

119111  
-01

유  
용  
성  
분  
  
고  
  
합  
유  
  
동  
충  
하  
초  
  
대  
량  
생  
산  
  
및  
  
이  
를

이  
용  
한  
  
복  
합  
기  
능  
성  
  
건  
강  
식  
품  
소  
재  
  
개  
발  
  
및  
  
제  
품  
화

2021  
농  
림  
축  
산  
식  
품  
부  
  
농  
림  
식  
품  
기  
술  
기  
획  
평  
가  
원

보안 과제( ), 일반 과제( O ) / 공개( O ), 비공개( )발간등록번호( O )  
고부가가치식품기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003410-01

유용성분 고 함유 동충하초 대량생산 및 이를 이용한  
복합기능성 건강식품소재 개발 및 제품화

2021. 02. 26

주관연구기관 / 경희대학교

농 립 축 산 식 품 부  
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

<제출문>

## 제 출 문

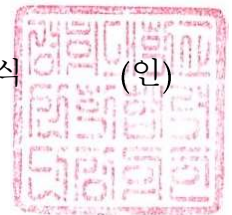
농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “유용성분 고 함유 동충하초 대량생산 및 이를 이용한 복합기능성 건강식품소재 개발 및 제품화”(개발기간 : 2019. 12. 02 ~ 2020. 12 01)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2021. 02. 26.

주관연구기관명 : 경희대학교 산학협력단

김우식 (인)



주관연구책임자 : 양 덕 춘

참여기관책임자 : 김 민 준

배 귀 식

김 유 미

이 동 욱

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	119111-01	해 당 단 계 연 구 기 간	2019. 12. 02 ~2020. 12 01	단 계 구 분	1/1
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	유용성분 고 함유 동충하초 대량생산 및 이를 이용한 복합기능성 건강식품소재 개발 및 제품화			
	세부 과제명	(해당없음)			
연구책임자	양덕춘	해당단계 참여연구원 수	총: 19명 내부: 19명 외부: 0명	해당단계 연구개발비	정부:150,000천원 민간: 50,000천원 계:200,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 19명 내부: 19명 외부: 0명	총 연구개발비	정부:150,000천원 민간: 50,000천원 계:200,000천원
연구기관명 및 소속부서명	경희대학교 산학협력단			참여기업명 농업회사법인(주)새롬한방제약 농업회사법인(주)에프앤비바이오 (주)뷰티맥스 한방바이오(주)	
국제공동연구	해당없음			해당없음	
위탁연구	해당없음			해당없음	
※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음					
연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반 「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의 4에 따른 분류로 일반과제에 해당함				

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물자원	정 보	실물
등록·기탁 번호	2편	2건	1		1						

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)

보고서 면수  
74

## <요약문>

연구의 목적 및 내용	<p>■ 연구개발 목표</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Cordycepin과 adenosine 고 함유 동충하초 대량배양기술 정립</li> <li>○ 유용성분 고 함유 복합기능건강식품(면역증강, 피부건강) 개발</li> <li>○ 동충하초에서 이너뷰티용 adenosine 원료 생산기술 정립</li> </ul> <p>■ 연구개발 내용</p> <p>1) 유용성분 고 함유 동충하초 대량배양기술 정립</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Cordycepin 고 함유 세포주 선발 : <i>Cordyceps militaris</i> HB8 분리 등록</li> <li>○ 유용성분 생성강화 조건 정립             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 배지 조성 변경에 의한 성분 강화</li> <li style="padding-left: 20px;">Cordycepin 4.11mg/g → 8.6mg/g dry weight</li> <li>- ADA 억제제 처리에 의한 adenosine 생성 강화</li> <li style="padding-left: 20px;">2주 액상배양으로 Adenosine trace/ml → 90μg/ml</li> </ul> </li> <li>○ 대량생산 시스템 정립 : 중, 대형 배양실 및 반자동화 설계</li> </ul> <p>2) 고기능성 식품원료 및 복합기능 건강식품개발(Inner Beauty Food)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 동충하초 자실체 식품원료 표준화 제품화: 분말, 농축액, 농축액SD분말</li> <li>○ 동충하초 함유 2중기능(면역력 증강, 피부건강) recipe 개발 : 2건             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 자실체추출물 첨가에 의한 연관 생리활성 시너지효과 확인</li> </ul> </li> <li>○ 동충하초 함유 2중기능 구현 액상음료, 스틱 및 젤리스트릭 시제품개발</li> </ul> <p>3) 주름개선 기능성 화장품 천연원료 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Adenosine 고 함유 동충하초 액상배양조건 정립</li> <li>○ Adenosine 신속 분리기술 정립 : 다공성(NKA-II) 활용, 회수율 80% 이상</li> </ul>				
연구개발성과	<p>&lt;핵심성과&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 특허출원 2건, 기술이전 4건, 제품화 6건(시제품 2건)</li> <li>○ 논문게재 : SCI급 1편, 비SCI급 1편</li> </ul> <p>&lt;전략성과&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 반자동형 동충하초 중, 대형 대량배양시스템 개발</li> <li>○ 동충하초 식품원료 표준화 및 제품화</li> </ul> <p>&lt;활용계획&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 동충하초 대량생산 체계 구축을 통한 규모화</li> <li>○ 동충하초를 이용한 고부가가치 식품, 건강기능식품 개발에 활용</li> </ul>				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 유용성분 고품유 동충하초 대량생산 기술 이용 고부가가치 식품 산업화</li> <li>○ 동충하초의 피부건강 기능성 개별인정형 건강기능식품원료 등록 추진</li> <li>○ 주름개선 천연 기능성 원료개발 및 수입 대체원료로 활용</li> <li>○ 동충하초 재배농가 소득 증대에 기여</li> </ul>				
국문핵심어 (5개 이내)	동충하초	코디세핀 아데노신	고기능성생물소 재	건강식품	이너뷰티
영문핵심어 (5개 이내)	<i>Cordyceps militaris</i>	Cordycepin Adenosine	High Functional Biomaterials	Health Foods	Inner Beauty

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

## < 목 차 >

### 제 1장 연구개발과제의 개요

제 1절 연구개발 목적 .....	5
제 2절 연구개발의 필요성 .....	6
제 3절 연구개발 범위 .....	11

### 제 2장 연구수행 내용 및 결과

제 1절 유용성분 고 함유 동충하초 대량생산기술 정립 .....	13
제 2절 동충하초 추출물 함유 복합기능 건강식품 개발 .....	36
제 3절 피부건강(주름개선) 기능성 천연 원료 개발 .....	55

### 제 3장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

제 1절 목표 및 달성여부 .....	68
----------------------	----

### 제 4장 연구결과의 활용계획

제 1절 연구종료 후 성과 창출계획 .....	69
제 2절 연구결과의 활용방안 .....	70
제 3절 후속 연구의 필요성 및 계획 .....	71

### 붙임. 참고문헌

# 제 1장 연구개발과제의 개요

## 제 1절 연구개발 목적

### 1. 연구개발 개요

인구의 급속한 고령화와 환경오염, 식문화의 변화 등에 의한 여러 가지 생활습관병의 유발은 건강에 대한 큰 위협요소로 대두되면서 천연자원을 이용한 다양한 건강식품들이 건강을 보호하는 한 요소로 주목을 받고 있다. 그 중 동충하초는 녹용, 인삼과 함께 3대 명약으로 알려져 왔으며 면역력증진, 피로회복, 노화방지, 간보호 등 다양한 효능이 밝혀졌고, 특히 밀리타리스 동충하초 (*Cordyceps militaris*)는 인공재배에 성공하여 최근 건강식품의 소재로 많은 관심을 모으고 있다.

그러나 동충하초는 효용성이 높은 귀중한 천연자원임에도 불구하고 여전히 원료의 안정적 수급과 고품질 유지가 미흡하고, 높은 가격, 모호한 positioning 등으로 인해 식품으로도 의약품으로도 명료한 자리매김을 하지 못하고 있는 실정이다.

이 연구에서는 고품질의 동충하초 원료를 안정적으로 생산할 수 있는 시스템 정립과 동충하초가 지니고 있는 생리활성을 이용하여 개념이 다른 2중 기능 건강기능식품 개발을 통해 이를 고부가가치 식품원료로 육성하기 위한 기반을 마련하고자 한다.

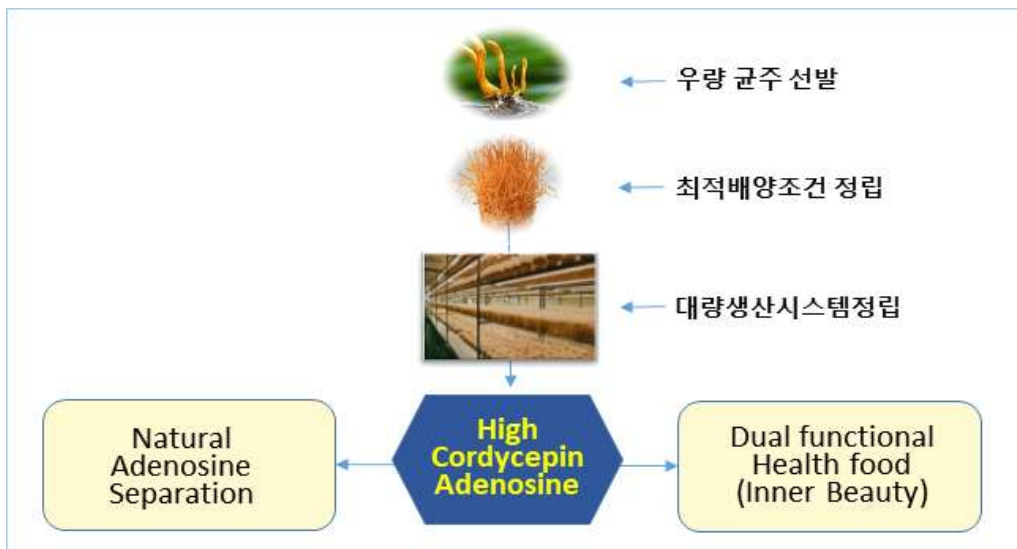


그림 1.1. 연구개발 개요도.

### 2. 연구목표

본 연구의 목표는 ① 토종 우량 종균을 선발하고 유용성분인 cordycepin, adenosine 고 함유 배양기술 및 대량생산시스템 정립, ② 동충하초 추출물을 함유한 면역력 증강-피부건강 2중 기능 (Inner beauty) 건강식품개발, ③ 동충하초로부터 주름개선 천연 기능성 물질인 adenosine을 신속하게 분리하는 기술을 정립 응용함으로써 동충하초 고부가가치 산업화에 기여하는데 있다.

## 제 2절 연구개발의 필요성

### 1. 동충하초

동충하초는 겨울에 곤충의 몸에 있다가 여름에 버섯을 발아시켜 그 모습이 풀처럼 보이는 모습에 유래된다. 곰팡이의 일종인 동충하초 균이 살아있는 곤충의 몸속으로 들어가 발생하는 곤충기생성 약용버섯으로, 균에 감염된 곤충은 버섯이 나오기 전까지는 죽어도 썩지 않고 미라처럼 형태를 유지하는 것이 특징이다. 동충하초는 자낭균문 (*Ascomycota*), 동충하초강(*Sordariomycetes*), 동충하초목(*Hypocreales*), 맥각균과(*Clavicipitaceae*) 버섯으로 500여종의 품종이 있으며, 현재 동충하초과(*Cordycipitaceae*), 잠자리동충하초과(*Ophiocordycipitaceae*) 및 맥각균과(*Clavicipitaceae*)로 분류되고 있다. 이중 국내에서 채집 및 분류된 것은 약 80여종으로 알려져 있다(Lee *et al.*, 2017).

현재 한의약에서 널리 쓰이고 있는 동충하초는 박쥐나방동충하초(*Ophiocordyceps sinensis*)와 큰번데기동충하초(*Cordyceps militaris*)이다(Shrestha *et al.*, 2012; Tuli *et al.*, 2013). 자연산 동충하초 *Ophiocordyceps sinensis*는 그것의 특정 숙주와 조건이 성장에 필요하고 자연에서 찾기가 어렵기 때문에 매우 고가로 거래되고 있다. 반면 큰번데기동충하초(*Cordyceps militaris*)는 중국, 한국, 일본 및 아시아 국가에서 전통 약용 버섯으로 널리 사용되고 있는 맥각균과 동충하초에 속하는 곰팡로서 (Sung *et al.*, 2007). 식, 의, 약 및 화장품산업 분야에서 널리 주목받고 있다.

### 2. 큰번데기동충하초(*Cordyceps militaris*)

*Cordyceps militaris*는 큰번데기동충하초, 번데기동충하초, 홍초 또는 밀리타리스 동충하초 등으로 불리우며, 2000년도에 대한민국식약처에 식품원료로 등록되었으며 눈꽃동충하초와 더불어 현재 2종 만이 식품원료로 사용이 가능하다(그림 1.2). 반면, 박쥐나방동충하초(*Ophiocordyceps sinensis*)는 해발 3,000-4,000m 고산지대에서만 자라며, 채집하기가 어려움에도 불구하고 Global 시장에 형성된 동충하초는 대부분을 차지하고 있다. 그러나 약리효능의 주성분으로 알려진 cordycepin은 큰번데기동충하초(*cordyceps militaris*)가 약 15배, 조단백질은 3배, 비타민 A는 2배 이상 많은 것으로 보고되었다(Oh *et al.*, 2003). 본 연구에서 특별한 언급이 없는 한 동충하초라함은 큰번데기동충하초를 의미한다.



그림 1.2. 식품원료로 등록된 동충하초.



### 3. 동충하초의 성분과 효능

큰번데기동충하초 균사체의 일반성분 중 탄수화물 54.7%, 조단백질 20.5%, 조지방 14.0, 회분 7%. 수분 3.7%이고, 무기질은 K, P, Mg, Ca, Na, Fe, Mn, Zn, Ca 등이 함유되어 있으며, 유리아미노산 22종 그중 필수 아미노산 9종이 포함되어 있으며, 비타민은 100g당 221.43m이 함유되어있는 것으로 보고되었다(Cha *et al.*, 2004). Hur(2008)의 연구에 의하면 동충하초 자실체 및 균사체의 총 유리아미노산 69.32 mg/g 및 14.03 mg/g이었고, 자실체에서 가장 많은 아미노산은 lysine, glutamic acid, proline and threonine이었다. 또한 자실체에는 총 지방의 70%에 해당하는 풍부한 불포화지방산을 가지고 있었으며 linoleic acid 함량이 가장 높았다. 아데노신은 자실체에 0.18% 균사체에 0.06%, 코디세핀은 0.97%, 0.36% 이었다. 또 다른 보고에 의하면 밀리타리스동충하초가 박쥐나방동충하초에 비해 조단백질은 75.1%로 3배, 비타민 A는 308IU/100g 2배, 코디세핀은 448mg/100g으로 15배 높다고 한다(Oh *et al.*, 2003).

주요 생리활성 성분으로는 cordycepin, cordycepic acid(mannitol), adenosine, ergosterol, polysaccharide, 포화지방산 및 불포화지방산, 아미노산, 비타민 A, C, E 등이 포함되어 있다. 그 외에도 아데노신 유사 뉴클레오시드나 다양한 다당체 등이 존재한다(표 1.1, 표 1.2).

그 중 cordycepin (3'-deoxyadenosine)과 adenosine은 nucleoside 유사체이며. 핵심적인 생리활성물질로서 면역조절(Kim *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2004), 항산화(Hong *et al.*, 2016), 항암(Park *et al.*, 2006), 항염증(choi *et al.* 2012), 항당뇨(Kim *et al.*, 2005), 항고지혈증(Lee *et al.*, 2006), 항혈전(Ahan *et al.*, 2012), 인지기능(Cai *et al.*, 2013), 항바이러스(Otha *et al.*, 2007), 항균(Tran and Tran, 2019), 항해충(Kim *et al.*, 2002), 피부미백(Chin *et al.*, 2006) 등 매우 다양한 기능이 보고되었다(Opeyami 2018).

Cordycepin은 일반적으로 *Cordyceps militaris*에서 주성분으로 알려져 있지만, 자연산 동충하초에 함유되어 있는 양은 건조중량 기준으로 0.5% 미만이다. 그러나, 고체배지에서 배양이 가능함에 따라 이들로부터 2차 대사산물 생성을 강화할 수 있는 장점이 있다. 많은 연구자들이 인공배양 조건, 특히 비번데기배지에서 높은 농도의 cordycepin, adenosine 등 유용성분을 생산하기 위한 최적의 조건을 찾는 데 초점을 두고 연구해 왔고(Cha *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2003), *Cordyceps militaris*로 부터 2차 대사산물의 생성은 특정 아미노산, 질소원, 탄소원, 미네랄, 성장촉진제 및 특수한 배양조건을 필요로 하는 것으로 밝혀지고 있다 (Choi *et al.*, 1999).

표 1.1. 큰번데기동충하초(*Cordyceps militaris*)의 주요성분과 생리활성

Chemical constituents	Contents	Biochemical activities
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Cordycepin</li> <li>▪ Cordycepic acid(d-mannitol)</li> <li>▪ Adenosine</li> </ul>	0.1~4mg/g 7~29% in fruiting body of <i>C. sinensis</i> 0.5~1.5mg/g	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Immunity</li> <li>▪ Antitumor, anticancer</li> <li>▪ Inflammation</li> <li>▪ Anti wrinkles</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Nucleotides/Nucleotide derivatives</li> <li>▪ Polysaccharides</li> <li>▪ Sterol and fattyacids(Ergosterol)</li> <li>▪ Unsaturated fatty acids</li> <li>▪ Saturated fatty acids</li> </ul>	3~8% in fruiting body of <i>C. militaris</i> 10.68mg/g 57.84%(C16:1, C:171, C18:1,2) 42.16%(C14, C15, C16, C17, C18, C20, C21)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vit. D2 precursor</li> <li>• Decreasing blood lipids and protecting against cardiovascular disease.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Protein, Amino acid, Metal element</li> </ul>		

표 1.2. *Cordyceps militaris* 주요 생리활성(Olatunji, 2018)

<i>C. militaris</i>	Anticancer A	4T1, SMMC-7721, BGC-823, MCF-7 cells	A
	Antitumor	J6/JFH1-huh 7.5 cells	A
	Antioxidant	N/A	A
	Anti-inflammatory	human ADMSC cells	20-40 µg/ml
	Antihyperlipidemic	Mice	25-400 mg/kg
	Hepatoprotective	Mice	25-400 mg/kg
	Acetylcholinesterase inhibition	N/A	5.3-32.3 mg/ml
	Anti-HCV	HuH-7-derived OR6, AH1R cells	A
	Anti-HCV activity		
	Immunomodulatory	Sea cucumbers	A
	Antihyperglycemic	Mice	8-72 mg/kg
	Anti-obesity	CS8BL/6 J mice	100-300 mg/kg
	Antimicrobial	N/A	MIC = 0.015-3.00 mg/ml MBC = 0.03-6.25 mg/ml
	Anti-allergic	Mice	28.5 µg/ml
	Hypouricemic activity	Mice	50-200 mg/kg
	HIV-1 protease inhibiting	N/A	A

#### 4. 동충하초 연구현황

국내에서 동충하초에 대한 연구는 2,000년대 초부터 부분적으로 시작되었다. 그러던 중 잠업산업의 쇠퇴로 인해 이에 대한 새로운 활로를 찾기 위한 노력의 일환으로 누에동충하초에 대한 연구가 활발히 이루어지면서 동충하초 연구는 새로운 국면을 맞게 되었다. 즉, 본래의 동충하초 즉, *cordyceps sinensis*나 *cordyceps militaris*에 대한 연구보다 눈꽃동충하초로 불리 우는 누에동충하초 연구가 앞서 나감으로 인해 다소 주춤하였다.

그럼에도 불구하고 이에 대한 꾸준한 연구가 이어졌으며 90여편의 논문이 발표되었고, 수건의 국비지원 연구사업도 수행된 바 있다. 그 결과로 동충하초의 항아토피 효능, 항암효능, 면역력증가 등 다양한 효능이 밝혀진바 있다. 특허검색정보서비스(KIPRIS)를 통해 검색한 2020년 9월 현재 동충하초에 관한 실용특허는 총 2255건이다. 그중 동충하초 효능에 관한 검색결과는 1305건, 식품관련 1736건, 화장품관련은 452건, 의약품관련은 648건이 검색되었다. 이들중 상당 부분은 중복 계산된 것도 있겠지만 밀리타리수 동충하초의 효능을 이용한 산업화 노력은 지속되고 있다.

특히 잠업산업의 활성화를 위한 누에동충하초에 대한 연구가 활발한 연구는 많은 성과도 얻었지만 예로부터 알려진 *Cordyceps sinensis*나, *Cordyceps militaris* 본래의 효능과 의미는 다소 희석되지 않았나 하는 생각도 있다.

#### 5. 동충하초 산업화 현황

현재 우리나라에서 일정 규모 이상의 동충하초를 재배하는 농가는 10여 곳이 있으며, 주로 누에동충하초, 일명 눈꽃동충하초를 재배하고 있으며 다음은 큰번데기동충하초(*Cordyceps militaris*)이다. 동충하초를 원료로 한 가공식품은 20여 제품이 유통되고 있으며, 식품전문기업 보다 재배농가 자체에서 생산하여 판매하는 경우가 많다. 또한 밀리타리스 동충하초 추추물물을 이용한 건강기능식품으로 등록된 것은 지구력 증진(2011)과 면역력 증강(2013) 2종이 있다. 2014년 2월 농촌진흥청 브리핑자료에 의하면 동충하초의 국내 연간 생산량은 약 10톤 규모이며 그중 밀리타리스 동충하초는 약 15% 정도라고 보고한바 있다.

식품 외에 화장품 원료로 중국에 수출한 기업이 소개된바 있고 (본쉬즈코리아, 2017. 12), 코디세핀을 이용한 의약품 개발을 시도한 기업도 언론보도는 있었으나 아직까지 국내에서 의약품 개발로 성공한 사례는 없다. 현재 동충하초와 그 연관 산업에 대한 시장규모는 잘 알려져 있지 않다.

농림축산식품부는 건강, 웰빙 등 사회적 관심증가에 따라 2016년도에 특용작물산업발전 종합 대책을 발표하고, 약용작물, 버섯 등 스타제품 15개를 육성하여 2014년 1조 8천억원 규모의 특용작물 생산액을 2020년까지 3조원 규모로 확대할 계획임을 발표하였으며, 특히 동충하초 등 약용버섯 5종은 스타제품으로 지정하여 해외시장 진출에 나설 계획임도 밝혔다.

표 1.3. 시판 중인 동충하초 제품(2019년 10월 현재)

구분	제품명	제조원	식품유형
분말	동충하초, 동충하초분말, 동충하초분말, 성재모동충하초비료, 제주로알동충하초	㈜제주사랑농수산, 인그린(주), 맑은들(주), 힐성인삼영농조합,(주)제주로알식품	기타가공품, 기타가공식품
진액	광동숯누애동충하초진액, 국민액기스, 금룡밀리타리스 동충하초추출액, 다음누애동충하초, 본초위동충하초발효, 현미동충하초액기스	광동제약(주), ㈜유출형약용버섯, 동이바이오영농조합, ㈜다음, ㈜정호네추럴, 엄지식품	추출가공식품, 액상차, 다류액상차
환	누애동충하초환골드, 눈꽃동충하초환, 동충일기, 동충하초버섯환, 파워킹, 홍삼동충하초환, 홍삼동충하초헛개환	서초원, 정인, 동아제약(주), 포항바이오파크, ㈜굿시드, ㈜홍자은, ㈜경주생약식품사업부	기타가공품, 동충하초주정추출물제품, 기타가공품

근년에 중국에서는 동충하초 건강식품에 비소와 납이 검출되어 생산과 판매가 제한된 바 있고, 국내에서도 일부 제품에서 기준치 이상의 미생물과 중금속이 검출되는 등 제품에 대한 부정적 요인들이 보고됨에 따라 또한번 위축되었지만 동충하초, 특히 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*)는 그 효능과 인지도 면에서 여전히 매력적인 건강식품 소재임에는 틀림이 없다.

## 6. 연구의 필요성

동충하초는 기능성 생물소재로서의 여러 가지 장점을 가지고 있다. 첫째 핵심 성분이 cordycepin과 adenosine 등 그 유도체로 천연물임에도 비교적 단순하고, 그 함량 또한 다른 식물들에 비해서는 높은 편이다. Cordycepin은 동충하초에 들어 있는 가장 중요한 성분으로 항암, 항염, 간 보호, 면역증강 등 다양한 효능이 밝혀졌다. 또한 미국에서는 동충하초를 백혈병 치료의 희귀약품으로 승인한바 있고, cordycepin은 21세기의 천연항생물질로 불린다. 시판되고 있는 cordycepin은 동충하초에서 분리한 것이며 1g에 1,200만원을 호가하는 고가이다. 아데노신은 생체 내 DNA 구성의 한 염기성분으로 코디세핀과 구조가 유사하나 특히 피부의 주름개선에 중요한 성분으로 알려져 있다. 둘째, 두 유효성분에 대한 효능이 과학적으로 충분히 입증될 수 있는 많은 연구논문이 있다. 즉, cordycepin은 면역증강 기능성 원료로, adenosine은 주름개선 기능성화장품 원료로 각각 식품의약품안전처에 등록되었다. 셋째, 친환경적 재배로 2개월이면 수확할 수 있고, 유효성분 함량 증강이 기술적으로 가능하다. 또한 면역기능과 피부건강은 그 작용기전이 생화학적으로 상호 연관성이 있어 한 소재로 두 가지 기능성을 발현할 수 있다. 다만 고품질의 원료를 안정적으로 생산하고 가격을 다운시킬 수 있는 자동화 기술 또는 생산증가가 기술적으로 해결된다면 매우 요긴한 소재가 될수 있다.

따라서, 동충하초를 고부가가치 산업으로 육성하기 위해서는 첫째, 유용성분의 함량이 높고 고품질의 원료를 보다 저렴하게 안정적으로 생산, 공급할 수 있는 기술 개발이 필요하다. 둘째는 동충하초의 worm이 연상되는 혐오성을 불식하고 성분과 효능의 장점을 부각할 수 있는 새로운 개념의 제품개발이 필요하다. 셋째는 새로운 수요처 발굴이 필요하다. 즉, 웰빙을 추구하는 트렌드에 맞게 주름개선 기능성 원료인 아데노신이나 항암, 항생물질인 코디세핀 등의 성분을 고함유하는 배양기법을 개발하여 함유량을 증가시킨 후 이 물질을 분리하여 식품, 의약품, 화장품 원료로 활용하는 등 천연 원료의 응용과 활용을 다각화 할 필요가 있다.

이에 본 연구에서는 첫째, 동충하초 토종 우량균주를 선발하고 이를 이용 코디세핀과 아데노신을 등 유용성분의 함량을 높일 수 있는 최적배양조건을 정립하고, 이를 이용 고품질의 원료를 안정적으로 대량 생산할 수 있는 기술을 정립하고자 한다. 둘째, 동충하초가 갖고 있는 기능성 증성분과 효능이 명확히 밝혀진 면역력증강(코디세핀), 피부건강(아데노신, 코디세핀) 효능을 이용하여 2중 기능건강식품(Inner Beauty, Eating cosmetics)을 개발하고자 한다. 셋째, 동충하초의 활용도 확대를 위해 특수 배양방법으로 코디세핀, 아데노신 생성을 증가시킨 후 이를 신속하게 분리하여 기능성 천연원료로 활용함으로써 동충하초를 고부가가치 산업으로 육성하는데 기여하고자 한다.

## 제 3절 연구개발 범위

### 1. 유용성분 고품유 동충하초 대량생산기술 정립

#### 가. 자연산 우량 종균 분리 및 선발

- (1) 토종 동충하초(*Cordyceps militaris*) 우량 종균 분리 선정
- (2) 유용성분 함량 확인

#### 나. 유용성분 강화 배양 조건 정립

- (1) 배지 조성 변화에 의한 방법 : 탄소원, 질소원 성장호르몬 등
- (2) 최적 배양 환경 확인 : 조도, 온도, 습도 등
- (3) 성장인자, Adenosine deaminase inhibitor 처리에 의한 강화

#### 다. 대량생산 시스템 정립

- (1) 중형(100m<sup>2</sup>), 대형(1,000m<sup>2</sup>) 규모

### 2. 동충하초를 이용한 복합기능 건강식품 개발

#### 가. 동충하초 원료 표준화

- (1) 동충하초 건조분말, 추출농축액 및 농축액분말 표준화

#### 나. 면역력 증강 및 피부건강 2중기능 건강식품 개발(Inner beauty)

- (1) 동충하초 추출물 및 고시형 원료 함유 2중기능 건강기능식품 recipe
- (2) 동충하초의 면역력-피부건강 효능 및 시너지 효과의 확인
- (3) 2중 기능 건강식품(Inner Beauty food) 시제품 제조

### 3. 동충하초로부터 주름개선 기능성 천연 원료 아데노신 분리

#### 가. 동충하초의 부위별 Adenosine 분포와 농도 조사

- (1) 자실체(fruit body), 균사체(mycelium), 배양액 cordycepin, adenosine 분포 조사

#### 나. Adenosine 강화 최적 배양기술 정립

- (1) 액상 및 고상배양법
- (2) ADA inhibitor 처리에 의한 방법

#### 다. 아데노신 추출 및 분리

- (1) 추출 최적 조건 정립 → 추출용매, 가열, 초음파처리 등 물리적 방법 선정
- (2) 최적 분리 조건 정립 : Batch type 및 chromatographic method

#### 라. 아데노신 회수

- (1) Adenosine 회수율 및 순도확인

## 제 2장 연구수행 내용 및 결과

### 제 1절 유용성분 고 함유 동충하초 대량생산기술 정립

#### 1. 유용 종균 분리 및 선발

##### 가. 자연산 우량 균주 선발

토종 동충하초(*Cordyceps militaris*) 우량균주 선발을 위해 국내에서 자체 탐색하여 2종의 세포주를 분리하였다. 또한 토종의 특성을 다른 종균과 비교하기 위하여 중국과 베트남에서 분리 동정한 균주 3종 확보하고 총 5종의 균주를 대상으로 기본적인 특성을 비교하였다. 즉, 먼저 기본배지에서 배양하여, cordycepin과 adenosine 함량을 비교하였다. 그 결과 중국에서 구입한 균주는 코디세핀의 함량이 상대적으로 낮았으며 아데노신의 함량은 유사하였고, 베트남산은 코디세핀은 높은 반면 아데노신 함량은 상대적으로 낮았다. 본 연구에서는 cordycepin 함량이 높고 전반적으로 우수한 HB8를 최종 선발하였다.

표 2.1.1. 채집 및 수집한 종균 자실체의 유용성분 함량 비교

No	Sources	Strains	Cordycepin (ug/g dry weight)	Adenosine (ug/g dry weight)
1	KOR	HB8	4109	1135
2	KOR	HB9	304	1256
6	VIET	AN-1	6093	293
7	CHN	CH-1	1032	1240
8	CHN	CH-2	1043	1158

##### 나. 동충하초 토종균주 *Cordyceps militaris* HB8 특성 구명

최종 선발된 동충하초는 충청북도 오대산에서 채집한 새로운 strain으로 자실체를 멸균수로 세척한 후 1% 차아염소산 나트륨(sodium hypochlorite, NaClO) 용액에 1분간 담근 후 다시 멸균수로 충분히 씻어 주었다. 잘 세척된 자실체를 약 5mm 길이로 자른 후 PDA(potato dextrose agar; 감자 15g, 포도당 20g, 한천 20g/L) 배지에서 배양하였다. 새로이 분리한 동충하초를 *Cordyceps militaris* HB8로 명명하였으며, 배양한 원균(Stock culture)은 10% glycerol 용액에 소분하여 -80℃에서 보관하였다. 이 균주의 형태학적 특성은 그림 2.1.1과 같다.

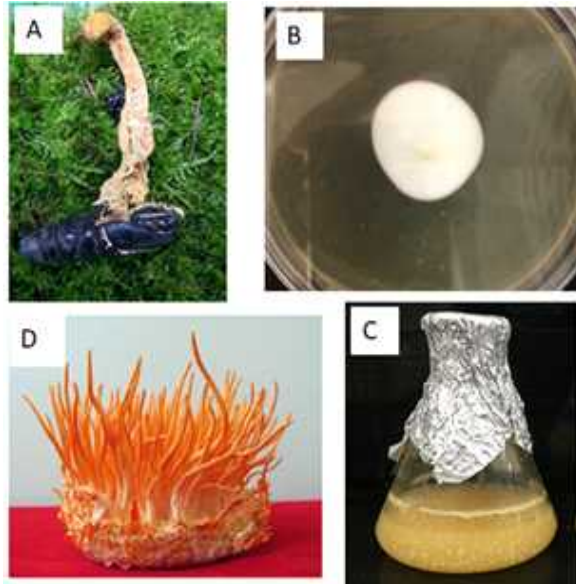


그림 2.1.1. 동충하초(*Cordyceps militaris* HB8)의 형태학적 특성. A, wild *Cordyceps militaris*; B, Mycelium of *Cordyceps militaris* HB8 on PDA agar; C, liquid culture *Cordyceps militaris* HB8 on PDB after 5 day, D, fruit body artificial culture of *Cordyceps militaris* on Rice medium.

#### 다. 동충하초 토종 균주 *Cordyceps militaris* HB8 유전자 분석

새로이 분리한 동충하초의 DNA추출, PCR 및 Sequencing은 다음과 같이 실시하였다. 즉, 배양된 큰번데기동충하초에서 Sung 등(2007)의 CTAB 방법을 약간 수정하여 DNA를 추출하였다. Internal transcribed spacer 1 (ITS1)과 (ITS2) 영역의 rRNA 유전자는 universal primer (ITS-1:5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; ITS-4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')를 사용하여 증폭하였다. PCR 조건은 94°C에서 4분, 94°C에서 1분과 58°C에서 1분 (30 cycles), 72°C에서 1분 그리고 마지막 extension은 72°C에서 10분을 설정하였다. ITS1과 ITS2 영역의 염기서열 분석을 위해, 증폭된 PCR 생산물은 제노텍 업체 (대전, 대한민국)에 보내졌다. 분석된 strain HB8의 DNA 염기서열은 LASERGENE software (version 6.0; DNASTAR, Madison, WI, USA)을 사용하여 수정되었고, NCBI 데이터 베이스에서 이용 가능한 곰팡이 염기서열과 함께 비교 분석 하였다.

그 결과 분리한 *Cordyceps militaris* HB8의 염기서열은 표 2.1.2와 같고, NCBI Asscession number는 MT835161이었다. 분리된 *Cordyceps militaris* HB8 (MT835161)은 ITS 염기서열 분석으로 *Cordyceps militaris*로 확인되었다. 가장 가까운 균주의 학명과 유사성은 *Cordyceps militaris* strain JLCY-LI819 (99.82%), *Cordyceps militaris* strain W141456 (99.82%), *Cordyceps militaris* strain W141449 (99.82%) 및 *Cordyceps militaris* strain 4642 (99.81%)로 확인되었다. HB8 균주의 ITS1 / 2 유전자 서열과 그 분류 학적 이웃으로부터 유래 된 계통수는 그림 2.1.2와 같다.

표 2.1.2. *Cordyceps militaris* HB8의 유전자 염기서열

```
GCCTGCGGAGGGATCATTAACGAGTTTTCCAACCTCCCAACCCCTTGTGAACATACCTATCGTTGCTTCGGCGGACTCGCCCAGCGCCTGGACGCG
GGCCTGGGCGGGCCGCTCGGGGGCCCAAACTGTATCTACCAAGTTTTCTGAATCCGCCGAAGGCAAACAAATGAATCAAACTTTCAAC
AACGGATCTCTTGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC
GCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCGCTGTTTCGAGCGTCAATTTCAACCCTCGACGTCCCTGGGGGATGTCGGCGTTGGGGACCGG
CAGCACACCGCCGCCCCGAAATGAAGTGGCGGCCGTCCGCGGCGACCTCTGCGTAGTACCCCAACTCGACCCGGAACCCGACGTGGCCACGC
CGTAAAACGCCCAACTCTGAACGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCATAA
```

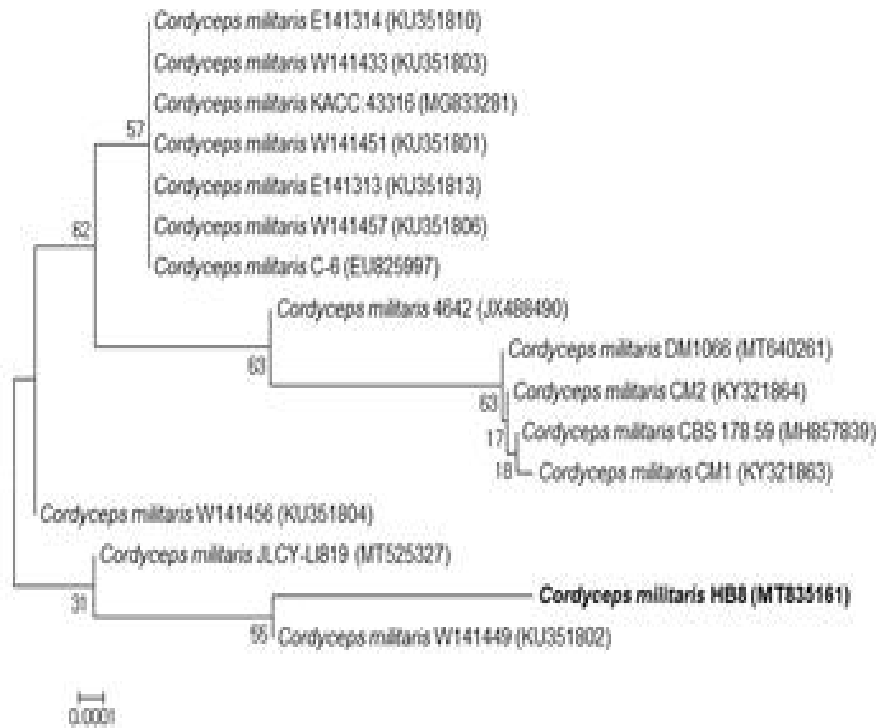


그림 2.1.2. Phylogenetic tree derived from ITS1/2 gene sequences of strain HB8 and its taxonomic neighbors, reconstructed with neighbor-joining method.



## 라. 아데노신 및 코디세핀 정량

Cordycepin 및 adenosine의 표준물질은 미국 시그마 알드리치 (Sigma Aldrich, Co.)로부터 구입하였다. Cordycepin, adenosine의 각 표준 용액의 시리즈는 12.5, 25.0, 50.0, 75.0, 100.0 및 125 $\mu$ g/mL로 준비하였다.

자실체로부터 코디세핀 및 아데노신의 추출하기 위하여 동충하초 건조 자실체 분말 1g을 탈이온수 20mL에 현탁시키고 42kHz, 70W (08890-06, Cole-Parmer, USA)에서 60도에서 1시간 동안 초음파처리하였다. 처리한 용액을 10분 동안 9,000rpm에서 원심분리하여 상등액을 수득하고, 그 중 1ml를 0.45 $\mu$ m 막필터를 통해 여과 한 다음, 고성능액체크로마토그래피(HPLC) 분석에 적용하였다. 고성능액체크로마토그래피(HPLC) 분석은 Agilent infinity 1260 HPLC 시스템에서 수행되었다. 사용된 column은 역상 Agilent C18 (4.6mm $\times$ 150mm, 5 $\mu$ m 입자크기)이었다. 추출물로부터 아데노신 및 코디세핀의 분리는 탈 이온수 및 HPLC 등급 메탄올(Merck, Germany)로 구성된 이동상을 이용하여 컬럼온도 25 $^{\circ}$ C에서 부피기준 85:15의 상대 비율로 수행하였다. 유속은 분당 1.0mL 및 UV-visible 검출이 260nm에서 수행되었다(그림 2.1.3).

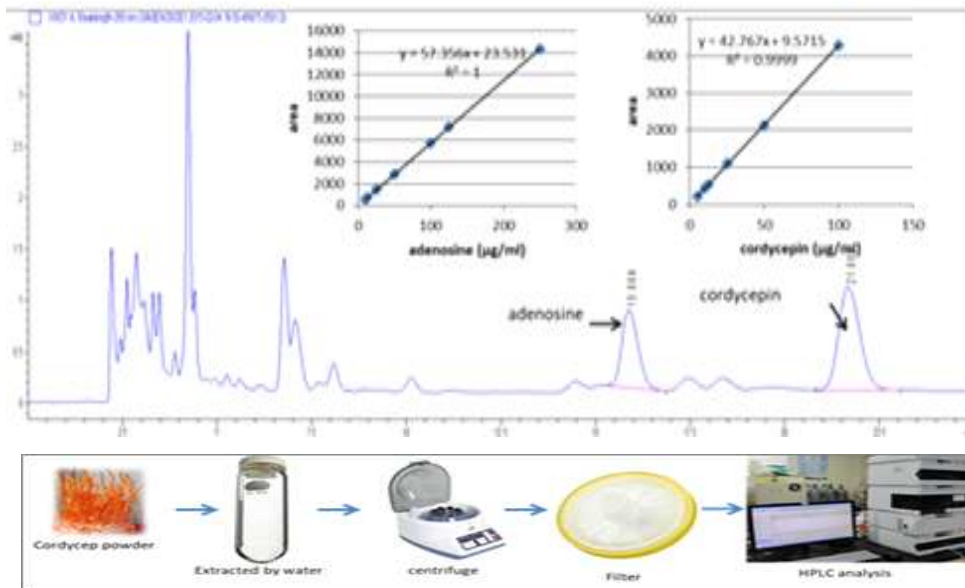


그림 2.1.3. 코디세핀, 아데노신 정량분석 개요.

## 2. 유용성분 강화를 위한 최적 배양조건 정립

동충하초 유용성분 함량을 강화하기 위하여 *Cordyceps militaris* HB8을 배양 시 배양 환경, 즉, 빛, 질소원, 탄소원, 기질, 성장호르몬 등의 배양 환경과 성분의 조성에 따른 아데노신과 코디세핀의 함량을 비교 분석하였다. 이 결과를 토대로 목적별 배지조성과 배양환경의 최적 조건을 도출하였으며 이 결과를 한국자원식물학회지 2020년 12월호에 제출하였고, 특허출원 2건(출원번호 : 10-2020-0154620, 10-2020-0154827)을 제출하였음.

### 가. 종균 및 모균 배양

*Cordyceps militaris* HB8 스탁배양은 PDA 배지에서 10일 동안 성장시킨 다음 모 배양에 사용되었다. 모 배양 배지는 L당 펩톤 10g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5g, 포도당 20g,  $\text{MgSO}_4$  1g, 비타민 B1 0.05g로 구성되었다. 배양된 균사체를 멸균된 원통형 절단기로 약 1cm의 PDA 플레이트 배양물을 10 편칭하여 모 배양 배지로 옮겼다. 시드 배양은 500mL의 액상배양액을 함유하는 1,000ml 플라스크에서 성장시키고, 암 조건에서 5일 동안 회전 진탕(110rpm)하며 23°C에서 배양하였다.

기본배지 및 배양조건 : 기본배지는 L당 효모 추출물 2g, 펩톤 8g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5g, 포도당 20g,  $\text{MgSO}_4$  1g으로 구성되었다. 다음 각 고체 기질 30g을 배양 병에 별도로 부어 넣고 45mL의 영양분을 배양 병에 첨가한 다음 121°C에서 20분 동안 멸균하였다. 배양 병을 어두운 배양실로 옮긴 다음 3일 동안 배양하고 다시 400~700럭스의 광도에 노출시키면서 60일 동안 배양하였다. 낮과 빛의 상태는 명 14시간, 암 10시간이었다. 배양 기간이 끝나면 동충하초 자실체를 고체배지에서 분리한 후 40°C에서 건조하였다.

### 나. 배양환경의 영향

#### (1) 빛의 영향

시드 배양액 10ml를 고체기질이 들어 있는 멸균 배양 병에 접종하였다. 배양 병은 암실 조건하에서 3일 동안 배양한 후 다시 60일 동안 각각 400~700럭스, 100럭스 이하, 1200럭스 이상 조도 강도로 상이 한 광 노출로 변경하면서 배양하였다. 명, 암 상태는 명 14시간, 암 10시간으로 하였다. 배양 기간이 끝나면 동충하초의 자실체를 고체 배지에서 분리 한 후 40도에서 건조하였다.

*Cordyceps militaris* HB8의 성장을 위한 최상의 빛 조건은 400~700럭스 상태였다. 이 조건에서 자실체의 길이는 7~14cm이었고 이는 100럭스 이하에서의 5~9cm나, 1200럭스 이상에서의 5~9cm보다 길었다(표 2.1.3). 100럭스 이하에서 배양한 동충하초의 건조 전 및 건조 후 자실체의 무게는 각각 37.7g 및 6.0g이었고, 이는 1,200럭스에서의 27.9g 및 4.1g 및 100럭스 이하에서의 24.0 및 3.3g 보다 높았다. 아데노신 함량은 100럭스 이하에서 1,369 $\mu\text{g}$ 으로 가장 높았고, cordycepin의 함량은 500럭스에서 건조 자실체 g당 3,586 $\mu\text{g}$ 으로 1,200럭스 이상이나 100럭스 이하 처리 때 보다 높았다. 이 결과는 동충하초 배양을 위한 최적 조도는 400~700럭임을 보여준다.

표 2.1.3. Effect of light contidition on growth of *Cordyceps militaris* HB8

조도(Lux)	자실체길이(cm)	비건조중량(g)	건조중량(g)	아데노신( $\mu$ g)	코디세핀( $\mu$ g)
400~700	7~14	37.7	6.0	1,248	3,586
>1200	5~9	27.9	4.1	886	635
<100	5~9	24.0	3.3	1,368	1,289



그림 2.1.4. Effect of light contidition on growth of *Cordyceps militaris* HB8.

(2) 배양 환경의 영향

동충하초 배양 온도, 습도 및 환기에 대한 영향을 관찰하였다. 이 지표는 대형 배양실에서 정교한 실험을 쉽지 않다. 배양 온도는 21~25℃까지, 상대습도는 70~80%까지 변화시키면서 배양을 시도하였으나 자실체 생성이나 코디세핀 함량에 있어서 유의한 차이는 나타나지 않았다. 또한 환기의 일일 2~3회 순환하며 배양하였다.

다. 최적 배지 조건

(1) 기질의 영향

동충하초 자실체 배양에 대한 기질의 여행을 관찰하기 위하여 배지 구성 곡류의 종류와 배합 비율의 영향 등을 조사하였다. 즉, 배지 구성 곡류호는 현미(R), 기장(M), 귀리(O) 및 검은콩(B)을 사용하였고 그 비율은 O:M=25:5, R:O=15:15, R:O:M=15:10:5 및 R:O:B:M=10:10:5:5로 배합비를 달리하여 고체배지에서 배양하였다. 고형배양 배지조성은 L당 효모추출물 2g, peptone 8g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g, 포도당 15g, MgSO<sub>4</sub> 1g으로 하였다. 각 고형기질 30g을 배양 병에 별도로 부어 넣고 45mL의 영양분을 첨가하였다. 배양 병을 121℃에서 20분 동안 멸균하였으며, 각 실험은 32개의 배양 병에서 수행되었다.

그 결과 자실체 생성은 현미와 귀리 15:15의 혼합균에서 상대적으로 높았다. 그러나 코디세핀의 생성에 있어서는 귀리와 검은콩 균에서 가장 높은 반면 아데노신은 모든 것을 혼합한 시험균에서 가장 높았다. 이 결과는 목적하는 바에 따라서 기질을 달리할 필요가 있음을 보여주지만 주요성분인 코디세핀 함량을 높이기 위해서는 귀나 검은콩이 우수함을 암시해 준다. 또한 기장과 같은 아밀로펙틴이 많은 곡물은 기질로서 적절하지 않음을 보여준다(표 2.1.4).

표 2.1.4. Effect of different basal substrates on fruiting body, and cordycepin and adenosine production

곡류(g)	단위(g)	비건조중량(g)	건조중량(g)	아데노신(μg)	코디세핀(μg)
현미	30	38.2	4.1	1,302	1,861
귀리	30	22.0	2.3	1,314	8,251
검은콩	30	10.0	1.4	1,300	7,892
기장	30	23.8	3.0	1,219	2,666
귀리:기장	15:5	42.2	5.5	1,131	4,109
현미:귀리	15:15	44.1	5.6	1,139	3,738
현미:귀리:기장	15:10:5	40.3	5.3	1,251	4,682
현미:귀리:검은콩:기장	10:10:5:5	37.6	4.8	1,424	3,654

(2) 질소원(Nitrogen sources)의 영향

동충하초 자실체에서 cordycepin 및 adenosine 생성에 대한 질소원의 영향은 보기 위하여 동일한 기본배지 조건 하에서 실험을 수행하였다. 질소원은 7종의 상이한 질소원 즉, 펩톤, 효모추출물, 대두, 탈지분유, 달걀노른자, 신선한 번데기 및 마른 번데기를 사용하였고, 모든 실험은 적어도 3회 수행되었다(표 2.1.5). 그 결과 번데기분말은 동충하초 자실체 길이 및 생산량에 가장 적합하였다. 반면 아데노신을 생산하기 위해서는 탈지분유가, cordycepin을 생산하기 위해서는 건조한 번데기가 질소원으로 가장 우수하였다. 이 또한 목적에 따라서 질소원을 선택해야 함을 암시해 준다.

표 2.1.5. Effect of nitrogen sources on the fruiting body and cordycepin production by *Cordyceps militaris* HB8

질소원	단위	자실체길이 (cm)	비건조중량 (g)	건조중량 (g)	아데노신 ( $\mu\text{g}$ )	코디세핀 ( $\mu\text{g}$ )
펩톤	15g/L	7~13	30.0	5.4	951	3,025
번데기	10g/bx	10~14	38.0	6.4	1,747	5,492
건조번데기	5g/bx	6~11	30.0	5.3	1,548	6,865
대두효소분해물	15g/L	7~11	29.7	5.4	863	3,427
이스트추출물	15g/L	6~11	23.1	4.5	1,152	3,995
계란노른자	25g/L	7~10	30.0	5.1	1,174	2,150
탈지분유	15g/L	7~13	27.2	4.6	2,598	1,974

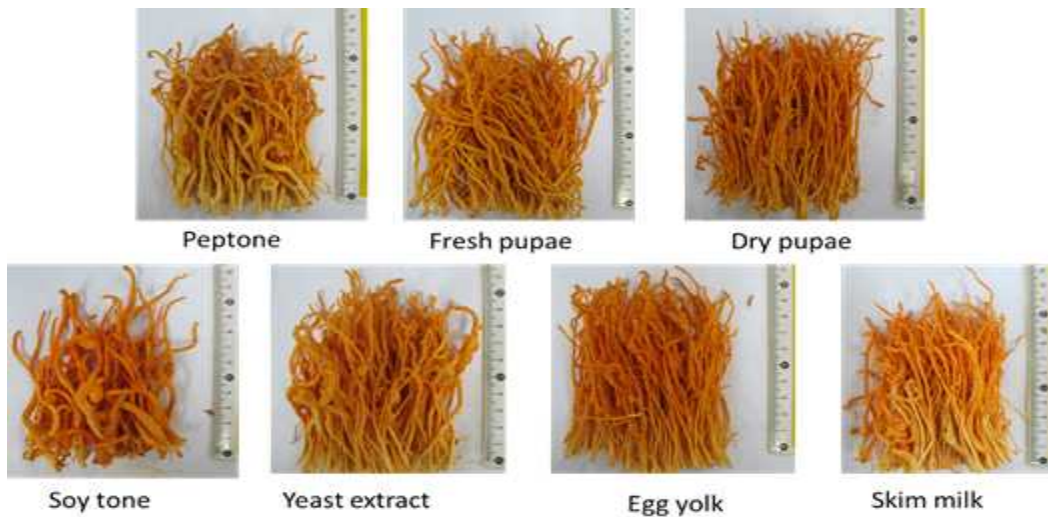


그림 2.1.5. Effect of nitrogen sources on the fruiting body and cordycepin production by *Cordyceps militaris* HB8.

(3) 탄소원(Carbon sources)의 영향

탄수화물은 배양 세포에 가장 중요한 요소 중 하나이다. 동충하초 배양에 있어서 자실체 생성, cordycepin 및 adenosine 생산에 대한 탄소원의 영향을 보기 위하여 기본 배지의 탄소원을 glucose, sucrose, lactose, maltose 및 mannose와 같은 상이한 탄소원 20g/L을 각각 첨가하여 glucose의 대체 당으로 수행하였다. 배양액의 pH는 6.0으로 조정하고, 배양조건은 기본배지 배양조건에서 동일하게 실시하였다..

그 결과 포도당 배지는 가장 높은 자실체 수율 및 자실체 길이를 보여주었다. 또한 adenosine 과 cordycepin 생성에도 상대적으로 우수하였다(표 2.1.6). 반면 젓당과 과당은 자실체나 유용 성분 생성에 적절하지 않음을 알 수 있었다. 따라서 산업적으로 동충하초 자실체, adenosine 및 cordycepin의 생산을 위해서는 탄소원으로 포도당의 사용이 바람직한 것으로 사료된다.

표 2.1.6. Effect of carbon sources on the fruiting body, adenosine and cordycepin production by *Cordyceps militaris* HB8

탄소원	단위 g/L	자실체길이 (cm)	비건조중량 (g)	건조중량 (g)	아데노신 ( $\mu$ g)	코디세핀 ( $\mu$ g)
포도당	20	7~13	32	5.5	972	3,218
설탕	20	5~11	26	4.8	820	2,103
젓당	20	4~9	18	2.5	560	2,302
과당	20	4~6	14	1.5	210	1,320
만노스	20	5~9	22	2.1	841	2,315

라. 성장호르몬(Growth factors)의 영향

식물의 성장호르몬 또한 세포의 시험관 배양에 중요한 요소 중 하나이다. 동충하초의 자실체와 유용성분 cordycepin 및 adenosine 생성에 미치는 성장인자의 영향을 관찰하기 위하여 기초배양을 준비하고, 3종의 성장인자 2,4-Chlorophenoxy acetic acid(2,4-D),  $\alpha$ -Naphthyl acetic acid (NAA), Indol-3-butylic acid(IBA)를 각 1mg/L되게 처리하고 관찰하였다.

그 결과 성장 인자들은 자실체 크기와 무게, adenosine 및 코디세핀 함량 등에 크게 영향을 주지는 않았다. 다만 NAA 처리군에서 자실체와 cordycepin 생산에서 다소 높은 값을 보여주었다(표 2.1.7).

표 2.1.7. Effect of different growth factors on fruiting body, adenosine and cordycepin production

성장요소	농도	자실체 길이 (cm)	비건조 중량 (g)	건조 중량 (g)	아데노신 ( $\mu$ g)	코디세핀 ( $\mu$ g)
대조군	0	7~13	32	5.5	972	3,218
$\alpha$ -Naphthylacetic acid (NAA)	1mg/L	7~13	35	5.7	562	3,421
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D)	1mg/L	6~11	30	5.2	891	2,936
Indole-3-butytric acid (IBA)	1mg/L	5~11	35	5.3	802	2,737

마. Adenosine deaminase(ADA) inhibitor 영향

고상배양에서 ADA 천연 억제제가 아데노신 및 코디세핀 함량에 미치는 영향을 관찰하였다. 아데노신 대사에 있어서 ADA와 이 효소 억제제의 생물학적인 역할과 작용기전에 대해서는 제3절에서 보다 자세하게 기술하고 여기서는 ADA 천연 억제제 처리가 아데노신과 코디세핀 함량에 미치는 영향을 확인한다.

(1) ADA와 ADA inhibitor 처리

ADA 억제제를 처리하면 adenosine이 inosine으로 전환되는 것을 억제하므로써 adenosine의 함량을 증가될수 있다. 또한 코디세핀이나 N6-lauroyl cordycepin, N6-octaroylcordycepin 등과 같은 코디세핀 대사물도 ADA억제 작용을 하는 것으로 알려져 있어 결과가 주목된다.

본 연구에서는 생체 내에 존재하는 억제물질이 아닌 천연 억제제를 사용함으로써 ADA 저해 작용뿐만 아니라 배지의 기질 역할도 할 수 있을 것으로 기대하면서 몇 가지 후보자원을 선발하고 실험을 수행하였다. 후보자원으로는 GT, GF, GL, TM을 선발하고 우선 GT로 실험하였다. 후보 천연자원 GT는 추출물이나 성분을 분리하지 않고, 원물을 자연 건조한 후 분쇄하여 배지와 섞어 멸균 후 사용하였다. 이는 배지의 기질로 사용될 수 있을 뿐만 아니라 대량배양 시 공정도 단순하고 적용이 용이하기 때문이다.

먼저 예비실험에서 효과가 가장 뚜렷한 한 종류의 천연물 GT를 선정하고 00%농도로 모배양 단계에서 처리하고 배양하는 동안 자실체 형성, 코디세핀과 아데노신 및 ADA 효소 활성도 변화를 측정 비교하였다. 그 결과 자실체 형성은 대조군과 같이 정상적으로 성장하였다. 배양기간 동안 시료 채취가 가능한 28일 이후부터 측정된 ADA 활성도는 대조군에 비해 ADA 억제제 처리군에서 전반적으로 낮았다(표 2.1.8).

또한 성분 변화의 측정이 가능할 정도로 자실체가 성장된 40일부터 아데노신과 코디세핀의 함량을 정량 비교하였다.

아데노신 함량은 ADA 처리후 40일에는 대조군에 비해 약 60% 이상 증가되었고, 코디세핀도 20% 이상 증가되었다. 그러나 그 이후로는 아데노신 함량은 큰 변화가 없었다. 그러나 코디세핀은 수확시기 까지 계속 증가되었으며 증가폭도 약 20% 수준으로 ADA 억제제를 처리하지 않은 대조군에 비해 높았다.

이 결과는 ADA 천연 저해제 처리는 유용성분의 함량을 증가시킬 수 있는 재배방법이 될 수 있음을 암시해 준다. 그러나 아데노신의 증가를 위해서는 ADA 억제제를 처리하는 시간이 매우 중요하며 자실체가 생성되기 시작하는 단계에 처리하는 것이 더 효과적일 것으로 사료된다.

표 2.1.8. 동충하초 고상배양에서 ADA 활성도에 미치는 영향

구분	배양기간(day) Activity(Arbitrary units, Absorbance change)					
	28일	40일	45일	50일	55일	60일
대조군	0.052±0.008	0.051±0.008	0.094±0.005	0.124±0.005	0.251±0.011	0.287±0.012
GT	0.041±0.002	0.048±0.002	0.125±0.006	0.179±0.002	0.145±0.002	0.143±0.013

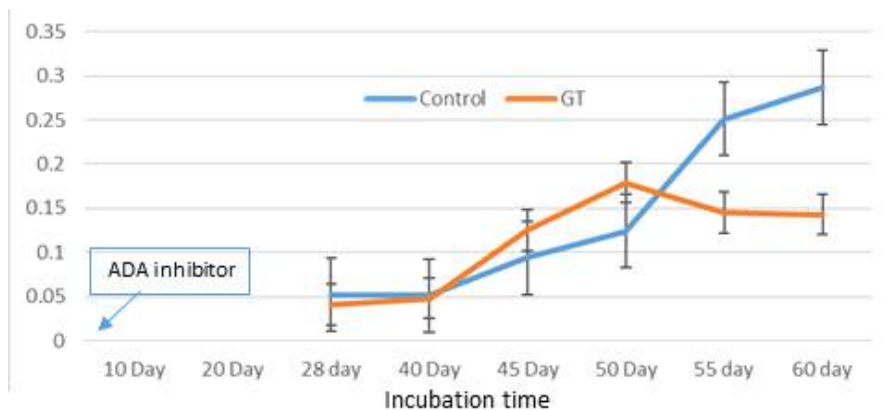


그림 2.1.6. 동충하초 고상배양에서 ADA 활성도에 미치는 영향.



표 2.1.9. 동충하초 고상배양에서 ADA 천연 저해제가 아데노신 생성에 미치는 영향

구분	배양기간(day) / 아데노신함량( $\mu\text{g/g}$ )				
	40일	45일	50일	55일	60일
대조군	786 $\pm$ 27	1,028 $\pm$ 28	1085 $\pm$ 44	1014 $\pm$ 11	1138 $\pm$ 21
GT	1,273 $\pm$ 11	982 $\pm$ 36	1104 $\pm$ 34	1073 $\pm$ 9	1029 $\pm$ 24
증가율(%)	62% $\uparrow$	-	-	-	-

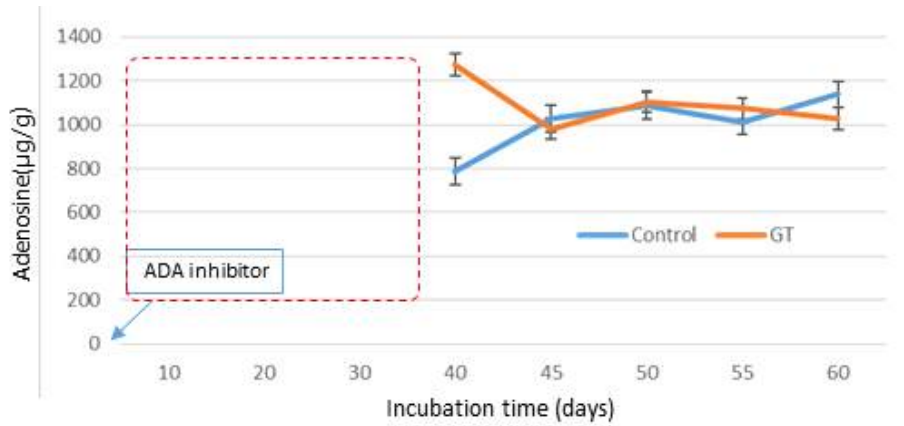


그림 2.1.7. 동충하초 고상배양에서 ADA 천연 저해제가 아데노신 생성에 미치는 영향.

표 2.1.10. 동충하초 고상배양에서 ADA 천연 저해제가 코디세핀 생성에 미치는 영향

구분	배양기간(day) / 코디세핀( $\mu\text{g/g}$ )				
	40일	45일	50일	55일	60일
대조군	2771 $\pm$ 77	3984 $\pm$ 38	4779 $\pm$ 69	5507 $\pm$ 45	7013 $\pm$ 123
GT	3402 $\pm$ 26	3897 $\pm$ 41	5529 $\pm$ 271	6642 $\pm$ 16	8662 $\pm$ 99
증가율(%)	23% $\uparrow$	-	16% $\uparrow$	21% $\uparrow$	24% $\uparrow$

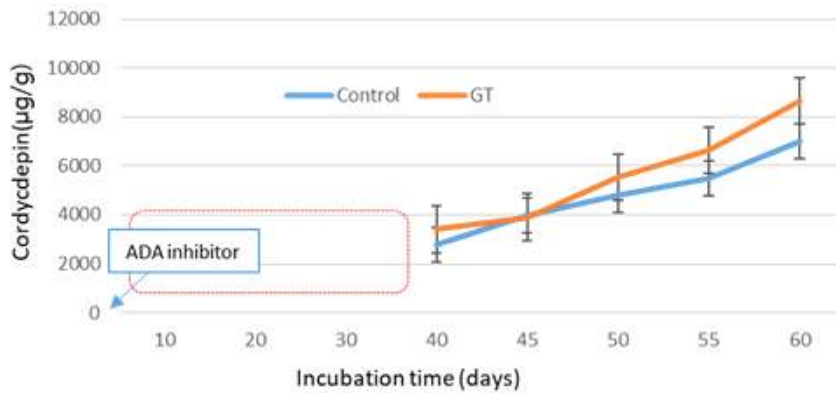


그림 2.1.8. 동충하초 고상배양에서 ADA 천연 저해제가 코디세핀 생성에 미치는 영향.

바. 단세포교배에 의한 방법(Mating of single ascospore of *Cordyceps militaris* HB8)

*Cordyceps militaris*의 인공재배가 가능해 지면서 한국을 비롯하여 중국, 베트남 등에서 대량생산 및 산업화가 이루어지고 있다. 그러나 동충하초의 대량생산을 위해 균주를 계대배양하는 과정에서 세대가 지날수록 자실체 형성이 불안정함은 물론 원래의 특성을 잃어가는 현상이 나타나고 있다. 즉 계대배양 세대가 지나갈수록 자실체가 거의 생성 되지 않거나 전혀 형성되지 않는 경우도 있고, 코디세핀 등 유용성분의 함량도 잘 유지되지 않는 등 품질이 균일한 자실체를 생산하는데 어려움이 많다.

따라서 분리한 균주의 세대에 따른 퇴화현상은 동충하초 산업화에 있어서 해결해야 할 매우 중요한 장애요소의 하나이며, 이를 해결하기 위한 연구가 시도된바 있지만 여전히 미진한 상태이다(Sato and Shimazu, 2002; Shrestha *et al.*, 2004; Yokoyama *et al.*, 2005).

본 연구에서는 자낭포자의 교배시스템(ascospore mating system)에 초점을 두고 분생포자형성관찰과 PCR을 통해 분석하고, 자실체 생성과 코디세핀, 아데노신과 같은 2차 대사산물의 생성이 우수한 균주의 유전적 변이의 영향을 조사하였다.

#### (1) 실험방법

##### (가) 단일포자 분리(Isolation of Single spore)

단일자낭포자는 2020년 오대산에서 채집한 3종의 균주로부터 포자 drop/shooting 으로 분리하였다(Choi *et al.*, 1999). 분리한 단일 자낭포자는 23°C, PDA plate상에서 배양하였다. 단일포자가 고유의 형태를 가졌는지 확인하기 위하여 MAT1-1 primer (MAT1-1 F: CATTTCAGAAGTGAGTGCA; MAT 1-1 R: ATATACCTTCGCGATCAT) 및 MAT1-2 primer (MAT1-2 F: CGACATACGCTTGTC AAG; MAT1-2 R: GATGCCGTTCGAGGAGAG)을 사용하여 Mat-PCR을 수행하였다. PCR은 1µl DNA, 1µl reverse primer 1 (5 µM), 1µl forward primer 2 (5 µM), 7 µl 2x premix, 5µl H<sub>2</sub>O를 포함한 15µl 반응액에서 수행되었으며, MAT1-1의 경우, 95°C 에서 3분, 이어서 30 cycles of 95°C 30 cycle에서 30초, 50.5°C에서 30초, 72°C에서 60초 그리고 마지막으로 72°C에서 5분간 수행되었다. MAT1-2의 경우는 95°C에서 3분, 이어서 95°C, 30 cycle에서 30초, 55.5°C에서 30초, 72°C에서 60초 마지막으로 72°C에서 10분간 수행되었다.

##### (나) 교배와 기질도입(Matting system and stroma introduction)

기질의 생성은 14종의 모균으로부터 현미배지에서 유도하였다. 접종물은 100ml의 PDB 배양액 (10g/L peptone, 1g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 1g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50mg/L Vitamin B1)이 들어있는 250ml 삼각플라스크에서 다양한 포자 혼합물을 접종하여 준비되었다. 접종된 배양액은 25°C, 120rpm으로 5일 동안 배양하였다. 현미배지는 30g의 현미와 45ml의 액상배지(20 g glucose, 10 g peptone, 1 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50mg/L Vitamin B1 and distilled water to 1 L)를 혼합하여 버섯배양병에 넣었다. 이 배양병은 121°C에서 15분간 멸균하고 식힌 후 10ml의 포자 혼합물을 접종하였다.

(다) 교배실험(Matting experiment)

교배실험은 MAT1-1 6종과 MAT1-2 8종을 이용하여 수행하였다(표 2.1.11). 표에서 와 같이 각 MAT 유전자의 싱글 자낭포자는 *Cordyceps militaris* (one single ascospore strain for MAT 1-1 and one single ascospore strain for MAT 1-2)의 교배를 위해 선발되었고, 10%웹톤-이스트추출물 함유 PDA배지 plate의 서로 반대쪽에 접종하였다. 접종된 plate는 23°C에서 14일간 배양하였다. 그 후 경계선 부분을 잘라서 새로운 PDA plate에 옮겼으며, 이 균사체를 5일간 배양하고 F1 균주를 얻었으며, 양쪽 단일 자낭포자의 교배에 성공한 분생포자를 F1 균주로 표기하였다.

표 2.1.11. 교배실험 디자인

MAT1-2 MAT1-1	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8
B1	o	o	o	o	o	o	o	o
B2	o	o	o	o	o	o	o	o
B3	o	o	o	o	o	o	o	o
B4	o	o	o	o	o	o	o	o
B5	o	o	o	o	o	o	o	o
B6	o	o	o	o	o	o	o	o

그 결과 단일포자 분리방법에 따라 분리한 각 단일포자 MAT1-1 6종과 MAT1-2 8종의 유전자를 PCR을 통해 확인한 결과는 아래와 같다(그림 2.1.9). 사진에서와 같이 MAT1-1 및 MAT1-2 유전자의 존재가 확인되었다.

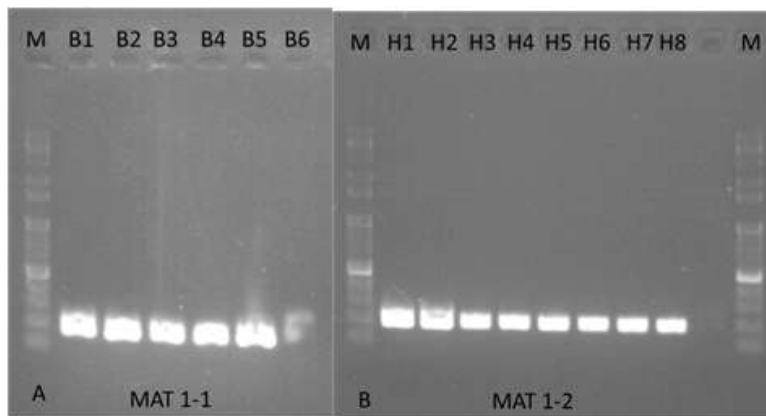


그림 2.1.9. MAT-PCR을 통한 균사체로부터 유도된 단일포자의 MAT 유전자 동정. A, MAT1-1 gene; B, MAT1-2 gene.

그림 2.1.10은 자낭포자의 교배는 양쪽의 단일 자낭포자의 상호교잡에 의해 이루어졌음을 보여준다.

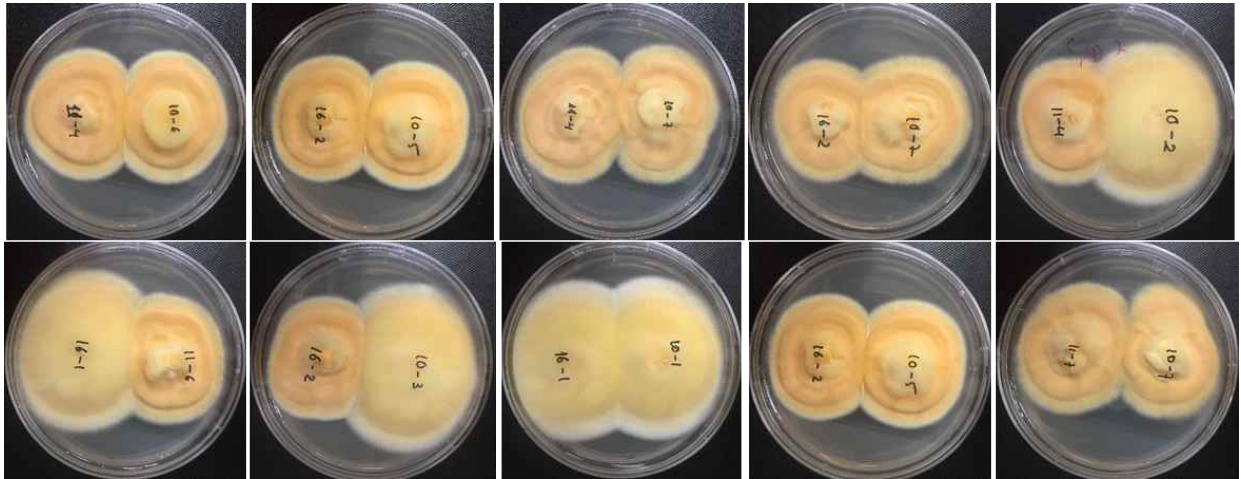


그림 2.1.10. 두 개의 단일 자낭포자 사이의 접선에서 신생 포자의 형성 시작.

아래 사진은 두 개의 단일 자낭포자 사이의 교잡성공에 의해 생성된 분생포자를 이용하여 고상배양에서 배양 후 수확된 자실체를 보여준다(그림 2.1.11). 이 결과로부터 자실체의 형성이 충실한 B1xH3, B3xH7 및 B4H2를 선발하고 이 자실체로부터 MAT1-1과 MAT1-2 유전자를 확인하였으며 그 결과는 그림 2.1.12와 같다.



그림 2.1.11. *Cordyceps militaris* 단일 자낭포자의 교잡에 의한 분생포자의 생성.

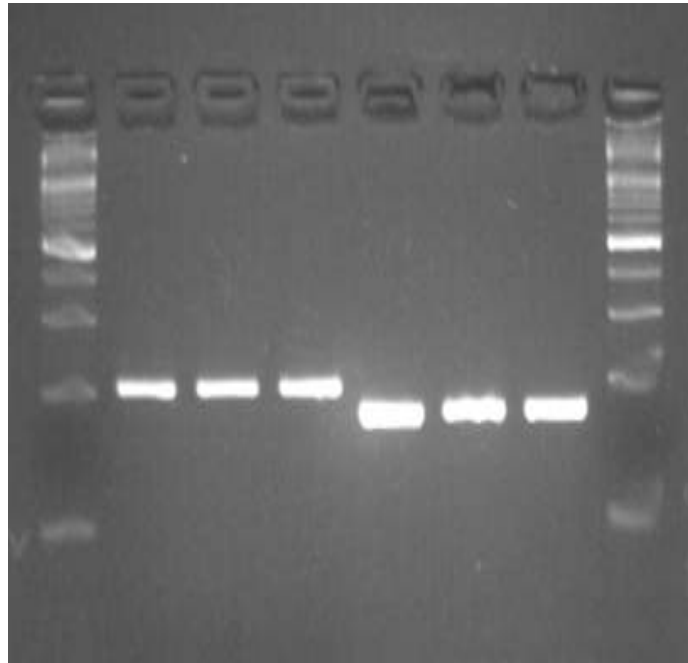


그림 2.1.12. MAT-PCR에 의한 F1 자실체로부터 MAT1-1 및 MAT1-2 유전자 동정.

이 연구에서 *Cordyceps militaris*의 단일 자낭세포의 교잡에 의한 분생세포의 형성을 확인하였고, 그 중 자실체의 형성이 우수한 균종을 선발할 수 있었으며 이의 유전적 특성도 발현됨을 확인하였다. 이 우수 균주를 배양, stock하여 활용함으로써 계대배양에서 나타나는 자실체의 퇴화 현상이나 유용성분 함량 감소 등을 개선할 수 있을 것으로 사료된다.

사. 목적별 최적 배양 조건 요약

이상의 결과들을 종합해 보면 배지조성 등 배양조건에 따라서 코디세핀 및 아데노신 생성량이 다르게 나타났다. 즉 어떤 경우는 자실체 성장이 충실하고, 어떤 경우는 코디세핀이, 어떤 경우는 아데노신의 함량이 특별히 증가되는 반면 아데노신과 코디세핀을 동시에 증가시킬 수 있는 경우는 없었다. 따라서 그 목적에 따라서 배양 조건을 정리해 보면 표 2.1.12에서와 같다.

이를 토대로 본 유용성분 고함유 동충하초의 산업적 활용도 및 제품화의 목적에 맞는 적절한 배양환경을 구축하여 최적의 배양시스템을 활용한다면 본 기술의 활용도는 높은 산업적 우수성을 보일 수 있을 것으로 사료된다.

표 2.1.12. 목적별 최적 조건 요약

	Components/Conditions	For Fruit body	For Cordycepin	For Adenosine
Media	Substrates (g)	R:O=15:15	O=30	R:O:B:M=10:10:5:5
	Carbon sources (g/L)	Glucose 20	Glucose 20	Glucose 20
	Nitrogen sources (g/L)	Fresh pupae 10	Dry pupae 5	Skim milk 15
	Growth factors (mg/mL)	NAA 1.0	NE	NE
	Peptone (g/L) : Replaceable	10	10	10
	pH	5.6~7.0(6.0)	5.6~7.0(6.0)	5.6~7.0(6.0)
Ions	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (g/L)	1.0	1.0	1.0
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/L)	1.0	1.0	1.0
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	1.0	1.0	1.0
Growth factors	NAA (mg/L)	1.0	1.0	1.0
Elicitors	Jasmonic acid etc	NE	NE	NE
ADA Inhibitor	Natural compound inhibitors	NE	~2.0%	~2.0%
Environments	Light (lux)	400~700	400~700	- 100 < 400~700
	Light/Dark, hrs	14/10	14/10	14/10
	Temperature (°C)	21~23°C(23)	21~23°C(23)	21~23°C(23)
	Relative Humidity (%)	70~80	70~80	70~80
	Air circulation, times/day	3~4	3~4	3~4
	Others			

### 3. 대량생산시스템 정립

#### 가. 대량생산시설 기본설계

동중하초 대량생산을 위한 배양실은 생산 예정량에 또는 가용면적에 따라 가변적으로 활용할 수 있는 소형, 중형 및 대형으로 구분 설계를 검토하였다.

##### (1) 소형배양실

이 모델은 소형 컨테이너 크기로 가정용 또는 적은 공간에서 집약적으로 활용할 수 있는 모델이다(그림 2.1.13). 소형 집종실을 두고, 배양은 양쪽 2열 3단으로 설치하고 각 단에 16개의 배양병이 들어가므로 박스를 4개가 들어가는 구조이다. 이 경우 1단에 256개병, 전체 786병의 배양할 수 있다. 따라서 한 개의 병에 약 4g의 건조 자실체를 생산할 수 있기 때문에 1회 배양으로 건조 자실체 3,144g (약 3.1kg)의 생산이 가능하다. 1년 6회 반복 생산할 수 있으므로 1년에 약 18.6kg을 건조 자실체를 생산할 수 있다.

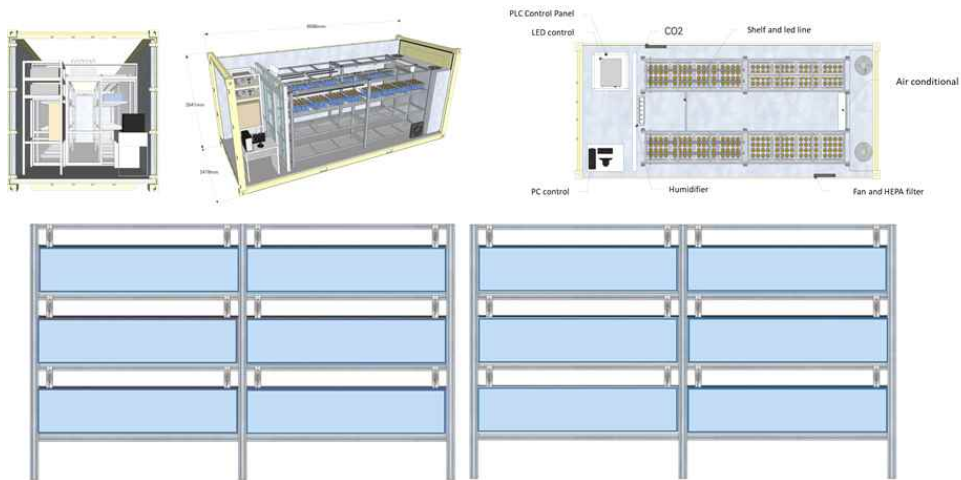


그림 2.1.13. 소형 배양실 모델.

(2) 중형배양실

중형배양실 모델은 배양실의 기본 규모는 준비실을 포함하여 전체 크기가 208m<sup>2</sup>(53평)이고 자실체 배양을 위한 공간은 96m<sup>2</sup>(약 30평)이며 1실당 6개의 선반을 설치한다(그림 2.1.14). 이 경우 한 개의 선반에 3,680개의 배양 병을 둘 수 있으며 1실에는 총 22,080개의 병을 배양할 수 있다. 한 병의 자실체 건조중량의 무게를 약 4g으로 계산하면 1회(2개월), 1실에서 약 88kg의 자실체를 수확할 수 있다. 이 경우는 자체 멸균, 배양, 접종, 건조 등의 부대시설 설치가 가능한 공간이다.

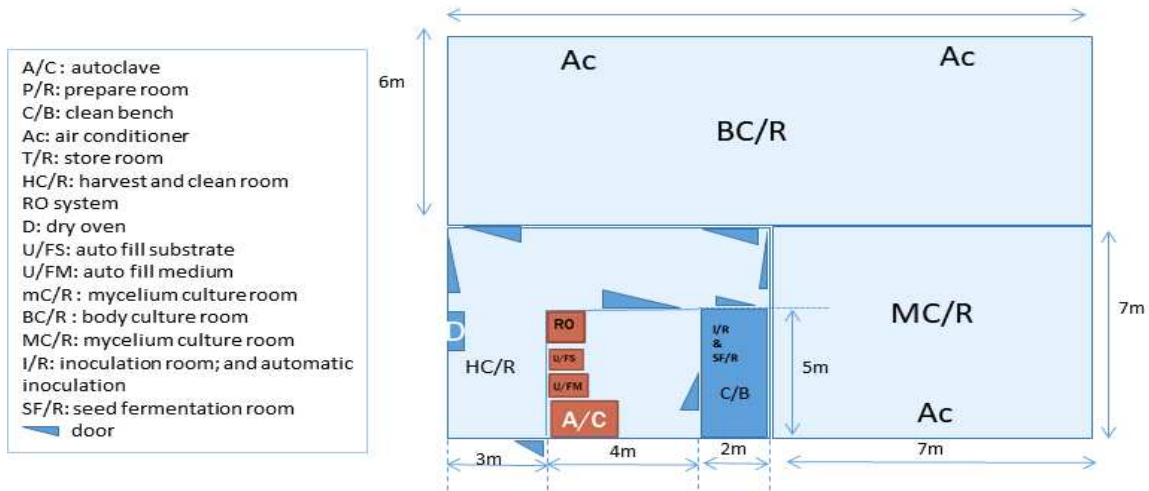


그림 2.1.14. 중형 배양실 53평 기본 unit.



### (3) 대형배양실

이 모델은 1,008m<sup>2</sup> (약 300평) 규모의 대형모델이다(그림 2.1.15). 한 개의 방은 8X11m (약 27평) 기본 unit를 기반으로 확장한 형태로 6개의 자실체 배양실을 운영할 수 있다. 한 개의 방에 6개 선반을 설치하며 한 단에 44개의 tray 들 수 있다. 따라서 44개 tray x 5단이므로 총 220개 tray, 각 tray에 16개의 배양병이 들어가므로 선반 하나에 총 3,520개 배양이 가능하다. 따라서 한 개의 방에는 3,520개 x 6개 선반으로 한방에 21,120개 병을 배양할 수 있으며 자실체 건조중량 4g을 계산하면 방 하나에 84.4kg, 년 6회 배양하면 506.88kg, 6개의 방에서 3041.28kg 이 생산되어 이 모델에서 년 3톤의 건조 자실체를 생산할 수 있다.

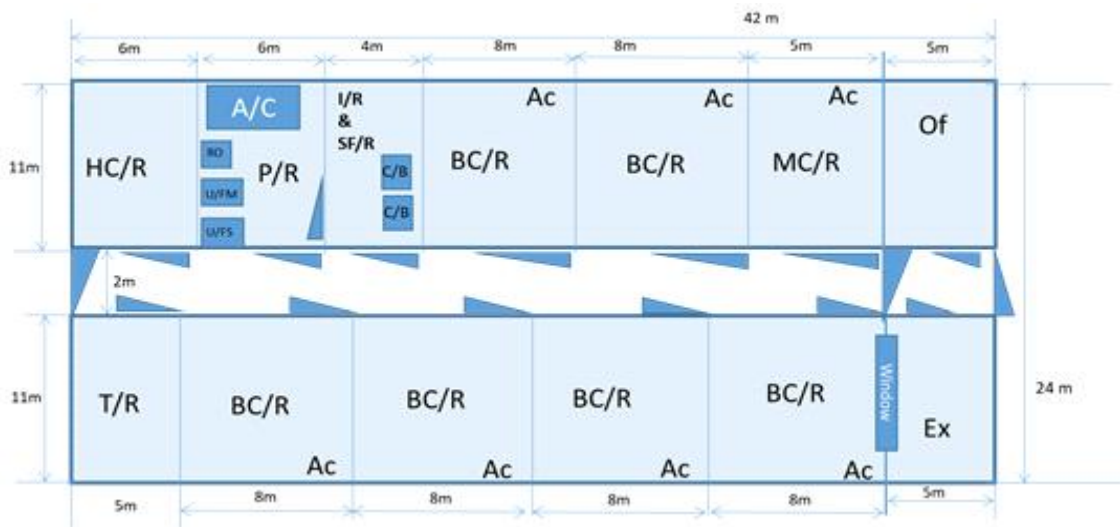


그림 2.1.15. 배양실 1,000m<sup>2</sup> (약 300평)기준.

(4) 부대장비

아래 그림은 동충하초 배양실 운영 시 기본적으로 소요되는 시설과 장비들이다. 필수적으로 필요한 장비는 대형멸균기, clean Banch, 선반, 받드, 배양병, 선반 등이다.

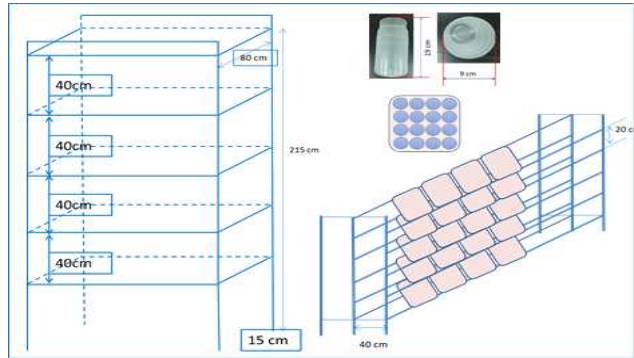


그림 2.1.16. 배양 선반.



그림 2.1.17. 대량배양을 위한 소요 장비.



그림 2.1.18. 대량배양 시설에서의 동충하초 배양.

### (5) 반자동화 시스템

대량생산시스템에서 오염방지와 인건비 절감을 위해 가능한 부분에 대한 자동화시스템을 개발하였다. 첫째는 기질을 주입하는 과정으로 40g의 고형 substrate를 자동으로 배양병에 주입한다. 이때 16개의 배양병이 들어있는 tray가 일정시간에 자동으로 이동하며 주입된다. 두 번째 단계는 배양액(media)을 주입하는 단계로서 같은 프로세스로 이루어진다. 이어서 대형 멸균기로 이동되며, 멸균이 끝나면 바로 clean room을 이동 종균을 자동으로 접종한 후 culture room을 이동 배양이 시작된다(그림 2.1.19)

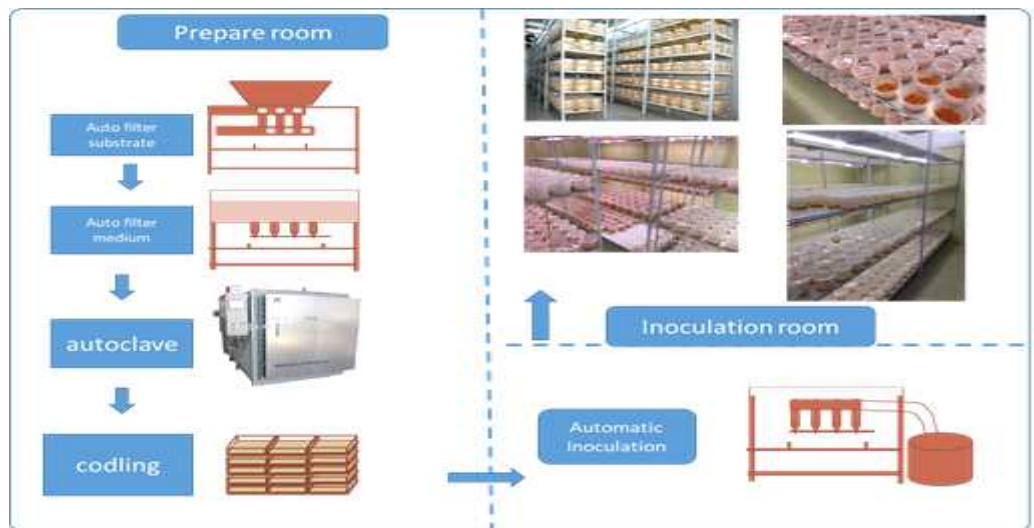


그림 2.1.19. 반자동화 대량생산 시스템.

#### 나. 오염(contamination) 관리

동충하초 재배는 두 가지 측면에서 오염방지가 매우 중요하다. 첫째는 균주가 번데기 내에서 성장하기 때문에 기주로부터 오염원이 함께할 가능성이 매우 높다. 둘째는 인공 배양시 배지를 구성하는 다양한 영양제로부터 오염될 가능성이 큰 뿐만 아니라 배양기간이 길어서 환경으로부터 오는 오염원을 방지해야하는 어려움이 있다.

2017년 한국소비자원은 시중에서 판매되는 동충하초 제품 18개를 대상으로 식중독균·중금속 검출 여부를 조사한 결과 3개 제품에서 기준치를 넘는 식중독균이 검출됐었고 12개 제품에서는 중금속이 나왔다고 보고한 바 있다. 이들 제품의 대부분은 누에를 이용한 눈꽃동충하초 제품이라는 하지만 대체로 5-10%가 오염되는 것으로 추정된다. 한 대학에서 22개 재배농가를 대상으로부터 수집한 누에동충하초에서 조사한 바에 의하면 수집 균은 두 가지 유형으로 구분되며 생육장애에 의한 기형 균은 23.2%, 오염균은 50.9%였다고 한다(Nam, 2002).

비슷한 시기에 중국에서도 동충하초 제품에 대한 오염문제가 사회적 이슈로 대두된 적이 있었다. 중국의 경우는 배지의 멸균을 우리나라에서와는 달리 95℃에서 실시하는 것으로 알려져 있다. 이 경우 영양소 소실은 다소 줄일 수 있을지 몰라도 오염에는 취약할 수밖에 없다.

본 연구에서는 동충하초 배지 조제 후 121℃ 멸균과정을 거쳐서 모든 작업이 클린룸에서 실시하기 때문에 현재까지는 오염으로 인한 문제는 발생되지 않았다. 그럼에도 불구하고 오염이 생겼을 경우 무작위로 sampling하여 R-PCR과 SNP를 이용한 오염균을 확인하려고 한다.

#### 다. 동충하초 수확 및 저장

배양된 동충하초는 55~60일 후 자실체의 길이 7~10cm때 균사체로부터 자실체를 분리하여 수확한다. 이때 자실체와 균사체 부분의 분리는 반자동 cutter를 이용하여 분리하고 자실체부분을 조심스럽게 tray에 올려놓는다. 수확된 자실체는 tray에 담은 채로 40℃ 건조기에서 수분이 12~14% 정도로 유지될 때 까지 건조하고 10kg으로 포장하여 냉장실 암소에서 보관한다. 또한 분말원료는 건조 후 바로 80~100mesh로 분쇄하여 10kg포장 단위로 만든 후 냉장실 암소에서 보관한다.



그림 2.1.20. 동충하초의 수확

## 제 2절 동충하초 추출물 함유 복합기능 건강식품 개발

### 1. 제품개발 개요

동충하초는 인공재배가 가능하게 되고 효능에 대한 많은 연구가 이루어졌음에도 불구하고 건강식품, 화장품 또는 의약품 중 그 어느 하나로도 산업화가 활성화되지 않는 이유가 무엇일까? 가능한 이유 중의 하나는 소비자들에게 이 자원의 positioning이 명확히 되지 못한 것으로 보인다. 즉, 의약품인지 식품인지 그 영역이 불분명할 뿐만 아니라 실제로 판매되고 있는 제품도 식품인지 의약품인지 모호한 경우가 많다. 제품의 홍보에 있어서도 소재가 가진 기능성보다는 벌레(worm)가 먼저 연상되는 “동충하초 ooo”로 강조되고 있는 것이 그 예이다.

표 2.2.1. 시판 중인 동충하초 제품(2019년)

구분	제품명	제조원	식품유형
분말	동충하초, 동충하초분말, 동충하초분말, 성재모동충하초비로, 제주로얄동충하초	(주)제주사랑농수산, 인그린(주), 맑은들(주), 황성인삼영농조합(주)제주로얄식품	기타가공품, 기타가공식품
진액	광동숫눈애동충하초진액, 국민액기스, 금룡밀리타리스동충하초추출액, 다옴눈애동충하초, 본초위동충하초발효, 현미동충하초액기스	광동제약(주), (주)유충형약용버섯, 동이바이오영농조합, (주)다옴, (주)청호네추럴, 엄지식품	추출가공식품, 액상차, 다류액상차
환	눈애동충하초환골드, 눈꽃동충하초환, 동충일기, 동충하초버섯환, 파워킹, 홍삼동충하초환, 홍삼동충하초헛개환	서초원, 정인, 동아제약(주), 포항바이오파크, (주)굿시드, (주)홍자은, (주)경주생약식품사업부	기타가공품, 동충하초주정추출물제품, 기타가공품

현재까지의 연구 결과를 종합해보면 동충하초는 면역 증강 및 피부건강 복합기능 건강식품(Inner Beauty Food)의 최상의 조건을 가진 소재로 사료된다. 그 이유는 천연물이지만 인삼처럼 복잡한 성분에 기인되지 않고 생리활성이 명확히 밝혀진 코디세핀과 아데노신이 단일성분으로 각각 고유기능성을 발현하고 있기 때문이다. 물론 코디세핀 유도체나, 비타민, 다당체 등 다른 성분들에 의한 효능이나 그들과의 시너지 효과를 전혀 배제할 수는 없지만 적어도 다른 천연자원과 비교했을 때 성분측면에서 다른 면이 분명히 있다. 이 연구에서는 동충하초의 이러한 장점들을 활용하여 개념이 다른 복합기능 건강식품을 개발하고 향후 개별인증형 건강식품원료 등록을 추진하여 고부가가치식품으로 발전시키고자 한다.

최근 건강기능식품은 소비트렌드가 크게 변화되고 있다. 그 중 대표적인 변화는 첫째 외모지상주의를 추구하는 청소년과 여성 소비자의 증가, 다이어트에서 몸매 가꾸기로, 인터넷 구매 증가, 그리고 먹는 화장품 불리우는 Inner beauty 증가이다. Inner Beauty는 내면을 뜻하는 ‘이너(inner)’와 아름다움을 뜻하는 ‘뷰티(beauty)’의 합성어로 말 그대로 속에서부터 건강을 가꿔 아름다움을 찾자는, 즉, “건강한 아름다움” 의미이다. 화장품업체가 강조하는 ‘먹는 화장품’은 제품컨셉트를 강조하기 위한 비유적 표현일 뿐 피부건강제품이라도 먹는 것이라면 식품이며 식품의약품안전처가 인정한 기능성 원료를 사용했다면 당연히 ‘건강기능식품’에 해당된다. C사, A사, H사 등 국내 굴지의 식품, 화장품 기업들이 뛰어들어 수십 종의 제품을 출시한 국내 이너뷰티 관련 시장규모가 최근 5년 동안 연평균 68.2%의 급격한 성장세를 보이고 있다. 또한 2011년 500억원 수준이던 시장이 2017년 5,300억원 대로 크게 증가되었으며, 소비자들의 인식 또한 매우 긍정적이다(한국식품연구원, 2018, 그림 2.2.1)

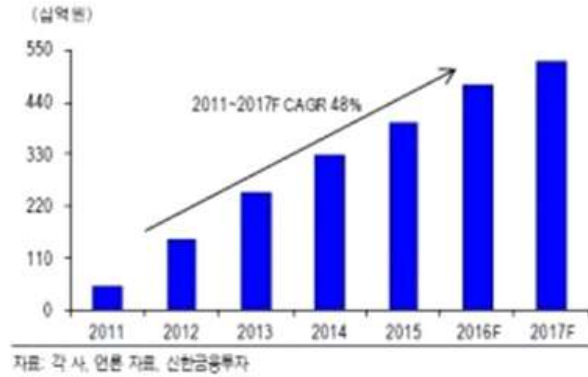


그림 2.2.1. 국내 inner beauty 시장 추이.

국내 A사는 이너뷰티 브랜드 ‘VB’는 2000년대 초에 출시 한 이후 지속적인 성장세를 유지하고 있으며 최근까지 꾸준히 성장되고 있으며, 후속 제품인 ‘자오비오’는 갱년기 현상을 개선하는 여성 갱년기 특화 애플이다. 이들은 홍삼을 주원료로 함유하고 있어 갱년기 및 중년 여성의 생기 및 활력 개선, 면역력 증진 및 항산화에 도움을 준다.

특히 피부 전문 건강기능식품 브랜드 B 사의 C00는 피부의 입체적 구조에서 착안하여 화장품 사용과 함께 섭취 시 더 큰 시너지 효과를 낼 수 있는 먹는 화장품 컨셉의 제품이다. 이 제품은 하루 한 번 물 없이 간편하게 씹어 먹을 수 있는 알약으로, 바르는 제품만으론 유효 성분이 진피까지 침투되기 어려운 단점을 보완, 소비자들을 공략하고 있다. 이 제품은 식약처에서 인정받은 기능성 히알루론산 120mg과 콜라겐, 엘라스틴 등을 함유해 피부에 수분을 보충해 준다.

이 외에도 L사 등은 간 건강, 눈 건강, 관절건강, 체지방 개선, 자외선으로부터 피부 보호 등 특정 기능성 강화 제품을 출시되어 이 분야의 시장을 리드하고 있다. 특히 홍삼, 녹용제품, 다이어트제품에서 어린이 영양제품까지 다양한 연령대로 전주기 제품으로 제품을 구성 하여 시장 확대에 주력하고 있다. 식이섬유나 프로바이오틱스로 장건강을 통한 다이어트 또는 체지방 조절용 제품도 대표적인 inner beauty 제품으로 꼽히고 있다. (그림 00)

먹는 화장품(Inner Beauty)에 대한 소비자의 인식을 조사한 결과 매우 고무적이다. 표에서와 같이 먹는 화장품에 대한 막연한 생각을 넘어 제품에 대한 신뢰도와 인지도가 매우 높음을 알 수 있다. 즉, 최근 소비자들은 피부 관리에 있어 바르는 화장품은 기본이고, 식습관과 영양 보충까지 영역을 넓혀 속부터 체계적으로 관리해야 한다는 인식이 확산되고 있다. 따라서 성장하고 있는 먹는 화장품 시장 선점을 위한 경쟁은 더욱 치열하게 전개될 것으로 전망된다.



그림 2.2.2. 시판 중인 Inner Beauty제품 및 먹는 화장품에 대한 소비자 인식 조사 결과.

## 2. 동충하초 자실체 원료 표준화

### 가. 동충하초(*Cordyceps militaris*) 원료 표준화

이 연구에서 도출한 동충하초 결과물을 제품화 및 향후 건강기능식품 등록을 위하여 원료에 대한 표준화를 실시하였다. 즉, 1) 동충하초 자실체 분말 (CM powder), 2) 자실체 추출농축물(Cmex) 및 추출물 분말 (Cmex P)에 대한 표준화이다.

#### (1) 지표성분 선정

식품원료로 등재된 동충하초는 큰번데기동충하초, 또는 번데기동충하초, 밀리타리스 동충하초, 홍초라고 불리우는 *cordyceps militaris*와 눈꽃동충하초 (*Cordyceps takaomontana*) 두 종이다. 이중 큰번데기동충하초는 인체 유용 성분인 코디세핀과 아데노신의 함량이 상대적으로 높고 면역증강, 지구력증강, 항암, 주름개선 등 다양한 생리활성이 밝혀졌고 식품, 화장품분야에 유용한 원료로 사용되고 있음을 이미 밝힌 바 있다.

그러나 동충하초 원료를 표준화 함에 있어서는 코디세핀을 지표성분으로 하는 것이 바람직하다. 그 이유는 아데노신보다 코디세핀의 농도가 적게는 3배에서 많게는 7-8배 높기 때문이다.

이 두 성분은 구조적으로는 OH기 하나가 있고 없는 차이지만 물에 대한 용해도가 전혀 다르다. 즉, 코디세핀은 에탄올 등 유기용매에 잘 녹지만 아데노신은 유기용매 보다는 물에 더 잘 녹는다. 따라서 식품에서 흔히 사용하는 주정의 농도에 따라 측정값이 달라질 수 있고, 코디세핀의 아데노신 대사과정 중의 한 물질이기 때문에 아데노신과 동시에 증가되거나 감소되지 않고 그 함량의 비가 유동적이다. 따라서 동충하초의 원료 표준화를 위해서 생리활성 더 다양한 코디세핀을 지표성분으로 선정하고 원료 표준화를 시행하였다.

#### (2) 동충하초균 선정

이 사업에 사용된 균주는 본 연구팀이 오대산에서 채집, 분리한 균으로 유전분석을 통해 NCBI Assession number는 MT835161을 획득하고 *Cordyceps militaris* HB8로 명명한 큰번데기 동충하초이다. 이 균은 코디세핀 함량이 기존의 균주 보다 높은 특징이 있다. 그러나 종균은 이 균으로 국한되지는 않고 코디세핀의 함량이 높은 다른 균주의 사용도 가능하다.

#### (3) 배양방법

종균 및 자실체 배양은 다음과 같다. *Cordyceps militaris* HB8 종균배양은 PDA 배지에서 10일 동안 성장한 다음 모 배양에 사용되었다. 모 배양 배지는 L당 펙톤 10g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5g, 포도당 20g,  $\text{MgSO}_4$  1g, 비타민 B1 0.05g로 구성되었다. 배양된 균사체를 멸균된 원통형 절단기로 약 1cm의 PDA 플레이트 배양물을 10 편칭하여 모 배양 배지로 옮겼다. 시드 배양은 500mL의 액상배양액을 함유하는 1000ml 플라스크에서 성장시키고, 암 조건에서 5일 동안 회전 진탕(110rpm)하며 23°C에서 배양하였다.

자실체 수확을 위한 기본배지 및 배양조건은 다음과 같다. 즉, 기본배지는 L당 효모 추출물 2g, 펙톤 8g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5g, 포도당 20g,  $\text{MgSO}_4$  1g으로 구성되었다. 다음 각 고체 기질 30g을 배양 병에 별도로 부어 넣고 45mL의 영양분을 배양 병에 첨가한 다음 121°C에서 20분 동안 멸균하였다.

각 실험은 3회 수행되었으며, 배양 병을 어두운 배양실로 옮긴 다음 3일 동안 배양하고 다시 400~700럭스의 광도에 노출시키면서 60일 동안 배양하였다. 빛의 상태는 명 14시간, 암 10시간으로 하였다.

(4) 자실체 수확

동충하초를 식품원료로 사용하기 위해서는 재배 착수 8주 후에 수확한 자실체를 사용한다. 수확한 자실체는 40℃ 열풍 건조기에서 12~13%의 수분이 유지될 때까지 건조하고 이를 분쇄하여 시료로 사용한다. 동충하초는 배양 55일 후에 자실체 수확량이 가장 많다. 코디세핀의 함량은 퇴화될 때까지 계속 조금 씩 증가한다. 그러나 수확하는 시기는 자실체 육질이 부러지지 않고 작업성이 좋으며 유용성분의 함량도 높게 유지되는 50일에서 60일 정도 배양 후에 하는 것이 바람직하다(그림 2.2.3).

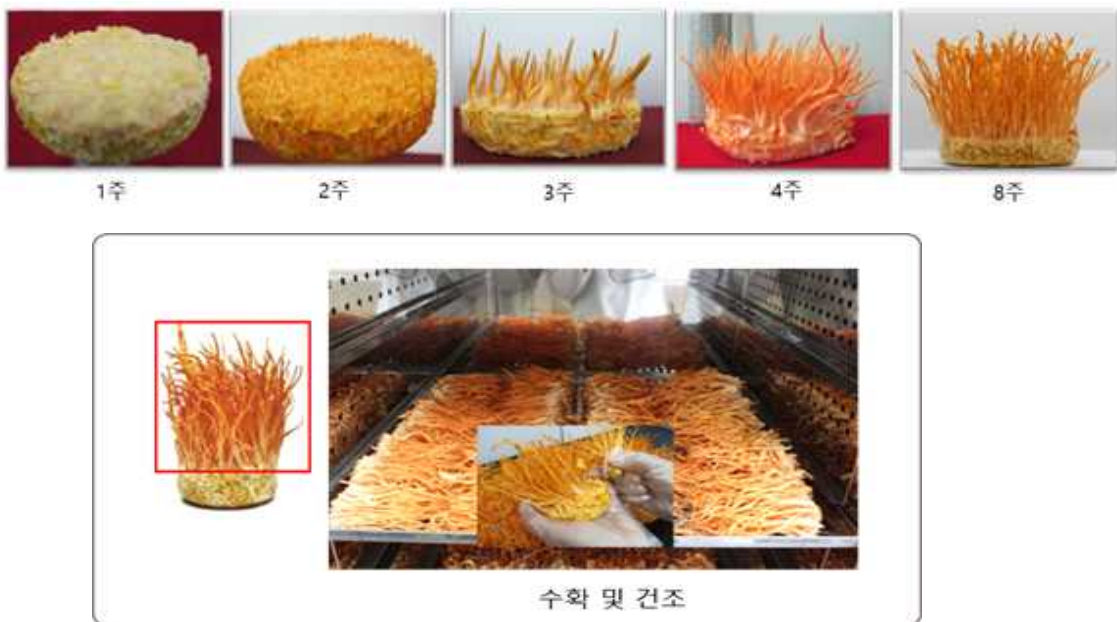




그림 2.2.3. 동충하초 배양 기간별 성장

표 2.2.2. 동충하초 성장 단계별 자실체 및 지표물질 함량 변화

구분		배양시간		
		40일	55일	70일
자실체 무게 (g/bottle)	Fresh	32.1±1.2	37.8±1.04	37.1±0.76
	Dried	4.8±0.18	5.7±0.15	5.5±0.11
코디세핀 함량 (µg/g)		2740±78	5507±46	7341±110
아데노신 함량 (µg/g)		785±27	1015±11	1055±25
자실체 형상				



## 나. 제조 공정의 표준화

### (1) 동충하초 자실체 분말

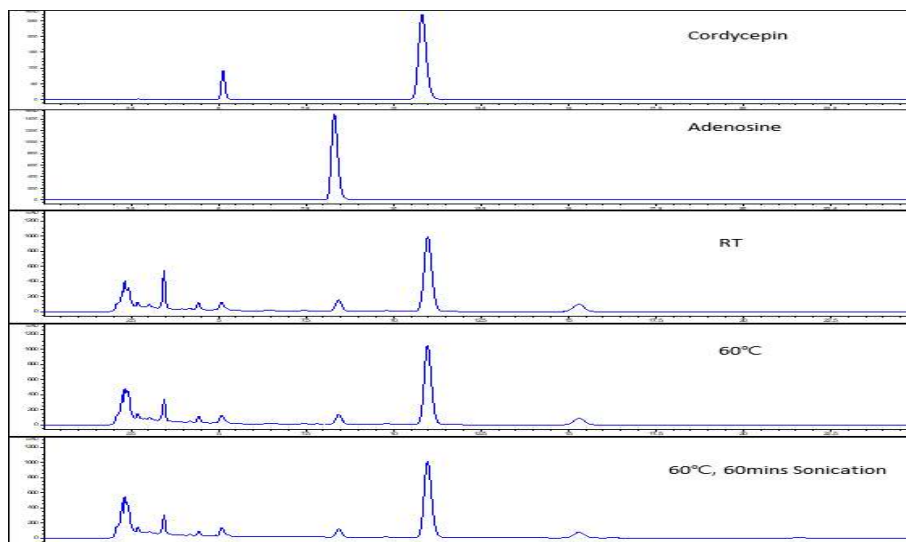
상기와 같이 8주간 배양한 동충하초로부터 자실체를 수확, 건조 한 다음 70~100 mesh 크기로 분쇄한다. 분말은 표준방법에 의해 지표성분인 코디세핀을 정량하여 품질을 관리한다.

### (2) 추출물 농축액(Cmex E)

동충하초 분말을 칭량하여 추출 용기에 넣고 정제수 용액 20배 용량을 첨가하고, 60°C에서 60분간 초음파 처리한다. 반응이 끝나면 9,000rpm에서 10분간 원심분리하여 침전물을 제거하고 감압농축방법으로 60Brix될 때까지 농축한다. 이과장이 끝나면 코디세핀과 아데노신의 함량을 정량하고 표준 추출농축액(Cmex E)으로 관리 한다. 농축물 조제를 위해 용매로 정제수를 사용하고 온도를 실온 및 60°C에서 추출 후 비교하였으나 온도에 따라서는 유의한 차이가 없었다.

한편, 농축액 중의 유용성분 함량을 증가시키기 위해 물 보다 용해도가 높은 50% 에탄올 용액으로 추출하여 코디세핀의 함량을 비교하였으나 기대와는 달리 정제수로 추출한 것과 차이가 없었다.

세 번째 방법으로 정제수를 용매로 초음파 처리 전 후의 추출액을 상용화된 가수분해효소 digezyme과 viscozyme을 농도별로 처리하고 37°C에서 시간별로 반응시킨 후 같은 방법으로 아데노신과 코디세핀의 함량을 정량하였다. 그 결과 visozyme 처리군에서 새로운 spot이 나타났으나 주성분인 코디세핀이나 아데노신 함량은 변화되지 않았다(그림 2.2.5). 따라서 시간 시약 등 경제성을 고려하여 정제수로 추출하고 초음파 처리하는 방법을 표준으로 정했다(표 2.2.5)



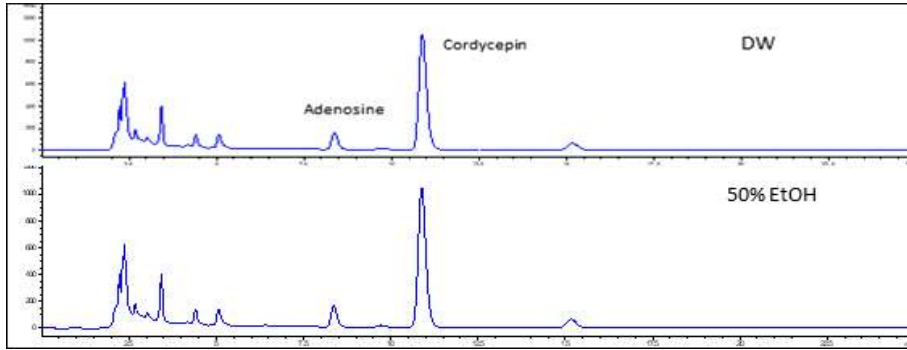


그림 2.2.4. 추출 방법별 코디세핀 및 아데노신 함량

표 2.2.3. 추출용매별 지표성분 함량

추출조건 (60min)	Cordycepin( $\mu\text{g/g}$ )	Adenosine( $\mu\text{g/g}$ )
DW	$7.58 \pm 0.03$	$0.68 \pm 0.01$
50% Ethanol	$8.05 \pm 0.095$	$0.12 \pm 0.01$
DW+Viscozyme( $37^\circ\text{C}$ )	not changed	not changed

표 2.2.4. 추출용매별 지표성분 함량

추출조건 (60min)	Cordycepin( $\mu\text{g/g}$ )	Adenosine( $\mu\text{g/g}$ )
Room Temperature	$7.35 \pm 0.05$	$0.63 \pm 0.01$
$60^\circ\text{C}$	$8.09 \pm 0.05$	$0.63 \pm 0.01$
$60^\circ\text{C}$ / Ultra-sonication(60min)	$7.33 \pm 0.02$	$0.47 \pm 0.01$

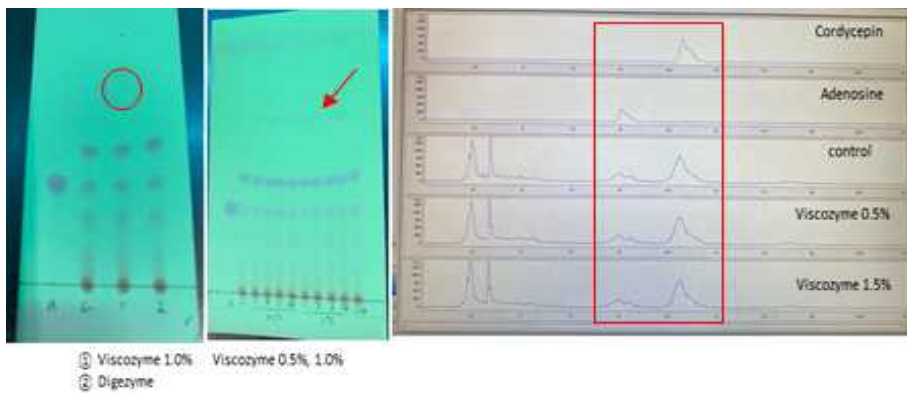


그림 2.2.5. 효소처리에 의한 코디세핀 및 아데노신 함량

표 2.2.5. 추출 방법별 장점과 단점 비교

Methods	Conditions	strength & weakness
Heating	80~100℃	· 신속 간편, 성분 손실 우려
Ultra-sonication	5~60 mins	· 효율성 기대, 비정량적,
Enzymes	Protease, Cellulase	· 효율성 기대, 고가, 비정량적
Solvents	Water . Ethanol	· Water > Ethanol

(3) 추출물 건조분말(Cmex P)

식품원료의 건조는 크게 동결건조(Freeze Dry, FD)와 분무건조(Spray Dry, SD) 두 가지로 나눌 수 있다. 동결건조는 유용성분 보존, 용해도 향상 등 장점이 많지만 비용이 많이 든다. 반면 분무건조는 액체상의 성분을 가루로 바꾸는 건조 방식 중의 하나이며 장기간 보관이 가능하며 운반이 편리하고 효율적인 방법이다.

분무건조(SD)는 어떤 재료의 액체를 열풍 속에 분무시켜, 미세한 물방울 상태로 기류에 동반시킨다. 이 분무건조는 수증기 막으로 둘러싸여 습구온도로 건조되므로 열에 민감한 식품의 건조에 알맞고 연속 대량 생산에 적합하다. 초기 우유를 장기간 보존 목적으로 분유로 제조하기 위하여 개발된 장비였던 분무건조기는, 첨단 소재산업의 발달 및 생산량 증대에 따라 식품, 의약품, 화학제품, 세라믹스를 비롯하여 나노, 바이오 등 신소재분야에서 널리 적용되고 있는 장비입니다. 분무건조기는 액상 상태의 원료를 짧은 시간에 유동성 및 용해성이 좋은 과립 분말(Granule)을 제조하기 위하여 사용되고 있으며, 이를 통해 간단한 원료 이송, 고속, 건식으로 가압성형 할 때 우수한 균일성을 부여할 수 있으며, 또한 용해성이 좋으므로 균질한 품질의 화학제품을 사용하는데 이용되고 있다.

본 연구에서 동충하초 추출농축물 분말은 추출물 70%에 30%의 dextrin을 첨가하여 SD 건조기로 건조하여 표준화하였다. 이 70% SD분말은 식품원료로 사용될 때 까지 진공 포장하여 관리한다.

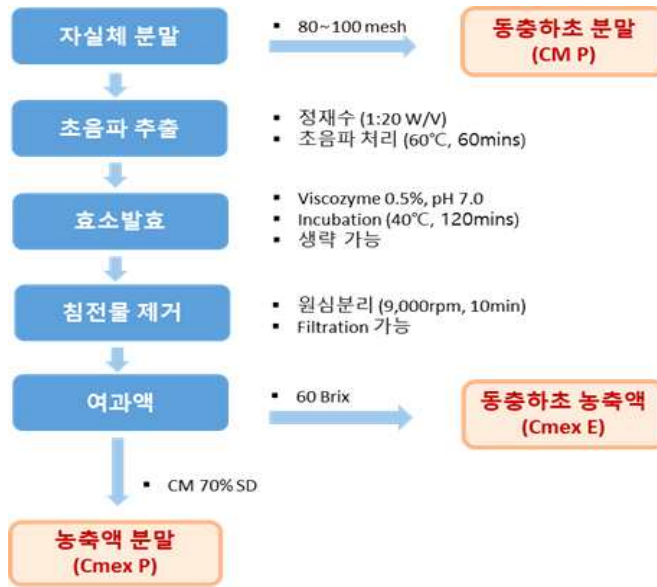


그림 2.2.6. 동충하초 표준화 원료

표 2.2.6. 표준화 원료의 성상

원료	지표성분 함량(μg/g)	참고
자실체 건조 분말 (CM Powder)	Cordycepin 7.0±1.05	80~100mesh
동충하초 농축액 (Cmex E)	Cordycepin 5.0±1.20	60 Brix
동충하초 농축물 분말 (Cmex P)	Cordycepin 6.0±1.50	CM 70% SD

다. 지표성분 시험법의 표준화

(1) 코디세핀과 아데노신 분석

코디세핀과 아데노신 정량은 HPLC법으로 이 보고서 11페이지에 있는 내용과 같다.

3. 면역력 증강-피부건강 2중기능 건강식품 컨셉

가. 제품개발 기본 개념

제품개발의 기본컨셉은 면역력 증강과 피부건강을 동시에 충족하는 제품(Inner Beauty), 즉 먹는 화장품을 개발하는 것이다. 동충하초 추출물은 탁월한 면역증강효능과 주름개선, 피부미백 효능 등이 있음이 밝혀졌다. 이 연구에서 복합 기능성의 목표는 면역력 증진과 피부건강에 있다. 따라서 면역력은 고시형 원료인 알로에겔 또는 홍삼 등으로 피부건강은 동충하초 코디세핀과 아데노신을 기본으로 하되 기 알려진 고시형 원료를 이용하여 2중기능성 inner beauty 제품으로 개발하고 ‘건강미인’ 또는 ‘동충하초 건강미인’ 등으로 표현하고자 한다. 추후 동충하초 분말 또는 추출물을 이용 차별화된 개별인정형 원료 등록을 추진하기 위하여 이에 준하는 원료 표준화도 정립하였다.

나. 면역력 증강 및 피부건강 고시형 기능성 원료

동충하초 추출물 함유 면역력 증강과 피부건강에 대한 이중기능 건강식품 개발을 위해 기반이 되는 고시형 원료 선정이 필요하다. 2020년 현재 면역력 증진 기능식품의 고시형 원료로 등록된 원료는 인삼, 홍삼을 비롯하여 6종이며, 피부건강 기능식품의 고시형 원료는 엽록소함유식물 등 8종이 있다(표 2.2.7). 그 중 면역력 증진과 피부건강 모두에 등록된 원료는 클로렐라와 알로에겔 2종이다.

표 2.2.7. 2020년 현재 면역증강 및 피부건강 건강기능식품 고시형 원료

면역기능(6종)	피부건강(8종)
인삼, 홍삼, 클로렐라, 알콕시글리세롤 함유 상어 간유, 알로에겔, 상황버섯추출물	엽록소함유식물, 클로렐라, 스피루리나, 포스파티딜세린, NAG(N-acetylglucosamine), 알로에겔, 히알루론산, 곤약감자추출

이 연구에서는 동충하초 추출물의 탁월한 효능을 기반으로 하고 한 물질로 두 가지 기능성을 인정받을 수 있는 알로에겔을 기능성 원료로 하는 방안, 그리고 이 원료와 친화성이 있으면서도 목표로 하는 두 가지 기능을 강화할 수 있는 다양한 부원료를 선정하여 recipe를 구성하였다.

다. 이중기능 건강식품 recipe

동충하초를 원료로 한 개별인정형 기능식품은 주정추출물 이용 면역력 증강과 지구력 향상 두 가지가 있다. 이 원료의 일일 섭취량은 건조분말 기준으로 500-1,500mg 수준이다. 이를 참고하여 본 실험에서 일일섭취량 기준은 코디세핀 함량 3~4mg, 건조분말로는 약 500mg을 기준으로 설정하였다. 면역력 증강 및 피부건강 기능성 주원료는 두 기능에 모두 고시형으로 등록된 엘로에젤, 또는 클로렐라를 검토하였다. 부원료는 홍삼, GT 또는 산삼배양근, 하이아룬산 등 기능이 잘 알려져 있는 다른 소재를 복합적으로 사용하되 관능적 특성과 제품의 이화학적 특성을 고려하여 구성하였다. 제품의 형태는 최근의 트렌드에 부합하는 액상스틱 및 젤리스틱형으로 정하였다.

위의 제품개발 기본컨셉에 따라 기본적으로 3가지 recipe 안을 작성하였다. 즉, 제1안은 두 가지 제품에 모두 한 가지 고시형 기능성 원료를 사용하고 type A에는 면역력 증강 관련 소재를 강화하고 Type B에는 피부건강에 효능이 알려져 있는 소재를 강화하는 방안이고, 제2안은 고시형 기능성 원료를 각기 다른 것을 사용하고 맛을 보완하는 방안, 제 3안은 고시형 기능성 원료를 모두 다르게 구성하는 방안을 마련하고 효능 작업성 등을 심도 있게 검토하였다.

그 결과 작업성 편리성, 경제성 등을 고려 제1안을 선택하고 기능 강화를 위해 면역력 증강에 시너지효과를 낼수 있는 원료로 홍삼을, 피부건강을 더 강화하기 위해서는 GT추출물을 최종 선정하였다. 그리고 이 원료 소재에 대한 시너지 효과를 확인하기 위해 면역력 증강 및 피부건강 바이오 마커를 이용하여 생리활성을 검증하였다.

표 2.2.8. <1안> : 두 가지 기능을 가진 원재료 사용

소재(원료)	Type A (면역+피부건강)	Type B (면역+피부건강)
Basic concepts	Immune 강화	Skin care 강화
동충하초 원료	- 동충하초 자실체 추출물	- 동충하초 자실체 추출물
기능성 원재료(면역)	AL	AL
기능성 원재료(피부)		
기타원료	- 맛 및 면역 관련 자원 등	- 맛 및 피부건강관련 자원 등
제형	- 농축액 스틱제품	- 젤리형 스틱제품

표 2.2.9. <2안> : 한 가지 기능 만 가진 원료 사용

소재(원료)	Type A (면역+피부건강)	Type B (면역+피부건강)
Basic concepts	Immune 강화	Skin care 강화
동충하초 원료	- 동충하초 자실체 추출물	- 동충하초 자실체 추출물
기능성 원재료(면역)	- 00 또는 00	- 00 또는 00
기능성 원재료(피부)	- HA 또는 000	- HA 또는 000
기타원료	- 맛 및 면역관련 자원 보강 등	- 맛 및 피부관련 자원 보강
제형	- 농축액 스틱제품	- 젤리형 스틱제품

표 2.2.10. <3안> : 단일기능 2가지 원료 사용

소재(원료)	Type A (면역+피부건강)	Type B (면역+피부건강)
Basic concepts	Immune 강화	Skin care 강화
동충하초 원료	- 동충하초 자실체 추출물	- 동충하초 자실체 추출물
기능성 원재료(면역)	- 00 또는 00	- AL 또는 0000
기능성 원재료(피부)	- HA 또는 000	- 알로에젤 또는 0000
기타원료	- 맛 및 면역관련 자원 보강	- AL 및 피부건강관련자원 보강
제형	- 농축액 스틱제품	- 젤리형 스틱제품

표 2.2.11과 표 2.2.12는 면역증강 및 피부건강 기능성을 강화하기 위해 조사한 부원료 후보 자원들이다. 현재 과학적으로 면역력 증강 효능이 입증된 자원은 여러 가지가 있으나 그 중 대표적인 자원은 동충하초를 포함하여, 브로콜리, 녹차, 황기, 인삼, 마늘 등이다. 피부건강에 유효한 자원으로 알려져 있는 것은 인삼을 비롯하여 녹차, 감잎, 감초, 강화 등이 있다. 제품의 기능성을 강화하기 위해 이들 중 일부를 부원료로 사용할 예정이다.

표 2.2.11. 면역력 증강 효능이 있는 천연 원료

원료	Ingredients	Functions	Others
Broccoli (브로콜리)	Indol-3-carbinol Vit. C, A, B, K Lutein, Zeaxanthin, Minerals	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anti-oxidant, Diet, Tonic, Cardiovascular disease</li> <li>• Immune, Heart, Dark circle, eye</li> <li>• Anti-cancer, bones, AD, Stomach</li> </ul>	
Green Tea (녹차)	EGCG(Epigallocatechin gallate), catechins Flavonoids, Vita, C Selenium	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anti-oxidant, Immune, Anti-cancer, Cholesterol</li> <li>• Diet, skin care, Anti-stress</li> </ul>	
Grapefruit (자몽)	Naringin, Apigenin, Flavonoids Lycopene, Vit. C	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Beauty, Diet, Hair tonic, Immune, Energy</li> <li>• Hangover, Osteoporosis, Antimicrobial</li> <li>• Skin care, Diabetes, eye, cholesterol,</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Interrupt drug absorption</li> </ul>
Cordyceps militaris (동충하초)	Cordycepin (Adenosine) Ergosterol	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anti-oxidant, Immune, Anti-cancer</li> <li>• Anti-microbial</li> </ul>	
Astragalus (황기)	Tragacanth gum Triterpenoid saponins (astragalosides), flavonoids, polysaccharides, phytosterols, essential oil, amino acids.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Immune, cancer, Diuresis, Diabetes, circulation</li> <li>• Beauty, Anti-aging, kidney, Tonic, Menstrual, Diet</li> <li>• Common cold, Upper respiratory infection</li> <li>• Seasonal allergies, Swine flu, Fibromyalgia, anemia</li> <li>• HIV/AIDS, Chronic fatigue, Kidney disease</li> <li>• Diabetes, High blood pressure, wound healing</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• AuNPs-Tragacanth gume</li> <li>• Bacteriocidal</li> </ul>
Tumeric (강황)	Curcumin beta-carotene, Vit. C, niacin, Zn Flavonoids,	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Immune, Dementia, anti-cancer,</li> <li>• cardiovascular disease, Inflammation</li> <li>• Depression, Detoxification, Hangover</li> </ul>	
Ginseng, CRMG, RG (인삼)	Saponins Rb1, Rg3, Compound K Re	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anti-oxidant, Immune, Anti-cancer, Memory</li> <li>• Anti-fatigue, Menopausal</li> </ul>	
Garlic (마늘)	Allicin, methionine cysteine Garlic oil	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anti bacterial, anti-oxidant, anti-cancer</li> <li>• Cardiovascular disease, hypertension, cholesterol</li> <li>• Heavy metal</li> </ul>	
Ashwaganda (아쉬와간다)	Steroidal lactone(withaferin-A) Saponins, Alkaloids	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Immune, Fatigue, Antioxidant, anti-cancer</li> <li>• Anti-aging, Anti-stress, Sleeping, Adaptogen</li> <li>• cardioprotective, anti-inflammatory, anti-<a href="#">angiogenesis</a>, anti-metastasis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Indian Ginseng,</li> <li>• Ayurvedic medicine</li> <li>• Pregnant</li> </ul>

표 2.2.12. 피부건강 효능이 있는 천연 원료

원료	Ingredients	Functions	Others
Shrimps (새우)	Astaxanthin	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anti-oxidant, Immune, Anti-cancer, Indigestion, Cholesterol, Male/female climacteric disorder</li> <li>• Pneumatoid arthritis, UV protection, wrinkle</li> </ul>	
Green Tea (녹차)	EGCG(Epigallocatechin gallate), catechins Flavonoids, Vita, C, Se	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anti-oxidant, Immune, Anti-cancer, Cholesterol</li> <li>• Diet, skin care, Anti-stress</li> </ul>	
Persimmon (감잎)	Vitamin C	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antioxidant, Eye care, anticancer</li> <li>• Anti inflammation, Glaucoma cataract</li> </ul>	20 times of Lemon
Licorice (감초)	Glycyrrhizin Triterpene, saponins	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Detoxification, Skin, Hangover, anticancer</li> <li>• Wound healing, inflammation, Dermatitis, Hives</li> </ul>	
Tumeric (강황)	Curcumin beta-carotene, Vit. C, niacin, Zn, Flavonoids,	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Immune, Dementia, anti-cancer,</li> <li>• cardiovascular disease, Inflammation</li> <li>• Depression, Detoxification, Hangover</li> </ul>	
Cordyceps militaris (동충하초)	Cordycepin, (Adenosine) Ergosterol	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anti-oxidant, Immune, Anti-cancer</li> <li>• Anti-microbial</li> </ul>	
Ginseng (인삼)	Minor Ginsenosides CK,	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anti-oxidant, Immune, Anti-cancer</li> </ul>	
Collagen	Chitosan, N-Acetylglucosamine(고시) Elastin, Peptides(개별)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• UV protection, wrinkle</li> </ul>	Small molecules Fish collagen, ab. 500~1,000 Dalton

#### 4. 고시형 원료에 대한 동충하초 및 기능 강화 소재의 시너지 효과 검증

이중기능성을 가지고 있는 고시형원료 알로에겔에 대해 동충하초 추출물과 기능강화를 위해 선정된 홍삼과 녹차추출물 각각에 대한 시너지 효과를 측정하기 위하여 면역력 증강 및 피부건강에 대한 생리활성을 측정 비교하였다.

##### 가. 시료조제

본 실험에 사용된 알로에 겔은 신선한 알로에를 화원에서 구입하여 껍질을 제거하고 겔을 수집하였으며, 이를 60℃에서 건조하여 사용하였다. 6년근 홍삼은 금산소재 (주)대동고려인삼에서, 녹차는 시중에서 구입하여 분말로 만든 다음 시료로 사용하였다. 동충하초를 포함한 모든 시료는 중량대비 20배 용량의 정제수로 60℃에서 60분간 초음파 처리하여 추출하고, 추출물은 9,000rpm에서 10분간 원심분리하여 침전물을 제거하였다. 상등액은 조심스럽게 취한 다음 Rotary evaporator로 60℃에서 농축, 건조한 다음 다시 정제수로 최종농도가 1,000µg/ml 되도록 희석하여 stock solution으로 사용하였다(그림 2.2.7).

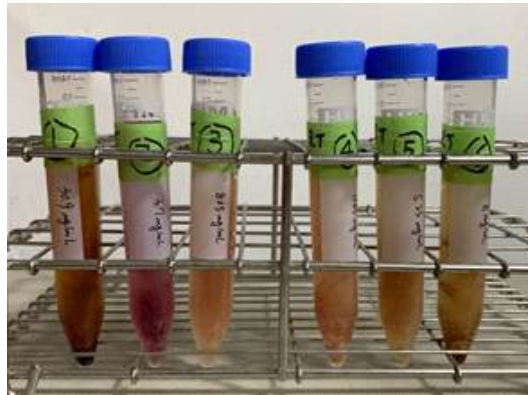


그림 2.2.7. 시료준비 (①CM, ②AL, ③CM+AL, ④CM+AL+RG, ⑤CM+AL+GT, ⑥CM+AL+RG+GT).

##### 나. 면역기능 효능검색

###### (1) 세포독성 측정

동충하초 및 기능성 강화를 위한 첨가 조합한 시료에 대한 세포독성은 다음과 같이 측정하였다. 먼저 대식세포주인 RAW264.7는 10% FBS를 포함하는 RPMI 1640 배지를 이용하고, 상피세포주인 HaCaT은 10% FBS를 포함하는 DMEM 1640 배지를 이용하여, 5% CO<sub>2</sub>, 37℃ 배양기에서 70~80%의 밀도로 배양하였다. 상기 배지들에는 항생제로서 페니실린(100 IU/ml) 및 스트렙토마이신(100µg/ml)를 첨가하였다. 상기 각각의 세포주에서 각 시료의 세포 생존에 미치는 영향을 알아보기 위해, MTT (3-[4,5-디메틸티아졸-2-일]-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드) 시험법을 이용하여 측정하였다.



96-wall plate에  $1 \times 10^6$ 의 세포를 플레이팅(plating)하고,  $37^\circ\text{C}$ 에서 각 실험 조건에 상응하는 배양시간 동안  $\text{CO}_2$  배양기에서 배양하였다. 이후  $10\mu\text{l}$  MTT 용액 (스톡 농도:  $5\text{mg}/\text{ml}$ )을 첨가하고 3시간 동안 추가 반응을 유도하였다. 반응 종료 및 포르마잔 결정(formazan crystal)의 용해를 위해, 각 웰에  $100\mu\text{l}$  MTT 정지 용액(stopping solution,  $0.01\text{M}$  HCl 중의  $10\%$  SDS)을 추가로 첨가하였다. 세포 생존율은 MTT가 포르마잔으로 환원된 양을  $570\text{nm}$ 에서 흡광도를 측정하여 얻어진 OD570 값을 통해 산출하였다. 여기서 CM은 동충하초(*Cordyceps militaris*), AL은 알로에겔(Aloe vera), RG, GT 등 이다.

### (2) NO generation

NO 생성억제 시험은 RAW 264.7 세포에 시행하였다. 즉, RAW264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여  $1 \times 10^5$  cells/ml로 조절한 후 96 well plate에 접종하고, 시료와 LPS( $1\mu\text{g}/\text{mL}$ )를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 생성된 NO의 양을 Griess reagent를 이용하여 세포배양 상등액  $100\mu\text{L}$ 와 Griess reagent[ $1\%$ (w/v) sulfanilamide,  $0.1\%$ (w/v) naphthyl-ethylenediamine in  $2.5\%$ (v/v) phosphoric acid]  $100\mu\text{L}$  를 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 ELISA microplate reader를 이용하여  $540\text{ nm}$ 에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 nitrite의 농도는 sodium nitrite를 DMEM 배지에 용해한 표준곡선을 이용하여 계산하였으며, LPS를 처리한 시험군과 LPS를 처리하지 않은 대조군에서 생성된 nitrite 양의 차이를 기준으로 각 시료의 NO 생성 저해활성을 확인하였다. 또한, 현재 알려진 NO 생성을 억제하는 물질로 L-arginine의 구조 유사체인 N-monomethyl-L-arginine (L-NMMA)와 비교하여 iNOS 유도 후 단계에 미치는 영향을 비교 조사하였다.

### (3) ROS generation

각 농축액에 대한 산화적 손상을 보호하는 효과를 확인하기 위해 활성산소와 반응하여 형광을 발산하는 2',7'-dichlorofluoresceindiacetate(DCF-DA)를 이용하여 세포내에서 발생하는 활성산소의 정도를 측정하였다. 6-well plate에  $2 \times 10^5$ 개의 HaCaT 세포를 분주한 후  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\%$   $\text{CO}_2$  배양기에서 24시간 동안 배양한 다음, 시료를 1시간 전 처리하였다. LPS( $100\text{ ng}/\text{mL}$ )를 24시간 처리한 다음 DCF-DA를 최종농도  $10\mu\text{M}$ 이 되도록 넣고  $37^\circ\text{C}$  에서 30분간 더 배양하였다. 이후, 상등액을 Black plate로 옮긴 후, ELISA reader를 이용하여(excitation:  $484\text{nm}$ , emission:  $530\text{nm}$ )에서 측정하였다. DCF 형광광도의 증가율은 대조군과 비교하여 배수(fold)로 계산 하였다.

## 다. 피부건강 효능검색

### (1) 프리라디칼 소거능(DPPH) 측정

또한 추출물의 항산화활성은 DPPH 이용한 자유 라디칼 소거 활성 측정법으로 실시하였다. 즉, 에탄올에 용해시킨 DPPH 용액을  $495\mu\text{l}$ 씩 시험관에 분주하고, 여기에 상기 시료 및 동충하초 추출물을  $5\mu\text{l}$ 씩 첨가하여, 최종 반응용액이  $500\mu\text{l}$ 가 되도록 하였다. 이를 일정시간 동안 반응시킨 후, 96-wall plate에  $200\mu\text{l}$ 씩 2개의 wall에 분주한 뒤  $517\text{nm}$ 에서의 흡광도 변화를 측정하였다.

(2) 미백효과 측정

피부미백 활성은 티로시나제 활성 저해 시험으로 검증하였다. 동충하초 추출물을 에탄올에 녹여 티로시나제 활성을 억제하기 위한 적당한 농도 범위로 희석한 것을 시료액으로 하여, 시험관에 0.1M 인산염 완충액(pH 6.5) 220 $\mu$ l, 시료액 20 $\mu$ l 및 버섯 티로시나제액(1500~2000U/ml) 20 $\mu$ l를 순서대로 넣는다. 이 용액에 1.5 mM 티로신액 40 $\mu$ l를 넣고, 37 $^{\circ}$ C에서 10~15분 동안 반응시킨다. 그리고 이것을 ELISA 판독기를 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

라. 동충하초 및 기능강화 물질 첨가에 의한 시너지 효과

(1) 동충하초의 생리활성

먼저 각 시료가 세포의 성장에 미치는 영향과 효능 측정을 위한 조건을 설정하기 위하여 세포 독성을 측정하였다(그림 2.2.8). 이 그림은 24시간 배양 후의 세포 생존율을 나타낸 것이다. 알로에 켈 추출물은 1,000 $\mu$ g/ml 수준까지 처리하여도 RAW264.7이나 HaCaT에 세포의 성장에 영향을 미치지 않았으나 동충하초(CM), RG, GT 또는 이들 혼합추출물 CM+AL, CM+AL+RG, CM+AL+GT는 500 $\mu$ g/ml이상으로 증가되면 농도 의존적으로 세포성장을 저해하였다. 또한 동충하초, RG, GT의 세포성장 억제작용은 혼합추출물에서는 현저히 줄어들었다.

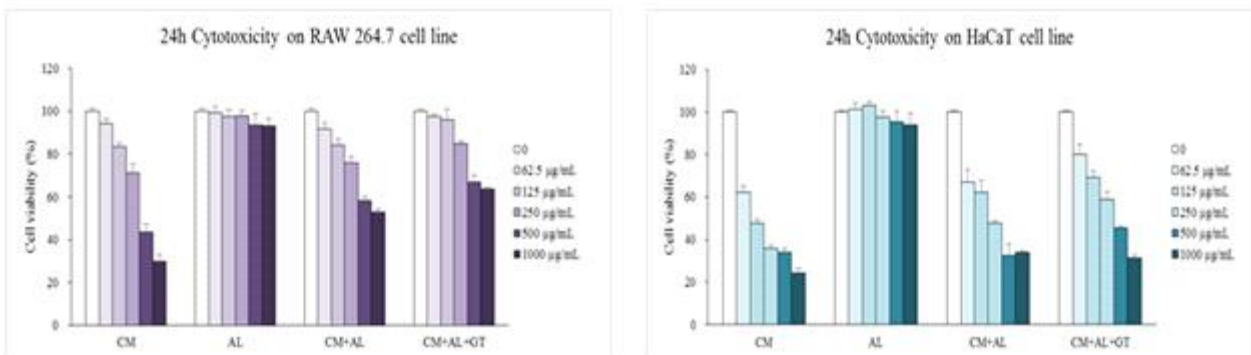


그림 2.2.8. 동충하초(CM), 알로에겔(AL), 홍삼(RG) 및 녹차추출물(GT)의 세포성장에 미치는 영향.

그림 2.2.9는 동충하초의 면역력 및 피부건강에 대한 몇 가지 지표에 대한 활성을 나타낸 것이다. 첫 번째 그림 DPPH는 항산화 활성을 나타낸 것으로 추출물의 농도가 증가될수록 항산화 활성이 62.5 $\mu$ g에서 7.1% 이었으나 500 $\mu$ g에서 15.5%로 크게 증가되었다. 피부미백 효능의 지표가 될 수 있는 멜라닌생성 효소 tyrosinase활성은 250 $\mu$ g 이하의 농도에 서는 억제되었으나 그 이상의 농도에서는 억제효과가 관찰되지 않았다. 또한 LPS에 의해 유도된 NO 생성도 62.5 $\mu$ g에서 88.8%에서 500 $\mu$ g에서 40.1% 까지 감소되었고 ROS생성 또한 농도 의존적으로 억제하였다. 이 결과는 이미 많은 연구자들이 보고한 것과 같이 동충하초 추출물이 항산화 활성과 피부 건강 및 면역력 증강에 효과가 있음을 보여 준다.

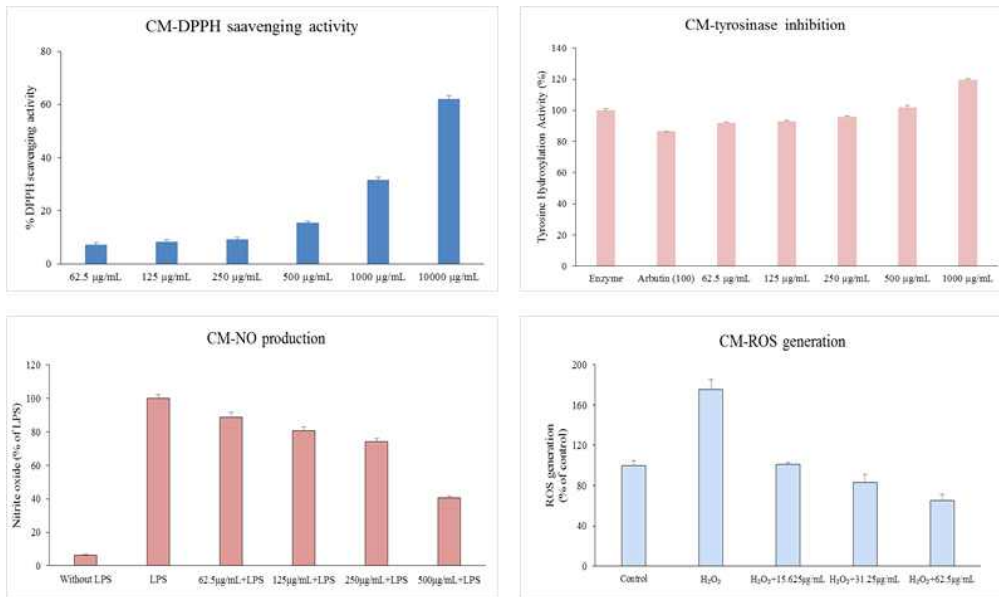


그림 2.2.9. 동충하초(CM) 추출물의 생리활성

(2) 동충하초 및 홍삼 첨가에 의한 시너지 효과(Recipe type A)

이중건강기능식품(Dual Functional Health Food) Recipe Type A는 면역력증강-피부건강 중에서 면역력 증강을 더 강화하기 위한 recipe 이다. 아래 그림은 recipe type A의 주 첨가 소재인 동충하초와 홍삼의 알로에겔에 대한 시너지 효과를 측정된 결과 이다. 먼저 DPPH 실험으로 500 $\mu$ g 농도에서 비교한 항산화활성은 동충하초(CM)가 알로에겔(AL) 보다 약 2.6배나 높았으며, 동충하초와 알로에겔 1:1 혼합추출물(CM+AL)에는 AL단독 보다 약 28% 증가되었고, 홍삼과 함께 혼합했을 때는 37%로 더욱 증가되었다. Tyrosinase활성도 억제효과는 250 $\mu$ g 농도에서 상대적으로 비교한 결과로서 동충하초 추출물이 알로에 겔에 비해 조금 낮은 활성을 보였으나 혼합추출물 군에서는 더 높은 활성 억제효과를 나타내었다. NO 생성의 경우 LPS 대비 알로에 겔은 81%이었으나 동충하초와 함께 첨가했을 때는 51.2%로 약 30% point 낮았다. ROS 생성억제 효과에 있어서도 NO에서와 비슷한 억제효과를 나타내었으며 혼합추출물에 의한 상승효과도 명확히 보여주었다. 이 결과는 본 연구에서 구성한 이중기능건강식품 Type A가 기존의 알로에 겔만으로 구성된 것 보다는 기능성이 훨씬 강화된 것으로 볼 수 있다.

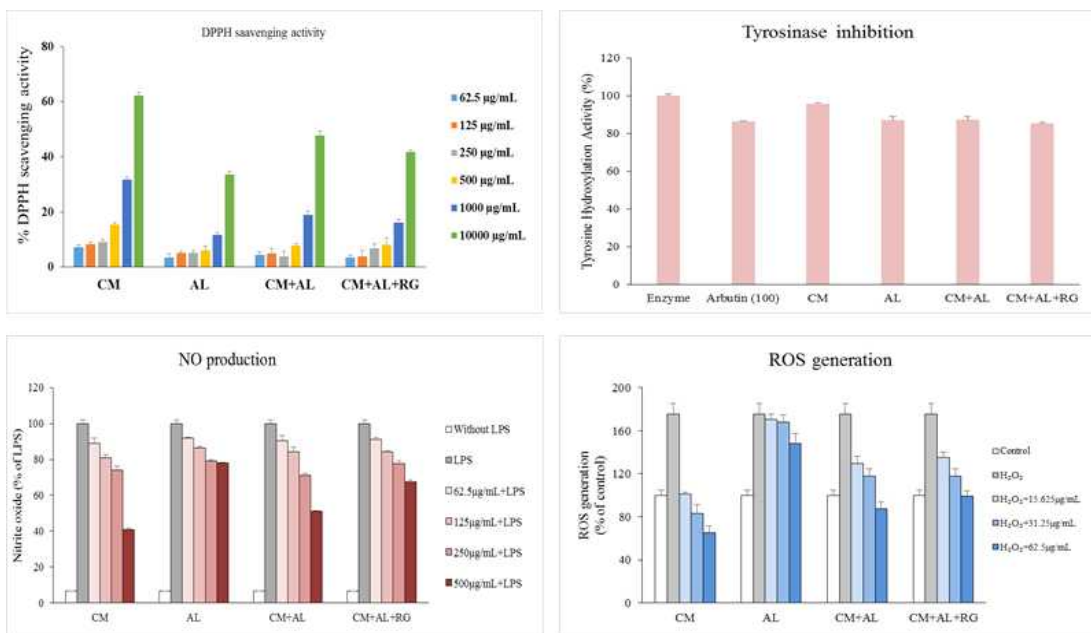


그림 2.2.10. 동충하초(CM), 알로에겔(AL), 및 홍삼(RG)의 생리활성 시너지 효과.

### (3) 동충하초 및 녹차 추출물 첨가에 의한 시너지 효과 (Recipe type B)

그림 2.2.11은 이중건강기능식품 type B의 주 첨가 소재인 동충하초(CM)와 GT의 알로에 겔에 대한 상승효과를 비교한 결과이다. 녹차추출물 첨가로 특이하게도 항산화 활성이(DPPH) 크게 증가되었다. 예를 들어 500 $\mu$ g 첨가군에서 상대적인 활성을 비교하면 알로에 겔은 프리레 디컬 소거능이 6.0% 이었으나, 동충하초 첨가(CM+AL)로 7.7% 증가되었고, CM+AL+GT 첨가 로 42.8%까지 크게 증가되었다. 항산화 활성은 피부건강과 면역증진 모두에 관련이 있는 생체 지표로서 녹차추출물 첨가는 알로에 겔의 이중 기능성을 크게 강화한다는 것을 보여 준다. 멜라 닌 형성 억제효과나 NO, ROS 생성 억제에 있어서도 비슷한 결과를 보여주어 알로에 겔에 동 충하초와 녹차추출물 첨가는 면역력 증강 및 피부건강 기능강화에 시너지 효과가 있음을 보여 준다.

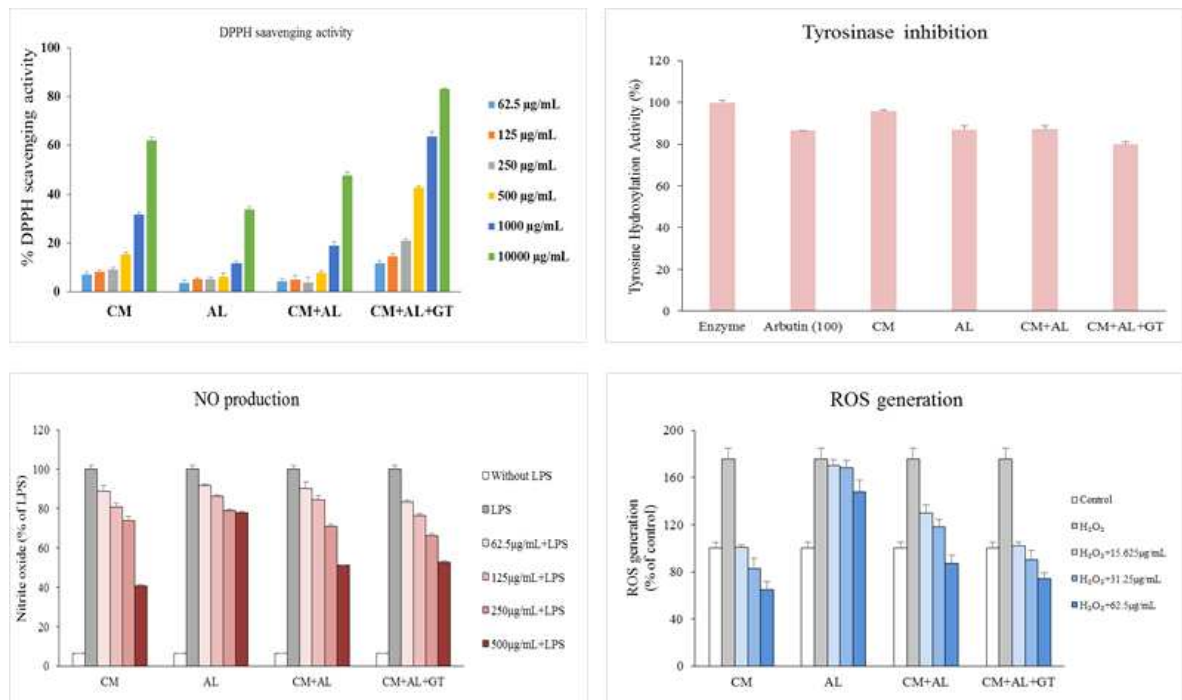


그림 2.2.11. 동충하초(CM), 알로에겔(AL), 및 GT의 생리활성 시너지 효과

본 연구결과 기능성 원료인 알로에 겔과 함께 면역 증강 및 피부건강 개선을 위한 부원료와 함께 제작한 레시피는 기존 기능성 원료인 알로에 겔 대비 강화된 기능성을 보여주었다. 따라서 이를 토대로 한 원료배합 비로 시제품을 제작하고, 추가적인 비임상, 전임상 및 임상을 거쳐 개별인정형 원료로서 등록하게 되면 산업적으로 활용도가 우수한 원료를 확보함과 동시에 천연 유용성분이라는 점을 부각시켜 높은 홍보 효과와 함께 성공적인 산업화로 이어질 수 있을 것으로 사료된다.

## 5. 최종 시제품 제작 및 제품화

### 가. 2중기능제품 최종 recipe 및 시제품

상기 실험결과와 당 연구실의 노하우를 종합적으로 고려하여 피부건강 및 면역력증진을 최대한 발휘하고 제품의 맛과 조화를 이룰 수 있으며 두 종의 최적 recipe를 구성하였다. 이를 기업에 이전 시제품을 제작평가하고 최종제품 개발에 활용할 예정이다.

Type A				Type B			
계	명	종	비율	계	명	종	비율
1. 총 중량 / 제품명 : 200g / 30종 2. 제품명 : 24종 3. 제품명 : 18종, 18종 4. 제품명 : 18종, 18종 5. 제품명 : 18종, 18종 6. 제품명 : 18종, 18종 7. 제품명 : 18종, 18종 8. 제품명 : 18종, 18종 9. 제품명 : 18종, 18종 10. 제품명 : 18종, 18종 11. 제품명 : 18종, 18종 12. 제품명 : 18종, 18종 13. 제품명 : 18종, 18종 14. 제품명 : 18종, 18종 15. 제품명 : 18종, 18종 16. 제품명 : 18종, 18종 17. 제품명 : 18종, 18종 18. 제품명 : 18종, 18종 19. 제품명 : 18종, 18종 20. 제품명 : 18종, 18종 21. 제품명 : 18종, 18종 22. 제품명 : 18종, 18종 23. 제품명 : 18종, 18종 24. 제품명 : 18종, 18종 25. 제품명 : 18종, 18종 26. 제품명 : 18종, 18종 27. 제품명 : 18종, 18종				1. 총 중량 / 제품명 : 100g / 30종 2. 제품명 : 24종 3. 제품명 : 18종, 18종 4. 제품명 : 18종, 18종 5. 제품명 : 18종, 18종 6. 제품명 : 18종, 18종 7. 제품명 : 18종, 18종 8. 제품명 : 18종, 18종 9. 제품명 : 18종, 18종 10. 제품명 : 18종, 18종 11. 제품명 : 18종, 18종 12. 제품명 : 18종, 18종 13. 제품명 : 18종, 18종 14. 제품명 : 18종, 18종 15. 제품명 : 18종, 18종 16. 제품명 : 18종, 18종 17. 제품명 : 18종, 18종 18. 제품명 : 18종, 18종 19. 제품명 : 18종, 18종 20. 제품명 : 18종, 18종 21. 제품명 : 18종, 18종 22. 제품명 : 18종, 18종 23. 제품명 : 18종, 18종 24. 제품명 : 18종, 18종 25. 제품명 : 18종, 18종 26. 제품명 : 18종, 18종 27. 제품명 : 18종, 18종			
1. 총 중량 : 100,000g 2. 제품명 : 24종 3. 제품명 : 18종, 18종 4. 제품명 : 18종, 18종 5. 제품명 : 18종, 18종 6. 제품명 : 18종, 18종 7. 제품명 : 18종, 18종 8. 제품명 : 18종, 18종 9. 제품명 : 18종, 18종 10. 제품명 : 18종, 18종 11. 제품명 : 18종, 18종 12. 제품명 : 18종, 18종 13. 제품명 : 18종, 18종 14. 제품명 : 18종, 18종 15. 제품명 : 18종, 18종 16. 제품명 : 18종, 18종 17. 제품명 : 18종, 18종 18. 제품명 : 18종, 18종 19. 제품명 : 18종, 18종 20. 제품명 : 18종, 18종 21. 제품명 : 18종, 18종 22. 제품명 : 18종, 18종 23. 제품명 : 18종, 18종 24. 제품명 : 18종, 18종 25. 제품명 : 18종, 18종 26. 제품명 : 18종, 18종 27. 제품명 : 18종, 18종				1. 총 중량 : 100,000g 2. 제품명 : 24종 3. 제품명 : 18종, 18종 4. 제품명 : 18종, 18종 5. 제품명 : 18종, 18종 6. 제품명 : 18종, 18종 7. 제품명 : 18종, 18종 8. 제품명 : 18종, 18종 9. 제품명 : 18종, 18종 10. 제품명 : 18종, 18종 11. 제품명 : 18종, 18종 12. 제품명 : 18종, 18종 13. 제품명 : 18종, 18종 14. 제품명 : 18종, 18종 15. 제품명 : 18종, 18종 16. 제품명 : 18종, 18종 17. 제품명 : 18종, 18종 18. 제품명 : 18종, 18종 19. 제품명 : 18종, 18종 20. 제품명 : 18종, 18종 21. 제품명 : 18종, 18종 22. 제품명 : 18종, 18종 23. 제품명 : 18종, 18종 24. 제품명 : 18종, 18종 25. 제품명 : 18종, 18종 26. 제품명 : 18종, 18종 27. 제품명 : 18종, 18종			






그림 2.2.12. 세제품 레시피와 사진.

나. 원료표준화를 통한 제품화

상기 원료표준화 및 제조공정 표준화를 통하여 일반 건강식품 1건과 식품원료제품 3건을 최종 제품화하여 식품(식품첨가물) 품목제조보고를 실시하였고 그 제품사진과 품목제조보고호는 아래 표 2.2.13.와 같다.

표 2.3.13. 제품 및 품목제조보고번호

	제품 사진	품목제조보고번호
1		2004034719794
2		2004034719795
3		2004034719796
4		2004034719793

## 제 3절 피부건강(주름개선) 기능성 천연 원료 개발

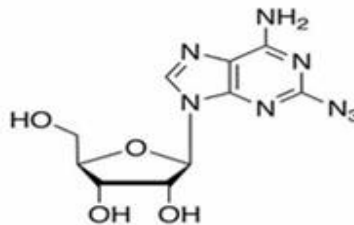
### 1. 피부건강(주름개선) 기능성 천연원료 개발

#### 가. 동충하초와 아데노신

동충하초는(*Cordyceps militaris*)는 천연 코디세핀과 아데노신을 얻을 수 있는 유용한 자원이다. 이중 아데노신은 핵염기인 purine nucleoside로서 에너지 전달, 신호 전달을 담당하는 신경 조절물질로서 수면을 촉진시키고 각성을 억제하는 역할을 하며, 혈관 확장을 통해 다양한 기관의 혈류 조절 역할을 한다. 아데노신은 주름개선 기능성 화장품 원료로 인정된 물질로서 특히 표피가 아닌 피부 내부에서 단백질 합성을 촉진하여 세포 재생력 향상시키며, 피부 탄력 증강에 탁월한 효능을 발휘한다. 또한 독성과 부작용이 없을 뿐만 아니라 지속력이 강하기 때문에 기 알려져 있는 기능성 물질 레티놀과는 달리 밤과 낮 상관없이 사용이 가능하여 주름개선을 위한 소비자가 선호하는 천연 기능성 원료이며 국내 주름개선 제품의 대부분이 아데노신을 원료로 사용하고 있다.

그러나 동충하초에서 아데노신은 동일 대사과정 상에 있는 코디세핀에 비해 상대적으로 함량이 낮다. 많은 연구에도 불구하고 이중 어느 한 물질 만을 선택적으로 또는 두 물질을 동시에 증가시킬 수 있는 기술은 현재까지 보고된바 없다. 아데노신과 코디세핀은 3'위치에 hydroxyl기 하나만 있고 없는 매우 유사한 구조이어서 이들을 서로 순수분리하기가 쉽지 않다.

따라서 천연 아데노신을 분리하여 산업적으로 이용하기에는 여전히 고가이며 해결해야 할 문제의 하나이다.



Adenosine

그림 2.3.1. 아데노신 구조

한편 최근 화장품 시장은 년 4%의 성장을 보이고 있으며, 그 중 16%는 cosmeceuticals, 즉 기능성 화장품으로 년 9%의 높은 성장을 보이고 있다. 우리나라의 경우 화장품 총 시장은 13조 5천억원이며 그중 35%가 기능성 화장품으로 년 18%의 높은 성장세 이다. 기능성 화장품을 세분해 보면 전체의 약 절반에 해당하는 48%가 복합유형, 22%가 주름개선을 복합기능성 기능성 화장품이 단연 리딩 제품이다 (2018 화장품 시장동향 및 전망, Euromonitor). 그러나 여기서 복합기능은 주름개선과 미백, 미백과 보습 등 바르는 화장품 내에서의 복합이다. 우리나라에서 주름개선 화장품의 기능성 원료로 등록된 것은 adenosino, retinylpalmitate, polyethoxylate retinamide 등 4종이다.



현재 사용되고 있는 아데노신은 합성약품이다. 따라서 동충하초로부터 분리정제 한 아데노신은 천연 아데노신으로 의미가 있다. 주름개선 기능성화장품에 적용되는 아데노신의 첨가량은 0.04%에 불과하여 제조원가 상승요인은 크지 않으며, 반면 천연원료라는 친환경 이미지 부여와 제품 차별화를 위해 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

3. 피부의 주름개선에 도움을 주는 제품의 성분 및 함량  
 (제형은 로션제, 액제, 크림제 및 침적 마스크에 한하며, 제품의 효능·효과는 "피부의 주름개선에 도움을 준다"로, 용법·용량은 "본품 적당량을 취해 피부에 골고루 펴 바른다. 또는 본품을 피부에 붙이고 10~20분 후 지지체를 제거한 다음 남은 제형을 골고루 펴 바른다(침적 마스크에 한함)"로 제한함)

연번	성분명	함량
1	레티놀	2,500IU/g
2	레티닐팔미테이트	10,000IU/g
3	아데노신	0.04%
4	폴리에톡실레이티드레틴아마이드	0.05~0.2%

그림 2.3.2. 주름개선 화장품에 적용되는 아데노신 첨가량.

#### 나. 동충하초 부위별 아데노신 함량

동충하초에서 아데노신을 분리하기 위해서는 크게 3 부분에서 가능하다. 즉, 일반 고상배양에서 재배 한 후 성장한 자실체(Fruit body)에서 분리하는 방법, 둘째는 균사체라고 불리는 밀 부분(rice cake)에서 분리하는 방법, 3번째는 액상배양하여 그 배양액으로부터 분리하는 방법이다(그림 2.3.3).

그러나 고상배양에서는 배지에 균종을 접종한 후 적어도 8주 이상 배양해야 하며 자실체에서 아데노신을 분리하는 것은 경제성이 없다. 자실체 아래에 배지 부분을 rice cake라고 부르는데 여기에는 기질을 포함한 배지와 균사체가 혼재되어 있는 부분이다. 일반적으로 아데노신과 코디세핀 모두 자실체에 많고 rice cake에는 낮은 것으로 알려져 있다. 그러나 이것은 배양 방법 및 성장기간에 따라 일정하지 않다. 균사체 부분은 자실체와 혼합하여 사용하는 경우도 있고 waste로 버리는 경우도 있어 만약 아데노신의 함량을 높일 수 있다면 활용할 가치가 있다. 반면 액상배양의 경우는 유용물질의 생성을 조절 및 모니터링하기가 쉽고, 배양 시간이 상대적으로 짧아 특정물질 강화 및 분리 정제가 용이할 것으로 생각된다.

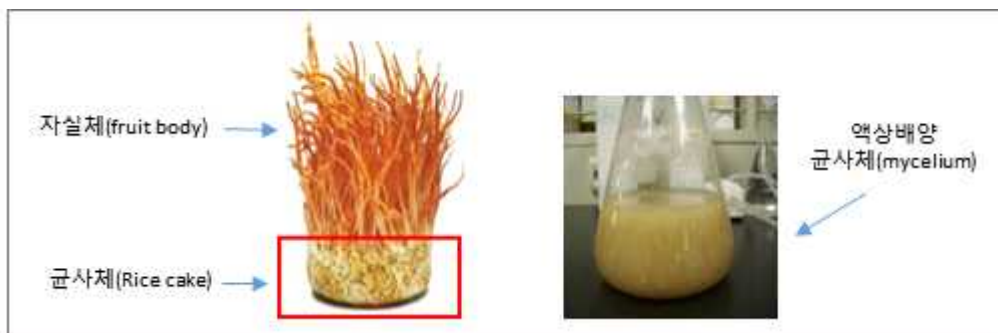


그림 2.3.3. 동충하초로부터 성분을 분리하기 위한 3가지 부분.

따라서 고상배양 한 동충하초의 자실체와 균사체 및 액상배양에서 아데노신과 코디세핀 함량을 조사하였다(표 2.3.1). 표에서와 같이 60일 고상배양 한 동충하초의 아데노신 함량은 자실체에 약 1.13mg/g, 균사체에서는 0.08g/g으로 자실체에서 상대적으로 높았다. 그러나 코디세핀의 함량은 자실체가 7.01mg/g이고 균사체에서는 3.31mg/g으로 자실체에서 약 2배 높았다. 이 결과는 동충하초 자실체에서 아데노신만을 얻고자 할 경우 적어도 8주 이상의 배양 시간이 필요하며, 버려지는 rice cake에는 그 함량이 낮아 순수분리하기에는 경제성이 매우 낮아 보인다. 또한 2주간 배양한 액상배지에서는 아데노신은 거의 생성되지 않았고, 코디세핀은 14~17µg/ml 수준이었다. 이결과는 고상배양이든 액상배양이든 기존의 일반적인 배양방법으로는 아데노신을 분리가 어려움을 알 수 있다. 그러나 액상배양의 경우는 비록 농도는 높지 않을지라도 배양이 용이하고 아데노신대사의 특정 pathway의 효소를 조절하거나 elicitor 등의 처리 등의 의해 아데노신 생성을 조절할 수 있는 시험이 가능한 한 방법이다.

표 2.3.1. 동충하초 부위별 아데노신 함량과 코디세핀 함량

	Adenosine	Cordycepin	기타
자실체(Fruit body)	1.13±0.02 (mg/g)	7.01±0.12 (mg/g)	60 day cultivation
Rice cake (Mycelium+Media)	0.08±0.002 (mg/g)	3.31±0.013 (mg/g)	60 day cultivation
액상배양액 (mycelium)	Trace (µg/ml)	15.8±1.15 (µg/ml)	2 week cultivation

## 다. Adenosine 고 함유 배양기술 정립

### (1) 이론적 배경

앞서 언급한 대로 동충하초 자실체에서 아데노신을 신속하게 다량으로 생산하기 위해서는 해결해야 할 몇 가지 문제가 있다. 첫째는 배양 시간이 길다는 점이다. 고상배양에서 자실체를 수확하기 위해서는 적어도 2-3개월 이상의 배양 시간이 필요하다. 둘째는 그 함량이 매우 낮고 코디세핀 등 다른 성분과 구조가 유사하여 분리하기가 쉽지 않다.

본 연구에서는 동충하초에서 아데노신의 함량은 짧은 시간에 선택적으로 증가시키고 그 배양액에서 아데노신을 신속하게 획득하는 기술을 검토하였다. 즉, 아데노신은 Adenosine deaminase(ADA)에 의해 inosine으로 대사되는데 본 연구에서는 ADA의 활성을 억제시켜 아데노신을 축적되게 하는 기전을 이용하여 아데노신 함량을 증가시키는 방안을 시행하였다. 또한 고체배양 대신 액상배양 방법은 생산시간을 단축시킬 수 있고 생성된 아데노신을 회수하기도 용이하다.

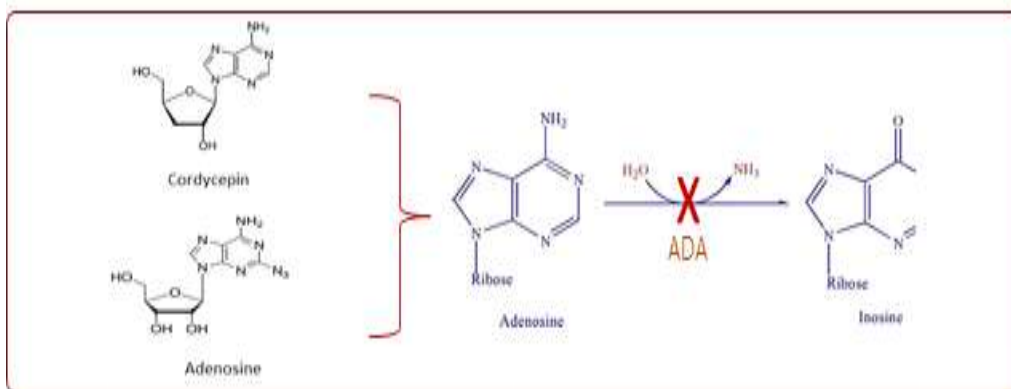


그림 2.3.4. ADA 억제를 통한 아데노신 함량 증진 모식도.

(2) 동충하초에서 아데노신 고함유 분획 생산 과정

Adenosine 고함유 액상배양 및 회수를 위한 전체 프로세스는 아래와 같다. 즉, 배양된 종균을 모배양배지에 접종하고 멸균한 ADA 천연억제를 첨가한 후 일정시간 배양한다. Adenosine 함량이 가장 높은 시점에서 배양을 끝내고 배양액을 초음파 처리하여 세포내 adenosine을 유출시킨 후 원심분리하여 adenosine rich fraction을 얻는다(그림 2.3.5).

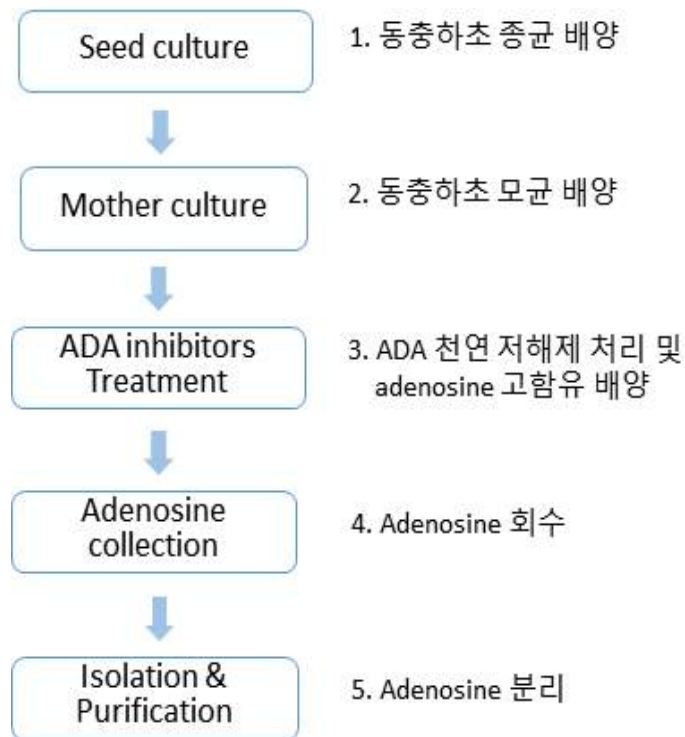


그림 2.3.5. 액상배양에서 아데노신 분리 프로세스.

### (3) 아테노신 생산을 위한 종균 배양(Seed culture)

이 연구에서 사용된 균주는 본 연구실에서 분리 동정한 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris* HB8)이었다. 먼저 동충하초 균을 배지에 접종하여 균사체를 배양하였다. 즉, 균사체 배양 단계는 *Cordyceps militaris* HB8 종균을 PDA 배지, 25℃에서 10일 동안 배양하여 균사체가 형성되면 그로부터 모균배양을 실시 하였다. 모균 배양(Mother culture)에 사용된 배지는 L당 펩톤 10g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g, 포도당 20g, MgSO<sub>4</sub> 1g, 비타민 B1 0.05g로 구성되었으며, PDA배지에서 배양된 균사체를 멸균된 원통형 절단기로 약 1cm의 PDA 플레이트 배양물을 10 편칭하여 모 배양 배지로 옮겼다. 시드 배양은 500mL의 액상배양액을 함유하는 1,000mL 플라스크에서 성장시키고, 암 조건에서 5일 동안 회전 진탕(110rpm)하며 23℃에서 배양하였다.

### (4) 아테노신 디아미네이즈(ADA) 천연 저해제 준비

본 연구에서 ADA inhibitor로 사용할 천연 저해제의 선별하였다. 즉, 문헌조사를 통해 ADA 천연 저해제로 GF, GT, GL, TM 등 다양한 천연물을 선별하였다. 그 결과 예비실험을 통해 저해 활성이 높고 배지와 친화성이 있는 GF 등 5종을 선별하였고 최종적으로 GF와 GT분말을 사용하였다(그림 2.3.6). 즉 GF를 잘게 자른 후 음지에서 1주야 간 자연 건조하고 다시 항량(constant weight)이 될 때까지 38℃ 건조기에서 건조하고, 잘 건조된 천연물을 70~100mesh 크기로 분쇄하고 농도별로 배양액에 첨가하여 사용하였다. 천연물에 들어있는 효소억제 성분은 GF에서는 NR 등의 화합물이 활성 성분이고 GT에서는 CH 등 이다. 천연물 내에 들어있는 활성 물질은 정제, 부분정제 또는 분말 자체로 배지에 첨가하여 사용할 수 있다.



그림 2.3.6. ADA 천연 억제제 GF 및 GT 분말.

(5) 천연물에 들어 있는 저해제 성분 정량

GF에 들어있는 NR 함량을 분석하기 위하여 GF 건조분말 1g에 물 20ml를 첨가 한 다음 배양액에서와 같은 조건에서의 농도를 확인하기 위해 121℃도에서 15분 동안 멸균한다. 샘플을 실온으로 냉각시킨 후 1ml를 취하고 13,000rpm에서 5분 동안 원심 분리하고, 상등액을 0.45µm 로 막 여과 한 다음 HPLC에 적용 한다. 나린진 분석은 HPLC 시스템 (Agilent technology 1260 infinity)을 사용하였으며, 분리는 C18 컬럼 (5µm, 4.6 x 250mm)에서 수행된다. 이동상은 A (물) 및 B (아세토니트릴)의 구배용출로 90% 용매 A 및 10% 용매 B로 시작하여 다음으로, A 90에서 80%, 0~2분; 80 내지 75%, 2.0~20분; 75 내지 0%, 20~22분; 0%, 22~25분; 0 내지 90%, 25~27분; 90~90%, 90분. 유량은 1.0 ml/min이었고, 주입량은 10µl로 280nm에서 흡광도를 모니터링하여 검출을 수행하였다. 또한 NR 표준품은 시그마-알드리치사로부터 구입하였다.

(6) 동충하초의 ADA 억제제 첨가 액상배양

모균배양 준비 완료 후 ADA 천연물 저해제를 GF와 GT 분말을 각각 1% 및 2%되게 첨가 하고 본 배양을 실시하였다. ADA저해제는 단독 또는 혼합 분말, 추출물 또는 특정성분 정제물을 농도별로 처리하고 배양할 수도 있다. 배양액은 다만 천연 저해제 첨가로 인해 배양액의 pH가 달라질 수 있기 때문에 이를 고려해야 한다.

한편, ADA 저해제를 처리한 후 5~14일 정도 배양하면 되지만 본 연구에서는 14일 만에 배양을 종료하였다. 아데노신의 축적은 세포내 아데노신 대사 및 ADA 활성도와 관계가 있기 때문이다. 즉, 아데노신 생성 증가를 위하여 배양 조건 중 기본배지는 용액 L 당 펩톤 10g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g, 포도당 20g, MgSO<sub>4</sub> 1g, 비타민 B1, 그리고 필요량의(1% 또는 2%) ADA 천연 저해제 GF분말 또는 GT분말을 배양액 100ml가 들어 있는 250ml 삼각 플라스크에 담은 후 121℃에서 15분간 멸균하였다. 멸균된 배양액에 모배양액을 1%되게 접종하고, 25℃, Shaking incubator에서 110rpm으로 14일 동안 배양한다. 배양 배지의 pH는 자연적으로 유지되었고 종자 배양 접종 전에 pH 5.8로 조정되었다. 첨가된 GF 분말의 경우 활성 억제성분 NG의 농도는 0.03% 및 0.06%이었다. 그림 2.3.7 천연억제제 첨가 후 pH의 영향을 관찰한 실험의 한 예를 보여준다. 배양 중 생성된 cordycepin과 adenosine은 7일과 14일 후에 1ml의 배양액을 취하여 표준방법에 따라 HPLC를 이용하여 정량하였다.

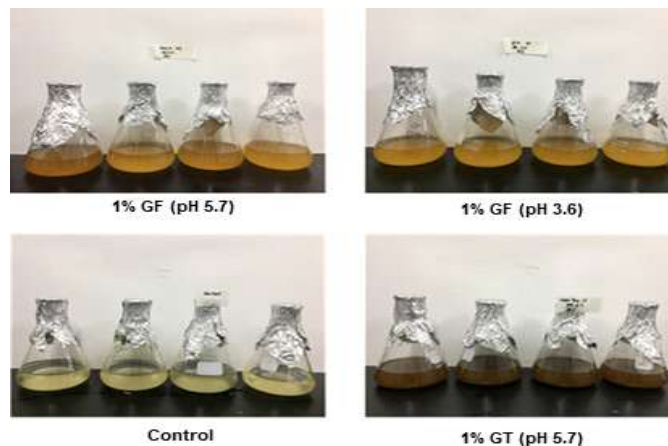


그림 2.3.7. 동충하초 액상배양액에서 GP 및 GT 분말 처리의 pH 영향.

(7) ADA 저해제에 의한 아데노신 생성 강화

표 2.3.2은 ADA저해제로 GF분말을 처리한 후 7일 및 14일 후 배양액 중의 아데노신 함량을 나타낸 것이다. 여기서 배양 시간이 오래될수록 아데노신 함량이 증가됨을 알 수 있다(그림 2.3.8, 표 2.3.2). 즉 ADA 저해제를 처리하지 않은 대조구에서는 14일 배양했음에도 아데노신은 거의 생성되지 않았고 코디세핀 만 ml 당 약 15 $\mu$ g 생성되었지만 GF분말 처리구는 7일에 68 $\mu$ g에서 14일 후에는 90 $\mu$ g인 반면 코디세핀은 거의 생성되지 않았다. GT 추출물 처리구에서도 유사한 결과를 보여주었다.

이는 액상배양에서 ADA 억제제를 처리하고 배양하면 짧은 시간에 아데노신 생성이 크게 증가됨을 보여준다. 그러나 이 연구에서 배양 시간과 ADA 억제제 처리 농도, ADA의 활성도 변화 등에 따라 아데노신과 코디세핀 생성량은 달라지는 것이 관찰되었기 때문에 아데노신 생산을 위한 최상의 조건 정립을 위해서는 더 많은 실험이 필요하다.

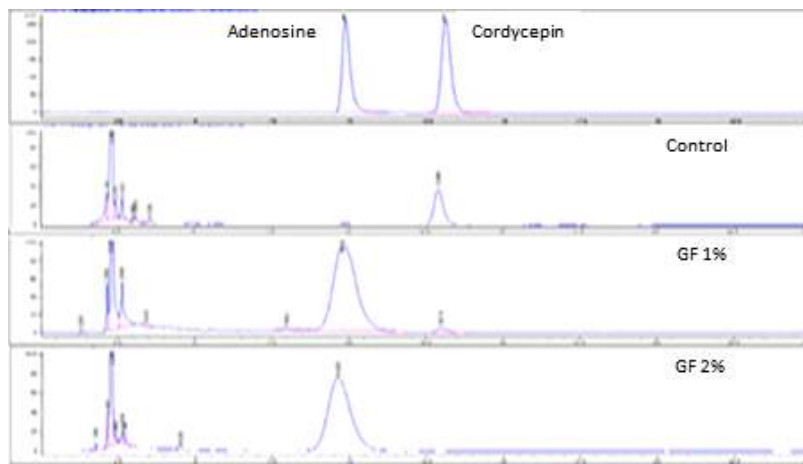


그림 2.3.8. GF 분말 처리에 의한 아데노신 생성 증가.

표 2.3.2. GF분말 처리 후 배양 시간에 따른 아데노신과 코디세핀 함량 변화

Treatment	time	Adenosine ( $\mu$ g/ml)	Cordycepin ( $\mu$ g/ml)
Control	7 days	-	-
	14 days	0	14.7
GF powder 1%	7 days	68.6	Trace
	14 days	90.3	Trace

표 2.3.3. GF분말 처리 농도에 따른 아데노신과 코디세핀 함량 변화

Treatment after 14 days		Adenosine (µg/ml)	Cordycepin (µg/ml)
Control	No treatment	0	17.0
GF powder	1% (NG 0.03%)	90.1	Trace
	2% (NG 0.06%)	89.2	Trace

### 라. 아데노신 추출 및 분리

#### (1) 생성된 아데노신 회수

상기와 같이 아데노신 생성을 증가시킨 배양액으로부터 아데노신을 회수하였다. 첫 단계로는 우선 배양액을 초음파처리하여 세포내에 존재하는 아데노신을 최대한 노출시킨 후 9,000rpm에서 10분간 원심분리하여 균사체 등 침전물을 제거하였다. 배양액에 존재하는 다당체 등을 제거하기 위하여 배양 여액의 부피가 절반이 될 때까지 농축하고 그의 3-4배 용량의 에틸알콜을 가하고 냉장실에서 15~18시간 방치하여 생성된 침전물은 원심분리하여 제거하였다. 이 아데노신 rich 분획을 분리 및 정제를 위해 사용하였다.

#### (2) 아데노신 분리

##### (가) NKA-II resin activation

아데노신 분리를 위해 NKA-II macoporous resin을 사용하였다. NKA-II resin은 사용 전에 먼저 protocol에 따라 수지를 활성화 시켰다. 활성화는 resin을 충분량의 에탄올에 4시간 동안 담겨 정치한 후 물로 세척하고, 이어서 0.2% NaOH, 물, 0.1% HCl, 물 순으로 4시간 이상 담근 후 증류수로 pH가 6~7 부근이 될 때까지 세척하는 순으로 진행하고 마지막 세척액의 pH 중성이 될 때까지 증류수로 하였다(그림 2.3.9). 그 후 38℃에서 완전히 건조하고 column chromatography 또는 batch type 분리에 사용되었다.



그림 2.3.9. NKA-II Macroporous resin activation.



(나) Column chromatography법

Column의 크기는 분리할 양에 따라 결정 되지만 본 연구에서는 실험실 수준에서의 직경 2.0cm 컬럼에 길이가 20cm의 컬럼을 사용하였다. 이 경우 배양액 15ml(아데노신 함량 1,350 $\mu$ g)를 흡착하였다. 용출액의 양은 컬럼의 bed volume을 기준으로 10% 에탄올 용액 2 bed volume 즉, 약 120ml로 먼저 용출하고 이어서 50% 에탄올 용액으로 2 bed volume 씩 두 차례 용출 하였다(그림 2.3.10). 마지막으로 2 bed volume의 70%에탄올로 용리하여 남아있을 수 있는 아데노신을 확인하였다. Scale up은 같은 비율로 확대 적용할 수 있다.



그림 2.3.10. NKA-II Macroporous resin을 이용한 elution pattern.

그림 2.3.11은 액상배양액에서 ADA 억제제 처리로 아데노신이 증가된 배양액 분획을 컬럼크로마토그래피를 이용해 분리한 결과이다. 그림에서와 같이 10% 에탄올 용액의 용리로 초기에 불순물이 제거되었고, 1차 50% 에탄올 용액에 의해 아데노신 만 깨끗하게 분리되었고 흡착된 아데노신의 60%가 회수되었다. 그리고 2차 50% 에탄올분획에서는 흡착량의 24%에 해당하는 329 $\mu$ g이 회수되었다. 그러나 70% 에탄올 분획에서는 아데노신이 전혀 검출되지 않았다. 이는 4 bed volume의 50% 에탄올 용액의 용출로 84%의 아데노신이 회수되어 4 bed volume의 용량으로 80% 이상의 비교적 높은 순도로 충분히 용출됨을 알 수 있었다(표 2.3.4)

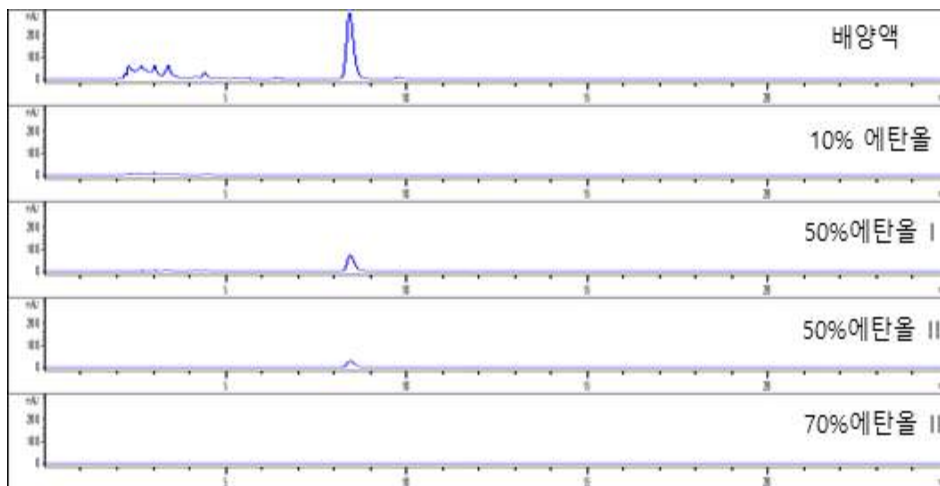


그림 2.3.11. 동충하초 액상배양 추출물의 NKA-II elution pattern.

표 2.3.4. NKA-II column chromatography에서 회수율 및 순도

Steps	Adenosine (µg)	회수율(%)	순도(%)
배양액 여과액	1,350	100	-
10% 에탄올	0	0	-
50%에탄올(I)	810	60	80.1
50%에탄올(II)	329	24	91.9
70% 에탄올	0	0	-
50%에탄올(Total)	1,239	84	86.0

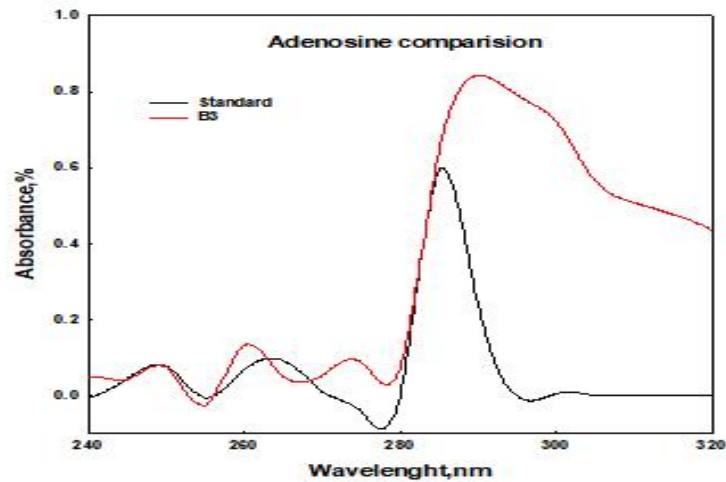


그림 2.3.12. 50% 에탄올 분획 아데노신의 UV spectrum.

(다) Batch type 분리

아데노신 대량분리를 위한 또 다른 한 가지 방법으로 NKA-II macroporous resin을 이용하여 batch type으로 흡착하여 분리를 실시하였다. 즉, 활성화된 NKA-II resin 2g에 11ml(아데노신 함량 990µg)의 배양액 여액을 첨가하고 상온에서 12시간 동안 shaking 하면서 흡착시켰다(그림 2.3.13). 흡착이 끝난 후 상등액을 decantation하고 먼저 50ml의 증류수로 세척하였다. 이어서 50% 에탄올 용액 50ml를 가하고 9시간 동안 shaking하면서 아데노신을 탈착시키고 상등액을 수집하고, 이어서 다시 50ml의 50% 에탄올 용액을 가해 4시간 동안 탈착하고 상등을 수집하였다. 수집한 각 회수액에서 아데노신 함량을 정량한 후 감압농축, 건조하여 아데노신을 회수하였다.



그림 2.3.13. batch type 아데노신 분리 방법.

그 결과 흡착되지 않은 불순물과 색소들은 흡착 후 decantation 과정에서 대부분 제거되었고, 이어서 증류수로 세척하는 분획에서는 아데노신이 전혀 검출되지 않았다. 그러나 1차 50% 에탄올 분획에서는 약간의 minor peak와 함께 약 60%의 아데노신이 회수되었다. 이어서 2차 탈착분획에서도 약 18%의 아데노신이 회수되었다. 그러나 순도는 약 74% 수분으로 높지 않았다.(그림 2.3.14, 표 2.3.5)

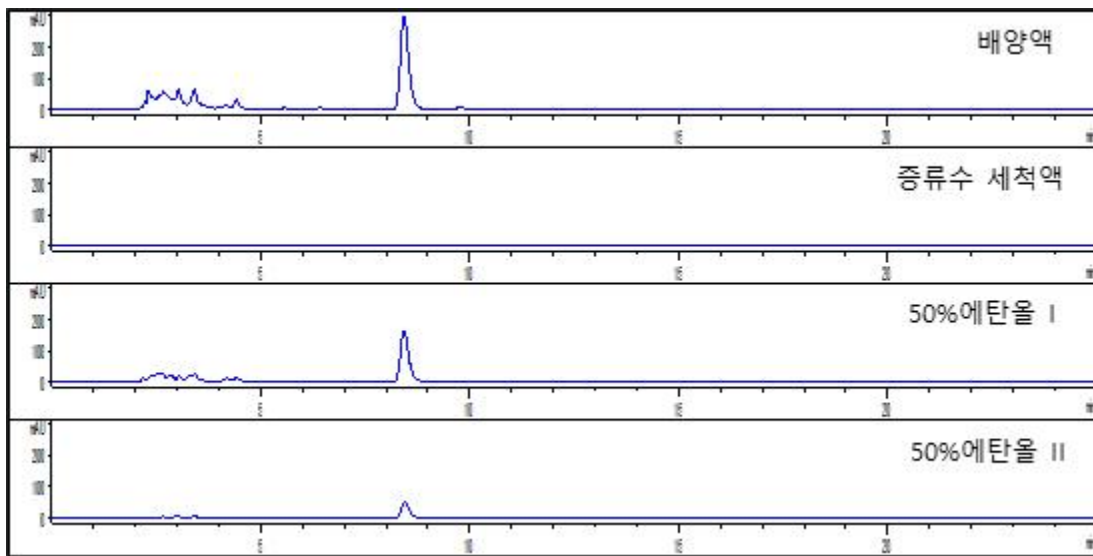


그림 2.3.14. 동충하초 액상배양액에서 NKA-II resin batch type 분리.

표 2.3.5. NKA-II resin batch type 분리에서 회수율 및 순도

Steps	Adenosine (µg)	회수율(%)	순도(%)
배양액 여과액	990	100	-
증류수 세척액	0	0	-
50%에탄올(I)	586	59	72.3
50%에탄올(II)	180	18	75.7
50%에탄올(Total)	766	77	74.0

#### (라) 분리방법 비교

본 연구에서 NKA-II macroporous resin을 이용한 아데노신 분리에서 batch type과 column 두 가지 방법을 비교하였다. 수율과 순도, 작업성, 소요시간 등 대부분의 지표에서 column chromatography 법이 다소 우수한 방법으로 평가되었다. 따라서 추후 이 방법을 scale up 시험을 통해 최적화 하고 대량생산에 활용하고자 한다.

#### 마. 아데노신 선택적 증강 및 신속분리방법의 의의

이 방법은 동충하초로부터 아데노신을 분해하는 효소의 활성을 천연저해제를 이용하여 억제함으로써 자실체 배양에서 8주 이상 걸리는 배양 기간을 단시간 즉 1~2주 배양으로 아데노신 함량을 획기적으로 증가시키고, 이 배양액으로부터 간단하고 쉽게 분리할 수 있는 새로운 기술이다. 또한, 이 기술로 생산된 천연 아데노신은 화장품의 주름개선 천연 기능성물질 또는 피부건강 기능성 물질로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

# 제 3장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

## 제 1절 목표 및 달성여부

### 1. 정량성과 및 달성 여부

성과목표												연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용-홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문		논문 평균 IF	학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
												SCI	비 SCI							
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	15			15	15	40			15											
최종목표	2			4	5	2			1		1	1								
1차년도	2			4	5	2			1		1	1								
소 계	2			4	5	2			1		1	1								
목표 소계	2			4	5	2			1		1	1								
달성 소계	2			4	5	6			2		1	1								
달성도(%)	100			100	100	300			200		100	100								

# 제 4장. 연구결과의 활용 계획

## 제 1절 연구종료 후 성과 창출계획

### 1. 연구 종료 후 연차별 정량성과 목표

성과목표												연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용-홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자 유치		논문		논문 평균 IF	학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
												SCI	비 SCI							
단위	건	건	건	건	백만 원	건	백만 원	백만 원	명	백만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	15			15	15	40			15											
최종목표	2			4	5	2			1		1	1								
1차년도	2			4	5	2			1		1	1								
소 계	2			4	5	2			1		1	1								
종료 1차년도					60		1000	500	1	500										
종료 2차년도					92		1500	800	4	1000										
종료 3차년도					120		2000	1000	4	1000										
종료 4차년도					180		3000	1500	5	1000										
종료 5차년도					240		4000	2000	5	1000										
소 계	2				692	2	11500	5700	19	4500										
합 계	2				692	2	11500	5700	20	4500										

## 제 2절 연구결과의 활용방안

### 1. 이전기술의 사후 관리

- 가. 기업에 이전한 기술이 조기에 정착 활용할 수 있도록 기술지원
- 나. 추가 연구로 발생하는 신기술 또는 보완기술 up-date 지원

### 2. 기업별 사업화 계획

#### 가. ○ 한방바이오(주)

- (1) 이전기술 : 동충하초 대량배양시스템 구축 및 원료 표준화 기술
- (2) 동충하초 고품질 원료생산 및 원료 사업화 지원
  - (가) 최적배양조건에서 양산체계 구축
  - (나) 표준화 원료 공급
  - (다) 아데노신분리용 원료 배양 공급
- (3) 건강식품 및 화장품원료 해외 수출
  - (가) 새롭한방, 에프앤비에서 제조한 건강기능식품 해외 수출 추진
  - (나) 뷰티맥스에서 개발한 화장품원료 해외수출

#### 나. ○ (주)새롭한방제약, (주)에프앤비바이오

- (1) 이전기술 : 2중기능건강식품 recipe
  - (가) 면역력증강-피부건강 2중기능건강식품(Inner beauty) 제조 판매
  - (나) 기 등록된 면역증강 고시형원료(에 피부미용 기능의 동충하초(천연 아데노신) 첨가 제품화
  - (다) 제품명 : 가칭 “동충하초 건강미인”
- (2) 제품형태
  - (가) 새롭한방 : 면역-피부건강 기능성 스틱형 음료
  - (나) 에프앤비바이오 : 항산화,미백,주름개선 먹는화장품 젤리스틱형 제품
  - (다) 제품생산 및 사업화
    - ① 제품명 및 포장 디자인 자체 개발
    - ② 각 기업보유 GMP생산시설에서 제품생산
    - ③ 기 구축한 유통채널을 통해 판매

#### 다. ○ (주)뷰티맥스

- (1) 이전기술 : 동충하초로부터 천연 아데노신 분리정제기술
- (2) 주름개선 천연 기능성화장품 원료 사업화
  - (가) 아데노신 고함유 동충하초 배양액을 한방바이오로부터 공급
  - (나) 기술이전 protocol에 따라 아데노신 분리 정제
  - (다) 원료표준화 후 원료사업
  - (라) 자체 브랜드 개발 ODM/OEM 제품에 기능성 원료로 사용

(3) 마케팅 및 판로개척

(가) 해외시장 개척

- ① 한방바이오(주)에서 기 구축한 해외기업에 완제품 및 원료 수출 추진
- ② 대상국: 중국 대경프리방, 심양 미래생명그룹, 인도네시아 갈배그룹 등
- ③ 예상목표 : 건강식품 년 30,000set 이상, 천연화장품 완제품원료 약 10톤(단가미정)

(나) ○ 국내시장

- ① (주)새롬한방제약, (주)에프앤비바이오 및 (주)뷰티맥스
- ② 복합기능건강음료 유통: 홈쇼핑 및 대형마트 납품, 주요 일간지 매체를 통한 유통, 연간 10만세트 판매 10% 마진 확보 가능. 유통 시스템이 갖춰진 뒤에는 연간 10% 성장 예상
- ③ 2021년부터 새로운 비즈니스모델을 개발 적극적인 마케팅 활동 전개
  - ㉠ 기 활동 중인 국내 유통망 활성화 : 전문유통기업, 인터넷판매 등
- ④ 신규 비즈니스모델 개발 운영(공동개발기관과 협력 추진)
  - ㉠ IP-Based SNS Promotion : 기술기반의 복합, 다기능제품 홍보
  - ㉡ Niche market 집중공략 등

### 제 3절 후속 연구의 필요성 및 계획

1. 동충하초 추출물의 피부건강 기능식품 원료 등록을 위한 추진 계획

- 가. 자체 예산 확보와 후속연구과제( 2021 IPET 우수과제후속연구사업 신청 등)를 통한 *In vitro* 및 *In vivo* 효능입증과 이를 통한 제품화와 홍보
- 나. 효능 입증 자료를 토대로 피부건강 건강기능식품 개별인정형 원료 등록 및 산업화
- 다. 천연 원료 이미지 부각으로 산업적 활용과 홍보 극대화

#### □ 피부건강 개별인정형 원료 등록을 위한 후속 연구





## 붙임. 참고문헌

- Ahn, H.Y., J.H. Lee, M.J. Kang, J.Y. Cha and Y.S. Cho. 2012. Fibrinolytic activity and chemical properties of cordycepin-Enriched *Cordyceps militaris* JLM 0636. *J. Life Sci.* 22:226-231.
- Cha, W.S., B.S. Cho and S.Y. Park. 2004. A study on the composition of *Cordyceps militaris* extract and mycelium. *J. Life Sci.* 14:727-731.
- Cai, Z.L., C.Y. Wang, Z.J. Jiang, H.H. Li, W.X. Liu, L.W. Gong, P. Xiao and C.H. Li. 2013. Effects of cordycepin on Y-maze learning task in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 714:24-253.
- Chin, J.E., H.S. Lee and K.C. Kim. 2006. Effect of mushroom extracts on tyrosinase promoter. *Kor. J. Sanitation* 21:1-8.
- Choi, I.Y., J.S. Choi, W.H. Lee, Y.J. Yu, G.T. Joung, I.O. Ju and T.K. Choi. 1999. The condition of production of artificial fruiting body of *Cordyceps militaris*. *Kor. J. Mycol.* 27:243-248.
- Choi, Y.S., H.K. Kim, B.J. Lee and Y.G. Kim. 2009. Characteristics and breeding of a new variety *Cordyceps militaris* 「Yedang 3」. *J. Mushrooms* 7:182-186.
- Choi, Y.W., K.D. Hyde and W. Ho. 1999. Single spore isolation of fungi. *Fungal Divers.* 3:29-38
- Choi, J.H., G.S. Kim, S.E. Lee, J.E. Cho, G.H. Sung, D.Y. Lee, S.Y. Kim, T.H. Lee and H.J. Noh. 2012. Anti-inflammatory effects of *Cordyceps militaris* extracts. *J. Mushrooms* 10:249-253.
- Das, S.K., M. Masuda, A. Sakurai and M. Sakakibara. 2010. Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris* : current state and prospect. *Fitoterapia* 81:961-968.
- Dong J.Z., C. Lei, X.R. Ai and Y. Wang. 2012. Selenium enrichment on *Cordyceps militaris* Link and analysis on its main active components. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 166:1215-1224.
- Hong, S.M., H.D. Cho, J.H. Kim, J.Y. Lee, J.M. Park and K.I. Seo. 2016. Anti-oxidant and anti-proliferative effects of water extract mixture of *Cordyceps militaris* and *Allium tuberosum*. *J. Life Sci.* 26:805-811.
- Hur, H. 2008. Chemical ingredients of *Cordyceps militaris*. *Mycobiology* 36:233-235.
- Jeong, J.W., C.Y. Jin, M.O. Kim, J.Y. Lee, Y.H. Choi and J.D. Lee. 2009. RAPD analysis and cordycepin concentration of hybridized *Cordyceps militaris* strains by mating. *Kor. J. Mycol.* 37:86-90.
- Jo, S.J., T.H. Lee, D.H. Chae and Y.H. Han. 2004. Optimization of culture condition and media composition on the production of cordycepin by *Cordyceps militaris*. *Kor. J. Microbiol.* 40:217-220.
- Jo, S.J., T.H. Lee, D.H. Chae and Y.H. Han. 2005. Effect of light conditions on production of cordycepin of *Cordyceps militaris*. *Kor. J. Microbiol.* 41:236-238.
- Kang, N., H.H. Lee, I. Park and Y.S. Seo. 2017. Development of High Cordycepin-Producing *Cordyceps militaris* Strains. *Mycobiology*. 2017 Mar; 45(1):31-38.
- Kim, J.R. S.H. Yeon, H.S. Kim and Y.J. Ahn. 2002. Larvicidal activity against *Plutella xylostella* of cordycepin from the fruiting body of *Cordyceps militaris*. *Pest Manag. Sci.* 58:713-717.
- Kim, J.R., S.H. Yeon, H.S. Kim, and Y.J. Ahn. 2002. Larvicidal activity against *Plutella xylostella*

- of cordycepin from the fruiting body of *Cordyceps militaris*. *Pest Manag. Sci.* 58:713-717.
- Kim, S.W., C.P. Xu, H.J. Hwang, J.W. Choi, C.W. Kim and J.W. Yun. 2003. Production and characterization of exopolysaccharides from an entomopathogenic fungus *Cordyceps militaris* NG3. *Biotechnol. Prog.* 19:428-435.
- Kim, H.S., Y.J. Rho and M. Choe. 2005. *Cordyceps militaris* increases hepatic glukokinase activities. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 34:158-161.
- Kim, H.J., T.H. Lee, Y.S. Kwon, M.W. Son and C.K. Kim. 2012. Immunomodulatory activities of ethanol extract of *Cordyceps militaris* in immunocompromised mice. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 41:494-500.
- Kim, Y.D., S.H. Kwak, K.J. Kim, K.S. Seo, T.Y. Park, K.Y. Yu and S.W. Jin. 2014. The analysis of useful components in *Flammulina velutipes* fruit body, *Flammulina velutipes* mycelium and *Cordyceps militaris* mycelium. *J. Mushrooms* 12: 193-200.
- Lee, H.M., Y.J. Lee and T.S. Park. 2004. Tumor growth inhibitory and immunomodulatory activities of *Cordyceps militaris* water extracts in ICR mice bearing Sarcoma-180 solid tumor. *J. Kor. Soc. Food. Sci. Nutr.* 33:59-65.
- Lee, S.M., N.S. Park and E.J. Park. 2006. Effects of *Cordyceps militaris* cultivated on rice on lipid metabolism in rats fed high fat-cholesterol diet. *J. Food Sci. Nutr.* 11:36-41.
- Lee, D.E., S.Y. Lee, J.S. Kim, C.K. Cho, H.S. Yoo and S.I. Choi. 2009. Antitumor effect of Hang-Am-Dan(HAD) and its ingredients on Calu6 and MCF-7 human cancer cell lines. *Kor. J. Orient. Med.* 30:50-60.
- Lee, B.J., M.A. Lee, Y.G. Kim, K.W. Lee, Y.S. Choi, B.E. Lee and H.Y. Song. 2013. Cultural characteristics of *Cordyceps militaris* strain 'Yedang 3' on various media and nutritional conditions. *J. Mushrooms* 11:124-130.
- Lee, B.J., M.A. Lee, Y.G. Kim, K.W. Lee, Y.S. Choi and B. E. Lee. 2015. Varietal characteristics of cross-bred *Cordyceps militaris* 'Dowonhonghco'. *J. Mushrooms* 13:151-156.
- Lee, S.M, Y.G. Kim, H.C. Park, K.K. Kim, H.J. Son, C.O. Hong and N.S. Park. 2017. Properties of the Silkworm (*Bombyx mori*) Dongchunghacho, a Newly Developed Korean Medicinal Insect-borne Mushroom: Mass-production and Pharmacological Actions. *Journal of Life Science* 27(2);247-266.
- Lou H., J. Lin, L. Guo, X. Wang, S. Tian, C. Liu, Y. Zhao and R. Zhao. 2019. Advances in research on *Cordyceps militaris* degeneration. *ppl Microbiol Biotechnol.* 103(19):7835-7841.
- Masino, S.A., M.Jr. Kawamura, L.M. Plotkin, J. Svedova, Fj Jr. DiMario and I.M. Eigsti. 2011. The relationship between the neuromodulator adenosine and behavioral symptoms of autism. *Neurosci Lett.* 500(1):1-5.
- Nallathamby, N., L.S. Guan-Serm, S.N. Abd Vidyadaran, J. Malek, V. Raman and Sabaratnam. 2015. Ergosterol of *Cordyceps militaris* Attenuates LPS Induced Inflammation in BV2 Microglia Cells. *Nat Prod Commun.* 10(6):885-6.
- Nam, S.H., C.S. Yoon, I.Y. Jung, S.D. Ji, S.Y. Cho and M.S. Han. 2002. Occurrence and Characteristics of other Fungi in the Artificial Cultivation Farms of *Paecilomyces tenuipes* 한국잡사학회지 44(1) 32~36

- Oh, S.W., S.H. Kim, H.N. Song and D. Han. 2003. Comparative chemical compositions of four kinds of Tochukaso. *Kor. J. Food Sci Technol* 35(1) 15-22.
- Ohta, Y., J.B. Lee, K. Hayashi, A. Fujita, D.K. Park and T. Hayashi. 2007. In vivo anti-influenza virus activity of an immunomodulatory acidic polysaccharide isolated from *Cordyceps militaris* grown on germinated soybeans. *J. Agric. Food Chem.* 55:10194-10199
- Olatunji, O.J., J. Tang, A. Tola, F. Auberon, O. Oluwaniyi and Z. Ouyang. 2018. The genus *Cordyceps*: An extensive review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology *Fitoterapia* 129, 293-316
- Park, C.S., C.J. Kwon, M.A. Choi, G.S. Park and K.H. Choi. 2002. Antioxidative and nitrite scavenging activities of *Cordyceps militaris* extracts. *Kor. J. Food Preserv.* 9:109-113.
- Sato, H. and M. Shimazu. 2002. Homothallism in *Cordyceps militaris*. Book of Abstracts of the 7th International Mycological Congress, August 11-17. Oslo, Norway, p. 311.
- Sung, J.M., S.H. Kim, C.S. Yoon, G.H. Sung and Y.W. Kim. 1999. Analysis of genetic relationship of *Cordyceps militaris* in Korea by random amplified polymorphic DNA. *Kor. J. Mycol.* 27:256-273.
- Sung, G.H., N.L. Hywel-Jones, J.M. Sung, J.J. Luangsa-Ard, B. Shrestha and J.W. Spatafora. 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi, *Stud. Mycol.*, 57:5-59.
- Shrestha, B., H.K. Kim, G.H. Sung, J.W. Spatafora and J.M. Sung. (2004). Bipolar heterothallism, a principal mating system of *Cordyceps militaris in vitro*. *Biotechnol. Bioprocess. Eng.*, 9: 440-446.
- Shrestha, B., Y.J. Park, S.K. Han, S.K. Choi and J. M. Sung. 2004. Instability in in vitro fruiting of *Cordyceps militaris*. *J. Mushrooms* 2:140-144.
- Shrestha, B., W. Zhang, Y. Zhang and X. Liu. 2012. The medicinal fungus *Cordyceps militaris*: Research and development. *Mycol. Prog.* 11:599–614.
- Tran N.Q. and D.X. Tran. 2019. Xanthine Oxidase Inhibitory Potential, Antioxidant and Antibacterial Activities of *Cordyceps militaris* (L.) Link Fruiting Body. *Medicines (Basel)*. Jan 29;6(1):20.
- Tuli, H.S. A.K. Sharma, S.S. Sandhu and D. Kashyap. 2013. Cordycepin: a bioactive metabolite with therapeutic potential. *Life Sci.* 93:863–869.
- Yang, H., S. Kim, M. Jang, H. Kim, S. Lee, Y. Kim, Y. Eom, G. Kang, L. Chiang, J.H. Baek, J.H. Ryu, Y.E. Lee, J. Koh and H. Jung. 2019. Two-phase delivery using a horse oil and adenosine-loaded dissolving microneedle patch for skin barrier restoration, moisturization, and wrinkle improvement. *J Cosmet Dermatol.* 18(3):936-943.
- Yokoyama, E., K. Yamagishi and A. Hara. 2005. Structures of the mating-type loci of *Cordyceps takaomontana*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:5019-5022.
- Zhang J, C. Wen, Y. Duan, H. Zhang and H. Ma. 2019. Advance in *Cordyceps militaris* (Linn) Link polysaccharides: Isolation, structure, and bioactivities: A review. *Int J Biol Macromol.* 132:906-914.

[별첨 1]

### 연구개발보고서초록

과 제 명	(국문) 유용성분 고 함유 동충하초 대량생산 및 이를 이용한 복합기능성 건강식품소재 개발 및 제품화 (영문) Development of multi functional health foods using the new bio-materials containing enriched special components from <i>Cordyceps militaris</i>				
주관연구기관	경희대학교 산학협력단		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 생명과학대학	
참 여 기 업	농업법인(주)새롭한방제약 (주)뷰티맥스, 한방바이오(주) 농업회사법인(주)에프앤비바이 오			(성명) 양덕춘	
총연구개발비	계	200,000,000원	총 연구 기간	2019.12.02. ~ 2020. 12. 01 (1년0월)	
(200,000천원)	정부출연 연구개발비	150,000,000원	총 참 여 연 구 원 수	총 인 원	19명
	기업부담금	50,000,000원		내부인원	19명
	연구기관부담금	-		외부인원	0명
<p>1. 연구개발 목표 및 성과</p> <p>가. Cordycepin과 adenosine 고 함유 동충하초 대량배양기술 정립</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 토종 유용 종균 선발 및 특성규명</li> <li>2) 유용성분 고 함유 최적 배양조건 정립</li> <li>3) 동충하초 대량배양 시스템 정립</li> </ol> <p>나. 유용성분 고 함유 복합기능 건강식품 개발</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 동충하초 자실체 원료 표준화</li> <li>2) 동충하초 함유 2중 기능 건강기능식품 시제품 개발</li> <li>3) 동충하초 첨가 기능성 시너지 효과 검증</li> </ol> <p>다. 동충하초에서 이너뷰티용 adenosine 원료 생산기술 정립</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) ADA 억제제 처리에 의한 아데노신 생성 증가 기술 정립</li> <li>2) 아데노신 신속 분리기술 정립</li> </ol> <p>2. 연구내용 및 결과</p> <p>가. Cordycepin과 adenosine 고 함유 동충하초 대량배양기술 정립</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 토종 유용 종균 선발 및 특성규명 : <i>Cordyceps militaris</i> HB8 (NCBI Asscession number MT835161)</li> <li>2) 유용성분 고 함유 최적 배양조건 정립             <ol style="list-style-type: none"> <li>가) 고상배양에서 최적 배지 및 배양조건 정립 : 자실체의 코디세핀 8.6mg/g, 아데노신 2.45mg/g</li> <li>나) ADA 억제제 처리에 의한 아데노신 생성 강화 : 액상배양 70mg/L, 고상배양(초기) 약 50% 증가</li> <li>다) 단일포자교배법에 의한 동충하초 자실체 안정화 기술 정립 : 우량개체 선발 유전자 확인</li> </ol> </li> <li>3) 반자동화형 대량배양 시스템 정립 : 중형 208m<sup>2</sup>, 공장형 1,008m<sup>2</sup> 규모 설계 (건조 자실체 년 3톤 생산 규모)</li> </ol>					

나. 유용성분 고 함유 복합기능 건강식품 개발

1) 동충하초 자실체 원료 표준화

가) 자실체 분말(Cm P), 농축액(Cmex), 및 농축액 분말(Cmex P, SD분말) 3종 원료 표준화 및 제품화

2) 동충하초 함유 면역력 증강-피부건강 2중 기능 건강기능식품 시제품 2종 개발

가) 동충하초추출물, 면역력증강-피부건강 고시형 원료 및 GT, RG 등 유용 소재 첨가로 기능이 강화된 제품

3) 동충하초 추출물 첨가 효능 시너지 효과 검증 : NO 및 ROS 생성억제, 항산화, 미백 활성화 등.

다. 동충하초에서 이너뷰티용 아데노신 원료 생산기술 정립

1) ADA 억제제 처리에 의한 주름개선 기능성 원료인 아데노신 생성 증가 기술 정립

가) ADA 천연 억제제 GF 및 GT 처리, 1~2주 액상배양으로 아데노신을 L당 약 70mg 이상 생성

2) 배양액으로부터 아데노신 분리기술 정립 : NKA-II macroporous resin 활용 신속분리

가) 회수율 85% 및 순도 80% 이상

나) Batch type 보다 column type이 효율성이 높음.

3. 연구성과 활용실적 및 계획

가. 연구논문 2편 (SCI 1, 비SCI 1편)

나. 특허출원 2건

다. 기술이전 4건

라. 2중기능 건강기능식품 시제품 개발 2건, 동충하초 건강미인 음료제품 등 제품화 등 4건

마. 유용성분 고 함유 동충하초 대량생산 기술을 이용한 고부가가치 식품원료 사업화

바. 복합 기능성 건강식품 개발 제품화로 동충하초 산업 활성화

[별첨 2]

## 자체평가의견서

### 1. 과제현황

		과제번호		119111-01	
사업구분	2019고부가가치식품기술개발사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	고부가가치식품기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	유용성분 고 함유 동충하초 대량생산 및 이를 이용한 복합기능성 건강식품소재 개발 및 제품화			과제유형	(기초,응용,√개발)
연구기관	경희대학교 산학협력단			연구책임자	양덕춘
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2019.12.02.- 2020.12.01	150,000	50,000	200,000
	2차연도	-	-	-	-
	3차연도	-	-	-	-
	4차연도	-	-	-	-
	5차연도	-	-	-	-
	계	1년	150,000	50,000	200,000
참여기업	농업법인(주)새롭한방제약, (주)뷰티맥스, 한방바이오(주), 농업회사법인(주)에프앤비바이오				
상대국	상대국연구기관				

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2020. 01. 11.

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
경희대학교	교수	양덕춘

4. 평가자(연구책임자) 확인 : 양덕춘

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	
----	---

## I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (■아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 1) 동충하초 토종 우량 종균 분리, 유전 및 형태학적 특성 구명, *C. militaris* HB8로 명명, 등록
  - 2) 최적배양조건 정립으로 코디세핀, 아데노신, 자실체 생성 등 강화 목적에 따라 선택적 활용 가능
  - 3) Adenosine deaminase(ADA) 천연 억제제를 선발, 활용하여, 고상배양 및 액상배양에서 아데노신 생성강화 기술 정립
  - 4) 단일포자교배시스템을 이용 자실체 안정화 기술 정립, 계대배양에 따른 자실체 퇴화 방지
  - 5) 건조 자실체 년 3톤 생산 규모의 반자동화 공장형 대량배양시스템 설계 지원
  - 6) 동충하초 자실체 원료 표준화 기술(분말, 추출물, SD분말) 정립 및 원료 제품화
  - 7) 동충하초 함유 2중기능(면역-피부) 건강식품(Inner beauty) 2종 개발, 기능 강화 효과 확인
  - 8) 주름개선 기능성 원료 천연 아데노신 신속분리 기술개발, NKA-II resin macroporous 활용
- 특허출원 2건, 논문 2편, 기술이전 4건, 원료제품화 6건, 고용창출 2명, 기술료 5백만원

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (■아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 동충하초 고부가가치 식품산업화 촉진
  - 유용성분 고 함유 동충하초 원료 확보로 연관제품 품질 고급화 유도
  - 새로운 고기능성 식품원료로 복합기능 건강식품, Inner beauty 제품개발 촉진
- 스마트영농으로 재배농가 소득증대 및 사업 활성화에 기여
  - 자실체 퇴화방지기술, 친환경 배지 - 고품질 고품질 동충하초 원료 안정적 생산
  - ADA억제제에 의한 특정성분 강화기술 - 원료품질고급화, 활용 다양화
  - 반자동화 대량재배기술 - 생산가격 경쟁력 강화
- 특정성분 강화 및 분리로 동충하초 사업 다각화
  - 주름개선 기능성 화장품 천연원료, 코디세핀을 이용한 의약품, 동물항생제 개발 등
  - 고품질 원료 해외수출 증대 및 수입 대체원료로 활용 외화 절감

### 3. 연구개발결과에 대한 활용 가능성

■ 등급 : (■아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 고품질 동충하초 안정적 대량생산 및 산업화에 활용
  - 토종 우량 종균 확보, 유용성분 고 함유 원료생산, 자실체 퇴화 방지 배양 기술 적용 등
- 건강기능식품, 주름개선 기능성화장품 원료로 활용 동충하초 고부가가치 산업화에 기여
- 코디세핀, 아데노신 등 유용성분을 분리하여 의약품, 화장품 산업에 응용 다각화
- 4개 기업에 기술(노하우)이전 기 실용화 달성
  - 동충하초 함유 2중 기능 건강식품(면역-피부) 개발 제품화 - (주)에프앤비바이오, (주)새롬한방
  - 동충하초 대량생산 및 원료 표준화 기술 - 한방바이오(주)
  - 동충하초로부터 주름개선 기능성 원료 아데노신 신속분리 기술 - 뷰티맥스(주)

### 4. 연구개발 수행 노력의 성실도

■ 등급 : (■아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 단기 연구기간(1년)에 비해 상대적으로 많은 성과를 도출한 것으로 사료됨

### 5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (■아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 논문 2편(SCI 1, 비SCI 1)
  - ① Isolation of New strain of *Cordyceps militaris* HB8 and Optimal Condition for Production of Adenosine and Cordycepin in Fruit Body. 2020, Korean J. Plant Res. 33(6) 696-706
  - ② *Cordyceps militaris* fungus extracts mediated nanoemulsion for improvement in antioxidants, anti-microbial and anti-inflammatory activities(IF = 3.267)
- 특허 2건
  - ① 큰번데기동충하초(*Corcyceps militaris*)의 모균배양과 균사체 배양방법(10-2020-0154620)
  - ② 큰번데기동충하초(*Cordyceps militaris*)의 대량생산과 유용성분 함량 강화를 위한 최적 배양조건(10-2020-0154827)



## II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
<p>1. 유용성분 고함유 동충하초 대량생산 기술 정립</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 토종 동충하초 우량 종균 분리 동정</li> <li>- 유용성분 강화 배양조건 정립</li> <li>- ADA inhibitor처리에 의한 강화</li> <li>- 대량생산시스템 설계</li> </ul>	50	100	<p>1) 토종 유용 종균 선발 및 특성규명 : <i>Cordyceps militaris</i> HB8 (NCBI Asscession number MT835161)</p> <p>2) 유용성분 고 함유 최적 배양조건 정립</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 고상배양에서 최적 배지 및 배양조건 정립 : 자실체의 코디세핀 8.2mg/g, 아데노신 2.45mg/g</li> <li>- ADA 억제제 처리에 의한 아데노신 생성 강화 : 액상배양 70mg/L, 고상배양(초기) 약 50% 증가</li> <li>- 단일포자교배법에 의한 동충하초 자실체 안정화 기술 정립 : 우량개체 선발 유전자 확인</li> </ul> <p>3) 반자동화형 대량배양 시스템 정립 : 중형 208㎡, 공장형 1,008㎡ 규모 설계 (건조 자실체 년 3톤 생산 규모)</p>
<p>2. 복합기능 건강식품(Inner Beauty) 2종 이상 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 면역증강, 피부건강 복합기능 제품 2종 개발</li> <li>- 식약처 기능성 지표성분 함량 충족</li> <li>- 관능적 특성 및 각 원료의 내용 성분을 고려 최적배합비 설정 및 최적 제형 설정</li> </ul>	30	100	<p>1) 동충하초 자실체 원료 표준화</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 자실체 분말(Cm P), 농축액(Cmex), 및 농축액 분말(Cmex P, SD분말) 3종 원료 표준화 및 제품화</li> </ul> <p>2) 동충하초 함유 면역력 증강-피부건강 2종 기능 건강기능식품 시제품 2종 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 동충하초추출물, 면역력증강-피부건강 고시형 원료 및 GT, RG 등 유용 소재 첨가로 기능이 강화된 제품</li> </ul> <p>3) 동충하초 추출물 첨가 효능 시너지 효과 검증 : NO 및 ROS 생성억제, 항산화, 미백 활성 등.</p>

<p>3. 기능성 화장품 천연 원료 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Adenosine 최적 추출 조건 정립</li> <li>- Adenosine 신속 분리 정제, 원료 표준화 기술 정립</li> </ul>	20	100	<p>1) ADA 억제제 처리에 의한 주름개선 기능성 원료인 아데노신 생성 증가 기술 정립</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- ADA 천연 억제제 GF 및 GT 처리, 1~2주 액상배양으로 아데노신을 L당 약 70mg 이상 생성</li> </ul> <p>2) 배양액으로부터 아데노신 분리기술 정립 : NKA-II macroporous resin 활용 신속분리</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 회수율 85% 및 순도 80% 이상</li> <li>- Batch type 보다 column type이 효율성 높음.</li> <li>- 아데노신 첨가량 0.04%</li> </ul>
합계	100	100	

### III. 종합의견

#### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

<ul style="list-style-type: none"> <li>- 동충하초(<i>Cordyceps militaris</i>)는 코디세핀과 아데노신 등 유용한 생리활성 물질을 함유하고 있고 다양한 효능이 잘 알려져 있음에도 불구하고 현재까지 산업화가 활성화되지 못하고 있는 것이 현실임. 그 가능한 이유로는 원료가 고가인 데다 품질이 일정한 원료의 안정적 공급이 어렵고, 버섯보다는 번데기(worm)에 대한 혐오이미지 연상, 시장에서 식품과 의약품의 애매한 포지션 등을 들 수 있음.</li> <li>-</li> <li>- 이 연구의 목적은 유용성분의 함량이 높은 고품질 원료를 보다 경제적이고 안정적으로 생산할 수 있는 기술을 개발, 적용하고, 동충하초가 가지고 있는 생리활성을 부가가치가 높은 제품개발에 응용함으로써 동충하초의 고부가가치 산업화를 유도하는데 있음.</li> <li>- 특히 계대배양시에 나타나는 자실체의 퇴화나 유용성분 감소 현상을 방지할 수 있는 기술, 특정 유용성분의 함량을 증가시킬 수 있는 기술, 이들 성분을 분리하는 기술 등을 개발 응용하여 원료 품질고급화는 물론 동충하초 활용 다각화에 기여하고자 함.</li> <li>-</li> <li>- 이 연구에서 얻은 대표적인 결과는 아래와 같음 <ul style="list-style-type: none"> <li>1) 국내에서 새로운 우량 균주 <i>Cordyceps militaris</i> HB8을 분리, 특성 구명</li> <li>2) 코디세핀 및 아데노신 함량, 자실체 생산량 최적 배양조건정립</li> <li>3) 자실체 퇴화방지를 위한 단일포자교배법으로 우수 균주 제작 및 stock 사용</li> <li>4) ADA 천연 억제제 GF, GT 등을 발굴 및 이를 이용한 아데노신, 코디세핀 생성 증가기술 정립</li> <li>5) 가격경쟁력 강화를 위한 반자동화 대량생산시설 설계 지원</li> <li>6) 자실체 원료 표준화 및 제품화 기술개발</li> <li>7) 동충하초 추출물 함유 2중기능(면역력증강-피부건강) Inner beauty 개발</li> <li>8) ADA 억제제 처리로 함량이 강화된 액상배양액에서 아데노신 신속 분리 정립</li> </ul> </li> </ul>
--

- 이 연구결과를 토대로 고품질 원료 생산기술에 관한 2편의 논문게재, 2건의 특허출원 등 지식재산을 확보하였으며, 고부가가치 제품화를 위한 자실체 원료표준화 및 3건의 Inner beauty 제품을 개발하고, 개발한 원천기술들을 연구에 참여한 4개의 기업에 기술을 이전 실용화하였음.
- 
- 짧은 연구기간 (1년) 내에 동충하초를 재배에서 제품화에 이르기까지 고부가가치 산업화에 필요한 요소 기술을 개발 실용화 한 연구사업임.

## 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 새로운 기술을 이용한 기능성 성분 선택적, 신속 생산 기술개발
- 단일포자교배(Single ascospore mating) 기술을 통한 우수 균주 제작 기술
- ADA inhibition 기술을 통한 유용성분 고도화
- 동충하초 활용 다각화 및 고부가가치 산업화를 위한 원천기술 재고
- 연구 기간에 비한 성과물

## 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 1) 이전기술의 사후 관리
  - 기업에 이전한 기술이 조기에 정착 활용할 수 있도록 기술지원
  - 추가 연구로 발생하는 신기술 또는 보완기술 up-date 지원
- 2) 기업별 사업화 계획
  - 한방바이오(주)
    - 이전기술 : 동충하초 대량배양시스템 구축 및 원료 표준화 기술
    - 동충하초 고품질 원료생산 및 원료 사업화 지원
      - 최적배양조건에서 양산체계 구축
      - 표준화 원료 공급
      - 아데노신분리용 원료 배양 공급
    - 건강식품 및 화장품원료 해외 수출
      - 새롬한방, 에프앤비에서 제조한 건강기능식품 회외 수출 추진
      - 뷰티맥스에서 개발한 화장품원료 해외수출
  - (주)새롬한방제약, (주)에프앤비바이오
    - 이전기술 : 2중기능건강식품 recipe
      - 면역력증강-피부건강 2중기능건강식품(Inner beauty) 제조 판매
      - 기 등록된 면역증강 고시형원료(에 피부미용 기능의 동충하초(천연 아데노신) 첨가 제품화
      - 제품명 : 가칭 “동충하초 건강미인”

- 제품형태
  - o 새롬한방 : 면역-피부건강 기능성 스틱형 음료
  - o 에프앤비바이오 : 항산화,미백,주름개선 먹는화장품 젤리스틱형 제품
- 제품생산 및 사업화
  - o 제품명 및 포장 디자인 자체 개발
  - o 각 기업보유 GMP생산시설에서 제품생산
  - o 기 구축한 유통채널을 통해 판매
- (주)뷰티맥스
  - 이전기술 : 동충하초로부터 천연 아데노신 분리정제기술
  - 주름개선 천연 기능성화장품 원료 사업화
    - o 아데노신 고함유 동충하초 배양액을 한방바이오로부터 공급
    - o 기술이전 protocol에 따라 아데노신 분리 정제
    - o 원료표준화 후 원료사업
    - o 자체 브랜드 개발 ODM/OEM 제품에 기능성 원료로 사용
- 3) 마케팅 및 판로개척
  - 해외시장 개척
    - 한방바이오(주)에서 기 구축한 해외기업에 완제품 및 원료 수출 추진
    - 대상국: 중국 대경프리방, 심양 미래생명그룹, 인도네시아 갈배그룹 등
    - 예상목표 : 건강식품 년 30,000set 이상, 천연화장품 완제품원료 약 10톤(단가미정)
  - 국내시장
    - (주)새롬한방제약, (주)에프앤비바이오 및 (주)뷰티맥스
    - 복합기능건강음료 유통: 홈쇼핑 및 대형마트 납품, 주요 일간지 매체를 통한 유통, 연간 10만세트 판매 10% 마진 확보 가능. 유통 시스템이 갖춰진 뒤에는 연간 10% 성장 예상
    - 2021년부터 새로운 비즈니스모델을 개발 적극적인 마케팅 활동 전개
      - o 기 활동 중인 국내 유통망 활성화 : 전문유통기업, 인터넷판매 등
    - 신규 비즈니스모델 개발 운영(공동개발기관과 협력 추진)
      - o IP-Based SNS Promotion : 기술기반의 복합, 다기능제품 홍보
      - o Niche market 집중공략 등

#### IV. 보안성 검토

○ 아래 2가지 사항은 기업기밀 사항으로 보안이 요구 됨.

- 1) ADA 천연 억제제 종류 및 활용방법에 관한 정보
- 2) 복합기능건강식품(Inner beauty) recipe 2종

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

##### 1. 연구책임자의 의견

보안성 필요 해당(세부내용 위와 동)

##### 2. 연구기관 자체의 검토결과

보안성 필요 해당(세부내용 위와 동)

[별첨 3]

### 연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제		분 야	LA0906
연구과제명	유용성분 고 함유 동충하초 대량생산 및 이를 이용한 복합기능성 건강식품소재 개발 및 제품화			
주관연구기관	경희대학교 산학협력단		주관연구책임자	양덕춘
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	150,000,000원	50,000,000원	-	200,000,000원
연구개발기간	2019. 12. 02 ~ 2020. 12. 01			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타(    ) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:    )			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① Cordycepin과 adenosine 고 함유 동충하초 대량배양기술 정립	- 토종 유용 종균 <i>C. militaris</i> HB8 분리 등록 - Cordycepin, adenosine 강화 배양 조건 정립 o 배지조성변화 및 ADA 억제제 처리 등 o 최대 코디세핀 8.6mg/g, 아데노신 70mg/L 이상 - 대량생산 시스템 정립 : 년 3톤 규모 반자동화 시스템
② 동충하초 유용성분 고 함유 복합기능성건강식품 (면역증강-피부건강) 2종 개발	- 동충하초 추출물함유 + 고시형 원료 포함한 면역력증강-피부건강 2종기능성 제품개발 2종 - Bioassay를 통한 기능성 강화 효과 입증
③ 동충하초에서 이너뷰티용 adenosine 원료 생산기술 정립	- ADA 억제제 처리에 의한 아데노신 증강기술 정립 o 2주 액상배양에서 70~90mg/L 생성 - NKA-II 이용 간편 신속분리기술 정립, 순도 80% 이상

\* 결과에 대한 의견 첨부 가능

### 3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문		논문 평균 IF	학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
												SCI	비SCI							
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	15			15	15	40			15											
최종목표	2			4	5	2			1		1	1								
연구기간내 달성실적	2			4	5	6			2		1	1								
달성율(%)	100			100	100	100			100		100	100								

### 4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	- 동충하초 대량생산 및 원료 표준화 기술 (종균선발, 배양조건, 생산시스템, 고부가 원료화)
②	- 동충하초를 함유한 면역력 중강-피부건강 2중기능 inner beauty 건강식품 개발(A)
③	- 동충하초를 함유한 면역력 중강-피부건강 2중기능 inner beauty 건강식품 개발(B)
④	- ADA 천연 억제제 처리에 의한 아데노신 강화 및 신속 분리 기술

### 5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해결	정책 자료	기타
①의 기술		✓				✓	✓	✓		
②의 기술	✓						✓			
③의 기술	✓						✓			
④의 기술		✓					✓	✓		

\* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	- 한방바이오(주)에 이전, 부가가치가 높은 기능성 식품, 화장품, 의약품 원료화
②의 기술	- (주)새롬한방제약 및 (주)F&BBio에 이전 Inner Beauty 2중기능식품 개발 상품화
③의 기술	- (주)에프앤비바이오에 이전 Inner Beauty 2중기능식품 개발 상품화
④의 기술	- (주)뷰티맥스에 이전 동충하초의 주름개선, 피부건강 기능성 화장품 원료화
.	.

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과				교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		논문평균IF	학술발표			정책활용	홍보전시	
												SCI	비SCI							
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명					
가중치	15			15	15	40			15											
최종목표	2			4	69/7	2	11/50/0	57/00	20			1	1							
연구기간내 달성실적	2			4	5	6			2			1	1							
연구종료 후 성과창출 계획					692	2	11500	5700	19	4500										



8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 <sup>1)</sup>	동충하초 대량생산 시스템 개발 및 원료표준화 기술		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액: 200만원	매출액의 4%
이전방식 <sup>2)</sup>	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타 (Know-how 전용실시권)		
이전소요기간	1년	실용화예상시기 <sup>3)</sup>	~2023
기술이전시 선행조건 <sup>4)</sup>	내.외부 여건에 따라 실용화가 지연될 경우 순연함		

핵심기술명 <sup>1)</sup>	동충하초를 함유한 2중 기능 건강식품 recipe 1건 (Know-how)		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액: 300만원	매출액의 4%
이전방식 <sup>2)</sup>	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타 (Know-how 전용 실시권)		
이전소요기간	1년	실용화예상시기 <sup>3)</sup>	~2023
기술이전시 선행조건 <sup>4)</sup>	내.외부 여건에 따라 실용화가 지연될 경우 순연함		

핵심기술명 <sup>1)</sup>	동충하초를 함유한 2중 기능 건강식품 recipe 1건 (Know-how)		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	매출액의 4%
이전방식 <sup>2)</sup>	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타 (Know-how 전용 실시권)		
이전소요기간	1년	실용화예상시기 <sup>3)</sup>	~2023
기술이전시 선행조건 <sup>4)</sup>	내.외부 여건에 따라 실용화가 지연될 경우 순연함		



#### 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.