

노랑다발동충하초의 이용성 개발 연구

(Studies on the product development of
Cordyceps bassiana)

제1세부: 노랑다발동충하초의 생리활성연구

(Studies on physiological properties
of *Cordyceps bassiana*)

제2세부: 노랑다발동충하초의 유전자원수집
및 대량생산연구

(A Study on mating type and
artificial culture of *Cordyceps
bassiana*)

제3세부: 동충하초의 이용성 연구

(Utilization of *Cordyceps bassiana*)

강원대학교

농림수산식품자료실



0017694

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “노랑다발동충하초의 이용성 개발 연구에 관한 연구” 과제

(제1세부: 노랑다발동충하초의 생리활성연구

제2세부: 노랑다발동충하초의 유전자원수집 및 대량생산연구

제3세부: 노랑다발동충하초의 이용성 연구 에 관한 연구”)의

보고서로 제출합니다.

2009 년 4월 10일

주관연구기관명 : 강원대학교

주관연구책임자 : 김 태 응

세부연구책임자 : 성 재 모

연 구 원 : 윤 덕 효

연 구 원 : 정 소 람

연 구 원 : 양 새 하

연 구 원 : 성 태 인

협동연구기관명 : 한림대학교

협동연구책임자 : 박 형 진

협동연구기관명 : 오 광

요 약 문

I. 제목:

“노랑다발동충하초의 이용성 개발 연구“

II. 연구개발의 목적 및 필요성:

1. 동충하초는 균주에 따라 암, 뇌졸중, 심장병과 같은 성인병에 대한 예방 및 개선효과가 최근 발견되어 이용가능 잠재력이 무한한 품목이며, 본 연구는, 아직 국내외에 알려지지 않은 노랑다발동충하초를 생리활성이 높은 우수한 기능성 식품으로 이용하며, 국제경쟁력을 높이기 위하여, 노랑다발동충하초에 대한 채집과 분리·동정과 보존 연구를 하는동시에,
2. 보존된 동충하초 균주를 이용하여 생리적인 특성을 알고 자실체 형성에 관한 연구를 체계적으로 하여 대량으로 생산하는 기술을 개발하는 것이 이 연구의 목표이며, 채집한 노랑다발동충하초의 기주와 형태적 특징으로 동정하고 노랑다발동충하초에 대한 생리실험으로 특성을 조사하며 선발된 균주 이용하여 대량으로 자실체를 형성하는 기술을 개발한다.
3. 본 속군 가운데 국내에서 밀리타리스동충하초(*C. militaris*)와 눈꽃동충하초(*Paecilomyces tenuipes*)는 인공적으로 버섯을 만드는데 성공하여 이에 대한 실용화가 이루어지고 있다. 또한 밀리타리스동충하초 이외에도 *Cordyceps martialis*, *C. sobolifera*, *C. ophioglossoides* 등이 각각 매니톨 형성, malaria 치료제, 혈액순환을 좋아지게 하고, 폐와 신장 치료제로서의 높은 의약적 가치를 지니고 있는 것으로 밝혀졌으며, 더 나아가 노랑다발동충하초의 유용 균주의 실용화가 이루어져야 한다.
4. 제1세부과제 및 제1협동과제와 참여기업의 연구 결과로 형성된 우수 유전자를 사용한 노랑다발동충하초 자실체 및 Cordycepin을 이용하여 항동맥경화, 항염효과를 in vitro 실험을 통하여 증명하며, 이러한 효과에 대한 유효물질을 정제하는 연구를 진행함과 동시에,
5. 아토피성 피부염, 류마치스성 관절염 및 간경화 억제효과에 대한 in vivo 실험을 통하여, 노랑다발동충하초 자실체 추출물 및 Cordycepin의 약리적인 효과를 진행한다.

6. 또한, 노랑다발동충하초의 식약청 등재를 위한 기초실험 및 식품공전에 필요한 안전성 및 지구력 실험을 진행하여 최종적인 이용 활용성을 증대하고자 한다.
7. 최근에, 동충하초속의 버섯은 최근 암의 억제, 면역성 회복, 항균작용 등 다양한 약효작용이 있음이 입증되었다. 그러므로 노랑다발동충하초와 우수한 균주를 이용한 자실체 형성, 약리 생리활성을 입증하여,
8. 아직 알려지지 않은 노랑다발동충하초의 이용성 연구를 통해서 새로운 식품 및 한의약 분야로의 이용성을 증대하여, 산업체 및 농가소득향상을 위한 특화작물의 활용하는데 있어서의 정당성 및 타당성을 부여하는데 있으며,
9. 최종적으로, 노랑다발동충하초 자실체를 대량생산하여, 농가소득향상을 위해 직접 활용될 수 있는 신기술의 개발이 본연구의 최종 목표이다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

제1세부과제 : 노랑다발동충하초의 생리활성연구

제2세부과제 : 노랑다발동충하초의 유전자원의 확보와 우수 자실체 형성 및 대량생산

제1협동과제: 노랑다발동충하초의 이용성 연구(아토피 치료제 연구)

IV. 연구개발결과

제1세부과제 : 노랑다발동충하초의 생리활성연구

1. 노랑다발동충하초 자실체의 시료의 추출 및 분획

- ethanol, hexane, ethyl acetate, water에 의한 분획물 제조
- 노랑다발동충하초의 자실체의 과쇄 및 용매에 의한 추출

2. 노랑다발동충하초 자실체의 기초생리활성 탐색

- 노랑다발동충하초의 추출물과 분획물을 DPPH 법을 통해서 항산화 효과를 측정.
- LDL의 산화 억제 효과는 TBARS 법과 agarose gel을 통해서 측정.

- LPS로 유도되는 대식세포에서의 NO 생성억제를 측정.
- 3. 노랑다발동충하초 자실체의 항염 특성연구
 - 노랑다발동충하초의 핵산 분획물(CBHF)의 항염 신호 기작은 ROS의 억제를 통한 I κ B-NF κ B pathway 와 JNK pathway의 억제를 통해서 일어남을 확인.
- 4. Cordycepin의 암세포 억제 기작 연구
 - Cordycepin을 18시간 처리한 암세포에서는 dose-dependent manner로, DNA fragments 관련된 cytoplasmic histone 이 증가함.
 - Cordycepin에 의한 MDA-MB231 cell 의 caspase가 activation됨.
 - cordycepin의 항암기작은 JNK phosphorylation을 증가시키며,
 - cordycepin에 의해, Bax가 MDA-MB231 cell에서 cordycepin의 농도에 따라 cytosolic fraction에서 mitochondrial fraction으로 이전됨을 확인.
 - cordycepin에 의해, cytochrome c가 mitochondria에서 cytosol로 방출됨을 확인.
- 5. 노랑다발동충하초 자실체의 균주간의 생리활성
 - 5종의 노랑다발동충하초 균주의 항산화 비교결과 15746>5657>9044>1784>1795의 순서를 보였다.
 - 5종의 노랑다발동충하초 균주의 항암 비교 실험 Hela, A549, B16F10를 사용하였으며, 1784=1795>9044>15746>5657 순서를 보였다.
- 6. 노랑다발동충하초를 이용한 기능성 약술의 제조
 - 노랑다발동충하초 약술의 관능검사결과
 - “맛”, “향”, “색”의 관능검사 결과를 평가하면, 60일에서 가장 바람직한 결과를 보였으며, I 보다는 II가 좋은 결과를 보였다.
 - 종합적인 평가에서는 II 보다는 I가 낫다는 의견도 있었으며, 맑은색이 더 바람직 하다 하였다.

제2세부과제 : 노랑다발동충하초의 유전자원의 확보와 우수 자실체 형성 및 대량생산

1. 동충하초의 유전자원 수집과 분리 동정
 - 동충하초의 분생포자 및 군사조직을 관찰하여 분류 동정
 - 다양한 영양원을 이용, 군사 성장 능력을 비교하여 우수한 최적배지를 찾으며, mating type별 포자 분리함.
2. Mating type 균주를 이용한 노랑다발동충하초 자실체의 대량생산
 - 성장 능력이 우수한 영양원을 조합하여 최적배지를 선발하고 여러 자실체 형성용 배지에서 우수한 자실체생성 능력을 보여주는 배지를 선발함.

3. 노랑다발 동충하초 균주간의 생리활성 차이 및 비교실험
 - EFCC 12511 6×9와 8×9의 확실한 mating type 규명을 위해 EFCC 12511 6×9와 8×9의 상태가 양호한 균주를 각각 10개 선발.
4. 노랑다발동충하초 자실체의 안정적인 대량생산 연구
 - 우수 균주의 선발- *Cordyceps bassiana* EFCC 783으로부터 재분리 되어 명명된 EFCC 12511의 조합인 6×9와 8×9를 사용하였다
 - Mating type에 의한 우수균주를 이용한 노랑다발동충하초 자실체의 대량생산
 - 선발된 mating type를 이용한 자실체 형성용 배지 선발 및 형성용 배지를 이용한 대량 형성 조건의 확립

제 1 협동과제 : 노랑다발동충하초의 이용성 연구(아토피 치료제 연구)

1. 노랑다발동충하초 자실체에 의한 아토피성 피부염치료연구를 위한, 아토피 유발 동물실험.
 - 시료의 피부염억제효과 관찰함과 동시에 혈청으로부터 각종 cytokine, IgE을 측정하고 피부조직으로부터 cytokine을 면역조직화학법으로 측정.
2. 노랑다발동충하초 자실체의 아토피성 피부염에 미치는 영향
 - 노랑다발 동충하초 butanol 추출분획(CBBF) 처리 후 피부염 환부의 육안적 변화확인:
 - 피부의 홍반, 출혈, 가피 등 육안적 변화를 평가한 dermatitis score가 atopy control(9.67 ± 1.45) 에서 normal control(1.67 ± 0.33)에 비해 크게 증가하였으며 이러한 증가는 CBBF 처리(2.67 ± 0.33)에 의해 크게 감소하여 normal control 수준으로 회귀하였습.
3. CBBF 처리 후 피부염 환부의 조직학적 변화:
 - CBBF에서는 각각 $81.10 \pm 16.31 \mu\text{m}$ 과 $615.07 \pm 50.92 \mu\text{m}$ 이어서 atopy control의 해당 측정치에 비해 크게 감소하여 normal control 수준으로 회귀하였다.
4. CBBF 처리 후 혈청 Ig E 수준의 변화:
 - Atopy control에서 혈중 IgE 농도는 $29,254 \pm 2,489 \text{ ng/ml}$ 로 normal control의 측정치에 비해 크게 증가하였으며 이러한 증가는 CBBF 투여 후 $5,629 \pm 509 \text{ ng/ml}$ 로 감소하여 normal control과 유사한 수준을 나타내었습.
5. CBBF) 처리 후 피부염 환부의 interleukin-4 발현:
 - 면역조직화학법으로 염색한 결과 atopy control의 진피에서 IL-4 발현이 normal control에 비해 증가하였으며 이러한 증가는 동충하초 추출물을 처리한 후 감소하였습.

6. CBBF 처리 후 피부염 환부의 interferon-gamma 발현:

- atopy control의 진피에서 interferon-gamma 발현이 normal control에 비해 증가 하였으며 이러한 증가는 동충하초 추출물을 처리한 후 감소하였음.

V. 연구 성과 및 성과 활용계획

1. 국내 노랑다발동충하초의 채집 및 분리·동정에 의해 우수·유전자원 확보.
 - mating에 의하여 노랑다발동충하초의 인공자실체를 형성함을 확인함.
 - 노랑다발동충하초의 교배형을 찾아 현미를 이용하여 대량으로 재배 할 수 있는 방법이 개발되었으므로, 현실적인 산업화가 가능하게 되었음.
 - 교배형을 이용하여 자실체를 형성하여, 국내 자원의 보존 및 차별화 할수 있다.
 - 노랑다발동충하초의 활용도 증진을 위한 균주자원의 종 다양성 및 우수 유전자원의 확보 및 보존을 가능하게 하였음.
 - 노랑다발동충하초 자실체의 대량생산법 확립하여 사용이 가능하게 함.
2. 노랑다발동충하초를 이용한 항암제 제조 기술 개발의 가능성.
 - 노랑다발동충하초 자실체의 항암기작을 규명함.
 - 항암 치료의 목적으로 산업적 이용가치가 높으며,
 - 신약 개발의 기술(특허)을 참여업체에 이전하여 산업화를 유도가 가능함.
3. 노랑다발동충하초를 이용한 항염제 개발 가능성.
 - 노랑다발동충하초 자실체의 생리활성연구로서 항염특성을 규명하였음.
 - 노랑다발동충하초 자실체의 항염 특성연구결과, 노랑다발동충하초의 핵산 분획물(CBHF)은 LPS로 유도되는 대식세포에서의 항염 신호 기작은 ROS의 억제를 통한 I κ B-NF κ B pathway와 JNK pathway의 억제를 통해서 일어남을 확인함.
 - 특허출원번호: 10-2009-19407(노랑다발동충하초 부타놀분획물을 함유하는 항염증 활성 약학 조성물)에 의하여, 노랑다발동충하초를 이용한 항염제 개발이 가능하게 되었다.
4. Cordycepin의 암세포 억제 기작 연구결과에 의해, Cordycepin의 암세포 억제제로의 사용을 가능케 하였다.
5. 노랑다발동충하초 추출물을 이용한 아토피성 피부염 개선방법 확립을 위한 동물실험 및

제품개발에 의해 특허를 획득하였습.

- 노랑다발동충하초 자실체의 아토피성 피부염억제 결과에 의해, 특허출원(10-2008-0065756: 피부 소양증 및 아토피 피부염 예방 및 치료용 노랑다발동충하초의 알콜추출물)이 되었으며, 노랑다발동충하초를 이용하여, 아토피성 피부염 치료제를 개발할수 있게 되었다.
6. 노랑다발동충하초 유효물질을 함유한 제품연구으로 기능성 술을 제조하였다.
 - 이를 이용한, 제약개발, 건강식품, 기호식품 혹은 환자를 위한 치료용 식품 개발에 유용한 자료가 될 수 있다.
 7. 이러한 노랑다발동충하초 연구의 결과로서, 약리작용·독성·안정성 검사에 의해 과학적인 약효규명에 의하여, 국민건강과 향상에 공헌함으로써 사회발전에 기여할수 있다.
 8. 산·학·연 협동의 꾸준한 연구를 통한 기초자료 제공 및 대체의학의 자료로 사용가능성을 제시하였으며, 국민보건의 증대로 산·학·연 협동연구의 발전 가능성이 있다.
 9. 노랑다발동충하초를 이용한 다양한 연구에 의해, 여러 제약을 제조할 수 있는 기초자료를 조성하였다.

SUMMARY

(영문요약문)

I. Title:

"Studies on the product development of *Cordyceps bassiana*"

II. Purpose of the research:

Cordyceps bassiana is one of entomogenous fungi that parasites mainly to pupae the entomogenous mycelia grow in and derive nutrients from the intestine of the pupae in the autumn and fruit bodies of the fungus protrude from the body in the next summer.

Cordyceps bassiana is a parasitic fungus and it has long been used in Chinese medicine to treat numerous illnesses, promote longevity, relieve exhaustion, anticancer and increase athletic power.

Cordyceps bassiana is a fungal parasite on larvae of Lepidoptera (Zhu *et al.*, 1998). In Asian countries, the fungus, which is used as traditional folk medicine for the treatment of stomach disorder and inflammatory diseases, has been widely investigated for medicinal effects (Zhu *et al.*, 1998). Therefore, they are traditionally called DongChungHaCho (summer-plant, winter-worm) in China.

Entomopathogenic fungi, such as *Cordyceps* species, are small as well as environmentally susceptible fungal micro-organisms. A great loss and extinction of biodiversity has occurred due to fast industrialization and destruction of natural ecosystems. Thus, the main objectives of the research are collection, isolation and identification of such genetic resources and development of technology to produce their fruit bodies in artificial condition for their industrialization. Other objectives of the research are extraction and investigation of the bio-active compounds, which are helpful not only for the improvement of health of general people but also to increase the income of mushroom growing farmers.

Recent studies have shown that *Cordyceps* extract prevents tissue injuries or pathological processes of many inflammatory diseases (Zhu *et al.*, 1998). This evidence suggests that *Cordyceps* extract can be used as a useful drug. However, the biochemical and pharmacological effect of *Cordyceps* on in anti-cancer, inflammation and the treatment of Atopi have not been yet elucidated.

And the final purpose of the research was "Studies on the product

development of *Cordyceps bassiana*". From the results, we found that buthanol fractions from *Cordyceps bassiana* showed very good enhancements of the treatment of Atopi.

Therefore, *Cordyceps bassiana* can be used for the treatment of atopi, cancer and inflammation.

II. Contents of the research:

The main research areas are follows; Collection of natural resources of entomopathogenic fungi is done in Korea. After collection, the specimens are photographed, morphologically described, isolated and preserved. The isolates are preserved by regular subcultures as well as in liquid nitrogen.

The basic research on the effects of temperature, pH, nitrogen sources, carbon sources, mineral salts etc. are carried out to find out the optimum conditions for the mycelial growth of different isolates. Simultaneously, technologies for the continuous fruit body production are developed to solve the problems of degenerating character of fruiting due to subculturing. Analysis and investigation of bioactive compounds of isolates with large scale fruiting viability, are carried out with joint collaboration with other scientists. The value of such useful fungal resources are well recongized from the results of such basic investigations.

The research were composed of the areas as follows.

- 1) **Growth characteristics** of mycelial growth of *Cordyceps bassiana*.
- 2) **Physiological properties** of *Cordyceps bassiana*.
- 3) The use of *Cordyceps bassiana*. for the new drug for the treatment of **atopi**.
- 4) **Animal tests** such as Pharmaceutical, toxicological and safety of *Cordyceps bassiana*. for the safety of a new drug.
- 5) Clinical application and tests of *Cordyceps bassiana*. to use as a **new drug** such as the treatment of atopi, cancer and inflammation and for the production of **bioactive drug** from *Cordyceps bassiana*..

III. Results of the research:

Characteristics of mycelial growth of *Cordyceps bassiana* was observed in 22 commonly used mycological agar media in both light and dark conditions at different culture ages. The characteristics of mycelial growth varied from strain to strain and medium to medium. Culture age also affected the mycelial growth characteristics. Mycelial growth was mostly moderate to abundant in rich media, but low in poor media. The colony

texture was mostly flat when grown in the light, but dark condition induced aerial hyphae. A wide range of colony color from yellowish white to light orange was observed under the light condition depending upon the medium type and culture age, whereas no color appeared in the dark culture, irrespective of medium type and culture age. The growth rate was also higher in the dark, compared to light culture. Abundant mycelial growth with darkest colony color was observed in SDAY and SMAY agar media. Similarly, colony color was observed darkest after 3 weeks of incubation in light. Variation in the mycelial growth characteristics of *C. bassiana* was found useful for characterizing the phenotypic characteristics of the pure strains under the given growth conditions.

For the physiological properties of *Cordyceps bassiana*, *Cordyceps bassiana* was extract with methanol. And then, methanol extract was further fractionated with Hexane, Ethyl acetate, Butanol and Water. To test the antioxidative effects of *Cordyceps pruinosa*, the extracts were separated with several methods.

Also, effects of inhibition of cancer were examined. First, we tested cytotoxicity of *Cordyceps bassiana* fractions on cancer cell lines and normal cell lines. And purified anticancer molecules. Tested cancer cell lines are B16F10(melanoma), Hela (cervixcarcinoma), SKOV3(adenocarcinoma), K562 (leukemia), HepG2 (hepatoblastoma), Du1459(prostate carcinoma), MKN-45 (stomach adenocarcinoma) and A549(lung carcinoma) cells. In those cell lines, K562, Du145 cell lines were highly prohibited by *Cordyceps bassiana* Butanol fraction. And, especially, we focused on the mechanisms of cell death exhibited by *Cordyceps bassiana* butanol fraction(CBBF) against human cervical adenocarcinoma cell line, HeLa. CBBF inhibited growth and induced apoptosis in HeLa cells in a dose-dependent manners determined by MTT assay, DNA fragmentation and phosphatidylserine distribution. In Western blot analysis, apoptosis in Hela cells was associated with the activation of caspase-3, -9 and proteolytic cleavage of PARP, decrease of Bcl-2/Bax protein ratio. and release of cytochrome C from mitochondria into cytosol. Apoptosis induced by CBBF could not be prevented by various antioxidants. These results show that apoptosis of CBBF toward HeLa cells is mediated by mitochondria-dependent death-signaling pathway regardless of reactive oxygen species. Thus, it indicated that CBBF may be a potential candidate in future research and development of bioactive ingredients as anticancer agents.

And the final purpose of the research was "Studies on the product development of *Cordyceps bassiana*". From the results, we found that buthanol fractions from *Cordyceps bassiana* showed very good enhancements of the treatment of **atopi, cancer and inflammation.**

IV. Utilization of the research:

Following impacts have been obtained after this Research.

1) Many people can use entomopathogenic fungal cultures due to collection and proper preservation of specimens and isolates. 2) It is not necessary to depend upon foreign countries for their collection and isolation. 3) Systematic classification of Korean entomopathogenic fungi could be developed. 4) Industrialization of fruit body production could be done due to their artificial fruiting. Artificial fruit bodies could be perfectly used after the investigation of the effects of their bio-active compounds. 5) Development of *Cordyceps bassiana* as a new drug for pharmaceutical purposes was achieved from this research.

And the final purpose of the research was "Studies on the product development of *Cordyceps bassiana*". From the results, we found that buthanol fractions from *Cordyceps bassiana* showed very good enhancements of the treatment of **Atopi**.

Therefore, *Cordyceps bassiana* can be used for the treatment of **atopi, cancer and inflammation**.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1	Cocepts of the research	14
	1) The purpose of research development	14
	2) Importance of the research	15
	3) Scope of the research	20
Chapter 2	Industrialization of the research on domestic and foreign countries.	24
	1) Researches in Cordyceps?	24
	2) Worldwide researches in Cordyceps	24
	3) Domestic researches of the project	26
	4) Researches in foreigners and domestics.	28
Chapter 3	Contents and Results of the research.	29
	1) Planning of yearly research project and results	29
	2) Research methodology	36
	3) Methods of the research	37
	4) Results of the research	61
Chapter 4	Achievements of the research and its dedications	.	141
Chapter 5	Utilizations of the research.	148
Chapter 6	The informations obtained abroad on the research work	154
Chapter 7	References.	160

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	14
제 1 절 연구개발의 목적	14
제 2 절 연구개발의 필요성 및 범위	15
제 3 절 연구개발대상 기술의 경제적·산업적 중요성 및 연구개발의 필요성	20
제 2 장 국내외 기술개발 현황	24
제 1 절 동충하초란?	24
제 2 절 동충하초의 세계적 수준	24
제 3 절 동충하초의 국내수준	26
제 4 절 동충하초의 국내외의 연구현황	28
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	29
제 1 절 년차별 연구내용 및 결과	29
제 2 절 기술 개발 접근방법	36
제 3 절 연구 방법	37
제 4 절 연구 결과	61
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 관련분야에의 기여도	141
제 5 장 연구개발결과 성과 및 활용계획	148
제 6 장 연구개발과장례서 수집한 해외과학기술정보	154
제 7 장 참고문헌	160

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

1. 동충하초는 균주에 따라 암, 뇌졸중, 심장병과 같은 성인병에 대한 예방 및 개선과 최근 발견되어 이용가능 잠재력이 무한한 품목이며, 본 연구는, 아직 국내외에 알려지지 않은 노랑다발동충하초를 생리활성이 높은 우수한 기능성 식품으로 이용하며, 국제경쟁력을 높이기 위하여, 노랑다발동충하초에 대한 채집과 분리·동정과 보존 연구를 우선 진행하며,
2. 보존된 동충하초 균주를 이용하여 생리적인 특성을 알고 자실체 형성에 관한 연구를 체계적으로 하여 대량으로 생산하는 기술을 개발하는 것이 이 연구의 목표이며, 채집한 노랑다발동충하초의 기주와 형태적 특징으로 동정하고 노랑다발동충하초에 대한 생리실험으로 특성을 조사하며 선발된 균주 이용하여 대량으로 자실체를 형성하는 기술을 개발한다.
3. 본 속군 가운데 국내에서 밀리타리스동충하초(*C. militaris*)와 눈꽃동충하초(*Paecilomyces tenuipes*)는 인공적으로 버섯을 만드는데 성공하여 이에 대한 실용화가 이루어지고 있다. 또한 밀리타리스동충하초 이외에도 *Cordyceps martialis*, *C. sobolifera*, *C. ophioglossoides* 등이 각각 매니톨 형성, malaria 치료제, 혈액순환을 좋아지게 하고, 폐와 신장 치료제로서의 높은 의약적 가치를 지니고 있는 것으로 밝혀졌으며, 더 나아가 노랑다발동충하초의 유용 균주의 실용화가 이루어져야 한다.
4. 제1세부과제 및 제1협동과제와 참여기업의 연구 결과로 형성된 우수 유전자를 사용한 노랑다발동충하초 자실체 및 Cordycepin을 이용하여 항동맥경화, 항염효과를 in vitro 실험을 통하여 증명하며, 이러한 효과에 대한 유효물질을 정제하는 연구를 진행함과 동시에,
5. 아토피성 피부염, 류마치스성 관절염 및 간경화 억제효과에 대한 in vivo 실험을 통하여, 노랑다발동충하초 자실체 추출물 및 Cordycepin의 약리적인 효과를 진행한다.
6. 또한, 노랑다발동충하초의 식약청 등재를 위한 기초실험 및 식품공전에 필요한 안전성 및 지구력 실험을 진행하여 최종적인 이용 활용성을 증대하고자 한다.
7. 최근에, 동충하초속의 버섯은 최근 암의 억제, 면역성 회복, 항균작용 등 다양한 약효작용이 있음이 입증되었다. 그러므로 노랑다발동충하초와 우수한 균주를 이용한 자실체 형성, 약리 생리활성을 입증하여,

8. 아직 알려지지 않은 노랑다발동충하초의 이용성 연구를 통해서 새로운 식품 및 한의약 분야로의 이용성을 증대하여, 산업체 및 농가소득향상을 위한 특화작물의 활용하는데 있어서의 정당성 및 타당성을 부여하는데 있으며,
9. 최종적으로, 노랑다발동충하초 자실체를 대량생산하여, 농가소득향상을 위해 직접 활용될 수 있는 신기술의 개발이 본연구의 최종 목표이다.

제 2절 연구개발의 필요성 및 범위

1. 본 연구의 필요성

가. 21세기 후반은 생명과학의 획기적인 발전이 기대되는 시기로 **다양한 생물 유전자원을 확보**한 국가만이 선진국의 대열에 참가할 수 있는 사회가 되었다.

나. 강원도는 산간으로 이루어진 천혜의 버섯 자원지역이지만, 아직 국내의 천연 유전 자원인 버섯 균주의 채집이나 분리·동정 및 보존의 투자는 아주 미미한 실정으로, **매년 감소하고 있는 버섯자원을 채집하여 분리·동정·유전자원을 보존 이용하여 고부가 가치의 제품으로의 유도는 국가적인 차원에서 우선 중요하다**, 천연자원이 풍부한 강원도에서도 중요하다.

다.. 보존한 유전자원을 이용하여 생리활성의 탐색으로 유용한 물질이 구명되면, 고부가 가치의 제품을 만들어 산업화시키는 것이 국가적인 차원에서 매우 필요하다고 중요하다.

라.. 한국에서 최근 많이 알려진, 동충하초(*Cordyceps*) 속은 800종이 있는 것으로 알려졌고, 보고된 것은 300종으로 각 종마다 형태가 다양하고 형성하는 기주가 다르므로 생리활성에도 차이가 있음으로 이에 대한 연구가 필요하다.

마.. 동충하초는 옛날부터 귀중한 한약재로써 면역력 증강, 염증억제 및 체력 증강, 결핵, 황달, 마약중독 해독제와 항암효과 등이 있으며, **버섯중에서 가장 광범위한 효과를 가지고 있는 버섯중의 하나이지만, 고부가가치 제품을 위한 체계적인 연구가 되지 않았다**.

바.. 동충하초는 최근, **암의 억제, 면역성 회복, 항균작용 중요한 약효작용이 입증**되고 있는 높은 부가가치의 버섯으로 국내 버섯의 시장은 약용버섯을 포함하여

현재 500억 원 정도로 추산되며, 세계시장 또한 무한하다.

사.. 동충하초의 300여종 중에서 연구된 종은 중국에서 박쥐나방동충하초 한국에서는 번데기동충하초와 눈꽃동충하초만이 산업화 된 것으로 최근 연구로 암의 억제 , 면역성 회복, 항균 작용 중요한 약효작용이 입증되고 있는 높은 부가가치의 버섯으로 국내 버섯의 시장은 약용버섯을 포함하며, 세계시장 또한 무한하다.

아.. 본 책임연구자(김태웅 교수)와 공동연구원(성재모 교수)은, 최근 많이 알려진 번데기동충하초를 비롯한 동충하초의 생리활성 연구를 1995년부터 시작하여 많은 연구 결과를 얻었다. 특히 공동연구원(성재모 교수)은, 동충하초를 1985년부터 동충하초를 채집·분리·동정을 시작하여 **동충하초균주를 보유하고 있으며 “한국의 동충하초”와 “강원의 버섯”에서 동충하초를 비롯한** 국내의 버섯을 총 정리하여 동충하초 연구에 기틀을 마련하였다. 따라서 이러한 균주를 이용하여 식품과 의약품에 사용될 수 있는 우수한 균주를 인공적으로 대량생산하여 생리활성을 확인하며. 제1협동(박형진 교수)의 동물실험을 통하여 노랑다발동충하초의 생리활성을 검증하여 부가가치의 높은 제품을 개발하여 산업화하는 것이 필요하다.

자.. 동충하초에 관한 국내에서의 연구는 번데기동충하초와 눈꽃동충하초 2종의 연구로 이제 시작 단계이다. 본 연구의 대상인 **노랑다발동충하초(Cordyceps staphylinidaecola)**는 현재 국내의 본 연구팀에서만 보유한 균주로 우수 유전자 확보, 대량생산 및 이용성을 위한 개발은 앞으로 진행되어야 할 과제이고, 본 속균에 대한 연구는 **국내·외에서 연구되지 않은 동충하초이다.**

차. 따라서, 천연자원인 노랑다발동충하초 자실체의 식품과 의약품으로서의 이용 개발 가능성을 고려하여, 본속균에 대한 **유전자원을 확보**하고, 인공적으로 **자실체의 대량생산의 기술 개발과 생리활성 탐색**으로 **식·의약품으로 개발되어 산업화된다면** 국내의 기업 **농가소득향상**을 위한 **직접적인 활용**할 수 있을 뿐만 아니라 **더 나아가서는 외화 획득**에도 기여하게 된다.

2. 본 연구의 년차별 범위

가. 1차년도 연구범위:

구분	연도	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위	연구범위
1차년도	2020	○ 유전자원 수집 분리 동정	- 우수균주의 채집과 분리 및 채집된 동충하초의 형태적 특징조사와 분류 동정	○ 동충하초의 유전자원 수집과 분리 동정
	2020	○ 생리실험과 자실체 형성	- 적정배지와 환경조건 구명과 노랑다발동충하초의 mating type에 의한 우수균주 선발	○ 분리·동정된 노랑다발동충하초의 생리실험과 자실체 형성
	2020	○ 자실체 대량생산	- 선발된 mating type를 이용한 자실체 형성용 배지 선발 및 형성용 배지를 이용한 대량 형성 조건의 확립	○ Mating type 균주를 이용한 노랑다발동충하초 자실체의 대량생산
	2020	○ 시료의 추출 및 분획	- 시료의 파쇄 및 용매에 의한 추출 - methanol, hexane, ethyl acetate, water에 의한 분획물 제조	○ 노랑다발동충하초 자실체의 시료의 추출 및 분획
	2020	○ 기초생리활성 탐색	- 기초 생리활성과 정제분리법의 확립 및 생리활성 물질의 추적	○ 노랑다발동충하초 자실체의 기초생리활성 탐색
	2020	○ 노랑다발동충하초 자실체의 항염 특성연구	- 유효항염성분의 추적과 항염성분의 염증억제기작 확립	○ 노랑다발동충하초 자실체의 항염 특성연구
	2020	○ 동물실험 (아토피성 피부염)	- 면역학적 조직학적인 방법으로 억제효과 및 그 기전의 규명	○ 노랑다발동충하초 자실체 및 Cordycepin의 아토피성 피부염에 미치는 영향

나. 2차년도 연구 범위:

구분	연도	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위	연구범위
2차년도	2027	○ 자실체의 안정적인 대량생산 연구	- 선발된 mating type를 이용한 자실체 형성용 배지 선발 및 형성용 배지를 이용한 대량 형성 조건의 확립	○ 우수 균주의 선발 ○ Mating type에 의한 우수균주를 이용한 노랑다발동충하초 자실체의 대량 생산
		○ 유효물질의 탐색 및 이용성 연구	-정제분리 (methanol, hexane, ethyl acetate, water)에 의한 분획물 제조 - 시료의 파쇄 및 용매에 의한 추출	○ 노랑다발동충하초 자실체의 유효물질의 정제 분리 및 이용성 연구
		○ 동충하초 균주간의 생리활성 차이 및 비교실험	○ 노랑다발동충하초 자실체의 균주간의 생리활성 ○ 노랑다발동충하초 자실체의 시료의 추출 및 분획	○ 노랑다발동충하초 균주간의 생리활성 ○ 노랑다발동충하초 자실체의 생리활성 탐색
		○ 노랑다발 동충하초 자실체의 생리활성연구	○ 노랑다발동충하초 자실체의 생리활성 탐색	○ Cordycepin의 암세포 억제 기작 연구 ○ 신 기능성 식품의 기초 약리 생리활성
		○동물실험 (아토피성 피부염) 동물실험을 통한 약리효과	-면역학적 조직학적인 방법으로 억제효과 및 그 기전의 규명	○ 노랑다발 동충하초 자실체의 아토피성 피부염에 미치는 면역학적 영향

다. 3차년도 연구 범위:

구분	연도	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위	연구범위
3차년도	2020년	○노랑다발 동충하초 자실체의 대량생산	○ 인공재배법 확립 ○ 안정적인 대량생산	○ Mating type에 의한 우수균주를 이용한 노랑다발동충하초 자실체의 대량생산
		○노랑다발 동충하초 자실체의 항암특성	○ 노랑다발동충하초의 항암 특성 연구	○ 노랑다발동충하초의 항암 기작 규명
		○ 동충하초 균주간의 생리활성 차이 및 비교실험	○ 노랑다발동충하초 자실체의 균주간의 생리활성 ○ 노랑다발동충하초 자실체 시료의 추출 및 분석	○ 노랑다발동충하초 균주간의 생리활성 ○노랑다발동충하초 자실체의 생리활성 탐색
		○노랑다발 동충하초 유효 물질을 함유한 제품연구	○ 노랑다발동충하초 유효물질을 이용한 신기능성 제품 연구	○노랑다발동충하초의 암세포 억제 기작 연구 ○ 신 기능성 식품의 생리활성
		○노랑다발 동충하초 추출물을 이용한 아토피성 피부염 개선방법 확립을 위한 동물실험 및 제품개발	○노랑다발 동충하초를 이용한 아토피성 피부염 개선 방법확립 ○동물실험 및 제품개발	○노랑다발 동충하초 자실체의 아토피성 피부염 억제 효과

제 3절 연구개발대상 기술의 경제적·산업적 중요성 및 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

- 가. 동충하초와 같은 생물유전자원의 확보와 개발은 앞으로 한국이 생명과학의 획기적인 발전과 더불어, 기술, 자본, 정책이 뒷받침이 되어 선진국의 대열에 참가할 수 있는 시기이므로 이에 대한 연구가 필요하다.
- 나. 한국은 다른 나라에 비하여 동충하초가 가장 많이 자생하고 있으나 국내의 천연 동충하초의 유전자원의 채집이나 분리·동정 및 보존의 투자는 아주 미미한 실정으므로 현재 매년 감소하고 있는 동충하초자원을 채집하여 분리·동정·보존 및 이용할 수 있는 연구가 필요하다.
- 다. 충하초는 옛날부터 귀중한 한약재로써 면역력 증강, 염증억제 및 체력 증강, 결핵, 황달, 마약중독 해독제와 항암효과 등이 있으며, 버섯중에서 가장 광범위한 효과를 가지고 있는 버섯중의 하나로 이에 대한 체계적인 연구가 필요하다.
- 라. 구채임자들이 소속되어 있는 강원도는 자연조건으로 보아 동충하초 연구에 적합한 환경임에도 불구하고 다른 도에 비하여 버섯 재배에서는 사업의 영세성 및 실험장비의 부족으로 체계적인 학문적인 연구 및 대량생산을 위한 기초 실험의 부족으로 산업화가 미흡한 실정이다.
- 마. 동충하초는 300여종이 보고되었으나 국외에서는 박쥐나방동충하초에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있고 국내에서도 번데기동충하초와 눈꽃동충하초 연구에 국한되었으므로, 본 연구의 대상인 노랑다발동충하초는 현재 국내·외에는 알려지지 않은 동충하초이므로 이에 대한 연구가 필요하다.
- 바. 본 연구결과와, 더불어 향후 제품과 의약품으로서의 이용 개발 가능성을 고려할 때 야외에서의 채집이 어려운 본 균에 대한 유전자원을 확보하여, 인공적으로 자실체의 대량생산의 기술을 개발 그리고 생리활성에 관한 연구를 통해서 본 연구과제가 성공하였을 경우, 버섯생산에 전반적인 도움을 줄 수 있으며, 버섯농가와 기업체에서 이용할 수 있는 기반을 마련할 수 있다.

2. 경제·산업적 측면

- 가. 한국에서 주로 생산되는 식·약용버섯은 느타리, 표고, 양송이, 영지, 팽이, 송이와 동충하초를 들 수 있다. 이들 중 송이를 제외하고는 모두 농업 또는 임업부 산물을 이용하여 인공재배하고 있으며 해를 거듭할수록 생산량은 크게 증가하고 있다.
- 나. 재배농작물 중에서 버섯은 어떤 작물보다도 고수익성 소득작물이다. 느타리 재배를 예로 들면, 벼농사의 2.1배, 시설고추 재배의 1.7배, 포도재배의 3.2배 및 장미재배의 1.1배에 달하는 수익성을 보이고 있다.

다. 최근 재배하는 버섯 가운데 동충하초가 사람에게 유익한 물질 함유한 것이 발표된 후 동충하초를 이용한 많은 제품이 나오고 있다. 동충하초 중 지금 상품화되어 지금 시판하고 있는 것은 눈꽃동충하초이나 앞으로 번데기동충하초가 아주 중요한 위치를 차지하고 있다.

라. 시장규모

- 주시장(국가 또는 지역) : 미 국 , 일 본 , 동남아
- 시장규모

구 분	현재의 시장규모	예상되는 시장규모
세 계 시 장 규 모	1,000 억 원	(2007 년) 2,000 억 원
한 국 시 장 규 모	300 억 원	(2007 년) 500 억 원

*** 산출근거 :**

지금 버섯을 이용하여 식품이나 약품으로 이용하는 버섯은 느타리를 비롯하여 표고, 송이, 영지, 운지, 동충하초와 그 외의 많은 버섯이 재배되고 있고 이들 버섯은 2000년 농림부 특용작물 생산실적과 한국의 버섯과학과 버섯산업(버섯 2(1) : 19-37에서 나와 있는 것 같이 앞으로 버섯 시장은 더욱 넓어져 갈 전망이다. 특히 영지버섯은 일약약품에서 영비천, 대웅제약에서 운지천 또 동충하초가 세상에 알려진 후 바로 상업화되어, 눈꽃동충하초를 이용한 제품이 남양유업의 위풍당당 등 6개회사에서 제품이 나오게 되었다. 노랑다발동충하초의 경우는 본 연구팀만이 보유하고 있으며, 좋은 결과를 얻어 식품 허가를 받을 수 있다면 앞으로 식용으로 이용할 수 있고 약용으로도 사용할 수 있어, 본 연구를 통하여 제품만 개발된다면 어떠한 소재보다도 좋은 소재가 될 수 있다고 생각된다.

3. 사회·문화적 측면

- 가. 동충하초는 예로부터 중국에서 인삼, 녹용과 함께 귀한 3대 한약재로 이용되어 사회 문화적으로 오랜 역사를 가지고 이용되어 왔으나 그에 대한 **체계적인 학문적 연구와 산업적 활용은 세계적으로 거의 이루어지지 않은 상태**이다.
- 나. 국내에서는 동충하초는 몇 년 동안에 건강보조 제품으로 널리 알려지게 되었지만 동충하초의 종류는 다양한데 비해서, 그 **연구는 매우 미흡한 실정**이다.
- 다. 인공적으로 동충하초가 대량으로 생산된다면 **약용이나 식용으로 이용할 수 있는 계기를 마련하여 이를 산업적으로 이용할 수 있고, 또한 유전자의 연구를 함으로 자원을 유용하게 이용할 수 있는 파급효과를 기대할 수 있다.**
- 라. 따라서 본 연구과제는 동충하초의 대량생산 및 생리활성 연구를 통해서 노랑다발동충하초의 식약청 허가를 통한 이용을 유도함으로써 고부가가치의 제품을 생산함으로써 **동충하초의 다변화와 국민 건강의 향상, 강원도 농가 및 침체된 산업체에 큰 도움**이 될 것이다.

4. 환경적 특성

- 가. 본 과제 책임자(김태웅 교수)와 공동연구자(성재모 교수)가 수행한 연구를 보면 동충하초 연구는 이제까지 많은 균주를 보존함과 동시에 자실체 형성 기술을 개발함과 동시에 균주를 분양하고 기술을 보급시켜 지금과 같이 동충하초를 산업화하는데 기여하였다.
- 나. 본 연구는, 본 연구의 공동연구자인 성재모 교수팀이 지난 22년간 강원도에서 활발한 연구에 의해 수십 종의 자생 동충하초를 채집하였고, 고전적 방법에 의해 주로 자낭균에 속하는 동충하초의 기본적인 분류동정을 수행하였다. 또한 십여 종의 동충하초에 대한 인공배양에 성공함으로써 좀 더 다양한 동충하초의 인공배양에 적용할 기반을 마련하였다.
- 다. 또한 본 연구과제의 과제 책임 연구자인 김태웅 교수팀은 다년간 성재모 교수팀과 긴밀한 협력 하에 동충하초의 생리, 생화학적 분석을 제1협동(박형진 교수)와 체계적으로 수행하며, 약리학적, 경제적 가치가 있는 연구를 하여 동충하초 연구에 기반을 다지었다
- 라. 노랑다발동충하초는 공동연구자인 성재모 교수가 강원도에서 채집한 균주를 소장하고 있으며, 유전자 특성, 생리활성 등 그 특성에 관하여는 국내외에 밝혀지지 않은 상태이므로, 이러한 희귀한 유전자원의 연구는 버섯유전자원이 고갈, 소멸되는 시점에서 필요하다.

5. 정책적 특성

- 가. 특히 동충하초는 중국에서 인삼 녹용 등과 함께 3대 귀한 한방약제로 취급되어져 왔으며 불로장생의 비약으로 결핵, 황달, 아편중독, 알코올 중독의 해독제로 이용되고 있다. 현재는 동충하초 버섯의 인공적인 대량 생산 방법의 개발로 얻은 버섯을 이용하여 이로부터 물질을 추출하여 의약품개발에 유용하게 사용하려는 연구가 활발히 진행되어 있어 정책적으로 동충하초 연구를 활성화시키는 것이 필요하다.
- 나. 이제까지 알려진 항암효과, 면역강화 기능, 마약중독 해독하는 물질이 밝혀짐으로 의약품의 유전자원으로 활용 할 수 있어 신약 연구의 유전자원으로 활용할 수 있을 것이다.
- 다. 현재, 국외에서 활발한 연구가 진행 중인 동충하초는 중국 및 티베트지역에서 많이 채집되고 있는 박쥐나방동충하초(*Cordyceps sinensis*)와 형태적으로 비슷하며 기주도 유충에서 형성되는 한국에서 자생하는 노랑다발동충하초를 개발하여 산업화하므로 중국보다 한국이 동충하초 면에서 우위를 선점할 수 있게끔 본 연구가 필요하다.
- 라. 앞으로 인공적으로 버섯을 대량으로 만들어 물질 분석에 재료로 제공하고 이것으로부터 새로운 물질이 추출되어 이용될 수 있고 유전자 연구를 수행하므로 새로운 유전자를 찾아 낼 수 있어 동충하초는 앞으로 좋은 유전자원으로 이용될 수 있어 연구가 필요하다.
- 마. 본 연구에서는 이러한 세계적인 추세 속에 경쟁력이 있는 국내 자생 동충하초를 대상으로 실용화 및 산업화에 기여하고 궁극적으로 이 분야에서 세계적으로 우위에 위치할 수 있는 계기가 마련되게 하는 것은 정책적으로 필요한 연구이다.

바. 이용 및 부가가치가 높은 노랑다발동충하초의 우수 유전자의 이용 및 유전자 특성 연구는, 국내외적으로 바람직한 가치가 있으며, 외국에 없는 이러한 유전 자원의 생리활성연구 및 이용은 앞으로 국제 경쟁력에서 유리한 면이 있기 때문에 필요하다.

6. 지역적 특성

가. 동충하초의 균주 및 표본의 보관은, 강원대학교의 성재모 교수팀(공동 연구자)이 국내외 어느 팀보다 앞서 있으며, 자실체의 대량생산 기술도 현재 국내•외에서 기술이 앞서 있으며, 세계적인 우수한 연구팀들이 체계적인 연구를 시작하기 때문에 노랑다발동충하초를 이용한 연구는 최대의 효과를 얻을 수 있는 연구팀에서 수행하는 것이 필요하다.

나. 본 공동 연구자인 성재모 교수에 의해 자생 동충하초은행이 이미 다년간 운영하여 다양한 동충하초가 이미 확보되어 있고, 김태웅 교수 팀에 의해 이미 시작된 활발한 생리, 생화학적 분석을 고려해 볼 때 국내의 동충하초 연구는 세계적으로 경쟁력이 있어 본속균에 대한 연구가 필요하다.

다. 강원도의 신선한 버섯의 생산과 소비가 증대하고 있는 까닭은 자연환경을 동경하고, 보다 자연적으로 **친밀한 식생활을 선호함과 동시에 건강에 대한 인식**이 높아지고 있으며, 국민식생활의 변화, 건강식품 및 자연 무공해 제품에 대한 선호 그리고 생산기술의 향상과 우량종균의 개발 등으로 대량 생산이 가능하였기 때문이다.

라. 따라서 이를 뒷받침 할 버섯산업은 강원도의 농업과 임업에 종사하는 사람의 경제안정과 진흥을 위하여 큰 역할을 할 것이며, 강원도의 농림업에서 없어서는 안 된 산업으로 정착될 것이다. 또한 국가의 중요한 수출품으로 성장할 가능성이 있으므로 강원도의 지역적인 특성이 많은 소재이므로 연구가 필요하다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 동충하초(冬蟲夏草)란

1. 동충하초는 모든 곤충군의 유충, 번데기, 성충 등의 전 시기에 걸쳐 침입하며 곤충을 죽게 한 후 이를 기주로 하여 충체 전반에 걸쳐 자실체와 포자과를 형성하는데 이것을 동충하초라고 한다(1,2,3,4,5).
2. 대표적인 곤충기생균은 *Cordyceps*속균이며 전 세계적으로 분포하며 현재 보고된 종만도 300여종이 된다. 동충하초는 AD800년경 Fungus-born wasp로 기록된 이래, 예로부터 중국에서 불노장생의 비약으로 결핵, 황달 등의 치료와 강장제로서의 효과가 인정되어 이용되고 있으며 주로 병후의 신체조절, 보양 등에 사용되는 한방약제로 널리 사용되고 있다(1,3,5).
3. 현재는 이를 뒷받침하기 위하여 동충하초에 관한 초창기 신종발표와 분류중심의 연구에서 최근 본 균의 이용면에 초점을 두어 연구한 결과 동충하초로부터 생리활성 탐색 연구로 분리 정제된 물질이 높은 항암효과가 실증되었고 아편중독 해독제로서의 이용 가능성이 제기 되었다.
4. 번데기동충하초(*Cordyceps militaris*)의 경우에 있어서 주성분이기도 한 quinic acid의 이성체인 Cordycepin은 항균·항암작용이 있는 것으로 밝혀졌고 본 연구팀에 의하여 자실체에서 militarin이라는 물질이 정제되어 cordycepin보다 항암효과 알리어지었다. 따라서 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 최근 국내에서도 많은 관심을 가지게 되었다.
5. 그러나 보고된 300여종 중에서 연구에 걸림돌이 되고 있는 인공 자실체의 형성 연구와 이를 이용한 생리활성의 규명 연구는 실험실 수준에서는 시행되고 있으나, 동충하초 버섯의 대량 배양생산 및 제약 또는 신물질을 위한 생리활성 물질의 정제, 구조 확인, 등이 현실적으로 필요한 분야이다.

제 2 절 동충하초의 세계적 수준

1. 선진국 및 개발도상국 현황 및 동향

- 가. 동충하초 자실체를 인공적으로 형성시키는 연구는 미국과 일본에서 성공한 보고가 있으나 **대량으로 생산하지는 못하고 있음.**
- 나. 중국에서 발생하는 박쥐나방동충하초의 균사체를 이용하여 미국과 일본에서는 동충하초를 이용하여 의약품으로 제조하여 시판하며 중국에서는 인공적으로 자실체를 형성시켜 한약제로 사용하는 연구가 활발히 진행되고 있으나 아직은 초보단계에 있다(1,3,5).

다. 다양한 동충하초균주의 확보와 자실체의 대량생산의 연구는 다른 선진국에 비하여 본 연구팀이 균주의 다양성, 자실체의 형성, 대량생산 면에서 우위에 있다.

2. 주요 해당분야 국가의 현황 및 동향

가. 중국에서 인삼 녹용과 함께 3대 귀한 한방약재로 널리 사용되고 있다. 현재는 이를 뒷받침하기 위하여 동충하초에 관한 초창기 신종발표와 분류중심의 연구에서 최근 *Cordyceps sinensis*를 이용하여 성분분석 연구로 높은 항암 효과가 실증되어 한약재로 사용하고 있다. 성분분석은 균사체를 배양하여 이용하고 있으며 박쥐나방동충하초는 아직 인공적으로 자실체를 형성시키는 기술이 완성되지 않은 상태이므로 자실체를 이용한 산업화는 초보 단계이다.

나. 중국과 브라질, 폴란드에서는 해충방제를 위하여 주로 병원성을 갖는 곰팡이를 대상으로 탐색되었으며, 실제로 *Beauveria bassiana*의 포자를 대량으로 생산하여 pine caterpillar, corn borer, eriophid mites 등의 방제에 이용되고 있다.

다. 스위스에서는 박쥐나방동충하초(*Cordyceps sinensis*)를 이용하여 임상실험결과 마약중독중독자도 2주일 정도 복용하면 마약의 심각한 부작용을 말끔히 씻어 줄뿐만 아니라 유혹을 떨쳐 버리게 해 완전히 정상적인 사람으로 되돌려 줄 수 있다는 보고도 있다.

라. 일본에서는 동충하초 연구가 많이 되어 Kobayasi(1993)에 의하여 동충하초도감을 만들었고 생리활성에 대한 연구도 하였으며 기적을 부르는 동충하초라는 책이 나오기도 하였으나 동충하초를 이용한 산업적인 아직 초기 단계에 있다.



마. 미국에서는 USDA ARSEF에서 곤충기생균에 대한 균주를 수집하고 있고 Oregon State University에서 본 동충하초에 대한 연구를 본격적으로 하고 있다. 또한 박쥐나방동충하초(*Cordyceps sinensis*)를 이용하여 Ancient Healer로 Tablet를 만들어 현재 판매하고 있다.



바. 위에서 언급한 것과 같이 중국을 비롯한 미국, 일본, 영국, 소련에서는 동충하초를 채집하여 분류하여 보고하는 등 기초적인 연구를 수행하였다. 산업적으로 이용은 중국에서 잘 알려진 박쥐나방동충하초(*Cordyceps sinensis*)를 균사 배양을 하였고 자실체 형성 연구는 아직 하지 못하고 있다. 균사체를 배양하여 의약품으로 제조하여 시판하고 있다. 다른 동충하초의 균주의 다양성, 자실체의 형성, 대량생산 면에서 한국이 우위에 있다.

제 3 절 동충하초의 국내수준

1. 국내 기술의 현황 및 수준

- 가. 1984년도부터, 공동책임자(성재모 교수)가 한국의 여러 산에서 자생하는 동충하초를 채집한 후 지금까지 이에 연구를 계속하고 있다. 이 동충하초가 모든 사람에게 알게 된 것은 1994년 MBC 자연 다큐멘터리에서 한국의 버섯에서 동충하초가 소개된 후 관심을 갖게 되었지만 체계적이고 산업적인 연구는 아직도 부진한 편이다(1,3).
- 나. 한국에서는 동충하초의 연구는 최근 많이 이루어지고 있으며, 대부분 성재모 교수의 연구가 많으며, “Korean Cordyceps”라는 제목으로 미국균학회 소식지인 inoculum에 2004년 한국의 동충하초를 소개하였고 많은 동충하초 논문을 발표하였고 필요하면 동충하초를 알리기 위하여 전시회와 더불어 많은 강연을 통하여 정보를 제공받았다.
- 다. 특히 한국과학재단 특성화 장려사업으로 지원하는 동충하초은행이 설립으로 현재까지 많은 균주를 수집하여 보존하고 있으며, 표본 중에서는 세계 어느 곳에 가도 볼 수 없는 것들을 많이 소장하고 있으며 균주를 분양하므로 다른 연구기관에서 연구를 할 수 있게 만들었다.
- 라. 총괄과제 책임자인 김태웅교수는 세부과제 책임자인 성재모교수와 12년 동안 동충하초 연구를 하여 밀리타리스동충하초 자실체로부터 신물질인 militarin를 순수 분리 정제하여 특허를 받았다. 그 외에도 붉은자루동충하초와 풍뎅이동충하초 연구를 수행하였다.

2. 관련기관들의 사업추진 현황 및 비교분석

- 가. 아직 국내·외에서는 동충하초 제품을 이용하여 고부가 가치의 제약 생산 이루어지지 않고 있으며, 제품화된 제약 개발은 아직 초기 상태이다.
- 나. 현재 국내에서 생산되어 판매되고 있는 동충하초의 제품은 눈꽃동충하초 (*Paecilomyces tenuipes*)로 한정되어 있다.
- 다. 밀리타리스동충하초의 경우는 자실체 형성을 위하여 계대로 배양하면 균주의 활력이 떨어져 자실체를 형성하기가 어렵지만 본 연구팀은 교배형을 만들어 일률적으로 자실체 형성시킬 수 있는 기술을 개발하였다.
- 라. 다른 기관들에서는 밀리타리스동충하초의 인공적인 자실체의 대량생산방법 및 활력이 우수한 균주를 보관하고 있지 않기 때문에 산업적으로 이용성을 증대하거나 생리활성연구를 위한 시료의 대량 확보에 문제가 있기 때문에 연구는 노랑다발동충하초 연구를 통하여 자실체 형성 연구하는 것이 중요하다.
- 마. 따라서, 눈꽃동충하초를 이용하여 만든 제품의 종류를 보면, drink, 차, 자실체의 종류로 시판되고 있다

3. 기술 개발의 타당성

- 가. 일반 국민인 소비자는 새롭게 개발되는 동충하초를 선호하므로 새로운 노랑다발동충하초가 자실체 형성이 잘 되고 좋은 물질이 본 연구 결과로 얻어진다면 국민식생활의 많은 변화, 건강식품 및 자연 무공해 식품에 대한 선호 그리고 생산기술의 향상과 우량종균의 개발 등으로 대량 생산이 가능하기 때문에 소비가 증대되고 산업화가 가능하리라 본다.
- 나. 이러한 동충하초재배는 비교적 소규모로도 안정적인 수익이 확보되며, 농림업에서 복합경영이 가능한 작물로 자리잡아가고 있어 단기소득자원으로써 중요한 위치를 차지하고 있다.
- 다. 동충하초는 앞으로 많은 연구를 수행하여 상품화되면 국민 생활수준의 향상으로 동충하초가 자생하는 자연환경을 동경하고 보다 자연적으로 친밀한 생활을 선호함과 동시에 건강에 대한 인식이 높아지고 있기 때문에 전망이 밝다고 본다.
- 라. 따라서 이를 뒷받침 할 동충하초산업은 농업과 임업에 종사하는 사람의 경제안정과 진흥을 위하여 큰 역할을 할 것이며, 농림업에서 없어서는 안 될 산업으로 정착될 것이다. 또한 국가의 중요한 수출품으로 성장할 가능성이 있다.
- 마. 이에 관련하여, (주) 머쉬텍은, 성재모 교수와 함께 여러 가지 동충하초에 관한 많은 기초적인 배양법을 다년간 계속 연구하여, 기본 자료를 축적하였으며, 생화학 전공자(김태웅 교수), 의대 생리학 전공자(박형진 교수)에 의한 공동 연구로 약리생리 활성 및 동물실험을 종합적으로 연구, 분석하여 기업에서의 제품을 형성한다는 것이 큰 의미가 있다.
- 바. 본 연구과제에 사용될 노랑다발동충하초속균은 기초적인 생리 활성에 대한 연구가 진행되고 있지만, 현재 이 동충하초를 이용한 식품 허가의 부족으로 상품개발이 결여되어 있어 본 연구를 앞으로 식품 허가를 얻어 산업화에 기여하려고 한다.
- 사. 이러한 종합적인 공동 연구는, 다양한 자료를 축적할 수 있으며, 단독적인 개인 연구보다는, 공동 연구를 통해서 동충하초의 제품의 형성과 더불어 생화학적, 약리적 특성을 규명함으로써 제품 생산에 있어서의 타당성 및 적합성을 얻을 수 있다.
- 아. 이외에도, 국내의 많은 기업들도 이러한 알려지지 않은 동충하초균에 관심이 많으므로, 공동 연구가 종료되는 시점에서 개발 참여기업에 실험의 결과자료를 제공하면, 상품 생산화에 바람직한 일이며, 이러한 서로 연계된 전공의 연구자에 의한, 공동 연구의 진척으로, 동충하초의 이용성에 있어서 좋은 결과가 나올 수 있는 것으로 확신된다.

제 4 절 동충하초의 국내·외의 연구현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
일본, Applied Fungi Institute	동충하초의 균사체 형성물의 산업적 이용연구	생리활성 물질을 정제분리하여 생리활성물질로 이용하고자 함.
Oregon State University	동충하초 유전자의 검색 및 규명	동충하초 유전자의 비교검색 및 규명에 의하여, 산업적으로 사용하고자 함.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 년차별 연구 내용 및 결과의 요약

가. 1차년도 결과

구분	연도	연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근 방법)	구체적인 결과
1 차 년 도	2 0 0 6	○ 동충하초의 유전자원 수집과 분리 동정	- 우수균주의 채집과 분리 및 채집된 동충하초의 형태적 특징조사와 분류 동정	동충하초의 분생포자 및 균사조직을 관찰하여 분류 동정
		○ 분리·동정된 노랑다발동충하초의 생리실험과 자실체 형성	- 적정배지와 환경조건 구명과 노랑다발동충하초의 mating type에 의한 우수균주 선발	다양한 영양원을 이용, 균사 성장 능력을 비교하여 우수한 최적배지를 찾으며, mating type별 포자 분리
		○ Mating type 균주를 이용한 노랑다발동충하초 자실체의 대량생산	- 선발된 mating type를 이용한 자실체 형성용 배지 선발 및 형성용 배지를 이용한 대량 형성 조건의 확립	성장 능력이 우수한 영양원을 조합하여 최적배지를 선발하고 여러 자실체 형성용 배지에서 우수한 자실체생성 능력을 보여주는 배지 선발
		○ 노랑다발동충하초 자실체의 시료의 추출 및 분획	- 시료의 파쇄 및 용매에 의한 추출 - ethanol, hexane, ethyl acetate, water에 의한 분획물 제조	노랑다발동충하초의 자실체를 에탄올로 추출을 한 후에 에탄올을 evaporater를 이용하여 제거한 후에 잉여분의 에탄올은 동결건조하여 없앤 후에 그 가루를 증류수에 녹인 후에 극성의 차이에 따라서 용매를 분획하였다..
		○ 노랑다발동충하초 자실체의 기초생리활성 탐색	- 기초 생리활성과 정제분리법의 확립 및 생리활성 물질의 추적	노랑다발동충하초의 추출물과 분획물을 DPPH 법을 통해서 항산화 효과를 측정하였으며, LDL의 산화 억제 효과는 TBARS 법과 agarose gel을 통해서 측정하였다. 또한 LPS로 유도되는 대식세포에서의 NO 생성억제를 측정하였다.
		○ 노랑다발동충하초 자실체의 항염 특성연구	-유효항염성분의 추적과 항염성분의 염증억제기작 확립	노랑다발동충하초의 핵산 분획물(CBHF)은 LPS로 유도되는 대식세포에서의 항염 신호 기작은 ROS의 억제를 통한 IκB-NFκB pathway와 JNK pathway의 억제를 통해서 일어남을 알 수가 있었다.
		○ 노랑다발동충하초 자실체의 아토피성 피부염에 미치는 영향	-면역학적 조직학적인 방법으로 억제효과 및 그 기전의 규명	시료의 피부염억제효과 관찰함과 동시에 혈청으로부터 각종 cytokine, IgE을 측정하고 피부조직으로부터 cytokine을 면역조직화학법으로 측정하고 있다.

나. 2차년도 결과

(2차년도-1)

구분	연도	연구개발 목표	연구수행방법 (이론적·실험적 접근 방법)	구체적인 결과
2 차 년 도	2 0 0 7	○ 노랑다발 동충하초 자실체의 안정적인 대량생산 연구	<ul style="list-style-type: none"> ○ 우수 균주의 선발 ○ Mating type에 의한 우수 균주를 이용한 노랑다발동충하초 자실체의 대량생산 ○ 선발된 mating type를 이용한 자실체 형성용 배지 선발 및 형성용 배지를 이용한 대량 형성 조건의 확립 	<p>-<i>Cordyceps bassiana</i> EFCC 783으로부터 재분리 되어 명명된 EFCC 12511의 조합인 6×9와 8×9를 사용하였다. EFCC 12511 6×9와 8×9의 확실한 mating type 규명을 위해 EFCC 12511 6×9와 8×9의 상태가 양호한 균주를 각각 10개 선발하였고, 임의로 1에서10까지 번호를 부여하였다.</p> <p>-10개의 균주를 서로 mating 시켜 나온 결과로부터 단포자에서 자실체가 형성된 것 2개와 조합에서 자실체가 형성된 것 4개를 선발하여 총 12개의 자실체로부터 각각 5~10개의 단포자를 분리하였고, 다시 mating을 하였다.</p> <p>-그 결과 a 타입과 b 타입으로 확실히 구분 되었고, 노랑다발 동충하초 (<i>Cordyceps bassiana</i>)는 기존의 예상과는 달리 heterothalism임을 증명하였다.</p>
		○ 유효물질의 탐색 및 이용성 연구	○ 노랑다발 동충하초 자실체의 유효물질의 정제 분리 및 이용성 연구	<ul style="list-style-type: none"> - 시료의 파쇄 및 용매에 의한 추출 - 정제분리 (methanol, 에 의한 추추 및 Buthanol에 의한 분획물 제조 (CBBF라 명명: 동물실험에 사용함))
		○ 노랑다발 동충하초 균주간의 생리활성 차이 및 비교실험	<ul style="list-style-type: none"> ○ 노랑다발 동충하초 균주간의 생리활성 ○ 노랑다발 동충하초 자실체의 생리활성 탐색 	<ul style="list-style-type: none"> - 노랑다발동충하초 자실체의 균주간의 생리활성 - 노랑다발동충하초 자실체의 시료의 추출 및 분획 -EFCC 12511 6×9와 8×9의 확실한 mating type 규명을 위해 EFCC 12511 6×9와 8×9의 상태가 양호한 균주를 각각 10개 선발.

(2차년도-2)

구분	연도	연구개발 목표	연구수행방법 (이론적·실험적 접근 방법)	구체적인 결과
2차년도	2007	○노랑다발동충하초 자실체의 생리 활성 연구	<p>○ Cordycepin의 암세포 억제 기작 연구</p> <p>○ 신 기능성 식품의 기작 약리 생리활성</p>	<p>-여러종류의 암세포를 사멸시키는 Cordycepin의 효과: Cordycepin을 18시간 처리한 암세포에서는 dose-dependent manner로 ,DNA fragments 관련된 cytoplasmic histone 이 증가한다는 (DNA fragments가 증가한다는) 결론을 얻었다.</p> <p>-Cordycepin에 의한 MDA-MB231 cell 의 caspase activation 효과: cordycepin은 time 및 dose dependent한 manner로, PARP, caspase-3, caspase-9 의 cleavage에, 효과가 있음을 알수 있었다.</p> <p>-결론으로: -MDA-MB231 cell line의 cordycepin의 함양기작은 JNK phospholation을 증가시키며, caspase-3 및 9은 cordycepin에 의한 MDA-MB231 cell의 apoptosis와 관련이 있음을 알수 있었다. - pro-apoptotic Bcl-2 family인 Bax가, MDA-MB231 cell에서 cordycepin의 농도에 따라 cytosolic fraction에서 mitochondrial fraction으로 이전 되며, - cytochrome c가 mitochondria에서 cytosol로 방출되는 연구의 결과를 볼수 있었다.</p> <p>-결론으로, cordycepin의 함양기작은 Fig. 7과 같은 신호전달과정을 통하여 함양효과가 있음을 알수 있었다.</p> <p>- 노랑다발동충하초로 제조된 기능성 술의 사진을 첨부함.</p>

(2차년도-3)

구분	연도	연구개발 목표	연구수행방법 (이론적·실험적 접근 방법)	구체적인 결과
2차년도	2007	<p>○동물실험 (아토피성 피부염)</p> <p>○동물 실험을 통한 약리효과</p>	<p>○노랑다발 동충하초 자실체의 아토피성 피부염에 미치는 영향</p>	<p>-노랑다발 동충하초 butanol 추출분획 (CBBF) 처리 후 피부염 환부의 육안적 변화 :</p> <p>피부의 홍반, 출혈, 가피 등 육안적 변화를 평가한 dermatitis score가 atopy control(9.67 ± 1.45) 에서 normal control(1.67 ± 0.33)에 비해 크게 증가하였으며 이러한 증가는 CBBF 처리(2.67 ± 0.33)에 의해 크게 감소하여 normal control 수준으로 회귀하였다.</p> <p>-CBBF 처리 후 피부염 환부의 조직학적 변화:</p> <p>CBBF에서는 각각 81.10 ± 16.31 μm 과 615.07 ± 50.92 μm이어서 atopy control의 해당 측정치에 비해 크게 감소하여 normal control 수준으로 회귀하였다.</p> <p>-CBBF 처리 후 혈청 Ig E 수준의 변화:</p> <p>Atopy control에서 혈중 IgE 농도는 29,254 ± 2,489 ng/ml로 normal control의 측정치에 비해 크게 증가하였으며 이러한 증가는 CBBF 투여 후 5,629 ± 509 ng/ml로 감소하여 normal control과 유사한 수준을 나타내었다.</p> <p>-CBBF) 처리 후 피부염 환부의 interleukin-4 발현:</p> <p>면역조직화학법으로 염색한 결과 atopy control의 진피에서 IL-4 발현이 normal control에 비해 증가하였으며 이러한 증가는 동충하초 추출물을 처리한 후 감소하였다.</p> <p>-CBBF 처리 후 피부염 환부의 interferon-gamma 발현:</p> <p>atopy control의 진피에서 interferon-gamma 발현이 normal control에 비해 증가하였으며 이러한 증가는 동충하초 추출물을 처리한 후 감소하였다.</p>

다. 3차년도 결과

(3차년도-1)

구분	연도	연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근 방법)	구체적인 결과
3차년도	2008	○ 노랑다발 동충하초 자실체의 대량생산	○ 인공재배법 확립 ○ 안정적인 대량생산	<p>노랑다발동충하초(<i>Cordyceps bassiana</i>)의 교배형 조사: - C - 1 2 5 1 1 - 6 × 9 와 C-12511-8×9의 mating 실험.</p> <p>균주 선발과 단포자 분리 및 mating 실험: -mating에 의하여 인공자실체를 형성함을 확인함.</p> <p>다포자 균주의 계대배양에 따른 인공자실체 형성실험: -C-15739-6, C-15741-6, C-15744-8 균주를 이용하여 원균에서 7차 계대배양까지 순차적인 계대 실험을 실시함.</p> <p>대립교배형 균주의 mating을 통한 계대배양에 따른 인공자실체 형성: C-15736-2×6 균주는 5차 계대배양까지 인공자실체를 형성함.</p> <p>액체종균의 소량배양과 대량배양으로부터 형성된 인공자실체의 활력 비교 -생물학적 효율(%)은 250 ml Erlenmeyer flask 배양에서 2-3% 높게 조사됨.</p> <p>인공재배에서 적정 수확시기 조사: 안정적인 수확시기는 6주, 7주로 조사되었으며 자실체의 활력은 7주차 배양에서 가장 양호하였습.</p>
	2008			

(3차년도-2)

구분	연도	연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근 방법)	구체적인 결과
3차년도	2008	○ 노랑다발 동충하초 자실체의 항암특성	○ 노랑다발 동충하초의 항암 특성 연구	<p>MTT assay를 통한 PC-3와 Du145 세포의 생존율 조사: -Du-145 세포에 대한 억제 효과가 PC3보다 더욱 효과가 좋았습.</p> <p>Clonogeny assay를 통한 Du-145세포의 생존율 조사: -CBBF농도에비례하여 dose-dependant하게 colony가 감소함</p> <p>CBBF와 세포사멸과의 관계: -FACS,DNA fragmentation에 의해 apoptosis를 확인. PARP protein에 대한 CBBF의 효과: -200ug/ml이상의 농도에서부터 cleavage 된 PARP의 detection 이 확인됨.</p> <p>Bcl-2와 Bax protein에 대한 CBBF의 효과: - Bcl-2의 경우는 농도가 증가할수록 발현이 감소함. Bax의 경우는 농도가 증가할수록 발현이 증가하였습.</p>
		○ 동충하초 균주간의 생리활성 차이 및 비교실험	○ 노랑다발동충하초 자실체의 균주간의 생리활성 ○ 노랑다발동충하초 자실체의 시료의 추출 및 분획	<p>5종의 노랑다발동충하초 균주의 항산화 비교 -15746>5657>9044>1784>1795의 순서를 보였다. 5종의 노랑다발동충하초 균주의 항암 비교 실험 Hela, A549, B16F10을 사용하였으며, 1784=1795>9044>15746>5657 순서를 보였다.</p>

(3차년도-3)

구분 연도	연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근 방법)	구체적인 결과
3차 년도	2008	<ul style="list-style-type: none"> ○ 노랑다발동충하초 유효물질을 함유한 제품연구 ○ 노랑다발동충하초 유효물질을 이용한 신기능성 제품연구 	<p>노랑다발동충하초 약술의 관능검사. “맛”, “향”, “색”의 관능검사 결과를 평가하면, 60일에서 가장 바람직한 결과를 보였으며, I 보다는 II가 좋은 결과를 보였다. 종합적인 평가에서는 II 보다는 I가 낫다는 의견도 있었으며, 맑은색이 더 바람직 하다 하였다.</p>
3차 년도	2008	<ul style="list-style-type: none"> ○ 노랑다발동충하초 추출물을 이용한 아토피성 피부염 개선 방법확립을 위한 동물실험 및 제품개발 ○ 노랑다발동충하초를 이용한 아토피성 피부염 개선방법 확립 ○ 동물실험 및 제품개발 	<p>노랑다발 동충하초 butanol 추출분획(CBBF) 처리 후 아토피 치료 효과.:</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ CBBF 처리 후 피부염 환부의 조직학적 변화: ○ CBBF 처리 후 혈청 Ig E 수준의 변화: ○ CBBF) 처리 후 피부염 환부의 interleukin-4 발현 ○ CBBF) 처리 후 피부염 환부의 interferon-gamma 발현을 확인 하였으며, ● 치료용 제약(연고)를 제조하였습. ● 노랑다발 동충하초를 이용한 아토피 치료제 제조 특허를 출원함.

제 2 절 기술 개발 접근 방법

1. 노랑다발동충하초 속균(*Cordyceps bassiana*)의 자실체 대량형성과 생리활성 물질 탐색에 의해 유효약효성분 및 상품화 개발에 관한 본 연구의 구성을 보면, **제1세부과제(김태웅 교수)**는 본 연구의 총괄책임자로, 연구의 진행을 관리하며, 또한 생화학적인 특성을 연구하며, **제2세부과제 공동연구책임자(성재모 교수)**는 동충하초속균의 분포 및 형태적 특징을 다년간 연구하여왔으며, 현재 붉은자루동충하초의 유전자를 확보하고 있어, 동충하초속균의 인공자실체 형성 및 배양조건을 제공하였다.
2. **제1협동과제 (박형진 교수, 한림대 의과대학)**는 노랑다발동충하초 자실체를 **참여기업[(주) 머쉬텍]**으로부터 제공 받아, 노랑다발동충하초의 약리생리활성 연구를 하였으며, **제1세부과제(김태웅 교수)**와 공동 협조를 하며 연구를 진행하였다.
3. 본 연구를 통해서 노랑다발동충하초 자실체를 이용하여, 약리생리활성 물질의 규명(항암, 항염 및 동맥경화 억제), 신기능성 제품 개발 및 제품의 d용성 확대로 이어지는 동충하초 상품개발에 관한 기초자료로 사용되어 기업의 생산성 및 근거를 높이고자 하였다.
4. 제1세부과제 책임자는 제1협동과제 그리고 참여기업과 유기적인 관계를 유지하여 기능성 제품군의 생산을 도모하였다.
5. 제1세부과제 책임자는 제1협동과제 연구책임자와 참여기업의 상호·유기적인 관계로서, 기본 영역을 확장·이용시킬 수 있도록, 서로의 기술을 적용하여, 노랑다발동충하초의 연구를 통해 얻어지는 결과 자료를 토대로 제품화를 시험하여, 본 연구의 최종 단계를 완성하였다.

제 3 절 연구 방법

1. 노랑다발동충하초의 유전전자 수집, 분리동정, 자실체 형성 및 대량생산

가. Water potential에 따른 노랑다발동충하초균의 생장

- 영양 미네랄의 흡수에 따른 균사의 생장을 알아보기 위해 대표적인 SDAY 평판배지로 실험을 실시하였다(6,7,8).

① KCl 용액 제조

- KCl 3.3mol의 Solution을 이용하여 Molarity가 0, 0.33, 0.67, 1.0, 1.33, 1.67, 2.0이 되도록 증류수를 혼합하여 만든다. 용액의 양은 250ml로 만들었다.

$$3.3 * \text{필요한 KCl solution} = \text{molarity} * 250$$

② SDAY 평판배지 제조

- ①에선 만든 solution을 이용, SDAY평판배지를 500 ml 삼각 플라스크 7개에 250 ml 씩 제조한다. 그 후, 121°C, 15psi, 20분간 살균한 후 평판배지 각각 15개씩 만든다.

water potential(-bars)	혼합한 KCl solution	사용된 증류수의 양
0	0	250ml
-15	25ml	225ml
-30	50.76ml	199.24ml
-45	75.76ml	174.24ml
-60	100.76ml	149.24ml
-75	125.76ml	124.24ml
-90	150.76ml	99.24ml

나. 노랑다발동충하초균의 자낭 포자를 이용한 mating 검정

- 분생포자 A와 B의 mating을 통해 형성된 자실체에서 해부 현미경을 이용하여 11개의 자낭포자를 분리하였다. 분리한 단포자는 SDAY평판배지에서 1주일간 배양한 후 접종원으로 이용하였다. 유성 세대를 관찰하기 위하여 현미 배지를 만들어 mating실험을 하였고, 배양은 50일간 실시하였다.

다. 노랑다발동충하초균의 자낭포자 mating type 결과에 따른 우수한 균주 확보 검정.

- 2번 실험에 의해 자실체를 형성한 mating type을 알 수 있었고, 또한 이들 조합 중 우수한 자실체 형성능을 보여주는 균주를 확보를

위해 실험을 실시하였다. mating type별로 자실체 형성능력이 우수한 균주를 찾기 위해 현미배지에 접종하여 50일간 배양하였다.

라. 노랑다발동충하초균의 포자 및 군사 관찰

-광학 현미경을 이용하여 채집된 노랑다발동충하초의 자낭포자를 비교하였고 분생포자 모습을 비교 관찰 하였다.

2. 노랑다발 동충하초(*Cordyceps bassiana*)의 확실한 mating type 규명

가. 연구 내용:

본 연구에서 사용된 균주는 1995년 9월 강원도 춘천시 삼악산에서 채집·분리되어 강원대학교 동충하초은행(Entomopathogenic Fungal Culture Collection)에 보관되어 있는 *Cordyceps bassiana* EFCC 783으로부터 재분리 되어 명명된 EFCC 12511의 조합인 6×9와 8×9를 사용하였다. EFCC 12511 6×9와 8×9의 확실한 mating type 규명을 위해 EFCC 12511 6×9와 8×9의 상태가 양호한 균주를 각각 10개 선발하였고, 임의로 1에서10까지 번호를 부여하였다. 10개의 균주를 서로 mating 시켜 나온 결과로부터 단포자에서 자실체가 형성된 것 2개와 조합에서 자실체가 형성된 것 4개를 선발하여 총 12개의 자실체로부터 각각 5~10개의 단포자를 분리하였고, 다시 mating을 하였다. 그 결과 a 타입과 b 타입으로 확실히 구분 되었고, 노랑다발 동충하초(*Cordyceps bassiana*)는 기존의 예상과는 달리 heterothalism임을 증명하였다(6,8,10).

나. 연구의 목적:

*Cordyceps*속 균은 곤충의 몸을 기주로 하여 자실체를 형성하는 곤충 기생균(Entomopathogenic fungi)으로 자낭균류의 동충하초속에 속하는 균들로 약 300여종이 보고되었으며, 국내에서도 번데기동충하초 등 약 76종이 보고된 바 있다(성, 1996). 동충하초속균의 분류학적 위치는 자낭균문(Ascomycota), 핵균강(Pyrenomycetes), 맥각균문(Clavicipitales), 맥각균과(Clavicipiceae), 동충하초속(*Cordyceps*)에 속하는 균이다(Samson, 1974). 노랑다발 동충하초(*Cordyceps bassiana*)는 2001년 Li. 등에 의해 처음 보고되었다. 이 종은 토양이나 썩은 나무속 죽은 나비목 번데기를 기주로 발생하며 우리나라에서는 매우 드물게 발견된다. 이 종의 형태학적 특징은 자연 상태에서 기주의 몸에 1~4개의 자실체를 형성하며 노란색을 띤다. 전체길이는 45mm이고, 17mm×4mm 크기의 머리와 28mm의 자루로 이루어져 있지만, 경계는 뚜렷하지 않다. 자낭각은 머리에 조밀하게 분포하고, 그 크기는 530~550µm×290~300µm이며, 자낭은 400~450µm×1~1.5µm이다. 노랑다발 동충하초(*Cordyceps bassiana*)는 자연 상태에서 매우 드물게 발견될 뿐만 아니라 인공 자실체를 잘 형성하지 않기 때문에 연구 및 상업적인 이용을 어렵게 한다. 이번 연구는 기존에 연구되었던 자료를 참고로 상태가 양호한 균주를 선발하였고, 확실한 mating type의 규명에 그 목적을 두었다(6,7,8,9,10).

다. EFCC 12511 6×9와 8×9의 균주 선발 및 자낭각 형성

(1). 공시균주

본 연구에 사용된 EFCC 12511 균주는 1995년 9월 16일 삼악산에서 채집된 균주 EFCC 783으로부터 EFCC 2830, EFCC 2831, EFCC 2832를 계대하였다. 계대한 후 water dilution 방법으로 분생포자를 받았다. 그리고 그것을 배양하여 그 중 EFCC 2832-3번 즉, 3번째 분생포자에서 자낭각이 형성되어 그것을 다시 12511로 명명하였다.

그런 다음 EFCC 12511를 배양하여 자낭포자를 받았고 그것을 mating 시킨 결과 6×9와 8×9에서 자낭각이 형성되었다. 따라서 본 연구에서는 EFCC 12511 6×9와 8×9를 사용하였다(6,9,10).

(2). 균주 선발

Petri-dish에 보관된 EFCC 12511 6×9와 8×9 원균을 다시 계대하였고 그 중 활력이 좋다고 판단되는 10개의 균주를 선발하여 본 연구에 사용하였다.

(3). Mating 실험

Petri-dish에 계대 배양된 EFCC 12511 6×9와 8×9 균주 가장자리에서 1~2개의 균총을 떼어내어 flask에 접종하였다. 접종 후 배양실(24±1℃)에서 2~3일간 배양하였다.

이러한 액체종균을 1000cc pp병에 현미 60g, 번데기 10g 그리고 distilled water 70ml를 넣고 121℃, 1.2psi에서 20분간 살균하여 만든 현미배지에 접종하였다.

접종 후 24±1℃ 조건에서 7일간 배양하여 균사가 현미에 활착되면 다시 20±1℃에서 5~6주간 배양하여 인공자실체 형성을 유도하였다.

(4). Mating type 조사

인공 자실체가 형성되기 시작하면 3~4일 간격으로 자낭각 형성 여부를 조사하였다.

라. EFCC 12511 6×9와 8×9의 heterothalism 또는 homothalism 여부 규명 실험

(1). 자낭포자 분리

위 실험결과에서 자낭각이 형성된 자실체를 대상으로 단일조건에서 자낭각이 형성된 EFCC 12511 6×9의 1번과 9번 그리고 EFCC 12511 8×9의 9번과 10번에서 성숙한 자낭각이 형성된 자실체를 떼어내어 water agar 배지에 고정하여 자낭포자를 받았다.

그리고 단일조건에서와 비교하기 위해 mating이 되었을 때 자낭각이 형성된 것 중 EFCC 12511 6×9의 2×8, 3×6, 4×7, 5×6과 EFCC 12511 8×9의 1×2, 2×5, 3×6, 5×6을 선발하였고 위와 같은 방법으로 자낭포자를 분리하였다.

3. 노랑다발 동충하초(*Cordyceps bassiana*)의 교배형 구명 및 인공배양에 관한 연구

가. 노랑다발동충하초(*Cordyceps bassiana*)의 교배형 조사

(1) 공시균주

본 실험은 국내에서 채집 · 분리되어 강원대학교 동충하초 은행 Entomopathogenic Fungal Culture Collection, Kangwon National University, Chuncheon, Korea(EFCC)에서 보관중인 노랑다발동충하초(*Cordyceps bassiana*) C-783으로부터 분리된 C-12511-6×9와 C-12511-8×9의 단포자 균주와 이로부터 분리된 C-15736을 포함한 12개의 균주를 이용하여 mating 실험을 실시하였으며, 위의 결과로부터 C-15736-2×8을 포함한 4개의 조합균주를 선발하여 자성배우자와 옹성 배우자를 조사하였다(Table 1).

Table 1. List of *Cordyceps bassiana* strains used in the experiment

Experiments	Strains	
Mating test I	C-12511-6×9	
	C-12511-8×9	
Mating test II	Before	After
	C-12511-6×9-1	C-15736
	C-12511-6×9-9	C-15737
	C-12511-6×9-2×8	C-15738
	C-12511-6×9-3×6	C-15739
	C-12511-6×9-4×7	C-15740
	C-12511-6×9-5×6	C-15741
	C-12511-8×9-9	C-15742
	C-12511-8×9-10	C-15743
	C-12511-8×9-1×2	C-15744
	C-12511-8×9-2×5	C-15745
	C-12511-8×9-3×6	C-15746
	C-12511-8×9-5×6	C-15747
	Female gamete or male gamete test	Combination of strains C-15736-2 and C-15736-8
Combination of strains C-15738-3 and C-15738-7		
Combination of strains C-15741-4 and C-15741-9		
Combination of strains C-15746-2 and C-15746-10		

(2) 공시균주의 유래

본 연구를 하기 위하여 사용된 C-12511-6×9와 C-12511-8×9, 이로부터 분리된 C-15736을 포함한 12개의 균주는 국내에서 채집·분리되어 강원대학교 동충하초은행 Entomopathogenic Fungal Culture Collection, Kangwon National University, Chuncheon, Korea(EFCC)에서 보관중인 노랑다발동충하초(*Cordyceps bassiana*) C-783으로부터 유래되었다. 원균인 C-783으로부터 C-2830, C-2831, C-2832를 계대하였고, 이것을 배양하여 water dilution 방법에 의해 분생포자를 분리하였다. 이렇게 하여 분리된 분생포자를 다시 배양한 결과 C-2832에서 인공자실체가 형성되었고, C-2832의 인공자실체는 C-12511의 새 균주번호를 부여하였다. C-2832로부터 유래된 C-12511의 자낭각으로부터 단포자를 분리하여 mating 실험을 실시한 결과 C-12511-6×9와 C-12511-8×9의 조합에서 인공자실체가 형성되었다. 인공자실체가 형성된 C-12511-6×9와 C-12511-8×9의 자낭각으로부터 단포자를 분리하였고, 이것을 4°C의 chamber에서 보관하였다. 본 실험을 하기 위하여 보관중인 C-12511-6×9와 C-12511-8×9로부터 분리된 단포자 균주를 SDAY 고체배지에 이식하여 활력을 확인 후 상태가 양호한 균주를 각각 10개씩 선발하여 mating 실험을 하였다. 실험 결과 mating type이 확실한 heterothallism의 특성을 보였고, 이를 증명하기 위하여 앞서 실시한 실험 결과 형성된 인공자실체로부터 C-12511-6×9-1을 포함한 12개의 균주를 선발하였다. 선발된 12개의 균주는 C-15736부터 C-15747까지 새 균주번호를 부여하였고, 이로부터 단포자를 분리하여 mating 실험을 반복하였다(Table 1.1, Fig. 1).

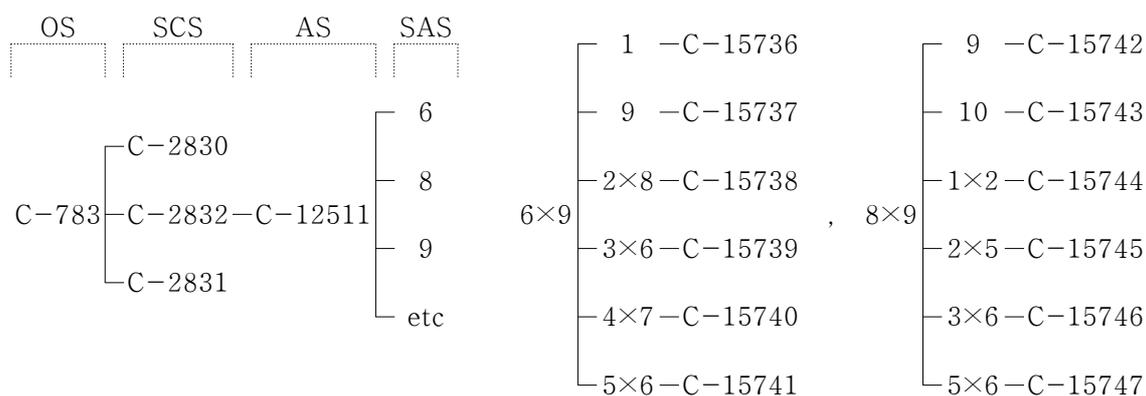


Fig. 1. The origin of *Cordyceps bassiana* strains used in the experiment.
 OS: Original strain, SCS: Single conidium strain, AS: Artificial stromata, SAS: Single ascospore strain

(3) C-12511-6×9와 C-12511-8×9의 mating 실험(I)

본 실험은 4°C의 chamber에서 보관중인 C-12511-6×9와 C-12511-8×9로부터 분리된 단포자 균주를 SDAY 고체배지에 이식하여 활력을 확인 후 상태가 양호한 균주를 각각 10개씩 선발하여 다음의 방법으로 mating 실험을 실시하였다. 250ml Erlenmeyer flask에 SDAY 액체배지를 100ml씩 분주하였다. Silicon plug로 flask 입구를 막은 후 호일을 씌워 121°C, 1.2psi에서 20분간 고압 살균하여 액체배지를 제조하였다. 각 Petri-dish상에 배양된 단포자의 가장자리 부분을 직경 5mm의 cork borer를 이용하여 절단 후 교배조합에 맞추어 flask에 접종하였고, 24±1°C의 군사배양실에서 2-3일간 배양하였다. 배양된 액체종균은 1000cc pp병에 현미 60g, 번데기 10g 그리고 distilled water 70ml를 넣고 121°C, 1.2psi에서 20분간 살균하여 만든 현비배지에 접종하였다. 접종 후 24±1°C의 군사배양실에서 3-4일간 배양 후 군사가 현미에 활착되면 20±1°C의 자실체 형성 배양실로 옮겨 6주간 인공자실체 형성을 유도하여 mating type을 조사하였다(11,12,13,14).

(4) 균주 선발과 단포자 분리 및 mating 실험(II)

C-12511-6×9와 C-12511-8×9의 mating 실험 결과로부터 형성된 인공자실체에서 활력이 양호한 C-12511-6×9-1을 포함한 12개의 균주를 선발하였다. 선발된 12개의 균주는 C-15736부터 C-15747까지 새 균주번호를 부여하였고, 성숙한 인공자실체로부터 WA(Water Agar)배지 상에 포자를 받았다. 받아들인 포자는 만 하루정도 방치하여 형태가 보다 선명해지면 해부현미경을 이용하여 단포자(single ascospore)를 분리하였다. 분리한 단포자는 미리 제조해 놓은 SDAY 고체배지에 이식 후 24±1°C의 군사배양실에서 2주간 배양하였다. 2주간 배양된 단포자 중 상태가 양호한 균주를 각각 10개씩 선발하였고, 다음의 방법으로 mating 실험을 반복하였다(선발된 단포자 균주의 개수가 10개가 되지 않을 경우에는 그대로 사용했다). 250ml Erlenmeyer flask에 SDAY 액체배지를 100ml씩 분주하였다. Silicon plug로 flask 입구를 막은 후 호일을 씌워 121°C, 1.2psi에서 20분간 고압 살균하여 액체배지를 제조하였다. 각 petri-dish상에 배양된 단포자 균주의 가장자리 부분을 직경 5mm의 cork borer를 이용하여 절단 후 교배조합에 맞추어 flask에 접종하였고, 24±1°C의 군사배양실에서 2-3일간 배양하였다. 배양된 액체종균은 1000cc pp병에 현미 60g, 번데기 10g 그리고 distilled water 70ml를 넣고 121°C, 1.2psi에서 20분간 살균하여 만든 현비배지에 접종하였다. 접종 후 24±1°C의 군사배양실에서 3-4일간 배양 후 군사가 현미에 활착되면 20±1°C의 자실체 형성 배양실로 옮겨 6주간 인공자실체 형성을 유도하여 mating type을 조사하였다(6, 15,16,17).

(5) 자성배우자와 음성배우자 조사

이전에 실시한 mating 실험 결과로부터 C-15736-2×6, C-15738-3×7, C-15741-4×9 그리고 C-15746-2×10 균주를 선발하였다. A×a 균주는 A, a 단포자 균주의 mating

에 의하여 자실체를 형성하므로 A, a 단포자 균주를 각각 배양 후 A 단포자 균주를 일정기간 배양한 배지에 a 단포자 균주를 배양한 액체종균을 접종하고, a 단포자 균주를 일정기간 배양한 배지에 A 단포자 균주를 배양한 액체종균을 접종하여 인공자실체 형성여부로 자성배우자와 옹성배우자를 조사하였다. 실험은, 먼저 각 조합의 단포자 균주를 SDAY 액체배지를 100ml씩 분주하여 제조한 250ml Erlenmeyer flask에 접종하였다. 접종된 액체종균은 2-3일간 $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 의 군사배양실로 옮겨 배양 후 미리 제조해 놓은 현미배지에 각 조합 당 3반복하여 접종하였다(3개의 배지 중 1개는 대조군으로 단포자 균주만 배양하였다). 접종된 현미배지는 $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 의 군사배양실에서 3-4일간 배양 후 군사가 현미에 활착되면 $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ 의 자실체 형성 배양실로 옮겨 3-4주간 배양하였다. 3-4주 후 군사가 완전히 배지를 덮어서 배지가 보이지 않음을 확인 후 미리 제조해 놓은 SDAY 액체배지에 각 조합의 단포자를 접종하여 $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 2-3일간 배양한 액체종균을 교배조합에 맞게 접종하였다. 접종된 현미배지는 $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ 의 자실체 형성 배양실에서 3-4주간 인공자실체 형성을 유도하여 자낭각의 형성 여부, 자실체의 길이(mm), 자낭각이 형성된 자실체의 개수를 조사하였다(6,17,18,19).

나. 계대배양 및 Petri-dish배양에서 균주의 활력 조사

(1) 공시균주 선발

본 실험은 세 가지 조건에서 실시하였다. 첫 번째로 C-15739-6, C-15741-6, C-15744-8을 이용하여 다포자 균주의 계대배양에 따른 인공자실체의 활력을 조사하였다. 두 번째로 C-15736-2×6, C-15746-2×4를 이용하여 대립교배형 균주의 mating을 통한 계대배양에 따른 인공자실체의 활력을 조사하였다. 세 번째로 다포자 균주의 계대 실험으로부터 C-15741-6의 2차 계대균주를 선발하여 Petri-dish상의 군사배양기간에 따른 인공자실체의 활력을 조사하였다. 위의 실험에 사용된 균주는 이전에 실시한 mating 실험 결과로부터 선발하였다.

(2) 다포자 균주의 계대배양에 따른 인공자실체 형성

다포자 균주 C-15739-6, C-15741-6 그리고 C-15744-8을 이용하여 원균에서 순차적인 계대 실험을 실시하였다. 원균의 선단부분에서 5mm cork borer를 이용하여 두 개의 균총을 절단 후 미리 제조해 놓은 SDAY 고체배지에 한 개의 균총을 접종하여 1차 계대를 하였고, 나머지 균총은 미리 제조해 놓은 SDAY 액체배지에 접종하였다. SDAY 고체배지에 접종된 1차 계대균주는 일주일 동안 $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 의 군사배양실에서 배양하였고, 원균과 같은 방법으로 순차적인 계대 실험을 실시하였다. 제조된 액체종균은 2-3일간 $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 의 군사배양실로 옮겨 배양 후 미리 제조해 놓은 현미배지에 각 균주 당 3반복하여 접종하였다. 접종된 현미배지는 $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 의 군사배양실에서 3-4일간 배양 후 군사가 현미에 활착되면 $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ 의 자실체 형성 배양실로

옮겨 6주간 인공자실체 형성을 유도하여 자낭각의 형성 여부, 자실체의 길이(mm), 자낭각이 형성된 자실체의 개수, 자실체의 건중량(g/bottle) 및 생물학적 효율(B.E.)을 조사하였다(6,18,19,20).

(3) 대립교배형 균주의 mating을 통한 계대배양에 따른 인공자실체 형성

C-15736-2×6, C-15746-2×4 균주를 이용하여 대립교배형 균주의 mating을 통한 원균에서 순차적인 계대 실험을 실시하였다. A×a 균주는 A, a 단포자 균주의 mating에 의하여 자실체를 형성하므로 A, a 단포자 균주의 선단부분에서 5mm cork borer를 이용하여 두 개의 균총을 절단 후 미리 제조해 놓은 SDAY 고체배지에 한 개의 균총을 접종하여 1차 계대를 하였고, 나머지 균총은 미리 제조해 놓은 SDAY 액체배지에 A, a 균주를 같이 접종하였다(A×a). SDAY 고체배지에 접종된 1차 계대균주는 일주일 동안 24±1℃의 균사배양실에서 배양하였고, 원균과 같은 방법으로 순차적인 계대 실험을 실시하였다. 제조된 액체종균은 2-3일간 24±1℃의 균사배양실로 옮겨 배양 후 미리 제조해 놓은 현미배지에 각 균주 당 3반복하여 접종하였다. 접종된 현미배지는 24±1℃의 균사배양실에서 3-4일간 배양 후 균사가 현미에 활착되면 20±1℃의 자실체 형성 배양실로 옮겨 6주간 인공자실체 형성을 유도하여 자낭각의 형성 여부, 자실체의 길이(mm), 자낭각이 형성된 자실체의 개수, 자실체의 건중량(g/bottle) 및 생물학적 효율(B.E.)을 조사하였다.

(4) Petri-dish상의 균사배양기간에 따른 인공자실체의 활력을 조사

다포자 균주의 계대 실험 결과로부터 활력이 양호하게 조사된 C-15741-6의 2차 계대균주를 선발하여 Petri-dish상의 균사배양기간을 1주 간격으로 3주, 2주 간격으로 3주간 배양하여 총 9주 동안 인공자실체의 활력을 조사하였다. 실험은, 먼저 C-15741-6의 1차 계대균주의 선단부분에서 5mm cork borer를 이용하여 균총을 절단 후 미리 제조해 놓은 SDAY 고체배지에 접종하였다. 접종된 2차 계대균주는 24±1℃의 균사배양실에서 배양하며 3일 간격으로 균사의 성장 길이를 측정하였고, 7일 또는 14일 간격으로 배양중인 균주의 선단부분에서 5mm cork borer를 이용하여 균총을 절단 후 미리 제조해 놓은 SDAY 액체배지에 접종하였다. 접종된 액체종균은 2-3일간 24±1℃의 균사배양실로 옮겨 배양 후 미리 제조해 놓은 현미배지에 3반복하여 접종하였다. 접종된 현미배지는 24±1℃의 균사배양실에서 3-4일간 배양 후 균사가 현미에 활착되면 20±1℃의 자실체 형성 배양실로 옮겨 6주간 인공자실체 형성을 유도하여 자낭각의 형성 여부, 자실체의 길이(mm), 자낭각이 형성된 자실체의 개수, 자실체의 건중량(g) 및 생물학적 효율(B.E.)을 조사하였다(6,19,20,21).

다. 인공재배에서 액체종균 제조 조건 및 수확시기 조사

(1) 공시균주 선발

본 실험은 네 가지 조건에서 실시하였다. 첫 번째로 C-15736-2×6, C-15746-2×4 균주를 이용하여 액체종균 제조에서 접종 균총의 적정 개수를 조사하였다. 두 번째로 C-15738-3×7을 포함한 4개의 균주를 이용하여 액체종균 제조에서 접종 균총의 적정 비율을 조사하였다. 세 번째로 C-15744-7, C-15747-3 균주를 이용하여 액체종균의 소량배양과 대량배양으로부터 형성된 인공자실체의 활력을 비교하였다. 네 번째로 C-15746-2×4 균주를 이용하여 인공재배에서 적정 수확시기를 조사하였다. 위의 실험에 사용된 균주는 이전에 실시한 mating 실험 결과로부터 선발하였다.

(2) 액체종균 제조에서 접종 균총의 적정 개수 조사

C-15736-2×6, C-15746-2×4 균주를 이용하여 A×a에서 A, a 대립교배형 균주의 균총 접종 개수를 1×1, 2×2, 3×3, 4×4, 5×5의 방법으로 mating을 하였다. 실험은 각 조합균주의 선단부분에서 5mm cork borer를 이용하여 정해진 양만큼 균총을 절단 후 미리 제조해 놓은 SDAY 액체배지에 접종하였다. 제조된 액체종균은 2-3일간 24±1℃의 균사배양실로 옮겨 배양 후 미리 제조해 놓은 현미배지에 각 균주 당 3반복하여 접종하였다. 접종된 현미배지는 24±1℃의 균사배양실에서 3-4일간 배양 후 균사가 현미에 활착되면 20±1℃의 자실체 형성 배양실로 옮겨 6주간 인공자실체 형성을 유도하여 자낭각의 형성 여부, 자실체의 길이(mm), 자낭각이 형성된 자실체의 개수, 자실체의 건중량(g/bottle) 및 생물학적 효율(B.E.)을 조사하였다.

(3) 액체종균 제조에서 접종 균총의 적정 비율 조사

C-15738-3×7, C-15741-4×9, C-15744-5×7, 15746-2×10 균주를 이용하여 A×a에서 A, a 대립교배형 균주의 균총 접종 비율을 2:2, 1:3, 3:1로 하여 mating을 하였다. 실험은 각 조합균주의 선단부분에서 5mm cork borer를 이용하여 정해진 양만큼 균총을 절단 후 미리 제조해 놓은 SDAY 액체배지에 접종하였다. 제조된 액체종균은 2-3일간 24±1℃의 균사배양실로 옮겨 배양 후 미리 제조해 놓은 현미배지에 각 균주 당 3반복하여 접종하였다. 접종된 현미배지는 24±1℃의 균사배양실에서 3-4일간 배양 후 균사가 현미에 활착되면 20±1℃의 자실체 형성 배양실로 옮겨 6주간 인공자실체 형성을 유도하여 자낭각의 형성 여부, 자실체의 길이(mm), 자낭각이 형성된 자실체의 개수, 자실체의 건중량(g/bottle) 및 생물학적 효율(B.E.)을 조사하였다.

(4) 액체종균의 소량배양과 대량배양으로부터 형성된 인공자실체의 활력 비교

C-15744-7, C-15747-3 균주를 이용하여 250ml Erlenmeyer flask 배양과 8L 대량 배양으로부터 형성된 인공자실체의 활력을 비교하였다. 다포자 균주의 선단부분에서 5mm cork borer를 이용하여 균총을 절단 후 미리 제조해 놓은 2개의 SDAY 액체배지에 접종하였다. 접종된 액체종균은 정치 배양하여 24±1℃에서 2-3일간 배양

후 1개는 8 L 액체배지에 접종하였다. 8 L 액체배지는 통기 배양하여 2일간 배양 후 250ml Erlenmeyer flask에 접종된 액체종균과 같이 1000cc pp병에 현미 60g, 번데기 10g 그리고 distilled water 70ml를 넣고 121°C, 1.2psi에서 20분간 살균하여 만든 현미배지에 접종하였다. 접종된 현미배지는 24±1°C의 군사배양실에서 3-4일간 배양 후 군사가 현미에 활착되면 20±1°C의 자실체 형성 배양실로 옮겨 6주간 인공 자실체 형성을 유도하여 자낭각의 형성 여부, 자실체의 길이(mm), 자낭각이 형성된 자실체의 개수, 자실체의 건중량(g/bottle) 및 생물학적 효율(B.E.)을 조사하였다(6,13).

(5) 인공재배에서 적정 수확시기 조사

C-15746-2×4 균주를 이용하여 인공재배에서 적정 수확시기를 조사하였다. 실험은, 먼저 조합균주의 선단부분에서 5mm cork borer를 이용하여 균총을 절단 후 미리 제조해 놓은 SDAY 액체배지에 접종하였다. 제조된 액체종균은 2-3일간 24±1°C의 군사배양실로 옮겨 배양 후 미리 제조해 놓은 현미배지에 각 균주 당 3반복하여 접종하였다. 접종된 현미배지는 24±1°C의 군사배양실에서 3-4일간 배양 후 군사가 현미에 활착되면 20±1°C의 자실체 형성 배양실로 옮겨 현미배지 접종 후, 3주 후부터 9주까지 일주일 간격으로 배양중인 인공자실체의 자낭각 형성 여부, 자실체의 길이(mm), 자낭각이 형성된 자실체의 개수, 자실체의 건중량(g/bottle) 및 생물학적 효율(B.E.)을 조사하였다(6,15,20).

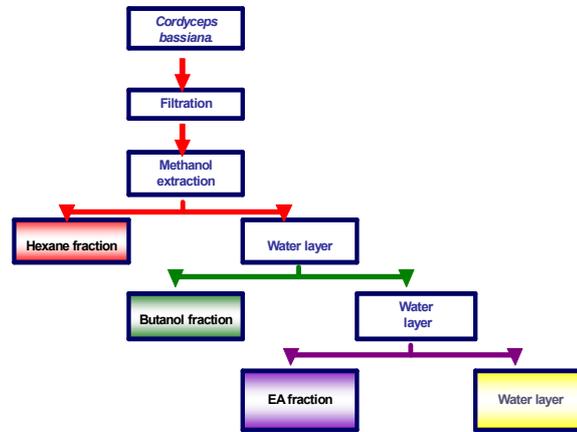
4. 노랑다발동충하초의 생리활성 및 생화학특성 연구

가. 노랑다발 동충하초(*Codyceps bassiana*)



강원대학교 EFCC에서 분양받아 주식회사 머쉬텍에서 대량생산하여 얻어진 자실체를 시료로 사용하였다.

나. 노랑다발 동충하초의 추출 및 분획 과정



Fractionation of *Cordyceps bassiana*.

노랑다발 동충하초를 Methanol로 추출하여, 여러 가지 용매로 분획하였다. 본 실험에서는 Hexane 분획물로 실험하였다.

다. 시 약

DMEM(high glucose dulbecco's modified eagle's medium), hepes buffer, antibiotics ,streptomycin and penicillin-G, FBS(fetal bovin serum), DMSO(dimethyl-sulfoxide), Tween-20, TEMED, SDS, PBS(phosphated based saline, PH7.4), LPS(lipopolysaccharide), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), culturel -asks/dishes and Multiwell culture plate, Antibody (iNOS, COX-2, p38, p-p38, Ikb, p-Ikb, JNK, p-JNK, b-actin)

라. 기기

본 실험에 사용된 기기는 다음과 같다.

UV/VIS spectrophotometer : U-100 spectrophotometer Hitachi

마. 노랑다발동충하초의 항산화효과 측정 (DPPH assay)

시료의 항산화효과를 측정하기 위하여 전자공여능(electron donating ability EDA%)에 의한 환원력으로 항산화증을 표시하는 방법이다. 동충하초 각각의 시료 100, 200, 400, 600, 800, 1000ug/ml을 전체부피 1000ug/ml가 되도록 pH7.4 PBS buffer와 잘 섞고, 0.1mM DPPH(1,1-Diphenyl-2picryl hydrazyl) 용액 (99.5% Ethanol 용해) 3ml을 가한다. 37°C에서 30분동안 incubation 한 후, 515nm의 spectrophotometer에서 측정하였다.

바. LDL 산화도 측정 (TBARS)

Human plasma LDL(400 μ g 단백질), 1mM CuSO₄ 16 μ l, 농도별로 조제한 각 시료 (25, 50, 100, 200ppm) 100 μ l에 PBS(pH 7.4)를 섞어 전체 부피가 1ml가 되도록 한다. Vortex mixer로 혼화하여 37 $^{\circ}$ C 수욕 상에서 4시간 동안 진탕 배양하여 산화시킨 후 1mM EDTA 20 μ l를 첨가하여 산화를 중지시킨다. 산화된 LDL용액에 25% trichloroacetic acid 1ml를 넣어 단백질을 침전시킨 후 그 상등액에 1% thiobarbituric acid 1ml를 첨가하여 95 $^{\circ}$ C에서 발색시킨 후 냉각시킨다. 생성된 MDA의 양을 532nm에서 spectrophotometer를 이용하여 측정한다.(Scheme 2) MDA 표준시료로는 10nM 1,1,3,3-Tetraethoxypropane 용액을 용시 조제하여 사용한다. 각 시료의 LDL 지질과산화 억제효과를 비교검토하기 위해서 Cu²⁺에 의해 유도되는 과산화지질의 생성을 50% 억제하는데 필요한 시료의 농도(IC₅₀)을 측정한다(22,23).

사. Agarose gel electrophoresis

LDL oxidation solution을 sample의 농도를 달리하여 첨가한 후 oxidation시킨 다음 0.7% agarose gel을 이용하여 mobility를 관찰하였다. Sample buffer와 LDL oxidation solution을 같은 양을 섞은 후 2~3시간 정도 농축시킨다. 10~20ul를 injection하였고, 30mA~35mA의 전력으로, loading buffer는 TBE buffer를 사용하여 전개시켰다.

아. Cell culture

대식세포인 RAW 264.7세포는 ATCC에서 구입 하였으며, 10% FBS DMEM medium [penicillin (100 units/ml) plus streptomycin (100 μ g/ml)] 으로 키웠으며 배양 조건은 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C로 유지되는 incubator에서 배양하였다. 그 후 60mm culture dish에 (2X10⁶)개의 세포를 심고 24시간 배양 후 실험 시작하였다. 번데기동충하초의 각 분획을 DMSO에 100mg/ml로 녹인 후, 각각의 최종 동도가 되도록 DMSO의 최종농도가 0.5%이하가 되게 시료를 첨가하였다 그리고 각각의 시료를 세포에 가하기 전에 LPS(1 μ g/ml), IFN- γ (10U/ml)을 세포에 가한 후 각각의 시료를 세포에 첨가하였다(24,25,26).

자. nitrite의 측정.

NO의 생성은 Nitrite 측정으로 간접적으로 확인 하였다. 실험 과정은 다음 과 같다. 세포에 시료를 투여한지 16시간 후에 배지를 걷어

서(100ul) A, B의 Griess reagent(A ; 1% sulfanilamide, B ; 0.1% naphthylenediamine in 5% phosphoric acid)를 섞은 시약 (50ul+ 50ul=100ul)과 반응시킨 후 550nm에서 측정하였다. 이때 nitrite 기준물질로 sodium nitrite를 사용하여 Raw264.7세포의 nitrite의 분비를 측정하였다(23).

차. Western blotting

대식세포에서 PGE₂, NO의 생성 단백질인 COX-2 및 iNOS를 다음과 같이 측정하였다. 최초 얻어진 세포들을 PBS(PBS, Sigma Chemical Company, USA)로 2회 가볍게 세척한다. 그 후 TBS를 완전히 제거 후 세포용해 및 염색시약인 phospho sample buffer를 200ul을 각각의 dish에 넣고 스크래퍼를 이용하여 긁는다. 그 후 10%의 SDS-PAGE를 통하여 전기이동 하였다. 전기 이동한 SDS-PAGE젤의 단백질을 PVDF막으로 이동 시킨다. 단백질 이동이 완료된 PVDF막을 상온에서 PBS-T(in 100 mM NaCl, 10 mM Tris, 0.1% (v/v) Tween-20, pH 7.4 (PBS-T) containing 5% milk)로 blocking한다. 그 후 PBS-T를 사용하여 5분간 세 번 세척한 후 5%탈지분유 PBS-T에 녹인 1차 항체를 붙인다. 그리고 2차 항체를 붙이기 전 PBS-T로 충분히 세척한다. 40분간 방치한 후 역시 PBS-T로 20분씩 3번 세척한다. 마지막으로 ECL detection system (Amersham, England) 을 사용하여 특정 단백질의 양 및 위치를 확인한다. 단백질양의 보정은 PVDF막을 재활용(stripping)하여 actin 단백질의 양을 확인함으로써 동량임을 보여주었다. 각각의 항체는 BD co.및 Cayman co.에서 구입 하였다

카. ROS 측정 (Confocal)

Raw 264.7 cell 을 18 mm coverslips 위에 37°C, 5% CO₂로 하루 정도 배양한다. 16시간의 starvation을 하고 phenol-red free 배지로 washing을 한 후 노랑다발 동충하초를 30분간 처리한다. 그리고 LPS를 20분간 처리 후 암실에서 DCF-DA를 9분간 처리하고 H₂O₂를 1분간 처리한다. phenol-red free 배지로 washing 후 detection 한다.

5. Cordycepin의 암세포 억제 기작 연구

가. 시약(materials)

High glucose dulbecco's modified eagle's medium(DMEM), RPMI1640, hepes buffer, antibiotics(streptomycin, penicillin-G) 및 fetal bovine serum(FBS)는 Gibco[USA]에서 구입하였으며, 0.01% trypsin-EDTA solution, 3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), dimethyl sulfoxide(DMSO), isopropanol, sodium dodecylsulfate(SDS), 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO), Catalase 는 Sigma chemical co.(USA)에서 구입하였다. phosphate based saline. (PBS pH 7.4). Culture flask/dishes 및 multi-well culture plates는 Corning CO.[USA]에서 구입하여 사용하였다. BCA™ protein assay kit는 PIERCE에서 구입하였으며, Mito-tracker RedCMXRos mitochondriol-selective probes sensor reagent, API(4,6-diamidino-2-pfenylindole, dihydrochloride), FITC-conjugated secondary antibody는 Molecular Probe Co(USA)에서 구입하였다. The colorigenic synthetic peptide substrate(Ac-DEVD-pNA)는 Alexis에서 구입하여 실험하였다.

나. Cordycepin의 암세포 억제 기작 연구

- ▶ 연구 범위: Cordycepin의 항암효과 측정
- ▶ 연구수행방법: Normal cell line으로는 CHO(chinese hamster ovary), NIH3T3(embryo fibroblast) cell line을, Cancer cellline으로는 HeLa (adenocarcinomas, cervix), B₁₆F₁₀ (melanoma), SKBR3 (breast), Du145 (adenocarcinoma, prostate, metastasis to brain), SKOV3 (adenocarcinoma, ovary) cell line을 사용하였다, 10% FBS DMEM or RPMI media에서 배양한 cell을 trypsinization하여 96well plate에 2×10^4 cell/well이 되도록 seeding하였으며 12hr 10% FBS media에서 증식시켰다. 12hr동안 0.5% FBS media에서 starvation후 drug(동충하초분획물, Sample)을 첨가한 후 , 48hr,72hr후 5 mg/ml의 MTT시약으로 cell의 증식억제정도를 흡광 570nm에서 ELISA를 통해 확인하였다. Assay에 사용한 동충하초 시료의 농도는 100mg/ml를 0% FBS media를 이용하여 0.01, 0.04, 0.08, 0.12, 0.16, 0.20mg/ml의 농도로 희석하여 사용하였다.

다. Cordycepin의 항암 기작 규명방법(Apoptosis assay)

▶ 연구 범위: Cordycepin의 항암 기작 규명방법

▶ 연구수행방법:

(1) TUNNEL assay

100mm dish에 고르게 MDA-MB231 cell을 키운 후에 Cordycepin을 12시간 처리한 후에, 세포사멸 효과로 인해서 일어나는 DNA 조각은 APO-BrdUTMTUNNEL assay kit를 이용하여 감지하였다.

(2) Annexin V-FITC/PI assay

Apoptotic cell을 Vybrant apoptosis assay kit를 이용하였다. 우선 60mm dish (2×10^6 cell)에 MDA-MB231 세포를 같은 양으로 넣은 후에 12시간 동안 CPBF를 처리하였다. 시간이 지나 후에 supernatant를 버린 후에 차가운 PBS buffer로 3회 씻어 준 trypsin-EDTA로 세포를 dish에서 분리한다. 분리된 세포를 원심분리한 후에 3% BSA buffer를 처리하여 resuspend한 후 4도에서 12,000 rpm으로 원심분리하여 얻은 pellet에 5ul Alexa Flour 488 annexin V와 동량의 PI를 넣고 100ul FACS buffer를 넣는다. 15분간 실온에 방치한 후에 400ul의 FACS buffer를 넣어서 FACS analyzer로 530nm와 575nm에서 형광을 측정한다.

라. 항암기작과 관련된 Western Blotting analysis

▶ 연구 범위: 항암기작과 관련된 Western Blotting analysis

▶ 연구수행방법:

MDA-MB231 세포에서 caspase-3, -8, -9, cytochrome C 그리고 AIF를 다음과 같이 측정하였다. 최초 얻어진 세포들을 PBS(PBS, Sigma Chemical Company, USA)로 2회 가볍게 세척한다. 그 후 PBS를 완전히 제거 후 세포용해 및 염색시약인 phospho sample buffer를 200ul을 각각의 dish에 넣고 스크래퍼를 이용하여 긁는다. 그 후 7%의 SDS-PAGE를 통하여 전기이동 하였다. 전기 이동한 SDS-PAGE젤의 단백질을 PVDF막으로 이동 시킨다. 단백질 이동이 완료된 PVDF막을 상온에서 PBS-T(in 100 mM NaCl, 10 mM Tris, 0.1% (v/v) Tween-20, pH 7.4 (PBS-T) containing 5% milk)로 blocking한다. 그 후 PBS-T를 사용하여 5분간 세 번 세척한 후 5%탈지분유 PBS-T에 녹인 1차 항체를 붙인다. 그리고 2차 항체를 붙이기 전 PBS-T로 충분히 세척한다. 40분간 방치한 후 역시 PBS-T로 20분씩 3번 세척한다. 마지막으로 ECL detection system (Amersham, England) 을 사용하여 특정 단백질의 양 및 위치를 확인한다. 단백질양의 보정은 PVDF막을 재활용(stripping)하여 actin 단백질의 양을 확인함으로써 동량임을 보여주었다. 각각의 항체는 BD co. 및 cell signaling에서 구입 하였다.

마. caspase의 활성 측정

- ▶ 연구 범위: caspase의 활성 측정
- ▶ 연구 수행 방법: AC-DEVD-pNA caspase 3을 이용하여 측정하였다. 12시간 동안 세포를 cordycepin과 함께 배양한 후에 세포를 PBS로 3번 씻어준다. 그런 후에 10% glycerol, 2mM DTT를 포함한 20mM HEPES buffer(pH 7.4)로 resuspension하여 3분간 15,000 rpm에서 원심분리를 하여 단백질이 50mg을 함유한 clear lysate를 1시간에서 3시간 동안 37도에서 100mM colorimetric substrate로 배양을 한다. Caspase-3 효소의 활성을 405nm에서 흡광을 측정하여 활성을 나타내었다.

바. Mitochondria 실험

- ▶ 연구 범위: Mitochondria 실험
- ▶ 연구 수행 방법:

(1) Mitochondria membrane potential(Mito Tracker Red CMXRos)

MDA-MB231세포와 함께 6시간동안 **Cordycepin**을 처리한 후에 500nM Mito Tracker Red CMXRos를 30분 동안 처리한다. 그런 후에 배지를 제거한 후에 Trypsin-EDTA를 이용하여 세포를 배양 접시에서 세포를 분리하여 5ml의 polystyrene-round bottom tube에 넣는다. PBS로 씻어 준 후에 Mito Tracker Red CMXRos의 세포내로 들어간 양을 FACS analyzer를 이용하여 579nm와 539nm에서 측정한다. 이 때 Mito Tracker Red CMXRos가 처리되지 않은 세포를 기준으로 삼아서 실험을 한다.

(2) Mitochondria membrane potential (JC-1)

MDA-MB231세포와 함께 6시간동안 **Cordycepin**을 처리한 후에, 37도에서 10ug/ml의 JC-1을 20분간 배양한다. 배양액을 버린 후에 PBS로 2회에서 3회 깨끗하게 씻어준 후에 Confocal microscope를 이용하여 측정한다.

(3) 미토콘드리아 분리 및 cytochrome C 측정

Cordycepin이 처리된 세포와 처리되지 않은 세포를 4℃에서 5 min간 1000 x g 로 원심분리한다. 얻어진 pellet을 차가운 PBS로 washing을 한 후, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, and 250 mM sucrose를 포함한 20 mM HEPES-KOH (pH 7.5)로 resuspension 한 후에 4℃에서 10분간 50 x g에서 원심분리를 한다. 원심분리가 끝난 상층액을 4℃에서 15분간 10,000 x g로 재 원심분리 한 후 그 pellet을 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.15 M NaCl, 5 mg/ml leupeptin, 0.5 mM PMSF, 2 mM sodium orthovanadate, 그리고 1% SDS가 포함된 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) lysis buffer 100ul로 suspension한다. 이 용해된 시료를 western

blotting을 통해서 cytochrome C를 확인하였으며, 원심분리를 한 후 얻어진 상층액은 다시 4℃에서 15분 동안 10,000 x g에서 원심분리를 하여 그 상층액을 western blotting을 통해서 cytosolic cytochrome C를 측정하였다.

사. Immunofluorescence microscopy

▶ 연구 범위: **Immunofluorescence microscopy**

▶ 연구수행방법: MDA-MB231 세포를 sterile glass coverslip에 16시간에서 24시간 동안 배양을 하여 세포를 안정화시킨다. 100nM Mito Tracker Red CMXRos는 10분 동안 4% paraformaldehyde을 가지고 고정시키기 전에 30분 동안 먼저 처리한다. 세포는 10% human AB serum을 포함한 PBS로 희석된 0.05% saponin을 넣어 세포 안으로 들어가게 한다. 4℃에서 45분간 5 Ag/ml의 AIF에 대한 rabbit mAB을 먼저 incubation 한 후에 세포는 Alexa 488 anti-rabbit 2차 항체(1:400)와 0.05% saponin을 포함한 PBS로 씻어준다. 또는 5분 동안 300nM DAPI을 가지고 배양한 후에 coverslip에 fluoromount-G를 넣고 confocal microscope로 측정을 한다.

아. Nuclear 추출

▶ 연구 범위: **Nuclear 추출**

▶ 연구수행방법:

Cordycepin이 처리된 세포와 처리되지 않은 세포를 4℃에서 2분간 2500rpm으로 원심분리하여 세포를 얻는다. 얻어진 pellet을 10mM KCl, 0.1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM DTT, 0.5mM PMSF, 5ug/ml leupeptin을 포함한 10mM HEPES(pH7.9)로 얼음에서 15분간 방치한 후에 다시 NP-40(Final CONC. 0.6%) 25ul을 추가하여 1분간 vortex 하여 4℃에서 5분간 14,000rpm으로 원심분리한다. 원심분리하여 얻은 pellet을 0.4N NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM DTT, 1mM PMSF, 10ug/ml leupeptin을 포함한 20mM HEPES(pH7.9)으로 resuspension하여 얼음에서 30분간 방치한다. 그런 후에 4℃에서 5분간 14,000rpm으로 원심분리하여 상층액을 새로운 tube에 넣고 BSA로 정량한다.

자. MTT assay

Cancer cell line(MDA-MB231, MCF7, PC3, DU145, MCF7 및 LNCap)을 사용하였고, 10% DMEM(or RPMI) media에서 배양한 cell을 96well plate에 1×10^4 cell/well이 되도록 seeding 하였으며, 24

시간동안 10% FBS media에서 증식시켰다. 24시간동안 serum free media에서 starvation후 각각의 cell에 Water, Ethanol 추출물을 dose dependent하게 되도록 첨가한 후 5mg/ml의 MTT 사약으로 흡광 570nm에서 ELISA를 통해 확인하였다.

6. 노랑다발동충하초의 항암특성

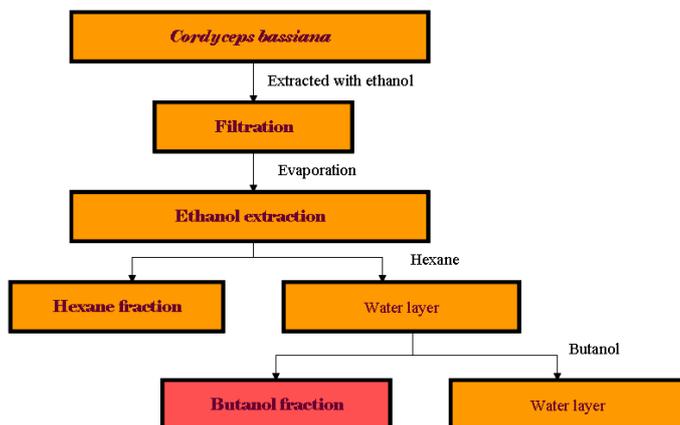
가. 시약

RPMI with 10% fetal bovine serum (FBS), L-glutamine (2 mM), penicillin (100U/mL), streptomycin (100mM), 1M HEPES buffer, trypsin-EDTA, (3-[4,5dimethyl 2-thiazolyl]-2,5-diphenyltetrazolium brolmide-(MTT), glucose, essential amino acids, and sodium pyruvate. DMSO(dimethyl-slufoxide), Tween-20, TEMED, SDS, PBS(phosphated based saline, PH7.4), culturel -asks/dishes and Multiwell culture plate, protein extraction solution, Antibody (Parp, Bcl-2, Bax, β -actin).

나. 전립선암세포(human prostate cancer cell)인 Du145와 PC3는 한국세포주은행 (Korea cell line bank)에서 구입하여 사용하였다.

다. 노랑다발 동충하초 부탄올 추출물제조

Preparation of extraction and fractionation of *Cordyceps bassiana*



라. 실험에 사용된 기기

UV/VIS spectrophotometer, Centrifuger, Flow cytrometer, Shaker

마. MTT assay

전립선암세포인 PC-3와 DU145를 10%의 FBS가 함유된 RPMI 배지에 배양한다. 24시간후 CBBF를 50ug/ml, 100ug/ml, 200ug/ml, 300ug/ml의 농도로 처리하여, 24시간 배양한 후, 3mg/ml MTT용액을 2시간 처리 후 세포벽을 용해시키고 570nm에 흡광도를 측정하여 각 세포의 생존율을 측정하였다.

바. Clonogenic assay

DU145 세포를 100mm 페트리디쉬에 24시간 배양한 후 CBBF를 50ug/ml, 100ug/ml, 200ug/ml, 300ug/ml의 농도로 각 디쉬별로 처리해준다. 24시간 후, Drug을 제거하고 10%의 FBS가 함유된 RPMI 배지로 교체해준 후, 약 2주간 배양한다. 콜로니가 형성되면 배지를 제거하고 PBS로 워싱한 후 crystal violet mixture(glutaraldehyde 6.0%, crystal violet 0.5% in H₂O)를 가해준 후 30분 이상 incubation 시킨 후, Crystal violet mixture를 제거하고 물로 헹궈 준 후 콜로니를 count하였다.

사. Flow cytometry

10%FBS가 함유된 RPMI 배지에 24시간 배양된 세포에 CBBF를 50ug/ml, 100ug/ml, 200ug/ml, 300ug/ml의 농도로 처리한 후, 24시간 후에 세포를 튜브에 모으고 알코올을 처리하여 고정시켜준 후, binding buffer(10mM HEPES; 140mM NaCl; 2.5mM CaCl₂) 0.5ml, RNase solution 10ul, PI(1mg/ml propidium iodoide) 25ul를 넣고 20~30분간 incubation시킨 후, flow cytometry로 측정하였다.

아. DNA fragmentation

96well plate에 각 well당 세포를 10000개씩 들어가게 seeding해 주고, 24시간을 배양한 후에 농도별로 50ug/ml, 70ug/ml, 100ug/ml, 200ug/ml 의 농도로 처리하고 24시간이 지난 후에, cell death detection ELISA의 키트를 순서대로 처리해 준 후 반응시켜 405nm와 490nm에서 흡광도를 측정하고, 405nm에서 490nm를 빼준 흡광도 값으로 DNA fragmentation을 확인하였다.

자. Western blot

DU145세포를 24시간 배양한 후 CBBF를 50ug/ml, 100ug/ml, 200ug/ml, 300ug/ml의 농도로 24시간 처리해준다. 세포배양액을 모아서 4000RPM에서 5분간 원심분리한 후 침전물을 모으고 세포를 lysis buffer로 긁어 모은 후에 침전물과 섞어서 충분히 용해시킨 후, 14000RPM에서 20분간 원심분리를 해준다. 상층액을 모아서 BCA solution으로 562nm에서 흡광도를 측정을 통해 정량을 한다. 그리고 SDS-PAGE를 통해서 전기영동한 후, 젤을 PVDF membrane에 transfer시킨 후,

이 membrane에 1, 2차 안티바디를 붙여서 ECL solution을 통해 필름에 감광시켰다.

7. 노랑다발동충하초 균주간의 생리활성 차이 및 비교실험

가. 노랑다발동충하초 균주의 선택

노랑다발동충하초 균주간의 생리활성 차이 및 비교실험을 위하여 사용된 균주는, 1784, 1795, 5657, 9044, 15746의 5종의 노랑다발동충하초 균주를 사용하여 생리활성 비교를 하였다.

나. 5종의 노랑다발동충하초 균주의 제조.

종의 노랑다발동충하초 균주는 아래의 사진과 같이 배양법에 의해 균사체(the cultural mycelium) 를 제조하였으며, 배양된 5종의 노랑다발동충하초 균사체는 filter paper로 거른후(filter), 건조하여 각각 시료로 사용하였다.

다. 5종의 노랑다발동충하초 균주의 항산화 비교 실험(antioxidative activity).

DPPH실험법을 사용하였으며, 균주 1784, 1795는 100mg/ml로 녹이고, 균주 5657, 9044, 15746는 10mg/ml로 녹여서 각 Sample의 저해율에 따른 radical의 저해율이 60~70%가되는 농도를 찾아 실험하였다.

라. 5종의 노랑다발동충하초 균주의 항암 비교 실험.

MTT assay를 사용하여 항암능력을 비교 하였으며, Cancer cell line으로는, Hela, A549, B16F10를 사용하였다. cell을 각 well당 5×10^3 개로 seeding한 후 0.5% FBS media에서 starvation후, 각각의 노랑다발동충하초 시료를 100, 200, 300 ug/ml로 첨가한 후, 24hr, 48hr, 72hr 배양후, 1mg/ml의 MTT시약으로 570nm에서 흡광도를 확인하였다.

생리활성 비교에 사용된 5종의 노랑다발동충하초 균주의 특성

균주명	채집날짜	속명	종명	채집장소
1784	1997-09-27	Beauveria	SP.	Gujeol Mt
1795	1997-09-27	Beauveria	SP.	Gujeol Mt
5657	2000-08-15	Cordyceps	Scarbaeicola	Guryungryung
9044	2005-08-01	Cordyceps, OSU herbarium	Scarbaeicola	Taebeng Mt
15746	2008-02-11	Beauveria	bassiana	춘천 오봉산

마. 5종의 노랑다발동충하초 균주의 균사체 배양
아래 그림과 같은 방법으로 5종의 노랑다발동충하초 균주의 균사체를 배양하였다.

노랑다발 동충하초(5종) 균사체 배양 장치



8. 노랑다발동충하초유효물질을 함유한 제품연구 (기능성 약술 제조)

가. 노랑다발동충하초를 이용한 기능성 약술 제조법.

노랑다발동충하초유효물질을 이용한 기능성 약술은 아래의 표와 같이 제조하였다.

노랑다발동충하초를 이용한 기능성 약술 제조법.

동충화초 시료	노랑다발 동충화초를 이용한 기능성 약술		
	노랑다발 동충화초	술	숙성일수
CB1-5	35g	1L당	5일
CB2-5	70g	1L당	5일
CB1-10	35g	1L당	10일
CB2-10	70g	1L당	10일
CB1-20	35g	1L당	20일
CB2-20	70g	1L당	20일
CB1-30	35g	1L당	30일
CB2-30	70g	1L당	30일
CB1-60	35g	1L당	60일
CB2-60	70g	1L당	60일
CB1-90	35g	1L당	90일
CB2-90	70g	1L당	90일
CB3(CB1-#)	15g	1L당	90일

나. 노랑다발동충하초 이용한 기능성 약술 제조법의 항산화 비교 실험(antioxidative activity).

DPPH법을 사용하여 항산화력을 비교하였으며, 노랑다발동충하초 술을, 75mg/ml 농도로 녹인 후 각 Sample의 DPPH 따른 저해율 radical이 60~70%되는 농도를 찾아 희석하여 실험했다.

다. 노랑다발동충하초 이용한 기능성 약술의 항암 실험.

MTT assay를 이용하였으며, Cancer cell line인. Hela, A549, B16F10 cell을 사용하여 각 well당 cell을 5×10^3 개를 seeding 하였고, Sample(노랑다발동충하초 술)의 농도를 200ug/ul 처리하여 24hr,48hr,72hr 시간에 지난 후 2mg/ml MTT 시약으로 570nm 흡광

도를 측정하여, 각 cell의 Sample에 대한 viability를 조사했다

라. 노랑다발동충하초 약술의 관능검사.

노랑다발동충하초 약술의 관능검사를 위하여, 검사자들에게 아래의 표를 사용하여 평가를 하였다.

노랑다발 동충하초 기능성 술 관능검사							
		이름 :					
		5일	10일	20일	30일	60일	90일
맛	I						
	II						
향	I						
	II						
색	I						
	II						
average	I						
	II						

평가 범위 : 최고 : 10 - 최저 : 0
 최종평가 의견 :

9. 노랑다발동충하초를 이용한 아토피 치료 실험

제2세부과제로부터 노랑다발동충하초의 충분량 생산과 제1세부과제로부터 시료의 추출 및 분획, 각 분획물의 기초생리활성 탐색 및 항염효과 탐색 등의 실험이 선행되기를 기다림으로 인하여 본 제1협동과제의 실험이 지연되었다. 제1세부과제에서 노랑다발동충하초의 추출분획으로부터 항염효과가 관찰되었으므로 이들 추출분획의 아토피성 피부염 억제효과를 위하여 다음과 같이 실험을 진행하였다.

가. 실험동물

NC/Nga 마우스 (male, 6-wk-old)를 SLC(Shizuoko, Japan)로부터 공급받았다. 사육실 온도는 20±2℃, 습도는 50%를 유지하였고, 12시간 간격으로 명암을 바꿔 주었으며 사육실에서 1주간 적응 시킨 후 실험에 사용하였다.

나. 아토피성 피부염 유발

NC/Nga 마우스의 등 부위를 깨끗하게 제모하고 피부의 미세 상처가 치유되도록 24시간 방치하였다. 0.15% 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene(DNFB) 용액(acetone : olive oil = 3 : 1) 150 μ l을 제모한 부위에 주당 2회씩 총 6주간 도포하여 피부염을 유발하였다.

다. 동충하초 추출물 처치

노랑다발 동충하초(*Cordyceps bassiana*)의 butanol 추출분획(CBBF)의 분말을 vaseline에 10 mg/g의 농도로 균질 혼합하여 피부염이 발생된 환부에 12일 동안 도포하였다. 대조군에게는 vaseline 만을 동일 기간 도포하였다.

라. 혈청 중 IgE 측정

실험동물을 마취시킨 후 심장에서 채혈하여 원심분리 후 혈청을 얻었다. 얻은 혈청은 IgE ELISA Kit(Shibayagi Co., Japan)를 이용하여 측정하였다.

마. 조직학적 검사

환부의 피부조직을 1.5×1.5cm 두께로 잘라 내어 10% formaldehyde 용액에 고정하였다. Paraffin embedding과정을 거친 뒤 4 μ m 두께로 section하고 hematoxylin-eosin 염색법을 이용하여 광학현미경 상에서 관찰하여 피부의 변화를 관찰하였다.

바. Interleukin-4와 interferon-gamma 발현에 대한 피부의 면역조직화학적 검사

Paraffin 제거와 탈수과정을 거친 뒤 항원복구용액 (S2031, DAKO) 에 넣어 10분간 끓이고 냉각시킨 뒤 Peroxidase-blocking solution(S2023, DAKO)으로 20분간 반응시켰다. Slide에 normal serum을 추가하여 1시간 반응시킨 뒤 rat anti-mouse IL-4 mAb (11B11, PharMingen) 또는 anti-mouse interferon-gamma (PharMingen)를 떨어뜨리고 4℃에서 하루 밤 반응시켰다. TBS-T buffer(S3306, DAKO)로 5회 세척한 후 biotinylated secondary antibody를 추가하고 30분간 반응시켰다. 반응이 끝나면 5회 세척하고 Vectastain ABC Reagent(PK-6101, VECTOR)를 추가하여 30분간 반응시켰다. 반응이 끝나면 Chemmate DAB Kit(K5007, DAKO)로 발색시키고 hematoxylin으로 대조염색하였다.

사. 측정치의 통계처리

본 실험에서 얻은 모든 측정치는 평균 \pm 표준오차(mean \pm S.E.)로 제시하였다. 평균의 차이는 Student's *t* test를 이용하여 통계적으로 검정하였으며 유의수준은 5%로 하였다.

제 4 절 연구 결과

1. 노랑다발동충하초의 유전전자 수집, 분리동정, 자실체 형성 및 대량생산

가. Water potential에 따른 노랑다발동충하초균의 생장

- 평판배지에 25일 동안 배양 후 Colony의 직경을 측정하였다. 대부분의 균들이 0~-30 bar까지는 생장이 잘 되었으나 농도가 높아질수록 생장이 늦어지는 것을 알 수 있다(6,8,10).

Colony diameter(mm/after 25days)

(1) 0 bars

isolates	AxB - 1	AxB - 2	AxB - 4	AxB - 6	AxB - 8
	81.4	56.5	56.3	55.6	70.7
	51.5	85.0	60.5	75.6	68.8
	56.4	64.6	-	72.3	64.6

(2) -15 bars

isolates	AxB - 1	AxB - 2	AxB - 4	AxB - 6	AxB - 8
	85.0	85.0	80.6	83.8	71.8
	85.0	85.0	80.1	65.6	73.7
	83.3	65.6	72.6	80.6	85.0

(3) -30 bars

isolates	AxB - 1	AxB - 2	AxB - 4	AxB - 6	AxB - 8
	85.0	57.6	65.3	58.5	63.6
	62.6	67.4	65.6	57.5	64.5
	76.1	51.2	50.3	56.5	70.5

(4) -45 bars

isolates	AxB - 1	AxB - 2	AxB - 4	AxB - 6	AxB - 8
	60.5	64.4	63.5	60.4	57.5
	51.4	48.2	47.4	35.3	56.4
	69.6	55.3	61.5	50.3	43.8

(5) -60 bars

isolates	AxB - 1	AxB - 2	AxB - 4	AxB - 6	AxB - 8
	62.8	41.3	38.3	35.3	43.3
	62.4	41.3	48.3	36.3	43.7
	41.2	44.2	44.4	40.3	42.3

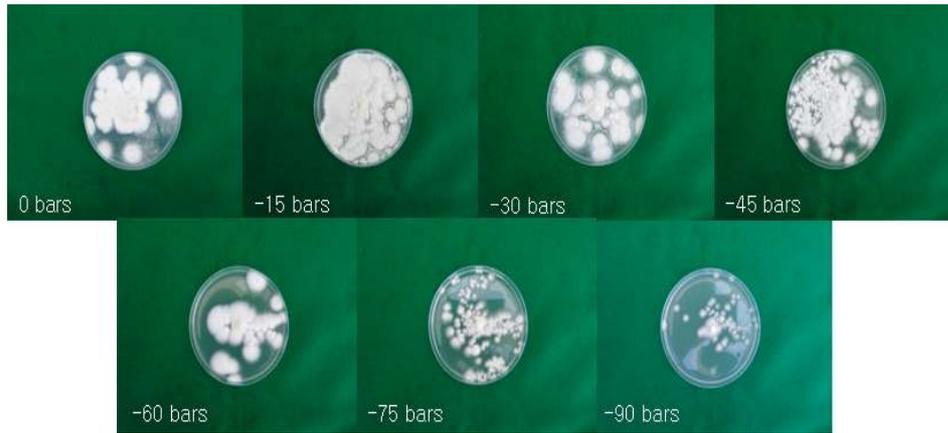
(6) -75 bars

isolates	AxB - 1	AxB - 2	AxB - 4	AxB - 6	AxB - 8
	20.1	21.3	26.2	22.2	24.2
	24.1	28.2	28.2	24.2	23.1
	23.2	28.2	28.2	20.1	28.1

(7) -90 bars

isolates	AxB - 1	AxB - 2	AxB - 4	AxB - 6	AxB - 8
	12.1	20.1	18.1	20.1	21.1
	20.2	18.1	20.1	18.6	16.1
	11.0	15.2	16.1	16.6	16.5

AxB -1



AxB -2



AxB -4



AxB -6



AxB -8



나. 노랑다발동충하초균의 자낭 포자를 이용한 mating 검정

- 완전 자실체의 형성 유무에 따라 서로 다른 sexual type이 만났을 수 있다. 자낭균류의 유성 세대 즉 완전 자실체는 서로 다른 mating type에서만 형성되기 때문이다. 그 결과 type A : 7, 4, 9, 2 type a : 1, 3, 5, 6, 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1					C	S,C	O	S,C		C
2			O			O				
3						S,C				
4						O		S		
5							O	S		S
6									O	
7								O		O
8										S
9										
10										

(S : Synemata; C : cottony; O : 자실체 형성)

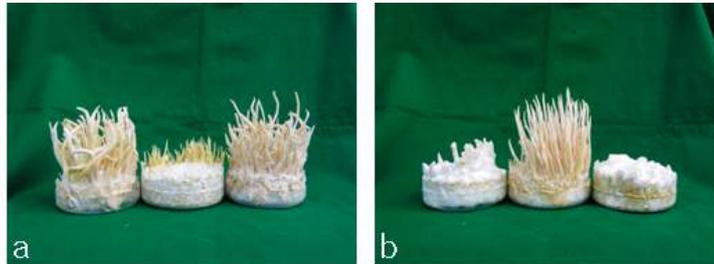


Fig. 2. a. 7x8, 8x10, 7x10. b. 8x1, 1x7, 1x10

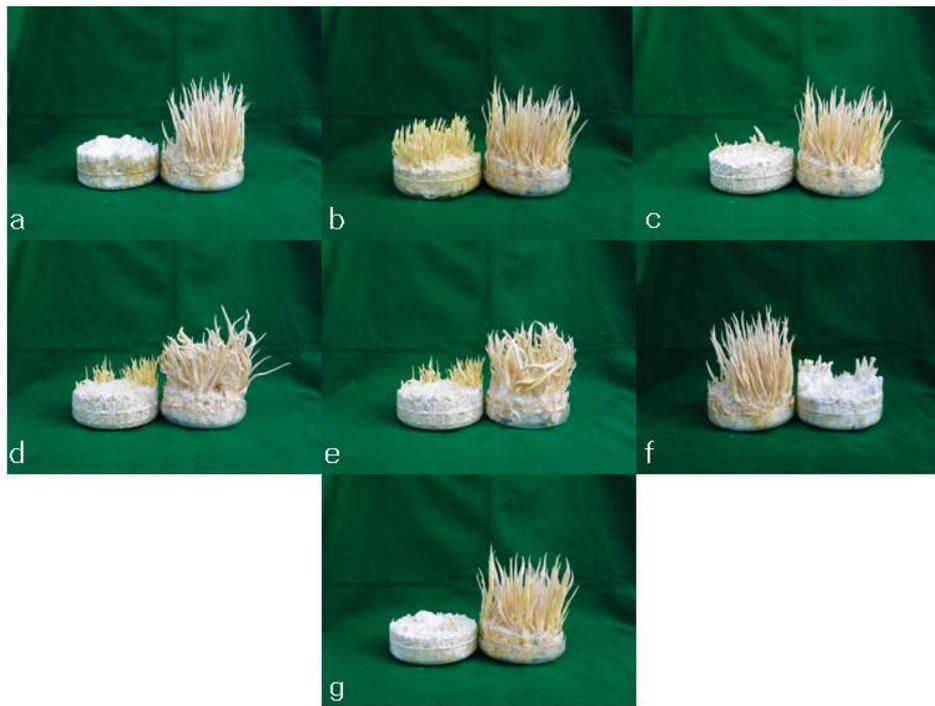


Fig. 3. a. 1x5, 5x7. b. 5x8, 5x7. c. 5x10, 5x7. d. 8x10, 7x8. e. 8x10, 7x10.
f. 1x7, 1x8. g. 1x10, 1x7

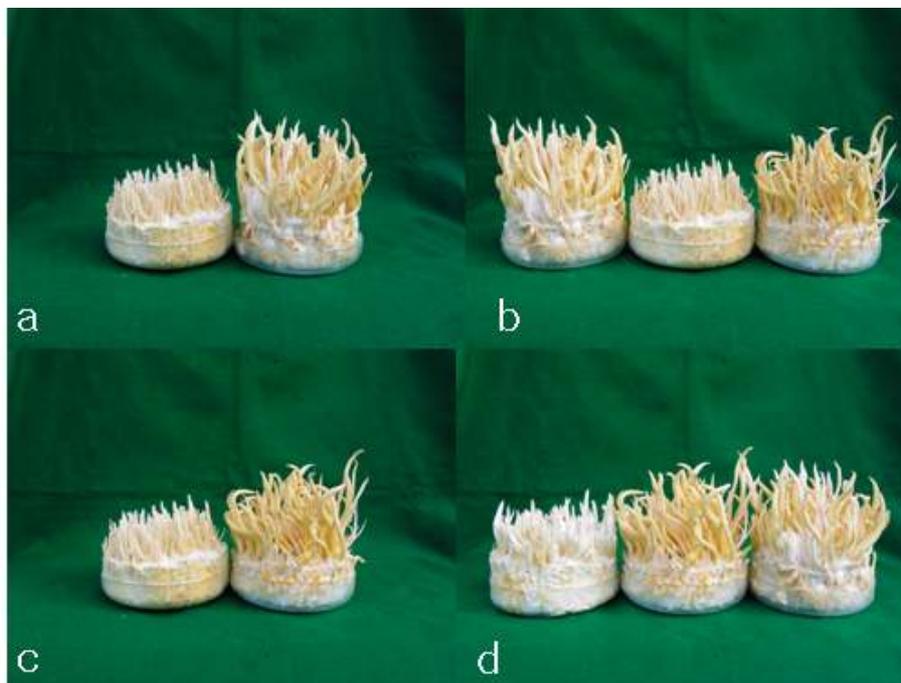


Fig. 4 a. 4x9, 4x6. b. 4x6, 4x9, 6x9. c. 4x9, 6x9 d. 6x1, 6x9, 6x4

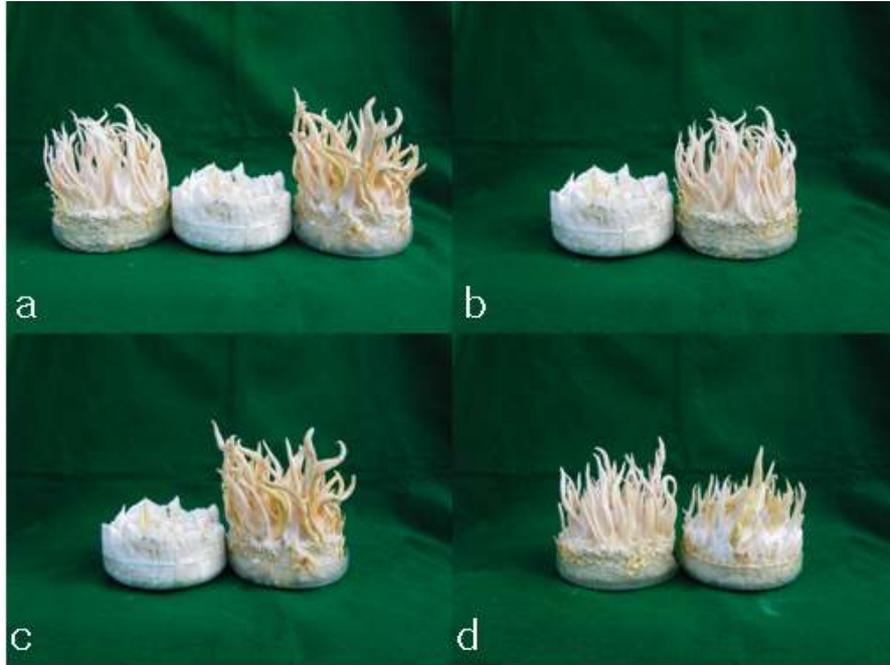


Fig. 5. a. 2x3, 3x6, 2x6. b. 3x6, 2x3. c. 3x6, 2x6. d. 3x4, 3x9

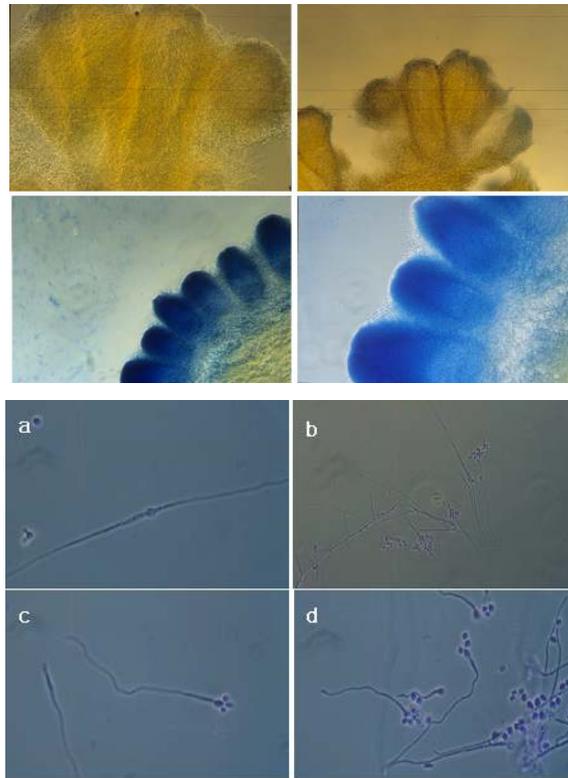
다. 노랑다발동충하초균의 자낭포자 mating type 결과에 따른 우수한 균주 확보 검정.

- 완전 자실체를 형성한 균주 조합을 다시 현미배지에 접종하여 우수한 균주를 검정하였다.
- 아래의 균주 조합이 우수한 능력을 보이는 것으로 나타났다.



Fig. 6. 재 검정을 통한 우수한 자실체 형성.

라. 노랑다발동충하초균의 포자및 균사 관찰



2. 노랑다발 동충하초(*Cordyceps bassiana*)의 확실한 mating type 규명
 가. EFCC 12511 6×9와 8×9의 균주 선발 및 자낭각 형성

가. EFCC 12511 6×9와 8×9의 자낭각 형성 유무

실험 결과 EFCC 12511 6×9와 8×9의 자낭각 형성 유무를 다음의 표로 정리하였다.

Table 2 EFCC 12511 6×9의 자낭각 형성 유무

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2		-	+	-	+	-	+	+	+	+
3			-	+	+	+	-	-	+	+
4				-	+	-	+	+	+	+
5					+	+	+	+	+	+
6						-	+	+	+	+
7							-	-	+	+

8								-	+	+
9									+	+
10										+

+: 자낭각 형성, -: 자낭각 형성하지 않음.

EFCC 12511 6×9의 결과

총 10개의 균주를 선발하였고 mating 결과 1,5,9,10번은 스스로 자낭각이 형성되었고, 나머지는 a 타입 2,4,6번, b 타입 3,7,8번의 조합에 의해 자낭각이 형성되었다. 그리고 homothalism인지 heterothalism인지 알아보기 위해 스스로 자낭각을 형성한 1번과 9번 그리고 조합에서 자낭각을 형성한 2×8, 3×6, 4×7, 5×6번을 다음 실험에 사용하였다.



Fig. 7. EFCC 12511 6×9, 6×8의 -, +, -의 조합



Fig. 8. EFCC 12511 6×9, 6×10의 -, +, +의 조합



Fig. 9. EFCC 12511 6×9, 4×6의 -, -, -의 조합



Fig. 10. EFCC 12511 6×9, 1×10의 +, +, +의 조합

표 2. EFCC 12511 8×9의 자낭각 형성 유무

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2		-	+	-	+	-	+	+	+	+
3			-	+	+	+	-	-	+	+
4				-	+	-	+	+	+	+
5					+	+	+	+	+	+
6						-	+	+	+	+
7							-	-	+	+
8								-	+	+
9									+	+
10										+

+: 자낭각 형성, -: 자낭각 형성하지 않음.

EFCC 12511 8×9의 결과

총 10개의 균주를 선발하였고 mating 결과 7,8,9,10번은 스스로 자낭각을 형성하였고, 나머지는 a 타입 1,3,4,5번, b 타입 2,6번의 조합에 의해 자낭각을 형성하였다. 그리고 homothalism인지 heterothalism인지 알아보기 위해 스스로 자낭각을 형성한 9번과 10번 그리고 조합에서 자낭각을 형성한 1×2, 2×5, 3×6, 5×6번을 다음 실험에 사용하였다.



Fig. 11. EFCC 12511 8×9, 1×4의 -, +, -의 조합



Fig. 12. EFCC 12511 8×9, 3×8의 -, +, +의 조합

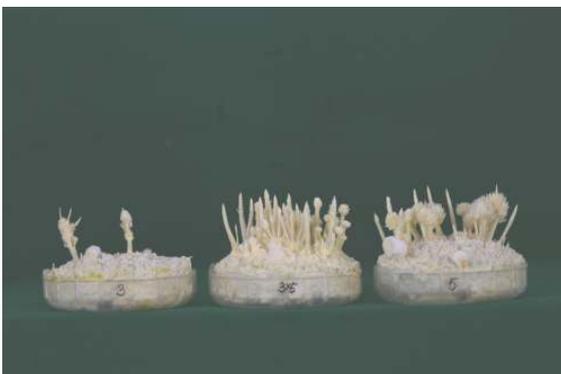


Fig. 13. EFCC 12511 8×9, 3×5의 -, -, -의 조합



Fig. 14. EFCC 12511 8×9, 3×10의 +, +, +의 조합

나. EFCC 12511 6×9와 8×9의 heterothalism 또는 homothalism 여부 규명 실험

(1). 자낭포자 분리

위 실험결과에서 자낭각이 형성된 자실체를 대상으로 단일조건에서 자낭각이 형성된 EFCC 12511 6×9의 1번과 9번 그리고 EFCC 12511 8×9의 9번과 10번에서 성숙한 자낭각이 형성된 자실체를 떼어내어 water agar 배지에 고정하여 자낭포자를 받았다.

그리고 단일조건에서와 비교하기 위해 mating이 되었을 때 자낭각이 형성된 것 중 EFCC 12511 6×9의 2×8, 3×6, 4×7, 5×6과 EFCC 12511 8×9의 1×2, 2×5, 3×6, 5×6을 선발하였고 위와 같은 방법으로 자낭포자를 분리하였다(6,7,12,15).

그리고 다음과 같이 번호를 부여하였다.

- (가) EFCC 12511 6×9, 1: EFCC 15736
- (나) EFCC 12511 6×9, 9: EFCC 15737
- (다) EFCC 12511 6×9, 2×8: EFCC 15738
- (라) EFCC 12511 6×9, 3×6: EFCC 15739
- (마) EFCC 12511 6×9, 4×7: EFCC 15740
- (바) EFCC 12511 6×9, 5×6: EFCC 15741
- (사) EFCC 12511 8×9, 9: EFCC 15742
- (아) EFCC 12511 8×9, 10: EFCC 15743
- (자) EFCC 12511 8×9, 1×2: EFCC 15744
- (차) EFCC 12511 8×9, 2×5: EFCC 15745
- (카) EFCC 12511 8×9, 3×6: EFCC 15746
- (타) EFCC 12511 8×9, 5×6: EFCC 15747

(2). 단포자 이식

분리된 자낭포자를 하루 동안 방치하여 보다 선명하게 되면 현미경을 이용하여 단포자를 SDAY 배지에 이식했다. 이식한 단포자는 배양실(24±1℃)에서 배양하였다.

(3). 균주 선발

배양된 여러 개의 단포자 중 단포자라고 판단되는 깨끗한 균주를 각 10개씩 선발하였다. (부득이하게 10개가 되지 않을 경우는 그대로 사용했다.)

(4). Mating 실험

배양된 EFCC 12511 6×9와 8×9 단포자의 가장자리에서 1~2개의 균총을 떼어내어 flask에 접종하였다. 접종 후 배양실(24±1℃)에서 2~3일간 배양하였다.

이러한 액체종균을 1000cc pp병에 현미 60g, 번데기 10g 그리고 distilled water 70ml를 넣고 121℃, 1.2psi에서 20분간 살균하여 만든 현미배지에 접종하였다.

접종 후 24±1℃ 조건에서 7일간 배양하여 균사가 현미에 활착되면 다시 20±1℃에서 5~6주간 배양하여 인공자실체 형성을 유도하였다.

(5). Mating type 조사

인공 자실체가 형성되기 시작하면 3~4일 간격으로 자낭각 형성 여부를 조사하였다.

EFCC 12511 6×9와 8×9의 실험결과는 다음의 표 3와 같다.

표 3. EFCC 12511 6×9, 1 (EFCC 15736)의 자낭각 형성 유무

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	-	-	-	-	+	+	+	+	-
2		-	-	-	+	+	+	+	-
3			-	-	+	+	+	+	-
4				-	+	+	+	+	-
5					-	-	-	-	+
6						-	-	-	+
7							-	-	+
8								-	+
9									-

+: 자낭각 형성, -: 자낭각 형성하지 않음.

EFCC 12511 6×9, 1 (EFCC 15736)의 결과

총 10개의 단포자를 분리하였고 그 중 상태가 좋지 못한 10번은 제외하였다. 나머지는 a 타입 1,2,3,4,9번, b 타입 5,6,7,8번의 조합에 의해 자낭각을 형성하였다.

표 4. 12511 6×9, 9 (EFCC 15737)의 자낭각 형성 유무

	1	2	4	5	6	7	8
1	-	+	-	+	-	+	-
2		-	+	-	+	-	+
4			-	+	-	+	-
5				-	+	-	+
6					-	+	-
7						-	+
8							-

+: 자낭각 형성, -: 자낭각 형성하지 않음.

EFCC 12511 6×9, 9 (EFCC 15737)의 결과

총 9개의 단포자를 분리하였고 그 중 상태가 좋지 못한 3,9번은 제외하였다. 나머지는 a 타입 1,4,6,8번, b 타입 2,5,7번의 조합에 의해 자낭각을 형성하였다.

표 5. 12511 6×9, 2×8 (EFCC 15738)의 자낭각 형성 유무

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+
2		-	+	+	-	+	-	-	-	+
3			-	-	+	-	+	+	+	-
4				-	+	-	+	+	-	-
5					-	+	-	-	-	+
6						-	+	+	+	-
7							-	-	-	+
8								-	-	+
9									-	+
10										-

+: 자낭각 형성, -: 자낭각 형성하지 않음.

EFCC 12511 6×9, 2×8 (EFCC 15738)의 결과

총 10개의 단포자를 분리하였고, a 타입 1,2,5,7,8,9번, b 타입 3,4,6,10번의 조합에 의해 자낭각을 형성하였다.

표 6. 12511 6×9, 3×6 (EFCC 15739)의 자낭각 형성 유무

	1	3	4	5	7	8	9	10
1	-	+	-	+	+	+	+	-
3		-	+	-	-	-	-	+
4			-	+	+	+	+	-
5				-	-	-	-	+
7					-	-	+	+
8						-	-	+
9							-	+
10								+

+: 자낭각 형성, -: 자낭각 형성하지 않음.

EFCC 12511 6×9, 3×6 (EFCC 15739)의 결과

총 10개의 단포자를 분리하였고 그 중 상태가 좋지 못한 2,6번은 제외하였다. 나머지는 a 타입 1,4,10번, b 타입 3,5,7,8,9번의 조합에 의해 자낭각을 형성하였다.

표 7. EFCC 12511 6×9, 4×7 (EFCC 15740)의 자낭각 형성 유무

	2	3	4	7	9	10
2	-	+	-	+	-	+
3		-	+	-	+	-
4			-	+	-	+
7				-	+	-
9					-	+
10						-

+: 자낭각 형성, -: 자낭각 형성하지 않음.

EFCC 12511 6×9, 4×7 (EFCC 15740)의 결과

총 10개의 단포자를 분리하였고 그 중 상태가 좋지 못한 1,5,6,8번은 제외하였다. 나머지는 a 타입 2,4,9번, b 타입 3,7,10번의 조합에 의해 자낭각을 형성하였다.

표 8. EFCC 12511 6×9, 5×6 (EFCC 15741)의 자낭각 형성 유무

	1	2	4	5	8	9
1	-	+	-	+	-	+

2		-	+	-	+	-
4			-	+	-	+
5				-	+	-
8					-	+
9						-

+: 자낭각 형성, -: 자낭각 형성하지 않음.

EFCC 12511 6×9, 5×6 (EFCC 15741)의 결과

총 10개의 단포자를 분리하였고 그 중 상태가 좋지 못한 3,6,7,10번은 제외하였다. 나머지는 a 타입 1,4,8번, b 타입 2,5,9번의 조합에 의해 자낭각을 형성하였다.

표 9. EFCC 12511 8×9, 9 (EFCC 15742)의 자낭각 형성 유무

	1	2	3	4	5	6	7	8
1	-	+	-	-	-	-	+	+
2		-	+	+	+	+	-	-
3			-	-	-	-	+	+
4				-	-	-	+	+
5					-	-	+	+
6						-	+	+
7							-	-
8								-

+: 자낭각 형성, -: 자낭각 형성하지 않음.

EFCC 12511 8×9, 9 (EFCC 15742)의 결과

총 8개의 단포자를 분리하였고 a 타입 1,3,4,5,6번, b 타입 2,7,8번의 조합에 의해 자낭각을 형성하였다.

표 10. EFCC 12511 8×9, 10 (EFCC 15743)의 자낭각 형성 유무

	1	2	3	4	5
1	-	+	-	-	-
2		-	+	+	+
3			-	-	-
4				-	-
5					-

+: 자낭각 형성, -: 자낭각 형성하지 않음.

EFCC 12511 8×9, 10 (EFCC 15743)의 결과

총 5의 단포자를 분리하였고 a 타입 1,3,4,5번, b 타입 2번의 조합에 의해 자낭각을 형성하였다.

표 11. 12511 8×9, 1×2 (EFCC 15744)의 자낭각 형성 유무

	1	2	3	4	5	6	10
1	-	+	-	-	+	-	-
2		-	+	+	-	+	+
3			-	-	+	-	-
4				-	+	-	-
5					-	+	+
6						-	-
10							-

+: 자낭각 형성, -: 자낭각 형성하지 않음.

EFCC 12511 8×9, 1×2 (EFCC 15744)의 결과

총 10개의 단포자를 분리하였고 그 중 상태가 좋지 못한 7,8,9번은 제외하였다. 나머지는 a 타입 1,3,4,6,10번, b 타입 2,5번의 조합에 의해 자낭각을 형성하였다.

표 12. EFCC 12511 8×9, 2×5 (EFCC 15745)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+
2		-	+	+	-	+	+	-	+	+
3			-	-	+	-	-	+	-	-
4				-	+	-	-	+	-	-
5					-	-	+	-	+	+
6						-	-	+	-	-
7							-	+	-	-
8								-	+	+
9									-	-
10										-

+: 자낭각 형성, -: 자낭각 형성하지 않음.

EFCC 12511 8×9, 2×5 (EFCC 15745)의 결과

총 10개의 단포자를 분리하였고 a 타입 1,2,5,8번, b 타입 3,4,6,7,9,10번의 조합에 의해 자낭각이 형성되었다.

표 13. EFCC 12511 8×9, 3×6 (EFCC 15746)의 자낭각의 형성 유무

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+
2		-	-	+	-	+	-	+	+	+
3			-	+	-	+	-	+	+	+
4				-	+	-	+	-	-	-
5					-	+	-	+	+	+
6						-	+	-	-	-
7							-	+	+	+
8								-	-	-
9									-	-
10										-

+: 자낭각 형성, -: 자낭각 형성하지 않음.

EFCC 12511 8×9, 3×6 (EFCC 15746)의 결과

총 10개의 단포자를 분리하였고 a 타입 1,2,3,5,7번, b 타입 4,6,8,9,10번의 조합에 의해 자낭각을 형성하였다.

표 14. 12511 8×9, 5×6 (EFCC 15747)의 자낭각 형성 유무

	1	2	4	5	6	7	8	9	10
1	-	-	-	+	-	-	+	-	+
2		-	-	+	-	-	+	-	+
4			-	+	-	-	+	-	+
5				-	+	+	-	+	-
6					-	-	+	-	+
7						-	+	-	+
8							-	+	-
9								-	+
10									-

+: 자낭각 형성, -: 자낭각 형성하지 않음.

EFCC 12511 8×9, 5×6 (EFCC 15747)의 결과

총 10개의 단포자를 분리하였고 상태가 좋지 못한 3번은 제외하였다. 나머지는 a 타입 1,2,4,6,7,9번, b 타입 5,8,10번의 조합에 의해 자낭각을 형성하였다.

3. 노랑다발 동충하초(*Cordyceps bassiana*)의 교배형 구명 및 인공배양에 관한 연구

가. 노랑다발동충하초(*Cordyceps bassiana*)의 교배형 조사

(1) C-12511-6×9와 C-12511-8×9의 mating 실험(I)

C-12511-6×9와 C-12511-8×9로부터 분리되어 보관중인 단포자 균주를 이용하여 mating 실험을 실시하였으며 인공자실체를 형성할 경우 +로 표기(Fig. 15A)하고, 분생포자경다발(synnemata) 또는 분생포자를 형성할 경우 -로 표기(Fig. 15B)한 결과(Table 15), 전체 균주의 60%는 A, a type의 대립교배형으로 분리되었으며 이들의 mating에 의하여 인공자실체를 형성하였다. C-12511-6×9로부터 선발된 10개의 단포자 균주 중 2, 4, 6번과 3, 7, 8번은 대립교배형이며, C-12511-8×9로부터 선발된 10개의 단포자 균주 중 1, 3, 4, 5번과 2, 6번은 대립교배형으로 나타났다(Table 16). 전체 균주의 40%는 mating 없이 단독으로 인공자실체를 형성하였으며 C-12511-6×9로부터 선발된 10개의 단포자 균주 중 1, 5, 9, 10번과 C-12511-8×9로부터 선발된 10개의 단포자 균주 중 7, 8, 9, 10번은 mating 없이 단독으로 인공자실체를 형성하였다. 위의 mating 실험으로부터 인공자실체 형성의 네 가지 type을 확인할 수 있었다(Fig. 16).

Table 15. Stromata formation from 20 single ascospore strains of *Cordyceps bassiana* C-12511-6×9 and C-12511-8×9 by mating test

strain	C-12511-6×9										strain	C-12511-8×9										
NO.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	NO.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
2		-	+	-	+	-	+	+	+	+	2		-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
3			-	+	+	+	-	-	+	+	3			-	-	-	+	+	+	+	+	+
4				-	+	-	+	+	+	+	4				-	-	+	+	+	+	+	+
5					+	+	+	+	+	+	5					-	+	+	+	+	+	+
6						-	+	+	+	+	6						-	+	+	+	+	+
7							-	-	+	+	7							+	+	+	+	+
8								-	+	+	8								+	+	+	+
9									+	+	9									+	+	+
10										+	10										+	+

+: perithecial stromata formation

-: non-perithecial or sterile stromata formation

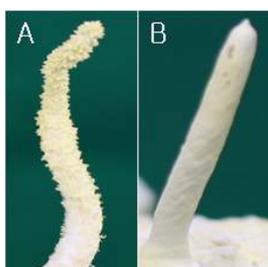


Fig. 15. Comparison between perithecial(A) and non-perithecial stromata(B).

Table 16. Mating types of single ascospore strains of *Cordyceps bassiana* C-12511-6×9 and C-12511-8×9

Mating type	Strains	
	C-12511-6×9	C-12511-8×9
A	2*	1
	4	3
	6	4
		5
a	3	2
	7	6
	8	

*Single ascospore strain number

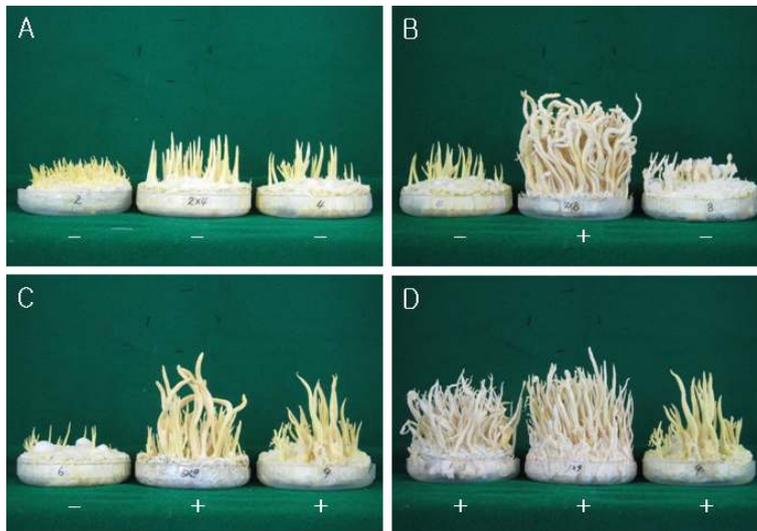


Fig. 16. Mating type of *Cordyceps bassiana* C-12511-6×9.

A: Combination of strains C-12511-6×9-2 and C-12511-6×9-4, B: Combination of strains C-12511-6×9-4 and C-12511-6×9-8, C: Combination of strains C-12511-6×9-6 and C-12511-6×9-9, D: Combination of strains C-12511-6×9-1 and C-12511-6×9-9
 +: perithecial stromata formation
 -: non-perithecial or sterile stromata formation

(2) 균주 선발과 단포자 분리 및 mating 실험(II)

C-12511-6×9와 C-12511-8×9의 mating 실험 결과로부터 대립교배형 균주의 mating에 의하여 인공자실체를 형성하는 C-15738을 포함한 8개의 조합균주와 mating 없이 단독으로 인공자실체를 형성하는 C-15736을 포함한 4개의 다포자 균주를 선발하여 mating 실험을 반복 실시하였다. 인공자실체를 형성할 경우 +로 표

기하고, 분생포자경다발(synnemata) 또는 분생포자를 형성할 경우 -로 표기한 결과 (Table 17, Table 18), 전체 균주의 86%는 A, a type의 대립교배형으로 분리되었고, 이들의 mating에 의하여 인공자실체를 형성하였으며(Table 18, Table 20) 전체 균주의 14%는 mating 없이 단독으로 인공자실체를 형성하였다. 위의 mating 실험에서, 대립교배형 균주의 mating에 의해 형성된 인공자실체로부터 단포자를 분리하여 mating 실험을 실시한 결과, 전체 균주의 82.5%는 A, a type의 대립교배형으로 분리되었으며 17.5%는 mating 없이 단독으로 인공자실체를 형성하였다. 또한 mating 없이 단독으로 형성된 인공자실체로부터 단포자를 분리하여 mating 실험을 실시한 결과, 전체 균주의 92.5%는 A, a type의 대립교배형으로 분리되었으며 7.5%는 mating 없이 단독으로 인공자실체를 형성하였다(Fig. 17). 위의 mating 실험에서 단독으로 인공자실체를 형성하는 균주 또한 A, a type의 대립교배형으로 분리되었고, 이들의 mating에 의하여 인공자실체를 형성함을 확인할 수 있었다(6, 12, 15,17).

Table 17. Stromata formation from 59 single ascospore strains of *Cordyceps bassiana* C-12511-6×9 by ister-crossing

strain		C-15736										strain		C-15737									
NO.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	NO.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
1		-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	1		-	+	+	-	+	-	+	-	+	
2			-	-	-	+	+	+	+	-	+	2			-	+	+	-	+	-	+	+	
3				-	-	+	+	+	+	-	+	3				+	+	+	+	+	+	+	
4					-	+	+	+	+	-	+	4					-	+	-	+	-	+	
5						-	-	-	-	+	+	5						-	+	-	+	+	
6							-	-	-	+	+	6							-	+	-	+	
7								-	-	+	+	7								-	+	+	
8									-	+	+	8									-	+	
9										-	+	9										+	
10											+	10										+	

strain		C-15738										strain		C-15739										
NO.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	NO.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1		-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	1		-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
2			-	+	+	-	+	-	-	-	+	2			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3				-	-	+	-	+	+	+	-	3				-	+	-	+	-	-	-	+	
4					-	+	-	+	+	+	-	4					-	+	+	+	+	+	-	
5						-	+	-	-	-	+	5						-	+	-	-	-	+	
6							-	+	+	+	-	6							+	+	+	+	+	
7								-	-	-	+	7								-	-	-	+	
8									-	-	+	8									-	-	+	
9										-	+	9										-	+	
10											-	10											-	

strain		C-15740										strain		C-15741									
NO.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	NO.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1		-	+	+	-	+	+	+	-	+	+
2			-	+	-	+	+	+	+	-	+	2			-	+	+	-	+	+	+	-	+
3				-	+	+	+	-	+	+	-	3				+	+	+	+	+	+	+	+
4					-	+	+	+	+	-	+	4					-	+	+	+	-	+	+
5						+	+	+	+	+	+	5						-	+	+	+	-	+
6							+	+	+	+	+	6							+	+	+	+	+
7								-	+	+	-	7								+	+	+	+
8									+	+	+	8									-	+	+
9										-	+	9										-	+
10											-	10											+

+: perithecial stromata formation

-: non-perithecial or sterile stromata formation

Table 18. Mating types of single ascospore strains of *Cordyceps bassiana* C-12511-6×9 by sister-crossing.

Mating type	Strains					
	C-15736	C-15737	C-15738	C-15739	C-15740	C-15741
A	1*	1	1	1	1	1
	2	4	2	4	4	4
	3	6	5	10		8
	4	8	7			
	9		8			
a	5	2	3	3	2	2
	6	5	4	5	3	5
	7	7	6	7	7	9
	8		10	8	9	
				9	10	

*Single ascospore strain number

Table 19. Stromata formation 53 from single ascospore strains of *Cordyceps bassiana* C-12511-8×9 by sister-crossing

strain	C-15742								strain	C-15743				
NO.	1	2	3	4	5	6	7	8	NO.	1	2	3	4	5
1	-	+	-	-	-	-	+	+	1	-	+	-	-	-
2			-	+	+	+	+	-	2		-	+	+	+
3				-	-	-	+	+	3			-	-	-
4					-	-	+	+	4				-	-
5						-	+	+	5					-
6							-	+						
7								-						
8								-						

strain	C-15744										strain	C-15745									
NO.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	NO.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	1	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+
2			-	+	+	-	+	+	+	+	2		-	+	+	-	+	+	-	+	+
3				-	-	+	-	+	+	+	3			-	-	+	-	-	+	-	-
4					-	+	-	+	+	+	4				-	+	-	-	+	-	-
5						-	+	+	+	+	5					-	+	+	-	+	+
6							-	+	+	+	6						-	-	+	-	-
7								+	+	+	7							-	+	-	-
8									+	+	8								-	+	+
9										+	9									-	-
10										-	10										-

strain	C-15746										strain	C-15747									
NO.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	NO.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	1	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+
2			-	-	+	-	+	-	+	+	2		-	+	-	+	-	-	+	-	+
3				-	+	-	+	-	+	+	3			+	+	+	+	+	+	+	+
4					-	+	-	+	-	-	4				-	+	-	-	+	-	+
5						-	+	-	+	+	5					-	+	+	-	+	-
6							-	+	-	-	6						-	-	+	-	+
7								-	+	+	7							-	+	-	+
8									-	-	8								-	+	-
9										-	9									-	+
10										-	10										-

+: perithecial stromata formation

-: non-perithecial or sterile stromata formation

Table 20. Mating type of single ascospore strains of *Cordyceps bassiana* C-12511-8×9 by sister-crossing

Mating type	Strains					
	C-15742	C-15743	C-15744	C-15745	C-15746	C-15747
A	1*	1	1	1	1	1
	3	3	3	2	2	2
	4	4	4	5	3	4
	5	5	6	8	5	6
	6		10		7	7
						9
a	2	2	2	3	4	5
	7		5	4	6	8
	8			6	8	10
				7	9	
				9	10	
				10		

*Single ascospore strain number

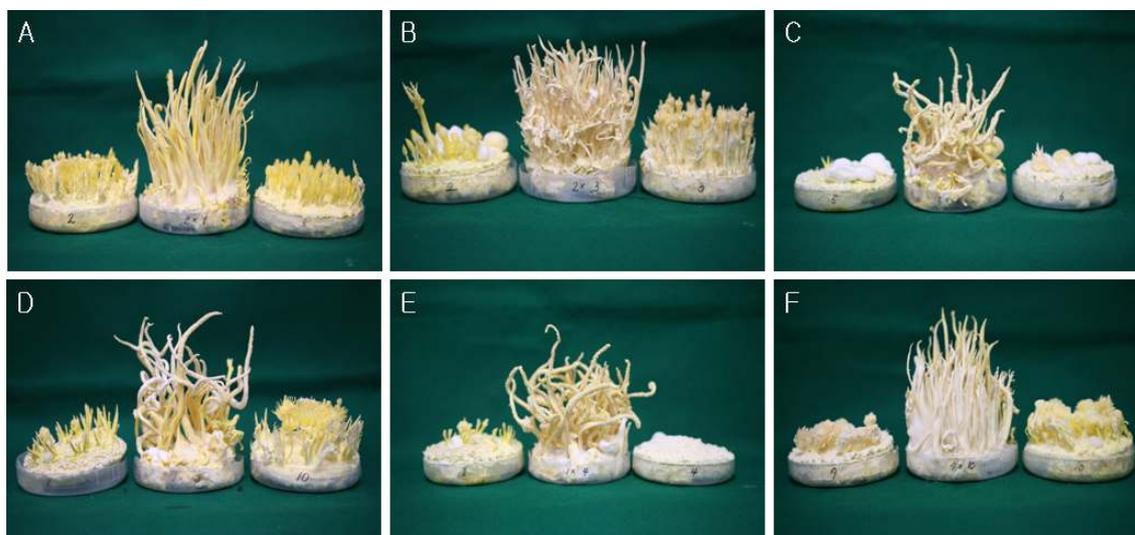


Fig. 17. Mating type from combination of single ascospore strains of *Cordyceps bassiana* C-12511-8×9 by sister-crossing.

A: Combination of strains C-15742-2 and C-15742-4, B: Combination of strains C-15743-2 and C-15743-3 C: Combination of strains C-15744-5 and C-15744-6, D: Combination of strains C-15745-1 and C-15745-6, E: Combination of strains C-15746-1 and C-15746-4, F: Combination of strains C-15747-7 and C-15747-10

(3) 자성배우자와 양성배우자 조사

Shurestha(2003)는 번데기 동충하초(*Cordyceps militaris*) 균주를 이용하여 자웅동주성(hermaphroditic)균의 가정 하에 자성과 융성에 관한 실험을 하였으며, 이를 통하여 번데기 동충하초(*Cordyceps militaris*)는 heterothallic 균임을 증명한 바 있다. 이러한 사실에 근거하여, Shurestha(2003)의 실험과 동일한 방법으로 C-15736-2×6, C-15738-3×7, C-15741-4×9 그리고 C-15746-2×10 균주를 이용하여 본 균주의 자성과 융성을 조사한 결과 한쪽 배지에서만 인공자실체를 형성하였다(Table 21, Fig. 18). 또한 mating을 하였으나 자실체가 형성되지 않은 배지에서는 자실체와 유사한 형태의 분생포자경다발(synnemata)을 형성하였으며, 이는 대조균으로 단포자만을 접종하여 배양한 배지와는 확연한 차이를 보였다(Fig. 18B). 위의 실험 결과, 인공자실체를 형성한 배지에서 먼저 접종된 단포자 균주는 자성배우자이며 나중에 접종된 단포자 균주는 양성배우자로 볼 수 있다(6, 13, 15).

Table 21. Female gamete or male gamete test from combination of ascospore strains of *Cordyceps bassiana* C-15736-2×8, C-15738-3×7, C-15741-4×9 and C-15746-2×10

Later inoculum	First inoculum		Later inoculum	First inoculum	
	C-15736-2	C-15736-8		C-15738-3	C-15738-7
C-15736-2		+	C-15738-3		—
C-15736-8	—		C-15738-7	+	

Later inoculum	First inoculum		Later inoculum	First inoculum	
	C-15741-4	C-15741-9		C-15746-2	C-15746-10
C-15741-4		+	C-15746-2		—
C-15741-9	—		C-15746-10	+	

+ : perithecial stromata formation

- : non-perithecial or sterile stromata formation



Fig. 18. Female gamete or male gamete test from combination of ascospore strains of *Cordyceps bassiana* C-15741-4×9.

A: Comparison between C-15741-9(left) and C-15741-4(right), first inoculum, B: Comparison between C-15741-4(left), first inoculum and C-15741-4, culture(right), C:

Comparison between C-15741-9(left), first inoculum and C-15741-9, culture(right)
 +: perithecial stromata formation
 -: non-perithecial or sterile stromata formation

나. 계대배양 및 Petri-dish배양에서 균주의 활력 조사

(1) 다포자 균주의 계대배양에 따른 인공자실체 형성

C-15739-6, C-15741-6 그리고 C-15744-8 균주를 이용하여 원균에서 7차 계대배양까지 순차적인 계대 실험을 실시한 결과 공통적으로 2차 계대배양까지 인공자실체를 형성하였고, 3차 계대배양부터 7차 계대배양까지는 아무것도 형성하지 않거나 분생포자경다발(synnemata) 또는 분생포자를 형성하였다(Table 22, Fig. 21). 원균 및 1, 2차 계대배양으로부터 형성된 인공자실체의 활력을 비교하여 보면, 공통적으로 1차 계대배양에서 활력이 불량하였으며(Fig. 2.3.B) 2차 계대배양에서 형성된 인공자실체의 활력은 원균과 비슷하거나 원균보다 약간 양호한 결과를 보였다(Table 22, Fig. 21C). 노랑다발동충하초(*Cordyceps bassiana*) 균주는 배지의 옆면과 밑면에서도 자실체를 형성하는 경우가 있으므로(Fig. 21) 자실체의 건중량은 배지무게를 포함하여 측정하였다(Fig. 2.2). 건중량에 따른 생물학적 효율(%)을 측정하여 보면, C-15739-6, C-15741-6 균주는 3차 계대배양에서 각각 62.8%, 68.67%, C-15744-8 균주는 2차 계대배양에서 53.56%로 가장 양호하였으며 원균 및 다른 계대배양과 비교하여 1차 계대배양에서 생물학적 효율(%)이 저조하였다(Fig. 2.4). 위의 실험 결과, 다포자 균주의 계대배양에서 인공자실체를 형성할 수 있는 안정적인 계대횟수는 2차 계대배양까지로 조사되었으며 공통적으로 1차 계대배양에서 활력 및 생물학적 효율(%)이 저조한 양상을 보였다(6,14,16).



Fig. 19. Example of stromata formation at brown rice medium.

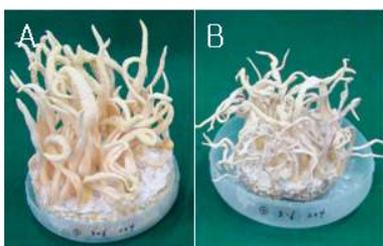


Fig. 20. Comparison between fresh fruit body(A) and dried fruit body(B)

Table 22. Characteristics of fruiting body formation from multi ascospore strain of *Cordyceps bassiana* C-15739-6, C-15741-6 and C-15744-8 by frequency of subculture

C-15739-6					
Frequency of subculture	Perithecial ^{a)}	Length(mm)	Density ^{b)}	Dry weight (g/bottle)	B.E.(%) ^{c)}
Original	+	90	++	26.97	38.53
1st	+	60	+	18.56	26.51
2nd	+	90	++	29.96	42.80
3rd	-	.	.	43.96	62.80
4th	-	.	.	32.20	46.00
5th	-	.	.	30.90	44.14
6th	-	.	.	27.93	39.90
7th	-	.	.	27.07	38.67

C-15741-6					
Frequency of subculture	Perithecial ^{a)}	Length(mm)	Density ^{b)}	Dry weight (g/bottle)	B.E.(%) ^{c)}
Original	+	50	++	19.70	28.14
1st	+	60	++	15.57	22.24
2nd	+	90	++	26.99	38.56
3rd	-	.	.	48.07	68.67
4th	-	.	.	32.07	45.81
5th	-	.	.	28.25	40.36
6th	-	.	.	24.39	34.84
7th	-	.	.	25.52	36.46

C-15744-8					
Frequency of subculture	Perithecial ^{a)}	Length(mm)	Density ^{b)}	Dry weight (g/bottle)	B.E.(%) ^{c)}
Original	+	90	++	33.39	47.70
1st	+	60	+	24.99	35.70
2nd	+	90	+++	37.49	53.56
3rd	-	.	.	34.07	48.67
4th	-	.	.	28.22	40.31
5th	-	.	.	28.86	41.23
6th	-	.	.	23.81	34.01
7th	-	.	.	29.50	42.14

^{a)}Perithecial: +, perithecial; -, non-perithecial

^{b)}Density: +, thin(≤ 30); ++, moderate($30 \leq$, ≥ 50); +++, compact($50 \leq$)

^{c)}Biological efficiency(%): (Dry weight of fruiting body/Weight of substrate) $\times 100$

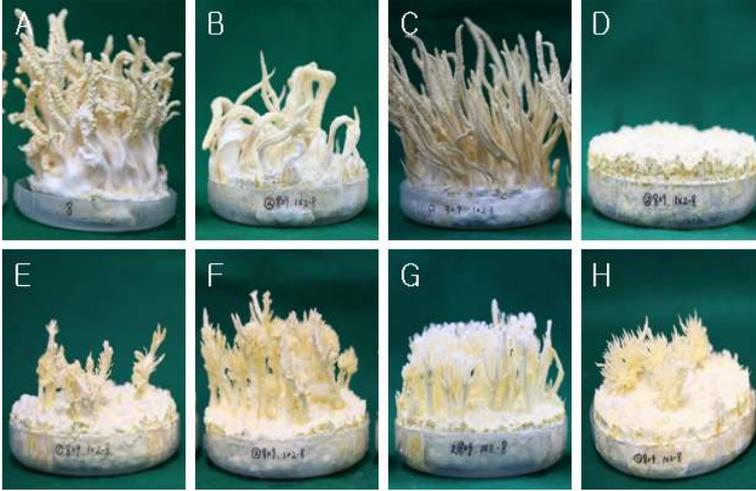


Fig. 21 Fruiting body formation from multi ascospore strain of *Cordyceps bassiana* C-15744-8 by frequency of subculture.

A: Original strain, B: first generation strain, C: second generatons strain, D: third generations strain, E: forth generations strain, F: fifth generations strain, G: sixth generations strain, H: seventh generations strain

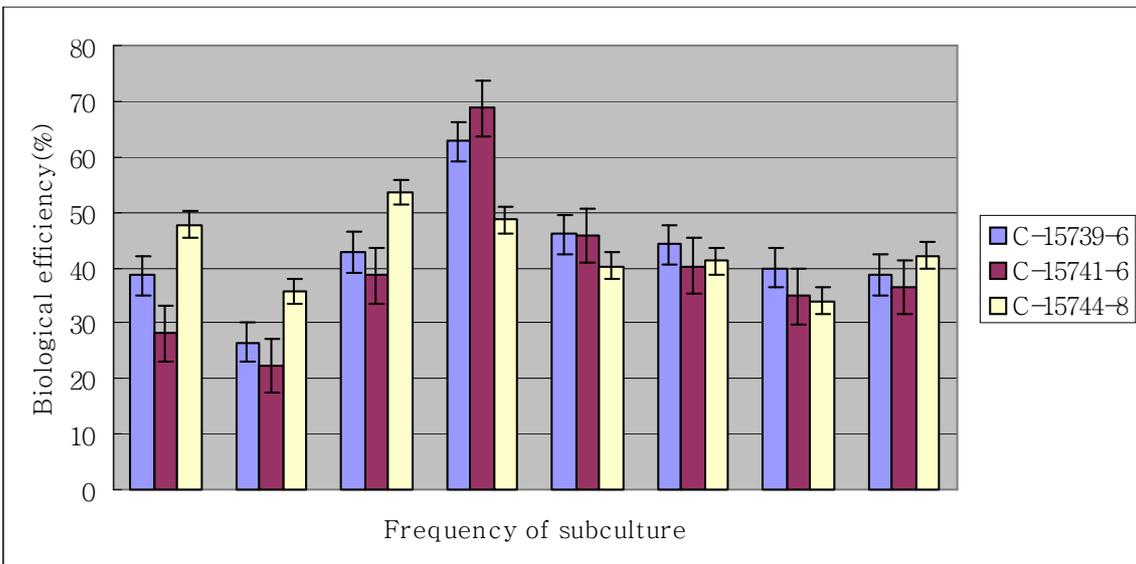


Fig. 22. Biological efficiency(%) of fruiting body formation from multi ascospore strain of *Cordyceps bassiana* C-15739-6, C-15741-6 and C-15744-8 by frequency of subculture.

(2) 대립교배형 균주의 mating을 통한 계대배양에 따른 인공자실체 형성

C-15736-2×6, C-15746-2×4 균주를 이용하여 원균에서 13차 계대배양까지 순차적인 계대 실험을 실시한 결과, C-15736-2×6 균주는 5차 계대배양까지 인공자실체를 형성하였고, 6차 계대배양부터 13차 계대배양까지는 자실체와 유사한 형태의 분생포자경다발(synnemata)을 형성하였다(Table 23, Fig. 23). 원균 및 1차 계대배양에서 5차 계대배양까지 형성된 인공자실체를 비교하여 보면, 1차 계대배양에서 3차 계대배양까지 인공자실체의 활력이 불량하였으며 그 중 1차 계대배양에서 활력이 가장 저조하였다(Fig. 23B). C-15746-2×4 균주는 원균에서 13차 계대배양까지 계속하여 인공자실체를 형성하였으며 1차 계대배양에서 활력이 가장 저조하였으나(Fig. 24B) 이후에는 대체적으로 양호하였고, 또한 비교적 일정하게 활력이 유지되었다(Table 23, Fig. 24). 노랑다발동충하초(*Cordyceps bassiana*) 균주는 배지의 옆면과 밑면에서도 자실체를 형성하는 경우가 있으므로 자실체의 건중량은 배지무게를 포함하여 측정하였다. 건중량에 따른 생물학적 효율(%)을 측정하여 보면, C-15736-2×6, C-15746-2×4 균주는 2차 계대배양에서 각각 39.97%, 47.3%로 가장 양호하였고, 13차 계대배양에서 각각 26.69%, 27.24%로 가장 저조하였다(Fig. 25). 또한 계대배양에 따른 인공자실체 형성 밀도는 고저(高低)를 반복하며 전체적으로 높아지다가 각각 4차, 10차 계대배양 이후 낮아졌다(Fig. 2.7). 위의 실험 결과, 다포자 균주보다 조합균주에서 계대배양에 따른 인공자실체 형성능력이 오래 지속됨을 확인할 수 있었으며, 1차 계대배양에서 자실체의 활력 및 생물학적 효율(%)이 저조한 양상을 보였다. 이러한 결과는 다포자 균주의 계대 실험 결과와 같았다.

Table 23. Characteristics of fruiting body formation from combination of single ascospore strains of *Cordyceps bassiana* C-15736-2×6 by frequency of subculture

Frequency of subculture	C-15736-2×6				
	Perithecial ^{a)}	Length(mm)	Density ^{b)}	Dry weight (g/bottle)	B.E.(%) ^{c)}
Original	+	120	+++	23.76	33.94
1st	+	60	+	22.44	32.06
2nd	+	90	+	27.98	39.97
3rd	+	80	+	21.78	31.11
4th	+	90	+++	24.79	35.41
5th	+	110	++	24.07	34.39
6th	-	.	.	27.81	39.73
7th	-	.	.	26.24	37.49
8th	-	.	.	24.04	34.34
9th	-	.	.	23.56	33.66
10th	-	.	.	20.64	29.49
11th	-	.	.	21.03	30.04
12th	-	.	.	19.97	28.53
13th	-	.	.	18.68	26.69

^{a)}Perithecial: +, perithecial; -, non-perithecial

^{b)}Density: +, thin(≤ 30); ++, moderate($30 \leq$, ≥ 50); + + +, compact($50 \leq$)

^{c)}Biological efficiency(%): (Dry weight of fruiting body/Weight of substrate)×100

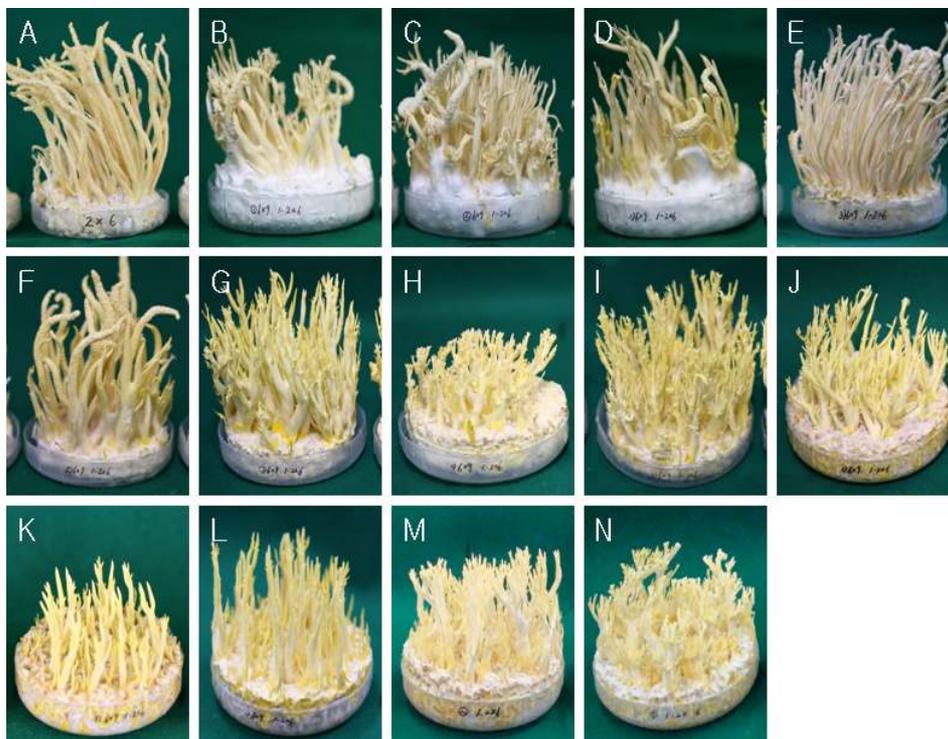


Fig. 23. Fruiting body formation from combination of single ascospore strains of *Cordyceps bassiana* C-15736-2×6 by frequency of subculture.

A: Original strain, B: first generation strain, C: second generations strain, D: third generations strain, E: forth generations strain, F: fifth generations strain, G: sixth generations strain, H: seventh generations strain, I: eighth generations strain, J: ninth generations strain, K: tenth generations strain, L: eleventh generations strain, M: twelfth generations strain, N: thirteenth generations strain

Table 23. Characteristics of fruiting body formation from combination of single ascospore strains of *Cordyceps bassiana* C-15746-2×4 by frequency of subculture.

Frequency of subculture	C-15746-2×4				
	Perithecial ^{a)}	Length(mm)	Density ^{b)}	Dry weight (g/bottle)	B.E.(%) ^{c)}
Original	+	120	+++	24.90	35.57
1st	+	90	+	22.78	32.54
2nd	+	100	++	33.11	47.30
3rd	+	100	+++	28.79	41.13
4th	+	100	++	28.02	40.03
5th	+	110	+++	25.89	36.99
6th	+	100	+++	27.26	38.94
7th	+	120	++	24.85	35.50
8th	+	100	+++	24.99	35.70
9th	+	80	+++	23.90	34.14
10th	+	80	+++	25.28	36.11
11th	+	80	+++	21.09	30.13
12th	+	90	++	23.09	32.99
13th	+	90	++	19.07	27.24

^{a)}Perithecial: +, perithecial; -, non-perithecial

^{b)}Density: +, thin(≤ 30); ++, moderate($30 \leq, \geq 50$); +++, compact($50 \leq$)

^{c)}Biological efficiency(%): (Dry weight of fruiting body/Weight of substrate)×100

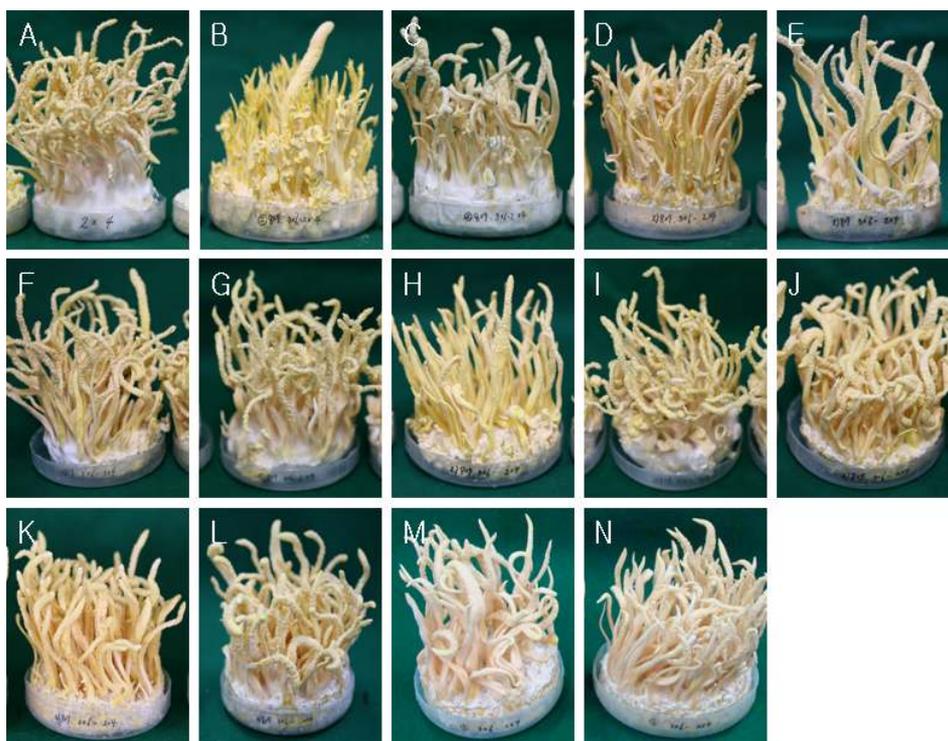


Fig. 24. Fruiting body formation from combination of single ascospore strains of *Cordyceps bassiana* C-15746-2×4 by frequency of subculture.

A: Original strain, B: first generation strain, C: second generations strain, D: third generations strain, E: fourth generations strain, F: fifth generations strain, G: sixth generations strain, H: seventh generations strain, I: eighth generations strain, J: ninth generations strain, K: tenth generations strain, L: eleventh generations strain, M: twelfth generations strain, N: thirteenth generations strain

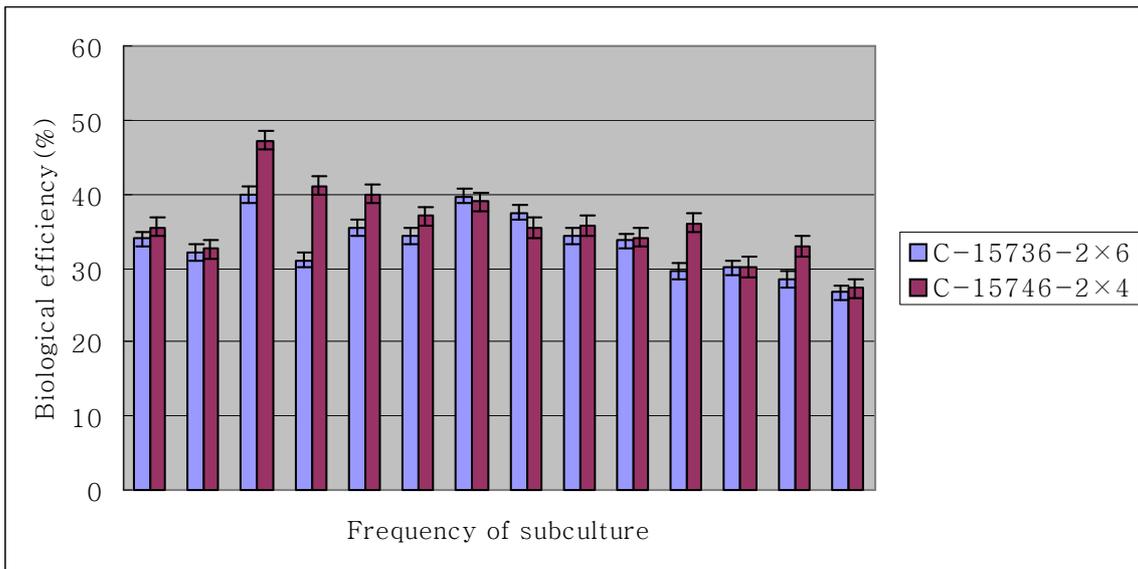


Fig. 25. Biological efficiency(%) of fruiting body formation from combination of single ascospore strains of *Cordyceps bassiana* C-15736-2x6 and C-15746-2x4 by frequency of subculture.

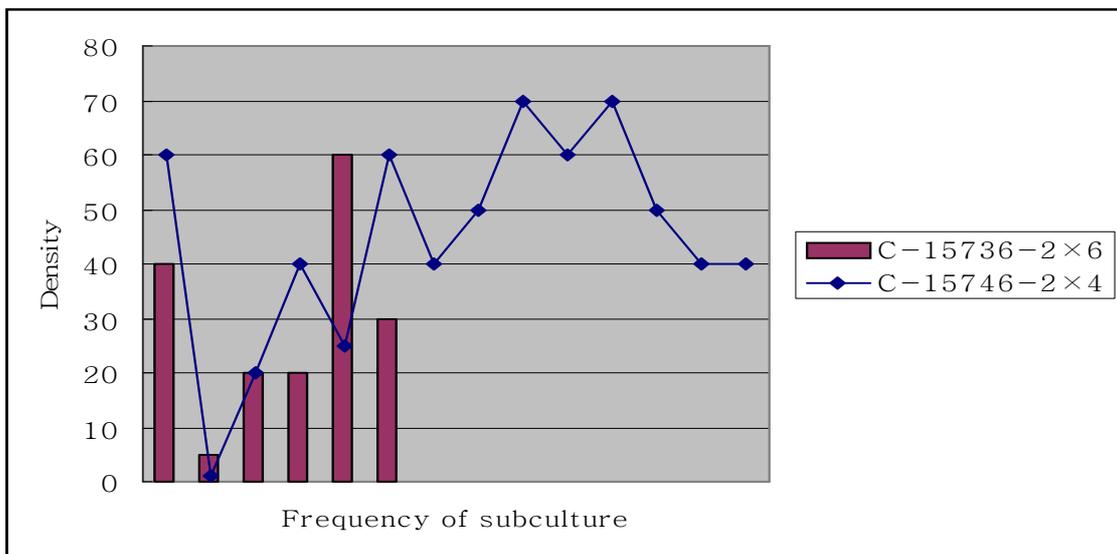


Fig. 26. Density of fruiting body formation from combination of single ascospore strains of *Cordyceps bassiana* C-15736-2x6 and C-15746-2x4 by frequency of subculture.

(3) Petri-dish상의 균사배양기간에 따른 인공자실체의 활력을 조사

다포자 균주의 계대 실험 결과에서 활력이 양호하게 조사된 C-15741-6의 2차 계대균주를 선발하여 Petri-dish상의 균사배양기간에 따른 인공자실체의 활력을 조사한 결과 균사생장은 시간당 0.02mm씩 성장하여 40-50일 정도 지나면 지름 53mm의 Petri-dish상에 균사가 완전히 성장하였다. 또한 균총 접종 5주 후 Petri-dish 내부에서 인공자실체가 형성되었음을 확인하였고(Fig. 28A), 다른 다포자 균주에서도 이와 같은 현상을 확인할 수 있었다(Fig. 28B). Petri-dish상의 균사배양기간을 1주간격으로 3주, 2주간격으로 3주간 배양하여 총 9주 동안 인공자실체의 활력을 조사한 결과 1주차 배양에서 5주차 배양까지는 인공자실체의 활력이 양호하였고, 7주차 배양부터는 같은 배양기간에 비해 조기에 분생포자를 형성하기 시작하였다(Table 24, Fig. 27). 노랑다발동충하초(*Cordyceps bassiana*) 균주는 배지의 옆면과 밑면에서도 자실체를 형성하는 경우가 있으므로 자실체의 건중량은 배지무게를 포함하여 측정하였다. 건중량에 따른 생물학적 효율(%)은 3주차 배양에서 38.31%로 가장 높았고, 7주차 배양에서 27.5%로 가장 낮았다(Fig. 29). 위의 실험 결과, Petri-dish상의 균사배양기간에 따른 인공자실체 형성에서 안정적인 균주확보는 5주차 배양까지로 조사되었다(6,15,19,21).

Table 24. Characteristics of fruiting body formation from 2nd generations strain of *Cordyceps bassiana* C-15741-6 by culture period(weeks)

Culture period (weeks)	C-15741-6				
	Perithecial ^{a)}	Le(3차년도)ngth(mm)	Density ^{b)}	Dry weight (g/bottle)	B.E.(%) ^{c)}
Original strain	+	90	+++	26.99	38.56
After 1 weeks	+	70	+++	20.91	29.87
After 2 weeks	+	90	+++	25.75	36.79
After 3 weeks	+	80	+++	26.82	38.31
After 5 weeks	+	90	+++	26.00	37.14
After 7 weeks	+	70	+	19.25	27.50
After 9 weeks	+	70	++	22.95	32.79

^{a)}Perithecial: +, perithecial; -, non-perithecial

^{b)}Density: +, thin(≤ 30); ++, moderate($30 \leq$, ≥ 50); +++, compact($50 \leq$)

^{c)}Biological efficiency(%): (Dry weight of fruiting body/Weight of substrate) $\times 100$



Fig. 27. Fruiting body formation from second generations strain of *Cordyceps bassiana* C-15741-6 by culture period(weeks) in Petri-dish.

A: Original strain, B: one week culture, C: two weeks culture, D: three weeks culture, E: five weeks culture, F: seven weeks culture, G: nine weeks culture

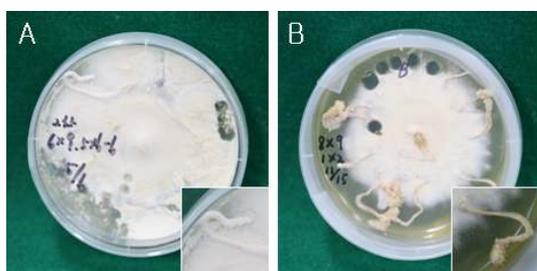


Fig. 28. Fruiting body formation from multi ascospore strains of *Cordyceps bassiana* C-15741-6(A) and C-15744(B) in Petri-dish.

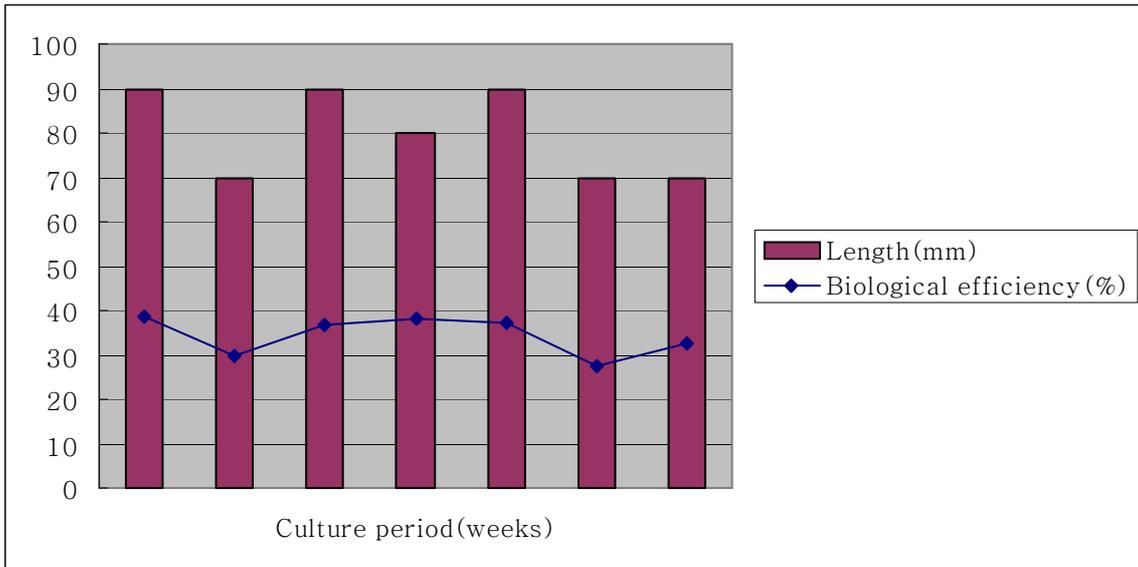


Fig. 29. Relationship between length(mm) and biological efficiency(%) of fruiting body formation from second generations strain of *Cordyceps bassiana* C-15741-6 by culture period(weeks) in Petri-dish.

다. 인공재배에서 액체종균 제조 조건 및 적정 수확시기 조사

(1) 액체종균 제조에서 접종 균총의 적정 개수 조사

C-15736-2×6, C-15746-2×4 균주를 이용하여 액체종균 제조에서 접종 균총의 적정 개수를 조사한 결과, 공통적으로 A×a 조합균주에서 A, a 단포자 균주의 mating 개수를 1×1로 하여 제조한 액체종균으로부터 형성된 인공자실체의 활력이 가장 양호하게 나타났다. C-15736-2×6, C-15746-2×4 균주로부터 형성된 인공자실체의 평균 길이는 각각 70mm, 86mm로 비교적 양호하였으나, 밀도는 저조한 편이었으며 접종 균총의 개수를 늘릴수록 형성되는 자실체의 개수는 감소하였다(Table 25, Fig. 30). C-15736-2×6 균주의 경우에는 한배지에서 자실체와 분생포자경다발(synnemata)을 동시에 형성하였으며 자실체는 하얀색 계열의 열은 노란색을 나타냈고, 분생포자경다발(synnemata)은 짙은 노란색을 나타내어 확연하게 구분되었다(Fig. 30A). C-15746-2×4 균주는 접종 균총의 개수를 늘릴수록(2×2 이상으로 하였을 경우), 형성되는 자실체에서 나선형으로 뒤틀리는 현상을 확인할 수 있었다(Fig. 31B). 또한 접종 균총의 개수를 늘릴수록 자실체의 길이 및 밀도는 점차 감소하는 반면, 생물학적 효율(%)은 비교적 일정하게 유지되었다(Fig. 31).

Table 25. Characteristics of fruiting body formation from combination of single ascospore strains of *Cordyceps bassiana* C-15736-2×6 and C-15746-2×4 by inoculum amount

Inoculum amount	C-15736-2×6				
	Perithecial ^{a)}	Length(mm)	Density ^{b)}	Dry weight (g/bottle)	B.E.(%) ^{c)}
1×1	+	80	++	22.88	32.69
2×2	+	80	+	24.87	35.53
3×3	+	70	+	25.62	36.60
4×4	+	60	+	22.64	32.34
5×5	+	60	+	23.77	33.96

Inoculum amount	C-15746-2×4				
	Perithecial ^{a)}	Length(mm)	Density ^{b)}	Dry weight (g/bottle)	B.E.(%) ^{c)}
1×1	+	100	+++	17.64	25.20
2×2	+	100	++	23.73	33.90
3×3	+	90	++	21.56	30.80
4×4	+	70	+	21.86	31.23
5×5	+	70	+	18.79	26.84

^{a)}Perithecial: +, perithecial; -, non-perithecial

^{b)}Density: +, thin(≤ 30); ++, moderate($30 \leq \leq 50$); +++, compact($50 \leq$)

^{c)}Biological efficiency(%): (Dry weight of fruiting body/Weight of substrate)×100

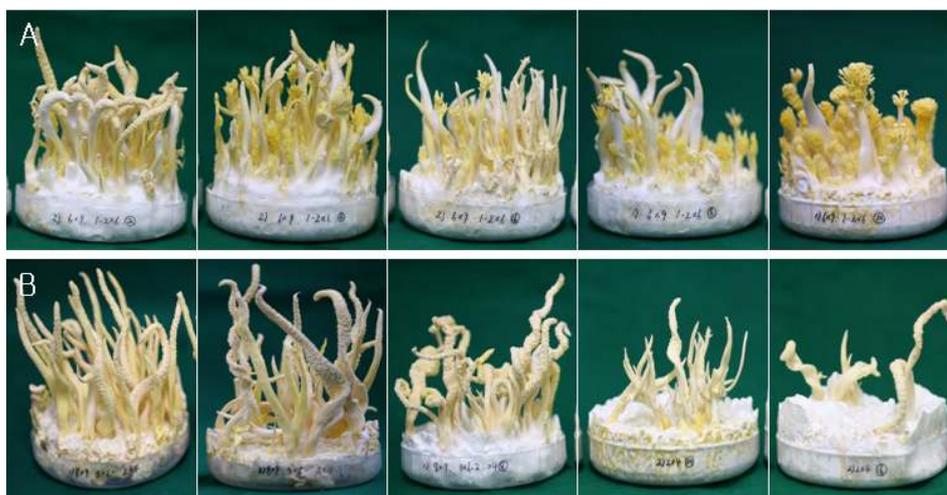


Fig. 30. Fruiting body formation from combination of single ascospore strains of *Cordyceps bassiana* C-15736-2×6(A) and C-15746-2×4(B) by inoculum amount(left side of 1×1, 2×2, 3×3, 4×4, 5×5).

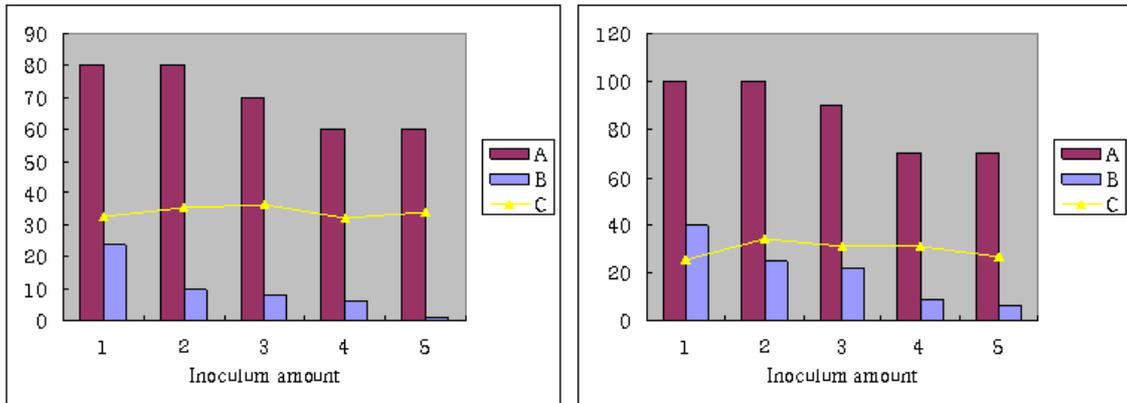


Fig. 31. Relationship among length(A), density(B) and biological efficiency(C) of fruiting body formation from combination of single ascospore strains of *Cordyceps bassiana* C-15736-2×6(left) and C-15746-2×4(right) by inoculum amount.

(2) 액체종균 제조에서 접종 균총의 적정 비율 조사

C-15738-3×7, C-15741-4×9, C-15744-5×7 그리고 15746-2×10 균주를 이용하여 액체종균 제조에서 접종 균총의 적정 비율을 조사한 결과, 자실체의 평균 길이는 접종비를 2:2로 하였을 경우 82.5mm로 가장 양호하였고, 1:3으로 하였을 경우 72.5mm, 3:1로 하였을 경우 75mm로 조사되었다. 각 비율별 평균 생물학적 효율(%)은 접종비를 2:2로 하였을 경우 34.27%로 가장 낮았고, 1:3으로 하였을 경우 36.74%, 3:1로 하였을 경우 36.01%로 자실체의 길이와 마찬가지로 세 가지 조건에서 큰 차이를 보이지 않았다(Table 26, Fig. 33). 또한 자실체의 밀도는 전체적으로 매우 양호하였다(Fig. 32)(6,20,21).

Table 26. Characteristics of fruiting body formation from combination of single ascospore strains of *Cordyceps bassiana* C-15738-3×7, C-15741-4×9, C-15744-5×7 and C-15746-2×10 by inoculum rate

C-15738-3×7					
Inoculum rate	Perithecial ^{a)}	Length(mm)	Density ^{b)}	Dry weight (g/bottle)	B.E.(%) ^{c)}
2:2	+	80	++	23.73	33.90
1:3	+	90	++	25.50	36.43
3:1	+	100	++	27.66	39.51

C-15741-4×9					
Inoculum rate	Perithecial ^{a)}	Length(mm)	Density ^{b)}	Dry weight (g/bottle)	B.E.(%) ^{c)}
2:2	+	70	++	22.39	31.99
1:3	+	90	+++	29.06	41.51
3:1	+	80	+++	21.88	31.26

C-15744-5×7					
Inoculum rate	Perithecial ^{a)}	Length(mm)	Density ^{b)}	Dry weight (g/bottle)	B.E.(%) ^{c)}
2:2	+	80	++	24.17	34.53
1:3	+	60	+++	23.45	33.50
3:1	+	70	+++	28.71	41.01

C-15746-2×10					
Inoculum rate	Perithecial ^{a)}	Length(mm)	Density ^{b)}	Dry weight (g/bottle)	B.E.(%) ^{c)}
2:2	+	100	+++	25.67	36.67
1:3	+	50	+++	24.85	35.50
3:1	+	50	++	26.09	37.27

^{a)}Perithecial: +, perithecial; -, non-perithecial

^{b)}Density: +, thin(≤ 30); ++, moderate($30 \leq \leq 50$); +++, compact($50 \leq$)

^{c)}Biological efficiency(%): (Dry weight of fruiting body/Weight of substrate)×100

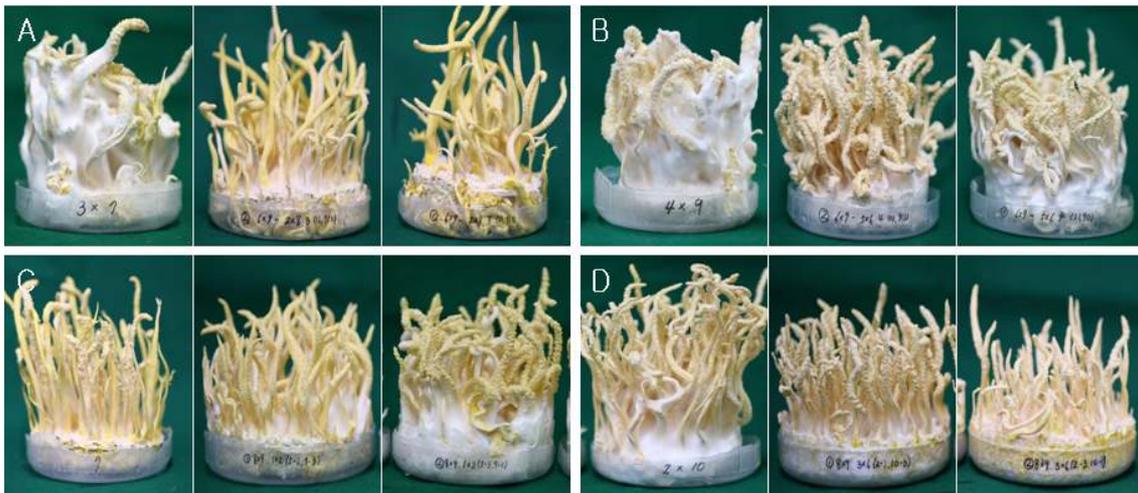


Fig. 32. Fruiting body formation from combination of single ascospore strains of *Cordyceps bassiana* C-15738-3×7(A), C-15741-4×9(B), C-15744-5×7(C) and C-15746-2×10(D) by inoculum rate(left side of 2:2, 1:3, 3:1).

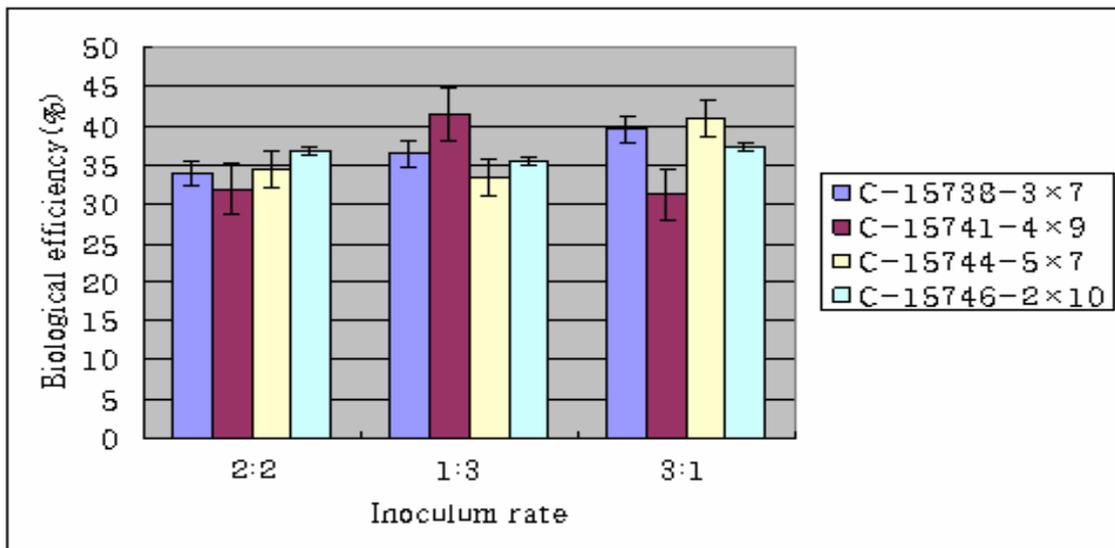


Fig. 33. Relationship among length(A), density(B) and biological efficiency(C) of fruiting body formation from combination of single ascospore strains of *Cordyceps bassiana* C-15738-3×7, C-15741-4×9, C-15744-5×7 and C-15746-2×10 by inoculum rate.

(3) 액체종균의 소량배양과 대량배양으로부터 형성된 인공자실체의 활력 비교

C-15744-7, C-15747-3 균주를 이용하여 액체종균 제조에서 250ml Erlenmeyer flask 배양과 8L 배양으로부터 형성된 인공자실체의 활력을 비교함으로써 본 균주의 대량배양(8L) 가능성을 조사하였다. 두 가지 조건에서 제조된 액체종균은 각각 8개의 현미배지에 접종하였고, 임의로 4개씩 선발하여 형성된 인공자실체의 특성을 조사한 결과, C-15744-7 균주로부터 형성된 인공자실체의 평균길이 및 밀도는 두 가지 조건에서 70mm, 55개로 거의 동일했고(Fig. 34A), 생물학적 효율(%)은 250ml Erlenmeyer flask 배양에서 38.21%, 8L 배양에서 34.72%로 3.49%의 차이를 보였다(Fig. 35). C-15747-3 균주로부터 형성된 인공자실체의 평균길이 및 밀도는 두 가지 조건에서 100mm, 55개로 거의 동일했고(Fig. 34B), 생물학적 효율(%)은 250ml Erlenmeyer flask 배양에서 34.4%, 8L 액체배양에서 32.28%로 2.12%의 차이를 보였다(Fig. 35). 위의 실험 결과, 두 가지 조건에서 형성된 인공자실체의 활력은 큰 차이가 없었으며 생물학적 효율(%)은 250ml Erlenmeyer flask 배양에서 2-3% 높게 조사되었다(6.15.19).

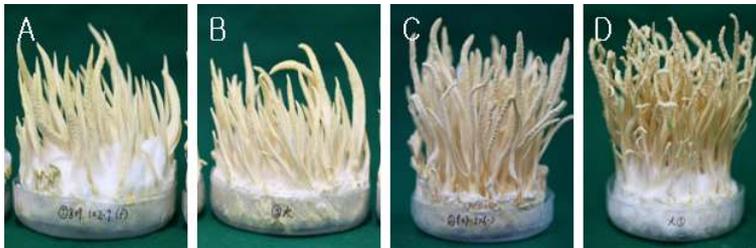


Fig. 34. Comparison between artificial fruit body in 250ml Erlenmeyer flask culture(A, C) and 8L culture(B, D).

A, B: C-15744-7

C, D: C-15747-3

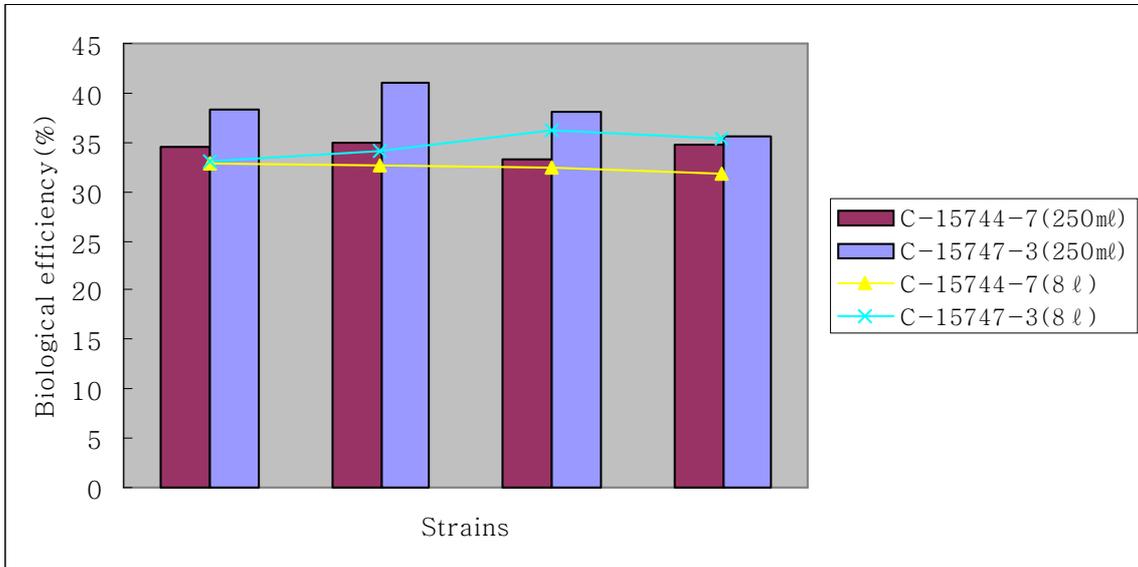


Fig. 35. Comparison between biological efficiency(%) of artificial fruit body in 250ml Erlenmeyer flask culture and 8l culture.

(4) 인공재배에서 적정 수확시기 조사

C-15746-2×4 균주를 이용하여 현미배지 접종 후, 3주 후부터 9주까지 7주 동안 일주일 간격으로 인공자실체 형성특성을 조사하여, 본 균주의 인공재배에서 적정 수확시기를 조사한 결과, 현미배지 접종 후, 2주 후부터 초발이가 시작되었으며(Fig. 35A) 3주차 배양부터, 형성된 인공자실체의 길이 및 밀도를 측정하였다. 자실체 형성은 3주차 배양부터 6주차 배양까지 빠르게 진행되었으며 5주차 배양부터, 형성된 자실체의 개수는 60개 정도로 유지되었다(Fig. 35D). 또한 7주차 배양부터 자실체의 길이는 대체적으로 70mm 정도로 유지되었고, 이때 자실체의 활력이 가장 양호하였다(Table 27, Fig. 35F). 자실체의 활력은 6주차 배양부터 안정적이었고(Fig. 35E), 7주차 배양 이후에는 분생포자를 형성하기 시작하였다(Fig. 3.7.G). 생물학적 효율(%)은 자실체의 배양기간에 반비례하였으며 자실체의 길이가 증가할수록 건중량 및 생물학적 효율(%)은 점차 감소하는 양상을 보였다(Fig. 36). 위의 실험 결과, 인공재배에서 안정적인 수확시기는 6주, 7주로 조사되었으며 자실체의 활력은 7주차 배양에서 가장 양호하였다(5,14,19).

Table 27. Characteristics of fruiting body formation from combination of single ascospore strains of *Cordyceps bassiana* C-15746-2×4 by culture period(weeks)

Culture period (weeks)	C-15746-2×4				
	Perithecial ^{a)}	Length(mm)	Density ^{b)}	Dry weight (g/bottle)	B.E.(%) ^{c)}
After 3 weeks	+	30	++	25.06	35.80
After 4 weeks	+	40	++	25.04	35.77
After 5 weeks	+	50	+++	22.63	32.33
After 6 weeks	+	70	+++	20.91	29.87
After 7 weeks	+	80	+++	20.58	29.40
After 8 weeks	+	80	+++	17.92	25.60
After 9 weeks	+	80	+++	15.37	21.96

^{a)}Perithecial: +, perithecial; -, non-perithecial

^{b)}Density: +, thin(≤ 30); ++, moderate($30 \leq \leq 50$); +++, compact($50 \leq$)

^{c)}Biological efficiency(%): (Dry weight of fruiting body/Weight of substrate)×100

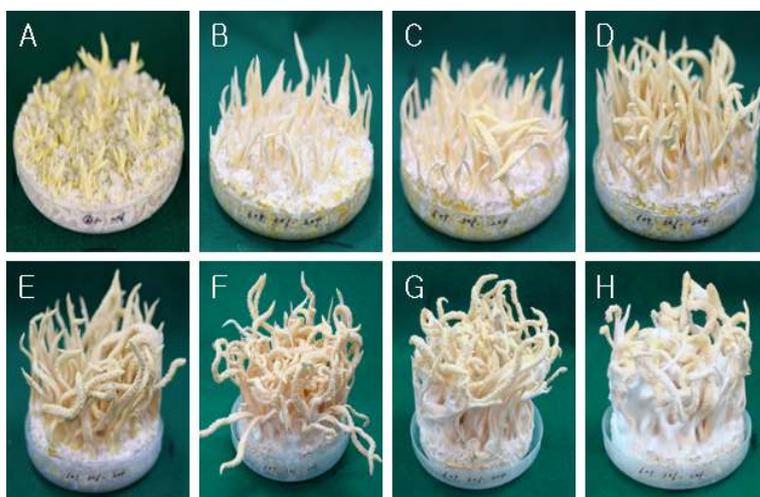


Fig. 35. Fruiting body formation from combination of single ascospore strains of *Cordyceps bassiana* C-15746-2×4 by culture period(weeks).

A: Stromatal primordia formation(two weeks culture), B: three weeks culture, C: four weeks culture, D: five weeks culture, E: six weeks culture, F: seven weeks culture, G: eight weeks culture, H: nine weeks culture

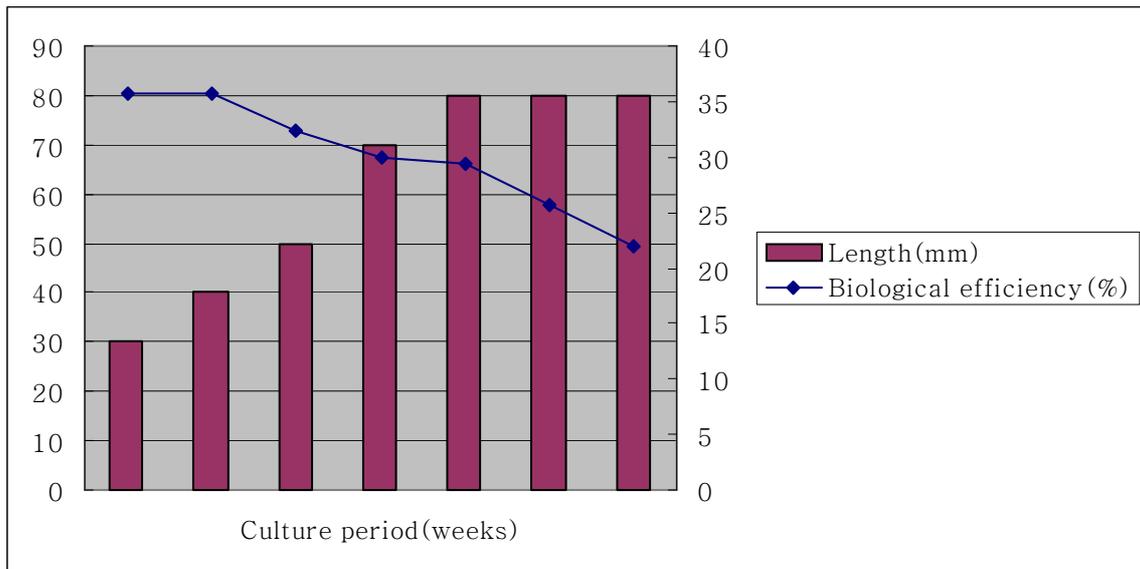


Fig. 36. Relationship between length(mm) and biological efficiency(%) of fruiting body formation from combination of single ascospore strains of *Cordyceps bassiana* C-15746-2×4 by culture period(weeks).

4. 노랑다발동충하초의 생리활성 및 생화학특성 연구

가. 노랑다발동충하초의 항산화 효과

노랑다발동충하초의 ethanol 추출물 및 여러 분획물의 항산화 효과를 측정된 결과, Hexane과 Ethyl acetate에서 가장 항산화 효과가 있는 것을 알 수 있었다. LDL의 산화 억제 효과는 항산화 효과와 밀접한 관계가 있으므로 Hexan 분획물을 이용하여 실험을 진행하였으며, EA 분획물은 분획되는 양이 적기 때문에 항산화 효과가 좋아도 시료에서 사용하지 않았다. 따라서, Hexan 분획물을 처리할 경우에 있어서 LDL의 산화 방지 효과를 보기 위해 실험을 진행하였다(Fig. 37).

나. 노랑다발동충하초 Hexane 분획물(CBHF)의 LDL 산화 억제 효과

Lipid peroxidation은 free radical에 의해 시작되는 화학현상으로 세포막의 지질에서 주로 일어난다. lipid peroxidation에 의해 생성된 lipid peroxide는 aldehyde 나 carbonyl composites로 전환되며 구조와 기능을 변질시키고 막의 유동성을 감소시켜 이온 구성요소들을 무능하게 만들어서 세포를 파괴시키기도 한다. 노랑다발동충하초 Hexane 분획물을 농도별로 처리함으로써 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 산화됨에 따라서 LDL은 (-) 이온들을 많이 갖게 되어 Charge가 변해 agarose gel의 이동거리에 영향을 주었다. 노랑다발동충하초의 농도별로 처리함에 따라 이동속도가 줄어드는 것으로, 산화억제에 많이 영향을 준다는 것을 확인했다(Fig. 38,39).

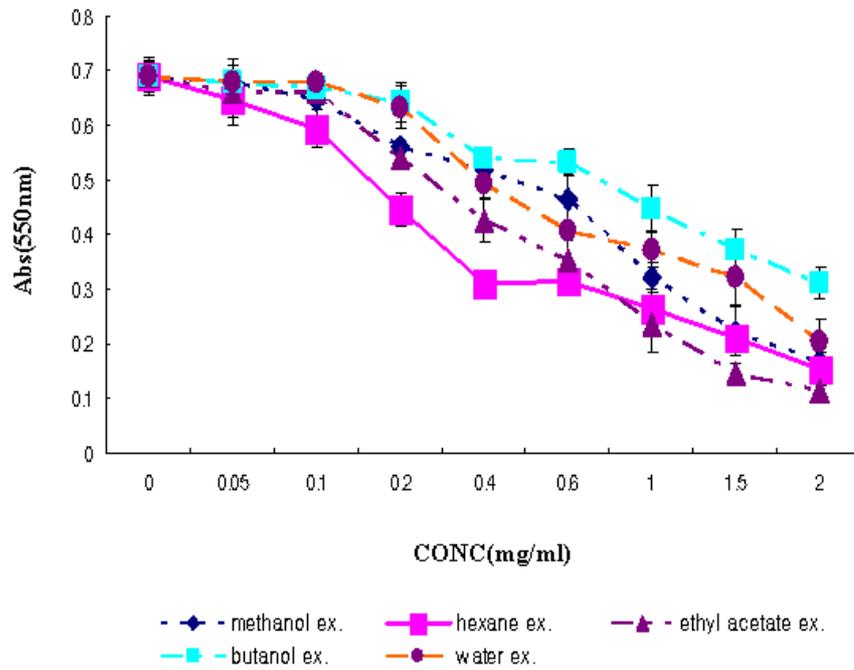


Fig. 37 Anti-oxidant effect of ethanol extract and fractions from *Cordyceps bassiana*

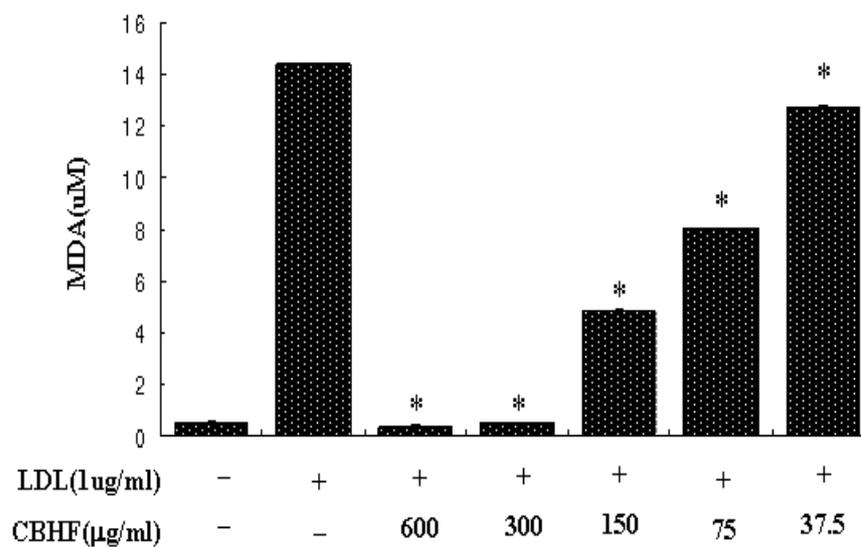


Fig. 38. Effect of CBHF on the inhibition of MDA.

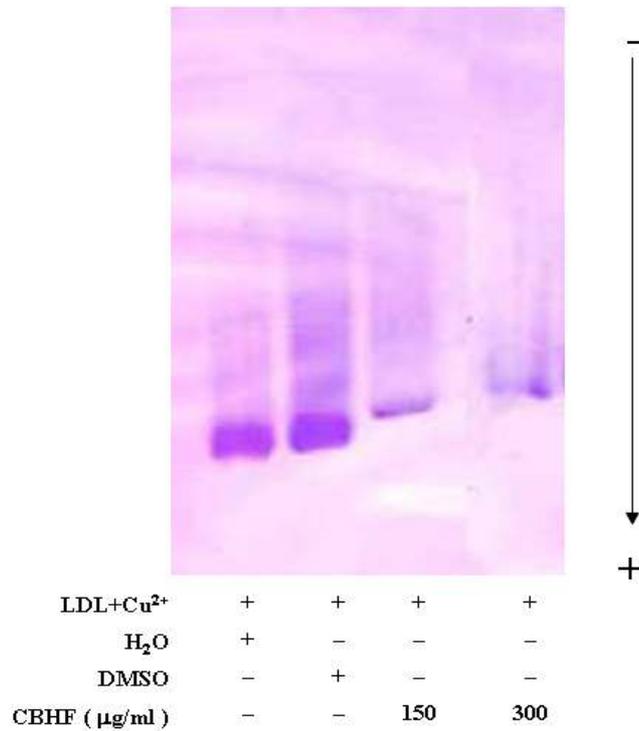


Fig. 39. Effect of CBHF on the mobility changes on agarose gel electrophoresis

다. 노랑다발동충하초의 ethanol 추출물 및 여러 분획물의 항염 효과

노랑다발동충하초를 ethanol로 추출한 것으로 농도별로 처리하여 iNOS와 COX-2의 저해능력을 확인해보았다. 그 결과 iNOS와 COX-2 모두 노랑다발동충하초 ethanol 추출물을 처리하였을 때 iNOS가 뚜렷히 감소함을 확인하였으며, COX-2 또한 뚜렷히 감소함을 확인하였다. 이러한 에탄올 추출물을 여러 극성에 따라서 분획하여 CBHF (*Cordyceps bassiana* hexane fraction), CBBF (*Cordyceps bassiana* butanol fraction), CBEAF (*Cordyceps bassiana* ethylacetate fraction) 그리고 CBWF (*Cordyceps bassiana* water fraction)을 얻었다. 각각의 분획물을 가지고 LPS로 유도되는 대식세포에서의 NO의 생성 억제효과를 측정된 결과, CBHF, CBBF와 CBEAF에서 NO의 생성 억제를 줄였으며 이로써 LPS로 유도되는 대식세포의 염증을 억제함을 알 수가 있었다. 이에 항산화 효과와 LDL 산화 억제에 효과를 가지고 있는 CBHF를 가지고 항염 신호 기작에 대해서 실험을 진행하였다(Fig. 40,41)(23,25,27).

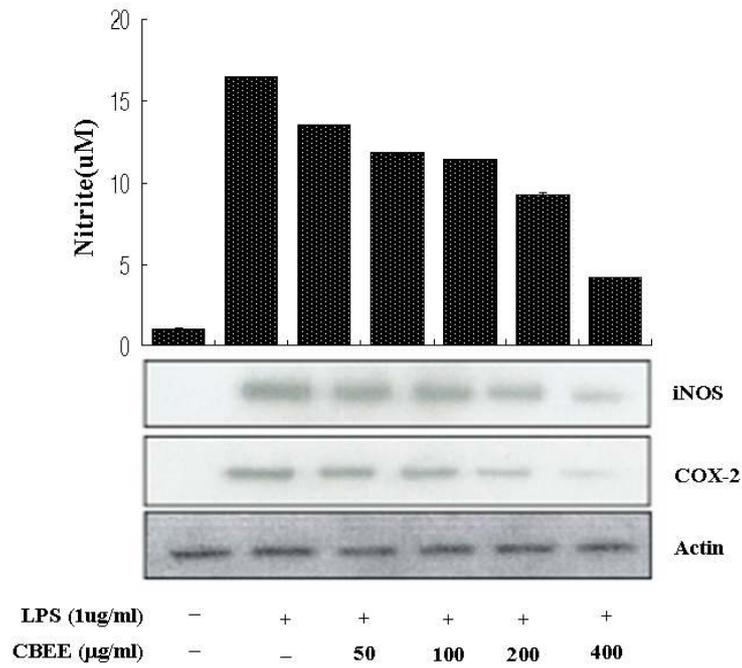


Fig. 40. Effect of CBEE on NO production, iNOS protein and COX-2 expression in LPS-induced macrophage (CBEE : ethanol Extract from *Cordyceps bassiana*)

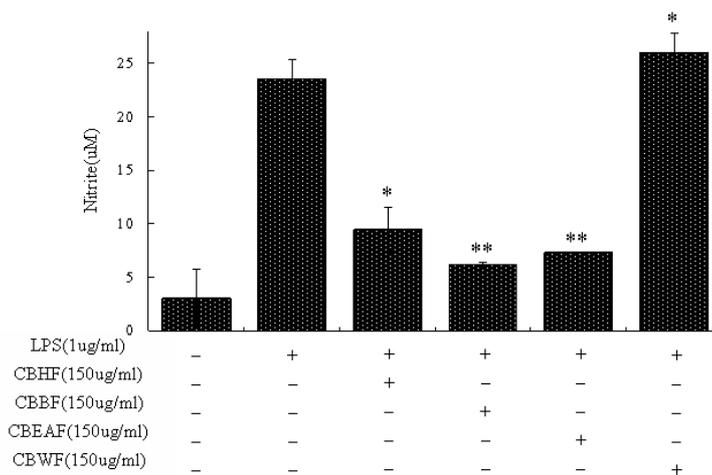


Fig. 41 Effect of fractions from *Cordyceps bassiana* on LPS-induced NO production

라. CBHF의 iNOS 단백질과 NO 생성의 억제 효과

LPS를 대식세포에 처리하여 염증을 유발시키면 염증 유발 단백질인 iNOS 단백질과 NO의 생성이 증가됨을 알 수가 있다. 이 때 CBHF를 농도에 따라서 처리하게 되면 LPS로 유도되는 iNOS가 단백질 level에서도 줄어드는지를 확인하고자 Western blotting을 통해서 실험한 결과 iNOS 단백질이 농도 의존적으로 감소함을 알 수가 있었다. 또한 RT-PCR을 통해서 단백질의 전사에 관련해서도 억제가 되는지를 확인한 결과 Dose-dependent하게 감소함을 알 수가 있었다. 따라서 CBHF는 항염 효과가 있음을 알 수가 있었다(Fig. 42)(23,28,29).

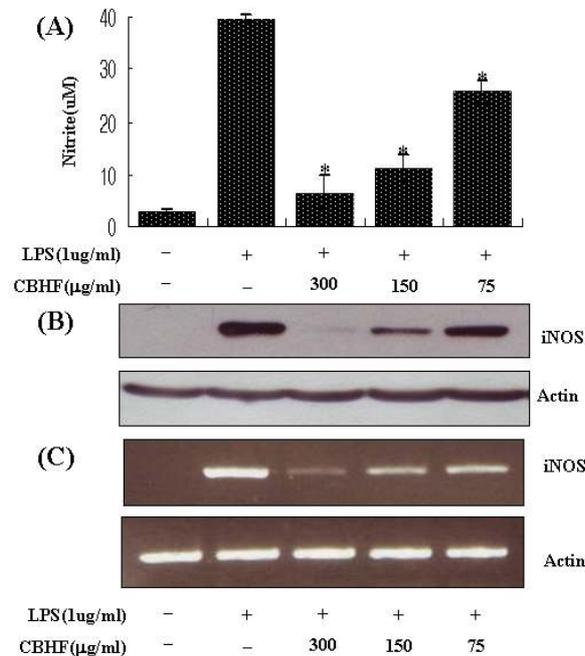


Fig. 42. Effect CBHF on LPS-induced NO, iNOS protein and mRNA expression

마. CBHF의 IκB, p38 그리고 JNK의 인산화 억제효과

LPS로 유도되는 염증 신호 기작에서는 많은 신호 전달에 의해서 염증 유발 단백질들의 발현이 조절되고 있다고 보고되어져 있다. 그 중에서 IκB-NFκB pathway가 많이 알려져 있으며, 또한 MAP kinases에 의해서 조절되어진다고 보고되어져 있다. 따라서

I κ B-NF κ B pathway 중에서 I κ B의 인산화가 되면, I κ B와 결합하고 있던 NF κ B가 핵 내로의 유입되면서 염증 유발 단백질의 promoter에 결합하여 염증 유발 인자들이 발현이 증가된다 (22,25,28,29). LPS로 인산화가 촉진되는 I κ B를 CBHF에 의해서 인산화가 억제되는지 확인한 결과 농도 의존적으로 억제됨을 알 수가 있었다. 또한 MAP kinases에는 ERK, p38 그리고 JNK로 분류가 되며, 그 중에서 iNOS는 JNK pathway를 통해서 발현이 조절되어진다고 보고되어져 있어, JNK의 인산화 억제를 weatern blotting을 통해서 실험한 결과 인산화가 농도 의존적으로 억제됨을 알 수가 있었다. 따라서 CBHF는 LPS로 유도되는 iNOS의 발현의 조절은 I κ B-NF κ B pathway와 JNK pathway를 통해서 억제함을 알 수가 있었다(Fig. 43)(32,33,36).

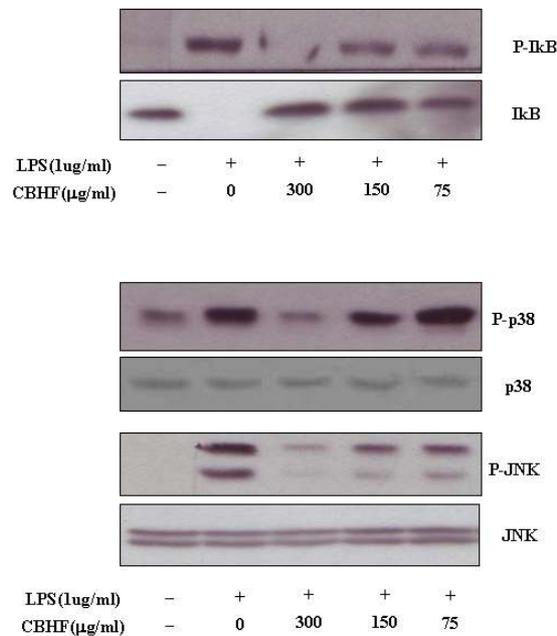


Fig. 43. Effect of CBHF on I κ B, p38 and JNK activation in LPS-induced RAW 264.7 macrophage cells

바) CBHF의 ROS 형성 억제 효과

앞의 실험에서 I κ B의 인산화와 JNK의 인산화는 signal upstream에서 ROS가 영향을 준다고 보고(23,30,32,33)되어져 있으며, 본 실험에서 ROS의 저해자인 NAC과 DPI을 처리하였을 경우 iNOS 및 NO의 생성이 억제됨을 알 수가 있었다. 따라서 Confocal assay를 통해서 LPS 처

리로 생성되는 ROS를 CBHF에 의해서 억제되는지를 확인하였다. 그 결과 CBHF의 처리는 LPS로 생성되는 ROS를 저해함을 알 수가 있었으며, CBHF는 ROS의 생성을 억제함으로써 downstream에 I κ B와 JNK의 인산화가 억제하여 iNOS의 단백질을 억제함을 알 수가 있었다(Fig. 44,45).

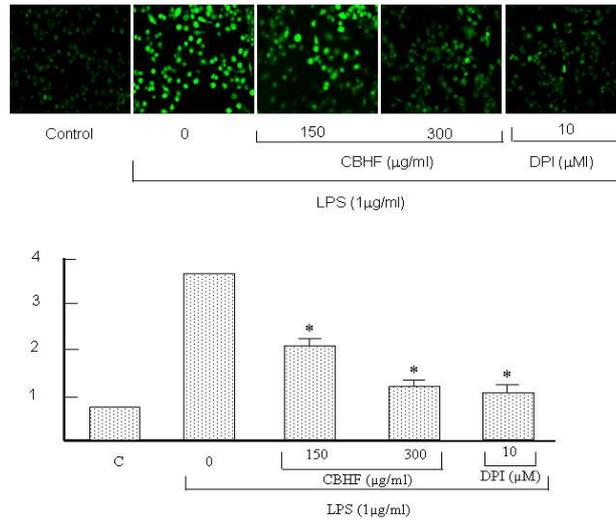


Fig. 44. Inhibition of LPS-induced reactive oxygen species (ROS) generation by CBHF

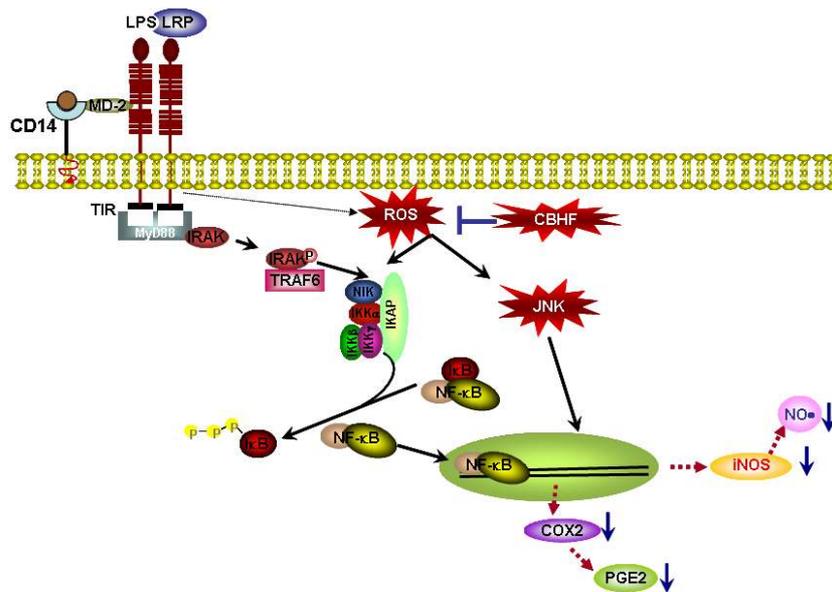


Fig. 45. Anti-inflammatory signal mechanism by CBHF

5. Cordycepin의 암세포 억제 기작 연구

가. 여러종류의 암세포를 사멸시키는 Cordycepin의 효과:

cordycepin이 여러종류의 cancer cell에서의 암세포 사멸작용을 비교하였다. Cordycepin을 처리한 여러 암세포인 MDA-MB231, MCF7, PC3, DU145, MCF7 및 LNCap에서 48시간 배양후, dose-dependent manner로 암세포 사멸을 보인다는것을 알수 있었다(Fig. 46A). 또다른 방법으로, ELISA kit assay.를 사용하여, DNA fragmentation 를 비교하여 보았을 때, Cordycepin을 18시간 처리한 암세포에서는 dose-dependent manner로, DNA fragments 관련된 cytoplasmic histone 이 증가한다는 (DNA fragments가 증가한다는) 결론을 얻었다(Fig. 46B).

나. MDA-MB231 cell의 사멸에 미치는 Cordycepin의 효과.

다음은, cordycepin이 MDA-MB231 cell line의 viability를 감소시키는 효과가 있는지 실험하였다. cordycepin으로 처리한 세포를 DAPI staining(Fig. 47A)방법으로 실험하여 외관을 비교하였다. 또한 PI staining assay(Fig. 2B)을 사용하여 cell viability를 비교 실험하였다. 실험결과, Cordycepin은 MDA-MB231 cell line 암세포를 dose-dependent manner하게 감소시킨다는것을 알수 있었다(Fig. 47B). 이러한 실험의 결과는, cordycepin은 apoptotic induction을 통하여 MDA-MB231 cell의 viability를 감소 시킨다는 결론을 얻었다.

다. Cordycepin에 의한 MDA-MB231 cell 의 caspase activation 효과

Caspase 계열이 활성화되면, 세포사멸효과를 보인다는것이 알려져 있다(25,32). 그러나, 여러형태의 caspases activation 과 cordycepin-induced apoptosis는 아직 알려져 있지 않고 있다. western blotting의 결과를 보면, cordycepin은 caspase-3 substrate protein인, PARP의 degradation과 관련하여, caspase-3의 cleavage에 관련되어 있다는 것을 알수 있었다. 또한 cordycepin은 caspase-9의 활성을 증가시키지만, caspase-8에는 효과가 없음을 알수 있었다(Fig. 48A). cordycepin은 time 및 dose dependent한 manner로, PARP, caspase-3, caspase-9 의 cleavage에, 효과가 있음을 알수 있었다(Fig. 48B). 이러한 실험결과는 caspase-3 및 9은 cordycepin에 의한 MDA-MB231 cell의 apoptosis와 관련이 있음을 알수 있었다.

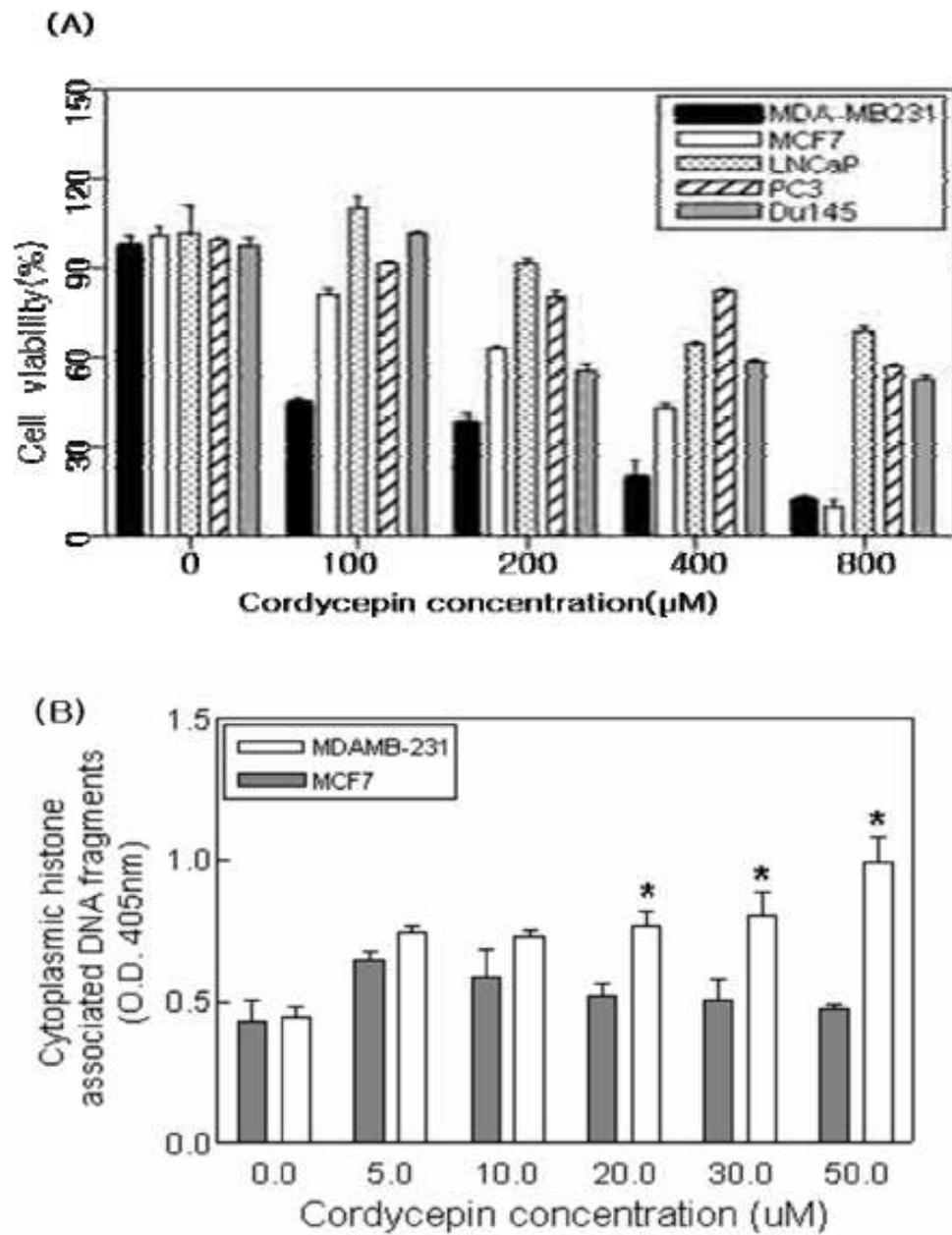


Fig. 46. Cordycepin decreased cell viability(A) and increased DNA Fragmentation(B).

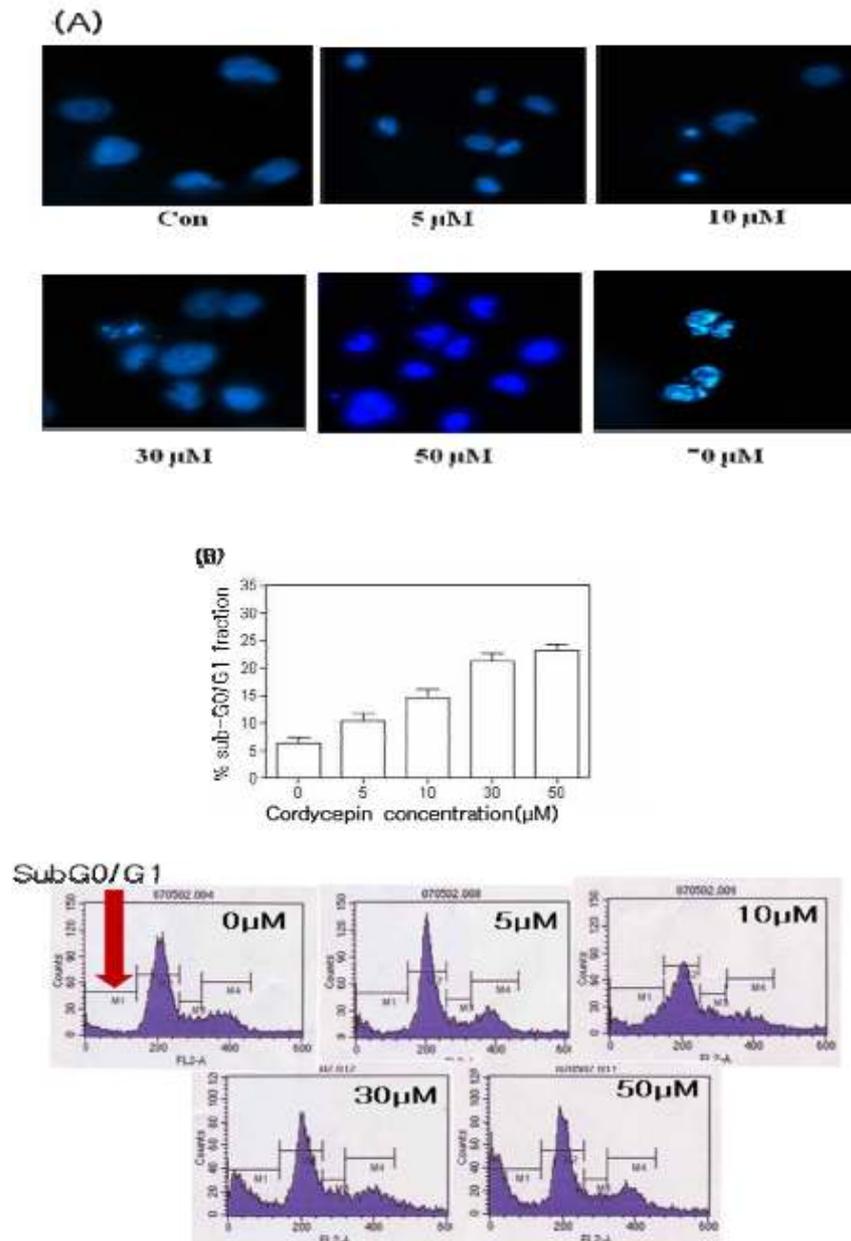


Fig. 47. Cordycepin induced apoptosis (A)DAPI staining (B)Flow cytometric analysis.

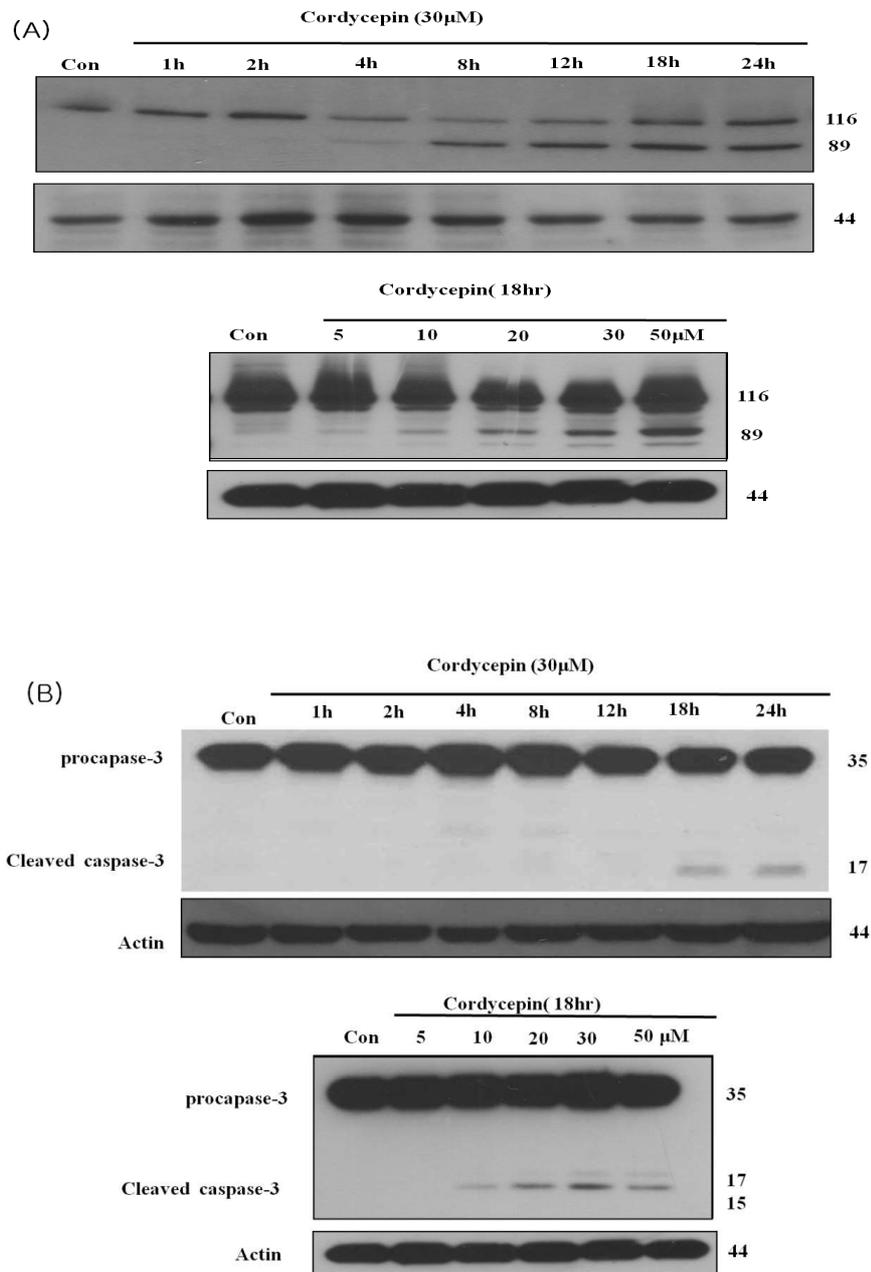


Fig. 48. Cordycepin induced apoptosis by activation of PARP(A) and Caspase-3(B).

라. Cordycepin의 conventional mitochondrial apoptotic pathway를 통한 사멸기작.

cordycepin 처리전에는, Cytochrome c 는 mitochondrial fraction에서 localize되고 있지만, cordycepin을 18시간 처리후에는 cytochrome c가 mitochondrial fraction에서는 감소되며, cytosolic fraction에서 발견되었다(Fig. 49A). 이러한 cordycepin의 mitochondrial apoptotic pathway를 실험하기 위하여, the mitochondria membrane potential을 조사하였으며, cytochrome c release 를 confocal microscopy를 이용한 Immunohistochemistry를 test하였다. cordycepin에 의한 mitochondria membrane permeability의 유도를 추적할수 있었으며, cordycepin에 의한 mitochondria membrane permeability의 변화는 MDA-MB231 cell내의 cytochrome c가 mitochondria에서 cytosol로 방출되는연구의 결과를 볼수 있었다(Fig. 49B)(25,28,31).

마. Cordycepin의 처리에 의한 Bax의 Mitochondrial Translocation 효과.

Bcl-2 계열이 the cytosol에서 mitochondria로 translocation 된다는것은 mitochondria-mediated apoptosis에 의해 암세포의 apoptosis를 촉진시키는 것으로 알려져 있다(24,27). pro-apoptotic Bcl-2 family인 Bax가, MDA-MB231 cell에서 cordycepin의 농도에 따라 cytosolic fraction에서 mitochondrial fraction으로 이전 된다는 결과를 얻었다(Fig. 50). 이러한 실험의 결과는 cordycepin에 의한 암세포 사멸 기작은 mitochondria membrane potential의 감소와 cytochrome c의 방출 및 Bax 의 증가에 의한, 대표적인 mitochondrial apoptotic pathway인 것으로 결론을 얻었다.

바. Cordycepin은 JNK 활성을 증가 시킨다.

일반적으로, JNK는 Bax의 upstream molecule로 아려지고 있다. Fig. 51A에서와 같이, cordycepin(30 μ M)을 처리할 경우, 2hrs에서 12hr사이에서 p-JNK 를 증가 시켰다. 그러나, JNK phospholation은 18hrs이후에는 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 51B). SP600125(JNK inhibitor)는 JNK phospholation을 억제하였으나, 반면에 cordycepin은 증가 시키는것을 보였다(Fig. 51C). 이러한 결과는 cordycepin은 JNK phospholation을 증가시킨다는것을 알수 있었다(26,28,30).

사. Cordycepin의 암 세포 사멸기작

연구의 결과를 도표로 도시화 하면 Fig. 52과 같다. MDA-MB231 cell line의 cordycepin의 항암기작은 JNK phospholation을 증가시키며, caspase-3 및 9은 cordycepin에 의한 MDA-MB231 cell의 apoptosis와 관련이 있음을 알수 있었으며, pro-apoptotic Bcl-2 family인 Bax가, MDA-MB231 cell에서 cordycepin의 농도에 따라 cytosolic fraction에서 mitochondrial fraction으로 이전 되며, cytochrome c가 mitochondria에서 cytosol로 방출되는 연구의 결과를 볼수 있었다.

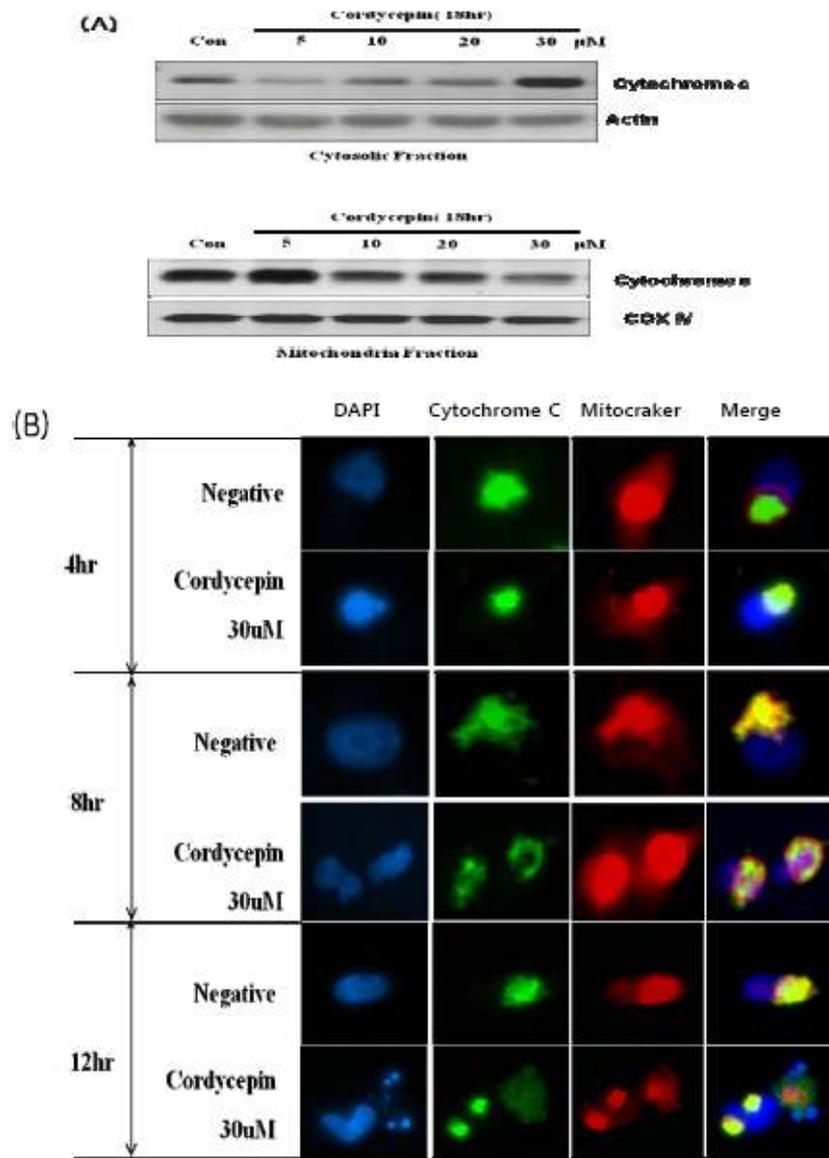


Fig. 49. Cordycepin activated the conventional mitochondrial apoptotic pathway on MDA-MB231 cell.

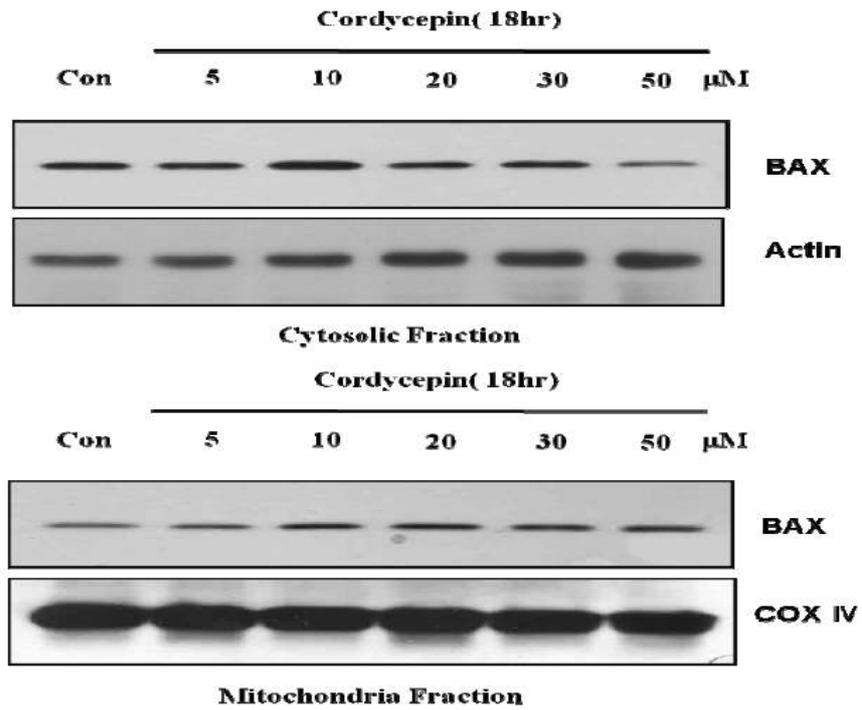


Fig. 50. Cordycepin induced apoptotic pathway by increasing Bax in mitochondrial fraction.

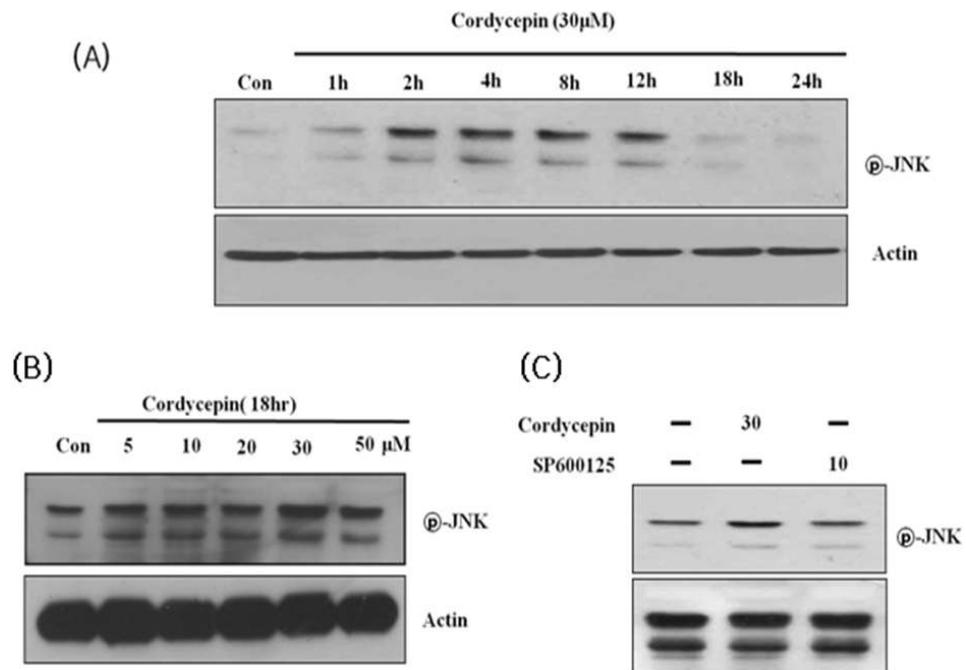


Fig. 51. Cordycepin induced apoptotic pathway by the activation of JNK.

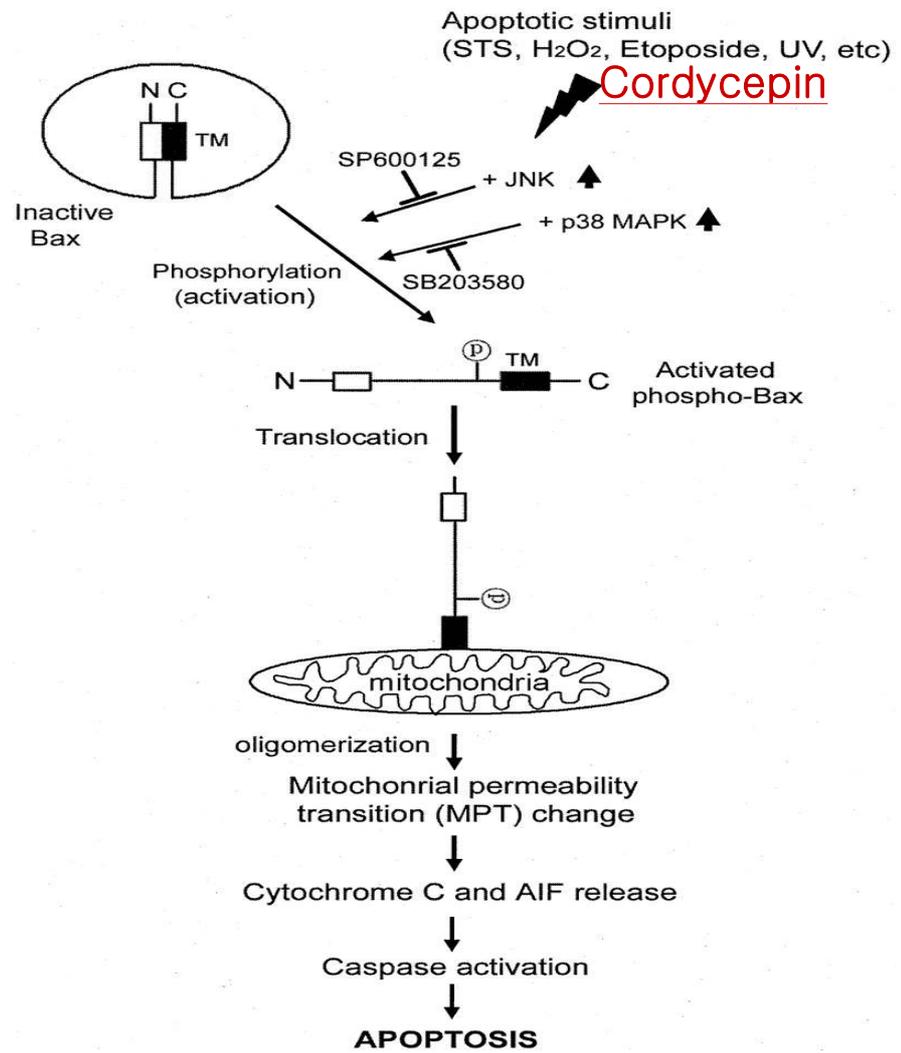


Fig. 52. Proposed model of Cordycepin for mitochondrion-dependent apoptosis through JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax

6. 노랑다발동충하초의 항암특성

가. CBBF의 세포 생존율에 미치는 영향

(1) MTT assay를 통한 PC-3와 Du145 세포의 생존율 조사

CBBF가 암세포에 있어서 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위해 MTT assay를 행하였다. CBBF를 동일한 농도로 각각의 세포에 처리를 해준 후, 24시간을 배양시켰다. 실험결과 농도에 dose dependant하게 생존율이 감소하는 것을 확인하였다. 그 중 Du-145 세포에 대한 억제 효과가 PC3보다 더욱 효과가 좋다는 결론을 얻었으며(Fig. 53-A), Du-145 세포에 샘플을 녹인 DMSO용액의 영향을 알아보았고, 이 DMSO가 세포의 생존율에 영향을 미치지 않는다는 사실을 확인하였다. (Fig.53-B)(32,33).

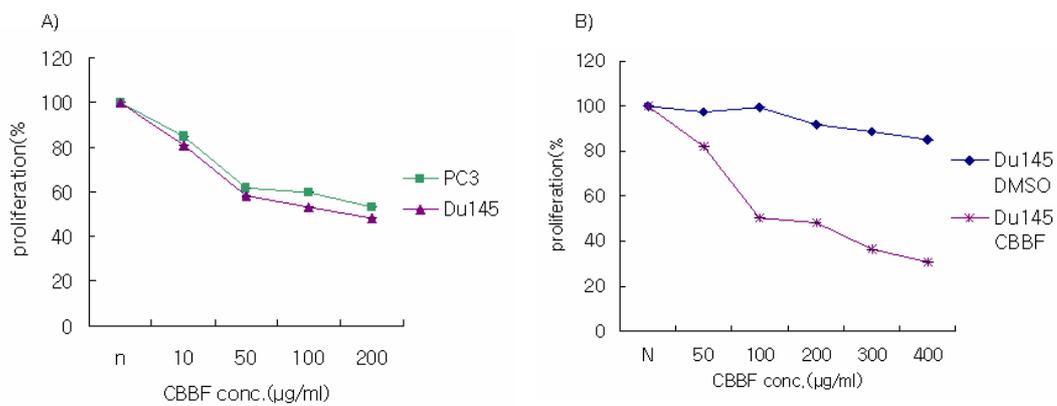


Fig.53 MTT assay

(2) Clonogeny assay를 통한 Du-145세포의 생존율 조사

CBBF에 의한 Du145세포의 생존율을 더 자세히 관찰하기 위하여 농도별로 CBBF를 처리해 주었고 24시간동안 노출시킨 후, 제거하고 배지를 갈아주며 1-2주간 배양한 결과, 농도에 비례하여 dose-dependant하게 colony가 감소한다는 것을 확인하였다(Fig. 54).

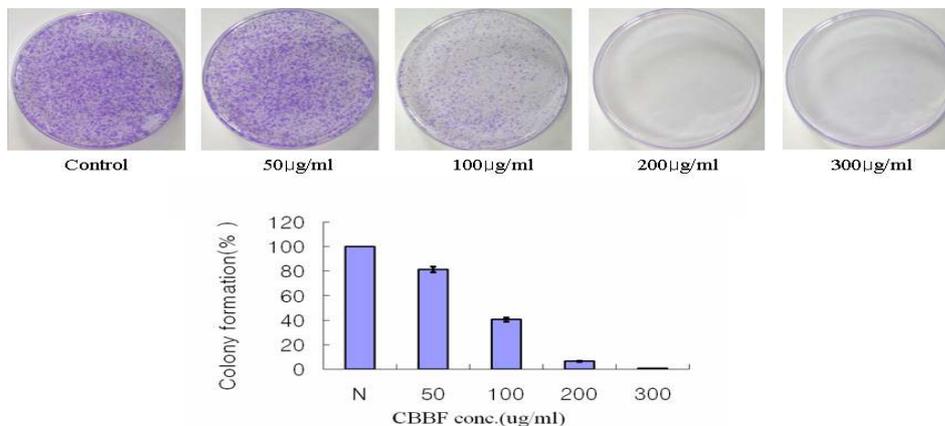


Fig. 54 Clonogeny assay

나. CBBF와 세포사멸과의 관계

(1) FACS를 통한 세포사멸 확인

CBBF가 세포사멸에 어떠한 영향을 주는지 확인해 보기 위해서 CBBF를 일정농도로 하여 처리를 해주었고 24시간 배양시킨 뒤 flow cytometry를 이용하여 세포의 주기와 세포사멸을 확인해 보았다. CBBF의 농도가 200 μ g/ml에서 최대의 sub-G1의 증가를 확인해 볼 수 있었다. (Fig. 55)

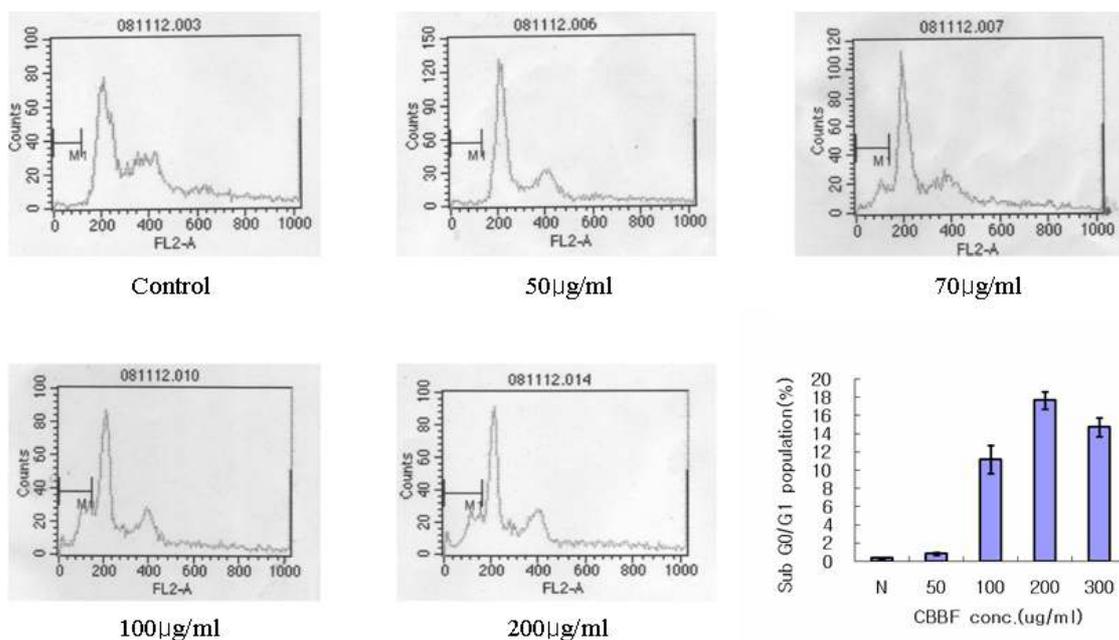


Fig. 55 FACS(Fluorescence activated cell sorter)

(2) DNA fragmentation

CBBF에 의해 일어나는 암세포의 생존을 감소가 세포사멸에 의한 것인지 아니면 세포괴사에 의한 것인지를 확인하기 위하여 DNA fragmentation을 실시하였다. Cell death detection ELISA 키트를 사용하여 96 well plate에 배양한 세포를 대상으로 실험을 진행하였고 그 결과에서 50 μ g/ml이상의 CBBF 농도에서 DNA fragmentation이 일어나는 것을 확인하였으며, 100 μ g/ml에서 최대의 DNA fragmentation이 일어나는 것을 확인하였다. (Fig. 56)(25,32).

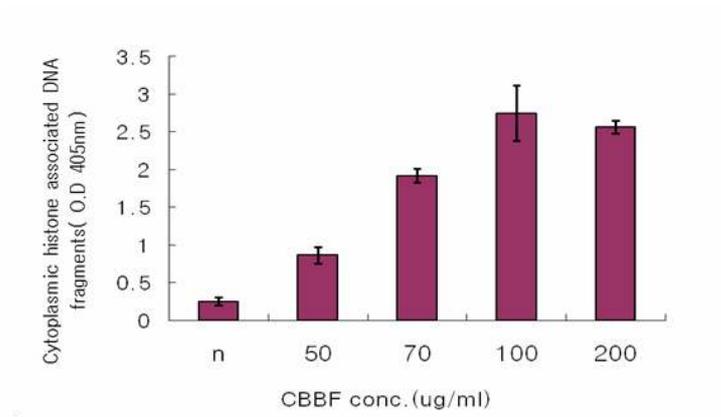


Fig. 56 DNA fragmentation

(3) PARP protein에 대한 CBBF의 효과

CBBF가 Du145 세포에서 어떠한 pathway에 의해서 세포사멸에 이르는 지를 확인해 보기 위해서 western blot을 사용하였다. 여기서는 대표적인 세포사멸 촉진인자로 알려져 있는 PARP protein의 cleavage된 형태를 확인해 보았다. CBBF를 농도적인 변화를 두고 세포에 처리해 주었다. 그리고 24시간이 지난 후 세포를 추출하여 직접적으로 western blot을 행해준 결과 200ug/ml이상의 농도에서부터 cleavage 된 PARP의 detection이 가능하였다. (Fig. 57)(23,30).

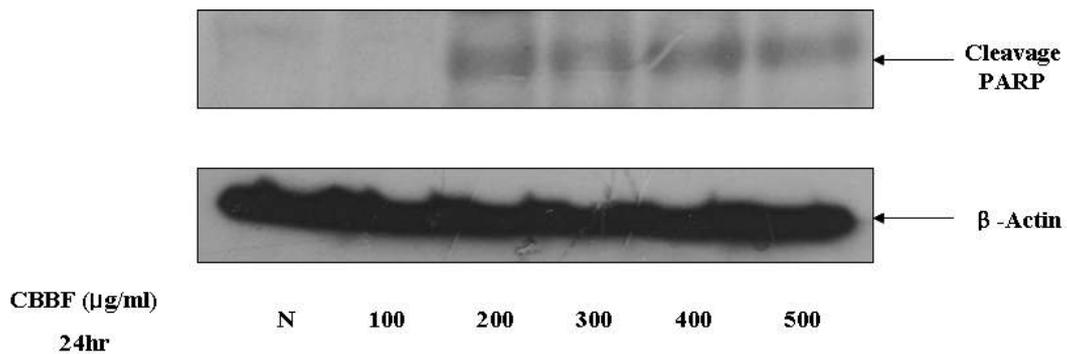


Fig. 57 Effect of CBBF on PARP protein expression in Du145

(4) Bcl-2와 Bax protein에 대한 CBBF의 효과

우리는 또한 세포사멸 신호전달에서 대표적인 Bcl-2 family에 대한 CBBF의 효과를 알아보았다. Bcl-2 family중에서도 대표적인 세포사멸 억제신호인 Bcl-2 protein과 촉진신호인 Bax protein을 동일한 방법으로 실험하였다. 실험결과 Bcl-2의 경우는 농도가 증가할수록 발현이 감소하는 것을 발견하였고 Bax의 경우는 농도가 증가할수록 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. (Fig. 58)(25,31,32).

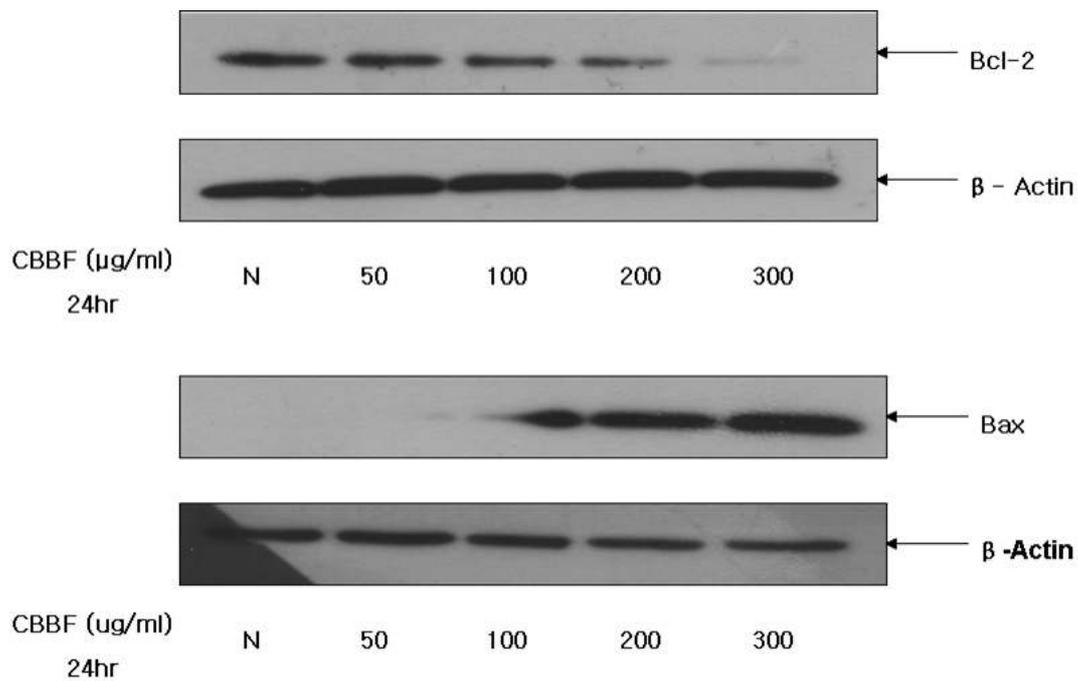


Fig. 58 Effect of CBBF on Bcl-2 and Bax protein expression in Du145

(5) 노랑다발동충하초 buthanol분획물의 항암 기작

이러한 연구의 결과를 종합하여보면, CBBF는 전립선암세포인 DU145 세포에 대해서 세포사멸의 과정을 통해 항암작용을 나타내고 이것은 세포내의 미토콘드리아를 거쳐서 일어나는 intrinsic pathway를 통한 세포사멸의 과정이라는 것을 확인할 수 있었다.(Fig. 59)

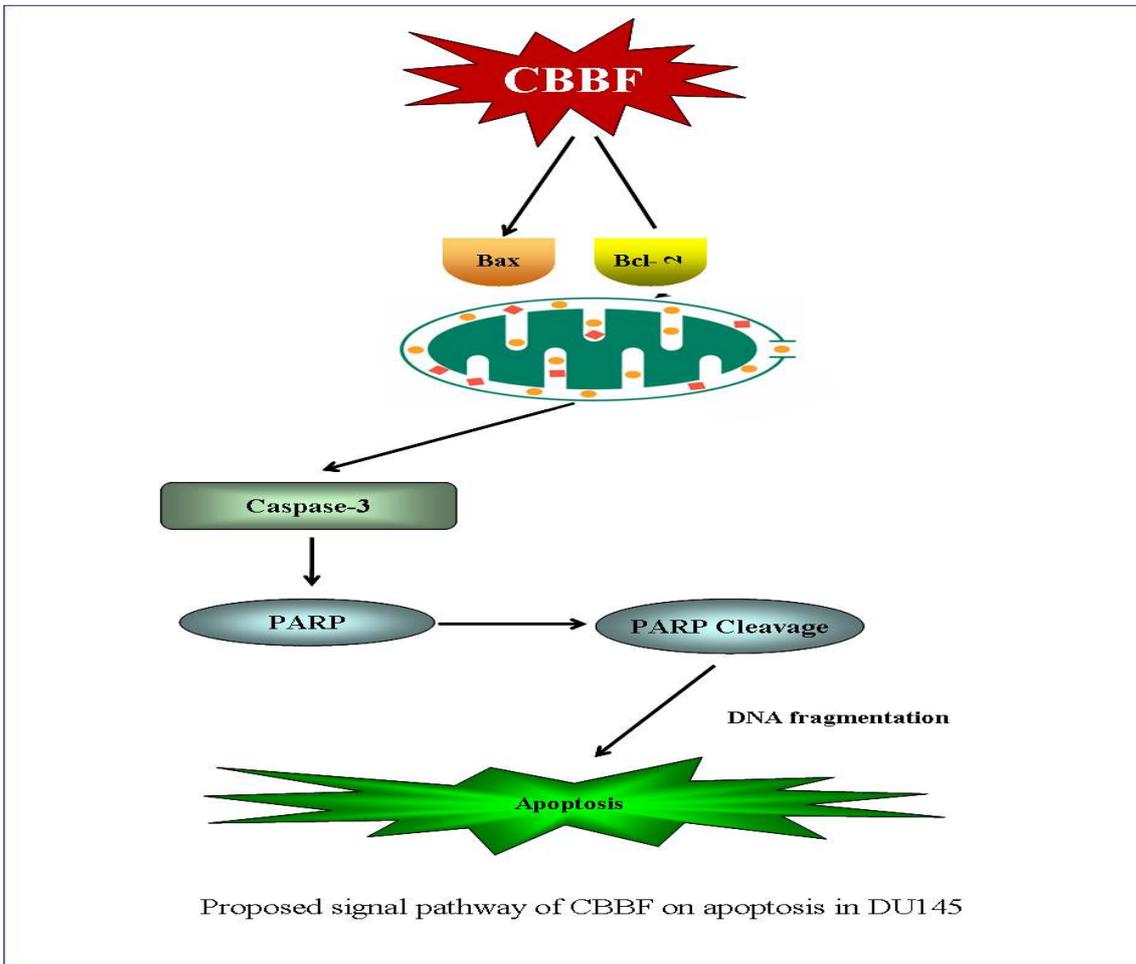


Fig. 59 Proposed signal pathway of CBBF on apoptosis in DU145

7. 노랑다발동충하초 균주간의 생리활성 차이 및 비교실험

가. 노랑다발동충하초 균주의 선택

노랑다발동충하초 균주간의 생리활성 차이 및 비교실험을 위하여 사용된 균주는, 1784, 1795, 5657, 9044, 15746의 5종의 노랑다발동충하초 균주를 사용하였다.

나. 5종의 노랑다발동충하초 균주의 항산화 비교 실험(antioxidative activity).

DPPH실험법을 사용하여 항산화력을 비교하였으며, 그 결과는 Fig. 60과 같았으며, IC50에 해당되는 양을 표시하였다. IC50이 가장 낮은 균주는, 15746이 가장 좋은 결과를 보였으며, 1795이 가장 항산화 효력이 낮았다. 항산화력이 높은 순서로 비교하면, 15746>5657>9044>1784>1795의 순서를 보였다.

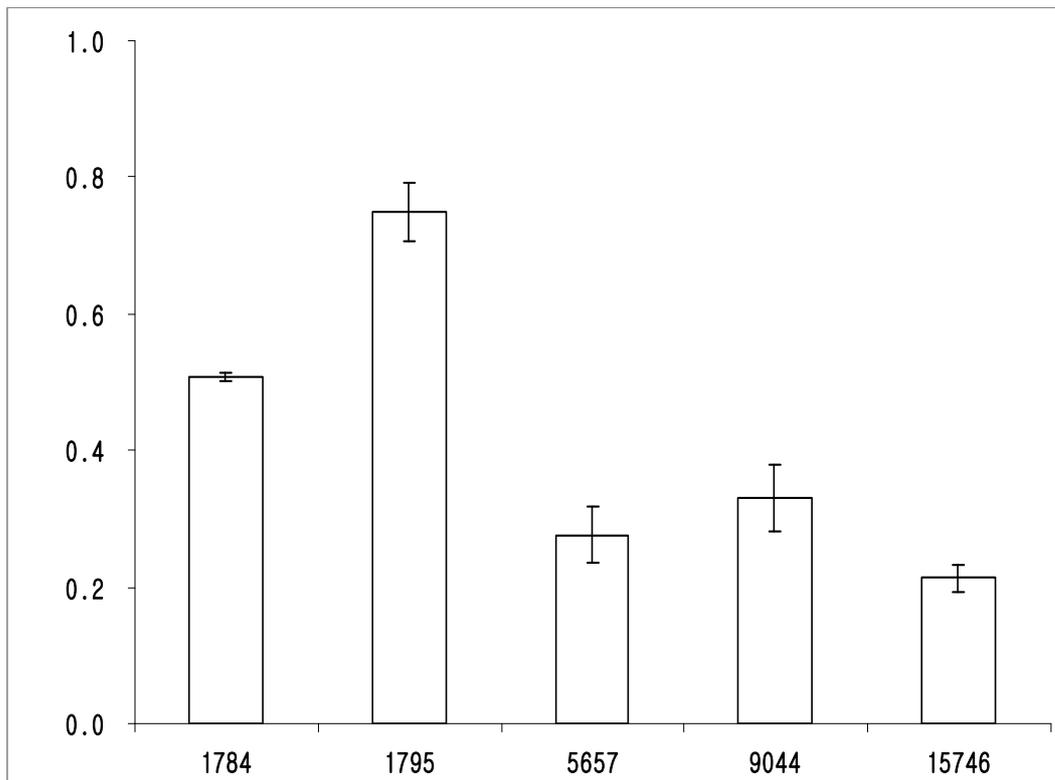


Fig. 60 5종의 노랑다발동충하초 균주의 항산화 비교 결과
(IC50에 해당되는 양으로 표시)

다. 5종의 노랑다발동충하초 균주의 항암 비교 실험.

MTT assay를 사용하여 항암능력을 비교 하였으며, Cancer cell line으로는, Hela, A549, B16F10를 사용하였다. cell을 각 well당 5×10^3 개로 seeding한 후 0.5% FBS media에서 starvation후, 각각의 노랑다발동충하초 시료를 100, 200, 300 ug/ml로 첨가한 후, 24hr,48hr,72hr 배양후, 1mg/ml의 MTT시약으로 570nm에서 흡광도를 확인하였다.

(1) 5종의 노랑다발동충하초 균주의, Hela cell(자궁암 세포)의 억제 효과

Fig. 61 에서와 같이, 1784, 1795 가 좋은 효과를 보였으며, 5657이 가장 낮은 효과를 보였다.

5종 노랑다발동충하초 균주의, 자궁암 억제 효과를 비교하면,

1784=1795>9044>15746>5657 순서를 보였다.

(2) 5종의 노랑다발동충하초 균주의, A549(폐암 세포)의 억제 효과

Fig. 62 과 같이, 1784=1795>9044>15746>5657 의 순서를 보였으며, 자궁암세포에서와 유사한 결과를 보였다.

(3) 5종의 노랑다발동충하초 균주의, B16F10(피부암 세포)의 억제 효과

Fig. 63과 같이, 위의 Hela cell(자궁암 세포)과, A549(폐암 세포)에 비해 아주 좋은 억제효과를 보였으며,

1784=1795>9044>15746>5657 의 순서를 보였으며,

억제 순서는 위의 Hela cell(자궁암 세포)과 유사한 결과를 보였다.

Hela cell MTT assay 결과

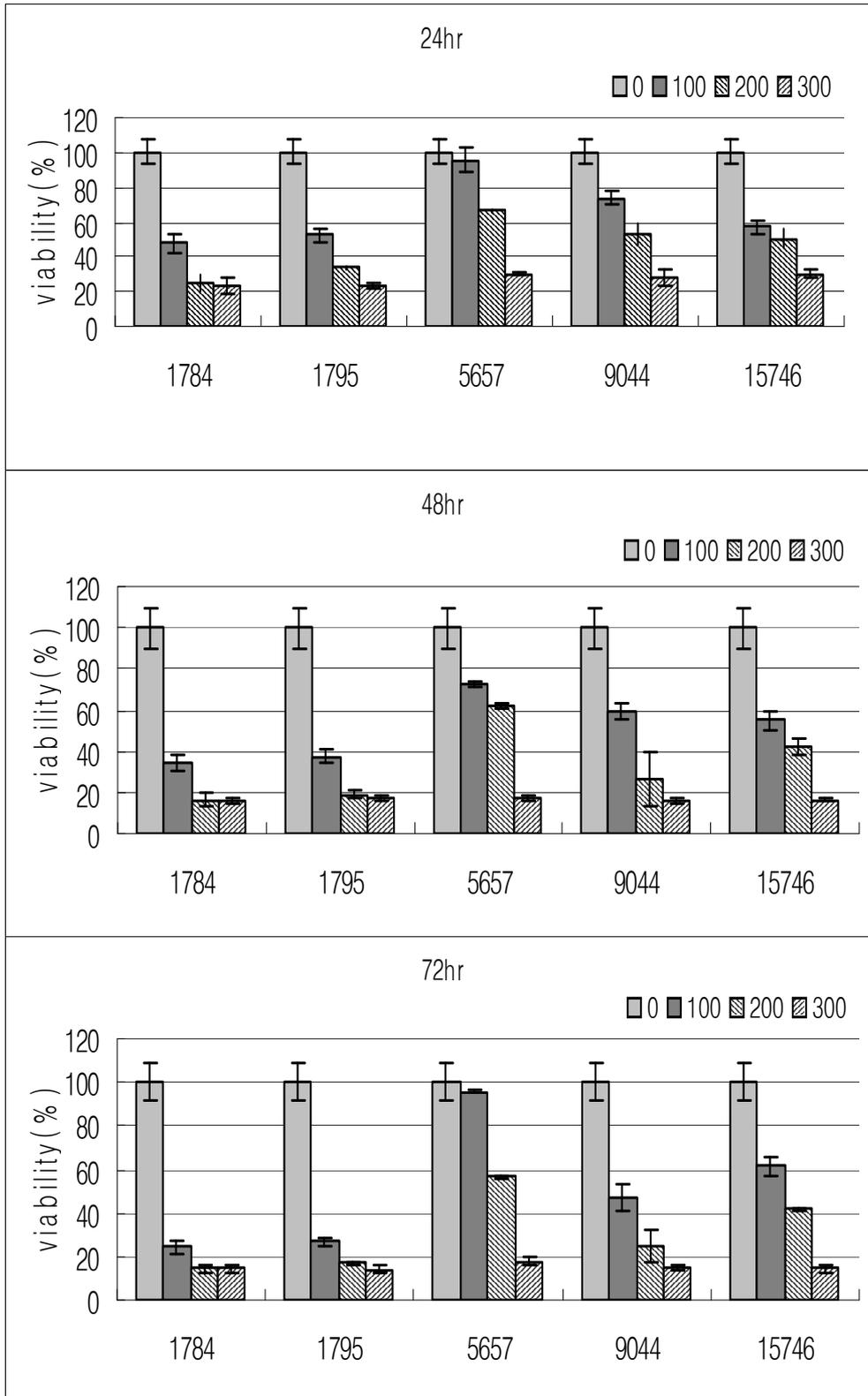


Fig. 61 5종의 노랑다발동충하초 균주의, Hela cell 억제 효과(MTT assay)

A549 MTT Assay 결과

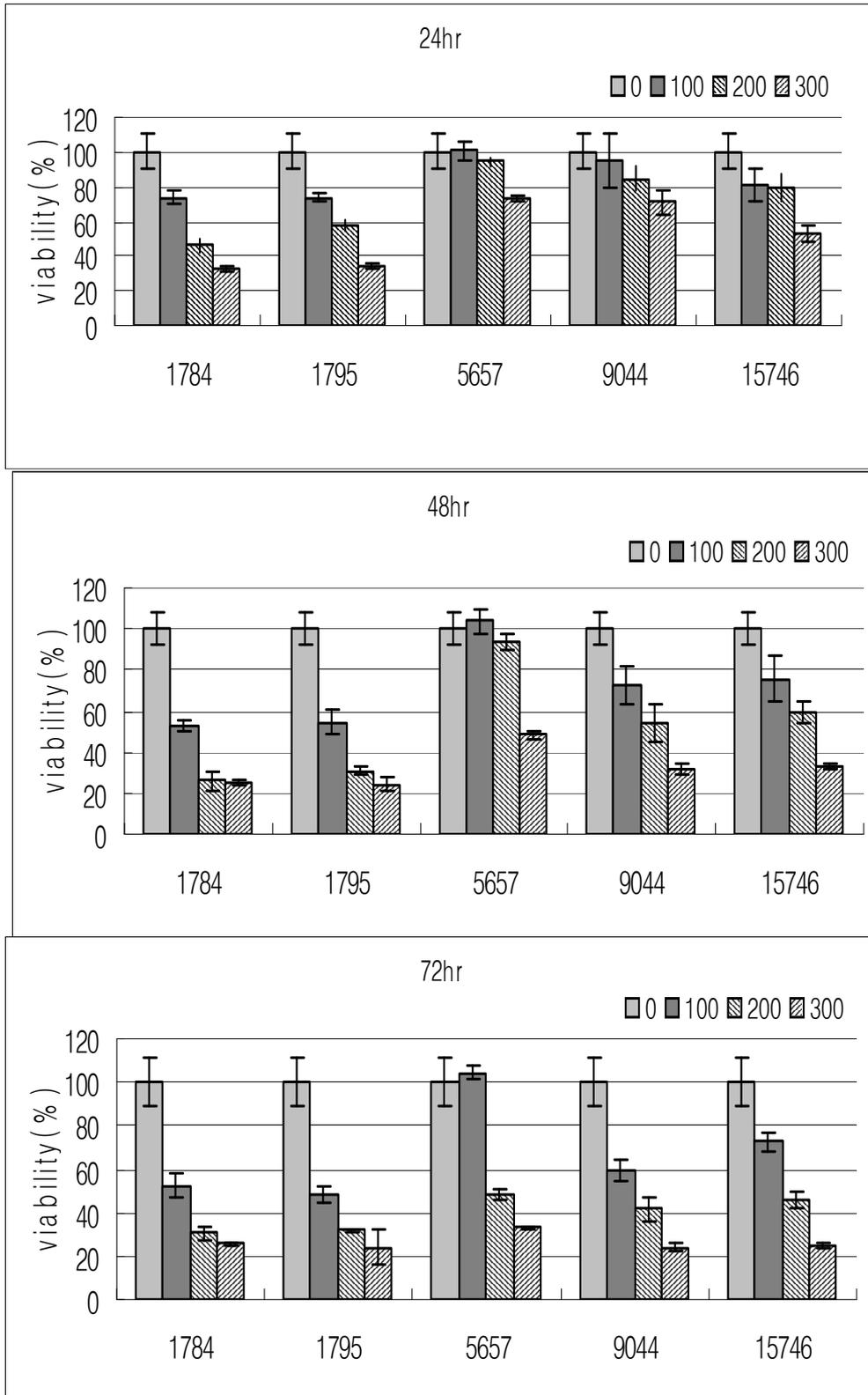


Fig. 62 5종의 노랑다발동충하초 균주의, A549 억제효과(MTT assay)

B16F10 MTT assay 결과

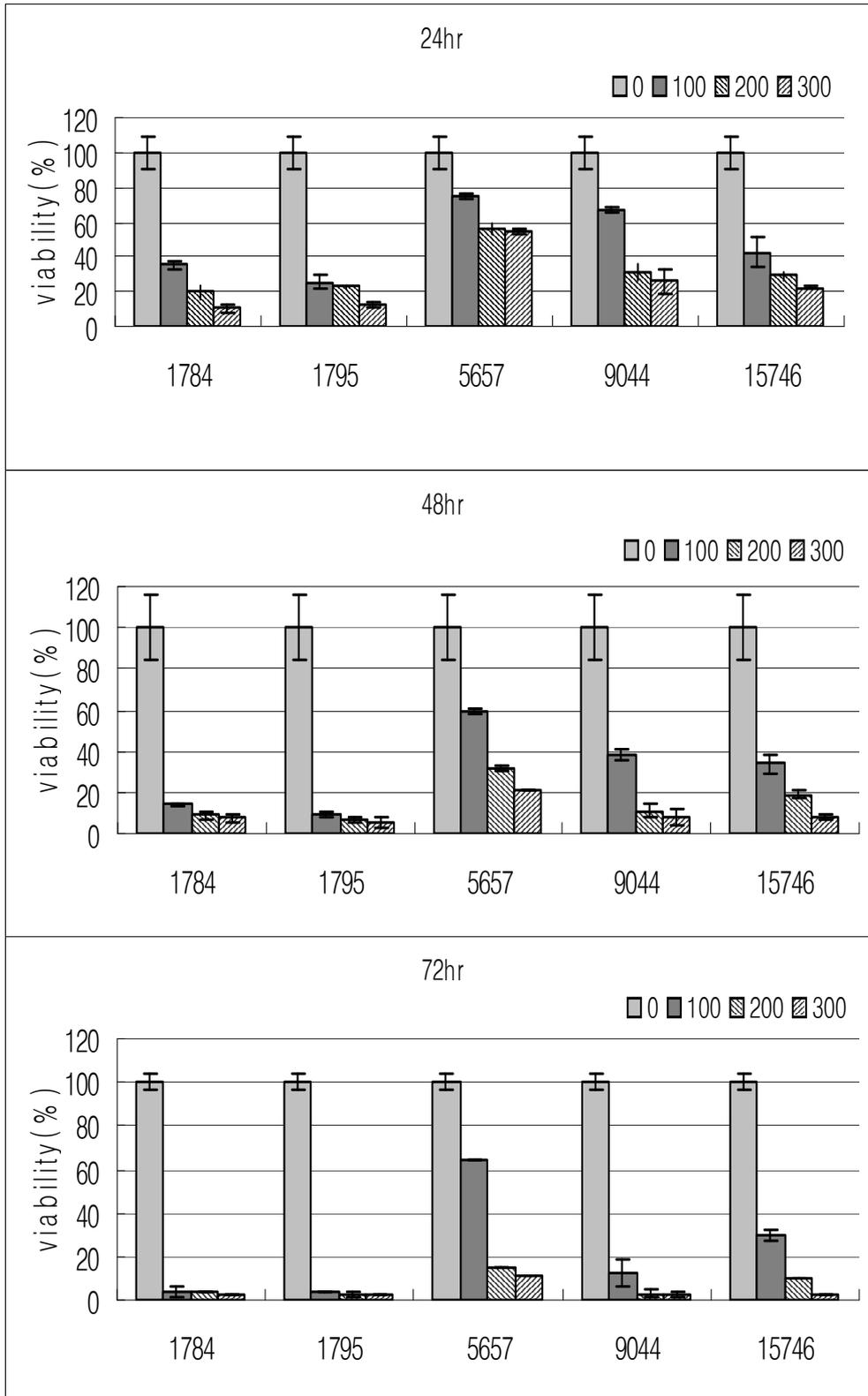


Fig. 63 5종의 노랑다발동충하초 균주의, B16F10 억제효과(MTT assay)

8. 노랑다발동충하초유효물질을 함유한 제품연구 (기능성 약술 제조)

가. 노랑다발동충하초를 이용한 기능성 약술 제조법.

노랑다발동충하초유효물질을 이용한 기능성 약술은 다음과 같이 제조하였다.

동충하초 시료	노랑다발 동충하초를 이용한 기능성 약술		
	노랑다발 동충하초	술	숙성일수
CB1-5	35g	1L당	5일
CB2-5	70g	1L당	5일
CB1-10	35g	1L당	10일
CB2-10	70g	1L당	10일
CB1-20	35g	1L당	20일
CB2-20	70g	1L당	20일
CB1-30	35g	1L당	30일
CB2-30	70g	1L당	30일
CB1-60	35g	1L당	60일
CB2-60	70g	1L당	60일
CB1-90	35g	1L당	90일
CB2-90	70g	1L당	90일
CB3(CB1-#)	15g	1L당	90일

나. 노랑다발동충하초 약술



노랑다발동충하초 자실체 (70g) 노랑다발동충하초 자실체 (140g)
술 제조전



노랑다발동충하초 자실체(70g) 노랑다발동충하초 자실체(140g)
술 제조후

다. 노랑다발동충하초 약술의 관능검사.

노랑다발동충하초 약술의 관능검사를 위하여, 검사자들에게 아래의 표를 사용하여 평가를 하였다. 그 결과는 Fig. 64와 같았다.

(1) “맛”의 평가

“맛”의 평가에서는 5일에서 60일까지 맛의 평가가 증가하는 경향을 보였으며, 90일에서는 30일정도의 결과를 보였다. “맛”의 전체적인 평가를 보면, 60일>90일>30일>20일>10일>5일 의 순서를 보였다.

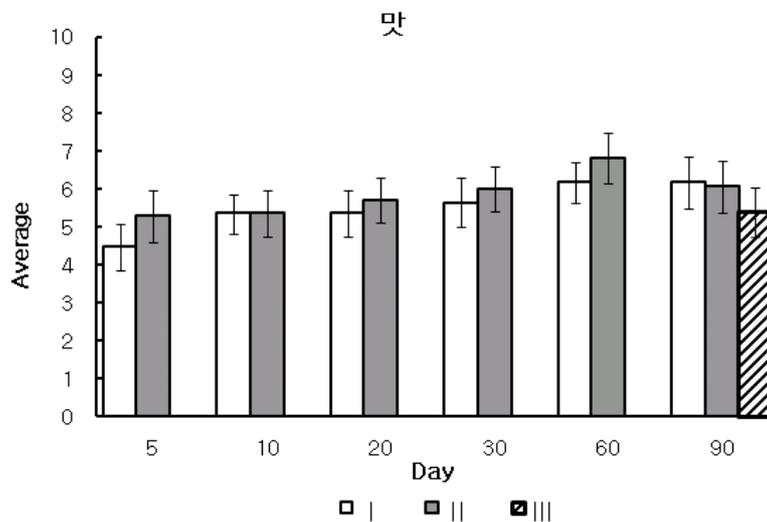
(2) “향”의 평가

“향”의 평가에서는 20일=30일=60일=90일 으로 보였으며, 5일이 가장 낮았다.

(3) “색”의 평가

“색”의 평가에서는, 5일-90일사이에 뚜렷한 차이를 보이지는 않았다.

종합적으로, “맛”, “향”, “색”의 관능검사 결과를 평가하면, 60일에서 가장 바람직한 결과를 보였으며, I 보다는 II가 좋은 결과를 보였다.



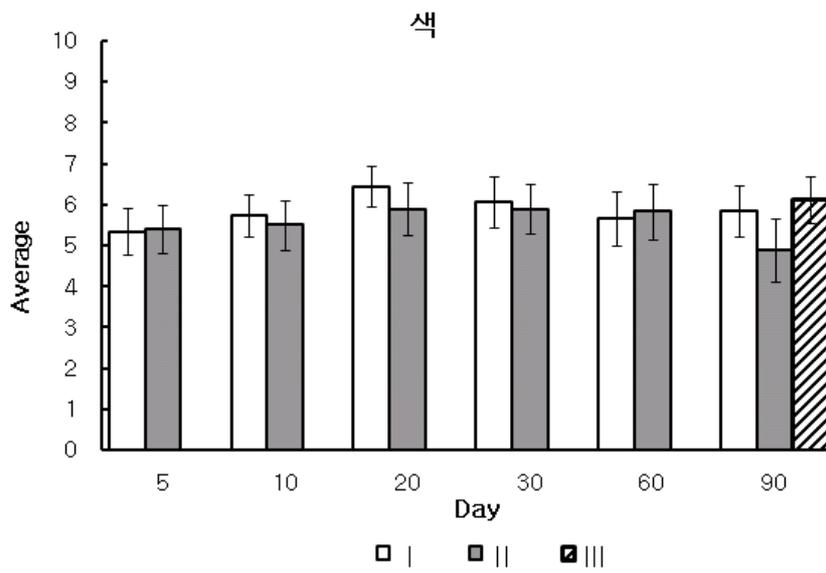
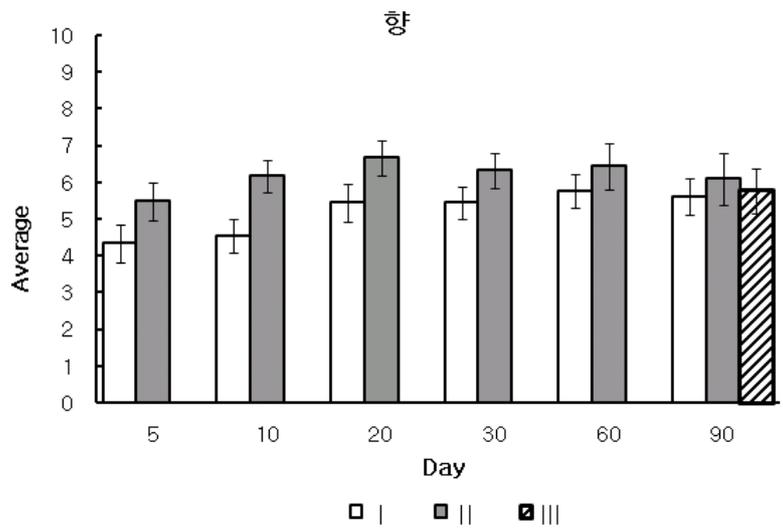


Fig. 64 노랑다발동충하초 약술의 관능검사 결과

라. 관능검사의 전체적인 평(의견의 정리)

관능검사 요원(30인)들의 전체적인 의견은 다음과 같았다.

노랑다발동충하초 자실체를 이용한 기능성 약술의 평가	
평가자 번호	평가자의 종합적인 의견
1	다들 맛은 비슷비슷 했습니다. 향을 더 보완했으면 좋겠습니다.
2	Ⅱ보다는 Ⅰ의 색이 맑아보인다. 맛은 Ⅰ보다 Ⅱ가 부드러운 것이며 5일부터 90일까지 보았을때 60일 정도일 때가 제일 마시기 편했다.
3	숙성일수가 낮은 것은 Ⅰ,Ⅱ모두 알코올 향이 너무 강했고 일수가 증가할수록 구수한 향이 증가했다. 전체적으로 숙성일수가 30일일때 가장 맛이 좋았다.
4	색은 Ⅰ이 더 보기 좋았는데 향이나 맛은 농도가 진해지고 구수한 맛과 향이 숙성될수록 더 좋았습니다.
5	대체적으로 Ⅱ의 맛들이 마시기에는 더 편안했고, 그중 20일 째의 맛이 가장 부드럽고 편안했던 것 같습니다.
6	맛에서는 Ⅰ이 더 나은것 같고, 향이나 색에서도 Ⅰ이 더 나은 것 같다. 대체적인 특성들이 숙성기간이 오래될 수록 점점 나아지다가 시간이 너무 지나면 오히려 향이나 색이 약해지는 것 같다.
7	오래숙성된 술은 독한 느낌이 납니다. 색은 조금 진한것들이 좋아보이고 맛은 20일 Ⅱ가 가장 좋은것 같습니다. 그리고 술맛의 차이를 잘 알지 못하겠습니다. 20일 Ⅱ외에는 맛이 비슷한거 같습니다.
8	숙성된 기일이 길어질수록 색깔이 진했으며 Ⅰ과Ⅱ의 경우 2배의 색차이가 났고 Ⅲ는 제일 연했다. 향의 경우도 색과 마찬가지로였다. 맛의 경우 숙성도가 너무길고 색이 짙어지니 맛이 강하게 남는데 취향에 따라 다르겠지만 맛이 너무 짙으니 향 때문에 오히려 술맛이 적어지는 느낌이 없고 짧게 숙성된 것은 약했지만 부드럽고 은은한 맛이 났다.
9	처음 마실때보다 마신후 뒷맛이 진하게 남아 있어서 좋습니다.
10	Ⅱ는 너무 맛이 진한감이 없지않고, Ⅰ이 더 깔끔한 맛이 났습니다. 색은 맑은 색에 더 높은 점수를 주었고, 향은 크게 좋은 향이 나지 않았습니다.
11	전체적으로 숙성이 오래 될수록 맛과 향과 색이 강하게 나타났고, 90일Ⅲ는 다른 것 보더 현저히 낮게 나타났다. 20일까지는 비슷한 맛과 향이 나타났지만 20일 후부터는 진한 맛과 향이 나옴을 알수있었고, 전체적으로 끝맛이 부드럽고, 향이 은은했다.
12	90일된 것이 향이 강하고 맛도 진하다. 5일,10일 된 것은 향도 약하고 맛이 연하다. 색은 좋았다.
13	Ⅰ은 알코올 맛이 적은 반면 Ⅱ는 알콜맛이 느껴진다. Ⅰ,Ⅱ모두 숙성일에 따라 향이 적어지는 반면 맛은 알콜향이 잘 느껴지지 않고 부드러운 느낌이 있다.
14	Ⅰ 5일의 맛과 향이 전체적으로 가장 좋았습니다.
15	Ⅱ형은 동춘하초 향이 너무 진해 술맛이 잘 안나고 Ⅰ형이 숙성되면서 향과 맛이 좋아집니다.
16	숙성일이 짧은 것은 단맛이 심한 것 같다. 그리고 진한 것은 좀 쓴맛이 대체로 심한 것 같다. 숙성일이 긴 Ⅰ의 경우가 그나마 맛이 제일 좋은 것 같다. 하지만 전체적으로 현미의 맛이 너무 강해 약을 먹을 때 느끼는 맛이 난다.
17	향은 20일 정도가 너무 독하지도 않고 은은하게 좋았고, 맛은 30일 정도가 너무 독하지도 않으면서 맛이 좋았다. 첫맛은 특쓰면서 끝맛은 부드러웠다. 약간 씹는 맛이 줄었으면 더 좋을 듯하다.

마. 노랑다발동충하초 이용한 기능성 약술의 항산화 비교 실험(antioxidant activity). DPPH법을 사용하여 항산화력을 비교하였으며, 항산화력 비교실험 결과는 Fig. 65와 같았다.

30일까지는 비슷한 결과를 보였으나, 전반적으로 비슷한 결과를 보였다.

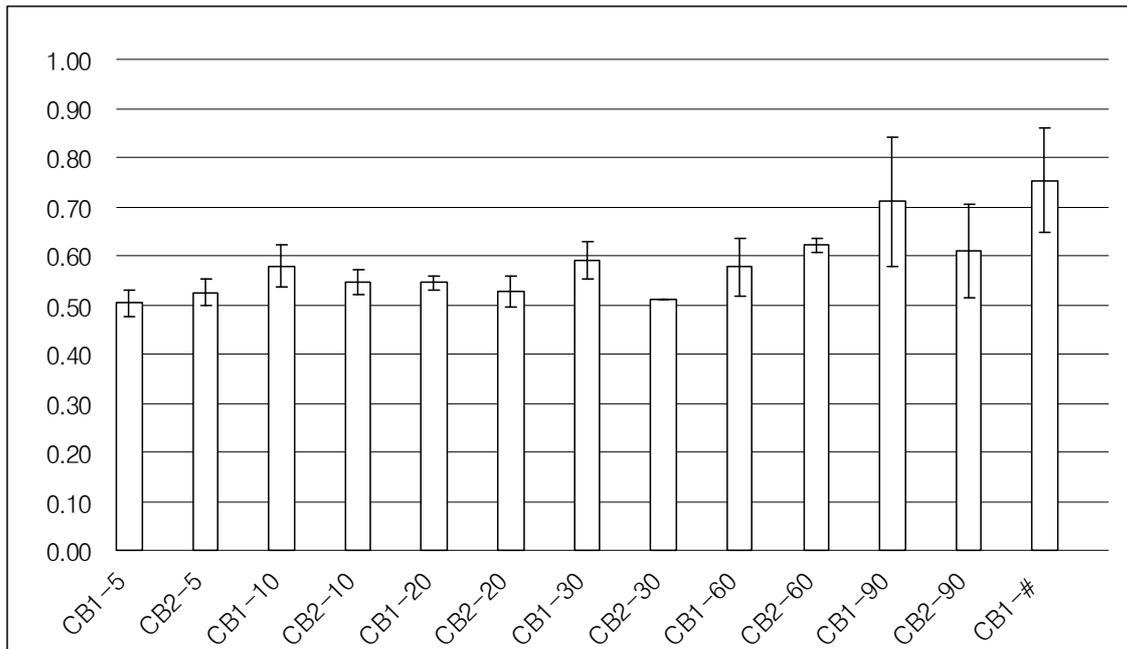
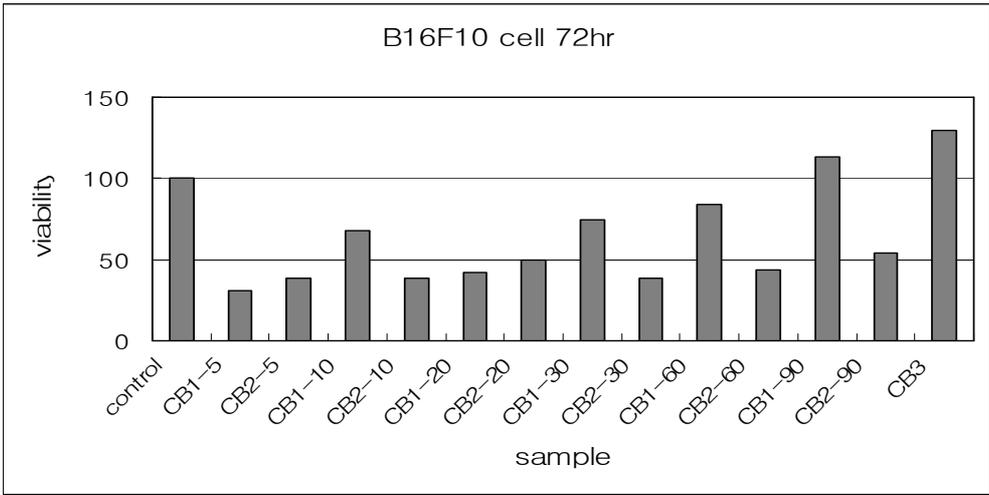
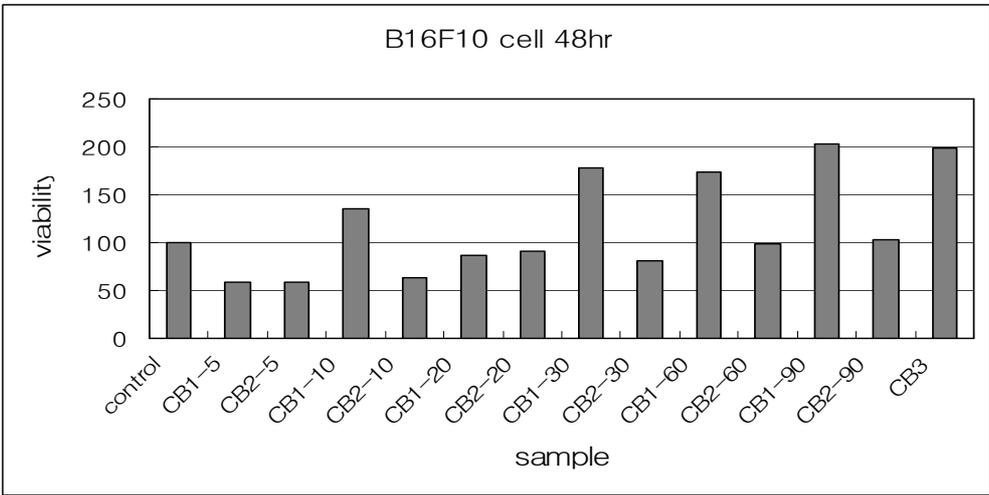
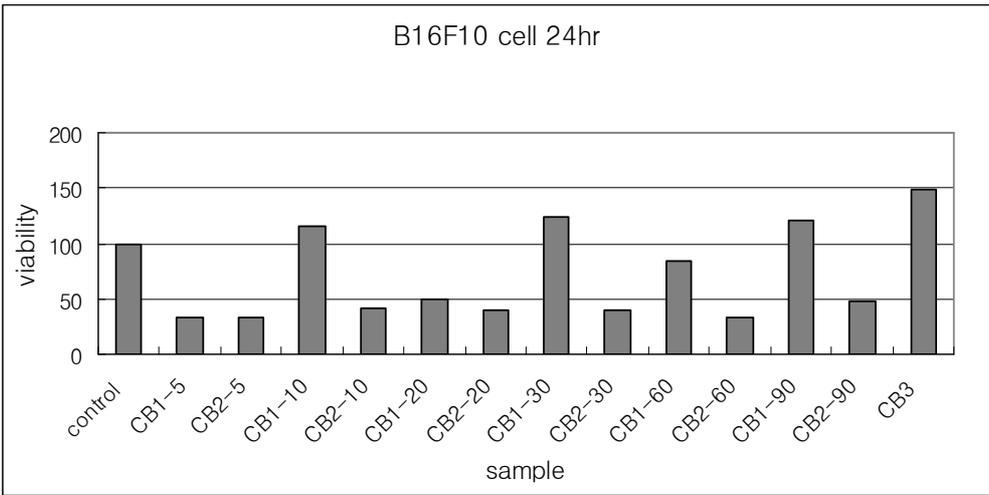


Fig. 65 노랑다발동충하초 이용한 기능성 약술의 항산화 비교 실험 (IC50 mg/ul로 표시)

바. 노랑다발동충하초 이용한 기능성 약술의 항암 실험.

MTT assay를 이용하여 암억제력을 비교하였다, Cancer cell line인. B16F10 cell을 이용하여 항암효과를 비교하였다. 결과는 Fig. 66과 같았다.



(B16F10 피부암 세포)

9. 동물실험을 위한 아토피 유발 실험
(노랑다발동충하초를 이용한 아토피 치료 실험)

가. 아토피성 피부염의 유발: 5-6주령인 NC/Nga mouse를 구입하여 1% 2,4-dinitrofluorobenzene(DNFB)으로 처리함으로써 아토피성 피부염을 유발하였다. 겨울철인 관계로 아토피성 피부염의 발현이 지연되는 경향이 있으나 현재 모든 mouse에서 피부염의 관능평가항목(홍반, 가려움증, 피부건조, 짓무름 등이 출현)이 성공적으로 발현되었다(Fig. 67).



Fig. 67. 아토피성 피부염의 발현된 모습.
좌측; 대조 mouse, 우측; 발현 mouse

나. Cytokine 및 IgE 수준 측정을 위한 혈청 채취:

시료가 아토피성 피부염에 미치는 영향을 알아보기 위한 대조치를 얻기 위해 시료를 처리하기 직전에 채혈하고 혈청을 분리하여 섭씨 -70도에 보관하였다.

다. 시료의 피부염억제효과 관찰:

현재 아토피성 피부염이 발현된 피부 부위에 제1세부과제에서 제공한 노랑다발동충하초의 ethnol 및 butanol 추출물을 도포하기 시작하였으며 5-6주 후 그 결과가 나타날 것으로 예상된다.

라. 혈청으로부터 각종 cytokine, IgE을 측정하고 피부조직으로부터 cytokine을 면역조직화학법으로 검출하기 위한 각종 시약이 준비 중에 있다.

마. 항염성을 지닌 추출분획이 결정됨에 따라 이들 분획의 아토피성 피부염 억제효과를 관찰하는 실험이 다소 지연되었으나 순조롭게 진행되었다.

10. 노랑다발동충하초를 이용한 아토피 치료 실험

가. 노랑다발 동충하초 butanol 추출분획(CBBF) 처리 후 피부염 환부의 육안적 변화
0.15% DNFB 용액을 6주간 처리하여 아토피성 피부염을 유발하고 노랑다발 동충하초 추출물을 12일간 환부에 도포하여 얻은 피부의 육안적 변화를 Figure 1과 Plate 1에 제시한다. 피부의 홍반, 출혈, 가피 등 육안적 변화를 평가한 dermatitis score가 atopy control(9.67 ± 1.45)에서 normal control(1.67 ± 0.33)에 비해 크게 증가하였으며 이러한 증가는 CBBF 처리(2.67 ± 0.33)에 의해 크게 감소하여 normal control 수준으로 회귀하였다(Fig. 68, Plate 1)(34,35).

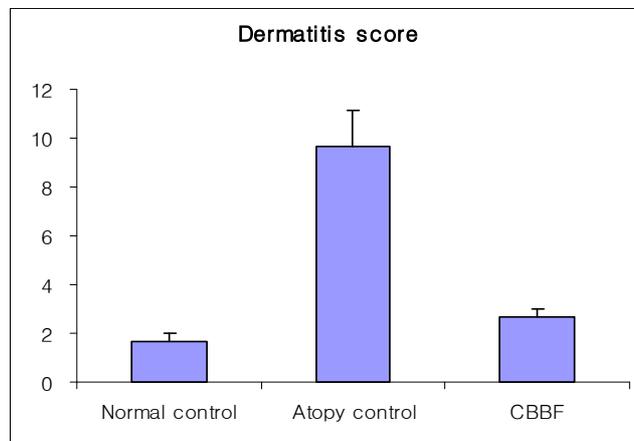


Fig. 68. Effects of CBBF on dermatitis score(mean \pm S.E.) in Nc/Nga mice. The dermatitis score, which is greatly elevated by treatment with DNFB(atopy control), is markedly reduced to the level of the normal control after treatment with CBBF(CBBF).



Plate 1. Changes of the skin lesion in response to CBBF in Nc/Nga mice. A: normal control, B: atopy control, C: CBBF.

나. 노랑다발 동충하초 butanol 추출분획(CBBF) 처리 후 피부염 환부의 조직학적 변화
 아토피성 피부염을 유발하고 노랑다발 동충하초 추출물을 12일간 환부에 도포하여 얻은 피부의 조직학적 변화를 Figure 2과 Plate 2에 제시한다. Normal control에서 외피 두께 (epidermal thickness)와 진피 두께(dermal thickness)는 각각 $56.70 \pm 2.43 \mu\text{m}$ 과 $526.88 \pm 12.08 \mu\text{m}$ 이었다. 외피와 진피 두께는 atopy control 군에서 각각 $240.21 \pm 25.86 \mu\text{m}$ 과 $808.46 \pm 9.15 \mu\text{m}$ 이어서 normal control의 해당 측정치에 비해 유의하게 증가하였으며 동충하초 추출물을 처리한 CBBF에서는 각각 $81.10 \pm 16.31 \mu\text{m}$ 과 $615.07 \pm 50.92 \mu\text{m}$ 이어서 atopy control의 해당 측정치에 비해 크게 감소하여 normal control 수준으로 회복하였다(Fig. 69, Plate 2)(36,37,38).

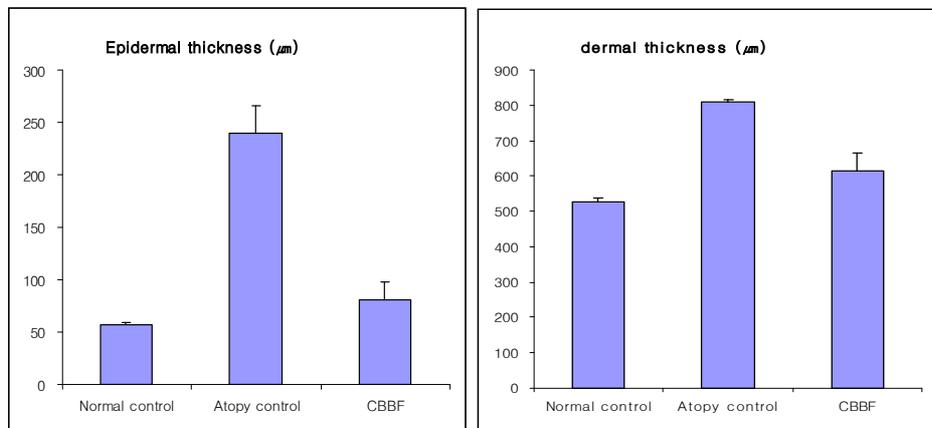


Fig. 69. Effects of CBBF on epidermal and dermal thickness in Nc/Nga mice. Thicknesses of the epidermis and dermis are greatly increased in atopy control. CBBF markedly reduced the atopy-induced increases to the level of corresponding value in the normal control.

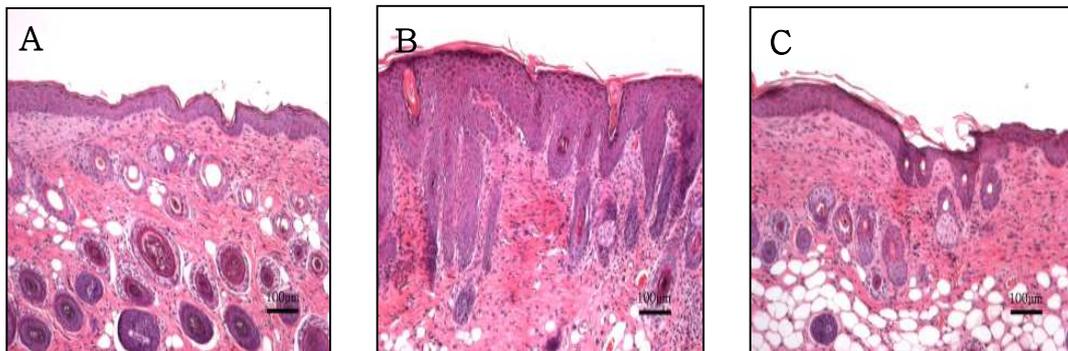


Plate 2. Histological changes of the skin lesion in response to CBBF in Nc/Nga mice. CBBF resumed atopy-induced histological changes to the normal. A: normal control, B; atopy control, C: CBBF. Original magnification $\times 100$, Scale bar = $100 \mu\text{m}$.

다. 노랑다발 동충하초 butanol 추출분획(CBBF) 처리 후 혈청 Ig E 수준의 변화

아토피성 피부염을 유발하고 노랑다발 동충하초 추출물을 12일간 환부에 도포한 다음 혈중 IgE 농도를 측정된 결과를 Figure 3에 제시한다. 혈중 IgE 농도는 normal control에서 $5,314 \pm 404$ ng/ml이었다. Atopy control에서 혈중 IgE 농도는 $29,254 \pm 2,489$ ng/ml로 normal control의 측정치에 비해 크게 증가하였으며 이러한 증가는 CBBF 투여 후 $5,629 \pm 509$ ng/ml로 감소하여 normal control과 유사한 수준을 나타내었다(Fig. 70). (39,40,41).

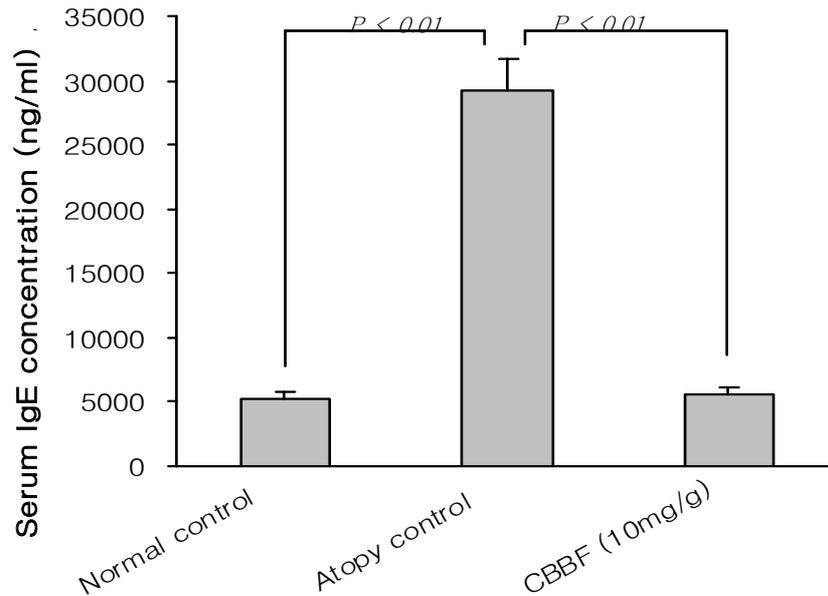


Fig. 70. Changes of the serum IgE level in NC/Nga mice. The serum concentration of IgE was determined using mouse IgE-specific ELISA kits. Each bar represents mean \pm SE of 6 mice.

라. 노랑다발 동충하초 butanol 추출분획(CBBF) 처리 후 피부염 환부의 interleukin-4 발현

아토피성 피부염을 유발하고 노랑다발 동충하초 추출물을 12일간 환부에 도포하여 얻은 환부의 interleukin(IL)-4 발현 상황을 Plate 3에 제시한다. 환부 조직을 IL-4 항체를 이용하여 면역조직화학법으로 염색한 결과 atopy control의 진피에서 IL-4 발현이 normal control에 비해 증가하였으며 이러한 증가는 동충하초 추출물을 처리한 후 감소하였다 (Plate 3).

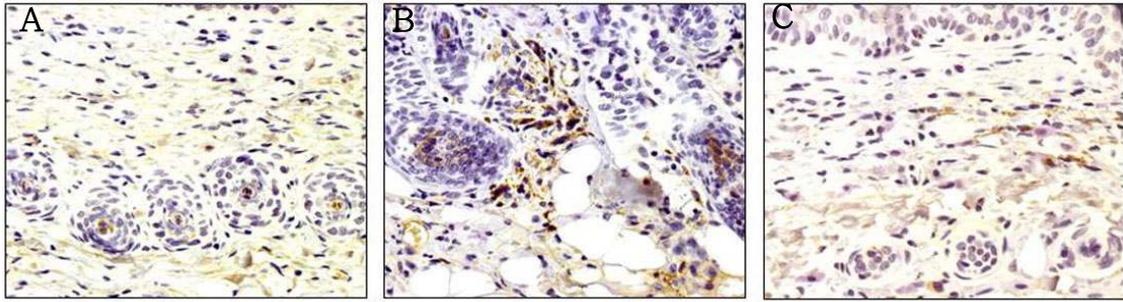


Plate 3. Immunohistochemical staining the skin lesion for interleukin-4 in Nc/Nga mice. A: normal control, B: atopy control, C: CBBF. Original magnification $\times 400$.

마. 노랑다발 동충하초 butanol 추출분획(CBBF) 처리 후 피부염 환부의 interferon-gamma 발현

아토피성 피부염을 유발하고 노랑다발 동충하초 추출물을 12일간 환부에 도포하여 얻은 피부의 interferon-gamma 발현 상황을 Plate 4에 제시한다. 마우스 피부 조직을 interferon-gamma 항체를 이용하여 면역조직화학법으로 염색한 결과 atopy control의 진피에서 interferon-gamma 발현이 normal control에 비해 증가하였으며 이러한 증가는 동충하초 추출물을 처리한 후 감소하였다(Plate 4)(36,38,41).

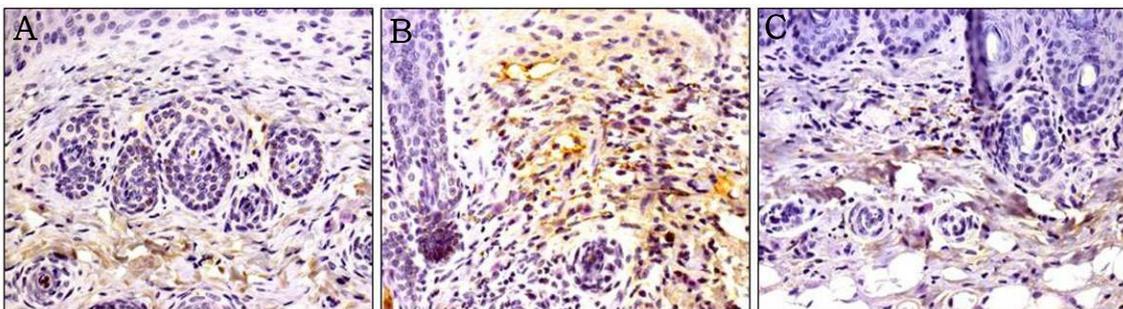


Plate 4. Immunohistochemical staining of the skin lesion for interferon-gamma in Nc/Nga mice. A: normal control, B: atopy control, C: CBBF. Original magnification $\times 400$.

4 장 연구개발 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연도별 연구목표 달성도

구분	연도	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위	연구범위	달성도 (%)
1차년도	2006	○ 유전자원 수집·분리 동정	- 우수균주의 채집과 분리 및 채집된 동충하초의 형태적 특징조사와 분류 동정	○ 동충하초의 유전자원 수집과 분리 동정	100%
		○ 생리실험과 자실체 형성	- 적정배지와 환경조건 구명과 노랑다발동충하초의 mating type에 의한 우수균주 선발	○ 분리·동정된 노랑다발동충하초의 생리실험과 자실체 형성	100%
		○ 자실체 대량생산	- 선발된 mating type를 이용한 자실체 형성용 배지 선발 및 형성용 배지를 이용한 대량 형성 조건의 확립	○ Mating type 균주를 이용한 노랑다발동충하초 자실체의 대량생산	100%
		○ 시료의 추출 및 분획	- 시료의 과쇄 및 용매에 의한 추출 - methanol, hexane, ethyl acetate, water에 의한 분획물 제조	○ 노랑다발동충하초 자실체의 시료의 추출 및 분획	100%
		○ 기초생리활성 탐색	- 기초 생리활성과 정제분리법의 확립 및 생리활성 물질의 추적	○ 노랑다발동충하초 자실체의 기초생리활성 탐색	100%
		○ 노랑다발동충하초 자실체의 항염 특성연구	- 유효항염성분의 추적과 항염성분의 염증억제기작 확립	○ 노랑다발동충하초 자실체의 항염 특성연구	100%
		○ 동물실험(아토피성 피부염)	- 면역학적 조직학적인 방법으로 억제효과 및 그 기전의 규명	○ 노랑다발동충하초 자실체 및 Cordycepin의 아토피성 피부염에 미치는 영향	100%
2차년도	2007	○ 자실체의 안정적인 대량생산 연구	- 선발된 mating type를 이용한 자실체 형성용 배지 선발 및 형성용 배지를 이용한 대량 형성 조건의 확립	○ 우수 균주의 선발 ○ Mating type에 의한 우수 균주를 이용한 노랑다발동충하초 자실체의 대량생산	100%
		○ 유효물질의 탐색 및 이용성 연구	- 정제분리 (methanol, hexane, ethyl acetate, water)에 의한 분획물 제조 - 시료의 과쇄 및 용매에 의한 추출	○ 노랑다발동충하초 자실체의 유효물질의 정제 분리 및 이용성 연구	100%
		○ 동충하초 균주간의 생리활성 차이 및 비교실험	○ 노랑다발동충하초 자실체의 균주간의 생리활성 ○ 노랑다발동충하초 자실체의 시료의 추출 및 분획	○ 노랑다발동충하초 균주간의 생리활성 ○ 노랑다발동충하초 자실체의 생리활성 탐색	100%
		○ 노랑다발동충하초 자실체의 생리활성연구	○ 노랑다발동충하초 자실체의 생리활성 탐색	○ Cordycepin의 암세포 억제 기작 연구 ○ 신 기능성 식품의 기초 약리 생리활성	100%
		○ 동물실험(아토피성 피부염) 동물실험을 통한 약리효과	- 면역학적 조직학적인 방법으로 억제효과 및 그 기전의 규명	○ 노랑다발동충하초 자실체의 아토피성 피부염에 미치는 면역학적 영향	100%
3차년도	2008	○ 노랑다발동충하초 자실체의 대량생산	○ 인공재배법 확립 ○ 안정적인 대량생산	○ Mating type에 의한 우수 균주를 이용한 노랑다발동충하초 자실체의 대량생산	100%
		○ 노랑다발동충하초 자실체의 항암특성	○ 노랑다발동충하초의 항암 특성 연구	○ 노랑다발동충하초의 항암 기작 규명	100%
		○ 동충하초 균주간의 생리활성 차이 및 비교실험	○ 노랑다발동충하초 자실체의 균주간의 생리활성 ○ 노랑다발동충하초 자실체의 시료의 추출 및 분획	○ 노랑다발동충하초 균주간의 생리활성 ○ 노랑다발동충하초 자실체의 생리활성 탐색	100%
		○ 노랑다발동충하초 유효물질을 함유한 제품연구	○ 노랑다발동충하초 유효물질을 이용한 신기능성 제품 연구	○ 노랑다발동충하초의 암세포 억제 기작 연구 ○ 신 기능성 식품의 생리활성	100%
		○ 노랑다발동충하초 추출물을 이용한 아토피성 피부염 개선 방법확립을 위한 동물실험 및 제품개발	○ 노랑다발동충하초를 이용한 아토피성 피부염 개선방법 확립 ○ 동물실험 및 제품개발	○ 노랑다발동충하초 자실체의 아토피성 피부염 억제 효과	100%

제 2절 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도

구분	연도	세부연구개발 목표	가중치		평가의 착안점 및 기준	
					평가의 착안점	평가기준(%)
1차 년도	2006	노랑다발동충하초의 유전자원의 확보 및 기초배양 실험	20	%	○ 우수균주의 채집과 분리 방법으로 유전자원 확보.	45%
			15	%	○ 균주의 형태학적 특징으로 동정	
			10	%	○ 균사의 생리시험으로 적정 배지선발	
		노랑다발동충하초의 기초생리활성 실험	15	%	○ 노랑다발동충하초의 시료의 추출 및 분획	40%
			10	%	○ 노랑다발동충하초의 기초생리 활성 탐색	
			15	%	○ 노랑다발동충하초의 항염효과	
동물실험(in vivo)	15	%	○ 노랑다발동충하초 및 cordycepin이 아토피성 피부염에 미치는 영향	15%		
	100	%		100%		
2차 년도	2007	자실체의 안정적이 대량생산 연구	15	%	○ 우수 균주의 선발	30%
			15	%	○ Mating type에 의한 우수균주 선발	
		유효물질의 탐색 및 이용성 연구	20	%	○ 노랑다발동충하초 자실체의 유효물질의 정제 분리 및 이용성 연구	20%
		노랑다발동충하초 자실체의 생리활성연구	10	%	○ Cordycepin의 암세포 억제 기작 연구	30%
			20	%	○ 신 기능성 식품의 기초 약리 생리활성	
		동물실험을 통한 약리효과	20	%	○ 노랑다발동충하초 자실체와 cordycepin이 아토피성 피부염 및 류마치스 관절염에 미치는 영향	20%
	100	%		100%		
3차 년도	2008	노랑다발동충하초의 자실체의 대량생산	20	%	○ 인공재배법 확립	35%
			15	%	○ 안정적인 대량생산	
		노랑다발동충하초의 항암특성	15	%	○ 노랑다발동충하초의 항암 기작	15%
		동충하초 균주간의 생리활성 차이 및 비교실험	5	%	○ 노랑다발동충하초 균주간의 항염, 항암 효과 비교실험	5%
		노랑다발동충하초 유효물질을 함유한 제품연구	10	%	○ 노랑다발동충하초 유효물질을 이용한 신기능성 제품 연구	10%
		노랑다발동충하초 추출물을 이용한 아토피성 피부염 개선방법 확립을 위한 동물실험 및 제품개발	20	%	○ 노랑다발동충하초의 급성독성실험	35%
15	%	○ 노랑다발동충하초를 이용한 아토피성 피부염 개선방법 확립 ○ 동물실험 및 제품개발				
	100	%		100%		
최종 평가	2006 ~ 2008	노랑다발동충하초의 균주 확보 및 자실체 대량생산	15	%	○ 노랑다발동충하초의 우수균주의 선발 및 확보	30%
			15	%	○ 노랑다발동충하초 자실체의 인공재배법 확립	
		노랑다발동충하초 자실체의 생리활성 연구	10	%	○ 노랑다발동충하초 자실체의 항염, 항동맥 효과	20%
			10	%	○ Cordycepin의 암세포 억제기작 연구	
		노랑다발동충하초 추출물을 이용한 아토피성 피부염 개선방법 확립을 위한 동물실험 및 제품개발	10	%	○ 노랑다발동충하초를 이용한 아토피성 피부염 개선방법 확립 ○ 동물실험 및 제품개발	20%
		동충하초의 이용성 연구	15	%	○ 노랑다발동충하초 유효물질을 이용한 신기능성 제품 연구	30%
			15	%	○ Cordycepin의 항암제품화 이용연구	
			100	%		100%

1. 1차년도 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
○ 우수균주의 채집과 분리 방법으로 유전자원 확보.	○우수한 균주를 확보는 되었으나, 확보된 균주를 장기간 보관시 활력 감소를 위한 새로운 연구 필요하다.
○ 균주의 형태학적 특징으로 동정	○현미경으로 포자 및 균사를 관찰하여 분류동정에 어려움이 없었다.
○ 균사의 생리시험으로 적정 배지선발	○일반적인 영양원이 아닌 완전 자실체 형성에 필수적인 미량 원소 영양원 선발하였다.
○ 노랑다발동충하초의 시료의 추출 및 분획	○노랑다발동충하초를 초미분하여 에탄올 추출을 한 후에 극성에 따라서 분획을 하여 CBHF, CBBF, CBEAF 그리고 CBWF를 제조하였다.
○ 노랑다발동충하초의 기초생리 활성 탐색	○노랑다발동충하초 추출물과 분획물을 이용하여 항산화 효과를 DPPH법을 통해서 확인한 결과 핵산 분획물이 가장 효과가 좋음을 알 수가 있었다. ○노랑다발동충하초의 핵산 분획물이 동맥경화의 원인이 LDL의 산화를 억제하는지를 agarose gel과 TBARS법을 통해서 실험한 결과 LDL 산화 억제 효과가 있음을 알 수가 있었다.
○ 노랑다발동충하초의 항염효과	○노랑다발동충하초 에탄올 추출물을 이용하여 LPS로 유도되는 대식세포에서의 NO, iNOS 그리고 COX-2의 생성 억제 능력을 본 결과 염증 유발 인자 및 단백질의 발현이 억제됨을 알 수가 있었다. ○분획물들의 항염증 효과는 CBHF, CBBF, CBEAF에서 효과가 있었으며, 이중 CBHF를 이용하여 항염 신호 기작에 대해서 실험한 결과 ROS를 통한 NFkB pathway와 JNK pathway를 통해서 iNOS 단백질 및 NO의 생성이 억제됨을 알 수가 있었다. ○특허출원번호: 10-2009-19407
○ 노랑다발동충하초 및 cordycepin이 아토피성 피부염에 미치는 영향	○ 제 아토피성 피부염이 발현된 피부 부위에 제1세부과제에서 제공한 노랑다발동충하초의 ethnol 및 butanol 추출물을 도포하기 시작하여 면역학적 방법으로 cytokine을 측정하였다.

2. 2차년도 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
○ 자실체의 안정적인 대량 생산 연구	<p>○ 10개의 균주를 서로 mating 시켜 나온 결과로부터 단포자에서 자실체가 형성된 것 2개와 조합에서 자실체가 형성된 것 4개를 선발하여 총 12개의 자실체로부터 각각 5~10개의 단포자를 분리하였고, 다시 mating을 하였다.</p> <p>○ 그 결과 a 타입과 b 타입으로 확실히 구분 되었고, 노랑다발 동충하초(<i>Cordyceps bassiana</i>)는 기존의 예상과는 달리 heterothalism임을 증명하여 2차년도의 계획을 달성하였다..</p>
○ 유효물질의 탐색 및 이용성 연구	<p>○ 시료의 파쇄 및 용매에 의한 추출</p> <p>○ 정제분리 (methanol,에 의한 추추 및 Buthanol에 의한 분획물 제조 (CBBF라 명명: 동물실험에 사용함)</p>
○ 동충하초 균주간의 생리활성 차이 및 비교실험	<p>○ 노랑다발동충하초 자실체의 균주간의 생리활성</p> <p>○ EFCC 12511 6×9와 8×9의 확실한 mating type 규명을 위해 EFCC 12511 6×9와 8×9의 상태가 양호한 균주를 각각 10개 선발을 하여 균주간의 우수균주를 확인하였다.</p> <p>○ 노랑다발동충하초 자실체의 시료의 추출 및 분획</p>
○ 노랑다발동충하초 자실체의 생리활성연구	<p>○ 결론으로, cordycepin의 항암기작은 Fig. 7과 같은 신호 전달과정을 통하여 항암효과가 있음을 알수 있었다.</p> <p>○ 노랑다발동충하초로 제조된 기능성 술의 사진을 첨부하였으며, 3차년도에 생리활성을 계속하여, 결과를 얻음.</p>
○동물실험(아토피성 피부염) 동물실험을 통한 약리효과	<p>○ 노랑다발 동충하초 butanol 추출분획(CBBF) 처리 후 피부염 환부의 육안적 변화 :</p> <p>○ CBBF 처리 후 피부염 환부의 조직학적 변화:</p> <p>○ CBBF 처리 후 혈청 Ig E 수준의 변화:</p> <p>○ CBBF) 처리 후 피부염 환부의 interleukin-4 발현</p> <p>○ CBBF) 처리 후 피부염 환부의 interferon-gamma 발현을 확인 하였으며,</p> <p>○ 3차년도에는 치료용 제약(연고)를 제조할 계획.</p>

3. 3차년도 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
○ 노랑다발동충하초 자실체의 대량생산	<ul style="list-style-type: none"> ○ 노랑다발동충하초(<i>Cordyceps bassiana</i>)의 교배형 조사: ○ 균주 선발과 단포자 분리 및 mating 실험: ○ 다포자 균주의 계대배양에 따른 인공자실체 형성실험: ○ 대립교배형 균주의 mating을 통한 계대배양에 따른 인공자실체 형성: ○ 액체중균의 소량배양과 대량배양으로부터 형성된 인공자실체의 활력 비교 ○ 인공재배에서 적정 수확시기 조사:
○ 노랑다발 동충하초 자실체의 항암특성	<ul style="list-style-type: none"> ○ MTT assay를 통한 PC-3와 Du145 세포의 사멸(apoptosis)확인. ○ Clonogeny assay를 통한 Du-145세포의 사멸을 확인. ○ CBBF와 세포사멸과의 관계 규명함. ○ Bcl-2와 Bax protein에 대한 CBBF의 효과 확인.
○ 동충하초 균주간의 생리활성 차이 및 비교실험	<ul style="list-style-type: none"> ○ 1784, 1795, 5657, 9044, 15746의 5종의 노랑다발동충하초 균주를 비교. ○ 5종의 노랑다발동충하초 균주의 항산화 비교 ○ 5종의 노랑다발동충하초 균주의 항암 비교 ○ HeLa, A549, B16F10, DU145를 사용하여 비교함.
○ 노랑다발동충하초유효물질을 함유한 제품연구	<ul style="list-style-type: none"> ○ 노랑다발동충하초 약술의 관능검사. ○ “맛”, “향”, “색”의 관능검사 비교. ○ 노랑다발동충하초 이용한 기능성 약술의 항산화 비교 ○ 노랑다발동충하초 이용한 기능성 약술의 항암 비교.
○ 노랑다발동충하초 추출물을 이용한 아토피성 피부염 개선방법확립을 위한 동물실험 및 제품개발	<p>노랑다발 동충하초 butanol 추출분획(CBBF) 처리 후 아토피 치료 효과.:</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ CBBF 처리 후 피부염 환부의 조직학적 변화: ○ CBBF 처리 후 혈청 Ig E 수준의 변화: ○ CBBF) 처리 후 피부염 환부의 interleukin-4 발현 ○ CBBF) 처리 후 피부염 환부의 interferon-gamma 발현을 확인 하였으며, ● 치료용 제약(연고)를 제조하였습. ● 노랑다발 동충하초를 이용한 아토피 치료제 제조 특허를 출원함.(특허출원:10-2008-0065756)

제 3절 관련분야의 기술발전예의 기여도

1. 본연구를 통한 기술발전예의 기여도

- 가. 노랑다발동충하초의 활용도 증진을 위한 균주자원의 종 다양성 및 우수 유전자원의 확보 및 보존을 가능하게 하였습.
- 나. 노랑다발동충하초 자실체의 대량생산법 확립하여 사용이 가능하게 함.
- 다. 노랑다발동충하초 자실체의 생리활성연구로서 항염특성을 규명하였습.
- 라. 노랑다발동충하초 자실체의 항암기작을 규명함.
- 마. 노랑다발동충하초 유효물질을 함유한 제품연구으로 기능성 술을 제조하였다.
- 바. 노랑다발동충하초 추출물을 이용한 아토피성 피부염 개선방법 확립을 위한 동물실험 및 제품개발에 의해 특허를 획득하였습.
- 사. cordycepin의 항암기작을 규명하여, 새로운 제약으로의 사용을 가능하게 하였다.

2. 기술적인 측면에서의 기여도

- 가. 동충하초가 학문적 산업적 가치가 높아짐에 따라 이들의 버섯을 구하려는 수요가 증가하고 또한 버섯을 재배하려는 농가가 점점 늘어나고 있다. 그러나 동충하초 속균에 관한 분류체계가 명확하게 세워져 있지 않고 이들에 대한 연구가 미흡하기 때문에 자칫 이들의 실용화에 있어 장애요인으로 작용하거나 커다란 논란을 불러일으킬 여지가 있다. 그러므로 본 연구 결과를 통해 동충하초속균의 분류체계가 세워짐에 따라 각각의 동충하초 종들의 형태학적 및 유전적인 특성이 확립될 수 있어 이러한 **형태적 분류에 분자생물학적 분류를 보완함으로써 정확한 분류동정 체계를 정립**할 수 있다.
- 나. 동충하초는 옛날부터 귀중한 한약재로써 면역력 증강, 염증억제 및 체력 증강, 결핵, 황달, 마약중독 해독제와 항암효과 등이 있으며, 버섯중에서 가장 광범위한 효과를 가지고 있는 버섯중의 하나로 **국내 동충하초 유전자원의 우수성을 밝히고, 나아가 유전자원을 개발하여 버섯산업의 발전을 도모하게 되어 산업화 시킬 수 있다.**
- 다. 동충하초는 균주에 따라 암, 뇌졸중, 심장병과 같은 성인병에 대한 예방 및 개선효과

가 최근 발견되면서 동충하초의 신약개발을 위한 생리활성 연구분야, 화장품 원료제품, 건강보조식품을 위한 생물배양 및 물질 추출, 분리, 정제과정 등에 **동충하초균이 이용**되고 있으므로 새로운 노랑다발동충하초를 개발하므로 소재를 다양화시킬 수 있다.

라. 노랑다발동충하초를 이용하여 연구하므로 **새로운 기능성 제품 및 국제 경쟁력이 있는 천연자원의 개발**을 기대할 수 있어 지역산업의 발전은 물론 국제경쟁력도 가질 수 있다.

마. 노랑다발동충하초 자실체를 대량생산하는 연구 결과 기술을 이용하여, **농가소득향상**을 위해 직접 **활용될 수 있는 신기술**의 개발을 기대할 수 있다.

3. 경제산업적 측면에서의 기여도

가. 지금까지 알려진 동충하초의 중요성은 임상적으로 유용한 생리활성과 해충의 방제를 위한 개발응용이다. 동충하초의 임상적인 활성으로 면역기능 강화에 의한 질병예방과 치료 촉진효과, 항암효과, 해독작용이 잘 알려져 있다.

나. 또한 동충하초는 자연 생태계에서 곤충 개체군의 밀도 조절자로 작용하여 농작물에 피해를 주는 해충방제를 위한 천연 생물 농약 개발로 중요하다.

다. 채집된 동충하초와 노랑다발동충하초를 이용하여 **자실체의 대량생산 방법의 개발로 동충하초의 저변확대**를 늘릴 수가 있다.

라. 동충하초속균의 새로운 재배법의 창출로, 대량생산된 동충하초를 이용한 생리활성 물질의 규명을 목적으로 하며 상기 연구가 성공 될 경우 강원도의 동충하초속균의 대량 생산화 연구에 의해 **기업에서의 대량 생산화를 기대**할 수 있다.

마. 이와 같은 결과로서 수반되는 부가 가치를 높일 수 있고, **지역 농가 소득 증대 활성화** 및 제품 기업화에 의해 **생산성 증대에 의한 고용 창출을 유도**한다.

바. 국내의 재배농작물 중에서 버섯은 어떤 작물보다도 고수익성 소득작물이다. 느타리 재배를 예로 들면, **벼농사의 2.1배, 시설고추 재배의 1.7배, 포도재배의 3.2배 및 장미재배의 1.1배에 달하는 수익성이 있다.**

사. 양적으로 극히 제한된 자원인 동충하초의 이러한 산업적 실용화는 대량 인공배양과 유용 유전자 활용에 의한 유용물질 대량 생산이 필수적이다. 따라서 본 연구과제는 **동충하초(노랑다발) 자실체 대량 인공배양 및 생리활성을 중심으로 이용성을 개발**하는 경제, 산업적 목적과 궁극적 목표에 기대효과를 가지고 있다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구 개발 성과

1. 1차년도 연구개발 성과 및 달성도

목 표	연구개발 수행내용	달성도(%)
○노랑다발동충하초 자실체의 시료추출 및 분획	노랑다발동충하초의 자실체를 이용하여 에탄올 추출물을 제조하였으며, 극성에 따라서 CBHF, CBBF, CBEAF, CBWF를 제조하였다.	100%
○노랑다발동충하초 자실체의 기초생리활성탐색	노랑다발동충하초 추출물과 분획물을 이용하여 DPPH를 통한 항산화 효과를 보았으며, Human LDL의 산화 억제 효과를 측정하였다. 또한 항염증 효과를 확인하였다.	100%
○노랑다발동충하초 자실체의 항염 특성 연구	분획물 중, CBHF를 가지고 LPS로 유도되는 대식세포에서의 항염 신호 기작은 ROS의 저해를 통한 I κ B-NF κ B pathway의 억제 뿐만 아니라 JNK의 인산화를 억제함으로써 항염 효과가 있다는 세포 신호기작을 밝혔다. 더 나아가 CBBF의 항염 신호 기작에 대해서도 진행되고 있다.	100%
○ 노랑다발동충하초의 수집과 분리·동정	수집된 동충하초의 균사 및 포자 관찰을 통하여 분류 동정을 실시함	100%
○ 노랑다발동충하초 자실체를 이용한 생리시험과 자실체형성	여러 배지에 배양하여 동충하초의 생리적인 특징과 최적 영양원을 찾으며, 특히 자실체를 잘 형성시키는 형성 배지 연구 개발	100%
○ Mating type 균주를 이용한 노랑다발동충하초 자실체의 대량생산	각각의 mating type 균주를 분리, 균일한 자실체 형성을 위한 연구 수행.	100%
○ 노랑다발동충하초 자실체의 아토피성 피부염에 미치는 영향	5-6주령인 NC/Nga mouse를 구입하여 1% 2,4-dinitrofluorobenzene(DNFB)으로 처리함으로써 아토피성 피부염을 유발시켰으며, 노랑다발동충하초 에탄올 추출물과 부탄올 분획물을 처리하여 진행.	50%
○ Cordycepin이 아토피성 피부염에 미치는 영향	5-6주령인 NC/Nga mouse를 구입하여 1% 2,4-dinitrofluorobenzene(DNFB)으로 처리함으로써 아토피성 피부염을 유발시켰으며, cordycepin을 처리하여 진행.	30%

2. 2차년도 연구개발 성과 및 달성도

목 표	연구개발 수행내용	달성도(%)
○ 자실체의 안정적인 대량 생산 연구	각각의 mating type 균주를 분리, 균일한 자실체 형성을 위한 연구 수행	100%
○ 유효물질의 탐색 및 이용성 연구	○ 노랑다발동충하초 자실체의 유효물질의 정제 분리 및 이용성 연구	100%
○ 동충하초 균주간의 생리활성 차이 및 비교실험	○ 노랑다발동충하초 균주간의 생리활성 ○ 노랑다발동충하초 자실체의 생리활성 탐색	100%
○ 노랑다발동충하초 자실체의 생리활성 연구	○ Cordycepin의 암세포 억제 기작 연구	100%
○ 동물실험(아토피성 피부염) 동물실험을 통한 약리효과	○ 노랑다발동충하초 자실체의 아토피성 피부염에 미치는 영향	100%

3. 3차년도 연구개발 성과 및 달성도

목 표	연구개발 수행내용	달성도(%)
○ 노랑다발동충하초자실체의 대량 생산 연구	○ 인공재배법 확립 ○ 안정적인 대량생산	100%
○ 노랑다발동충하초 자실체의 항암특성	○ 노랑다발동충하초의 항암 특성 연구	100%
○ 동충하초 균주간의 생리활성 차이 및 비교실험	○ 노랑다발동충하초 자실체의 균주간의 생리활성 ○ 노랑다발동충하초 자실체의 시료의 추출 및 분획	100%
○ 노랑다발동충하초 유효물질을 함유한 제품연구	○ 노랑다발동충하초 유효물질을 이용한 신기능성 제품 연구	100%
○ 노랑다발동충하초 추출물을 이용한 아토피성 피부염 개선 방법확립을 위한 동물실험 및 제품개발	○ 노랑다발동충하초를 이용한 아토피성 피부염 개선방법 확립 ○ 동물실험 및 제품개발	100%

제 2 절. 대학관점

1. 동충하초가 학문적 산업적 가치가 높아짐에 따라 이들의 버섯을 구하려는 수요가 증가하고 또한 버섯을 재배하려는 농가가 점점 늘어나고 있다. 그러나 동충하초속균에 관한 분류체계가 명확하게 세워져 있지 않고 이들에 대한 연구가 미흡하기 때문에 자칫 이들의 실용화에 있어 장애요인으로 작용하거나 커다란 논란을 불러일으킬 여지가 있다. 그러므로 본 연구 결과를 통해 학문적인 차원에서 동충하초속균의 분류체계가 세워짐에 따라 각각의 동충하초 종들의 형태학적 및 유전적인 특성이 확립될 수 있다.
2. 기대효과로는 동충하초균은 서로 형태적 특징이 매우 유사하여 형태분류상에서 오류와 논란이 있을 수 있는 요인들이 존재한다. 따라서 이러한 형태적 분류에 분자생물학적 분류를 보완함으로써 정확한 분류동정 체계를 정립하여 **학문적인 체계성을 이룩**할 수 있다.
3. 따라서, 동충하초는 옛날부터 귀중한 한약재로써 면역력 증강, 염증억제 및 체력 증강, 결핵, 황달, 마약중독 해독제와 항암효과 등이 알려져 있으며, 버섯중에서 가장 광범위한 효과를 가지고 있는 버섯중의 하나로 **국내 동충하초** 유전자원의 우수성을 밝히고, 나아가 유전자원을 개발하여 **버섯산업의 발전을 도모**하게 된다.
4. 현재, 동충하초는 균주에 따라 암, 뇌졸중, 심장병과 같은 성인병에 대한 예방 및 개선효과가 최근 발견되면서 동충하초의 신약개발을 위한 생리활성 연구분야, 화장품 원료제품, 건강보조제품을 위한 생물배양 및 물질 추출, 분리, 정제 공정 등에 **동충하초균이 이용**되고 있어, 여러 용도의 이용성을 개발이 필요하다.
5. 본 연구를 통해서, 노랑다발동충하초를 이용하여, **새로운 균주의 확보 및 식약청 허가를 통한 국제 경쟁력이 있는 천연자원의 이용성 개발**을 기대할 수 있어 지역산업의 발전에 기여하게 된다.

제 3 절 지역산업연계 관점:

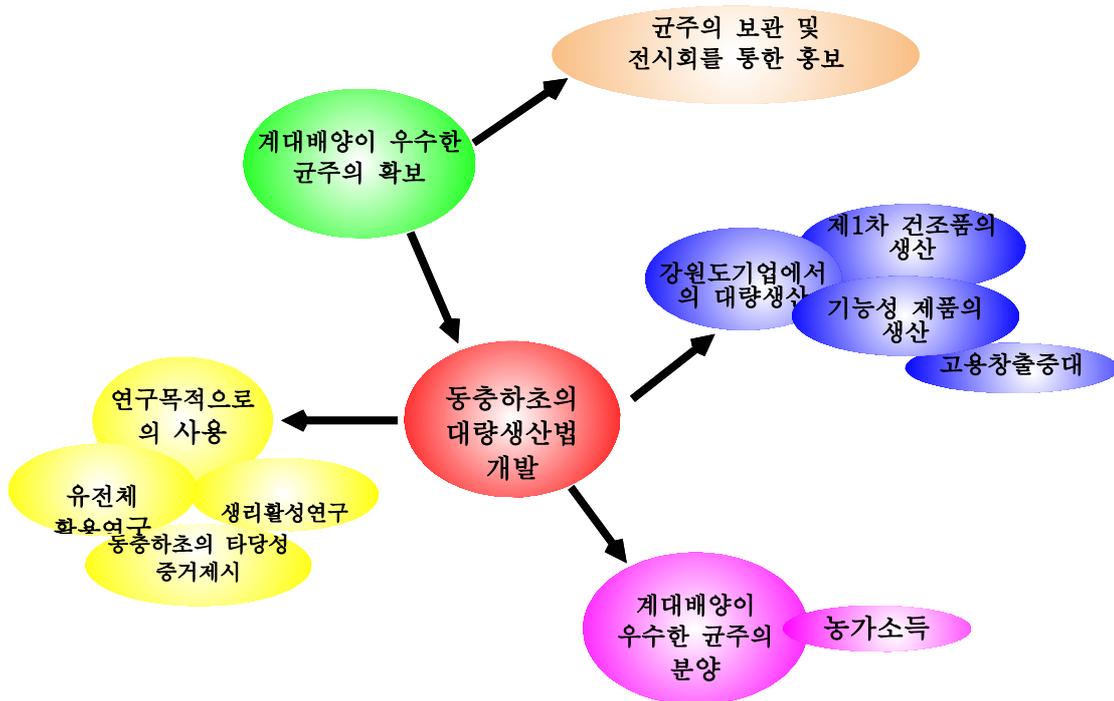
1. 지역사회 입장에서는, 학문을 중심으로 하며, 장래의 교육 및 현장 종사자를 키우는 대학과 산학 연구를 하므로, 특히, 강원대학교, 한림대학교와 기업(주)머쉬텍 간의 산학 연구에 의해, 기업의 활성화, 지역사회의 활성화를 도모할 수 있으며, 훈련된 대학생들의 취업에 의한 지역사회의 기여 가능성이 크며, 이로 인한 지역사회와 대학 간의 공조활성은 매우 바람직하다.
2. 국내에 존재하는 노랑다발동충하초의 대량 생산화 연구에 의해, 기업에서 **대량 생산화**를 기대할 수 있으며,
3. 이에 의해 동충하초균 속의 새로운 **재배법의 창출**을 기대할 수 있어 **벼섯농가**에 직접 활용할 수 있는 기술을 개발하여 소득향상을 기대할 수가 있다.
4. 천연 자원인 노랑다발동충하초에서 유효성분을 추출 정제하여 생리활성 물질을 규명함으로써, 한국인의 특성 및 체질에 맞는 **기능성 응용 제품**을 기업에서 생산할 수 있다.
5. 이와 같은 결과로서 수반되는 **부가가치율의 증대**를 보면, 지역 농가 소득 증대 **활성** 및 **제품 기업화**에 의해 **생산성 증대**에 의한 강원도 내의 **고용 창출**을 유도할 수 있다.
6. 국내의 천연자원을 이용한 **개발 및 유통으로 관련 산업 발전 유도** 및 **경쟁력**이 있는 **국산제품 개발**에 의하여, **지역산업의 육성**에 의해, **국내의 외화를 절약**할 수 있다.

제 4 절 기업관점

1. 채집된 노랑다발동충하초를 이용하여 **자실체의 대량생산 방법의 개발**로 **동충하초의 저변확대**를 늘릴 수가 있다.
2. 동충하초속균의 새로운 재배법의 창출로, 대량생산된 동충하초를 이용한 생리활성 물질의 규명을 목적으로 하며 상기 연구가 성공 될 경우, 동충하초속균의 대량 생산화 연구에 의해 **기업에서의 대량 생산화**를 기대할 수 있다.
3. 이와 같은 결과로서 수반되는 부가 가치를 높일 수 있고, **지역 농가 소득 증대** **활성** 및 **제품 기업화**에 의해 **생산성 증대**에 의한 **고용 창출**을 유도할 수 있다.
4. 국내의 재배농작물 중에서 벼섯은 어떤 작물보다도 고수익성 소득작물이다. 느타리 재배를 예로 들면, **벼농사의 2.1배, 시설고추 재배의 1.7배, 포도재배의 3.2배 및 장미재배의 1.1배에 달하는 수익성을 보이고 있다.**
5. 양적으로 극히 제한된 자원인 동충하초의 이러한 산업적 실용화는 대량 인공배양과 유용 유전자 활용에 의한 유용물질 대량 생산이 필수적이다. 따라서 본

연구과제는 노랑다발동충하초의 대량 인공배양 및 약리생리활성의 검증을 통해 천연물의 이용성을 개발하여 경제, 산업적 궁극적 목표와 기대효과를 가지고 수행된다.

동충하초의 이용성의 모식도



제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절 학술적인 면(논문)

1. 동충하초 및 생리활성에 관련된 문헌:

1. Bai, S.K., Lee, S.J., Na, H.J., Ha, K.S., Han, J.A., Lee, H.S., Kwon, Y.G., Chung, C.K., Kim, Y.M., 2005. β -Carotene inhibits inflammatory gene expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages by suppressing redox-based NF- κ B activation. *Experimental and Molecular Medicine* 37, 23-334.
2. Berenbaum, F., 2000. Proinflammatory cytokines, prostaglandins, and the chondrocyte: mechanisms of intracellular activation. *Joint Bone Spine* 67, 561-564.
3. Chen, C.C., Wang, J.K., 1999. p38 but not p44/42 mitogen-activated protein kinase is required for nitric oxide synthase induction mediated by lipopolysaccharide in RAW 264.7 macrophages. *Molecular Pharmacology* 55, 481-488.
4. Chen, T.H., Kao, Y.C., Chen, B.C., Chen, C.H., Chan, P., Lee, H.M., 2006. Dipyridamole activation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 mediates inhibition of lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in RAW 264.7 cells. *European Journal of Pharmacology* 541, 138-146.
5. Coker, R.K., Laurent, G.J., 1998. Pulmonary fibrosis: cytokines in the balance. *European Respiratory Journal* 11, 1218-1221.
6. D'Acquisto, F., May, M.J., Ghosh, S., 2002. Inhibition of nuclear factor kappa B (NF- κ B): an emerging theme in anti-inflammatory therapies. *Molecular Interventions* 2, 22-35.
7. Di Rosa, M., Lalenti, A., Ianaro, A., Sautenbin, I., 1996. Interaction between nitric oxide and cyclooxygenase pathway. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 54, 229-238.
8. Forman, H.J., Torres, M., 2001. Redox signaling in macrophages. *Molecular Aspects of Medicine* 22, 189-216.
9. Fujiwara, N., Kobayashi, K., 2005. Macrophages in inflammation. *Current Drug Targets, Inflammation and Allergy* 4, 281-286.
10. Green, I.C., Wagner, D.A., Glowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.B., 1982. Analysis of nitrate, nitrite and [^{15}N] nitrate in

biological fluids. *Analytical Biochemistry* 126, 131–138.

11. Ginn-Pease, M.E., Whisler, R.L., 1998. Redox signals and NF- κ B activation in T cells. *Free Radical Biology and Medicine* 25, 346–361.
12. Han, S.B., Lee, C.W., Jeon, Y.J., Hong, N.D., Yoo, I.D., Yang, K.H., Kim, H.M., 1999. The inhibitory effect of polysaccharides from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis. *Immunopharmacology* 41, 157–164.
13. Han, Y.J., Kwon, Y.G., Chung, H.T., Lee, S.K., Simmons, R.L., Billiar, T.R., Kim, Y.M., 2001. Antioxidant enzymes suppress nitric oxide production through the inhibition of NF- κ B activation: role of H₂O₂ and nitric oxide in inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 5, 504–513.
14. Herlaar, E., Brown, Z., 1999. p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease. *Molecular Medicine Today* 10, 439–447.
15. Hommes, D.W., Peppelenbosch, M.P., van Deventer, S.J.H., 2003. Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. *Gut* 52, 144–151.
16. Islam, S., Hassan, F., Mu, M.M., Ito, H., Koide, N., Mori, I., Yoshida, T., Yokochi, T., 2004. Piceatannol prevents lipopolysaccharide (LPS)-induced nitric oxide (NO) production and nuclear factor (NF)- κ B activation by inhibiting I κ B kinase (IKK). *Microbiology and Immunology* 48, 729–736.
17. Kamata, H., Manabe, T., Kakuta, J., Oka, S., Hirata, H., 2002. Multiple redox regulation of the cellular signaling system linked to AP-1 and NF κ B: effects of *N*-acetylcysteine and H₂O₂ on the receptor tyrosine kinases, the MAP kinase cascade, and IB kinases. *Annals of the New York Academy of Sciences* 973, 419–422.
18. Kim, B.C., Choi, J.W., Hong, H.Y., Lee, S.A., Hong, S., Park, E.H., Kim, S.J., Lim, C.J., 2006a. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of mushroom *Phellinus linteus* in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology* 106, 364–371.
19. Kim, C.S., Kawada, T., Kim, B.S., Han, I.S., Choe, S.Y., Kurata, T., Yu, R., 2003. Capsaicin exhibits anti-inflammatory property by inhibiting I κ B-degradation in LPS-stimulated peritoneal macrophages. *Cellular Signalling* 15, 299–306.
20. Kim, G.Y., Choi, G.S., Lee, S.H., Park, Y.M., 2004a. Acidic polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* enhances through the up-regulation of nitric oxide and tumor necrosis factor- α from peritoneal macrophages. *Journal of Ethnopharmacology* 95, 69–76.

21. Kim, G.Y., Han, M.G., Song, Y.S., Shin, B.C., Shin, Y.I., Lee, H.J., Moon, D.O., Lee, C.M., Kwak, J.Y., Bae, Y.S., Lee, J.D., Park, Y.M., 2004b. Proteoglycan isolated from *Phellinus linteus* induces toll-like receptors 2- and 4-mediated maturation of murine dendritic cells via activation of ERK, p38, and NF- κ B. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 27, 1656--1662.
22. Kim, H.G., Shrestha, B., Lim, S.Y., Yoon, D.H., Chang, W.C., Shin, D.J., Han, S.K., Park, S.M., Park, J.H., Park, H.I., Sung, J.M., Jang, Y., Chung, N., Hwang, K.C., Kim, T.W., 2006b. Cordycepin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by the suppression of NF- κ B through Akt and p38 inhibition in RAW 264.7 macrophage cells. *European Journal of Pharmacology* 18, 192--199.
23. Kim, J.H., Kim, D.H., Baek, S.H., Lee, H.J., Kim, M.R., Kwon, H.J., Lee, C.H., 2006c. Rengyolone inhibits inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide production by down-regulation of NF- κ B and p38 MAP kinase activity in LPS-stimulated RAW264.7 cells. *Biochemical Pharmacology* 71, 1198--1205.
24. Kim, S.H., Song, Y.S., Kim, S.K., Kim, B.C., Lim, C.J., Park, E.H., 2004c. Anti-inflammatory and related pharmacological activities of the *n*-BuOH subfraction of mushroom *Phellinus linteus*. *Journal of Ethnopharmacology* 93, 141--146.
- Libby, P., Ridker, P.M., Maseri, A., 2000. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105, 1135--1143.
25. Lo, A.H., Liang, C., Lin-Shiau, S.Y., Ho, C.T., Lin, J.K., 2002. Carnosol, an antioxidant in rosemary, suppresses inducible nitric oxide synthase through down-regulating nuclear factor- κ B in mouse macrophages. *Carcinogenesis* 23, 983--991.
26. Makarov, S.S., 2000. NF- κ B as a therapeutic target in chronic inflammation: recent advance. *Molecular Medicine* 6, 441--448. Manzi, S., Wasko, M.C., 2000. Inflammation-mediated rheumatic diseases and atherosclerosis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 59, 321--325.
27. Moynagh, P.N., 2005. The NF- κ B pathway. *Journal of Cell Science* 118, 4389--4392.
28. Pan, M.H., Lin-Shiau, S.Y., Ho, C.T., Lin, J.H., Lin, J.K., 2000a. Suppression of lipopolysaccharide-induced nuclear factor- κ B activity by theaflavin-3,3-digallate from black tea and other polyphenols through down-regulation of NF- κ B kinase activity in macrophages. *Biochemical Pharmacology* 59, 357--367.

29. Pan, M.H., Lin-Shiau, S.Y., Lin, J.K., 2000b. Comparative studies on the suppression of nitric oxide synthase by curcumin and its hydrogenated metabolites through down-regulation of IB kinase and NFB activation in macrophages. *Biochemical Pharmacology* 60, 1665--1676.
30. Paul, A., Cuenda, A., Bryant, C.E., Murray, J., Chilvers, E.R., Cohen, P., Gould, G.W., Plevin, R., 1999. Involvement of mitogen-activated protein kinase homologues in the regulation of lipopolysaccharide-mediated induction of cyclo-oxygenase-2 but not nitric oxide synthase in RAW264.7 macrophages. *Cellular Signalling* 11, 491--497.
31. Shin, K.M., Kim, Y.H., Park, W.S., Kang, I., Ha, J., Choi, J.W., Park, H.J., Lee, K.T., 2004. Inhibition of methanol extract from the fruits of *Kochia scoparia* on lipopolysaccharide-induced nitric oxide, prostaglandin E₂, and tumor necrosis factor-production from murine macrophage RAW 264.7 cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 27, 538--543.
32. Suh, S.J., Chung, T.W., Son, M.J., Kim, S.H., Moon, T.C., Son, K.H., Kim, H.P., Chang, H.W., Kim, C.H., 2006. The naturally occurring biflavonoid, ochonaflavone, inhibits LPS-induced iNOS expression, which is mediated by ERK1/2 via NF- κ B regulation, in RAW 264.7 cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 447, 136--146.
33. Surh, Y.J., Chun, K.S., Cha, H.H., Han, S.S., Keum, Y.S., Park, K.K., Lee, S.S., 2001. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. *Mutation Research*, 480--481.
34. Tak, P.P., Firestein, G.S., 2001. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *Journal of Clinical Investigation* 107, 7--11.
35. Uto, T., Fujii, M., Hou, D.X., 2005. 6-(Methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate suppresses inducible nitric oxide synthase expression through the inhibition of Janus kinase 2-mediated JNK pathway in lipopolysaccharide activated murine macrophages. *Biochemical Pharmacology* 70, 1211--1221.
36. Wadsworth, T.L., Koop, D.R., 1999. Effects of the wine polyphenolic quercetin and resveratrol on pro-inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages. *Biochemical Pharmacology* 57, 941--949.
37. Zhang, G., Ghosh, S., 2000. Molecular mechanisms of NF- κ B activation induced by bacterial lipopolysaccharide through Toll-like receptors. *Journal of Endotoxin Research* 6, 453--457.

2. 아토피 관련 문헌정보

1. Jujo K., Renz H., Abe J., Gelfand E.W., Leung D.Y.(1992). Decreased interferon gamma and increased interleukin-4 production in atopic dermatitis promotes IgE synthesis, *J Allergy Clin Immunol.*, 90, 323-331.
2. Kondo K., Nagami T., Teramoto S.(1969). Comparative cellular and Species Radiosensitivity, ed by Bondo P V. Sugahara, Igakushoin, Tokyo, 20-29.
3. Leung D.Y.M., Sorter N.A.(2001). Cellular and immunologic mechanisms in atopic dermatitis, *J Am Acad Dermatol*,44, 1-12.
4. Pene J., rousset F., Chretien I., Bonnefoy J.Y., Spits H.,Yokota T., Arai N., Arai K., Banchereau J., De vries J.E.(1998). IgE production by normal human lymphocytes is induced by IL-4 and suppressed by interferon and α and prostaglandin E2. Proceedings of the national Academy Sciences of the United States of America, 85, 6880-6884.
5. Tsuyoshi Ohmura, Ayako Konomi, Yayoi Satoh, et al(2004). Suppression of atopic-loke dermatitis by treatment with antibody to lymphocyte funtion-associated antigen-1 in NC / Nga mouse, *European*
6. Kim HM, Han SB, Oh GT, Kim YH, Hong DH, Yoo LD. 1996. Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Int J Immunopharmacol* 18: 295-303.
7. Sukurai T, Suzu S, Yamada M, Yanai N, Kawashima T, Hataka K, Takaku T, Motovoshi K. 1994. Induction of tumor necrosis factor in mice by recombinant human macrophage colony- stimulating factor. *Jpn J Cancer Res* 85: 80-85.
8. Xu RH, Peng XE, Chen GZ, Chen GL. 1992. Effects of *Cordyceps sinensis* on natural killer activity and colony formation of B16 melanoma. *Chin Med J* 105: 971-980.
9. Chen GZ, Chen GL. 1991. Effects of *Cordyceps sinensis* on murine T lymphocyte subsets. *Chin Med J* 104:4-11.
10. Leung, D. Y., M. Boguniewicz, M. D. Howell, I. Nomura, and Q. A. Hamid. 2004. New insights into atopic dermatitis. *J. Clin. Invest.* 113: 651-657.
11. Grewe, M., C. A. Bruijnzeel-Koomen, E. Schoëpf, T. Thepen, A. G. Langeveld-Wildschut, T. Ruzicka, and J. Krutmann. 1998. A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Immunol. Today* 19: 359-361.
12. Spergel, J. M., E. Mizoguchi, H. Oettgen, A. K. Bhan, and R. S. Geha.

1999. Roles of TH1 and TH2 cytokines in a murine model of allergic dermatitis. *J. Clin. Invest.* 103: 1103–1111.
13. Vestergaard, C., H. Yoneyama, M. Murai, K. Nakamura, K. Tamaki, Y. Terashima, T. Imai, O. Yoshie, T. Irimura, H. Mizutani, and K. Matsushima. 1999. Overproduction of Th2-specific chemokines in NC/Nga mice exhibiting atopic dermatitis-like lesions. *J. Clin. Invest.* 104: 1097–1105.
14. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor *foxp3*. *Science* 299: 1057–1061.
15. Vestergaard, C., H. Yoneyama, and K. Matsushima. 2000. The NC/Nga mouse: a model for atopic dermatitis. *Mol. Med. Today* 6: 209–210.
16. Matsuda, H., N. Watanabe, G. P. Geba, J. Sperl, M. Tsudzuki, J. Hiroi, M. Matsumoto, H. Ushio, S. Saito, P. W. Askenase, and C. Ra. 1997. Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *Int. Immunol.* 9: 461–466.
17. Yagi, R., H. Nagai, Y. Iigo, T. Akimoto, T. Arai, and M. Kubo. 2002. Development of atopic dermatitis-like skin lesions in STAT6-deficient NC/Nga mice. *J. Immunol.* 168: 2020–2027.
18. Horwitz, D. A., S. G. Zheng, and J. D. Gray. 2003. The role of the combination of IL-2 and TGF- γ or IL-10 in the generation and function of CD4⁺CD25⁺ and CD8⁺ regulatory T cell subsets. *J. Leukocyte Biol.* 74: 471–478.
19. Sumiyoshi, K., A. Nakao, H. Ushio, K. Mitsuishi, K. Okumura, R. Tsuboi, C. Ra, and H. Ogawa. 2002. Transforming growth factor- β 1 suppresses atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *Clin. Exp. Allergy* 32: 309–314.
20. Yoshiaki Tomimori, Yoshitaka Tanaka, Megumi Goto, and Yoshiaki Fukuda. 2005. Repeated topical challenge with chemical antigen elicits sustained dermatitis in NC/Nga mice in specific-pathogen-free condition. *J Invest Dermatol* 124: 119–124.

제 7 장 참고문헌

1. 성재모, 이현경, 양근우. 1995. 동충하초속균의 형태적인 특징과 단백질 Pattern 에 의한 계통 분류. 한국균학회지. 23: 92 - 104
2. 이현경. 1996. 한국산 동충하초의 분포와 분류 및 배양적 특성에 관한 연구. 강원대학교 석사학위 논문
3. 성재모. 1996. 한국의 동충하초. 교학사. pp. 153.
4. 최인영. 2000. 동충하초속균의 유연관계 분석 및 인공배양. 전북대학교 농학박사학위 논문
5. 성재모, 홍성준, Humber, R.A., Spatafora, J.W. 2003. 유충노랑곰보동충하초 (*Cordyceps staphylindaecola*)의 불완전세대와 자실체 형성. 한국균학회지. 31:1-7.
6. 박성수, 2009. 노랑다발 동충하초(*Cordyceps bassiana*)의 교배형 구명 및 인공배양에 관한 연구 강원대학교, 석사학위논문.
7. de Bary A. 1967. Zur kenntniss insectentodtender Pilze, in Bot. Zeit. 25: 2-7,
8. Sommers, L. E., R. F. Harris, F. N. Dalton, and W. R. Gardner. 1970. Water potential relations of three root-infecting *Phytophthora* species. *Phytopathology* 60: 932-934.
9. Bruhel, G. W. and B. Cunfer. and M. Toiviainen. 1972. Influence of water potential on growth, antibiotic production, and survival of *Cephalosporium gramineum*. *Can. J. Plant Sci.* 52: 417-423.
10. Cook, R. J., and R. I. Papendick. 1972. Influence of water potential of soil and plants on root disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 10: 349-372.
11. Manandhar, J. B., and G. W. Bruehl. 1973. In vitro interactions of *Fusarium* and *Verticillium* wilt fungi with water, pH, and temperature. *Phytopathology* 63: 413-418.
12. Sung, J. M. 1980. Effect of water potential on reproduction and apore germination by *Fusarium roseum* "Graminearum", "Culmorum", and "Avenaceum". Master Thesis. Washington State University.
13. Feng, M. G., Poprawski, T. J. and Khachatourians, G. G. 1994. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol SCI. Technol.* 4: 3-34.
14. Humber, R. A. 2000. Fungal pathogens and parasites of insects. In: Priest, F.G. and Goodfellow, M., (eds.). *Applied Microbial Systematics*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. P. 203-230.
15. Li Zengzhi, Li Chunru, Huang Bo, and Fan Meizhen. 2001. Discovery and

- demonstration of the teleomorph of *Beauveria bassiana*(Bals.) Vuill., an important entomogenous fungus. Chinese Science Bulletin Vol.46 No.9
16. Sung, G. H., Spatafora, J. W., Zare, T., Hodge, K. T. and Gams, W. 2001. A revision of *Verticillium* sect. *Prostromata*. II. Phylogenetic analysis of SSU and LSU nuclear rDNA sequences from anamorphs and teleomorphs of *Clavicipitaceae*. *Nova Hedwigia* 72: 311-328.
 17. Shrestha Bhushan, In-Seon Nam, Ho-Kyung Kim, and Jae-Mo. Sung 2002. Effect of Sector of isolates on fruiting of *Cordyceps militaris*. *The Korean Society of Mycology News letter* vol. 14(1): 98.
 18. Shrestha Bhushan. 2003. Growth characteristics of somatic mycelium and mating system of *Cordyceps militaris* (L. ex Fr.) Link. D. Thesis, Kangwon National university. Chuncheon, Korea.
 19. Shrestha Bhushan, Ho-Kyung Kim, Gi-ho Sung, Joseph W. Spatafora, and Jae-Mo Sung. 2004. Bipolar Heterothallism, a principal mating system of *Cordyceps militaris* in vitro *Biotechnology and Bioprocess engineering* 9: 440-446.
 20. Shrestha Bhushan, Sung-Keun Choi, Ho-Kyung Kim, Tae-Woong Kim, and Jae-Mo Sung. 2005, *Mycobiology* 33(3): 125-130.
 21. Yi, J. O. 2007. Characteristics of fruiting body formation of *Cordyceps bassiana* and its relationship with *Beauveria bassiana*. Thesis, Kangwon National University. Chuncheon, Korea.
 22. Berenbaum, F., 2000. Proinflammatory cytokines, prostaglandins, and the chondrocyte: mechanisms of intracellular activation. *Joint Bone Spine* 67, 561-564.
 23. Chen, T.H., Kao, Y.C., Chen, B.C., Chen, C.H., Chan, P., Lee, H.M., 2006. Dipyridamole activation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 mediates inhibition of lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in RAW 264.7 cells. *European Journal of Pharmacology* 541,138-146.
 24. D'Acquisto, F., May, M.J., Ghosh, S., 2002. Inhibition of nuclear factor kappa B (NF- κ B): an emerging theme in anti-inflammatory therapies. *Molecular Interventions* 2, 22-35.
 25. Forman, H.J., Torres, M., 2001. Redox signaling in macrophages. *Molecular Aspects of Medicine* 22, 189-216.
 26. Ginn-Pease, M.E., Whisler, R.L., 1998. Redox signals and NF- κ B activation in T cells. *Free Radical Biology and Medicine* 25, 346--361.
 27. Han, Y.J., Kwon, Y.G., Chung, H.T., Lee, S.K., Simmons, R.L., Billiar,

- T.R.,Kim, Y.M., 2001. Antioxidant enzymes suppress nitric oxide production through the inhibition of NF- κ B activation: role of H₂O₂ and nitric oxide in inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 5, 504--513.
28. Herlaar, E., Brown, Z., 1999. p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease. *Molecular Medicine Today* 10, 439--447.
 29. Kamata, H., Manabe, T., Kakuta, J., Oka, S., Hirata, H., 2002. Multiple redox regulation of the cellular signaling system linked to AP-1 and NF κ B: effects of *N*-acetylcysteine and H₂O₂ on the receptor tyrosine kinases, the MAP kinase cascade, and IKK kinases. *Annals of the New York Academy of Sciences* 973, 419--422.
 30. Kim, G.Y., Han, M.G., Song, Y.S., Shin, B.C., Shin, Y.I., Lee, H.J., Moon, D.O., Lee, C.M., Kwak, J.Y., Bae, Y.S., Lee, J.D., Park, Y.M., 2004b. Proteoglycan isolated from *Phellinus linteus* induces toll-like receptors 2- and 4-mediated maturation of murine dendritic cells via activation of ERK, p38, and NF- κ B. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 27, 1656--1662.
 31. Kim, H.G., Shrestha, B., Lim, S.Y., Yoon, D.H., Chang, W.C., Shin, D.J., Han, S.K., Park, S.M., Park, J.H., Park, H.I., Sung, J.M., Jang, Y., Chung, N., Hwang, K.C., Kim, T.W., 2006b. Cordycepin inhibits lipopolysaccharide -induced inflammation by the suppression of NF- κ B through Akt and p38 inhibition in RAW 264.7 macrophage cells. *European Journal of Pharmacology* 18, 192--199.
 32. Kim, J.H., Kim, D.H., Baek, S.H., Lee, H.J., Kim, M.R., Kwon, H.J., Lee, C.H., 2006c. Rengyolone inhibits inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide production by down-regulation of NF- κ B and p38 MAP kinase activity in LPS-stimulated RAW264.7 cells. *Biochemical Pharmacology* 71, 1198--1205.
 33. Zhang, G., Ghosh, S., 2000. Molecular mechanisms of NF- κ B activation induced by bacterial lipopolysaccharide through Toll-like receptors. *Journal of Endotoxin Research* 6, 453--457.
 34. Jujo K., Renz H., Abe J., Gelfand E.W., Leung D.Y. (1992). Decreased interferon gamma and increased interleukin-4 production in atopic dermatitis promotes IgE synthesis, *J Allergy Clin Immunol.*, 90, 323-331.
 35. Leung D.Y.M., Sorter N.A. (2001). Cellular and immunologic mechanisms in atopic dermatitis, *J Am Acad Dermatol*, 44, 1-12.
 36. Pene J., rousset F., Chretien I., Bonnefoy J.Y., Spits H., Yokota T., Arai

- N., Arai K., Banchereau J., De vries J.E.(1998). IgE production by normal human lymphocytes is induced by IL-4 and suppressed by interferon and α and prostaglandin E2. *Proceedings of the national Academy Sciences of the United States of America*, 85, 6880-6884.
37. Tsuyoshi Ohmura, Ayako Konomi, Yayoi Satoh, et al(2004). Suppression of atopic-loke dermatitis by treatment with antibody to lymphocyte function-associated antigen-1 in NC / Nga mouse, *European*
 38. Kim HM, Han SB, Oh GT, Kim YH, Hong DH, Yoo LD. 1996. Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Int J Immunopharmacol* 18: 295-303.
 39. Xu RH, Peng XE, Chen GZ, Chen GL. 1992. Effects of *Cordyceps sinensis* on natural killer activity and colony formation of B16 melanoma. *Chin Med J* 105: 971-980.
 40. Chen GZ, Chen GL. 1991. Effects of *Cordyceps sinensis* on murine T lymphocyte subsets. *Chin Med J* 104:4-11.
 41. Leung, D. Y., M. Boguniewicz, M. D. Howell, I. Nomura, and Q. A. Hamid. 2004. New insights into atopic dermatitis. *J. Clin. Invest.* 113: 651-657.