienoic acid)인 것으로 분석되었으며 불순물은 약 5%이내인 것으로 관찰되었다. 따라서 아가리쿠스 버섯 자실체는 기존의 극성 물

질 추출방법을 통하여 극성 생리활성물질로 β-glucan을 가지고 있으며 초임계 추출을 통하여 비극성 생리활성물질로 linoleic acid를 포함하고 있음을 알 수 있었다.

2) 초임계 추출공정 운전변수의 최적화

초임계 추출공정을 이용한 아가리쿠스 버섯에서 비극성 생리활성물질인 linoleic acid의 최적 추출조건을 찾기 위하여 추출 온도와 압력을 각각 40℃, 50℃, 60℃와 150 Kg_f/cm^2, 200 Kg_f/cm^2, 250 Kg_f/cm^2로 변화시켜가며 추출 효율을 비교 분석하였다. 운전조건에서 추출 효율의 비교는 GC-MS 분석결과를 이용하였으며, Fig. 18에 대표적인 예로 50℃에서의 추출물질의 분석결과를 도시하였다. Linoleic acid의 추출 효율은 일정한 양의 아가리쿠스 버섯자실체를 이용하였으므로 10 g의 자실체에서 추출된 linoleic acid의 몰수로 표시하였다. Table 7에 나타낸 바와 같이 각 운전조건에서의 추출 효율을 비교한 결과로부터 추출온도의 증가는 50℃까지는 급격한 효율 증가를 유도하지만 그 이상에서는 추출 효율의 증가 효과가 미약하며, 추출압력의 증가도 200 Kg_f/cm^2까지는 급격한 추출 효율의 증가를 보이나 그 이상에서는 효율의 증가가 두드러지지 않으므로 최적 추출조건을 온도 50℃와 압력 200 Kg_f/cm^2로 결정하였다. 이상으로부터 초임계유체 추출법을 이용한 비극성 생리활성물질(linoleic acid)의 최적 추출조건을 결정하였다. Fig. 19에 초임계 유체 추출공정의 구성을 개략적으로 표현하였다.

Table 1. 각 생성물의 탄수화물량

Products	Absorbance (480nm)	Carbohydrates conc. (mg/L)	Percent (%)
CR.PS	0.86	42	56
IN	0.93	56	61
IA	0.68	40	44
GH	0.97	57	63
GL	0.84	49	54

Table 2. 각 생성물의 단백질량

Products	Absorbance (595nm)	Protein conc. (μg/L)	Percent (%)
CR.PS	0.5945	3.98	7.96
IN	0.5620	1.62	3.24
IA	0.6981	11.48	22.96
GH	0.5521	0.91	1.82
GL	0.5744	2.52	5.04

Table 3. Comparison of monosaccharides concentrations in each product(nmol).

Product	Fructose	Glucosamine	Galactose	Glucose	Mannose
CR.PS	0.4	0.2	2.3	18.8	0.7
IN	0.6	0.2	4.2	16.8	1.8
IA	0.2	0.2	1.7	5.0	0.4
GH	1.4	0.4	8.1	5.9	3.2
GL	0.4	0.3	2.1	1.2	-

Table 4. Yield (g/g) of product at various operation conditions in open system

time (min) / Watt	30	40	50	60	70
200	0.0311	0.0321	0.0341	0.0342	0.0343
500	0.0354	0.0363	0.0382	0.0384	0.0389
650	0.0377	0.0382	0.0405	0.0411	0.0417

Table 5. Yield (g/g) of product at various operation conditions in closed system

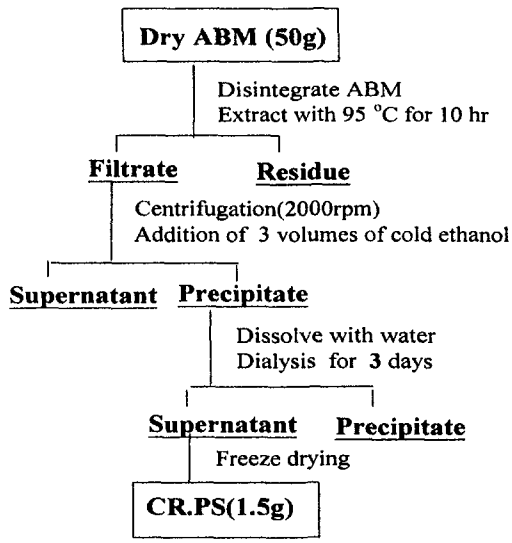
time (min) / Watt	30	40	50	60	70
200	0.0332	0.0336	0.0352	0.0353	0.0358
500	0.0369	0.0368	0.0393	0.0396	0.0397
650	0.0383	0.0387	0.0411	0.0414	0.0421

Table 6. ^{13}C-NMR chemical shifts (δ) and signal assignments for natural products in D_2O (25℃, 500 MHz)

C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
104.23	74.86	87.83	71.45	77.59	69.66
104.12	74.02	87.52	69.88	77.32	62.35
	73.87	87.45	69.73	76.00	62.15
	73.80	87.25	69.66		62.04
		77.85			

Table 7. Extraction efficiencies of linoleic acid at the various temperatures and pressures (unit: $\times 10^{-8}$ mole/10g)

Pressure (Kg_f/cm^2) \ Temp. (℃)	40	50	60
150	1.031	1.509	1.509
200	2.069	2.476	2.562
250	2.091	2.608	2.647


Dry ABM (50g)
Disintegrate ABM
Extract with 95 °C for 10 hr
Filtrate
Residue
Centrifugation(2000rpm)
Addition of 3 volumes of cold ethanol
Supernatant
Precipitate
Dissolve with water
Dialysis for 3 days
Supernatant
Precipitate
Freeze drying
CR.PS(1.5g)

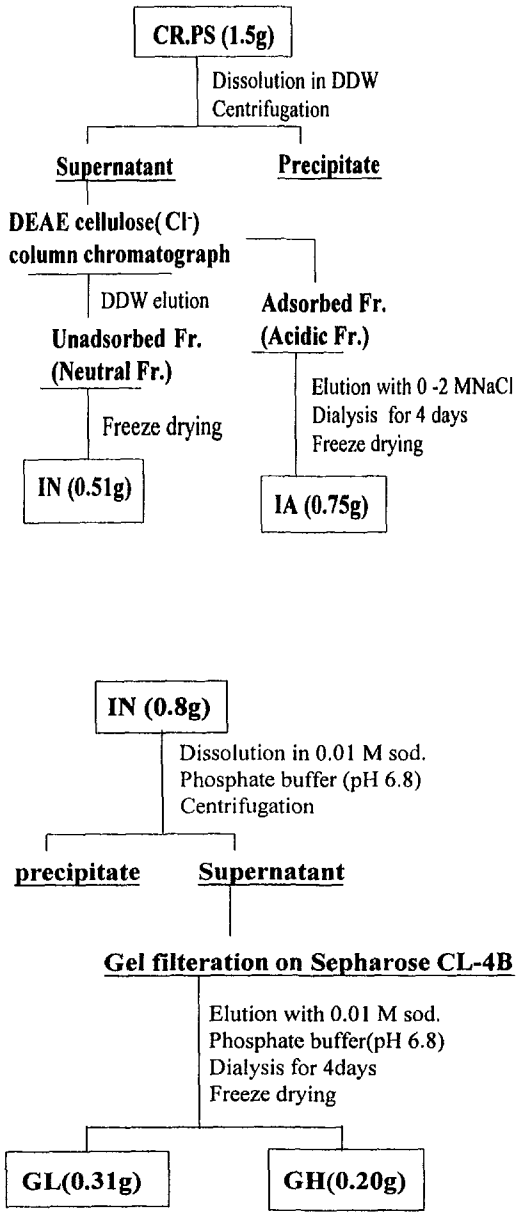
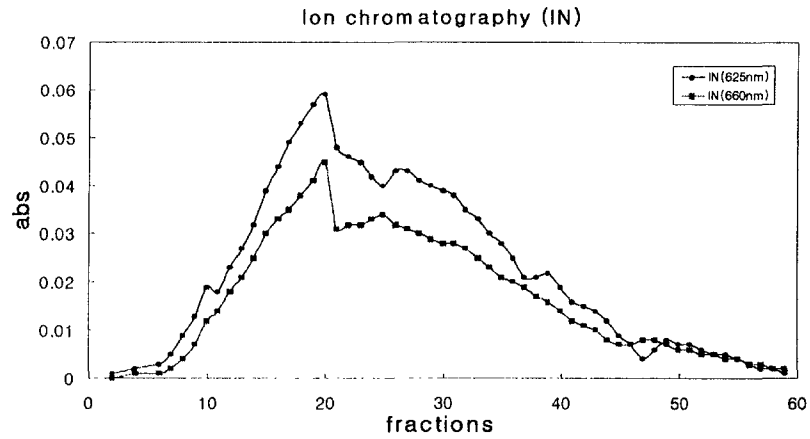
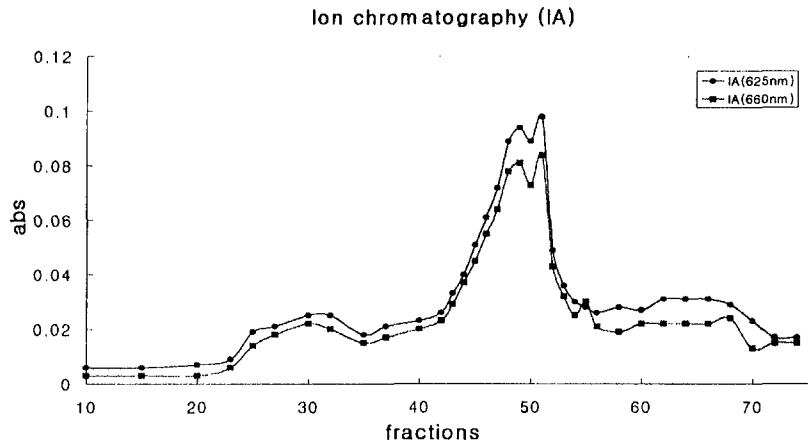


Fig. 1. 생리활성물질 분리, 정제 공정 개략도



(a)



(b)

Fig. 2. 이온 크로마토그래피를 이용한 중성분획물(IN)과 산성분획물(IA)의 농도곡선.
(a) 중성분획물(IN) (b) 산성분획물(IA)

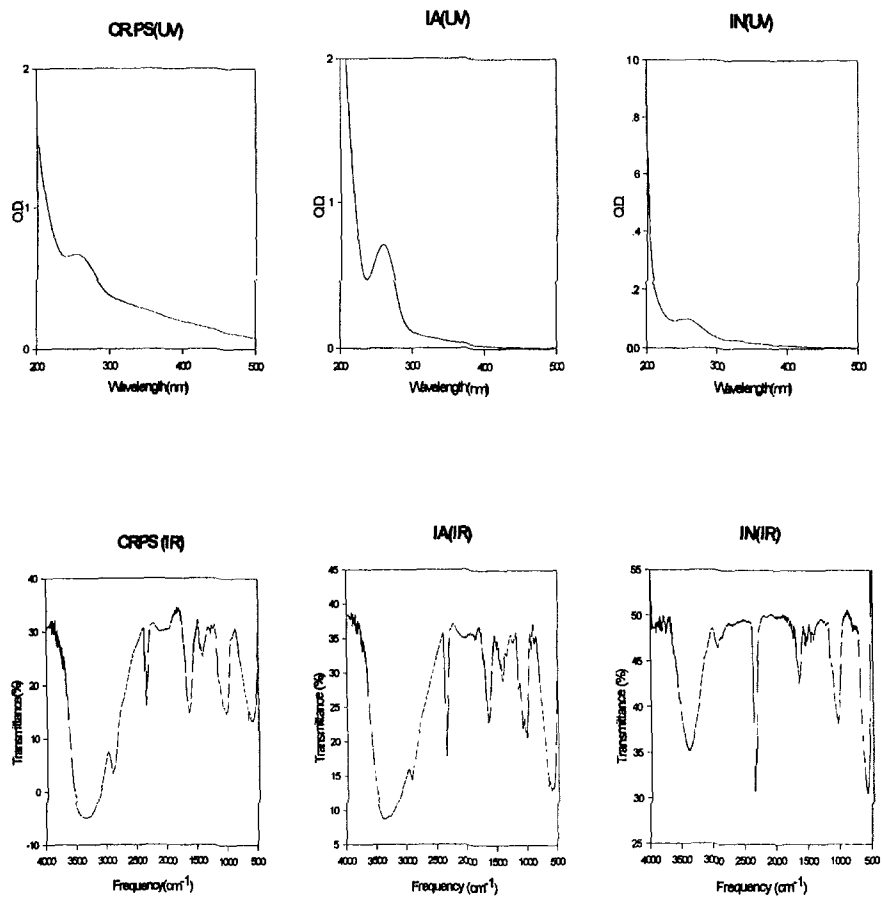


Fig. 3. 아가리쿠스 버섯에서 추출한 생리활성 물질들의 UV, IR spectrum

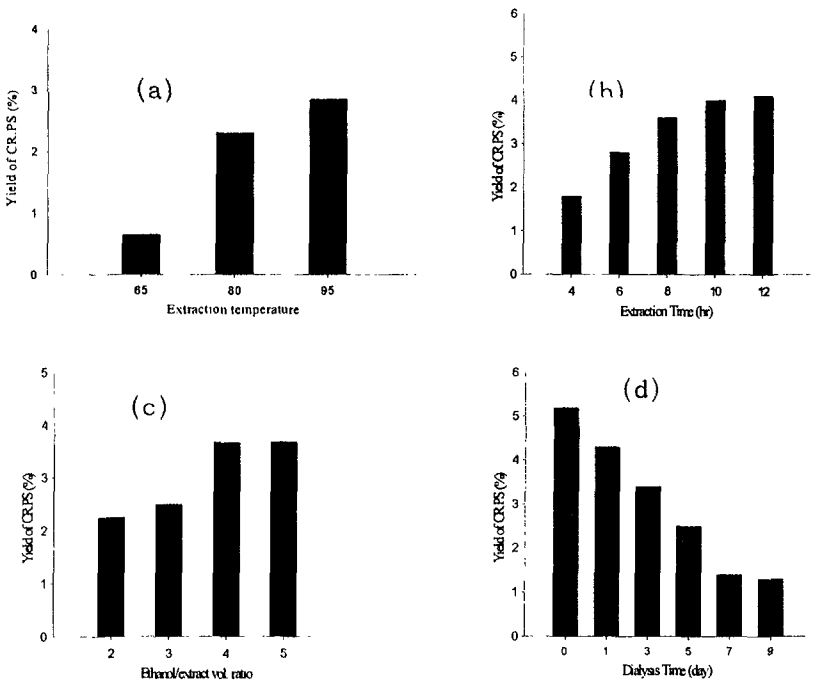


Fig. 4. Comparison of CR.PS yields according to various operation parameter (a) extraction temperature, (b) extraction time (c) ethanol/extract volume ratio for precipitation, (d) dialysis time.

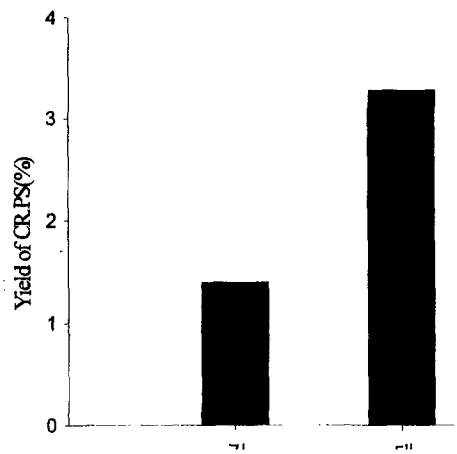


Fig. 5. Comparison of CR.PS yields of mustard and stalk

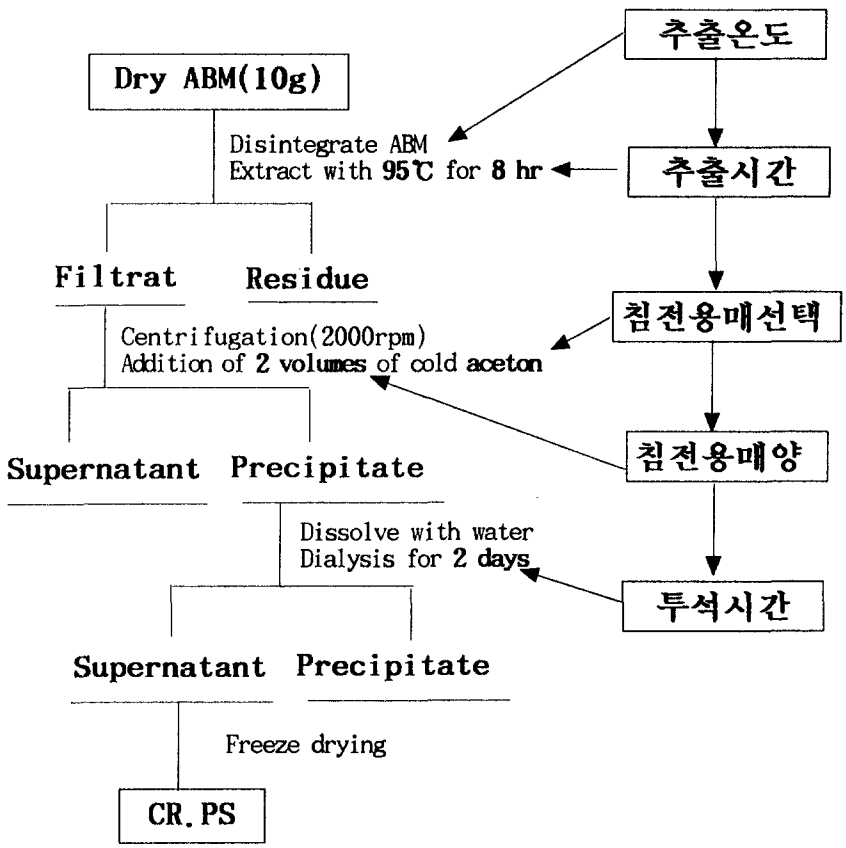


Fig. 6. 생리활성물질(CR.PS)추출 공정의 최적화

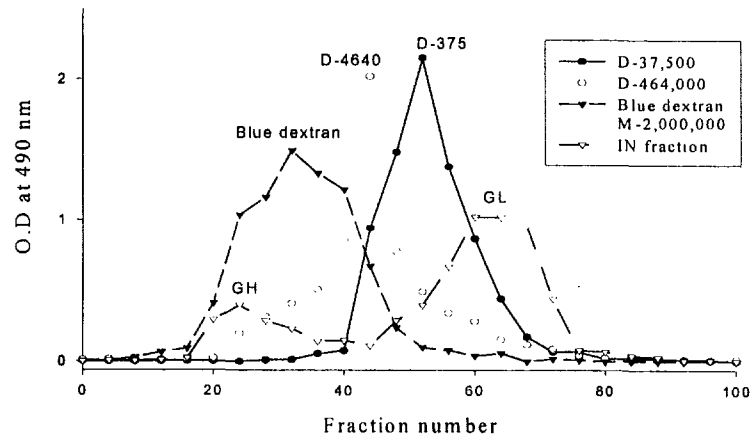


Fig. 7. Elution of standard dextrans and IN fraction by Sepharose CL-4B gel filtration.

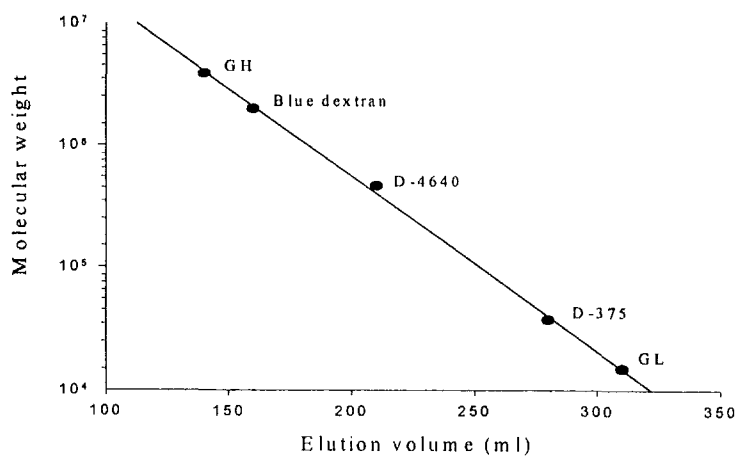


Fig. 8. Determination of molecular weight of GL and GH by gel filtration

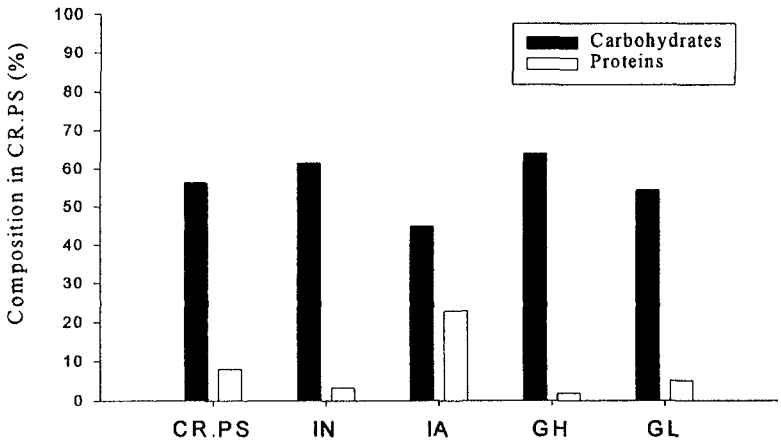


Fig. 9. Comparison of total carbohydrates and proteins quantities of products

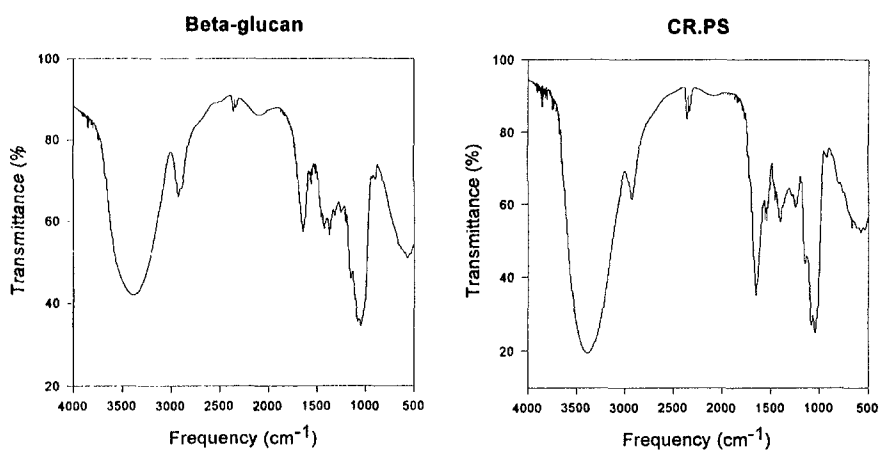
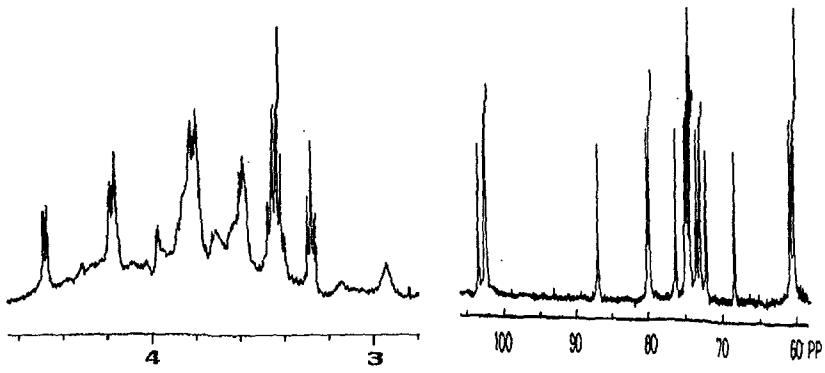
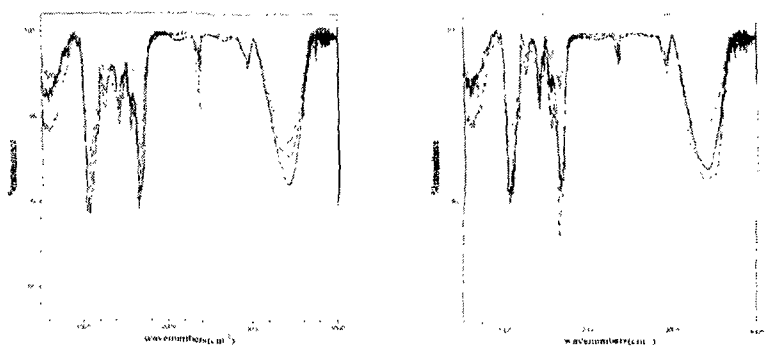


Fig. 10. FT-IR spectrum comparison of β-glucan and extracted CR.PS.



(a) (b)

Fig. 11. NMR spectrum of CR.PS in D_2O (a) ^{1}H-NMR (b) ^{13}C-NMR.



(a) (b)

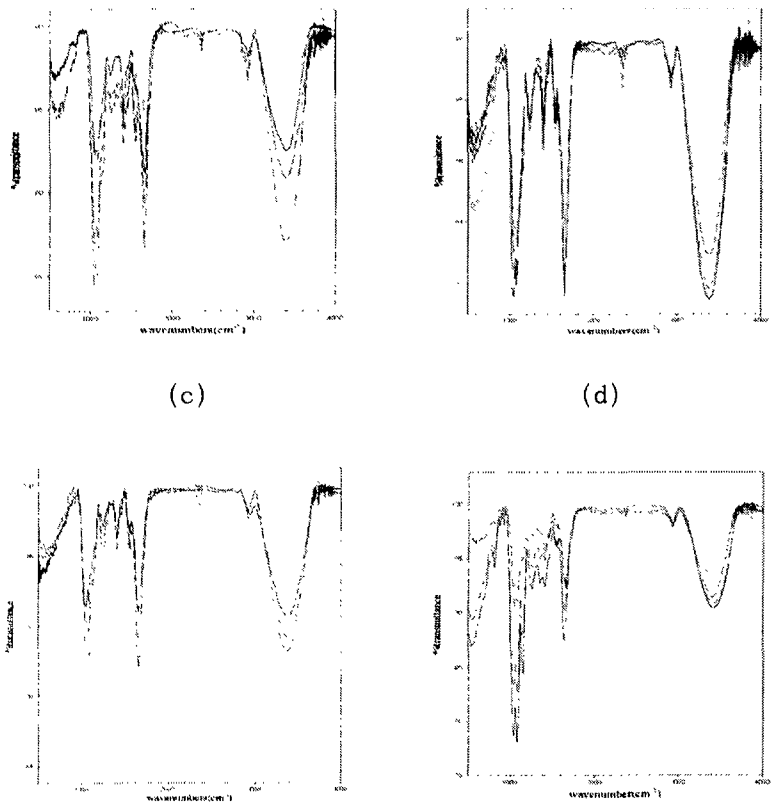


Fig. 12. IR spectra of products extracted by microwave assisted extraction. (a)results of 200 watt applied power in open system (medium dashed line: 30 min, solid line: 40 min, long dashed line: 50 min, dash-dot-dot line: 60 min, dotted line: 70 min) (b) results of 200 watt applied power in closed system (medium dashed line: 30 min, solid line: 40 min, dotted line: 50 min, long dashed line: 60 min, dash-dot-dot line: 70 min) (c) results of 500 watt applied power in open system (medium dashed line: 30 min, long dashed line: 40 min, dash-dot-dot line: 50 min, solid line: 60 min, dotted line: 70 min) (d) results of 500 watt applied power in closed system (long dashed line: 30 min, dash-dot-dot line: 40 min, dotted line: 50 min, solid line: 60 min, medium dashed line: 70 min) (e) results of 650 watt applied power in open system (solid line: 30 min, long dashed line: 40 min, dash-dot-dot line:50 min, medium dashed line: 60 min, dotted line:70 min) (f) results of 650 watt applied power in closed system (dotted line: 30 min, medium dashed line: 40 min, long dashed line: 50 min, dash-dot-dot line: 60 min, solid line: 70 min)

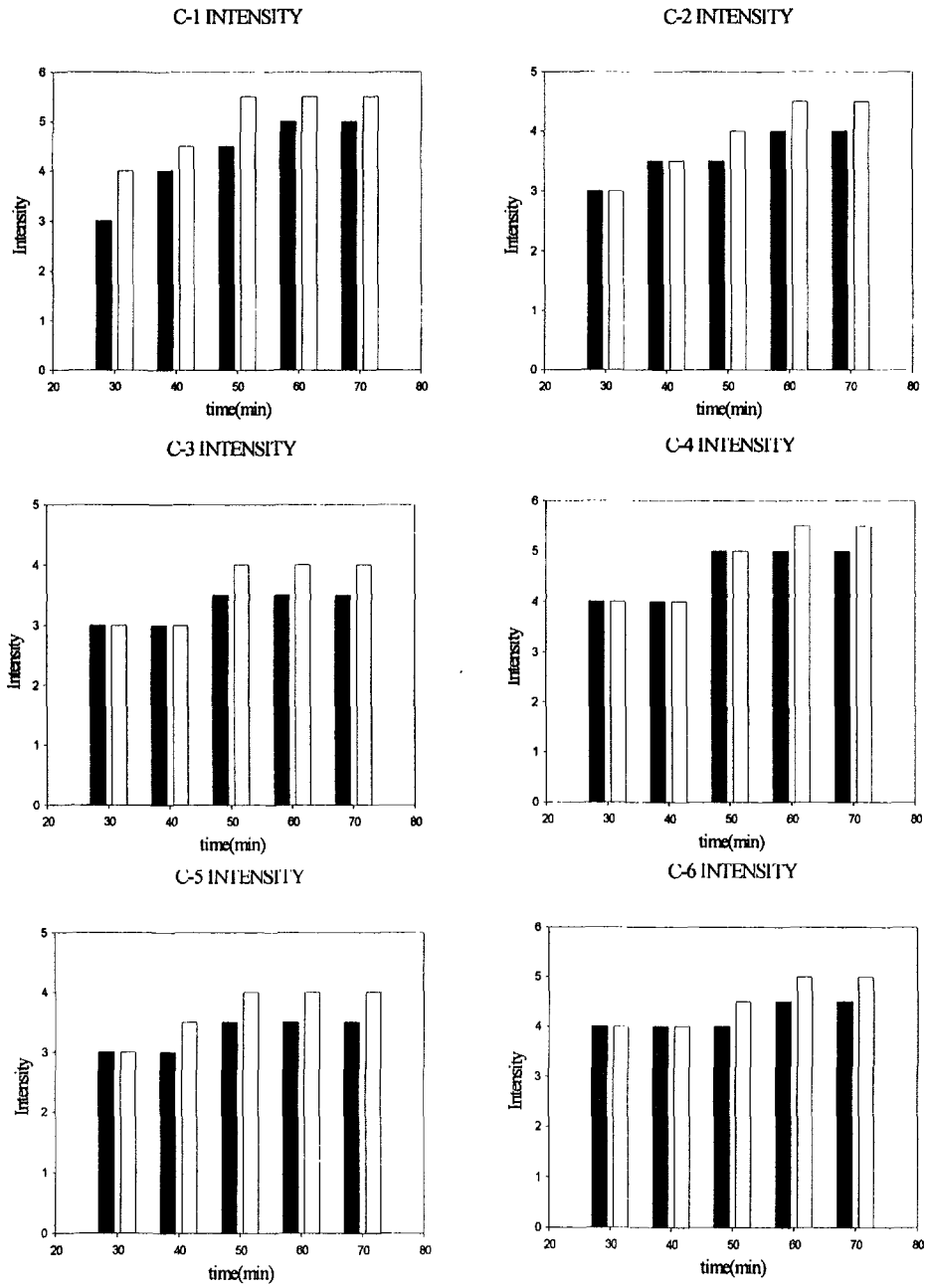


Fig. 13. The results of ^{13}C-NMR analysis((black bar: open system, white bar: closed system). Applied power 200 watt

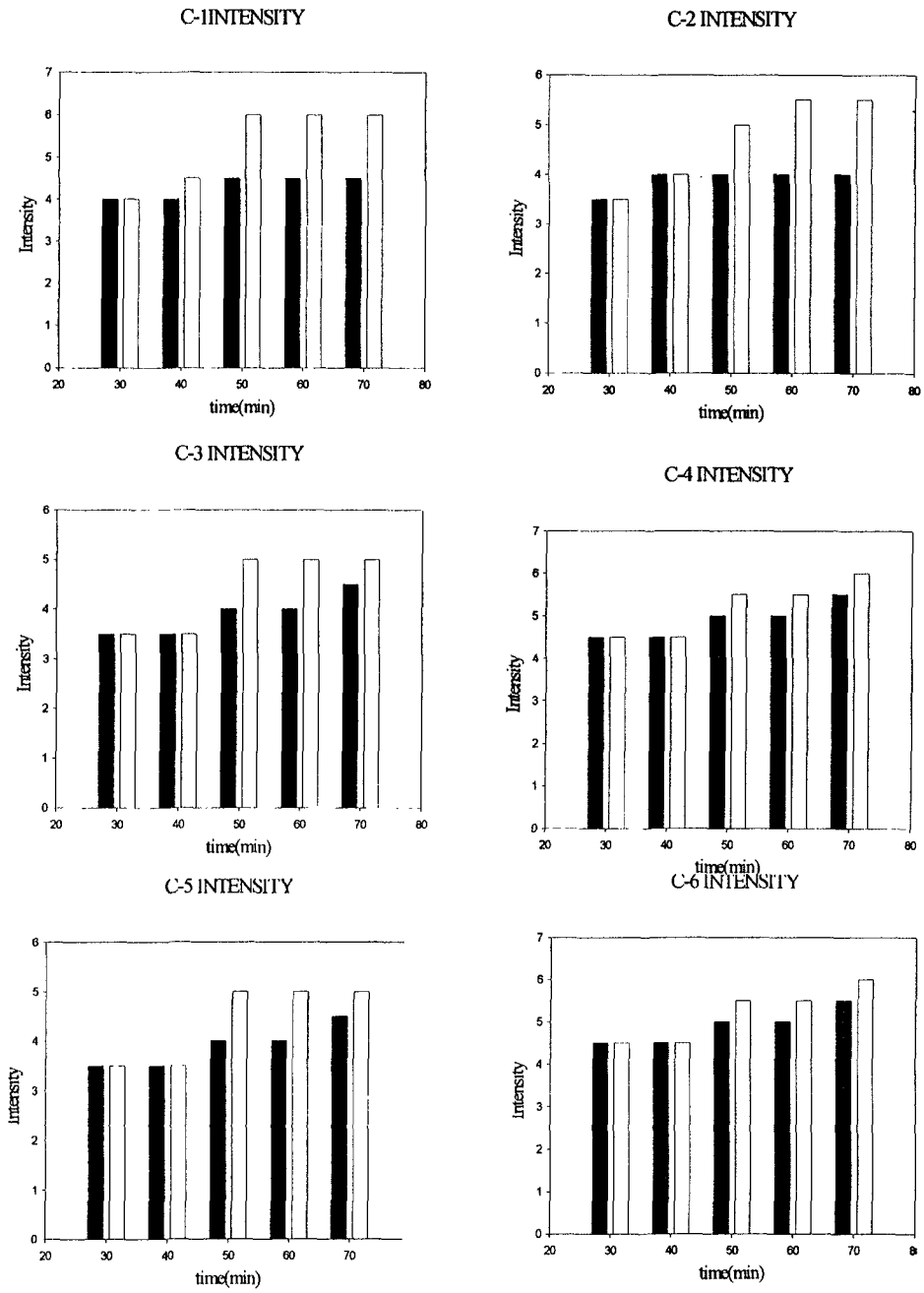


Fig. 14. The results of ^{13}C-NMR analysis((black bar: open system, white bar: closed system). Applied power 500 watt

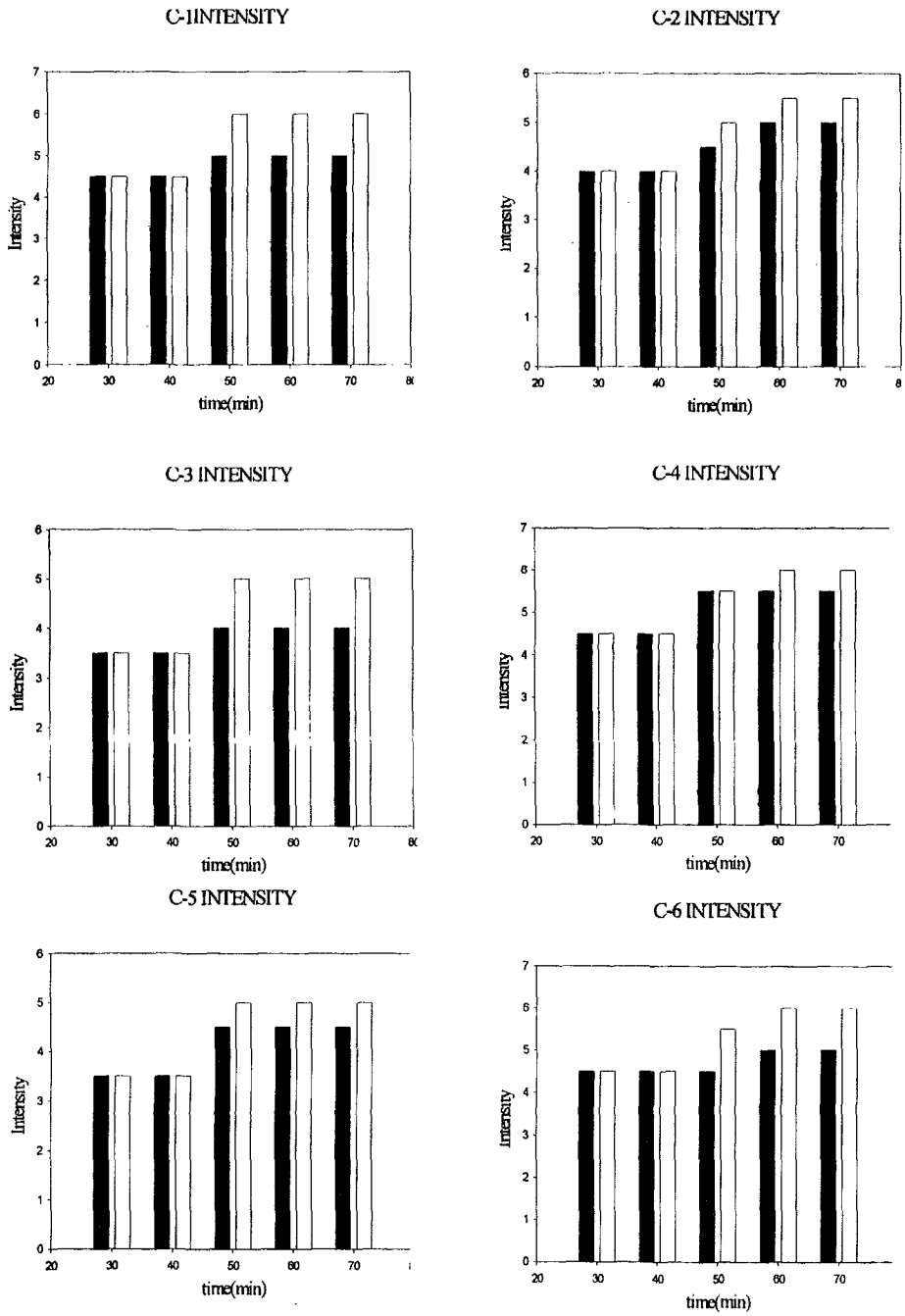


Fig. 15. The results of ^{13}C-NMR analysis((black bar: open system, white bar: closed system). Applied power 650 watt

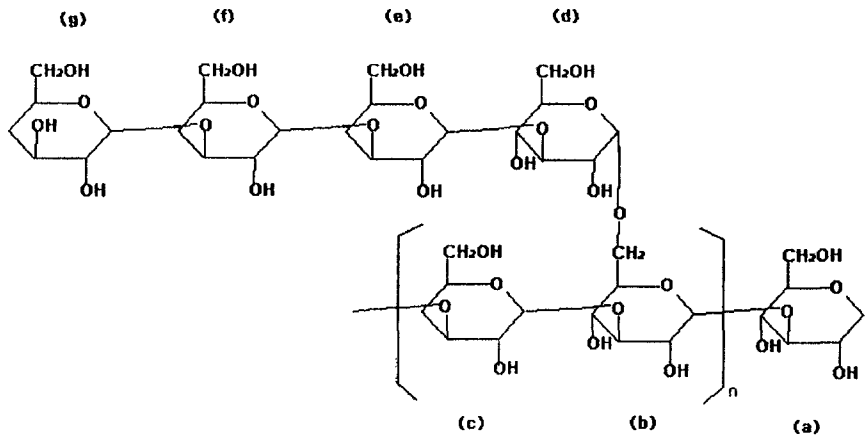


Fig. 16. Chemical structure of products; n represent the number of repeating sequences of residues b and c commensurate with the length of the branch.

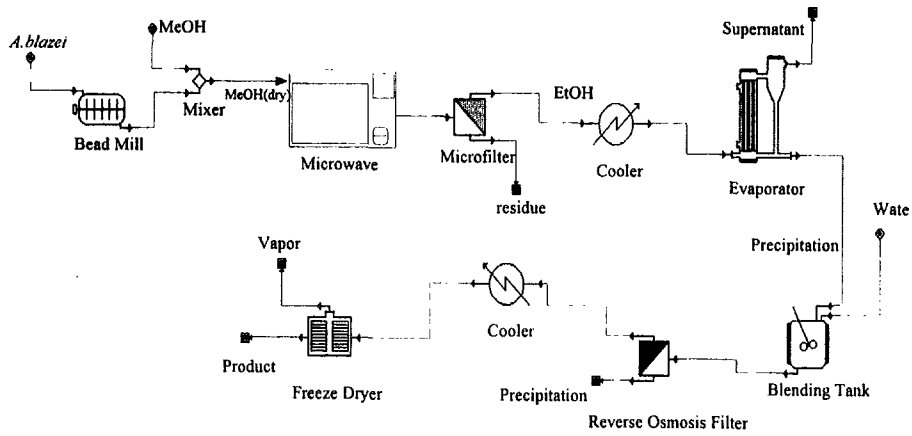


Fig. 17. 마이크로웨이브를 이용한 추출공정 개략도

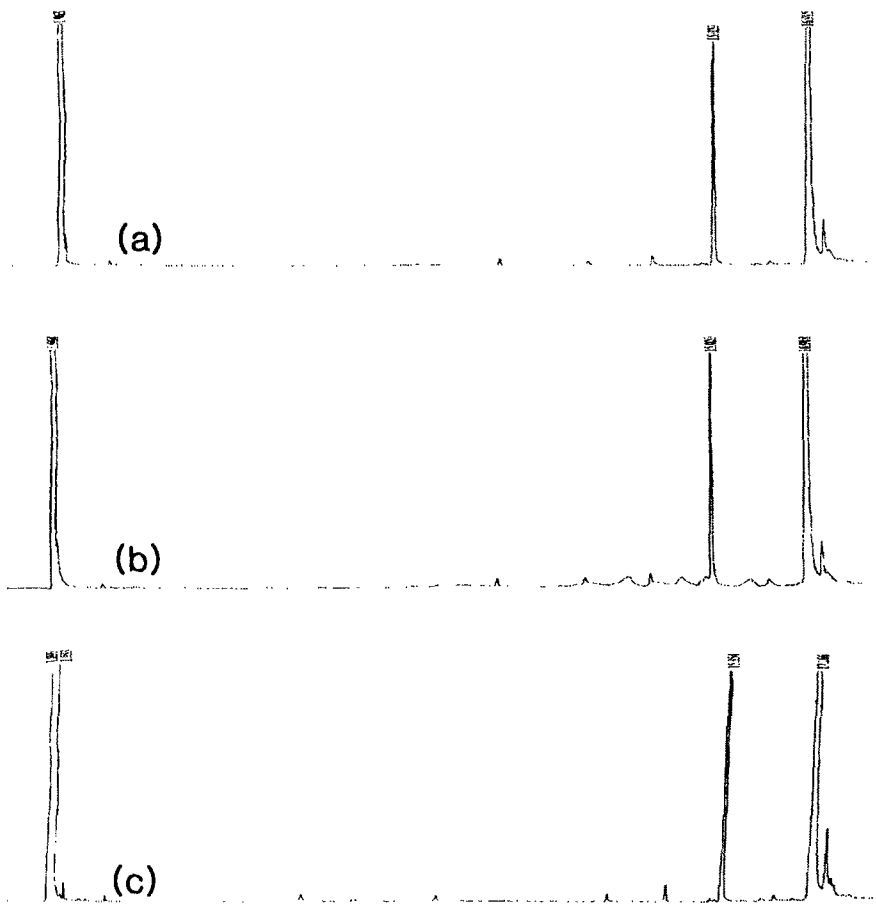


Fig. 18. Analytical results of extracts at 50℃ using GC-MS at various pressures; (a) 150Kg_f/cm^2, (b) 200Kg_f/cm^2, (c) 250Kg_f/cm^2.

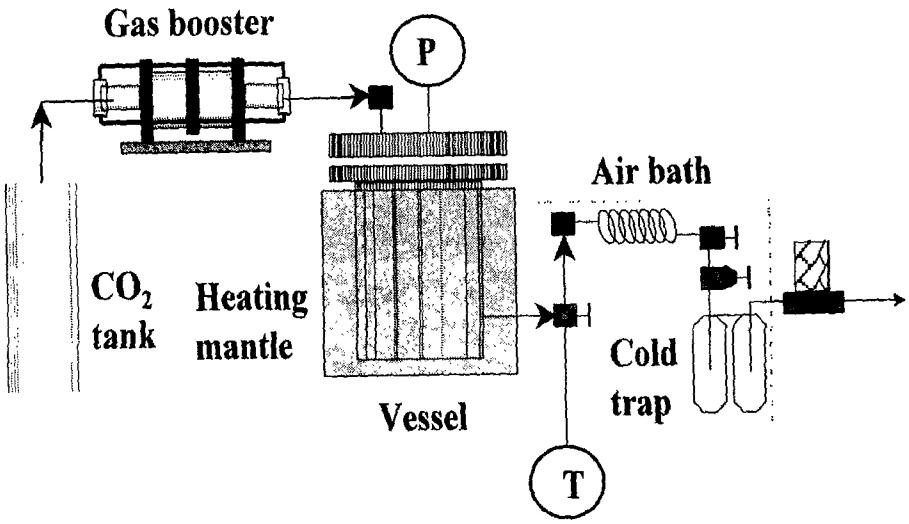


Fig. 19. 초임계 유체 추출공정 구성도

제 4 절 결 론

본 연구과제는 *Agaricus blazei* murill 버섯(아가리쿠스버섯)에서 생리활성물질을 분리, 정제하기 위한 최적화된 공정을 개발하기 위한 것으로 추출공정을 열수추출, 마이크로웨이브를 이용한 추출, 초임계유체를 이용한 추출공정에 대한 최적화가 수행되었다.

생리활성물질의 추출 및 정제는 동결건조된 아가리쿠스 버섯 자실체 50 g을 열수추출한 후 에탄올에 의한 침전과 저분자 불순물 제거를 위한 투석공정을 거쳐 동결건조하여 조다당체(CR.PS) 1.5 g을 생성하여 3.0%의 수율을 나타내었다. 이것을 ion chromatography법을 이용하여 중성다당체(IN) 0.51 g과 산성다당체(IA) 0.75 g으로 분리되었다. 또한 분자량 측정과 고분자량 다당체(GH)와 저분자량 다당체(GL)를 분리하기 위하여 gel filtration chromatography법을 이용하였다. IN 0.8 g에서 고분자량 다당체 0.20 g과 저분자량 다당체 0.31 g을 분리하였다.

분리된 다당체 IN은 gel chromatography coloumn를 이용하여 GH와 GL을 분리하였고 분리된 GH와 GL의 분자량은 3.90×10^{6}, 1.50×10^{4} g으로 측정되었다. IN 100 mg을 적용해 분리된 GH, GL의 양은 24 mg, 53 mg으로 분자량이 적은 GL이 IN에 많이 포함되어있는 것을 확인하였다. 생리활성물질의 분석결과 탄수화물량은 GH가 63%로 가장 많은 탄수화물을 함유하고 있고, IN이 44%로 가장 적은 탄수화물을 함유하고 있는 것을 알 수 있다. 또한 단백질의 함유량이 가장 많은 것은 22.96%를 함유한 IA이고, 가장 적은 것은 1.82%를 함유한 GH임을 알수있었다.

HPLC를 이용하여 탄수화물의 단당 성분분석을 하였고 특히 CR.PS와 IN에 많이 포함되어 있으며, galactose와 mannose는 GH에 가장 많이 함유되어 있고, fructose와 glucosamine은 각 추출물질에 조금씩 고루 함유되

어 있음을 확인하였다. 추출 및 분리된 다당체에 대한 ^{1}H, ^{13}C-NMR과 FT-IR 분석 통하여 구입한 느타리버섯에서 추출한 β-glucan과 비교한 결과 대부분의 피크가 일치함을 확인할 수 있어 분리된 다당체는 β-glucan임을 확인하였다.

최적의 분리공정 조건을 결정하기 위하여 동결건조된 아가리쿠스 버섯 10 g을 사용하여 열수 추출온도를 달리한 결과 65℃에서 추출된 CR.PS양에 비해 95℃에서 추출된 것은 3배 이상이었으며 최적 추출 온도는 추출수율이 가장 높은 95℃로 결정하였다. 최적온도로 결정된 95℃에서 열수추출 시간을 달리하였을 때 생성된 CR.PS의 수율을 나타낸 것으로, 추출시간이 길어질수록 CR.PS의 생성량이 증가하나, 10시간 이후에는 거의 일정한 값을 보이므로 최적 추출시간을 10시간으로 결정하였다. 최적 침전용매량을 결정하기 위하여 침전용매인 ethanol의 양을 열수추출 액량의 2배, 3배, 4배, 5배로 변화시켰을 때의 CR.PS양은 Ethanol의 양이 증가함에 따라 CR.PS의 수율이 증가하지만, 4배 이상의 양에서는 더 이상 수율의 증가가 이루어지지 않아 최적침전 용매량을 추출액의 4배에 해당하는 ethanol량으로 결정하였다. 알려진 생리활성물질들은 분자량이 2만 이상이므로 저분자의 불순물들을 제거하기 위한 투석공정이 필요함에 따라 최적 투석시간은 생성물에서 저분자 불순물들이 검출되지 않는 최소의 시간으로 결정하였으며, 7일 동안 투석한 이후에는 저분자 불순물의 투석이 완료되어 CR.PS의 양의 변화가 거의 없으므로 고분자량 다당체를 얻기위한 최적 투석시간을 7일로 결정하였다. 그러나 CR.PS와 7일간 투석한 것을 비교해보면 70%이상 감소함을 알 수 있었다. 이는 투석되는 분자량이 12,000 이하인 불순물이 침전액 전체의 70% 이상에 해당함을 알 수 있게 하였다.

분리 수율을 높일 수 있는 새로운 공정으로 마이크로웨이브를 이용한 추출, 초임계유체를 이용한 추출공정에 대한 최적화가 수행되었고 마이크

로웨이브 이용한 개방형 추출실험과 밀폐형 추출실험에서 추출시간과 마이크로웨이브 출력등 운전조건을 달리하여 얻은 결과 모든 실험조건에서 개방형의 경우보다 밀폐형 추출실험의 수율이 약 5%정도 높게 나타났으며, 수율향상을 위해서는 밀폐형 추출공정이 적절함을 알 수 있었다.

추출시간과 마이크로웨이브 출력에 따른 수율의 변화를 살펴보면, 추출시간과 마이크로웨이브 출력의 증가는 모두 수율을 향상시키는 결과를 보였다. 수율을 향상시키는 정도는 마이크로웨이브의 출력증가가 훨씬 효과적이었다. 추출시간의 증가에 따른 수율의 증가는 추출시간이 50분까지 증가함에 따라서 선형적 수율 증가가 이루어지지만 50분 이후의 추출시간 증가가 유도하는 수율의 증가는 매우 낮았다. 반면에 마이크로웨이브 출력의 증가에 따라서는 실험한 조건 내에서 추출 수율의 선형적 증가가 유지되는 것으로 나타났다. 따라서, 다당류 추출 수율의 향상을 위한 최적 운전조건으로 50분의 추출시간과 실험조건내에서는 650 watt의 마이크로웨이브 출력으로 밀폐형 추출방법을 이용하는 것으로 결정하였다.

본 연구자들에 의해 수행되었던 열수추출방법과 본 연구의 다당류 추출 수율을 비교해 보면 열수추출의 경우 10시간의 추출시간, 추출액대비 4배의 유기용매량, 3일의 투석시간의 최적조건하에서 0.0301 g/g의 다당류를 얻을 수 있었으며, 마이크로웨이브를 이용한 밀폐형 추출의 경우에는 50분의 추출시간, 추출액대비 2배의 유기용매량, 2일의 투석시간과 마이크로웨이브 출력 650 watt의 최적조건하에서 0.0411 g/g의 다당류를 얻음으로써 추출수율이 열수추출에 비해 36.5% 증가하였다. 수율의 증가뿐 아니라, 마이크로웨이브를 이용한 추출은 기존의 열수추출에 비하여 추출시간은 1/10 이하로, 사용되는 용매의 양은 1/2로, 투석에 소요되는 시간은 2/3를 줄일 수 있어 추출공정의 집적화와 소형화가 가능하였다. 또한 초임계 유체 추출법을 이용하여 비극성 생리활성물질을 분리하였으며 추출물질

은 linoleic acid(cis-9, cis-12-octadecadienoic acid)인 것으로 분석되었다. 따라서 아가리쿠스 버섯 자실체는 기존의 극성 물질 추출방법을 통하여 극성 생리활성물질로 β-glucan을 가지고 있으며 초임계 추출을 통하여 비극성 생리활성물질로 linoleic acid를 포함하고 있음을 알 수 있었다.

제 5 절 참 고 문 헌

1. Bradford, M. M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analyt. Biochem.*, 72, 248-254

2. Dais, P. and A. S. Perlin (1982), High-field, ^{13}C-N.M.R. spectroscopy of -D-Glucans, Amylopectin, and Glycogen, *Carbohydrate Research,* 100, 103-116

3. Harry, E. E. and T. Brain (1994), NMR spectral analysis of a water-insoluble (1→3)--D-Glucan isolated from *Saccharomyces cerevisiae, Carbohydrate Research,* 258, 307-311

4. Choi, J. W., D. Y. Ryu, E. K. Hong, M. S. Kwon, J. S. Han, and W. H. Lee (2000), Microwave assisted extration of physiologically active materials from *Agaricus blazei* fruiting bodies, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, 15, 307-312

5. Kim, B. K., J. E. James, K. S. Chung, H. S. Chung, and E. C. Choi (1982), Antitumor components of *Cryptoporus volvatus, Kor. J. Mycol.*, 10(3), 111-117

6. Kawagishi, H., I. Ryuichi, T. Kanao, M. Takashi, S. Keishiro, I.

Hitoshi, H. Toshihiko, and N. Takuji (1989), Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies, *Carbohydr. Res.*, 186, 267-273

7. Gandon, C. and B. Maud (1998), Structural studies of the extracellular β-D-glucans from *Phytophthora parasitica dastur*, *Carbohydr. Res.*, 313, 259-263

8. Dais, P. and S. P. Arthur (1982), High-Field, ^{13}C-NMR. Spectroscopy of β-D-glucans, Amylopectin, and Glycogen, *Carbohydr. Res.*, 100, 103-116

9. Kitamura, S., H. Tsutomu, K. Kurita, K. Takeo, H. Chihiro, I. W ataru, K. Tabata, A. Elgsaeter, and T. S. Bjorn (1994), An antitumor, branched (1→3)-β-D-glucan from a water extract of fruiting bodies of *Crypotoporus volvatus*, *Carbohydr. Res.*, 263, 111-121

10. Choi, J. W., D. Y. Ryu, Y. K. Kim, E. K. Hong, M. S. Kwon, and J. S. Han (2000), Extraction and purification of bioactive materials from *Agaricus blazei* fruiting bodies, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, accepted

11. Choi, J. W., D. Y. Ryu, Y. K. Kim, S. Y. Kim, K. P. Yoo, and E. K. Hong (2000), Supercritical fluid extraction of physiologically

active materials from *Agaricus blazei* fruiting bodies, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, 15, 408-410

12. Chang, S. T. and P. G. Miles (1989), Edible mushroom and their cultivation, p27, CRC press, New York

13. Sugihara, T., Y. Yoshioka, and K. Nishioka (1972) Anticomplementary activity of antitumor polysaccharides, *Nature New Biol.*, 238, 59-60

14. Mizumo, T. (1990), Antitumor acitivity and some properties of water soluble polysaccharides from the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill, *Agric. Biol. Chem.*, 54(11), 2889-2896

15. Itoh, H., H. Amano, and H. Noda (1994), Inhibitory action of a (1 →6)-β-D-glucan-protein complex isolated from *Agaricus blazei* Murill on meth a fibrosarcoma-bearing mice and its antitumor activity mechanism, *Jpn. J. Pharmacol.*, 66, 265-271

16. Mizuno, T., R. Inagaki, T. Kanao, and T. Hagiwara (1990), Antitumor activity and some properties of water-insoluble hetero-glycans trom "Himematsutake" the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill, *Agric. Biol. Chem.*, 54(11), 2897-2905

17. Kawagishi, H., R. Inagaki, and T. Kanao (1989), Fraction and

antitumor activity of the water insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. *Carbohydrate Research*, 186, 267-273

18. Mizuno, T., M. Kato, and M. Shimizu (1984), Fractionation, structural features and antitumor activity of water-soluble polysaccharide from 'Reishi', the fruit body of *Ganoderma lucidum*, *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 58(9), 873-879

19. Johnston, K. (1984), Supercritical fluids, in *Kirk-Othmer Encycolpedia of Chemical Technology*, supplement. *Vol., 3rd ed.*, p872, Kird-Othmer, New York

20. Charpentier, B. A. (1988), Supercritical fluid extration and chromatography-tehniques and applications, in *ACS. Symp. Ser., 366*, Am. Chem. Soc., Washington, DC.

21. McHugh, M. and V. Krukonis (1986), Supercritical fluid extraction-principles and practice, butterworths, London

22. McHugh, M. and V. J. Kruknis (1989), Superctitical fluids, in *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, *Vol.* 16, John Wiley, New York

23. Brennecke, J. F. and C. A. Eckert (1989), Journal Review, Phase equilibria for supercritical fluid process design, *AIChE J.*, 35,

24. John, M. O. (1984), A history of microwave heating applications, *Transactions on Microwave Theory and Techniques*, 9, 1200-1223

25. David, M. P. (1990), Microwave engineering, 2nd ed, p1-11, Addison- Wesley Publishing Company, New York

26. Misaki, A., M. Kakuta, T. Sasaki, T. Motohiro, and M. Hideki (1981), Studies on interrelation of structure and antitumor effects of polysaccharides: Antitumor action of periodatemodified, branched (1→3)-β-D-glycan of *Auricularia auricula-judae*, and other polysaccharides containing (1→3)-glycosidic linkages, *Carbohydr. Res.*, 92, 115-129

27. Tabata, K., I. wataru, K. Takemasa, K. Shozo, and M. Akira (1981), Ultrasonic degradation of schizophyllan, an antitumor polysaccharide produced by *schizophyllum commune* fries, *Carbohydr. Res.*, 89, 121-135

28. Nakamura, T., I. Hitoshi, S. Keishiro, S. Toshimitsu and A. Akihiro (1990), Antitymor activity and some properties of water-insoluble hetero-glycans from himematsutake, the fruiting body of *Agaricus blazei murill*, *Agric. Biol. Chem.*, 54(11), 2897-2905

29. Takashi, M., T. Hagiwara, T. Nakamura, I. Hitoshi, K. Shimura, T. sumiya, and A. Akihiro (1990), Antitumor activity and some properties of water-soluble polysacchariees from himematsutake, the fruition boky of *Agaricus blazei murill*, *Agric. Biol. Chem.*, 54(11), 2889-2896

제 5 장 아가리쿠스 버섯 추출물의 가공과정에 따른 효능검색

제 1 절 자실체 추출물의 면역학적 작용평가

1. In vitro내에서 종양세포주에 대한 항암작용 검색

열수 추출 *Agaricus blazei*의 in vitro내에서의 종양세포주에 대한 억제 효과를 검토하였다.

가. 연구 수행 방법

1) 종양세포의 배양

*Agaricus blazei*가 in vitro내에서 종양세포주에 미치는 항암 효과를 보기 위해서 human gastric carcinoma (KATO-III), human lung carcinoma (A-549), human breast adenocarcinoma (MCF-7), mouse lymphoma (Sarcoma-180), mouse lymphoma (Yac-1)는 Korea Cell Line Bank(KCLB)로부터 구입하였고 사람의 간암세포인 Hep-3B (Human hepatocellular carcinoma)는 American Tissue Culture Collection(ATCC, HB8064)로부터 구입하였다. Hep-3B(간암)와 Sarcoma-180을 제외한 모든 세포주들은 RPMI-1640배지에서 10% fetal bovine serum(FBS), 37℃, 5% CO_2에 적응시켜 배양하였다(Table 1). 암세포 배양은 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, 6.7 g)과 nutrient mixture F-12(5.3 g)를 1:1(V/V) mixture, gentamicin sulfate 40 mg, sodium bicarbonate 2 g, hepes buffer 2 g을 3차 증류수에 용해시킨 후 pH 7.0-7.2로 조절하여 20% FBS로

보강된 배지에 접종하여 37℃(5% CO_2 incubator)에서 24시간 배양하였다. Hep-3B(간암)와 Sarcoma-180을 제외한 모든 세포주들은 RPMI-1640배지에서 10% FBS, 37℃, 5% CO_2에 적응시켜 배양하였다.

2) In vitro내에서 SRB(sulforhodamine B) method를 이용한 종양세포주에 대한 증식 억제능력 평가

SRB(sulforhodamine B) 분석은 세포 단백질 염색을 이용하여 세포 생육정도를 측정하는 방법이다. 종양세포 생육 저해효과 실험은 96 well plate의 각 well에 5×10^4/mL의 다양한 cell line(MCF-7, A-549, Hep-3B)이 포함된 100 ㎕의 배지를 가하여 37℃(5% CO_2 incubator)에서 24시간 배양한 후 0.1 ㎍/mL, 1㎍ /mL, 10㎍ /mL 및 100 ㎍ /mL의 각 농도의 *Agaricus blazei*가 들어있는 100 ㎕의 배지를 가한 후 48시간 배양한다. 48시간 후 배지를 aspirator로 제거하고 미리 cooling한 TCA(trichloro acetic acid, 최종농도 10%) 100 ㎕를 가하여 4℃에서 1시간 방치한다. 그리고 증류수로 5회 세척하여 건조시킨 후 각 well에 1% acetic acid에 녹인 SRB(sulforhodamine B) 용액 100 ㎕를 가한다. 그리고 상온에서 30분 염색한 후 1% acetic acid로 5회 세척하여 건조시킨다. 건조시킨 후 10 mM Tris buffer 150 ㎕로 염색액을 충분히 녹인 다음 ELISA reader로 540nm에서 흡광도 값을 측정하였다.

3) MTT(3-(4,5-dimethylthiazal-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromine) method를 이용한 종양세포의 *Agaricus blazei* 추출액에 의한 cell viability 변화도 측정

MTT assay는 cell의 생육 및 분화를 측정하는 colorimetric assay로

서 살아있는 cell의 미토콘드리아내 dehydrogenase enzyme이 노란 수용성 물질인 MTT에 의해 dark blue formazan 생성을 기초로 하였다. 96 well microtiter plate에 KATO-III ,Sarcoma-180, Yac-1 cell및 10% fetal bovine serum을 함유한 RPMI 1640배지를 1×10^5/mL 농도로 각각의 well에 180 ㎕씩 넣고 37℃, 5% CO_2에서 24시간 incubation한 다음 0.1 ㎍/mL, 1 ㎍/mL, 10 ㎍/mL 및 100 ㎍/mL의 각 농도별 *Agaricus blazei*의 시료를 첨가하고 최종 volume이 200 ㎕가 되게 배지를 채운 후 48시간 incubation한 다음 MTT soln(2 mg/mL)을 50 ㎕씩 각 well에 첨가하고 formazan을 형성시키기 위해 4시간 동안 incubation한 후 aspirator로 상등액을 제거하고 150 ㎕의 DMSO(dimethylsulfoxide)를 첨가하여 formazan을 녹인 다음 ELISA reader를 이용하여 540㎚에서 흡광도 값을 측정하였다.

나. 연구수행 내용 및 결과

1) 연구 수행 내용

본 연구는 *Agaricus blazei*의 열수추출물이 in vitro내에서 종양세포주에 대해 나타내는 세포독성을 항암작용의 지표로 삼았으며 본 실험 결과는 향후 가공제품을 만들어 상품화하려고 할 때 객관적인 실험 자료로서 국내에서 보유하여야 할 중요한 정보를 제공할 수 있기에 매우 중요하다고 하겠다. 시험군의 평균 O.D.값을 구하여 대조군(100% 생존군)의 평균 O.D. 값에 대한 백분율을 산출하여 저해효과로 하였다.

2) 연구결과

Table 2와 3은 SRB method와 MTT method를 종합한 결과로 *Agaricus blazei*를 모든 종양세포에 3, 10, 30, 100, 그리고 1,000 ppm을 첨가하였

다. 그리고 세포의 수는 5×10^5/well, 1×10^6/well 그리고 1×10^7/well의 3 가지로 하였는데 실험에 사용한 모든 암세포들이 공히 억제작용을 나타냈으며 그 중에서도 특히 사람의 위암 세포주인 KATO-III의 경우 1×10^7/well의 군에서 65.9%, 간암 세포주인 Hep3B의 경우는 1×10^6/well의 군에서 78.2% 그리고 폐암세포주인 A-549의 경우는 고농도인 1,000 ppm에서 세포의 농도에 관계없이 공히 70%가 넘는 발육억제효과를 나타내었다. 이에 반하여 같은 사람의 자궁암 세포주인 MCF-7의 발육억제 효과는 앞의 3가지 세포주에 비하여 상대적으로 약하여 1,000 ppm의 농도의 투여군에서 5×10^5/well 군의 경우 16.8%의 발육억제 효과를 나타내었다.

2. In vitro내에서 면역세포주에 미치는 항암/항염효과 탐색

In vitro내에서 면역세포주에 미치는 항암/항염효과를 알아 보기위해 사람의 혈액으로부터 분리한 탐식세포에 대한 영향을 알아보았다.

가. 연구 수행 방법

건강한 사람의 혈액으로부터 Double-density Percoll을 이용하여 상층으로부터는 neutrophil을 분리하고 하층의 mononuclear cell로부터는 monocyte를 분리하여 chemiluminescence 용 media인 phenol red가 함유되지않은 1%의 BSA가 첨가된 RPMI-1640 배지에 각각 1 × 10^6/mL과 5 × 10^5/mℓ로 세포를 고정한 후 *Agaricus blazei*의 열수추출물을 3 ppm, 10 ppm, 30 ppm, 100 ppm, 및 1,000 ppm씩 첨가한 후 neutrophil은 30분간, 그리고 monocyte는 1시간 사전 배양한 후 탐식능력의 변화에 따른 respiratory burst시 생성하는 reactive oxygen(RO)를 측정하기 위하여 luminol을 amplifier로 하여 사전에 5분간 O_2^- 의 발생을 증폭시켰으며 보

체 C3b와 opsonization시킨 zymosan particle을 stimulator로 하여 40분간 Luminometer(Berthold LB-9505)를 이용하여 chemiluminescense를 측정하였다.

나. 연구수행 내용 및 결과

1) 연구 수행 내용

본 연구는 *Agaricus blazei*의 열수추출물이 in vitro내에서 면역세포인 polymorphonuclear granular neutrophil(PMN : 호중구)와 monocyte(단핵구)의 기능에 어떠한 영향을 주는 가를 검색키 위함이다. 본 연구내용 및 결과는 국내외적으로 처음 시도된 것으로 향후 본 과제의 연구 결과를 바탕으로 가공제품을 생산하여 산업화 및 실용화시킬 경우 본 연구진의 방법대로 추출한 *Agaricus blazei*의 면역약리학적인 효능 검증이 없이는 특히 국내 연구진의 고유한 방법에 의한 효과 검증 없이는 매우 불리한 처지에 있을 수 있기에 이에 대한 정확한 효과 검증의 차원에서 수행되었다.

2) 연구결과

본 연구결과로 미루어 볼 때 *Agaricus blazei*의 자실체 열수추출물은 일반적인 버섯 추출물의 갖는 것으로 알려진 면역증강작용이상의 강력한 면역증강작용을 하는 것을 알 수 있었으며 호중구나 단핵구 모두 3 ppm부터 100 ppm의 농도까지는 농도에 비례한 증가된 탐식작용을 나타내었으며 1,000 ppm의 농도에서는 대조군에 비하여서는 여전히 현저히 증가된 탐식작용을 나타내긴 하였지만 100 ppm의 농도보다는 감소되기 시작하는 것을 관찰할 수 있었다. 그리고 단핵구의 탐식작용의 경우 100 ppm의 *Agaricus blazei* 처리군의 경우 대조군에 비하여 797% 라는 강력한 탐식작용을 함으로써 강력한 항염증효과가 있음을 알 수 있었다(Table 4와 5).

3. 주요 질병원인균에 대한 in vitro 항균효과 검증

열수추출물의 주요 질병원인균에 대한 in vitro내의 항균효과를 알아보았다.

가. 연구수행 방법

1) 사용한 균주 및 배지

Table 6의 균주를 국립수의과학검역원 및 강원도 보건환경연구원에서 분양받아 일차적으로 증식용 배지에 세균을 증식시킨 다음 탁도계를 이용하여 10^8 /mL로 농도를 맞춘 후 각각의 세균에 적합한 분리 배지에 멸균된 면봉으로 도말하여 사용하였다. 아울러 무균 처리된 paper disc에 충분히 적시어 세균이 도말된 배지 위에 올려놓았다. 그리고 각 세균의 특성에 따라 적합한 시간 동안 35±1℃의 배양기에서 배양한 후 결과를 관찰하였다. 즉 억제환의 직경을 측정하여 대조군과 비교하였다. 이때 positive control로는 비교적 새로운 항생제인 quinolone계의 norfloxacin (disc potency:10 ㎍)을 사용하였으며 버섯 자실체는 강원대 홍억기교수와 서강대 최정우 교수팀에서 분리한 자실체 성분을 최고농도 50,000 ppm부터 10배씩 희석하여 5 ppm까지 사용하였다.

나. 연구수행 내용 및 결과

1) 연구수행 내용

본 연구는 *Agaricus blazei* 추출물을 가지고 주요 질병원인균에 대한 항균효과를 검토하였다. 국내에서 일반적으로 세균성 질환의 주 원인균으로 알려진 것들을 택하여 항균실험을 수행하였으며 positive control로는 최신의 항생제의 하나인 quinolone계의 norfloxacin을 택하였다.

2) 연구 결과

Agaricus blazei 버섯 자실체의 각종 병원성 세균에 대한 항균력을 비교한 Table 7과 8에서 보는 바와 같이 각종 질병의 원인균으로서 문제시 되는 중요한 세균들은 모두 버섯 자실체의 농도에 관계없이 감수성이 없는 것으로 판명되었다. 대조군으로 사용된 quinolone계의 norfloxacin 은 각각의 세균에 모두 항균효과를 나타내었다. 이 결과는 *Agaricus blazei*의 자실체 성분이 세균들에 직접 작용하지 않아 항균력은 지니지 아니하고 주된 작용이 면역기능과 깊은 관련이 있음을 추정케 하였다.

Table 1. 종양세포의 생육저해효과 실험에 사용한 세포주

Cell line	Target organ 및 cell	배양액
Sarcoma 180	mouse lymphoma	DMEM
YAC-1	T-lymphoma	RPMI-1640
MCF-7	유방암	RPMI-1640
KATO-III	위암	RPMI-1640
Hep-3B	간암	DMEM
A-549	폐암	RPMI-1640

Table 2. 종양세포의 *Agaricus blazei*에 의한 생육저해효과 I

세포주 / well / 농도	Sarcoma-180			YAC-1			MCF-7		
	5×10^5	1×10^5	1×10^4	5×10^5	1×10^5	1×10^4	5×10^5	1×10^5	1×10^4
control	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3 ppm	3.6[a)]	3.9	2.4	1.4	1.2	1.0	2.0	2.5	2.1
10 ppm	4.4	3.2	2.8	2.6	1.9	1.2	4.2	3.8	2.6
30 ppm	9.2	10.8	7.3	9.9	11.0	8.4	7.4	7.1	5.4
100 ppm	17.3	19.3	14.0	24.9	20.3	18.4	11.3	10.7	8.9
1,000 ppm	32	30.5	26.3	29.0	25.9	22.6	16.8	15.6	13.4

a)는 %, 모든 실험 결과는 triplicate에 의함

Table 3. 종양세포의 *Agaricus blazei*에 의한 생육저해효과 II

세포주 /well / 농도	KATO-III			Hep-3B			A-549		
	5×10^5	1×10^6	1×10^7	5×10^5	1×10^6	1×10^7	5×10^5	1×10^6	1×10^7
control	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3 ppm	11.2[a)]	12.8	10.7	5.0	8.3	11.8	4.3	2.9	3.6
10 ppm	13.6	14.2	11.5	7.5	13.8	15.9	6.3	9.1	8.2
30 ppm	25.9	20.5	21.0	18.4	27.4	23.1	38.1	26.7	33.5
100 ppm	48.1	47.3	39.4	50.1	45.9	50.7	37.3	42.5	54.3
1,000 ppm	64.7	63.0	65.9	67.5	78.2	73.0	73.2	75.2	76.1

a)는 %, 모든 실험 결과는 triplicate에 의함

Table 4. *Agaricus blazei* 자실체 열수추출물이 사람 neutrophil의 chemiluminescence 생성에 미치는 효과

	total cpm[a]	증가율(%)
control	4.044×10^9	-
3 ppm	4.371×10^9	8.0
10 ppm	4.925×10^9	22.9
30 ppm	5.338×10^9	32.0
100 ppm	5.575×10^9	37.9
1,000 ppm	4.830×10^9	19.4

Human neutrophil = 1×10^6/mℓ, [a]cpm = count per minute

Table 5. *Agaricus blazei* 자실체 열수추출물이 사람 monocyte의 chemiluminescence 생성에 미치는 효과

	total cpm[a]	증가율(%)
control	7.233×10^{b}	-
3 ppm	1.973×10^{f}	272
10 ppm	2.497×10^{f}	345
30 ppm	3.635×10^{f}	503
100 ppm	5.764×10^{f}	797
1,000 ppm	1.985×10^{f}	274

Human monocyte = 5×10^{5}/mℓ, [a]cpm = count per minute

Table 6. *Agaricus blazei* 자실체의 항균력시험에 사용된 균주명 및 배지

Strains	증식 및 분리 배지
1. *Staphylococcus aureus-NCTC 5663 β-hem*	Brain-heart-infusion broth Brain-heart-infusion agar
2. *Staphylococcus epidermis-ATCC 12228*	Brain-heart-infusion broth Brain-heart-infusion agar
3. *Streptococcus agalactiae-ATCC 13813*	Brain-heart-infusion broth Brain-heart-infusion agar
4. *Streptococcus pyogenes-ATCC 21059*	Brain-heart-infusion broth Tryptic soy agar
5. *Streptococcus uberis-ATCC 27958*	Brain-heart-infusion broth Tryotuc soy agar
6. *Proteus vulgaris*- 원숭이 분리균	*Escherichia coli* broth MacConkey agar
7. *Klebsiella pneumoniae*	*Escherichia coli* broth MacConkey agar
8. *Escherichia coli*	*Escherichia coli* broth MacConkey agar

Table 7. *Agaricus blazei* 자실체의 농도에 따른 주요 병원 원인체에 대한 항균력(강원대 분리추출물)

농도 (ppm) / 균종	50,000	5,000	500	50	5	Norfloxacin
Staphylococcus aureus	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	15
Staphylococcus epidermis	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	15
Streptococcus agalactiae	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	11
Streptococcus pyogenes	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	10
Streptococcus uberis	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	7
Proteus vulgaris	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	16
Klebsiella pneumoniae	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	12
Escherichia coli	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	15

(단위:mm), N.D.=no detectable

Table 8. *Agaricus blazei* 자실체의 농도에 따른 주요 병원 원인체에 대한 항균력(서강대 분리추출물)

농도 (ppm) / 균종	50,000	5,000	500	50	5	Norfloxacin
Staphylococcus aureus	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	15
Staphylococcus epidermis	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	15
Streptococcus agalactiae	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	11
Streptococcus pyogenes	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	10
Streptococcus uberis	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	7
Proteus vulgaris	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	16
Klebsiella pneumoniae	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	12
Escherichia coli	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	15

(단위:㎜), N.D.=no detectable

제 2 절 자실체 추출물의 병리조직학적 검색

1. In vivo mice 급여에 미치는 단기복용효과 검색

열수추출한 *Agaricus blazei*를 종양유발 mice에 복용하여 면역반응에 미치는 단기복용효과를 검토하였다.

가. 연구 수행 방법

1) 수컷의 KSN-nu 마우스와 ICR 마우스를 선정하여 각각 대조군과 Sarcoma-180투여군, 100 mg/kg, 300 mg/kg의 네 군으로 구분하여, 투여를 위해 미리 마우스 복강내에서 배양된 Sarcoma-180을 대조군을 제외한 모든 투여군에 $5x10^6$개씩 접종하였다. 10일뒤 암이 유발된 마우스를 대상으로 열수추출 *Agaricus blazei*를 100 mg/kg과 300 mg/kg의 농도로 경구 투여하였다. 투여후 10일째와 17일째에 각 군별 5마리를 ether로 흡입 마취후 체중, 간, 비장, 암괴의 무게를 측정하고, 비장은 4℃ HBSS에 보관 실험에 사용했다.

2) 적출된 비장에서 필요한 세포를 회수하기 위해 철망에 잘 갈은 후 NH_4Cl-tris용액을 이용 적혈구를 제거하고 HBSS로 3회 세척하여 사용하였다. 회수된 세포는 10% FBS-RPMI-1640 배지에 $1x10^6$개로 고정후, 형광물질로 conjugation된 antibody로 30분간 염색후 위의 배지로 3회 세척하여 1% formalin-PBS로 고정 측정시까지 보관하였다. 염색 직전부터 측정시까지 모든 실험은 4℃에서 실행되었다.

3) 본 실험에 사용된 antibody는 Table 9에 나타내었다.

나. 연구수행 내용 및 결과

1) 연구 수행 내용

앞의 실험은 in vitro상의 결과였으나 실제로 향후 가공제품을 만들어 정확한 국내산 *Agaricus blazei*의 효능을 논하려고 할 때는 in vivo에서의 연구결과가 필연적으로 요구되며 이것이 바로 인체의 작용에 대한 외삽을 의미할 수 있다. 그리하여 비장의 변화, 면역세포의 변화 등을 수행하였다.

2) 연구 결과

가) Spleen의 변화

체중 대 비장의 비율은 Fig.1에서 보는 바와 같이 대조군에 비하여 투여군 전체가 날짜의 변화에 따라 증가하는 양상을 띄며, KSN-nu mice의 경우는 전체적으로 Sarcoma-180 투여로 암이 유발된 군에서 통계적 유의성 있는 변화를 나타냈다. 특히, KSN-nu mice의 경우 10일차에 대조군의 0.3883%에 비하여 0.7721%와 0.7406%, 1.0622%로 유의성 있는 비장증대를 나타냈다. 이는 ICR에 비하여 흉선이 없는 KSN-nu mice에서는 비장이 1차 면역 반응 장기로서 항원에 대한 중추적인 기능을 하고 있음을 알 수 있었다. 비장의 비율은 아래 식으로 구했다.

$$Spleen/Body\ weight\ Ratio(\%) = \frac{Spleen\ Weight}{Body\ Weight - Tumor\ Weight}$$

나) Cell subpopulation의 변화

10일차 결과에서 ICR mice의 경우 300 mg/kg 투여군이 CD3+(pan T cell)과 CD3+, CD25+ (activated T cell), CD4+(MHC Class II-helper T cell), CD40+(B cell)에서 통계적으로 유의성있는 증가를 나타냈다. 반면

양성 대조군으로서 암을 갖고 saline만을 투여한 mice는 대조군에 비하여 CD3+와 CD3 및 CD25 double+에서 줄어드는 양상을 보였다(Table 10). KSN-nu Mice에서는 CD8+(cytotoxic or suppressor T cell)을 제외한 모든 cell population에 통계적으로 유의성 있는 증가를 나타냈으며, CD4+와 CD25+(IL-2 receptor)를 발현한 T cell subpopulation을 제외하고 가장 높은 값을 나타냈다. 또한 300 mg/kg 역시 대조군에 비하여 대부분 높은 값을 보였으나, 100 mg/kg과는 유의성이 없었다(Table 11).

17일차 결과에서 ICR Mice에서 CD3+와 CD4+에서 대조군(2.97%)에 비해 투여군이 현저한 증가를 보였다. 특히 100mg/kg(31.22%)은 10배에 가까운 증가를 나타냈으며, CD40 역시 투여군이 대보군에 비해 유의성 있는 증가를 나타냈다. 반면 NKR+는 투여군간에 유의성은 없으나, 대조군(15.99%)에 비교해서는 통계적으로 유의성 있는 감소를 나타냈다(Table 12). KSN-nu Mice에서 CD3+와 NKR은 각각 투여군이 대조군(1.29%, 12.74%)에 비해 통계적 유의성 있는 증가를 보였으나, CD3와 CD25를 동시에 발현하는 subpopulation과 CD4+, CD8+, TNFα, CD40+에서는 투여군이 대조군에 비해 감소하였다(Table 13).

투여 기간별 자료의 비교를 통해 KSN-nu Mice에서 saline 투여군과 300 mg/kg 투여군에서 세포군의 변화는 100 mg/kg과 비슷한 경향을 보였으며(Table 13), 전체 세포군의 비율이 떨어짐을 보였다(Fig. 2, 3, 4). ICR mice에서 saline만을 투여한 군은 CD3와 CD25를 동시에 발현하는 세포군과 CD3+, CD4+, CD8+, TNFα+, TCR α/β+, CD40+인 세포군에서 유의성있는 증가를 보였다. 반면 투여군의 경우는 CD3와 CD25를 동시에 발현하는 세포군과 CD4+세포군에서 10일차보다 17일차에서 증가하였다 (Table 10과 11).

이상의 결과에서 열수추출한 *Agaricus blazei* 투여는 종양이 발생한 KSN-nu Mice에서 면역계의 초기 반응에서 T cell의 활성을 유도했음을

알 수 있었다(Table 11). 그러나 시간이 지남에 따라 saline만 투여한 군 역시 *Agaricus blazei*투여군과 동일한 비율의 세포군을 보였다(Table 13). 특히 ICR mice에서 CD3+와 CD25+세포군의 증가와 항원제시 세포로부터 signal을 받아 면역 반응을 증진시키는 MHC class II를 발현하는 세포군의 증가는 *Agaricus blazei*의 투여가 면역계를 증진시킴을 확인할 수 있었다. 또한 ICR mice에서 Sarcoma-180의 투여로 유래된 tumor의 제거에 lymphocyte가 주요 역할을 하는 것으로 추측된다. 특히 helper T cell의 유의성 있는 증가는 signal transduction을 통해 B cell과 cytotoxic T cell의 항원 특이적인 cellular immunity를 증대시킴으로써 antitumor activity를 나타냄을 확인할 수 있었다(Table 12). 이는 *Agaricus blazei* 가 tumor에 대해서 직접적인 activity를 보이는 것이 아닌 면역계의 증진을 통한 간접적인 antitumor activity를 보이는 것으로 생각된다. 이런 경향은 항원제시 세포로부터 signal을 받아들이는 TCR α/β receptor를 발현하는 세포군이 100 mg/kg 투여한 KSN-nu mice에서 유의성 있는 증가를 보이는 것으로도 확인할 수 있다(Table 13).

또한 체중 대 비장의 비율은 흉선이 없는 KSN-nu mice에서 상대적으로 T cell의 분화를 할 수 있는 비장이 현저히 증가한 것으로 생각된다 (Fig. 1). 투여 용량에 따른 효과로는 KSN-nu mice에서는 100 mg/kg의 투여군이 ICR에서는 300 mg/kg의 투여군이 더 우위를 나타냈으며, 이는 Hiroko 등의 보고에서 용량과 무관한 생존력을 보였다는 점에서 차이를 보였다.

2. In vivio mice 급여에 미치는 장기복용효과 검색

열수추출한 *Agaricus blazei*를 종양유발 nude mice에 복용하여 항산화 효소활성에 미치는 장기복용효과를 검토하였다.

가. 연구 수행 방법

1) Sarcoma-180을 투여, 암을 유발한 KSN-nu 마우스에서의 종양 발생 평가

계대배양용으로 수컷 ICR 마우스의 복강내에 5 X 10^6개의 Sarcoma-180을 주사하여, 1주일후 같은 요령으로 종양세포주를 유지한다. 계대배양용 마우스를 경추탈구로 안락사시킨 후, 마우스 피부 표면을 알콜분무로 소독한 다음, 피부를 벗기고 복막이 보이면, 일부를 외과용 가위로 cutting 후, 복수를 채취하며 PBS(phosphate buffered saline)를 복강내에 주입하면서 지속적으로 최대로 복강내로 주입한 sarcoma-180을 50 mL cornical tube에 모은다. 모은 세포는 얼음내에 유지하면서 PBS를 부어 1000 rpm으로 4 ℃에서 5분간 원심분리로 washing하는 과정을 3번 한다. 5주령 수컷 ICR 마우스의 등에 5 X 10^6개의 Sarcoma-180 세포를 피하접종한다.

2) KSN-nu 마우스 아가리쿠스의 투여 및 실험군

수컷의 KSN-nu 마우스와 ICR 마우스를 선정하여 각각 대조군과 Sarcoma-180투여군, 100 mg/kg, 300 mg/kg의 네 군으로 구분하여, 투여를 위해 미리 마우스 복강내에서 배양된 Sarcoma-180을 대조군을 제외한 모든 투여군에 5x10^6개 씩 접종하였다. 10일뒤 암이 유발된 마우스를 대상으로 열수추출 *Agaricus blazei*를 100 mg/kg과 300 mg/kg의 농도로 경구 투여하였다. 투여 후 10일째와 17일째에 각 군별 5마리를 ether로 흡입 마취 후

체중, 간, 비장, 암괴의 무게를 측정하고, 비장은 4℃ HBSS에 보관 실험에 사용했다.

3) 시료의 채취

혈액은 절식후 ether로 흡입 마취후 복강 절개하여 1 mL 주사기를 사용하여 심장채혈하고 600 g에서 10분간 원심분리하여 혈청을 얻어 분석실험에 사용하였다. 적출한 간조직은 (0.25M/0.1mM, Sucrose/EDTA)용액을 가하여 빙냉하에서 마쇄한 균질액(10w/v%)을 4℃에서 600 g로 10분간 원심분리한 후 상층액을 취해 30초간 ultra-sonication하여 mitochondria를 파괴시킨 후 이를 효소활성도 측정 시료액으로 사용하였다. 효소활성은 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 Lowry법에 준해 측정한 단백질 mg당 specific activity로 나타내었다

4) Catalase 활성측정

Catalase 활성도는 Aebi의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 50 mM phosphate buffer(ph 7.0) 2.0 mL와 30 mM 과산화수소 1.0 mL를 포함하는 반응 혼합액에 효소액 20 ㎕를 가한 다음 20℃에서 파장 240nm서의 흡광도의 변화를 1분간 측정했다. 대조실험으로는 기질인 30 mM 과산화수소 용액 대신 50 mM phosphate buffer(pH 7.0) 1.0 mL을 가하고 다른 조건은 위와 동일하게 하여 흡광도의 변화를 측정하였다. 효소의 활성도는 1분동안의 1 ㎛의 과산화수소를 분해시키는 효소의 양을 1 unit로 하여 표시하였다.

5) Mn-SOD 활성측정

SOD 활성은 superoxide radical에 의해 환원되는 cytochrome c가 SOD에 의해 억제되는 것을 이용하여 측정하였다 즉, 세포질에 존재하는 SOD의

활성측정 반응 혼합액은 0.1 mM potassium phosphate buffer와 0.1 mM cytochrome c, 0.5 mM xanthine, 2 mM KCN과 반응액의 존재하는 미립자를 용해하기 위해 sodium deoxycholate를 추가한 것을 사용하였다. 이 혼합액에 0.1 mL의 xanthine oxidase와 시료를 10 $\mu\ell$를 가한 후 파장 550nm에서의 흡광도 증가속도를 측정하였다. 효소의 활성도는 위의 조건에서 cytochrome c의 환원속도를 50% 억제하는 효소의 양을 unit로 하여 표시하였다

6) Glutathione peroxidase 활성측정

GSH-PX의 활성도 측정은 GSH, H_2O_2를 기질로 사용하고 NADPH, GSSGR을 촉매로 하여 GSH-PX효소 시료와 함께 반응하는 동안의 GSH는 H_2O_2에 의해 GSSG로 산화되고 이것이 다시 GSSGR과 NADPH에 의해 GSH로 환원될 때 NADPH는 산화되는데 이때 NADPH가 NADP로 산화되는 정도를 time scanning하여 NADPH의 분자흡광계수를 이용하여 효소의 활성을 산출하는 Palia와 Valentine의 법등에 의하였다. 효소의 활성의 단위는 1분간 1 mg의 단백이 반응하여 산화된 NADPH를 nM로 나타내었다.

7) 과산화지질의 정량(MDA)

과산화지질의 함량측정은 malondialdehyde를 thiobarbituric acid로 비색정량하는 Ohakaw 등의 방법에 준하여 이용하였으며 측정된값은 N : normal group의 평균값에 대한 백분율로 표시하였다.

8) 통계처리

실험결과는 실험군당 평균±표준편차로 표시하였고, 각 군간 평균치의 통계적 유의성은 SAS package를 이용하여 α=0.05 수준에서 Duncan's

multiple test에 의해 검정하였다.

나. 연구수행 내용 및 결과

1) 연구수행 내용

Sarcoma-180등과 같은 악성종양이 생체내의 발육시 정상적인 우리 몸의 대사과정이 변형되고 질병상태가 진전됨에 따라 결국 죽음에 이른다. 이와같이 일반적으로 free-radical의 생성과 antioxidant의 방어력 사이의 장애가 생겨 세포손상을 일으키는 oxidative stress 상태가 발생되며 이러한 비정상적인 대사과정 중 근래 부각되는 활성산소와 관계되는 이론을 바탕으로 종양의 증식에 따라 oxidative stress 상태에서 우리 몸에 방어기능이 *Agaricus blazei*버섯에 의해서 어떻게 향상되어 가는지 연구하였다.

구체적으로 생명력 유지의 필수인 산소의 유익성 이외의 산소에 의한 독성에 대한 free radical 이론중 활성산소와 관계된 노화, 발암등과 같은 많은 질환과 생체내 지질 및 단백질등 주요 물질의 변성, 파괴 등 세부적으로 세포 소기관의 막지질의 과산화에 의한 microsome, mitochondria등의 세포소기관의 손상, 효소 단백질중의 아미노산 잔기의 산화를 통한 비가역적 불활성화, 핵산염기의 변형 및 산화적 분해절단을 통한 손상, DNA의 손상에 의한 암화등 free-radical의 유해작용으로부터 생체를 보호하는 antioxidant의 방어효과를 *Agaricus blazei*버섯을 이용한 실험으로 규명하려 하였다.

2) 연구 수행 결과

Table 14에는 Mn-SOD 활성도와 TNF-α receptor의 발현도를 나타내었다. 아가리쿠스 100 mg/kg 투여한 군의 Mn-SOD 활성도와 TNF-α receptor

의 발현도가 유의적으로 높았는데 이는 TNF에 의해서 Mn-SOD가 유도되는 단백질이라는 Harris의 보고와 일치하는 결과이다. SOD는 동물의 거의 모든 조직에 분포되어 있는데 간에 특히 많이 존재한다. SOD는 생성된 superoxide 유리기를 독성이 보다 적은 과산화수소로 대사시키는 효소로 알려져 있으며 아가리쿠스버섯추출물을 100 mg/kg 투여한 군에서는 종양에 의한 SOD의 직접적인 손상 또는 TNF-α에 의한 SOD 단백질 합성의 저해를 억제하였기 때문이라고 생각된다.

Table 15는 catalase와 glutathione peroxidase의 활성도를 나타낸 것이다. Catalase는 일반적으로 과산화수소가 hydroxyl유리기 생성에 관여하지 못하도록 과산화수소를 물로 대사시켜주는 효소로 알려져 있고 glutathione peroxidase는 생체내에서 hydrogen peroxide와 GSH로부터 산화형 glutathione(GSSG)과 물 그리고 기타 과산화물(ROOH)과 GSH로부터 GSSG, ROH 및 물을 생성하는 반응을 촉매하는 효소로 조직의 산화적 손상을 방지하고 free-radical을 해독하는 역할을 하는 효소로서 생체내의 종양을 가지고 있는 개체에서는 간과 근육내에서 이들 효소의 활성도가 떨어지며 SE, 비타민 E, 필수지방산의 결핍시 glutathione peroxidase의 활성도가 떨어지는데 catalase의 경우 아가리쿠스 100 mg/kg을 투여한 1AS : 100 mg/kg *Agaricus blazei* water extract and Sarcoma-180 treated group이 S : Sarcoma-180 treated group보다 유의적인 효소활성의 증가를 보였다. 이는 아가리쿠스 투여군이 종양을 가지고 있는 개체에 작용해 간과 근육내에서 이들 효소의 활성도가 떨어지는 것을 방지하였다고 생각된다. Glutathione peroxidase의 활성도 역시 1AS:100 mg/kg *Agaricus blazei* water extract and sarcoma-180 treated group 이 S:Sarcoma-180 treated group보다 유의적인 효소활성의 증가를 보였는데 이는 종양조직의 microsomal fraction의 Vit-E함량이 정상의 경우보다 높은 것을 참고할 때

체내 Vit-E함량이 종양조직에 의해 줄어들어 이로 인해 S:Sarcoma-180 treated group의 glutathione peroxidase의 활성도가 제일 떨어지며 1AS:100 mg/kg *Agaricus blazei* water extract and Sarcoma-180 treated group은 아가리쿠스 버섯 투여가 이를 차단하여 glutathione peroxidase의 합성을 저해한 것으로 사료된다.

Table 16은 간조직중의 과산화지질 함량의 변동을 N:normal group의 평균값에 대한 백분율로 표시하여 나타낸 것이다. 과산화지질의 함량은 N:normal group에 비하여 S:Sarcoma-180 treated group이 유의적으로 증가를 보이는데 이는 Sarcoma-180이 간의 xenobiotics으로 작용하여 대사되어 생성된 free radical이 지질과산화의 증가와 관련되었다고 사료되며 3AS:300 mg/kg *Agaricus blazei* water extract and Sarcoma-180 treated group도 위와 같다고 생각된다. 하지만 유의성은 없지만 1AS:100 mg/kg *Agaricus blazei* water extract and Sarcoma-180 treated group에서 S:Sarcoma-180 treated group과 3AS:300 mg/kg *Agaricus blazei* water extract and Sarcoma-180 treated group보다 과산화 지질의 생성량이 줄어 있음을 볼 때 아가리쿠스 100 mg/kg 투여가 S:Sarcoma-180 에 의한 증가된 과산화물에 대해서 보호작용을 한 것으로 사료된다.

Table 9. List of antibodies used for this research.

형광물질	FITC				PE			
Molecule	CD3	CD8	TNF α	TCR α / β	CD25	CD4	NKR	CD40
Specificity	T3	Ly-2	tumor necrosis factor α	T-cell	IL-2 receptor	Ly-4	NK cell	B-cell

Table 10. Changes of Cell subpopulation in 10day ICR Mice

	Percentages of Positive Cells in 10day ICR Mice(%)			
	Normal mice	Tumor-bearing mice		
	Saline	Saline	100 mg/kg	300 mg/kg
CD3	13.23 (5.21)	8.72 (4.84)	26.25 (6.45)	27.01 (1.76)
CD25		2.55 (0.56)	1.33 (0.39)	1.80 (0.69)
CD3, CD25		0.52 (0.69)	1.02 (0.45)	1.60 (0.38)
CD4	2.97 (0.52)	11.86 (7.41)	15.60 (7.96)	19.31 (4.27)
CD8	8.26 (0.40)	12.70 (6.50)	12.22 (3.69)	11.61 (1.48)
TNF α	2.95 (0.84)	2.30 (1.87)	2.01 (0.47)	1.73 (0.83)
NKR	15.99 (2.29)	15.12 (8.51)	15.08 (8.93)	8.88 (1.88)
TCR α / β		0.23 (0.15)	0.32 (0.17)	0.03 (0.03)
CD40	16.05 (0.72)	33.25 (22.85)	52.41 (21.87)	69.42 (5.42)

Values are the mean (S.D.)

Table 11. Changes of Cell Subpopulation in 10day KSN-nu Mice

	Percentages of Positive Cells in 10day KSN-nu Mice(%)			
	Normal mice	Tumor-bearing mice		
	Saline	Saline	100 mg/kg	300 mg/kg
CD3	1.29 (0.43)	0.67 (0.05)	3.35 (0.96)	1.46 (0.46)
CD25	2.27 (0.26)	2.02 (0.40)	3.48 (0.42)	3.57 (0.83)
CD3, CD25	0.51 (0.09)	0.35 (0.11)	1.30 (0.52)	1.06 (0.42)
CD4	1.76 (0.26)	2.72 (0.38)	3.70 (1.29)	4.44 (0.85)
CD8	20.74 (13.52)	6.73 (1.01)	18.33 (13.35)	8.88 (0.46)
TNF α	2.13 (1.39)	0.81 (0.21)	2.94 (2.36)	1.45 (0.24)
NKR	12.74 (2.37)	16.48 (2.75)	23.26 (4.01)	22.50 (2.50)
TCR α / β	0.50 (0.18)	0.29 (0.14)	1.98 (1.50)	1.01 (0.60)
CD40	80.36 (2.27)	66.41 (5.26)	59.24 (5.84)	53.49 (4.06)

Values are the mean (S.D.)

Table 12. Changes of Cell Subpopulation in 17day ICR Mice

	Percentages of Positive Cells in 17day ICR Mice(%)			
	Normal mice	Tumor-bearing mice		
	Saline	Saline	100mg/kg	300mg/kg
CD3	13.23 (5.21)	39.32 (21.63)	36.13 (2.44)	29.93 (7.49)
CD25		0.77 (0.09)	0.68 (0.02)	0.79 (0.11)
CD3, CD25		1.96 (0.80)	2.20 (0.10)	1.99 (0.60)
CD4	2.97 (0.52)	19.29 (10.53)	31.22 (1.92)	22.37 (5.56)
CD8	8.26 (0.40)	20.87 (20.01)	7.91 (0.41)	10.57 (2.56)
TNF α	2.95 (0.84)	6.29 (9.27)	0.08 (0.01)	1.27 (1.24)
NKR	15.99 (2.29)	9.26 (2.25)	7.34 (0.90)	6.67 (2.99)
TCR α / β		1.97 (2.55)	0.08 (0.03)	0.52 (0.79)
CD40	16.05 (0.72)	44.11 (17.03)	50.27 (1.47)	52.47 (7.62)

Values are the mean (S.D.)

Table 13. Changes of Cell subpopulation in 17day KSN-nu Mice

	Percentages of Positive Cells in 17day KSN-nu Mice(%)			
	Normal mice	Tumor-bearing mice		
	Saline	Saline	100 mg/kg	300 mg/kg
CD3	1.29 (0.43)	3.91 (0.83)	3.28 (0.65)	3.52 (0.78)
CD25	2.27 (0.26)	1.99 (0.47)	1.78 (1.11)	2.26 (0.87)
CD3, CD25	0.51 (0.09)	0.24 (0.06)	0.21 (0.13)	0.25 (0.09)
CD4	1.76 (0.26)	1.03 (0.22)	1.01 (0.32)	1.31 (0.63)
CD8	20.74 (13.52)	8.71 (2.15)	7.42 (2.81)	8.06 (0.46)
TNF α	2.13 (1.39)	0.80 (0.12)	0.64 (0.16)	0.61 (0.05)
NKR	12.74 (2.37)	16.00 (1.94)	16.69 (2.91)	18.96 (1.12)
TCR α / β	0.50 (0.18)	0.79 (0.90)	1.76 (0.76)	0.24 (0.08)
CD40	80.36 (2.27)	48.20 (3.83)	48.24 (6.65)	51.18 (4.25)

Values are the mean (S.D.)

Table 14. Effect of *Agaricus blazei* water extract on the liver superoxide dismutase activity and TNF-α receptor expression

Group	1) Superoxide dismutase	2) TNF-α
N	22.552 ± 2.970^{a}	2.128 ± 0.876^{a}
S	15.393 ± 4.307^{b}	0.818 ± 0.152^{b}
1AS	22.674 ± 4.096^{a}	2.937 ± 2.108^{a}
3AS	15.925 ± 1.601^{b}	1.453 ± 0.213^{b}

Values are the mean$\pm$S.D

Values followed by different letters are significantly different ($p<0.05$)

1) unit/mg protein

2) Anti-TNF-α receptor express positive cells(%)

N means normal group

S means Sarcoma-180 treated group

1 AS means 100 mg/kg *Agaricus blazei* water extract and Sarcoma-180 treated group

3 AS means 300 mg/kg *Agaricus blazei* water extract and Sarcoma-180 treated group

Table 15. Effect of *Agaricus blazei* water extract on the liver catalase activity and Glutathione peroxidase activity

Group	1) catalase	2) Glutathione peroxidase
N	132.913±6.832[b]	434.073±50.840[a]
S	127.222±84.851[b]	274.225±24.399[ab]
1AS	367.637±186.157[a]	464.463±64.916[a]
3AS	365.665±21.269[a]	380.243±57.819[ab]

Values are the mean±S.D

Values followed by different letters are significantly different ($p<0.05$)

1) μmole/min/mg protein 2) μmole/mg protein

N means normal group

S means Sarcoma-180 treated group

1AS means 100 mg/kg *Agaricus blazei* water extract and sarcoma-180 treated group

3AS means 300 mg/kg *Agaricus blazei* water extract and sarcoma-180 treated group

Table 16. MDA in liver(MDA % concentration compared with N:normal group mean, N:normal group=100%)

Group	1) catalase	2) glutathione peroxidase
N	100 ± 0.000^{b}	434.073 ± 50.840^{a}
S	126.243 ± 5.720^{a}	274.225 ± 24.399^{ab}
1AS	113.682 ± 28.069^{ab}	464.463 ± 64.916^{a}
3AS	130.832 ± 18.595^{a}	380.243 ± 57.819^{ab}

Values are the mean±S.D

Values followed by different letters are significantly different ($p<0.05$)

1) μmole/min/mg protein 2) μmole/mg protein

N means normal group

S means Sarcoma-180 treated group

1AS means 100 mg/kg *Agaricus blazei* water extract and Sarcoma-180 treated group

3AS means 300 mg/kg *Agaricus blazei* water extract and Sarcoma-180 treated group

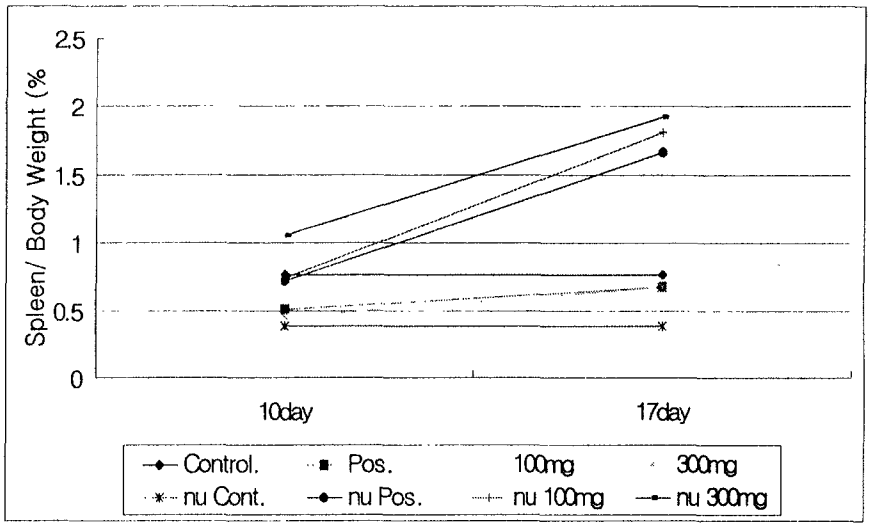


Fig.227 Modulation of Spleen in ICR Mice that have Tumor by Injecting Sarcoma-180

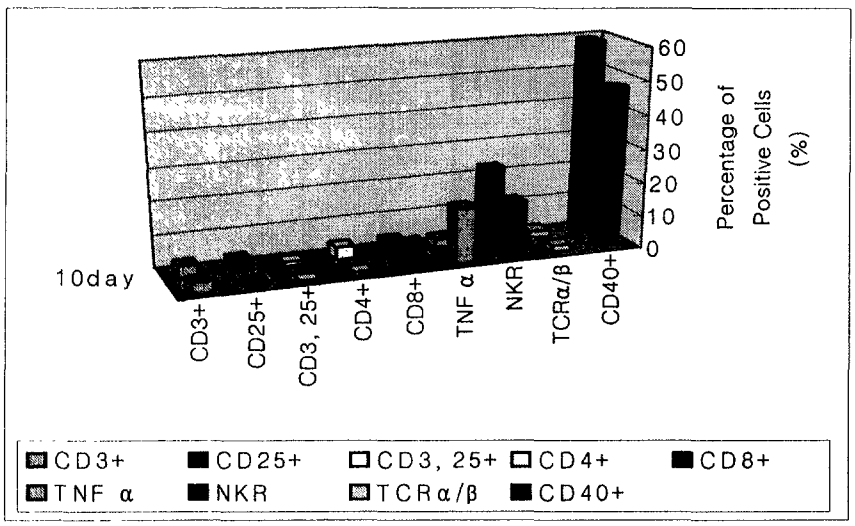


Fig. 228 Changes of Cell Subpopulation from 10 day to 17day in KSN-nu Mice injected 100mg/kg by P.O.

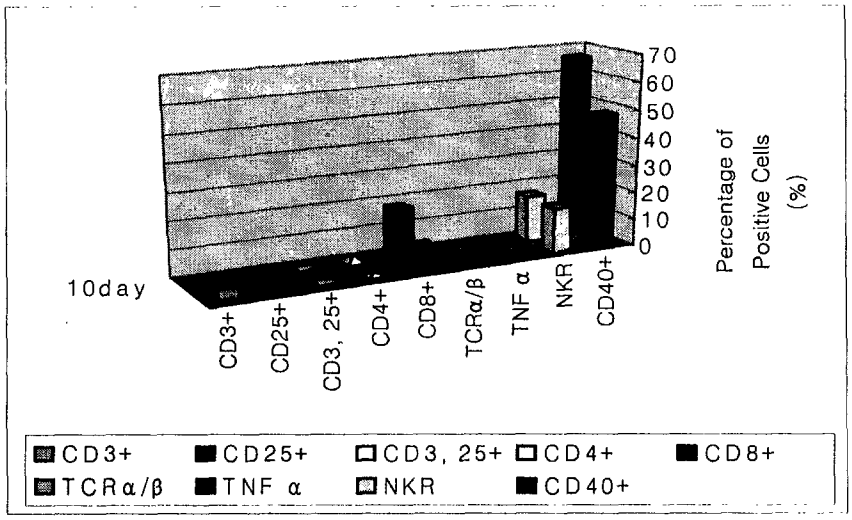


Fig. 3 Changes of Cell Subpopulation from 10 day to 17day in KSN-nu Mice injected saline by P.O.

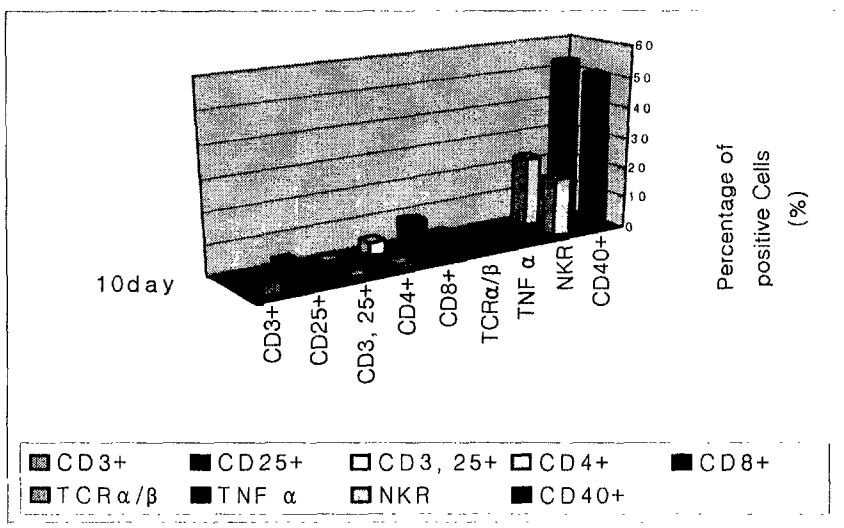


Fig. 4 Changes of Cell Subpopulation from 10 day to 17 day in KSN-nu Mice injected 300mg/kg by P.O.

제 3 절 가공제품에 따른 효능검색

1. 가공과정에 따른 추출물의 효능 검색

가공과정에 따른 추출물의 효능 검색을 위해 ethanol 추출한 *Agaricus blazei*의 종양세포주에 대한 억제 효과를 알아 보았다.

가. 종양주 세포에 대한 억제 효과

1) 연구수행 방법

가) 종양세포의 배양

Agaricus blazei 추출물의 가공과정에 따른 효능 검색을 위해 human gastric carcinoma (KATO-III), human lung carcinoma (A-549), human breast adenocarcinoma (MCF-7), mouse lymphoma (Sarcoma-180), mouse lymphoma (Yac-1)는 Korea Cell Line Bank(KCLB)로 부터 구입하였고 사람의 간암세포인 Hep-3B (Human hepatocellular carcinoma)는 American Tissue Culture Collection(ATCC, HB8064)로 부터 구입하였다. Hep-3B(간암)와 Sarcoma-180을 제외한 모든 세포주들은 RPMI-1640배지에서 10% fetal bovine serum(FBS), 37℃, 5% CO_2에 적응시켜 배양하였다(Table 1).

암세포 배양은 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, 6.7 g)과 nutrient mixture F-12(5.3 g)를 1:1(V/V) mixture, gentamicin sulfate 40 mg, sodium bicarbonate 2 g, hepes buffer 2 g을 3차 증류수에 용해시킨 후 pH 7.0-7.2로 조절하여 20% FBS로 보강된 배지에 접종하여 37℃(5% CO_2 incubator)에서 24시간 배양하였다. Hep-3B(간암)와

Sarcoma-180을 제외한 모든 세포주들은 RPMI-1640배지에서 10% FBS, 37℃, 5% CO_2에 적응시켜 배양하였다.

나) in vitro내에서 SRB(sulforhodamine B) method를 이용한 종양세포주에 대한 증식 억제능력 평가

SRB(sulforhodamine B) 분석은 세포 단백질 염색을 이용하여 세포 생육정도를 측정하는 방법이다. 종양세포 생육 저해효과 실험은 96 well plate의 각 well에 5×10^4/mL의 다양한 cell line(MCF-7, A-549, Hep-3B)이 포함된 100 ㎕의 배지를 가하여 37℃(5% CO_2 incubator)에서 24시간 배양한 후 0.1 ㎍/mL, 1 ㎍/mL, 10 ㎍/mL 및 100 ㎍/mL의 각 농도의 *Agaricus blazei*가 들어있는 100 ㎕의 배지를 가한 후 48시간 배양한다. 48시간 후 배지를 aspirator로 제거하고 미리 cooling한 TCA(trichloro acetic acid, 최종농도 10%) 100 ㎕를 가하여 4℃에서 1시간 방치한다. 그리고 증류수로 5회 세척하여 건조시킨 후 각 well에 1% acetic acid에 녹인 SRB(sulforhodamine B) 용액 100 ㎕를 가한다. 그리고 상온에서 30분 염색한 후 1% acetic acid로 5회 세척하여 건조시킨다. 건조시킨 후 10 mM Tris buffer 150 ㎕로 염색액을 충분히 녹인 다음 ELISA reader로 540nm에서 흡광도 값을 측정하였다.

다) MTT(3-(4,5-dimethylthiazal-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromine) method를 이용한 종양세포의 *Agaricus blazei* 추출액에 의한 cell viability 변화도 측정

MTT assay는 cell의 생육 및 분화를 측정하는 colorimetric assay로서 살아있는 cell의 미토콘드리아내 dehydrogenase enzyme이 노란 수용성 물질인 MTT에 의해 dark blue formazan 생성을 기초로 하였다. 96 well

microtiter plate에 KATO-III ,Sarcoma-180, Yac-1 cell 및 10% fetal bovine serum을 함유한 RPMI 1640배지를 1×10^5/mL 농도로 각각의 well에 180 ㎕씩 넣고 37℃, 5% CO_2에서 24시간 incubation한 다음 0.1 ㎍/mL, 1 ㎍/mL, 10 ㎍/mL 및 100 ㎍/mL의 각 농도별 *Agaricus blazei*의 시료를 첨가하고 최종 volume이 200 ㎕가 되게 배지를 채운 후 48시간 incubation한 다음 MTT soln(2 mg/mL)을 50 ㎕씩 각 well에 첨가하고 formazan을 형성시키기 위해 4시간 동안 incubation한 후 aspirator로 상등액을 제거하고 150 ㎕의 DMSO(dimethylsulfoxide)를 첨가하여 formazan을 녹인 다음 ELISA reader를 이용하여 540nm에서 흡광도 값을 측정하였다.

2) 연구수행 내용 및 결과

가) 연구 수행 내용

본 연구는 가공과정에 따른 추출물의 효능을 검색을 위해 열수 추출물에 대한 연구 결과를 바탕으로 *Agaricus blazei*의 ethanol 추출물이 암세포주에 대해 나타내는 세포독성을 항암작용의 지표로 삼았으며 본 실험결과는 향후 가공제품을 만들어 상품화하려고 할 때 객관적인 실험 자료로서 국내에서 보유하여야 할 중요한 정보를 제공할 수 있기에 매우 중요하다고 하겠다. 시험군의 평균 O.D.값을 구하여 대조군(100% 생존군)의 평균 O.D.값에 대한 백분율을 산출하여 저해효과로 하였다.

나) 연구 수행 결과

*Agaricus blazei*의 ethanol 추출물을 모든 종양세포에 3, 10, 30, 100, 그리고 1,000 ppm을 첨가하였다. 그리고 세포의 수는 5×10^5/well, 1×10^6/well 그리고 1×10^7/well 의 3 가지로 하였는데 실험에 사용한 모

든 암세포들이 공히 억제작용을 나타냈으며 그 중에서도 특히 사람의 위암 세포주인 KATO-III와 간암 세포주인 Hep3B 그리고 폐암세포주인 A-549의 경우는 30 ppm 이상의 농도에서 세포의 농도에 관계없이 공히 10%가 넘는 생육저해효과를 나타내었다. 이에 반하여 같은 사람의 자궁암세포주인 MCF-7와 mouse의 Sarcoma-180 및 Yac-1의 발육억제 효과는 앞의 3가지 세포주에 비하여 상대적으로 약하여 100 ppm 이상의 농도 투여군에서 10% 이상의 발육억제 효과를 나타내었다(Table 17과 18).

나. 사람의 탐식세포에 미치는 효과

1) 연구 수행 방법

건강한 사람의 혈액으로부터 Double-density Percoll을 이용하여 상층으로부터는 neutrophil을 분리하고 하층의 mononuclear cell로부터는 monocyte를 분리하여 chemiluminescence 용 media인 phenol red가 함유되지않은 1%의 BSA가 첨가된 RPMI-1640 배지에 각각 1 × 10^6/ mL과 5 × 10^5/mL로 세포를 고정한 후 서강대 최 정우교수팀으로부터 분양받은 *Agaricus blazei*의 ethanol 추출물을 3 ppm, 10 ppm, 30 ppm, 100 ppm, 및 1,000 ppm씩 첨가한 후 neutrophil은 30분간, 그리고 monocyte는 1시간 사전 배양한 후 탐식능력의 변화에 따른 respiratory burst시 생성하는 reactive oxygen(RO)를 측정하기 위하여 luminol을 amplifier로 하여 사전에 5분간 O_2^- 의 발생을 증폭시켰으며 보체 C3b와 opsonization시킨 zymosan particle을 stimulator로 하여 40분간 Luminometer(Berthold LB-9505)를 이용하여 chemiluminescense를 측정하였다.

2) 연구 수행 내용 및 결과

가) 연구 수행 내용

본 연구는 *Agaricus blazei*의 ethanol추출물의 독성학적 평가를 위해 인체의 급성 염증과 만성염증시 체내에서 방어 역할은 하는 세포인 polymorphonuclear granular neutrophil(PMN : 호중구)와 monocyte(단핵구)의 기능에 어떠한 영향을 주는 가를 검색키 위함이다. 향후 본 과제의 연구 결과를 바탕으로 가공제품을 생산하여 산업화 및 실용화시킬 경우 본 연구진의 방법대로 추출한 *Agaricus blazei*의 면역약리학적인 효능 검증이 없이는 특히 국내 연구진의 고유한 방법에 의한 효과 검증없이는 매우 불리한 처지에 있을 수 있기에 이에 대한 정확한 효과 검증의 차원에서 수행되었다.

나) 연구 수행 결과

본 연구 결과로 미루어 볼 때 *Agaricus blazei*의 자실체 ethanol 추출물은 면역증강작용을 하는 것을 알 수 있었으며 호중구의 경우 3 ppm부터 30 ppm의 농도까지는 농도에 비례한 증가된 탐식작용을 나타내었으며 100 ppm 이상의 농도에서는 대조군에 비하여서는 여전히 현저히 증가된 탐식작용을 나타내긴 하였지만 30 ppm의 농도 보다는 다소 감소되기 시작하는 것을 관찰 할 수 있었다. 그리고 단핵구의 탐식작용의 경우 10 ppm 이상의 *Agaricus blazei* 처리군들은 대조군에 비하여 2배이상의 강력한 탐식작용을 함을 알 수 있었다(Table 19와 20).

2. 추출물의 독성학적 평가

Ethanol 추출 *Agaricus blazei*를 가지고 Balb/C mice의 Natural Killer cell cytotoxicity에 미치는 영향을 검토하여 독성학적 평가를 검

토하였다.

1차년도에서 *Agaricus blazei* 버섯 추출물은 Sarcoma-180을 이식받은 마우스의 종양 성장을 저해하였고, FACS 결과로는 immunocyte subset의 population 중 특히 NK cell이 숫적으로 증가하였다. 거기에 Fujimiya 등도 역시 *Agaricus blazei* 버섯의 경우 항암 메카니즘이 immunomodulation 이라는 가능성을 제시하였으므로 이를 본 과제에서는 *Agaricus blazei* 버섯의 독성학적 평가를 위해 ethanol 추출물을 투여한 마우스의 비장세포내의 NK cell를 Yac-1 세포주와 반응시켜 cytotoxicity에 미치는 영향을 측정하였다.

가. 연구 수행 방법

1) Cell의 준비 및 labelling

5×10^6개의 Yac-1 cell을 100 μCi에 1시간 30분동안 37℃, 5%의 CO_2 incubator에서 labelling한 후 RPMI-1640으로 3회 washing하여 결합하지 않은 isotope을 제거하고 다시 1시간 동안 incubator에서 배양시켰다. 그리고 대조군, 4 mg(사람 투여량의 약 2배의 용량), 8 mg, 16 mg/day 등 4군으로 3주간 아가리쿠스 버섯을 경구 투여한 Balb/C mouse의 splenocyte를 채취하여 effcetor cell로 사용하였다. Target cell(5×10^3)과 Effector cell의 비율은 1:1/ 1:5/ 1:25/ 1:50/ 1:100로 하고 각 비율당 3개씩의 well을 준비한 후 실험에 임하였다.

2) Cytotoxicity의 측정

Natural Killer cell의 Cytotoxicity 측정은 감마 카운터를 이용하여 Target cell에 labelling된 Cr^{51}의 유리정도를 기준으로 cytotoxicity가

강할수록 유리되는 Cr^{51}의 양이 많아지므로 이를 이용하여 Cr^{51}의 유리되는 양을 측정하였다.

나. 연구 결과

상기의 Table 21을 분석하여 보면 암세포와 N-K 세포의 비율이 증가할수록 그리고 *Agaricus blazei* 버섯 ethanol 추출물의 용량이 증가할 수록(16mg) cytotoxicity가 증가함을 알 수 있어 1:5의 비율에서는 약 2%의 cytotoxicity 증가를 보인 반면 1:50의 비율에서는 약 7%의 cytotoxicity 증가를 나타내었다. 이는 버섯이 NK 세포에 대한 생리활성 기능이 있음을 시사하는 것이라고 하겠다.

Table 17. 종양세포의 *Agaricus blazei*에 의한 생육저해효과 I

세포주 / well / 농도	Sarcoma-180			YAC-1			MCF-7		
	5×10^5	1×10^5	1×10^4	5×10^5	1×10^5	1×10^4	5×10^5	1×10^5	1×10^4
control	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3 ppm	1.9[a)]	2.3	3.4	1.7	1.5	1.8	1.2	2.5	2.4
10 ppm	3.7	3.5	2.4	2.5	1.8	3.2	2.8	3.8	3.6
30 ppm	5.6	8.8	7.5	4.8	5.0	7.9	5.7	6.7	4.9
100 ppm	19.7	15.6	13.8	15.3	16.1	14.8	13.9	12.4	12.8
1,000 ppm	13.1	11.9	12.5	22.3	25.8	19.2	14.7	11.3	15.0

a)는 %, 모든 실험 결과는 triplicate에 의함

Table 18. 종양세포의 *Agaricus blazei*에 의한 생육저해효과 II

세포주 / well / 농도	KATO-III			Hep-3B			A-549		
	5×10^5	1×10^5	1×10^4	5×10^5	1×10^5	1×10^4	5×10^5	1×10^5	1×10^4
control	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3 ppm	7.2[a)]	6.0	8.7	2.8	3.1	6.7	2.4	2.5	2.8
10 ppm	8.3	6.9	11.5	4.2	5.8	9.0	4.6	7.2	3.8
30 ppm	12.9	9.3	13.0	14.7	17.4	14.2	8.9	13.8	22.8
100 ppm	18.1	11.8	21.6	24.1	36.5	31.6	23.3	24.8	35.1
1,000 ppm	9.7	13.0	16.5	35.6	54.8	45.0	27.9	31.7	37.8

a)는 % , 모든 실험 결과는 triplicate에 의함

Table 19. *Agaricus blazei* 자실체 ethanol 추출물이 사람 neutrophil의 chemiluminescence 생성에 미치는 효과

	total cpm[a]	증가율(%)
control	3.923×10^{y}	-
3 ppm	4.071×10^{y}	3.8
10 ppm	4.713×10^{y}	20.1
30 ppm	4.898×10^{y}	24.8
100 ppm	4.643×10^{y}	18.4
1,000 ppm	4.310×10^{y}	9.9

Human neutrophil = 1×10^{6}/mL [a]cpm = count per minute

Table 20. *Agaricus blazei* 자실체 ethanol 추출물이 사람 monocyte의 chemiluminescence 생성에 미치는 효과

	total cpm[a]	증가율(%)
control	7.411×10^{b}	-
3ppm	8.921×10^{7}	20.4
10ppm	1.497×10^{7}	201.9
30ppm	2.895×10^{7}	390,6
100ppm	1.816×10^{7}	245.0
1,000ppm	1.928×10^{7}	260.2

Human monocyte = 5×10^{5}/mL, [a]cpm = count per minute

Table 21. Effect of *Agaricus blazei* on natural killer cell cytotoxicity test

Target / cell Group	Yac-1			
	1 : 5[a)]	1 : 12.5	1 : 25	1 : 50
control	1.7[b)] ± 1.2	6.7[b)] ± 2.1	17.4 ± 2.4	21.8 ± 2.5
4 mg(*Agaricus blazei*)	3.3 ± 1.8	9.7 ± 3.1	21.4 ± 3.1	25.1 ± 2.9
8 mg(*Agaricus blazei*)	3.5 ± 2.1	11.2 ± 2.2	24.7 ± 3.2	29.9 ± 3.7
16 mg(*Agaricus blazei*)	3.7 ± 2.2	15.9 ± 3.6	29.3 ± 4.6	28.8 ± 3.8

제 4 절 가공제품의 생리활성물질 효능 검색

1. 급성독성 검색

암, 수컷 마우스에 본 연구팀이 추출한 시험물질 *Agaricus blazei*의 열수 및 ethanol 추출물을 0, 5000 및 10000 mg/kg의 용량으로 1회 경구 투여한 후 사망 여부, 임상 증상, 혈액 생화학적인 변화, 체중변화 및 부검을 실시하여 시험물질의 안전성을 검토하였다.

가. 연구 수행 방법

1) 시험물질 및 부형물질

시험에 사용한 시험물질은 서강대학교와 강원대학교에서 분리 추출한 것으로 다음과 같다.

물 질	로트번호	성 상	보관조건
D.W.	--	무색투명한 액체	상온보관
Agaricus blazei	Water extracted Ethanol extracted	암녹색분말	밀봉냉장

D.W. - distilled water

2) 시험계 및 사육환경

6주령의 Crj:CD-1 암, 수 마우스를 시험에 사용하였다. 시험계마다 꼬리색소도포 표시로서 개체식별을 하였으며, 각 사육상자마다 군, 성별 및 개체번호를 표기한 라벨(label)을 부착하여 쉽게 구별될 수 있도록 하였다. 관찰기간 종료시까지 온도 23±2℃, 상대습도 30~70%, 환기횟수 12-13 회/hr 및 12시간주기의 명암간격이 유지되는 사육실에서, 각 폴리카

보네이트 사육상자(26×42×18cm, [주]MJ)마다 시험계를 2마리씩 수용하였다. (주)삼양유지사료에서 제조한 실험동물용 고형사료를 시험계에 공급하였고, 필터(filter)장치와 유수살균기를 거쳐 여과살균된 수도물을 자동급수장치를 통하여 공급하였다.

3) 시험방법

가) 군분리 및 절식

육안적으로 보아 건강한 시험계를 선발하였다. 시험개시시 체중범위는 30 g 내외이었다. 단계별 연속무작위화법을 이용하여 마우스를 군 분리한 후, ANOVA를 실시하여 군들간에 유의한 차이가 없음을 확인하였다. 시험계를 시험물질 투여전에 약 6시간동안 절식시켰으며, 이때 음수는 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

나) 투여용량의 설정

*Agaricus blazei*가 화학물질이 아닌 일종의 식품에 속하는 물질이기에 최고 10,000 mg/kg의 용량으로 하여 투여용량을 설정하고, 각 시험군마다 시험계를 아래와 같이 배정하였다.

시험물질	시험군	투여용량 (mg/kg)	투여액량 (mℓ/kg)	시험계(마리)	
				수 컷	암 컷
Vehicle	G1	-	20	7	7
Agaricus blazei (Water extracted)	G2	5,000	20	7	7
	G3	10,000	20	7	7
Agaricus blazei (Ethanol extracted)	G4	5,000	20	7	7
	G5	10,000	20	7	7

다) 시험물질 조제 및 투여

시험물질조제계획서에 따라 시험물질을 칭량하여 유발에서 미세하게 분쇄한 다음 부형물질인 멸균증류수를 가하여 침전물이 없도록 균질하게 현탁 조제하였다. 군 분리시 측정한 체중을 기준으로 시험물질 현탁액 및 부형물질의 투여량을 산출하였다. 경구투여용 주사기를 사용하여 대조군에는 부형물질을, 시험물질투여군에는 시험물질 현탁액을 1회 경구투여하였다.

라) 증상관찰

임상증상은 시험물질투여 당일에는 투여후 15, 30분, 1, 2, 4 및 8시간까지 세밀히 관찰하였으며, 투여후 1일부터 14일까지는 1일 1회 매일 관찰하였다. 또한 관찰기간 중 1일 2회 사망여부를 확인하였다.

마) 체중측정

체중은 시험물질 투여직전, 시험물질투여 후 1일, 3일, 7일 및 부검직전에 측정하였다.

바) 부검

관찰기간 경과후 생존한 시험계를 부검하여 아래의 체내외 장기조직을 육안으로 관찰하였다.

- 체내외 및 모든 체공 (External surface & all orifices)
- 두개강 (Cranial cavity)
- 뇌 및 척수 표면 (External surface of the brain & spinal cord)
- 비강 및 부비강 (Nasal cavity & paranasal sinus)
- 흉강, 복강 및 골반강과 포함장기 (Thoracic, abdominal and pelvic cavities & their viscera)
- 경부장기조직 (Cervical tissues & organs)

사) 자료의 통계학적 해석방법

시험기간 동안의 체중측정 결과 및 체중증가율에 대해 분산의 동질성을 비교하기 위한 Levene's test를 실시한 결과, 분산이 동질(homogeneous)하여 one way ANOVA test를 실시하였으나 유의성은 없었다.

나. 연구내용 및 결과

1) 생존율 및 임상증상

*Agaricus blazei*의 열수 및 ethanol 추출물 모두에서 사망개체는 없었다. 임상증상 역시 모든 시험군에서 관찰되지 않았다.

2) 혈액 생화학적 소견

혈액 생화학적 분석 결과 모든 시험군에서 이상 소견은 발견되지 않고 대조군과 유사한 양상을 보였다.

3) 체중측정 결과

체중측정 결과, 시험물질 투여군에서 모두 대조군과 유사한 양상을 보였다.

4) 부검 소견

관찰기간 종료후의 부검 결과, 모든 시험군에서 이상소견은 관찰되지 않았다.

6주령의 Crj:CD-1 암, 수컷 마우스에 시험물질인 *Agaricus blazei*의 열수 및 ethanol 추출물을 0, 5,000 및 10,000 mg/kg 용량으로 1회 경구투여하여 시험물질의 안전성을 검토하였다(Table 22,23,24). *Agaricus blazei* 투여

군을 포함하여 모든 시험군에서 사망개체는 없었으며, 임상증상 역시 관찰되지 않았다. 시험물질 투여군에서 체중변화는 모두 대조군과 유사한 양상을 보였으며 아울러 혈액 생화학적 수치역시 대조군과 차이를 보이지 않았다. 관찰기간 경과후 생존개체의 부검결과, 모든 시험군에서 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상의 시험결과를 종합해 볼 때, *Agaricus blazei*는 암, 수컷 마우스에 1회 경구투여시 아무런 부작용이 없었으며, 반수치사량(LD_{50})은 *Agaricus blazei*의 열수 및 ethanol 추출물 모두에서 10,000 mg/kg 이상인 것으로 판단된다. 독성학적 검증에 있어서 경구투여시 반수치사량이 15 mg/kg 이상인 물질은 상대적으로 무해한 (relatively harmless)으로 인정되므로 본 연구진이 추출한 *Agaricus blazei*는 바로 이 범위에 속한다. 그러므로 *Agaricus blazei*를 향후 건강보조식품등으로 개발할 시 독성학적인 측면에서는 열수 추출물이나 ethanol 추출물 양쪽 모두 안전하게 사용할 수 있음을 입증할 수 있다.

2. 이식암 성장저해 평가

본 연구는 *Agaricus blazei* 자실체의 이식암에 대한 항암억제 작용에 대한 *in vivo*의 실험으로 *Agaricus blazei*가 실제로 생체내에서 생성된 암세포에 대한 저해 능력이 있는 가를 검증하기 위하여 실시하였다.

가. 연구 수행 방법

1) 종양세포의 접종

계대배양용으로 수컷 ICR 마우스의 복강 내에 5×10^6개의 Sarcoma-180을 주사하여, 1주일후 같은 요령으로 종양세포주를 유지하였다. 계대배

양용 마우스를 경추탈구로 안락사시킨 후, 마우스 피부 표면을 알콜분무로 소독한 다음, 피부를 벗기고 복막이 보이면, 일부를 외과용 가위로 cutting 한 후, 복수를 채취하며 PBS(phosphate buffered saline)를 복강내에 주입하면서 지속적으로 최대로 복강내로 주입한 Sarcoma-180을 50 mL cornical tube에 모은다. 모은 세포는 얼음 내에 유지하면서 PBS를 부어 1,000 rpm으로 4 ℃에서 5분간 원심분리로 washing하는 과정을 3번 하였다. 5주령 수컷 ICR 마우스의 등에 5×10^6개의 Sarcoma-180 세포를 피하접종 하였다.

2) 자실체의 항암 스크리닝 평가

서강대학교에서 분리 추출한 자실체를 종양발생 마우스에 경구로 투여하여 종양의 성장을 저해하는가에 대한 기초 스크리닝 검사를 실시하였다. Sarcoma-180을 종양을 접종한 후 7일이 되면, calliper로 종양의 직경을 재서 5 mm가 넘는 개체들을 골라 *Agaricus blazei*를 투여하였다. 투여방식과 투여량, 농도는 다음과 같다. 자실체 추출물 300 mg/kg과 600 mg/kg로 각 군에 zonde를 이용하여 경구로 위내에 투여하였다. 투여기간 중 일정한 기간의 차이를 두고 다음의 식 (1)에 의해 암의 크기를 측정하고 아울러 자실체의 Sarcoma-180의 저해도를 식 (2)에 의해 군별로 측정하였다.

(1) 암의 크기 = $4/3\ \pi \times a^2b/2$ (a: 최단직경, b : 최장직경)

(2) 암의 저해도 = $\dfrac{(C - T)}{\text{control 군의 암크기}}$ T : 실험군의 암 크기

나. 연구 결과 및 고찰

Table 25와 26에서 보는 바와 같이 자실체를 투여한 군의 경우 대조군에 비하여 현저한 암세포의 제어효과가 있음을 알 수 있었다. 즉 농도에 대한 효과로서 투여 16일째부터 300 mg/kg 자실체 투여군의 경우 암의 용적이 대조군의 133.6 mm^3 에 비하여 93.5 mm^3 의 현저한 저해작용을 하였으며 이를 저해율로 환산하면 30%에 해당한다. 한편 600 mg/kg 투여군의 경우는 73.1 mm^3로 더욱 더 억제되어 저해율은 45.5% 였다. 투여 29일째의 경우는 대조군의 경우 108.7 mm^3 인데 반하여 300 mg/kg 투여군은 59.1 mm^3로 저해율은 45.6%였으며 특히 600 mg/kg 자실체 투여군은 더욱 억제 작용을 하여 38.9 mm^3 의 64.2%의 강력한 저해율을 나타내었다. 그런데 본 실험에서 대조군 역시 시간의 경과함에 따라 암세포 접종 29일째부터 암세포의 크기가 점차적으로 줄어드는 현상을 볼 수 있는데 이는 암세포 자체가 ICR mice에 xenograft로 작용하여 생체 자체가 면역반응을 유발하여 암을 제거하려 하는 것을 알 수 있다. 그러므로 본 연구 결과가 시사하는 것은 *Agaricus blazei*추출물의 투여는 면역증강 작용을 하여 생체자체가 지닌 암세포 제어작용을 더욱 활성화시킬 수 있다는 것이다.

한편 암세포 접종후 *Agaricus blazei*투여군과 대조군의 체중의 변화를 비교하였을 때 Table 27에서 보는 바와 같이 *Agaricus blazei*투여에 따른 특별한 차이는 관찰되지 않았다.

3. 항간암 효과 검색

전년도의 단기적 항암효과 실험결과를 바탕으로 *Agaricus blazei* 추출물을 일별 300 mg의 용량으로 경구로 투여하여 그에 따른 간암발생 예방효과, 간암발생 저지효과를 알아보기 위한 일환으로 DEN과 간부분절제술을

이용한 mid-term hepatocarcinogenesis promotion model study를 실시하였다. 이러한 모델링은 간암에 대한 항암효과 혹은 종양유발효과에 관한 실험을 할 때 높은 빈도로 쓰이는 모델이며 이러한 모델을 사용한 실험결과는 객관화되며 국제적으로 인정된다. 더욱이 이 모델은 실험의 기간을 8주라는 단기간에 결과를 얻을 수 있고 Mizuno 등(1998)이 간에 영향을 주는 약제들을 가지고 실험한 외에도 천연물을 포함한 신물질을 대상으로 한 광범위한 데이터가 있다. 그러므로 같은 모델을 작출하여 다른 항암물질들과의 객관적인 약효의 비교가 가능하고, 실험결과에 따라 암의 발생기전인, initiation, promotion, progression 단계를 모두 탐구할 수 있다. 일관성 있고 객관적인 모델을 채택하여 단기 항간암효과 실험에 대한 결과에 따라 가장 효능이 있다고 나타난 *Agaricus blazei* 추출물로 장기 항암효과 실험을 실시할 수 있었다.

가. 연구 수행 방법

1) DEN 랫드 모델의 작출

SPF 6주령 수컷 SD 랫드를 polysulphone 재질의 shoebox 형 케이지에서 NIH 가이드에 의거하여 다음의 환경하에서 사육하였다 (12시간 명암주기, 온도 23±2℃, 습도 55±10%, SPF condition). 동물의 급이는 실험동물용 쥐사료(Purina, Korea)를, 급수는 R/O수를 자유롭게 공급하였다. 실험전 일주일간 분말 사료만을 주어 적응시킨 후, 공시동물에 DEN (Diethylnitrosamine, Sigma, USA)을 주사용 생리식염수를 용매로 200 mg/kg의 용량으로 조제하여 복강내 주사하고 3주후 Anderson과 Higgins의 방법에 따라 2/3 간부분절제술(partial hepatectomy; 이하 PH)을 실시하였다.

2) 시험물질의 투여

간암발생 예방처치군인 그룹 1과 그 대조군 2에는 DEN 처치 2주전부터 DEN 처치전일까지, 간암발생 저지처치군인 그룹 4와 그 대조군 5에는 DEN 처치 2주후부터 실험종료일까지, 매일 *Agaricus blazei* 추출물을 300 mg/kg의 용량으로 분말사료에 고르게 섞어 자유롭게 투여하였다(Table 28).

3) 병리조직 검사

실험 종료후 H&E 염색법으로 일반적인 간의 변화를, GST-P, PCNA 면역염색법으로 항간암효과를 판정하였다. 부분간절제술(PH) 5주후 공시동물을 에테르 마취하에서 체중을 재고, 안락사시킨 후 해부시 실험동물의 체중을 재고 육안소견을 관찰하였다. 간을 분리하여 무게를 측정하고, 모든 개체에서 임의로 공통적 위치를 정하여 각 엽을 2-3 mm 두께로 잘라 10% neutral formaline에 고정한 후 파라핀 블록을 만들어 해당 부위를 각각 H&E 일반염색과 GST-P, PCNA 면역염색을 아래와 같이 실시하였다.

4) PCNA면역조직 화학염색

세포증식의 표지자로 사용되는 PCNA를 검사하기 위해, 염색은 Histostain의 sp bulk rabbit/mouse primary kit를 기본으로 하여 xylene으로 탈파라핀하고 알콜로 탈수시킨 후, sodium citrate buffer에서 6분간 pressure cooker에서 처리하고, D.W.에 washing한 다음 H_2O_2 에 담가서 endogeneous peroxidase를 제거한다. Normal serum으로 30분간 blocking한다. 1:800으로 희석한 primary antibody (Santacruz, SC-56)를 room temperature에서 2시간동안, secondary antibody를 20분간 incubation 한 후 strepavidin HRP 와 DAB (Zymed)로 발색한다. Harry's hematoxylin으로 count stain을 한다. 다시 알콜 탈수과정과 xylene을 반응시킨 후 balsam

으로 mounting 한다. 염색결과는 400배 배율의 현미경 시야에서 세 시야를 선택하여 PCNA 전체 세포수중 염색된 세포의 수를 세어 그 평균치로 파악하였다.

5) GST-P 면역조직화학 염색

각 실험군에 대한 GST-P 염색은 Research Genetics의 키트를 기본으로 하여 다음의 과정으로 염색하였다. xylene으로 탈파라핀하고 알콜로 탈수시킨 후, sodium citrate buffer에서 6분간 pressure cooker에서 처리하고, D.W.에 washing한 다음 H_2O_2 에 담가서 endogenous peroxidase를 제거한다. Normal serum으로 30분간 blocking한다. primary antibody인 GST-P antibody인 MBL polyclonal Ab를 1:2000으로 희석하고, secondary antibody는 1:3으로 희석하여 사용한다. 반응이 끝나면 세척후 strepavidin HRP 와 DAB (Zymed)로 발색한다. Harry's hematoxylin으로 count stain을 한다. 다시 알콜 탈수과정과 xylene을 반응시킨 후 balsam으로 mounting 한다. GST-P 염색 후 각 슬라이드에서 양성 염색된 세포들의 foci 면적을 염색된 세포의 개수로 나누어 군별 특성을 특히, 가장 손상도가 높은 것으로 나타난 그룹 3의 결과와 비교하여 통계적 유의성을 검정하였다.

나. 연구수행 내용 및 결과

일반 H&E염색 슬라이드로는 군별로 간엽의 상태와 실험적 손상후 아가리쿠스 버섯에 의한 간의 반응을 보았고, 면역염색결과로 양성이 나타난 세포들을 각기, 직경이 0.1 mm가 넘는 GST-P 양성 간세포 foci의 수를 세고 넓이를 재거나, 양성 염색세포의 수를 세어 각 실험군들의 차이를 비교

하였다. 각 실험군의 분말사료 섭취량은 통계적으로 유의성을 보이지 않았다.

1) 광학현미경 소견

H&E 염색소견으로 볼 때, 부분 간절제술과 DEN투여에 의한 간손상으로 인하여 간세포 핵의 이형성이나 호산성병소 혹은 호염기성 병소 같은 간세포의 변성 소견이 양성 대조군에서 두드러지게 관찰되었으나 *Agaricus blazei*를 투여한 모든 군에서는 이러한 병소의 간세포 회복 소견이 관찰되었다. 즉, 조직의 재생정도가 *Agaricus blazei* 처치군에서 고르게 대조군과 비교하여 높았다. 이번 실험모델의 작출시 권장되는 스케줄은 8주인데 *Agaricus blazei*의 경우 음성대조군을 포함한 실험군의 재생정도로 보아 결과판정을 확실히 할 수 있는 시기가 더욱 앞당겨져야 될 것으로 사료된다.

2) 면역조직 화학염색 소견

본 실험에 있어서 일반적으로 손상된 세포의 재생정도를 평가하는 PCNA 결과를 볼 때, 모든 *Agaricus blazei* 투여군은 평균적으로 (+)control과 비교하여 절반수준의 결과를 보여, 항암 및 발암 저지효과를 나타내는 경향을 보였는데 이 수치들은 간에 부분절제술을 실시하여 물리적인 손상만을 가한 (-) control보다도 낮은 수치를 나타내었다 (Table 29). 또한, DEN에 의한 손상도를 나타내는 척도인 GST-P 염색결과를 볼 때, 비록 PCNA 염색상의 결과로는 유의적인 결과가 나타나지 않았으나 간암의 고유적인 척도로 파악되는 수치들은 현저하게 실험처치전 *Agaricus blazei* 추출물을 먹인 실험군에서 2배이상 높은 결과치를 보였다. 이로 미루어볼 때, *Agaricus blazei* 는 면역세포를 활성화시키므로 미리 투여하는

것이 효과적임을 알 수 있었고, 이 결과는 전년도 실험결과와 일맥상통하고 있다.

종합적으로 볼 때, *Agaricus blazei*추출물은 DEN 유발 모델에 대해 항암효과의 소견을 보였으며 실험 처치군에서는 간암모델 유발전에 *Agaricus blazei* 추출물을 먹인 예방처치군의 조직소견이나 면역염색화학 결과면에서 간암 발생 저지효과를 보였는데 이는 이미 밝혀진대로 immunomodulation 의 기능을 하기 때문인 것으로 사료된다. 또한, 본 실험 모델로 *Agaricus blazei*의 항암효과를 스크리닝하는데 있어서 그 치료효과를 보는데는, GST-P 염색소견이 치료군과 양성대조군에서의 큰 차이가 없는 것으로 미루어 보아, 비록 기간이 정해진 모델이지만 각 실험기간별로 샘플링을 하여 관찰하거나 혹은 실험기간을 줄이는 것이 보다 바람직할 것으로 사료된다.

Table 22. Mortality of Crj:CD-1 mice after single oral adminstration of *Agaricus blazei*

Sex	Dose (mg/kg)	Hours after treatment						Days after treatment							Final Mortality
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	
Male	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/7
	5,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/7
	10,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/7
Female	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/7
	5,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/7
	10,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/7

Table 23. Hematological and biochemical vlaues of Crj:CD-1 mice before after single oral adminstration of ethanol extracted *Agaricus blazei*

Group / Parameters	Male				Female			
	Control (n=7)		10,000(mg/kg) (n=7)		Control (n=7)		10,000(mg/kg) (n=7)	
	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After
WBC (10^3/mm^3)	9.8	9.0	11.7	12.6	14.7	15.6	14.2	11.0
RBC (10^6/mm^3)	8.2	8.5	9.0	9.9	8.9	9.6	15.0	9.8
Hb (g/dL)	16.4	17.0	19.3	21.4	18.0	19.6	21.8	20.3
Ht (%)	45.4	49.0	52.4	60.4	50.4	56.2	63.7	57.4
MCV (fl)	55.0	57.0	58.5	61.0	57.0	59.0	55.0	58.5
MCH (pg)	19.9	19.9	21.5	21.6	20.3	20.5	15.5	20.6
MCHC (g/dL)	36.1	34.6	36.8	35.4	35.7	34.8	36.1	35.2
PLT (10^3/mm^3)	286.0	194.0	215.0	110.5	256.0	190.0	304.5	162.5
ALT (U/L)	27.1	28.0	30.9	42.7	33.3	33.6	26.2	35.8
BUN (mg/dL)	26.9	27.4	17.4	22.0	35.2	34.0	15.0	23.7

Each vaule represents the mean±S.D.

Table 24. Lethal dose 50 value of single oral exposure of *Agaricus blazei*

Animal	Route	Sex	Extracted by	LD_{50} (mg/kg)
Mice (Crj:CD-1)	P.O.	Male	Water	> 10,000
	P.O.	Male	Ethanol	> 10,000
	P.O.	Female	Water	> 10,000
	P.O.	Female	Ethanol	> 10,000

Table 25. 자실체의 투여가 암의 크기의 변화에 미치는 효과

day / 군	8	16	22	29	36
대조군	65.5[a)]	133.6	125.2	108.7	106.5
300 mg/kg	61.3	93.5	78.2	59.1	63.9
600 mg/kg	64.5	73.1	52.4	38.9	31.2

공시동물은 대조 군 8마리, 시험군 각각 10마리로 하였음

a) 는 단위로 mm^3

· 암의 크기 = $4/3\ \pi \times a^2b/2$ (a: 최단직경, b : 최장직경)

Table 26. *Agaricus blazei*가 암의 저해도에 미치는 영향

days / 군	8	16	22	29	36
대조군	-	0%	0%	0%	0%
300 mg/kg	-	30.0[a)]	37.5	45.6	40.0
600 mg/kg	-	45.3	79.7	64.2	70.7

공시동물은 대조 군 8마리, 시험군 각각 10마리로 하였음

· 암의 저해도 = $\frac{(C - T)}{\text{control 군의 암크기}}$ T : 실험군의 암 크기

Table 27. *Agaricus blazei*투여에 따른 각 실험군의 체중의 변화

days / 군	8	16	22	29	36	43
대조군	37.4[a)]	37.9	39.3	40.7	40.9	41.4
300 mg/kg	37.3	38.6	38.4	40.1	41.0	40.7
600 mg/kg	37.6	39.8	39.7	40.6	41.3	41.1

공시동물은 대조군 8마리, 시험군 각각 10마리로 하였음
a)의 단위는 g

Table 28. 실험의 디자인

실 험 군	처 치 방 법
예방실험군	*Agaricus blazei* + DEN + PH
예방대조군	*Agaricus blazei* + NS + PH
양성대조군	DEN + PH
항암실험군	DEN + PH + *Agaricus blazei*
항암대조군	NS + PH + *Agaricus blazei*
음성대조군	NS + PH

PH means partial hepatectomy
Agaricus blazei = 300 mg/kg

Table 29. 실험군별 면역염색 결과 (각 군별 n= 6)

실험군	PCNA(+)cell #	GST-P(+)cell #	GST-P(+)area/cell#
(-)control(PH only)	58.3000	-	-
NS+PH+Agaricus	42.8333	-	-
Agaricus+NS+PH	31.1667	-	-
Agaricus+DEN+PH	44.7222	90.83	0.013617
DEN+PH+Agaricus	40.9048	41.55	0.038659
(+)control(DEN+PH)	86.5566	41.22	0.034213

제 5 절 결 론

1. In vitro내에서 종양세포주에 대한 항암작용 검색

열수 추출 *Agaricus blazei*의 종양세포주에 대한 항암효과를 알아본 결과 *Agaricus blazei*의 열수추출물은 농도에 의존한 강력한 종양억제작용을 나타내었다. 특히 사람의 위암 세포주인 KATOIII의 경우 1×10^7 /well의 군에서 65.9%, 간암 세포주인 Hep3B의 경우는 1×10^6/well의 군에서 78.2% 그리고 폐암세포주인 A549의 경우는 고농도인 1,000 ppm에서 세포의 농도에 관계없이 공히 70%가 넘는 발육억제효과를 나타내었다.

2. In vitro내에서 면역세포주에 미치는 항암/항염효과 탐색

열수 추출 *Agaricus blazei*의 면역세포주에 미치는 항암/항염효과는 호중구나 단핵구 모두 3 ppm부터 100 ppm의 농도까지는 농도에 비례한 증가된 탐식작용을 나타내었으며 특히 인체 monocyte의 탐식작용은 100 ppm 처리군의 경우 7.9배나 증가하여 강력한 탐식작용의 증가를 나타내었다. 이는 향후 *Agaricus blazei* 추출물의 가공 고부가가치의 상품화를 위한 준임상자료로서 매우 의미가 있다고 하겠다.

3. 주요 질병원인균에 대한 in vitro 항균효과 검증

열수 추출 *Agaricus blazei*의 주요 질병 원인균에 대한 in vitro내 항균효과는 각종 질병의 원인균으로서 문제시되는 중요한 세균들에 모두 자실체의 농도에 관계없이 감수성이 없는 것으로 판명되었다. 대조군으로 사용된 quinolone계의 norfloxacin은 각각의 세균에 모두 항균효과를 나타내었다. 이 결과는 *Agaricus blazei*의 성분이 세균들에 직접 작용하지 않아 항균력은 지니지 아니하고 주된 작용이 면역기능과 깊은 관련이 있음을

추정케 하였다.

4. In vivo mice 급여에 미치는 단기복용효과 검색

열수 추출 *Agaricus blazei*의 투여가 종양유발 mice의 면역반응에 미치는 단기복용효과는 KSN-nu Mice에서 면역계의 초기 반응에서 T cell의 활성을 유도했다. CD3+와 CD25+세포군의 증가와 항원제시 세포로부터 signal을 받아 면역 반응을 증진시키는 MHC class II를 발현하는 세포군의 증가는 *Agaricus blazei*의 투여가 면역계를 증진시킴을 확인할 수 있었다. 특히 helper T cell의 유의성 있는 증가는 signal transduction을 통해 B cell과 cytotoxic T cell의 항원 특이적인 cellular immunity를 증대시킴으로써 antitumor activity를 나타냄을 확인할 수 있었다. *Agaricus blazei*투여 nude mice 경우 면역계의 초기반응에 T-림파구의 활성화에 관여하고 아울러 T-helper 세포의 증가를 유발하여 B-림파구와 cytotoxic T-cell 의 세포면역반응의 증가를 유도하여 항암작용을 함을 알 수 있었다.

5. In vivio mice 급여에 미치는 장기복용효과 검색

열수 추출 *Agaricus blazei*의 투여가 종양유발 nude mice의 항산화 효소활성에 미치는 장기효과는 *Agaricus blazei* 100 mg을 함께 처리한 군은 종양세포 단독투여군에 비하여 Mn-SOD 활성도와 TNF-α receptor의 발현도가 유의차 있게 높았다. *Agaricus blazei* 100 mg을 함께 처리한 군은 종양세포 단독투여군에 비하여 조직의 산화적 손상을 방지하고 free radical의 해독작용을 하는 catalase의 양이 증가되었다.

6. 가공과정에 따른 추출물의 효능 검색

가공과정에 따른 추출물의 효능을 알아본 결과 Ethanol 추출

*Agaricus blazei*의 종양세포주에 대한 억제 효과는 *Agaricus blazei*의 ethanol 추출물은 농도에 의존한 강력한 종양세포 생육 저해효과가 있었다. 특히 100 ppm 이상의 농도에서 처리군의 경우 마우스의 Sarcoma-180, T-lymphoma인 Yac-1, 사람의 유방암에 대한 생육 저해효과가 있었고 30 ppm이상의 농도에서는 위암, 간암 및 폐암세포주에 대한 강력한 생육 저해 효과가 있음을 밝혀 낼 수 있었다.

또한 ethanol 추출 *Agaricus blazei*의 in vitro내에서 사람의 탐식세포에 미치는 효과는 급성염증시 작용하는 인체 neutrophil의 탐식작용을 10 ppm 이상의 농도에서 20%이상 증가시켰고 만성염증시 작용하는 인체 monocyte의 탐식작용은 10 ppm 이상 처리군의 경우 2배나 증가됨을 알 수 있었다. 이는 향후 *Agaricus blazei* 추출물의 가공 고부가가치의 상품화를 위한 준임상자료로서 매우 의미가 있다고 하겠다.

7. 추출물의 독성학적 평가

Ethanol 추출 *Agaricus blazei*의 독성학적 평가를 위해 Balb/C mouse의 Natural Killer Cell cytotoxicity에 미치는 영향을 검토하였다. Ethanol 추출 *Agaricus blazei*의 용량이 증가할수록(16㎎) cytotoxicity가 증가함을 알 수 있어 암세포와 자연살해세포의 비율이 1:5 에서는 약 2%의 cytotoxicity 증가를 보인 반면 1:50 에서는 약 7%의 cytotoxicity 증가를 나타내었다.

8. 급성독성 검색

*Agaricus blazei*의 마우스에서 경구투여에 의한 급성독성시험을 위해 *Agaricus blazei*의 열수 및 ethanol추출물을 마우스에 경구투여한 후 14일간 임상증상을 관찰하면서 체중 및 혈액 생화학치 분석 그리고 반수 치사율(LD_{50})을 조사하였다. 급성독성시험을 한 결과 열수추출물과 ethanol

추출물 공히 10,000 mg/kg 이상에서도 아무런 해가 없어 치사량에 해당되지 않는 안전한 것으로 사료되어 가공제품으로의 개발에 아무런 문제가 없음을 알 수 있었다.

9. 이식암 성장저해 평가

Agaricus blazei 자실체 투여가 Sarcoma-180의 성장 저해에 미치는 영향은 투여 16일째부터 300 mg/kg 자실체 투여군의 경우 암의 용적이 대조군의 133.6 mm^3 에 비하여 93.5 mm^3 의 현저한 저해작용을 하였으며, 이를 저해율로 환산하면 30%에 해당한다. 한편 600 mg/kg 투여군의 경우는 73.1 mm^3로 더욱 더 억제되어 저해율은 45.5% 이었다. 투여 29일째의 경우는 대조군의 경우 108.7 mm^3 인데 반하여 300 mg/kg 투여군은 59.1 mm^3 로 저해율은 45.6%였으며 특히 600 mg/kg 자실체 투여군은 더욱 억제작용을 하여 38.9 mm^3 의 64.2%의 강력한 저해율을 나타내었다.

10. 항간암 효과 검색

항간암 효과를 검색하기 위해 Diethyl nitrosamine(DEN) 랫드 모델을 이용하여 *Agaricus blazei*의 항간암효과 실험한 결과 부분 간절제술과 DEN 투여에 의한 간손상으로 인하여 간세포 핵의 이형성이나 호산성병소 혹은 호염기성 병소 같은 간세포의 변성 소견이 양성 대조군에서 두드러지게 관찰되었으나 *Agaricus blazei*를 투여한 모든 군에서는 이러한 병소의 간세포 회복 소견이 관찰되었다. 즉, 조직의 재생정도가 *Agaricus blazei* 처치군에서 고르게 대조군과 비교하여 높았다.

제 6 절 참고 문헌

1. Lowry, C. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R.J.(1951), *J. Bio. Chem.*, 193, 256-277

2. Ohakawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K.(1979), Assay for lipid peroxidase in animal tissues by thiobabituric acid reaction, *Anal. Biochem.*, 95, 351

3. Aebi, H.(1974), Catalase. In "Methods of enzymatic analysis" Ulrich. Bergmeyer(eds.), 673

4. Paglia, R. E. and Valentine, W. N.(1967), Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase, *J. Clin. Med.*, 70, 158

5. 정명희(1990), 산소는 언제나 유익한 것인가, 의학종설, 1(2), 24-41

6. 정해영(1991), 활성산소, 암, 노화., 의학종설, 2(4) 25-53

7. 백태홍,홍정태,홍순영(1982), 인삼중의 항산화물질에 관한 연구, 한국식품과학회지

8. Gerschman, R.(1981), Historical introduction to the "free radical

theory of oxygen toxicity" In *Oxygen and Living Processes*, Gilbert, D. L., Ed., Springer-Verlag, New YORK, 44

9. Tappel, A. L.(1970), Biological antioxidant protection against lipid peroxidation damage, *Am. J. Clin.* Nutr., 23(8), 1137-1139

10. Giorotti, A. W.(1985), Mechanisms of lipid peroxidation, *J. Free Rad. Biol. Med.*, 1, 87

11. Itoh, H., H. Ito, H. Amano, and H. Noda(1994), Inhibitory action of a (1→6)-β-D-glucan-protein complex (FIII-2-b) isolated from *Agaricus Blazei* murill ("Himematsutake") on meth a fibrosarcoma-bearing mice and its antitumor mechanism, *Jpn. J. Pharmacol.*, 66, 265-271

12. Basarkar, P. W. and Nath, N.(1981), Cholesterol lowering action of vitamin P-lide compounds in rats, *Ind. J. Exper. Biol.*, 19, 787

13. Cilliers, J. J. L. and Singleton, V. L.(1990), *J. Agric. Food Chem.*, 38, 1789

14. Cilliers, J. J. L. and Singleton, V. L.(1991), *J. Agric. Food Chem.*, 39, 1298

15. Clifton, P. M.(1995), Antioxidant vitamins and coronary heart disease risk, *Curr. Opin. Lipidol.*, 6, 20-29

16. Cohen, J. C., Noakes, T. D. and Benade, A. J.(1988), Serum triglyceride responses to fatty meals, effects of meal fat content, *Am. J. Clin. Nutr.*, 47, 825-827

17. David, K., Shirley, A. T., Lisa, M. L., and David, M. K.(1988), Serum and liver lipids of rats fed cocoa butter, corn oil, palm kernel oil, coconut oil and cholesterol, *Nutrition Research*, 8, 87

18. Folch, J., Lees, M., and Sloane-Stanly, G. H.(1957), A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J. Biol. Chem*, 226, 497

19. Friedewald, W. T., Levy, R. I. and Fedreicson, D. S.(1985), Estimation of concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge, *Clin. chem.*, 18, 449

20. Guy, M. C., Kimberly, C. I., and Marc, S. P.(1992), Lipoprotein oxidation and lipoprotein induced cell injury in diabetes, *Diabetes*, 41, 61-66

21. Havel, R. J., Hunninghake, D. B., Illingworth, D. R., Lees, R. S., Stein, E. A., Tobert, J. A., Bacon, S. R., Bolognese, J. A., Frost, P. H., Lamkin, G. E.(1987), Lovastatin(mevinolin) in the treatment of heterozygous familial hypercholesterolemia, *Ann. Internal Med.*, 107, 609-615

22. Halliwell, B. and Guteeridge, J. M. C.(1984), Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease, *Biochem. J.*, 219, 1-14

23. Kajinmi, K., Toshimure, A., and Watanabe, A.(1986), Proc. IXth. International Symposium on Drug Effecting Lipid Metabolism, *Florence, Oct* 27

24. Kannel, W. B., Castelli, W. P., Gordon, T.(1979), Cholesterol in the prediction of atherosclerotic disease. New prospectives based on the Framingm study, *Ann. Intern. Med.*, 90, 85-92

25. Margaaretha, C. N., Inga-Britt, G., and Bengt, V.(1994), Lipid lowering diets enriched with monounsaturated or polyunsaturated fatty acids but low in saturated fatty acids have similar effects on serum lipid concentrations in hyperlipidemic patients, *Am. J. Clin. Nutr.*, 59, 115

26. Mattson, F. H., Erickson, B. A., and Kligman, A. M.(1972), Effect

of dietary cholesterol on serum cholesterol in man, *Am. J. Clin. Nutr.*, 25, 589-594

27. Monforte, M. T., Trovato, A., Kirjavainen, S., Forestieri, A. M., Galati, E. M., and Lo Curto, R. B.(1995), Biological effects of hesteridin, a Citrus flavonoid.(note II): hypolipidemic activity on experimental hypercholesterolemia in rat, *Farmaco*, 50, 595-599

28. Morel, D. W., Hessler, J. R., and Chisolm, G. M.(1983), Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipids, *J. Lipid Res.*, 24, 1070

29. Sendecor, G. W. and Cochrane, W. G.(1967), Statistical Methods, 6th ed., Iowa State University Press, Iowa, p.1

30. Carrol, K. K.(1975), Experimental evidence of dietary factors and hormone-dependent cancers, *Cancer Research*, 35, 3374-3383

31. Reddy, G. V., Shahani, K. M., and Banerje, M. R.(1973), Inhibitory effect of yoghurt on Ehrlich ascites tumor cell proliferation, *J. Natl. Cancer Inst.*, 50, 815-817

32. Finegold, A. S.(1974), Effect of diet on human fecal flora : Comparision of Japanese and American diets, *Am. J. Clin. Nutr.*, 27, 1456-1469

33. Drasar, B. S.(1972), Intestinal bacteria and cancer, *J. Clin. Nutr.*, 25, 1399-1404.

34. Mitsuoka, T.(1981), Intestinal flora and cancer. Second annual national symposium for lactic acid bacteria and health, Korea, pp. 16-40

35. Goldin, B. R., Swenson, L,, Dwyer, J., Sexton, M., and Gorbach, S. L.(1980), Effect of diet and Lactobacillus acidophillus supplements on human fecal bacterial enzymes, *J. Natl. Cancer Inst.*, 64, 255-261

36. Goldin, B. R., and Gorbach, S. L.(1980), Effect of Lactobacillus acidophillus dietary supplemants on 1,2-dimethyl hydrazine dihydrochloride-induced intestinal cancer in rats, *J. Natl. Cancer Inst.*, 64, 263-265

37. Lee, W. K., Lee, S. M., Bae, H. S., and Baek, Y. J.(1999), Effect of *Bifidobacterium longum* HY8001 administration on human fecal bacterial enzymes and microflora, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 267-272.

38. Bogdanov, I. G., Popkhristov, P., and Marinov, L.(1962), Effect of antibioticum bulgaricum on Sarcoma-180 and the solid form of Ehlich carcinoma, *Abstr VIII Intl Cancer Congress, Moscow.*

pp. 364-365

39. Kohwi, Y.(1982), Antitumor effect of *Bifidobacterium infantis* in mice, *Gann.*, 69, 613-618

40. Sakamoto, K., and Konishi, K.(1988), Antitumor effect of normal intestinal microflora on Ehrlich ascites tumor, *Jpn. J. Cancer Res*, 79, 109-116

41. Oda, M., Hasegawa, H., Komatsu, S., kambe, M., and Tsuchiya, F.(1983), Antitumor polysaccharide from *Lactobacillus sp, Agric. Biol. Chem.*, 47, 1623-1625

42. Itoh, H., et al(1994), Inhibitory Action of a (1-6)-beta-D-Glucan-Protein Complex(FIII-2-b) Isolated from *Agaricus blazei* Murill on Meth Fibrosarcoma-Bearing Mice and Its Antumor Mechanism, *Jpn. J. Pharmacol.*, 66, 265-71

43. Mizuno, M. et al(1998), Polysaccharides from *Agaricus blazei* Stimulate Lymphocyte T-cell Subsets in Mice, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62(3), 434-7