

발간등록번호

11-1543000-000369-01

세리포리아 락세라타 균사체 배양물의
당뇨병 개선 및 치료용 기능성식품소재화

(Development of functional ingredient for improvement
of diabetic disease using
summerged culture *Ceriporia lacerata* mycelium)

농·생명공학연구소(주식회사 월드바이오텍)

농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “세리포리아 락세라타 균사체 배양물의 당뇨병 개선 및 치료용 기능성식품 소재화에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2014 년 1 월 25 일

주관연구기관명 : (주)월드바이오텍

주관연구책임자 : 김병천

연 구 원 : 김지은

연 구 원 : 박동철

협동연구기관명 : 계명대학교 산학협력단

협동연구책임자 : 이삼빈

협동연구책임자 : 장병철

요 약 문

I. 제 목

“세리포리아 락세라타 균사체 배양물의 당뇨병 개선 및 치료용 기능성식품소재화”

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 목적

난치성질환인 당뇨병을 예방함은 물론 완전한 치료를 가능토록 하여 인류의 건강한 삶과 국익증진에 기여하고자 한다,

2. 필요성

세계인구의 5%가 질환자로 추정되는 당뇨병은 합병증을 초래하는 난치성 질환으로 지속적 증가추세에 있으나 시판중인 경구용 혈당강하제나 피하주사용 인슐린제는 혈당강하 기능만 있지 진행차단이나 개선기능이 없다.

따라서 이러한 단점을 극복한 새로운 당뇨치료제의 개발은 환자나 학계 모두의 염원이다.

연구과제인 세리포리아 락세라타 균사체 배양물은 수년간에 걸친 실험과 국내·외 비공인 민간 임상 결과 당뇨와 당뇨합병증의 진행을 효과적으로 차단하고 병증의 개선에 탁월한 기능이 있는 것으로 평가되므로, 이의 실용화 연구는 반드시 필요하다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 연구의 범위

본 연구는 세리포리아 락세라타 균사체 액체배양물(Submerged culture of mycelium *Ceriporia lacerata*/CLD3)의 당뇨병 개선 및 치료용 기능성원료 개별인정 신청까지로 한정한다.

2. 연구의 내용

본 연구는 세계적으로 사용예가 없는 CLD3의 당뇨병개선 및 치료용 기능성식품 개별인정 획득에 필요한 일반사항에 연구의 초점을 둔다.

가. 물질구조(성분) 및 기작규명

나. 기능성 입증

다. 비임상 실시

라. 기능성 향상을 위한 최적 배양조건 개발

IV. 연구개발결과

1. 지표물질 함량 $10\% \pm 0.2$ 증가된 최적배양모델 개발
2. 기능성원료 인정요건에 부합하는 물질 성분분석 및 기작 규명 완료
3. 기능성 입증
4. 세계적으로 사용예가 없는 물질로 비임상 소항목 실시 및 완료
5. 기능성원료 개별인정용 인체임상 수행 중
6. IND(임상시험계획)승인을 위한 비임상 수행 중

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과

- 가. 국내·외 특허 출원 - 3건
- 나. 국제전문학술 논문 (SCI 2.0급) 게재 - 2건
- 다. 학위논문 - 박사학위 1건, 석사학위 1건
- 라. 학술대회 발표 - 10건
- 마. 인력양성 4건 - 박사취득 1, 석사취득 1, 석사진학 2
- 바. 홍보실적 2건 - 대한민국 환경문화 대상 수상, 농림축산식품부 행정간행물 발간
- 사. 산업화 - 1건, 진행중 - 1건

2. 성과활용 계획

가. 산업화

- (1) 공동연구, 국외 기술 이전, 투자유치에 활용
- (2) 기능성식품화(2014년 12월 중 기능성식품 인가 목표)
- (3) 의약품화(2017년 하반기 중 의약품 인가 목표)

나. 추가연구

- 당뇨치료용 의약품화를 위한 심층적 연구에 활용

다. 기타 연구에 활용

- 미생물 발효연구 및 간, 신장질환 치료제 개발 연구에 활용

SUMMARY

(영문요약문)

Chapter 1. Research Title

Development of functional ingredient for improvement of Diabetic disease using summerged culture *Ceriporia lacerata* mycelium

Chapter 2. Research Goal and Necessity

Section 1. Goal

Development of substance that can block the progress of Diabetes, an incurable disease, and make Diabetes be completely treated, thereby contributing to healthy life for humans

Section 2. Necessity

Blood glucose lowering drugs or insulin currently on sale at a market enable the patients with Diabetes to do everyday life and only seems to function to delay the progress of Diabetes. It is thus an important task for all pharmaceutical companies to develop therapeutics that completely inhibits Diabetes and the progress of Diabetes-associated complications, the most serious thing to patients with Diabetes. Culture of *Ceriporia lacerata* mycelium in this research proposal has been informally tested to patients who suffer from Diabetes for long years and proven to promptly block the progress of Diabetes-associated complications, suggesting that culture of *Ceriporia lacerata* mycelium may be a very effective material for complete cure of Diabetes and its associated complications. Bearing this in mind, manufacturing and industrializing of *Ceriporia lacerata* mycelium as potential anti-diabetic drug and/or agent is inevitable.

Chapter 3. Content and Scope of Research Development

Section 1. Scope of Research Development

The scope of Research Development is limited until meet of the requirements necessary for approval as functional foods

Section 2. Contents of Research Development

The Contents of Research Development include identification of material's structure and action mechanism, material's preclinical and human clinical test, and improvement of material's functionality, and development of optimum culture condition.

Chapter 4. Results of Research Development

1. Development of culture model that can increase the amounts of indication material by 10%
2. Complete elucidation of the structure and action mechanism of material meet of the requirements necessary for approval as functional foods
3. Completion of preclinical test for functional foods
4. Under human clinical test for functional foods
5. Under preclinical test for approval of investigational new drug (IND)

Chapter 5. Outcomes of Research Development and applications of the Results

1. Outcomes
 - A. Three patent application (Korea, USA)
 - B. Two publications in SCI journals
 - C. One PhD Dissertation
 - D. Ten presentations in Research conference
 - E. Fostering 4 scientific researchers including one with PhD degree, one with MS degree and one student who enters post-graduate program for MS degree
 - F. One publicity outcome (Receiving a Best Prize of Korea Environment and Culture)
2. Applications of the Results
 - A. Industrialization - Goals to get approval for functional foods in December, 2014 and for medicaments in the second half of 2017
 - B. Additional research - In-depth research for the development of medicaments
 - C. Applications to other research - Microorganism fermentation research for improving GABA contents (Patent application)

CONTENTS

Chapter 1. The Outline of Research Development	8
Section 1. The Goal and Necessity of Research Development	8
Section 2. The Scope of Research Development	8
Chapter 2. The Current State of Domestic and Foreign Technologies	9
Section 1. The Current State and Results of Domestic and Foreign Anti-Diabetes Technologies	9
Section 2. The Current Position in Domestic and Foreign Anti-Diabetes Technologies	9
Chapter 3. Research Contents and Results	10
Section 1. Theoretical, Experimental Approach Methods and Research Contents	10
Section 2. Section 2. Results	13
Chapter 4. Accomplishment of Objects and Contribution to the related Fields	86
Section 1. Accomplishment of Objects on basis of Research Goal and Assessment	86
Section 2. Contribution for Technologies Expansion to the related Fields	87
Chapter 5. Outcomes and Applications of the Results	88
Section 1. Plan for Practical Use and Industrialization of the Results	88
Section 2. Plan for Intellectual Property Right, such as Patent, Breeding, and Research Publication	89
Section 3. Additional Research and Application to Other Research Field	90
Section 4. Plan for Technologies Expansion, such as Education, Guidance, and Publicity	90
Chapter 6. Foreign Science and Technologies Information collected during Research Development	91
Chapter 7. Current State of Research Facility and Equipment	92
Chapter 8. References	93

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	8
제1절 연구개발의 목적, 필요성	8
제2절 연구의 범위	8
제 2 장 국내외 기술개발 현황	9
제1절 국내·외 당노치료제 기술개발현황과 연구결과	9
제2절 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치	9
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	10
제1절 이론적, 실험적 접근방법 및 연구내용	10
제2절 연구결과	13
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	86
제1절 연구목표의 달성도	87
제2절 관련분야 기술발전예의 기여도	87
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	88
제1절 실용화,산업화 성과 및 활용계획	88
제2절 특허, 논문 등 지식재산권 성과 및 추가적 확보계획	89
제3절 추가연구, 타연구에 활용 계획	90
제4절 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획	90
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	91
제 7 장 연구시설·장비 현황	92
제 8 장 참고문헌	93

제 1 장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발의 목적, 필요성

1. 목적

난치성질환인 당뇨병을 예방함은 물론 완전한 치료를 가능토록 하여 인류의 건강한 삶과 국익증진에 기여하고자 한다.

2. 필요성

세계인구의 5%가 질환자로 추정되는 당뇨병은 합병증을 초래하는 난치성 질환으로 지속적 증가추세에 있으나 시판중인 경구용 혈당강하제나 피하주사용 인슐린제는 혈당강하 기능만 있지 진행차단이나 개선기능이 없다. 따라서 이러한 단점을 극복한 새로운 당뇨치료제의 개발은 환자나 학계 모두의 염원이다.

연구과제인 세리포리아 락세라타 균사체 배양물은 수년간에 걸친 실험과 국내·외 비공인 민간 임상 결과 당뇨와 당뇨합병증의 진행을 효과적으로 차단하고 병증의 개선에 탁월한 기능이 있는 것으로 평가되므로, 이의 실용화 연구는 반드시 필요하다.

제2절 연구의 범위

본 연구는 세리포리아 락세라타 균사체 액체배양물(Submerged culture of mycelium *Ceriporia lacerata*/ CLD3)의 당뇨병 개선 및 치료용 기능성원료 개별인정 신청까지로 한정한다.

1. 기능성원료 인정요건 기준의 물질구조 규명, 기작규명, 기능성 입증
2. 사용된 예가없는 기능성원료의 개별인정을 위한 비임상, 임상
3. 기능성 향상 최적 배양모델 개발

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제1절 국내·외 당뇨치료제 기술개발현황과 연구결과

1.외과적 요법의 당뇨치료기술 개발 현황

외과적 방법의 당뇨병 치료기술이 다수 개발되었으나 연구단계로서 임상적용까지는 많은 시간필요 할 것이며 임상실시 시에도 고비용으로 인해 파급효과는 미지수다.

2.경구용 혈당강하제와 피하주사용 인슐린제

경구용 혈당강하제나 피하주사용 인슐린제의 일반적 작용기전을 벗어난 혁신적인 치료제의 발견이나 개발소식은 없음.

제2절 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치

현재까지 기존의 경구용 혈당강하제나 피하주사용 인슐린제의 단점을 극복한 혁신적 치료제가 개발되지 않고 있다.

본 연구의 성과물인 세리포리아 락세라타 균사체 배양물(연구명:CLD3)은 부작용 없이 당뇨와 당뇨합병증의 진행을 즉시 차단함은 물론 완전한 치료에도 효과적인 물질로, 안전성과 기능성에 있어 절대적 비교우위에 있으므로 천연물과 합성신약을 아울러 당뇨치료제 개발 분야에 있어 선도적 위치를 점할 것으로 평가 됨.

(표1) Invivo & invitro 에서 확인된 CLD3의 특성 (시판중인 신약대비)

구분		기작	기능성	장점	단점
기 존 치 료 제	혈당 강하제	<ul style="list-style-type: none"> •당흡수 및 생성 억제 •당이용 촉진 •인슐린 분비 촉진 	•혈당 강하	•속효성	<ul style="list-style-type: none"> •정상혈당 저해 •개선기능 無 •항구적 투약 •부작용 •저항성 유발
	인슐린 주사제	<ul style="list-style-type: none"> •당이용 촉진에 의한 혈당 조절 			
CLD3 연구성과물		<ul style="list-style-type: none"> •베타세포 자살사 방지 및 베타세포 증가 •미규명 추정 복합 기작 (간,신장,혈관질환 개선) 	<ul style="list-style-type: none"> •혈당 조절 •당뇨 및 당뇨합병증의 현저한 개선 	<ul style="list-style-type: none"> •정상혈당 無저해 •개선기능 有 •한시적 복용 •부작용 無 •저항성 非有發 	•완효성

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

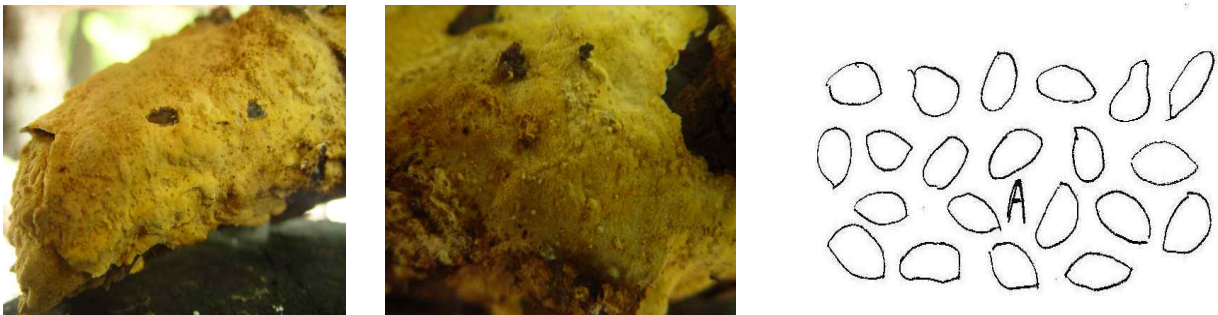
제1절 이론적, 실험적 접근방법 및 연구내용

1.연구의 기원

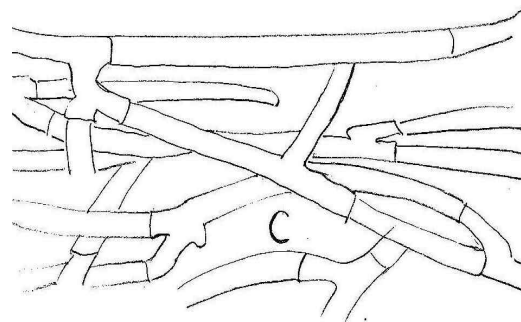
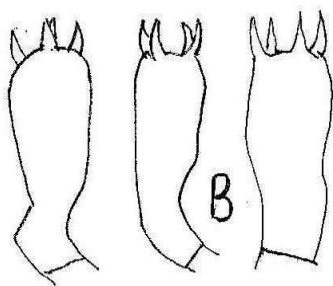
가. *Ceriporia lacerata*(세리포리아 락세라타)

Ceriporia lacerata(세리포리아 락세라타)는 구멍장이과 버섯으로 참나무나 적송에 부생하며 백색 부후균의 일종이다. 생태계에서 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 기타 다당류 및 글리세롤(glycerol)등의 탄소원을 이용하기 위하여 리그닌(Lignin)분해라는 공동대사를 수행하는 것으로 알려져 있다. 자실체는 완전 배착성이며 기주위에 단단히 부착하여 넓게 퍼진다. 자실층은 관공으로 형성되어 있고 백색이며 짙은 술향을 발산한다.

2002년 일본에서 처음 발견하여 학계에 보고되었고 연구 사례는 현재까지 30여건에 불과하며 식·의약적 목적으로 연구한 것은 본 연구의 주관기관인 (주)월드바이오텍이 최초 이다.



자실체



A-담자포자(擔子孢子/Basidio-spores)
C-균사체(菌絲體/Tram-hypha)

B-담자기세포(擔子器 細胞/Basidium)

나.세리포리아 락세라타 ITS-5.8S rDNA 시퀀스 분석 결과

세리포리아 락세라타 균주를 ITS-5.8S rDNA 시퀀싱을 한 결과 *Ceriporia lacerata* FJ462746 과 92% 상동하는 것으로 나타났다.

>CR

CGGGTTGTAGCTGGCCTTTAACGAGGTATGTGCACGCCTGGCTCATCCACTCTCAACCTCTGTG
 CACTTTATGTAAGAAACGGTGTAAAGCCAGCTATTCATTAGTTGGTAATAAGCCTTTCTTATGT
 TACTACAAACGCTTCAGTTATAGAATGTTTACTGTGTATAACACAATTATATACAACCTTTC
 AGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGA
 ATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCCGAGG
 AGTATGCCTGTTTGGAGTCTCATGGAATTCTCAACCCCTAAATTTTGTAAATGAAGTTTATTGGG
 CTTGGACTTGTAGGTTGTGTCGGCTTCTATTCAACTCCTCTGAAAA

b)

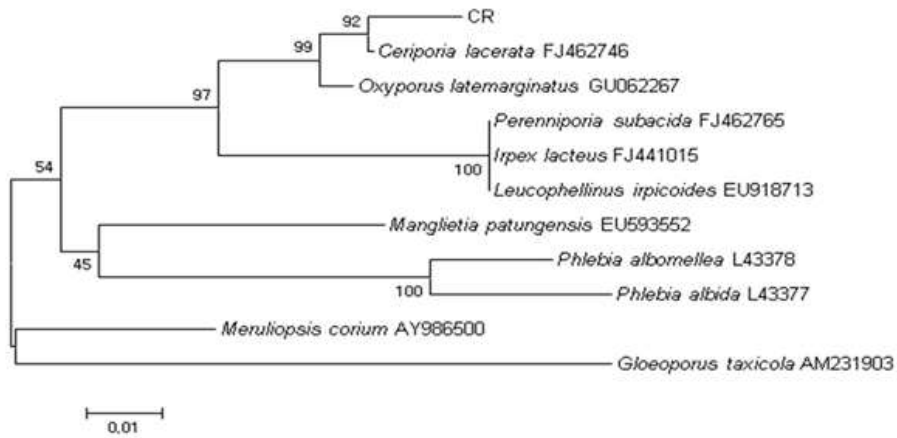


Figure 1. ITS-5.8S rDNA sequencing and phylogenetic relationships isolated *Ceriporia lacerata*.

a) ITS-5.8S rDNA sequencing b) phylogenetic relationships of *Ceriporia lacerata*. Numbers are bootstrap values. The tree constructed by the neighbor-joining method is based on nearly complete ITS-5.8S rDNA sequence. The bar indicates the relative sequence divergence.

2.세리포리아 락세라타 균사체 배양조건의 최적화 연구 및 비임상 실시

연구 범위	이론적·실험적 접근방법	연구 내용
배지영양원과 배양환경의 변동에 따른 지표물질함량 측정	<p>1) 선행연구시 확립한 표준모델을 기초로 배지 영양원 및 환경 변수의 조합변경 및 이의 확장, 축소 적 방법으로 접근</p> <p>2) 제1협동의 연구실 실험결과와 참여기업(주관세부)이 보유한 대용량설비 실험결과가 상이하여 참여기업의 대용량 상용시설을 사용하여 효능극대화 배양모델 개발</p>	<p>기능성과 지표물질 함량이 정비례하고 지표물질의 함량은 배양 조건에 따라 증감하므로 연구 전 지표물질 EPS의 함량 $4.5 \pm 0.20\text{g/L}$ 을 $5.50 \pm 0.15\text{g/L}$ 수준으로 향상시키는 배양기술 개발</p>
사용예가 없는 기능성원료의 개별인정용 비임상	GLP기관 위탁시험	<p>1.비임상 실시</p> <ul style="list-style-type: none"> ○시험물질 조제균질성 시험 ○시험물질 예비 적용 시험 ○13주 반복독성 시험 ○13주 회복시험 시험 <p>2.계획서 외 추가 실시</p> <p>계획서상 내용 만으로는 목표달성 불가능. 참여기업의 비용부담으로, 기능성원료 개별인정 비임상 전항목 수행 하기로 함.</p> <ul style="list-style-type: none"> ○설치류 단회독성 시험 ○설치류 4주 DRF시험 ○유전독성시험(복귀돌연변이) ○유전독성시험(염색체이상시험) ○유전독성시험(소핵시험) ○비설치류 DRF시험

3. 물질 구조규명 연구

연구 범위	이론적 · 실험적 접근방법	연구 내용
배양액에 함유된 균사체와 EPS 함량 측정	관련된 논문 검색을 통한 실험 방법 확립- 균사체와 EPS 동결 건조 후 무게를 측정하여 생산량 확인.	<ul style="list-style-type: none"> ○ 원심분리와 여과법을 이용한 균사체 함량 측정 ○ 원심분리와 유기용매 침전법을 이용한 EPS 함량 측정 ○ 최적배양모델 개발 연구에 결과 피드백
생산된 EPS의 분자량 측정	Gel permiation chromatography (GPC)를 이용한 분자량 측정 -stadard 물질로 분자량을 알고 있는 dextran을 이용함.	<ul style="list-style-type: none"> ○ 건조한 점질물을 0.1 M Na₂SO₄/0.05 M NaN₃ (glacial acetic acid로 pH를 4로 조정) 용액에 1% 되게 녹인 다음, 원심분리 후 상층액 만을 0.45 μm syringe filter로 여과하여 GPC로 분석함. 분석조건은 검출기로 RI를 이용하였으며, GPC column은 Shodex SB 805 HQ(Japan)를 이용하여 이동상을 0.1 M Na₂SO₄/0.05 M NaN₃ (glacial acetic acid로 pH를 4로 조정)로 유속은 1.0 mL/min의 속도로 흘려줌. 표준곡선은 각기 다른 분자량(130, 400, 770, 1200 kDa)을 가진 dextran (American Polymer Corporation, USA)을 이용하여 작성하였으며, 굴절지수 측정기를 이용하여 EPS의 분자량을 측정함.
생산된 EPS에 함유된 단백질의 가수분해 정도 확인. 기능성 실험.	효소처리 방법을 이용한 EPS 정제방법-SDS Page Gel을 이용한 당단백질 결합물의 단백질 가수분해 효소 처리에 의한 단백질 가수분해 정도 확인	<ul style="list-style-type: none"> ○ 생산된 EPS는 당과 단백질이 약 50:50으로 결합된 당단백질로써 단백질 가수분해 효소 처리를 통해 당에 결합된 단백질을 가수분해하여 정제를 할수 있는 방법을 확립. 10% SDS Page Gel에서의 단백질이 가수분해되어 저분자화 되는 pattern 확인.

4.기작규명 연구

연구 범위	이론적 · 실험적 접근방법	연구내용
<p>CLD3의 β-세포 재생/보호 효과 및 in vivo 항당뇨 효능 분석</p>	<p>1. 췌장 β-세포(이하 β세포)는 혈당 조절 호르몬인 insulin을 분비함. 2. β-세포의 증식을 유도하며, 세포 내 insulin 생성을 증가시킬 수 있는 물질이 있을 경우 이 물질은 항당뇨(당뇨 개선 및 치료) 효과가 있다고 할 수 있음.</p> <p>1. Cell culture 2. MTS assay 3. Cell count assay 4. DNA 분절화 분석 5. 당뇨동물 췌장조직 염색 6. 혈중 insulin/glucose 분석</p>	<p>1. CLD3의 β-세포 재생/보호 효능 연구(in vitro) ○스테로이드 dexamethasone (Dex) 처리에 따른 INS-1 세포 독성 영향 분석 ○CLD3의 Dex 유도 INS-1 세포 독성 억제 효능 평가 2. Steroid-induced diabetes (SID) 모델에서 CLD3의 당뇨 개선 및 보호 효능 분석(in vivo) ○Dex 유도 당뇨동물 모델 확립 ○Dex 유도 당뇨동물에서 CLD3 당뇨 개선 및 치료 효능/기전 분석</p>
<p>기작규명 연구</p>	<p>1. β-세포의 증식/생존/사멸은 세포 증식/생존/사멸에 관여하는 여러 종류의 단백질 발현 및 활성에 크게 영향을 받음. 2. 그러므로 CLD3에 의한 β세포 증식/생존/사멸 관련 단백질의 발현 및 활성에 미치는 영향 분석은 CLD3의 β세포 재생/보호 효능의 작용기작을 이해하는 데 도움이 됨.</p> <p>1. Cell culture 2. Western blot analysis 3. RT-PCR 4. Pharamcological inhibitor 5. ELISA</p>	<p>1. CLD3의 β-세포 재생/보호 효능의 기작 규명 연구(in vitro) ○INS-1 세포에 Dex 처리에 따른 세포 세포 증식/생존/사멸 조절 단백질 발현 및 활성 변화 분석 ○화학저해제에 CLD3의 보호 기작 검증 2. CLD3의 당뇨 개선 및 보호 효능 관련 기작 규명 연구(in vivo) ○Dex 유도 당뇨동물 췌장조직 염색, 혈중 insulin/glucose 변화 분석 ○조직 단백질 시료에서 glucose transporter (Glu-2, Glu-4) 단백질 발현 변화 분석</p>

제2절 연구결과

1. 세리포리아 락세라타 균사체 배양조건의 최적화 연구결과

가. 탄소원에 따른 영향

많은 종류의 버섯들은 균사체 액체 배양시 탄소원으로 sucrose, lactose, glucose, fructose, galactose 등을 필요로한다. CL 액체 배양시 탄소원이 미치는 영향을 알아보기 위하여 기본재비에 glucose 3%를 대신하여 다양한 탄소원을 첨가하여 배양하였다. 그 결과, pH는 큰 변화가 없었고 잔존당 함량은 glucose 첨가구에서 약간 감소되는 것으로 나타났다. 또한 균사체의 모양이 탄소원의 종류에 따라서 다른 것으로 확인되었다. Glucose를 농도별(1~5%)첨가하여 균사체와 EPS 함량을 측정 한 결과 3% 까지는 농도 의존적으로 높아지다가 그 이후에는 큰 변화가 없는 것으로 나타나 glucose의 농도는 3%가 최적 조건이라 선정하였다.

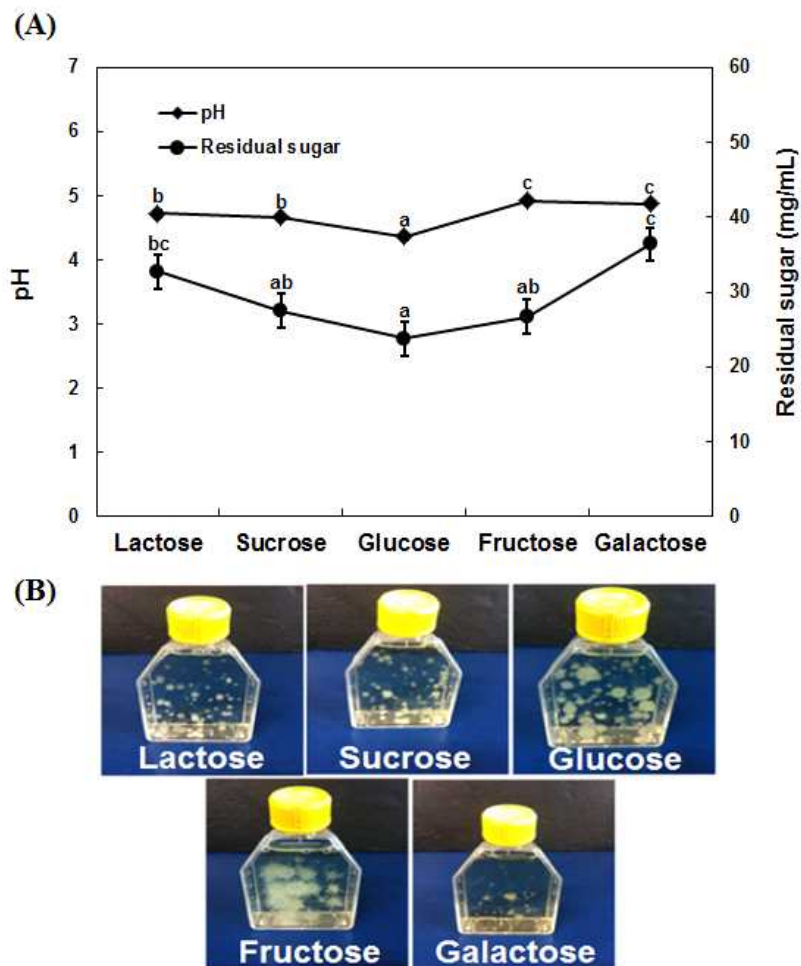


Figure. Effect of carbon sources on pH and residual sugar contents (A) and mycelial morphology (B) of CL in shake flask. Each value in the mean \pm SE ($n \geq 3$); Mean with the different letters in each column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

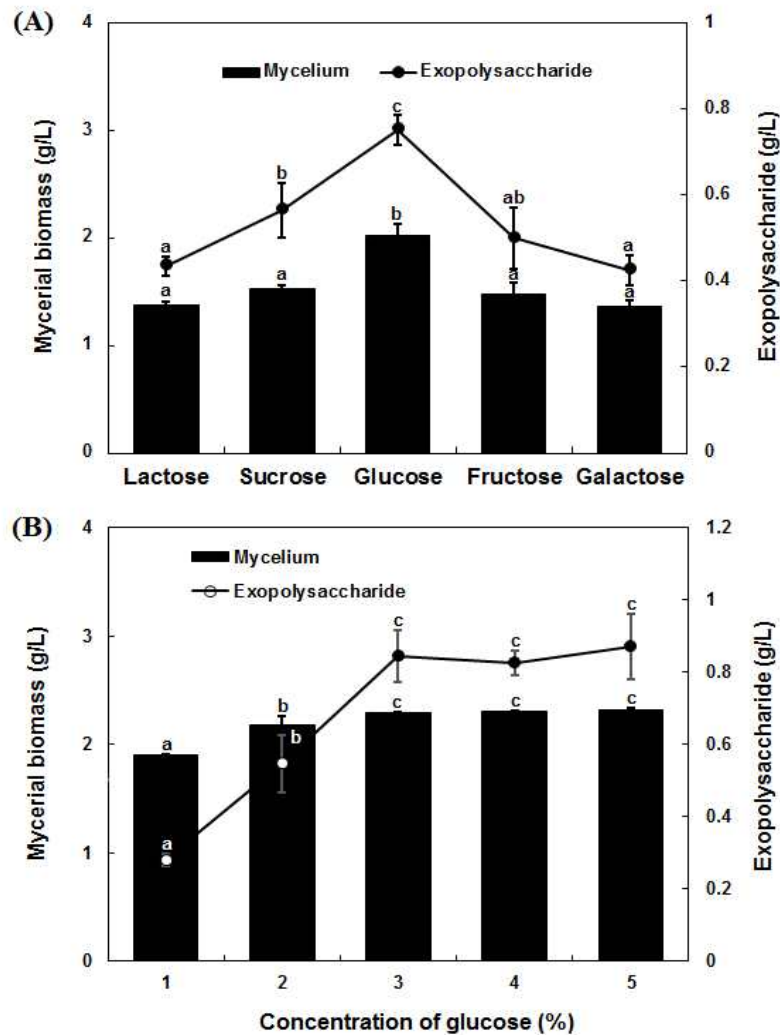


Figure. Effect of carbon sources on mycelial growth and EPS production of CL in shake flask. Each value is the mean±SE (n≥3); Mean with the different letters in each column are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

나. 질소원에 따른 영향

질소원 종류에 따른 이화학적 특성을 평가하기 위해 tryptone, yeast extract, soy flour, L-glutamic acid, ammonium persulfate, malt extract, peptone 7종류의 질소원을 3% 첨가하여 7일간 배양하였다. 균사체 함량은 대두분말 첨가구가 가장 높았고 EPS 함량은 tryptone, yeast extract, soy flour, L-glutamic acid가 비슷한 수준으로 높았으나 경제적, 산업적인 측면에서 균사체와 EPS 함량이 모두 높은 대두 분말을 질소원으로 선택하였다. 균사체와 EPS 함량은 탄소원 농도와 비슷한 경향으로 3%까지는 증가되는 경향을 보이다가 3% 이후에는 큰 변화가 없어 최적 농도는 3%로 설정하였다.

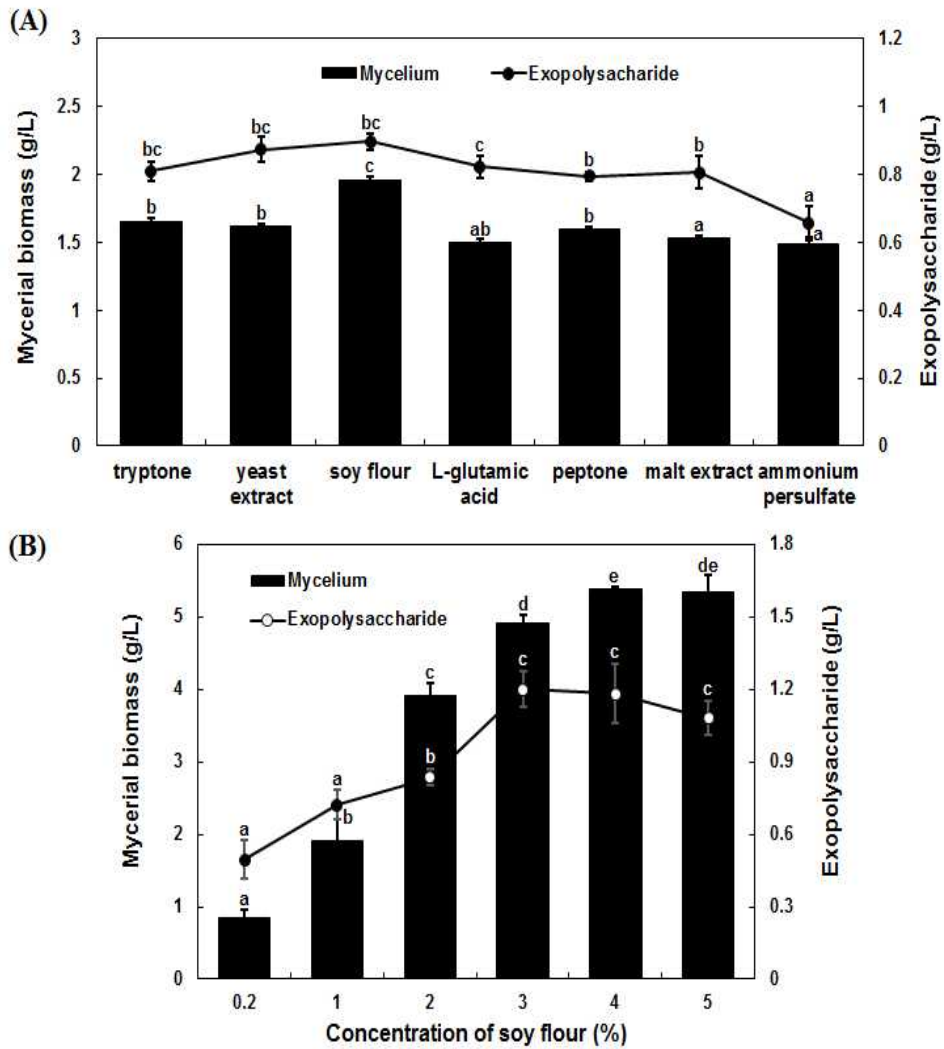


Figure. Effect of nitrogen sources on mycelial growth and EPS production of CL in shake flask. Each value is the mean±SE (n≥3); Mean with the different letters in each column are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

다. 미량원소에 따른 영향

미량 원소 종류에 따른 이화학적 특성을 평가하기 위해 KH_2PO_4 , MgSO_4 , ZnSO_4 , CuSO_4 , FeSO_4 , CaCl_2 5종류의 미량원소를 0.5% 첨가하여 7일간 배양하였다. 그 결과 균사체 함량은 CuSO_4 첨가구가 가장 높았으나 EPS 생산이 MgSO_4 첨가구가 가장 높아 MgSO_4 를 미량 원소로 선정하였다. 미량 원소 농도를 0~0.25% 농도로 첨가하여 균사체와 EPS 함량을 측정된 결과 0.15% 농도까지는 증가되나 0.25%에서는 큰 차이가 없어 최적 농도는 0.15%로 설정하였다.

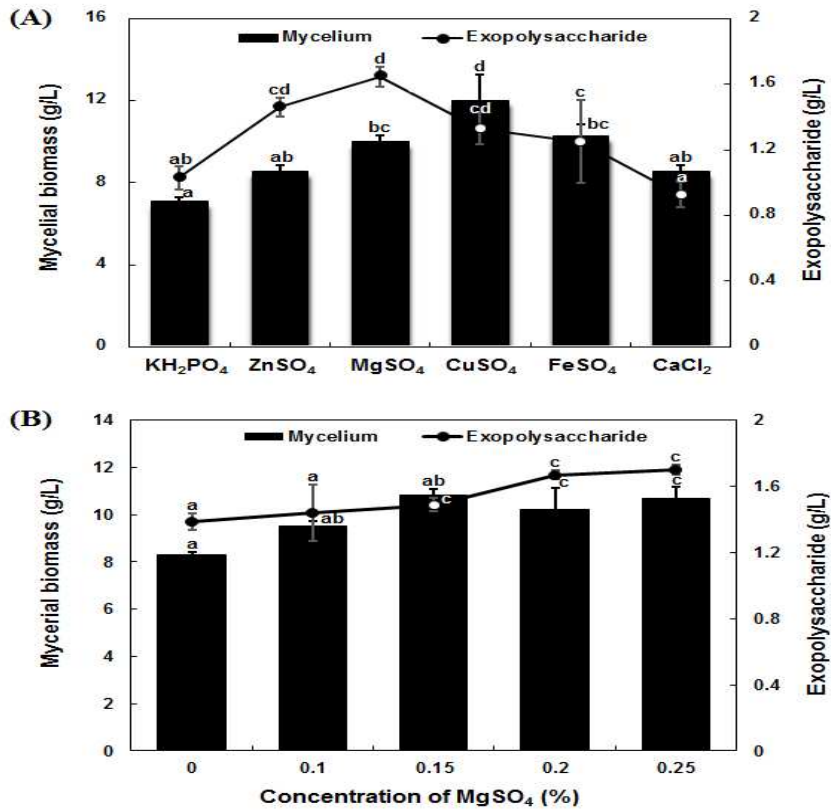


Figure. Effect of bio-elements on mycelial growth and EPS production of CL in shake flask. Each value is the mean±SE (n≥3); Mean with the different letters in each column are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

라. 액체 발효조 배양에 따른 최적 배양 조건 탐색

750L 상용배양기에서 배양기간에 따른 균사체와 EPS 함량을 측정하였다. 균사체와 EPS 함량이 7일까지는 지속적으로 증가하였으나 8일 부터는 균사체 함량에 큰 변화가 없었고 10일 이후에 감소하는 경향을 보였다. EPS는 8일 이후에도 증가되는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었다. 결과 최적 배양 일수는 8일로 선정하였다. 표1의 조건으로 8일간 배양시 가장 높은 EPS를 생성 시켰고, EPS의 함량은 $5.85 \pm 0.50\text{g/L}$ 수준을 유지하였다. 기능성 극대화 및 품질표준화를 위한 102회의 실험을 실시하였다. 전 연구 시 EPS의 함량은 $4.5 \pm 0.20\text{g/L}$ 이었으나 연구결과 확립한 배양모델로 배양시 EPS는 $5.85 \pm 0.15\text{g/L}$ 수준으로 향상되었다.

(표2) EPS 극대화 배양조건

배양환경		배지구성원	
배양기 용량(ℓ)	750	설탕(g)	5,000
살균수(ℓ)	400	포도당(g)	4,000
소포제(cc)	40	전분(g)	1,200
통기(kgf/cm^2)1800PPM	1.5	대두분(g)	4,000
배양온도($^{\circ}\text{C}$)	23	대맥분(g)	2,000
pH	5.0	MgSO_4 (%) 외 기타	0.15

2.비임상 실시 및 결과

(표3) GLP인증 기관 (주)캠온(2012.02.01.~2013.01.31.)

시 험 항 목	결 과
1)세리포리아 락세라타 균사체 배양물의 Ssrague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험	시험물질 투여에 의한 이상 관찰되지 않음
2)세리포리아 락세라타 균사체 배양물의 Ssrague-Dawley 랫드를 이용한 4주간 반복 경구투여 DRF독성시험	시험물질 투여에 의한 독성학적으로 의미있는 변화 관찰되지 않음
3)세리포리아 락세라타 균사체 배양물의 세균을 이용한 복귀돌연변이시험	시험물질 농도 증가에 따른 집락수의 증가 나타나지 않음. 세포독성 나타나지 않음.
4)세리포리아 락세라타 균사체 배양물의 배양 Chinese Hamster Lung (CHL)세포를 이용한 염색체이상시험	CHL세포에 염색체이상을 유발하지 않음
5)세리포리아 락세라타 균사체 배양물의 수컷 ICR마우스 골수세포를 이용한 경구투여 소핵시험	마우스 골수세포에 소핵을 유발하지 않음
6)세리포리아 락세라타 균사체 배양물의 Ssrague-Dawley 랫드를 이용한 13주간 반복 경구투여 독성시험 및 4주 회복시험	시험물질 투여와 관련된 변화 관찰되지 않음
7)세리포리아 락세라타 균사체 배양물의 Beagle Dog을 이용한 4주간 반복 경구투여 DRF 독성시험	시험물질 투여에 의한 독성학적으로 의미있는 변화 관찰되지 않음
8)세리포리아 락세라타 균사체 배양물의 ICR마우스를 이용한 단회 경구투여에 의한 OGTT효력시험	시간별 혈당 측정 결과 부형제대조군에 비해 30분에서 240분 사이에서 10~20%의 통계학적으로 유의한 혈당감소가 관찰되었다.
9)세리포리아 락세라타 균사체 배양물의 3주간 경구투여에 따른 db/d 마우스의 혈당강하 효능시험	대조군에 비해 지속적으로 유의한 혈당감소가 관찰되어 혈당강하에 효력이 있는 것으로 판단 함

참조 - 비임상결과 보고서 원문

3. 지표물질 규명 및 기능성 연구결과

가. CLD3(세리포리아 락세라타 균사체 배양물)의 성분분석

1) 일반성분 분석

(표4) CLD3의 이화학적 성분분석 결과

Moisture content	5.02±0.06
pH	5.96±0.04
Total acidity (%)	1.47±0.04
Sugar content (%)	10.75±0.07
β-Glucan content (% w/w)	29.16±1.58
Exopolysaccharide content (%)	5.10±0.81
Mycelium content (%)	8.60±0.10

2) 극성 및 비극성 용매를 이용한 미량특수성분 분석

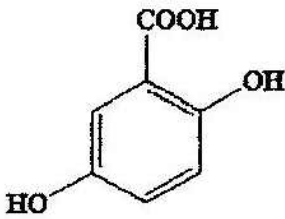
세리포리아 락세라타 균사체 액체배양 건조물 100 g을 1.5ℓ의 물에 현탁한 후 헥산 1.5ℓ를 가한다. 분액 깔대기에 넣고 헥산 불용성 층과 가용성 층으로 분획하여 상층부를 수집하였다. 하층과 동일한 부피의 헥산 용매를 동일한 방법으로 2회 반복하여 용액의 색이 옅어 질때까지 헥산층에 용해가 가능한 물질을 최대한 얻어내어 분획 및 건조하였다. 계속해서 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트, 부탄올을 상기와 같은 방법으로 수행하여 각각 헥산 가용추출물 15g, 메틸렌클로라이드 가용추출물 25g, 에틸아세테이트 가용추출물 30g, 부탄올 가용추출물 15g를 수득하여 시료로 사용하였다. 에틸아세테이트 가용추출물 30g을 용출액(헥산:에틸아세테이트:메탄올=10:3:1)을 이용하여 실리카겔 칼럼 크로마토그래피(12×60cm 머크사, ASTM7734 독일)를 실시한 후 TLC패턴에 의해 15개의 분획물을 수득하였다. **분획물 전부가 극미량 추출되어 합성소재가 아닌 천연물 소재화가 목표라면 15개 분획물은 지표물질화가 힘든 것으로 판단하였다.**

분획물 중 항당뇨 기능성이 보고된 물질은 2,5-dihydroxybenzoic acid, protocatechualdehyde가 있었다.

가) 2,5-dihydroxybenzoic acid 화합물의 분리

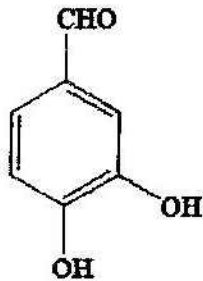
분획물 중 6번째 분획물을 용출액(톨루엔:에틸아세테이트:아세트산=5:3:1)을 이용하여 실리카겔 칼럼 크로마토그래피(1.5×12cm, ASTM7734)로 분리하고, 최종적으로 분리 및 정제하기 위해 TLC(전개용매/톨루엔:에틸아세테이트:아세트산=5:4:1)상에서 Rf가 0.58인 2,5-dihydroxybenzoic acid 7mg을 수득하였으며 EI-MASS 및 1H-NMR 분석을 통해

2,5-dihydroxybenzoic acid으로 동정하였다.



나) protocatechualdehyde화합물의 분리

분획물 중 7번째 분획물을 용출액(톨루엔:에틸아세테이트:아세트산=2.5:1:0.5)을 이용하여 실리카겔 칼럼 크로마토그래피(1.5×15cm, ASTM7734)로 분리하고, 최종적으로 분리 및 정제하기 위해 TLC(전개용매/톨루엔:에틸아세테이트:아세트산=5:4:1)상에서 Rf가 0.52인 protocatechualdehyde 2mg을 수득하였으며 EI-MASS 및 1H-NMR 분석을 통해 protocatechualdehyde로 동정하였다.



나. 지표물질 EPS의 분자 구조 규명

(1) EPS의 탄수화물/단백질 함량 및 분자량 확인

EPS를 2차 정제, 단백질 가수분해 효소 처리를 하여 단백질과 당 함량을 측정한 결과 당 함량은 정제에 의해 오히려 낮아지는 결과가 나타났고 단백질 함량은 높아지는 경향을 보였다. GPC를 이용하여 EPS의 분자량을 측정한 결과 약 120 kDa 전후인 것으로 나타났으며 단백질 가수분해 효소 처리에 의해 분자량이 약간 감소하는 것으로 나타났다.

Table. Total carbohydrate and protein contents of EPS according to purification

	Yield (%)	Total carbohydrate contents (%)	Total protein contents (%)
EPS	1.22±0.03 ^c	45.32±1.41 ^a	34.17±0.73 ^a
Secondary purification of EPS	0.78±0.01 ^b	50.49±0.52 ^b	33.50±2.79 ^a
Enzyme treatment of EPS*	0.24±0.06 ^a	51.39±1.32 ^b	34.61±1.51 ^a

*Enzyme treatment; alcalase 0.5%, 50° C, 30 min. Each value is the mean±SE (n≥3);

means with the different letters in each column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

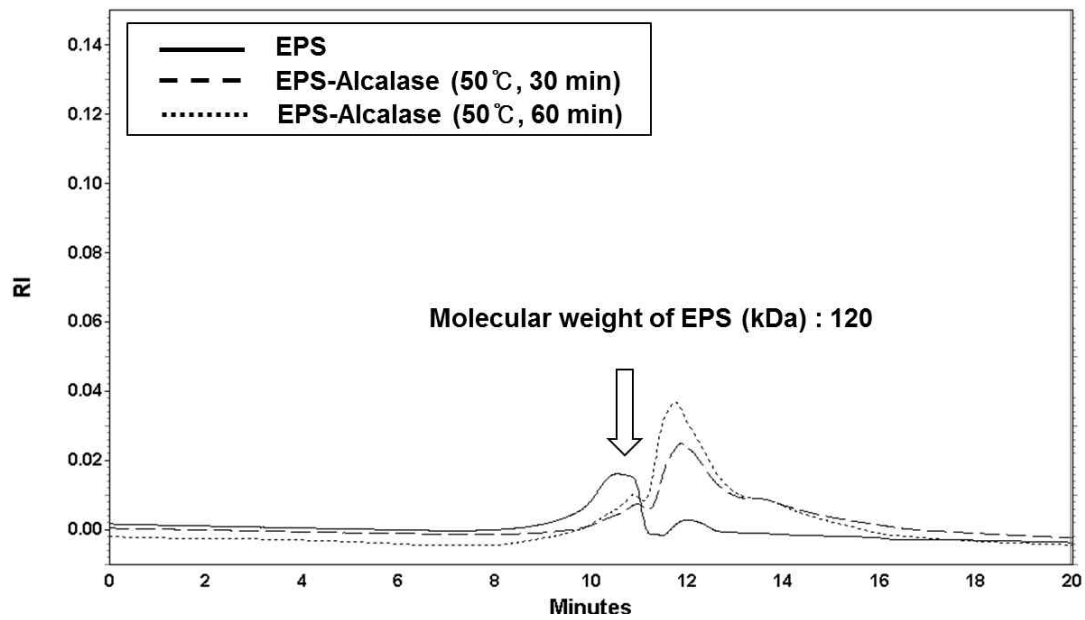


Figure. GPC chromatogram and molecular weight of EPS.

(2)EPS의 Coomassie blue와 glycoprotein 염색

SDS-PAGE를 하여 부분적으로 정제된 EPS의 분자량과 당/단백질 패턴을 알아보았다. Coomassie brilliant blue R-250과 concanavalin A-horseradish peroxidase 방법으로 염색한 결과는 다음 사진과 같다. 정제된 EPS는 Coomassie brilliant blue R-250로 염색하였을 때 저분자의 물질이 다량 분포하는 것으로 나타났는데 이 결과는 BCA 방법을 통한 단백질 함량 결과와 유사하였다. A-horseradish peroxidase 방법으로 crude한 EPS와 2차 정제된 EPS의 glycoprotein 염색을 한 결과, EPS는 소량의 저분자 단백질 다수의 glycoprotein으로 구성된 것으로 확인되었다.

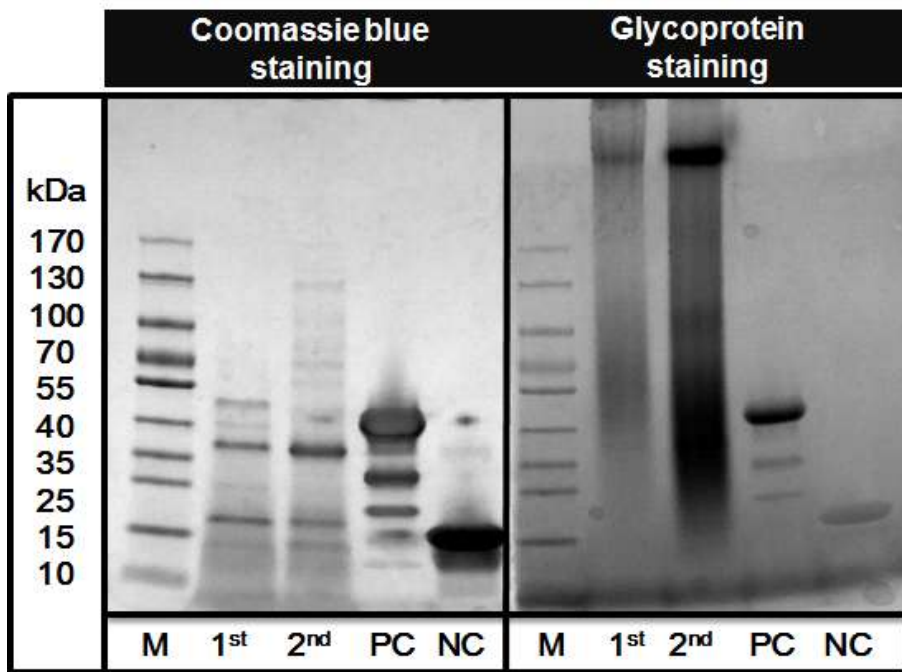


Figure. Coomassie blue and glycoprotein staining of EPS. M; Marker, 1st; first purification of EPS, 2nd; second purification of EPS, PC; positive control (horseradish peroxidase), NC; negative control (soybean trypsin inhibitor)

(3) EPS 분획 및 구성성분 분석

CL로부터 생산된 EPS를 Sepharose CL-6B column을 이용하여 정제하였다. 분획물(2.5 mL)을 회수하여 BCA 방법을 이용하여 단백질 함량을, phenol-sulfuric acid 방법을 이용하여 당 함량을 측정하였다. 세가지 분획물 (Fr-I, Fr-II, Fr-III)의 검출 순서는 아래 그래프와 같다. 주요 분획물인 Fr-II SMS 32-51번 튜브에서 분리되었다. 세가지 분획물 모두에서 소량의 단백질이 검출되었다. 전기영동을 한 후, Coomassie brilliant blue R-250와 concanavalin A-horseradish peroxidase 방법으로 겔을 염색한 결과 주요 분획인 Fr-II는 대부분 당으로 구성되었고 약간의 단백질이 존재하는 것으로 나타났다. Fr-II는 구성당으로 mannose (83.36%), galactose (12.54%), 그리고 glucose (4.10%)를 함유하고 있으며 분자량은 약 90 kDa인 것으로 나타났다.

EPS는 당과 단백질이 각각 45%와 34%로 구성된 glycoprotein 형태로 분자량이 약 120 kDa 정도였다. Sepharose CL-6B를 이용하여 분획한 주요 분획물인 Fr-II는 분자량이 약 90 kDa로 mannose가 83%로 구성된 β -glucan성 다당류임을 알 수 있었다.

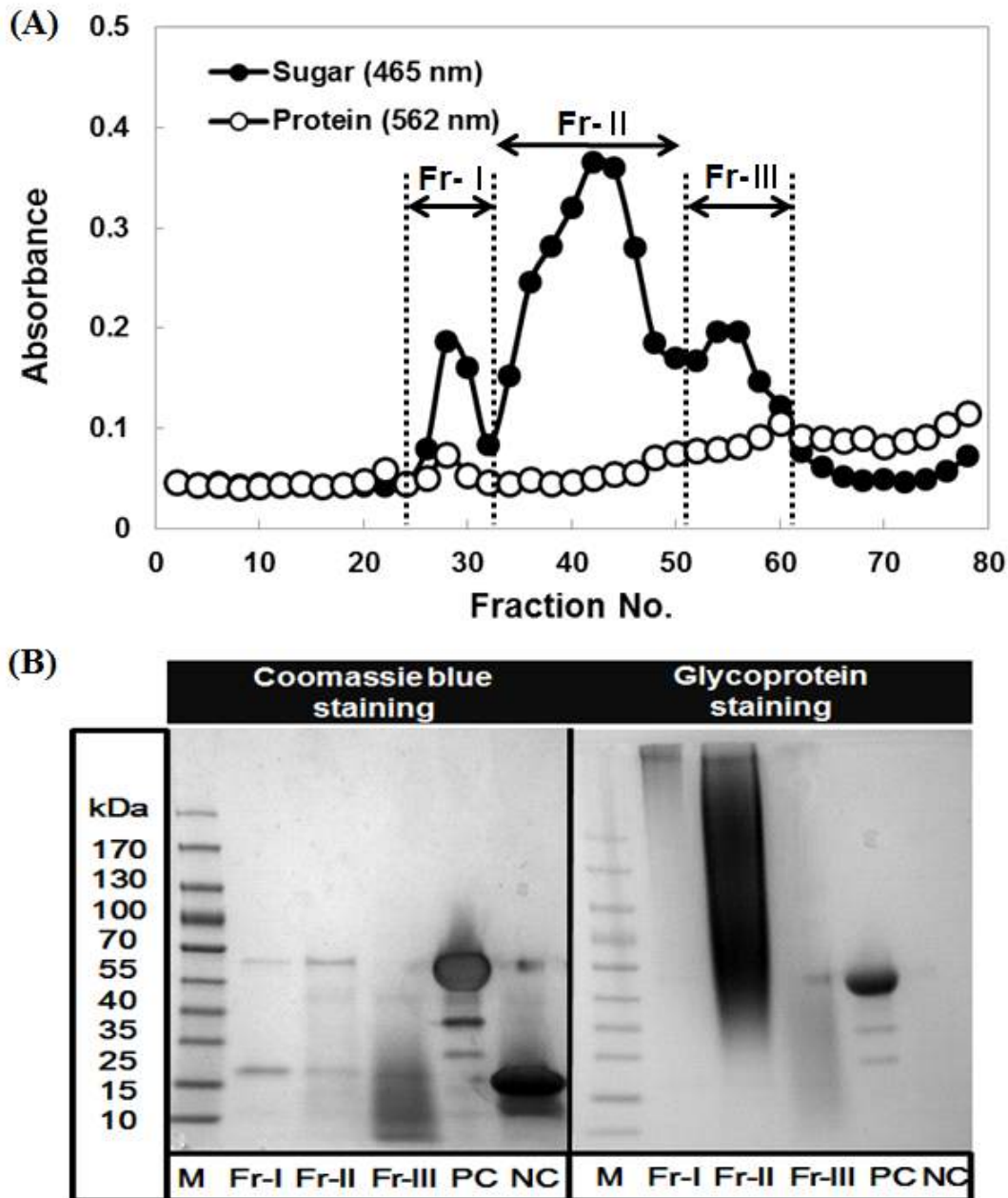


Figure. Elution profile (A) and coomassie blue and glycoprotein staining (B) of EPS in Sepharose CL-6B chromatography. Elutions were analysed by measuring the absorbance at 465 nm for carbohydrate and at 562 nm for protein. Fr-I; Fraction I in Sepharose CL-6B column, Fr-II; Fraction II in Sepharose CL-6B column, Fr-III; Fraction III in Sepharose CL-6B column, PC; positive control (horseradish peroxidase), NC; negative control (soybean trypsin inhibitor).

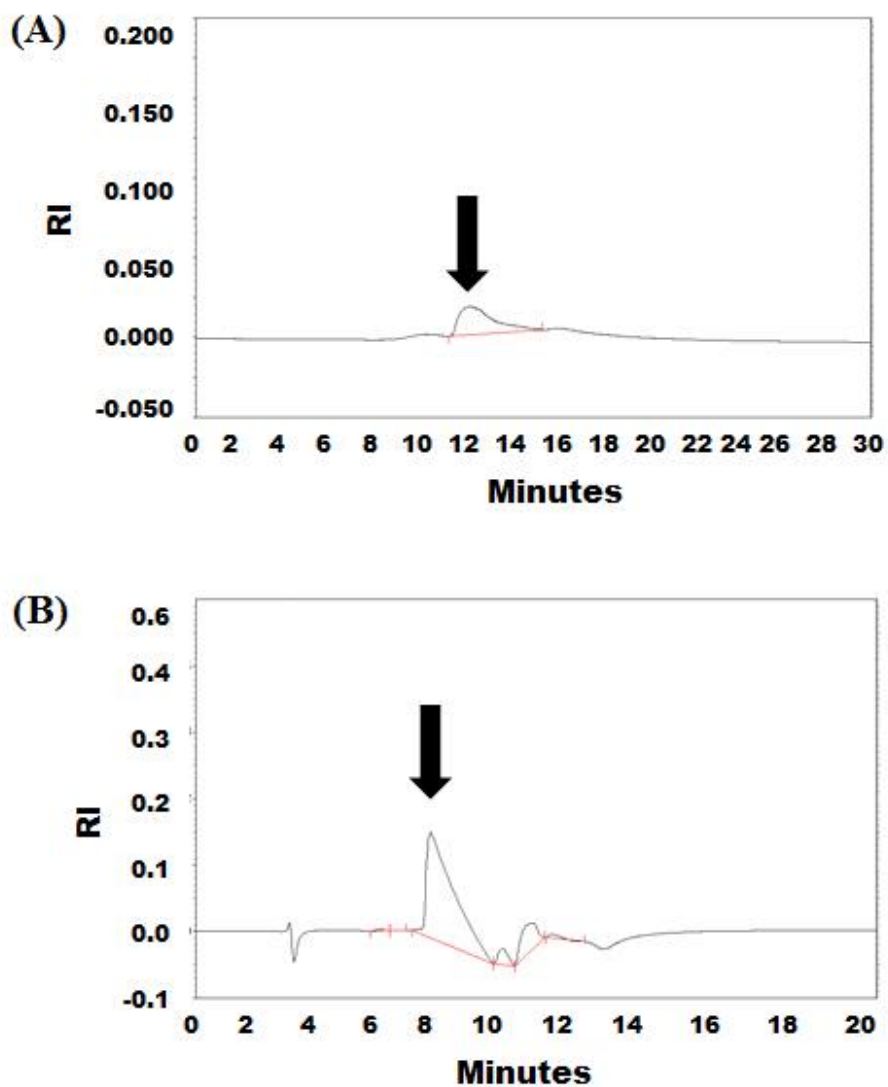


Figure. Molecular weight (A) and sugar composition (B) chromatogram of Fr-II.

Table. Molecular weight and sugar composition of Fr-II

Parameter		Fraction II (Fr-II)
Molecular weight (kDa)*		90
Sugar composition (%)	Mannose	83.36
	Galactose	12.54
	Glucose	4.10

*Molecular weight was determined using GPC.

(4) Fr-II 분획물의 FT-IR spectrum 조사

정제된 EPS의 작용기를 조사하고자 FT-IR을 분석하였다. Fr-II의 IR 스펙트럼은 아래 그래프와 같다. Fr-II 스펙트럼은 anomeric 부분 ($950\text{--}770\text{ cm}^{-1}$)인 805 cm^{-1} 에서 흡수영역대가 나타났고 이것은 mannose가 존재하는 결과라 추측된다. β 결합의 존재는 897 cm^{-1} 에서 흡수영역대가 나타났다. 또한 C=O 진동 영역대인 $1,606\text{ cm}^{-1}$ 에서 카복실 그룹의 흡수영역대가 나타났고 이것은 카복실 그룹에 hydrogen 본드가 존재한다. 또한 C-H 진동 영역대인 $2,932\text{ cm}^{-1}$ 와 $3,285\text{ cm}^{-1}$ 에서도 흡수대가 형성되어 카보하이드레이트 링이 존재하고 있는 것으로 확인되었다. 주요한 당인 만난의 밴드는 $1,019\text{ cm}^{-1}$ 로 나타났다.

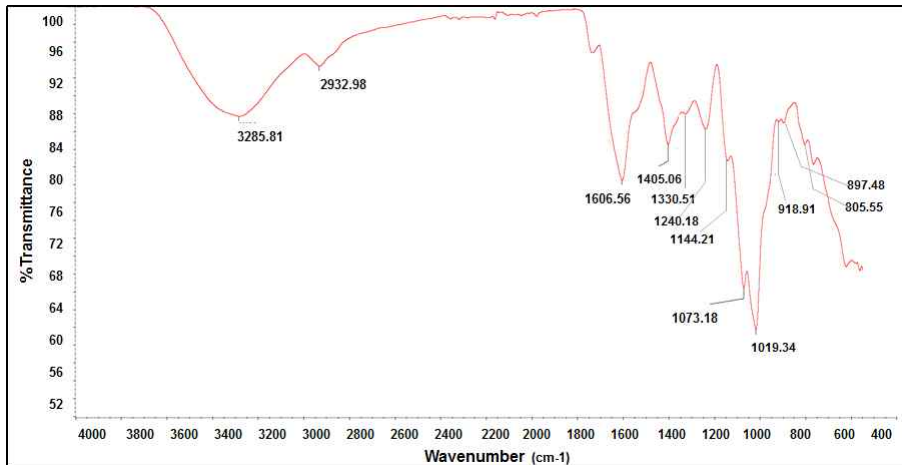


Figure . FT-IR spectrum of Fr-II produced by submerged culture of CL.

(5) Fr-II의 ^{13}C -NMR spectrum 조사

Fr-II의 ^{13}C -NMR 스펙트럼은 아래 그림과 같다. 주요 시그널은 anomeric 부분인 $100.4\text{--}104.6$ 과 $94\text{--}98.8$ ppm의 두 피크가 나타났고 이것은 각각 β -D-mannopyranosyl과 α -galactopyranosyl 잔기 인 것으로 나타났다.

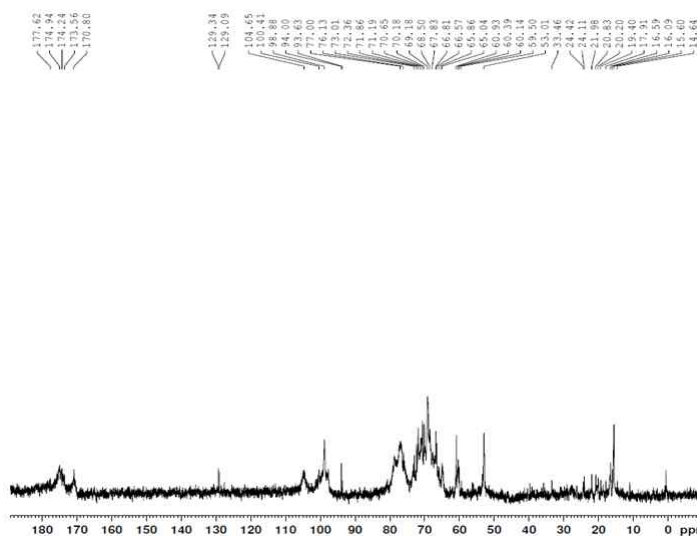


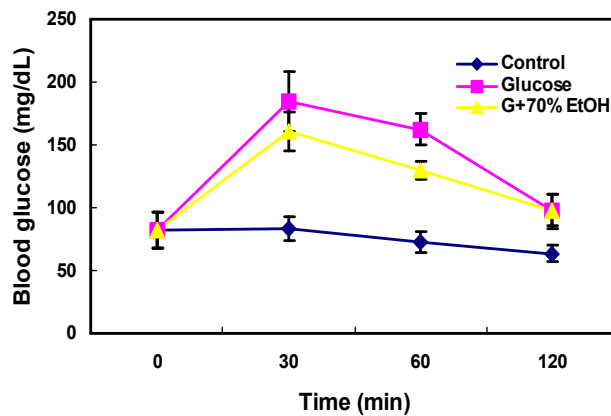
Figure. ^{13}C -NMR spectrum of Fr-II produced by submerged culture of CL.

다. 항당뇨 기능성 연구

EPS는 인슐린 저항성이 유도된 3T3-L1 지방세포에서 인산화된 IR- β , PI3K, Akt 및 AMPK 단백질의 발현의 증가시키고 GLUT4의 mRNA 발현양을 증가시킴으로써 PI3K-Akt pathway 조절을 통한 GLUT4의 세포막으로의 이동을 촉진시켜 glucose uptake를 증가시키는 것으로 나타났다. EPS를 2형 당뇨 모델인 *db/db* 마우스에 6주간 경구 투여하였을 때 혈당이 유의적으로 감소되었고 경구 내당능과 혈중 지질 수준이 당뇨 그룹보다 개선되는 것으로 나타났다. EPS의 투여는 혈청 인슐린, C-peptide, leptin의 농도를 증가시켜 인슐린 저항성을 개선시키고 췌장의 β -세포내 인슐린의 비율 증가 및 α -세포내 glucagon의 배열을 정상적으로 하여 췌장을 보호하는 역할을 하는 것으로 나타났다. 또한 EPS의 투여가 *db/db* 마우스의 대퇴부 근육에서 인슐린 신호전달에 미치는 영향을 조사한 결과, EPS는 IR, IRS의 인산화를 통한 PI3K-Akt pathway 및 AMPK의 활성화를 통한 GLUT4의 세포막으로의 이동을 촉진시켜 glucose uptake 증가에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 따라서 세리포리아 락세라타 버섯의 액체 배양물 및 EPS는 *in-vitro*와 *in-vivo* (STZ 유도 모델, *db/db* 모델) 실험을 통해 항당뇨 활성을 가지는 것으로 확인되었다.

1) 제1형 당뇨유도 동물 모델을 이용한 항당뇨 활성 평가

12시간 이상 절식시킨 정상 Rat(4주령)의 공복 시 혈당을 측정한 다음, 제조한 CLD3 추출물을 희석하기 쉽게 동결 건조시켜 분말로 만든 후 200mg/kg의 농도가 되도록 증류수로 희석시킨 시료를 각 군별로 다섯 마리씩 먼저 경구투여 하였다. 이때, 대조군에는 생리식염수를 동량으로 투여하였다. 그리고, 대조군을 제외한 다른 군에게는 40% 농도의 포도당을 2g/kg bw 농도로 경구투여한 다음 각각 30, 60, 90, 120분에 미정맥으로 부터 채혈하고 혈당변화를 관찰하였다. 각 시점의 혈당 증가치를 계산하여 혈당증가곡선을 구하여, 그림에 나타내었다.



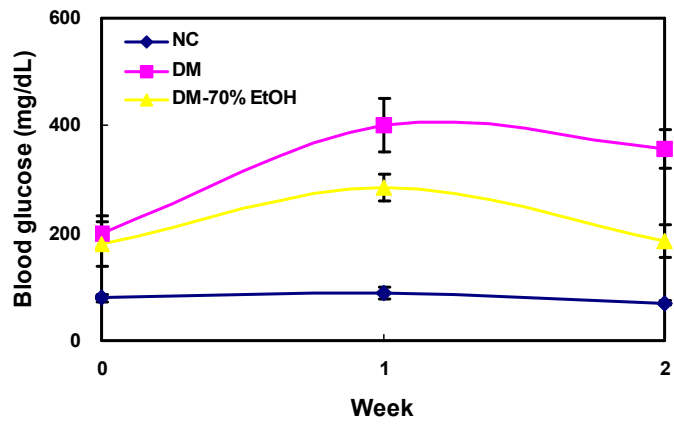
승 억제 효과를 보이는 것으로 판단된다.

실험 동물은 평균 체중이 $140 \pm 3.2\text{g}$ 인 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐로서, 각 실험군마다 8마리씩 총 24마리를 구입하여 실내온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $60 \pm 5\%$, 명암주기 12시간의 환경조건에서 적응시키기 위해 시중에서 구입한 일반 배합사료(Purina Co., Korea)로 1주간 예비사육한 후 2주간 실험을 실시하였다. 실험적인 제1형 당뇨 유발은 췌장의 β -세포를 선택적으로 파괴시킨다고 알려진 Streptozotocin; STZ(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 0.01M citrate산 버퍼(pH 4.5)에 용해시켜 60mg/kg을 복강 내로 주사하였다. 당뇨병 발생은 STZ 투여 24시간 후 꼬리 정맥으로부터 채혈하여 공복시 혈당이 200mg/dL 이상인 동물을 실험에 사용하였다. 실험군은 당뇨 유발 없이 정상 식이를 공급한 정상대조군(NC)과 당뇨 유발후 정상식이를 공급한 당뇨대조군(DM), 당뇨 치료 효과를 보기 위해서 당뇨 유발 후 2주간, 동결건조 분말화 된 CLD3을 200mg/kg의 농도로 희석하여 경구 투여한 당뇨치료군(DM-70% EtOH)의 3군으로 분류하였다. 모든 동물에 대하여 STZ 투여 개시 직전에 1회, STZ 투여 후와 제조한 ceriporia lacerata 추출물 투여 후 매주 1회씩, 그리고 부검 당일 체중을 측정하였다. 한편, 사육 케이지 별로 매주 1회씩 일정량의 식이를 공급하고 익일 같은 시간에 사료의 잔량을 측정하여, 일일 평균 식이 섭취량(g/day)을 산출하였다.

Table . Biochemical properties

Sample	체중(g/rat)	몸무게 증가량(g/day)	사료 섭취량(g/day)	사료 섭취효율
NC	340.08 ± 9.56	5.07 ± 0.81	27.14 ± 0.04	0.19
DM	260.40 ± 17.29	0.40 ± 0.05	29.63 ± 0.12	0.01
DM-70% EtOH	298.10 ± 14.04	2.04 ± 0.22	29.16 ± 0.08	0.07

STZ로 당뇨 유발된 쥐에 제조한 CLD3을 경구투여하면서 2주간 사육한 동물의 체중 변화를 하기 table 에 나타내었다. 정상군(NC)은 시간경과에 따라 체중이 지속적으로 증가하는 반면, 당뇨군(DM)의 경우 STZ에 의한 영향으로 체중이 감소하였다. 한편, 당뇨치료군(DM-70% EtOH)에서는 체중이 정상군보다는 감소하였으나, DM군에 비해서는 높은 체중을 보였다. STZ 투여는 췌장 내의 β -세포 파괴로 1형 당뇨가 유발되어 인슐린 생성 부족과 그 작용이 저하되며 당대사에 의한 에너지 생산 부족은 성장과 발달에 영향을 준다. 본 실험의 결과에서도 당뇨치료군(DM-70% EtOH)의 경우 당뇨 유발후 정상군(NC)에 비해 체중 감소를 보이다가 잔나비불로초 배양액 에탄올 추출물의 첨가로 당대사가 다소 개선되어 체중이 증가한 것으로 추정된다. 또한, 평균 1일 식이섭취량은 대조군에 비하여 당뇨 실험군(DM, DM-70% EtOH)에서 증가를 나타내었는데, 이는 당뇨의 증상인 다식, 다뇨, 다갈의 결과인 것으로 보인다. 본 실험에서 정상군(NC)에 비해 당뇨 실험군(DM, DM-70% EtOH)의 식이 섭취량이 많음에도 불구하고 지속적인 체중감소가 나타났는데, 이는 당뇨에 의한 체내 대사의 퇴행적인 변화 때문인 것으로 보인다.



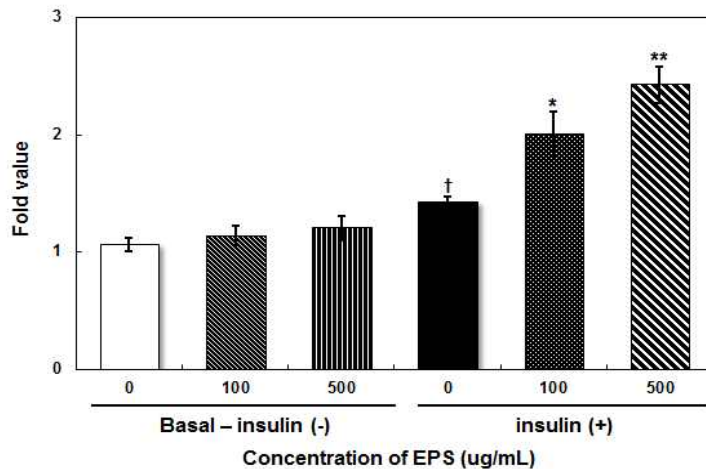


Figure . Effect of EPS on glucose uptake in 3T3-L1 adipocyte. Each value is the mean \pm SE (n \geq 3). † $p < .05$ vs. without EPS (basal-insulin (-)) and *, ** $p < .05, .01$ vs. without EPS (basal-insulin (+)).

(나) EPS가 인슐린 신호전달에 미치는 영향

EPS가 인슐린 신호전달에 미치는 영향을 조사하고자, IR, PI3K, Akt의 활성을 웨스턴 블랏방법으로 측정하였다. 예상했던대로, 인슐린에 의한 자극으로 IR- β (Tyr 1345), Akt (SER 473)의 인산화가 증가되었고 그 결과 PI3K의 활성도 증가되었다. EPS는 IR- β (Tyr 1345), Akt (SER 473) 인산화 와 PI3K의 활성을 더욱 촉진시키는 것으로 나타났다.

인슐린 신호전달은 인슐린 수용체 세포 내 β unit 티로신 잔기의 autophosphorylation이 일어나고 PI3K 활성화 후, IRS- 1 및 PI3K의 하류 의 Akt의 인산화등 하위 신호전달이 일어나는 것으로 보고되고 있다. 또한, Akt의 인산화는 포도당 흡수와 관련된 GLUT4의 이동 및 발현을 촉진시키는데 real time RT-PCR을 통해 확인한 결과 EPS는 GLUT4의 발현을 증가시키는 것으로 나타났다. 그리하여 세포막으로 이동된 GLUT4의 발현 증가로 인해 포도당 흡수가 증가된 것으로 나타났다. 또한 EPS의 처리로 급성 인슐린 처리에 의한 인슐린 저항성 셀에서 농도의존적으로 AMPK의 발현을 증가시키는 것으로 나타났다. AMPK는 지방산과 단백질 합성을 억제하고 세포의 에너지 레벨을 증가시켜 지방산 산화 및 포도당 수송을 자극하여 에너지 생산을 향상시키는 역할을 한다.

이러한 결과로 EPS는 AMPK의 인산화, PI3K-Akt의 활성 조절, 결과적으로 포도당 흡수를 증가시켜 인슐린 저항성을 개선시키는 효과가 있는 것으로 나타났다.

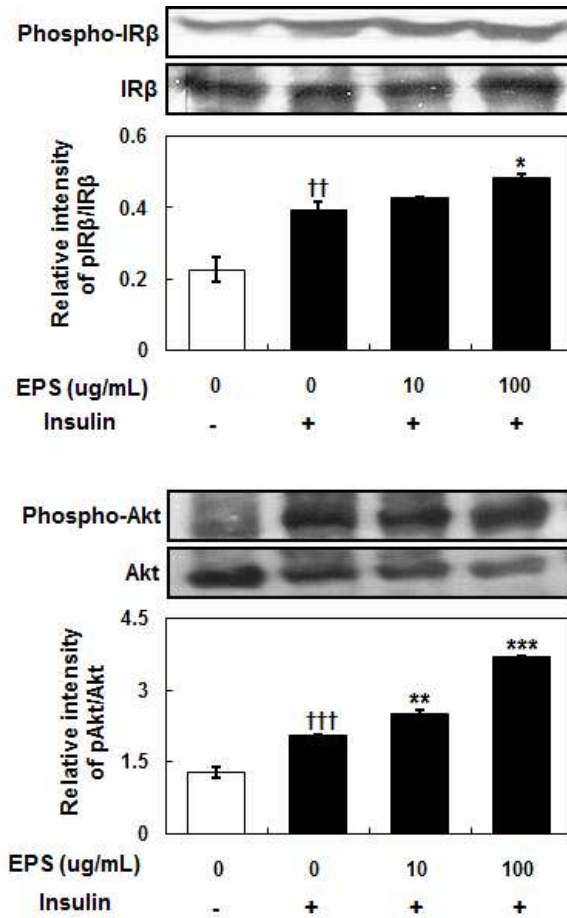


Figure. Effect of EPS on p-IRβ and p-Akt protein expression in 3T3-L1 adipocyte. Each value is the mean±SE (n≥3). ††, ††† $p < .01, .001$ vs. without EPS and insulin and *, **, *** $p < .05, .01, .001$ vs. without EPS.

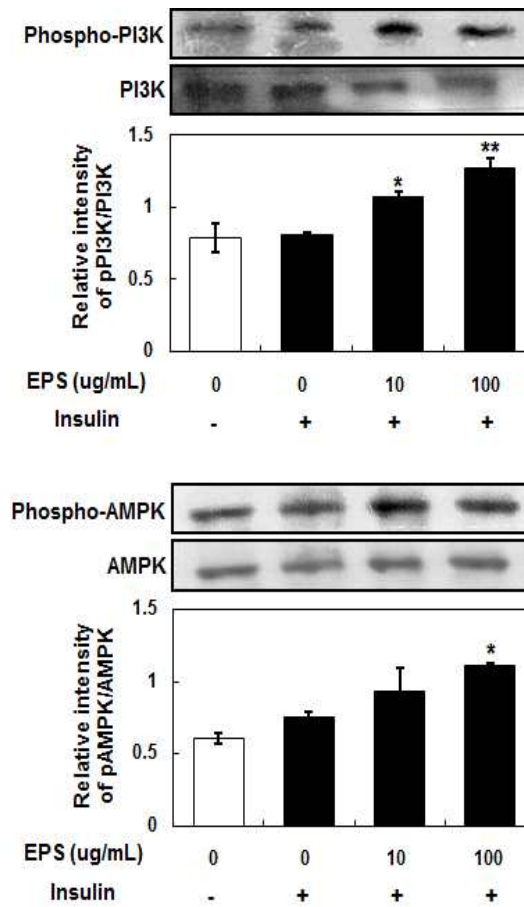


Figure. Effect of EPS on p-PI3K and p-AMPK protein expression in 3T3-L1 adipocyte. Each value is the mean \pm SE (n \geq 3). ††, ††† $p < .01$, $.001$ vs. without EPS and insulin and *, **, *** $p < .05$, $.01$, $.001$ vs. without EPS.

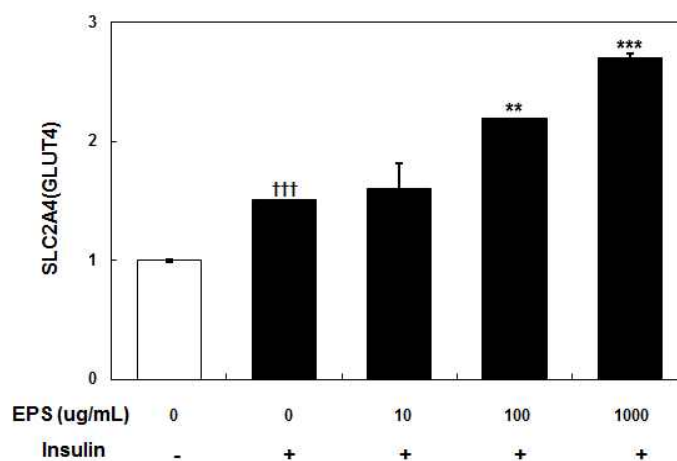


Figure. Effect of EPS on GLUT4 expression in 3T3-L1 adipocyte. Each value is the mean \pm SE (n \geq 3). ††† $p < .001$ vs. without EPS and insulin and **, *** $p < .01$, $.001$ vs. without EPS.

(2) C57BL/KsJ-*db/db* mice를 이용한 EPS의 항당뇨 효과 검증

(가) 사료와 음수 섭취량 변화

총 30마리의 *db/db* mice를 정상군(n=6), 당뇨 그룹(n=6), 당뇨그룹에 EPS를 농도별로 처리한 그룹(n=6)으로 몸무게와 혈당을 측정하여 분류하였다. 모든 마우스는 전체 실험기간(6주)동안 사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다. 실험 6주 기간 동안 정상군에 비해 당뇨 그룹은 사료와 음수 섭취량이 높은 것으로 나타났다. 체중은 그룹간에 큰 차이를 보이지 않고 실험기간 동안 계속적으로 증가하는 것으로 나타났다.

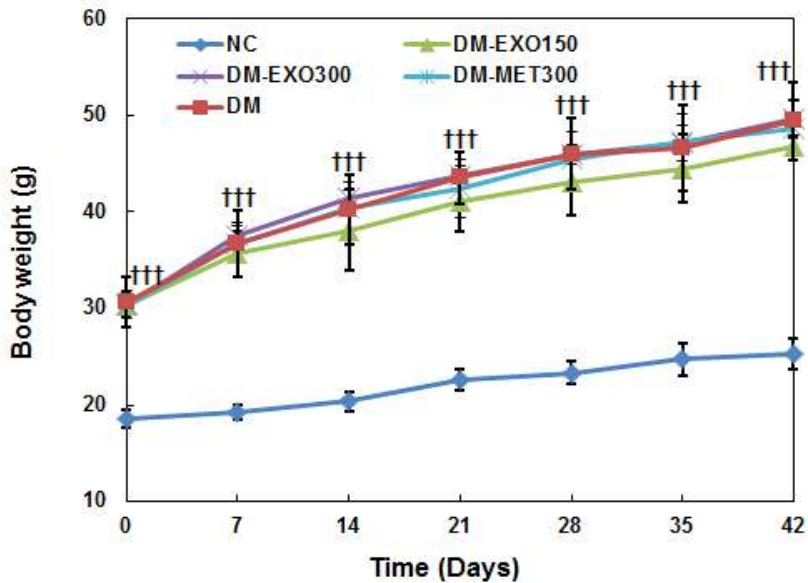


Figure. Changes in bodyweight in C57BL/KsJ-*db/db* mice fed diets supplemented with EPS. NC, normal control; DM, diabetes control; DM-EXO150, EPS administered at 150 mg/kg; DM-EXO300, EPS administered at 300 mg/kg; DM-MET300, metformin administered at 300 mg/kg. Each value is the mean±SE. ††† $p < .001$ vs. NC (n=6 for each group).

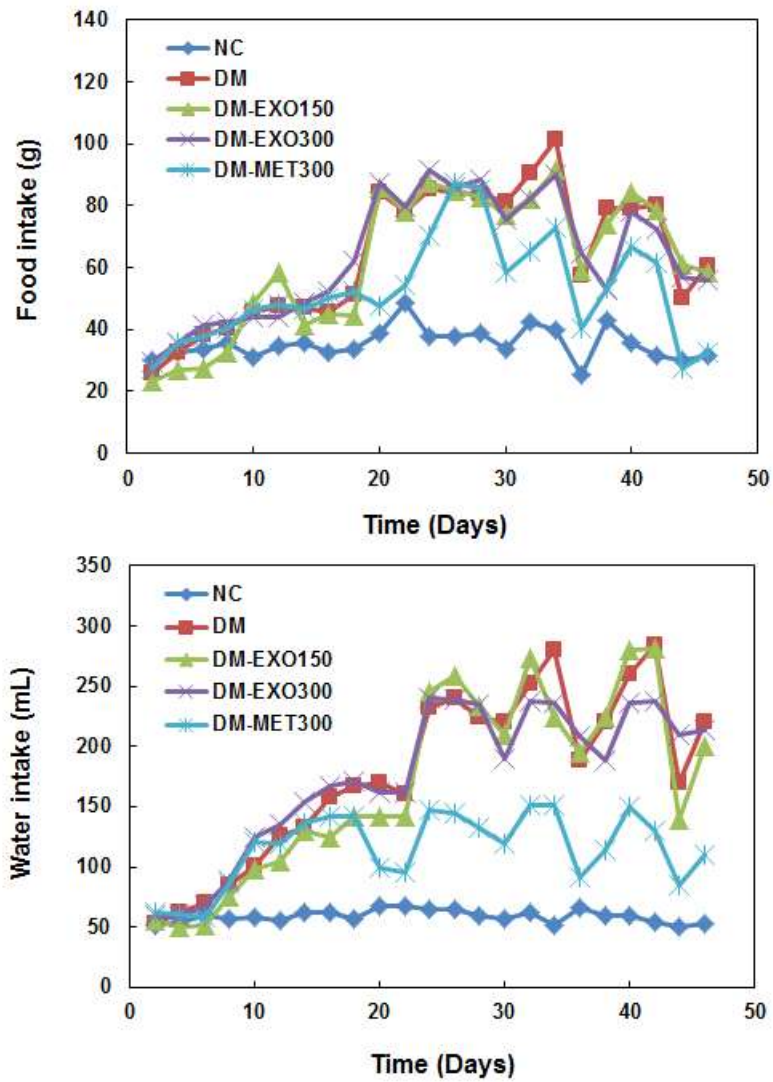


Figure. Changes in feed and water intake in C57BL/KsJ-*db/db* mice fed diets supplemented with EPS. NC, normal control; DM, diabetes control; DM-EXO150, EPS administered at 150 mg/kg; DM-EXO300, EPS administered at 300 mg/kg; DM-MET300, metformin administered at 300 mg/kg. Each value is the mean \pm SE (n=6 for each group).

(나) 혈당의 변화

공복 시 혈중 포도당의 농도를 매주 측정하였다. 초기에는 모든 그룹간의 비슷한 혈당(약 150 mg/dL)을 유지하다가 EPS 섭취 7일 이후부터 약간씩 증가하는 경향을 보였다. EPS 투여그룹(DM-EXO150, DM-EXO300)은 3주차부터 당뇨그룹에 비해 혈당이 낮은 것으로 나타났다. EPS 섭취 42일째 NC그룹은 164, DM그룹은 594, DM-EXO150은 498, DM-EXO300은 436 그리고 DM-MET300그룹은 351 mg/dL의 혈당 수치를 나타내었다. 당뇨그룹은 혈당이 계속적으로 증가되지만 EPS를 투여한 그룹은 당뇨그룹에 비해 혈당이 지속적으로 낮아지는 것으로 나타났다.

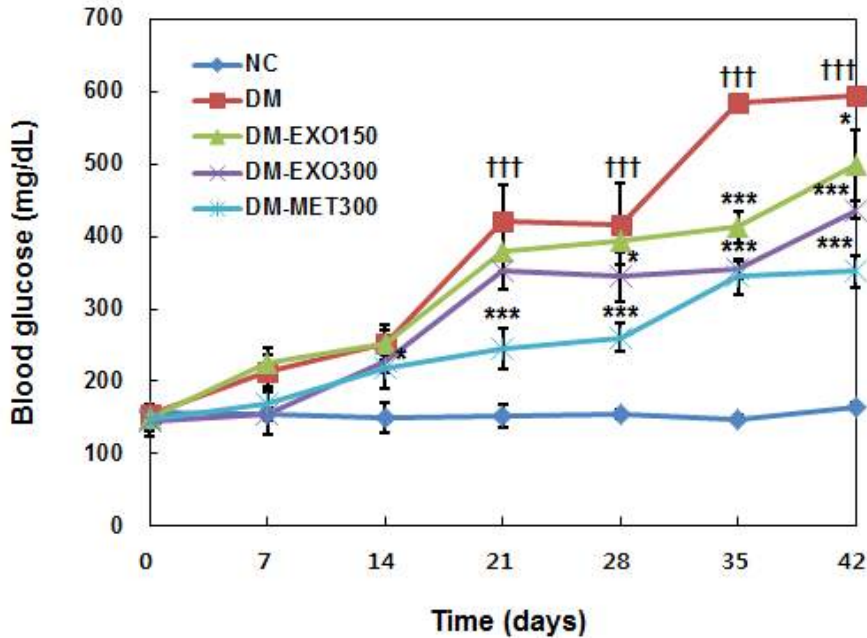


Figure. Changes in blood glucose levels in C57BL/KsJ-*db/db* mice fed diets supplemented with EPS. NC, normal control; DM, diabetes control; DM-EXO150, EPS administered at 150 mg/kg; DM-EXO300, EPS administered at 300 mg/kg; DM-MET300, metformin administered at 300 mg/kg. Each value is the mean±SE. †, ††† $p < .05, .001$ vs. NC. *, *** $p < .05, .001$ vs. DM (n=6 for each group).

(다) OGTT

EPS섭취 6주 후에 경구내당능을 측정하였다. 5개의 그룹의 마우스에게 1 g glucose/kg body weight의 농도로 glucose를 경구투여하였다. EPS 투여군 DM그룹에 비해 전체적으로 포도당의 농도가 낮아지는 것으로 나타났다. 모든 그룹은 경구 투여 후 30분만에 혈당이 상당히 상승되었고 그 후 서서히 감소하여 60분 후에 초기 혈당 수준과 비슷해졌다. DM그룹에 비해 DMEXO-150과 DMEXO-300그룹은 혈당이 각각 16, 18% 감소하였다. 이러한 결과로 볼때 EPS는 혈당 수준을 감소시키고 포도당 내성을 증가시키는 것으로 추측된다.

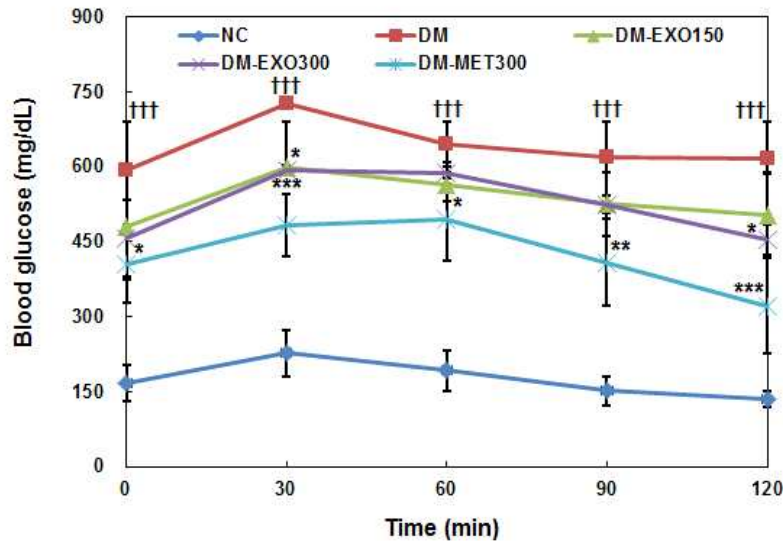


Figure. Effect of EPS on OGTT in C57BL/KsJ-*db/db* mice fed diets supplemented with EPS. NC, normal control; DM, diabetes control; DM-EXO150, EPS administered at 150 mg/kg; DM-EXO300, EPS administered at 300 mg/kg; DM-MET300, metformin administered at 300 mg/kg. Each value is the mean±SE. ††† $p < .001$ vs. NC. *, **, *** $p < .05$, .01, .001 vs. DM (n=6 for each group).

(라) 장기 무게

정상그룹과 당뇨그룹에 6주동안 EPS를 처리하였을 때 장기무게를 측정하였다. 당뇨 그룹은 정상군에 비해 비장을 제외한 간, 신장, 신장 지방, 복부 지방의 무게가 상당히 많이 나가는 것으로 나타났다. EPS의 투여그룹은 간, 신장, 비장에는 큰 영향을 주지 않았으며, 복부 지방과 신장 지방의 무게가 DM그룹에 비해 상당히 감소된 것으로 나타났다. 이러한 결과로 보아 EPS는 *db/db* 당뇨 마우스 모델에서 신장 지방 축적의 보호 효과를 나타낸다고 생각된다.

Table. Organ weight per body weight in C57BL/KsJ-*db/db* mice fed diets supplemented with EPS

Groups	Liver (W/BW)	Kidney (W/BW)	Spleen (W/BW)	Kidney fat (W/BW)	Abdominal fat (W/BW)
NC	0.94±0.14	0.29±0.03	0.06±0.01	0.12±0.04	0.43±0.17
DM	2.89±0.04 ^{†††}	0.41±0.06 ^{††}	0.04±0.02	0.82±0.17 ^{†††}	2.34±0.28 ^{†††}
DM-EXO150	2.50±0.29	0.39±0.05	0.06±0.03	0.63±0.02*	2.48±0.14
DM-EXO300	2.65±0.05	0.40±0.04	0.05±0.02	0.55±0.06**	2.55±0.15
DM-MET300	2.60±0.19	0.39±0.03	0.03±0.02	0.89±0.13	2.56±0.33

NC, normal control; DM, diabetes control; DM-EXO150, EPS administered at 150 mg/kg; DM-EXO300, EPS administered at 300 mg/kg; DM-MET300, metformin administered at 300 mg/kg. Each value is the mean±SE. ††, ††† $p < .01$, .001 vs. NC. *, ** $p < .05$, .01 vs. DM (n=6 for each group).

(마) EPS가 혈액 내 포도당 농도에 미치는 영향

EPS를 6주간 투여한 후 혈장의 포도당 농도를 측정하였다. 그 결과 EPS 투여 그룹의 혈당은 EPS 농도에 의존하여 감소하였고 DM그룹은 약 900 mg/dL까지 증가된 것으로 나타났다. 특히 DMEXO-300 그룹의 혈장 포도당 농도는 약 700 mg/dL으로 감소하여 EPS가 혈당 감소에 긍정적인 역할을 하는 것으로 나타났다.

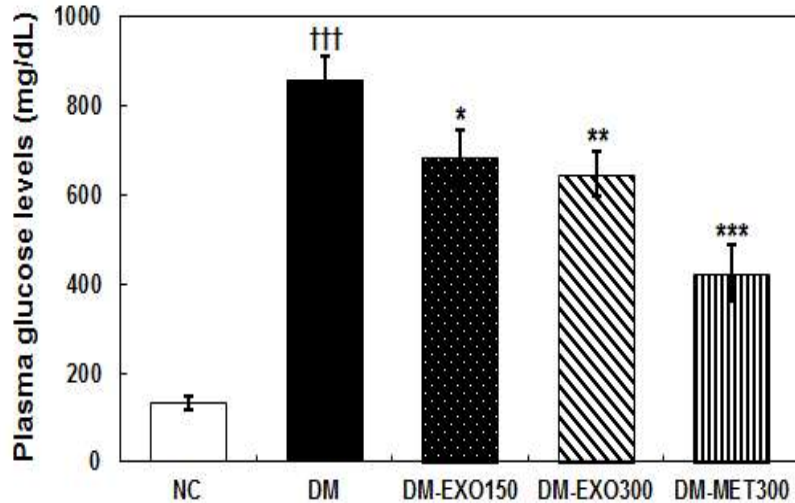


Figure. Effect of EPS on plasma glucose levels in C57BL/KsJ-*db/db* mice fed diets supplemented with EPS. NC, normal control; DM, diabetes control; DM-EXO150, EPS administered at 150 mg/kg; DM-EXO300, EPS administered at 300 mg/kg; DM-MET300, metformin administered at 300 mg/kg. Each value is the mean±SE. ††† $p < .001$ vs. NC. *, **, *** $p < .05$, .01, .001 vs. DM (n=6 for each group).

(바) ALT and AST 농도

EPS 섭취 6주 후의 *db/db* 마우스의 간 손상 정도를 ALT와 AST 함량을 측정하여 살펴보았다. ALT와 AST는 DM-EXO300 그룹에서 EPS 식이에 의해 DM그룹보다 약 25와 14%로 현저히 감소되는 것으로 나타났다.

Table. Concentration of ALT and AST levels in C57BL/KsJ-*db/db* mice fed diets supplemented with EPS

Groups	ALT (IU/mL)	AST (IU/mL)
NC	12.58±2.31	59.78±2.23
DM	123.33±10.04 ^{†††}	106.87±9.01 ^{†††}
DM-EXO150	96.00±3.28 ^{**}	92.01±9.33
DM-EXO300	92.81±3.73 ^{***}	92.30±10.41
DM-MET300	50.00±4.63 ^{***}	84.68±6.90 [*]

NC, normal control; DM, diabetes control; DM-EXO150, EPS administered at 150 mg/kg; DM-EXO300, EPS administered at 300 mg/kg; DM-MET300, metformin administered at 300 mg/kg. Each value is the mean±SE. ††† $p < .001$ vs. NC. *, **, *** $p < .05$, .01, .001 vs. DM (n=6 for each group).

(사) lipid 수준

인슐린 저항성은 혈액 내 TG 함량이 높고 HDL-C 함량이 낮고 LDL-C 함량이 높은 것이 특징이 있다. 2형 당뇨병 환자들은 지질 대사 장애, 고지혈증 발생율이 높고 고지혈증 자체는 동맥 경화를 유발하거나 진행을 가속화시킬수 있는 위험성이 있다. EPS를 6주간 경구 투여하여 희생한 후 혈액 내의 지질 수준을 측정된 결과, TC, TG 함량은 NC그룹보다 DM그룹에서 약2배정도 높았지만 EPS 투여 그룹에서 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다. EPS 투여 그룹에서는 체중을 크게 변화 시키지 않고 2형 당뇨 모델에서 혈장 지질 수준을 감소시키는 물질이란 것을 알수있었다.

Table. Concentrations of lipid levels in C57BL/KsJ-*db/db* mice fed diets supplemented with EPS

Groups	Total cholesterol (mg/dL)	Triglyceride (mg/dL)	HDL-Cholesterol (mg/dL)	LDL-Cholesterol (mg/dL)
NC	58.55±5.19	49.96±3.11	65.98±15.42	20.63±0.95
DM	111.12±11.15 ⁺⁺⁺	107.69±6.40 ⁺⁺⁺	107.48±4.57 [†]	21.84±0.99
DM-EXO 150	92.01±11.19	83.09±9.50	130.49±7.21	16.18±1.76 [*]
DM-EXO 300	92.30±13.66	83.99±5.45 [*]	140.02±10.87 [*]	14.69±2.06 ^{**}
DM-MET 300	84.68±8.05 [*]	73.81±9.19 ^{**}	134.80±10.12	18.15±1.40

NC, normal control; DM, diabetes control; DM-EXO150, EPS administered at 150 mg/kg; DM-EXO300, EPS administered at 300 mg/kg; DM-MET300, metformin administered at 300 mg/kg. Each value is the mean±SE. †, ††† $p < .05$, $.001$ vs. NC. *, ** $p < .05$, $.01$ vs. DM (n=6 for each group).

(아) 혈액내 insulin, C-peptide 및 leptin 농도

EPS를 6주동안 *db/db* 마우스에 투여한 후 혈장의 인슐린, C-peptide, 렙틴의 농도를 측정하였다. 혈장 인슐린, C-peptide와 렙틴의 농도가 EPS 투여 그룹에서 EPS 투여 농도에 의존하여 현저하게 높아지는 것으로 나타났다.

Table. Concentrations of plasma insulin, C-peptide, and leptin in C57BL/KsJ-*db/db* mice fed diets supplemented with EPS

Groups	Plasma insulin (ng/dL)	Plasma C-peptide (pg/mL)	Plasma leptin (ng/mL)
NC	0.86±0.15	13.70±2.43	20.33±3.72
DM	10.04±0.51 ⁺⁺⁺	135.14±13.40 ⁺⁺⁺	454.44±29.92 ⁺⁺⁺
DM-EXO 150	12.74±0.96 [*]	146.65±10.92	434.70±26.11
DM-EXO 300	13.71±0.87 ^{**}	186.77±5.11 ^{***}	550.15±29.95 [*]
DM-MET 300	13.41±1.71 [*]	172.34±10.86 ^{**}	561.85±40.76 ^{**}

NC, normal control; DM, diabetes control; DM-EXO150, EPS administered at 150 mg/kg; DM-EXO300, EPS administered at 300 mg/kg; DM-MET300, metformin administered at 300 mg/kg. Each value is the mean±SE. ††† $p < .001$ vs. NC. *, **, *** $p < .05$, $.01$, $.001$ vs. DM (n=6 for each group).

(자) 간과 췌장의 H&E 염색

EPS투여 6주 후에 간과 췌장을 hematoxylin and eosin (H&E)염색을 하여 조직을 관찰하였다. EPS 투여 그룹에서는 간 지질 drop이 DM 그룹보다 감소하는 것으로 나타났고 특히 DM-EXO300에서 지질 축적 수준이 매우 낮았다. 간 지질 축적은 인슐린 저항성의 결과물로 발생되며 간으로의 유리지방산의 순환을 증가시켜 간 지질 합성을 증가시키는 원인이 된다. 또한 췌장은 당뇨 그룹이 정상그룹보다 모양이 불규칙적인 것으로 나타났다. 당뇨병 환자는 췌장의 β -세포가 파괴되어 췌장이 손상되는 것이 특징이다.

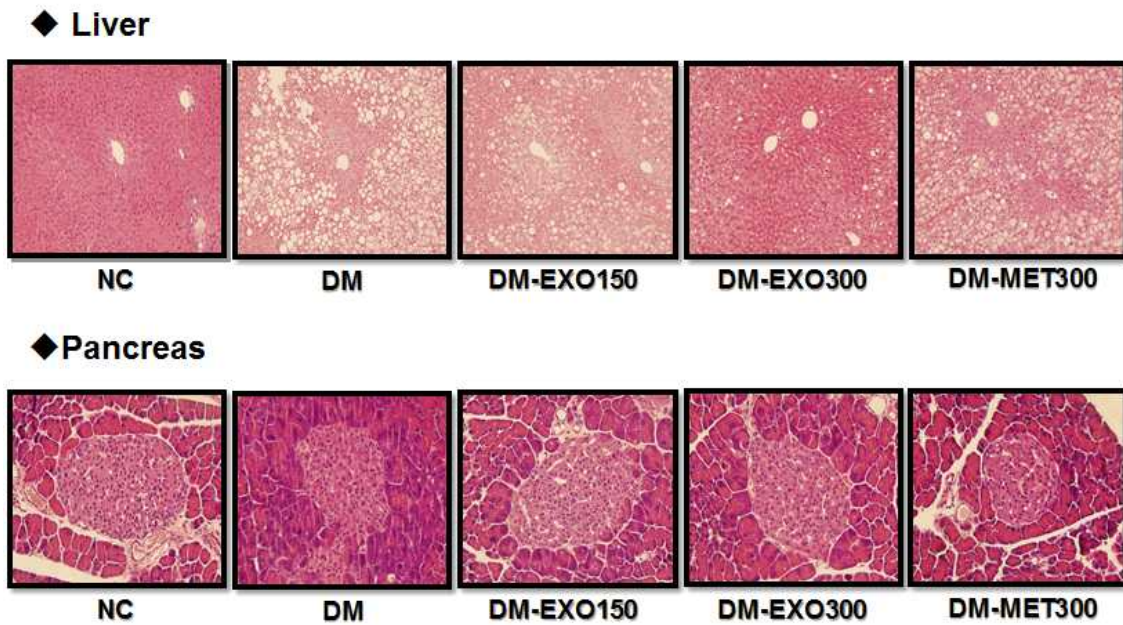


Figure. Histological photomicrograph of liver and pancreas in C57BL/KsJ-*db/db* mice fed diets supplemented with EPS. NC, normal control; DM, diabetes control; DM-EXO150, EPS administered at 150 mg/kg; DM-EXO300, EPS administered at 300 mg/kg; DM-MET300, metformin administered at 300 mg/kg.

(차) pancreas islets의 면역 조직화학 염색

db/db 마우스의 췌장의 인슐린과 글루카곤의 농도를 면역 조직화학 염색을 통해 확인하였다. DM그룹에서는 정상군에 비해 췌장의 랑게르한스섬내에 인슐린의 농도가 급격히 줄어드는 것으로 나타났고 EPS 투여그룹에서 그 농도가 증가되는 것으로 나타났다. 반면, 인슐린과 반대 역할을 하는 글루카곤은 정상군에서는 랑게르한스섬의 바깥쪽으로 배열을 하고 있는 반면 당뇨그룹에서는 배열이 흐뜨러지고 EPS투여 그룹에서는 정상그룹과 비슷한 형태로 바깥쪽 배열을 하는 모습이 관찰되었다.

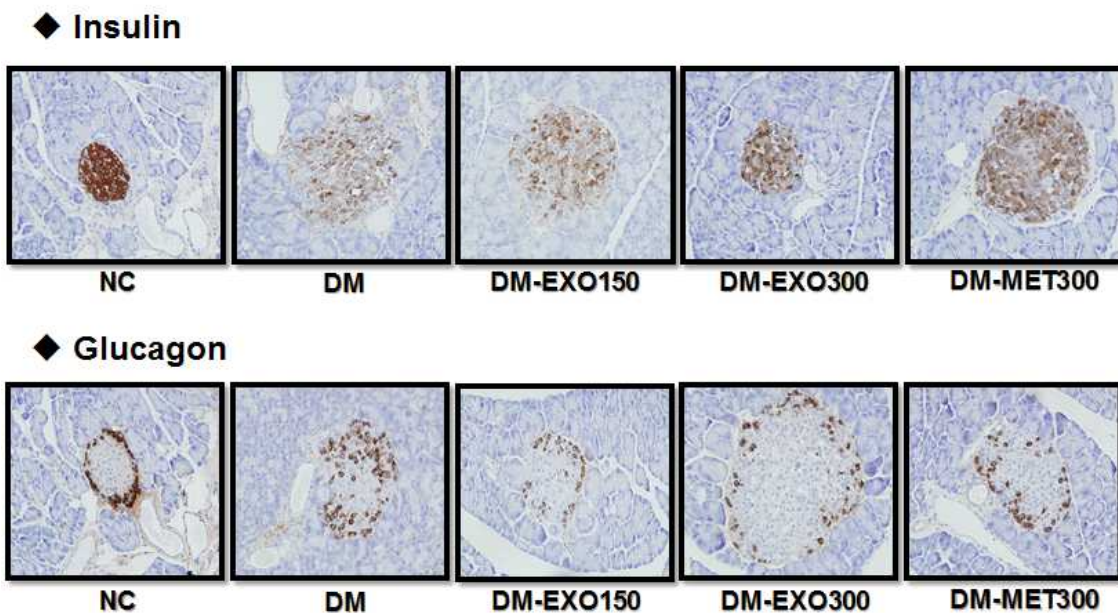


Figure. Immunohistochemical photomicrograph of liver and pancreas in C57BL/KsJ-*db/db* mice fed diets supplemented with EPS. NC, normal control; DM, diabetes control; DM-EXO150, EPS administered at 150 mg/kg; DM-EXO300, EPS administered at 300 mg/kg; DM-MET300, metformin administered at 300 mg/kg.

(카) EPS가 C57BL/KsJ-*db/db* mice의 인슐린 신호전달에 미치는 영향

db/db 마우스의 대퇴부 근육에서 EPS가 인슐린 신호전달에 미치는 영향을 살펴보았다. DM그룹에서는 p-IR, p-PI3K, p-Akt, p-AMPK의 농도가 정상군에 비해 발현양이 감소하였고 EPS투여 그룹에서 농도에 의존하여 발현양이 증가하는 것으로 나타났다. 또한 IRS1, Akt2, GLUT4의 mRNA 발현양도 증가시켜 포도당의 흡수를 증가시키는 것으로 나타났다. 이러한 결과로 EPS는 근육내의 인슐린 신호전달에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 추측된다.

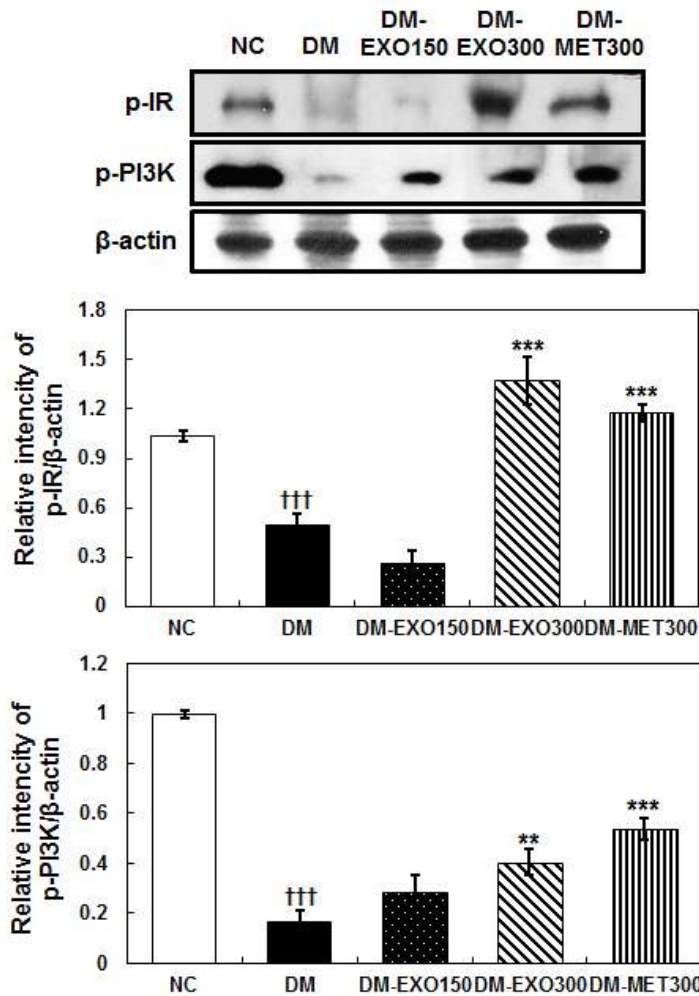


Figure. Effect of EPS on the protein (p-IR β and p-PI3K) expressions in skeletal muscle of C57BL/KsJ-*db/db* mice. NC, normal control; DM, diabetes control; DM-EXO150, EPS administered at 150 mg/kg; DM-EXO300, EPS administered at 300 mg/kg; DM-MET300, metformin administered at 300 mg/kg. Skeletal muscle was obtained for analysis of protein expression. Representative immunoblots and quantification expressed as means mean \pm SE were shown. ††† $p < .001$ vs. NC. **, *** $p < .01, .001$ vs. DM (n=6 for each group).

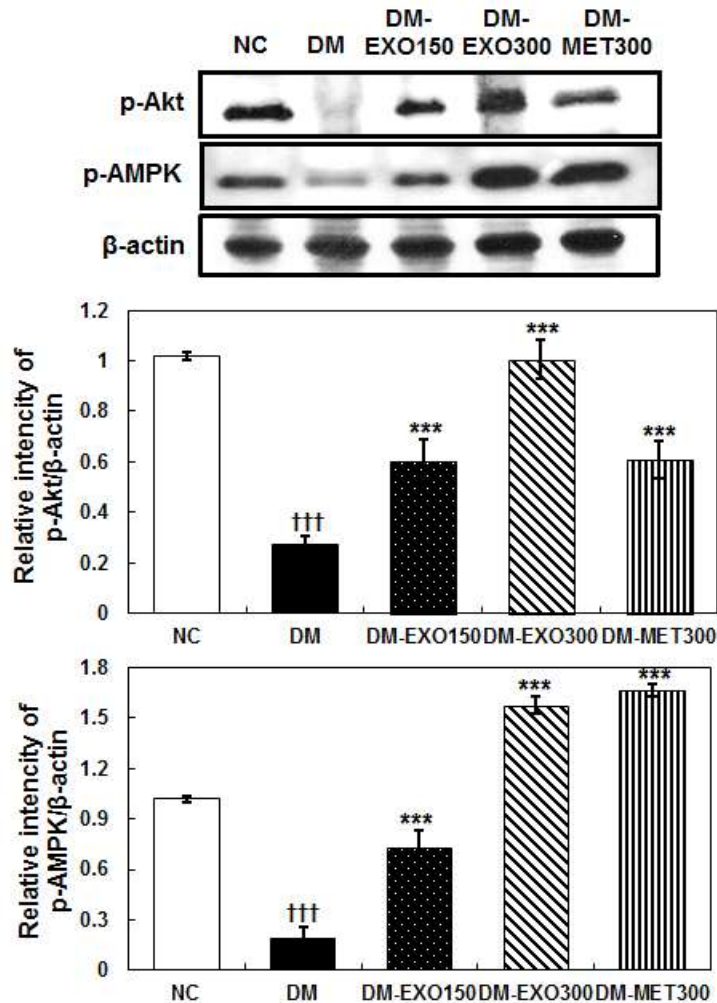


Figure. Effect of EPS on the protein (p-Akt and p-AMPK) expressions in skeletal muscle of C57BL/KsJ-*db/db* mice. NC, normal control; DM, diabetes control; DM-EXO150, EPS administered at 150 mg/kg; DM-EXO300, EPS administered at 300 mg/kg; DM-MET300, metformin administered at 300 mg/kg. Skeletal muscle was obtained for analysis of protein expression. Representative immunoblots and quantification expressed as means mean±SE were shown. ††† $p < .001$ vs. NC. **, *** $p < .01, .001$ vs. DM (n=6 for each group).

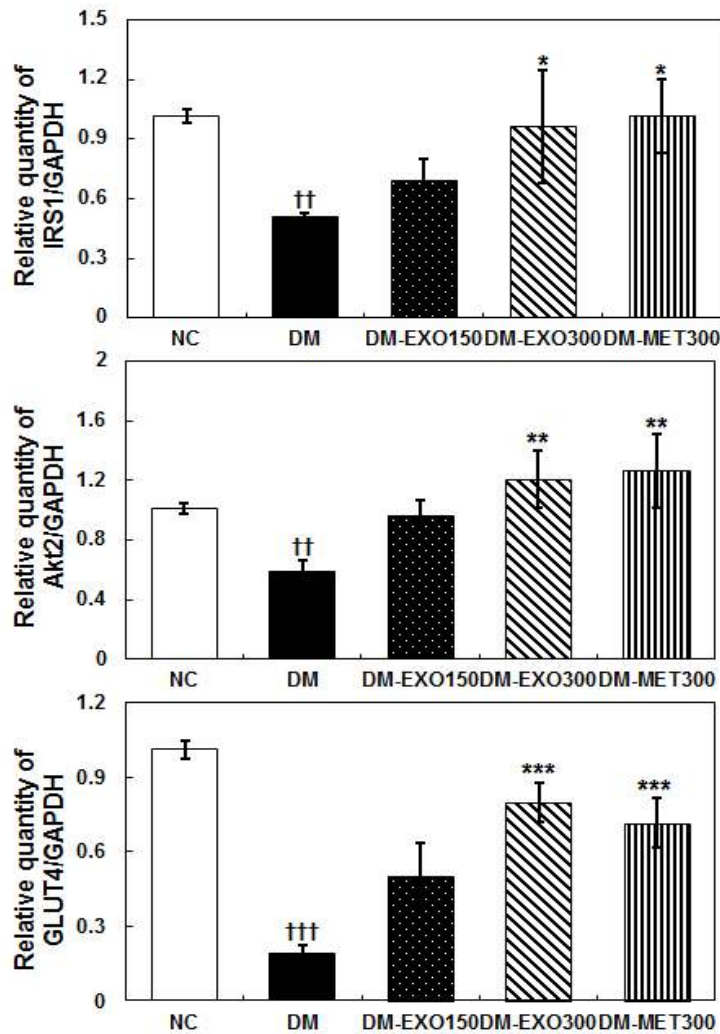


Figure. Effect of EPS on the gene (IRS1, Akt2, and GLUT4) expression in skeletal muscle of C57BL/KsJ-*db/db* mice. NC, normal control; DM, diabetes control; DM-EXO150, EPS administered at 150 mg/kg; DM-EXO300, EPS administered at 300 mg/kg; DM-MET300, metformin administered at 300 mg/kg. Skeletal muscle was obtained for analysis of protein expression. Representative immunoblots and quantification expressed as means mean \pm SE were shown. ††, ††† $p < .01$, $.001$ vs. NC. *, **, *** $p < .05$, $.01$, $.001$ vs. DM (n=6 for each group).

4.기작규명 연구결과

가. CLD3 유래 exopolysaccharide의 β -세포 재생/보호 효능 탐색 연구 결과

(1) INS-1 세포에 Dex 처리 시 INS-1 세포의 생존률이 약 50% 감소되었음(Fig. 1). 그러나 5 또는 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 exopolysaccharide를 처리 시 Dex에 의한 INS-1 세포독성(세포 생존률 감소)이 크게 감소됨을 확인하였음. 그러나 50 $\mu\text{g/ml}$ exopolysaccharide 처리 시 Dex에 의한 INS-1 세포독성이 그대로 나타남을 확인하였음. 결론적으로 exopolysaccharide (10 $\mu\text{g/ml}$)는 Dex에 의한 INS-1 세포 독성을 억제하는 효능을 가지고 있음을 확인하였음.

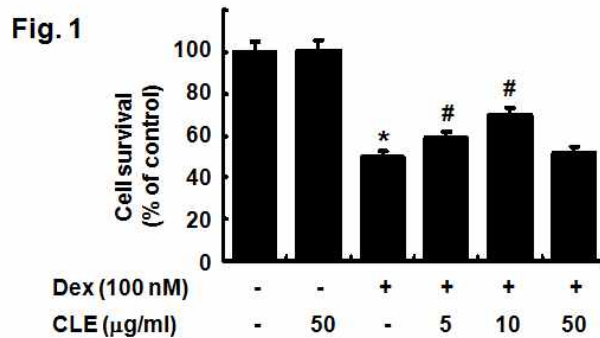


Fig. 1. INS-1 세포에 Dex 및 CLE (CLD3 유래 exopolysaccharide, CLE)를 단독 또는 혼합하여 24 시간 처리하였다. 이 후 각각의 실험 조건에서 살아있는 세포의 수를 trypan blue 염색시약으로 염색하여 현미경에서 직접 산정하였다(참고:Dex 및 CLE가 처리하지 않은 조건에서의 생존세포 수를 100%로 표현).

(2) INS-1 세포에 Dex 처리 시 INS-1 세포의 죽음이 유도됨을 확인하였음(Fig. 2). 그러나 10 $\mu\text{g/ml}$ CLE를 처리 시 Dex에 의한 INS-1 세포죽음이 크게 억제됨을 알 수 있었음. 결론적으로 exopolysaccharide (10 $\mu\text{g/ml}$)는 Dex에 의한 INS-1 세포죽음을 저해하는 효능을 가지고 있음을 확인하였음.

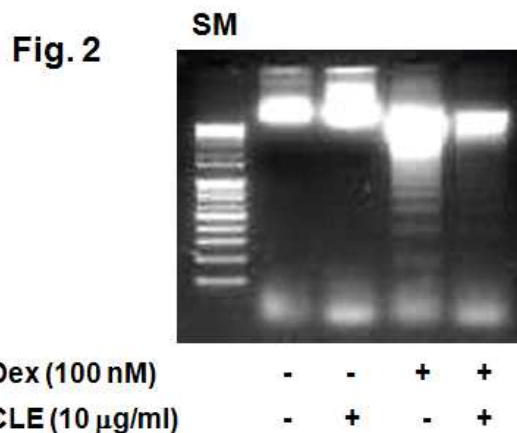


Fig. 2. INS-1 세포에 Dex 및 CLE를 단독 또는 혼합하여 24 시간 처리하였다. 이 후 각각의 시약이 처리된 세포의 핵 DNA를 분리 후 1% agarose gel에 전기영동하였다. SM, DNA size marker. (참고: 세포 핵 DNA 분절화 현상을 보이는 세포는 죽은 세포로 apoptotic 세포라 부르기도 함).

(3) CLE는 Dex 처리된 INS-1 세포 내 PKB 활성 감소 및 eIF-2a 활성 증가를 크게 억제하였음(Fig. 5). 그러나 CLE는 Dex 처리된 INS-1 세포 내 ERK-1/2 활성 감소 및 MKP-1 발현 증가에 대해 아무런 영향을 미치지 못하였음. 결론적으로 CLE는, INS-1 세포 내 PKB 및 eIF-2a 활성 조절 작용을 통해, Dex에 의한 INS-1 세포 독성을 억제하고 있음을 확인하였음.

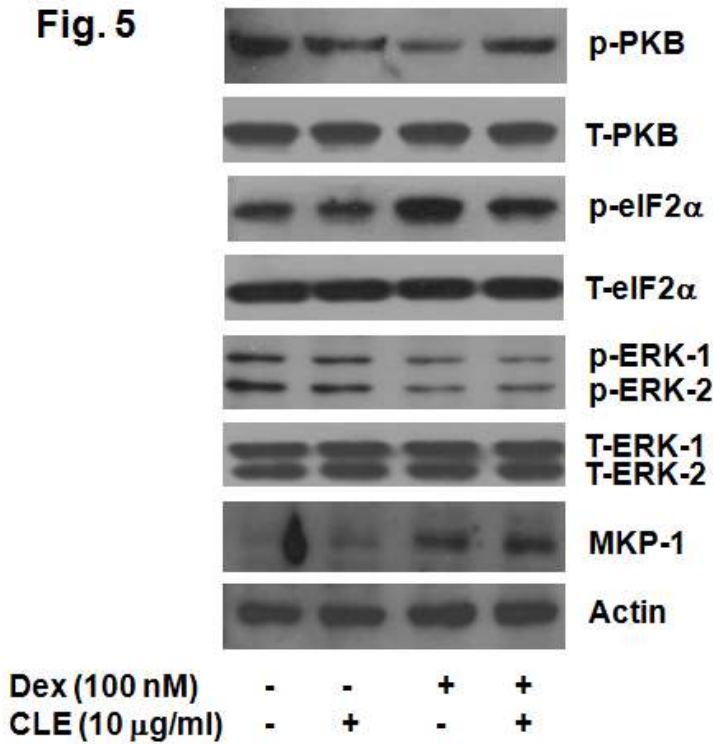


Fig. 5. INS-1 세포에 Dex 및 CLE를 단독 또는 혼합하여 8 또는 24 시간 처리하였다. 이 후 각각의 실험 조건 세포에서 단백질을 추출하였다. 단백질 농도를 정량 후 약 50 ug의 단백질을 10% PAGE gel에서 전기영동하였다. Nitrocellulose membrane으로 전기이동 후 각각의 특이적 항체를 이용하여 Western blot을 시행하였다.

다. CLE의 기타 INS-1 세포 독성 물질에 대한 약리 효능 연구 결과

스테로이드 약물이외에 다양한 물질 또는 시약[예를 들면, 염증성 사이토카인인 IL-1 β , 당뇨 유발 약물인 스트렙토조토신(streptozotocin, STZ), ER stress 유도 물질인 탐시갈진(thapsigargin, TG), 및 단백질 N-당화 억제제인 튜니카마이신(tunicamycin, TN) 등]이 INS-1 세포에 독성을 나타낸다는 것이 잘 알려져 있다. 과연 CLE가 Dex 유도 INS-1 세포 독성만을 보호하는 지 아니면 다른 INS-1 세포 독성 유발 인자에 대해서도 세포 보호 작용을 나타내는 지를 알아보기 위해 INS-1 세포에 CLE를 1 시간 전처리 후 IL-1 β , STZ, TG, TN 또는 CLE를 단독 또는 병용하여 24 시간 처리 시 IL-1 β , STZ, TG 또는 TN 단독 투여된 INS-1 세포의 생존율이 크게 떨어졌으며 CLE는 IL-1 β , STZ, TG 또는 TN 유도 INS-1 세포 생존율 감소를 차단하지 못하였다(Figure 6A-D).

Fig. 6

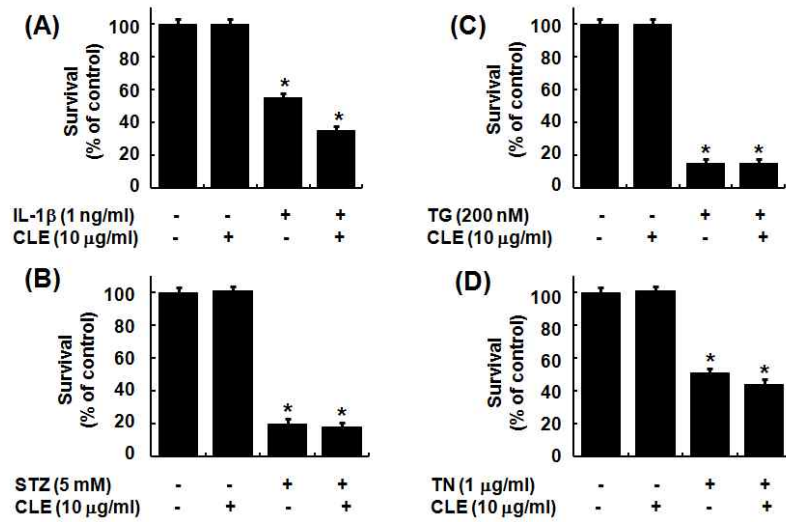


Fig. 6. INS-1 세포에 IL-1 β , STZ, TG, TN을 단독 또는 CLE와 혼합하여 24 시간 처리 후 각각의 세포의 생존을 변화를 cell count 실험으로 분석하였다.

라. Dexamethasone 유도 당뇨 쥐에서 CLE의 효능 연구 결과

(1) 실험 시작 전 동물의 체중과 식이섭취량의 변화는 각 군별로 큰 차이가 없었다. Dex 및/또는 CLE를 이용한 실험이 종료된 후에 대조군(control)과 CLE군은 식이섭취량 및 체중이 정상적으로 증가하였으며 특히 CLE군은 control군에 비하여 체중 증가 및 식이섭취량도 늘었다. 그러나 Dex 투여군 모두에서 control군에 비해 체중 및 식이섭취량 감소가 크게 나타났다. CLE와 Dex를 병용 투여 군 또한 Dex 단독 투여 군과 큰 차이를 보이지 않았다(Table 1).

	Body weight(g)		Food intake(g/day)	
	Before [*] Treatment	After ^{**} treatment	Before [*] treatment	After ^{**} treatment
control	281.8	301.5	96.0	83.0
CLE	283.0	306.5	93.0	99.0
Dex	290.8	229.0	99.0	35.0
Dex + CLE	289.8	233.3	93.0	33.0

*control (n = 4), CLE (n = 4), Dex (n = 4), Dex + CLE (n = 4). **control (n = 4), CLE (n = 4), Dex (n = 3), Dex + CLE (n = 2).

Table 1. Wistar rat을 임의로 나누어 군을 만들고 실험 시작 전 체중과 식이섭취량을 측정하였다. 이후 CLE 0.5 g/kg을 하루 먼저 먹인 뒤 Dex 1 mg/kg 을 복강 내 주사함과 동시에 CLE 0.5 g/kg을 5 일 동안 먹였다. 5일 후 각 군별로 체중과 식이섭취량을 측정하였다.

Fig. 7

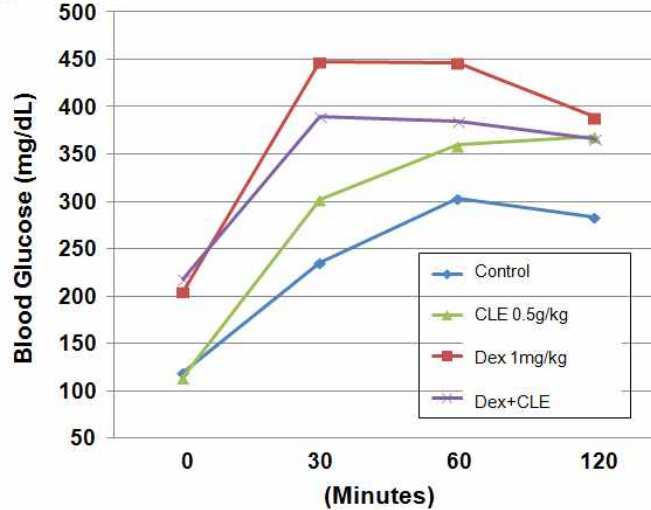


Fig. 7. 반나절이상 금식시킨 동물을 복강 내 당부하 검사를 위해 glucose (2 g/kg body weight)를 복강 내에 주사하였다. 그 후 30 / 60 / 120 분 시간별로 꼬리에서 혈액을 채취해 혈당량을 측정하였다. (참고: 공복 시 정상 혈당 범위 : 80-120 mg/dL // 공복 시 고혈당 주의 범위 : 140 mg/dL이상).

(2) 당뇨 진단과 혈당강하 효능 검증을 위해 복강 내 당부하 검사를 실시하였다. 각 군별로 금식을 한 뒤 혈당을 검사해본 결과 control과 CLE군의 공복 시 혈당은 정상 범위인 80-120 mg/dL를 나타냈으며 Dex와 Dex와 CLE를 함께 처리한 군은 200 mg/dL를 웃도는 높은 혈당 수치를 나타내었다. 복강 내로 glucose를 주사하여 60 분경과 후에 control과 CLE군은 혈당 최고치를 기록하였고, Dex와 Dex와 CLE를 함께 처리한 군은 30 분 후에 혈당이 최고치에 도달하였다. Dex군의 혈당은 시간이 지나도 높은 수치를 유지하는 반면, Dex와 CLE를 함께 처리한 군의 혈당수치는 Dex군보다 낮게 측정되는 것을 확인하였다(Figure 7).

(3) 상기의 체중, 식이 섭취량, 및 혈당 강하 효능 실험 종료 후 각 실험동물 군으로부터 췌장 조직을 떼어 islet의 파괴 정도를 H&E(Hematoxylin&eosin) 염색 및 인슐린에 대한 면역조직화학염색법(Immunohistochemistry, IHC)을 통해 관찰하였다. H&E 염색 결과를 통해 췌장 랑게르한스 islet을 구성하는 세포는 비교적 비슷한 크기의 둥글고 작은 핵을 가지는 신경 내분비 세포(neuroendocrine cell)들로 치밀하게 구성되어 있음을 알 수 있었다. control과 CLE군의 islet의 크기나 수의 변화는 크지 않은 것으로 나타났다. 하지만 Dex에 의해 당뇨가 유도된 쥐는 췌장 랑게르한스 islet 세포의 크기가 커지는 hypertrophy 현상이 나타났다. Dex 단독 투여 군과 비교하여 Dex와 CLE 병용 투여군의 랑게르한스 islet 및 islet세포의 크기가 작아졌음을 알 수 있었다(Figure 6A). IHC 결과의 경우에도 control과 CLE 병용 투여군은 거의 대부분의 islet 구성 세포에서 갈색으로 염색되어 인슐린 염색에 반응하는 베타세포가 90% 이상을 차지하고 있음을 알 수 있었다. 그러나 Dex 단독 투여군은 대조군에 비해 인슐린 염색성이 떨어졌으며 islet에서 베타세포가 차지하는 비율이 낮아 보이므로 islet 내부를 구성하는 세포 가운데 베타세포가 상대적으로 줄었음을 알 수 있었다. 하지만 Dex와 CLE를 병용 투여군은 Dex 단독 투여군보다 islet의 크기가 줄었고 인슐린 염색성 또한 강해진 것이 관찰되었다

Fig. 8

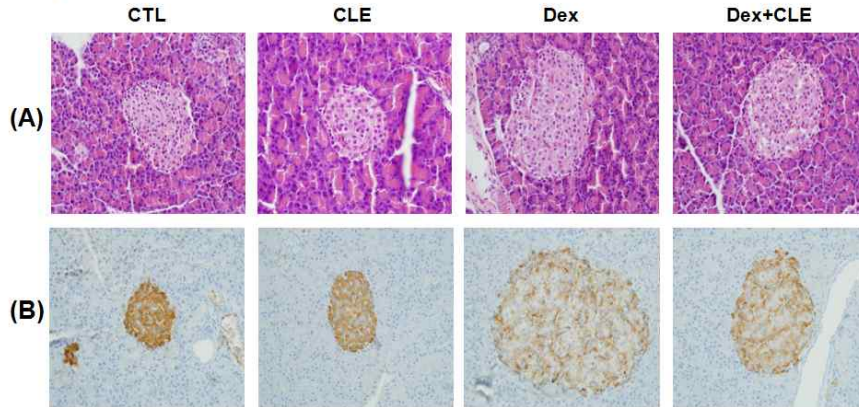


Fig. 8. 실험이 끝난 동물에서 췌장 조직을 떼어 파라핀 블록을 만들고 이를 절편화 하여 H&E 염색을 시행한 것을 현미경으로 관찰하였다(A). 또한 insulin IHC를 통해 insulin염색을 진행하였고 이를 현미경으로 관찰하였다(B). (참고: 모두 x400 배율로 관찰)

마. Dexamethasone 유도 당뇨 쥐에서 CLE의 항당뇨 기작 연구 결과

각 실험동물 군으로부터 췌장 조직을 떼어 단백질을 뽑아 웨스턴 블롯법으로 단백질 발현 정도를 분석하였다. Control군에 비해 CLE군의 PKB단백질의 인산화가 크게 증가하였고 Dex군은 control군에 비해 큰 변화가 없었다. Dex와 CLE를 함께 처리한 군은 Dex 단독 군보다 PKB의 인산화가 증가하였다. 그리고 total PKB의 발현은 control에 비해 CLE군에서 감소하였고 Dex군은 control군에 비해 큰 변화가 없지만 Dex와 CLE를 함께 처리한 군에서는 Dex 단독 군에 비하여 전체 PKB의 발현은 감소하였다. 또한 CLE 단독군에서 Glut-4와 Glut-2의 단백질 발현이 증가하였고 Dex 단독군에서는 감소하였다. 그러나 Dex+CLE 군에서의 발현이 다시 증가하였다. 그리고 CLE는 ERK-1/2의 인산화를 증가시키는 것이 나타났으며 Dex 단독군에서 줄었던 ERK-1/2의 인산화는 Dex+CLE 군에서 조금 증가한 것이 보인다. total ERK-1/2의 발현은 변화가 없는 것으로 나타났다.

Fig.9

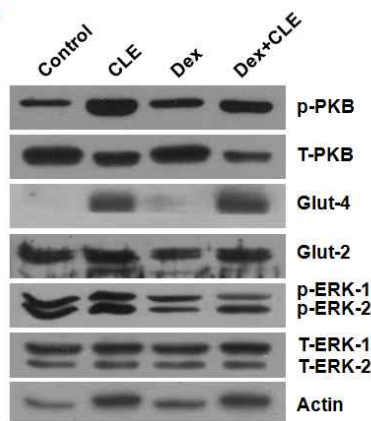


Fig. 9. 실험이 모두 끝난 동물에서 췌장 조직을 떼서 단백질을 추출하였다. 단백질 농도를 정량한 뒤 약 40 μ g의 단백질을 전기영동하여 각각의 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 시행하였다. (참고: ERK-1/2과 PKB는 대표적 세포 생존 단백질이며 Glut-4와 Glut-2는 glucose transporter로 glucose uptake와 췌장에서 insulin 분비 조절의 기능을 가지고 있다.)

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도

1. 최적배양 기술 개발 목표의 달성도

연구 전 확립된 기술로 배양된 모델의 지표물질(EPS)의 함량은 $4.5 \pm 0.20 \text{g/L}$ 이었으며 연구 목표는 $5.50 \pm 0.20 \text{g/L}$ 으로 설정하였다. 연구결과 지표물질 생성량을 $5.85 \pm 0.15 \text{g/L}$ 수준으로 향상시킴으로서 연구목표의 100%를 달성하였다.

비임상 시험은 부분실시목표에서 전항목 실시 후 이를 완료하여 연구목표를 초과 달성하였음.

2. 기능성 입증 및 물질구조 규명의 달성도

In-vitro 실험과, In-vivo 시험을 통해 통계학적으로 유의한 혈당강하 기능을 입증하여 기능성 입증목표를 100% 달성하였음.

지표물질인 EPS는 당과 단백질이 각각 45%와 34%로 구성된 glycoprotein 형태로 분자량이 약 120 kDa 정도였다. Sepharose CL-6B를 이용하여 분획한 주요 분획물인 Fr-II는 분자량이 약 90 kDa로 mannose가 83%, galactose (12.54%), glucose (4.10%)로 구성된 β -glucan성 다당류임을 알 수 있었다. EPS는 복합다당체로 구성되어 본 연구에서 완전한 구조를 밝혀낼 수는 없었다. 하지만 다당체의 경우 성분규명만으로 기능성원료 인정 요건을 충족하므로 목표를 100% 달성하였다고 판단 함.

3. 기작 규명의 달성도

CLD3의 in vitro β -세포 재생/보호 효과 및 스테로이드 유도 당뇨동물모델에서 CLD3의 당뇨개선/치료 효능을 확인한 동시에 관련 작용기작을 규명하여 연구개발목표는 100% 달성하였다고 판단 함.

제2절 관련분야 기술발전예의 기여도

1. 최적배양기술 개발 및 비임상 연구의 기여도

미생물 배양에 있어 보편적 이론은 배양환경 및 배지 구성시 연구용 미생물이 성장하기에 가장 좋은 조건을 제공해야 하는 것으로 되어있다. 하지만 미생물의 증식이 목적이 아닌 기능성 물질의 획득이 목적이라면 일반 이론과는 상반대는 최소 생존 조건하에서 배양하는 것이 효과적 일 수 있다는 것을 확인하였고 이는 미생물 특히 균류의 배양연구에 기여할 것으로 기대 함.

기능성이 우수한 버섯들은 대부분 인공재배가 어렵고 성장속도가 느리며, 요리재료가 아닌 기능성분의 획득 및 섭취를 목적으로 재배한다. 따라서 약용버섯(상황, 영지, 차가, 아가리쿠스, 잔나비결상 등)이나 기능성 버섯(노루궁뎅이, 꽃송이, 치마)은 효율성이 낮은 자실체를 생산, 판매하기보다 효율성이 높고 기능성이 증가되는 균사체 배양물을 생산해 기능성 소재로 판매하는 것이 유리하다. 또한 전형적인 농업보다는 농업과 공업이 융합된 미래지향적 농업을 추구하는

것이 지역민의 고용증대와 안정적 고소득 창출에도 효과적이다. 본 기술의 개발로 추가적인 기술개발 노력을 줄여주어 공급과잉으로 수익성이 극도로 악화된 버섯농가에 신사업 Idea를 제공하고, 한국농업의 고도화 및 경쟁력 강화에 기여할 것 임.

세리포리아 락세라타 균사체의 독성시험과 효력시험을 공인기관에서 세계최초로 수행함으로써, 이의 활용에 관심있는 후속 연구자들의 비용과 노력을 크게 경감시켜 줄 것임.

2.지표물질 성분 규명 및 기능성 입증 연구의 기여도

세리포리아 락세라타 균사체 배양물의 항당뇨 지표물질인 EPS는 복합다당체로서 구조규명에는 한계가 있다는 점을 확인시켰고 이를 성분분석으로 대신하였다. 세리포리아 락세라타 균사체 배양물 및 EPS는 in-vitro와 in-vivo 실험을 통해 항당뇨 활성을 가지는 것을 확인하였고, 비추출 천연물소재 임에도 불구하고 발현시간과 기능성면에서대조약물인 metformin과 유사하거나 약간은 낮은 효과를 보였다. 시판중인 대표적인 혈당강하제(metformin) 투여 그룹은 갑자기 사망하거나 희생하였을 때 간 등의 장기가 많이 훼손된 것을 확인할 수 있었으나 연구물은 독성이나 부작용이 전혀 없다는 것을 확인하였다. 본 연구결과는 향후 세리포리아 락세라타를 활용한 異種의 식·의약 소재 연구자들의 기초연구에 많은 도움을 줄 것으로 기대 함.

3.기작 규명 연구의 기여도

아직까지 완전한 당뇨치료제는 없다. 본 연구는 CLD3를 활용한 스테로이드 당뇨병의 예방 및 치료 약제 개발의 기회를 제공함으로써 천연물 당뇨치료제 발굴 및 개발 분야의 기술발전에 크게 기여할 것으로 봄.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제1절 실용화·산업화 성과 및 활용 계획

1. 실용화, 산업화 성과

가. 투자유치 - 기관투자 42억 유치

2. 활용 계획

가. 기능성 식품으로 생산, 판매

2015년 1월 중 주관기업인 (주)월드바이오텍(건강기능식품 벤처제조업)에서 혈당조절용 기능성식품으로 생산, 판매

나. 기능성원료의 수출

국외 부분은 단기적으로는 각국별 규제가 적은 기능성원료의 수출에 초점을 맞추고 장기적으로는 완제품을 수출할 계획 임

다. 의약품화

- (1) 2014.01~2014.11.30 - IND승인을 위한 3단계(비설치류) 비임상 실시 중
- (2) 2014.12 - IND 제출
- (3) 2015.03 - 임상2·3상 실시
- (4) 2017.07 - 의약품 인가 신청

라. 국외 기술이전, 투자유치, 공동연구

- (1) 다국적 제약사 및 전문투자기관의 투자유치 노력 중
- (2) 협동연구기관인 계명대산학협력단과 의약화를 위한 공동연구 실시 중

마. 개발기술의 적극적 보급

- (1) 버섯 기능성 성분의 선택적 극대화 기술 - 기술을 필요로 하는 농가와 산업체에 기술보급
- (2) 고효율 저온건조기술 - 고효율 저온건조기의 제조 및 공급(농가 및 관련 산업체의 생산성, 수익성 향상)

제2절 특허, 논문 등 지식재산권 성과 및 추가적 확보 계획

1. 성과

가. 국내·외 특허 출원

출원국	출원일	출원번호	출원명	등록자명
미국	2013.01.09	13737148	PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PREVENTION OR TREATMENT OF STEROID-INDUCED DIABETES AND HEALTH FUNCTIONAL FOOD	월드바이오텍 김병천
PCT	2013.01.28	KR2013/000398		
미국	2013.01.09	13737144	METHOD FROM PREPARING CERIPORIA LACERATA CULTURE EXTRACT AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PREVENTION OR TREATMENT OF DIABETES AND DIABETIC COMPLICAT	월드바이오텍 김병천
PCT	2013.01.28	KR2013/000393		
한국	2013.08.01	10-2013-0091537	세리포리아 락세라타 및 젓산균의 혼합배양을 통한 GABA가 증진된 발효물 제조방법	이삼빈 이은지 김지은

나. 논문

구분	학술지명	논문명	저자
국외 SCI	International Journal of Molecular Medicine	Crude extract of <i>Ceriporia lacerata</i> has a protective effect on dexamethasone-induced cytotoxicity in INS-1 cells via the modulation of PI3K/PKB activity	Yu-kyoung Park, Byung-chunKim, Byeong-chul Jang
국외 SCI	Food Science and Biotechnology	Hypoglycemic effect of submerged culture extract of <i>Ceriporia lacerata</i> in streptozotocin-induced diabetic rats	Ji-Eun Kim
학위논문	계명대학교 식품가공학과 박사학위	Production of expolysaccharides by submerged culture of <i>Ceriporia lacerata</i> and their anti-diabetic effect	Ji-Eun Kim

다. 학술대회 발표

발표일시	발표자	제목	학술대회명
2012.06.28	Ji-Eun Kim	Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by <i>Ceriporia lacerata</i> and insulin sensitizing and insulin-l	한국미생물생명공학회
2012.11.02	Ji-Eun Kim	Effect of exopolysaccharide from submerged culture of <i>Ceriporia lacerata</i> on glucose uptake and the insulin signal transduction in 3T3-L1 adipocytes	한국식품영양과학회
2012.06.14	Ji-Hye Kim	Exopolysaccharide from <i>Ceriporia lacerata</i> Has Pro-survival and Anti-apoptotic Effects on the Dexamethasone-treated INS-1 Cells through Activation of	Korean Society of Food Science and Technology
2012.11.02	Ji-Hye Kim	Crude Extract of <i>Ceriporia Lacerata</i> has a Protective Effect on INS-1 Cells through the Modulation of PI3K/PKB Pathway	The Korean Society of Food Science and Nutrition
2013.08.30	Eun-Ji Lee	Over-production of γ -Amino Butyric acid (GABA) in Submerged Culture of <i>Ceriporia lacerata</i> using <i>Lactobacillus plantarum</i> K154	한국식품과학회
2013.08.30	Jong Soon Im	Preparation of Set-Type Yoghurt Fortified with Peptides and GABA by Mixed Fermentation using <i>Bacillus subtilis</i> and <i>Lactococcus lactis</i>	한국식품과학회
2013.08.30	Ji-Eun Kim	Production of Exopolysaccharides by Submerged Culture of <i>Ceriporia lacerata</i> and Their Structural Analysis and Molecular Characterization	한국식품과학회
2013.11.15	Eun-Ji Lee	Mannitol Production in Submerged Culture of <i>Ceriporia lacerata</i> using <i>Leuconostoc mesenteroides</i> SM	한국식품영양과학회
2013.11.15	Jong Soon Im	Optimized Production of Gamma-Amino Butyric Acid (GABA) in Turmeric Culture using <i>Lactobacillus plantarum</i> K154	한국식품영양과학회
2013.11.15	Jong Soon Im	Physical and Functional enhancement of Sweet Pumpkin Pudding with Turmeric by Lactic Acid Fermentation	한국식품영양과학회

2. 추가적 확보계획

가. 당뇨치료용 제약화 과정에서 발생할 연구성과물의 지속적 특허출원 및 논문 게재

나. 추진 중인 추가적인 신약개발시 발생할 연구성과물의 지속적 특허출원 및 논문 게재

제3절 추가연구, 타연구에 활용 계획

1. 추가연구에 활용

가. 균사체 배양시 기능성 물질의 선택적 극대화 기술

- 의약품화 연구에 활용

나.비임상, 기능성 인체임상 결과

- 의약품화 연구에 활용

2.타 연구에 활용

가.군사체 배양시 기능성 물질의 선택적 극대화 기술

- 미생물 발효 연구에 활용

- 간, 신장질환 치료제 개발 연구에 활용

제4절 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획

기능성 식품 및 의약품 시장의 특수성으로 인해 개별인정 획득시 까지는 보안유지가 필요 함.
제품출시 후 교육, 지도, 홍보, 기술확산 등의 적극적인 대외 활동을 전개 할 예정 임.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

선행연구사례가 전무하여 연구기간 중 획득한 국외 관련 기술정보 전무 함

제 7 장 연구시설·장비 현황

주관기관과 협동기관의 보유시설 및 장비로 연구수행 완료 함.
과제수행을 위해 추가로 도입한 연구시설·장비 없음

제 8 장 참고문헌

세계적으로 선행연구 사례가 없어 참고문헌 없음.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치 식품기술 개발사업 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치 식품기술 개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.