

GOVP1200515314

GA 0362-0232

최종
연구보고서

동충하초 균사체 발효기술 및 인공재배 기술 개발

Fermentation of Tochukaso species and cultivation of their
fruiting bodies

연구기관
한국식품개발연구원

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “동충하초 균사체 발효기술 및 인공재배 기술 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2002년 12월 16일

주관연구기관: 한국식품개발연구원

총괄연구책임자: 한대석 책임연구원

연구원: 오세욱 선임연구원, 이영철 책임연구원, 김상희 선임연구원,
김인호 선임연구원, 김선희 연구원

협동연구기관: 강원대학교

협동연구책임자: 홍억기 교수

연구원: 김성수, 변학규, 김민석

협동연구기관: 조선대학교

협동연구책임자: 김성준 교수

연구원: 연구원: 김춘성, 송규영, 김재성, 문성민, 박영란

협동연구기관: 우석대학교

협동연구책임자: 조덕현 교수

연구원: 정재연, 방극소, 송기호

요 약 문

I. 제 목

동충하초 균사체 발효기술 및 인공재배 기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

가. *Cordyceps sinensis* 균사체 배양 및 가공식품 개발

동충하초의 건강기능성이 널리 알려지면서 국내에서도 동충하초 재배 및 판매가 활발히 이루어지고 있다. 그런데 시판이 허용된 눈꽃동충하초(*Paecilomyces tenuipes*)와 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*)의 건강기능성에 대해서도 부분적으로 과학적 근거가 있지만 지금까지 동충하초의 건강기능성에 관한 연구가 가장 많은 품종은 티벳에서 채취된 자연산 동충하초(*Cordyceps sinensis*)이다. 이 품종은 생산량이 제한적이기도 하지만, 그 효능이 알려지면서 채취량이 증가하고 따라서 시간이 지날수록 채취량이 다시 감소되며 이는 다시 가격 상승을 유발하는 문제가 있다. 따라서 이를 가공식품의 원료로 사용하기에는 가격이 너무 높은 단점이 있다. 본 연구에서는 다수의 버섯류 자실체와 균사체의 성분이 유사하다는데 착안하여 생물반응기를 이용하여 *C. sinensis* 품종의 균사체를 균사체를 배양하고 이를 가공식품의 원료로 사용할 수 있는 기술을 개발하고자 하였다.

나. *P. japonica* 액체배양을 통한 균사체 및 생리활성물질 생산공정개발

동충하초의 생리활성물질로는 다당체와 cordycepin이 있다. 다당체는 면역기능 저하에 따른 질환들의 면역체계를 활성화시킴으로써 면역기능 장애의 개선과 치료의 목적으로 사용되고 있고 cordycepin은 mRNA의 합성 저해작용 및 상당한 정도의 항암, 항세균, 항진균 효과가 있는 것으로 보고되고 있다. 현재 이루어

지고 있는 동충하초의 연구는 주로 고체배양을 이용한 자실체 생산에 관한 내용이며 액체배양을 통한 균사체 및 배양여액으로부터의 생리활성물질 생산기술에 관한 연구는 거의 없는 실정이다. 국내기술에 의한 동충하초 자실체를 대신할 수 있는 균사체 및 배양여액을 이용한 연구개발을 통하여 대량생산기술 및 가공제품 개발에 대한 필요성이 절실히 요구된다. 따라서, 본 연구과제 수행은 *Paecilomyces tenuipes*(눈꽃동충하초)의 액체배양을 수행함에 있어서 고수율의 균주개발, 최적 배지조성 및 최적 균사체 성장조건을 확립함으로써 균사체 생산 및 생리활성물질인 다당체와 cordycepin 생산을 증대시키는데 그 목적이 있다.

다. *C. militaris*의 대량생산 기술 개발과 효능 평가

동충하초는 겨울에는 벌레상태로 있다가 여름이 되면 버섯이 된다는 뜻에서 유래된 용어인데, 실제로는 토양 등에 존재하고 있는 곰팡이류인 동충하초균의 포자가 온도, 습도가 높아지는 시기에 살아있는 곤충의 호흡기나 소화기, 관절 등을 통하여 몸 속으로 들어가 영양분을 섭취하며 발육증식을 하다가 기주(숙주) 곤충이 죽으면, 얼마 후 버섯모양의 자실체를 곤충의 표피에 형성하여 자손을 퍼트리는 생활사를 가지고 있다. 따라서 동충하초는 일종의 곤충 기생성 약용(식용)버섯류이며, 자낭균류 맥각균목 동충하초과에 속한다. 최근 연구에서는 항암, 면역증강, 만성피로, 노화방지 등에 탁월한 효능이 있는 것으로 밝혀지고 있으며, 일본에서는 폐병이나 늑막염의 특효약으로 판매되고 있다. 동충하초가 관심을 끄는 이유는 무공해 농약이나 항암제 또는 건강보조식품으로 개발가능성이 높기 때문이며, 국내에서도 농촌진흥청과 서울대 천연물과학연구소 공동으로 약리효과를 검색한 결과 항암작용과 면역증강, 항피로작용 등이 탁월한 것으로 밝혀졌다. 동충하초는 의약품으로서 뿐만 아니라 건강보조식품으로서도 중요성이 인식되어 현재 각종 분말이나 액체 형태의 제품이 시판되고 있다. 또한 동충하초가 자연생태계에서 곤충의 밀도를 조절하는 것을 이용해 무공해 미생물 농약에 대한 연구도 활발하다. 이러한 천연 생물 농약의 개발은 그 해충의 천적이 되는 미생물이 해충의 방제는 물론이고 화학 농약에 의해 발생하는 환경오염문제 까지도 해결할 수 있기 때문에 큰 관심을 끌고 있다. 따라서 본 연구에서는 다양한 생리활성 기능을 가진 밀리타리스 동충하초(*C. militaris*)의 균사체 생산을 위한 배양특성

및 영양조건과 위에서 언급한 기능성 및 약리효과를 확인하고자한다.

라. 동충하초 우수균주 개발과 대량재배

동충하초의 우량균주 10~20 균주를 개발하여 싼값에 농가에 보급하여 농가 소득을 올려서 국가 경제에 이바지 한다. 또한 사양 산업인 잠업농가에 동충하초 재배를 할 수 있는 전업의 기회를 주어 소득을 증대시키고 품질이 높은 동충하초를 생산한다. 이 연구의 필요성은 우량균주를 선발하여 높은 농가 소득을 올리는 데 있으며 값싸게 동충하초를 소비자에게 공급하여 일반 서민의 경제적 부담을 줄이고 귀농하는 사람들에게 일거리를 창출한다. 나아가서 동충하초로부터 고부가가치의 보건의식품, 의약을 개발하여 국민 보건 향상에 기여한다. 동충하초를 이용한 여러 제품을 만들어 외국에 수출하여 국가경제에 기여한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

가. *C. sinensis* 균사체 배양 및 가공식품 개발

C. sinensis 균사체 배양을 위하여 이 품종을 삼각플라스크에서 배양할 때 탄소원, 유기 및 무기 질소원, 미네랄 등이 균사체를 증식에 미치는 효과를 분석하고 균사체 성장의 적정 배지 조성에 관한 연구를 수행하였다. 이 결과는 표면반응분석법을 이용하여 최적 배지 조성에 활용하였다. 생물반응기를 이용한 회분식 배양에서는 배지, pH, 산소공급 등의 발효 변수를 조절하여 균체량과 대사산물인 cordycepin 생산량을 증가시킬 수 있는 조건에 대해 연구하였다. 목적인 생산물을 더욱 증가시키기 위해 유가식 배양을 하였으며, 이때에도 발효 변수 및 배지 공급 조건을 최적화 하여 균체량과 cordycepin 생산량을 극대화 할 수 있는 생산공정을 개발하였다. 발효 생산물을 이용하여 음료, 정제 등 가공식품을 개발하였다.

나. *P. tenuipes* 액체배양을 통한 균사체 및 생리활성물질 생산공정 개발

*P. tenuipes*의 성장조건 구명을 위하여 고수율 균주 개발, 최적 성장조건 검토 및 최적 배지조성을 검토하였다. 또한, 액체배양공정을 개발하기 위하여 목적

산물 생산의 촉진 및 저해요인을 검토하였고, 배양조건 변화에 따른 목적산물 생산량의 변화를 검토하였으며 cordycepin 분석 방법을 설정하였다. 생물반응기를 이용하여 회분배양을 통해 고농도 배양공정을 개발하고 유가배양의 기술을 적용하여 생산성 극대화를 위한 생산공정을 개발하였다.

다. *C. militaris*의 대량생산 기술 개발과 효능 평가

본 연구에서는 *C. militaris*의 대량생산을 위한 배양조건을 확립하기 위하여 각종 조건에 따른 추출물 처리 종균의 증식과 산소공급 조건 및 다양한 배지를 사용하여 액체종균의 최적배지를 개발하고 생육기간의 단축을 위한 최적 배양조건을 확립하고 이를 바탕으로 하여 대량생산을 위한 동충하초 재배사의 조건을 확립하며, 종균의 대량 증식을 위한 조건을 조사한다. 또한 *C. militaris*의 생리활성기능을 검증하기 위하여 분자생물학적 접근방법을 이용하여 면역세포의 활성화, 신경성장인자 및 cytokine의 발현 여부와 항암작용을 확인하게 된다. *C. militaris*를 이용하여 특히 최근 들어 사회인구구조가 노령화되어감에 따라 퇴행성 신경계 질병인 Parkinson's disease에 관한 관심이 고조되어짐에 따라 퇴행성 질병에 연관이 있는 tyrosine hydroxylase의 발현여부를 검증하고, 세계 사망원인의 약 30%를 차지하고 있는 혈전저해 및 용해 효소에 관한 연구를 수행하게 된다. 최종적으로 본 연구의 결과를 종합하여 다양한 생리활성기능을 가지고 있는 *C. militaris*의 균사체 및 자실체를 이용한 기능성 식품 및 건강보조제로써의 유용성을 검증하였다

라. 동충하초 우수균주 개발과 대량재배

동충하초채집은 동충하초류와 눈꽃동충하초류를 지리산, 설악산, 한라산등 국립공원을 중심으로 채집하였다. 동정과 분류는 외부관찰, 현미경관찰, 생태적특성, 참고문헌을 이용하였다. 새로이 한국산 미기록종으로 확인된 것은 그들의 특성을 기재하였다. 채집된 동충하초를 포자와 조직분리를 통해 균사활력이 좋은 것을 자실체 발생실험을 통하여 우량 균주를 선발하였다. 동충하초 성분은 단백질의 아미노산을 측정하였고 눈꽃동충하초류는 병마개를 열은 것과 닫은 것을 비교하여 실험하였다. 대량재배실험은 판재배를 통하여 개체수의 수량을 조사하

였다.

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

가. *C. sinensis* 균사체 배양 및 가공식품 개발

*C. sinensis*의 균사체 성장과 cordycepin 생산의 최적화 기술 개발을 위하여 플라스크배양, 회분배양, 회분배양의 응용, 유가식 배양에 대한 연구를 수행하였다. 또한 배양한 균사체를 원료로 가공식품 2종을 제조하였다. 플라스크배양과 회분배양을 통해 최적 성장 조건과 최적 배지 조성을 구하였으며, 회분배양의 응용과 다양한 조건 (pH-stat, constant feeding strategy)의 유가식 배양 결과 탄소원인 maltose를 투입하기 위한 공급 시스템을 확립하였다. 고농의 maltose 공급으로 pH가 최적 pH로 자동 조절되는 배양상 유리한 결과를 보였다. 유가식 배양에서 생물반응기 내의 용존산소를 조절하고 pulsed-feed strategy에 의해 maltose를 공급함으로써 궁극적으로 균체량 (44.3 g/L)과 cordycepin의 생산(56.1 mg/L) 수율을 높일 수 있었다. Cordycepin은 주로 세포외로 분비되어 배양여액에서 검출되어지나 균체 내에 함유된 cordycepin의 생산량도 자연산 동충하초의 기주에 함유된 양과 비슷하므로 자연산을 대체할 가능성을 보이는 결과이다. 자연산 동충하초인 *C. sinensis*의 자실체와 기주로부터 각각 30.1 mg/100 g cell와 18.9 mg/100 g cell의 cordycepin을 생산할 수 있었다. 현재 자연산 동충하초가 국제 거래에서 가격이 970 \$/kg으로 고가로 거래되고 있고 표준시약으로 상용되는 cordycepin (Sigma-Aldrich Chem. Co., C3394)도 25 mg당 약 215,600원이다. 따라서 균사체 배양 기술을 통해 44.3 g/L의 균체량과 균사체와 배양 부산물인 배지로부터 56.1 mg/L의 cordycepin 생산량은 산업적 경제성이 있는 것으로 생각되어지며 또한 균사체 배양액을 원료로한 가공식품의 개발은 산업화 활용 가능성이 보이는 결과이다.

나. *P. tenuipes* 액체배양을 통한 균사체 및 생리활성물질 생산공정 개발

본 연구에서는 *P. tenuipes*를 이용한 액체배양을 통해 최적 균체성장과 다당체 및 cordycepin 생성 조건을 검토하였다. 균체량 및 다당체 생산을 위한 플라

스크 배양에서의 최적 배양조건은 접종량을 2%로 하여 27°C, 200 rpm, 초기 pH 7이었고, 최적 배지조성은 glucose 30 g/L, yeast extract 20 g/L, KH₂PO₄ 0.5 g/L, CuCl₂ · 2H₂O 0.1 g/L이었다. 그 결과 균체량은 배양 4 일째 22 g/L, 다당체 생성은 배양 5 일째 2.3 g/L로 가장 높은 값을 나타내었다. 생물반응기를 이용한 회분배양에서 균체량 및 다당체 생성을 위한 최적의 교반속도와 통기량은 각각 400 rpm과 1.0 vvm이었다. 이때 균체량과 다당체 생성량은 각각 배양 2 일째에 23.1 g/L, 배양 5 일째에 2.5 g/L이었다. 한편 pH를 7로 일정하게 조절하여 배양할 경우 균체량과 다당체 생성량은 각각 11 g/L와 1.5 g/L로서 오히려 pH를 조절하지 않은 경우에 비해 상대적으로 매우 낮은 값을 나타내었다. 균체량과 다당체 생성을 증가시키기 위해 최적의 회분배양 조건에서 균체활성이 가장 좋은 배양 1.5 일째에 10 g/L의 glucose를 간헐적으로 첨가한 후 glucose의 농도가 다소모되기 전에 지속적으로 5 g/L의 glucose를 배양 3.5 일째까지 첨가한 결과 균체량은 29.2 g/L, 다당체 생성량은 3.3 g/L를 나타내었다. 한편, cordycepin 생산을 위한 플라스크 배양을 통해 glucose 10 g/L, yeast extract 20 g/L, (NH₂)₄HPO₄ 5 g/L, histidine 2 g/L, CaCO₃ 1 g/L로 배지성분을 변형시켰다. 이를 생물반응기에 적용함에 있어서 배양 1.5~2 일째부터 시작되는 심한 wall growth로 인해 배양의 어려움이 나타났다. 이를 해결하기 위해 wall growth 방지제로 PAA(polyacrylic acid)와 SA(sodium acrylate) 등을 첨가하였다. 그 결과 약간의 방지효과는 있었으나 근본적인 문제를 해결하지는 못하였다. 또한, 용존 산소를 유지시키면서 배양한 결과에서도 wall growth에 의해 배양 2 일째 12.8 g/L의 균체량을 나타내었으나 이때 배양여액에서의 cordycepin 농도는 7.7 mg/L를 나타내었다. 회분배양을 통해 배양여액에서의 cordycepin은 glucose의 고갈 이후 1~2 일 사이에만 검출됨을 알 수 있었다. 이러한 문제점들을 해결하기 위해 유가배양을 실시하였다. 짧은 배양기간으로 높은 균체량을 얻고 균체내의 다당체와 cordycepin의 생산량을 높이려고 하였다. 배양방법으로는 복합배지성분을 사용하기 때문에 여러 가지의 매개변수 중 pH에 기준하여 기질을 공급하였는데 공급배지(glucose)의 농도를 50~400 g/L까지 변화를 주었다. 그 결과 균체내의 다당체 생성에 있어서는 50 g/L의 glucose를 공급하였을 때 32 mg/g cell이 측정되었으며 그때의 균체량은 20.3 g/L이었다. 또한, 균체내의 cordycepin 생성에 있

어서는 400 g/L의 glucose를 공급하였을 때 2.3 mg/g cell이 검출되었으며 그때의 균체량은 33.3 g/L이었다. 유가배양에서의 가장 좋은 결과를 토대로 scale-up에서의 적용 정도를 확인하기 위해 500 L 생물반응기를 이용해 실험을 실시하였다. 배양은 2.5 일까지 하였으며 5 L 생물반응기에서의 변화 양상과 비교해 보았을 때 scale-up 하였을 때에도 잘 적용되어졌다고 판단되었다. 한편, 자실체 재배를 위한 종균배양시 yeast extract를 사용한 경우 농가에서 사용하는 황두분 또는 번데기를 사용하였을 때보다 더 좋은 성장을 하였다. 또한, 자실체내의 cordycepin 함유량은 0.45 mg/g이었다. 따라서, 본 연구에서 개발한 균사체 및 배지조성은 자실체 재배를 위한 액체종균으로써 우수함을 확인하였다.

다. *C. militaris*의 대량생산 기술 개발과 효능 평가

합성배지상에서 *C. militaris* 균사체생산을 위한 배양조건은 배양기간은 10 일, 배양온도는 25℃, pH 7.0, 탄소원은 mannitol, 질소원은 유기태 질소원인 0.3% proteose-peptone, 무기염류는 0.2% KH₂PO₄, 0.02% MgSO₄·7H₂O, 비타민은 thiamine-HCl에서 30.8 g/l의 균사체 수율을 획득할 수 있었다. 또한 *C. militaris* 배양의 최적조건은 균사체 형성은 23~25℃, 자실체형성은 18~20℃, 습도는 균사체형성시 75%, 자실체형성시 90~95%의 습도를 유지시켜야된다. 또한 하루에 약 5~6차례의 환기가 필수적이며 조도는 약 200~500 Lux에서 배양하여야한다. 또한 *C. militaris*의 기능으로 스트레스와 연관되어 있는 inteferon-gamma inducing factor(IGIF)가 동충하초 추출물에 의하여 강하게 유도발현되어짐을 확인하였으며, 뇌신경에 영양을 제공하며 뇌세포의 생존 및 성장에 연관되어있는 다양한 신경성장인자들 중 Brain derived neurotrophic factor(BDNF)와 Nerve growth factor가 발현되어짐을 확인하였다.

최근 관심이 고조되고 있는 퇴행성 노인질환인 Parkinson's disease에 연관되어있는 tyrosine hydroxylase의 발현 및 tyrosine hydroxylase의 발현과 연관된 Glial-derived neurotrophic factor(GDNF)의 발현이 확인되었다. 다른 한편으로 *C. militaris* 추출물을 위암세포주, 자궁암 세포주, 폐암세포주, 정상세포주에 처리한 결과 강력한 항암작용을 가지고 있음을 확인하였으며, 동충하초추출물이 심혈관계질환의 원인인 혈전용해반응을 나타내어 이로부터 혈전분해효소를 정제하

여 검증하였다. 따라서 이 모든 결과를 종합하여 *C. militaris*의 균사체 및 자실체를 이용하여 다양한 약리 및 생리활성을 가진 기능성 식품의 개발이 가능하리라 사료되어지며, 더 나아가 동충하초 추출물을 이용한 의약품의 임상시험이 진행되리라 사료되어진다.

라. 동충하초 우수균주 개발과 대량재배

연구의 결과는 동충하초는 52 개, 눈꽃동충하초는 22 개체를 채집하였다. 이것들 중에서 동충하초 우량균주는 9 종, 눈꽃동충하초는 8 종을 실험을 통하여 선발하였다. 한국산 미기록종 4 종도 확인하였다. 눈꽃동충하초의 배양병의 개방형과 폐쇄형을 실험하였고 동충하초의 아미노성분을 분석하였다. 대량재배는 관재배를 권장할만하였다. 야생의 동충하초로부터 포자와 조직 분리법을 농가에 보급하여 순수분리된 균사로부터 자실체 발생의 기술을 익히도록 한다. 다양한 균주를 확보할 수가 있고 전업하거나 귀농하는 사람들에게 일거리를 창출하도록 한다. 동충하초를 이용한 건강식품의 다양한 개발과 동충하초로부터 신물질등의 개발하여 수출 품목으로 육성한다. 농가에 동충하초 균주를 저렴하게 보급하여 소득증대에 기여하고 동충하초를 싼값으로 수요자에게 공급한다.

SUMMARY

I. Title

Fermentation of Tochukaso species and cultivation of their fruiting bodies

II. Purpose and Significance of the Study

A. Batch and fed-batch culture of *Cordyceps sinensis* and development of processed foods using its mycelium and culture broth

It has been well known that Tochukaso has a beneficial effect to health. In Korea, two species of Tochukaso such as *Paecilomyces tenuipes* and *Cordyceps militaris* were allowed by KFDA to be used as raw materials for processed foods. There are over 300 species of Tochukaso. Scientific papers about their biological activities, however, has been focused on one species, *Cordyceps sinensis*. This grows at the high mountain in Tibet, and it is called natural or Chinese Tochukaso. Collection of natural Tochukaso is rare, so its high price is a high hurdle to be used in food processing. It has been often found that the composition of fruiting bodies of mushroom is similar with that of mycelium. This project was carried out to study batch and fed-batch culture of *Cordyceps sinensis* and development of processed foods using its mycelium and culture broth.

B. Process development for mycelium, polysaccharide and cordycepin production by liquid cultivation of *Paecilomyces tenuipes*

According to recent studies, useful biological response modifiers have been produced from fruiting body of *P. tenuipes*, for example, polysaccharides with anti-tumor and immuno-modulating activities and cordycepin with mRNA

synthesis inhibition, anti-bacterial, and anti-tumor activities. It has been necessary to develop the liquid cultivation technology for the mass production of mycelium, polysaccharide, and cordycepin. Liquid cultivation has several advantages, including short culture time, easy process operation, maintenance of quality control, and so on.

C. Biological efficacy and development for artificial mycelial cultivation technology of *Cordyceps militaris*.

Cordyceps militaris is so scarce in nature and high in price. In addition, most studies on *Cordyceps militaris* have been done in connection with Chinese traditional medicine, but it is appearing on the market without any scientific, medical, pharmacological or nutritional evidence of their effect. So we are required to develop for large scaling cultivation and scientific verification for biological efficacy of *Cordyceps militaris* mycelium.

The objects of this investigation were to characterize the proximate composition, the contents of the biological activity, and to evaluate the nutritional and health-promoting properties of *Cordyceps militaris*.

D. Development for mycelium fermentation technology and artificial cultivation technology of *Cordyceps sp.*

This study was concentrated on developing the production process for the maximum productivity of mycelium, polysaccharide, and cordycepin through the establishment of the optimum liquid culture conditions. The purpose of this research is to select of excellent 10~20 strains among many kinds of fungi and to provide farmers fungi with good price. Another purpose is to give transfer opportunity to silkworm agriculture by increasing income and by providing good quality *Cordyceps* products. The important of this research is to make of high income to farmers by developing good quality of fungi strains. Proper expense of *Cordyceps* is to decrease economic charge and to

provide new job people who want to work in agriculture. Also, it is possible to apply in food, medicine, pharmacy. Many goods of *Cordyceps* can be exported abroad and will contribute development of national economy.

III. Contents and Scope of the Study

A. Batch and fed-batch culture of *Cordyceps sinensis* and development of processed foods using its mycelium and culture broth

In a flask culture of *C. sinensis*, the effect of carbon sources, organic and inorganic sources, and minerals were studied based on the dry weight of mycelium. Optimal medium was formulated from the estimation of response surface method. In a batch culture using bioreactor, fermentation parameters such as medium composition, pH, and aeration were optimized to increase the production of mycelium and cordycepin. In order to maximize their production in a fed-batch culture, control of pH and aeration, pulsed-feed strategy were tried. The mycelium and culture broth were used to formulate a beverage and tablet products.

B. Process development for mycelium, polysaccharide and cordycepin production by liquid cultivation of *Paecilomyces tenuipes*

This study was concentrated on the development of production process for the optimal mycelial growth, polysaccharide, and cordycepin in liquid culture of *P. tenuipes* using bioreactor.

C. Biological efficacy and development for artificial mycelial cultivation technology of *Cordyceps militaris*

The maximum artificial cultivation of *Cordyceps militaris* mycelium are carried out the effect of carbon sources, organic and inorganic sources, minerals and vitamins. In addition, the scientific re-discovery of the broad medicinal effects and utilization of the *Cordyceps militaris* in

immunoregulatory, antitumor, antithrombosis, and induction of dopaminergic neurons, neurotrophic factors, and cytokines, as well as in preclinical *in vitro* and *in vivo* usage, has been studied.

D. Development for mycelium fermentation technology and artificial cultivation technology of *Cordyceps sp.*

Cordyceps and *Isaria* were collected at Mt. Jiri, Mt. Sorak, Mt. Hanla national park. Identification and classification were used observation of shape, microscope, ecology and references. Unrecorded *Cordyceps* and *Isaria* were described with their characteristics. Excellent hyphae of *Cordyceps* and *Isaria* were selected with spores separation and tissue culture. Excellent strains were selected with fruiting body experiment. Compound contents of *Cordyceps* and *Isaria* were experimented in the level of protein compound and amino acid. Comparative experiments of *Isaria* were experimented by open and close of culture bottles. Mass culture were cultivated with plate culture of *Cordyceps* and *Isaria* and counted numbers.

IV. Results and Recommendation

A. Batch and fed-batch culture of *Cordyceps sinensis* and development of processed foods using its mycelium and culture broth

In order to maximize the production of mycelium of *C. sinensis* and cordycepin, optimal conditions of a batch and fed-batch cultures were studied. A beverage and a tablet products were formulated from its mycelium and culture broth. In flask and batch cultures, medium, control of pH and dissolved oxygen, and aeration were optimized. Control of medium composition, pH, and dissolved oxygen and pulsed-feed strategy in a fed-batch culture yielded dry mycelium weight of 44.3 g/L and cordycepin of 56.1 mg/L. A cordycepin, an extracellular metabolite of *C. sinensis*, was found

in a culture broth. Considering that the cordycepin content in fruiting body and host of *c. sinensis* was 30.1 mg/100 g and 18.9 mg/100 g, respectively, its production using a bioreactor might be competitive with a natural mushroom.

B. Process development for mycelium, polysaccharide and cordycepin production by liquid cultivation of *Paecilomyces tenuipes*

This study was concentrated on obtaining the optimal mycelial growth, polysaccharide and cordycepin production conditions in liquid culture of *P. tenuipes*. YMP medium for mycelial growth and polysaccharide production was the best as a basal medium.

In a flask culture, the optimal culture conditions and the medium compositions for the polysaccharide production were examined. The culture conditions were 27 °C, 200 rpm and the inoculum size 2 % (v/v) with the initial pH 7. Modified medium for the polysaccharide production contained glucose 30 g, yeast extract 20 g, KH_2PO_4 0.5 g and $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g per liter. The biomass concentration was 22 g/L at 4th day of the cultivation and the polysaccharide production was 2.3 g/L at 5th day. In batch culture using a bioreactor, the maximum biomass concentration was 23.1 g/L at 2nd day and the polysaccharide production was 2.5 g/L at 5th day of the cultivation with 400 rpm and 1.0 vvm.

To increase biomass concentration and polysaccharide production, 10 g/L of glucose was added at 1.5th day of the cultivation under the optimal culture conditions. Since this extra addition, 5 g/L of glucose was repeatedly added every 12 hours until 3.5th day. In results, the biomass concentration and the polysaccharide production were 29.2 g/L and 3.3 g/L, respectively.

The modified medium for the cordycepin production was optimized into including glucose 10 g, yeast extract 20 g, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 5 g, histidine 2 g and CaCO_3 1 g per liter. The wall growth was solved from the fed-batch

fermentation. The feeding medium(glucose) concentration was varied from 50 g/L to 400 g/L and the feeding time was controlled by pH signal. In results, the biomass concentration and the polysaccharide production were 20.3 g/L and 32 mg/g cell, respectively when the feeding medium concentration was 50 g/L. And the biomass and the cordycepin production were 33.3 g/L and 2.3 mg/g cell, respectively when the feeding medium concentration was 400 g/L.

With the results from the fed-batch fermentation, the large scale(500 L) was applied in order to elucidate the possibility for scale-up, resulting in showing the similar results.

C. Biological efficacy and development for artificial mycelial cultivation technology of *Cordyceps militaris*

The optimal cultural and nutritional conditions for the mycelial production from *C. militaris* were investigated in synthetic media. The results are summarized as follows. The optimal temperature, pH, and the duration of culture for the mycelial production was 25°C, 7.0 and 10 days, respectively. Among the nitrogen sources, proteose-peptone was higher yield in mycelium, but nitrite nitrogen inhibited. The higher yield was obtained with 0.3% peptone. The optimum concentrations of KH_2PO_4 and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ were about 0.04 and 0.02% for the mycelial production, respectively. Among the vitamins used, we are obtained 30.8 g/ℓ mycelial dry weight by thiamin-HCl. In addition, the optimal condition of *C. militaris* is for mycelium; 23~25°C, 75% humid, and for fruiting body; 18~20°C, 90~95% in humid.

The crude extracts obtained from *C. militaris* has been known to have an efficacy to excessive tiredness, persistent cough, debility, anemia, asthma, and cancer. Thus, in this report, we investigated that *C. militaris* extracts induced IGIF and BDNF mRNA at transcriptional level via P1 promoter region and BDNFpM1.2, respectively. Since IGIF has a important role to cell-mediated

immunity and BDNF has potent trophic effect on dopaminergic neurons, the inductions of IGIF, GDNF, NGF and BDNF by *C. militaris* extracts suggests that *C. militaris* extracts have a potential to be developed as an immune activator or neurotrophic factors.

We also observed to induce the expression level of tyrosine hydroxylase gene and neurotrophic factors related to Parkinson's disease. Next, in anti-tumor activity, *C. militaris* extract was screened for cytotoxicity on several cancer cell lines by WST-1 assay. The result showed that tumor cell propagation was inhibited according to concentrate of the extract. Moreover, fibrinolytic protease from *C. militaris* was slightly inhibited by all metal ions, especially inhibited by PMSF, indicating that the enzyme is a serine protease. The result showed that the fibrinolytic protease from the *C. militaris* has a fibrinolytic activity *in vivo* and *in vitro*.

So, these might be developed as a therapeutic agent for the treatment of thrombic disease and a nutritional and health-promoting values of various sources of *Cordyceps* products as nutraceuticals related biological activity of *C. militaris*.

D. Development for mycelium fermentation technology and artificial cultivation technology of *Cordyceps sp.*

Result of this study was the collection of 52 fruiting bodies from 22 *Cordyceps* and 9 *Isaria* species. Nine strains of *Cordyceps* and 8 of *Isaria* were the excellent strains. Also there were 4 unrecorded species in Korea. In the comparative experiment of *Isaria*, open and closed culture bottles were used. Compounds of *Cordyceps* are consisted of many kinds of amino-acid. In a mass culture, plate is used and it is strongly recommended for mass culture. Pure separation techniques of spores and tissue from wild *Cordyceps* were provided to farm house. Technical methods of fruiting body formation were studied. It is possible to preserve of many strains of *Cordyceps* and

Isaria and to help people who want to work in agriculture. Many health foods could be developed by using *Cordyceps* and *Isaria*. Also, they are expected to be exported. In a low expence, it is possible to provide fungi to farmers who want to make high income.

CONTENTS

Summary in Korean	
Summary in English	
Chap. 1. Batch and Fed-batch Culture of <i>Cordyceps sinensis</i> and Development of processed foods using its mycelium and culture broth	
§1. Introduction	
§2. Materials and Methods	
1. Cell line	
2. Media and Culture conditions	
3. Analysis	
§3. Results and Discussion	
1. Optimization of culture conditions	
2. Optimization of medium compositions	
3. Batch culture	
4. Batch culture using pulsed-feeding strategy	
5. Fed-batch culture	
§4. Development of processed foods	
§5. References	
Chap. 2. Process Development for Mycelium, Polysaccharide and Cordycepin Production by Liquid Cultivation of <i>Paecilomyces tenuipes</i>	
§1. Introduction	10
§2. Materials and Methods	14
2.1. Experimental materials	14
2.2. Culture conditions	14
2.3. Analysis	16
§3. Results and Discussion	20

3.1. Inquiry of growth conditions in <i>Paecilomyces tenuipes</i>	20
3.2. Process development for liquid cultivation	36
3.3. Optimization of cell growth using bioreactor	72
§4. Conclusions	93
§5. References	95

Chap. 3.

Section 1. The optimal cultivation of *Cordyceps militaris*

§1. Introduction	
§2. Materials and Methods	
1. Cell line	
2. Media and Culture conditions	
§3. Result and Discussion	
1. Production of mycelium	
2. Optimal condition for large scale production of <i>C. militaris</i>	
§4. References	
§5. Summary	

Section 2. Induction of physiological activating material by *C. militaris*

§1. Introduction	
§2. Materials and Methods	
2.1. Crude extract from <i>C. militaris</i>	
2.2. Cultivation of animal cell line and experimental animals	
2.3. Treatment of LPS and crude extract <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i>	
2.4. Isolation of total RNA	
2.5. Reverse transcriptase(RT)-PCR	
2.6. DNA sequencing and analysis	
2.7. Production of DNA probe	
2.8. Northern blot hybridization	
2.9. INF- γ assay by treated LPS and <i>C. militaris</i> extract	

2.10. Isolation of chromosomal DNA	
2.11. Immunohistochemistry for the expression and identification of IGIF gene	
2.12. Ligation and transformation	
§3. Results and Discussion	
3.1. The expression of IGIF and BDNF gene from mouse's brain and liver treating <i>C. militaris</i> extract and LPS	
3.2. The expression of the IGIF gene from mouse's kidney and each part of mouse brain treating <i>C. militaris</i> extract and LPS	
3.3. The expression of IGIF gene by the treatment of water and ethanol extracts	
3.4. The expression of IGIF and IFN- γ gene by treatment of LPS and <i>C. militaris</i> extracts in PC12 cell line.	
3.5. The cloning and sequencing analysis of IGIF and BDNF gene	
3.6. The cloning and sequencing analysis of expressed IGIF and IGIF isoform in PC12 cell line.	
3.7. The active measurement of INF- γ in PC12 cell line	
3.8. Northern blotting analysis	
3.8. Immunohistochemistry	
3.9. Promoter research and CAT assay of IGIF gene	
3.10. Promoter research and CAT assay of BDNF gene	
3.11. Gene expression of neurotrophic factors	
3.12. Induction of GDNF gene in PC12 cell line	
3.12. Anti-cancer activity of <i>C. militaris</i>	
§4. Summary	
§5. References	
Section 3. The induction of tyrosine hydroxylase treated by <i>C. militaris</i> extract	
§1. Introduction	

§2. Materials and Methods	
2.1. Samples	
2.2. The cultivation of animal cell line and experimental animals	
2.3. Isolation of total RNA	
2.4. Reverse transcriptase(RT)-PCR	
2.5. Western blotting assay	
2.7. Immunohistochemistry	
§3. Results and Discussion	
3.1. Induction of TH mRNA treated by <i>C. militaris</i> extract using RT-PCR	
3.2. The level of TH protein treated by <i>C. militaris</i> extract using western blotting	
3.3. Observation of TH-IR neuron treated by <i>C. militaris</i> extract using immunohistochemistry	
§4. Summary	
§5. References	

Section 4. The effect of fibrinolysis by *C. militaris*

§1. Introduction	
§2. Materials and Methods	
2.1. The screening of proteolytic and fibrinolysis activity	
2.2. The purification of fibrinolytic enzyme from <i>C. militaris</i>	
§3. Results and Discussion	
3.1. Proteolytic activity of <i>C. militaris</i> extract	
3.2. Fibrinolytic activity of <i>C. militaris</i> extract	
3.3. The purification of fibrinolytic enzyme	
3.4. The effects of fibrinolysis <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i>	
3.5. The effects of cofactors	
§4. Summary	

§5. References	
Chap. 4. Selection of Excellent Strains of <i>Cordyceps</i> and Mass Culture	
§1. Introduction	
§2. Collection and Classification of <i>Cordyceps</i>	
1. Collection of <i>Cordyceps</i>	
2. Characteristics of <i>Cordyceps</i>	
3. Collection (1)	
4. Collection (2)	
5. Collection (3)	
§3. Experiment of Fruiting Body in <i>Cordyceps</i>	
1. Methods	
2. Experiment of Fruiting Body (1)	
3. Experiment of Fruiting Body (2)	
4. Experiment of Fruiting Body (3)	
5. Experiment of Fruiting Body (4)	
§4. Sele selection strains	
1. Selection (1)	
2. Selection (2)	
§5. Comparative Experiment of <i>Cordyceps</i>	
1. Comparative Experiment of Close form and Open form	
4. Results	
§6. Mass Culture	
1. Purpose	
2. Mass culture by plate	
3. Methods	
4. Results	
§7. Compounds	
1. Analysis of Protein and Amino acid	

2. Compounds

§8. Results

1. Collection of *Cordyceps*
2. Excellent Strains
3. Comparative Experiment
4. Mass Culture
5. Compounds of *Cordyceps*

목 차

국문요약문	
영문요약문	
제1장 <i>Cordyceps sinensis</i> 균사체 배양 및 가공식품 개발	
제1절 서론	
제2절 재료 및 방법	
1. 균주	
2. 배지 및 배양조건	
3. 분석	
제3절 결과 및 고찰	
1. 자료의 수집과 정리 및 균주 확보	
2. 최적 성장조건 검토	
3. 최적 배지 조성 검토	
4. 회분 배양	
5. 회분 배양의 응용	
6. 유가식 배양	
가. pH-stat 방법의 적용	
나. 일정비율 공급방법의 적용	
제4절 <i>C. sinensis</i> 균사체를 이용한 가공식품 개발	
제5절 참고문헌	
제2장 눈꽃동충하초(<i>P. tenuipes</i>) 액체배양을 통한 균사체 및 생리활성물질 생산공정 개발	
제1절 서론	
1.1. 배경	
1.2. 배양전략	
제2절 재료 및 방법	1

2.1. 실험재료	14
2.2. 배양조건	14
2.3. 분석	16
제3절 결과 및 고찰	20
3.1. <i>P. tenuipes</i> 의 성장조건 구명	20
가. 고수율 균주 개발	20
나. 최적 성장조건 검토	20
다. 최적 배지조성 검토	24
3.2. 액체배양공정 개발	36
가. 목적산물생산 촉진 및 저해요인 검토	36
나. 배양조건 변화에 따른 목적산물 생산 변화 검토	38
다. 동충하초의 효능 물질인 cordycepin 분석 방법 설정	47
3.3. 생물반응기에서 균사체 증식의 최적화	72
가. 고농도 배양공정 개발	72
나. Fed-batch culture 기술의 적용	77
다. 생산성 극대화를 위한 생산공정 개발	85
제4절 결론	93
제5절 참고문헌	95

제3장 *Cordyceps militaris*의 대량생산기술의 개발과 효능연구

제1절 <i>C. militaris</i> 의 최적배양 조건	
1. 서론	
2. 재료 및 방법	
가. 공시균주	
나. 배지의 조제	
3. 결과 및 고찰	
가. 균사체의 생산	
나. <i>C. militaris</i> 대량배양사의 최적조건	
4. 적요	

5. 참고문헌	
제2절 <i>C. militaris</i> 추출물처리에 의한 생리활성물질 유도	
1. 서론	
2. 재료 및 방법	
가. <i>C. militaris</i> 추출물 조제	
나. 세포배양 및 실험동물	
다. LPS와 <i>C. militaris</i> 추출물의 <i>in vivo</i> 와 <i>in vitro</i> 처리	
라. Total RNA의 분리	
마. Reverse transcription(RT)-PCR	
바. DNA sequencing과 분석	
사. DNA probe 제작	
아. Northern blot hybridization	
자. LPS와 <i>C. militaris</i> 추출물의 처리에 의한 IFN- γ Assay	
차. Chromosomal DNA 분리	
카. CAT assay를 위한 pCAT vector의 제작	
타. 세포내도입(Transfection)과 CAT 정량	
파. IGIF 유전자의 발현여부 확인을 위한 Immunohistochemistry	
하. Ligation과 transformation	
3. 결과 및 고찰	
가. <i>C. militaris</i> 추출물과 LPS를 처리한 생쥐의 뇌와 간에서 IGIF와 BDNF유전자의 발현	
나. <i>C. militaris</i> 추출물과 LPS를 처리한 쥐뇌의 각부위와 신장에서 IGIF 유전자의 발현	
다. <i>C. militaris</i> 추출방법에 따른 IGIF 유전자의 발현	
라. LPS와 <i>C. militaris</i> 추출물을 처리한 PC12세포에서의 IGIF와 IFN- γ 유전자의 발현	
마. IFIG와 BDNF 유전자의 클로닝 및 염기서열 분석	
바. PC12세포에서 발현되는 IGIF와 IGIF Isoform 유전자의 클로닝 및 염기서열 분석	

사. PC12세포에서의 IFN- γ 의 활성 측정	
아. Northern blot analysis	
자. Immunohistochemistry	
차. IGIF 유전자의 promoter 부위의 cloning 및 CAT assay	
카. BDNF 유전자의 promoter 부위의 cloning 및 CAT assay	
타. Neurotrophic factor 유전자 발현	
파. PC 12 세포에서 GDNF 유전자 발현유도	
하. <i>C. militaris</i> 의 항암효과	
4. 적요	
5. 참고문헌	
제3절 <i>C. militaris</i> 추출물처리에 의한 Tyrosine Hydroxylase 유전자의 유도	
1. 서론	
2. 재료 및 방법	
가. 시료	
나. 세포배양 및 실험동물	
다. Total RNA의 분리	
라. Reverse Transcriptase(RT)-PCR	
마. Western blotting assay	
바. 면역조직화학적 염색	
3. 결과 및 고찰	
가. RT-PCR에 의한 TH mRNA의 발현양상	
나. Western blotting analysis에 의한 Tyrosine Hydroxylase 단백질 수준	
다. 면역조직화학적 염색에 의한 TH-IR neuron 형태 및 유도발현 관찰	
4. 적요	
5. 참고문헌	
제4절 <i>C. militaris</i> 의 혈전분해효과	
1. 서론	
2. 재료 및 방법	
가. 단백질분해작용 및 혈전분해작용 검색	

나. 혈전분해효소의 정제	
3. 결과 및 고찰	
가. 추출물의 단백질분해활성	
나. 추출물의 혈전분해작용	
다. 혈전분해효소의 정제	
라. <i>In vivo</i> 와 <i>in vitro</i> 에서 혈전분해	
마. 혈전분해효소의 활성화에 미치는 factor	
4. 적요	
5. 참고문헌	

제4장 동충하초의 우량균주 개발과 대량재배

제1절 서론

제2절 동충하초의 채집과 분류

1. 동충하초의 채집
2. 본 연구에서 사용된 동충하초의 특성
3. 채집 (1)
4. 채집 (2)
5. 채집 (3)
6. 채집 (4)

제3절 동충하초의 자실체 발생실험

1. 실험방법
2. 자실체 발생실험 (1)
3. 자실체 발생실험 (2)
4. 자실체 발생실험 (3)
5. 자실체 발생실험 (4)

제4절 선발균주

1. 선발균주 (1)
2. 선발균주 (2)

제1장 *Cordyceps sinensis* 종균과 균사체 증식

제1절 서론

동충하초란 겨울에는 숙주인 곤충 몸에서 균사체를 번식시키다가 여름에는



풀(정확히 표현하면 버섯 자실체)처럼 돋아나오는 모습에서 연유된 버섯의 일종으로

대부분이 子囊菌綱(*Ascomycetes*), 麥角菌目(*Clavicipitales*), 麥角菌科(*Clavicipitaceae*)에 속하며 코르디셉스속(*Cordyceps*), 포도네트리아속(*Podonectria*), 토루비엘라속(*Torrubiella*)이 대표적이다. 현재는 곤충을 포함한 절지동물, 균류 또는 고등 식물의 종자에 기생하는 균류에 속하는 모든 균류를 넓은 의미에서 동충하초라고 부른다¹⁾.

천연 동충하초는 티벳 등지의 고원지대(해발 3,500 m 이상)에서 서식하는데 채취량이 한정되고, 수요가 급증하면서 자원이 고갈되어 가고 있는 실정이다. 따라서 국제 거래에서 가격이 970 \$/kg으로 매우 고가의 소재로 식품의 원료로 사용하기란 현실적으로 불가능한 실정이다. 동충하초 재배기술보다는 발효기술이 발달한 미국과 일본 등지에서는 버섯의 경우 균사체와 자실체의 구성성분이 매우 유사하다는 점에 착안하여 동충하초 균사체 배양기술을 이용하여 균사체 추출물(mycellium extract)을 생산, 판매하고 있다.

동충하초는 자양강장 효과가 있다고 알려져 있는데 Liu Chang-Xiao 연구진²⁾은 마우스에 동충하초를 급여하고 강제수영실험을 실시한 결과 대조구의 평균 수영시간은 56.3 분이었으나 동충하초 8 g 투여구의 수영시간은 81.2 분으로 동충하초가 지구력을 높여줄 수 있음을 보고하였다. 동충하초는 항암활성이 우수한 것으로 보고되고 있는데, 이는 주로 대부분의 담자균류 버섯에서 생산되는 β -D-glucan polysaccharide의 항암작용에 기인하며 또한 동충하초에 존재하는 cordycepin (3'-deoxyadenosine)에 의한 종양세포의 mRNA 합성저해에 기인한다고 알려져 있다³⁾. 최근에는 polysaccharide와 cordycepin 이외의 제 3의 물질에 의한 항암작용 가능성이 제기되기도 하였다⁴⁾. 동충하초는 또한 면역증강제로서의

효과가 있으며⁵⁾, 혈당강하 또는 콜레스테롤 저하 효과에 대해서도 보고된 바 있으며^{6,7)}, 생체 내에서 superoxide anion에 의한 세포막 계통 과산화물 생성을 감소시킬 수 있다는 연구가 보고된 바 있다⁸⁾. 동충하초 특히, *Cordyceps sinensis* 균주의 각종 생리활성, 동물 및 임상시험에 대한 과학적인 자료는 Zhu 등이⁹⁾ 정리한 총설이 있다.

동충하초의 건강기능성이 알려지면서 국내에서는 1998년 7월에 보건복지부에서 동충하초(*Paecilomyces japonica* 또는 *P. tenuipes* 품종)를 식품가공 원료로 사용할 수 있도록 허가한 이후 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*)도 식품으로 허가하였는데 이들은 모두 누에 또는 번데기를 기주로 재배한 제품이다. 그런데 위에 서술한 동충하초는 거의 모두가 자연산 동충하초(*C. sinensis*) 품종의 효능에 관한 연구이며 국내에서 유통되고 있는 품종에 관한 연구결과는 매우 미진한 실정이다.

현재 동충하초를 원료로 한 가공식품이 여러가지 유통되고 있는데, 영지의 경우처럼 초기에는 버섯의 자실체를 원료로 사용했으나 균사체 배양기술이 개발된 이후 영지 균사체를 원료로 대체하여 사용하는 것처럼 동충하초도 발효기술이 개발된다면 균사체가 함께 사용되리라고 예상된다. 국내에서는 강원대 성재모 교수가 연구용 종균배양 기술에 관한 연구를 수행해 왔으나, 삼각플라스크를 사용한 실험실 규모이며, 생물반응기(jar fermentor)를 이용한 동충하초 종균 액체배양과 균사체 증식기술 개발에 관한 연구는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 자연산 동충하초의 균사체 배양을 목적으로 회분식 및 유가식 배양에 관한 연구를 수행하였고, 배양한 균사체를 원료로 가공식품 2종을 제조하였다.

제2절 재료 및 방법

1. 균주

본 실험에 사용된 균주는 자낭균류의 일종인 *Cordyceps sinensis*(Berk.) Sacc.이다. 균주의 보관을 위해 MEPA(Malt extract peptone agar)를 사용하였으며 4 주마다 계대배양을 하였으며 4°C에서 보관하였다. 전배양을 위해 균주를 MEP medium에서 5 일간 배양한 후 10 mL을 취하여 멸균된 glycerol 4 mL과 증류수 2 mL을 잘 혼합하여 20 mL stock vial에 분주한 후, -70°C에서 glycerol stock으로 보관하여 seed culture 때마다 새로운 stock을 꺼내 사용하였다.

2. 배지 및 배양조건

균체의 seed culture를 위해 사용된 배지(MEP)의 조성은 malt extract 30 g/L 및 Soya peptone 3 g/L이었다. 본배양의 플라스크 배양에서는 SDY (Sabouraud dextrose yeast extract broth)와 MSM(Modified synthetic medium) 배지를 이용하였으며 그 기본조성은 다음과 같다. SDY medium은 glucose 40 g/L, peptone 10 g/L, yeast extract 10 g/L이었고 MSM medium은 maltose 20 g/L, proteose peptone 40 g/L, potassium nitrate 5.0 g/L, ammonium chloride 0.5 g/L, calcium chloride dihydrate 2 g/L이었다. 생물반응기를 이용한 배양에서는 MSM medium을 이용하였다. 발효를 위한 seed culture는 냉동보관된 glycerol stock을 8 mL 취하여 250 mL Erlenmeyer flask(working volume 100 mL)에 접종한 후 전배양 하였다. 여러 차례에 걸친 계대배양을 행한 후 5 일간 배양하여 지수기 성장 단계에 있는 활성 높은 seed를 접종원으로 사용하였다. 플라스크 배양은 shaking incubator(Vision Scientific Co., VS-8480SR)를 사용하여 2%(v/v)로 seed를 접종한 후, 배양 조건을 24°C, 120 rpm, 초기 pH 5.5로 조절하여 배양을 하였다. 회분배양과 유가식 배양은 5 L 생물반응기(BioTron, Inc., Fig. 1)에서 회분배양은 working volume을 3 L, 유가식 배양은 초기 working volume을 2 L로 하여 3%(v/v)로 seed를 접종한 후 24°C, 150~450 rpm, 1.0 vvm으로 조절하여 배양을 실시하였다. 유가식 배양에서 기질 공급은 pH

Fig. 1. Photograph of 5 L Jar-Fermentor used for *C. sinensis*.



signal에 의한 pH Stat과 일정비율공급 방법 (Constant feeding strategy)^{10,11)}에 의해 maltose 공급배지를 만들어 주입하였다. 소포제로는 식품용으로 쓰이는 silicon resin을 증류수로 10 배 희석하여 첨가하였다. pH는 2N HCl과 2N NaOH를 사용하여 조절하였다.

3. 분석방법

가. 균체량 분석

균체농도는 건조중량(Dry Cell Weight, DCW)을 기준으로 측정하였다. 건조 균체량은 세포 배양액을 filter paper (Whatman No. 4)를 사용하여 증류수로 2회 세척하여 감압여과한 후 80°C에서 항량이 될 때까지 건조하여(약 24 h) 측정하였다.

나. Maltose 분석

배양액 중의 maltose 분석은 세포배양액을 filter paper(Whatman No. 4)를 사용하여 균체와 배양여액으로 분리한 후 얻은 배양여액을 maltose kit (R-Biopharm Co., C1113950)를 사용하여 측정하였다. 배양여액을 분석 범위 내에 들어가도록 희석하여 사용하였으며, 낮은 농도(<0.5 g/L)에서는 분석 절차상 희석을 생략하였다. 다음의 반응을 수행한 후 분광광도계(Spectronic Co., GENESYS 5)를 사용하여 340 nm에서 흡광도를 측정하였다.

- 1) Maltose + H₂O *α-glucosidase* 2 D-glucose
- 2) D-glucose + ATP *Hexokinase* G-6-P + ADP
- 3) G-6-P + NADP⁺ *G6P-DH* D-gluconate-6-phosphate +
NADPH + H⁺



$$4) \text{ maltose (g/L) = } \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v \times 1000 \times 2} \times \Delta A$$

여기서, V = final volume(mL)

v = sample volume(mL)

MW = molecular weight of the substance to be assayed(g/mol)

d = light path(cm)

ε = extinction coefficient of NADPH

ΔA = (A₂-A₁)sample- (A₂-A₁)blank

다. Cordycepin 분석

균체배양액을 균사체와 배양여액으로 분리하여 균사체는 95℃에서 6 h 동안 열수추출을 한 후 filter paper(Whatman No. 2)를 사용하여 감압 여과하였다. 열수추출 여과액과 배양 여액에 각각 4 배 분량의 ^{cordycepin 7.768} ethanol을 가하여 4℃에서 24 h 방치하였다. 이것을 6,000 rpm에서 25 min 동안 원심분리하여 상등액만을 취해 완전히 감압 증발시킨 후 0.45 μm의 membrane filter로 여과한 다음 HPLC (Waters, Model 930)로 분석하였다. 표준품의 HPLC chromatogram과 표준곡선 (standard curve)은 Fig. 2에 나타내었다.

Standard : Cordycepin (Sigma-Aldrich Chemical Co., C3394)

Column : μBondapak C₁₈ (300 mm L × 3.9 mm ID, Waters)

Detector : UV detector (260 nm, Waters)

Mobile phase : 0.1% TFA : Acetonitrile (9:1)

Flow rate : 0.5 mL/ min

Sample size : 20 μl

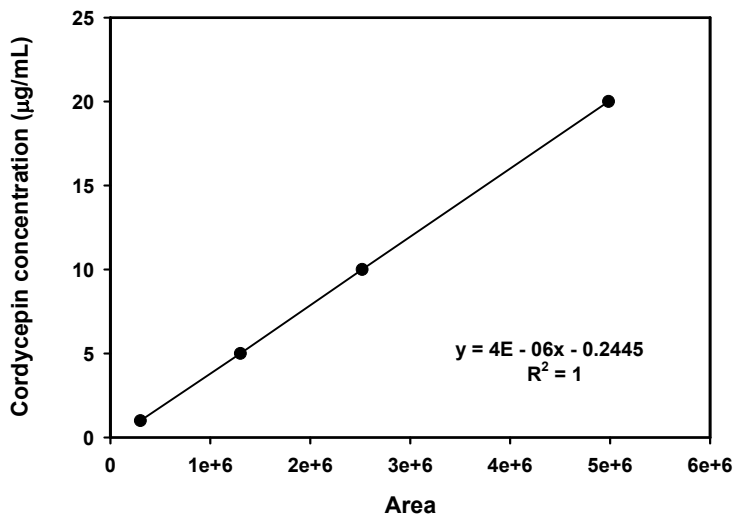
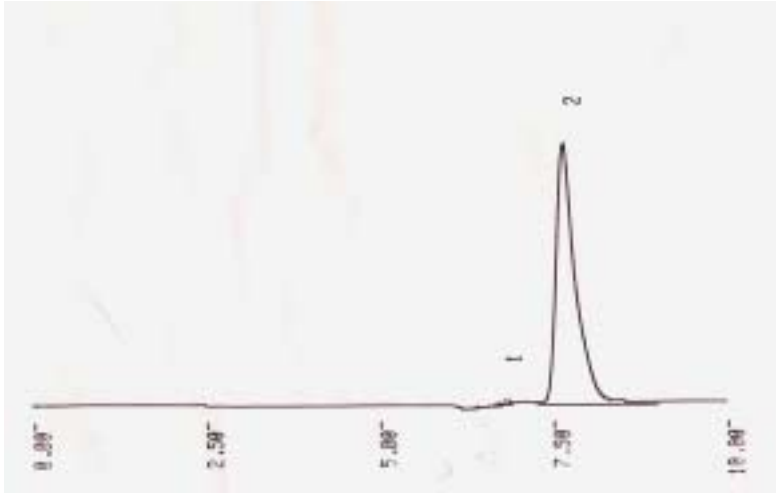


Fig. 2.
H P L C
chromato
g r a m
a n d
standard
curve of
cordycepi
n.

제3절 결과 및 고찰

1. 자료의 수집과 정리 및 균주 확보

가. 자료의 수집과 정리

*C. sinensis*의 균사배양에 대한 자료는 문헌 및 기타 참고자료도 찾아보기 어려웠으므로 *P. tenuipes* 균주의 배양 및 기타 버섯류의 배양 및 영양적 특성에 대한 자료를 확보하여 분석하였다. 확보된 자료는 논문류 60 여편, 서적 10 종, 기타 자료 3 종 등이었다.

나. 균주 확보

C. sinensis 균주는 지리산 등지에서 야생하는 균주를 직접 선별하여 사용하였다. 선별된 균주는 우선 외형적인 모양 및 기주하는 곤충이 박쥐나방 유충이었으므로 *C. sinensis*로 동정하였다. 또한 PCR을 통한 유전적 계통 조사에 의해 동정된 *C. sinensis*의 자실체로부터 자낭포자를 분리하여 MEPA와 PDA와 YMA배지등에서 배양과 여러 차례에 걸친 계대배양을 반복적으로 행하여 morphology가 안정되고 균사체 성장이 빠른 활성있는 *C. sinensis* 균주를 확보하였다. 확보된 균사체는 MEP 배지에서 액체 배양하여, 접종원에 따른 실험오차를 극복하기 위하여 세대가 동일한 균사체 배양액을 -70°C 에서 Glycerol stock으로 보관하여 Seed culture시마다 새로운 stock을 꺼내 사용하였다.

2.. 최적 성장 조건 규명

가. 액체배지 선별

C. sinensis 균주의 최적 배지조성을 알아보기 위하여 기본배지를 선별하기 위해 250 mL Erlenmeyer flask(working volume 100 mL)에서 배지를 달리하여 배양을 하였다. 동충하초 재배에 사용되거나 기타 버섯류 재배에 사용된다고 알려져 있는 균사체 성장용 배지중 13 종을 선별하였다. 선별된 13 종의 배지에 활성화된 2%(v/v)의 seed를 접종하여 24°C , 120 rpm, 초기 pH 5.5에서 14 일간 배양하면서 dry cell weight를 측정하여 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 사용된 배지중 SDY(sabouraud dextrose yeast extract medium)가 8.72 g/L로 가장 높은 균사체 농도를 나타내었으며 그 다음으로 GCL(glucose ammonium chloride medium)이 6 g/L의 균체량을 보인 반면, CD(Czapek Dox medium)에서 1.72 g/L의 낮은

균체량을 나타내었다. SDY 배지에서의 균사체 농도는 CD와 PD(Potato dextrose medium)배지에 비하여 약 2~4 배 정도의 높은 균사체 농도를 나타내었으므로 *C. sinensis* 성장에 있어서 최적 배지임을 확인하였으며, 이를 균사체 배양용 기본배지로 선발하였다.

나. 접종농도의 영향

*C. sinensis*의 최적 성장 배지로 선정된 SDY 배지를 기본배지로 하여 접종 농도를 달리하여 배양을 실시한 후 배양일에 따른 균체량의 변화를 측정하여 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 접종 농도 5%(v/v)에서 배양 9 일에 8.83 g/L (DCW, dry cell weight)로 최대의 균체량을 나타내었지만, 접종 균체량이 상대적으로 적은 1%(v/v) 및 2%(v/v)의 경우 3% 이상의 접종량 보다 짧은 유도기를 거쳐 바로 대수기에 접어들었으며, 배양초기에 높은 균체량을 나타내었다. 접종 농도 2%에서 배양 7 일에 7.58 g/L의 높은 균체량을 나타내었기에 배양일수의 단축을 고려하기 위해 접종농도에 대한 비생육속도 (Specific growth rate, $\mu = 1/X \cdot dX/dt$)를 Fig. 5에 나타내었다. 초기 접종농도가 2%(v/v)일 때 0.635 day^{-1} 의 최대 비생육속도(μ_{\max})를 나타내었으며 2%(v/v) 이상의 접종량에서는 오히려 비생육속도가 감소하였다. 따라서 균체량과 비생육속도를 고려하여 2%(v/v)를 최적 접종량으로 선정하였다.

다. 온도의 영향

*C. sinensis*의 성장에 미치는 물리·화학적 요인중 배양온도, agitation 속도, 초기 pH를 독립변수로 하여 RSM(Response surface methodology) analysis를 실시하여 최적 성장 조건을 설정하고자 하였다. 그러나 요인변수들간에 상호

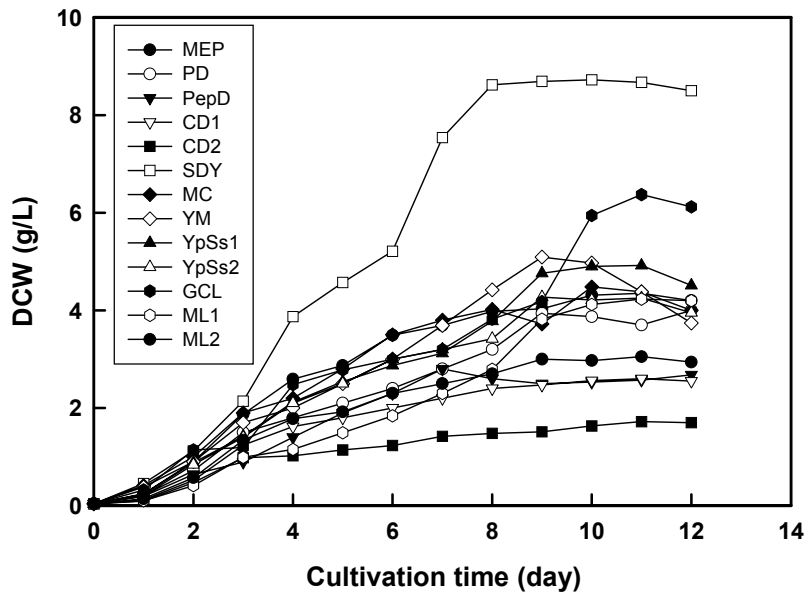


Fig. 3. Effects of various synthetic media on the mycelial growth of *C. sinensis* at 24°C and 120 rpm with the initial pH 5.5.

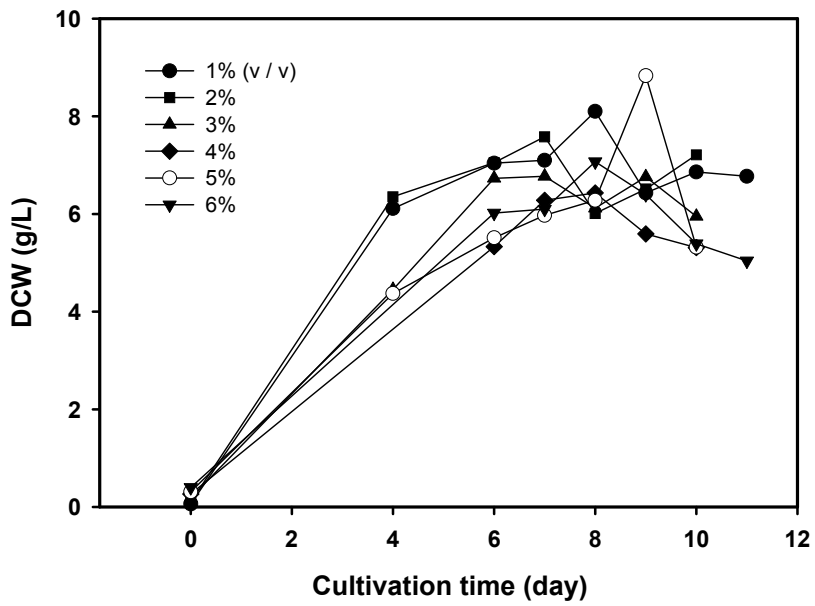


Fig. 4. Effects of inoculum concentrations on the mycelial growth of *C. sinensis* in SDY medium.

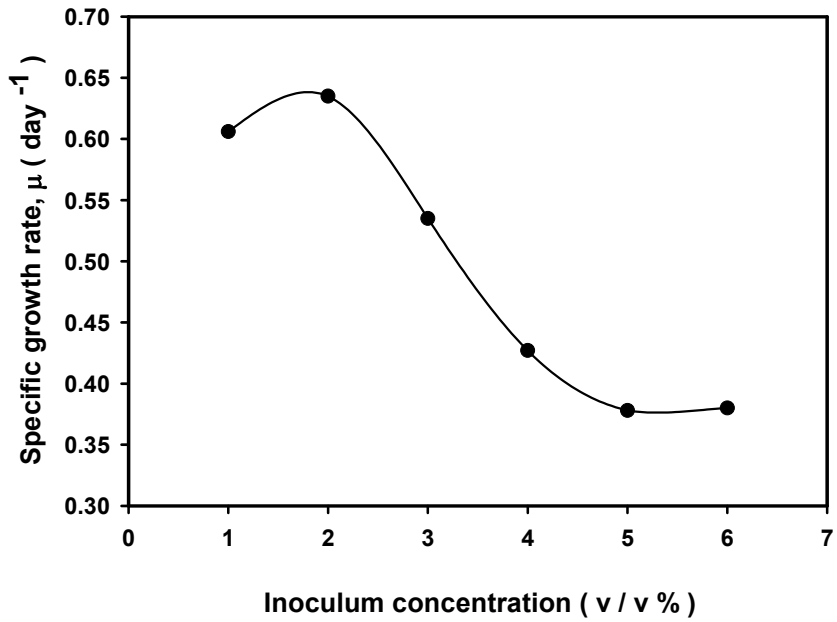


Fig. 5. Correlation between specific growth rate and inoculum concentration.

의존성이 매우 낮게 나타났으므로 요인변수들 중 한 변수를 제외한 모든 변수를 고정시키고, 한번에 한 변수만을 변화시켜 그 효과를 관찰하는 방법(one factor at a time method)으로 실험을 진행하였다. 그중 *C. sinensis*의 균사체 성장에 미치는 배양온도의 영향을 알아보기 위하여 배양온도를 14~34°C의 범위 내에서 4~6°C

간격으로 조정하여 건조 균체량을 측정된 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 접종농도 2%(v/v), 초기 pH 5.5, 교반속도 120 rpm의 배양조건 하에서 7 일간 배양을 한 것이다. 배양온도 24℃에서 7.2 g/L의 최대 균체량을 보였으며 18℃에서도 6.9 g/L의 비교적 높은 균체량을 나타내었다. 이는 *C. sinensis*가 배양온도 18~24℃의 낮은 온도 범위내에서 균체 성장이 활발히 이루어지는 것을 알 수 있는 결과이다. 이는 이미 보고된 *Lentinula edodes*, *Pleurotus eryngii*, *Hericiium erinaceus*, *Phellinus igniarius*, *Naematoloma sublateritium*의 담자균류 버섯과 유사한 결과를 보인다. 한편 *C. sinensis*는 24℃ 보다 높은 온도에서는 균체량이 급격히 감소하는 경향을 보였으며 34℃에서는 0.86 g/L의 매우 낮은 균체량을 나타내었다. 이로써 *C. sinensis*의 균사체 성장은 24℃ 보다 높은 온도에 대해서는 저해를 받는 것을 알 수 있었다. *C. sinensis*의 균사체 성장이 배양온도에 민감히 반응하는 것으로 보아 배양온도는 균사체 성장에 영향을 미치는 중요한 인자이며 24℃의 최적온도에서 균사체 배양을 하여야 함을 알 수 있었다.

라. pH의 영향

Fig. 7은 균사체 성장에 대한 pH의 영향을 알아보려고 초기 pH 3~8까지 달리하여 균체량을 측정된 결과이다. 초기 pH 4.5~6.5의 약산성에서 균체량이 높게 나타났으며 초기 pH 5.5에서 7.4 g/L의 최대 균체량을 보였다. 이는 pH 4.5~6.5의 약산성에서 균체량이 높게 나타났다는 *Phellinus igniarius*, *Naematoloma sublateritium*, *Agaricus bitorquis*, *Pleurotus ostreatus*의 연구보고와 일치하는 결과이다. 한편 pH 5.5 보다 낮은 pH에서는 균체량이 급격히 감소하였으며, pH 3에서는 3.4 g/L의 낮은 균체량을 나타내었다. 이는 산으로 쓰인 HCl이 세포독성을 일으켜 균사체 성장을 저해하는 것으로 판단되어진다. 이에 *C. sinensis*의 균사체 배양시 최적 초기 pH는 5.5로 결정하였다.

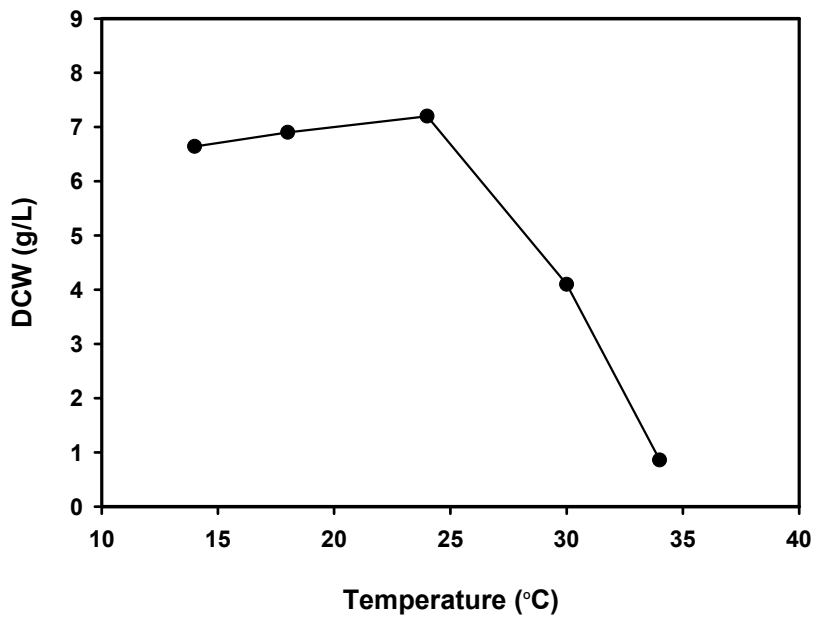


Fig. 6. Effects of culture temperature on the mycelial growth of *C. sinensis* in SDY medium.

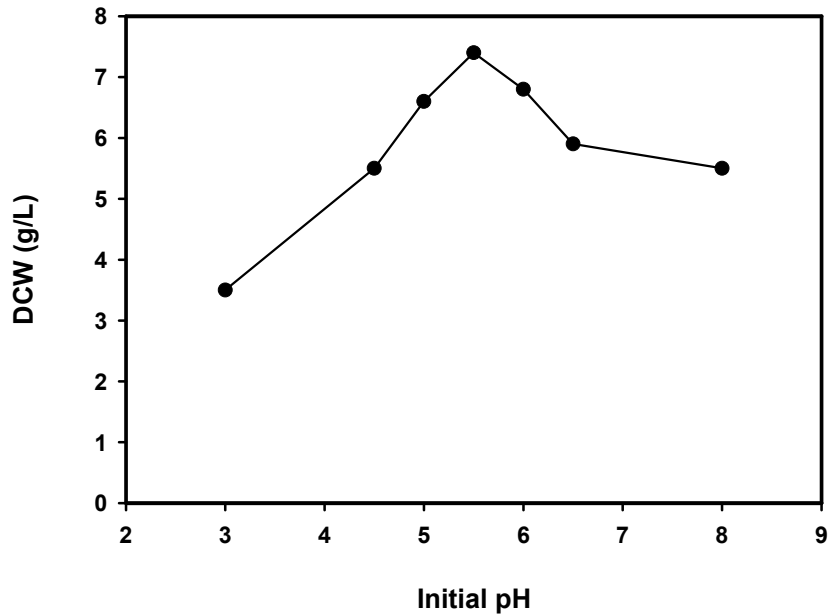


Fig. 7. Effect of pH on the mycelial growth of *C. sinensis* in SDY medium.

마. 교반속도의 영향

교반속도가 균체의 성장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 교반속도를 0~200 rpm으로 달리하여 균체량을 측정하여 Fig. 8에 나타내었다. 120 rpm의 교반속도에서 7.2 g/L의 최대 균체량을 보였다. 120 rpm보다 낮거나 높은 교반속도에서는 균체량이 감소함을 알 수 있었다. 이는 낮은 교반속도에서는 교반에 의한 물질전달이 충분하지 않아서 적절한 영양성분과 산소가 cell 내로 원활히 공급되지

않아 균체량이 감소하는 것으로 보이며, 160 rpm 이상의 높은 교반속도에서는 균체의 절단 및 균사의 형태에 변화를 주는 shear stress의 증가로 균체량이 감소하는 것으로 보인다. 따라서 교반에 의한 물질전달과 shear stress를 함께 고려할 때에 7.2 g/L의 최대 균체량을 보인 120 rpm을 최적교반속도로 선정하였다.

바. 최적 성장 조건에서의 경시변화

Fig. 9는 13 종의 배지중 기본배지로 선발된 SDY배지 상에서 최적 접종 농도, 배양온도, 초기 pH, 교반속도의 조건하에서 배양중 균체성장과 pH의 경시변화를 나타낸 것이다. 250 mL의 삼각플라스크(working volume 100 mL)에 2% (v/v)접종농도, 배양온도 24°C, 초기 pH 5.5, 교반속도 120 rpm의 배양조건 하에서 10 일간 배양을 한 것이다. 균체성장은 거의 유도기가 없이 대수기에 접어들었으며 배양 7 일에 7.58 g/L의 최대 건조균체량을 보였다. 한편, 세포내 수분의 변화는 대사활성을 예측할 수 있는 중요 척도이기에 세포내의 수분의 변화를 예측해보고자 균체의 생중량과 건조량의 경시변화를 살펴본 결과, 배양 전반부에 걸쳐 수분비의 변화는 거의 없는 것으로 나타났다. 이에 배양 조건의 최적화 실험시 건조균체량만을 언급하려한다. pH는 변화는 배양초기 균사체 성장이 활발히 이루어지면서 탄소원으로 쓰인 glucose를 소모함에 따라 초기 pH 5.5에서 대수기에는 pH가 급격히 하락하였다가 5~6일경부터 다시 증가하였으며 최대의 균체량을 나타내는 7 일경에 pH가 급격히 증가하였다가 이후 거의 일정하게 유지되는 특성을 나타내었다. 이상의 최적 성장조건하에서 보다 균체량을 증가시키기 위해 배지조성에 대한 연구가 진행되었다.

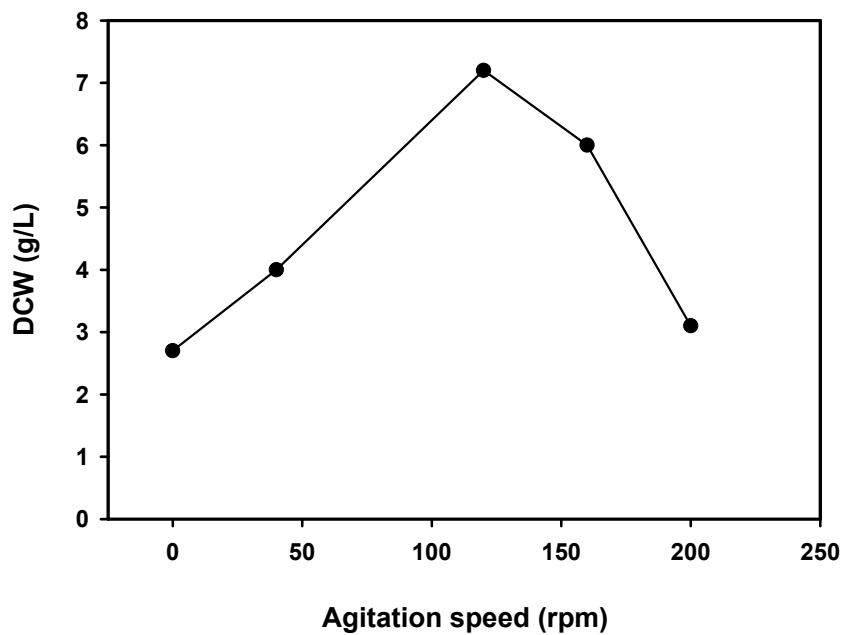


Fig. 8. Effects of agitation speed on the mycelial growth of *C. sinensis* in SDY medium.

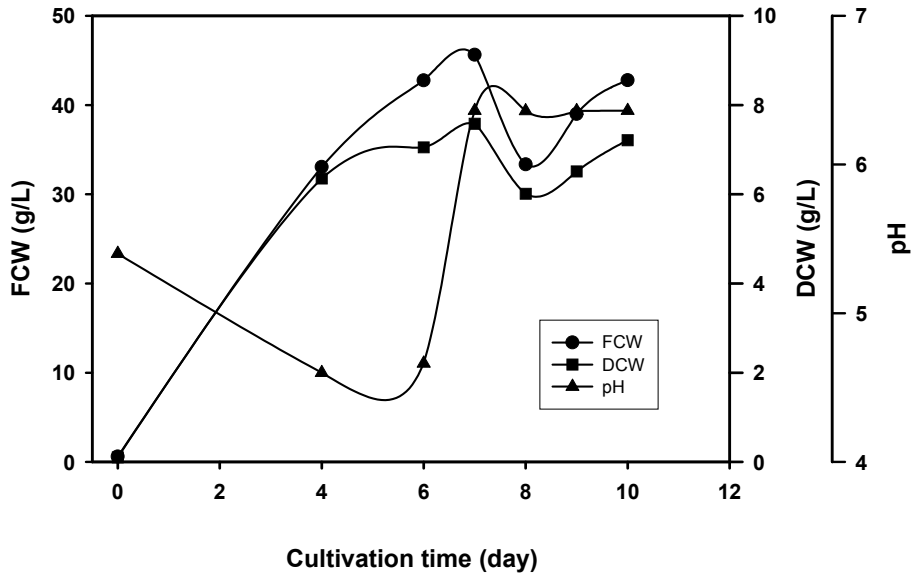


Fig. 9. Profiles of mycelial growth and pH at 24°C and 120 rpm with the initial pH 5.5 and 2% inoculum concentration.

3. 최적 배지 조성

가. 탄소원의 영향

기본 배지로 선정된 SDY 배지의 조성중 균체의 성장에 대한 탄소원의 영향을 알아보하고자 탄소원의 종류를 달리하여 7 일간 배양을 실시한 후 균체량을 측

정한 결과를 Fig. 10에 나타내었다. 배양조건은 최적 성장조건으로 선정된 2% v/v의 접종농도, 24°C, 120 rpm, 초기 pH 5.5 로 조절하여 배양하였다. 실험에 공시된 8 종의 탄소원중 maltose가 11.27 g/L로 최대 균체량을 나타내었으며 그 다음이 saccharose 및 starch 순으로 균체량이 높았다. 한편 lactose를 탄소원으로 사용했을 때 4.8 g/L로 가장 낮은 균체량을 나타내었다. 가장 균체량이 높게 나타난 maltose의 경우 SDY 배지의 탄소원인 glucose에 비하여 약 2 배정도 높은 균체량을 나타내었다. 실험에 공시된 8 종의 탄소원중 가장 균체량이 높게 나타난 maltose를 사용하여 0~10 % (w/v)의 농도 범위 내에서 2%(w/v) 간격으로 농도 변화를 주었다. 온도 24°C, 교반속도 120 rpm, 초기 pH 5.5 에서 7 일간 배양한 후 균체량을 측정하여 그 결과를 Fig. 11에 나타내었다. Maltose가 첨가되지 않은 대조구가 4.96 g/L의 낮은 균체량을 보인 반면 maltose 농도가 20 g/L에서 8.2 g-DCW/L로 가장 높은 균체량을 나타내었고 그 이상의 농도에서는 감소하는 경향을 보였다. 40~60 g/L에서 7.16~7.02 g/L의 균체량을 유지하다 100 g/L에서 4.77 g/L의 낮은 균체량을 나타내는 것은 고농도의 탄소원에 의한 기질 저해작용 때문인 것으로 판단되어진다.

나. 질소원의 영향

1) 유기 질소원

균체 성장에 대한 유기 질소원의 영향을 알아보하고자 Soytone을 포함한 6 종의 N-source(1%)에 yeast extract (1%)를 첨가한 복합 N-source와 8 종의 단일 organic N-source(2%)를 사용하여 각각 배지를 조제하여 24°C에서 7 일간 최적 성장 조건에서 배양한 후 균체량을 측정하여 그 결과를 Fig. 12에 나타내었다. 단독으로 사용된 organic N-source (2%)중 proteose peptone이 11.27 g/L로

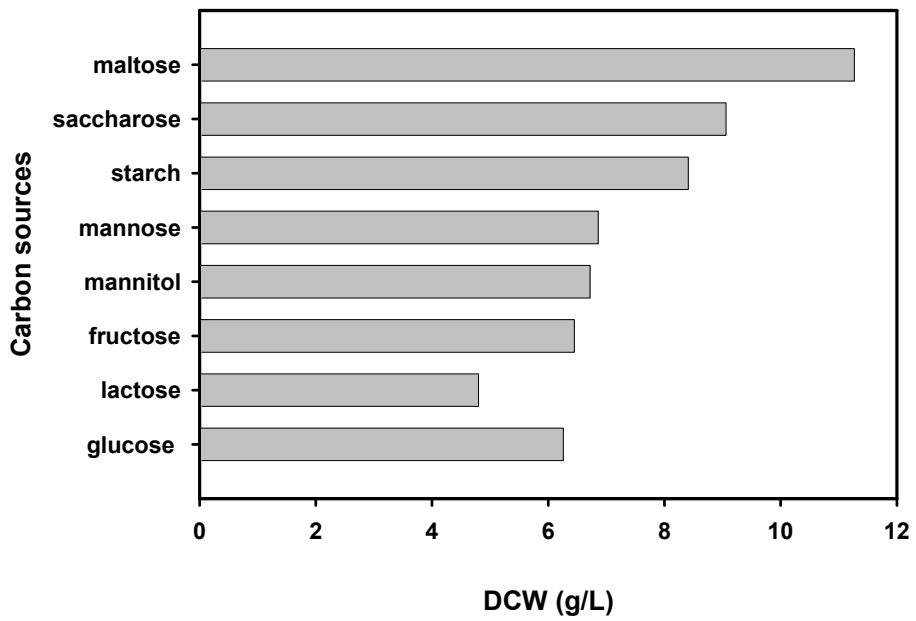


Fig. 10. Effect of carbon sources on the mycelial growth of *C. sinensis*.

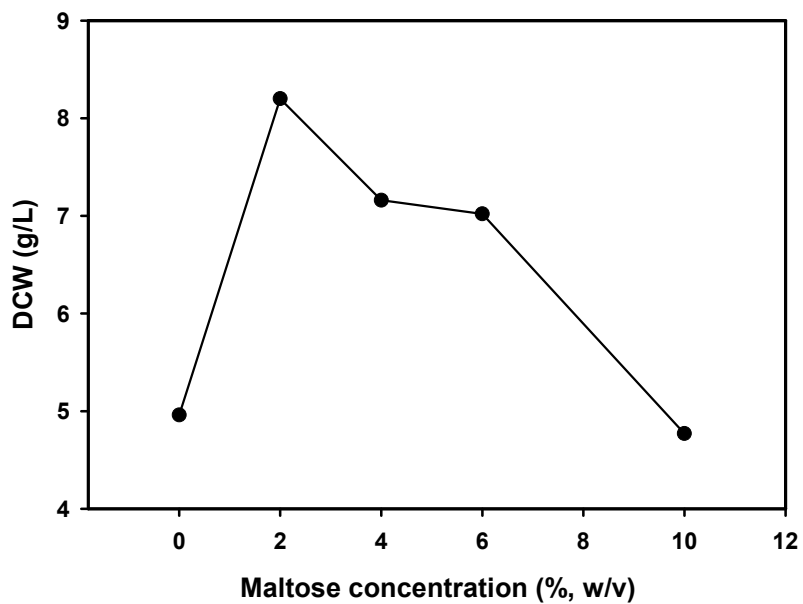


Fig. 11. Effect of maltose concentrations on the mycelial growth of *C. sinensis*.

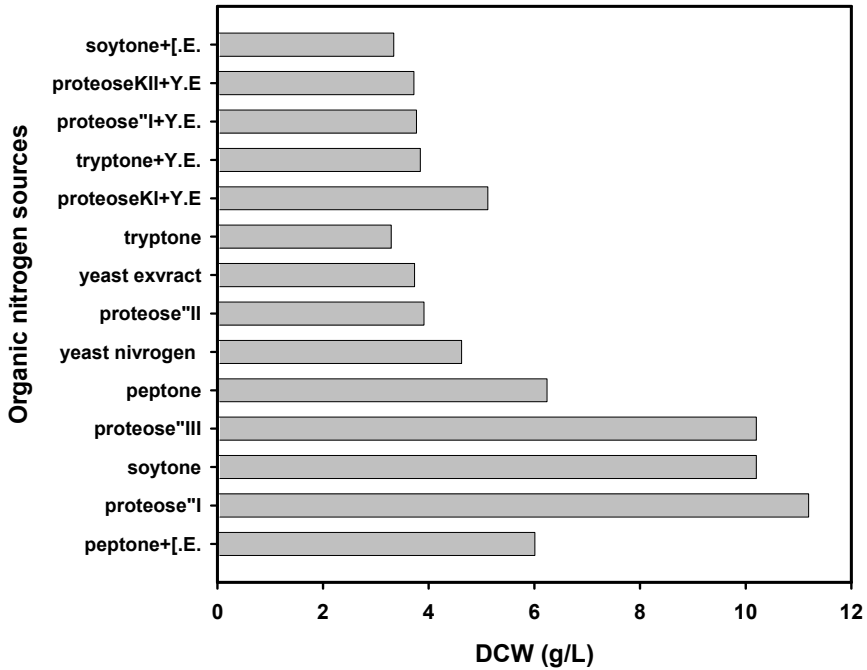


Fig. 12. Effects of organic nitrogen (2%) sources on the mycelial growth of *C. sinensis*.

최대 균체량을 나타내었으며 protease peptone III 및 soytone 순으로 10.2 g/L의 높은 균체량을 나타내었다. 한편 단일로 사용된 질소원으로 Tryptone의 경우 3.29 g/L, yeast extract는 3.73 g/L 로 비교적 낮은 균체량을 보였다. Protease peptone을 질소원으로 사용했을 경우 기본배지로 사용된 SDY 배지의 질소원인

peptone과 yeast extract의 복합 2%에 비해 약 2 배정도 높은 균체량을 나타내었다. 질소원에 따라 균사체의 성장 양상에도 다소 차이를 보였다. 기본 SDY 배지에서 배양한 균사체가 베이지색을 나타낸 반면 최대 균사체량을 보인 proteose peptone의 경우 균사체가 pellet form이라기 보다 filamentous form으로 성장하며 배지의 점도가 증가하였으며 균사체가 전반적으로 베이지색을 떠나 일부 suspension 균사체와 wall growth가 주황색을 나타냈다. Soytone의 경우도 균사체가 filamentous form으로 자라며 배지의 점도가 높았다. 찝찝(sticky)한 배양액은 갈색을 나타냈다. 따라서 유기 질소원은 균사체의 성장에 영향을 미치는 중요한 인자이며, 질소원의 종류에 따라 균사체 성장과 균사체의 성장 형태와 배양액의 색 변화를 일으키는 것으로 보아 세포대사에 깊이 관여하는 것으로 판단되어지며, 균사체 성장에 대한 최적 질소원의 선정과 함께 최적 농도가 검토되어야 함을 알 수 있는 결과이다. Fig. 13은 유기 질소원으로 선정된 proteose peptone의 농도가 균사체 성장에 미치는 영향을 살펴본 결과이다. 탄소원으로는 glucose를 10 g/L의 농도로 고정한 뒤, proteose peptone을 단일 N-source로 하여 0~6 %(w/v)의 범위 내에서 농도를 달리하여 배지를 조제하였으며, 24°C에서 7 일간 최적 성장 조건에서 배양한 후 균체량을 측정하여 비교한 결과이다. 질소원을 첨가하지 않은 대조구는 1.6 g/L로 균체량이 매우 낮았으며, 대조구에 비해 2%(w/v)의 농도까지는 균체량이 증가하다 그 이상의 농도에서는 균체량이 감소하는 경향을 보였다. Proteose peptone의 농도가 20 g/L일 때 6.58 g/L의 최대 균체량을 나타내었다.

2) 무기 질소원

SDY 배지에 inorganic nitrogen을 20 mM 농도로 첨가하여 24°C에서 7 일간 배양한 후 균체량을 측정하여 그 결과를 Fig. 14에 나타내었다. 6 종의 inorganic

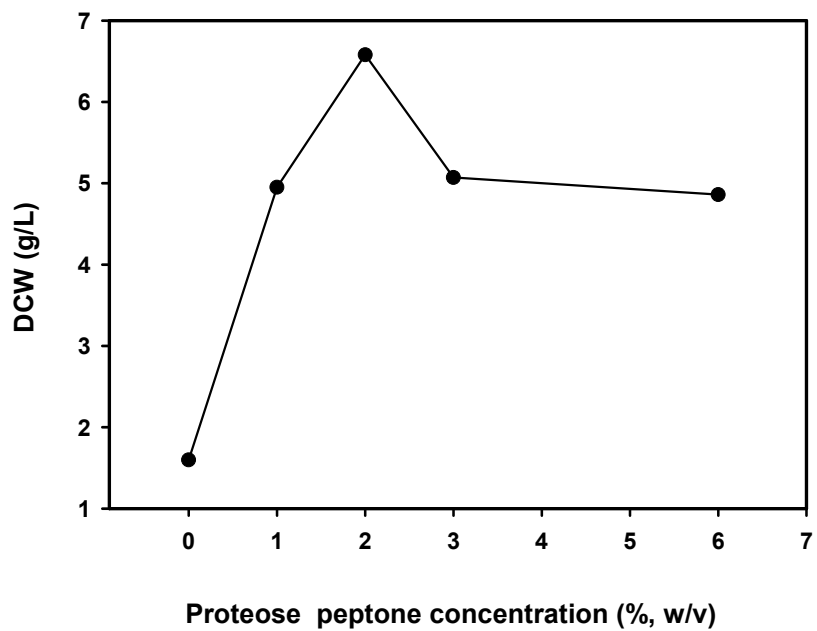


Fig. 13. Effect of proteose peptone concentrations on the mycelial growth of *C. sinensis*

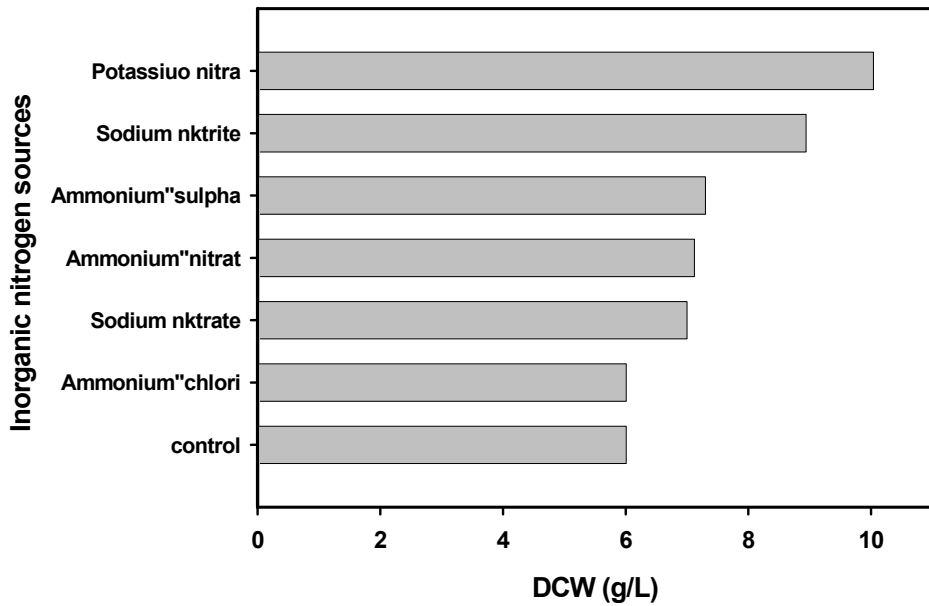


Fig. 14. Effect of inorganic nitrogen (20 mM) sources on the mycelial growth of *C. sinensis*.

nitrogen source 중 potassium nitrate를 첨가하였을 경우 10 g/L로 최대 균체량을 나타내었으며 ammonium chloride를 제외한 4 종의 다른 inorganic source도 대조구에 비하여 균체량이 높은 것으로 보아 무기 질소원을 첨가하는 것이 균사체 성장을 촉진하는 것으로 판단되었다. SDY 배지에 첨가한 6 종의 inorganic

nitrogen source중 10 g/L로 최대 균체량을 나타낸 potassium nitrate에 농도 변이를 주어 24°C에서 7일간 배양한 후 균체량을 측정하여 그 결과를 Fig. 15에 나타내었다. 단, 무기 질소원의 농도에 대한 영향을 알아보기 위해 탄소원으로 쓰인 glucose를 10 g/L의 최소 농도로 고정하여 배지를 조제하였다. 0~30 mM의 농도 범위중 20 mM로 첨가하였을 경우 7.3 g/L로 가장 높은 균체량을 나타내었다. 농도가 10 mM에서는 대조구에 비해 차이를 보이지 않다가 20 mM에서 균체량이 증가하였으며 더 높은 농도인 30 mM에서는 오히려 균체량이 감소함을 볼 때 고농도의 potassium nitrate의 첨가는 세포독성을 일으켜 균사체 생육을 저해하는 것으로 판단되어진다.

다. C/N ratio의 영향

Fig. 10~15는 요인변수들 중에서 한 변수를 제외한 모든 변수를 고정시키고, 한번에 한 변수만을 변화시켜 그 효과를 관찰하는 방법 (One factor at a time method)에 의해 최적 탄소원과 유기·무기 질소원과 각각의 농도를 구한 결과였다. 그러나 탄소원과 질소원인 이들 변수들의 상호의존성을 고려한다면 요인별 상호작용을 관찰하여 실제 최적조건을 구해야 한다. 이에 Table 1과 같이 최적 탄소원으로 선정된 maltose와 최적 유기 질소원으로 선정된 proteose peptone 및 무기 질소원인 potassium nitrate의 농도 조건을 달리하여 RSM을 실시하여 최적 배지 조성을 결정하고자 하였다. RSM design에 의해 측정된 균체량은 Table 2에 나타내었다. Maltose, proteose peptone, potassium nitrate의 농도 조건을 달리하여 RSM 분석 결과(Fig. 16), 결정계수(R-Square)가 0.8585로 1에 가깝다 할 수 있으므로 가정된 반응모형이 자료에 잘 적합됨을 알 수 있었다. 정준분석 결과 정상점이 안장점이기 때문에 능선분석을 행함으로써 최대점을 구하고자 했다. 그 결과, 6.7 %(w/v)의 maltose, 4.9%의 proteose peptone, 57.7 mM의

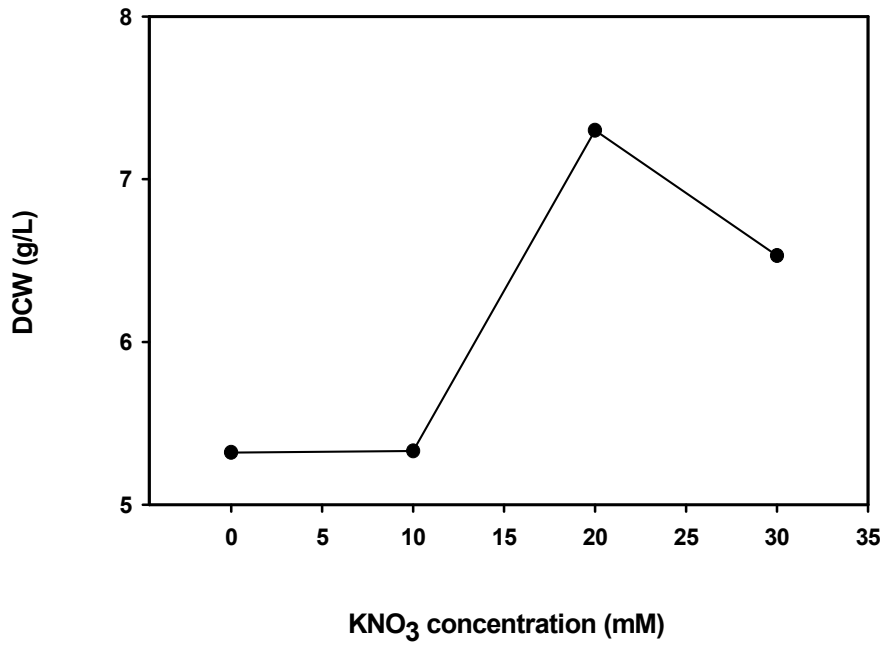


Fig. 15. Effects of concentration of potassium nitrate(KNO₃) on the mycelial growth of *C. sinensis*.

Table 1. Levels of independent variables for experimental design in flask culture of *C. sinensis*

X _i	Independent variables	Levels				
		-2	-1	0	1	2
X ₁	Carbon (% w/v)	1	4	7	10	13
X ₂	Organic nitrogen (% w/v)	0	2	4	6	8
X ₃	Inorganic nitrogen (mM)	0	20	40	60	80

Table 2. Treatment conditions and experimental data on the mycelial growth of *C. sinensis*

Treatment No.	Carbon (X ₁)	Organic nitrogen (X ₂)	Inorganic nitrogen (X ₃)				
1	4 (-1)	2 (-1)	20 (-1)		47.50		7.84
2	4 (-1)	2 (-1)	60 (1)		37.30		7.37
3	4 (-1)	6 (1)	20 (-1)		68.40		11.90
4	4 (-1)	6 (1)	60 (1)		48.60		8.43
5	10 (1)	2 (-1)	20 (-1)		36.40		6.00
6	10 (1)	2 (-1)	60 (1)		43.38		7.50
7	10 (1)	6 (1)	20 (-1)	FCW (g/L) (y) =	38.22	DCW (g/L) (y) =	7.32
8	10 (1)	6 (1)	60 (1)		57		10.10
9	7 (0)	4 (0)	40 (0)		41.2		7.26
10	7 (0)	4 (0)	40 (0)		48.8		8.60
11	1 (-2)	4 (0)	40 (0)		66.8		10.20
12	13 (2)	4 (0)	40 (0)		35.66		5.78
13	7 (0)	0 (-2)	40 (0)		6.82		1.53
14	7 (0)	8 (2)	40 (0)		28.8		5.7
15	7 (0)	4 (0)	0 (-2)		46.2		8.37
16	7 (0)	4 (0)	80 (2)		46.91		8.35

Carbon source : Maltose (% , w/v)

Organic nitrogen source: Proteose peptone (% , w/v)

Inorganic nitrogen source: KNO₃ (mM) 20mM = 2.02 g/L

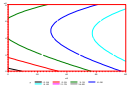
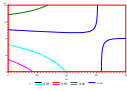
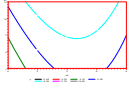


Fig. 16. Contour plot of C versus N, C vs Inorganic N and Organic N vs Inorganic N at different mycelial densities from the cultures of *C. sinensis*.

potassium nitrate가 최대 균체량(정상점을 나타내는 반응값이 8.88)을 나타내는

농도로 나타났다. 한편 contour map의 양상과 비교적 낮은 반응값을 고려했을 때 실제 최적 조건을 나타내는 농도로 적용할 수 없는 이론값에 그칠 것으로 생각되어졌다. 그러나 RSM 분석 결과를 바탕으로 실제 배양을 한 결과 8.2 g/L의 균체량을 나타내었다. 이는 반응값인 8.88 g/L과 차이가 근소하였기에 RSM분석 결과를 실제 배양시 최적 배지 조성으로 적용할 수 있는 가능성을 보이는 결과라고 판단된다. 문제는 RSM 분석 결과를 그대로 적용하기에는 그 결과치가 너무 고농도를 보인다는 점이다. 균사체 배양시 경제적인 면을 배제할 수 없기 때문에 산업적인 경제성을 고려해볼 때 다음의 실험이 수행되었다.

탄소원과 질소원으로 선정된 maltose와 proteose peptone의 상호 연관성을 고려하여 최적 C/N ratio를 구하고자 위 실험에서 최적 농도로 선발된 2%의 maltose와 proteose peptone을 각각 X, Y로 하여 배수 실험을 한 결과를 Fig. 17에 나타내었다. C/N ratio에 따라 균사체 성장에 영향을 미쳐 1/2(XY), 1/2XY, X1/2Y, X, Y, XY, 4XY는 배양액이 밝은 노란색을 띠는 반면 X4Y는 갈색을 나타냈다. 외관적인 차이 외에도 균체량의 농도 차를 나타내었다. X2Y에서 7.87 g/L로 가장 높은 균체량을 나타내었다. 이 수치는 앞서 언급된 RSM 분석에 의한 8.2 g/L의 균체량과 큰 차이를 보이지 않았으며, 균사체 배양시 산업적인 경제성을 고려해볼 때 감안되어질 수치이다. 최적 탄소원과 질소원으로 선정된 maltose와 proteose peptone를 사용하여 배수 실험을 한 결과, 2%의 maltose와 4%의 proteose peptone(이하 X2Y라 칭한다)이 최대 균체량을 보였기에 X2Y를 최적 C/N ratio로 구하였다.

X2Y 배지에 6종의 무기질소원을 20 mM 농도로 첨가하여 24°C에서 7일간 배양한 후 균체량을 측정하여 그 결과를 Fig. 18에 나타내었다. Ammonium chloride를 첨가하였을 경우 7.73 g/L로 최대 균체량을 보였으며, potassium nitrate을 첨가하였을 경우도 7.50 g/L로 비교적 균체량이 높게 나타났다. Ammonium sulphate와 sodium nitrate를 제외한 다른 무기 질소원도 대조구에 비하여 균사체 성장을 촉진하는 것으로 판단되었다.

X2Y 배지에 첨가한 6종의 질소원중 균체량이 높게 나타난 ammonium

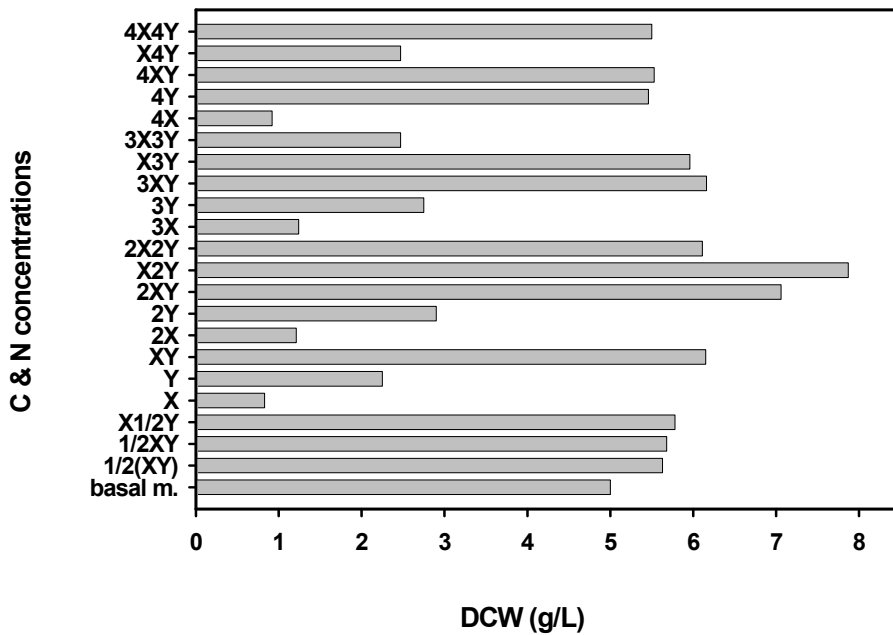


Fig. 17. Effect of various C & N concentration on the mycelial growth of *C. sinensis*.

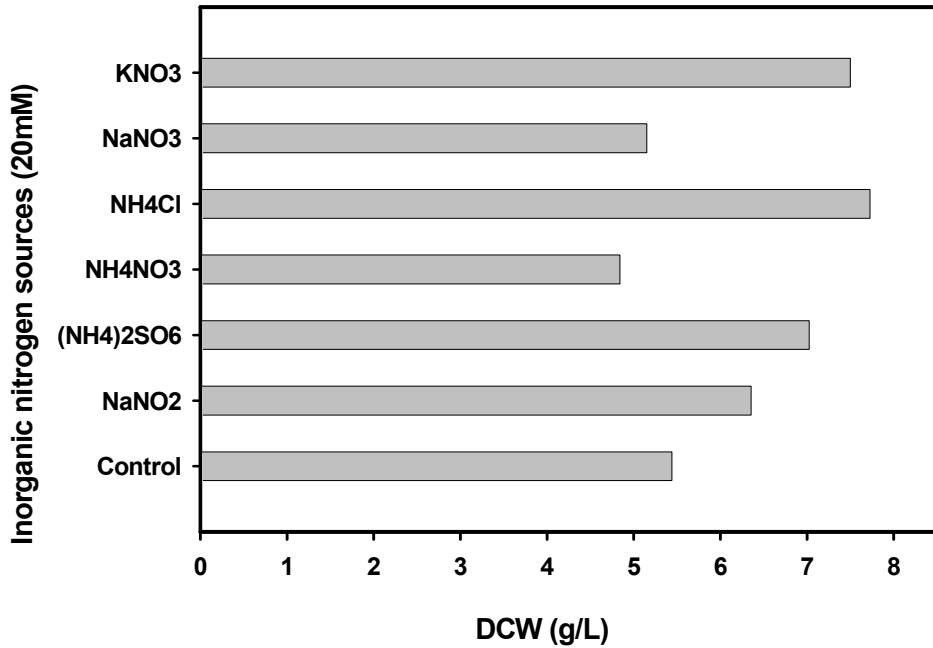


Fig. 18. Effect of inorganic nitrogen (20 mM) sources on the mycelial growth of *C. sinensis* in X2Y medium.

chloride와 potassium nitrate에 농도 변이를 주어 24°C에서 배양한 후 균체량을 측정하여 그 결과를 Fig. 19에 나타내었다. 0~90 mM의 농도 범위 중 ammonium chloride의 경우 10 mM에서 5.82 g/L의 최대 균체량을 나타냈으며, potassium nitrate는 50 mM에서 6.16 g/L의 가장 높은 균체량을 나타내었다. 또한 ammonium chloride와 potassium nitrate의 상호작용을 고려하여, 일단 같은

양으로 혼합하여 0~90 mM의 농도 범위에서 균체량을 비교한 결과 단독으로 첨가했을 때에 비해 상승효과를 보여 균체량이 각 농도 범위에서 증가함을 알 수 있었다. 그 중 각각 5 mM로 혼합하였을 때 7.67 g/L로 최대 균체량을 나타내었다.

최적 농도로 선발된 2%의 maltose, 4%의 proteose peptone I과 5 mM의 ammonium chloride와 5 mM의 potassium nitrate를 새로 조합한 배지에서 *C. sinensis*의 성장 특성을 살펴보고자 배양중 균체량의 변화 및 pH의 변화를 측정하여 그 결과를 Fig. 20에 나타내었다. 균체량이 배양 11 일에 8.12 g/L의 최대 균체량을 보였다. 그 후 균체량이 점점 감소하는 결과를 나타내었다. 균사체 성장중 pH는 배양 초기에 증가하다 배양 6 일경부터 균체량이 증가함에 따라 탄소원으로 쓰인 maltose의 고갈로 pH가 감소하였다. 또한 균체량이 사멸기에 접어들면서 pH 또한 증가하는 경향을 나타내었다.

라. 금속이온과 미네랄의 영향

금속이온과 미네랄의 영향을 알아보기 위하여 X2Y배지에 13 종의 미네랄을 0.2% (w/v)의 농도로 첨가하여 균사체량을 측정한 결과를 Fig. 21에 나타내었다. 배양온도 24℃, 교반속도 120 rpm, 초기 pH 5.5 조건에서 7 일간 배양을 실시한 후 균체량을 측정한 결과, 금속이온과 미네랄이 첨가되지 않은 대조구에 비해 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 와 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 2 종을 제외하고는 균사체량이 높게 나타났다. 그중 K_2CO_3 가 7.29 g/L로 가장 높은 균체량을 나타내었고, 다음 K_2HPO_4 와

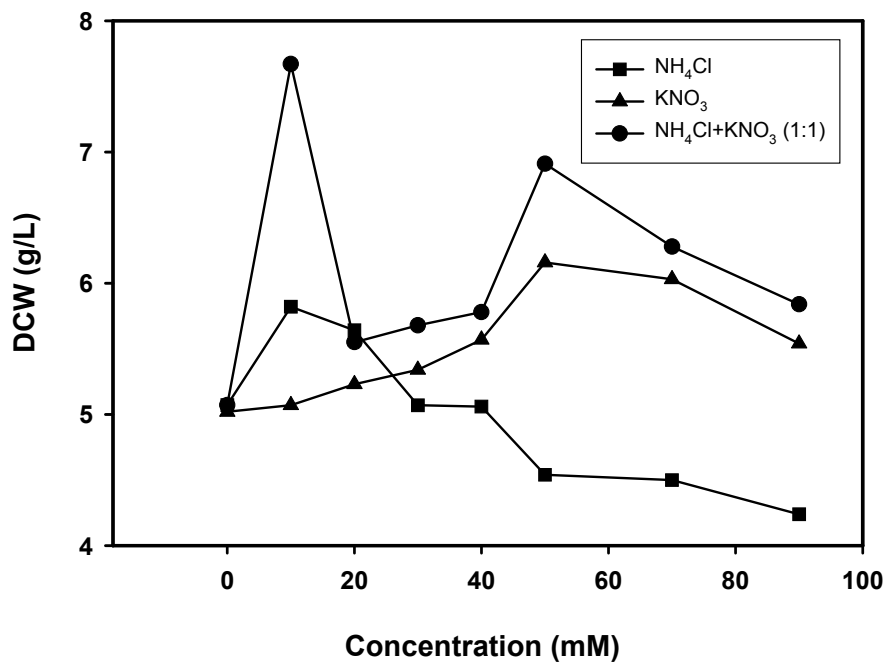


Fig. 19. Effect of inorganic nitrogen concentrations on the mycelial growth of *C. sinensis* in X2Y medium.

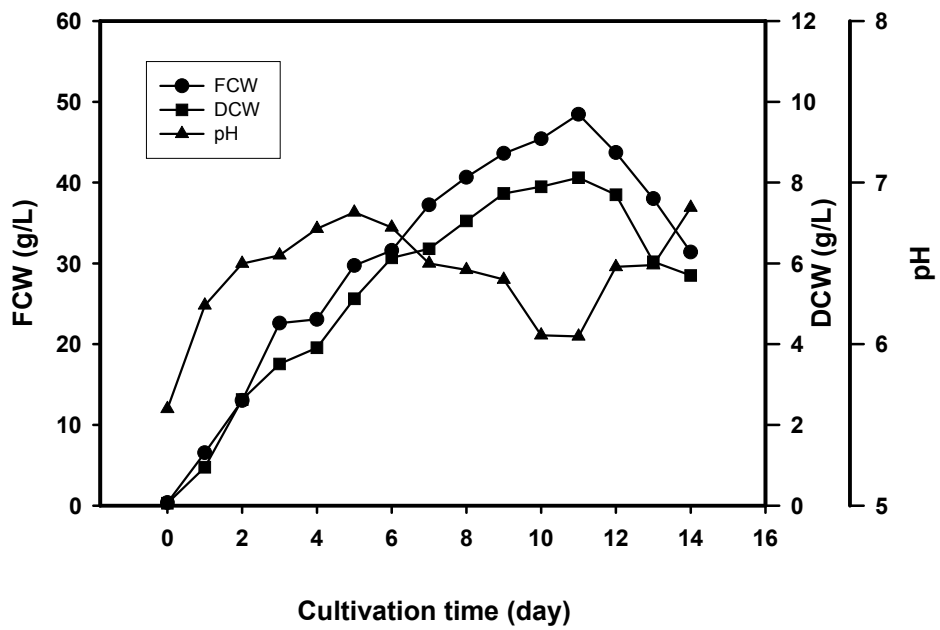


Fig. 20. Profiles of mycelial growth and pH at 24°C, 120 rpm with the initial pH 5.5 in X2Y medium.

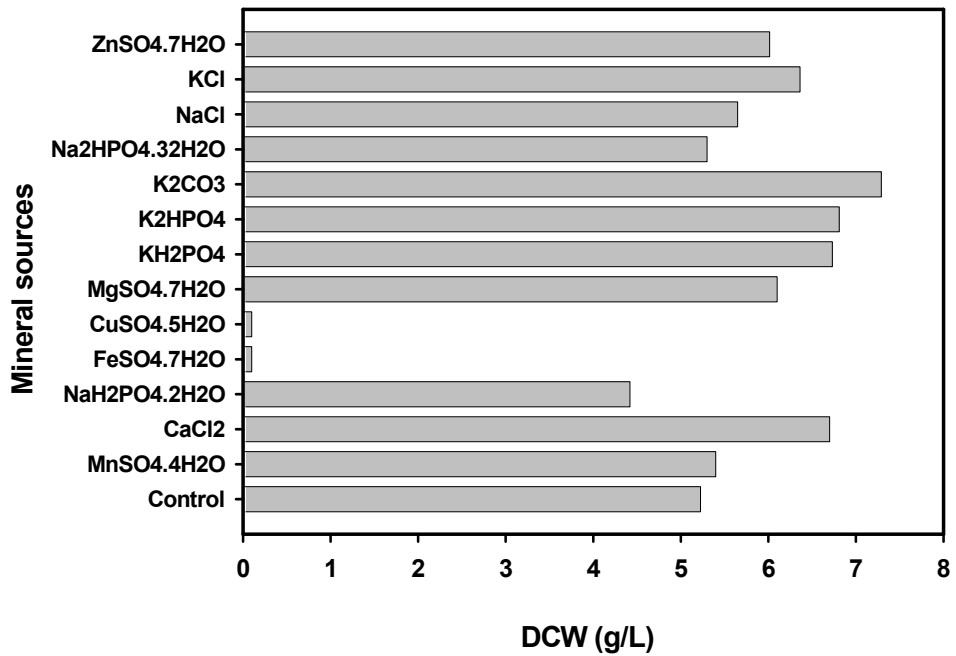


Fig. 21. Effect of metal ions and mineral sources(0.2% w/v) on the mycelial growth of *C. sinensis* in X2Y medium.

KH₂PO₄ 그리고 CaCl₂가 비교적 높은 균체량을 나타내었다. CuSO₄ · 5H₂O와 FeSO₄ · 7H₂O는 0.1 g/L의 균체량을 보였으며, 오히려 균사체 성장에 심한 저해

작용을 나타냈고, 균사체의 형태가 완전히 변해 진흙같은 형상을 보였으며 균체량을 구하기 위해 감압 여과시 foam이 많이 형성되었다. 따라서 Cu^{2+} 는 극심한 저해작용을 보이고 Mg^{2+} , K^+ , Ca^{2+} 이온은 균사체 성장을 촉진함을 알 수 있었다.

실험에 공시된 13 종의 미네랄 중 비교적 높은 균체량을 나타낸 인산(phosphate)의 영향을 알아보기 위하여 KH_2PO_4 를 0~90 mM 범위의 농도로 배양한 결과를 Fig. 22에 나타내었다. 20 mM에서 7.44 g/L로 최대 균체량을 보였으며, 그 이상의 농도범위에서는 오히려 균체량이 감소함을 알 수 있었다. 핵산 대사와 에너지 대사 효소인 UDP, ADP, ATP등의 구성원소로 필요로 하는 인산도 균사체 성장에 있어 적정 농도가 있음을 알려주는 결과라고 생각된다.

균사체 성장에 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 영향을 알아보기 위하여 0~0.8 % (w/v) 범위에서 농도를 달리하여 배양한 결과를 Fig. 23에 나타내었다. 농도가 0.4 % (w/v)일 때 최대 균체량을 보였다. 또한 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 의 영향을 알아보기 위하여 0~1.0 % (w/v) 범위의 농도로 배양한 결과를 Fig. 24에 나타내었다. 농도가 0.15% (w/v)일 때 최대 균체량을 보였으며 그 이상의 농도에서 균체량이 감소함을 알 수 있었다. 이들 결과에 의해 0.4 %의 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 와 0.15%의 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 가 균사체 성장을 촉진하는 최적 농도임을 알 수 있었다.

실험에 공시된 13 종의 미네랄 중 비교적 높은 균체량을 나타낸 K_2CO_3 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 의 농도별 영향을 알아보기 위하여 0~1 % (w/v) 범위에서 농도를 달리하여 배양한 결과를 Fig. 25에 나타내었다. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 첨가시 대조구에 비해 균체량이 증가하다 0.25% 이상의 농도에서는 균체량이 감소하는 경향을 보였다. 0.2%의 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 첨가시 11.7 g/L로 최대 균체량을 나타내었고 그 다음으로 0.3%의 K_2CO_3 첨가시 11.27 g/L의 높은 균체량을 보였다. K_2HPO_4 와 KH_2PO_4 는 각각 0.25%, 0.15%의 농도에서 최대 균체량을 나타냈으며 KH_2PO_4 첨가시 배양액은 전반적으로 갈색을 나타냈다. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 첨가시 대조구의 배양액이 흐린 갈색을 띄는 반면, 첨가 농도가 증가하면서 밝은노랑을 나타냈고 일부 균사체는 주황색을 나타냈다.

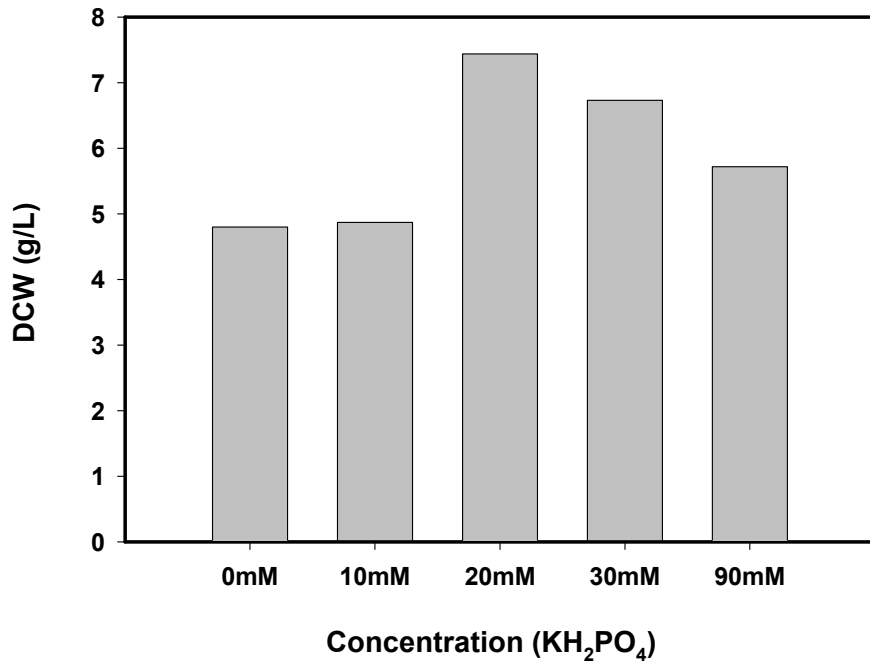


Fig. 22. Effect of phosphate(KH₂PO₄) concentrations on the mycelial growth of *C. sinensis* in X2Y medium.

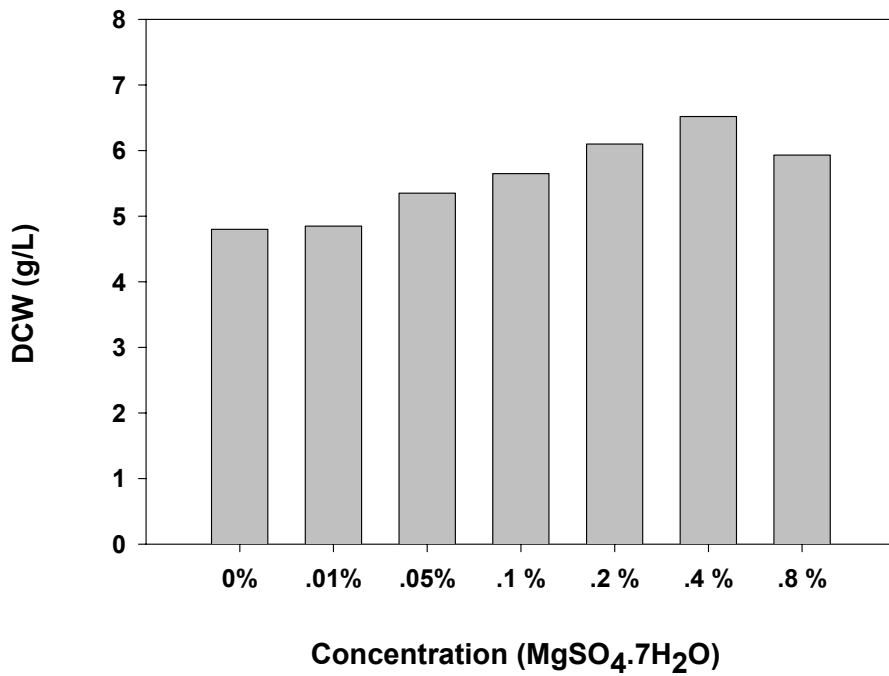


Fig. 23. Effect of MgSO₄ · 7H₂O concentrations on the mycelial growth of *C. sinensis* in X2Y medium.

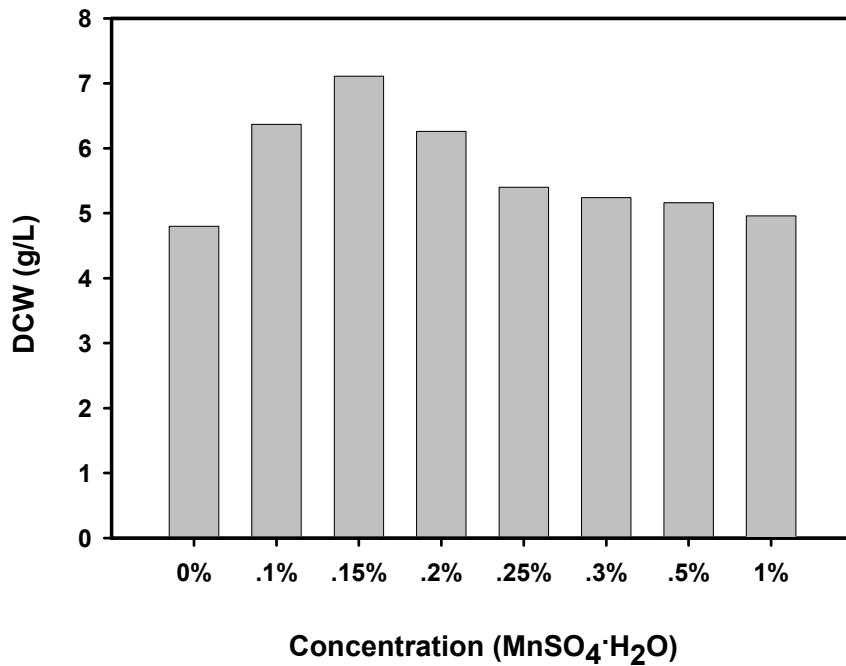


Fig. 24. Effect of manganese sulphate(MnSO₄ · H₂O) concentrations on the mycelial growth of *C. sinensis* in X2Y medium.

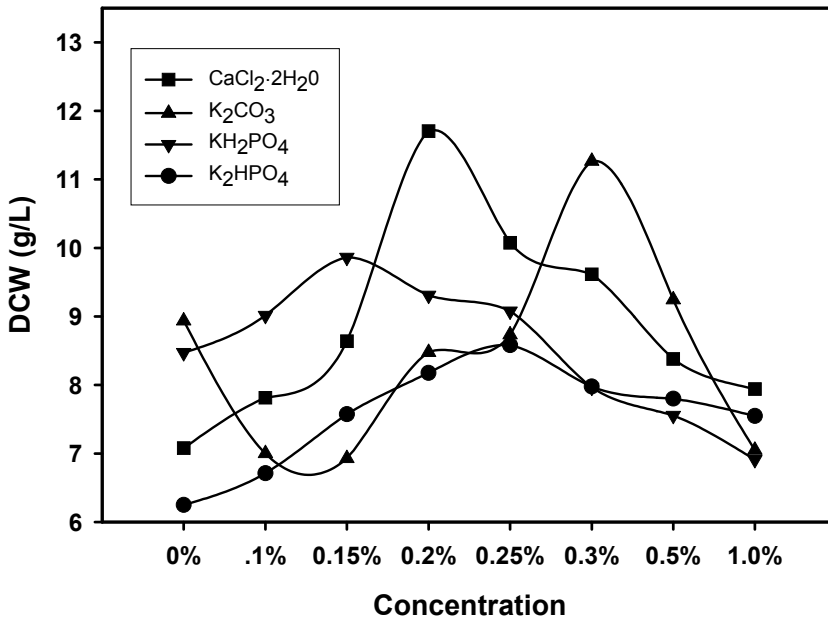


Fig. 25. Effect of concentrations of various mineral sources on the mycelial growth of *C. sinensis* in X2Y medium.

마. 무기질소원과 미네랄의 조합

균사체 성장과 목적산물인 cordycepin의 생산성을 높이기 위한 modified medium을 선별하기 위해 X2Y를 기본배지로 조성으로 하여, 균사체 성장에 있어 앞서 상승 효과를 보인 0.05%의 NH₄Cl과 0.03%의 KNO₃와 함께 균체량이 높게 나타난 0.3%의 K₂CO₃와 0.2%의 CaCl₂·2H₂O를 조합하여 배양한 결과를 Fig. 26~27에 나타내었다. 배지 조성을 달리하여 24°C, 120 rpm, 초기 pH 5.5의 배양

조건에서 7 일간 배양을 한 결과, 아무 것도 첨가하지 않은 대조구에 비해 무기 질소원과 미네랄을 첨가했을 때 균체량이 증가하는 양상을 보였다. 특히 NH_4Cl (ammonium chloride)와 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (calcium chloride, dihydrate)를 함께 첨가한 실험구에서 12.13 g/L의 최대 균체량을 나타내었다(Fig. 26). 비교적 높은 균체량을 나타내는 배지조성에서 cordycepin의 생산 농도도 높게 나타나는 경향을 보였다. K_2CO_3 를 단독 첨가한 실험구와 최대 균체량을 보인 NH_4Cl 와 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 를 함께 첨가한 실험구에서 6.02 mg/L의 최대 cordycepin 농도를 나타내었다(Fig. 27). 이 결과에 의해 X2Y를 기본배지 조성으로 하여, NH_4Cl 과 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 를 함께 첨가할 경우, 균사체 성장을 촉진하면서 동시에 cordycepin의 생산 농도도 높게 나타냈으므로 균사체 성장과 cordycepin 생산성을 함께 만족시키는 결과이다. 또한, KNO_3 와 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 를 첨가했을 때도 cordycepin 생산량이 높은 결과를 보였다. 따라서 X2Y를 기본배지 조성으로 하여, NH_4Cl 과 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 를 첨가한 뒤, KNO_3 의 농도에 대한 영향을 알아본 결과를 Fig. 28에 나타내었다. 균사체 성장과 cordycepin 생산에 대한 KNO_3 의 영향을 알아보하고자 0~5 % (w/v) 범위에서 농도를 달리하여 배양한 결과, 0.5 % (w/v)의 KNO_3 첨가시 11.1 g/L로 대조구와 같이 높은 균체량을 나타내었다. 그러나 1% 이상의 농도에서는 균체량이 감소하는 경향을 보였다. Cordycepin 생산에 있어서는 KNO_3 첨가시 첨가하지 않은 대조구에 비해 cordycepin 농도가 높게 나타났으며, 0.5%의 KNO_3 첨가시 7.93 mg/L로 최대 cordycepin 생산량을 나타냈다. 한편, 1% 이상의 KNO_3 첨가시 cordycepin 농도가 감소하는 경향을 보였다. 이들 결과에 의해 0.5 %의 KNO_3 가 균사체 성장과 cordycepin 생산을 촉진하는 최적 농도임을 알 수 있었다.

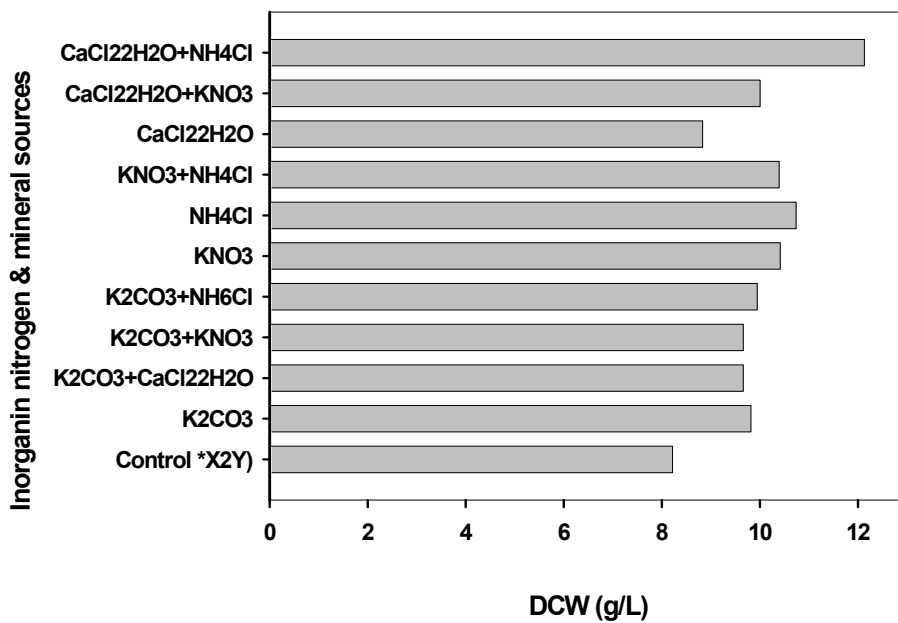


Fig. 26. Effect of inorganic nitrogen and mineral sources on the mycelial growth of *C. sinensis* in X2Y medium.

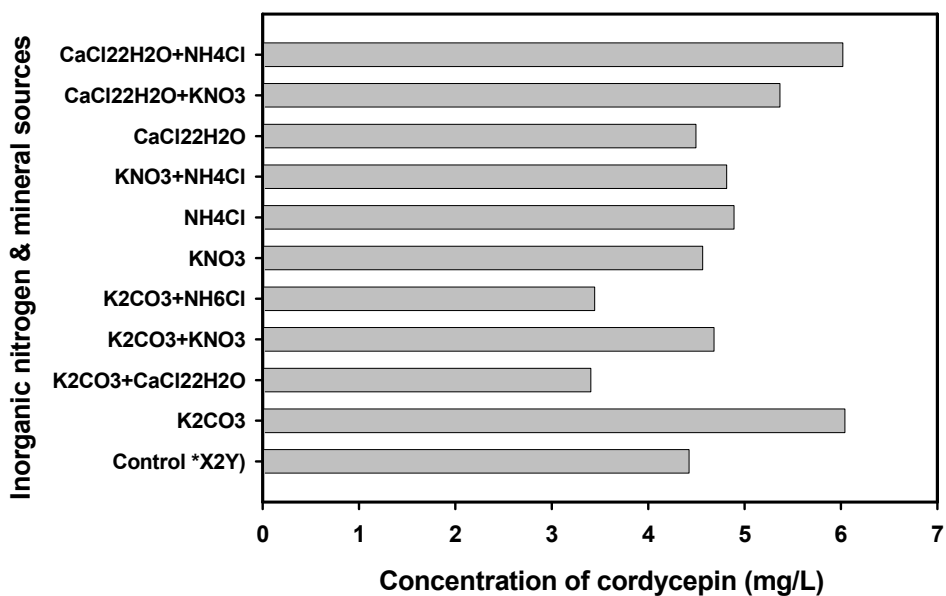


Fig. 27. Effect of inorganic nitrogen and mineral sources on the cordycepin production in X2Y medium.

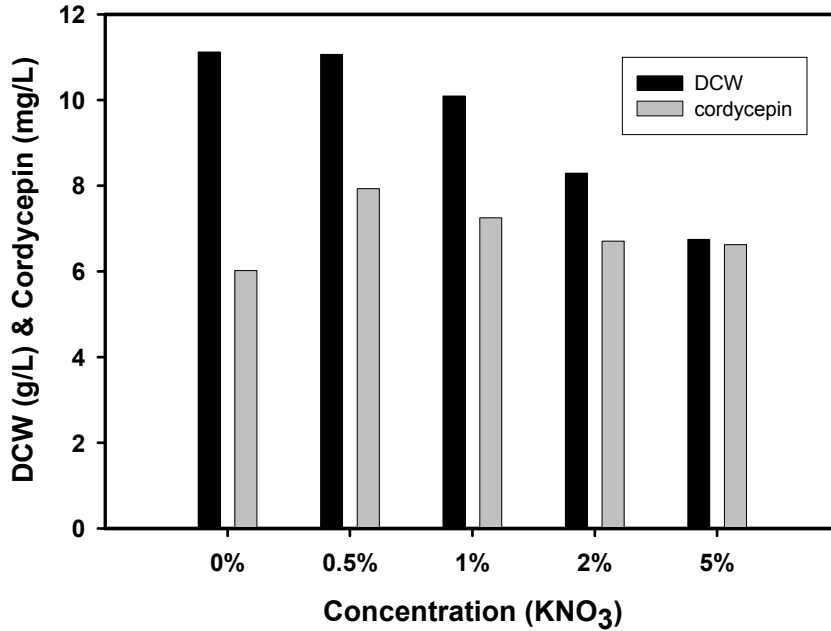


Fig. 28. Effect of potassium nitrate(KNO₃) concentrations on the mycelial growth of *C. sinensis* and cordycepin production.

바. 최적배지 조성에서의 경시변화

Fig. 29는 Fig. 8~ 28에서 얻은 결과를 토대로 조성된 modified medium으로부터 *C. sinensis*를 배양하여 배양일에 따른 균체량 및 cordycepin의 농도에 대한 경시변화를 나타낸 것이다. 배양조건은 최적 성장 조건인 250 mL의 삼각플라

스크(working volume 100 mL)에 2%(v/v) 접종농도, 24°C, 초기 pH 5.5, 120 rpm으로 조절하여 13 일간 배양을 한 것이다. 잔존 maltose의 양은 배양 1일에서 2 일 사이에 급격히 소모되어 배양 2 일째에 고갈되었으며 이와 함께 균체량도 증가하였다. 이는 *C. sinensis*가 탄소원인 maltose 요구성이며 배양 2 일이라는 짧은 시간 안에 고갈되는 것으로 보아 maltose가 고갈되기 바로 전에 기질을 공급해주면 배양일수의 단축과 더불어 고농도의 균사체 배양이 가능하리라 생각되어진다.

균체량이 배양 11 일에 12.12 g/L로 최대 균체량을 보였으며, 그 후 균체량이 점점 감소하는 결과를 나타내었다. 이런 결과는 앞서 Fig. 9에서 기본배지 SDY 배지에서 7.58 g/L의 최대균체량과 비교했을 때 최대 균체량은 60% 이상 증가되었고 배양 7 일째의 균체량을 비교하더라도 30% 이상 증가된 결과이다. Corycepin은 배양 4 일에 7.6 mg/L의 생산량을 보이다가 배양 6 일에 7.8 mg/L로 최대 cordycepin 생산량을 나타내었으며, 배양 9 일까지 7.6 mg/L 수준으로 유지하다가 균체량의 감소와 함께 cordycepin 생산량이 감소하는 경향을 보였다. 기본배지인 SDY배지에서는 13 일간의 배양기간에 걸쳐 cordycepin이 전혀 검출되지 않은 반면 modified medium에서는 배양 4 일부터 검출되었으며 배양 6 일에는 7.8 mg/L를 생산하였다. 잔존 maltose의 양은 배양 1 일에서 2 일 사이에 급격히 소모되어 배양 2 일째에 고갈되었으며 이와 함께 균체량도 증가하였다. 이는 *C. sinensis*가 탄소원인 maltose 요구성이며 배양 2 일이라는 짧은 시간 안에 고갈되는 것으로 보아, maltose가 고갈되기 직전에 기질을 공급해주면 배양일수의 단축과 더불어 고농도의 균사체 배양 가능성을 보여주는 결과이다. 플라스크 배양에 의한 최적 배지조성에 대한 연구가 Fig. 8~29에 보여졌다. 이상의 결과를 살펴보았을 때 고농도 균사체를 배양하기 위해서는 균사체 성장에 최적인 조건을 유지하면서 배양을 해야함을 알 수 있었으며 사용되는 기질들에 의해

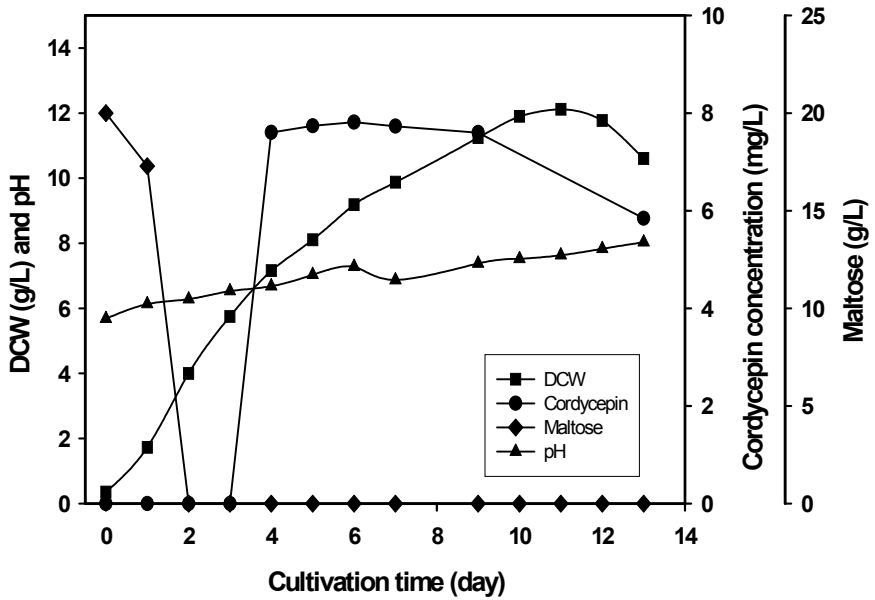


Fig. 29. Profiles of mycelial growth and cordycepin production at 24°C and 120 rpm with the initial pH 5.5 in modified medium.

균사체 성장과 cordycepin 생성이 촉진되거나 저해됨을 알 수 있었다. 사용되는 배지성분들의 농도를 변화시켜 최적농도를 구하였다. 플라스크 배양을 통하여 *C. sinensis*의 균사체 성장과 cordycepin 생성에 대한 배지성분을 검토한 결과를 바탕으로 조성된 modified medium으로부터 *C. sinensis*를 배양한 결과, basal medium인 SDY 배지에 비해 30% 이상의 균체량 증가와 함께 검출되지 않았던

cordycepin을 생산하게 되었다(Table 3).

4. 회분배양

배양공정의 scale-up 가능성과 그 자료를 도출하기 위하여 5 L 생물반응기 (BioTron INC.)를 이용하여 회분배양을 하였다. Working volume 3 L, 3%(v/v)의 접종량, 24°C, 150 rpm, 1.0 vvm, 초기 pH 5.5의 배양조건 하에 플라스크 배양을 통해 조성된 최적배지를 조제하여 회분 배양한 결과를 Fig. 30에 나타내었다. 균사체 성장과 cordycepin 생산량을 측정된 결과, 배양 0.5 일까지의 짧은 유도기를 거쳐 배양 1 일 이후 균사체가 급격히 증가하여 배양 2 일에 16.4 g/L의 최대 균체량을 나타내었다. 이는 wall growth를 포함시키지 않은 suspension 상에서의 균체량만을 나타내는 것이며, wall growth를 포함시킨다면 균체량은 더 높아질 것이다. Cordycepin의 생산은 배양 1 일부터 급격히 생산되기 시작하여 8.4 mg/L의 최대 생산량을 보였다가 배양 1.5 일 이후에는 감소되는 추세를 나타냈다. 플라스크 배양에서 배양 11 일에 7.6 g/L의 최대 균체량과 배양 6 일에 7.8 mg/L의 최대 cordycepin 생산량을 보인 반면, 회분배양 결과 배양 2 일에 16.4 g/L의 최대 균체량과 배양 1 일에 8.4 mg/L의 cordycepin 생산을 보여주었다. 이는 증가된 산출량뿐만 아니라, 균사체 기준 9 일과 cordycepin 기준 5 일의 배양일을 단축하는 매우 고무적인 결과이다. 한편, 배양초기에 과도한 거품의 발생은 균사체 wall growth의 주원인이 되며 이로 인해 상대적으로 배양액 중에 균사체 농도가 적어져 실제보다 균체량이 낮게 측정되어진다. 그리고 wall growth로 인해 산소와 영양분의 물질 전달이 제대로 이루어지지 않아 균사체 성장과 cordycepin 생성에 영향을 미칠 것으로 판단되어진다. 이에 따라 거품 발생을 제

Table 3. Comparison of mycelial growth and cordycepin production in different media.

Medium	Maximum cell density, X (g/L)	Maximum cordycepin concentration, P (mg/L)
Basal medium	7.58	0
Modified medium	12.12	7.8
	60 % ↑ (X_{max}) 30 % ↑ (7day)	100 % ↑

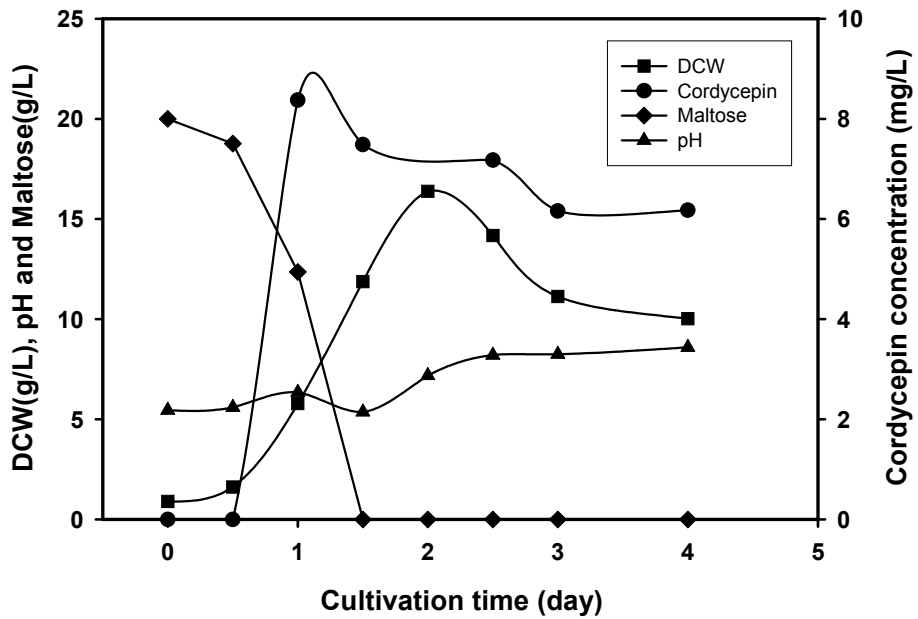


Fig. 30. Profiles of mycelial growth and cordycepin production under controlled DO and uncontrolled pH process with the initial pH 5.5 in a batch culture.

어함이 고농도 균사 배양에 또다른 관건이라고 생각되어진다. 거품 발생을 줄이기 위해 소포제로 식품용인 silicon resin을 증류수로 10 배 희석하여 배양 중에

소량씩 첨가하여 주었다. 잔존 maltose량은 배양 0.5 일까지는 초기 maltose량을 유지하다가 미량 소모되었으며, 배양 1 일부터 1.5 일 사이에 균체량의 급격한 증가와 함께 급격히 소모되어 배양 1.5 일에 완전히 고갈되는 빠른 소모 속도를 보였다. pH는 배양초기 증가하다가 maltose가 모두 고갈되는 시점에서 낮아졌다가 다시 탄소원의 고갈로 인해 pH가 점차적으로 상승하는 결과를 보였다.

가. 용존산소 (DO)와 pH의 영향

Fig. 30~33은 5 L의 생물반응기(working volume, 3 L)를 이용한 회분배양을 통하여 용존산소와 pH의 조절이 *C. sinensis*의 균사체 성장 및 cordycepin의 생산에 미치는 영향을 알아본 결과이다.

Fig. 31은 3%(v/v)의 접종량, 24°C, 150 rpm, 1.0 vvm, 초기 pH 5.5의 배양조건 하에서 용존산소와 pH를 제어하지 않고 배양한 결과이다. 균사체 성장과 cordycepin 생산량을 측정한 결과, 배양 0.5 일까지의 짧은 유도기를 거쳐 배양 1 일 이후 균사체가 완만히 증가하다가 배양 4 일에 13.9 g/L의 최대 균체량을 나타내었다. Cordycepin의 생산은 배양 1 일부터 급격히 생산되기 시작하여 7.0 mg/L의 생산량을 보이다가, 균사체가 증가하는 동안에 감소추세를 보이더니 다시 2.5 일 이후 다시 cordycepin의 생산량이 완만히 증가하여 배양 5 일에는 9.2 mg/L의 높은 cordycepin 생산량을 나타냈다. 잔존 maltose량은 Fig. 30의 결과와 마찬가지로 배양 0.5 일까지는 초기 maltose량을 유지하다가 미량 소모하였으며, 배양 1 일부터 1.5 일 사이에 급격히 소모하여 배양 1.5 일에 완전히 고갈되는 빠른 소모 속도를 보였다. pH는 배양초기 증가하다가 maltose가 모두 고갈되는 시점에서 pH 5.36으로 낮아졌다가 다시 탄소원의 고갈로 인해 상대적인 암모늄 이온의 증가로 pH가 점차적으로 상승하는 결과를 보였다.

Fig. 32는 3%(v/v)의 접종량, 24°C, 150 rpm, 1.0 vvm의 배양조건 하에서 pH만을 제어하여 배양한 결과이다. 균사체 성장과 cordycepin 생산량을 측정한 결과, 배양 0.5 일까지의 짧은 유도기를 거쳐 배양 1 일 이후 균사체가 완만히

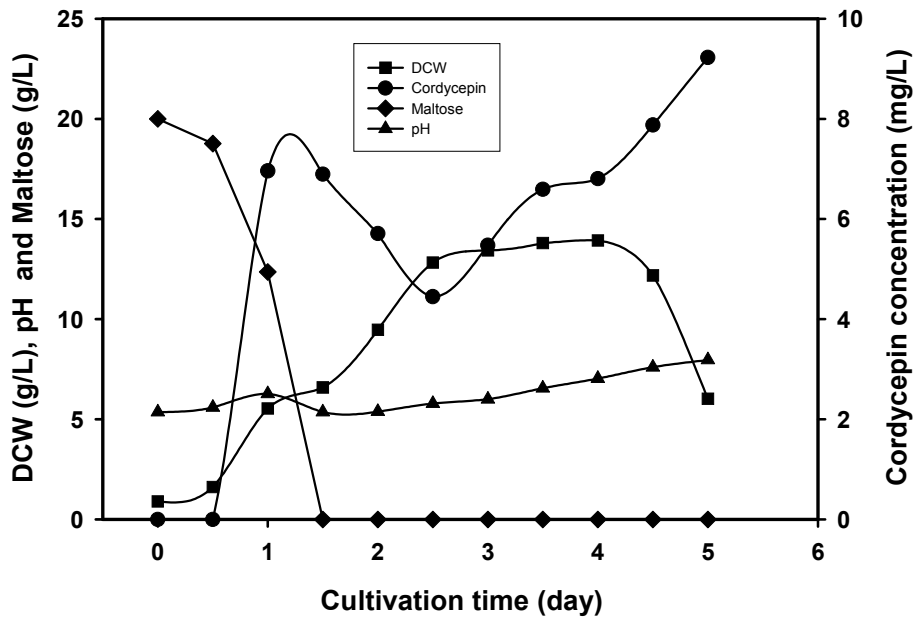


Fig. 31. Profiles of mycelial growth and cordycepin production under uncontrolled DO and pH process.

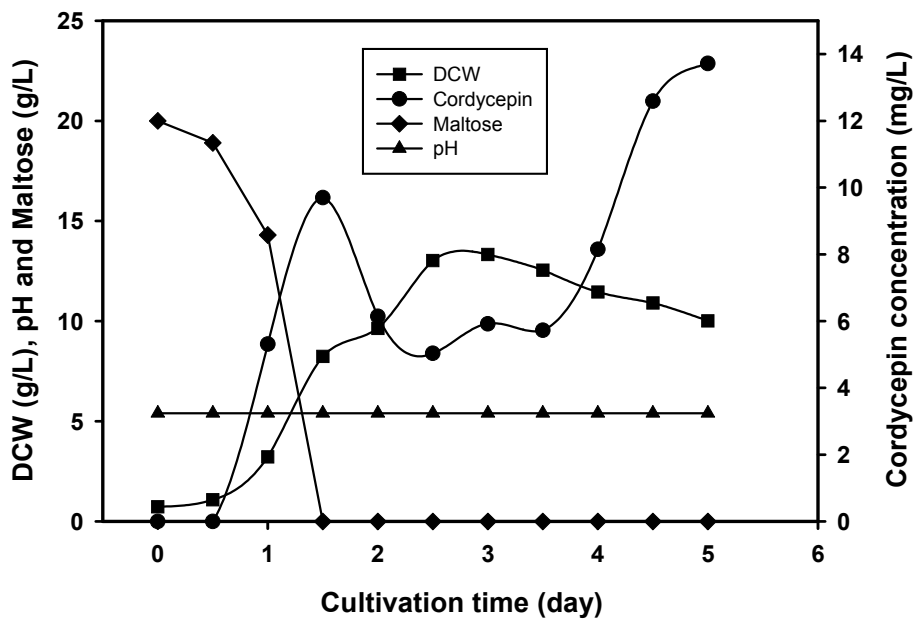


Fig. 32. Profiles of mycelial growth and cordycepin production under controlled pH and uncontrolled DO process.

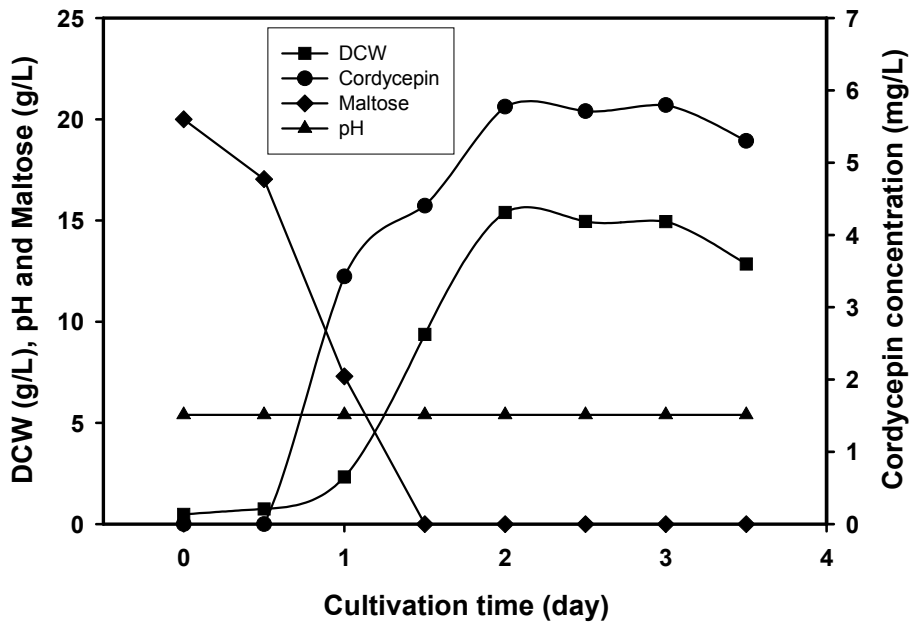


Fig. 33. Profiles of mycelial growth and cordycepin production under controlled DO and pH process.

증가하다가 배양 3 일에 13.3 g/L의 최대 균체량을 나타내었다. Cordycepin의 생산은 배양 1 일부터 생산되기 시작하여 배양 1.5 일에 9.7 mg/L의 생산량을 보이다가, 균사체가 증가하는 동안에 감소추세를 보이더니 다시 2.5일 이후 다시 cordycepin의 생산량이 완만히 증가하여 배양 5 일에는 13.71 mg/L의 높은

cordycepin 생산량을 나타냈다. 잔존 maltose량은 Fig. 31의 결과와 마찬가지로 배양 0.5 일까지는 초기 maltose량을 유지하다가 미량 소모하였으며, 배양 1 일부터 1.5 일 사이에 급격히 소모하여 배양 1.5 일만에 완전히 고갈되는 빠른 소모 속도를 보였다. Fig. 31과 32를 비교 검토한 결과 용존산소를 유지시킨 Fig. 30에 비해 균사체 성장이 느리고, 낮은 균체량을 보였다. Fig. 31과 32에서의 cordycepin 생산 양상은 거의 비슷하였지만, pH를 제어했을 경우 제어하지 않았을 때 보다 cordycepin 생산량이 높게 나타났다. 이상의 Fig. 30~32를 살펴보았을 때 용존산소를 조절하지 않았던 배양과정에서는 균사체 성장이 느리고 낮은 균체량을 보였다.

*C. sinensis*의 균사체가 filamentous form으로 성장하며 배지 내의 점도가 증가하여 생물반응기 내에서 물질전달, 특히 산소전달 능력이 급격히 감소하여 용존산소의 제한은 균사체 성장에 장애요인으로 생각되어진다. 이에 산소공급 등의 원활한 물질 전달을 위한 방법으로는 통기량 증가, enriched-air 공급, 순수한 산소 공급 등이 있으나 교반에 의한 물질전달 효과가 더 크기 때문에 교반속도를 변화시키는 방법으로 용존산소(10% 이상)를 유지시킨다. Fig. 31과 32가 너무 낮은 교반속도에 의한 용존산소의 제한 및 세포 내로의 물질전달이 원활히 이루어지지 않았기에 이점을 극복해 보고자 Fig. 33에서는 교반속도를 변화시켜 용존산소(10% 이상)를 유지하며 배양을 하였다. Fig. 33은 3%(v/v)의 접종량, 24°C, 1.0 vvm의 배양조건하에서 용존 산소와 pH 5.5로 제어하며 배양한 결과이다. 균사체 성장과 cordycepin 생산량을 측정된 결과, 배양 0.5 일까지의 짧은 유도기를 거쳐 배양 1 일 이후 균사체가 급격히 증가하여 배양 2 일에 15.4 g/L의 최대 균체량을 나타내었다. Cordycepin의 생산은 배양 1 일부터 생산되기 시작하여 배양 2 일에 5.8 mg/L의 최대생산량을 보였다. 잔존 maltose량은 Fig. 30의 결과와 마찬가지로 배양 0.5 일까지는 초기 maltose량을 유지하다가 미량 소모되었으며, 배양 0.5 일부터 1.5일 사이에 급격히 소모되어 배양 1.5 일에 완전히 고갈되는 빠른 소모 속도를 보였다.

Fig. 34는 용존산소와 pH의 조절이 *C. sinensis*의 균사체 성장에 미치는 영향을 비교 검토하기 위해 Fig. 30~33의 균체량을 경시적으로 나타낸 결과이다. pH를 제어하지 않은 경우가 pH를 조절했을 때 보다 짧은 유도기를 지나 대수기에

일찍 접어들었으며 배양 1 일에 높은 균체량을 보였다. 일정 통기 속도(1.0 vvm) 하에서 교반속도(150~450 rpm)에 변화를 주어 용존산소(10%이상)를 유지하는 것이 pH 조절 여하에 상관없이 건조균체량이 높았으며, 배양 2 일에 최대균체량을 보였기에 배양일을 단축시키는 결과이다. 이는 교반속도 변화에 따른 용존산소 유지시 산소전달율(OTR, oxygen transfer rate)이 증가하여 세포 내로의 물질 전달이 원활히 이루어지기 때문인 것으로 판단되어진다. 그림에 나타내어진 건조균체량은 wall growth를 배제한 오로지 suspension 상에서의 균체량을 표현한 것이기에 배양종료시 wall growth형태의 균사체를 포함하여 측정한다면 균체량은 더 증가되어질 것이다. 용존산소를 유지하는 것이 균사체 성장을 촉진하는 결과를 보였지만 교반속도를 무한정 늘릴 수 없는 것은 교반속도 증가에 따른 과도한 foam이 발생되어 생물반응기 내부에 부착된 각종 sensor, baffle 및 벽면 등에 wall growth를 유발하며, 강한 전단응력 (shear force)에 의한 shear stress를 받기 때문이다. 그렇다고 너무 낮은 교반속도는 물질 전달이 충분하지 않기 때문에 균사체 성장에 영향을 받는다. 이상의 결과를 바탕으로 용존산소(10% 이상)를 유지하기 위해 교반속도를 150~450 rpm의 범위 내에서 변화를 주는 것이 pH 조절 여하에 상관없이 생물반응기에서 높은 균체량과 함께 배양일을 단축시키는 최적 교반조건임을 알 수 있었다. Fig. 35는 용존산소와 pH의 조절이 *C. sinensis*의 cordycepin 생산에 미치는 영향을 비교 검토하기 위해 Fig. 30~33의 cordycepin 생산량을 경시적으로 나타낸 결과이다. pH를 제어하지 않은 경우가 용존산소 조절 여하에 상관없이 배양 1 일째의 초기 cordycepin 생산량이 높게 나타났다. 한편, 배양말기에는 용존산소를 조절한 경우 균사체가 사멸기에 접어들면서 cordycepin 생산량은 감소한 반면, 용존산소를 조절하지 않은 경우는 cordycepin 생산량이 증가하는 경향을 보였다.

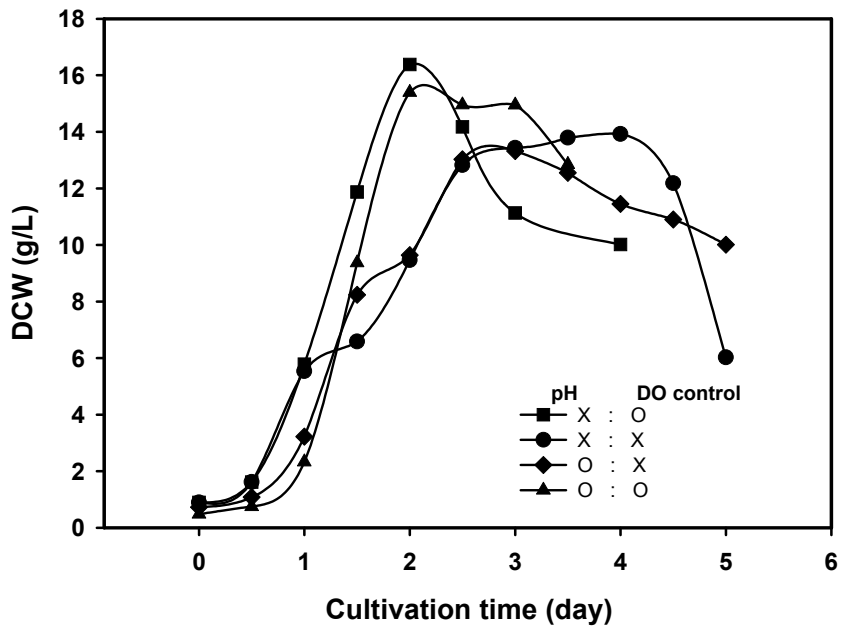


Fig. 34. Comparison of mycelial growth under different DO and pH processes in a batch culture.

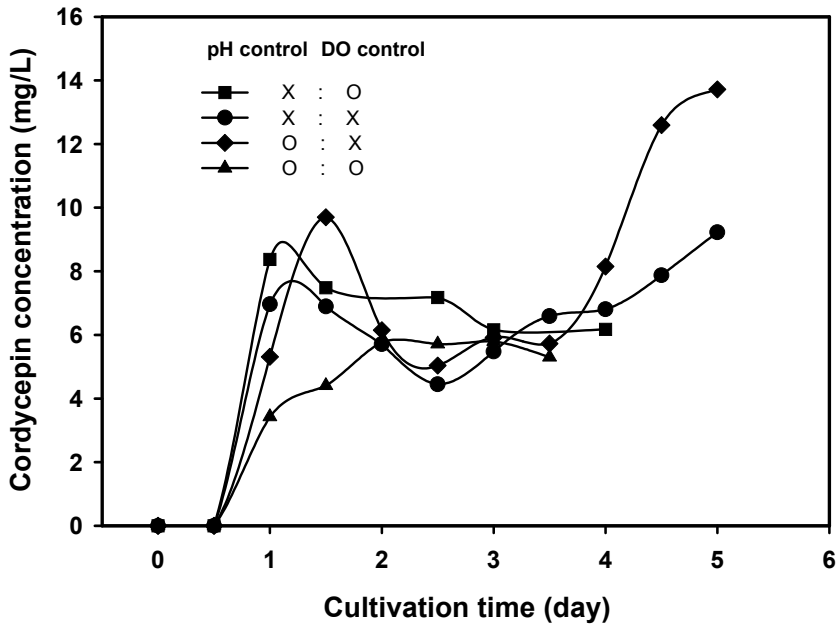


Fig. 35. Comparison of cordycepin production under different DO and pH processes in a batch culture.

Table 4는 용존산소와 pH 제어를 달리한 배양공정에서의 최대 균체량(X_{max}), 최대 비생육속도(μ_{max}), 그리고 최대 cordycepin 생산량(P_{max})을 비교한 것이다. 용존산소를 조절한 것이 균체량이 높았으며, 최대 비생육속도(μ_{max})는 약 0.11 hr^{-1} 로써 용존산소를 조절하지 않은 경우보다 높게 나타났다. 배양초기에는 pH를 조절하지 않았을 때 균사체 성장과 cordycepin 생산속도가 빨랐으며, 대수기에

접어들어서는 용존산소를 조절하는 경우에 배양일을 단축시킬 수 있었고, 배양말기에는 용존산소를 조절하지 않았을 때 cordycepin 생산량이 증가하였다. 이상의 결과들로부터 균사체 성장과 cordycepin 생산성을 높이기 위한 시도로 배양 초기에는 pH를 제어하지 않다가 배양 1 일 이후에 pH와 용존산소를 조절하여 균체량을 높인 후, cordycepin 생산량을 증가시키기 위해 용존산소를 조절하지 않는 실험 디자인을 도출하였다.

Fig. 36~39는 앞의 실험결과에서 도출된 실험 디자인을 검토하기 위해 배양 구간별로 용존산소와 pH의 제어를 달리하여 배양한 결과이다. 3%(v/v)의 접종량, 24°C, 1.0 vvm, 초기 pH 5.5의 배양조건 하에서 용존산소(10% 이상)를 유지하기 위해 교반속도를 조절하다가 균체량이 감소하는 시점부터 용존산소 조절을 멈추었다. 배양 1 일까지는 pH를 조절하지 않다가 0 h, 12 h, 24 h, 72 h에 pH (pH 6.0~6.5)를 조절하여 균사체 성장과 cordycepin 생산에 미치는 영향을 살펴 보았다.

Fig. 36은 초기 pH 5.5의 배양조건 하에서 pH를 제어하지 않고 배양한 결과이다. 균사체 성장과 cordycepin 생산량을 측정한 결과, 배양 1 일 이후 균사체가 완만히 증가하다가 배양 3 일에 wall growth가 심하면서 배양 3.5 일에 15.1 g/L의 최대 균체량을 나타내었다. 배양 5.5 일에 suspension상의 균체량은 12.7 g/L였으며 wall growth를 포함한 균체량은 19.6 g/L였다. Cordycepin의 생산은 배양 1 일부터 생산되기 시작하여 완만히 증가하다 배양 4 일에는 9.2 mg/L의 높은 cordycepin 생산량을 나타냈다. 잔존 maltose량은 배양 0.5 일까지는 초기 maltose량을 유지하다가 미량 소모되었으며, 배양 1 일부터 1.5 일 사이에 급격히 소모되어 배양 1.5 일에 완전히 고갈되는 빠른 소모 속도를 보였다. pH는 배양초기 증가하다가 maltose가 모두 고갈되는 시점에서 pH 5.36으로 낮아졌다

Table 4. Comparison of mycelial growth and cordycepin production under different DO and pH processes

Processes	Maximum cell density, X_{\max} (g/L)	Specific growth rate, μ (1/h)	Maximum cordycepin P_{\max} (mg/L)
Controlled DO & pH	15.4 (2day)	0.116	5.8
Controlled pH & Uncontrolled DO	13.4 (3day)	0.085	13.7
Controlled DO & Uncontrolled pH	16.4 (2day)	0.106	8.4
Uncontrolled DO & pH	14.0 (4day)	0.102	9.2

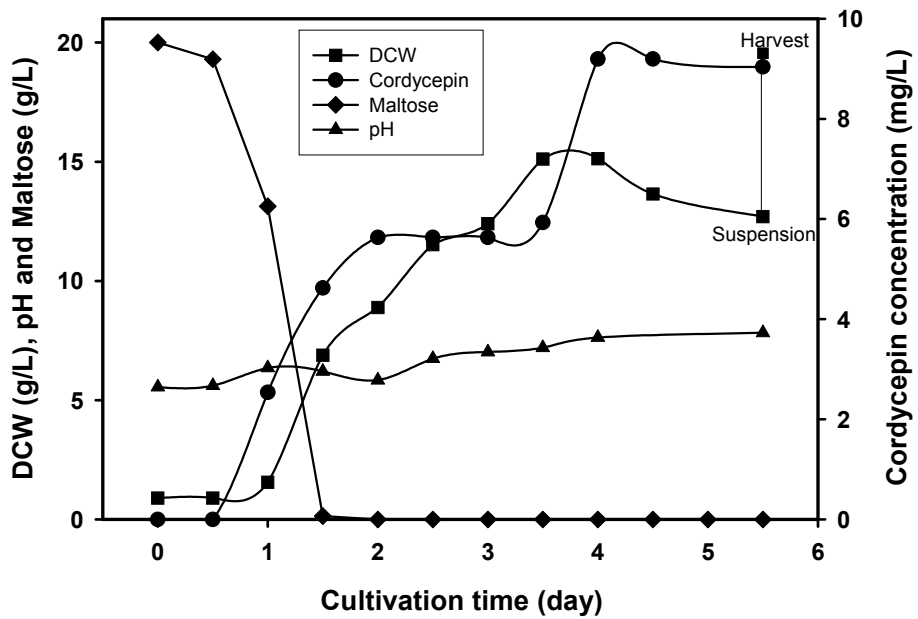


Fig. 36. Profiles of mycelial growth and cordycepin production without pH control(initial pH 5.5) under DO control (over 10%) in a batch culture.

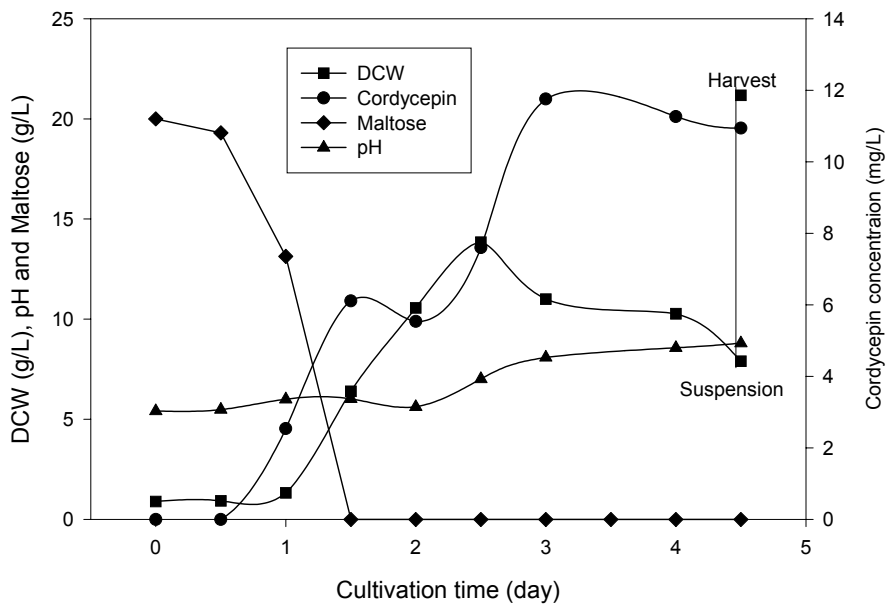


Fig. 37. Profiles of mycelial growth and cordycepin production with pH control (12 h, 1~1.5 days) under DO control (over 10%) in a batch culture.

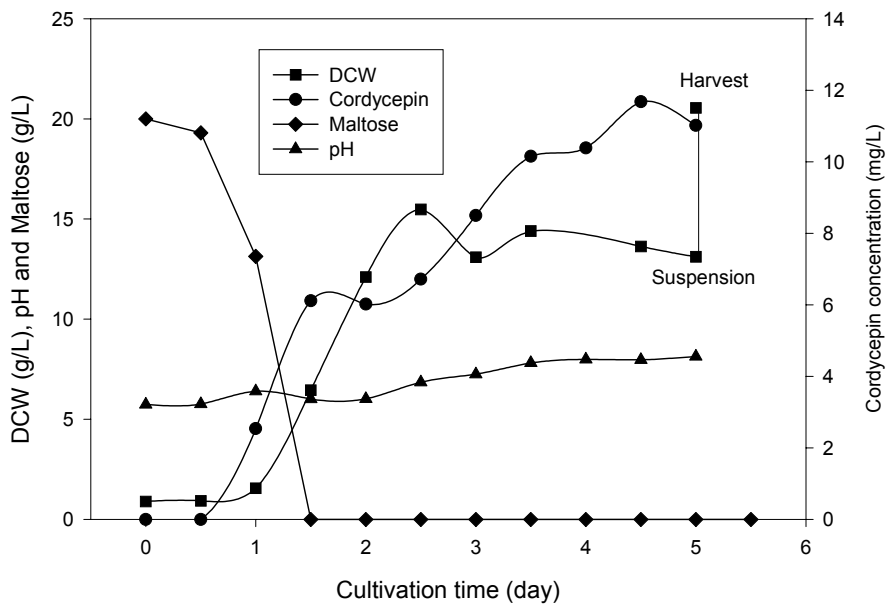


Fig. 38. Profiles of mycelial growth and cordycepin production with pH control (24 h, 1~2 days) under DO control (over 10%) in a batch culture.

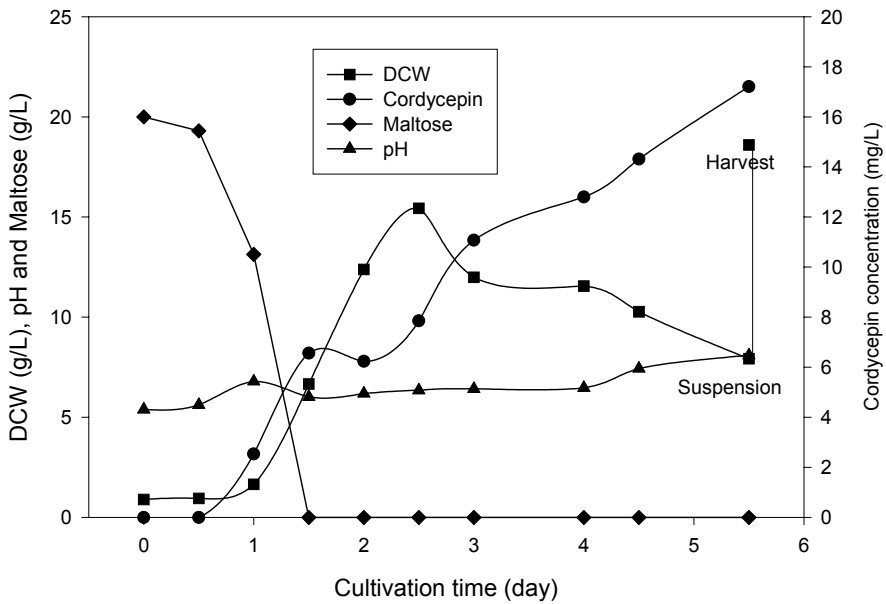


Fig. 39. Profiles of mycelial growth and cordycepin production with pH control(72 h, 1~4 days) under DO control(over 10%) in a batch culture.

pH가 다시 점차적으로 상승하는 결과를 보였다.

Fig. 37은 초기 pH 5.5의 배양조건 하에서 배양 1일부터 12 h만 pH를 제어하여 배양한 결과이다. 균사체 성장과 cordycepin 생산량을 측정한 결과, 배양 1일 이후 균사체가 급격히 증가하다가 wall growth가 심하여 배양 2.5 일에 13.84

g/L의 최대 균체량을 나타내었다. 배양 4.5 일에 suspension상의 균체량은 7.9 g/L였으며 wall growth을 포함한 균체량은 21.2 g/L였다. Cordycepin의 생산은 배양 3 일에는 11.8 mg/L의 높은 cordycepin 생산량을 나타냈다. 배양여액이 갈색을 띄다가 배양 3 일 이후 배양여액이 밝은 노랑을 나타냈다. 12 h에서만 pH를 제어하여 배양한 결과 제어하지 않은 경우(Fig. 36)보다 균체량과 cordycepin 생산량이 높아졌다. 잔존 maltose량은 Fig. 36과 같이 배양 1 일부터 1.5 일 사이에 급격히 소모되어 배양 1.5 일에 완전히 고갈되는 빠른 소모 속도를 보였다. pH는 배양초기 증가하다가 maltose가 완전히 소모되는 시점인 배양 1.5 일에서 pH 조절을 멈추니 pH가 점차적으로 상승하는 결과를 보였다.

Fig. 38은 초기 pH 5.5의 배양조건 하에서 배양 1 일부터 24 h에서만 pH를 제어하여 배양한 결과이다. 균사체 성장과 cordycepin 생산량을 측정한 결과, 배양 1 일 이후 균사체가 급격히 증가하다가 배양 2.5 일에 15.48 g/L의 최대 균체량을 나타내었다. 배양 5 일에 suspension상의 균체량은 13.1 g/L였으며 wall growth을 포함한 균체량은 20.6 g/L였다. Cordycepin의 생산은 배양 4.5 일에 11.7 mg/L의 높은 cordycepin 생산량을 나타냈다. 배양여액이 갈색을 띄다가 배양 3.5 일 이후 배양여액이 밝은 노랑을 띄었다. 24 h 동안 pH를 제어하여 배양한 결과 제어하지 않은 경우(Fig. 36)보다 균체량과 cordycepin 생산량이 높아졌다. 잔존 maltose량은 Fig. 37과 같이 배양 1.5 일에 완전히 고갈되었다. pH는 pH 조절을 멈춘 시점부터 pH가 점차적으로 상승하는 결과를 보였다.

Fig. 39은 초기 pH 5.5의 배양조건하에서 배양 1 일부터 72 h 동안 pH를 제어하여 배양한 결과이다. 균사체 성장과 cordycepin 생산량을 측정한 결과, 배양 1일 이후 균사체가 급격히 증가하다가 배양 2.5 일에 15.4 g/L의 최대 균체량을 나타내었다. 배양 5.5일에 suspension상의 균체량은 7.9g/L였으며 wall growth을 포함한 균체량은 18.6 g/L였다. Cordycepin의 생산은 배양 5.5 일에 17.2 mg/L의 높은 cordycepin 생산량을 나타냈다. 배양여액이 갈색을 띄다가 배양 3 일 이후 배양여액이 밝은 노랑을 나타냈다. 이는 균사체가 성장하면서 cordycepin 생성을 촉진하는 물질을 분비하여 cordycepin 농도가 증가되는 것으로 판단되어진다. 72 h 동안 pH를 제어하여 배양한 결과 제어하지 않은 경우(Fig. 36)보다 균체량과 cordycepin 생산량이 높아졌다. 잔존 maltose량은 Fig. 38과 같이 배양 1.5 일에

완전히 고갈되었다. pH는 pH 조절을 멈춘 시점부터 pH가 급격히 상승하는 결과를 보였다.

Fig. 40은 용존산소와 pH의 제어를 배양 구간별로 달리하여 균사체 성장에 미치는 영향을 비교 검토하기 위해 Fig. 36~39의 균체량의 경시적 변화를 나타낸 결과이다. 배양 1 일까지는 pH를 조절하지 않다가 0 h, 12 h, 24 h, 72 h에 pH(pH 6.0~6.5)를 조절하여 균체량을 비교한 결과, pH를 조절하지 않았을 때 배양 4 일에서 최대 균체량을 나타낸 반면, pH를 제어했을 때 배양 2.5 일에 최대균체량을 보였기에 배양일을 단축시키는 결과이다. 배양 2.5 일에 균체량을 비교한 결과 24 h, 72 h 동안 pH 조절을 한 경우는, 15.4 g/L의 높은 균체량을 보였으며 12 h, 0 h는 각각 13.8 g/L, 11.52 g/L의 상대적으로 낮은 균체량을 보였다.

Fig. 41은 용존산소와 pH의 제어를 배양 구간별로 달리하여 *C. sinensis*의 cordycepin 생산에 미치는 영향을 비교 검토하기 위해 Fig. 36~39의 cordycepin 생산량의 경시적 변화를 나타낸 결과이다. pH를 조절하였을 때 pH를 제어하지 않았을 때보다 cordycepin 생산량이 높게 나타났으며 pH를 조절한 시간이 길수록 cordycepin 생산량이 증가하는 경향을 보여주었다. 배양 1 일 이후에 pH를 조절하는 것은 균사체 성장과 cordycepin 생산량을 증가시키는 결과를 보여주었다.

5. 회분배양의 응용

Fig. 42는 균사체와 cordycepin 생산량을 높이고자 최적 회분배양 조건하에 탄소원인 maltose를 Pulsed-feeding mode로 공급하여 배양한 결과이다. Maltose 공급 시점은 Fig. 39에서 잔존 maltose가 배양 1 일부터 1.5 일 사이에 급격히

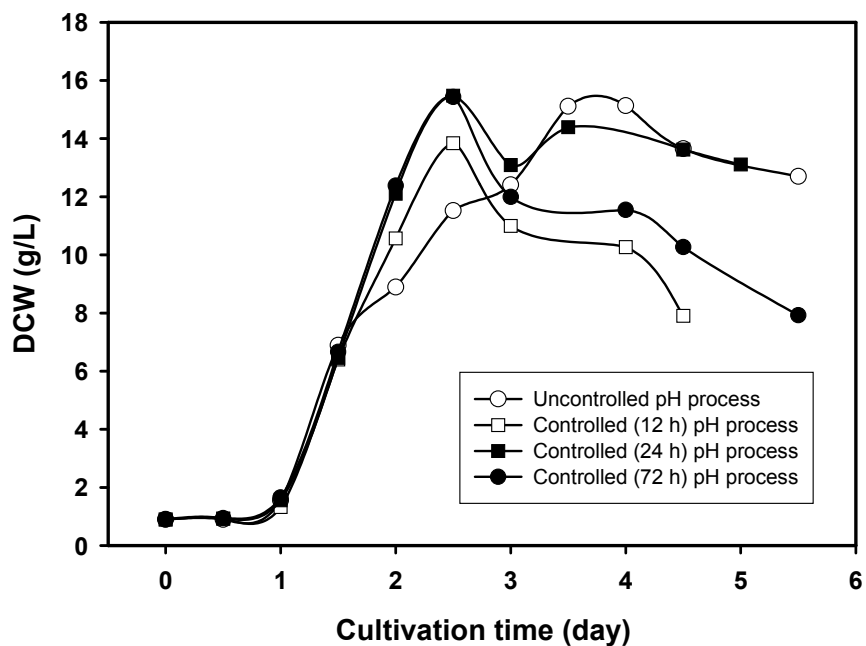


Fig. 40. Comparison of mycelial growth under various time course of pH control in a batch culture.

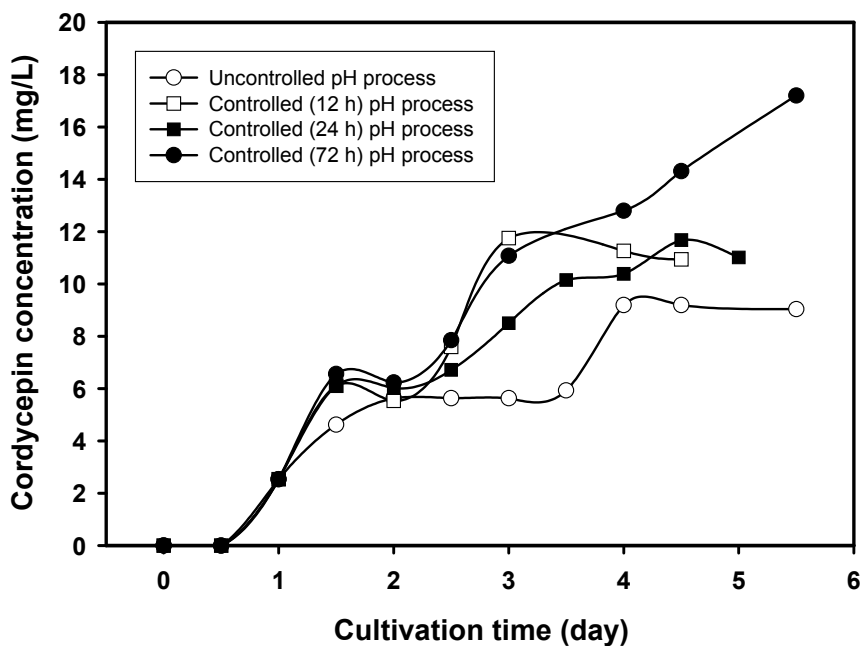


Fig. 41. Comparison of cordycepin production under various time courses of pH control in a batch culture.

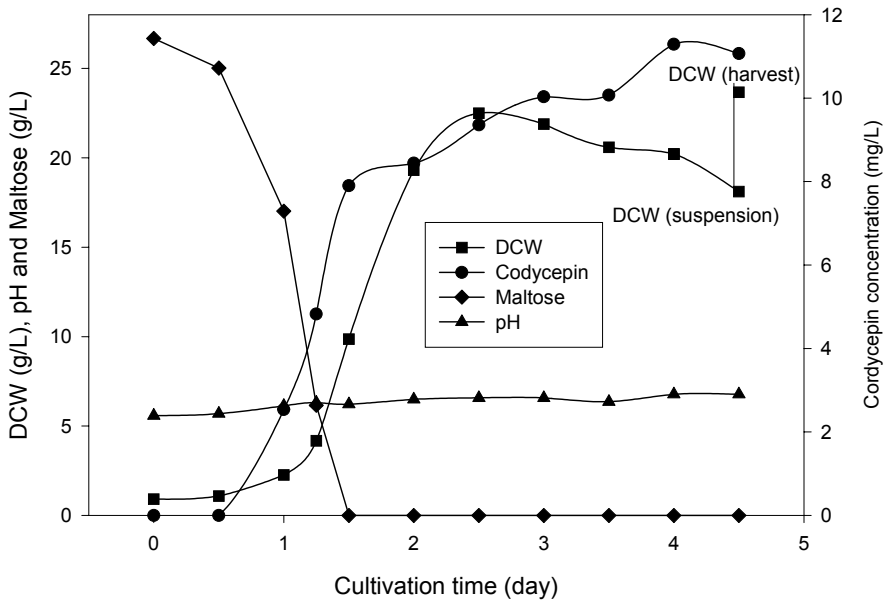


Fig. 42. Profiles of mycelial growth and cordycepin production with pulsed-feeding strategy in a batch culture mode(pulsed-feeding medium : 40g/L maltose).

소모되어 배양 1.5 일에 완전히 고갈되었으므로 maltose가 거의 소모되어 미량 잔존하는 1.25 일을 maltose 공급 시점으로 잡았다. 40 g/L의 maltose를 1.25 일

에 100 mL, 1.5 일에 250 mL, 2 일에 100 mL를 첨가한 결과 maltose는 모두 소모되었으며 균사체가 급격히 증가하여 배양 2.5 일에 22.5 g/L의 높은 균체량을 나타내었다. Cordycepin 생산량은 배양 4 일에 11.3 mg/L를 나타내었다.

회분배양과 pulsed-feeding 회분배양에서의 균체량과 cordycepin 생산량을 비교한 결과를 Fig. 43에 나타내었다. Maltose를 간헐적으로 공급하였을 때가 회분배양에서보다 균체량이 45% 이상 증가하였다. 배양 2.5 일까지는 cordycepin 생산량이 maltose를 공급하였을 때 높게 나타났다. 배양 1.5 일에 maltose가 모두 고갈되는 빠른 소모 속도를 토대로, maltose를 간헐적으로 공급함으로써 균사체 성장과 cordycepin 생성을 촉진할 수 있었다.

6. 유가식 배양

*C. sinensis*의 균사체 성장과 cordycepin의 생성을 촉진하여 균체량과 cordycepin 생산 수율을 높이기 위한 시도로 회분식 배양의 배지 속에 기질을 공급하는 유가식 배양을 실시하였다. Fig. 43을 통해 탄소원인 maltose를 공급기질로 보고 maltose를 공급함으로써 짧은 배양시간 내에 고밀도의 균체량을 얻기 위해 배양기간동안 탄소원의 농도가 적합한 수준으로 유지되게 하였다. 최적의 maltose 공급 방법을 결정하기 위해, maltose를 공급하기 위한 제어 지시변수로서 기질 농도 이외에도 대사작용에 의한 pH와 용존산소를 고려하여 배양하였다.

가. pH Stat 방법

회분배양에서 잔존 maltose량은 배양 0.5 일까지는 초기 maltose량을 유지하다가 배양 1 일부터 1.5 일 사이에 급격히 소모되어 배양 1.5 일에 완전히 고갈되는 빠른 소모 속도를 보였다. pH는 배양초기에 증가하다가 다시 감소하기 시작하여 maltose가 모두 고갈되는 시점에서 pH 5.5 이하로 낮아졌다가 다시 탄소원의 고갈로 인한 상대적인 암모늄이온의 증가로 pH가 점차적으로 상승하는 결

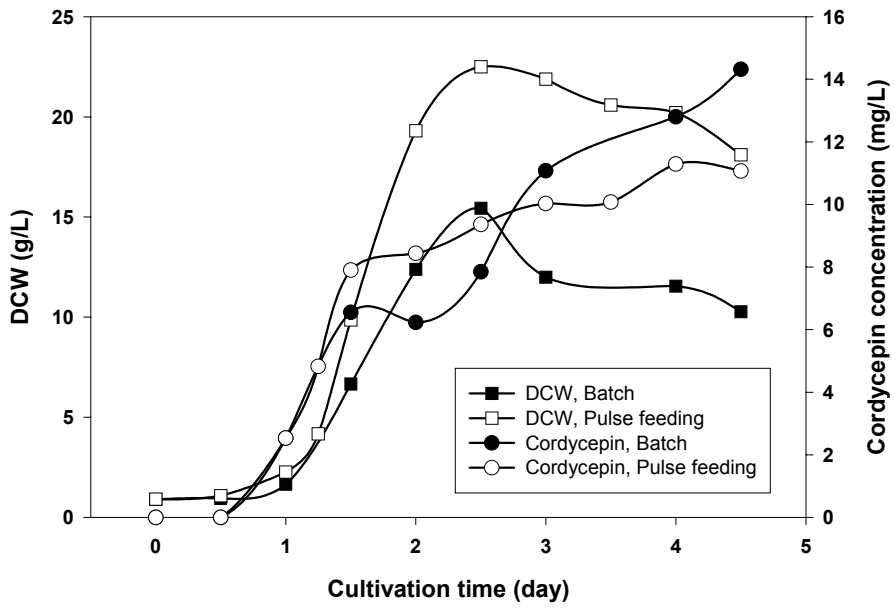


Fig. 43. Comparison of mycelial growth and cordycepin production under different batch culture modes (pulsed-feeding medium : 40 g/L maltose).

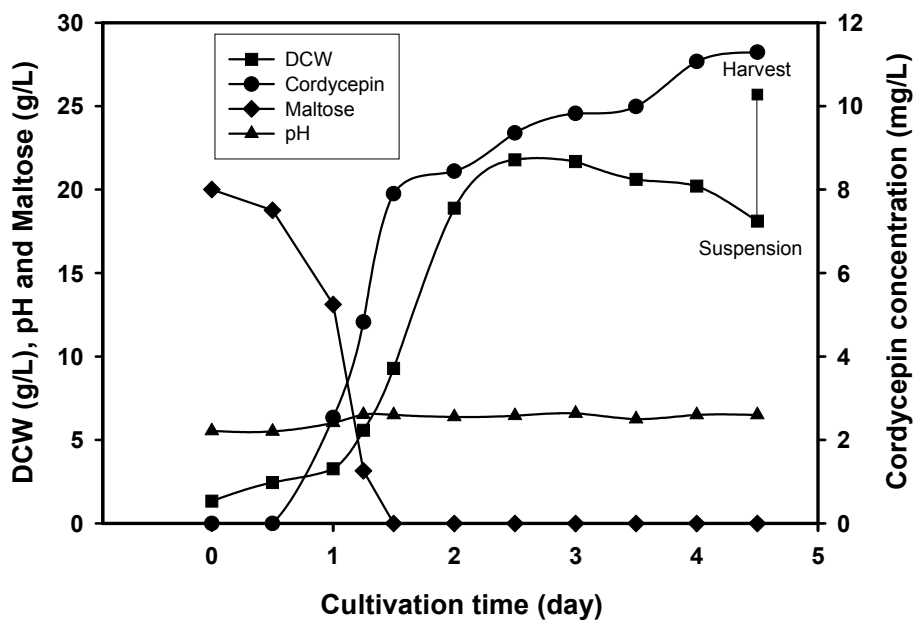


Fig. 44. Profiles of mycelial growth and cordycepin production under DO control(over 10%) with medium feeding by pH stat(feeding medium : 200 g/L maltose).

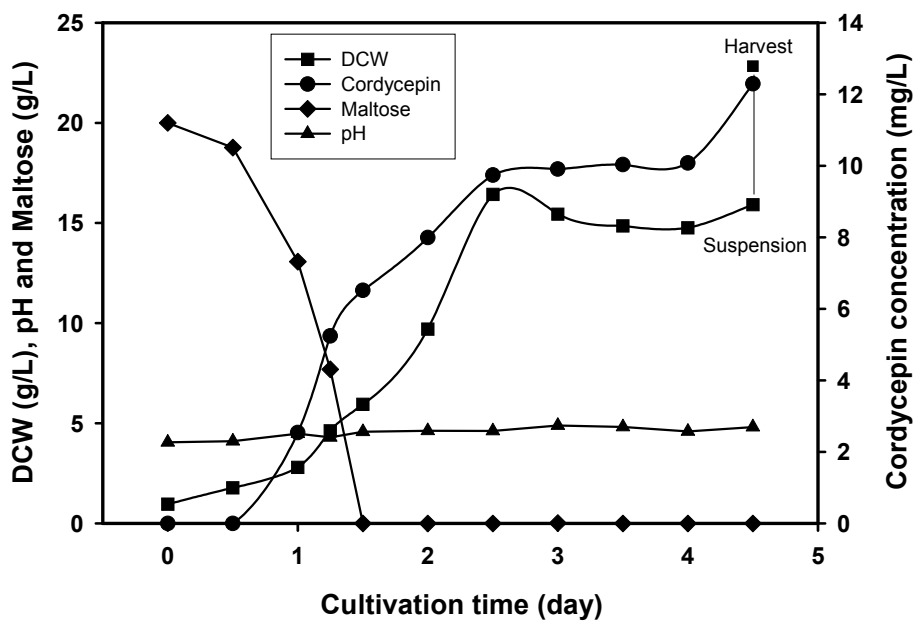


Fig. 45. Profiles of mycelial growth and cordycepin production under DO control(over 10%) with medium feeding by pH stat(feeding medium : 300 g/L maltose).

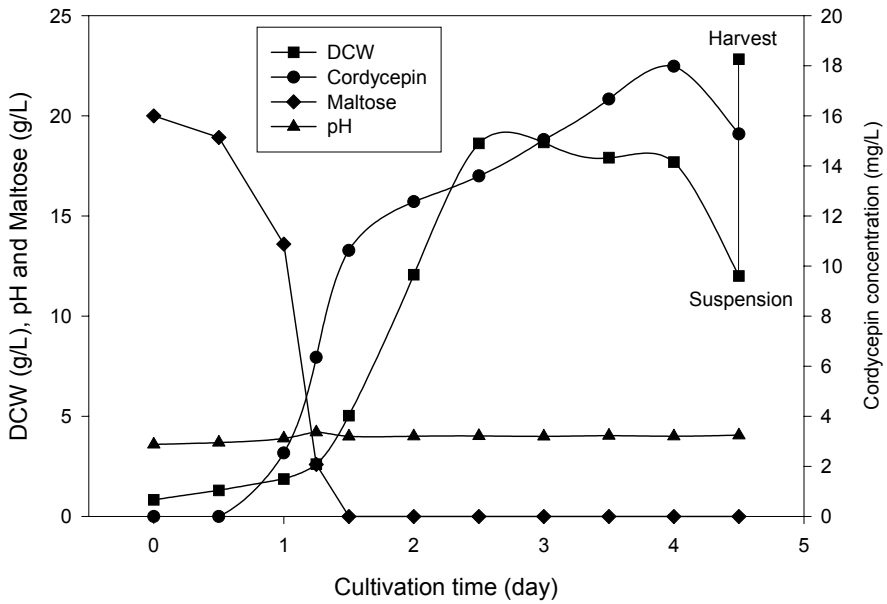


Fig. 46. Profiles of mycelial growth and cordycepin production under DO control(over 10%) with medium feeding by pH stat(feeding medium : 400 g/L maltose).

를 보였다. 따라서 Fig. 44~46은 잔존 maltose 농도와 pH 변화의 상관관계를 근거로 하여 maltose가 미량 잔존하는 1.25 일부터 pH를 일정(pH 6.25)하게 유지시키면서 maltose를 공급하는 pH-stat을 적용한 결과이다. 공급배지의 농도는 pH를 조절할 수 있어야한다. 앞에서 언급된 pulsed-feeding시에 사용된 40 g/L의

maltose 공급배지는 pH 5.14로 pH를 조절하기에는 부족한 농도였다. 따라서 pH를 조절할 수 있는 고농도의 maltose를 사용하여 공급배지 농도에 대한 영향을 살펴보았다. Fig. 44는 pH 4.15를 나타내는 200 g/L의 maltose 공급배지를 가지고 pH-stat을 적용한 결과이다. 그 결과, pH는 일정하게 유지되었으며 pH-stat에 의해 공급된 maltose는 완전히 소모되었다. 배양 2.5 일에 21.8 g/L의 최대 균체량을 나타내었다. Cordycepin의 생산은 배양 4.5 일에 11.3 mg/L의 높은 cordycepin 생산량을 나타냈다. Fig. 45는 pH 3.90을 나타내는 300 g/L의 maltose 공급배지를 가지고 pH-stat을 적용한 결과이다. 그 결과, pH는 일정하게 유지되었으며 pH-stat에 의해 공급된 maltose는 완전히 소모되었다. 배양 2.5 일에 23.0 g/L의 최대 균체량을 나타내었다. Cordycepin의 생산은 배양 4.5 일에 12.3 mg/L의 높은 cordycepin 생산량을 나타냈다. Fig. 46는 pH 3.68을 나타내는 400 g/L의 maltose 공급배지를 가지고 pH-stat을 적용한 결과이다. 그 결과, pH는 일정하게 유지되었으며 pH-stat에 의해 공급된 maltose는 완전히 소모되었다. 배양 2.5 일에 30.0 g/L의 최대 균체량을 나타내었다. Cordycepin은 배양 4 일에 18.0 mg/L의 최대 cordycepin 생산량을 나타냈다.

Fig. 47은 pH signal에 의한 pH-stat에서 균사체 성장에 대한 공급 배지농도의 영향을 알아보기로 maltose의 농도를 달리하여 배양한 Fig. 44~46의 결과를 비교한 것이다. 공급된 maltose의 농도가 높을수록 균체량이 증가하여 400 g/L의 공급배지로 pH-stat을 했을 때 30.0 g/L의 최대 균체량을 나타내었다. 공급된 maltose의 양은 120~160 g이었으나 공급배지의 농도가 높을수록 투입된 양이 적었기에 고농도로 적은 양을 첨가하는 것이 배양상 유리한 것으로 판단되었다. Fig. 48은 cordycepin 생산에 대한 공급 배지농도의 영향을 알아보기로 maltose의 농도를 달리하여 배양한 Fig. 44~46의 cordycepin 결과를 비교한 것이다. 공급된 maltose의 농도가 높을수록 cordycepin 생산량이 증가하여 400 g/L의 공급

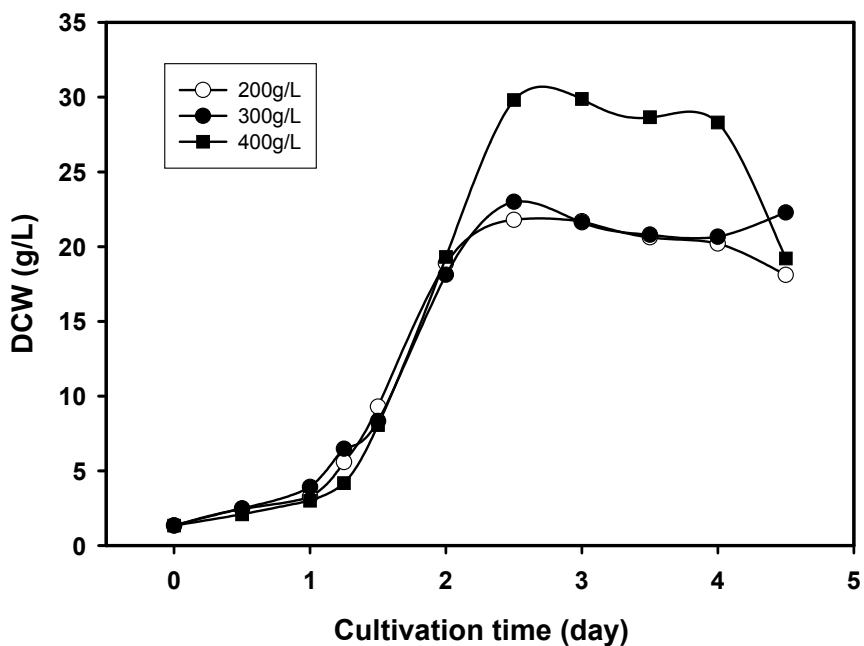


Fig. 47. Comparison of mycelial growth under various concentrations with medium feeding by pH stat(feeding medium : 200~400 g/L maltose).

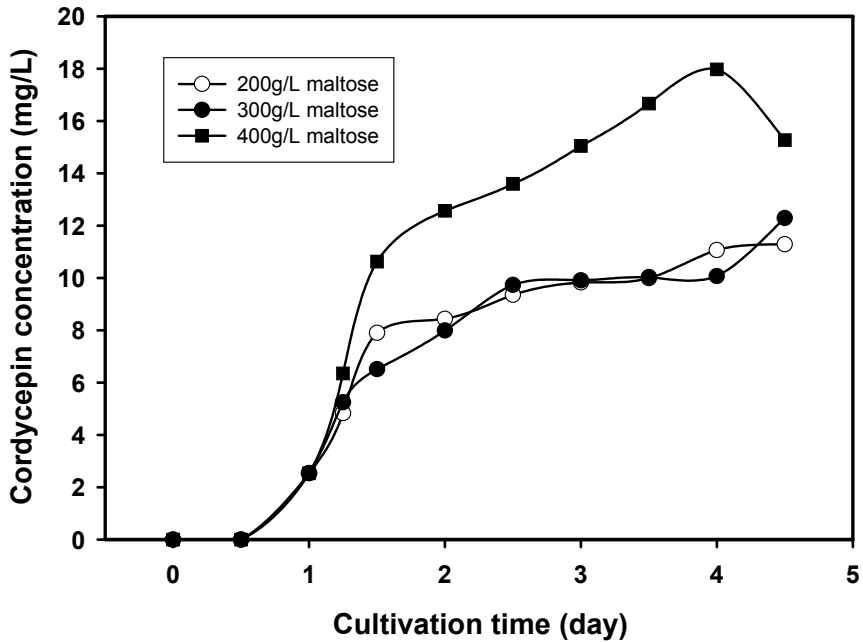


Fig. 48. Comparison of cordycepin production under various concentrations with medium feeding by pH stat(feeding medium : 200~400 g/L maltose).

배지로 pH-stat을 했을 때 배양 4일에 18.0 mg/L의 최대 cordycepin 생산량을 나타내었다. Cordycepin 생산에 있어서도 공급배지의 농도가 높을수록 배양상 유리한 것으로 판단되었다.

나. 일정비율 공급방법 (Constant Feeding Strategy)

탄소원인 maltose를 투입하기 위한 공급 시스템으로서 일정 비율 공급방법을 택하였다. 배양이 끝날 때까지 탄소원의 농도를 일정하게 유지시키기 위해 maltose를 일정비율로 지속적으로 첨가하였다. Maltose 공급배지의 주입 속도는 Fig. 46의 결과로부터 구하였다. 또한 공급배지의 주입 속도를 계산함에 있어 일정하게 공급되어지는 maltose의 양과 균사체가 소모하는 속도를 근거로 Peristaltic pump(Cole-Parmer Co., Master flex 7518-10)의 속도와 Tubing size를 고려하여 maltose의 농도는 300 g/L, 주입속도는 8.4 mL/h로 결정하게 되었다. Fig. 49는 초기 volume을 2 L로 시작하여 Peristaltic pump를 이용하여 1.25 일 부터 8.4 mL/h의 속도로 maltose 공급배지를 주입함으로써 배양한 결과이다. pH를 조절하지 않았음에도 공급되는 maltose의 pH가 3.90이기에 배양기간 내내 pH는 일정(pH 5.5~6)하게 유지되었으며 8.4 mL/h의 속도로 공급되어지는 maltose는 완전히 소모되었다. 유가 배양이 시작되는 시점부터 균체량이 급격히 증가하여 배양 3 일부터는 배지내 점도가 증가하여 sampling을 하기 힘들 정도였으며, 배양액은 진한 밝은 노랑색을 띄었다. 배양 4일에 39.4 g/L의 최대 균체량을 나타내었다. 이는 suspension상에서의 균체량이고 이때 배양을 종료하여 wall growth를 포함시킨다면 균체량은 더 증가할 것이다. 배양 4.5일째에 배양을 종료한 다음 균체량은 wall growth 포함하여 44.3 g/L를 나타냈다. Filamentous form으로 자라는 대부분의 fungi가 가지는 배양 특성상 균사체가 성장함에 따라 배지내 점도가 높아져 균사체가 성장하는데 한계가 있다. 따라서 44.3 g/L의 균체량은 fungi 배양에서 한계치에 도달한 최대치로 생각되어진다. Cordycepin의 생산은 배양 3.5일에 15.4 mg/L의 높은 cordycepin 생산량을 나타냈다. 주입 기질의 농도가 300 g/L로 고농도이기 때문에 경제성을 고려하여 주입배지의 농도를 100 g/L의 농도로 낮춰 일정비율 공급한 결과를 Fig. 50에 나타내었다. 배양

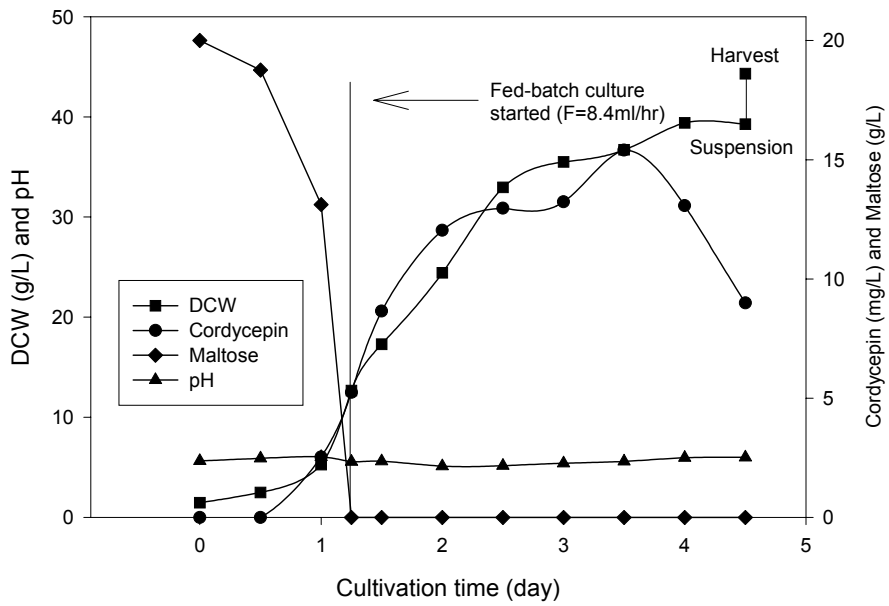


Fig. 49. Profiles of mycelial growth and cordycepin production under DO control(over 10%) with constant feeding strategy(feeding medium : 300 g/L maltose).

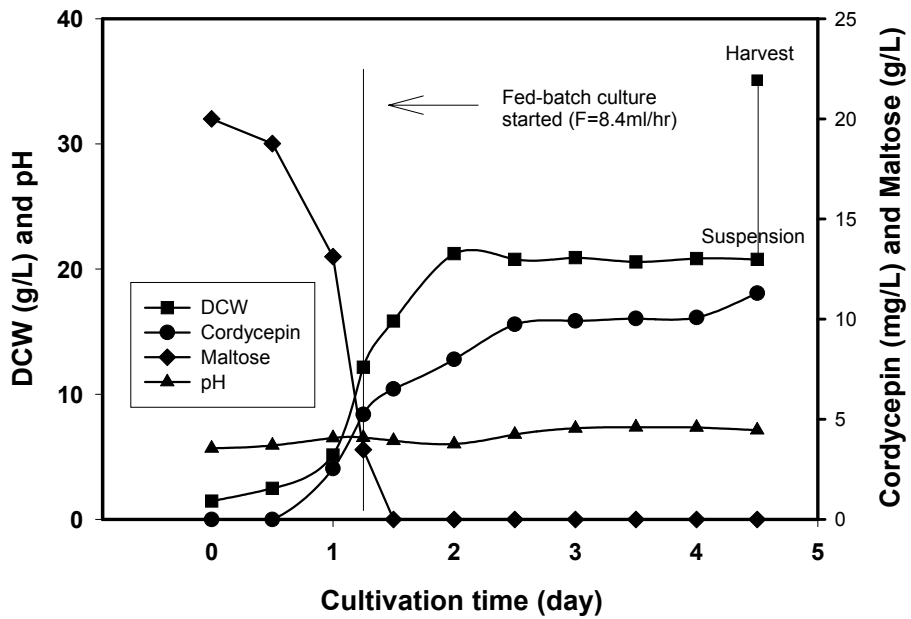


Fig. 50. Profiles of mycelial growth and cordycepin production under DO control(over 10%) with constant feeding strategy(feeding medium : 100 g/L maltose).

2일에 21 g/L의 균체량을 나타내었으며 지속적인 기질 공급으로 인해 21 g/L의 균체량을 유지하였다. Cordycepin의 생산은 배양 4.5일에 11.3 mg/L의 cordycepin 생산량을 나타냈다.

Fig. 51과 52는 일정 비율 공급 방법에 의해 maltose 공급 배지농도를 달리하여 배양한 Fig. 49~50의 균체량과 cordycepin 생산량을 비교한 것이다. 주입 기질의 농도가 100 g/L일 때 배양 2 일에 21 g/L의 균체량을 나타낸 후 지속적인 maltose의 공급과 함께 균체량이 유지된 반면 300 g/L의 고농도에서는 기질을 공급하면서 균체량이 급격히 증가하여 배양 4 일에 39.4 g/L의 최대 균체량을 나타내었다. Fig. 52에서 보여지는 것처럼 기질을 공급한 이후로 주입 기질의 농도가 100 g/L에 비해 300 g/L일 때 cordycepin의 생산량이 증가하였다.

Table 5는 플라스크 배양, 회분배양, 회분배양응용, 유가식 배양에서의 최대 균체량과 최대균체량을 보이는 배양일, wall growth를 포함한 균체량, 최대 cordycepin 생산량을 비교한 것이다. 생물반응기를 통한 회분배양과 유가식 배양으로 균체량(최대 3.5 배이상, wall growth 포함)을 높일 수 있었으며 동시에 배양일(7~9일)도 단축시킬 수 있었다. 일정비율공급 방법에 의한 유가식 배양을 통하여 cordycepin 생산량(56.1 mg/L)을 높일 수 있었다. Cordycepin은 주로 세포외로 분비되어 배양여액에서 검출되어지나 균체내에 함유한 cordycepin의 생산량도 자연산 동충하초의 기주에 함유된 양과 비슷하므로 자연산을 대신할 가능성을 보이는 결과이다. 자연산 동충하초인 *C. sinensis*의 자실체와 기주로부터 각각 30.1 mg/100 g cell과 18.9 mg/100 g cell의 cordycepin을 생산할 수 있었다. 현재 자연산 동충하초가 국제 거래에서 가격이 970 \$/kg으로 고가로 거래되고 있고 표준시약으로 상용되는 cordycepin(Sigma Co., C3394)도 25 mg당 약 215,600원이다. 따라서 균사체 배양 기술을 통해 44.3 g/L의 균체량과 균사체와 배양 부산물인 배지로부터 56.1 mg/L의 cordycepin 생산량은 산업적 경제성이 있는 것으로 생각되어지며 또한 균사체 배양액을 원료로한 가공식품 개발 가능성이 보이는 결과이다.

이상으로 자연산 동충하초인 *C. sinensis*의 균사체 배양을 목적으로 균사체 성장과 cordycepin 생산 최적화를 위한 기술 개발을 위하여 플라스크배양과 회분

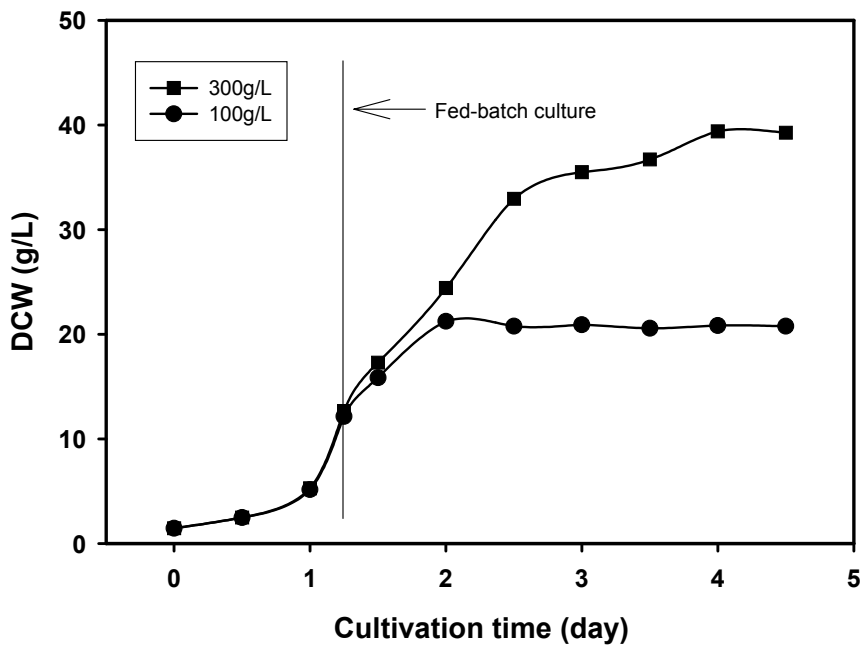


Fig. 51. Comparison of mycelial growth under different concentrations of constant feeding medium in fed-batch cultures.

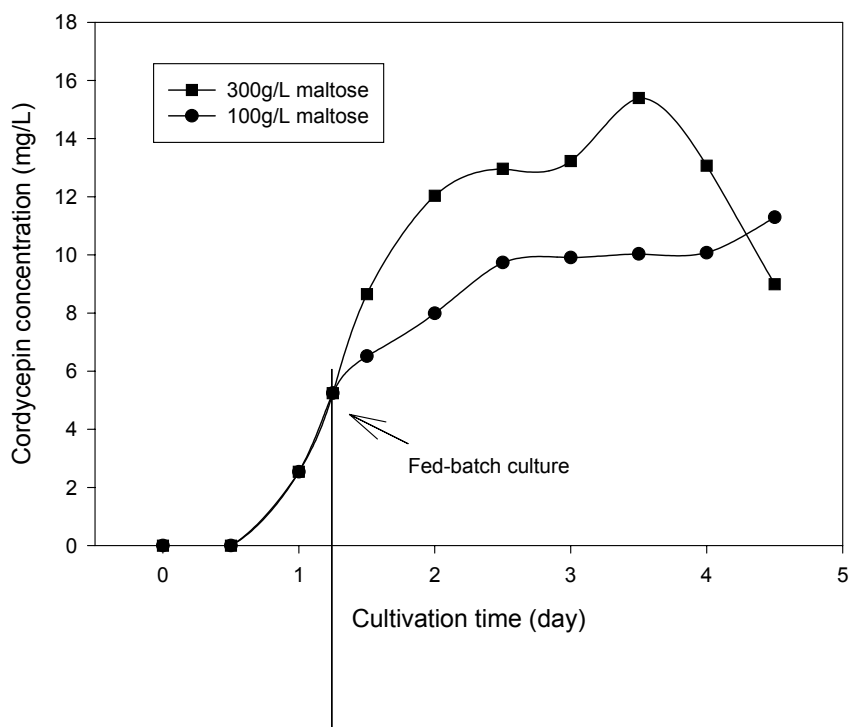


Fig. 52. Comparison of cordycepin production under different concentrations of constant feeding medium in fed-batch cultures.

Table 5. Comparison of mycelial growth and cordycepin production in different culture mode

배양을 통해 최적 성장 조건과 최적 배지 조성을 구했다. 또한 회분배양의 응용과 다양한 조건 (pH-stat, constant feeding strategy)의 유가식 배양 결과 탄소원인 maltose를 투입하기 위한 공급 시스템을 확립하였다. 공급배지의 최적농도 및 주입속도와 함께 교반속도의 동시 조절을 통해 생물반응기 내의 용존산소와 maltose를 조절함으로써 균체량과 cordycepin 의 생산 수율을 높일 수 있었다.

Type of culture		Maximum cell density, X_{max} (g/L)		Maximum productivity, P_{max}		
		Suspension	Suspension + Wall growth	Suspension (mg/L)	Mycelium (mg/100g)	Total (mg/L)
Flask	Modified medium	12.12 (11day)		7.8		
	Uncontrolled pH & DO control	14 (4day)		9.2		
Batch	pH control (72 h)	15.4 (2.5day)	18.6	17.2	28.4	23.9
	Pulse feeding strategy (40g/L)	22.5 (2.5day)	23.7	11.3	18.6	28.1
Fed-batch	pH Stat (400g/L)	30 (2.5day)	36.5	18	25.2	45.7
	Constant feeding strategy (300g/L)	39.4 (4day)	44.3	15.4	19.4	56.1

고농의 maltose 공급으로 pH가 최적 pH로 자동 조절되는 결과를 보였다. 이상의 결과를 토대로 한다면 *C. sinensis*의 균체량과 cordycepin의 생산 수율을 극대화

시킬 수 있을 것이며, 산업화 활용 가능성이 있을 것으로 생각되어진다.



Fig.
53.
Myceli
al
growt
h of
C.

sinensis in a jar fermentor(5 L).

제4절 *Cordyceps sinensis* 균사체를 이용한 가공제품 개발

1. Cordycepin 분리

배양액



여과



4 일간 교반(activated charcoal, 500 g)



24 시간 방치 후 siphon으로 상등액 제거



activated charcoal 감압여과 후 24℃에서 7 일간 건조



Soxhlet 장치에서 acetone으로 7 일간 추출



Acetone 혼합물(2 L) 감압농축



냉각 acetone(20 ml)으로 갈색 잔사 수세



가열한 n-butanol(50 ml)에 용해



냉각 후 여과



바늘 모양의 결정(1.0 g)



Ethanol 또는 n-propanol로 재결정화 가능

2. 정제 제품

C. sinensis 배양액을 121℃에서 15 분간 살균하여 균사체의 응집을 유도하고 감압여과 한다. 여과액은 cordycepin 분리에 사용하고 여과박(균사체)은 30℃에서 건조하였다. 건조된 분말을 미분쇄하고 정제 제품의 원료로 사용하였다. *C. sinensis* 품종은 아직 식품 가공원료로 사용할 수는 없지만 향후 식약청에서 허

용하면 식품공전에서 특수영양식품중 영양보충용식품으로 허가 받을 수 있도록 제조하였다. 이외에도 다양한 영양소를 보충한 정제의 개발이 가능한데, 타정이 가능한 범위에서 강화하고자 하는 영양소를 1회 섭취 때 해당 영양소의 일일권장량의 15% 이상을 섭취할 수 있는 양을 강화하면 특수영양식품으로 허가 받을 수 있다.

Table 6. *C. sinensis* tablet enriched with vitamins

원료	첨가량(300 mg/정 기준)	첨가량(3 ton 기준)	배합비(%)
분말셀룰로오스	60 mg	600 kg	20.0
동충하초 분말	215 mg	2,150 kg	71.7
산화아연	3 mg	30 kg	1.0
스테아린산	1.5 mg	15 kg	0.5
비타민 A	140 µgRE	1.4 kg	0.05
비타민 D	2 µg	20 g	
비타민 E	2 mg	20 kg	0.67
비타민 C	14 mg	140 kg	4.67
비타민 B ₁	0.28 mg	2.8 kg	0.09
비타민 B ₂	0.32 mg	3.2 kg	0.11
나이아신	3.6 mg	36 kg	1.2
비타민 B ₆	0.30 mg	3 kg	0.1
엽산	50 µg	500 g	0.02

3. 음료 제조

음료는 두 가지 방법으로 원료를 처리하였는데 첫째는 균사체 발효액을 있는 그대로 초음파로 파쇄하고 여과한 후 여액을 음료 제조 원료로 사용하였다. 둘째는 발효액을 1 기압, 121℃에서 살균하여 균사체의 응집을 유도하고 여과한 후 여과박인 균사체와 여과액인 배양액을 분리하였다. 균사체는 증류수로 3회 수세하고 균체량의 10 배의 증류수를 가하고 초음파로 파쇄하는 과정을 거쳐 균사체

추출물을 제조하였다. 발효액은 상기한 cordycepin 정제 과정을 cordycepin 결정을 얻었다. 발효액 전체를 사용할 경우 배지 성분이 모두 식용 가능한 원료이기 때문에 식품위생법 상 문제는 없으나 발효취가 남아있으므로 음료로서 기호성을 부여하기 위해 향미를 강하게 조절하였다. 균사체를 분리하여 수세하고 cordycepin 결정을 얻어 음료를 제조할 경우에는 향미 조절이 용이하였으나 cordycepin이 식품첨가물로 허용되어 있지 않은 점이 문제가 될 수 있다. 본 연구는 아직 식품가공의 원료로 허용되어 있지 않은 신소재에 관한 연구이므로 이런 문제를 차치하고 아래 표에 음료를 제조할 수 있는 배합비를 제시하였는데, 건강 지향적인 음료의 이미지를 부여하기 위하여 일부 약용식물을 첨가하였고 향도 한약재향을 사용하였다. 본 음료는 일반적인 음료의 제조과정을 거쳐 생산할 수 있으므로 제조공정은 생략하였다.

Table 7. Formulation of a beverage made from the mycelium and culture broth of *C. sinensis*

	원 료 명	제 조 회 사	첨가량 (100 ml/병)	첨가량 (ton 제조)
1	<i>C. sinensis</i> 추출액		10 g	100 Kg
2	영지추출액	에스앤디	2.8 g	28 Kg
3	구기자추출액	다송, 64. Bx	2.6 g	26 Kg
4	올리고당	대상, 프락토올리고당	2 g	20 Kg
5	사과농축액	경북능금조합 72. Bx	1.5 g	15 Kg
6	오미자 추출액	0.8. Bx	5 g	50 Kg
7	갈근 추출액	1.0. Bx	7 g	70 Kg
8	고과당	대상	8.3 g	83 Kg
9	구연산		0.22 g	2.2 Kg
10	안식향산		0.05 g	0.5 Kg
11	한약재향	삼정향료	200 μ l	2.0 L
12	정제수	상기 첨가물 용해 후 정제수로 부피를 조절한다		
pH				3.43

* 제조사는 제품 개발 당시 사용한 재료를 나타내며 원하는 사항이 아님.

Table 8. Formulation of a beverage made from the washed mycelium of *C. sinensis* and separated cordycepin from the culture broth

	원 료 명	제 조 회 사	첨가량 (100 ml/병)	첨가량 (1 ton 제조)
1	수세한 균사체 추출액		10 g	100 Kg
2	Cordycepin		10 mg	100 g
3	영지추출액	에스앤디	2.8 g	28 Kg
4	구기자추출액	다송, 64. Bx	2.6 g	26 Kg
5	올리고당	대상, 프락토올리고당	2 g	20 Kg
6	사과농축액	경북능금조합 72. Bx	1.5 g	15 Kg
7	오미자 추출액	0.8. Bx	5 g	50 Kg
8	갈근 추출액	1.0. Bx	7 g	70 Kg
9	고과당	대상	8.3 g	83 Kg
10	구연산		0.22 g	2.2 Kg
11	안식향산		0.05 g	0.5 Kg
12	한약재향	삼정향료	100 μ l	1.0 L
13	정제수	상기 첨가물 용해 후 정제수로 부피를 조절한다		
pH				3.43

제5절 참고문헌

1. Sung, J.M., Yu, Y.B., and Cha, D.Y. P. 569. Mushroom Science, Kyohaksa, Seoul, 1998.
2. Liang, Y.L., Liu, Y., Yang, J.W., and Liu, C.X. Studies on pharmacological activities of cultivated *Cordyceps sinensis*. Phytotherapy Res. 11: 237-239 (1977)
3. Furuya, T., Hirotani, M. and Matsuzawa, M. N⁶-(2-hydroxyethyl)adenosine. A biologically active compound from cultured mycelia of *Cordyceps* and *Isaria* species. Phytochemistry. 22: 2509-2512 (1983)
4. Kuo, Y.C., Lin, C.Y., Tsai, W.J., Wu, C.L., Chen, C.F. and Shirao, M.S. Growth inhibitors against tumor cells in *Cordyceps sinensis* other than cordycepin and polysaccharides. Cancer Invest. 12(6): 611-615 (1994)
5. Kou, Y.C., Tsai, W.J., Shiao, M.S. Chen, C.F., and Lin, C.Y. *Cordyceps sinensis* as an immunomodulatory agent. Am. J. Chin. Med. 24(2): 111-125 (1996)
6. Kiho, T., Hui, J., Yamane, A., and Ukai, S. Polysaccharides in fungi, XXXII. Hypoglycemic activity and chemical properties of a polysaccharide from the cultural mycellium of *Cordyceps sinensis*. Biol. Pharm. Bull. 16(12): 1291-1293 (1993)
7. Kiho, T. Yamane, A., Hui, J., Usui, S., and Ukai, S. Polysaccharides in fungi. XXXVI. Hypoglycemic activity of a polysaccharide(CS-F30) from the cultural mycellium of *Cordyceps sinensis* and its effect on glucose metabolism in mouse liver. Biol. Pharm. Bull. 19(2): 294-296 (1996)
8. Liu, Y.X., Wu, C.Z., and Li, C.C. Antioxidation of *Paecilomyces sinensis*(S. pnov.). Chin. J. Trad. Med. 16(4): 240-242 (1991)
9. Zhu, J.S., Halpern, G.M., and Jones K. The scientific rediscovery of an ancient Chinese herbal medicine: *Cordyceps sinensis* Part I. J. Altern. Complem. Med. 4(3): 289-303 (1998)
10. Chun, G.-T., Park, S.K., Kwon, H.K. Jeong, Y.-H., Jeong, Y.-S., Chang,

Y.K., and Lee, Y.-H. Studies of Cyclosporin A biosynthesis under the conditions of limited dissolved oxygen or carbon source in fed-batch culture. J. Biotechnol. Bioeng. 13(2): 203-208 (1998)

11. Kim, K., Lee, S.R., Shon, J.W., and Ji, H.S. Effect of glucose feeding strategy on biomass of *Serratia marcescens* in high density fed-batch fermentation. J. Biotechnol. Bioeng. 13(6): 681-686 (1998)

제2장 *P. tenuipes* 액체배양을 통한 균사체 및 생리활성물질 생산공정 개발

제1절 서론

1. 배경

동충하초란, 겨울에 벌레상태로 있다가 여름이 되면 풀이 된다는 뜻에서 나온 말로서 동충하초(*Cordyceps*)속균은 벌, 잠자리, 나비, 매미, 노린재, 거미등 거의 모든 곤충균의 유충(larva), 성충, 번데기(pupae) 등의 전 시기에 걸쳐 침입하여 곤충을 죽게한 후 이를 기주로 자실체(fruiting body)를 형성하거나 포자과를 형성하는 곤충기생균(entomopathogenic fungi)의 일종이며 자낭균강(Ascomycetes), 맥각균목(Clavicipitales), 동충하초속(*Cordyceps*)에 포함된다. 그러나, 동충하초속균은 기주 특이성이 있는 종류와 그러한 특이성이 없는 종류가 있어 동일종의 곤충을 침입하더라도 곤충의 각 발육단계별로 침입하는 균이 다른 경우도 있어 분류에 어려움이 따른다. 지금까지 곤충에 침입하는 동충하초균은 약 800여종으로 알려져 있으며 이들중에서 버섯으로 형성되는 것은 약 300여종으로 한국, 중국, 일본등 세계적으로 분포하고 있다^(1~3). 대표적인 동충하초로는 *Cordyceps sinensis*, *Cordyceps militaris*, *Paecilomyces tenuipes* 등이 있다. *Cordyceps sinensis*(동충하초)는 해발 3000~4000m되는 고산 지대에서 자연적으로 형성된 것을 채집하며 중국에서는 이것을 인삼, 녹용과 함께 귀한 3대 한방 약재로 취급하여 왔으며, 불로 장생의 비약으로 결핵, 황달 치료와 아편 중독의 해독제로 이용되어 왔지만 인공재배가 불가능하다고 알려져 있다. *Cordyceps militaris*(번데기 동충하초)는 국내 식품공전에 등록(2000.9.1)되어 있으며 다량의 인공재배가 이루어지고 있기 때문에 시중에 유통되고 있는 것들을 쉽게 볼 수 있다. *Paecilomyces tenuipes*(눈꽃동충하초)는 대표적인 불완전세대형의 동충하초로 무성생식 기관인 분생포자를 형성한다. 특이할 점은 *Paecilomyces tenuipes*가 국내 식품공전에는 등록되어 있으나 외국에서는 인정되지 않고 있다는 것이

다. 또한, 국내 뿐만이 아니라 외국에서도 연구가 미비한 실정이다^(4~7). 동충하초의 유용물질로는 핵산물질인 cordycepin, 다당체의 polysaccharide, 해독작용을 하는 ergosterol 등 여러 가지가 보고되어지고 있다. Cordycepin (3'-deoxyadenosine)은 동충하초의 품질 지표 물질로 알려져 있으며 *Cordyceps militaris*의 배양액에서 처음으로 발견되었다⁽⁸⁾. Fig. 1은 cordycepin의 분자구조이고 분자량은 251, 수용성이며 빛과 열에 안정하다. 기능으로는 RNA합성저해⁽⁹⁾, 세포분화 증진⁽¹⁰⁾, 세포내의 세포골격근 분포를 변화^(11,12), protein kinase 활성의 저해⁽¹³⁾, 방광암·허파암·섬유조직암 등의 항종양활성⁽¹⁴⁾, 핵산의 methylation 저해⁽¹⁵⁾ 등 보고된 바가 있다. 효과에 있어서는 항암, 항종양, 항균작용 등이 보고되어 졌으며 곤충에 있어서의 cordycepin은 독성물질로 작용하는데 이는 살충제로도 응용이 가능하다. Cordycepin의 항균활성은 ADA(adenosine deaminase)의 저해로 나타낼 수 있다⁽¹⁶⁾. 또한, cordycepin과 2'-deoxycofomycin을 함께 사용했을 때 cordycepin만을 사용했을 때 보다 더 강한 세포독성이 나타남을 쥐의 실험을 통해 증명되었다⁽¹⁷⁾. Adenosine이 cordycepin과 경쟁적으로 반응하기 때문에 cordycepin의 mRNA의 합성저해능력을 감소시키며, cordycepin이 mono-, di-, 그리고 tri-phosphate(3'-dAMP, 3'-dADP, 3'-dATP)로 인산화(phosphorylation)되어 여러 가지의 효소반응을 억제시키기 때문에 일부 단백질 합성에도 관여하여 생산성을 저해시키고 45S rRNA 전구체를 비성숙 종결시켜 ribosome 생합성을 억제하기도 한다^(18,19). β -D-glucan의 다당체(polysaccharide)는 담자균류의 버섯으로부터 생산되며 다양한 약효를 가지고 있는데 면역기능 저하에 따른 노인기에 많이 나타나는 간장질환, 관절염, 당뇨병, 뇌혈관 장애, 치매증 등과 같은 질환의 면역체계를 활성화시킴으로서 면역기능 장애의 개선과 치료를 목적으로 사용되고 있고, 유화제, 응고제, gel 형성제, 흡착제 및 안정제 등과 같은 다양한 용도로 응용이 가능할 뿐만 아니라 종양 치료에 화학적, 방사선 요법에 병행하여 사용되고 있다^(20~24). 동충하초에서도 자실체, 균사체 및 배양여액에서 이러한 다당체를 얻을 수 있다. 특히, 동충하초에서 얻어진 다당체는 저혈당 활성을 나타내 당뇨병에 상당한 효과가 있다⁽²⁵⁾. 또한, 동충하초속균인 *Cordyceps ophioglossoides*에서 분리한 불용성 다당체에서 높은 항종양 활성을 갖는 성분이 있음이 밝혀졌으며 그 구조는 β -D-(1 \rightarrow 3)-glucan이다. 일반적으로 분자량

(molecule weight), 화학적 구조(chemical structure), 분지의 정도(degree of branch) 등의 특성 차이로 인해 항종양 활성의 정도가 다르게 나타난다. 분자량은 10만~100만 이상의 고분자에서는 높은 활성이 나타나며 분자량이 작을수록 활성이 저하하는 현상이 나타난다. 분지의 정도는 0.2-0.33 일 때에 항종양 활성이 우수하다고 하며 분지가 너무 많거나 너무 적으면 항종양 활성을 갖지 않는다고 알려져 있다^(26~35). Fig. 2는 β -(1,6)-glucosyl 분지를 가진 β -(1 \rightarrow 3)-glucan의 분자구조를 나타낸 그림이다.

2. 배양전략

플라스크 배양을 통하여 눈꽃동충하초의 최적 생육조건을 확립하기 위하여 YMP media를 기본배지로 하여 온도, pH, 접종비 및 배양시간을 검토하였다. 또한, 다당체와 코디세핀 생산을 위한 배지성분을 각각 검토하였다. 다당체 생산을 위해서는 탄소원, 질소원, 무기염류 및 금속이온의 영향을 검토하였고, C/N ratio를 검토하여 최적의 배지 조성을 확립하였다. 코디세핀 생산을 위해서는 탄소원, 유기·무기 질소원, 아미노산, 무기염류 및 금속이온을 검토하였고, C/N ratio를 검토하여 배지성분을 변화시켰다. 생물반응기를 이용한 회분배양을 통하여 pH, 통기량 및 교반속도에 따른 균체량 및 다당체 생산에 대한 촉진 및 저해요인을 검토하였다. 이를 토대로 회분배양을 응용하였는데 glucose와 yeast extract를 간헐적으로 공급하였다. 또한, 코디세핀 생산에 있어서는 배양여액에서의 불규칙한 검출과 심한 wall growth로 인해 배양상의 어려움이 있기 때문에 짧은 배양시간 내에 균체량을 늘려 균체내의 다당체와 코디세핀을 생산하는 전략의 유가배양을 실시하였다. 유가배양시 공급배지는 glucose로 하였으며 공급배지의 농도를 변화 주어 pH의 신호에 의해 공급하였다. 이의 산업적으로 응용하기 위하여 500L fermenter를 사용하여 유가배양을 실시하였다.

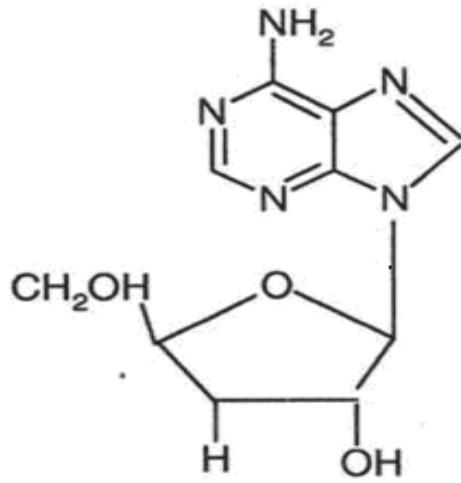


Figure 1. Structure of cordycepin

Figure 2a. Primary molecular diagram of mushroom beta-D-glucans. From Yanaki et al⁴

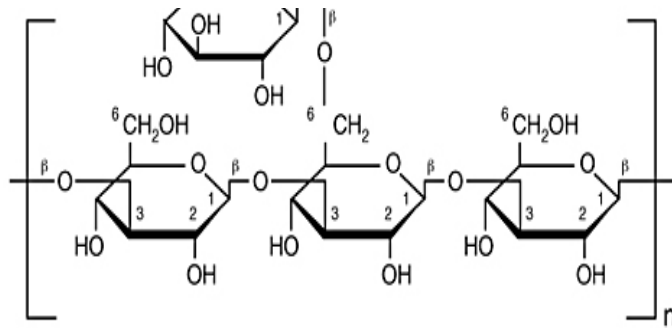


Figure 2. Structure of β -(1 \rightarrow 3)-glucan

제 2절 재료 및 방법

1. 실험재료

가. 균주 및 보존

본 실험에 사용된 균주는 자낭균류의 일종인 *Paecilomyces tenuipes*를 사용하였다. 보관용 배지로는 PDA(potato dextrose agar)를 사용하였으며 4 주마다 계대배양하였다. 전배양에서 사용된 접종원은 YMP medium에서 3 일간 배양한 후 5 mL을 취하여 멸균된 glycerol 1 mL과 증류수 1 mL을 잘 혼합한 stock cell solution 7 mL을 10 mL vial(Iwaki) 옮겨서 잘 혼합한 후 -75°C 에서 냉동보관하였다.

나. 배지

배양에 사용된 배지들은 전배양에서는 YMP medium(Table 1)을 기본배지로 사용하였다. 본배양시 다당체 생산을 위하여는 modified medium I (Table 2), 코디세핀 생산을 위하여는 modified medium II (Table 3)를 각각 사용하여 실험을 수행하였다.

2. 배양 조건

가. 플라스크 배양

냉동보관된 7 mL의 활성화된 stock cell solution을 플라스크(working volume 50 mL)에 접종하여 3 일간 전배양을 실시하였다. 본배양은 전배양액 2%를 취하여 접종하여 배양을 실시하였다. 배양기는 shaking incubator(Vision Scientific Co., VS-8480SR)를 사용하였으며 25°C , 200 rpm, 초기 pH 7로 조절하여 배양하였다. pH는 2 N HCl 과 2 N NaOH를 사용하여 조절하였다.

나. 회분배양

전배양은 플라스크 배양에서와 같으며 본배양에서는 전배양액 2%를 취하

Table 1. Compositions of the YMP media.

Component	Concentration (g/L)
Glucose	10.0
Yeast extract	10.0
Malt extract	15.0
Peptone	10.0

Table 2. Compositions of the modified media for the polysaccharide production

Component	Concentration (g/L)
Glucose	30.0
Yeast extract	20.0
KH ₂ PO ₄	0.5
CuCl ₂ · 2H ₂ O	0.1

Table 3. Compositions of the modified media for the cordycepin production

Component	Concentration (g/L)
Glucose	10
Yeast extract	20
(NH ₄) ₂ HPO ₄	5
Histidine	1
CaCO ₃	0.1

여 접종하였다. 배양기는 5 L 생물반응기(Korea Fermener Co., KF-5L)를 사용하였다. Working volume을 3 L로 하여 25°C, 300 rpm, 1 vvm으로 5 일간 배양

하였다. 소포제로는 식품용인 silicon resin을 10 배 희석하여 사용하였다.

다. 유가배양

곰팡이 배양시 박테리아 배양에 비해 재현성이 떨어지기 때문에 feedback control 적당하다고 판단되었다. 그 중 DO-stat은 합성배지(synthetic defined medium)에서 기질 고갈에 민감하게 반응하고 pH-stat은 yeast extract와 peptone 등의 복합배지(complex medium)의 사용에 잘 적용된다. 따라서, 본 실험에서는 pH를 신호로 탄소원인 glucose의 농도를 50~400 g/L까지 변화를 주어 공급하였다^(36~39).

3. 분석방법

가. 균체량 분석

균체량 측정은 건조균체량을 이용하여 수행하였다. 건조균체량은 세포 배양액을 filter paper(Whatman #2)를 사용하여 여과하였고 2회 세척한 후 항량(80℃, 약 24 h)을 측정하였다.

나. Glucose 분석

배양액중의 glucose 농도는 세포 배양액을 filter paper(Whatman #2)를 사용하여 균체와 배양액을 분리한 후 얻은 배양여액을 glucose kit(Sigma Chemical Co., 510-A)를 사용하여 측정하였다. 분석범위는 0.25~3.0 g/L로 하여 배양여액에서의 glucose 농도가 이 범위에 들어가도록 희석하여 사용하였으며, 낮은 농도 (0.25 g/L 이하)에서는 분석 절차상 희석을 생략하였다. 반응은 37℃에서 30 분간 행하였으며, 반응이 끝난 후 분광광도계(Spectronic Co., GENESYS 5)를 사용하여 440 nm에서 흡광도를 측정하였다.

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

다. 코디세핀 정량

Fig. 3은 균체 및 배양여액에서의 코디세핀(cordycepin) 정량 분석을 위한 sample 전처리 과정을 나타낸 그림이다. HPLC를 이용해 cordycepin standard (Sigma Chemical Co., C 3394)와 비교, 분석하였으며 분석조건은 다음과 같다.

Column : μ Bondapak C₁₈ (300 mm L x 3.9 mm ID)
Detector : UV detector (260 nm)
Mobile phase : 0.1% TFA/Acetonitrile(9:1)
Flow rate : 0.5 mL/min

Fig. 4는 cordycepin의 standard curve이며 이 standard curve를 이용하여 cordycepin의 농도를 계산하였다.

라. 다당체 정량

다당체(polysaccharide)는 균체 및 배양여액에서의 농도를 측정하였으며 측정방법은 Fig. 3에 나타내었다. Filter paper는 Whatman #2를 사용하였으며 filtering 후 항량(80℃, 약 24 h)을 측정하였다⁽⁴⁰⁾.

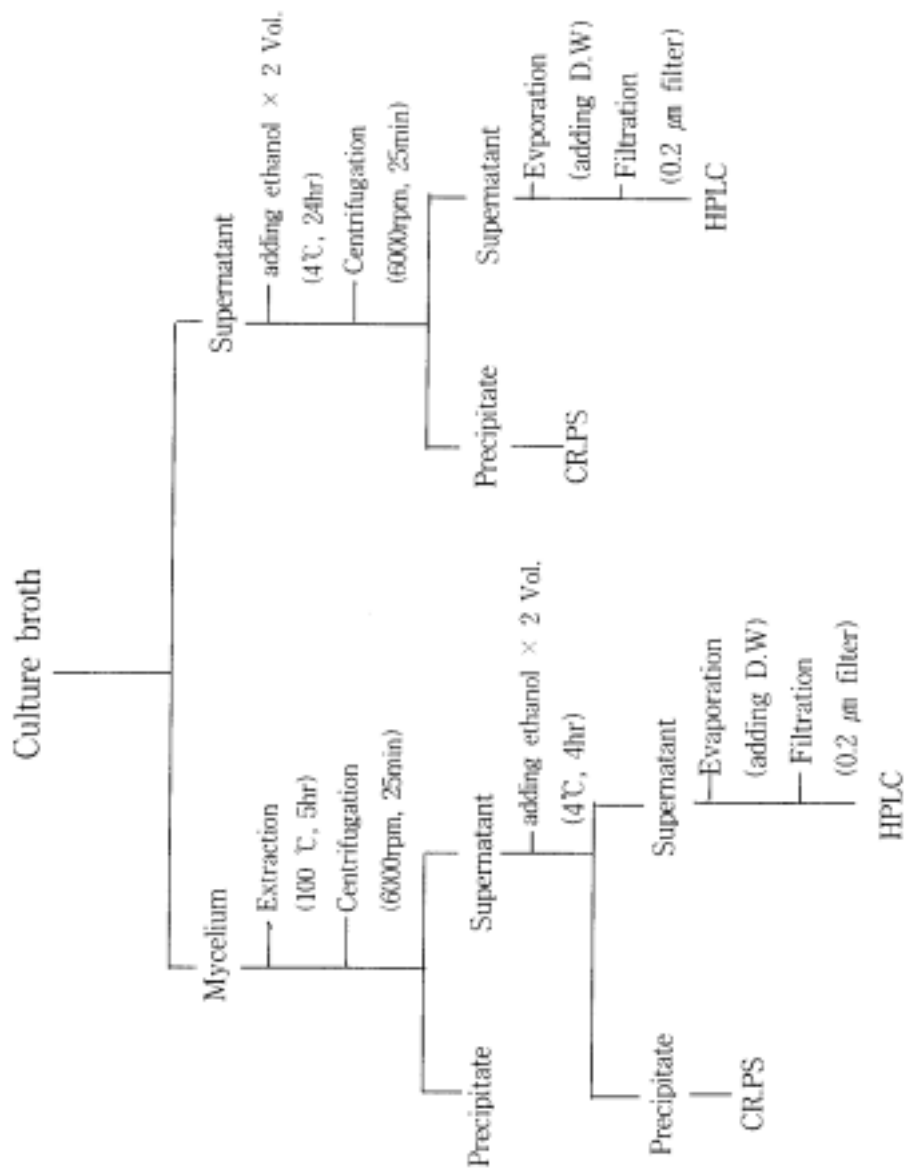


Fig. 3 Scheme diagram of cordycepin and crude polysaccharide assay from intracellular and extracellular

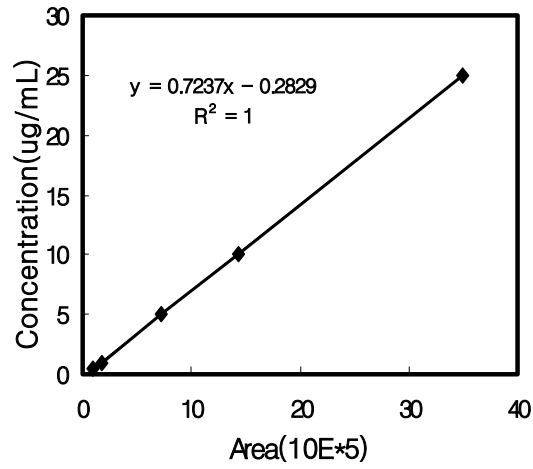


Fig. 4. Cordycepin standard curve

제 3절 결과 및 고찰

1. *P. tenuipes*의 성장조건 구명

가. 고수율 균주 개발

여러 균주를 확보하여 활성이 높은 균주를 선별하였다. 이 균주를 여러 차례에 걸친 계대배양을 하여 균체의 안정성을 검토하였다. 또한, 최적 기본배지를 선별하기 위하여 Czapek dox 배지의 6종인 YM, Malt yeast extract, MCM, Hopppkins, Lilly, YMP 배지를 사용하였으며(Table 4), 접종량 5 %로 하여 4일간 배양한 결과를 나타낸 그림이 Fig. 5이다. Fig. 5에서 보면 YMP 배지에서 균체량 16.2 g/L와 다당체 생성량 1.1 g/L로 가장 높은 값을 나타내었다. 반면 Hopppkins 배지에서는 균체량 6 g/L와 다당체 생성량 0.11 g/L로서 가장 낮은 값을 보였다. YMP 배지가 다른 기본배지와 비교해 볼 때 *Paecilomyces tenuipes*의 균체량과 다당체 생성에 있어서 최적 배지임을 확인하였다. Fig. 6은 결정된 YMP media(Table 1)에서 배양온도 25℃, 200 rpm, 초기 pH 7 그리고 접종량 2%(v/v)로 균체량과 pH, 잔존당 그리고 다당체 생성에 관한 경시변화를 나타낸 것이다. 균체량과 다당체는 각각 3 일째 16.9 g/L, 5 일째 1.7 g/L로 최고치를 보였다. pH는 균체량이 증가함에 따라서 감소하다가 배양말기에서는 pH 7을 유지하는 것을 볼 수 있다. 또한, YMP 배지를 사용하여 stock cell solution으로 준비하여 -75℃에서 냉동보관 하였다.

나. 최적 성장조건 검토

1) 온도와 pH의 영향

Fig. 7은 균체성장 및 다당체 생성에 미치는 배양온도를 규명하고자 배양온도를 15~33℃로 달리하여 실험을 행하였으며, 그 결과를 나타낸 그림이다. 배양 조건은 접종량 2%로 200 rpm, 초기 pH 7로 4 일간 배양한 결과를 나타낸 그림

Table 4. Compositions of the various media

Nutritional reagents	Media and compositions (g/L)						
	Czapek Dox	YM	Malt yeast extract	MCM	Hoppkins	Lilly	YMP
Glucose		10	10	20	10		10
Sucrose	30						
Maltose						10	
Peptone		5	5	2			10
Yeast ext.		3	3	2			10
Malt ext.		3					15
NaNO ₃	2						
K ₂ HPO ₄	1			1			
KH ₂ PO ₄				0.5	0.1	1	
KCl	0.5						
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5			0.5		0.5	
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01						
KNO ₃					2		
Asparagine						2	

이다. 균체량은 20℃에서 18.5 g/L로 가장 높은 값을 보였으며, 이 온도 전후로는 감소하였다. 특히 18℃보다 낮거나 27℃보다 높은 온도에서는 균체량이 급격히 낮아지는 경향을 보였으며 다당체 생성에 있어서는 15~27℃까지는 계속 증가하여 27℃에서 2 g/L로서 가장 높은 값을 보였으며, 그 이상의 온도에서는 급격히 감소하였다. Fig. 8은 초기 pH가 균체성장과 다당체 생성에 미치는 영향을 검토한 결과이다. 그림에서 알 수 있듯이 균체성장은 pH 4~7까지 약산성에서 중성까지 잘 자랐으며, pH 5.5에서 16.6 g/L로 가장 높았다. pH가 염기성으로 갈수록 균체량은 급격하게 감소하였고 다당체 생성에 있어서는 초기 pH 9(평균 후 pH

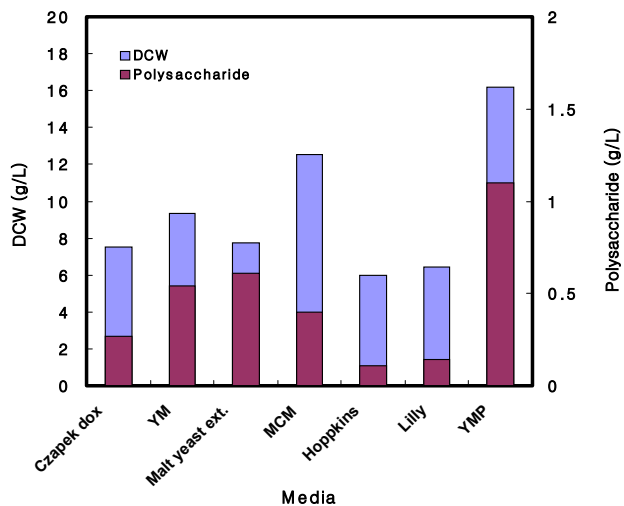


Fig. 5. Effects of various media on the cell growth and the polysaccharide production at 25°C and 200 rpm with the initial pH 7

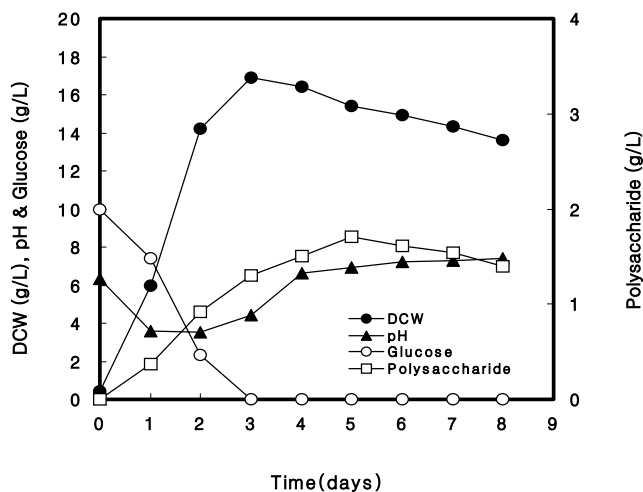


Fig. 6. Profiles of cell growth, pH, glucose and polysaccharide production at 25°C and 200 rpm in YMP medium

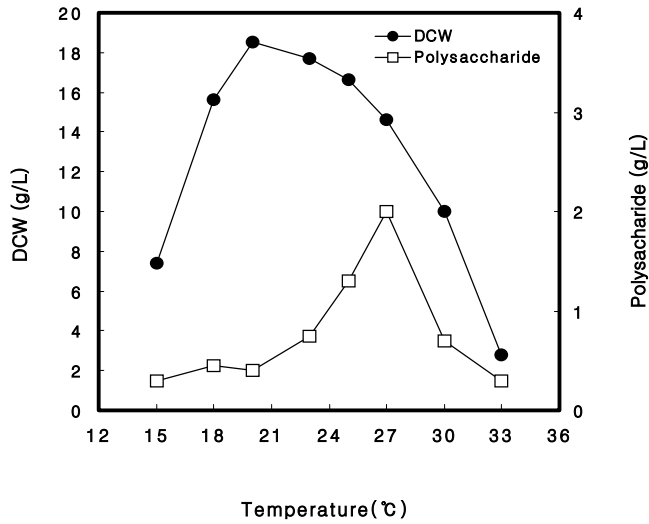


Fig. 7. Effects of temperature on the cell growth and the polysaccharide production in YMP medium

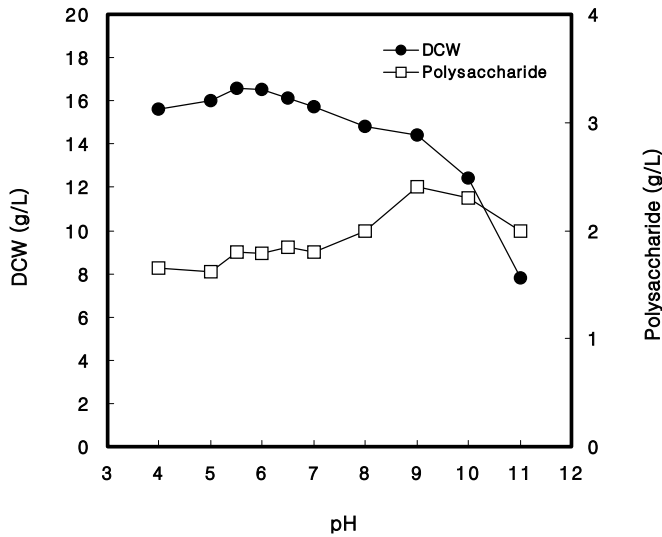


Fig. 8. Effects of pH on the cell growth and the polysaccharide production in YMP medium

8.2)에서 2.4 g/L로 가장 높았다. 따라서 결과적으로 이 균주의 균체성장 및 다당

체 생산을 위한 최적 배양온도는 27°C이며, 최적 초기 pH는 9인 것을 알 수 있었다.

2) 접종비의 영향

Fig. 9는 접종량이 균체성장과 다당체 생성에 미치는 영향을 검토한 결과이다. 배양조건은 온도 27°C, 200 rpm, 초기 pH 9로 4일간 배양한 것이다. Fig. 5에서 알 수 있듯이 균체량은 접종량이 증가할수록 균체량은 다소 증가하였다. 그러나 다당체 생성에 있어서는 접종량이 2%일 때 가장 좋은 2.6 g/L를 나타냈으며 접종량에는 크게 영향을 받지 않았다.

3) 최적 성장조건에서의 경시변화

본 배양에 사용된 배지는 YMP medium(Table 1)이다. 배양조건은 250 mL 삼각플라스크에 working volume 50 mL로 접종량은 2%이며 27°C, 200 rpm에서 초기 pH를 9로 조절하여 8일간 배양을 실시하였다. Fig. 10은 기본배지, 온도, pH, 접종량 등 성장조건이 종합적으로 작용하였을 경우 균체성장 및 다당체 생성에 미치는 성장조건에 대한 결과를 나타내었다. Fig. 10을 보면 균체량은 3일째까지 지연없이 대수증식기로 계속 증가하여 3일째 16.8 g/L로 가장 높은 값을 보였으며, 그 후로는 감소하는 경향을 보였다. 이는 잔존 glucose의 고갈로 인한 성장제한 때문인 것으로 판단된다. 한편 다당체 생성에 있어서는 5일째까지 계속 증가하여 배양 5일째에 2.3 g/L로 가장 높은 값을 나타냈으며 그 후로는 거의 일정하게 유지되었다.

다. 최적 배지조성 검토

1) 탄소원의 영향

Fig. 11은 균체성장과 다당체 생성에 미치는 탄소원의 영향을 비교·검토한 것이다. Yeast extract를 5 g/L로 고정시킨 후 각각의 탄소원을 10 g/L씩 첨가해 초기 pH 7로 하여 4일간 배양한 결과이다. 그 결과 균체량에 좋은 탄소원은

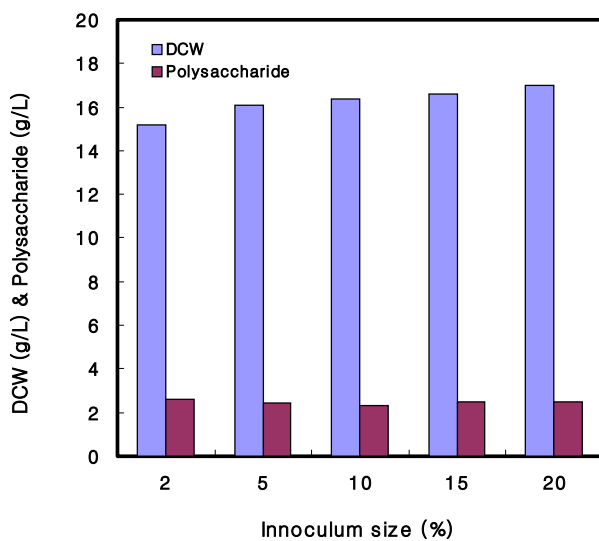


Fig. 9. Effects of inoculum size on the cell growth and polysaccharide production in YMP medium

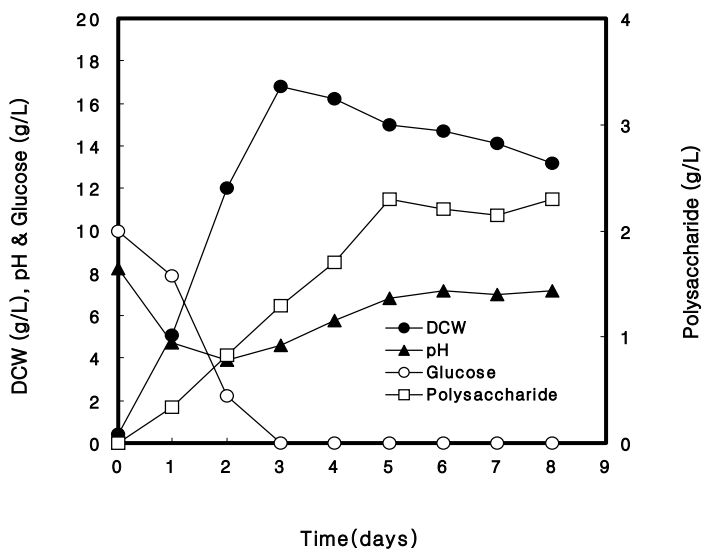


Fig. 10. Profiles of cell growth, pH, glucose and polysaccharide production at 27°C and 200 rpm

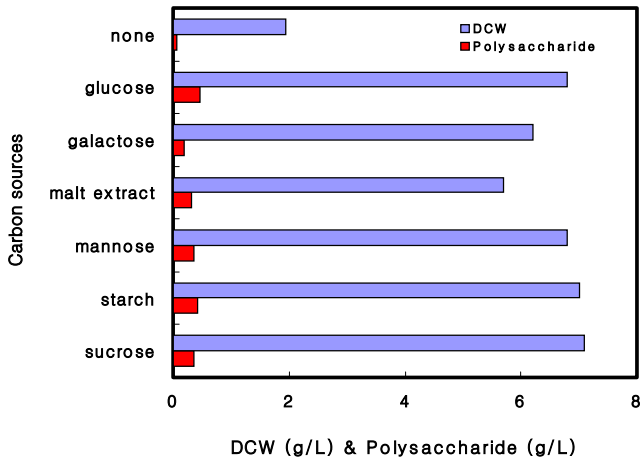


Fig. 11. Effects of carbon sources on the cell growth and the polysaccharide production

glucose, mannose, starch 그리고 sucrose이었고, 다당체 생성에 좋은 탄소원은 glucose와 starch이다. starch보다는 glucose가 다당체 생성에 보다 좋았기 때문

에 탄소원을 glucose로 결정하였다. Fig. 12는 결정된 glucose를 가지고 0~100 g/L까지 10 g/L씩 농도변화를 주어 4 일간 실험한 결과이다. 이때 yeast extract의 농도는 5 g/L로 고정시켰다. 균체량은 농도가 증가할수록 증가했으나 다당체 생성에 있어서는 30 g/L까지는 증가하다가 그 이상에서는 감소하는 경향을 보였다.

2) 질소원의 영향

Fig. 13은 질소원이 균체성장과 다당체 생성에 미치는 영향을 비교·검토한 결과이다. 탄소원인 glucose를 10 g/L로 고정시키고 각각의 질소원들을 5 g/L로 첨가해서 초기 pH 7로 하여 4 일간 배양한 결과이다. 결과를 보면 무기질소원보다 유기질소원이 균체량이나 다당체 생성을 훨씬 좋은 영향을 주었다. 그중 균체량은 soytone, tryptone, yeast extract 그리고 yeast extract + peptone이 좋았고 다당체 생성에 있어서는 yeast extract와 yeast extract + peptone이 좋았으나 yeast extract + peptone의 영향은 peptone에 의한 것이 아니라 yeast extract에 의한 것이다. 따라서 질소원은 yeast extract로 결정하였다. Fig. 14는 glucose 10 g/L로 고정시키고 yeast extract를 0~50 g/L까지 농도 변화를 주어 균체량과 다당체 생성에 미치는 영향을 살펴보았다. 균체량과 다당체 생성에 있어서 모두 yeast extract가 증가할수록 증가했으나 경제성을 고려해 볼 때 최적의 농도는 20 g/L이었다. Fig. 15~16은 glucose(10~80g/L)와 yeast extract(1~40g/L) 모두 농도 변화를 주어 초기 pH 7로 하여 4일간 배양한 결과이다. Fig. 15에서 보면 균체량은 glucose가 10~30 g/L까지는 yeast extract가 증가할수록 증가했고, 30 g/L 이상에서는 거의 일정하거나 약간의 증가를 보였다. 이것은 Fig. 12에서와 같은 결과이다. Fig. 16에서 보면 다당체 생성에 있어서는 yeast extract가 증가할수록 증가했지만 경제성을 고려해 볼 때 20 g/L가 최적의 농도로 판단된다.

3) C/N ratio의 영향

Fig. 15-1과 16-1은 균체량과 다당체 생성에 미치는 영향의 결과를 C/N

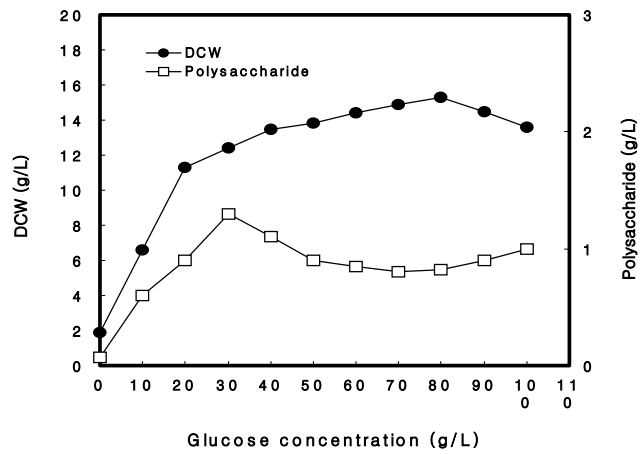


Fig. 12. Effects of glucose concentration on the cell growth and the polysaccharide production

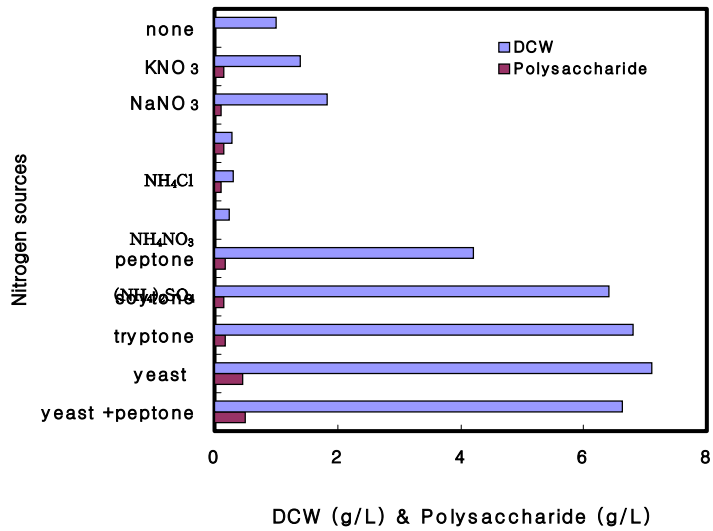


Fig. 13. Effects of nitrogen sources on the cell growth and the polysaccharide production

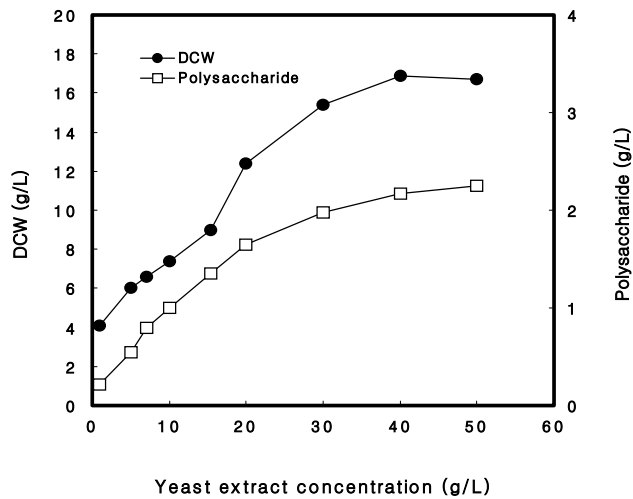


Fig. 14. Effects of yeast extract concentration on the cell growth and the polysaccharide production

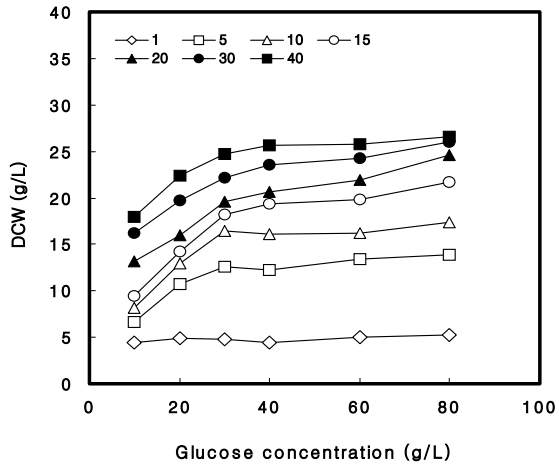


Fig. 15. Effects of various C & N concentrations on the cell growth

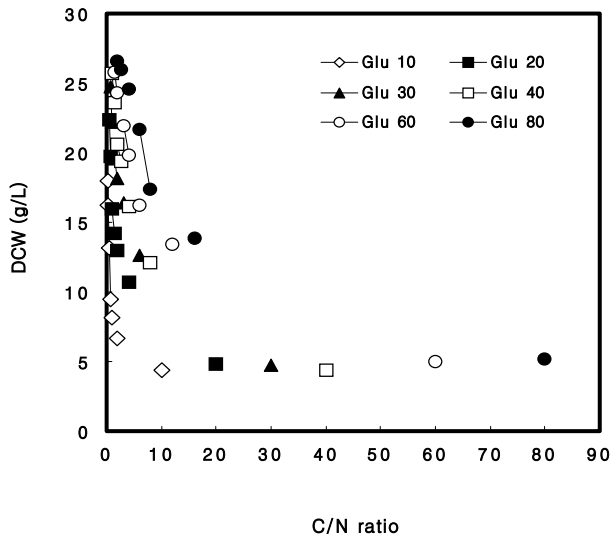


Fig. 15-1. Effects of C/N ratio on the cell growth

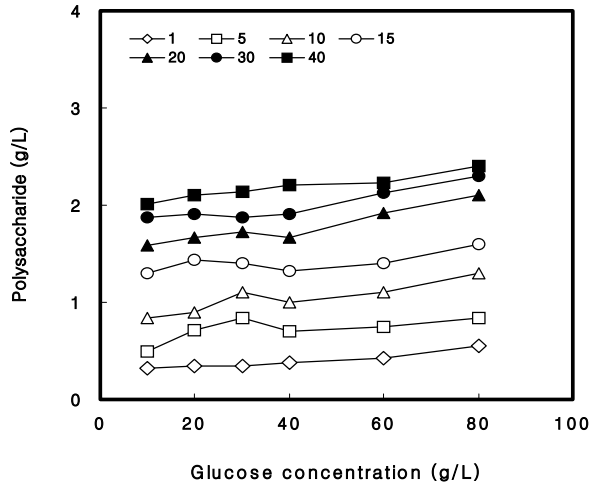


Fig. 16. Effects of various C & N concentrations on the polysaccharide production

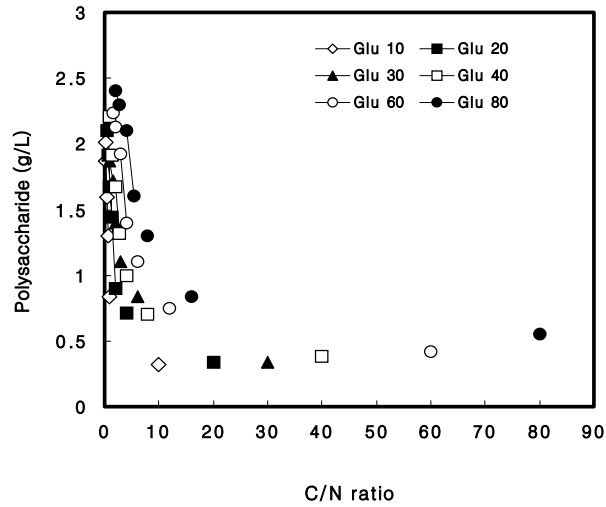


Fig. 16-1. Effects of C/N ratio on the polysaccharide production

ratio로 나타낸 것이다. 그림에서 알수 있듯이 균체량과 다당체 생성 모두 C/N

ratio은 낮은 범위에서 좋았다. 이상의 결과로서 균체량과 다당체 생성에 가장 좋은 탄소원의 농도는 glucose 30 g/L이고, 질소원은 yeast extract로서 농도는 20 g/L이었다.

4) 무기염류의 영향

Fig. 17은 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 비롯한 7종의 무기염류가 균체성장과 다당체 생성에 미치는 영향을 비교·검토한 결과이다. 본 배양에 사용된 배지는 glucose 10 g/L, yeast extract 5 g/L, 그리고 각각의 무기염류를 1 g/L씩 첨가했다. 배양 조건은 접종량 2%이며 27°C, 200 rpm, 초기 pH 9로 4일간 배양을 실시하였다. None은 무기염류가 첨가되지 않은 배지이다. 균체량에 있어서는 none과 비교해 볼 때 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, KCl 그리고 CaCO_3 에서 높은 결과를 나타냈으며, 그 중 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 를 미네랄로 사용했을 때 7.6 g/L로 가장 높은 균체량을 보였다. 반면 K_2HPO_4 에서 6.2 g/L로서 가장 낮은 값을 보였다. 한편 다당체 생성에 있어서는 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 에서 각각 0.66 g/L와 0.6 g/L로 높게 나타내었다. 따라서 위의 결과를 바탕으로 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 그리고 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 와 KH_2PO_4 를 같은 양으로 혼합한 후 0~4 g/L로 농도변화를 주어 균체성장과 다당체 생성에 관한 영향을 검토하여 Fig. 14-15에 그 결과를 나타내었다. 배양조건은 접종량 2%이며 27°C, 200 rpm, 초기 pH 9로 4일간 배양을 실시하였다. Fig. 18을 보면 KH_2PO_4 는 농도가 증가할수록 균체량이 감소하는 경향을 보였고, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 는 2 g/L까지는 균체량이 증가하다가 그 이상에서는 조금 감소하였으며, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 와 KH_2PO_4 를 같은 양으로 혼합한 배지 또한 2 g/L까지는 균체량이 증가하다가 그 이상에서는 조금 감소하였다. Fig. 19는 다당체 생성에 있어서 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , 그리고 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 와 KH_2PO_4 를 같은 양으로 혼합한 배지에 대한 영향을 나타낸 것이다. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , 그리고 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 와 KH_2PO_4 를 같은 양으로 혼합한 배지 모두 농도가 0.5 g/L에서 가장 높은 값을 나타냈으며, 그 이상의 농도에서는 모두 감소하는 경향을 알 수 있다. 이 중 KH_2PO_4 가 0.5 g/L에서 다당체 생성이 0.8 g/L로서 가장 높은 값을

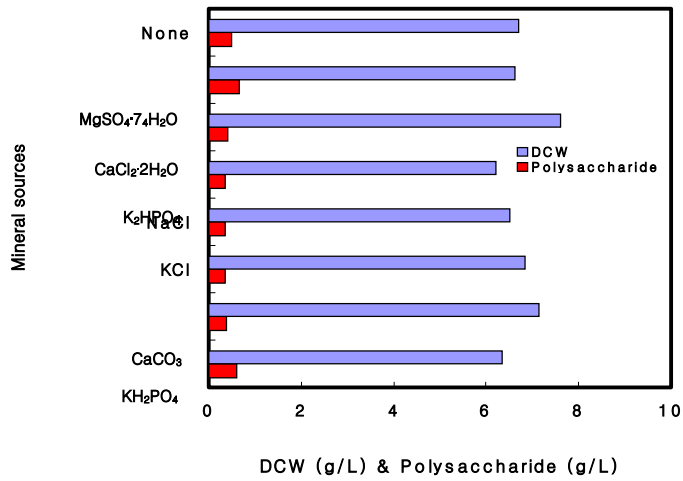


Fig. 17. Effects of mineral sources on the cell growth and the polysaccharide production

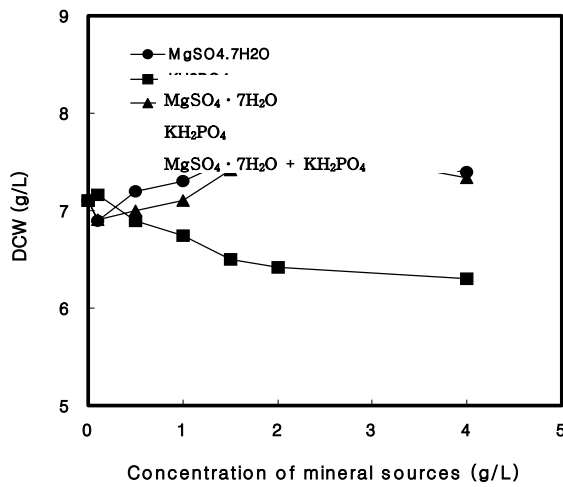


Figure 18. Effects of concentration of mineral sources on the cell growth

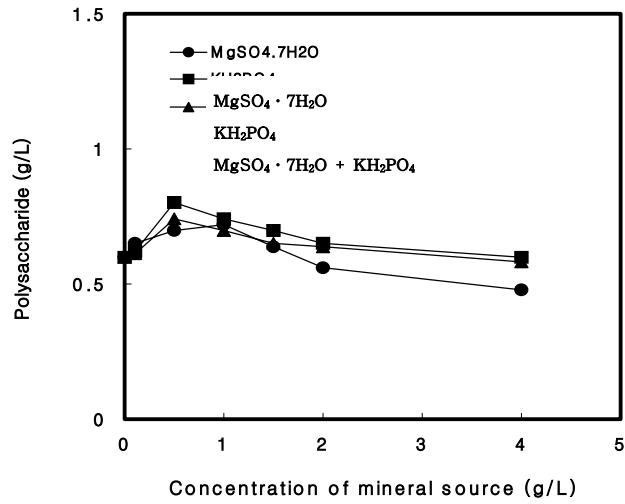


Fig. 19. Effects of concentration of mineral sources on the polysaccharide production

나타냈다. 위와 같은 결과를 바탕으로 무기염류의 종류 및 농도를 KH₂PO₄ (0.5 g/L)로 결정하였다.

5) 금속이온의 영향

Fig. 20은 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 비롯한 8종의 금속이온이 균체성장 및 다당체 생성에 미치는 결과를 나타낸 그림이다. 본 배양에 사용된 배지는 glucose 10 g/L, yeast extract 5 g/L, 그리고 각각의 금속이온 0.1 g/L씩 첨가했다. 배양조건은 접종량 2%이며 27°C, 200 rpm, 초기 pH 9로 4 일간 배양을 실시하였다. None은 금속이온이 첨가되지 않은 배지이다. 그림에서 보면 균체량은 $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 이 경우 7.44 g/L로서 가장 높은 결과를 나타냈으나 상대적으로 다당체 생성에 있어서는 none과 비교해 볼 때 0.4 g/L로서 낮은 값을 나타내었다. 이 밖에 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 등에서 균체성장은 none에 비해서 높았다. 한편 다당체 생성에 있어서는 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 가 1.0 g/L로 가장 높은 값을 나타냈고, $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 도 0.8 g/L로서 높은 값을 보였다. 일반적으로 균체량이 높은 금속이온은 다당체 생성에 있어서는 낮았다. 위와 같은 결과를 바탕으로 다당체 생성에 좋은 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 등을 금속이온으로 결정하였다. Fig. 21~22는 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 그리고 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 와 $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 을 같은 양으로 혼합한 배지를 0~0.2 g/L로 0.05 g/L씩 농도변화를 주어 균체성장 및 다당체 생성량을 검토한 결과이다. Fig. 21에서 보면 균체량은 $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 의 농도가 0.05 g/L일 때 다른 금속이온보다 7.46 g/L로 가장 높은 값을 나타냈으며, 그 이상의 농도에서는 점차 감소하는 경향을 보였다. 한편 Fig. 22의 다당체 생성에 있어서는 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 그리고 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 와 $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 을 같은 양으로 혼합한 배지의 농도 0.1 g/L에서 모두 높게 나타내었으며 0.1 g/L이상의 농도에서는 모두 다당체 생성이 감소하는 경향을 보였다. 그 중 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 가 1.1 g/L로서 가장 높은 다당체 생성량을 보였다. 위와 같은 결과로부터 금속이온종류 및 농도를 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1.1 g/L)으로 결정하였다. Fig. 23은 Fig. 11~22에서 얻은 결과를 바탕으로 조성된 modified medium I (Table 2)로부터 균체량 및 다당체 생성에 관한 경시변화의

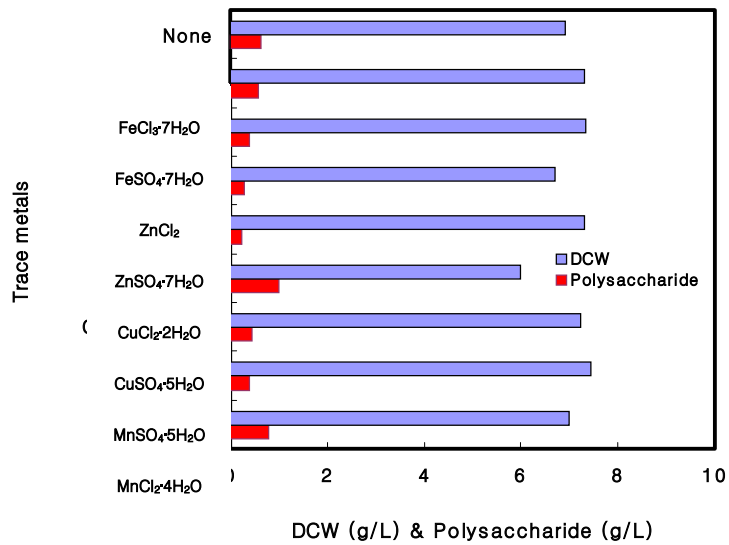


Fig. 20. Effects of trace metals on the cell growth and the polysaccharide production

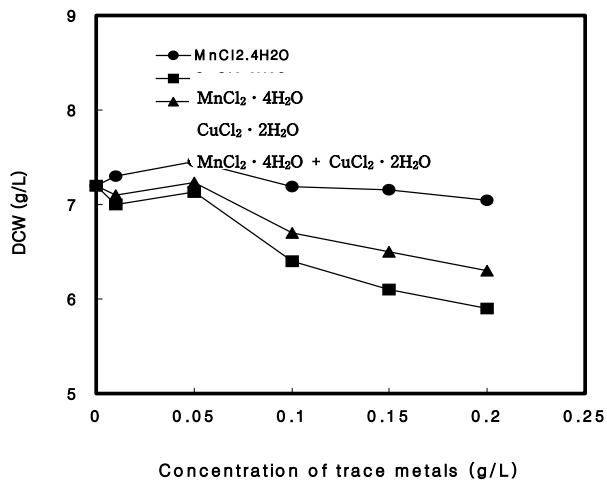


Fig. 21. Effects of concentration of trace metals on the cell growth

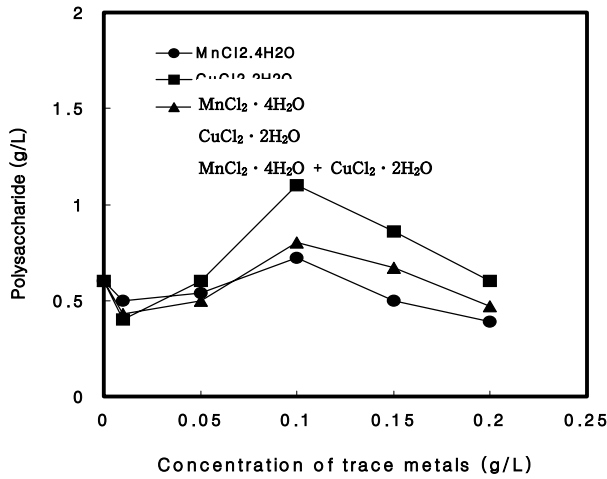


Fig. 22. Effects of concentration of trace metals on the polysaccharide production

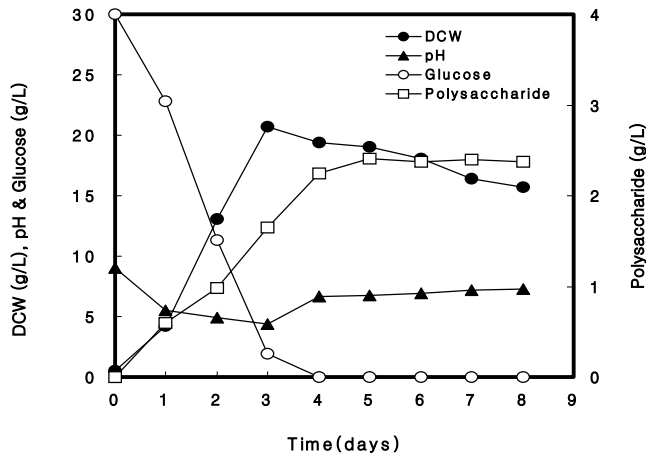


Fig. 23. Profiles of cell growth, pH, glucose and polysaccharide production at 27°C and 200rpm with initial pH 9 in modified medium

결과를 나타낸 것이다. 배양조건은 접종량 2%이며 27°C, 200 rpm, 초기 pH 9로 조절하였으며, 멸균 후 pH는 7.8이었다. 그림에서 알 수 있듯이 잔존당은 배양 3

일째까지 급격히 소비되었으며 4 일째에 모두 소모되었다. 이와 함께 균체량도 배양초기부터 3 일째까지는 계속 증가하다가 4 일째부터는 점점 감소되었다. pH 는 균체량이 증가함에 따라 pH가 급격하게 감소하다가 균체량이 감소하는 4 일째부터 증가하는 경향을 보였다. 한편 균체량은 3 일째 20.7 g/L로 가장 높은 값을 보였으며, 다당체 생성에 있어서는 배양초기부터 증가하여 5 일째 최대값인 2.41 g/L를 보였고, 그 이후로는 일정하게 유지되었다. 이런 결과는 Fig. 6에서의 균체량 16.9 g/L 및 다당체 1.71 g/L와 비교해 볼 때 각각 균체량은 20%이상, 다당체는 40%이상 증가되었다.

2. 액체배양공정 개발

가. 목적산물생산 촉진 및 저해요인 검토

Fig. 24는 Fig. 23에서 초기 pH를 9로 조절하는데 있어서 너무 많은 양의 NaOH가 첨가되었기 때문에 배양초기에 균체성장이 억제받는 것으로 판단되었고 또한 pH가 배양말기로 갈수록 pH가 7로 수렴하는 경향을 보여 Fig. 24는 Fig. 23에서와 같은 조건에서 초기 pH를 9(평균 후 7.8)에서 pH 7(평균 후 6.4)로 조절해서 실험한 결과를 나타낸 것이다. 결과를 살펴보면 pH는 배양초기에 균체량이 증가함에 따라 감소하다가 4 일째 이후부터 증가하여 초기 pH 7로 수렴하였다. 한편 잔존당은 3 일째에 모두 소모되었으며 이와 더불어 균체량도 함께 증가하여, 배양 4 일째 최대값 22 g/L를 나타내었다. 다당체 생성에 있어서는 Fig. 20과 비슷한 배양 5일째 2.34 g/L로 가장 높은 결과를 나타내었으며 그 이후로는 일정하게 유지되었다. Fig. 21과 비교해볼 때 Fig. 24에서의 균체량은 약 2 g/L 증가하였으며, 다당체 생성량은 거의 비슷하였다. 따라서 modified medium I (Table 2)에서의 배양초기 pH를 7로 결정하였다.

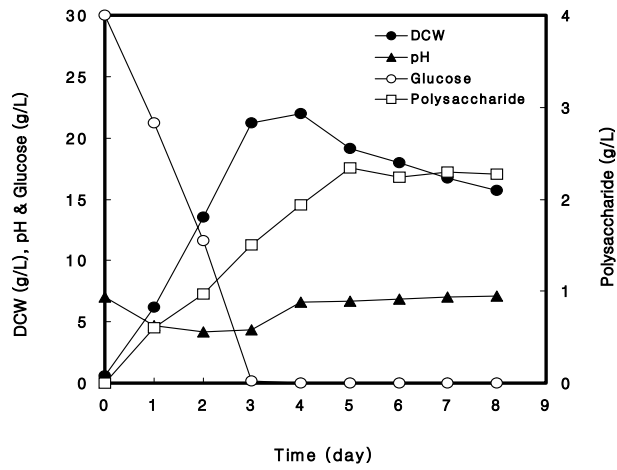


Fig. 24. Profiles of cell growth, pH, glucose and polysaccharide production at 27°C and 200rpm with initial pH 7 in modified medium

나. 배양조건 변화에 따른 목적산물 생산 변화 검토

1) pH와 교반속도의 영향

Fig. 25는 100 rpm, 1.0 vvm의 통기량(aeration) 조건에서 초기 pH 7로 조절하여 pH의 영향에 대한 실험을 실시한 결과이다. 결과를 살펴보면 잔존 glucose양은 배양 7 일째까지 다 소모되지 않았으며 이에 따라서 균체량과 다당체 생성량 모두 현저하게 감소되었다. 한편 pH는 배양초기부터 떨어지기 시작해 pH 4.7수준을 유지하는 경향을 보였으며 플라스크 배양에서와 전혀 다른 결과를 보였다. 이러한 결과는 너무 낮은 agitation에 의한 용존산소의 제한 때문인 것으로 판단된다. 따라서 이와같은 조건에서 pH의 영향을 판단하기 어렵다고 생각되어 교반속도를 높여 pH의 영향을 검토하였다. Fig. 26~28은 200 rpm, 1.0 vvm의 배양조건에서 각각 초기 pH 7, 초기 pH 4.8(배지조성 그대로), 그리고 pH 7로 일정하게 유지하여 균체량과 다당체 생성량에 대한 결과를 나타낸 것이다. Fig. 26은 초기 pH 7로 하여 배양을 실시한 결과로서 잔존 glucose양은 배양 5 일째 모두 소모되었고, 이에 따라 균체량도 증가하여 배양 4 일째 20.1 g/L로 최대값을 보였고, 다당체 생성은 배양 5 일째 1.9 g/L로 가장 높은 값을 보였다. 한편 pH 변화는 플라스크배양과 비슷한 결과를 보였다. Fig. 27은 초기 pH 4.8(평균 후 pH 4.6)로 하여 배양을 실시한 결과이다. Fig. 26과 비교해 볼 때 잔존 glucose양은 배양 4 일째 모두 소모되어 빠른 소모속도를 보였고, 또한 균체량도 22 g/L로서 더 높았다. 반면 다당체 생성에 있어서는 배양 5 일째 1.76 g/L로 조금 낮았다. Fig 27은 플라스크 배양에서 pH가 7로 유지되는 경향을 보여 pH를 7로 일정하게 유지한 결과이다. 그림에서 알 수 있듯이 잔존 glucose양은 배양말기에도 다 소모되지 않았고, 이에 따라서 균체량도 배양 4 일째 11 g/L로 가장 높은 값을 보여 아주 미미한 균체성장을 보였다. 다당체 생성에 있어서는 최대값이 1.52 g/L로 아주 저조한 값을 보였다. 이러한 결과는 배양초기에 pH가 떨어지는 것에 대한 너무 많은 양의 NaOH가 첨가되어 세포독성으로 작용한 것으로 판단된다. 따라서 pH를 일정하게 유지하는 방법은 좋지 않은 것으로 판단되었다. Fig. 26과 Fig. 27에서는 pH의 영향을 판단할 수 없어서 각각 pH에 대한 영향을

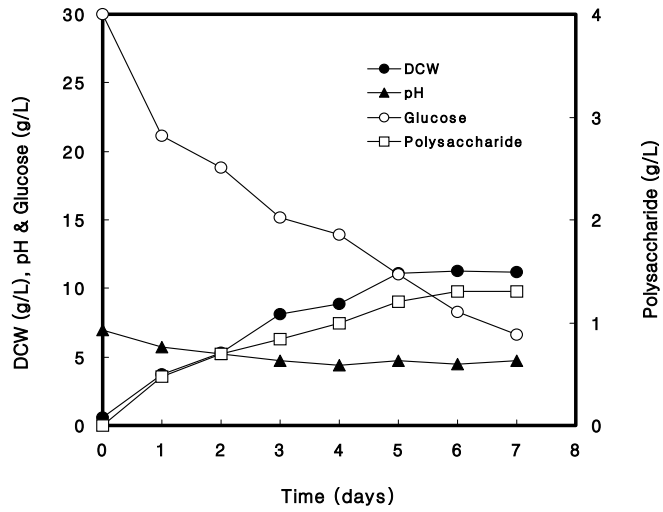


Fig. 25. Profiles of cell growth, pH, glucose and polysaccharide production with initial pH 7 at 100 rpm and 1 vvm

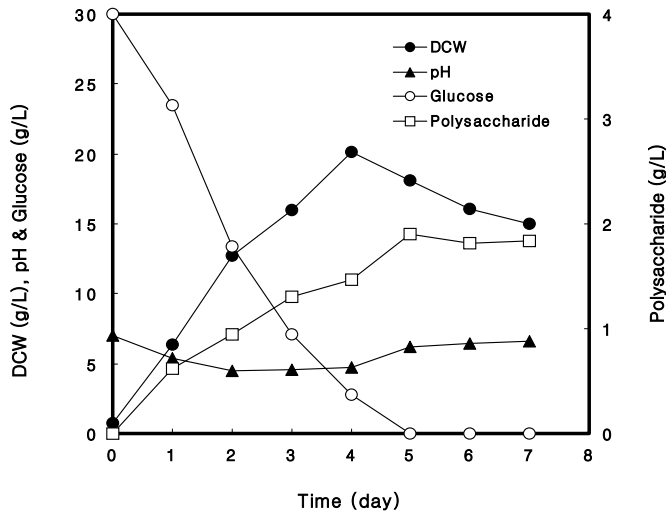


Fig. 26. Profiles of cell growth, pH, glucose and polysaccharide production with initial pH 7 at 200 rpm and 1 vvm

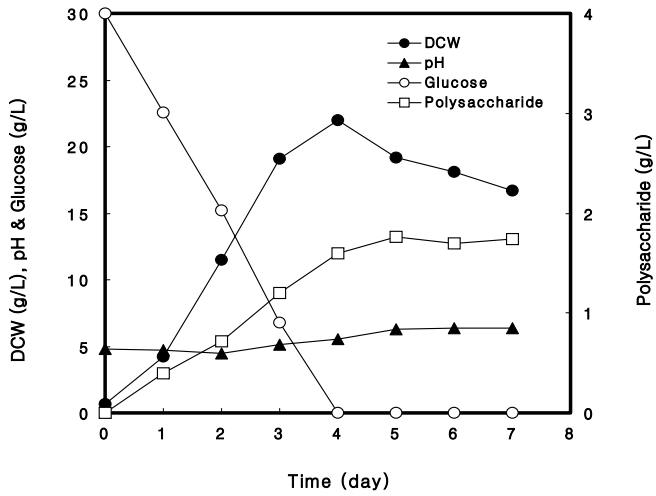


Fig. 27. Profiles of cell growth, pH, glucose and polysaccharide production with initial pH 4.8 at 200 rpm and 1 vvm

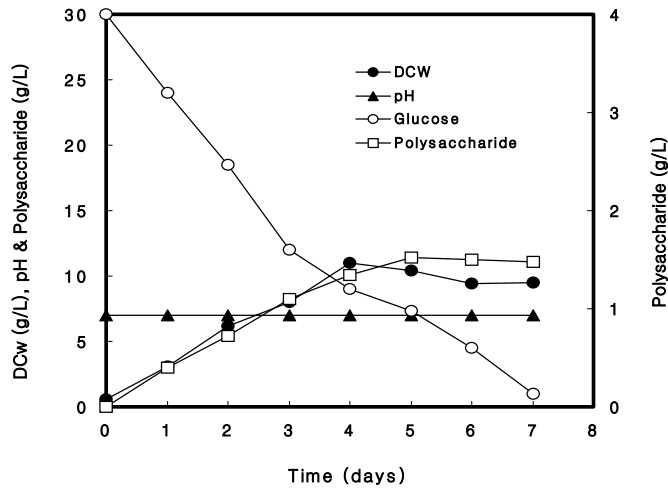


Fig. 28. Profiles of cell growth, pH, glucose and polysaccharide production with controlling at pH 7 in 200 rpm and 1 vvm

교반속도(agitation)을 달리하여 검토하게 되었다. Fig. 29~31은 초기 pH 7로 1.0

vvm에서 교반속도를 300~500 rpm까지 100 rpm씩 달리하여 실험을 실시한 결과이다. Fig. 29를 살펴보면 잔존 glucose양은 배양 4 일째 모두 소모되었고 이에 따라서 균체량도 증가하여 3 일째 21 g/L로 가장 높은 값을 보였다. 이는 Fig. 26와 비교해 볼 때 균체량은 같지만 배양기간이 1 일 단축되었다. 또한, 다당체 생성에 있어서는 거의 비슷한 값을 보였다. Fig. 30은 1.0 vvm, 400 rpm의 조건에서 배양을 한 결과이다. 그림에서 보면 잔존 glucose양은 2일째까지 아주 빠르게 소모되어 3 일째 모두 소모되었다. 균체성장은 glucose의 소모속도와 더불어 배양 2 일째에 23.1 g/L로서 상당히 높은 값을 보였다. 한편 다당체 생성에 있어서는 배양초기부터 계속 증가하여 6 일째 2.51 g/L로서 지금까지 실험한 결과중 가장 높은 값을 보였다. Fig. 31은 rpm을 500으로 증가시켜 실험한 결과이다. 결과를 살펴보면 균체량은 2 일째 19.7 g/L, 다당체 생성은 2.1 g/L로서 Fig. 26과 비교해 볼 때 낮은 값을 보였다. 이처럼 생물반응기에서의 배양은 초기 pH 7에서는 1.0 vvm, 400 rpm이 최적조건임을 알 수 있었다. Fig. 32~33는 초기 pH 4.8로 1.0 vvm의 조건에서 교반속도를 300~400 rpm까지 100 rpm씩 달리하여 실험을 실시한 결과이다. Fig. 32의 결과를 보면 잔존 glucose양은 배양 3 일째까지 거의 다 소모되어 배양 4 일째 모두 소모되었다. 균체량은 배양 3 일째 19 g/L로 가장 높은 값을 보였으며, 그 이후로는 점차 감소되었다. 한편 다당체의 생성에 있어서는 배양 6 일째 1.9 g/L로 가장 높았다. Fig. 33의 결과를 보면 잔존 glucose양은 배양 3 일째 모두 소모되었으며 균체량은 배양 2 일째 18 g/L로 가장 높은 값을 보였다. 다당체 생성은 배양 5 일째 1.72 g/L로 가장 높은 값을 보였다가 그 후에 약간 감소하였다. Fig. 27, 31~32의 결과에서처럼 초기 pH 4.8에서는 1.0 vvm, 200 rpm이 최적조건임을 알 수 있었다. 한편 Fig. 27과 Fig. 30의 결과를 비교해 보면 균체량과 다당체 생성 모두 Fig. 30에서 더 우수하였다. 이상의 결과로부터 초기 pH 및 교반속도를 각각 pH 7, 400 rpm으로 결정하였다.

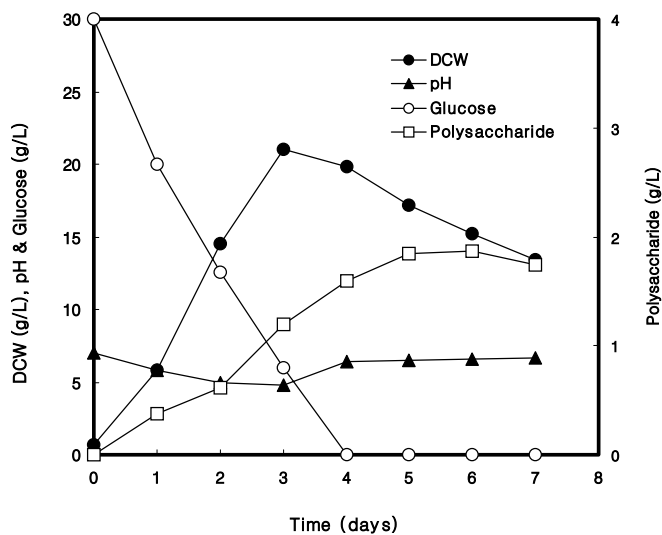


Fig. 29. Profiles of cell growth, pH, glucose and polysaccharide production with initial pH 7 at 300 rpm and 1vvm

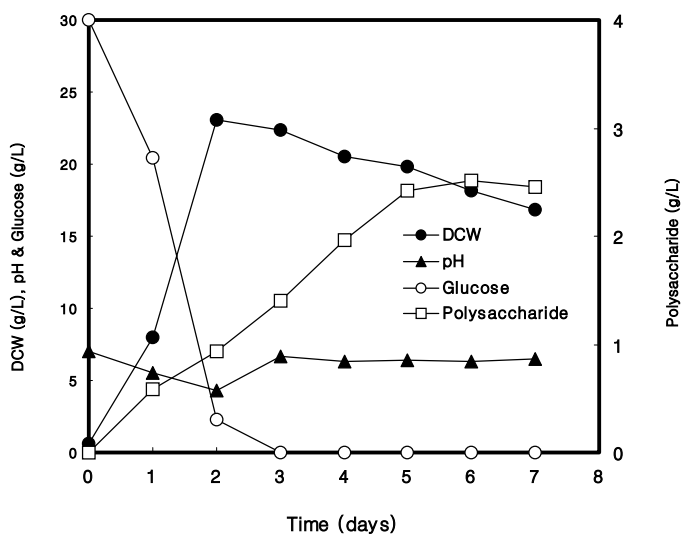


Fig. 30. Profiles of cell growth, pH, glucose and polysaccharide production with initial pH 7 at 400 rpm and 1 vvm

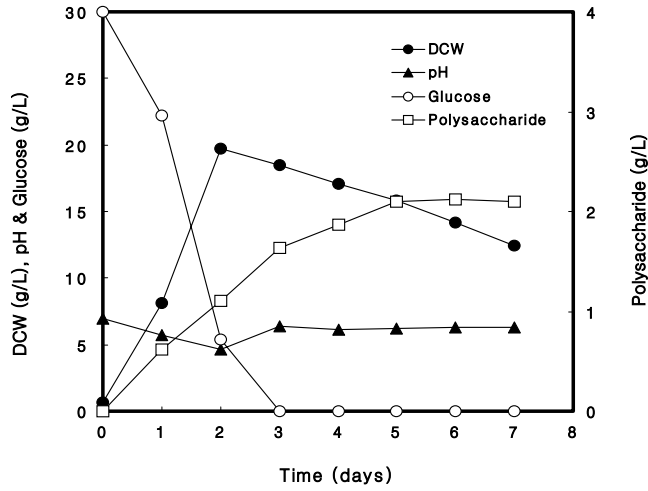


Fig. 31. Profiles of cell growth, pH, glucose and polysaccharide production with initial pH 7 at 500 rpm and 1vvm

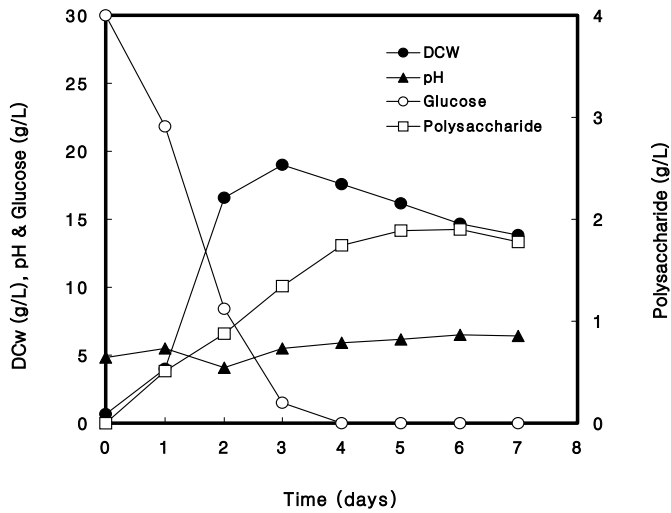


Fig. 32. Profiles of cell growth, pH, glucose and polysaccharide production with initial pH 4.8 at 300 rpm and 1 vvm

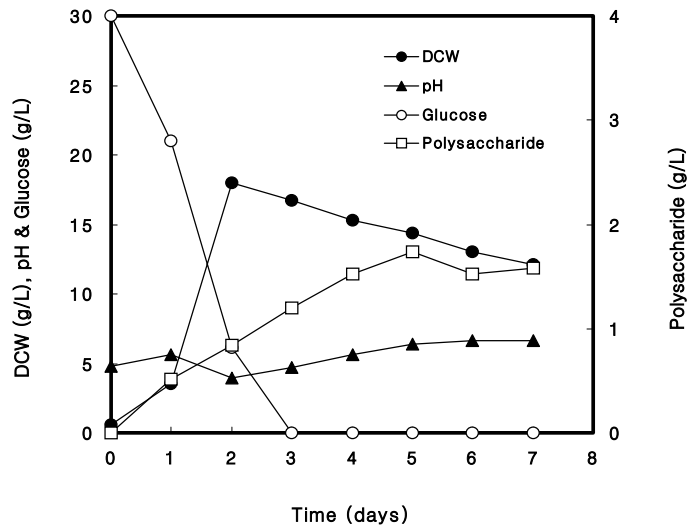


Fig. 33. Profiles of cell growth, pH, glucose and polysaccharide production with initial pH 4.8 at 400 rpm and 1 vvm

2) 통기량의 영향

Fig. 34~35는 초기 pH 7, 400 rpm에서 각각 0.5 vvm, 1.5 vvm의 조건에서 통기량에 대한 영향을 실험한 결과이다. Fig. 34에서 보면 잔존 glucose양은 배양 3 일째 모두 소모되었고 균체량은 배양 2 일째 21.9 g/L로 가장 높았고 그 후로는 감소하는 경향을 보였다. 다당체 생성에 있어서는 배양초기 부터 계속 증가하여 2 g/L로 최대값을 보였다. Fig. 35의 결과를 살펴보면 Fig. 30과 비교해 볼 때 균체량은 거의 비슷하였지만 다당체 생성에 있어서는 약간 상승된 값을 보였다. 한편 Fig. 30의 조건인 1.0 vvm과 Fig. 35를 비교해 볼 때 Fig. 35의 균체량은 22.7 g/L로서 Fig. 30과 거의 비슷하였지만 다당체 생성에 있어서는 2.25 g/L로서 다소 낮았다. 따라서 통기량은 1.0 vvm으로 결정하였다. 이상과 같은 결과로서 회분배양에 있어서 최적 배양조건은 초기 pH 는 7로 교반속도와 통기량은 각각 400 rpm 그리고 1.0 vvm이었다(Table 5).

Table 5. Comparison of cell growth and polysaccharide production depending on aeration and agitation

Aeration : 1.0 vvm

	100 rpm	200 rpm	300 rpm	400 rpm	500 rpm
DCW (g/L)	8.9	20.1	21	23.1	19.7
Polysaccharide (g/L)	1.3	1.9	1.87	2.51	2.12

Agitation : 400 rpm

	0.5 vvm	1.0 vvm	1.5 vvm
DCW (g/L)	21.9	23.1	22.7
Polysaccharide (g/L)	1.95	2.51	2.25

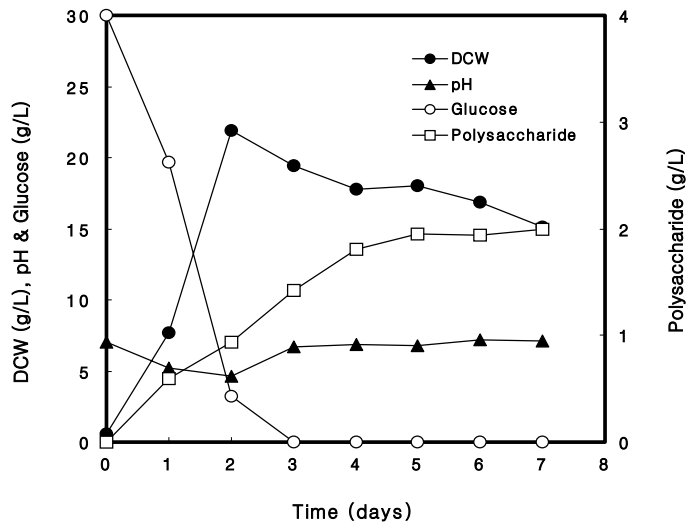


Fig. 34. Profiles of cell growth, pH, glucose and polysaccharide production with initial pH 7 at 400 rpm and 0.5 vvm

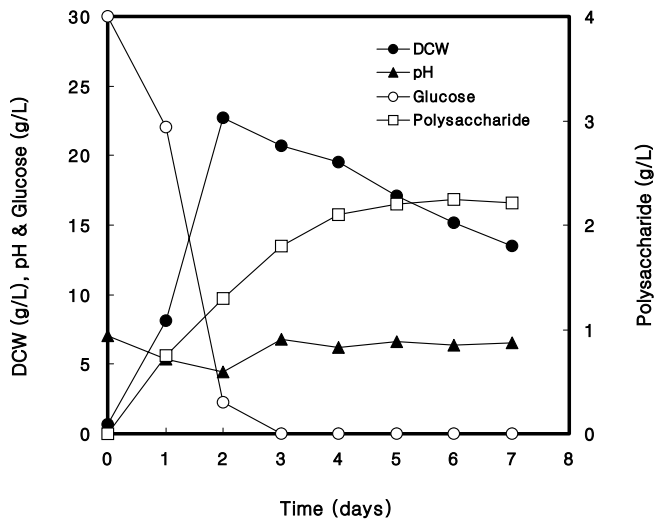


Fig. 35. Profiles of cell growth, pH, glucose and polysaccharide production with initial pH 7 at 400 rpm and 1.5 vvm

다. 동충하초 효능 물질인 cordycepin 분석 방법 설정

1) Cordycepin 분석 조건 확립

본 연구에 사용된 균주인 *P. tenuipes*를 이용한 액체배양을 통해 균사체, 배양여액 및 자실체에서의 cordycepin을 분석하기 위하여 가장 일반적인 방법인 HPLC를 이용하였으며 분석조건은 아래와 같다.

Column : μ Bondapak C₁₈ (300mm L x 3.9mm ID)
Detector : UV detector (260nm)
Mobile phase : 0.1% TFA/Acetonitrile(9:1)
Flow rate : 0.5 mL/min

Fig. 36은 standard cordycepin(Sigma Chemical Co., C 3394)의 chromatogram을 나타내며 체류 시간(retention time)은 8.4 분이였다. Fig. 37은 standard cordycepin(3'-deoxyadenosine)과 분자구조가 비슷한 adenosine을 혼합한 후 HPLC를 실행한 결과이다. Adenosine의 retention time은 7.6 분으로 cordycepin과 확연한 차이를 보였다. Fig. 38은 액체배양으로부터 얻은 균사체를 가지고 HPLC 전처리를 한 다음 실행한 것이다. 그 결과 peak(#4)의 retention time이 8.348 분으로서 cordycepin의 retention time과 같았다. 이를 확인하기 위해서 cordycepin과 1:1로 혼합한 후 다시 HPLC를 행하여 얻은 결과를 나타낸 것이 Fig. 39이다. 혼합하기 전 Fig. 36과 Fig. 38에서 해당되는 peak 면적의 합의 절반이 Fig. 39에서의 peak(#4) 면적과 같았다. 그러므로, Fig. 38에서의 peak(#4)는 균사체내 존재하는 cordycepin을 나타내는 것으로 확인할 수 있었다. 동결건조된 자실체의 경우를 나타내는 Fig. 40에서 peak(#7)의 retention time을 보면 8.465 분으로서 Fig. 36에서의 cordycepin의 retention time과 거의 같음을 알 수 있었다. Fig. 41은 cordycepin과 1:1로 혼합한 결과를 나타낸 것이다. Fig. 39에서와 마찬가지로 Fig. 36과 Fig. 40에서 해당되는 peak 면적의 합의 절반이 Fig. 41의 peak(#6) 면적과 거의 같았다. Fig. 42는 배양여액을 전처리하여 HPLC를 행한 결과를 나타낸 것이다. 배양여액을 cordycepin과 1:1로 혼합한 후 다시 HPLC를 행한 것이 Fig. 43의 결과이다. 혼합한 결과 Fig. 42에서의 peak(#4)와 peak(#5)는

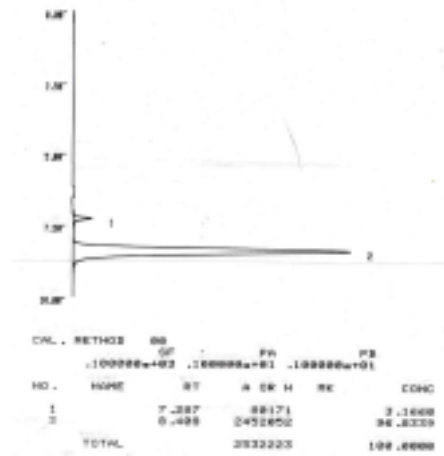


Fig. 36. HPLC peak diagram of cordycepin

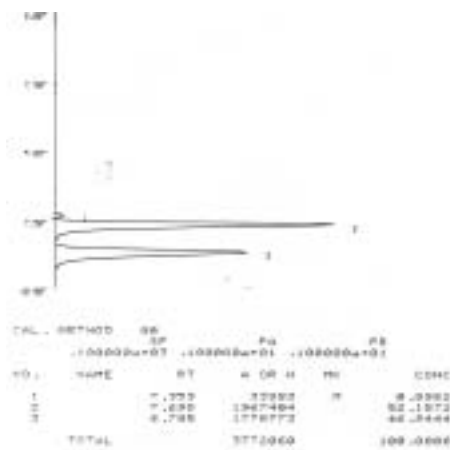


Fig. 37. HPLC peak diagram of cordycepin and adenosine



Fig. 38. HPLC peak diagram of mycelium

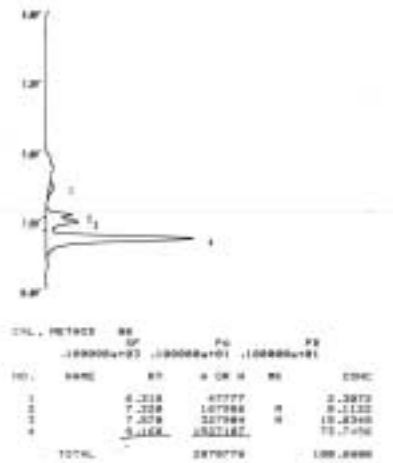


Fig. 39. HPLC peak diagram of mycelium and cordycepin



Fig. 40. HPLC peak diagram of fruiting body

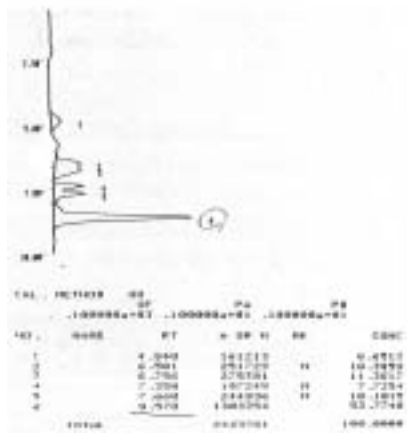


Fig. 41. HPLC peak diagram of fruiting body and cordycepin

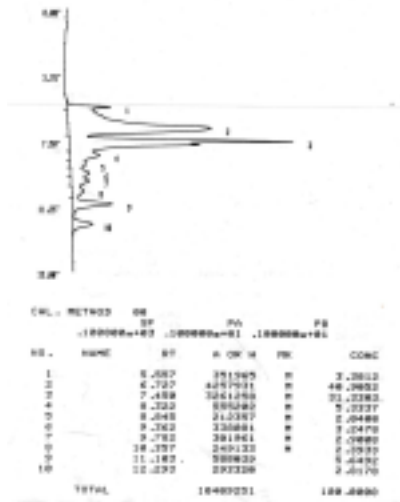


Fig. 42. HPLC peak diagram of culture broth

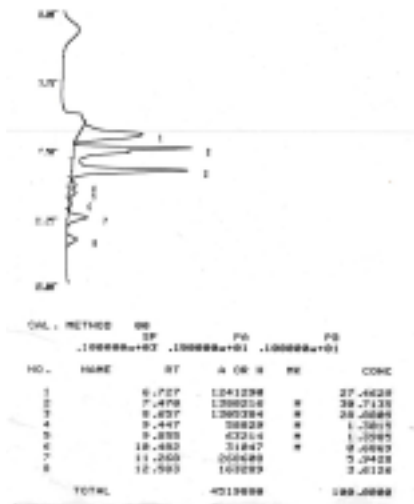


Fig. 43. HPLC peak diagram of culture broth and cordycepin

Fig. 43에서의 peak(#3)으로 합쳐져 나타나 cordycepin에 해당되는 peak가 어느 것인지 판단할 수 없었다. 이를 해결하기 위해 배양여액과 standard cordycepin

의 혼합비율을 2:1, 3:1, 4:1로 변화를 주어 chromatogram을 확인한 결과 Fig. 42에서 cordycepin에 해당되는 peak는 peak(#5)임을 알 수 있었다. Fig. 44는 yeast extract에 대해 HPLC를 행한 결과를 나타낸 것이다. 배지성분중 yeast extract는 복합배지성분으로 cordycepin peak와 겹쳐질 우려가 있기 때문에 확인한 실험이었다. 그림에서 보면 알 수 있듯이 cordycepin의 retention time과 다름을 알 수 있었다. Fig. 45는 yeast extract와 cordycepin을 1:1로 혼합한 결과이다. 그 결과 yeast extract의 성분에는 cordycepin과 같은 retention time을 갖는 물질이 없음을 알 수 있었다.

2) Cordycepin 생성에 대한 배지조성 검토

Fig. 46은 플라스크 배양에서의 경시 변화를 나타낸 결과이다. 배양 2 일째 배양 여액에서 cordycepin의 양이 4.1 mg/L로 가장 높은 값을 나타내었고, 다당체는 배양 1 일째 1.1 g/L로 가장 높은 값을 나타내었다. 따라서, cordycepin 분석을 위해 배양 2 일째의 시료를 사용하였다.

i) 탄소원의 영향

Fig. 47은 탄소원 중 단당류인 glucose, galactose 등과 이당류인 sucrose, 다당류인 starch를 사용하여 이에 따른 균체량과 cordycepin 생성에 대한 영향을 비교·검토한 결과이다. 배양시 yeast extract를 1%로 고정시키고 각각의 탄소원을 1%씩 첨가하였으며 대조구는 탄소원 없이 yeast extract만 1% 들어간 경우이다. 균체량은 starch를 첨가한 경우 12.9g/L로 가장 높게 나타났으나 다른 탄소원을 첨가했을때의 균체량과 크게 차이나지는 않았다. cordycepin생성에 있어서는 균체내의 경우 모두 낮은 농도로 검출되었고 배양여액에서는 lactose, fructose 그리고 glucose 순으로 높게 나타났으며 그 농도가 3.9 mg/L, 3.5 mg/L 그리고 3.4 mg/L이었다.

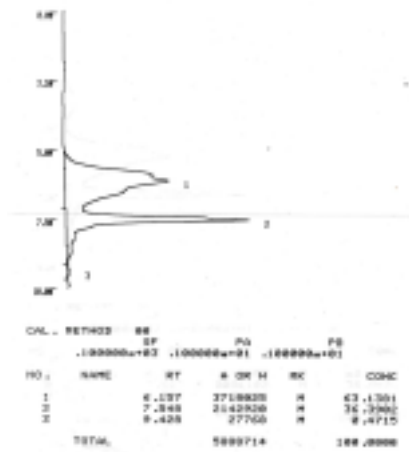


Fig. 44. HPLC peak diagram of yeast extract

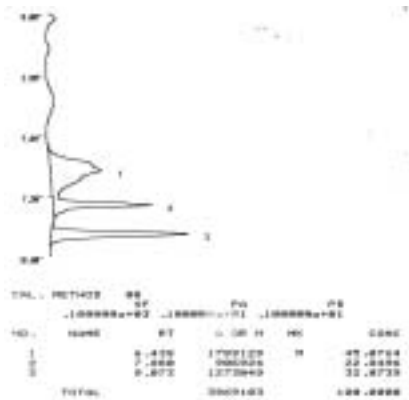


Fig. 45. HPLC peak diagram of yeast extract and cordycepin

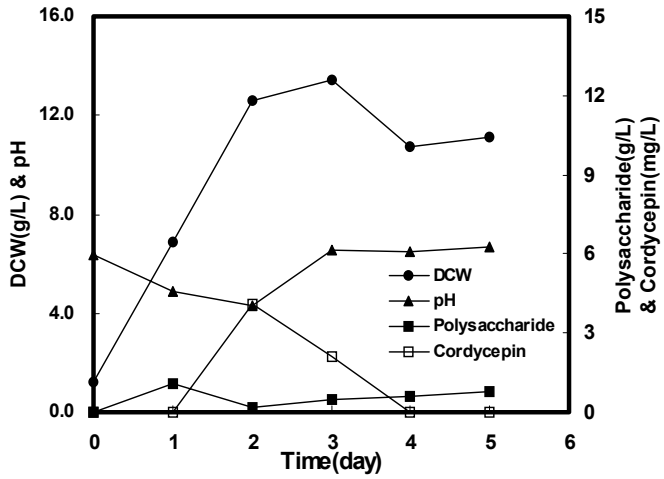


Fig. 46. Profiles of cell growth, pH, cordycepin and polysaccharide production with basal medium in flask culture

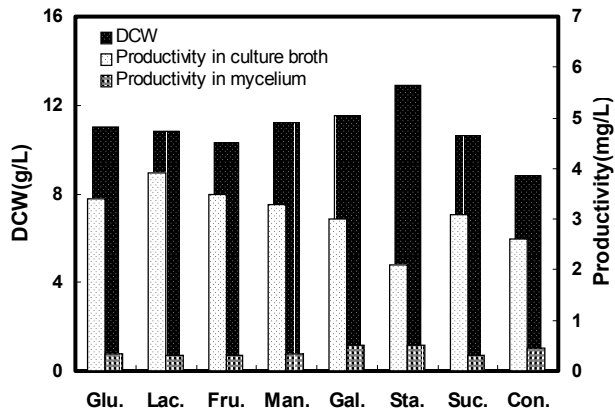


Fig. 47. Effects of C-sources on the cell growth and cordycepin production

ii) 질소원의 영향

Fig. 48은 yeast extract, soytone, casein 등의 유기 질소원을 사용하여 이에 따른 균체량과 cordycepin 생성에 대한 영향을 비교·검토한 결과이다. 배양시 glucose를 1%로 고정시키고 각각의 유기 질소원을 1%씩 첨가하였으며 대조구는 glucose 1%만을 첨가하여 실험하였다. 그 결과 균체량은 yeast extract를 첨가했을 때 10.8 g/L로 가장 높게 나타났고, cordycepin도 yeast extract를 첨가했을 때 균체내와 배양여액에서 각각 0.07 mg/g cell과 3.2 mg/L로 다른 유기 질소원을 첨가했을 때 보다 좋은 결과를 나타내었다. Fig. 6~7의 결과를 토대로 경제성을 고려하였을 때 균체량 및 cordycepin 생성에 있어서 탄소원으로는 glucose를 유기 질소원으로는 yeast extract를 최적의 탄소원과 유기 질소원으로 결정하였다.

iii) C/N ratio의 영향

Fig. 49~50은 균체량과 배양여액에서의 cordycepin 농도에 대한 C/N 농도를 점검한 결과이다. 탄소원인 glucose는 10 g/L에서 100 g/L까지 변화를 주었고 질소원인 yeast extract는 1 g/L에서 30 g/L까지 변화를 주었다. 즉, C/N 농도의 변화를 100:1부터 10:30까지 변화를 주어 실험을 수행하였다. 일반적으로 보고되어진 결과와 달리 본 균주에서는 C/N 농도가 낮을수록 균체량과 cordycepin 농도가 높아짐을 알 수 있었다. C/N 농도가 30:20일때 최대 균체량 19 g/L이었고, C/N 농도가 10:30일때 cordycepin의 최대 농도는 5.6 mg/L이었다. 그러나 C/N 농도가 10:20일때의 cordycepin 농도가 5.5 mg/L이었으므로 경제성을 고려하여 최적의 C/N 농도는 10:20으로 결정하였다.

iv) 무기 질소원 및 아미노산의 영향

Fig. 51은 glucose 1%와 yeast extract 1%를 사용한 것을 대조구로 하여 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 등의 무기 질소원을 각각 0.5%씩 첨가한 결과이다. 균체량은 NH_4Cl 을 첨가했을 때 12.6 g/L로 대조구에 비해 약간 높게 나타내었고, cordycepin 생성에 있어서 균체내에서는 별다른 차이가 없으나 배양여액에서의 경우 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 를 첨가했을 때 6.3 mg/L로 가장 높게 나타났다. 배지성분으로

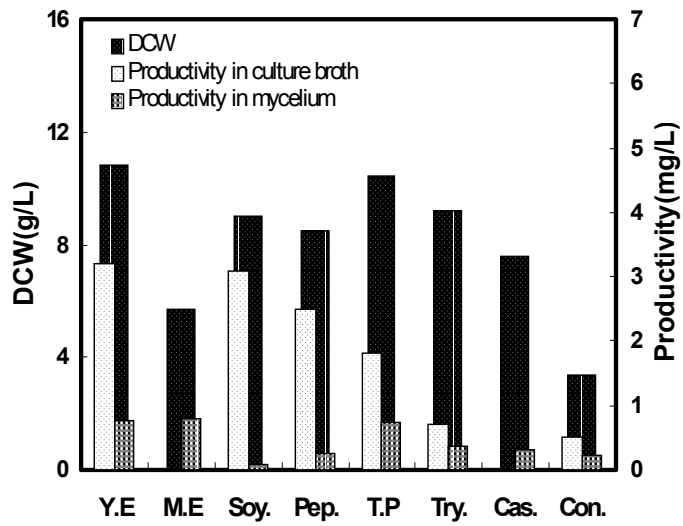


Fig. 48. Effects of N-sources on the cell growth and cordycepin production

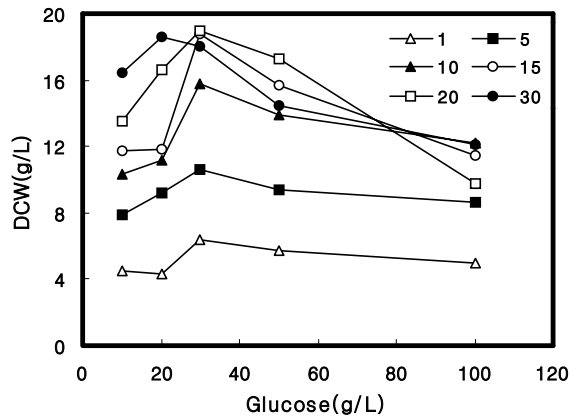


Fig. 49. Effects of various glucose & yeast extract concentrations on the cell growth. The legend indicates the concentration of yeast extract(g/L)

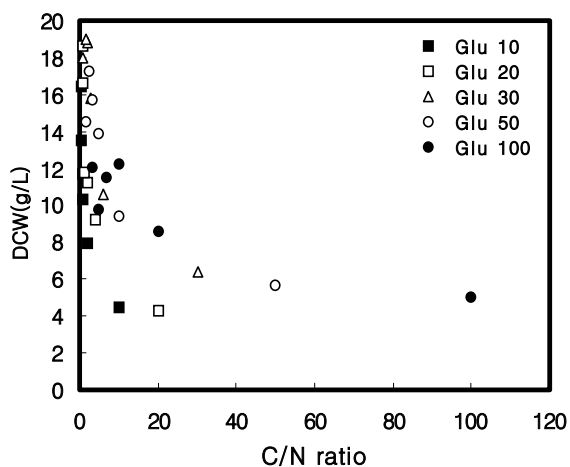


Fig. 49-1. Effects of C/N ratio on the cell growth. The legend indicates the concentration of glucose(g/L)

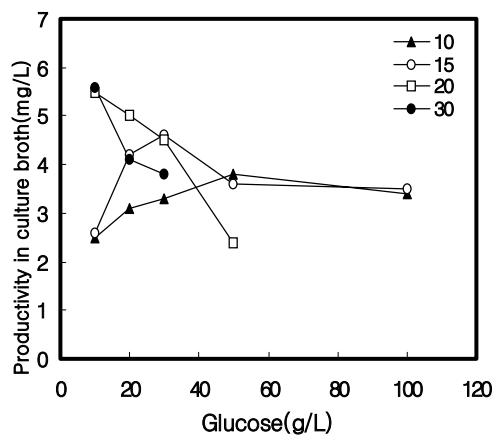


Fig. 50. Effects of various glucose & yeast extract concentrations on cordycepin production. The legend indicates the concentration of yeast extract(g/L)

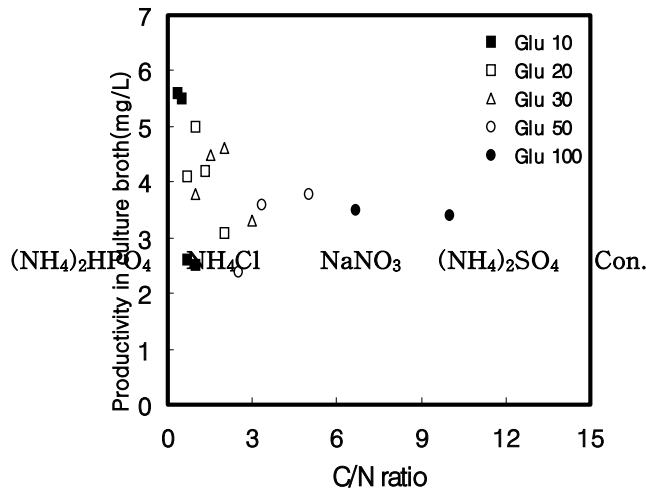


Fig. 50-1. Effects of C/N ratio on cordycepin production. The legend indicates the concentration of glucose (g/L)

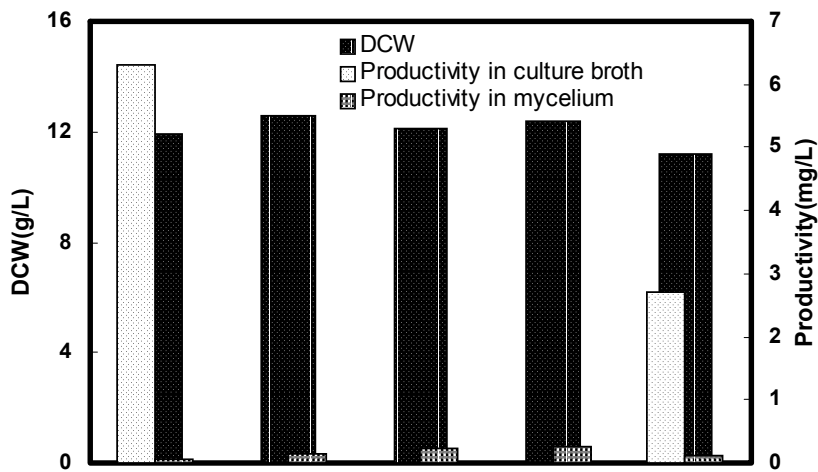


Fig. 51. Effects of inorganic N-sources on the cell growth and cordycepin production

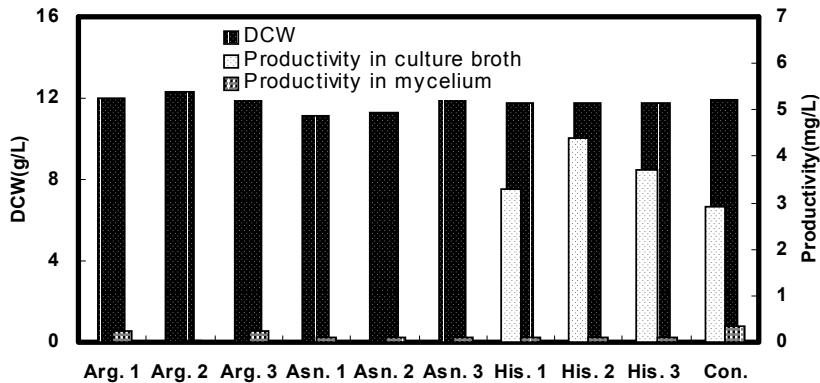


Fig. 52. Effects of amino acids on the cell growth and cordycepin production

아미노산을 첨가하였을 때 이차대사산물의 전구물질로 작용하기도 한다. 이러한 이유로 아미노산 첨가에 따른 영향을 검토하였다. Fig. 52는 glucose 1%와 yeast extract 1%를 사용한 것을 대조구로 하여 미리 선정한 세가지의 아미노산 (Arginine, Asparagine, Histidine)을 각각 0.1%, 0.2%, 0.3%로 첨가량의 변화를 주어 실험한 결과이다. 균체량에서는 arginine 0.2%(Arg.2)를 첨가하였을 때 12.3 g/L로 가장 높게 나타났으나 대조구에서도 11.9 g/L가 나타났기 때문에 아미노산 첨가에 대한 영향은 거의 없는 것으로 판단되며 cordycepin의 생성에 있어서는 균체내의 경우 거의 차이가 없었으나 배양여액에서의 경우 histidine 2 g/L를 넣었을 때 4.4 mg/L로 가장 높게 나타났다.

v) 무기염류 및 금속이온의 영향

Fig. 53은 glucose 1%와 yeast extract 1%를 사용한 것을 대조구로 하여 KCl, CaCO₃ 그리고 KH₂PO₄ 등의 무기염류를 각각 0.1% 첨가하여 그에 따른 영

항을 비교·검토한 결과이다. 그 결과 균체량은 CaCO_3 를 첨가했을 때 15.0 g/L로 가장 높게 나타났고, cordycepin 생성에 있어서는 균체내의 경우 KCl을 첨가했을 때 0.07 mg/g cell로 대조구에 비해 약 3배 높았으며 배양여액의 경우 CaCO_3 를 첨가했을 때 5.1 mg/L로 가장 높게 나타났다. Fig. 54는 glucose 1%와 yeast extract 1%를 사용한 것을 대조구로 하여 금속이온의 첨가량에 따른 영향을 나타낸 결과이며 첨가량은 각각 0.01%이다. Fig. 54에서 볼 수 있듯이 균체량은 11.4 g/L로 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 를 첨가했을 때 가장 높게 나타났다. cordycepin 생성에 있어서는 균체내의 경우 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 첨가했을 때 0.1 mg/g cell, 배양여액에서의 경우 대부분 검출되지 않았으며 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 를 첨가했을 때에만 3.0 mg/L로 대조구에 비해 높게 나타났다.

플라스크 배양을 통해 cordycepin 생성에 대한 배지성분을 검토한 결과로 modified medium II (Table 3)을 만들었다. 균체내에서 보다 배양여액에서의 cordycepin 농도가 더 높기 때문에 배양여액에서의 cordycepin 농도가 높은 배지 성분들 중 균체 성장과 균체내의 cordycepin 생성에 저해되지 않는 성분들이 배지 선정의 기준이 되었으며 각 배지성분들의 첨가량, HPLC 분석시 cordycepin peak와의 중복 여부, 경제성 등이 고려되었다.

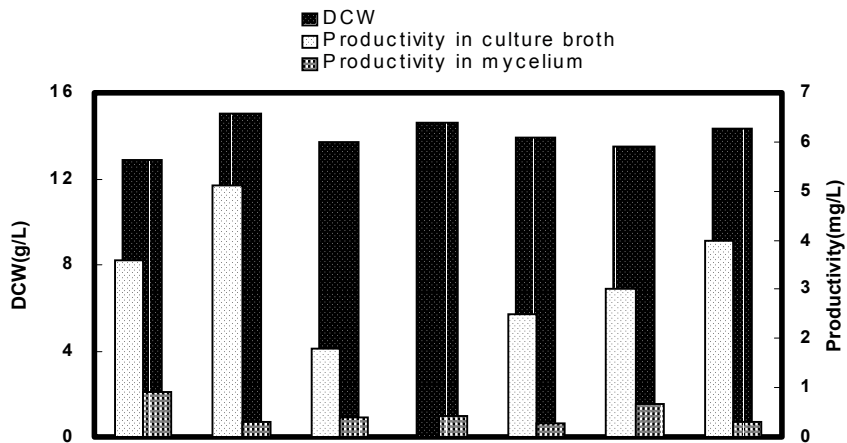


Fig. 53. Effects of inorganic salts on the cell growth and cordycepin production

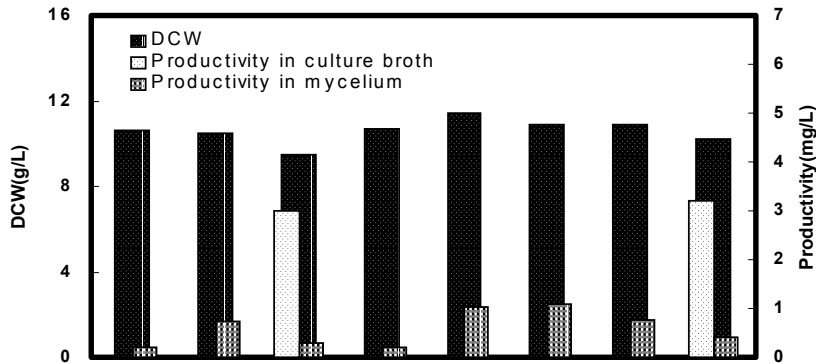


Fig. 54. Effects of trace elements on the cell growth and cordycepin production

3. 생물반응기에서 균사체 증식의 최적화

가. 고농도 배양공정 개발

-회분배양에서의 glucose 및 yeast extract의 첨가 영향

Fig. 55~56은 회분배양을 응용한 것 후판 $100 \times 100 \times 10 \text{ mm}$ batch culture를 실시한 결과이다. Glucose와 yeast extract는 모두 증류수 30mL에 녹여 첨가하였다. Fig. 55는 최적의 회분배양 조건(초기 pH 7, 400 rpm, 1.0 vvm)에 glucose의 농도가 거의 다 소모되는 시기인 배양 2 일째에 10 g/L의 glucose를 첨가해서 균체량과 다당체 생성량에 대한 영향을 검토한 결과이다. Fig. 55의 결과를 보면 균체량 및 다당체 생성량은 각각 배양 3 일째에 22.3 g/L, 배양 6 일째에 2.48 g/L로서 최적의 회분배양 조건에서와 거의 비슷한 결과를 보였다. Fig. 56은 최

적의 회분배양 조건에 glucose를 배양 2 일째에 10 g/L를 첨가하고, 배양 3 일째에는 5 g/L의 yeast extract를 첨가해서 균체량과 다당체 생성량에 미치는 영향을 검토한 결과이다. 그 결과 G10는 glucose양은 배양 4 일째에 모두 소모되었으며, 균체량은 배양 5 일째 24.1 g/L로서 가장 높은 값을 나타냈으며, 다당체 생성에 있어서는 yeast extract를 첨가한 배양 3 일째부터 급격하게 증가하여 배양 5 일째에 2.75 g/L로 최대값을 보였다. 균체량이 배양 5 일째 증가한 원인은 벽면에 wall growth된 것이 떨어졌기 때문이다. Fig. 57은 최적 회분 배양조건에 배양 2 일째와 배양 2.5 일째에 각각 5 g/L의 yeast extract를 첨가해 균체량과 다당체 생성량에 대한 영향을 살펴본 것이다. 잔존 glucose양은 2.5 일째에 모두 소모되었으며, 균체량은 2.5 일째 22.8 g/L로 가장 높은 값을 보였다가 그 이후로는 계속 감소하였다. 다당체 생성량은 배양 6 일째 2.76 g/L로 가장 높았다. 배양 3 일째에 균체량이 다소 감소하였는데 이는 yeast extract의 축적에 따른 고농도에 대한 영향인 것으로 판단된다. Fig. 55~57을 비교해 보면 glucose만 첨가한 것보다 yeast extract를 같이 첨가했을 때가 다당체 생성에 있어서는 좋은 영향을 주었다. Fig. 58은 Fig. 55~57을 바탕으로 첫 번째 glucose의 첨가는 잔존당의 농도가 5 g/L 이상이면서 세포활성이 가장 좋은 대수기에 10 g/L의 농도로 배양

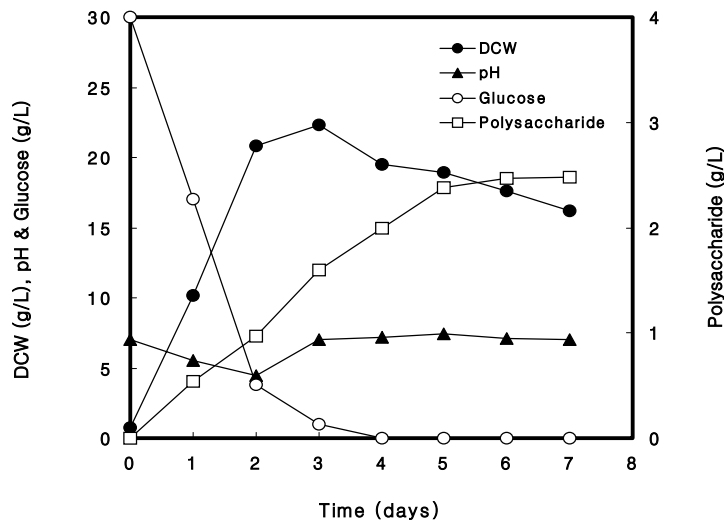


Fig. 55. Profiles of cell growth, pH, glucose and polysaccharide production with adding glucose 10 g/L (G10)

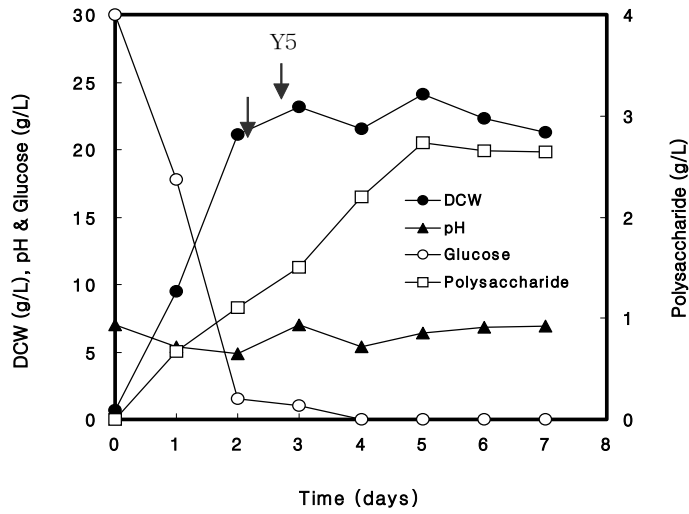


Fig. 56. Profiles of cell growth, pH, glucose and polysaccharide production with adding glucose 10 g/L (G10) and yeast extract 5 g/L (Y5)

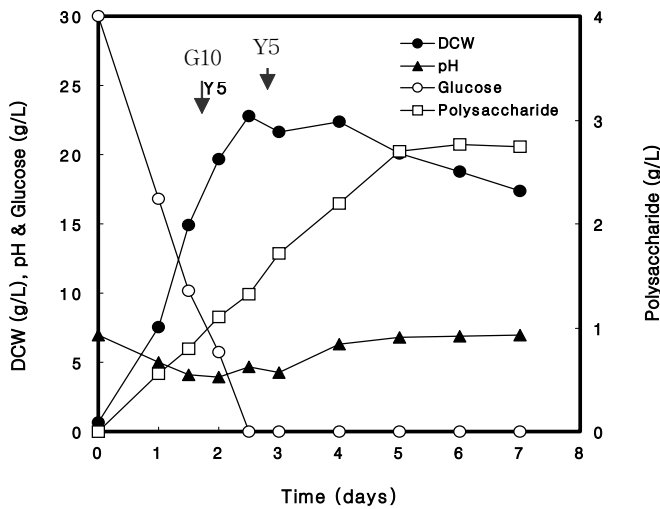


Fig. 57. Profiles of cell growth, pH, glucose and polysaccharide production with adding yeast extract 5 g/L (Y5)

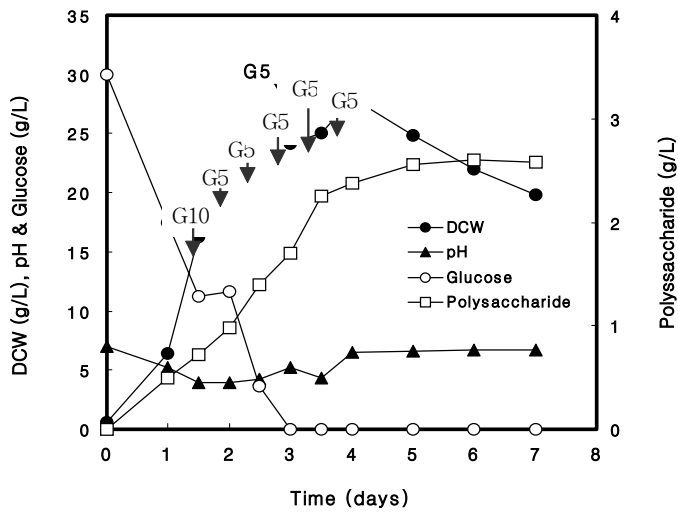


Fig. 58. Profiles of cell growth, pH, glucose and polysaccharide production with adding glucose (G10, G5) and yeast extract (Y5)

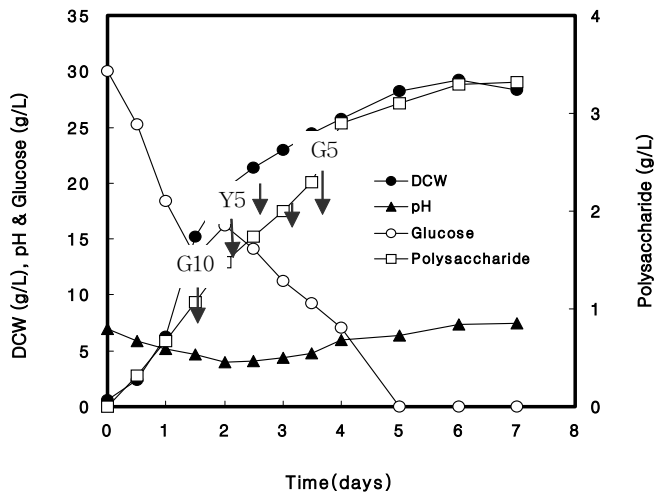


Fig. 59. Profiles of cell growth, pH, glucose and polysaccharide production with adding glucose (G10, G5)

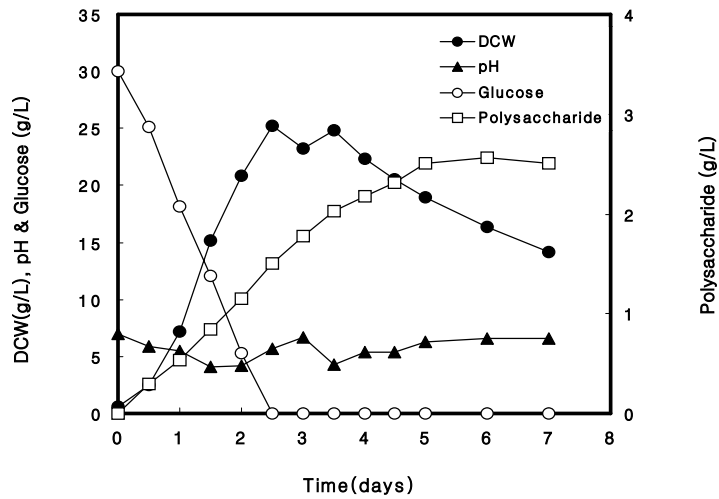


Fig. 60. Profiles of cell growth, pH, glucose and polysaccharide production with adding yeast extract 5 g/L (Y5)

1.5 일째 첨가를 했고 glucose의 농도가 5 g/L 이하로 떨어지면 5 g/L glucose를 첨가했으며, glucose 첨가 사이사이에 Y5 ↓ yeast extract를 5 g/L씩 반복해서 첨가하여 균체량과 다당체 생성량에 대한 영향을 살펴보았다. 그 결과 균체량은 배양 4 일째 28 g/L로서 아주 높은 값을 나타냈으며 glucose를 첨가하지 않는 시기때부터는 균체량이 아주 많이 감소하는 경향을 볼 수 있었다. 다당체 생성에 있어서는 배양 6 일째 2.6 g/L로 가장 높았으며, 배양 3.5 일까지는 계속 증가하다가 배양 4 일째에 가서 기울기가 크게 줄어들었다. Fig. 59는 연속적으로 glucose의 첨가에 따른 균체량과 다당체 생성량에 대한 결과를 나타낸 것이다. 첫 glucose의 첨가는 배양 1.5 일째 10 g/L, 그 후로는 5 g/L의 농도로 배양 3.5 일째까지 배양 0.5 일 마다 첨가했다. 균체량은 glucose를 첨가함에 따라서 계속 증가하여 배양 6 일째 29.2 g/L로서 지금까지 실험한 결과중 가장 높은 값을 보였다. 이러한 결과는 배지내의 잔존 glucose의 양이 모두 다 소모되지 않고 5 g/L이상을 유지했기 때문인 것으로 판단된다. 배양 5 일째 glucose가 모두 소모되자 균체량은 증가되지 않고 거의 일정하게 유지되는 것을 볼 수 있었다. 또한 다당체 생성에 있어서도 계속 증가되어 배양 6 일째 3.3 g/L로서 지금까지 실험한 결과중 가장

높은 값을 나타내었다. Fig. 60은 yeast extract의 첨가시 다당체 생성에 좋은 영향을 주었기 때문에 지속적으로 yeast extract의 첨가에 따른 균체량과 다당체 생성량에 대한 결과를 나타낸 것이며, 배양 2 일째, 3 일째, 그리고 4 일째에 각각 5 g/L의 yeast extract를 첨가하였다. 잔존 glucose양이 다 소모된 2.5 일째 이후부터 균체량이 감소하는 경향을 볼 수 있다. 하지만 yeast extract를 첨가해 주자 다시 균체량이 증가하였다. 균체량은 배양 2.5 일째 25.2 g/L로 가장 높았고, 배양 4 일째 때 yeast extract를 첨가했는데도 균체량이 감소하는 원인은 이미 균체의 활성이 잃은 후에 첨가됐기 때문인 것으로 판단된다. 또한 다당체 생성에 있어서도 2.56 g/L로서 낮았다. 따라서 Fig. 55~60의 결과에서 알 수 있듯이 변형된 회분배양은 Fig. 59의 방법이 가장 좋았다. 이러한 이유는 배지내에 잔존 glucose의 양이 균체가 성장할 수 있는 농도로 유지되었기 때문이며, 이와 아울러 다당체 생성 또한 증가한 것으로 판단된다.

나. Fed-batch culture 기술의 적용

1) 회분배양의 문제점

Fig. 61은 cordycepin 생성에 대한 배지조성 검토를 통해 얻어진 modified medium II (Table 3)을 사용해 생물반응기로 실험한 결과이다. 그 결과 균체량은 배양 1.75 일째 11.9 g/L로 대조구를 사용하였을 때보다 높게 나타났고 배양여액에서의 cordycepin 농도는 배양 2 일째 13.7 mg/L로 대조구에 비해 3배 이상 증가한 결과를 얻을 수 있었다. Harvest시의 wall growth의 농도는 46.6 g/900 mL이며 남아있는 배양액과의 합친 농도는 28.7 g/L 이었다. 배양여액에서의 cordycepin 생산을 위한 회분배양에서 배양 1.5 일과 배양 2 일 사이에 시작되는 심한 wall growth로 인해 균체량의 변화양상에 대한 정확한 측정이 어렵고 물질 전달이 균일하지 못하기 때문에 배양의 재현성이 떨어질 것이라 판단하였다. Fig. 62는 배양시 가장 큰 문제가 되는 wall growth 사진이다. Wall growth는 배양 1.5~2일에 시작되며 시작된 하루정도 후부터는 대부분의 증식이 벽면을 타고 이루어짐을 관찰할 수 있었다. Fig. 63~64의 배양조건은 Fig. 61에서와 같으며 wall growth 방지제인 PAA(polyacrylic acid) 와 SA(sodium acrylate)를 각각 0.1%씩 첨가한 결과이다. 그 결과 Fig. 63에서의 harvest시 wall growth의 양은 1080 mL 이었다. 균체량은 배양 3 일째 12.9 g/L이고 배양여액에서의

cordycepin 농도는 배양 5 일째 5.9 mg/L 이었다. Fig. 64에서의 harvest시 wall growth의 양은 600 mL로 다소 효과가 있음을 알 수 있었다. 균체량은 배양 2 일째 13.6 g/L를 나타내었으며 배양여액에서의 cordycepin 농도는 배양 3 일째 8.8 mg/L를 나타내었다. 본 실험에 사용된 균주는 filamentous 형태로 자라면서 점도가 증가한다. 점도가 증가하면서 산소전달 능력이 급격히 감소하게 되는데 산소공급을 원활히 해주어야 한다⁽⁴¹⁻⁴²⁾. Fig. 65는 용존산소의 농도를 20% 이상 유지 시킨 결과이다. OTR(oxygen transfer rate)을 증가시키기위해 교반속도(30 0~450rpm)를 변화시켰다. 그림에서 볼 수 있듯이 잔존당은 배양 1.5 일째 0.1 g/L로 거의 다 소모되었고 균체량은 배양 2 일째 12.8 g/L를 나타내었다. 또한, 배양여액에서의 cordycepin 농도는 배양 3 일째 7.7 mg/L로 관찰되었다. Harvest시 wall growth의 농도는 23.4 g/580 mL이었다.

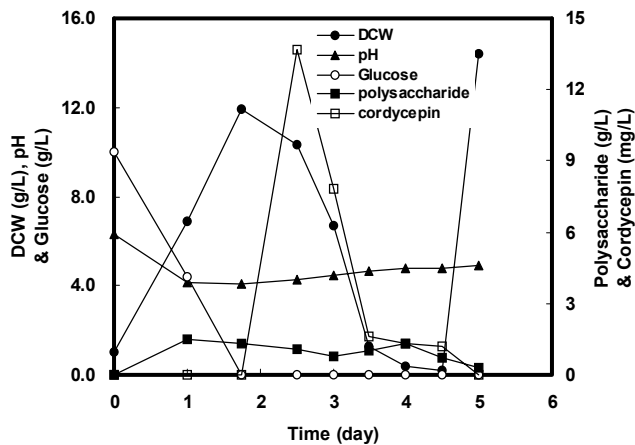


Fig. 61. Profiles of cell growth, pH, glucose, cordycepin and polysaccharide production in modified medium



Fig. 62. Photographs of wall growth on fermentation

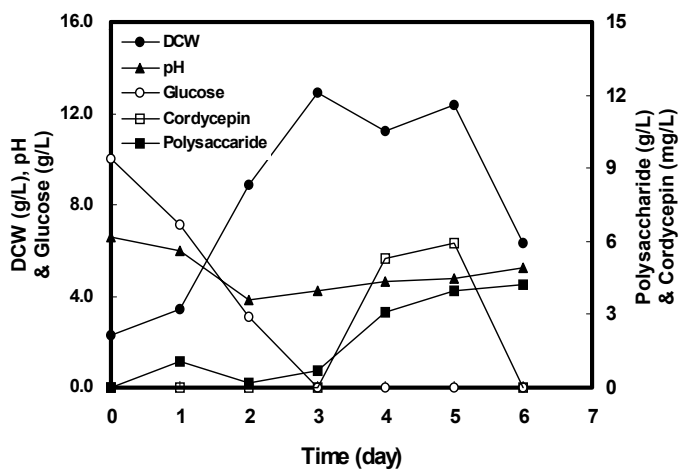


Fig. 63. Profiles of cell growth, pH, glucose, cordycepin and polysaccharide production in modified medium (adding PAA)

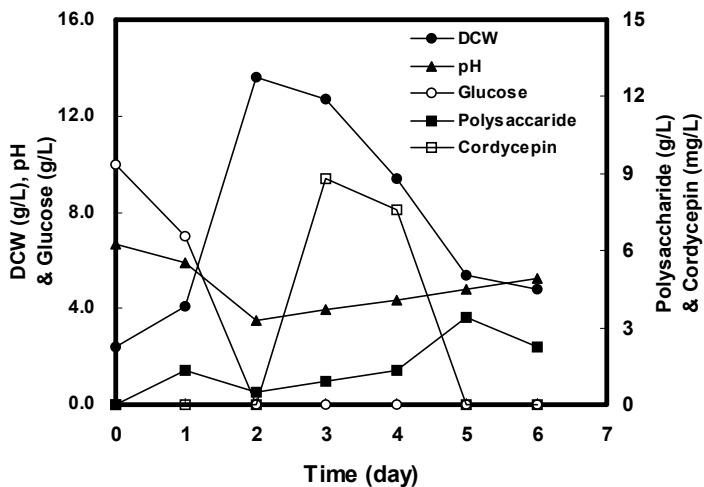


Fig. 64. Profiles of cell growth, pH, glucose, cordycepin and polysaccharide production in modified medium (adding SA)

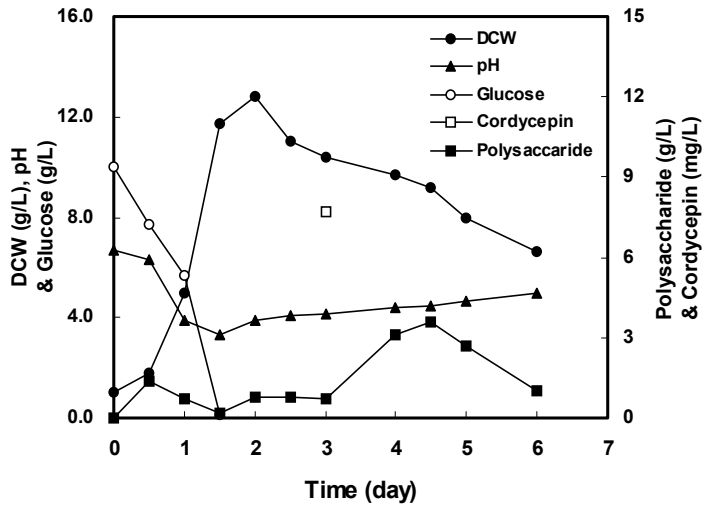


Fig. 65. Profiles of cell growth, pH, glucose, cordycepin and polysaccharide production under DO control (over 20%) in modified medium

생물반응기를 이용한 회분배양을 통해 배양여액에서의 cordycepin은 잔존

당이 모두 고갈된 이후 하루에서 이틀사이에서만 한정적으로 검출되었고 wall growth 방지제의 사용으로 조금의 효과를 보았으나 wall growth로 인한 배양상의 문제점은 해결되지 못했다.

2) Fed-batch culture

회분배양의 결과를 통하여 얻어진 문제점들은 wall growth로 인한 배양 진행의 어려움과 cordycepin의 검출시기가 불분명하다는 것이다. 균체량을 높이기 위해 탄소원인 glucose를 공급하였는데 공급시기는 pH와 DO의 변화에 의해 결정하였다. 배양이 시작되면서 pH는 감소하고 탄소원이 고갈되면 pH가 점차적으로 상승하기 시작한다. 이때 DO는 유지(약 4 시간 정도)되다가 증가하는데 그때의 pH값을 기준으로 배지를 공급하기 시작하였다. 특기할 사항은 wall growth만을 전처리하여 cordycepin을 측정하였는데 플라스크 배양에서의 균체내 cordycepin 농도보다 월등히 높은 것을 알 수 있었다. 따라서, wall growth를 방지하기 보다는 오히려 유도를 하여 균체내의 cordycepin 생산량을 높이는 것이 바람직하다고 판단하였다. Fig. 66~68은 공급배지(glucose)의 농도를 각각 50, 100, 400 g/L로 하여 pH-stat에 적용한 결과이다. Fig. 66은 glucose의 농도를 50 g/L로 하여 배양 1.75일부터 3 일째까지 pH변화에 따라 공급한 결과이다. 그 결과 배양 3 일째의 균체량은 20.3 g/L, 균체내의 다당체와 cordycepin은 각각 32 mg/g cell 및 1 mg/g cell이 검출되었다. 탄소원이 고갈되면 세포로부터 배출된 암모늄 이온 농도의 증가에 pH가 증가하는데 여기서 공급된 glucose의 농도 50 g/L는 pH를 일정하게 유지시키기에는 낮은 농도라 판단되었다. Fig. 67은 Fig. 66과 같은 방법으로 glucose의 농도를 100 g/L로 하여 공급한 결과이다. 그 결과 균체량은 22.9 g/L, 균체내의 다당체와 cordycepin은 각각 25.9 mg/g cell 및 1.6 mg/g cell이 검출되었다. 또한, pH의 변화양상을 보면 Fig. 66에서 보다는 pH를 잘 유지시킨 것을 알 수 있다. 이와같은 결과를 통해 공급배지를 고농도(400 g/L)로 미량 첨가하는 것이 바람직하다고 판단하였고 Fig. 68은 그에 따른 결과이다. 그림에서 볼 수 있듯이 pH는 정확하게 유지되었으며 균체량은 33.3

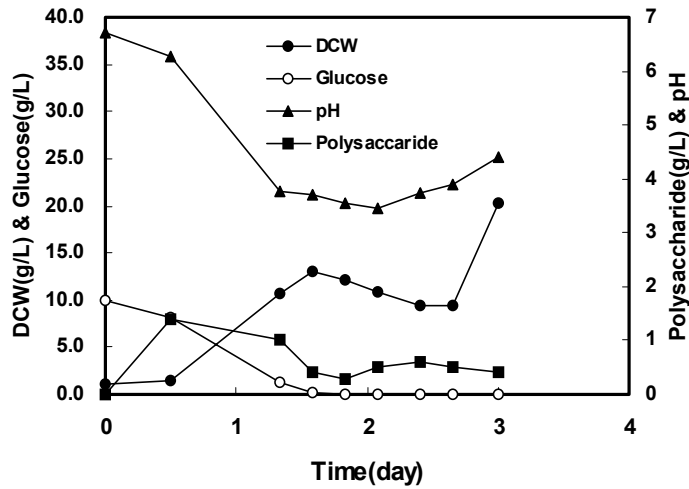


Fig. 66. Profiles of cell growth, pH, glucose and polysaccharide production under DO control (over 20%) with medium feeding by pH signal (feeding medium : 50 g/L glucose)

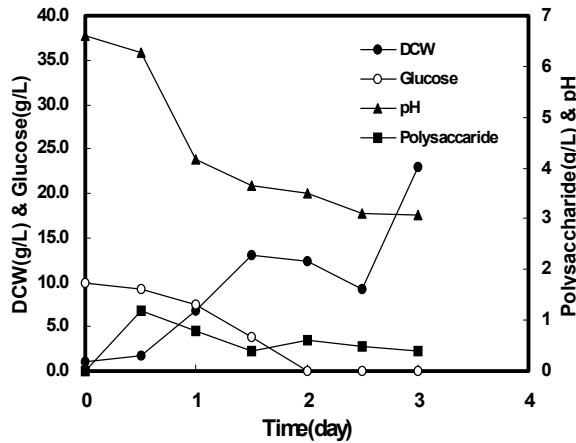


Fig. 67. Profiles of cell growth, pH, glucose and polysaccharide production under DO control (over 20%) with medium feeding by pH signal (feeding medium : 100 g/L glucose)

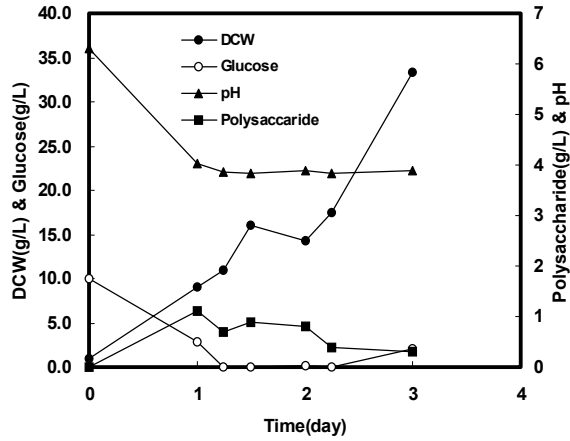


Fig. 68. Profiles of cell growth, pH, glucose and polysaccharide production under DO control (over 20%) with medium feeding by pH signal (feeding medium : 400 g/L glucose)

g/L로 지금까지 실험한 결과중 가장 좋았다. 또한 균체내의 다당체와 cordycepin

은 각각 10 mg/g cell 및 2.3 mg/g cell이 검출되었다. 유가배양의 결과 균체내 다당체의 specific productivity는 공급배지의 농도가 50 g/L일 때 32 mg/g cell로 가장 높았고 cordycepin의 specific productivity는 공급배지의 농도가 400 g/L일 때 2.3 mg/g cell로 가장 높게 나타났다. (Table 6)

Table 6. Comparison of cell growth, polysaccharide and cordycepin production obtained from various concentration of feeding medium in mycelium

Glucose concentration (g/L)	DCW (g/L)	Polysaccharide (mg/g cell)	Cordycepin (mg/g cell)
50	20.3	32	1
100	22.9	25.9	1.6
400	33.3	10	2.3

다. 생산성 극대화를 위한 생산공정 개발

1) Scale up

산업화에의 활용 가능성을 확인하기 위해 유가배양에서의 결과를 pilot plant scale에 응용하였다. 전배양조건은 50 L 생물반응기(KF-50L)에서 working volume 20 L, 200 rpm, 1 vvm 이었고 배양조건은 500 L 생물반응기(KF-500L)에서 working volume 250 L, 100~220 rpm, 1 vvm 이었으며 배지공급 방법은 Fig. 69에서와 같았다. Fig. 69은 본배양에 대한 결과이다. 그 결과 배양 2.5 일째의 균체량이 13.5 g/L로(wall growth 포함하지 않음) Fig. 68에서의 변화 양상과 비교해 보았을 때 scale-up에도 잘 적용되었다고 판단된다.

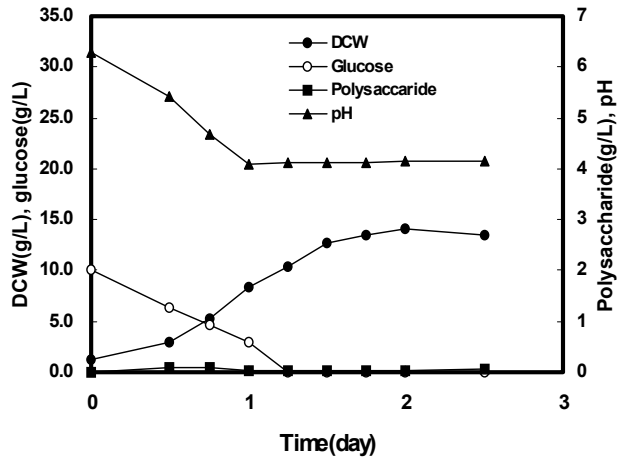


Fig. 69. Profiles of cell growth, pH, glucose and polysaccharide production under DO control (over 20%) with medium feeding by pH signal (feeding medium : 400 g/L glucose) at pilot plant scale(500 L)

2) 자실체 재배

본 연구에서 개발된 균사체가 자실체 재배시 고체배지에서 종균으로서 활성을 갖추는지에 대한 검토를 하였다. 냉동보관된 7 mL의 활성화된 stock cell solution을 500 mL 플라스크(working volume 200mL)에 접종하여 3 일간 전배양을 실시하였다. 전배양시의 배지성분은 ①변형배지(Table 3) ②황두분+glucose ③번데기+glucose 로 나누어 수행하였다. 3 일간 전배양을 실시한 후 약 15 mL 씩 본배양에 접종하였다. 자실체 생산을 위해서는 배양 온도의 변화가 필요하기 때문에 배양 초기에는 처음 25℃로 유지하다가 균사 활착 시기(약 8~10 일)에서 하루동안 18℃로 온도충격을 주고 이후 22℃로 배양하였다. Fig. 70~73은 본배양에서의 배양일수에 따른 성장변화에 대한 결과이다. ①-1은 온도충격을 주기 전(배양 8 일)까지는 암배양을 하다가 이후 빛이 있는 곳으로 옮겨 배양을 실시한 것이다. Fig. 70은 배양 8 일째에서의 결과를 나타내었다. 사진에서 볼 수 있듯이 ①의 경우에서 가장 많은 균사가 활착되었음을 알 수 있었다. Fig. 71은 배양 12 일째의 결과이며 ①-1의 경우가 가장 좋은 성장을 하고 있음을 관찰할 수 있었다. Fig. 72는 배양 20 일째의 결과로 자실체(자좌)가 형성되어 가는 모습을 나타내고 있다. 자실체가 형성되어 가는 과정에서 역시 ①-1이 가장 좋은 성장을 나타내고 있다. Fig. 73은 배양 33 일째 결과이다. ①과 ①-1의 경우에서 큰 차이 없이 좋은 자실체 성장을 보이고 있다. 따라서, 본 연구에서 개발된 배지 및 종균을 활용하여 기존 생산되고 있는 제품보다 우수한 자실체를 형성시킨 ①과 ①-1의 경우 상품화가 가능할 것으로 판단되었다. 결과적으로 자실체 재배를 위한 종균배양시 Table 3에서의 배지를 사용하였을 때 농가에서 흔히 사용하는 (황두분 + glucose) 또는 (번데기 + glucose)를 사용하였을 때 보다 더욱 좋은 결과를 얻었으며 일반적으로 농가에서의 재배 기간은 약 45 일이나 본 연구 결과에서는 35 일 이내에 수확하여 판매할 수 있을 정도의 성과를 얻을수 있었다. 이러한 성과는 종균배양시 변형배지 사용에 따른 결과로 균사의 활착시기가 단축되었기 때문이며 그 이유는 배지성분중의 yeast extract가 *Paecilomyces tenuipes*(눈꽃동충하초)의 성장에 많은 영향이 있었음을 알 수 있었다.

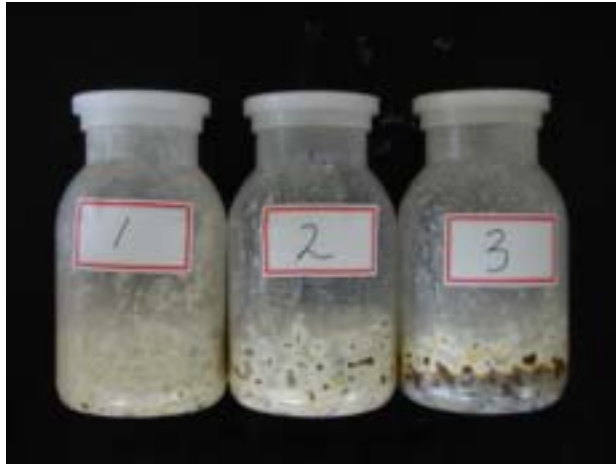


Fig. 70. Photographs of fruiting body at the 8th day after inoculation

- ※ Compositions of medium in seed culture
1. Medium in Table 3
 2. Glucose and yellow bean
 3. Glucose and pupa

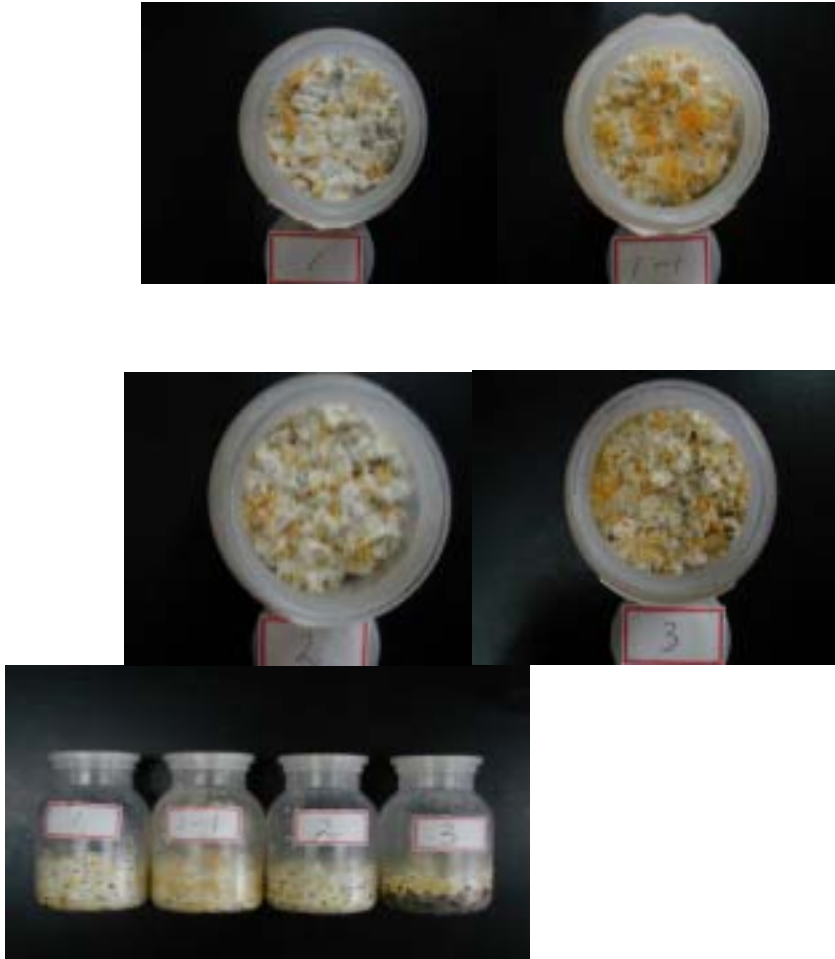


Fig. 71. Photographs of fruiting body at 12th day after inoculation

※ Compositions of medium in seed culture
1. Medium in Table 3

- 1-1. Same as the case of 1. with dark culture until heat shock
2. Glucose and yellow bean
3. Glucose and pupa

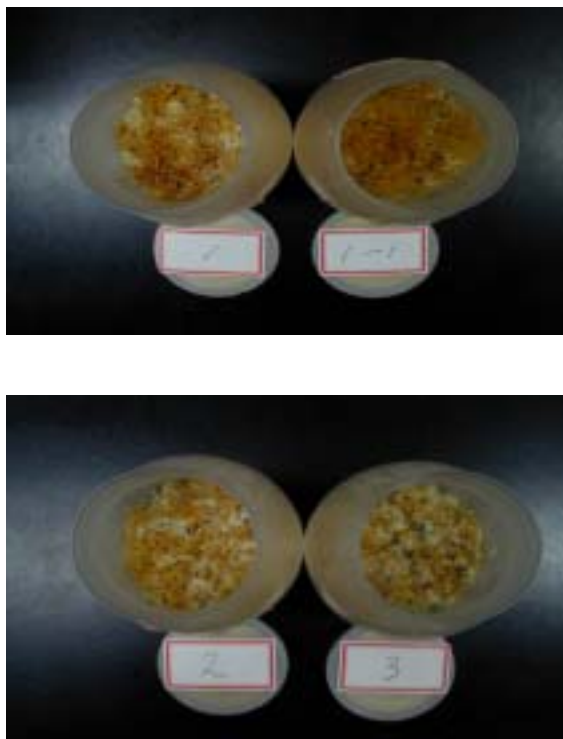


Fig. 72. Photographs of fruiting body at 20th day after inoculation

※ Compositions of medium in seed culture

1. Medium in Table 3

1-1. Same as the case of 1. with dark culture

- until heat shock
2. Glucose and yellow bean
 3. Glucose and pupa

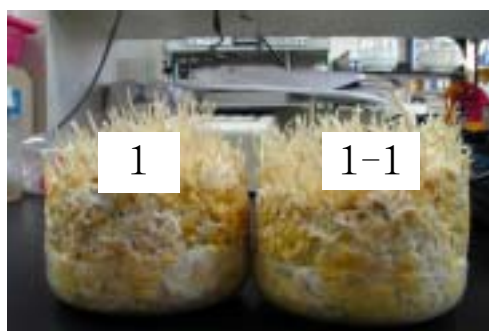


Fig. 73. Photographs of fruiting body at 33th day after inoculation

※ Compositions of medium in seed culture

1. Medium in Table 3

1-1. Same as the case of 1. with dark culture until heat shock

3) 액체배양의 경제성

본 연구에서 개발된 공정기술을 이용하여 액체배양을 수행할 경우의 경제성을 검토해 보았다. 액체배양시 제품화에 응용될 수 있는 산물은 군사체와 배양여액에 포함되어 있는 고형물 전체일 수 있다. 그러나 정확한 경제성을 산출하기 위해 산출근거에는 생산되는 군사체의 함량만을 고려하여 검토하였다. 본 연구에서 확보된 연구결과로서 군사체 생산량은 3 %이상이었으므로 최소 기준을 건조중량 30 g/L 또는 30 kg/ton으로 설정하였다.

항목	산출근거	비고
A. 생산규모 · 군사체 생산량 · 생산설비 규모 · 월 가동 회수 · 월 생산 규모	30 g/L or 30 kg/ton 5 ton 8 회 1.2 ton(40 ton)	working volume 배양일수 : 3 일 건조중량 기준(배양물 기준)
B. 생산단가산출	-30 만원/ton 배지 : 20 만원/ton 분리 및 농축 : 5 만원/ton 건조 : 3 만원/ton 주변시설 및 관리 : 2 만원/ton -건조중량 기준시(배양물 40 ton처리) 생산단가 : 1,200 만원/1.2 ton (1,000 만원/ton)	인건비 제외(ton : 배양물 기준) 식품 첨가물 기준 전기료 및 임대료 전기료 및 임대료 인건비 제외
C. 최종생산단가	10,000 원/kg	인건비 제외

<액체배양에 따른 소요경비산출>

표에서 알 수 있듯이 인건비 및 유통에 따른 제반 경비를 포함하더라도 공급가액이 최대 4 만원/kg 수준 이하로 낮출 수 있다. 반면에 일반적으로 유통되고 있는 자실체 건조물의 공급가액이 최소 10~30 만원/kg 이상인 것으로 판단되어 진다. 따라서 액체배양 기술을 활용하여 상업화할 경우 제품의 경쟁력 우위는 확실한 것으로 판단된다.

제 4절 결 론

본 연구에서는 *Paecilomyces tenuipes*를 이용한 액체배양을 통해 최적 균체성장과 다당체 및 코디세핀 생성 조건을 검토하였다. 균체량 및 다당체 생산을 위한 플라스크 배양에서의 최적 배양조건은 접종량을 2%로 하여 27°C, 200 rpm, 초기 pH 7이었고, 최적 배지조성은 glucose 30 g/L, yeast extract 20 g/L, KH₂PO₄ 0.5 g/L, CuCl₂ · 2H₂O 0.1 g/L이었다. 그 결과 균체량은 배양 4 일째 22 g/L, 다당체 생성은 배양 5 일째 2.3 g/L로 가장 높은 값을 나타내었다. 생물반응기를 이용한 회분배양에서 균체량 및 다당체 생성을 위한 최적의 교반속도와 통기량은 각각 400 rpm과 1.0 vvm이었다. 이 때 균체량과 다당체 생성량은 각각 배양 2 일째에 23.1 g/L, 배양 5 일째에 2.5 g/L이었다. 한편 pH를 7로 일정하게 조절하여 배양할 경우 균체량과 다당체 생성량은 각각 11 g/L 와 1.5 g/L로서 오히려 pH를 조절하지 않은 경우에 비해 상대적으로 매우 낮은 값을 나타내었다. 균체량과 다당체 생성을 증가시키기 위해 최적의 회분배양 조건에서 균체활성이 가장 좋은 배양 1.5 일째에 10 g/L의 glucose를 간헐적으로 첨가한 후 glucose의 농도가 다 소모되기전에 지속적으로 5 g/L의 glucose를 배양 3.5 일째 까지 첨가한 결과 균체량은 29.2 g/L, 다당체 생성량은 3.3 g/L를 나타내었다. 한편, 코디세핀 생산을 위한 플라스크 배양을 통해 glucose 10 g/L, yeast extract 20 g/L, (NH₂)₄HPO₄ 5 g/L, histidine 2 g/L, CaCO₃ 1 g/L로 배지성분을 변형시켰다. 이를 생물반응기에 적용함에 있어서 배양 1.5~2 일째부터 시작되는 심한 wall growth로 인해 배양의 어려움이 나타났다. 이를 해결하기 위해 wall growth 방지제로 PAA(polyacrylic acid)와 SA(sodium acrylate) 등을 첨가하였다. 그 결과 약간의 방지효과는 있었으나 근본적인 문제를 해결하지는 못하였다. 또한, 용존산소를 유지시키면서 배양한 결과에서도 wall growth에 의해 배양 2 일째 12.8 g/L의 균체량을 나타내었으나 이때 배양여액에서의 cordycepin 농도는 7.7 mg/L를 나타내었다. 회분배양을 통해 배양여액에서의 cordycepin은 glucose의 고갈이후 1~2 일 사이에만 검출됨을 알 수 있었다. 이러한 문제점들을 해결하기 위해 유가배양을 실시하였다. 짧은 배양기간으로 높은 균체량을 얻고 균체

내의 다당체와 cordycepin의 생산량을 높이려고 하였다. 배양방법으로는 복합배지성분을 사용하기 때문에 여러 가지의 매개변수 중 pH에 기준하여 기질을 공급하였는데 공급배지(glucose)의 농도를 50~400 g/L까지 변화를 주었다. 그 결과 균체내의 다당체 생성에 있어서는 50 g/L의 glucose를 공급하였을 때 32 mg/g cell이 측정되었으며, 그때의 균체량은 20.3 g/L이었다. 또한, 균체내의 cordycepin 생성에 있어서는 400 g/L의 glucose를 공급하였을 때 2.3 mg/g cell이 검출되었으며 그때의 균체량은 33.3 g/L이었다. 유가배양에서의 가장 좋은 결과를 토대로 scale up 에서의 적용 정도를 확인하기 위해 500 L 생물반응기를 이용해 실험을 실시하였다. 배양은 2.5 일까지 하였으며 5 L 생물반응기에서의 변화 양상과 비교해 보았을 때 scale up하였을 때에도 잘 적용되어졌다고 판단되었다. 한편, 자실체 재배를 위한 종균배양시 yeast extract를 사용한 경우 농가에서 사용하는 황두분 또는 번데기를 사용하였을 때보다 더 좋은 성장을 하였다. 또한, 자실체내의 cordycepin 함유량은 0.45 mg/g이었다. 따라서, 본 연구에서 개발한 균사체 및 배지조성은 자실체 재배를 위한 액체종균으로써 우수함을 확인하였다.

제 5절 참고 문헌

1. Sung, J.M., Kim, C.H., Yang, K.J., Lee, H.K., and Kim, Y.S. Studies on Distribution and Utilization of *Cordyceps militaris* and *C. nutants*, Kor. J. Mycol., 21: 94-105 (1993)
2. Sung, J.M., Lee, H.K., and Yang, K.J. Classification of *Cordyceps* spp. by Morphological Characteristics and Protein Banding Pattern, Kor. J. Mycol., 23: 92-104 (1995)
3. Tadashi, K., Hajime, T., and Shigeo, U. A minor, protein-containing galactomannan from a sodium carbonate extract of *Cordyceps sinensis* Carbohydrate Research., 156: 189-197 (1986)
4. Zengzhi. L., Chunru, L., Bo, H., and Lee, M.W. New variety of *Cordyceps gunnii* (Berk.) and its *paecilomyces* anamorph, Kor. J. Mycol., 27: 231-233 (1999)
5. Liang, Y.L., Liu, Y., and Yang, J.W. Studies on pharmacological activities of cultivated *Cordyceps sinensis*, Phytotherapy Research 11: 237-239 (1997)
6. Toshio, M., Naoko, O., and Haruki, Y. Studies on fungal polysaccharides. XX. Galactomannan of *Cordyceps sinensis*, Chem. Pharm. Bull, 25: 3324-3328 (1977)
7. Song, C.H., Jeon, Y.J., Yang, B.K., Ra, K.S., and Sung, J.M. The anti-complementary activity of exo-polymers produced from submerged mycelial cultures of higher fungi with particular reference to *Cordyceps militaris*, J. Microbiol. Biotechnol, 8: 536-539 (1998)
8. Cuningham, K.G., Hutchinson, S.A., Manson, W., and Spring, F.S. Cordycepin, a metabolic product from cultures of *Cordyceps militaris* (Linn.) Link. Part I. Isolation and characterization, J. Chem Soc, 2: 2299-2302 (1951)
9. Plagemann, F.G., and Erbe, J. Effect of 3'-deoxyadenosine (cordycepin) and 2'-deoxyadenosine on nucleoside transport, macromolecular synthesis,

- and replication of cultured Novikoff hepatoma cell, *Arch Biochem Biophys*, 144: 401-412 (1971)
10. Mathew, P.A., Ellis, L.K. and Studzinski, G.P. Enhanced messenger RNA stability and differentiation of HL 60 cells treated with 1,25-dihydroxy-vitamin D3 and cordycepin, *J. Cell Physiol*, 140: 212-218 (1989)
 11. Zieve, G.W., and Roemer E.J. Cordycepin rapidly collapses the intermediate filament networks into juxtannuclear caps in fibroblast and epidermal cells, *Exp. Cell. Res.*, 177: 19-26 (1988)
 12. Deitch, A.D., and Sawick, S.G. Effects of cordycepin on microtubules of cultured mammalian cells, *Exp. Cell. Res.*, 118: 1-13 (1979)
 13. Glazer, R.I., and Kuo, J.F. Inhibition effects of cordycepin on cyclic nucleotide-dependent and cyclic nucleotide-independent protein kinases, *Biochem Pharmacol*, 26: 1287-1290 (1977)
 14. Hubbell, H.R., Pequigno, E.C., Willis, D.H., Lee, C., and Suhadolnik, R.J. Differential antiproliferative actions of 2',5' oligo a trimer core and its cordycepin analogue on human tumor cells, *Int J. Cancer*, 36: 389-394 (1985)
 15. Noval-Fernandez, A., and Leroy, F. Inhibition of nucleic acid methylation by cordycepin, *J. Biol. Chem*, 255: 7380-7385 (1980)
 16. Donald, V.J., Kredich, N.M., and Guarino, A.J. Inhibition of ehrlich mouse ascites tumor growth by cordycepin, *Cancer Research*, 21: 216-220 (1961)
 17. Adamson, R.H., Zaharevitz, D.W., and Johes, D.G. Enhancement of biological activity of adenosine analogs by the adenosine deaminase inhibitor 2'-deoxycoformycin, *Pharmacol.*, 15: 2733-281 (1977)
 18. Carmelo, J.R., Dougherty, J.P., and Breslow, R. 3'-deoxy-2'-phosphoramidites of Adenosine and 5'-methyluridine used for the solid phase synthesis of unnatural 3'-deoxy-2'-5'-oligonucleotides,

- Tetrahedron Letters, 33: 4129-4123 (1992)
19. Roger, F.D. Cordycepin blocks recovery of non-heat-shock mRNA translation following heat shock in *Drosophila*, Eur. J. Biochem, 233: 784-792 (1995)
 20. Nanba, H., Hamaguchi, A., and Kuroda, H. The chemical structure of an antitumor polysaccharide in fruit bodies of *Grifola frondosa* (Maitake), Chem. Pharm. Bull., 35: 1162-1168 (1987)
 21. Ohmori, T., Wakaiki, A., Kawanishi, G., Tsuru, S., Yadomae, T., and Nomoto, K. Dissociation of a gulcan fraction (CO-1) from protein-bound polysaccharide of *Cordyceps ophioglossoides* and analysis of its antitumor effect, Chem. Pharm. Bull., 36: 4512-4518 (1998)
 22. Sato, K., Oikawa, S., Miyazaki, T., and Yadomae, T. Structural characterization and antitumor activity of the extracts from matted mycelium of cultured *Grifola frondosa*, Chem. Pharm. Bull., 33: 3395-3401 (1985)
 23. Cho, S.M., Lee, J.H., Han, S.B., Kim, H.M., Yu, S.H., and Yoo, I.D. Immuno-stimulating polysaccharides from the fruiting bodies of *Formitella fraxinea*, Kor. J. Mycol., 23: 332-339 (1995)
 24. Sone, Y., Okuda, R., Wada, N., Kishida, E., and Misaki, A. Structures and antitumor activities of the polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*, Agric. Biol. Chem., 49: 2641-2653 (1985)
 25. Lee, W.L., Kwon, H.Y., Park, J.S., Choi, S.Y., and Lee, K.S. Effect of *Cordyceps militaris* on the mutagenicity and DNA fragmentation of *E. coli*, J. Toxicol. Pub. Health, 15: 363-367 (1999)
 26. Yamada, H., Kawaguchi, N., Ohmori, T., Takeshita, Y., Taneya, S.I., and Miyazaki, T. Structure and antitumor activity of and alkali-soluble polysaccharides from *Cordyceps ophioglossoides*, Carbohydr. Res., 125: 107-115 (1984)

27. Gibbs, P.A., and Seviour, R.J. Influence of bioreactor design on exopolysaccharide production by *Aureobasidium pullulans*, Bio. Letters, 14: 491-494 (1992)
28. Thompson, B.G., and Walter, T.L Effect of dissolved oxygen on growth and production of exopolysaccharide by *Rhizobium trifolii*, J Ferment. Technol., 64: 335-338 (1986)
29. Shinichi. K., Tsutomu, H., Kaori, K., Kenichi, T., Chihiro, H., Wataru, I., Kengo, T., and Arnljot, E. An antitumor, branched (1→3)-β-D-glucan from a water extract of fruiting bodies of *Cryptoporus volvatus*, Carbohydr. Res., 263: 111-121 (1994)
30. Chihiro, Hara. A branched (1→3)-β-D-glucan from a water extract of *Dictyophora indusiata* fisch, Carbohydr. Res., 145: 237-246 (1986)
31. Ana, Gutierrez., Prieto, A., and Martinez, T. Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*, Carbohydr. Res., 281: 143-154 (1996)
32. Stasinopoulos, S.J., and Seviour, R.J. Exopolysaccharide production by *Acremonium persicinum* in stirred-tank and air-lift fermentors, Appl. Micorbiol Biotechnol, 36: 465-468 (1992)
33. Stasinopoulos, S.J., and Seviour, R.J. Exopolysaccharide formation by isolates of *Cephalosporium* and *Acremonium* , Mycol. Res, 92: 55-60 (1989)
34. Terry, L. B. and Sarko, A. The triple helical structure of lentinan a linear β-(1→3)-D-glucan, CAN. J. Chem, 55, 293-299 (1977)
35. Itaru, N., Kazutsugu, K., Takashi, S., Michio, I., Isao, B., Takeshi, S., and Tokuya, H. Demonstration of curdlan-type polysaccharide and some other β-1,3-glucan in microorganism with aniline blue, J. Gen. Appl. Microbiol., 22: 1-11 (1976)
36. Kim, K., Lee, S.R., Shon, J.W., and Ji, H.S. Effect of glucose feeding

- strategy on biomass of *Serratia marcescens* in high density fed-batch fermentation, Kor. J. Biotechnol. Bioeng., 13: 681-686 (1998)
37. Norio, S., Fukuzono, S., Fujimori, K., Nishimura, N., and Odawara, Y. Fed-batch cultures of recombinant *Escherichia coli* with inhibitory substance concentration monitoring, J. Ferment. Technol., 66: 187-191 (1988)
38. Ran, U., Gura, E., Olszewski, E., and Wagner, F. Enhanced glucan formation of filamentous fungi by effective mixing, oxygen limitation and fed-batch processing, J. Industrial Microbiology , 9: 19-25 (1992)
39. Dane, W. Zabriskie, Dave, A. Wareheim, and Michael, J. Polansky, Effects of fermentation feeding strategies prior to induction of expression of a recombinant malaria antigen in *Echerichia coli*, J. Industrial Microbiology, 2: 87-95 (1987)
40. Choi, J.W., Ryu, D.Y., Kim, Y.K., Hong, E.G., Kwun, M.S., and Han, J.S. Extraction and purification of bioactive materials from *Agaricus blazei* fruiting bodies, Kor. J. Biotech., 15: 293-298 (2000)
41. Chun, G.T., Park, S.K., Kwon, H.K., Jeong, Y.H., Jeong, Y.S., Chang, Y.K., and Lee, Y.H. Studies of cyclosporin A biosynthesis under conditions of limited dissolved oxygen or carbon source in fed-batch culture, Kor. J. Biotechnol. Bioeng., 13: 203-208 (1998)
42. Denis, Rho, Mulchandani, A., and LeDuy, A. Oxygen requirement in pullulan fermentation, Appl. Microbiol. Biotechnol. 28: 361-366 (1988)

제3장 *Cordyceps militaris*의 대량생산기술의 개발과 효능연구

제1절 *C. militaris*의 최적배양 조건

1. 서 론

동충하초는 겨울에는 벌레상태로 있다가 여름이 되면 버섯이 된다는 뜻에서 나온 말인데, 실제로는 토양 등에 존재하고 있는 곰팡이류인 동충하초균의 포자가 온도, 습도가 높아지는 시기에 살아있는 곤충의 호흡기나 소화기, 관절 등을 통하여 몸속으로 들어가 영양분을 섭취하며 발육증식을 하다가 기주(숙주)곤충이 죽으면, 얼마 후 버섯모양의 자실체를 곤충의 표피에 형성하여 자손을 퍼트리는 생활사를 가지고 있다¹⁾. 따라서 동충하초는 일종의 곤충 기생성 약용(식용)버섯류이며, 자낭균류 맥각균목 동충하초과에 속한다²⁾. 최근 연구에서는 항암, 면역증강, 만성피로, 노화방지 등에 탁월한 효능이 있는 것으로 밝혀지고 있으며³⁾, 일본에서는 폐병이나 늑막염의 특효약으로 판매되고 있다. 동충하초가 관심을 끄는 이유는 무공해 농약이나 항암제 또는 건강보조식품으로 개발가능성이 높기 때문이며, 국내에서도 농촌진흥청과 서울대 천연물과학연구소 공동으로 약리효과를 검색한 결과 항암작용과 면역증강, 항피로작용 등이 탁월한 것으로 밝혀졌다. 동충하초는 의약품으로서 뿐만 아니라 건강보조식품으로서도 중요성이 인식되어 현재 각종 분말이나 액체 형태의 제품이

시판되고 있다. 또한 동충하초가 자연생태계에서 곤충의 밀도를 조절하는 것을 이용해 무공해 미생물 농약에 대한 연구도 활발하다^{4,5,6,7)}. 이러한 천연 생물 농약의 개발은 그 해충의 천적이 되는 미생물이 해충의 방제는 물론이고 화학 농약에 의해 발생하는 환경오염문제 까지도 해결할 수 있기 때문에 큰 관심을 끌고 있다.

따라서 활성이 높은 우수균주를 개발하여 생산성 향상을 도모하기 위하여 본 연구에서는 *Cordyceps militaris* ATCC 26846 공시균주를 이용하여 생육 기간의 단축을 위한 배양조건의 확립과, 다양한 배지를 사용한 액체종균의 최적배지 개발, 종균의 증식과 산소공급 조건 및 대량증식을 위한 조건과 동충하초 배양사의 성장조건(광, 온도, 영양, 가스, 수분조건 등)을 확립하였다.

2. 재료 및 방법

가. 공시균주 : *Cordyceps militaris* ATCC(R) 26848

나. 배지의 조제

1) 보관 및 종배양용 배지

보관 및 종배양용 배지로는 PDA (Difco) 배지를 pH 6.5로 조정 하였다.

2) 액체 배양용 기본배지

액체 배양용 기본배지인 SDAY배지의 조성은 Table 1과 같고, 균사체 생산 기본배지는 SDAY 배지 50 ml 씩 삼각플라스크에 분주하고 멸균한 후 25℃, 110 rpm으로 진탕배양 하였다. 접종원은 SDAY배지에서 생장시킨 균을 무균적으로 균질화하고 1 ml 씩 접종하였다. 각종 배지에서 증식한 균은 평량된 정량용 여지로 여과하고 105℃ 건조법으로 균체량을 측정하였다.

가) 탄소원

Table 1의 배지에 일반적으로 버섯균이 잘 이용하는 각종 탄소원을 1% 씩 가하여 당류 비교실험을 행하였고, 배지의 pH는 pH 비교실험을 제외하고는 모두 pH 6.5로 조정하였다.

나) 질소원

(가)의 배지에서 질소원을 peptone 대신에 각종 질소원을 0.028%되게 조제하였다. 단 질소원 중 균사체 생산이 양호한 peptone의 농도를 0~0.5% 되게 가하여 농도 비교실험을 행하였다.

다) KH_2PO_4

(나)의 배지에 KH_2PO_4 를 0~0.5%의 농도로 가하여 조제하였다.

라) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

(다)의 배지에 KH_2PO_4 의 농도를 0.2%로 조정 한 후 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도를 0~0.05%로 조정하였다.

마) 기타 각종 무기염류

(라)의 배지에서 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도를 0.02%로 조정 한 후 CaCl_2 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 의 농도를 Fig. 8과 같이 조정하였다.

바) Vitamin

(마)의 배지에서 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도를 0.02%로 조정 한 후 기본배지의 thiamine-HCl 대신에 일반적으로 버섯균의 생육을 촉진시키는 것으로 보고된 vitamin들⁸⁾인 ascorbic acid, biotin, folic acid, nicotinic acid, Ca-pantothenate 및 thiamine-HCl을 Fig. 9과 같은 농도로 조제하였다.

사) 유기물질

Malt extract, soybean extract, yeast extract, 번데기 가루 등이 균사체

생산에 미치는 영향을 검토하기 위하여 (바)의 배지에 1.0%되게 가하여 조제하였다.

다. 배양 방법

보존균주를 종배양용 배지 50 ml에 직경 0.5 cm의 균편 3 개씩을 접종하여 25℃에서 7 일간 shaking incubator에서 종배양한 후 500 ml 삼각 flask에 배양액을 200 ml 씩 넣어 1.2 kg/cm² 압력에서 15 분간 살균한 배지에 배양물을 Omni mixer로 2 분간 무균적으로 마쇄한 균사 현탁액 5 ml 씩 접종하여 온도와 배양 기간 비교실험을 제외하고는 25℃에서 5 일간 배양하였다.

라. 균사체의 정량

5 일간 액체 진탕배양한 배양물을 Buchner funnel에서 평량한 정량용 여과지로 여과하고 증류수로 수회 세척한 다음 80℃에서 12 시간 건조 평량하였으며 모든 실험은 5 반복 이상으로 하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 균사체의 생산

동충하초균의 균사체 생산량을 검토하기 위하여 배양조건과 기본배지의 조성을 달리하여 균사체 생산을 위한 배양조건과 각종 영양원의 효과를 검토하였다.

1) 배양 기간의 영향

기본 배지상에서 배양 기간에 따른 균사체 생산 과정을 검토한 결과는 Fig. 1과 같다. Fig. 1에서와 같이 Table 1의 기본배지 상에서 배양한 동충하초 균사체는 배양 기간이 경과함에 따라 균사체 생산도 점진적으로 증가하여 배양 9 일 까지는 현저히 증가하였으나 그 이후는 비교적 완만한 증가를 나타내어 경제성 면에서는 10 일 전후의 배양기간이 효율적임을 알 수 있었다.

2) 배양 온도의 영향

15~35℃에서 배양 온도를 달리하여 배양 5 일에 온도가 균사체 생산에 미치는 영향을 검토해 본 결과는 Fig. 2와 같다.

Fig. 2에서와 같이 배양 온도를 상승시킴에 따라 균사 생육도 증가하여 25℃에서 가장 생산량이 많았고 그 이상의 온도에서는 급격한 감소 추세를 보여 25℃ 배양이 가장 우수하였다.

3) 배지 pH의 영향

배지를 pH 3.0~8.0으로 달리하여 *C. militaris*의 균사체 생산에 미치는 영향을 검토한 결과는 Table 2와 같다. Table 2에서와 같이 각종 배양 pH에 따른 균사생육은 pH 6.5~7.5의 범위에서 비교적 양호하였고, pH 7.0에서 가장 높은 생산량을 보였다. 그러나 7.5 이상의 pH에서는 균사체 생산량이 심한 감소추세를 나타냈다.

4) 탄소원의 영향

각종 탄소원이 *C. militaris*의 균사체 생산에 미치는 영향을 검토하기 위하여 기본배지의 glucose 대신에 각종 당류를 동일 농도로 첨가하여 그 영향을 비교 검토해 본 결과는 Fig. 3과 같다.

Fig. 3에서와 같이 기본배지의 glucose를 탄소원으로 첨가했을 때보다 담자 균류가 잘 이용하는 각종 당류를 탄소원으로 첨가했을 때 cellulose와 sorbitol구를 제외하고는 균사체 생산에 효과를 보였다.

그 중에서도 fructose, soluble starch, mannose, maltose, glucose, mannitol 등이 균사체 생산에 상당한 효과를 나타내었고, 이들 탄소원 중 균사체 생산에 가장 우수한 탄소원은 mannitol 이었다.

5) 질소원의 영향

가) 각종 질소원의 영향

각종 질소원이 *C. militaris*의 균사체 생산에 미치는 영향을 검토하기 위하여 각종 질소원을 질소량으로 0.028%되게 조정하여 그 첨가 효과를 검토한 결과는 Fig. 4와 같다.

Fig. 4에서와 같이 균사체 생산에는 무기태 질소원에 비하여 유기태 질소원에서 우수한 경향을 나타내었는데 유기태 질소원에서는 peptone, proteose peptone, tryptone 등이 양호하였고, 이 중 proteose-peptone이 질소원 중 가장 우수하였다.

무기태 질소원에서는 ammonium phosphate, ammonium sulfate, ammonium tartrate, ammonium nitrate 등과 같은 ammonia 태 질소원은 비록 균체 생산에는 효과가 미약하였다. Ammonium tartrate는 담자균류들이 무기 질소원 중에서는 비교적 잘 이용¹⁴⁾하는 것으로 알려져 있다. 반면에 무기 질소원 중 potassium nitrate, sodium nitrate, sodium nitrite 등의 무기태 질소원은 균사 생육에 저해적인 것으로 나타났다.

나) Proteose peptone 농도의 영향

질소원 중 균사체 생산에 가장 우수하였던 proteose peptone의 농도를 0~0.5%로 달리 조정하여 효소생산에 미치는 영향을 검토한 결과는 Fig. 5와 같다. Fig. 5에서와 같이 0.3%의 proteose peptone 농도에서 균사체 생산이 가장 우수하였는데 proteose peptone의 농도가 증가함에 따라 0.3%까지 급격히 증가하였으나 0.4% 이상에서는 비교적 완만한 감소 추세로 나타났다.

6) KH_2PO_4 농도의 영향

배지 중의 KH_2PO_4 의 농도를 0~0.5%로 달리하여 균사체 생산에 미치는 영향을 검토한 결과는 Fig. 6과 같다.

Fig. 6에서와 같이 KH_2PO_4 의 농도가 증가함에 따라 0.2~0.3%의 범위에서 양호하였는데 이중에서도 0.2%의 농도가 제일 우수하였다.

7) MgSO_4 농도의 영향

MgSO₄·7H₂O 농도를 0~0.05%로 달리하여 균사체 생산에 미치는 영향을 검토한 결과는 Fig. 7와 같다.

Fig. 7에서와 같이 균사체 생산은 0.01% 보다 0.02%에서 약간 우수한 경향을 보였으며, 그 이상의 농도에서는 거의 차이를 나타내지 않았다. 따라서 0.02%의 MgSO₄·7H₂O 첨가가 균사체 생산에는 대체적으로 적당하였다.

8) 기타 무기염류의 영향

기타 각종 무기염류가 균사체 생산에 미치는 영향을 검토한 결과는 Fig. 8과 같다.

Fig. 8에서와 같이 각종 미량원소들의 첨가는 균사체 생산에 촉진 효과를 나타내지 않았다. 이는 유기물로써 첨가되고 있는 yeast extract에 함유되어 있는 미량원소들만으로도 충분한 것으로 생각된다.

9) Vitamin의 영향

각종 vitamin이 균사체 생산에 미치는 영향을 검토하기 위하여 일반적으로 버섯의 생육 및 효소 생산에 영향을 주는 vitamin으로 보고된⁸⁾ ascorbic acid, biotin, folic acid, nicotinic acid, Ca-pantothenate, thiamine-HCl 등의 첨가효과를 검토한 결과는 Fig. 9과 같다.

Fig. 9에서와 같이 각종 vitamin 중 ascorbic acid와 thiamin 첨가구에서 무첨가구에 비하여 균사체 생산에 다소 양호한 촉진효과를 나타내었다. 첨가된 각종 vitamin 중 균사체 생산에는 ascorbic acid 250 mg/ℓ, thiamine-HCl 0.1 mg/ℓ에서 양호하였다. 전체적으로는 thiamine-HCl 0.1 mg/ℓ 첨가가 균사체 생산에 가장 효과적이었다.

10) 기타 유기물질의 영향

기타 유기물질로서 일반 미생물의 생육 및 효소생산에 촉진효과가 있는 malt extract, 대두분, yeast extract, 번데기 가루, 마가루를 1% 되게 첨가하여 그 영향을 검토한 결과는 Fig. 10과 같다. Fig. 10에서와 같이 각종 천연

유기물의 첨가는 *C. militaris*의 생육에는 어느 정도 기여하고 있다. 그러나 천연물 1% 첨가구 중 malt extract, 대두분과 yeast extract 첨가구에서 우수하였는데 대두분이나 마가루의 경우 수확된 균사체 중에는 약간의 미분해된 유기물도 포함되어 있을 것으로 생각되기 때문에 천연 유기물 중에는 yeast extract가 가장 적당할 것으로 사료된다.

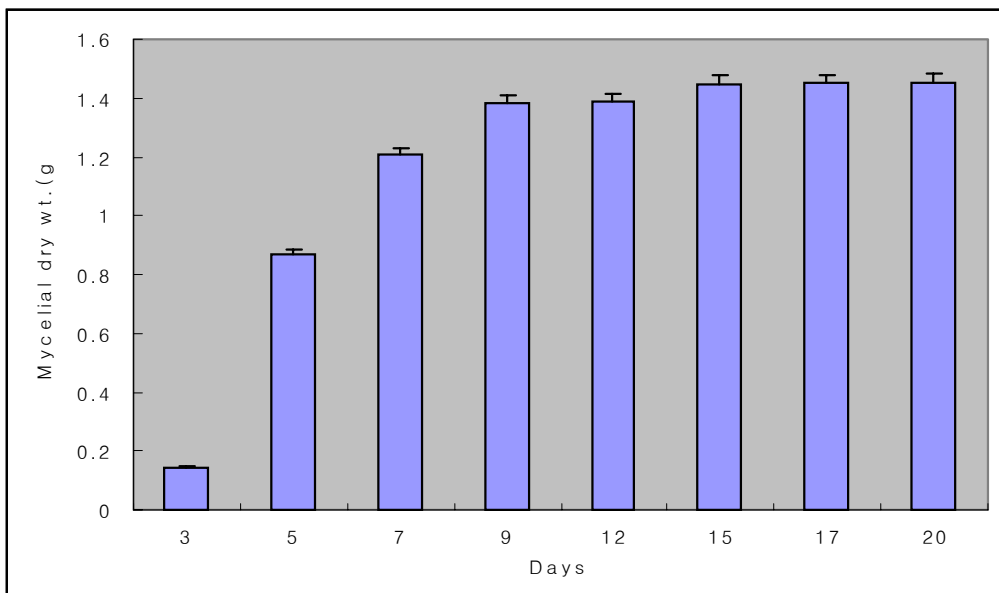
이상과 같이 기본배지의 각종 영양원의 종류와 농도를 개선하여 Table 3과 같은 최적 균체생산을 위한 영양 조건을 확립하였으며, 개선 결과 기본배지의 균사체 생산량인 27.72 g/l 보다 약 11% 증가한 30.8 g/l의 균사체를 얻었다.

4. *C. militaris* 대량배양사의 최적조건

*C. militaris*는 ATCC 26848를 다양한 배지를 조제하여 균을 액체배양하였으며, 배양조건은 Table 4. 사용한 배지의 조성은 Table 5와 같다. 균사의 생장조건은 약 23°C ~ 25°C이며, 120 rpm에서 3 일에서 5 일 진탕배양하여 충분한 균사의 성장을 얻었다. 액체배양을 할 때에는 삼각플라스크에 1/10 정도의 배지를 넣고 성장한 균사를 멸균한 번데기 및, 여러 가지의 영양공급원을 첨가하고 약 5 ml당 100 g을 번데기를 넣어 주었다. 그 후, 5 일이 지나면 균사가 번데기에 활착되고(Fig. 11A) 다시 5일이 지나면 하얗게 퍼진 균사가 약간 주황색을 띠게 되며 이때부터 균사의 영양생장은 멈추고 생식생장을 하게 된다. 생식생장의 조건으로는 온도는 약 18°C ~ 20°C, 습도는 약 95%, 빛은 약 200 Lux 정도이다. 약 20 일이 지나면 번데기에 표면에 주황색의 자실체(Fig. 11A)가 형성되며, 서서히 자실체의 형태가 올라온다(Fig. 11B). 일반적으로 창형의 자실체를 관찰하였으며 대량생산을 위한 더욱더 다양한 배지와 조건(Table 5)을 이용하여 대량생산 할 수 있다.

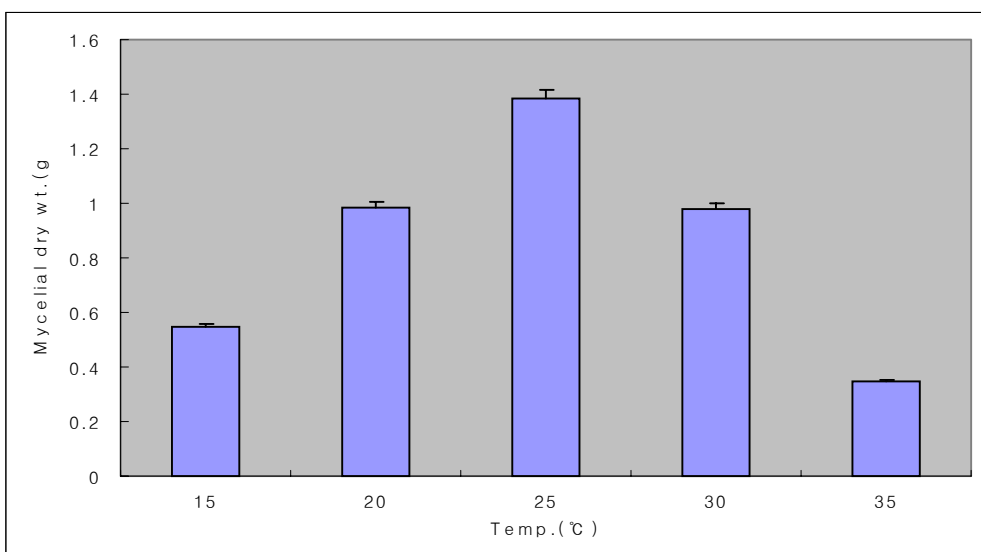
Table 1. Composition of the basal medium

Glucose	40g
Peptone	10g
Yeast extract	10g
Distilled water	1000ml
pH 6.5	



Days	Mycelial dry wt. (g/50ml)
3	0.145
5	0.868
7	1.207
9	1.381
12	1.386
15	1.448
17	1.450
20	1.452

Fig. 1. Influence of cultural periods on the mycelial production from *C. militaris*.

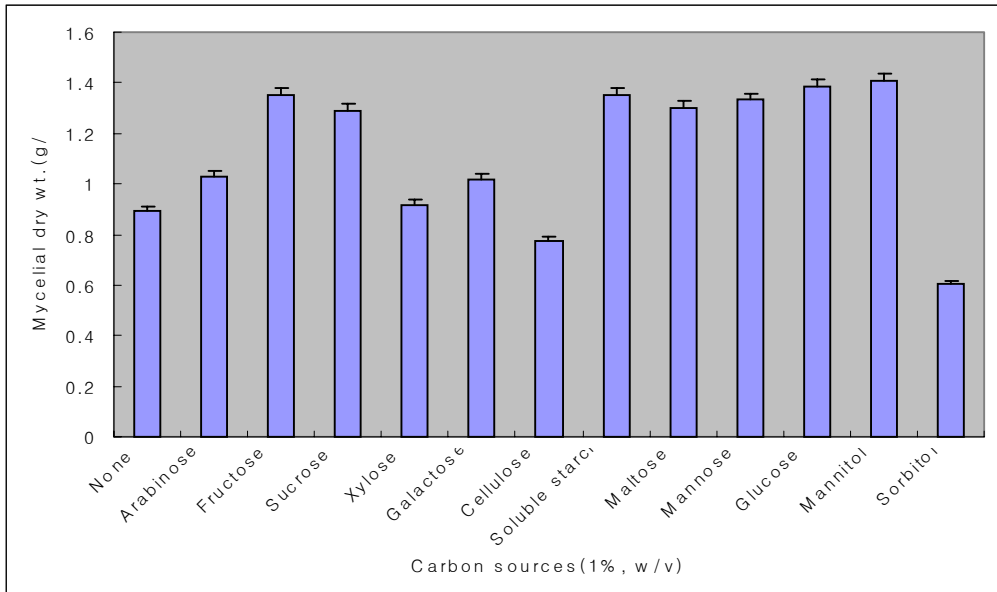


Temp. (°C)	Mycelial dry wt.(g/50ml)
15	0.545
20	0.986
25	1.386
30	0.978
35	0.345

Fig. 2. Influence of cultural temperature on the mycelial production from *C. militaris*.

Table 2. Influence of pH on the mycelial production from *C. militaris*.

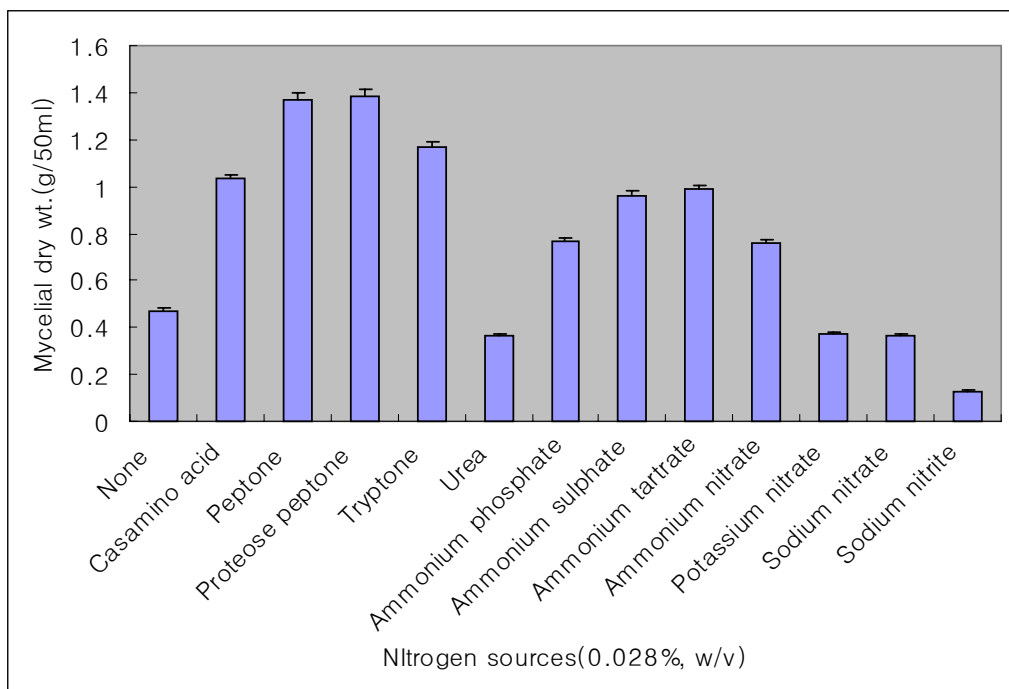
pH	Final pH	Mycelial dry wt.(g/50ml)
3.0	4.2	0.145
4.0	5.6	0.268
4.5	5.7	0.407
5.0	5.7	0.778
6.0	5.9	1.145
6.5	6.1	1.386
7.0	6.5	1.380
7.5	6.6	0.910
8.0	6.7	0.489



Carbon sources (1 %, w/v)	Mycelial dry wt. (g/50 ml)
None	0.892
Arabinose	1.031
Fructose	1.350
Sucrose	1.289
Xylose	0.918
Galactose	1.020
Cellulose	0.776
Soluble starch	1.352
Maltose	1.302
Mannose	1.332
Glucose	1.386
Mannitol	1.406
Sorbitol	0.605

Fig. 3. Effect of different carbon sources on the mycelial production from *C.*

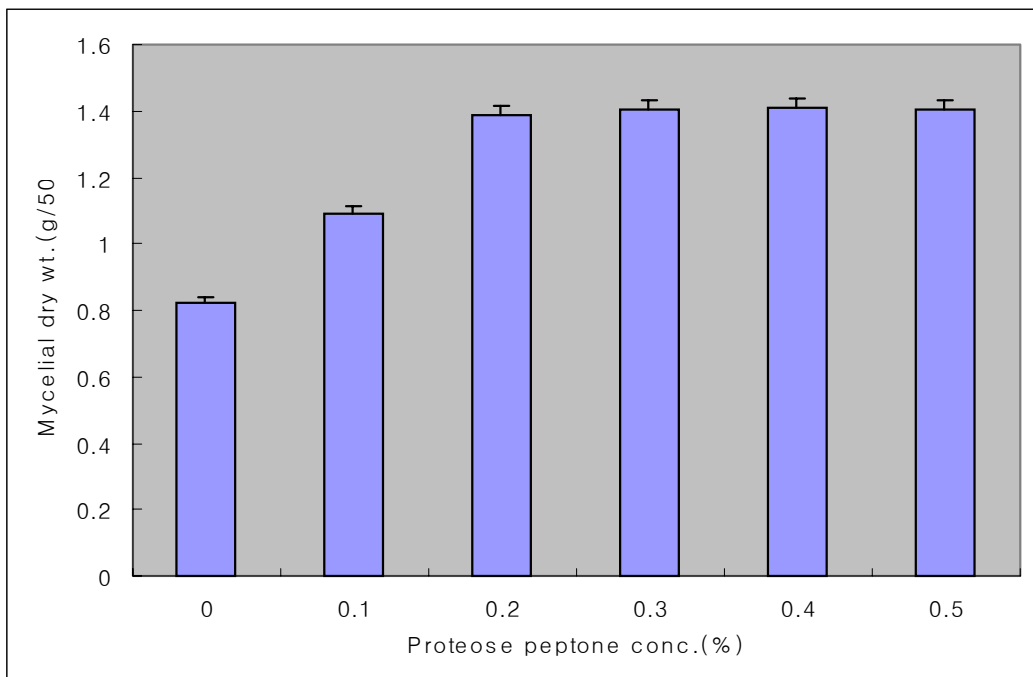
militaris.



Nitrogen sources (0.028 %, w/v)	Mycelial dry wt. (g/50 ml)
None	0.471
Casamino acid	1.032
Peptone	1.370
Proteose peptone	1.386
Tryptone	1.169
Urea	0.367
Ammonium phosphate	0.764
Ammonium sulphate	0.960
Ammonium tartrate	0.987
Ammonium nitrate	0.762
Potassium nitrate	0.372
Sodium nitrate	0.364
Sodium nitrite	0.128

Fig 4. Effect of different nitrogen sources on the mycelial production from *C.*

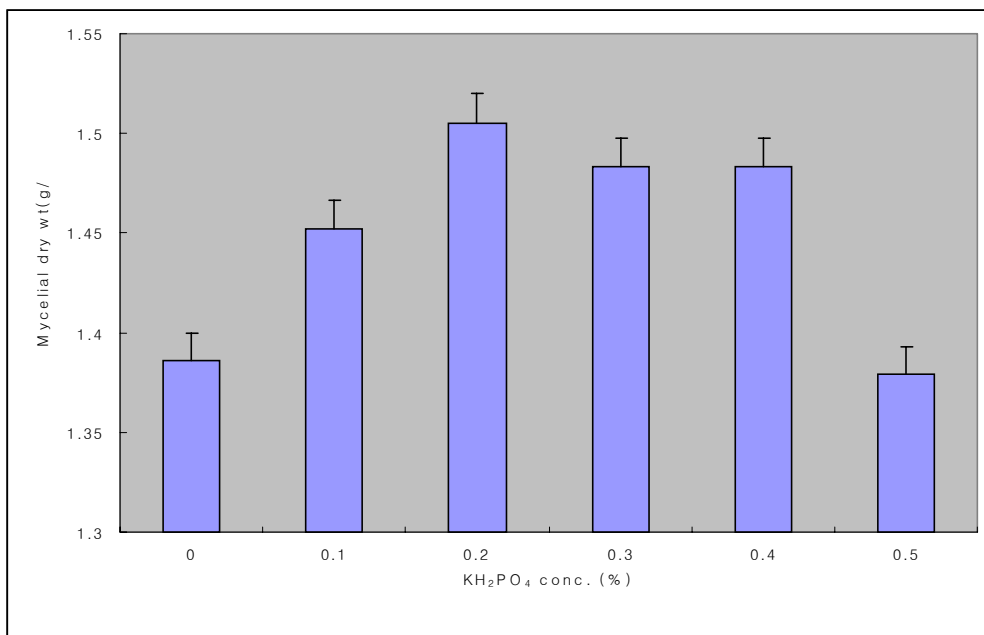
militaris.



Proteose peptone conc. (%)	Mycelial dry wt. (g/50 ml)
0	0.825
0.1	1.091
0.2	1.386
0.3	1.404
0.4	1.408
0.5	1.402

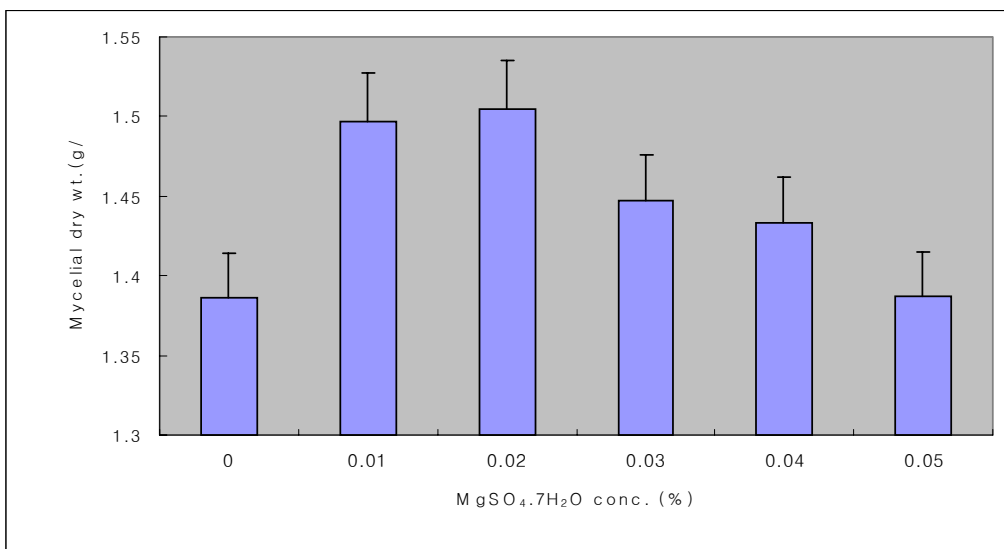
Fig. 5. Effect of proteose peptone concentration on the mycelial production

from *C. militaris*.



KH_2PO_4 conc. (%)	Mycelial dry wt. (g/50 ml)
0	1.386
0.1	1.452
0.2	1.505
0.3	1.483
0.4	1.433
0.5	1.379

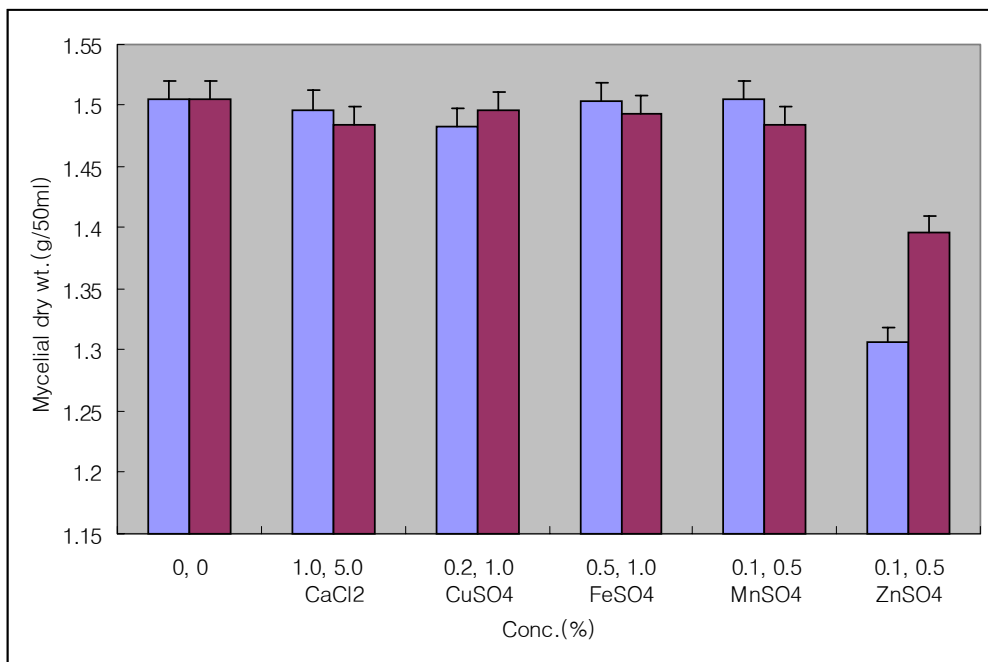
Fig. 6. Effect of KH_2PO_4 concentration on the mycelial production from *C. militaris*.



$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ conc. (%)	Mycelial dry wt. (g/50 ml)
0	1.386
0.01	1.497
0.02	1.505
0.03	1.447
0.04	1.433
0.05	1.387

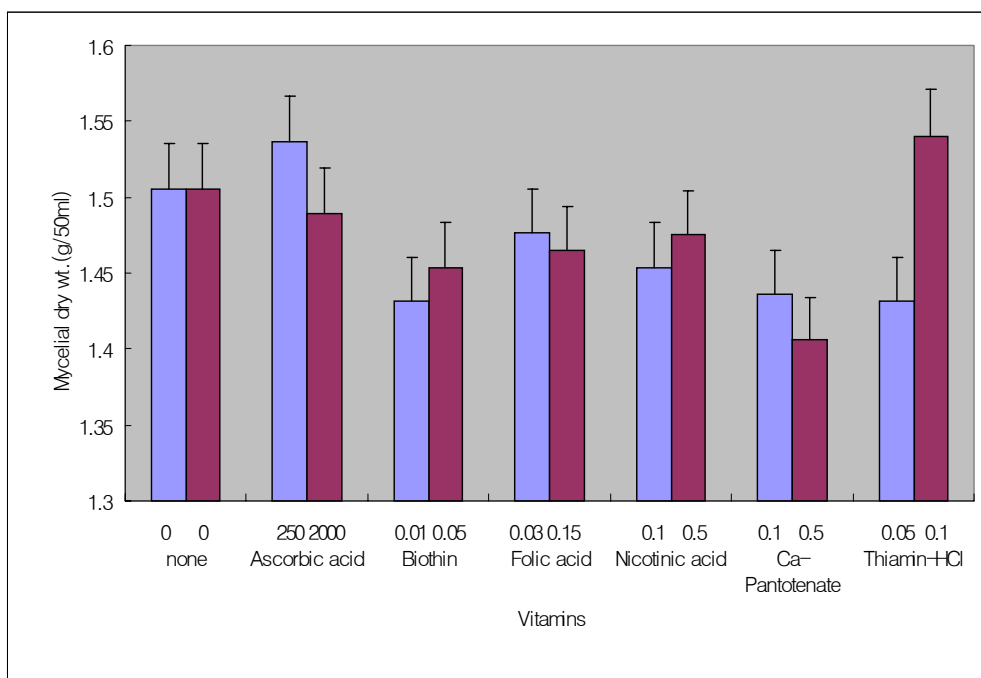
Fig. 7. Effect of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ concentration on the mycelial production from

C. militaris.



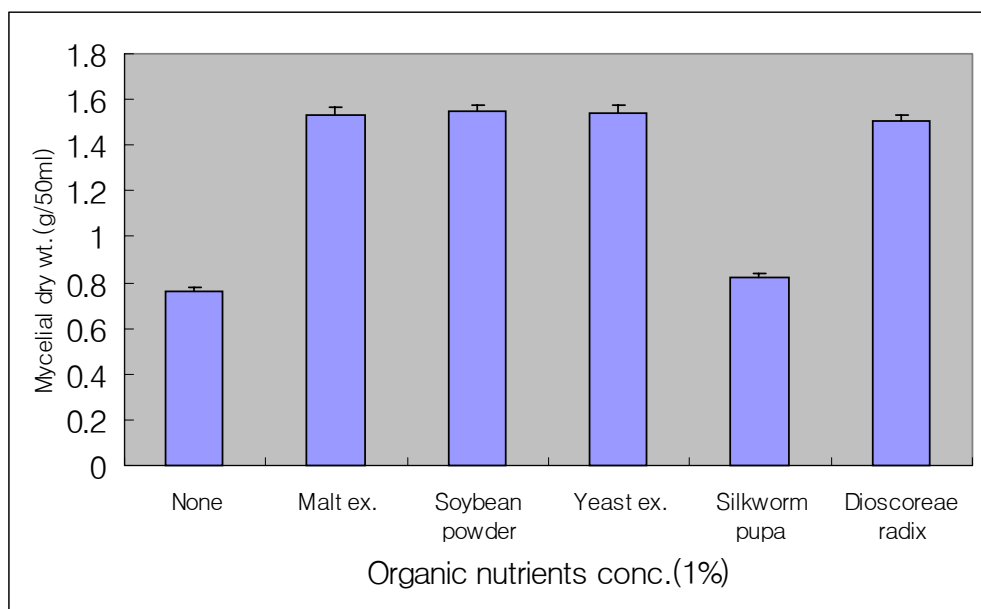
Mineral salts	Conc. (%)	Mycelial dry wt. (g/50 ml)
None	0	1.505
CaCl ₂	1.0	1.497
	5.0	1.484
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.2	1.483
	1.0	1.496
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.5	1.503
	1.0	1.494
MnSO ₄ .4H ₂ O	0.1	1.505
	0.5	1.485
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.1	1.306
	0.5	1.396

Fig. 8. Effect of mineral salts on the mycelial production from *C. millitaris*.



Vitamins	Conc. (mg/ℓ)	Mycelial dry wt.(g/50 ml)
None	0	1.505
	250	1.536
Ascorbic acid	1000	1.489
	0.01	1.432
Biotin	0.05	1.454
	0.03	1.476
Folic acid	0.15	1.465
	0.1	1.454
Nicotinic acid	0.5	1.475
	0.1	1.436
Ca-Pantothenate	0.5	1.406
	0.05	1.432
thiamine.HCl	0.1	1.540

Fig. 9. Effect of vitamins on the mycelial production from *C. militaris*.



Organic nutrients	Conc. (%)	Mycelial dry wt. (g/50 ml)
None	0	0.760
Malt extract	1	1.532
Soybean powder	1	1.547
Yeast extract	1	1.540
Silkworm pupa	1	0.825
Dioscoreae radix	1	1.504

Fig. 10. Effect of organic nutrients on the mycelial production from *C. militaris*.

Table 3. The composition of optimal medium for the mycelial production from *C. militaris*.

Mannitol	10 g
Yeast extract	10 g
Proteose peptone	3 g
KH ₂ PO ₄	2 g
MgSO ₄	0.2 g
thiamine.HCl	100 µg
Distilled water	1000 ml
pH	7.0

Table 4. Conditions for *C. militaris* culture

Characterization	Lepidopteran insects Entomopathogenic fungi
Optimal temperature	Hyphal formation : 23-25°C Fruiting body formation :18-20°C
Humidity	Hyphal formation: 75 % Fruiting body formation : 90-95 %
Airation	5-6 times/ day
Optimal pH	Hyphal formation : pH 6.8- 6.9
Light	200-500 Lux

Table 5. The composition of optimal medium for the mycelial production from *C. millitaris*.

Potato Dextrose Agar and Yeast Medium(1 L) (PDA and Yeast Medium),(ATCC Medium 104) Composition per liter	
Potato, infusion from-----	200.0 g
Glucose-----	20.0 g
Agar-----	15.0 g
KH ₂ PO ₄ -----	2.0 g
Yeast extract -----	1.5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O -----	0.5 g
SDAY Liquid medium	
Dextrose-----	40 g
Peptone-----	10 g
Yeast extract-----	10 g
SDAY solid medium	
Dextrose-----	40 g
Peptone-----	10 g
Yeast extract-----	10 g
Bacto-Agar-----	1.5%
YPD liquid medium	
Yeast-----	10 g
Peptone-----	10 g
Dextrose-----	40 g
YPD solid medium	
Yeast-----	10 g
Peptone-----	10 g
Dextrose-----	40 g
Bacto-Agar-----	1.5%

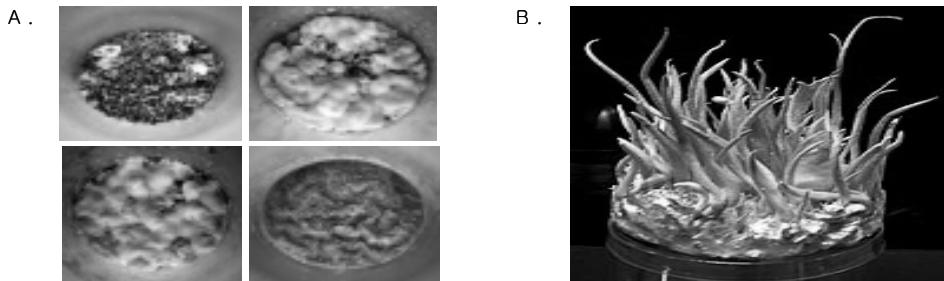


Fig. 11. *C. militaris* are formed on the hypha which is produced in culture media(A). A mass formation of the *C. militaris* fruiting bodies (B)

4. 적 요

합성배지상에서 *C. militaris*으로부터 균사체 생산을 위한 배양조건과 각종 영양원의 효과를 검토한 결과는 다음과 같다.

C. militaris 균사체는 생산을 위한 배양조건은 배양기간 10 일, 배양온도 25 °C, pH 7.0에서 가장 높은 생산량을 보였으며, 탄소원 중 균사체 생산에 우수한 것은 mannitol이었다. 질소원 중에서는 유기태 질소원인 proteose-peptone 이 가장 우수하였으며, 무기 질소원 중에서는 ammonium sulfate, urea 등도 이용할 수 있었다. 그러나 아질산태 질소원은 균사 생육에 저해적이었다. 질소원 중 가장 우수한 proteose-peptone의 적정 농도는 0.3%이었다. 무기염류 중 KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 적정 농도는 각각 0.2%, 0.02%이었다. 첨가된 각종 vitamin 중 균사체 생산에 양호한 것으로는 thiamine-HCl이었으며, 적정 농도는 0.1 mg/ℓ 이었다. 균사체 생산에 효과적인 유기물은 yeast extract와 대두분이었다. 최적배지에서 균사체 수율은 30.8 g/ℓ 이었다.

5. 참고문헌

1. Choi, I. Y., Choi, J. S. and Lee, W. H 1999. The production of artificial fruiting body of *Paecilomyces tenuipes*. *Kor. J. Mycol.* 27:87-93.
2. Sung, J. M. 1996. The insect-born fungus of Korea in color. Kyo-Hak Press. p. 299
3. Sung, J. M., Lee, H. K. and Yoo, K. J. 1995. Classification of *Cordyceps* spp. by morphological characteristic and protein banding pattern. *Kor. J. Mycol.* 23:92-104.
4. Shimazu, M., Tsuchiya, D., Sato, H. and Kushida, T. 1995. Microbial control of *Monochamus alternatus* Hope (Coleoptera : Cerambycidae) by application of nonwoven fabric strips with *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina : Hypomycetes) on infected tree trunks. *Appl. Entomol. Zool.* 30:207-213.

5. Kamata, N., Sato, H. and Shimazu, M. 1997. Seasonal changes in the infection of pupae of the beech caterpillar, *Quadricalcarifera punctatella* (Motsch.) (Lep., Notodontidae), by *C. militaris* Link (Clavicipitales : Clavicipitaceae) in the soil of the Japanese beech forest. *J. Appl. Ent.* 121:17-21.
6. Sato, H., Kamata, N., and Shimazu, M. 1997. Aerial infection of *C. militaris* Link (Clavicipitales : Clavicipitaceae) against larvae of *Quadricalcarifera punctatella* Motschlsky (Lepidoptera : Notodontidae). *Appl. Entomol. Zool.* 32:249-252.
7. Youn, Y. N., Yeo, W. H. and Seo, M. J. 1998. Searching for insecticidal metabolites produced by insect pathogenic fungi. *Kor. J. Mycol.* 26:78-85.
8. Chang, S., Buswell, J. A. and Miles, P. G. 1993. Ed. "Genetics and breeding of edible mushrooms". OPA, Amsterdam p. 88-90.
9. Yamanaka, K., Inatomi, S. and Hanaoka, M. 1998. Cultivation characteristics of *Isaria japonica*. *Mycoscience.* 39:43-48.
10. Ban, K. W., Park, D. K., Shim, J. O., Lee, Y. S., Park, C. H., Lee, J. Y., Lee, T. S., Lee, S. S. and Lee, M. W. 1998. Cultural characteristics for inducing fruiting-body of *Isaria japonica*. *Kor. J. Mycol.* 26:380-386.
11. Harada, Y., Akiyama, N., Yamamoto, K. and Shirota, Y. 1995. Production of *C. militaris* fruit body on artificially inoculated pupae of *Mamestra brassicae* in the laboratory. *Mycol. Soc. Japan.* 36:67-72.
12. Sung, J. M., Choi, Y. S., Lee, H. K. Kim, S. H., Kim, Y. O and Sung, G. H. 1999. Production of fruiting body using culture of entomopathogenic fungal species. *Kor. J. Mycol.* 27:15-19.
13. 홍재식, 최윤희, 윤세억. 1986. 합성배지에서 불노초가 생산하는 섬유소 분해 효소에 관한 연구. *한국균학회지* 14:121-130.
14. 홍재식, 강귀환. 1983. 합성배지를 이용한 고온성 느타리버섯의 자실체 형성에 관한 연구. *한국균학회지* 11:121-128.

Abstracts

The optimal cultural and nutritional conditions for the mycelial production from *C. militaris* were investigated in synthetic media. The results are summerized as follows. The optimal temperature, pH, and the duration of culture for the mycelial production was 25°C, 7.0 and 10 days, respectively. Mannitol was good substance for the mycelial production. Among the nitrogen sources, proteose-peptone was higher yield in mycellium, but nitrite nitrogen inhibited. The higher yield was obtained with 0.3% peptone. The optimum concentrations of KH_2PO_4 and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ were about 0.04 and 0.02% for the mycelial production, respectively. Among the vitamins used, the greatest mycelial production brought about by thiamin-HCl. And its proper concentration was about 0.1 mg/ℓ. Among the organic nutrients, yeast extract was good for the mycelial production and its proper concentration was about 1%. In this study, we are obtained 30.8 g/ℓ mycelial dry weight.

제2절 *C. militaris* 추출물처리에 의한 생리활성물질 유도

1. 서론

*C. militaris*는 면역증강 및 항암물질로 알려진 cordcepin, 혈전형성 및 심근경색을 예방하는 Mannitol, 암세포 및 AIDS 억제에 관여하는 동충하초다당(Polysaccharide)등의 주요성분을 함유하고 있다. 천연추출물 성분의 특정 물질인 ligand는 표적세포의 표면의 수용체 (receptor)에 결합하여 세포 내 반응을 매개하여 신호전달 연쇄반응을 통하여 증폭되어 세포 내에서 유전자 발현과 대사과정에 관여한다.

본 연구에서는 다양한 *C. militaris*와 *C. sinenesis* 추출물을 이용하여 Cytokine의 일종으로 면역반응과 염증반응, 배 발생 과정에 관여하는 Interferon gamma inducing factor(IGIF)와 neuron 및 척추신경생존에 관여 Brain derived neurotrophic factor(BDNF), 척추동물의 autocrine survival factor로 포유동물의 신경과 분화에 관여하는 Nerve growth factor(NGF)인 신경세포의 생존과 분화에 관여하는 neurotrophic factor의 발현을 유도하여 면역반응 및 stress에 의하여 발병하는 질병과 신경세포의 퇴화 및 사멸에 관여되는 질병에 대한 예방제 및 치료제로써의 효과를 검증하고자 *in vivo* 와 *in vitro* 에서 RT-PCR, Western blotting, 면역조직화학염색법과 같은 실험 방법을 통해 IGIF, neurotrophic factor의 발현유도에 대하여 실험을 수행하였다.

1. 재료 및 방법

가. *C. militaris* 추출물 제조

*C. militaris*는 물과 ethanol을 이용해서 추출하였다. Ethanol 추출은 각 시료 100 g에 ethanol 500 ml을 첨가하여 homogenizer를 이용하여 4℃, 10,000 RPM에서 2 분간 5 회 균질화시킨 후 72 시간 이상 담근 뒤 evaporator로 농축하여 ethanol을 제거한 후 saline 완충액에 잘 녹여 0.45 μ m filter를 이용하여 여과시킨 후 -20℃에 저장하여 사용하였다. 물추출은 동일한 과정을 거친 후 증탕하여 사용하였다.

나. 세포배양 및 실험동물

Pheochromocytoma 12(PC12) 세포를 Cornell University 신경분자생물학 연구소로부터 분양 받아 사용하였으며 PC12 세포배양은 RPMI 1640 (Gibco BRL) 기본 배지에 10% Horse Serum, 5% Fetal Bovine Serum (FBS), P/S (50 units/ml penicillin, 25mg/ml streptomycine)을 첨가하여 5% CO₂ incubator에서 2~3 일에 한번씩 배지를 교환하며 배양하였다. 실험동물은 생후 6~8 주된 약 150 g의 specific pathogenic free male *sprague-dawely* rat를 한국화학연구소 안정성 연구부로부터 구입하여 실험에 사용하였다. 사료와 물은 자유롭게 먹게 하며, 사육실의 온도는 21~24℃, 상대 습도는 40~60%로 유지한다. 또한 사육실의 밤과 낮이 12 시간마다 반복되도록 조절하였다.

다. LPS와 *C. militaris* 추출물의 *In vivo*와 *In vitro*처리

Mouse와 Rat에 *C. militaris* 추출물(20 mg/kg)과 LPS(10mg/kg) 복강과 경구를 통해 주입한 후, 4 시간, 8 시간이 경과한 후, 뇌 부위를 절단하고 뇌와 각 조직을 적출 하였다.

PC12 세포는 세포밀도가 70~80% 밀도로 자랐을 때 *C. militaris* 추출물(3 µg/ml)과 LPS(2 µg/ml)을 처리한 후, 2 시간, 4 시간, 6 시간동안 반응시킨 후 세포를 사용하여 실험하였다. 또한 본 실험에 사용한 추출물에 의한 유전자의 발현이 추출물 내 LPS의 오염에 의한 것인지를 확인하기 위해 배양세포 내 LPS inhibitor인 Polymycin B sulfate를 함께 배양하여 수행하였다.

라. Total RNA의 분리

1) PC 12 세포에서 total RNA의 분리

Total RNA를 분리하기 위하여 모든 시약과 초자기구류는 DEPC (diethylpyrocabonate)를 처리하였고, RNA는 RNA ZOL™ B 용액

(Lawrence. packaging supply co.)을 이용하여 분리하였다. 배양용기에서 세포가 70~80% 밀도로 자랐을 때 PC 12 세포에 최종 농도가 1 μM 이 되도록 reserpine, forskolin을 처리한 후 각각 4 시간동안 반응시키고 배지를 제거하였다. 그리고 d-PBS와 Trypsin/EDTA를 처리하여 CO₂ incubator에서 3~5 분간 반응시켜 세포를 분리하였고, 800xg에서 10 분간 원심분리하여 세포를 수확하였다. 수확한 세포는 RNA ZOL™ B 용액을 첨가하여 균질화 시키고 2 M sodium acetate (pH 4.2)를 1/10 volum을 첨가하고 chloroform을 혼합하여 15 초간 얼음에 둔 후 12,000 X g로 4℃에서 15 분간 원심분리하여 상층액을 새로운 시험관에 옮겨 동량의 isopropanol을 첨가하고 얼음에서 15 분간 반응시켰고, 12,000xg에서 4℃로 15 분간 원심분리하여 pellet만을 0.8 ml DEPC를 처리한 물에 녹인 75% 에탄올에 씻어준 후, 7,500 X g에서 원심분리하여 RNA pellet을 얻었다. 이 RNA pellet을 speed vacuum에서 건조시켰으며, DEPC-water에 녹여 -70℃에 보관하면서 cDNA 합성에 이용하였다.

2) 쥐 조직에서 total RNA의 분리

조직 100 mg당 0.5 ml의 GIT용액 (4 M guanidine thiocyanate, 25 mM sodium citrate(pH. 7.0), 0.5% sarcosyl, 0.1 M 2-mercaptoethanol)을 첨가하여 4℃에서 homogenizer(labware size 5. PYREX)로 조직을 파쇄한 후, 2 M sodium acetate(pH 4.0) 50 μl 와 water-saturated phenol (pH4.0) 0.5 ml을 첨가하여 30 초간 교반하였다. 그리고 난 후 chloroform 100 μl 를 첨가하여 20 초간 교반하고 얼음에서 15 분간 반응시킨 후 4℃, 12,000 X g으로 20 분간 원심 분리하여 상층액만을 새로운 시험관에 옮겼고 동량의 isopropanol을 첨가해 -20℃에서 1 시간 이상 반응시켰다. 반응시킨 샘플을 4℃에서 12,000 X g으로 20 분간 원심 분리하여 상층액을 버리고 -20℃에 보관한 75% 에탄올 0.5 ml을 첨가하여 혼합하고, 4℃에서 7,500xg으로 5 분간 원심 분리하여 모은 RNA pellet을 speed vacuum을 이용하여 건조시켰으며, 이 pellet을 DEPC-water에 녹여 -20℃에 보관하면서 사용하였다.

3) 암세포주 배양

가) 대식세포주 RAW 264.7 (ATCC No, TIB71)

10% Fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 units/ml penicillin, 그리고 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin이 함유된 DMEM(High- glucose)배지를 이용하여 37°C humidified 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. PC 12 세포는 cell death, 신호전달 및 신경세포의 분화 등의 기작 연구에 폭넓게 사용되는 세포로, 한국세포주은행에서(KCLB 21721) 분양 받아 10% fetal Bovine serum, 100 units/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin이 포함된 RPMI 1640 배지를 이용하여 5% CO₂ incubator에서 2~3 일에 한번씩 배지를 교환하며 배양하였다.

나) SNU-484, 601, HeLa, A-549, OV-3(KCLB No. 00484, 00601, 10002, 10185) 암세포주

한국 세포주은행으로 분양 받았으며, NIH3T3 세포주는 코넬대학교 의과 대학으로부터 분양 받아 사용하였다. 암세포주는 한국 세포주은행의 배지 구성에 따라 5% CO₂ incubator에서 2~3 일에 한번씩 배지를 교환하며 배양하였고, NIH3T3 세포주는 10% calf serum, 100 units/ml penicillin, 그리고 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin이 함유된 DMEM (High- glucose)배지를 이용하여 37°C humidified 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

마. RT (Reverse Transcriptase) - PCR

PC 12와 쥐의 뇌에서 추출한 RNA를 각각 2 μg 를 사용하여 역전사 반응용액 [2 mM dNTPS, 10 units RNase inhibitor, 1 μl oligo-dT(100 pmol), 15 units AMV reverse transcriptase]에서 역전사 반응을 하였다. 각각 얻어진 sample의 cDNA를 primer (Table 1)를 제작하여 PCR(Alison M. Comer and

Hannah M. Gibbons, 1999; Alison M. Comer and Jianguo Qi, 1998)을 수행한 후 PCR product는 1.2~1.5% agarose gel에 전기영동한 후 ethidium-bromide로 염색한 후 확인하였다.

바. DNA sequencing과 분석

발현된 유전자를 확인하기 위해 pGEM T-easy (Promega)에 클로닝 하여 클로닝된 vector를 T7 primer와 sp6 primer를 사용하여 염기서열을 분석하였다. 염기서열 분석은 기초과학지원연구소 광주분소에 의뢰하여 수행하였다. Perkin elmer(USA)사의 Automatic DNA sequencer(모델명:ABI PRISM 377)로 reading하여 염기서열 해석 소프트웨어 SequencerTM(Gene Codes Inc. USA)와 (Hitachi software engineering CO., Ltd. Japan)를 이용하여 해석하였다.

사. DNA Probe 제작

DNA probe는 Random primed DNA labelling Kit (Boehringer Mannheim Co.)를 이용하여 제작하였다.

아. Northern blot hybridization

2.2 M formaldehyde/ 1% agarose gel에 일정량의 total RNA samples을 loading한 다음, 1 X MOPS buffer를 이용하여 70~80 V로 3~4 시간 running 하였다. formaldehyde를 희석시키기 위하여 증류수에 gel을 20~30 분 담근 후 EtBr 용액에 30 분 정도 염색하였다. 탈색은 증류수에 3~4 번 정도 30 분 간격으로 세척한 후, 이 gel을 10 X SSC 용액으로 모세관 원리를 이용한 transfer를 하였다. 2 X SSC로 간단히 세척하여 80℃로 열처리 후, Prehybridization buffer (10 ml of deionised formamide, 1 ml of 20% SDS, 4 ml of 50% dextran sulfate, 1.16 g NaCl, 그리고 5 ml DEPC-treated distilled

water)로 42℃에서 1 시간 반응 후 Prehybridization buffer와 salmon sperm DNA 그리고 [α - 32 P] -dCTP로 라벨된 probe를 이용하여 hybridization 반응을 하룻밤 동안 처리한 후 2 X SSC로 세척하여 -70℃에서 Kodak X-ray film에 노출하여 현상 후 결과를 조사하였다.

차. LPS와 *C. militaris* 추출물의 처리에 의한 IFN- γ Assay

C. militaris 추출물과 LPS의 처리에 의한 IFN- γ 의 생성을 알아보기 위하여 PC 12 세포의 밀도가 60~70 %에 달하면 각각 세포에 LPS(2 μ g/ml)와 *C. militaris* 추출물(3 μ g/ml)을 처리하여 시간별로(0, 1, 2, 3, 4 hr) 배양액을 얻은 후, Bender Medsystems ELISA kit를 사용하여 지시 방법에 따라 수행하였다.

차. Chromosomal DNA 분리

쥐의 꼬리를 1~2 cm를 절단하여 1.5 ml microcentrifuge tube에 넣은 다음 0.7 ml의 용액(50 mM Tris, pH 8.0, 100 mM EDTA, 0.5% SDS)를 더하고 proteinase K(10 mg/ml) 용액 35 μ l를 첨가하였다. rocking platform(Clay Adams aliquot mixer)상에서 하룻밤 동안 55℃에서 배양시킨다. tube를 꺼내서 0.7 ml의 phenol을 첨가하고 완전하게 상을 혼합하기 위해 tube를 닫고 3 분 동안 강하게 교반하였다. 상을 분리하기 위해 3 분 동안 원심분리기에서 원심분리하였다. 새로운 tube에 액체상을 옮긴 후 phenol/chloroform(1:1) 0.7 ml을 더하고 2 분간 강하게 교반하여 2 분 동안 원심분리하였다. 다시 상등액을 1.5 ml microcentrifuge tube에 옮긴 후 3 M sodium acetate(pH 6.0) 70 μ l와 실온에서 보관된 100% ethanol 0.7ml를 첨가하였다. DNA pellet을 모으기 위해 30 초 동안 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 여기에 실온에 보관된 70% ethanol 1 ml를 가하여 DNA를 씻기 위해 강하게 vortex 하였다. 실온에서 1 분 동안 원심분리기에서 원심분리하였다. 그리고 상등액을 제거하고 DNA를 진공상태에서 간단하게 건조시킨다. tube에 TE용액(10 mM Tris, pH

8.0, 1 mM EDTA) 0.1 ml를 첨가하여 실온에서 하룻밤 동안 녹인 후 다음 실험에 사용하였다.

카. CAT assay를 위한 pCAT vector의 제작

1) IGIF promoter 유전자의 클로닝과 pCAT vector의 제작

C. militaris 추출물이 IGIF promoter 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 exon I과의 상위 부위와 exon II의 상위 부위(intron) 부위를 PCR을 수행하여 증폭시킨 후, pGEM-T Easy cloning vector에 삽입하여 제한효소 sph I 과 pst I으로 pCAT vector와 함께 절단한 후 삽입하여 pCAT p1과 p2를 제작하였다(Fig. 1)

2) BDNF promoter 유전자의 클로닝과 pCAT vector의 제작

BDNF의 promoter 부위를 클로닝하기 위해 chromosomal DNA를 주형으로 각각의 primer를 이용하여 PCR를 수행하였으며 다음과 같은 primer를 사용하여 PCR반응 혼합액 50 μ l내에 10 X PCR 완충용액(500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.3, 15 mM MgCl₂, 0.1% gelatin, 200 mM(dATP, dCTP, dTTP, dGTP)] , primer(forward primer와 reverse primer) 각각 20 pmol, DNA주형 100 ng, adventage Taqpolymerase 5 unit, 멸균수를 잘 혼합하여 Thermal cycler system 2400(Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT)를 사용하여 94°C에서 1 분, 58°C에서 2 분, 68°C에서 3 분 순으로 30 회 반복하여 수행하였다. Exon I 5' 상위부위, Intron I 과 Exon II를 포함한 부위 그리고 이들을 모두 포함한 부위를 얻어 pGEM T-easy vector에 클로닝 하여 CAT vector의 적당한 제한효소를 사용하여 pCAT assay를 위한 vector를 제작하였다(Fig. 2). 이들을 각각 pCAT m1.2, pCAT m3.4 그리고 pCAT m1.4로 명명하였다. PCR을 수행하기 위한 primer는 다음과 같다.

pCAT m1.4

sense; 5'TTGCGGCTTCAGTTCTCAAC3'

antisense; 5'CGGTTTCTTCCACTTCCTTACG3'

pCAT m1.2

sense; 5'TTGCGGCTTCAGTTCTCAAC3'

antisense; 5'GAGATTTCCCTGTCGCCA3'

타. 세포내도입(transfection)과 CAT 정량

제한효소 절단부위를 포함한 promoter 부위의 유전자를 PCR를 수행하여 증폭시킨다. 이들을 chloramphenicol acetyltransferase(CAT)을 갖는 pCAT-promoter vector에 삽입시켜 재조합플라스미드를 만들어 CAT 유전자가 발현되도록 하였다.

제조한 pCAT promoter vector를 Omega(Korea) maxiplasmid isolation kit를 사용하여 정제하였다. 세포에 lipofectamine plus reagent를 이용하여 transfection 시킨 후, 24 시간이 경과하고 *C. militaris* 추출물을 처리한 후 5% CO₂ 배양기를 이용하여 37°C에서 24 시간 배양한 후, PBS buffer로 씻어 준 후, 동결과 해동을 3 번 반복 시켜 lysate를 만들고 4°C, 12,000×g에서 10 분간 원심분리후 상등액만을 얻는다. CAT assay는 CAT ALISA kit(Boehringer mannheim)를 사용하여 측정하였으며 β-galactosidase assay를 위하여 pCMV plasmid를 동시에 transfection하여 그 효율을 조절하였다.

파. IGIF 유전자의 발현여부 확인을 위한 Immunohistochemistry

30 μm 두께의 절편을 얻어 anti-rabbit primary antibody(1:25,000)를 하룻밤 반응시킨 후 세척하였다. Biotinylated anti-rabbit secondary antibody를 이용하여 1 시간 정도 반응시킨 후 Avidin-biotin complex Kit로 antigenic signal를 증폭시킨 후 0.05% 3,3'-diaminobenzidine-tetrachloride(DAB)와 H₂O₂로 처리하였다.

하. Ligation and transformation

Ligation은 Promega Co.(USA)의 방법에 따라 수행하였다. ligation 반응액 10 μ l 내에 fresh PCR product, 2 \times ligation 완충용액(250mM Tris-HCl pH 7.8, 100 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 4 mM ATP) 1 μ l, pGEM-T easy vector(25 ng/ μ l) 1 μ l, T4 DNA ligase(3.0 Weiss units) 1 μ l, 멸균수를 첨가한 후 잘 혼합하여 실온에서 1 시간 반응 후 혼합액을 형질전환 시켜 X-gal 과 IPTG가 포함된 LB 배지에 도말하고 얻어진 clone을 LB배지에 배양하여 제한효소를 통해 확인하였다.

형질전환은 Hanahan(1985) 방법에 의하여 숙주인 *E. coli* DH5a를 사용하였다. 적합세포(Competent cell)를 준비하기 위해 종 배양한 *E. coli* DH5a를 새로운 SOB 액체배지(2% bacto tryptone, 0.5% bacto yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, pH 6.8~7.0) 30~100 ml /l 플라스크에 접종하여 600 nm에서 OD가 0.3~0.5가 될 때까지 37°C에서 진탕 배양하였다. 배양액을 4°C에서 1,000 X g로 15 분 동안 원심 분리하여 세포들을 모은 후 RF1 용액(100 mM KCl, 50 mM MnCl₂ · 4H₂O, 30 mM KOAc, 10 mM CaCl₂ · 2H₂O, 15% glycerol, pH 5.8)의 1/3에 현탁 시키고 15 분 동안 얼음에 정치한 후 다시 4°C에서 1,000 X g로 15 분 동안 원심 분리하였다. 침전물에 RF2 용액(10mM MOPS, 10 mM KCl, 75 mM CaCl₂ · 2H₂O, 15% glycerol, pH 6.8)의 1/12.5로 현탁시켜 15 분 동안 얼음에 정치한 후 1.5ml microfuge tube에 적당량을 분주한 후 액체질소나 dry ice/ethanol에서 신속하게 얼린 다음 -70°C에 보관하면서 형질전환에 사용하였다.

Ligation 혼합액 10 μ l와 적합세포 100 μ l를 혼합하여 잘 섞은 후 30 분 동안 얼음에 정치하고 42°C에서 90 초 동안 heat shock 하였다. 곧바로 2~3 분 동안 얼음에 방치한 후 세포벽의 재생을 위하여 LB 액체배지 800 μ l를 가하여 수평으로 37°C에서 1 시간 동안 225 rpm으로 진탕 배양하였다. 배양한 세포를 50 μ g/ml ampicillin, 50 μ g/ml kanamycin과 X-gal (40 mg/ml) 40 μ l, IPTG(100 mM) 40 μ l가 함유된 LB 고체배지에 도말 하여 37°C에서 하룻밤 동안 배양하여 흰색 집락을 선발하였다.

형질전환체를 확인하기 위하여 선별한 흰색 집락을 50 μ g/ml ampicillin, 50 μ g/ml kanamycin이 함유된 LB 액체배지에 37°C에서 하룻밤 동안 배양한 후

배양액 1.5 ml을 집균하여 alkaline lysis 방법(Maniatis *et al*, 1989)에 의하여 재조합 플라스미드 DNA를 분리하였다. vector에 삽입된 DNA가 정확히 삽입되었는지의 여부를 확인하기 위하여 제한효소 *EcoR* I 으로 절단한 후 이것을 EtBr가 함유된 1.2% agarose gel에 전기영동 시킨 후 자외선을 조사하여 관찰하였다.

2. 결과 및 고찰

가. *C. militaris* 추출물과 LPS를 처리한 생쥐의 뇌와 간에서 IGIF와 BDNF 유전자의 발현

20~30 g의 생쥐를 이용하여 복강과 경구를 통해 saline을 처리하여 대조군으로 사용하기 위해 4 시간 후, total RNA를 추출하였고 *C. militaris*(10 mg/kg) ethanol 추출물과 LPS(10 mg/kg)를 투여하여 4시간과 8 시간 그리고 2 시간, 4 시간, 8 시간, 24 시간이 각각 경과 후, 뇌와 간을 적출하여 Total RNA를 분리하였다. 분리된 total RNA(5 μ g)을 역전사효소를 이용하여(2 mM dNTPS, 15 units RNase inhibitor, 1 μ g of oligo(dT), 200 units의 M-MLV Reverse transcriptase 또는 15 units의 AMV reverse transcriptase) cDNA를 합성한 후, 생쥐 특이적인 IGIF primer를 사용하여 RT-PCR를 수행하였다. 그 결과, 복강에 투여한 생쥐의 뇌에서는 *C. militaris* 추출물을 처리한지 4 시간 후에 IGIF의 발현이 비처리(saline 투여)생쥐와 LPS투여 생쥐보다 강하게 나타났음을 확인하였고(Fig. 3A), 간에서는 LPS와 *C. militaris* 추출물을 처리한 4 시간과 8 시간 후 IGIF가 모두 강하게 발현됨을 확인하였다(Fig. 3B). 또한 *C. militaris* 추출물을 경구 투여한 생쥐의 뇌에서는 4 시간과 8 시간 후에 IGIF의 발현이 강하게 유도되었다(Fig. 4).

Okamura 등(1995)¹⁵⁾은 생쥐에 bacterium *P. acnes* 와 LPS를 처리하여 간에서 새로운 cytokine인 IGIF를 분리하였는데 이는 비장에서 NK 활성을 가지고 있었다. 또한 그 유전자는 192 개의 아미노산 전구체를 암호화하고 있으며 157 개의 성숙 단백질을 암호화하였다고 보고하였다. IGIF는 IL-12와 함께

Kupffer 세포에서 발견되었고 macrophage를 활성화시킨다. 재조합 IGIF 단백질은 IL-12보다 IFN- γ 를 더욱더 강하게 유도 시켰으며 이로 인해 발현 경로를 분리할 수 있었다. IGIF는 Th1 세포의 분화에 관여하며 조직상해와 염증 반응에 관여한다고 보고하였다. 최근에는 IFN- γ 의 생성기작을 Th1 단위체의 분화와 NK 세포들의 세포독성에 관련이 있다고 보고하였으며, 쥐의 IGIF cDNA를 probe로 사용하여 정상인간의 간의 cDNA library로부터 인간의 IGIF cDNA를 클로닝 하였다. 인간의 cDNA로부터 아미노산 서열을 추론한 결과 193 개의 잔기체로 구성되어 있으며 mouse IGIF와 65%의 상동성을 지니고 있었다. 이는 IL-1과 유사한 서열을 보였고 클로닝된 cDNA를 *E. coli*에서 발현하여 생물학적 활성을 갖는 재조합 단백질을 만들어 그 기능을 연구한 결과 재조합 단백질은 NK 세포들의 세포독성을 증가시키고 항원촉진된 PBMC(peripheral blood mononuclear cells)에 의해 IFN- γ 를 유도하였다고 보고하였다.

본 실험에서는 Conti 등(1997)³⁾이 보고한 LPS투여 생쥐의 부신피질에서 IGIF가 강하게 발현유도된 결과와 동일하게 LPS와 *C. militaris*투여 생쥐 모두 강하게 발현 유도됨을 확인하였다. 그러나 Conti 등의(1997)³⁾ 신경조직에서의 발현유도 증가가 없음을 보고한 결과와 다르게 본 실험에서는 *C. militaris* 추출물이 생쥐의 뇌에서 IGIF의 발현유도를 증가시킴을 확인하였다. 이는 IGIF의 중요한 기능으로 IFN- γ 를 유도함으로써 결과적으로 염증성, 항바이러스, 항스트레스 등에 중요한 역할을 한다. 따라서 *C. militaris* 추출물이 생체의 면역작용에 효과가 있음을 확인 할 수 있었다. IGIF 발견된 지 8년이 지난 지금도 그 특성 분석이 되지 않고 있으며 Jakubs(2000)⁷⁾이 보고한 IGIF의 효과는 최근 그 연구가 다양해지고 있다. 특히 암치료를 위한 유전자 치료법에 대해 그 가능성이 강하게 제시되고 있어 IGIF의 발현유도를 증가시키는 *C. militaris*는 이런 관점에서도 그 중요성이 크다고 사료되며 앞으로 성분분석을 통한 추가적인 연구가 수행되어야 할 것이다.

위와 동일한 방법으로 LPS나 *C. militaris* 추출물을 생쥐에 주사하여 BDNF의 발현양상을 분석하기 위해 실시하였으며, 그 결과 뇌에서는 LPS처리 4 시간과 8 시간 후, 발현양이 증가하였으며, *C. militaris* 추출물은 8 시간

후에 발현양이 가장 증가함을 확인하였다. 또한 간에서도 발현이 증가함을 확인하였으며 특히 *C. militaris*는 처리 후 4 시간 후에 가장 강하게 발현이 유도됨을 확인하였다(Fig. 5).

BDNF, NGF, 그리고 NT-3은 모두 뇌에서 발현되어지는데 이들 mRNA의 가장 높은 수준들은 해마(hipocampus)내에서 발견되고 이 해마는 그 인자들이 아직까지 명백하게 분배되어 있지 않지만 서로 중복되어 신경세포에서 발현된다고 보고하였다. 또한 BDNF mRNA는 어떤 성체의 비 신경세포 조직에서도 발현된다. 본 실험 결과에서도 BDNF의 발현이 뇌에서 유도되었고 비 신경세포 조직인 간에서도 발현이 유도됨을 확인할 수 있었다. Kainic acid 주입 후 또는 치상회문(dentate gyrus hilus)의 전기적 자극에 의해 해마, 편도(amygdala), 신피질(neocortex)에서 NGF나 BDNF mRNA가 증가된다고 보고한 것과 같이 BDNF 발현이 LPS나 *C. militaris* 추출물에 의해 유도 될 수 있음을 확인할 수 있었다. Lindvall 등(1992)⁹⁾에 의하면, BDNF mRNA는 칼슘이온에 영향을 받으며 BDNF mRNA는 알츠하이머병이 있는 개인에게서는 감소되어지며 이는 BDNF의 수준이 알츠하이머병에 영향을 끼친다는 것으로 생각된다고 보고하였다. 또한 BDNF는 척추동물의 신경시스템내의 신경세포의 특정부분의 신경세포들의 생존을 도와 주며 상해에 의해 보호 역할을 한다고 보고하였고 수용성 forskolin에 의해 rat의 뇌에서 adenylyl cyclase를 자극하여 BDNF와 TrkB의 발현을 조절함을 보고하였다. 따라서 본 실험에서는 *C. militaris* 추출물이 뇌에서도 BDNF를 발현유도 하는 것으로 보아 AD나 특정 신경세포들의 생존을 보호하고 퇴행성 뇌질환에 대한 예방 및 치료효과를 나타낼 것으로 추론된다.

나. *C. militaris* 추출물과 LPS를 처리한 쥐뇌의 각 부위와 신장에서의 IGIF 유전자의 발현

뇌에서의 IGIF의 발현을 확인한 후, 뇌의 주요 발현 부위를 확인하기 위하여 Toxic shock인 LPS(10 mg/kg)와 *C. militaris* 추출물(20 mg/kg) 쥐의 복강을 통해 주입한 후, 4 시간이 경과한 다음 뇌의 전뇌, 중뇌, 후뇌, 소뇌 부위

를 적출하여 Total RNA를 분리하였다. 각각의 분리된 Total RNA(2 μ g)를 역전사효소를 사용하여(2 mM dNTPS, 15 units RNase inhibitor, 1 μ g of oligo dT, 5 units of AMV reverse transcriptase) cDNA를 합성하고 쥐의 IGIF에 대한 특이적인 primer를 사용하여(94°C에서 1 분, 56°C에서 1 분 30 초, 72°C에서 1 분 30 초, 35 cycle) RT-PCR를 수행하였다. 수행한 결과 뇌의 모든 부위에서 IGIF가 발현함을 확인하였다(Fig. 6). 쥐의 뇌와 신장에서는 *C. militaris* 추출물과 LPS를 처리한 4 시간 후 유전자의 발현이 관찰되었으며 같은 쥐의 뇌에서는 IGIF의 발현 유도가 강하게 나타났다. 또한 8 시간 처리한 후 IGIF의 발현유도는 뇌와 신장에서 모두 발현되었으며 특히, *C. militaris* 추출물을 처리한 뇌에서 강하게 나타났음을 확인하였다(Fig. 6). Conti 등은(1997)³⁾ IGIF가 rat의 부신피질에서 reserpine을 처리하여 발현함을 보고하였고, granulocyte-macrophage-CSF를 생산하는 반면 IL-10을 감소시킨다고 보고하였으며 또한 IGIF의 mRNA 발현의 영향으로 cold stress가 강하게 IGIF의 유전자 발현이 유도되었고 *in situ* hybridization을 통해 부신피질의 *zona reticularis*와 *fasciculata* 부위에서 발현됨을 보고하였다. 또한 각종 스트레스에 의한 신경계에서는 그 발현의 변화가 없음을 보고하였다. 그러나 본 실험에서는 *C. militaris* 추출물이 뇌에서도 IGIF의 발현을 유도 할 수 있음을 확인하여 신경계에서는 발현증가가 없었다는 위의 보고와 다른 새로운 결과를 확인 할 수 있었다.

또한 위와 동일한 방법으로 신장에서도 IGIF가 발현 유도됨을 확인 할 수 있었으며 특히, 뇌와 신장 모두 LPS와 *C. militaris* 추출물을 동시에 처리한 4 시간 후에서 IGIF의 발현유도가 강하게 증가함을 확인하였다. 이는 LPS와 *C. militaris*를 각각 처리한 것보다 강하게 유도됨으로 시너지 효과를 나타냄을 확인 할 수 있었다(Fig. 7). 이는 Okamura 등(1995)¹⁵⁾은 *P. acnes*가 감염된 생쥐에 LPS를 처리하여 간에서 새로운 cytokine인 IGIF를 분리하였는데 이는 비장에서 NK세포 활성을 가지고 있었다는 보고와 동일하게 신장에서도 IGIF가 발현되었으며 1999년 KIM⁸⁾ 등이 다양한 세포주에서 IGIF가 발현된다는 보고와 동일하게 생체내의 여러 부위에서 IGIF가 발현될 수 있음을 확인 할 수 있었다.

다. *C. militaris* 추출 방법에 따른 IGIF 유전자의 발현

일반적으로 *C. militaris*는 현재 인간이 복용하는 방법으로 고압에서 물로 추출하는 방법과 술로 만드는 방법이 널리 알려져 있다. 따라서 추출 방법에 따른 IGIF의 발현 효과를 알아보기 위하여 *C. militaris*를 물로 증탕한 것과 ethanol로 추출하여 쥐에 복강 주사하여 RT-PCR를 수행하였다. 복강 주사한 양은 각각 30 mg/kg을 투여하여 2 시간, 4 시간, 8 시간 후, 뇌를 적출하여 total RNA를 추출한 후 RT-PCR를 같은 방법으로 수행하였다. 그 결과 두 가지 경우 모두 비슷한 발현 양이 발현함을 알 수 있었으나 ethanol을 이용하여 추출한 *C. militaris*는 8 시간 후에도 발현효과가 지속됨을 확인하였으며 이는 효과를 지속시킬 수 있는 성분이 ethanol로 인해 추출될 수 있음을 보여주었다(Fig. 8).

라. LPS와 *C. militaris* 추출물을 처리한 PC12 세포에서의 IGIF와 IFN- γ 유전자의 발현

PC 12 세포에서의 IGIF와 IFN- γ 의 발현 영향을 알아보기 위해 PC 12 세포들이 배양용기에 70~80% 밀도로 자랐을 때 LPS(2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 *C. militaris* 추출물(3 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 처리하고 2 시간, 4 시간, 8 시간 후 세포를 얻은 후, Total RNA를 분리하고 전술한 바와 같은 방법으로 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과 PC 12 세포에서도 LPS와 *C. militaris* 추출물을 처리한 세포 모두 IGIF가 발현이 증가하였으며 IFN- γ 의 발현도 증가함을 확인하였다(Fig. 9). Masahide 등(1997)¹³⁾은 거식세포주인 raw 264.7 세포에서 LPS를 처리한 결과 IGIF의 발현이 증가함을 보고하였다. 또한 Charles(1999)⁴⁾는 IGIF가 IL-1과 유사하며 T-cell을 활성화하여 IGIF의 T-cell_helper type 1(Th1) 반응에서 가장 중요한 역할을 하며 이는 T cell과 NK세포에서 IFN- γ 를 유도한다고 보고하였다. 또한 IGIF 결손 쥐에서는 IL-12의 존재에도 불구하고 IFN- γ 가 억제되었으며 IL-1 β 와 유사성을 지닌다고 보고하였다. 쥐의 IGIF cDNA를 probe로 사용하

여 정상인간의 간의 cDNA library로부터 인간의 IGIF cDNA를 클로닝 하였다. 이는 IL-1과 유사한 서열을 보였고 클로닝된 cDNA를 *E. coli*에서 발현하여 생물학적 활성을 갖는 재조합 단백질을 만들어 그 기능을 연구한 결과 재조합 단백질은 NK 세포들의 세포독성을 증가시키고 항원촉진된 PBMC에 의해 IFN- γ 를 유도하였다고 보고하였다. 따라서 본 실험에서도 위의 보고에서와 동일하게 LPS와 *C. militaris* 추출물이 IGIF의 발현을 유도함을 확인 할 수 있었다. 특히 LPS투여 4 시간, *C. militaris* 투여 2 시간, reserpine 투여 2 시간 후에 IGIF가 강하게 발현유도 되었으며 IFN- γ 는 LPS, *C. militaris*, reserpine 처리 4 시간 후에 모두 강한 발현을 보였다. Conti 등(1997)³⁾이 reserpine을 처리한 쥐의 부신피질에서의 IGIF의 발현 증가 보고와 동일하게 PC 12세포에서도 IGIF가 reserpine뿐만이 아니라 *C. militaris*추출물도 IGIF를 유도함이 확인되었다.

마. IGIF와 BDNF 유전자의 클로닝 및 염기 서열 분석

생쥐를 LPS와 *C. militaris* 추출물로 처리한 후 Total RNA를 분리하고 합성된 cDNA를 이용하여 발현된 IGIF와 BDNF 유전자를 확인하기 위해 pGEM T-easy 클로닝 vector에 삽입하여 각각 pIGIF와 pBDNF로 명명하고 제한효소를 처리하여 클로닝 여부를 확인하였으며(Fig. 10A) 염기 서열을 각각 분석·비교하였다. 그 결과, 뇌에서 발현된 IGIF 유전자는 Conti 등(1997)³⁾이 쥐의 IL-18을 분리하여 쥐의 IL-18과 비교하여 약 91%의 아미노산 서열의 상동성을 가지고 있고 194 개의 아미노산으로 이루어 졌다는 보고와 동일함을 확인하였다. 또한 Shimpei 등(1996)¹⁹⁾은 인간의 IGIF유전자를 클로닝하여 아미노산 서열이 193 개의 전구체 단백질로서 생쥐 IGIF cDNA와 65%의 상동성이 있음을 보고하였다. 지금까지 생쥐의 뇌에서의 IGIF 유전자는 염기 서열이 알려지지 않았으나 본 실험을 통하여 뇌의 IGIF 유전자도 간이나 부신피질에서 발견된 유전자와 그 서열이 동일함을 확인하였다. 그러나 아직까지 뇌에서의 IGIF 기능에 대한 구체적인 연구는 수행되지 못하고 있어 더욱 더 많은 연구가 요구된다.

RT-PCR을 통한 BDNF 유전자를 클로닝 vector에 삽입한 후 제한효소처리를 통해 클로닝 여부를 확인하고(Fig. 10B) 이는 1989년 Leibrock 등이 돼지 genome 주형과 돼지 뇌의 상구 (superior colliculus)에서 얻어진 cDNA 주형을 이용하여 중합연쇄반응(PCR)을 실시한 결과 cDNA clone이 분리되고 서열이 결정되었는데 이것은 BDNF가 252 개 아미노산 잔기의 전구체 단백질을 만드는 즉, intron이 없는 open reading frame(ORF)에 의해 암호화된다는 것을 보고한 결과와 일치함을 확인할 수 있었다.

재조합 플라스미드 DNA인 pBDNF를 Plasmid mini kit(Bioneer)를 이용하여 정제한 뒤 DNA 염기서열을 분석하였다. 그 결과, 1991 년에 Maisonpierre 등은 인간과 쥐 BDNF의 게놈과 cDNA clone의 염기서열과 아미노산 서열이 이전에 보고된 돼지(Leibrock *et al*, 1989)와 생쥐 (Hofer *et al*, 1990) cDNA의 서열을 비교한 결과 매우 유사하다는 것을 보고하였다. 생쥐의 개시 코돈(ATG)과 종결 코돈(TAG)까지 750 bp의 BDNF 유전자 염기서열을 보여주는 데 , 250 개의 아미노산 서열을 갖는 BDNF 유전자를 생쥐와 비교한 결과 100%의 상동성을 보였다.

바. PC 12 세포에서 발현되는 IGIF와 IGIF Isoform 유전자의 클로닝 및 염기서열분석

Conti 등(1996)³⁾은 쥐에서 reserpine을 처리하여 부신피질에서 differential display방법을 이용해서 생쥐와 염기서열 및 아미노산서열이 91%의 상동성을 갖는 IGIF 유전자를 밝혀냈으며, RT-PCR 결과 두 가지의 유전자 밴드가 발현됨을 보고하였다. 그 중 긴 유전자 서열은 쥐와 91% 상동성을 나타냈고 194 개의 아미노산을 암호화하고 있었으며 아미노산 8 번과 64 번에 mouse에는 존재하지 않은 glycine과 proline이 각각 첨가되어짐을 확인하였다. 짧은 유전자 서열은 57 개의 염기 서열이 결손 되어졌으며 이는 359 번째와 360 번째의 염기서열 AG코돈 뒤에 361 번에서 417 번의 서열이 잘려 나가고 바로 418 번째 염기 서열이 존재한다고 예측하였다. 이로써 아미노산 서열이 Phe¹¹⁹-Glu¹²⁰-Glu¹²¹에서 Phe¹¹⁹-Glu¹²⁰-Lys¹²¹의 순으로 전환됨을 보고하였다.

본 실험에서도 여러 가지의 IGIF 특이적인 primer를 조합하여 RT-PCR을 수행한 결과 위의 보고와 같이 희미한 짧은 유전자 밴드가 있음을 확인하였고 클로닝 vector에 삽입하여 pIGIFiso로 명명하고(Fig. 11) 염기서열을 분석하였다(Fig. 12). 그 결과, PC 12 세포에서도 57 개의 염기 서열이 결손 되어져 있고 2 개의 염기가 변환되어져 있음을 확인하였다. 이로서 아미노산 서열도 변환되어 있음을 확인하였으며(Fig. 13) isoform이 존재함을 확인하였다. Pierre 등(2000)¹⁶⁾은 NGF의 receptor인 TrkA의 isoform인 6 개의 아미노산이 첨가된 TrkAII를 발견하여 보고하였는데 rat에서는 TrkAII가 뇌의 모든 부분에서 발현되었으나 사람의 뇌에서는 조직특이적으로 발현함을 보고하였고 특히 알츠하이머 환자의 뇌에서는 발현양이 감소함을 확인하였다. 따라서 이러한 isoform이 뇌에서 중요한 역할을 하고 있음을 제시하였다. 그러나 아직까지 IGIF의 isoform이 생체내에서만 알려져 있어 이에 대한 기능연구가 수행되어 지지 못하고 있다. 따라서 본 실험에서는 이러한 어려움을 해결하고자 PC 12 세포에서 isoform을 클로닝 함으로써 그 기능 연구가 용이해 졌다. 나아가서 IGIF 유전자를 발현 vector에 클로닝하여 재조합 단백질을 만들어 단백질 구조를 분석하고 receptor와의 결합여부 그리고 IGIF의 중요한 기능인 INF- γ 를 유도하는지 등의 연구가 실행되어야 할 것이다.

사. PC 12 세포에서의 INF- γ 의 활성 측정

PC 12 세포가 60~70%의 밀도로 자랄 때까지 배양한 후 세포에 *C. militaris* 추출물과 LPS를 처리한 후 배양액을 획득하여 각각의 시간대 별로 INF- γ 의 생물학적 활성을 ELISA kit를 사용하여 측정하였다. 그 결과, PC 12 세포에서는 LPS와 *C. militaris* 추출물을 처리한 세포 모두 반응시간이 경과함에 따라 발현양이 증가함을 보였고 앞에서의 RT-PCR의 결과와 동일하게 LPS가 더 높은 INF- γ 의 발현유도를 보였으나 이는 *C. militaris*의 추출액이 crude한 상태이므로 발현유도물질의 양이 상대적으로 너무 적었기 때문이라 사료된다. 이러한 INF- γ 의 발현은 Junming 등과의 결과와도 동일한데 그는 human peripheral blood mononuclear cell(PBMC)에서 LPS와

phytohemagglutinin(PHA)가 IFN- γ 를 유도함을 보고하였고, 낮은 농도의 LPS(0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에서 IL-2를 전처리 한 결과 IFN- γ 의 발현양이 증가함을 보고 하였다.

Peritoneal exudate cell(PEC)에서도 LPS와 interleukin-2의 처리한 결과 유사함을 확인하였다. Yong Gu 등(1997)²³⁾은 interleukin-1 β converting enzyme(ICE)이 IGIF의 전구체 단백질을 절단하여 활성화시킴을 ICE 결손 Kupffer cell에서 밝혀 보고하였다. 또한 ICE와 IGIF를 동시에 세포에 처리함으로써 IFN- γ 의 유도가 증가하였음을 보고하였다. Shimpei 등(1997)¹⁹⁾은 인간의 IGIF cDNA를 클로닝 하였으며 발현 vector를 이용하여 재조합 단백질을 생산하였으며 이는 PBMC 세포에서 IFN- γ 를 유도함을 보고하였다. IGIF와 IL-1 β 는 모두 비활성 전구체로 합성되어지고 signal peptide를 지니고 있지 않으며 IL-1 β -converting enzyme(ICE, caspase-1)에 의해 성숙 단백질로 변환되어진다(Fig. 14).

아. Northern blot analysis

쥐에 *C. militaris* 추출물과 LPS를 처리하고 각각 4 시간, 8 시간 후에 뇌와 간을 절취하여 total RNA를 Trizol reagent (Lifetechnologies, USA)를 사용하여 지시한 방법에 따라 분리하였다. Total RNA를 20 μg 을 formaldehyde agarose 젤 전기영동(Fig. 15)하여 확인한 후 pBDNF에 클로닝된 BDNF cDNA를 probe로 이용하여 Northern blotting을 수행하였다. 그 결과 쥐의 뇌에서는 *C. militaris* 추출물을 8 시간 처리한 BDNF mRNA의 양이 가장 증가함을 보여주었고 (Fig. 15), 간에서는 LPS를 투여한지 8 시간에서 *C. militaris* 추출물을 처리한지 4 시간과 8 시간에서 발현이 증가함을 확인하였다. 이는 앞에서 수행하였던 RT-PCR의 결과와 동일함을 보여 주었고 또한 raw 264.7 세포와 쥐의 각 조직에서 toxic drug를 처리하여 IGIF mRNA양의 증가를 보고한 Masahide 등(1997)¹³⁾과 Conti 등(1997)³⁾의 결과와 유사함을 확인 할 수 있었다. 두 개의 RNA 전사체인 1.5 kb 크기가 확인되었으며 뇌에서 BDNF 유전자 발현체인 BDNF mRNA 생성을 감지할 수 있었다. 1.5 kb 크기의 전사체

를 확인하였으며, 또한 성체 쥐 뇌의 전 부위에서 BDNF mRNA 전사체의 분배를 실험한 결과 해마에서 매우 높은 수준으로 발현되었으며 다음은 피질, 소뇌 순으로 발현되었음을 보고하였다. 1992 년 Lindvall⁹⁾ 등에 의하면, BDNF mRNA는 칼슘이온에 영향을 받으며 BDNF mRNA는 알츠하이머병이 있는 개인에게서는 감소되어지며 이는 BDNF의 수준이 알츠하이머병에 영향을 끼친다고 보고하였다. 또한 BDNF는 척추동물의 신경시스템내의 신경세포의 특정부분의 신경세포들의 생존을 도와주며 상해에 의해 보호 역할을 한다고 보고함에 따라 본 실험의 결과로 *C. militaris* 추출물이 이러한 BDNF의 발현을 증가함에 따라 *C. militaris*의 이용이 질병의 예방과 치료에 응용될 수 있음을 확인하였다.

자. Immunohistochemistry

뇌에서 30 μm 두께의 절편을 얻어 anti-rabbit primary antibody(1:25,000) 하룻밤동안 반응시킨 후 세척하였다. Biotinylated anti-rabbit secondary antibody를 이용하여 1 시간정도 반응시킨 후 Avidin-biotin complex Kit로 antigenic signal를 증폭시킨 후 0.05% 3,3'-diaminobenzidine-tetrachloride (DAB)와 H_2O_2 로 처리한 후 발색하여 LPS와 *C. militaris* 추출물을 처리한 쥐의 뇌에서 IGIF의 발현 여부와 발현 양상을 비교하였다. 그 결과, *C. militaris* 추출물이 뇌에서 IGIF의 발현을 유도하며 뇌 전체 부위에서 IGIF가 발현되고 있음을 확인하였다. 특히 소뇌의 Purkinje 세포에서 IGIF의 발현이 뚜렷이 증가되고 있음을 확인하였다(Fig. 16). 소뇌의 Purkinje 세포는 신경세포에서 중요한 역할을 하고 있으며 특히 소뇌는 운동신경과 밀접한 관련이 있음이 알려져 있다. 운동적응의 관점에서 소뇌는 구심성 신호와 원심성 신호를 모두 받아 서로 비교하여 신호의 차이를 산출하고 다시 이를 대뇌의 운동령으로 전달함으로써 반사운동과 수의적 근운동을 면밀히 조정하는데 Purkinje 세포가 매우 밀접한 관계를 갖는다. 즉 Purkinje 세포는 새롭게 행한 운동에서 근육과 관절의 고유수용기로부터 feedback 신호를 받게 되고 이것을 원래 원했던 운동과 비교해서 신호차이를 대뇌피질의 운동령으로 전달하여 학습기능을 수행

하게 된다. 또한 Purkinje 세포는 소뇌 피질중 Purkinje 세포층을 구성하는 세포이다. 크기는 약 50~80 μm 정도이며, 중추신경계에서 1.5×10^7 개가 있다. 세포가 나무모양으로 축색돌기는 나무가지같이 소뇌피질의 제일 바깥층인 분자층으로 뻗어있다. large primary dendrite, secondary dendritic branches, tertiary dendritic branches로 분지되면서 다른 세포들과의 시냅스 면적을 넓힌다. 모든 Purkinje 세포는 그 표적세포에게 시냅스 후 억제를 유도한다. Purkinje 축색종말에서 방출되는 전달물질이 억제성 아미노산 전달물질인 GABA라는 강력한 증거가 있다. 본 실험에서는 IGIF가 Purkinje 세포에서 강력하게 유도되는 것으로 보아 IGIF가 운동신경에도 연관이 있을 수 있으며 특히 PD에서 나타나는 운동마비와도 연관이 있을 것으로 사료된다. 하지만 현재까지 IGIF의 기능 연구가 대단히 미진한 실정이며 특히 뇌에서의 IGIF의 연구는 아직까지 전무한 실정이므로 본 실험을 통하여 뇌에서의 IGIF의 발현 연구의 기초가 될 수 있다고 생각된다.

차. IGIF 유전자의 promoter 부위의 cloning 및 CAT assay

본 연구에서는 *C. militaris* 추출물이 IGIF promoter 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 exon I의 5'상위 부위와 exon II의 상위 부위(intron) 즉 intron I 부위를 PCR을 수행하여 증폭시킨 후 pGEM-T Easy cloning vector에 삽입한 후 제한효소 *sph* I과 *pst* I으로 pCAT vector와 함께 절단한 후 삽입하여 pCAT p1과 p2를 제작하였다. 또한 pCAT p1과 p2를 DH5a에 형질 전환시킨 후 200 ml의 LB배지에 배양하고 maxiplasmid kit(Omega, Korea)을 이용하여 pCAT p1과 p2를 순수분리 하였고 제한효소로 절단하여 클로닝 여부를 확인하였다(Fig. 17). RAW 264.7 세포가 60%의 밀도로 자랐을 때 lipofectamine과 vector DNA를 serum free medium인 optiMEM 배지에 혼합한 후 세포에 transfection시켰다. Transfection시킨 후 5 시간 후에 혈청을 첨가하고 24 시간 후에 LPS(3 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 *C. militaris*(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 추출물을 처리하고 24 시간 후에 세포를 수확한 후 lysis 완충용액에 30 분 동안 반응 후 원심분리하여 얻은 상층액을 사용하여 CAT assay를 수행하였다. CAT assay

는 Boehringer Mannheim Biochemica(Germany) ELISA kit를 사용하였으며 실험방법은 지시방법에 준하여 실시하였고 pCMV β -gal plasmid를 동시에 transfection시키고 β -galactosidase assay를 수행하여 transfection 효율을 평균화하였다. 그 결과 pCAT p1 promoter는 LPS와 *C. militaris* 추출물을 처리한 세포에서 활성이 높게 나왔으며 특히, *C. militaris*추출물을 처리한 promoter의 활성이 강하게 나타남을 확인하였다. 또한 pCAT p2에서는 약간의 활성이 증가함을 확인하였다. Kim 등(1999)⁸⁾은 Exon I 5' 상위부위와 ExonII 5' 상위부위를 클로닝하여 raw 264.7 세포에 transfection 시킨 후 LPS를 처리한 결과 promoter의 활성이 증가하였으며 Exon I 상위부위에 IFN consensus sequence binding protein site가 -39에서 -13부위에 존재함을 보고하였다. 또한 이 부위를 인위적으로 제작하여 gel shift assay를 수행한 결과 LPS를 처리한 세포에서 결합체가 증가하였다. 본 실험 결과에서도 LPS를 처리한 promoter의 활성이 동일한 결과를 나타냈으며 특히, *C. militaris*를 처리한 promoter의 활성은 LPS의 활성보다 더 강함을 확인하였다(Fig. 18). 따라서 *C. militaris* 추출물이 IGIF의 promoter 활성에 관여하며 IFN consensus sequence binding protein site에 결합함을 추측 할 수 있다. 보고된 LPS 처리 결과와 비슷한 양상을 보였으며 *C. militaris* 는 pCAT p1 promoter에서 높은 활성을 보임을 확인하였다. 더 나아가 IGIF 결합 receptor와의 반응 여부 등을 조사하여 *C. militaris* 추출물이 IGIF 발현유도를 일으키는 기작을 밝혀내야 할 것으로 사료된다.

카. BDNF 유전자의 promoter부위의 cloning 및 CAT assay

C. militaris 추출물이 BDNF promoter의 활성에 미치는 영향을 연구하기 위해 exon I 5' flanking 부위와 exon I과 II 사이의 intron을 포함하는 유전자를 PCR 기법을 이용하여 pGEM T-easy vector에 클로닝하고, exon I의 5' flanking 부위를 클로닝 하였으며, intron과 exon I을 포함하는 promoter를 클로닝하여 각각 제한효소를 이용하여 pCAT basic벡터에 클로닝하여 제한효소로 확인한 후(Fig. 17), transfection시켜 CAT assay를 통하여 promoter의 활

성을 측정하였다. 그 결과 exon I의 5' flanking 부위를 포함한 부위에서 가장 강한 활성을 보였으며 Exon I과 Intron I을 모두 포함하는 promoter의 활성은 Exon I의 5' 상위부위에서보다 활성이 다소 낮아짐을 확인하였다. BDNF 유전자의 promoter가 4 개로 구성되어 있으며 그들 중 2 개는 신경조직 특이성을 가지며 나머지 두 개의 promoter는 비 신경조직 특이성을 가지고 있다고 보고하였다. 따라서 본 연구는 뇌에서의 발현을 분석하기 위하여 신경조직 특이성을 가지는 promoter를 클로닝 하였으며 이를 neuroblastoma cell인 SK-N-BE(2)C를 배양하여 사용하였다. Exon I의 5' 상위부위의 활성이 높음을 확인하였다. 그의 결과를 보면 Exon I과 II의 5' 상위부위를 분리하여 염기서열을 분석하였으며 쥐와 비교할 때 그 서열이 유사하였다. 각각의 비 암호화 부위가 500 bp정도이며 쥐와 생쥐의 상동성이 93%였다. 두 종의 보존된 서열인 AP1과 C/EBP부위의 전사조절 결합부위를 분석하기 위해 luciferase reporter 유전자를 이용해 primary cortico-hippocampal culture를 하여 transfection하고 kainic acid를 처리한 결과, exon I의 전사시작 부위로부터 989 위치에 kainic acid 조절반응인자가 위치해 있음을 보고하였다. 따라서 본 연구의 결과로 보아 *C. militaris* 추출물이 BDNF의 promoter의 exon I 상위부위에서 높은 활성이 kainic acid와 같이 *C. militaris* 추출물 성분이 전사조절인자 또는 promoter 부위에 전사조절 부위가 있음을 예상 가능케 한다. 또한 이는 특히 퇴행성 뇌질환에 밀접한 관련이 있으므로 *C. militaris*가 치료제로서의 가능성을 확인하였다(Fig. 18).

타. Neurotrophic factor 유전자 발현.

GDNF와 TH의 발현유도를 확인한 결과 에탄올 및 물 추출물을 투여 한 후 2 시간에서 발현이 강하게 나타난 후 시간이 경과함에 따라 감소함을 확인하였으며 에탄올보다는 물 추출물에서 발현이 더 강하게 나타남을 확인하였다(Fig. 19). NGF는 에탄올 추출물에서는 2 시간, 물 추출물에서는 2~4 시간까지 발현이 강하게 나타남을 확인하였고(Fig. 20), 추출물에 대한 양상으로 볼 때 에탄올에서는 일시적으로 2 시간에서 반응이 강하게 나타나며 물

추출물에서는 8 시간까지 지속적으로 발현이 나타남을 확인하였다.

파. PC 12 세포에서 GDNF유전자 발현유도

*In vitro*에서는 두 가지 추출물 중에서 강한 발현유도를 하는 물 추출물을 PC12 cell에 투여 ($5 \mu\text{g/ml}$)한 후 2 시간, 4 시간, 8 시간 경과 후 IL-18 및 neurotrophic factor의 발현유도를 확인한 결과 2 시간에서 강하게 유도됨을 확인하였다(Fig. 19).

하. *C. militaris*의 항암효과

C. militaris 에탄올 추출물에 의한 암세포 사멸효과를 확인한 결과 Fig. 21 처럼 정상 섬유아세포에서는 $10\sim 100 \mu\text{g/ml}$ 농도에서 오히려 세포 증식 효과를 가져 왔지만, PC 12에서는 $50 \mu\text{g}\sim 100 \mu\text{g/ml}$ 농도에서, 위암 세포주인 SNU 484, 638세포, 그리고 HePG 2 세포에서는 $50\sim 100 \mu\text{g/ml}$ 농도에서 암세포 사멸효과를 확인할 수 있었다. 또한 *C. militaris* 에탄올 침전에 의해 얻은 분획에서의 암 세포 사멸효과는 Fig. 22에서처럼 $22.5\sim 157.5 \mu\text{g}$ 까지 처리한 정상 섬유아세포에서 세포독성을 나타내지 않았고, PC12세포에서는 $22.5\sim 67.5 \mu\text{g}$ 처리농도까지, 위암 세포주 SNU 638 세포주에서는 $112.5 \mu\text{g}$ 농도에서 암세포사멸효과를 확인하였다.

또한 *C. militaris* 균사체 추출물에서의 암세포 사멸효과를 확인한 결과는 Fig. 27에서처럼 정상 섬유아세포에서는 세포독성을 나타내지 않았으며, 위암 세포주인 484, 638에서는 각각 $100 \mu\text{g/ml}$ 농도에서, 601에서는 $1\sim 0.1 \mu\text{g/ml}$ 농도에서 암세포 사멸 효과를 확인하였다. 아울러 *C. militaris* 균사체에 selenium(Se)과 germanium(Ge)을 첨가하여 성장한 *C. militaris* 균사체에 의한 암세포 사멸효과에서는 Fig. 24와 25에서처럼 암세포사멸효과를 확인하였다. Se-*C. militaris* 균사체 처리 정상 섬유아세포에서 $100 \mu\text{g/ml}$ 농도에서 세포독성을 나타내었기 때문에 암세포주에의 효과도 추출물 성분의 세포독성으로 판단하였고(Fig. 24), 이런 결과 PC 12세포에서는 $10\sim 1 \mu\text{g/ml}$, 484, 601,

638 세포주에서는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 암 세포 사멸효과를 확인하였다. 또한 Ge-*C. militaris* 추출물에서는(Fig. 25) NIH3T3세포에서 세포독성이 20 %미 만이므로 이들의 농도까지 암세포 사멸효과에 적용한 결과, 484 에서는 10~1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 601 세포주에서는 100~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도까지, 그리고 638 세포주에서는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, HeLa 세포주에서는 10~1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 암세포 사멸효과가 있었다.

또한 *C. militaris* 메탄올 추출물에서는 Fig 26에서처럼 NIH3T3세포에서의 세포독성이 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 70%, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 30%을 나타내었지만 위암 세포주(601)와 난소암 세포(OV-3) 그리고 폐암 세포(A-549)에선 각각 100~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 추출물 처리에 따라 90~86 %, 85~50 %, 그리고 88~74%의 암세포 억제 효과를 나타내었다.

마지막으로 *C. militaris* 열수 추출물에서의 암세포 사멸효과를 확인한 결과는 Fig. 27에 나타내었다. 484 세포에서는 100~10 μg 처리에 의해 60%까지, 601 과 638 세포주에서는 암세포의 증식만을 억제하였고, A549와 OV-3 세포 주에서는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 가장 우수한 암 세포 사멸 효과를 나타내었다.

Table 1. Oligonucleotide primers for PCR

Gene name	5' Primer	3' Primer	product size (base)
Mouse IGF	5'ATGGCTGCCATGTCAGAAGA3'	5'CTCTATAAATCATGCAGCCT3'	700
Rat IGF	5'ATGGCTGCCATGTCAGAAGA3'	5'GTAGGTTATCATAAAGGCTCG3'	654
PC12 IGF	5'ATGGCTGCCATGTCAGAAGA3'	5'GTAGGTTATCATAAAGGCTCG3'	654
Rat IFN- γ	5'TGAACAACCCACAGATCCAG3'	5'GCCGATGTATAGACATTCCT3'	653
Mouse BDNF	5'ACCAGGTGAGAAGAGTGA3'	5'CCACTATCTTCCCCTT3'	750
GDNF	5'-AGCTGCCAGCCCAGAGAATT-3'	5'-GATACATCCACACCGTTTAG-3'	340
NGF	5'-TGGACCCAAGCTCACCTCA-3'	5'-GTGGATGAGCGCGCTTGCTCCT-3'	430
TH	5'-GCTGTCACGTCCCCAAGGTT-3'	5'-AAGCGCACAAAATACTCCAGG-3'	320
β -actin	5'CCTCTATGCCAACACAGT3'	5'AGCCACCAATCCACACAG3'	153



Fig. 1. pGEM-T Easy vector circle map.

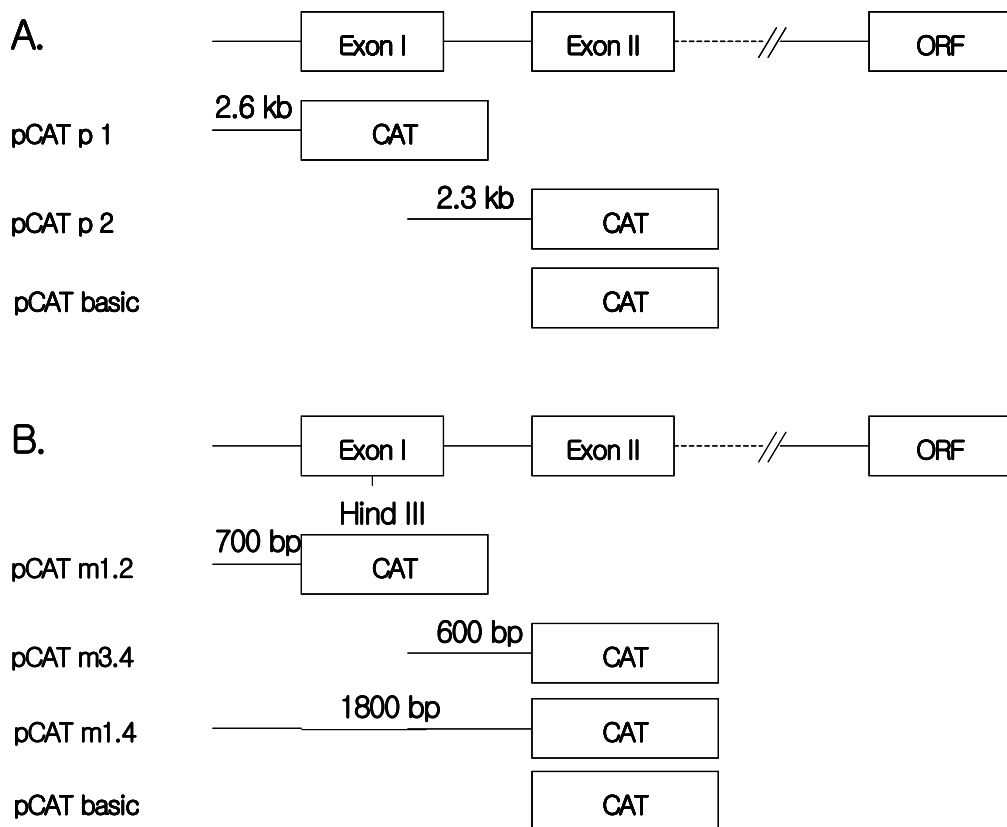


Fig. 2. Schematic representation of the mouse IGIF(A) and BDNF promoter(B).

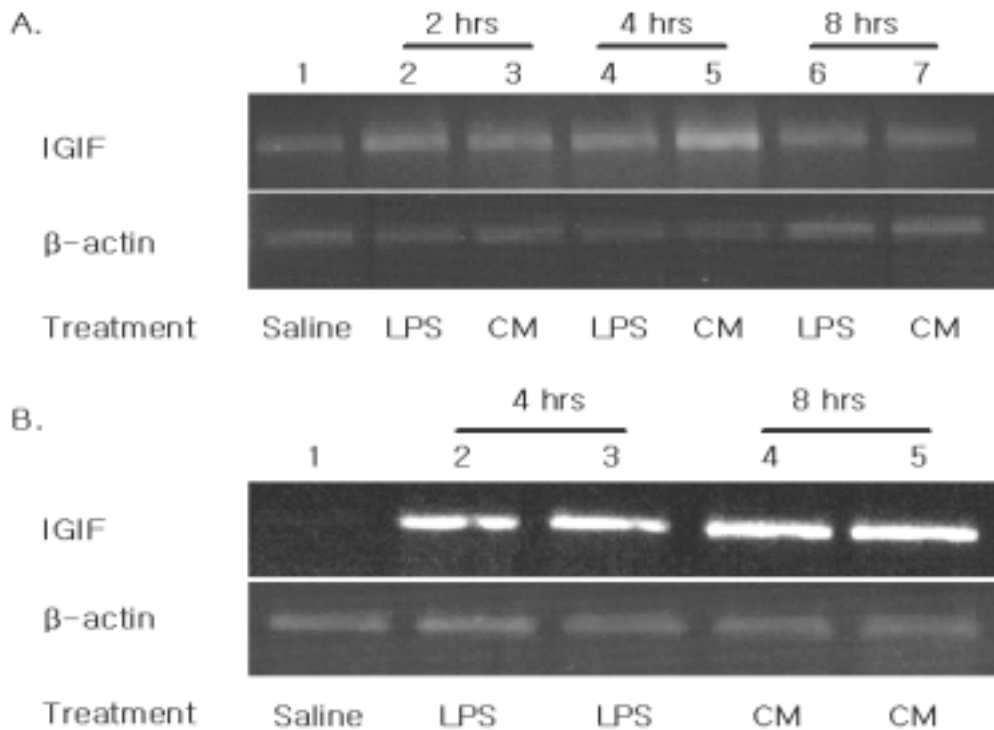


Fig. 3. Induction of IGIF expression by *C. militaris*(CM) and LPS in mouse brain(A) and liver(B). Amounts of *C. militaris* extract(20 mg/kg) and LPS(10 mg/kg) were injected . A: lane 1, saline-treated. lane 2, LPS-treated for 2 hrs. lane 3, *C. militaris* extract-treated for 2 hrs. lane 4, LPS-treated for 4 hrs. lane 5, *C. militaris* extract-treated for 4 hrs. lane 6, LPS-treated for 8hrs. 7, *C. militaris* extract-treated for 8 hrs. B: lane 1, saline-treated. lane 2, LPS-treated for 4 hrs. lane 3, LPS-treated for 8 hrs. lane 4, *C. militaris* extract-treated for 4 hrs. lane 5, *C. militaris* extract-treated for 8 hrs. The PCR products were visualized on agarose gel (1.2 %) electrophoresis and stained with ethidium-bromide, and then photographed.

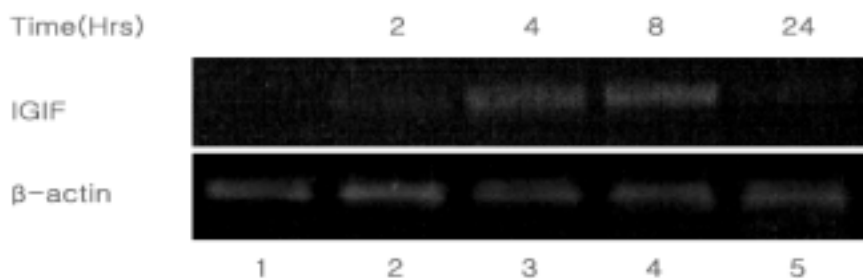


Fig. 4. Induction of IGIF expression by *C. militaris* in mouse brain. Amounts of *C. militaris* extract(40 mg/kg) was injected by oral injection. A: lane 1, saline-treated. lane 2, 2 hrs. lane 3, 4 hrs. lane 4, 8 hrs. lane 5, 24 hrs.

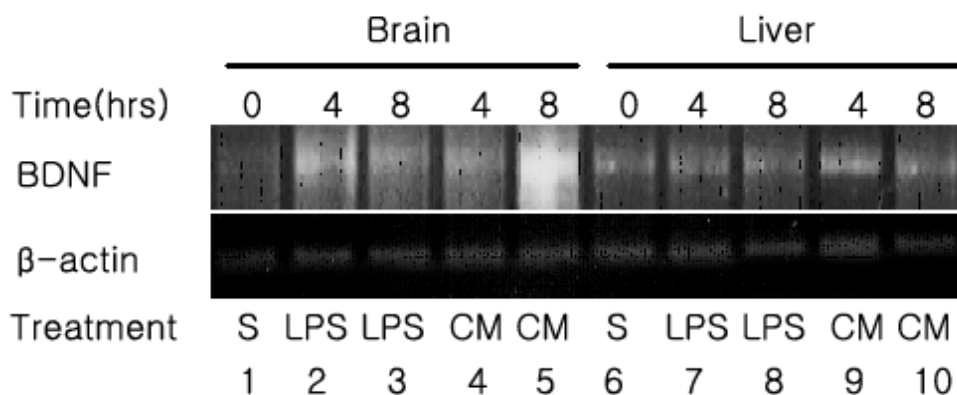


Fig. 5. Induction of BDNF expression by *C. militaris*(CM) and LPS in mouse brain and liver. Amounts of *C. militaris* extract(20 mg/kg) and LPS(10 mg/kg) were injected. lane 1 and 6, saline-treated for 4 hrs. lane 2 and 7, LPS-treated for 4 hrs. lane 3 and 8, LPS-treated for 8 hrs. lane 4 and 9, *C. militaris* extract-treated for 4 hrs. lane 5 and 10, *C. militaris* extract-treated for 8 hrs.

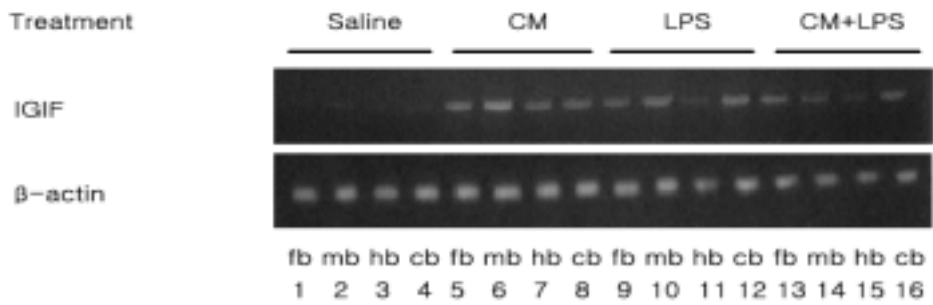


Fig. 6. Induction of IGIF expression by *C. militaris*(CM) and LPS in different rat brain. Amounts of *C. militaris* extract(20 mg/kg) and LPS(10 mg/kg) were injected for 4 hrs. lane 1~4, saline-treated brain. lane 5~8, *C. militaris* extract-treated. 9~12, LPS-treated. lane 13~16, *C. militaris* extract and LPS treated. lane 1, 5, 9, 13; forebrain(fb). lane 2, 6, 10, 14; midbrain(mb). lane 3, 7, 11, 15; hindbrain(hb). lane 4, 8, 12, 16; cerebellum(cb).

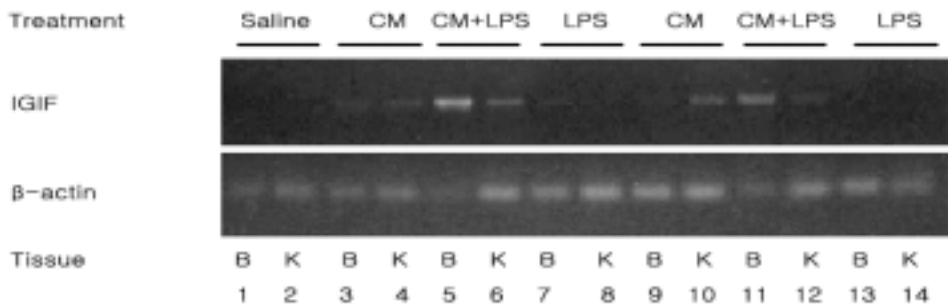


Fig. 7. Induction of IGIF expression by *C. militaris*(CM) and LPS in rat brain and kidney. Amounts of *C. militaris* extract(20 mg/kg) and LPS(10 mg/kg) were injected. lane 1, 2, saline-treated brain and kidney for 4 hrs. lane 3, 4, 11, 12; *C. militaris* extract-treated. lane 7, 8, 9, 10; LPS-treated. lane 5, 6, 13, 14; LPS and *C. militaris* extract-treated: lane 3, 5, 7, 9, 11, 13; brain(B). lane 4, 6, 8, 10, 12; kidney(K): lane 3, 4, 5, 6, 7, 8; treated for 4 hrs. lane 9, 10, 11, 12, 13, 14; treated for 8 hrs.

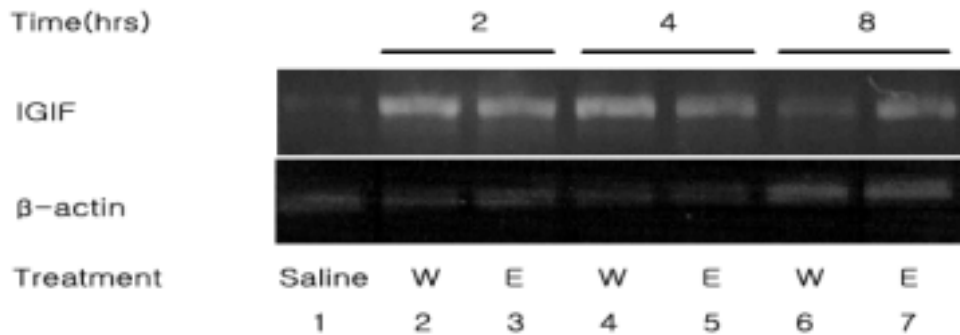


Fig. 8. Induction of IGIF expression in mouse brain by different extraction method of *C. militaris* with water(W) and ethanol(E). Amounts of *C. militaris* extract(20 mg/kg) were injected. lane 1, saline-treated for 4hrs. lane 2, 4, 6; extracted with water. lane 3, 5, 7; extracted with ethanol: lane 2, 3; treated for 2 hrs. lane 4, 5; treated for 4 hrs. lane 6, 7 treated for 8 hrs.

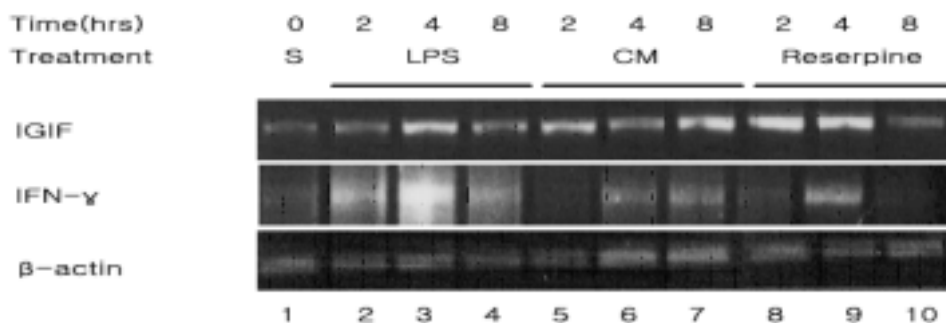


Fig. 9. Induction of IGIF and IFN-γ expression by *C. militaris*(CM), LPS and reserpine in PC 12 cells. Amounts of *C. militaris* extract(20 mg/kg) and LPS(10 mg/kg) were injected. lane 1, treated with saline for 2 hrs; lane 2, 3, 4, treated with LPS; lane 5, 6, 7, treated with *C. militaris*. lane 8, 9, 10; treated with reserpine: lane 2, 5, 8; treated for 2 hrs. lane 3, 6, 9; treated for 4 hrs. lane 4, 7, 10; treated for 8 hrs.

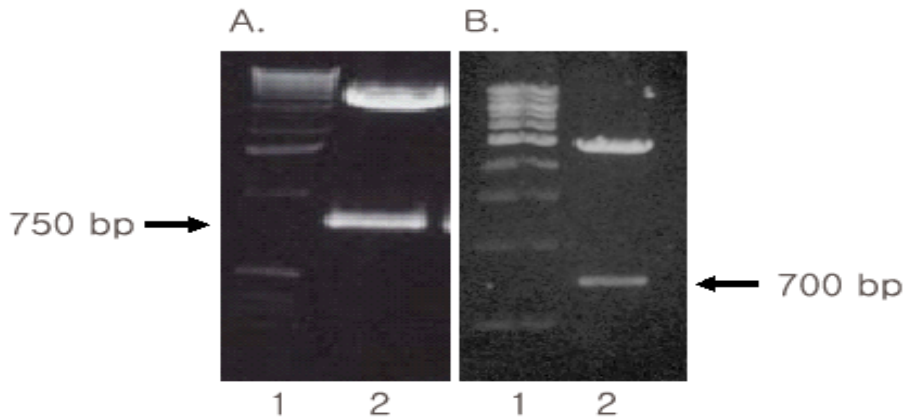


Fig. 10. Restriction enzyme digestion of the recombinant pBDNF(A) and pIGIF(B). (A)Lanes 1, 1kb ladder molecular weight marker(England biolab, USA); Lane 2, pBDNF; (B)Lanes 1, 1kb ladder molecular weight marker(GOBCO BRL, USA); Lane 2, pIGIF; pBDNF and pIGIF digested with *EcoR* I.

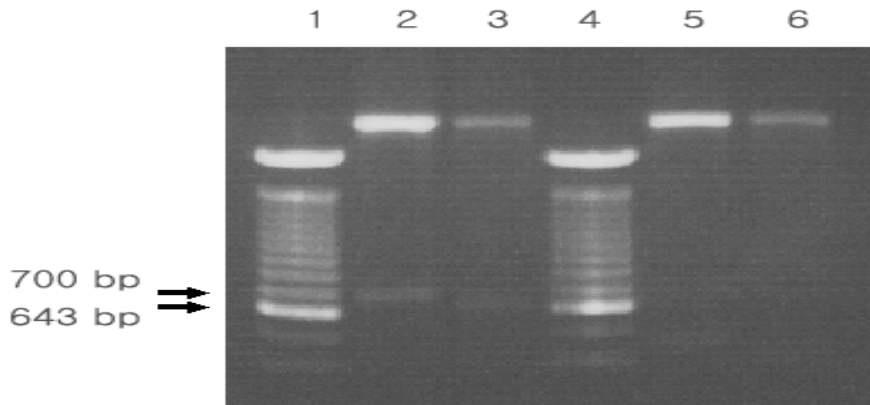


Fig. 11. Restriction enzyme digestion of the recombinant pIGIF and pIGIFiso. Lane 1, 100bp standard marker; lane 2, 3, Digested with *EcoR* I; Lane 4, Marker; Lane 5, 6, Digested with *EcoR* I and *EcoR* V.

mouse GIF	ATGGCTGCCATGTCAGAAGA CTCTTGCCTCAACTTCAAGGAAATGATGTTTATTGACAACA
rat GIF	ATGGCTGCCATGTCAGAAGAAGGCTCTTGTGTCAACTTCAAAGAAATGATGTTTATTGACAACA
PC12 GIF	ATGGCTGCCATGTCAGAAGAAGGCTCTTGTGTCAACTTCAAAGAAATGATGTTTATTGACAACA
mouse GIF	CGCTTTACTTTTACCTGAAGAAAATGGAGACCTGGAATCAGACAACCTTTGGCCGACTTCACTG
rat GIF	CACTTTACCTTATACCTGAAGATAATGGAGACTTGGAAATCAGACCACCTTTGGCAGACTTCACTG
PC12 GIF	CACTTTACCTTATACCTGAAGATAATGGAGACTTGGAAATCAGACCACCTTTGGCAGACTTCACTG
mouse GIF	TACAACCGCAGTAATACGGAATATAAATGACCAAGTTCTCTTGTGACAAAAGACA GCCT
rat GIF	TACAACCGCAGTAATACGGAGCATAAATGACCAAGTTCTCTTGTGACAAAAGAAACCCGCCT
PC12 GIF	TACAACCGCAGTAATGCGGAGCATAAATGACCAAGTTCTCTTGTGACAAAAGAAACCCGCCT
mouse GIF	GTGTTTCGAGGATATGACTGATATTGATCGAAGTGCCAGTGAACCCAGACCAGACTGATAATAT
rat GIF	GTGTTTCGAGGACATGCCTGATATCGACCGAACAGCCAACGAATCCCAGACCAGACTGATAATAT
PC12 GIF	GTGTTTCGGGACATGCCTGATATCGACCGAACAGCCAACGAATCCCAGACCAGACTGATAATAT
mouse GIF	ACATGTACAAAGACAGTGAAGTAAGAGGACTGGCTGTGACCCTCTCTGTGAAGGATAGTAAAT
rat GIF	ATATGTACAAAGATAGTGAAGTAAGAGGACTGGCTGTGACCCTATCTGTGAAGGATGGAAGGAT
PC12 GIF	ATATGTACAAAGATAGTGAAGTAAGAGGACTGGCTGTGACCCTATCTGTGAAGGATGGAAGGAT
mouse GIF	GTCTACCCTCTCCTGTAAGAACAAGATCATTTCCCTTTGAGGAAATGGATCCACCTGAAAAATATT
rat GIF	GTCTACCCTCTCCTGTAAAAAACAAAATCATTTCCCTTTGAGGAAATGAATCCACCTGAAAAATATT
PC12 GIF	GTCTACCCTCTCCTGTAAAAAACAAAATCATTTCCCTTTGAGGAAATGAATCCACCTGAAAAATATT
mouse GIF	<u>GATGATATACAAAGTATCTCATATTCTTTTCAGAAACGTGTCCAGGACACACAACAAGATGGAGT</u>
rat GIF	<u>GATGATATAAAAAGTATCTCATATTCTTTTCAGAAACGTGTCCAGGACACACAACAAGATGGAAT</u>
PC12 GIF	<u>GATGATATAAAAAGTATCTCATATTCTTTTCAGAAACGTGTCCAGGACACACAACAAGATGGAAT</u>
mouse GIF	TTGAATCTTCCCTGTATGAAGGACACTTTCTTGTGTTGCCAAAAGGAAGATGATGCTTTCAAAC
rat GIF	TTGAATCTTCCCTGTATGAAGGACACTTTCTAGCTTGTCCAAAAGGAAGATGATGCTTTCAAAC
PC12 GIF	TTGAATCTTCCCTGTATGAAGGACACTTTCTAGCTTGTCCAAAAGGAAGATGATGCTTTCAAAC
mouse GIF	CATTCTGAAAAAAGGATGAAAAATGGGGATAAATCTGTAATGTTCACTCTCACTAECTTACAT
rat GIF	CGTTTTGAAAAGGAAGGATGAAAAATGGGGATAAATCTGTAATGTTCACTCTCACTAECTTACAT
PC12 GIF	CGTTTTGAAAAGGAAGGATGAAAAATGGGGATAAATCTGTAATGTTCACTCTCACTAECTTACAT
mouse GIF	CAAAGTTAGGTGGGGAGGGTT TGTGTTCCAGAAAAGATGATTAGCACACATGCGCCTTGTGAT
rat GIF	CAAAGTTAGGTATTAAGGTTTCTGTATTCCAGAAA GACGATTAGTATACACGAGCCTTATGAT
PC12 GIF	CAAAGTTAGGTATTAAGGTTTCTGTATTCCAGAAA GACGATTAGTATACACGAGCCTTATGAT
mouse GIF	GACCT C
rat GIF	AACCTAC
PC12 GIF	AACCTAC

Fig. 12 . Comparison of IGIF gene nucleotide sequences from mouse, rat and PC12 cell. The identical sequences are grouped in boxes. The underlined portion is absent in the PC12 short form.

MouseIGIF	MAAMSED SCVNFKEMMFIDNTLYFIP EENG DLESDNFGRLHCTTAVIRNINDQV
RatIGIF	MAAMSEEGSCVNFKEMMFIDNTLYLIPEDNGDLESDHFGRLHCTTAVMRSINDQV
PC12IGIF	MAAMSEEGSCVNFKEMMFIDNTLYLIPEDNGDLESDHFGRLHCTTAVIRNINDQV
MouseIGIF	LFVDKRQP VFEDMTDIDQSASEPQTRLIIMYKDSEVRGLAVTLSVKDSKMSTL
RatIGIF	LFVDKRNPVFGDMPDIDRTANESQTRLIIMYKDSEVRGLAVTLSVKDGRMSTL
PC12IGIF	LFVDKRNPVFE DMPDIDRTANESQTRLIIMYKDSEVRGLAVTLSVKDGRMSTL
MouseIGIF	SCKNKIISFE <u>EMDPPENIDDIQSDL</u> IFFQKRVPGHNKMEFESSLYEGHFLACQKE
RatIGIF	SCKNKIISFE <u>EMNPPENIDDIKSDL</u> IFFQKRVPGHNKMEFESSLYEGHFLACQKE
PC12IGIF	SCKNKIISFE <u>EMNPPENIDDIKSDL</u> IFFQKRVPGHNKMEFESSLYEGHFLACQKE
MouseIGIF	DDAFKLILKK KDENGDKSVMFTLTNLHQS
RatIGIF	DDAFKLVL LKRKDENGDKSVMFTLTNLHQS
PC12IGIF	DDAFKLVL LKRKDENGDKSVMFTLTNLHQS

Fig. 13. Homology between IGIF amino acid sequences from mouse, rat and PC12 cell. The identical sequences are grouped in boxes. The underlined portion is absent in the short form.

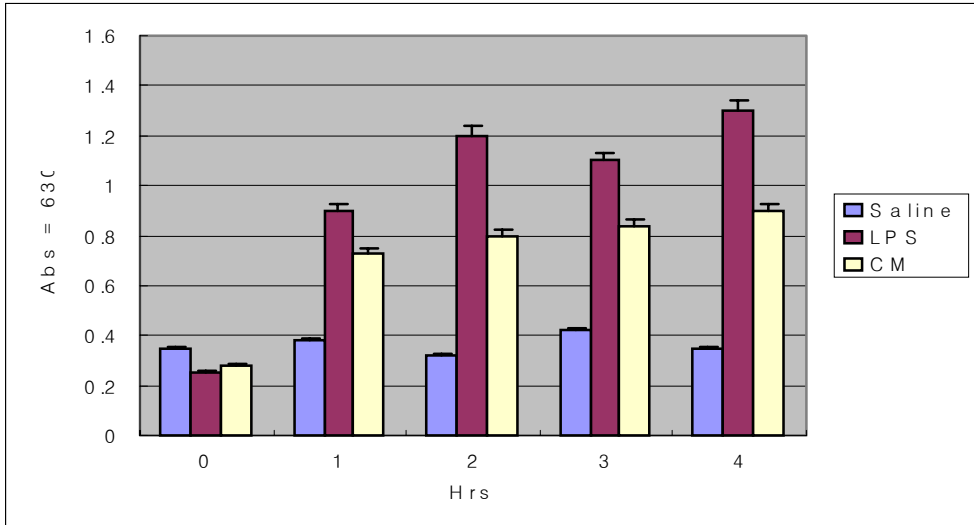


Fig. 14. Effects of *C. militaris* and LPS on IFN- γ Induction in PC12 cells. *C. militaris* (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and LPS(2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were injected.

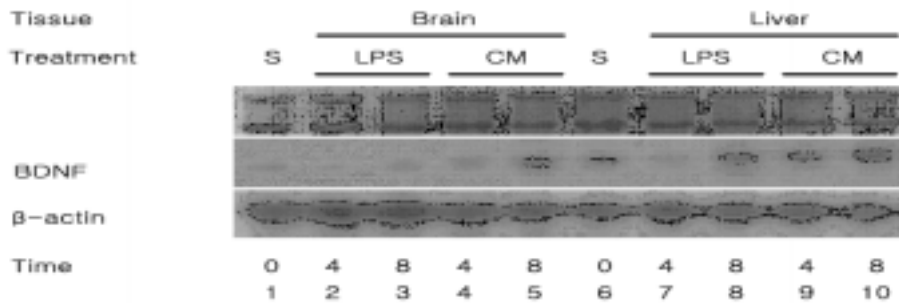


Fig. 15. Formaldehyde agarose gel(1.2 %) electrophoresis of total RNA(20 μg)(A) and Northern blot analysis of BDNF mRNA from mouse brain and liver(B) using mouse BDNF cDNA coding region as probes. Amounts of *C. militaris* extract(20 mg/kg) and LPS(10 mg/kg) were injected. As a control experiment, 153-bp product of β -actin was amplified.

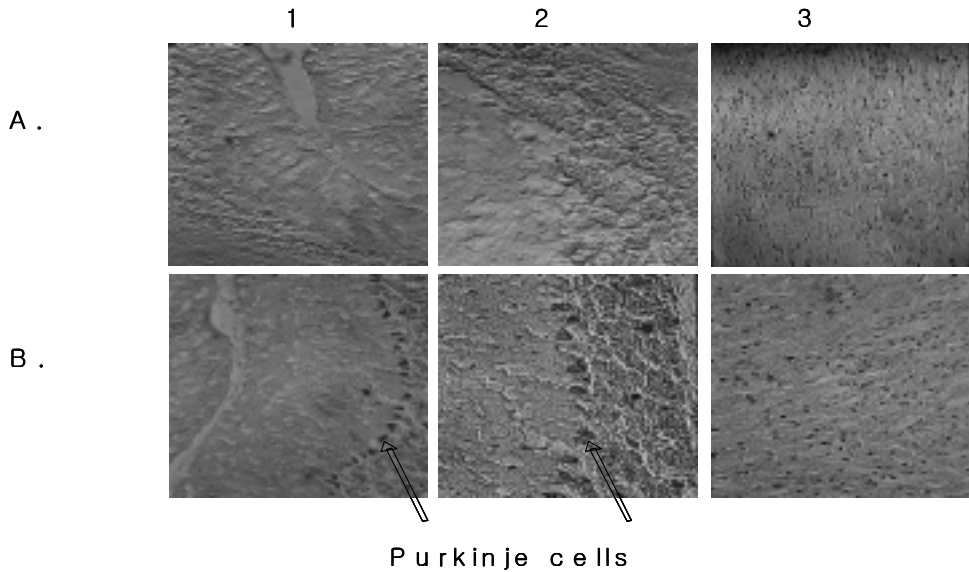


Fig. 16. Immunohistochemistry of IGIF protein in mouse brain. *C. militaris* extract(20 mg/kg) was injected and sectioned after 4 hrs. A, saline treated; B, *C. militaris* extreats treated. 1, cerebellum(20×); 2, cerebellum(40×); 3, midbrain(20×)

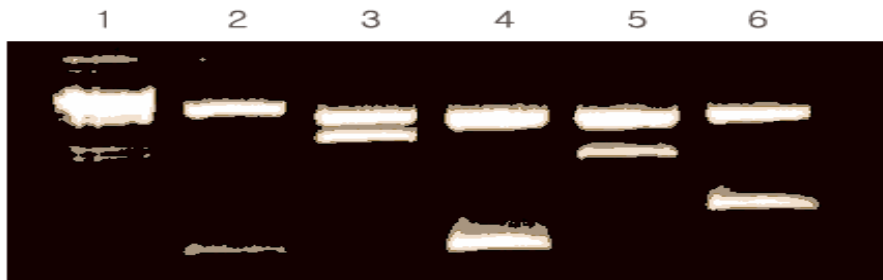


Fig. 17. Restriction enzyme digestions of the recombinant pCAT vector. lane 1, λ /HindIII marker; lane 2, pCAT p1 digested with *hind*III; lane 3, pCAT p2 digested with *pst* I; lane 4, pCAT m1.2 digested with *pst* I and *sph* I; lane 5, pCAT m1.4 digested with *pst* I and *sph* I; lane 6, pCAT m3.4 digested with *Hind*III and *pst* I.

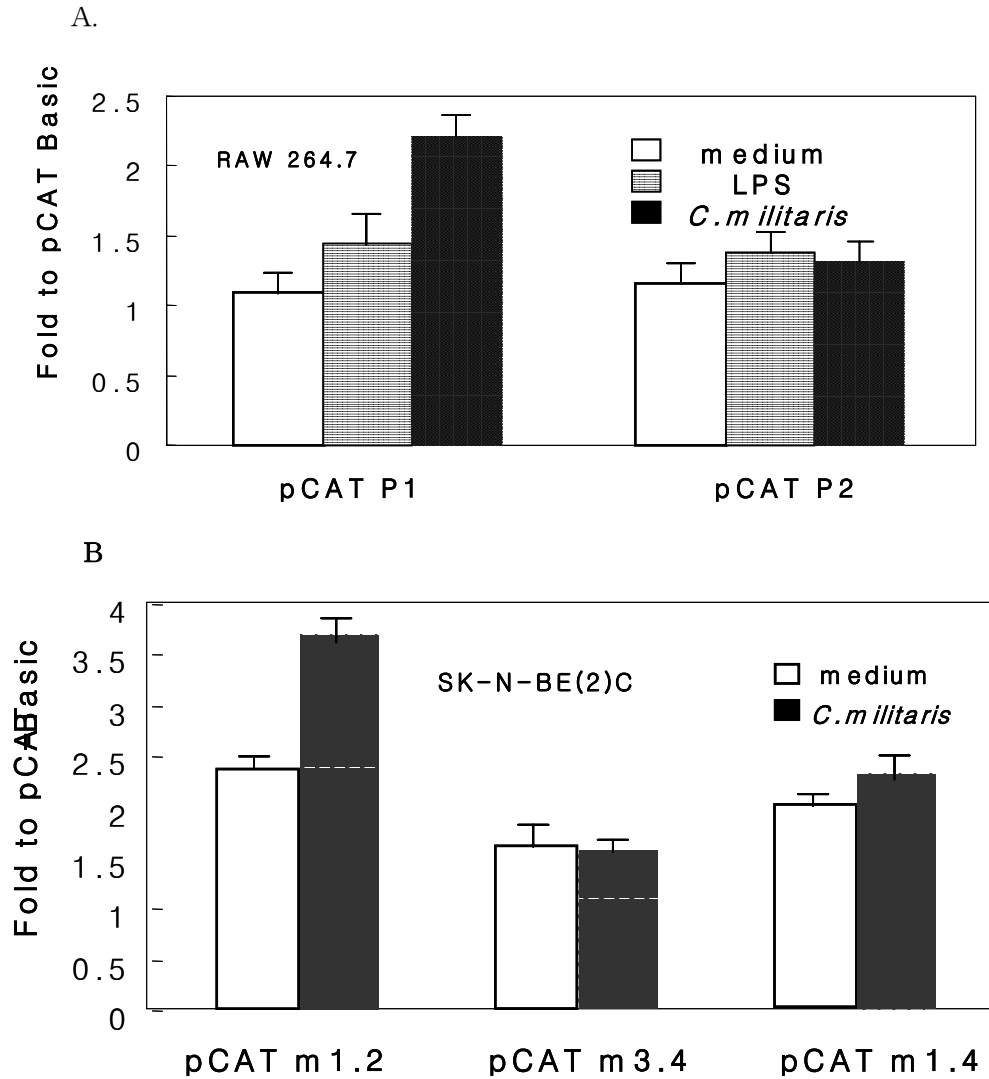
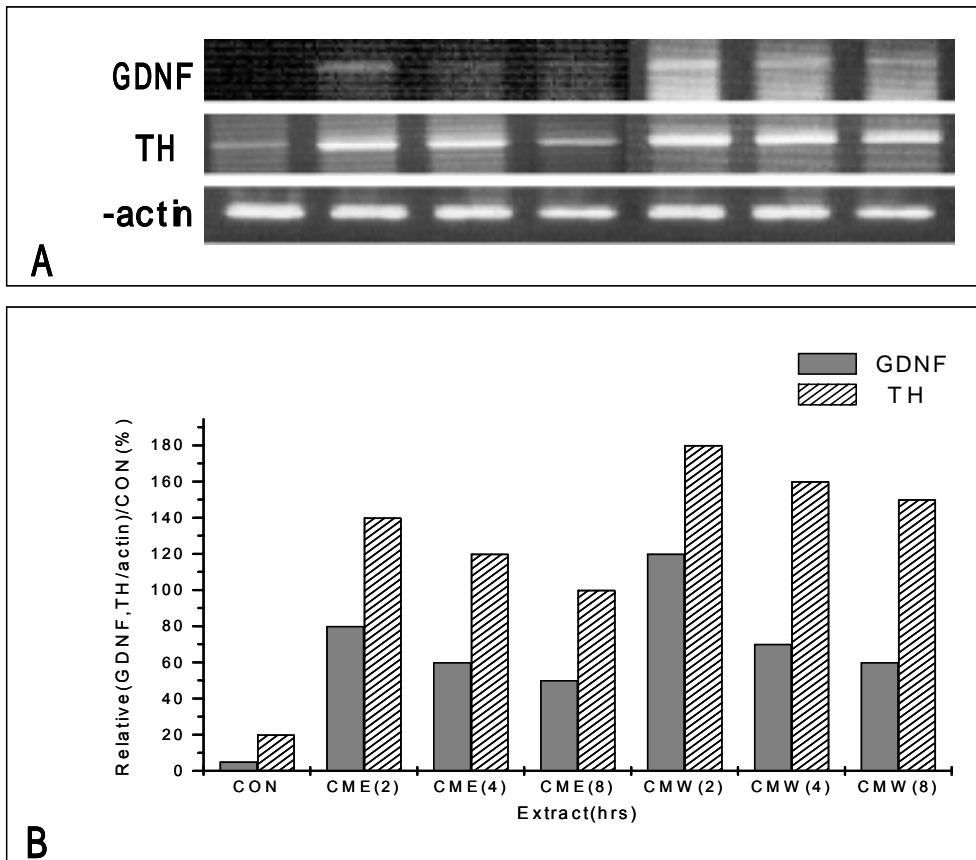
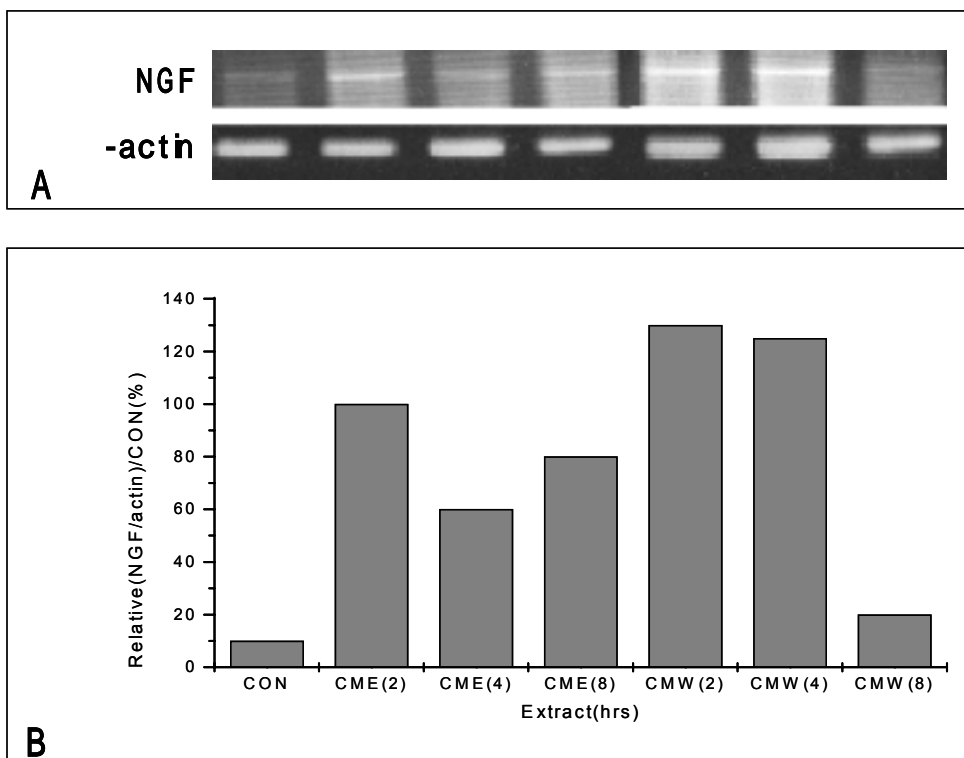


Fig. 18. Transient expression analysis of CAT constructs of the mouse IGIF(A) and BDNF(B) promoter. These plasmids were used to transfect the raw 264.7 macrophage and the human neuroblastoma SK-N-BE(2)C using the lipofectamine reagent. CAT activity was measured using the CAT-ELISA kit and normalized with β -Gal activity by using pCMV β -gal.



*Abbreviation: CON, control; CME, ethanol extract of *C. militaris*; CMW, water extract of *C. militaris*

Fig. 19. Induction of GDNF and TH mRNA by the extract of *C. militaris*. The extract was intraperitoneally injected into a mouse as a time indicated. After 2 to 8 hrs, the mouse brain was obtained and RT-PCR was performed as described in Materials and methods. The resulting PCR products were electrophoresed onto 1.2 % agarose gel and visualized with 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ethidium bromide (A). The relative increase of the level of GDNF and TH mRNA is expressed in panel (B).



*Abbreviation: CON, control; CME, ethanol extract of *C. militaris*; CMW, water extract of *C. militaris*

Fig. 20. Induction of NGF mRNA by the extract of *C. militaris*.

The extract was intraperitoneally injected into a mouse as a time indicated. After 2 to 8 hrs, the mouse brain was obtained and RT-PCR was performed as described in Materials and methods. The resulting PCR products were electrophoresed onto 1.2 % agarose gel and visualized with 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ethidium bromide (A). The relative increase of the level of NGF mRNA is expressed in panel (B).

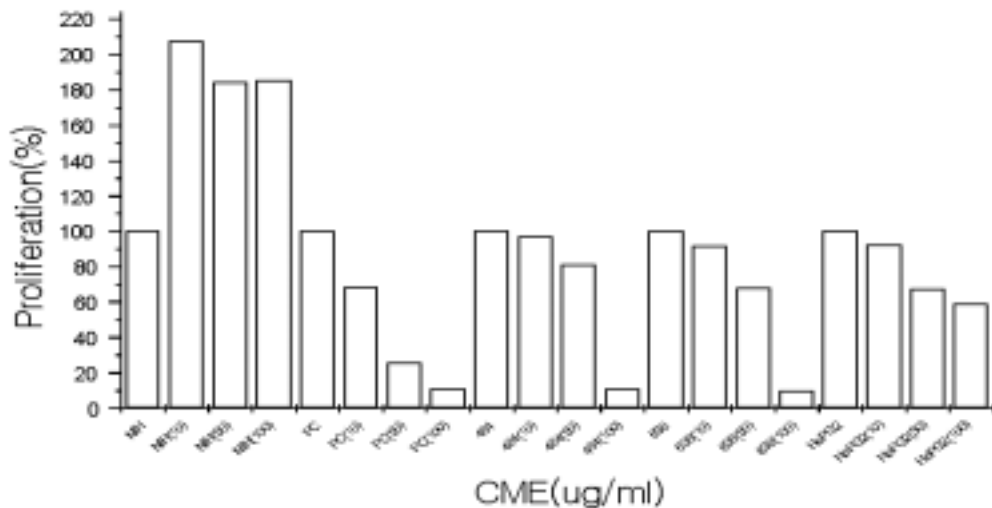


Fig. 21. Effect of EtOH-extract(CME) from *C. militaris* on the growth of tumor cell lines.

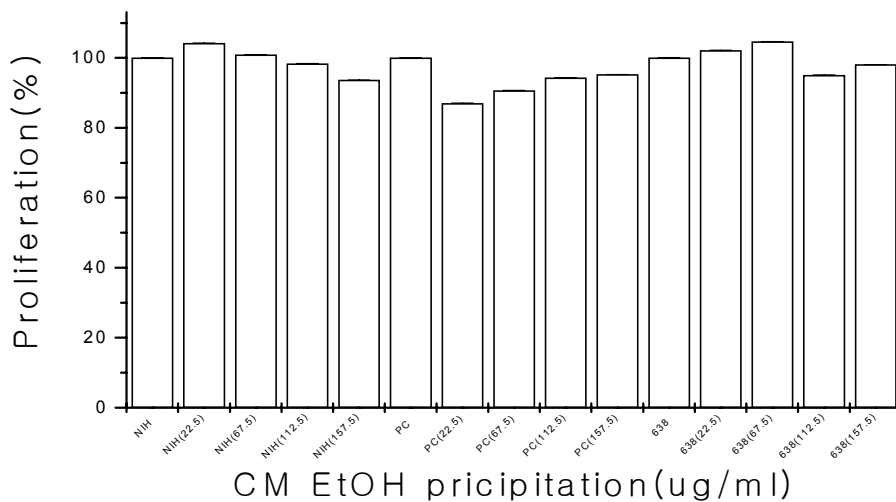


Fig. 22. Effect of EtOH-precipitation extract from *C. militaris* on the growth of tumor cell lines.

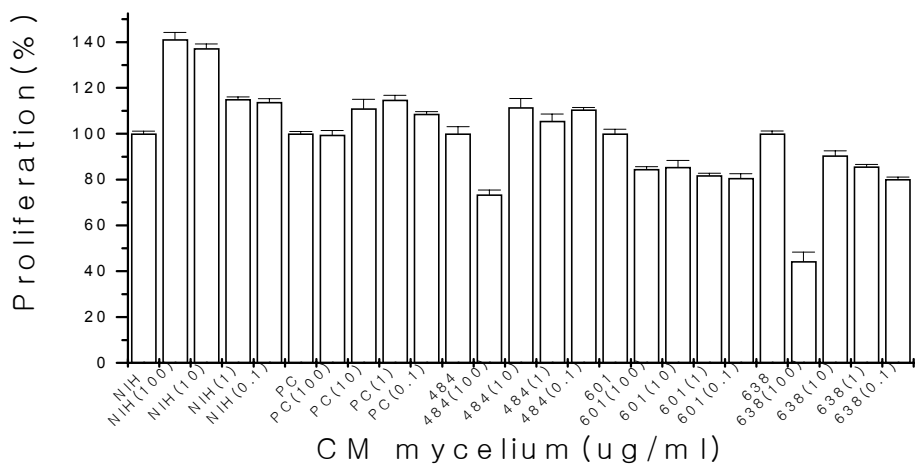


Fig. 23. Effect of extract from *C. militaris* mycelium on the growth of tumor cell lines.

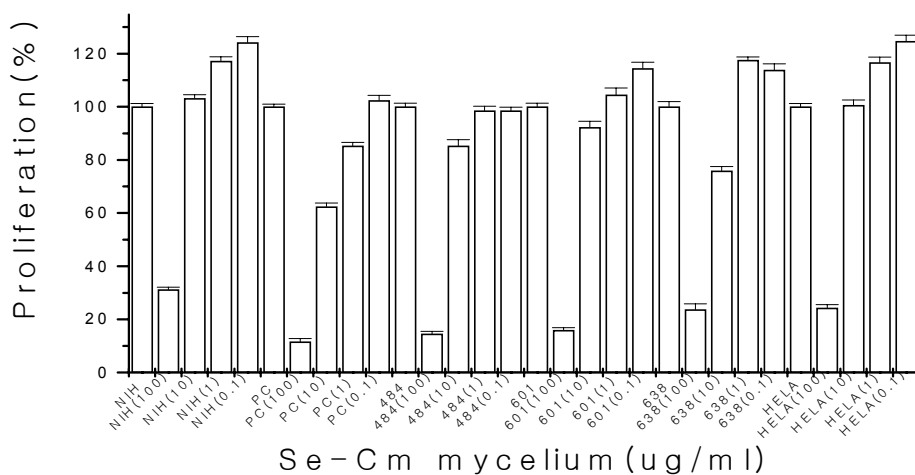


Fig. 24. Effect of extract of selenium-contained *C. militaris*(Se-CM) mycelium on the growth of tumor cell lines.

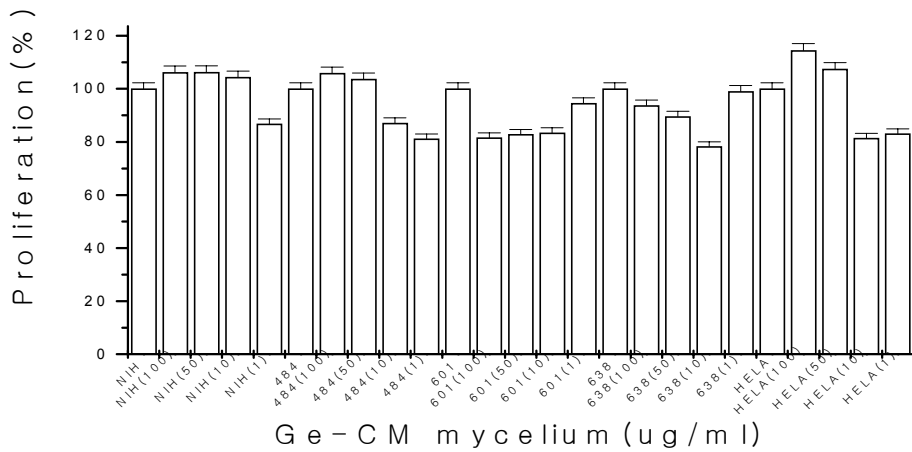


Fig. 25. Effect of extract of Germanium-contained *C. militaris* mycelium(Ge-CM) from *C. militaris* Germanium added mycelium on the growth of tumor cell lines.

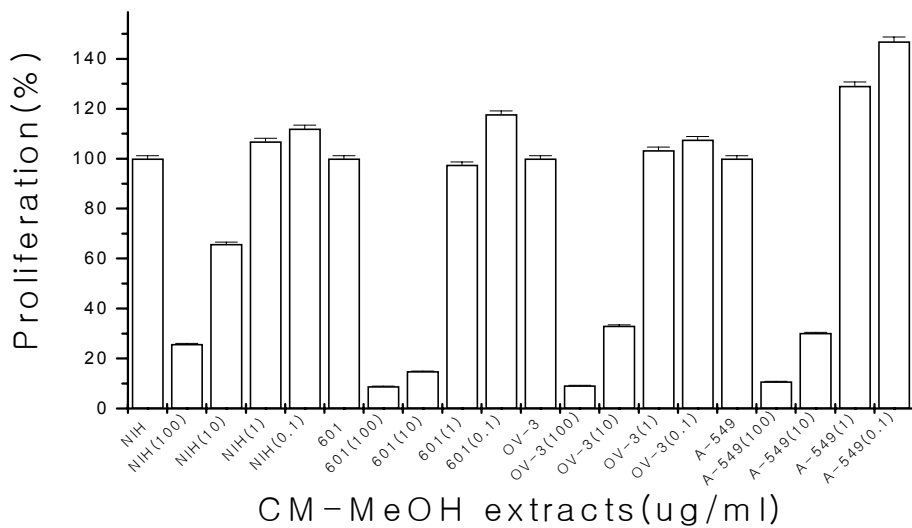


Fig. 26. Effect of methanol extract from *C. militaris* mycelium (CM-MeOH) on the growth of tumor cell lines.

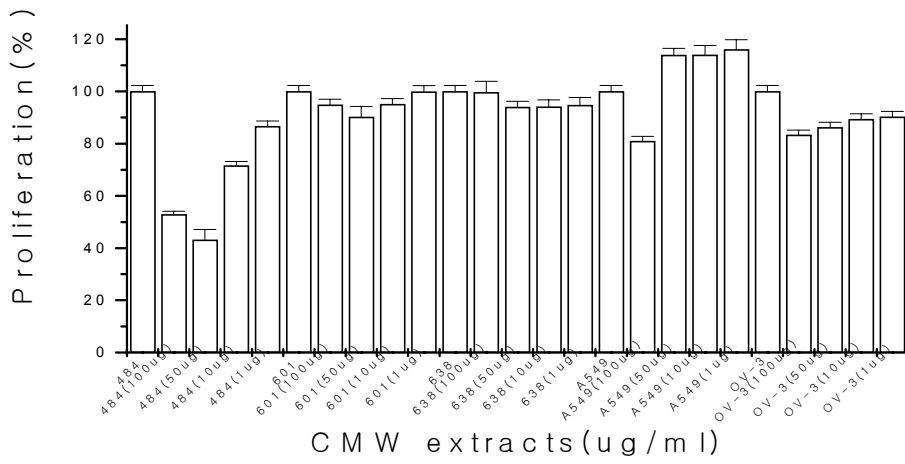


Fig. 27. Effect of water extracts (CMW) from *C. militaris* mycelium on the growth of tumor cell lines.

4. 적요

생쥐에 *C. militaris*의 추출물과 LPS를 주사한 후, 4 시간과 8 시간 경과 후 IGIF mRNA의 발현유도를 RT-PCR를 이용하여 분석한 결과 *C. militaris*의 추출물이 LPS에서보다 발현이 증가하였다. 또한 쥐에서는 뇌의 각 부위에서 발현하였으며 신장에서도 IGIF가 발현됨을 확인하였다. *C. militaris*의 추출물 방법을 달리한 실험에서는 물과 ethanol추출 모두 IGIF의 발현을 증가 시켰으며 특히 ethanol 추출은 8 시간에서도 발현이 지속됨을 확인하였다.

PC12 세포에서는 LPS 처리 후 4 시간과 8 시간에 IGIF의 발현이 증가하였으며 *C. militaris*의 추출물을 처리한 결과는 4 시간 후에 강한 발현 유도를 보였다. 이러한 IGIF의 발현으로 인해 IFN- γ 도 LPS와 *C. militaris*의 추출물 처리 모두 4 시간과 8 시간에서 발현이 증가함을 확인하였다.

PC 12세포에서는 RT-PCR을 수행한 결과 두 개의 밴드를 확인할 수 있었으며 그 중 주요 밴드는 IGIF의 cDNA임을 염기서열 분석을 통해 확인하였으며 그 상동성을 인간과 쥐와 비교했을 때 각각 74%와 91%의 상동성을 확인하였다. 또한 희미하게 발현되는 다른 유전자를 클로닝하여 염기서열을 분석한 결과 57 bp가 결손되었고 쥐와 두 개의 염기서열이 변환되어져 있었으며 그로 인해 아미노산이 변이된 유전자를 확인하였다.

쥐에서의 *C. militaris*의 추출물과 LPS처리한 BDNF의 발현은 뇌에서는 각각 4 시간과 8 시간 후에 발현이 증가하였고 간에서는 8 시간과 4 시간 후에 강한 발현이 유도됨을 확인하였다. 또한 Northern blot 분석을 통해서도 동일한 결과를 얻었다.

*C. militaris*의 추출물과 LPS가 IGIF 유전자 promoter에 미치는 영향을 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포를 이용하여 CAT assay를 수행한 결과 LPS보다 *C. militaris*의 추출물이 강한 활성을 보였으며 pCAT p1에서 *C. militaris*의 추출물이 가장 강한 활성을 나타냄을 확인하였다.

Neuroblastoma SN-N-BE(2)C를 이용한 *C. militaris*의 추출물과 LPS의 DBNF 유전자의 promoter 활성조사에서도 *C. militaris*의 추출물이 pCAT

m1.2에서 가장 강한 활성을 나타냈으며 LPS보다 발현이 증가됨을 확인하였고 pCAT m1.4의 활성은 pCAT m1.2보다 활성이 감소함을 확인하였다.

이와 같은 결과로 종합해볼 때 *C. militaris*의 추출물은 항바이러스기능, 스트레스에 대한 방어기능 등을 포함한 면역조절작용을 가지는 IGIF를 발현유도 하고 항암작용 및 염증작용에 중요하게 작용하는 IFN- γ 를 유도하는 특성을 지니고 있으며 더불어 신경세포의 증식에 관여하며 퇴행성 신경세포를 억제하는 기능을 가지는 BDNF의 발현을 증가시키는 효과를 가지고 있음이 확인되어 *C. militaris*의 추출물을 이용한 예방 및 치료제로서의 가능성이 있음을 제시하였고 더 나아가 추출물의 성분을 분석하여 이를 이용한 더욱더 효과적인 생리활성물질에 대한 연구가 필요하리라 사료된다.

C. militaris 군사체 추출물에서의 암세포 사멸효과를 확인한 결과는 위암 세포주인 484, 638에서는 각각 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서, 601에서는 1~0.1 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 암세포 사멸 효과를 확인하였다. *C. militaris* 군사체에 selenium(Se)과 Germaium(Ge)을 첨가하여 성장한 *C. militaris* 군사체에 의한 암세포 사멸효과를 확인하였다.

C. militaris 메탄올 추출물에서는 NIH3T3 세포에서의 세포독성이 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 70%, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 30%을 나타내었지만 위암 세포주(601)와 난소암 세포(OV-3) 그리고 폐암 세포(A-549)에선 각각 100~10 $\mu\text{g/ml}$ 농도 추출물 처리에 따라 90~86%, 85~50%, 그리고 88 ~74%의 암세포 억제효과를 나타내었다.

484 세포에서는 100~10 μg 처리에 의해 60 %까지, 601과 638 세포주에서는 암세포의 증식만을 억제하였고, A549와 OV-3 세포주에서는 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 가장 우수한 암 세포 사멸 효과를 나타내었다.

5. 참고문헌

1. Alderson, R. F., Alterman, A. L., Barde, Y. A., and R. M. Lindsay. 1990. Brain-derived neurotrophic factor increases survival and differentiated functions of rat septal cholinergic neurons in culture. *Neuron*. 5: 297-306.

2. Altar, C. A., Boylan, C. B., Fritsche, M., Jackson, C., Hyman, C., and R. M. Lindsay. 1994a. The neurotrophins NT-4/5 and BDNF augment serotonin, dopamine, and GABAergic systems during behaviorally effective infusions to the substantia nigra. *Exp. Neurol.* 130: 31-40.
3. Bruno Conti, Jeong Won Jahng, Cristina Tinti, Jin H. Son, Tong H. Joh. 1997. Induction of Interferon- γ Inducing Factor in the Adrenal Cortex. *J. Bio. Chemi.* 272:2035-2037.
4. Charles A. Dinarello. 1999. Interleukin-18. *Methods*, 19:121-132.
5. Conover, J. C., Erickson, J. T., Katz, D. M., Bianchi, L. M., Poueymirou, W. T., McClain, J., Pan, L., Helgren, M., Ip, N. Y., and P. Boland. 1995. Neuronal deficits, not involving motor neurons, in mice lacking BDNF and/or NT4. *Nature*. 375: 235-238.
6. Gao, W. Q., Zheng, J. L., and M. Karihaloo. 1995. Neurotrophin-4/5 (NT-4/5) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) act at later stages of cerebellar granule cell differentiation. *J. Neurosci.* 15: 2656-2667.
7. Jakub Golab. 2000. Interleukin 18-Interferon γ inducing factor-A novel player in tumour immunotherapy *Cytokine*, 12: 332-338.
8. Kim Y. M., H. S. Kang., S. G. Paik., K. H. Pyun., Karen L. Anderson., Bruce E. Torbett ., and Inpyo Choi. 1999. Roles of IFN Consensus Sequence Binding Protein and PU.1 in Regulating IL-18 Gene Expression. *J. Immunol.* 163: 2000-2007.
9. Lindvall, O., Ernfors, P., Bengzon, J., Kokaia, Z., Smith, M. L., Siesjo, B. K., and H. Persson. 1992. Differential regulation of mRNAs for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin 3 in the adult rat brain following cerebral ischemia and hypoglycemic coma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 648-652.
10. Liu, X., Ernfors, P., Wu, H., and R. Jaenisch. 1995. Sensory but not motor neuron deficits in mice lacking NT4 and BDNF. *Nature*. 375: 238-241.
11. Mamounas, L. A., Blue, M. E., Siuciak, J. A., and C. A. Altar. 1995.

Brain-derived neurotrophic factor promotes the survival and sprouting of serotonergic axons in rat brain. *J. Neurosci.* 15: 7929-7939.

12. Manabu Nakayama, Yoshinari Gahara, Tadahisa Kitamura, Osamu Ohara. Distinctive four promoters collectively direct expression of brain-derived neurotrophic factor gene. 1994. *Mol. Brain Res.* 21:206-218.

13. Masahide Tone, Sara A. J. Thompson, Yukiko Tone, Paul J. Fairchild, and Herman Waldmann. 1997. Regulation of IL-18 (IFN- γ -Inducing factor) gene. *J. Immunol.* 159:6156-6163.

14. Okamura, H. K. Nagata, T. Komatsu, T. Tamimoto, Y. Nukata. F. Tanabe K. Akita, K. Torigoe, T. Okura, S. Fukuda, and M. Kurimoto. 1995. A novel costimulatory factor for γ interferon induction found in the liver of mice causes endotoxic shock. *Infect. Immun.* 63 :3966.

15. Okamura, H., H. Tsutsui, T. Komatsu, M. Yutsudo, A. Hakura, T. Tanimoto, K. Torigoe, T. Okura, Y. Nukada, K. Hattori, K. Akita, M. Namba, F. Tanabe. K. Konishi, S. Fukuda, and M. Kurimoto. 1995. Cloning of a new cytoline that induces IFN- γ production by T cells. *Nature* 378:88

16. Pierre Dubus, Baptiste Faucheux, Florence Boissiere, Alexis Groppi, Claude Vital, Anne Vital, Yves Agid, Etienne C. Hirsch and Jean Philippe Merlio. 2000. Expression of Trk isoforms in brain regions and in the striatum of patients with Alzheimer's disease. *Experimental Neurology.* 165: 285-294.

17. Rodman, L. E., D. R. Farnell., J. M. Coyne., P. W. Allan, D. L. Hill., and J. G. Page. 1997. Toxicity of Cordycepin in combination with the adenosine deaminase inhibitor 2'-deoxycoformycin in Beagle Dogs. *Toxi. and App. Pharma.* 147: 39-45.

18. Shigeru Morichiro, Koichiro Fujimaki, Naoyama Okuyama, Michihiro Takahashi, and Ronal S. Duman. 1999. Stimulation of adenylyl cyclase and induction of Brain-Derived Neurotrophic factor and TrkB mRNA by NKH477, a Novel and Potent Forskolin Derivative. *J. Neurochem.* 72: 2198-2205.

19. Shimpei Ushio, Motoshi Namba, Takanori Okura, Kazuko Hattori, Yoshiyuki

- Nukada, Kenji Akita, Fujimi Tanabe, Haruki Okamura, and Masashi Kurimoto. 1996. Cloning of the cDNA for Human IFN- γ -Inducing Factor, Expression in *Escherichia coli*, and Studies on the Biologic Activities of the Protein. *J. Immunol*, 156:4274-4279.
20. Singer, L. L. S. Scott, J. Chin, E. K. Bayme, G. Limjuco, J. Weidner, D. K. Miller, K. Chapman, and M. J. Kotsuna. 1995. The interleukin-1 β -converting enzyme(ICE) is localized on the external cell surface membrane and in the cytoplasmic ground substance of human monocytes by immuno-electron microscopy *J. Exp. Med.* 182:1447
21. Spina, M. B., Squinto, S. P., Miller, J., Lindsay, R. M., and C. Hyman. 1992. Brain-derived neurotrophic factor protects dopamine neurons against 6-hydroxydopamine and N-methyl-4-phenylpyridinium ion toxicity: involvement of the glutathione system. *J. Neurochem.* 59: 99-106.
22. Tadashi Kiho, Akihiro Yamane, Ji Hui, Shigeyuki Usui, and Shigeo Ukai. 1996. Polysaccharides in fungi. XXXVI. Hypoglycemic activity of a polysaccharide(CS-F30) from the cultural mycelium of *cordyceps sinensis* and its effect on glucose metabolism in mouse liver. *Biol. Pharm. Bull*, 19: 294-296.
23. Yong Gu, Keisuke Kuida, Hiroko Tsutsui, George Ku, Kathy Hsiao, Mark A. Fleming, Nobuki Hayashi, Kazuya Higashino, Haruki Okamura, Kenji Nakanishi, Masashi Kurimoto, Tadao Tanimoto, Richard A. Flavell, Vicki Sato, Matthew W. Harding, David J. Livingston, Michael S.-S. Su. 1997. Activation of Interferon- γ Inducing Factor Mediated by Interleukin-1 β Converting Enzyme. *Science*, 275:206-209.
24. Yong-Man Kim, Hyung-Sik Kang, Sang-Gi Paik, Kwang-Ho Pyun, Karen L. Anderson, Bruce E. Torbett, and Inpyo Choi. 1999. Roles of IFN consensus sequence binding protein and PU.1 in regulating IL-18 gene expression. *J. Immunol*, 163: 2000-2007.

Abstracts

C. militaris is one of entomopathogenic fungi infecting lepidopteran insects and parasitises and kills moth pupae. It is an ascomycete that invades the pupae in the ground and that remains a worm during the winter and transforms into a mushroom in the summer. The crude extracts obtained from *C. militaris* has been known to have an efficacy to excessive tiredness, persistent cough, debility, anemia, asthma, and cancer.

In present studies, crude extracts extracted from *C. militaris* and LPS were used to investigate effects on inducibility of IGIF, IFN- γ , BDNF *in vivo* and *in vitro*.

LPS treatment markedly induced IGIF mRNA expression after 4 hr and 8 hr. *C. militaris* extracts treatment induced higher level of IGIF mRNA than that of LPS in brain, liver, kidney in mouse and rat. It has been known that IGIF increase the production of IFN- γ in T cells, level of IFN- γ message was tested after treatment of LPS and *C. militaris* extracts. IFN- γ mRNA was induced at 4 hr and 8 hr after treatment in PC12 cells.

In addition to IGIF and IFN- γ mRNA, expression of BDNF mRNA was investigated after injecting LPS and *C. militaris* extracts. Both of LPS and *C. militaris* extracts significantly increased BDNF message in the mouse brain and liver at 4 hr and 8 hr after treatment. These results were confirmed by Northern blot analysis.

When IGIF gene was amplified by RT-PCR in PC12 cells, two distinct PCR bands were amplified. those bands were cloned and sequenced. the lower bands had 57 bp deletion.

To analysis the promoter region having the activity to *C. militaris* extracts and LPS, promoter region of IGIF was cloned from genomic DNA of mouse brain. The 5' upstream region of exon I and intron I were subcloned into pCAT-basic vector to yield P1 and P2 promoter, respectively. Both promoter

showed basal constitutive activity. *C. militaris* extracts increased P1 promoter activity greater than that of LPS in RAW264.7 macrophages. This implies that P1 promoter has *C. militaris* extracts responsible element.

BDNF promoter region was also cloned to identify the promoter region having the activity to *C. militaris* extracts and LPS. BDNFpM1.2 containing the 5'-flanking region of exon I and BDNFpM3.4 containing intron I were constructed, subjected to promoter analysis. Both promoters showed basal constitutive activity. *C. militaris* extracts increased BDNFpM1.2 promoter activity greater than that of LPS in SK-N-BE(2)C. This implies that BDNFpM1.2 promoter has *C. militaris* extracts responsible element.

Collectively, *C. militaris* extracts induced IGIF and BDNF mRNA at transcriptional level via P1 promoter region and BDNFpM1.2, respectively. Since IGIF has a important role to cell-mediated immunity and BDNF has potent trophic effect on dopaminergic neurons, the inductions of IGIF and BDNF by *C. militaris* extracts suggests that *C. militaris* extracts have a potential to be developed as an immune activator or neurotrophic factors.

A point of view of anti-cancer activity, the ethanol extract and water extract were screened for cytotoxicity on several cancer cell lines by WST-1 assay. The results showed that *C. militaris* ethanol extract was inhibited with increasing concentration of the extract. The ethanol extract from *C. militaris* had strongly inhibitory effects in 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ treatment by WST-1 assay, showing 83%, 86%, 87% and 42% inhibition in PC 12, 484, 638 and HePG2, respectively. The extract precipitated by ethanol from *C. militaris* had weakly inhibitory effects in 112.5 μg treatment in 638 cell lines. In addition, the water extracts of *C. militaris* mycelium, selenium added mycelium and germanium added mycelium extract were inhibited in several cancer cell lines. The methanol extract had significantly inhibitory effects in 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ treatment, showing 84%, 68% and 70% inhibition in 601, OV-3 and A-549, respectively. The last, the water extract from *C. militaris* had inhibitory effects in 58%(50

$\mu\text{g/ml}$), 12%(50 $\mu\text{g/ml}$), 8%(50 $\mu\text{g/ml}$), 22%(100 $\mu\text{g/ml}$) and 19%(100 $\mu\text{g/ml}$) inhibition in 484, 601, 638, A-549 and OV-3, respectively.

제3절 *C. militaris* 추출물처리에 Tyrosine Hydroxylase의 유도

1. 서론

Tyrosine hydroxylase(TH)는 Dopamine의 전구체인 L-DOPA를 tyrosine으로부터 전환을 촉진하는 효소(Fig. 1)이며, 이 효소는 카테콜라민 생합성 경로의 첫 번째로 작용하는 rate-limiting enzyme이다(Molinoff 등, 1971). 카테콜라민 생합성에서 도파민은 노르에피네프린(norepineprine)과 에피네프린

(epineprine)을 생성하는 전구체이다. TH는 카테콜라민 생합성경로의 활성화에 다양한 기작을 부여하며 카테콜라민을 생성하는 신경세포들의 활성화에 매우 중요한 역할을 하고 있다. 또한 TH는 카테콜라민성 신경세포에 고도의 특이적인 면역세포화학적 표지효소로 알려져 있으며 조직을 이용한 immunohistochemistry를 실행한 TH의 형태학적인 연구가 활발히 진행되어졌다. TH는 주로 중추신경계(CNS)인 midbrain, 뇌간, diencephalon, retina와 olfactory bulb에서 발현되고 neural crest에서 발달한 말초신경계통(PNS)인 sympathetic ganglia와 adrenal medullary chromaffin 세포에서도 발현된다(chen-palay 등, 1984; kiss, 1987). 또한 TH는 adrenal medullary tumor에서 기원한 rat pheochromocytoma(PC) 세포인 PC12에서도 발현되어(Greene 등, 1996) 연구되었다.

TH의 활성화는 퇴행성 질병과 관련이 있어 TH 유전자와 활성화에 대한 많은 연구되었다. TH의 활성화는 여러 가지 환경적, 생리적인 자극과 다양한 인자에 의해 영향을 받는데 주로 glucocorticoid administration(Zhe 등, 1993), drug administration, cold/immobilization stress(Lee 등, 1996)와 같은 다양한 약리적, 생리적인 상태에 따라 변화된다. 특히 reserpine(Nicole 등, 1986), forskolin(Spyridon 등, 2001)은 rat brain과 PC12에서 TH 효소를 유도 발현한다고 보고하였다. 그리고 neurotrophin의 일종인 BDNF(Spyridon 등, 2001; Lewis 등, 1987), NGF(Acheson 등, 1984)와 GDNF(Carl 등, 2000), EGF(Goodman 등, 1980; Lewis 등, 1987), cAMP(Kumakara 등, 1999; Lewis 등, 1993)에 의해 TH를 유도 발현한다고 보고하였다.

뇌에서 카테콜라민 체계의 비정상적인 기능은 정신적인 질병과 연관된다. 특히 SN의 mesencephalic dopaminergic 신경세포는 신체 운동성 기능의 degenerate에 중요한 역할을 담당하고 있어 Parkinson's disease(PD)와 관련된다. 이러한 dopaminergic 신경세포의 활성화는 TH의 발현 양상에 따라 큰 영향을 받는다. PD는 계속적으로 진전되는 퇴행성 신경질환이며, 전형적인 신경적 형태는 striatum에서의 TH 및 다른 카테콜라민과 연관된 효소와 도파민이 결핍되거나 감소된다(Birkmayer 등, 1989; Nagatsu, 1984; Riedere 등, 1989). 지금까지 가장 효과적인 PD의 치료법으로서 L-DOPA를 처리함으로 회복된다

는 보고(Weiner등, 1980)가 있으나 이 도파민 치료는 지속적인 복용으로 인한 여러 side effect를 초래(Obeso등, 1989)하고 경제적인 손실이 크기 때문에 현재에는 TH나 L-DOPA의 유도생성에 대한 관심이 모아지고 있다. 또한 이를 생성할 수 있는 세포를 이식하는 방법 (Koji등, 2000)들이 보고되어지고 있으나 효율성과 윤리적인 면에서 논쟁의 여지가 계속적으로 제기되고 있어 다른 치료법의 개발이 요구되어지고 있다.

버섯추출물은 *C. militaris*(CM)와 selenium(Se)과 germanium(Ge)을 첨가하여 배양한 *C. militaris*를 이용하였다. 미량의 Se은 쥐 뇌에서 TH효소의 발현을 유도하고(Marina등, 2000), methamphetamine에 의한 손상된 뇌를 보호한다고 보고되었다. Se은 glutathione(GSH) system에서 중요한 효소인 glutathione peroxidase(GPx)의 4가지 구성요소 중의 하나인 selenocysteine에 포함된 상태로 존재하며, reactive oxygen species(ROS)를 제거하는 역할을 한다(Simonian등, 1996).

게르마늄은 interferon 또는 macrophage, T lymphocyte와 같은 숙주방어 기전을 통한 항종양효과(Jao, 2000)와 면역강화작용(Suzuki 등, 1985; Aso 등, 1985), 중금속 해독작용(lee 등, 1991)과 운동성 증가(Ho 등, 1990)등의 다양한 약리작용을 가지는 것으로 보고되었다.

본 실험에서는 미국 FDA에서 보조식품으로서 승인되어 있는 버섯추출물질을 이용하여 Parkinson's disease의 원인중의 하나인 TH유전자발현유도를 관찰하였다. 따라서 *C. militaris*추출액을 이용한 발현유도는 RT-PCR, Western blotting으로 확인하였으며, immunohistochemistry를 이용하여 쥐 뇌와 위의 조직에서 TH-IR 신경세포들을 관찰하고 각각의 실험군들과 발현양상 등을 비교, 분석하였다.

2. 재료 및 방법

가. 시료

본 실험에는 *C. militaris*, Se와 Ge를 첨가한 추출액을 사용하였다. *C. militaris*에 Se의 첨가는 50 ppm의 농도를 함유한 액체배지에 접종하였으며 Ge의 첨가는 무기게르마늄 0.144 g/l (100 ppm)을 함유한 액체배지에 무균적으로 접종하여 성장한 균주를 모아 철저히 씻어준 후 건조하여 사용하였다. 시료는 각각 100 g기준의 재료에 100% EtOH를 첨가하여 3 일 동안 추출하거나 증류수를 넣어 증탕하여 evaporation으로 농축시켜 동결건조시킨 분말을 만든 후 무게를 측정하여 사용하였다. 그리고 chemical stress에 사용된 reserpine과 forskolin (Sigma, USA)은 각각 구입하여 사용하였다.

나. 세포배양 및 실험동물

2절의 세포배양 및 실험동물과 동일한 조건으로 수행하였다.

다. Total RNA의 분리

1) PC 12 세포에서 total RNA의 분리

2절의 PC 12 세포에서 total RNA의 분리와 동일한 방법으로 수행하였다.

2) 쥐 조직에서 total RNA의 분리

2절의 쥐 조직에서 total RNA의 분리와 동일한 방법으로 수행하였다.

라. RT (Reverse Transcriptase)-PCR

2절의 RT-PCR 조건과 동일한 방법으로 수행하였다.

마. Western blotting analysis

단백질 분리를 위한 SDS-PAGE는 Laemmi (1970) 방법을 이용하여 12% separating gel (acrylamide/bis-acrylamide 30 ml, 1M Tris-HCl buffer, pH 8.9 28.1 ml, deionized D.W. 10 ml, 10% SDS 0.75 ml, TEMED 20 μ l, 10% ammonium persulfate 0.18 ml/75ml) 용액을 만들어 실온에서 중합반응을 시켰고, 4% stacking gel(acrylamide/bisacrylamide 2.66 ml, 1 M Tris-HCl buffer, pH 6.7 2.5 ml, dD.W 14.6 ml, 10% SDS 0.2 ml, TEMED 20 μ l, 10% ammonium persulfate 0.12 μ l/20ml)용액을 만들어 사용하였다. 단백질 sample(20 μ g)과 4 X sample buffer를 혼합하여 5 분간 끓여 얼음에서 식힌 후 loading하고 전기영동은 60~80 V로 시작해 100 V로 전기영동하였고 western blotting은 Jacpueline 등(2001)의 방법을 이용하였다. 전기영동 후 coomassie blue R-250을 이용해 염색과 탈색하여 확인하였다. 다른 단백질 겔은 NC paper에 transfer 한 후 membrane blocking을 위하여 blocking sol. [5% blocking reagent + PBS-T (phosphate buffered saline tween)]를 이용하여 실온에서 한 시간 동안 흔들며 반응시킨 후 PBS-T washing buffer에서 5 분간 실온에서 씻고 TH primary 항체를 1 : 10000 비율로 희석하여 실온에서 한 시간 동안 반응하였다. 반응 후 PBS-T washing buffer에서 15 분간 3~4 회에 걸쳐 실온에서 씻고 이차항체(biotinylated antibody, vectastain ABC kit)를 1:100으로 희석하여 membrane을 실온에서 한 시간 동안 반응하여 A+B complex를 희석하여 50 분간 처리한 후 DAB (3-3' diaminobenzidine tetrahydrochloride, sigma)로 발색하여 TH 특이적 단백질 밴드를 확인하였다.

바. 면역 조직 화학적 염색

rat은 흉부를 절개한 후 심장의 정맥을 이용해 PBS로 체내의 혈액을 제거한 뒤 4% Para-formaldehyde로 관류 고정하였다. 고정된 쥐 뇌와 위를 적출하여 microcryocut를 이용하여 3~5 μ m두께의 동결절편을 제작하였다. 준비된 뇌와 위 절편은 PBS로 여러 번 씻어주었다. 30% hydrogen peroxide로 전처리하여 씻어준 후 vectastain ABC kit의 normal goat serum을 0.5% BSA/PBS에 섞어 1 시간동안 반응시켜 비특이적 단백질의 결합을 막는다.

TH primary 항체와 0.5% BSA/PBS (1 : 10000) 희석하여 실온에서 1 시간에 서 2 시간 정도 반응시켰다. Sample을 PBS로 3 번 씻은 후, 이차 항체 (biotinylated anti-rabbit IgG in 1% BSA/ PBS)를 이용하여 1 시간 동안 반응시킨 다음 1% BSA/ PBS로 두 번 씻어냈다. 사용하기 30 분 전에 vectastain ABC kit (1 : 50)를 희석하여 50 분동안 반응시킨 후 PBS로 2 번 씻고, 50 ml DAB 용액과 0.2 M PB 용액에 30 % hydrogen peroxide 12 μ l를 첨가한 용액으로 5 분간 염색시켜 0.1 M PB로 5 분간 반응을 동시에 정지시킨 다음, 광학 현미경으로 관찰하였다. 그리고 위에서의 세포 counting은 각각 처리된 4 개의 염색된 절편을 선택하여 X 400에서 전 층을 대상으로 조직절편의 단위면적당 TH가 발현된 세포의 수를 측정하였고 계수 결과는 윌콕슨의 순위합 검정(Wilcoxon rank sum test)을 이용하였다.

3. 결과 및 고찰

가. RT-PCR에 의한 TH mRNA의 발현양상

TH의 발현유도는 카테콜라민 합성경로에서 매우 중요한 위치를 차지하며 퇴행성질병의 치료에 대한 길을 모색할 수 있어 TH 유도발현에 대해 많이 연구되어졌다. TH 유전자의 발현유도를 확인하기 위한 *C. militaris* 추출은 증류수와 ethanol을 사용하였다. 그러나 Lee 등(1996)의 보고에 의하면 ethanol에 의한 TH의 활성은 변화되지 않는다고 하여 본 실험에서는 ethanol에 의한 TH변화는 배제하였다. PC 12 세포 와 Mouse, rat의 뇌와 위를 적출하여 이용하였으며 각각의 시료들은 Table 1, 2와 같이 처리하였다. 그리고 대조군으로 사용하기 위한 PC 12 세포와 동물들은 saline을 시료 대신 처리하여 4 시간 후 조직을 적출하고 시료를 처리한 실험군들은 2, 4, 8, 혹은 4, 8 시간동안 반응시킨 후 조직을 적출하였다. 그리고 total RNA를 분리해 실험에 이용하여 TH mRNA의 발현유도 양상을 관찰하였다.

Spyridon등(2001)은 Fsk이 TH-IR 신경세포의 증가 비율을 높인다고 보고하였고 Nicole등(1986)은 Res의 처리가 TH mRNA 수준을 증가시킨다고 보고

하였다. 이에 본 실험에서는 먼저 chemical stress로서 Fsk, Res과 *C. militaris* 추출물을 PC 12 세포에 4 시간 처리하여 위의 조건과 같은 방법으로 실행하였다. 그 결과 전반적으로 대조군에 비해 Fsk, Res과 *C. militaris* 에서 발현유도가 되었다. 그리고 Fsk와 Res의 발현은 Res도 발현이 유도되었지만 Fsk이 Res에 비해 훨씬 발현양이 높았으며 이러한 chemical stress의 발현유도는 언급한 보고와 일치하였으며, Fsk와 비슷한 비율의 TH 발현유도를 나타내었다(Fig. 2). 이러한 TH 유전자 발현유도양상을 나타낸 *C. militaris*와 Se, Ge이 첨가된 *C. militaris*를 증류수에 의해 추출한 시료를 이용하여 실험을 실시하였다. se는 낮은 농도에서 TH의 발현농도를 증가시킨다는 Marina-Rama

s and Jose(2000)의 보고가 있으며 Ge는 여러 질병에 효능이 있다는 Suzuki 등 (1985), Ho등 (1990)과 같은 많은 보고가 있다. 각각의 천연 추출물들은 PC12에 각각 2, 4, 8 시간으로 처리하였으며 그 결과 전반적으로 시료를 처리한 실험군들이 대조군에 비해 2 시간과 4 시간에 발현이 강하게 나타났으나 4 시간이 더 강하게 발현되었다. 8 시간에는 거의 발현이 유도되지 않아 대조군과 비슷한 양상을 나타냈다. 그리고 Se/*C. militaris*와 Ge/*C. militaris*을 처리한 결과를 비교하면 Se/*C. militaris*은 Ge/*C. militaris*보다 더 높은 발현 양상을 나타냈으며 4 시간에서는 훨씬 더 강하게 발현되었다. 이는 Se에 의한 자극이 *C. militaris*과 같이 TH 발현을 유도하고 se이 TH 발현을 강하게 유도하는 물질임을 확인하였다(Fig. 3). *C. militaris*의 결과는 Ge/*C. militaris*과 거의 비슷하게 발현하였다(Fig. 3). 또한 *In vivo*인 mouse의 복강에 Fig. 3과 동일한 각각의 시료들을 시간별로 처리하고 그에 따른 결과를 관찰하였다. 그 결과 대조군에 전반적으로 실험군에서 발현유도가 확인되었으며 Fig. 3과 거의 동일한 결과가 관찰되었다(Fig. 4). 그러나 Fig. 4에서 Ge/*C. militaris*의 8 시간 처리에서도 발현이 증가됨을 확인할 수가 있었다. 이러한 결과는 시간에 따른 *in vivo*의 효율성을 보여준다.

증류수에 의해 추출한 시료를 처리하여 실험한 결과인 Fig 3.과 ethanol로 추출한 시료를 처리하여 실험한 결과인 Fig. 5를 비교하였다. 그 결과 Fig. 5에서의 TH 유전자 발현유도 정도가 Fig 3.에 비해 훨씬 높은 비율로 증가되

었다. 이에 ethanol 추출에 의한 방법이 더 효율적임을 보여준다.

그리고 SN부위가 PN의 부위보다 TH 발현유도가 더 많이 증가했으며 PN에서도 발현이 증가되었지만 거의 대조군과 같은 양상을 나타냈다. (Fig. 6). 이는 *C. militaris* 추출물이 일차적으로 PN보다는 SN에 더 많은 영향을 주는 것으로 사료된다.

나. Western blotting analysis에 의한 Tyrosine Hydroxylase 단백질 수준

TH의 발현이 RNA 수준에서 뿐만 아니라 단백질 수준에서도 발현이 증가되었는지 재확인하기 위해서 western blotting analysis를 하였다. PC 12 세포와 mouse에서의 total protein을 분리하여 후 SDS-PAGE 전기영동을 하여 coomassie blue로 염색한 후 각각 정량이 동일하게 되었는지 확인하였다. 그리고 NC membrane에 protein을 transfer시켜 TH primary antibody를 이용한 western blotting을 하여 특이적으로 반응한 단백질 밴드를 대조군과 각각의 시료를 투여한 실험군들간의 양상을 비교하였다.

PC 12 세포에 *C. militaris* 추출물을 단시간으로 처리하여 단백질을 분리한 후 western blotting을 하였다. Fig. 7. A는 Total protein 정량을 보여주고 있으며 Fig. 7. B는 western blotting의 결과로서 대조군에 비해 *C. militaris* 추출물을 처리한 실험군에서 더 진한 TH 단백질 밴드를 확인하였다(Fig. 7). 모두 두 개의 TH 양성반응 밴드가 나타났는데 Rf값을 구하여 확인한 결과 TH 단백질의 분자량이 60 kDa(Marc 등, 1997)으로서 두 번째 밴드가 TH 단백질 밴드임을 확인하였다.

또한 *C. militaris*, Se/*C. militaris*과 Ge/*C. militaris*의 TH protein유도발현의 증가를 확인하기 위해서는 각각의 시료를 처리한 Mouse whole brain으로부터 단백질을 분리하였으며 시료 처리 시간은 4 시간으로 하였다. SDS-PAGE에서 단백질의 정량을 확인하고(Fig. 8. A), western blotting에서는 대조군에 비해 *C. militaris*과 같이 Se/*C. militaris*이 가장 많은 발현이 되었으며 이는 RT-PCR에 의해 확인되었던 결과와 일치하며(Fig. 8. B) 이는 단백질상에서도 *C. militaris*뿐만 아니라 Se/*C. militaris*에 의한 TH 유도발현

이 나타남을 보여준다.

Western blotting에 의한 결과인 Fig. 7, B와 Fig. 8, B에서 보인바와 같이 TH antibody에 대한 양성반응 단백질 밴드 형태가 단일 단백질 밴드가 아닌 2 개와 3 개의 단백질 패턴으로 나타났다. TH 분자량은 약 60 kDa정도로 Rf 값을 구하여 확인한 결과 2 번째 밴드가 TH 단백질임을 확인할 수가 있었다. 이러한 결과는 Marina 등 (2000)과 Joh (1987)가 보고한 결과와 유사하게 나타났다. 이런 밴드양상은 카테콜라민 합성에 관여하는 물질들이 거의 비슷한 구조를 가지는 TH의 전구체 및 분해 상동성 단백질로 볼 수 있으며, TH 단백질은 높은 염이나 열에 의해 가수분해되는데 Fig. 8, B에서 보여지는 가장 아래에 존재하는 밴드는 TH 단백질이 가수분해된 것으로 사료된다.

다. 면역 조직화학적 염색에 의한 TH-IR neuron 형태 및 유도발현 관찰

면역조직화학적 염색은 *In vivo*상에서 직접적으로 TH 발현양상을 관찰할 수 있으며 각각의 시료를 처리한 조직에서의 TH 발현유도양상을 비교하였다.

시료는 RT-PCR에서 TH mRNA를 유도 발현시킨 *C. militaris*, *Se/C. militaris*, *Ge/C. militaris*, 를 이용하여 쥐의 뇌와 위에서 면역조직화학적 염색을 실행하여 TH-Immunoreactive (TH-IR) neuron들의 발현양상을 관찰하였다. 시료들을 처리한 뇌 조직에서의 결과는 거의 비슷하여 대표적인 *C. militaris*의 결과만을 보여주었다. 쥐 뇌에서 가장 많은 TH neuron들이 분포되어 있는 SN부위를 중점으로 관찰하였다. 그 결과 TH-IR neuron들은 갈색을 나타내는데 대조군에 비해 실험군이 TH antibody에 대한 염색이 전반적으로 더 진하게 나타났다(Fig. 7. A, B). 또한 TH-IR neuron들의 세포질이 훨씬 더 진한 염색이 되어 뚜렷하게 보이는 더 많은 수의 neuron들이 관찰되었다(Fig. 7. C, D). 각각 대조군과 실험군의 *Substantia nigra, compacta* (SNC)와 *Substantia nigra, reticular*(SNR)의 부위를 각각 비교해보면 SNC에서 TH-IR neuron의 양상이 Fig. 7.의 C, D와 같았다(Fig 8. A, B). 그리고 *Substantia nigra, Lateral*(SNL)에 독립적으로 존재한 neuron을 400 배로 관찰한 결과 대조군에 비해 실험군의 TH-IR

neuron에서 작은 돌기들이 많이 생성되었다(Fig. 8. C, D). 이는 실험에 사용한 시료에 의해 TH neuron들이 활성화되었음을 나타낸다.

그리고 Eisenhofer 등 (1999)과 Paul 등 (1997)에 따르면 위(Stomach)에서 dopamine이 생성되고 TH activity를 가진다고 보고하였다. 그리고 Eisenhofer 등 (1999)이 위에서의 dopamine은 gastrointestinal tract의 보호물질로 작용하며 Immunohistochemistry와 western blotting을 이용하여 위에서의 TH-IR 세포들이 존재함을 보고하였다. 이에 *C. militaris*추출물을 복강에 처리했을 때 위에서의 TH 반응 양상 변화를 관찰하였다. 먼저 대조군을 살펴보면 TH-IR 세포들이 점막근관(Muscularis mucosae)에서 주로 나타났으며 위선(Gastric glands)에서는 갈색의 씨앗 모양을 하고 있는 한 두 개의 TH-IR 세포들을 관찰하였다(Fig. 11. A, B). 반면에 시료를 처리한 조직들에서는 대조군에 비해 점막근관에서 더 많이 발견됨을 확인하였고 발견영역이 위선까지 더 넓어짐을 확인하였다(Fig. 11. C, E, G, I; D, F, H, J). 특히 Se/*C. militaris*을 처리한 조직에서는 다른 시료처리 조직에 비해 많은 TH-IR 세포들이 관찰되었다. 그리고 각각의 위 조직에 나타난 TH-IR 세포를 일정한 단위면적에서 cell counting을 하여 비교해 본 결과, 대조군에 비한 실험군들의 TH-IR 세포들의 수가 더 많이 나타났으며 특히 Se/*C. militaris*의 처리조직에서는 3 배 이상의 숫적 증가를 확인하였다(Fig.. 12). 이러한 결과들은 *C. militaris*과 같이 Se/*C. militaris*에 의해 쥐의 뇌와 위에서 TH에 대한 발현유도에 작용함을 나타낸다.

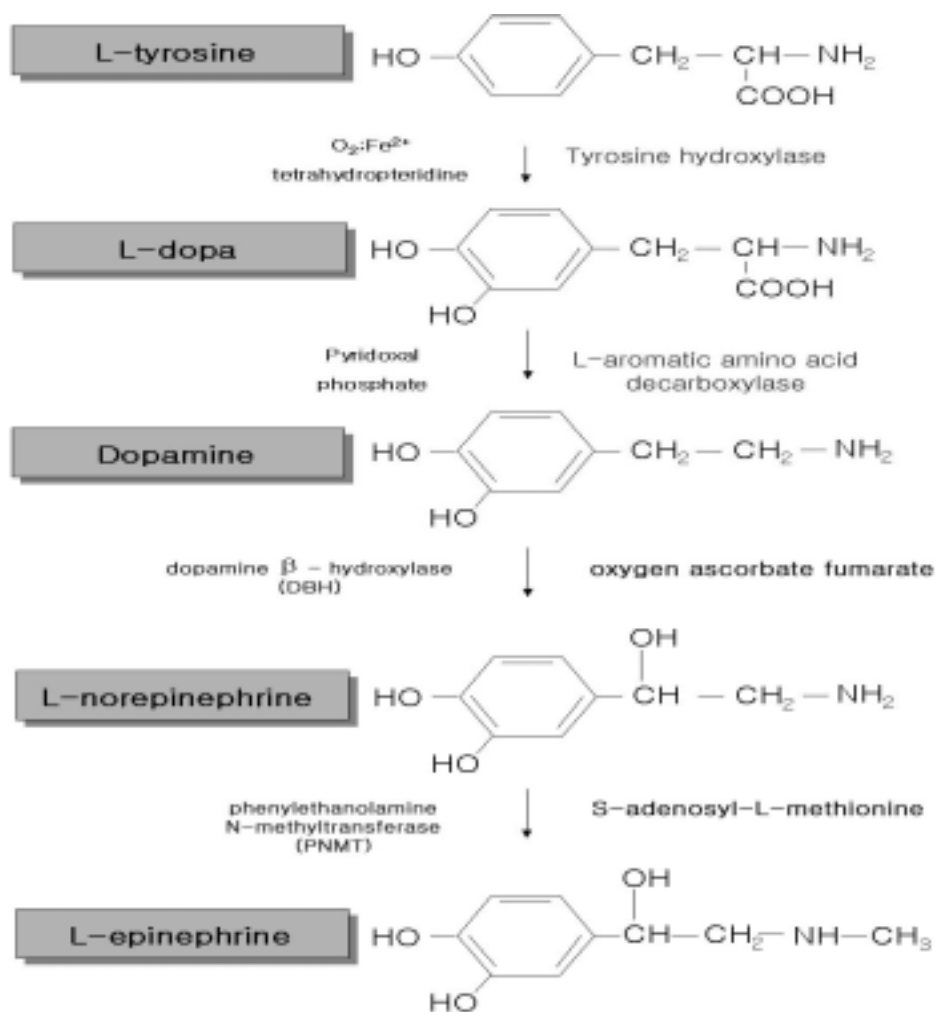


Fig. 1. The pathway of Catecholamine biosynthesis

Table 1. The Treatment of Chemical Products

Agent	Solvent	Treatment amount	Time(hr)
		PC 12	
forskolin	water	10 μ M/ml	4
Reserpine	water	10 μ M/ml	4

Table 2. The Treatment of Crude Extracts from Medicinal Mushrooms

extracts	Solvent	Treatment amount		Time(hr)
		PC 12	Rat, Mouse	
<i>C. militaris</i>	water	10 μ g/ml	20 mg/kg	2, 4, 8
	ethanol			4, 8
se/ <i>C. militaris</i>	water	10 μ g/ml	20 mg/kg	2, 4, 8
	ethanol			4, 8
ge/ <i>C. militaris</i>	water	10 μ g/ml	20 mg/kg	2, 4, 8
	ethanol			4, 8

※ Se/*C. militaris* : selenium-contained *C. militaris*, Ge/*C. militaris* : germanium-contained *C. militaris*,

Table 3. Oligonucleotide Primers for PCR of Tyrosine Hydroxylase

Gene name	5' primer(5' - 3')	3' primer(5' - 3')	product size (base)
PC12 TH	5'GCT GTC ACG TCC CCA AGG TT 3'	5'AAG CGC ACA AAA TAC TCC AGG 3'	324bp
Rat TH			
β -actin	5'CCT CTA TGC CAA CAC AGT 3'	5'AGC CAC CAA TCC ACA CAG 3'	153bp

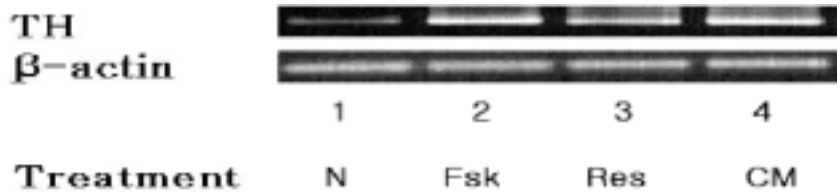


Fig. 2. Induction of Tyrosine Hydroxylase expression of Foskolin (Fsk), Reserpine (Res) and *C. militaris* (CM) in PC12 cells. Lane 1. Non-treated; Lane 2. forskolin (Fsk); Lane 3. Reserpine (Res); Lane 4. CM-treated. PCR products were visualized as a band on a 1.2 % agarose gel.

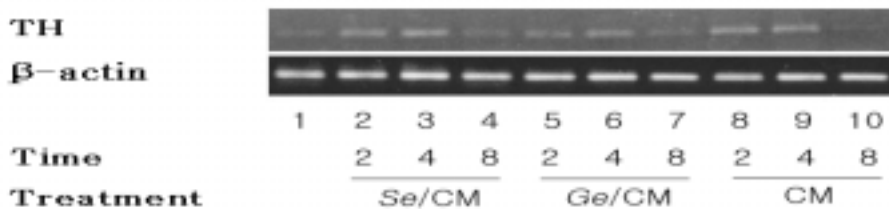


Fig. 3. Induction of Tyrosine Hydroxylase expression by water extracts of *C. militaris*(CM) and organoselenium, organogermanium contained *C. militaris* (se, ge/CM) in PC12 cells. Lane 1. Non-treated; Lane 2. se/CM-treated for 2 hrs; Lane 3. se/CM-treated for 4 hrs; Lane 4. se/CM-treated for 8 hrs; Lane 5. ge/CM-treated for 2 hrs; Lane 6. ge/CM-treated for 4 hrs; Lane 7. ge/CM-treated for 8 hrs; Lane 8. CM-treated for 2 hrs; Lane 9. CM-treated for 4 hrs; Lane 10. CM-treated for 8 hrs. PCR products were visualized as a band on a 1.2 % agarose gel.



Fig. 4. Induction of Tyrosine Hydroxylase expression by water extracts of *C. militaris* (CM), organo selenium contained *C. militaris* (se/CM) and organo germanium-contained *C. militaris* (ge/CM) in *substantia nigra* of mouse brain. Lane 1. Non-treated; Lane 2. se/CM-treated for 2hrs; Lane 3. se/CM-treated for 4 hrs; Lane 4. se/CM-treated for 8 hrs; Lane 5. ge/CM-treated for 2 hrs; Lane 6. ge/CM-treated for 4 hrs; Lane 7. ge/CM-treated for 8 hrs; Lane 8. CM-treated for 2 hrs; Lane 9. CM-treated for 4 hrs; Lane 10. CM-treated for 8 hrs. PCR products were visualized as a band on a 1.2 % agarose gel.



Fig. 5. Induction of Tyrosine Hydroxylase expression by ethanol extracts of *C. militaris* (CM), organoselenium contained *C. militaris* (se/CM) and organogermanium contained *C. militaris* (ge/CM) in PC12 cells. Lane 1. Non-treated; Lane 2. se/CM-treated for 4 hrs; Lane 3. se/CM-treated for 8 hrs; Lane 4. ge/CM-treated for 4hrs; Lane 5. ge/CM-treated for 8 hrs; Lane 6. CM-treated for 4hrs; Lane 7. CM-treated for 8 hrs. PCR products were visualized as a band on a 1.2 % agarose gel.

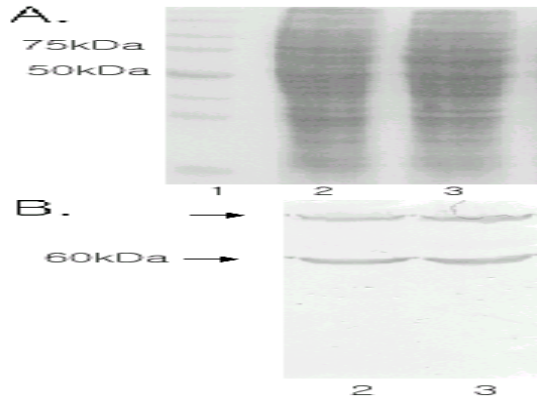


Fig. 7. Western blotting analysis of Tyrosine Hydroxylase amount by *C. militaris*(CM) in the PC12 cells. Lane 1. Marker (Promega); Lane 2. non-treated ; Lane 3. CM-treated. A. protein electrophoresis at SDS-PAGE(12 %) gel. B. Western blotting of TH. The TH band at 60 kDa correspond results with shown in Fig.7. A.

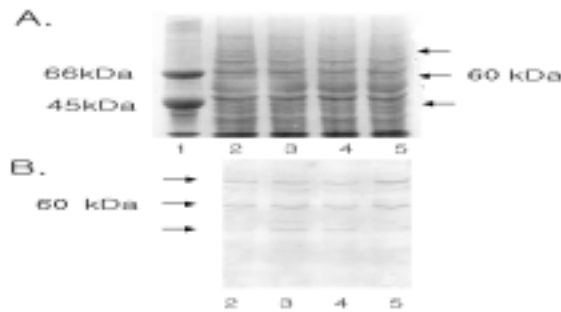


Fig. 8. Western blotting analysis of Tyrosine Hydroxylase amount *C. militaris*(CM), organoselenium-contained *C. militaris*(se/CM) and organo-germanium-contained *C. militaris*(ge/CM) in Mouse whole Brain. Lane 1. Marker(Sigma); Lane 2. non-treated ; Lane 3. se/CM-treated for 4 hrs; Lane 4. ge/CM-treated for 4 hrs; Lane 5. CM-treated for 4 hrs. A. protein electrophoresis at SDS-PAGE(12 %) gel. B. Western blotting of TH. The TH band at 60 kDa correspond with results shown in Fig.8. A.

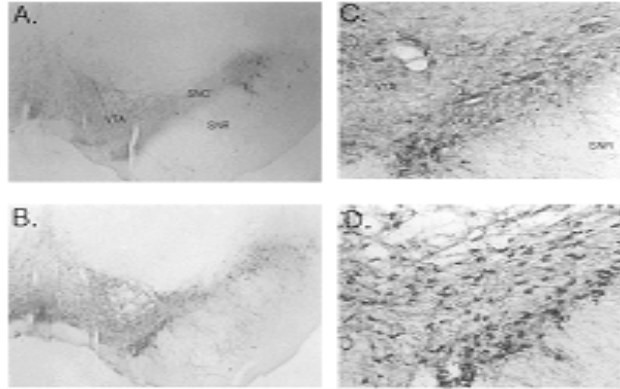


Fig. 9. Immunohistochemical detection of Tyrosine Hydroxylase by *C. militaris* (CM) in the substantia nigra. Sections were incubated with TH antibodies (1:10000) and visualised by DAB reaction products using the avidin-biotin technique. A. Non-treated ($\times 40$) B. *C. militaris* ($\times 40$); C. Non-treated ($\times 200$) D. *C. militaris* ($\times 200$) VTA : Ventral Tegmental Area, SNC : *Substantia nigra, compact*, SNR : *Substantia nigra, reticular*.

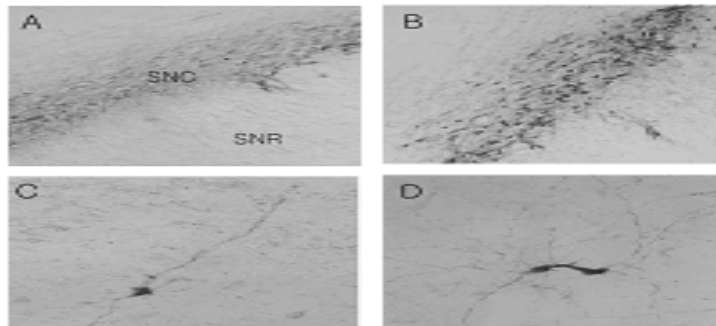


Fig. 10. Immunohistochemical detection of Tyrosine Hydroxylase by *C. militaris*(CM) in the substantia nigra. Sections were incubated with TH antibodies(1:10000) and visualized by DAB reaction products using the avidin-biotin technique. AB : SN, CD : SNL ; A. Non-treated($\times 40$) B. *C. militaris*($\times 40$); C. Non-treated($\times 400$) D. *C. militaris*($\times 400$) SNC : *Substantia nigra, compact*, SNR : *Substantia nigra, reticular*, SNL : *Substantia nigra, lateral*.

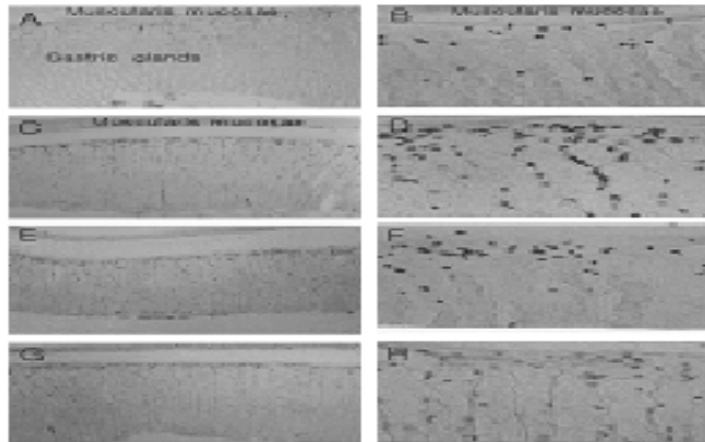


Fig. 11. Immunohistochemical detection of Tyrosine Hydroxylase in the stomach. Section were incubated with TH antibodies (1:10000) and visualized by DAB reaction products using the avidin-biotin technique. A, B. Non-treated; C, D. *se/C. militaris*; E, F. *ge/C. militaris*; G, H. *C. militaris*; A, C, E, G ($\times 100$); B, D, F, H ($\times 400$)

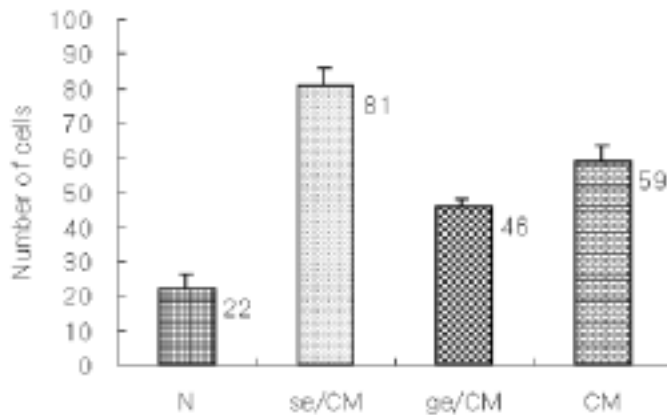


Fig. 12. The change of Tyrosine Hydroxylase-Immunoreactive(TH-IR) cells number in the stomach by treatment of several extracts.

4. 적요

Tyrosine hydroxylase(TH)는 카테콜라민생합성 경로의 첫 번째로 작용하는 rate-limiting enzyme이며, 이들의 활성화는 다양한 기작을 가지고 카테콜라민을 생성하는 신경세포들에 영향을 미치기 때문에 매우 중요한 요소이다. 또한 TH 및 카테콜라민의 비정상적인 발현은 Parkinson's disease(PD)와 같은 퇴행성 신경질환의 원인이 되는데 TH의 발현유도는 이를 치료할 수 있는 기본이 된다.

따라서 본 연구에는 TH 발현을 유도하기 위해 *C. militaris*를 중점으로 사용하였다. 먼저 기존에 TH의 발현을 유도한다고 보고가 되어있는 forskolin(spyridon 등 2001), Reserpine (Nicole 등 1986)과 실험에 이용할 *C. militaris*, *Se/C. militaris*, *Ge/C. militaris*을 처리하고 이들로부터 RNA를 분리하여 RT-PCR에 의한 결과를 비교 분석하였다.

그 결과 대조군에 비해 Fsk와 Res에서 TH mRNA의 발현이 증가함을 볼 수 있었고 다른 실험시료들에 의해서도 발현됨을 확인하였다. 특히 낮은 양의 selenium을 포함하고 있는 *C. militaris*은 기존의 *C. militaris*보다 훨씬 많은 TH가 발현되었다. 발현시간은 시료 투입 후 *In vitro*에서는 4 시간에서 가장 높게 발현되었으며 *In vivo*에서는 4, 8 시간이 높게 발현되었다. 증류수에 의한 추출물보다는 ethanol 추출물이 더 효과적이었다.

western blotting을 한 결과에서 먼저 PC 12 세포를 사용한 결과 대조군에 비해 *C. militaris*을 처리한 실험군의 TH 양성 단백질 밴드가 더 진함을 관찰할 수 있었다. 그리고 mouse whole brain에서는 대조군에 비해 *Se/C. militaris*이 가장 많은 발현이 되는 것을 확인할 수가 있으며 다음으로 *C. militaris*이 높은 발현양상을 볼 수 있었다. 이는 RT-PCR에 의해 확인되었던 결과와 일치하였다. 그리고 이 실험을 통해 3 개의 단백질 양상이 나타났는데 이는 TH단백질을 포함 (약 60 kDa)하며 카테콜라민 합성에 관여하는 물질들은 거의 비슷한 구조를 가지는 상동성 단백질이다.

Immunohistochemistry에 의한 결과는 RT-PCR에서 TH mRNA를 유도 발현시킨 *C. militaris*, *Se/C. militaris*, *Ge/C. militaris*을 이용하였으며 쥐의 뇌와

위에서 TH-IR neuron들의 발현양상을 관찰하였다. TH-IR neuron들은 갈색을 나타내는데 rat brain에서 가장 많이 TH neuron들이 분포되어 있는 SN부위를 살펴보았다. 그 결과 대조군에 비해 신경세포체의 세포질이 훨씬 더 진한 염색이 되어 또렷이 관찰되었으며 독립적으로 존재하는 TH-IR neuron을 살펴보면 작은 돌기들이 많이 생성됨을 확인할 수가 있었다. 그리고 Eisenhofer 등 (1999)과 Paul 등 (1997)은 위(Stomach)에서 dopamine이 생성되고 TH activity를 가진다고 보고하였고 Eisenhofer 등 (1999)은 위에서의 dopamine이 gastrointestinal tract의 보호물질로 작용한다고 보고하였다. 따라서 본 실험에서 위에서의 TH-IR 세포들을 관찰하였으며 반응 세포들이 점막근관에서 주로 나타남을 관찰하였다. 또한 시료를 처리한 조직들이 대조군에 비해 점막근관에서 더 많이 발현됨을 확인할 수 있고 발현영역이 위선까지 더 넓어짐을 확인하였다.

이와 같은 결과로 종합해볼 때 *C. militaris*이 퇴행성 질병과 관련이 있는 TH 유전자의 활성을 증가시켰다. 또한 *C. militaris*에 첨가하여 사용한 se은 효과가 더 높게 나타났다. 이는 Se의 작은 양은 인체에는 필수적이지만 만성으로 인한 과도한 양은 독성을 갖는 특징이 있다. 이는 *C. militaris*의 배지에 첨가하여 유기물질로 전환시킴으로서 이러한 독성을 줄일 것으로 사료된다. 또한 이러한 실험결과들은 TH의 감소의 원인을 갖는 PD와 같은 질병의 예방과 치료제로서의 가능성을 제시하며 시료들의 추출물 성분을 분석하여 효과적인 물질 연구가 계속되어야 한다고 사료된다.

4. 참고문헌

1. Acheson A.L., Naujoks K. and Thoenen H.. Nerve growth factor-mediated enzyme induction in primary cultures of bovine adrenal chromaffin cells: specificity and level of regulation. *J. Neurosci.* 4:1771-1780, 1984.
2. Alison M. Comer., Hannah M. Gibbons., Jianguo Qi., Yoshinori Kawai., Joe Win., Janusz Lipski.. Detection of mRNA species in bulbospinal neurons

isolated from the rostral ventrolateral medulla using single-cell RT-PCR. *Brain Research protocols* 4:367-377, 1999.

3. Alison M. Comer, Jianguo Qi., David L. Christie., Hannah M. Gibbons., Janusz Lipski.. Noradrenaline transporter expression in the pons and medulla oblongata of the rat: localisation to noradrenergic and some C1 adrenergic neurones. *Molecular Brain Research* 62:65-76, 1998.

4. Aso H., Suzuki F., Yamaguchi T., Hayashi Y., Ebina T. and Ishida N.. Induction of interferone and activation of NK cells and macrophages in mice by oral administration of Ge-132, and organic germanium compound. *Microbiol. Immunol.* 29(1):65-74, 1985.

5. Birkmayer W. and Birkmayer G.D.. The L-DOPA story. In: Parkinsonism and Aging. Calne DB *et al.* eds, Raven Press, New York 1-7, 1989.

6. Bok J.w., Lermer L., Chilton J., Klingeman H.G., Towers G.H.. Antitumor sterols from the mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Phytochemistry* 51(7):891-898, 1999.

7. Carl Rosenblad., Mette Gronborg., Claus Hansen., Nikolai Blom., Morten Meyer.. In Vivo protection of nigral dopamine neurons by lentiviral gene transfer of the novel GDNF-Family member Neublasrin/Artemin. *Molecular and Cellular Neuroscience* 15:199-214, 2000.

8. Chan-Palay V., Zaborszky L., Kohler C., Goldstein M. and Palay S.L.. Distribution of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the hypothalamus of rats. *J. Comp. Neurol.* 227:467-496, 1984.

9. Dimartino M.J.. Antiarthritic and immunoregulatory activity of spirogermanium. *J. pharmacol. Exp. ther.* 236(1):103-110, 1986.

10. Edgar D.H. and Thoenen H.. Selective enzyme induction in a nerve growth factor-responsive pheochromocytoma cell line PC12. *Brain Res.* 154:186-190, 1978.

11. Eells J.B., Rives J.E., Yeung S.K., Nikodem V.M.. In vitro regulated expression of tyrosine hydroxylase in ventral midbrain neurons from

- Nurr1-null mouse pups. *Journal of Neuroscience Research* 64(4):322-330, 2001.
12. Eisenhofer E., Hansson G., Harta S., Hoffman G.. Non-neuronal dopamine in the gastrointestinal system. *Clinical and Exp. Pharm. & Phys. Supplement* 26:14-22, 1999.
13. Gao Jin Ming, Yang Xue, Wang Chen Ying, Liu Ji Kai. Armillaramide, anew sphingolipid from the fungus *Armillaria mellea*. *Fitoterapia* 72:858-864, 2001.
14. Grima B., Lamouroux A., Blanot F., Faucon Biguet N. & Mallet.. *J. Proc. natn. Acad. sci. U.S.A.* 82:617-621, 1985.
15. Goodman R., Slater E. and Herschman H.R.. Epidermal grow the factor induces tyrosine hydroxylase in a clonal pheochromocytoma cell line PC-G2. *J. Cell Biol.* 84:495-500, 1980.
16. Hirokazu Kawagishi, Atsushi Shimada, Satoshi Hosokawa. Erinacines E, F, and G, srimulators of Nerve Growth Factor(NGF)-synt hesis, from the Mycelia of *Hericium erinaceum*. *Tetrahedon Letters*, 37(41):7399-7402,1996.
17. Ho C.C., Cherm Y.F. and Lin M.T.. Effects of organogermanium compound 2-carboxyethylgermanium sesquioxide on cardiovascular function and motor activity in rats. *Pharmacology* 41(5):286-291, 1990.
18. Horellou P., Guibert B., Leviel V., & Mallet.. *J. FEBS Lett.* 205:6-10, 1986.
19. Hyoung-Chun Kim, Wang-Kee Jhoo, Shin Guoying Bing. Selenium deficiency potentiates methamphetamine-induced nigral neuronal loss: comparison with MPTP model. *Brain Research* 862: 247-252, 2000.
20. Jacqueline K. Phillips, Ratna Dubey, Erekle Sesiashvilvi. Differential expression of the noradrenaline transporter in adrenergic chromaffin cells, ganglion cells and nerve fibers of the rat adrenal medulla. *J. chem. Neutoanatomy* 21:95-104, 2001.

21. Jao S.W., Lee W., Ho Y.S.. Effects of germanium on 1,2-dimethylhydrazine-induced intestinal cancer in rats. *Dis-Coln-Rectum* 33(2):99-104, 1990.
22. Kiss J.Z., Peczely p.. Distribution of tyrosine-hydroxylase (TH)-immunoreactive neurons in the diencephalon of the pigeon (*Columbia livia domestica*). *J. Comp. Neurol.* 257:333-346, 1987.
23. Kumakara K., Guidotti A. and Costa E.. Primary culture of chromaffin cells: molecular mechanism for the induction of tyrosine hydroxylase mediated by 8-Br-cyclic AMP. *Mol. Pharmacol.* 16:865-876, 1979.
24. Kumano N. Nakai, Y. Ishikawa, T. Koinumaru, S. Kuzuki, S. and Konno, K.. Effect of carboxyethylgermanium sesquioxide in the methylcholathrene-induced tumorigenesis. *Sci. Rep. Res. Inst. Tohoku Univ.* 25:89-95, 1978.
25. Kuo Y.C., Lin C.Y., Tsai W.J., Wu C.L., Chen C.F., Shiao M.S.. Growth inhibitors against tumor cells in *Cordyceps sinensis* other than cerdycepin and polysaccharides. *Cancer Invest* 12(6):611-615, 1994.
26. Lee H.M. and Chung Y.. Effect of organic germanium on metallothionein induction in liver and kidney of cadmium and mercury intoxicated rats. *Yakhak Hoeji* 35(2):99-110,1991.
27. Lee YongKyu and Park DongHa.. Tyrosine Hydroxylase Activity and mRNA in rat Locus Coeruleus and Adrenals Following Chronic Ethanol Treatment and Acute Cold Stress. *J. Biochem. Mol. Biol.* 29(5):393-397, 1996.
28. Lewis E.J. and Chikaraishi D.M.. Regulated expression of the tyrosine hydroxylase gene by epidermal growth factor. *Mol. Cell. Biol.* 7:3332-3336, 1987.
29. Lewis E.J., Tank A.W., Weiner N. and Chikaraishi D.M.. Regulation of tyrosine hydroxylase mRNA by glucocorticoid and cyclic AMP in a rat pheochromocytoma cell line. Isolation of a cDNA clone for tyrosine hydroxylase mRNA. *J. Biol. Chem.* 258:14632-14637, 1983.

30. Marina Romero-Ramos., Jose L. Venero., Josefina Cano., Alberto Machado. Low selenium diet induces tyrosine hydroxylase enzyme in nigrostriatal system of the rat. *Molecular Brain Research*, 84:7-16, 2000.
31. Molinoff P.B. and Axelrod J.. Biochemistry of catechol amines. *Annu. Rev. Biochem.* 40:465-500, 1971.
32. Nagatsu T., Yamaguchi T., Rahman M.K., Trocewicz J., Oka K., Hirata Y., Nagatsu I., Narabayashi H., Kondo T. and Iizuka R.. Catecholamine-related enzymes and the bipterin cofactor in parkinson's disease and related extrapyramidal diseases. *Advances in Neurology* 40:467-473, 1984.
33. Nagatsu I., Kondo Y., Inagaki S., Karasawa N., Kato T. and Nagatsu T.. Immunofluorescent studies on tyrosine hydroxylase. Application for its axoplasmic transport. *Acta Histochem. Cytochem.* 10:494-499, 1977.
34. Nagatsu T., Levitt M. and Udenfriend S.. Tyrosine hydroxylase-the initial step in NE biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 239:2910-2917, 1964.
35. Nicole Faucon Biguet, Michel Buda, Annie Lamouroux, Daniele Samolyk. and Jacques, Mallet.. Time course of the changes of TH mRNA in rat brain and adrenal medulla after a single enjection of recerpine. *The EMBO Journal* 5(2):287-291, 1986.
36. Obeso J.A., Grandas F., Vaamonde J., Luquin M.R., Artieda J., Lera L.M., Rodriguez M.E. and Martinez-Lage J.M.. Motor complicatrons associated with chronic levodopa therapy in Parkinson's disease. *Neurology* 39(2):11-1, 1989.
37. Riederer P., Sofic E., Rausch W.D. and Hebenstreit.. Tyrosine hydroxylase, dopamine, and energy metabolism. Role in Parkinson's disease and aging. In *Parkinsonism and Aging*. Calne DB et al. eds, *Raven Press, New York*, 69-77, 1989.
38. Sasaki K., Ishikawa M., Monma K. and Takayanagi G.. Effect of carboxyethylgermanium sesquioxide(Ge-132) on the acute inflammation and CC14-induced hepatic damage in mice.

Pharmacometrics 27(6):1119-1131, 1984.

39. Shahed A.R., Kim S.I., and Shoskes D.A.. Dawn-regulation of apoptotic and inflammatory genes by cordyceps senensis extract in rat kidney following ischemia/Reperfusion. *Transplantation Proceedings* 33:2986-2987, 2001.

40. Simonium N.A., and Coyle J.L.. Oxidative stress in neutodegenerativ e diseases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36:83-106, 1996.

41. Spyridon Theofilopoulos, Julian Goggi, Samina S. Riaz, Eric Jauniaux, Gerald M. Stern, Henry F. Bradford. Parallel induction of the formation of dopamine and its metabolites With induction of tyrosine hydroxylase expression in foetal rat and human cerebral cortical cells by brain-derived neurotrophic factor and glial-cell derived neurotrophic factor. *Developmental Brain Research* 127:111-112, 2001.

42. Suzuki F.. Antitumor activity of Ge-132, a new organogermanium compound, in mice is expressed through the functions of macrophages and T lymphocytes. *Gan-To-Kagaku-Ryoho.* 12(7): 1445-1452, 1985.

43. Suzuki F., Brutkiewicz R.R. and Pollard R.B.. Cooperation of lymphokine(s) and marcrophager in expression of antitumor activity of carboxyethylgermanium (Ge-132). *Antitumor Res.* 62(2):177-182, 1986.

44. Willner P.. Dopamine mechanisms in depression and mania. In. Bloom FE, Kupfer DJ, editors. Psychopharmacology. The fourth generation of progress. *New York. Raven Press.* 921-931, 1995.

45. Weiner W.J., Koller W.C., Perlik S., Nausieda O.P.A. and Kwans H.L.. Drug holiday and management of Parkinson's disease. *Neurology* 30:1257-1268, 1980.

46. Zhe YuanShan, Brodsky Marina, Steven O. Franklin, Theresa Huang, and Charles E. Inturrisi. "Metrazole Induces the Sequential Activation of c-fos, Oroenkephalin, and Tyrosine Hydroxylase Gene Expression in the Rat Adrenal Gland: Modulation by Glucocorticoid and Adrenocorticotropic Hormone." *Molecular Pharmacology* 44:328-336, 1993.

ABSTRACT

Tyrosine Hydroxylase(TH) is the rate-limiting enzyme in the biosynthesis of catecholamines(CA) that mediate a wide range of the physiological and behavioral functions in the central and peripheral nerves systems. Abnormal function of the CA system in the brain is associated with certain neurological and psychiatric disorders. Especially, Mesencephalic dopaminergic neurons in the *substantia nigra* play an important role in motor functions in Parkinson's disease(PD). The PD is a progressively neurodegenerative disease and results from the decrease of TH, other CA-related enzymes, and dopamine(DA) in the striatum. Over the years, one of the most effective therapeutic strategies for PD is the restoration of DA levels by the treatment with L-DOPA, but chronic levodopa therapy causes several side effects.

The expression level of TH mRNA and TH enzyme activity is altered in response to changes in several physiological states, such as glucocorticoid administration, drug administration (forskolin, reserpine, apomorphine, etc.), Epidermal Growth Factor (EGF), Nerve Growth Factor (NGF), Glial-Derived Neurotrophic Factor(GDNF), and cyclic AMP.

C. militaris is one of endomoprogenic fungi infecting lepidopteran insects and a rare chinese herbal medicine. The crude extracts obtained from *C. militaris* is used for the treatment of excessive tiredness, persistent cough, debility, anemia, asthma, aging, and cancer. The aim of this study was to examine efficacy of TH mRNA induction by crude of *C. militaris* and other mushrooms, as demonstrated by RT-PCR. First at all, we identified induction of TH mRNA by Fsk, Res and *C. militaris*. Next, we examined that TH mRNA induction increased in *C. militaris*-treated tissues. And the *C. militaris*, the organoselenium and organogermanium contained, has also been shown to

increase the TH mRNA induction in brain of mouse. Specially, We further determined the highly effect of organoselenium-contained *C. militaris* on the induction of expression of TH mRNA.

Western blot analysis revealed that TH protein level increased effects of induce on crude extracts from *C. militaris* and other mushrooms. When TH protein was detected by western blotting, it was appeared three distinct immuno-detect bands including TH molecular weight of 60 kDa.

After the treatment of *C. militaris*, Se/*C. militaris*, and Ge/*C. militaris*, TH-IR neuron by immunohistochemistry compared with microscope. In the result, *C. militaris*-treated tissues indicated higher levels of TH immunoreactivity than non-treatment tissue in *substantia nigra* of brain. The changes occurring from the treatment of crude extracts in brain appeared to be the result of an increase in number and color of the TH-containing cells and a number of nerve fibers in brain. In the non-treated stomach tissue, TH-IR cells localized in Muscularis mucisae of stomach layer. But, in the extracts-treated stomach tissue, TH-IR cells had higher levels and it extended in gastric glands. This result agreed with RT-PCR and western blotting. This result suggests that *C. militaris* optimal level of se might play a new clue to treat neurodegenerative disease, such as PD .

제4절 *C. militaris*의 혈전분해효과

혈관이 손상되면 출혈이 일어나고 지혈과정이 뒤따르며 이 과정에서 형성된 혈소판과 섬유소(fibrin)의 응집체인 혈전(thrombus)은 지혈과정이 완결되고 손상된 부위의 조직이 재생되면 plasminogen 활성화제인 Urokinase(UK), tissue-type plasminogen activator(tPA), streptokinase(SK)에 의해 plasminogen이 활성화된 plasmin에 의해 용해되어 혈관의 혈액은 다시 정상

상태를 유지하게 된다. 만약 생성된 혈전이 체내에 과도하게 축적되거나 혈전 용해 기작이 원활하게 작동하지 못할 경우 혈전증(thrombosis)을 유발하여 인체에 치명적인 손상을 줄 수도 있다(Fig. 1). 이 혈전은 혈관을 따라 흐르며 뇌혈전증, 뇌출혈, 심부전증, 심장마비와 같은 혈관계 질환을 유발하는데 현대인의 사망원인 중 혈관계 질환에 의한 사망이 39%로 알려지고 있어 이 혈관계 질환의 주원인 중 하나인 혈전을 용해하는 혈전 용해제에 관한 관심이 점점 더 커지고 있다.

임상에서 사용되어지고 있는 혈전 용해제로는 UK, tPA, SK 등이 있으나 UK를 제외하고는 경구 투여를 할 수 없고 tPA의 경우 반감기가 짧은 단점이 있다. 이 용해제들은 투여 시 혈전에 대한 선택성이 적어 전신출혈이 발생하며 또한 가격이 비싼 단점이 있다. 기존에 사용되고 있는 혈전 용해제들은 plasminogen활성화제들로 간접적인 방법으로 혈전을 용해하지만 혈전을 직접 용해하는 새로운 혈전 용해제들이 보고되었고, 경제적이고 경구투여가 가능한 혈전증 치료제에 대한 연구가 다양하게 시도되고 있으며, 현재 경구투여가 가능한 혈전제로 지렁이(*Lumbricus lubellus*)이로부터 6 가지의 혈전분해효소를 분리하였으며, 혈전을 직접 분해하는 효소를 뱀독으로부터 분리하였다(chai 등, 1995)⁶⁾. 또한 한국과 일본을 중심으로 한 발효식품에서의 혈전분해효소의 연구는 직접 섭취가 가능한 식품을 대상으로 하였다(Park 등, 1995²³⁾; Kim 등, 2000¹⁸⁾; Kim 등, 1999²¹⁾, Heo 등¹⁴⁾). 일본의 전통대두 발효식품인 natto(nattokinase)와 절임식품인 shiokara (katsuwo kinase)에서 혈전용해효소 생산 균주를 분리하고 효소를 정제하였으며, 이의 경구투여 시 생체내의 혈전 분해능을 높일 수 있다고 보고하였다. 우리나라에서도 일본의 natto와 유사한 콩을 원료로 한 전통발효식품인 청국장에서 혈전분해능을 가진 *Bacillus* sp.를 분리 및 정제에 관한 많은 연구가 진하였으며, 전통대두 발효식품인 된장으로부터 natto와 청국장에서 분리한 균주에 비해 2~3 배 이상의 높은 혈전용해 효소를 생산하는 균주를 분리하여 보고하였다(Kim 등, 1996)¹⁹⁾.

한편 버섯의 경우 간단한 요리로 직접섭취가 가능하므로 이에 대한 행되고 있으나, 주로 metalloprotease(Doonana 등, 1999)¹¹⁾와 항진균활성에 관한 연구(Lee 등, 2000)²²⁾가 많이 되었다. 한국산 버섯은 약 990여종이 분류되어 있으

며, 이 중 100 여종이 식용 가능한 버섯으로 확인되었고, fibrin plate와 fibrin zymography(Leber 등, 1997¹⁾; Kim 등, 1998²⁰⁾)을 이용하여 혈전분해능을 가진 버섯을 선발하고 활성의 특이성을 연구하였다.

현재 임상적으로 사용되어지고 있는 혈전용해제인 UK, SK, tPA등은 plasminogen 활성화제로 작용하여 plasmin을 만드는데 관여할 뿐 아니라 혈소판응집을 강하게 억제하는 작용도 한다. 그러나 이 혈전용해제들은 활성은 크지만 fibrin에 대한 선택성이 작아 장기간 복용 시 용혈현상과 면역반응이 나타나는 것으로 알려져 있고 또한 가격이 매우 높은 단점이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 버섯의 자실체 및 균사체로부터 혈전에 대한 선택성이 크고 fibrin 분해활성이 높은 새로운 혈전분해물질에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 버섯류의 균사체 배양은 직접 섭취가 가능하고, 가격이 저렴하며, 대량생산할 수 있다는 장점을 가지고 있다.

따라서 본 연구에서는 식용 및 약용으로 널리 이용되고 있으나 아직 혈전분해능이 보고되지 않은 *C. militaris*로부터 혈전용해효소를 분리하고 그 특성을 연구하게 되었다.

1. 재료 및 방법

가. 단백질분해작용 및 혈전분해작용 검색

1) 시료

본 연구에서는 *C. militaris* ATCC 공시균주를 구입하여 기 정립된 배양조건에 의하여 자실체와 균사체를 배양하여 사용하였다.

2) 버섯추출물의 조제

C. militaris 자실체 10 g을 동일양의 멸균수에 균질화하여 600 X g에서 원심분리 후 상층액을 회수하여 사용하였다.

3) 단백질분해 활성테스트

멸균수에 0.3% skim milk 용액 5 ml에 동량의 2% agarose용액 5ml을 첨가하여 혼합하여 1 시간 동안 실온에서 고화시켜 skim milk agarose plate를 제조하였다. 단백질 분해작용을 검색하기 위하여 skim milk agarose plate에 지름 5 mm의 구멍을 만들어 *C. militaris* 조추출물을 10 μ g을 침적하고 37°C에서 12 시간 반응시켜 생성된 투명대로 확인하고, 이때 효소 1 unit는 위의 반응조건에서 10 mm²의 투명대를 생성시키는 효소량으로 하였다.

4) 혈전분해 활성테스트

fibrinogen을 0.3%가 되도록 TN완충용액(50 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.4)에 용해시킨 용액 5 ml 에 동량의 2% agarose 용액 5 ml 을 첨가하여 혼합한 후, thrombin(100NIH unit/ml) 0.1 ml을 첨가하여 1 시간 동안 실온에서 고화시켜 fibrin agarose plate를 제조하였다. 혈전분해활성을 위해 fibrin agarose plate에 지름 5 mm의 구멍을 만들어 *C.militaris* 조추출물 시료 10 μ g를 침적하고 37°C에서 12 시간 반응하여 형성된 투명대를 확인함으로써 검색하였다.

나. 혈전분해효소의 정제

1) 조단백질 분리

모든 정제과정은 4°C에서 수행하였으며 Doonan (1999)¹¹⁾등의 방법을 변형하여 분리하였으며 정제과정마다 단백질분해활성 및 혈전분해활성과 단백질농도를 측정하였다.

C. militaris 자실체 100 g을 동일한 양의 멸균수를 넣어 균질화하여 600 X g에서 원심분리하여 상층액을 회수하고 동량의 100%에탄올(-70°C)을 천천히 가하며 교반(final EtOH conc. 50%)시킨 후 1 시간 동안 4°C에서 교반하였다.

다시 상층액을 회수하고 최종 에탄올 농도를 75%로 하여 1,200 X g로 원심분리하여 생성된 침전물을 10 mM citrate-NaOH pH 6.0 완충용액에 현탁하여 시료로 사용하였다.

2) 단백질 정량

효소의 단백질정량은 단백질정량 kit(Pierce co.)를 사용하여 측정하였으며 bovine serum albumin(BSA)을 사용한 표준곡선에 의하여 환산하였다.

3) Ion-exchange column chromatography

FPLC system(Pharmacia co.)을 이용하여 DEAE-sephacel을 5 X 20 cm의 column에 충전시켜 10 mM citrate-NaOH(pH 6.0)완충용액으로 평형화시킨 후 주입시켜 0~1 M NaCl의 농도구배를 형성시켜 0.5 ml/min의 속도로 분획을 수집하였다.

4) 활성 분획 분리

혈전분해효소 활성측정은 azocasein으로부터 acid-soluble material 양을 측정함으로써 결정하였다. 1% azocasein(50 mM Tris-HCl, pH 7.0) 300 μ l에 각 분획 50 μ l를 넣고 37°C에서 20 분간 배양시킨 후 ice-cold 10%(W/V) Trichloroacetic acid(TCA) 600 μ l를 넣고 즉시 혼합시켜 10 분 동안 얼음에 보관시킨 후 15,000 rpm, 4°C, 15 분 동안 원심분리시킨 후 상층액을 분리하여 OD₃₆₆에서 측정하여 단백질분해활성을 가지는 분획을 분리하였고, 혈전분해능을 확인하기 위하여 분리된 분획을 2% fibrin agarose plate에 침적하여 혈전분해활성을 검색하였다.

5) 혈전분해작용 및 활성 측정

단백질분해활성을 나타내는 분획을 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.4, 0.15 M NaCl포함)에 fibrinogen을 최종농도 0.3%가 되도록 완전히 용해시킨 용액 5 ml에 동량의 2% agarose 5 ml을 첨가하여 혼합하였다. 혼합한 용액에 thrombin(100 NIH unit/ml) 0.1 ml을 첨가하여 충분히 혼합한 후 1 시간 동안 실온에서 고화시켜 fibrin plate를 제조하여 fibrin plate에 지름 5 mm의 구멍을 만들어 각 분획을 첨가하여 투명대가 형성된 분획을 취하여 10 K centricon(Amicon co.)으로 농축하였다. 농축된 각 시료를 단백질 정량을 하여 fibrin plate에 첨가시키고 대조구로 정제된 혈전용해효소인 plasmin 1 unit(calbiochem 10 μ g)을 사용하였다. 추출액의 혈전분해활성은 대조구의 용해면적에 대한 시료의 용해면적의 상대적인 비율로 환산하여 산출하였다.

6) 혈전분해효소의 분자량 측정

가) SDS-PAGE

정제된 *C. militaris* 혈전분해단백질은 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 수행하여 분자량을 분석하였다. 12%의 separating gel과 5% stacking gel로 이루어진 SDS-PAGE에 활성분획 20 μ g과 5 X sample 완충용액(60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 25% glycerol, 2 % SDS, 14.4mM β -mercaptoethanol, 0.1 % bromophenol blue)과 혼합하여 100°C에서 5 분간 중탕하여 전기영동을 수행하였으며, protein marker(BMA co.)를 사용하여 분자량을 확인하였고, 전기영동 된 gel은 Coomassie blue R-250로 염색하였다.

나) Fibrin-zymography

SDS-fibrin zymography활성확인법은 fibrinogen 농도가 0.12%(W/V)가 되게 polyacrylamide 용액에 혼합한 후 즉시 thrombin(1 NIH unit/ml)을 첨가하여 제조한 12% fibrin-polyacrylamide gel에서 수행하였다. 각 lane에 시료 10

μg 의 단백질을 loading한 후 10 mA의 일정한 전류를 걸어 전기영동을 실시한 다음 SDS에 의해 불활성화된 효소를 재활성화 시키기 위하여 gel을 2.5% Triton X-100을 포함한 Tris-HCl(50 mM, pH 7.4)에 gel을 30 분간 침적하여 SDS를 제거한 후 다시 증류수로 Triton X-100을 제거하였다. 분획된 단백질의 혈전분해활성은 활성반응 완충용액(200 mM NaCl, 10 mM CaCl_2 , 0.02% NaN_3 가 포함된 30 mM Tris-HCl pH 7.4)에 gel을 침적하여 37°C 배양기에서 12 시간 반응시켰다. fibrin 분해능을 지닌 단백질 분획은 활성염색법에 의해 gel상의 fibrin을 분해하여 coomassie blue염색결과 형성된 투명대로 활성을 확인한다(Beber 등. 1997¹⁾; Kim 등. 1998²⁰⁾).

7) *In vitro* 와 *in vivo*에서 혈전분해효과 검증

가) *In vitro*에서 혈전분해작용 검색

Well plate에 50 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 7.4, 0.15 M NaCl포함)에 용해되어있는 1 mg fibrinogen과 thrombin 1unit를 첨가하여 실온에서 1 시간 동안 고화시킨 후 정제된 *C. militaris* 혈전분해효소 10 μg 을 첨가하여 37°C 항온기에서 5 시간 동안 반응시킨 후 400 배의 현미경하에서 관찰하였다.

나) *In vivo*에서 혈전분해작용 검색

Diethyl ether로 Rat을 마취시키고, 복부 대동맥으로부터 채혈을 하였다. 채혈 시 항응고제로 ACD용액(12.5 g Trisodium citrate dihydrate, 7.5 g citric acid monohydrate, 10 g glucose and up to 100 ml water)을 사용하고 혈액과 1 : 6 의 비율로 혼합한 후 150 X g 에서 10분간 원심분리하여 상층의 혈소판부혈장(PRP, platelet rich plasma)를 취하여 다시 500 X g에서 10분간 원심분리하여 혈소판 pellet을 얻어 세척완충용액(11.9 mM NaHCO_3 , 0.33 mM NaH_2PO_4 , 163.3 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 1.1 mM NgCl_2 , 11.2 mM α -D-Glucose, 2.0 mM EDTA, 0.35% Bovine serum albumin, pH 7.4)로 세척

한 후 pellet 을 현탁완충용액(11.9 mM NaHCO₃, 0.33 mM NaH₂PO₄, 163.3 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 1.1 mM NgCl₂, 11.2 mM α-D-Glucose, 2.0 mM EDTA, pH 7.4)에 최종밀도를 5 X 10⁸/ml로 부유시킨 후 thrombin 1 unit를 첨가하여 실온에서 고화시킨 후 정제된 *C. militaris* 혈전분해효소 10 μg을 첨가하여 37°C 항온기에서 5 시간 동안 반응시켜 400 배의 현미경하에서 관찰하였다.

8) 혈전분해효소 특성분석

가) 금속이온에 대한 혈전분해효소 활성 측정

정제한 효소의 활성에 대한 금속이온의 영향을 알아보기 위해 CaCl₂, CoCl₂, ZnCl₂, CuSO₄, MgCl₂, FeCl₂, EDTA, PMSF를 각각 2 mM이 되도록 20 mM Tris-HCl(pH 7.0)에 첨가한 뒤, 같은 부피의 효소용액과 섞은 후 60 분 동안 37°C 항온기에서 반응을 시킨 후 azocasein assay와 fibrin agarose plate를 수행하여 활성을 비교하였다.

나) pH에 대한 혈전분해효소 활성 측정

효소반응의 최적 pH를 검토하기 위해 정제된 혈전용해효소를 각 pH 완충용액에 가하여 37°C에서 60 분간 반응시킨 후 효소활성을 비교하였다. 이때 사용한 완충용액은 혈전분해효소 활성에 대한 영향을 최소화하기 위하여 0.5 M Glycin-HCl(pH 2~pH 3), 0.5 M Acetate(pH 4~pH 5), 0.5 M Tris-HCl(pH 6~pH 8), 0.5 M Glycine-NaOH(pH 9~pH 10) 완충용액을 사용하였으며, azocasein assay와 fibrin agarose plate를 수행하여 pH에 대한 혈전분해효소의 활성을 측정하였다.

다) 온도에 대한 혈전분해효소 활성 측정

분리된 단백질의 열안정성을 알아보기 위하여 효소액 0.1 ml을 30°C ~ 80°C에서 60 분간 반응시킨 후 azocasein assay와 fibrin agarose plate를 수행하여

온도에 대한 혈전분해효소의 활성을 측정하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 추출물의 단백질분해활성

2% skim milk agarose plate에 정량된 *C. militaris* 조효소 10 μg 과 양성대조군으로 trypsin 10 μg 을 침적하고 37°C에서 12 시간 동안 반응시켜 형성된 투명대로 단백질 분해활성을 검색하였다. 이때 효소 1 unit는 위의 반응조건에서 10mm²의 투명대를 생성시키는 효소량으로 하였다. 침적된 각 버섯추출물은 12 시간 반응 후 투명대를 형성하였다. 따라서 이들 버섯추출물 내에 단백질분해효소가 존재함을 확인하였고, 정제된 단백질분해효소인 trypsin은 0.5 unit/ μg , *C. militaris* 조효소는 0.35 unit/ μg 의 단백질분해활성을 나타내었다 (Fig. 2).

나. 추출물의 혈전분해작용

정량된 *C. militaris* 조효소로부터 혈전분해작용 및 활성을 확인하기 위하여 2% fibrin agarose plate assay를 수행하였다. *C. militaris* 조효소 10 μg 을 침적시킨 후 12 시간동안 37°C 항온기에서 반응하였으며, 혈전분해반응시간을 확인하기 위하여 1 시간 별로 활성을 확인하였다. 버섯시료가 침적된 모든 lane에서 혈전분해반응을 확인할 수 있는 투명대가 형성되었으며, *C. militaris*은 양성대조군으로 사용한 정제된 혈전분해효소인 plasmin과 동일하게 침적 후 1 시간 내에 강력한 혈전분해활성을 나타내었다(Fig. 3). 따라서 *C. militaris*를 가공하여 혈전증예방에 대한 기능성 식품 및 예방제로 개발이 가능할 것으로 사료된다.

다. 혈전분해효소의 정제

1) 에탄올침전법에 의한 단백질 분리

모든 정제 과정은 4°C에서 수행하였으며, 안정적인 혈전분해효소 활성을 유지시키기 위하여 에탄올추출을 수행하였다. 혈전분해효소가 분리되어지는 에탄올 농도를 측정하기 위하여 50%, 70%, 85%로 에탄올 농도를 점진적으로 증가시켜서 분리된 단백질을 10 mM citrate-NaOH (pH 6.0) 완충용액에 현탁하여 azocasein assay 및 fibrinolysis assay를 수행하였고, 단백질분해활성 1 unit는 OD₃₆₆에서 0.1의 값으로 정하였다.

C. militaris 단백질은 50%~75% 에탄올 농도분획에서 940 unit로 가장 높은 단백질분해활성을 나타내었다 (Table 1).

따라서 향후 50%-70%의 에탄올 농도에서 조단백질을 분리하여 시료로 사용하였다.

2) Ion-exchange column chromatography

DEAE-sephacel column을 10mM citrate-NaOH(pH 6.0)으로 평형화한 후 0~1 M NaCl의 농도구배를 형성시켜 0.5 ml/min으로 분획하였다. 분리된 분획은 azocasein assay 및 fibrin agarose plate를 수행하여 활성분획을 분리하게 되었다. 활성분획은 400 mM NaCl 농도에서 분리된 분획에서 가장 높은 활성을 나타내었다(Fig. 4).

3) 혈전분해효소 활성

Ion-exchange column chromatography로부터 분리된 각 버섯으로부터의 혈전용해효소를 정량하여 혈전분해능 및 활성을 측정하기 위하여 2% fibrin agarose plate assay를 수행하여 37°C 항온기에서 12 시간 반응하였다. 혈전분해활성은 1 unit는 정제된 혈전분해효소인 plasmin 10 µg에 의하여 형성된 투명대 면적에 대한 상대적인 투명대 면적으로 환산하였다. 12 시간 후 정제된

혈전분해효소(10 μ g)가 침적된 lane에서 투명대가 형성됨을 확인하였다. 각 정제된 혈전분해효소는 plasmin에 의해 형성된 투명대 면적에 대하여 *C. militaris*로부터 정제된 혈전분해효소는 1.5 배의 활성을 나타내었다(Fig. 5). 전통발효식품인 된장으로부터 분리되어진 *Bacillus* sp.로부터 정제된 혈전분해효소는 약 1.3 배의 활성을 가지고 있으며, 또한 Kim등(1999)에 의해 혈전분해능을 갖는 버섯류인 중 가장 활성이 높은 버섯인 장식솔버섯(*Tricholoma-opsis decora*)의 혈전분해활성은 0.99 배로, *C. militaris*로부터 정제된 혈전분해효소활성이 높음을 확인하였다.

4) 혈전분해효소의 분자량

분리 정제된 *C. militaris* 혈전분해효소는 12% SDS-PAGE과 Beber등(1997)¹⁾의 방법을 이용한 12% fibrin SDS-PAGE zymography를 수행하여 정제된 혈전분해효소의 분자량을 측정하였다.

정제된 *C. militaris* 혈전분해효소를 12% SDS-PAGE에 전기영동한 결과 52 kDa(Fig. 6, lane 3)의 분자량을 확인하였다. 또한 fibrin zymography를 수행하여 동일한 위치에 SDS-PAGE에서 확인한 동일한 분자량에 투명대가 형성됨을 확인하였다(Fig. 6 lane, 4).

위의 결과로부터 SDS-PAGE와 fibrin zymography상에서 동일한 분자량을 나타내어 정제된 혈전분해효소가 단량체(monomer)임을 확인 할 수 있었고 기존에 보고된 *Bacillus* sp.로부터 정제된 혈전분해효소는 45 kDa, 일본의 전통 발효식품인 natto로부터 분리된 효소는 44 kDa로 미생물에서 분리된 혈전분해효소는 다른 효소임을 확인할 수 있었다.

라. *In vivo*와 *in vitro*에서 혈전분해

1) *In vitro*에서 혈전분해

Fibrin 분해작용을 검증하기 위한 *in vitro* test로서 Fibrinogen용액 1 mg에

Thrombin 1unit를 첨가하여 고화시켜 정제된 혈전분해효소 10 μg 을 처리하여 37°C 항온기에서 5 시간동안 반응시켜 fibrin 응집유무를 현미경하에서 관찰하였다. saline을 처리한 음성대조군에는 Blinc등(2000)²⁾이 보고한 fibrin과 동일하게 그물모양으로 존재하였으며(Fig. 7, A), plasmin을 처리한 시료는 fibrin이 용해되었다(Fig. 7, B). 각 정제된 혈전분해효소를 처리한 lane에서는 fibrin이 용해되었다. 그러나 각 정제된 혈전분해효소의 활성에 따라 약간의 fibrin이 존재하였으나, 12 시간 반응 후 fibrin이 완전히 용해됨을 확인하였다. 혈전효소활성은 *C. militaris*에서 plasmin과 동일하게 fibrin이 용해되었으며, Blinc 등(2000)²⁾이 보고한 바와 같이 *C. militaris*로부터 분리된 효소가 혈전을 분해시킴을 확인 할 수 있었다(Fig. 7. C). 따라서 *C. militaris*로부터 분리정제된 혈전분해효소가 plasmin의 활성과 유사하며 활성도 약 1.5 배정도 활성이 높기 때문에 혈전용해제 개발이 가능할 것으로 사료되며, 혈전증 예방을 위한 기능성식품개발이 가능하리라 사료되어진다.

2) *In vivo*에서 혈전분해

In vivo tset를 위해 rat의 혈액으로부터 분리한 PRP에 thrombin을 처리하여 고화시켜 음성대조군으로 saline, 양성대조군으로 plasmin, 그리고 각 정제된 혈전분해효소를 처리하여 혈전분해작용을 검증하였다. saline을 처리한 음성대조군에서는 적혈구와 fibrin이 엉켜 혈전이 형성되었으며(Fig. 7, C), plasmin을 처리한 양성대조군에서는 fibrin이 용해되어(Fig. 7. D) 적혈구만 확인되어 Blinc 등(2000)²⁾이 보고한 plasma clot에서 혈전분해와 동일한 결과(Fig. 7. E)를 확인 할 수 있었다. 특히 혈전용해제의 경우 fibrin만 특이적으로 분해하여야 한다. 본 실험의 결과에서 나타나듯이 혈전용해제로 정제된 plasmin과 본 연구에서 분리 정제된 효소 모두 동일하게 fibrin만을 용해시키고 적혈구에는 영향을 미치지 않았음을 확인하였다. 따라서 정제된 효소들은 섭취 및 투여 시 체내에서 일어날 수 있는 부작용 중의 하나인 국소적인 용혈현상을 최소화 할 것으로 사료된다.

마. 혈전 분해효소의 활성화에 미치는 factor

1) 금속이온 및 단백질분해효소 저해제에 대한 혈전분해효소 활성화

금속이온에 대한 혈전분해효소의 활성화는 금속이온을 처리하여 azocasein assay 및 fibrin agarose plate를 수행하여 확인하였다. 금속이온에 대하여 활성저해를 나타내었고(Fig. 8), 단백질분해효소 저해제인 PMSF에 의해 강한 활성저해반응이 나타남으로 *C. militaris*로부터 정제된 혈전분해효소는 serine 계열의 단백질분해효소임을 확인하였다(Fig. 9).

2) pH에 대한 혈전분해효소활성

혈전분해효소반응의 최적 pH를 검토하기 위해 정제된 혈전용해효소를 각 pH 완충용액에 가하여 37°C에서 60 분간 반응시킨 후 azocasein assay 및 fibrin agarose plate를 수행하여 효소활성을 비교하였다. 분리된 혈전분해효소는 대부분 pH 6.0~pH 8.0에서 비교적 안정한 활성을 나타내었으며, *C. militaris*로부터 정제된 혈전분해효소는 pH 7.0에서 가장 안정적인 활성을 나타낸 반면 pH가 높아짐에 따라 그 활성이 저해가 되었다(Fig. 10).

3) 온도에 대한 혈전분해효소 활성화

분리된 단백질의 열안정성을 알아보기 위하여 효소액 0.1 ml을 10°C 간격으로 30°C~80°C에서 10 분간 처리하여 azocasein assay 및 fibrin agarose plate를 수행하였다. 분리된 혈전분해효소들은 30°C~40°C 안정적인 효소활성을 나타내었다. *C. militaris*로부터 정제된 혈전분해효소는 37°C에서 최적활성을 나타내었으나 60°C 이상에서는 효소활성이 급격히 저해됨을 확인할 수 있었다(Fig. 11). 미생물로부터 분리정제된 혈전분해효소 (Chen 등 2000⁷⁾, Heo 등 2001¹⁴⁾과 할미송이버섯(*Tricholoma asponaceum*)으로부터 분리정제된 혈전분해효소는 최적활성온도가 50°C~60°C로 보고된 반면에 분리된 혈전분해효소

는 인체 내에서 최적활성을 나타낼 수 있는 약 37℃로 인체 투여시 안정적인 효소반응을 나타낼 것으로 사료된다.

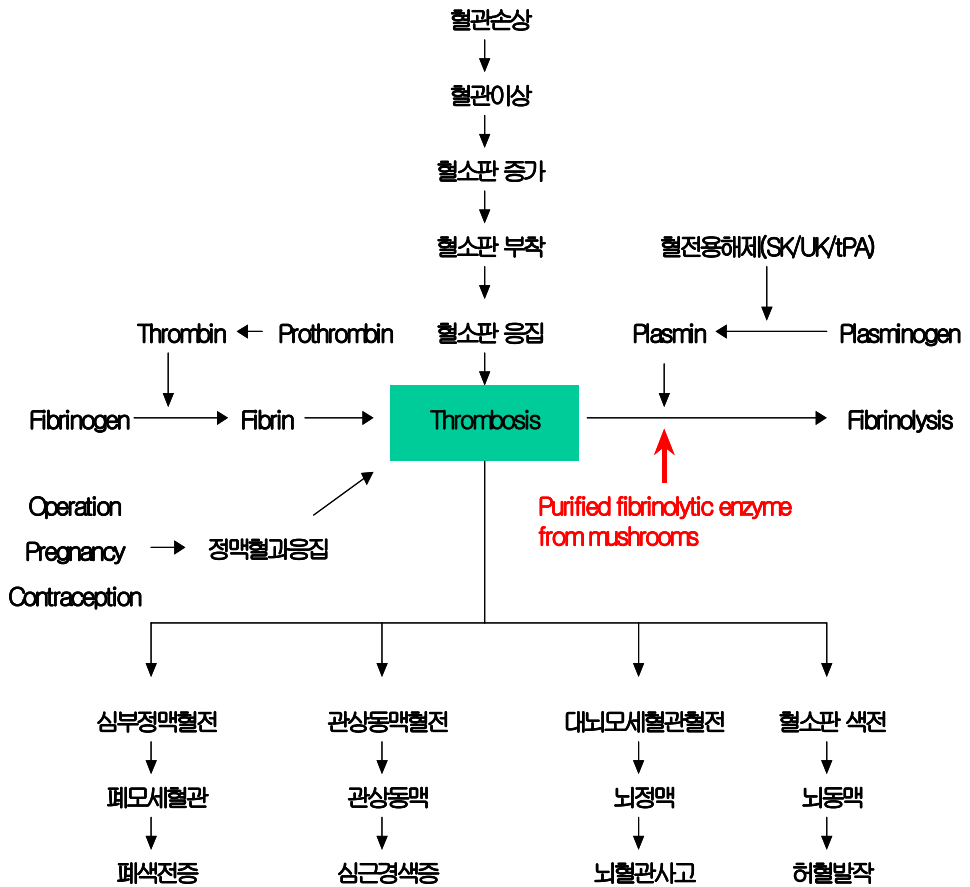
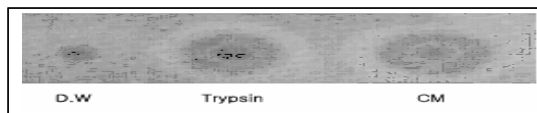


Fig. 1. The pathway of thrombosis and fibrinolysis



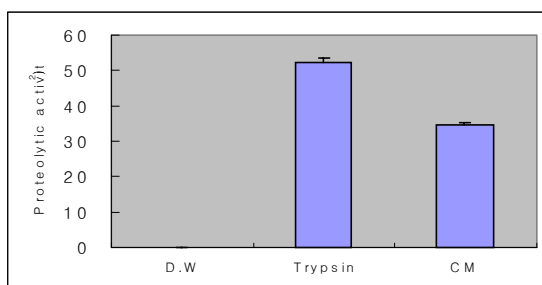


Fig. 2. The proteolytic activity from crude extract on 2 % skim milk agarose plate. Lane 1. Negative control : Autoclaved 3rd D.W , Lane 2. Positive control : trypsin (10 μ g), Lane 3. *C. militaris* crude extract (10 μ g)

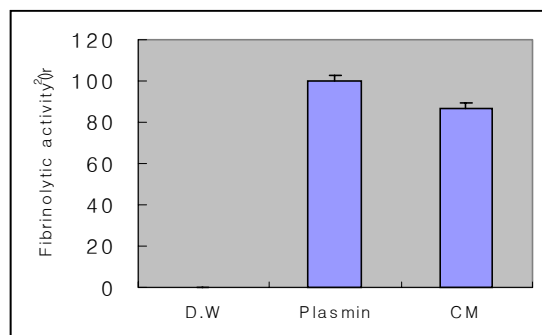
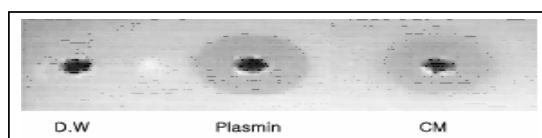


Fig. 3. The screening of fibrinolytic activity from crude extracts on 2 % fibrin agarose plate. Lane 1. Negative control : Autoclaved 3rd D.W, Lane 2. Positive control : plasmin(10 μ g), Lane 3. *C. militaris* crude extract(10 μ g)

Table. 1. Purification steps for the fibrinolytic enzyme

:

Unit(Protease activity)

EtOH conc.	<i>C. militaris</i>
Crude	455
EtOH Conc. 50%	664
EtOH Conc. 70%	940
EtOH Conc. 85%	202
Purified enzyme	1962

※ 1 unit is azocasein yield at absorbance of 0.1 at 366 nm following a incubation at 37°C for 20 min

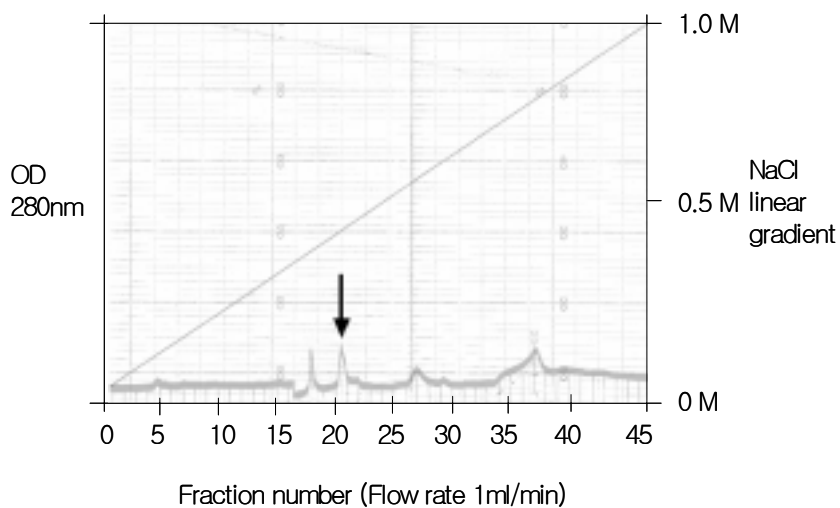
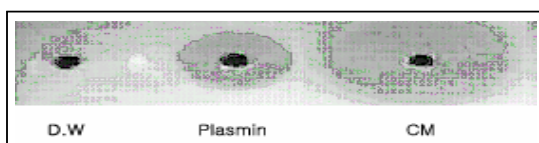


Fig. 4. Anion-exchange column chromatography of fibrinolytic enzyme from *C. militaris* on DEAE-sephacel. The protein sample was applied to the column (7 × 15 cm) equilibrated with 10 mM citrate-NaOH (pH 6.0). The protein was eluted with 0~1 M of the NaCl linear gradient at the flow rate of 0.5 ml/min at 4°C



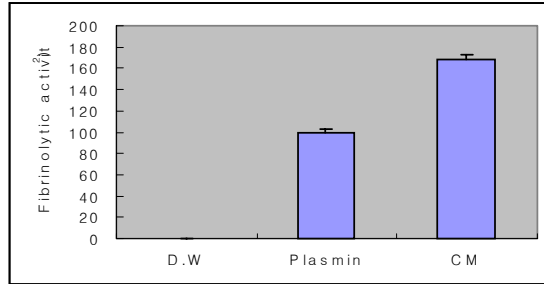


Fig. 5. The fibrinolytic activity of purified enzyme. The protease from *C. militaris* showed a level of fibrinolytic activity that was about 1.5 fold higher than 1.0 unit of plasmin. Lane 1. Negative control : 10mM Citrate-NaOH (pH 6.0) ; Lane 2. Positive control : Plasmin (10 μ g) ; Lane 3. *C. militaris* (10 μ g)

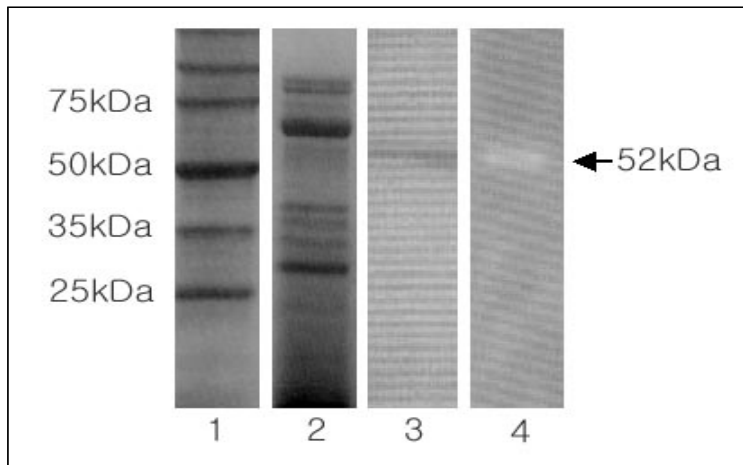


Fig 6. SDS-PAGE and fibrin zymography of the purified enzyme from *C. militaris*. The fibrinolytic activity was detected 52 kDa (arrow) on 10% polyacrylamide gel slabs containing 0.12% fibrinogen. Clear band indicated 52kDa on fibrin zymography. Lane 1. Protein marker ; Lane 2. *C. militaris* crude extract (10 μ g) ; Lane 3. purified enzyme (10 μ g) ; Lane 4. fibrin zymography

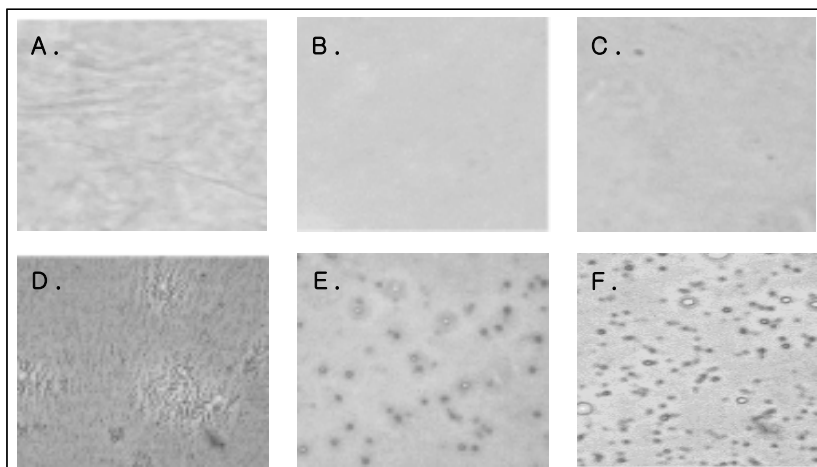


Fig. 7. Hydrolysis of human fibrin(A, B, C) and platelet aggregation(D, E, F) by purified enzyme from *C. militaris*($\times 400$). A, D : Negative control : saline ($20 \mu\text{l}$) ; B, E : Positive control : Plasmin ($10 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$) ; C, F : purified enzyme from *C. militaris* ($10 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$)

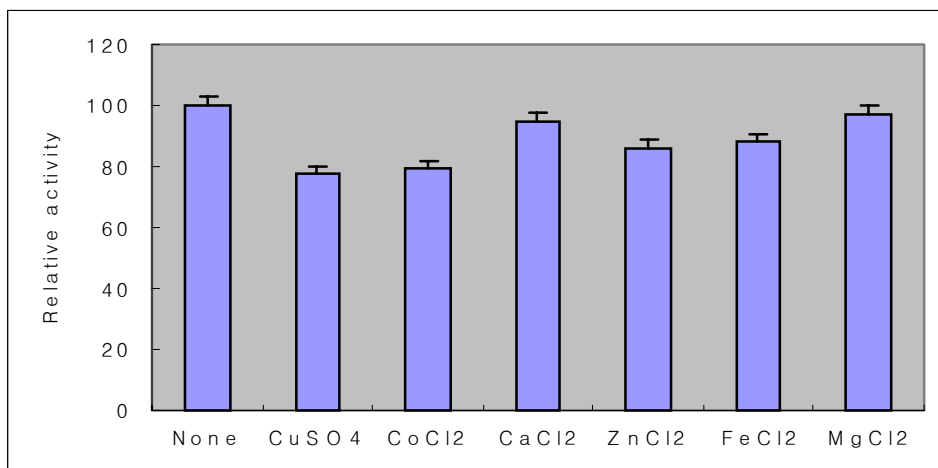


Fig. 8. Effect of metal ions on the activity of the fibrinolytic enzyme The enzyme was pre-incubated with various 1 mM metal ions in 10 mM citrate-NaOH(pH 6.0) buffer for 1h at 37°C, After incubation, the mixture was performed to the azocasein assay and fibrinolysis assay. The results were expressed as percent(%) relative activity to that of none.

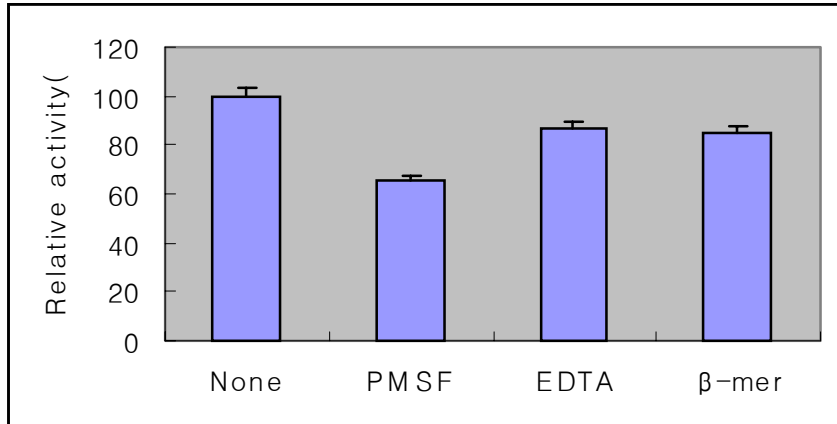


Fig. 9. Effect of protease inhibitors on the activity of fibrinolytic enzyme. The enzyme was pre-incubated with 1 mM protease inhibitors of 10 mM citrate-NaOH(pH 6.0) buffer for 1h at 37°C, After incubation, the mixture was performed to the azocasein assay and fibrinolysis assay. The results were expressed as percent(%) relative activity to that of none.

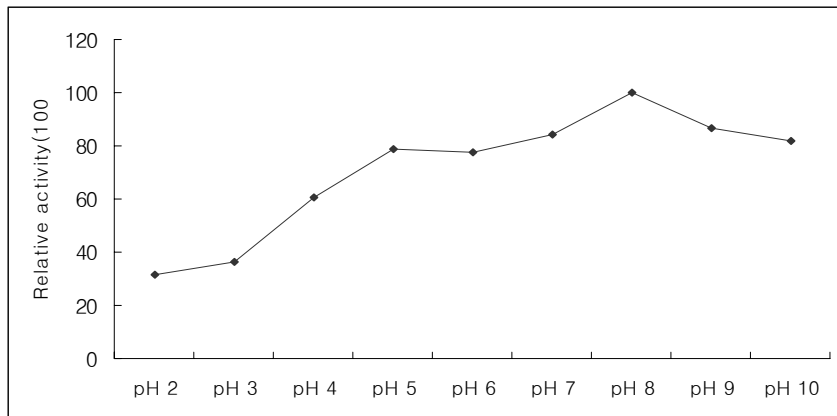


Fig. 10. Effect of pH on the activity of the fibrinolytic enzyme. The enzyme activity was assayed in the pH range of 2-10, respectively in 0.5 M glycine-HCl buffer for pH 2-3, 0.5 M acetate buffer for pH 4-5, 0.5 M Tris-HCl buffer for pH 6-8, and in 0.5 M glycine-NaOH buffer for pH 9-10. The enzyme activity was measured by incubating it for 1h at the various pH values at 37°C. After incubation, the mixture was performed to the azocasein assay and fibrin agarose plate.

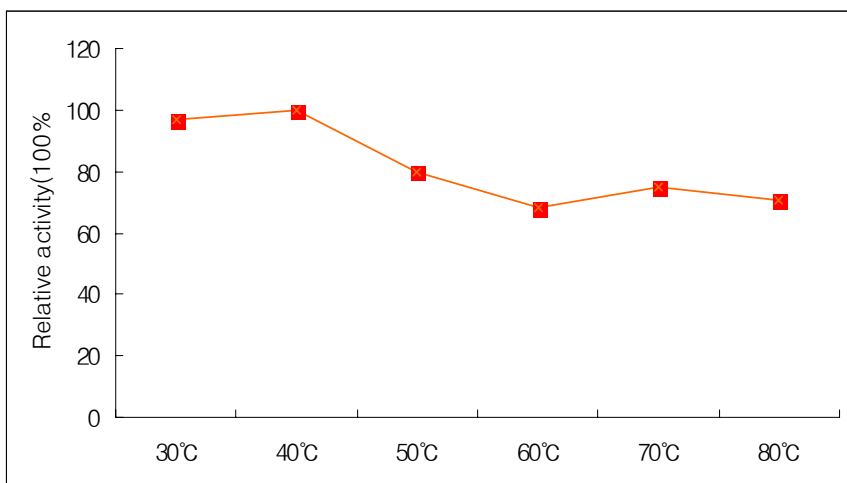


Fig. 11. Effect of temperature on the enzyme activity. The enzyme activity was assayed at various temperatures of 30-80°C and pH 6.0 in 10 mM citrate-NaOH buffer. The enzyme activity was measured by keeping it for 10 min at the various temperatures and pH 6.0, and the enzyme assay was performed to the azocasein assay and fibrinolysis assay.

4. 적 요

최근 버섯류로부터 혈전분해물질, 항함, 항종양, 면역활성, 항산화제 등에 대한 연구들이 많이 진행되고 있다. 본 연구에서는 *C. militaris*로부터 분리된 단백질분해효소들이 fibrin을 특이적으로 분해하는 혈전분해효소임을 확인하였고, *C. militaris*로부터 정제된 혈전분해효소는 serine계열 단백질 분해효소이며 plasmin에 대하여 약 1.5 배의 활성을 나타내었다. 정제된 혈전분해효소는 52 kDa의 분자량을 가지고 있으며, 최적활성온도는 35~42°C, 최적활성 pH는 pH 7에서 가장 높은 활성을 나타내었다. *In vivo*와 *in vitro*에서 혈전분해를 확인하기 위하여 fibrin과 rat의 PRP에서 반응시킨 결과 Blinc 등 (2000)이 보고한 결과와 동일하게 fibrin과 rat의 PRP의 음성대조군에서는 fibrin섬유가 그물모양으로 얽혀있었고, plasmin과 버섯으로부터 추출된 효소를 처리한 곳에서는 fibrin 섬유가 분해되어 있음을 현미경(X 400)하에서 확인 할 수 있었다. 또한 혈전분해 관련 유전자 연구와 새로운 혈전분해물질에 대한 앞으로의 연구를 통하여 기능성 버섯류 개발과 인체 부작용을 최소화할 수 있는 새로운 혈전분해제 개발이 가능하리라 사료되다.

5. 참고문헌

1. Beber T.M., and Balkwill F.R Zymography:A Single-Step Staining Method for Quantitation of Proteolytic Activity on Substrate Gels. Analytical Biochemistry 249,24-28 (1997)
2. Blinc A., Magdic J., Musevic I. and Fric J. Atomic force microscopy of fibrin networks and plasma clots during fibrinolysis. Fibrinolysis & Proteolysis (2000) 14(5), 288-299
3. Booth N. A. Fibrinolysis and Thrombosis. Bailliere's Clinical haematology. Vol. 12, No. 3, pp. 423-433, (1999)
4. Booth N. A. Regulation of fibrinolytic activity by localization of inhibitors

- to fibrin(ogen). Fibrinolysis & Proteolysis (2000) 14(2/3), 206-213
5. Brattig N.W., Haffner A., Guilavogui A.Z., and Tischendorf F.W. Onchocerca volvulus : Microfilariae Secrete Elastolytic and Matrix Nonelastolytic Matrix-Degrading Serine and Metalloproteases. Experimental Parasitology 90, 26-33(1998)
 6. Chai C.S., B.J. Kim, Lee M.H., Rim J.S., Lee H., Lee H.S., and Kim J.H. Studies on the Development of a Thrombolytic Agent from Korean Snake Venom II. Characterization and Thrombolytic Activity of a Protease from the Venom of *A. Bromhoffi brevicaudus*. The Journal of Applied pharmacology 3, 165-170(1995)
 7. Chen S.T., Sookkheo B., Sinchaikul S., and Phutrakul S. Purification and Characterization of the highly Thermostable Protases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33. Protein Expression and Purification 20, 142-151(2000)
 8. Collen D., Lijnen H.R., Hof B.V., and Roelants I. Fibrin(ogen) degradation by a 24K- endopeptidase from a *Chryseobacterium* Sp. Fibrinolysis & Proteolysis (2000) 14(4), 247-252
 9. Creasy C.L., Savopoulos J.W., Carter P.S., Turconi S., Pettman G.R., Karran E.H., C.W. Gray, R.V Ward,, and Jenkins O. Expression, Purification, and Function Analysis of the Human Serine Protease HtrA2. Protein Expression and Purification 19, 227-234(2000)
 10. Diamond S.L. and Wu J.H. A Fluorescence Quench and Dequench Assay of Fibrinogen Polymerization, Fibrinogenolysis, or Fibrinolysis. Analytical Biochemistry 224, 89-91(1995)
 11. Doonan S., Healy V., O'Connell J., and McCarthy T.V., The Lysine-Specific Proteinase from *Armillaria mellea* Is a Member of a Novel Class of Metalloendopeptidases Located in Basidiomycetes. Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 262, No. 1, Aug, pp.60-63(1999)

12. Geider K., Shang Y., Bak D.D., and Heid H. Molecular Characterization of a Protease Secreted by *Erwinia amylovora*. J. Mol. Biol. 289, 1239-1251(1999)
13. Gupta M.N., and Agarwal R. Sequential Precipitation with Reversibly Soluble Insoluble Polymers as a Bioseparation Strategy :Purification of β -glucosidase from *Trichoderma longibrachiatum*. Protein Expression and Purification 7, 294-298(1996)
14. Heo S., Lee S.K., Bae D.H., Kwon T.J., Lee S.B., Lee H.H., Park J.H., and Johnson M.G. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme from *Bacillus sp. KDO-13* isolated from soybean paste. J. Microbiol.Biotechol.(200), 11(5). 845-852
15. Imhoff J.M., Poulouin L., Gallet O., and Rouahi M. Plasma Fibronectin : Tree Steps to Purification and Stability. Protein Expression and Purification 17, 146-152(1999)
16. Kim D.C and Kim Y.W. Evalutin of Thrombolytic Effect of Streptokinase-Dextran Conjugate in a Rat Model of Arterial Thrombosis. J. Kor. Pharm. Sci. Vol. 29, No. 3, 211-216(1999)
17. Kim J.H. Purification and Characterization if fibrinolytic enzyme from *Tricholoma saponaceum*. The Korean Journal of Mycology Vol. 28, No. 1,60-65(2000)
18. Kim J.O., Jeong Y.K., Yang W.S., Kang J.O., and Kong I.S. Fibrinolysis of Fermented Kimchi. Korean J. Life Science 5(4), 203-210(1995)
19. Kim S.H. Ahn C.W., Shon D.H., and Lee K.A. Screening of Antithrombotic Peptides from Soybean Paste by the Microplate Method. Korean J. Food SCI. Technol. Vol. 28, No. 4, pp.684-688(1996)
20. Kim S.H., Choi N.S. and Lee W.Y. Fibrin Zymography: A Direct Analysis of Fibrinolytic Enzyme on Gels. Analytical Biochemistry 263, 115-116(1998)
21. Kim S.H., Noh K.A., Kim D.H., and Choi N.S. Isolation of Fibrinolytic Enzyme Producing Strains from Kimch Korean J. Food SCI. Technol. Vol.

- 31, No. 1, pp. 219-223(1999)
22. Lee E.B., Shim J.Y., Lee Y.S., Lim S.S., Shin K.H., Hyun J.E., and Kim S.Y. Pharmacological Activities of *Paecilomyces japonica*, A New type *Cordyceps* sp. Korean Journal of Pharmacogn. 31(2): 163-167(2000)
23. Park I.S., Kil J.O., and Kim G.N. Productin and Characterization of Fibrinolytic Enzyme: Optimal Condition for Production of the Enzyme from *Bacillus* sp. *KP-6408* Isolated from Chungkook-jang. Journal of Korean Soc. Food Sci. Nutr. 27(1), 51-56(1998)
24. Presta M., Gualandris A., Conejo T.L, Giunciuglio D., Albini A., Sabini E., Rusnati M., and Dell'Era P., "Urokinase-Type Plasminogen Activator Overexpression Enhances the Invasive Capacity of Endothelial Cells" Microvascular Research 53, 254-260(1997)
25. Shiao M.S., and Wang S.Y. Pharmacological functions of Chinese Medical Fungus *Cordyceps sinensis* and Related Species. J. Food and Drug Analysis Vol. 8 第4期
26. Shiao M.S., Wang J.J., Wang Z.N., Lin L.J., and Lien J.Y. Profiles of nucleosides and nitrogen bases in Chinese medical fungus *Cordyceps sinensis* and related species. Bot. bull. Acad. Sin 35, 261-267(1994)
27. Shiao M.S., Chiu J.H, Ju C.H, Wu L.H., Lui W.Y., and C.W Wu *Cordyceps sinensis* increases the Expression of Major Histocompatibility complex Class II Antigens on Human Hepatoma Cell line HA22T/VGH Cells. American Journal of Chinese Medicine, Vol. XXVI, No. 2, pp. 159-170(1998)
28. Yun H.S., Paik Y.S., Song J.K., Yoon C.H., and Shung K.S. Anti-platelet and Anti-thrombotic effects of *Gastrodia elata*. Kor. J. Pharmacogn. 26(4) : 385-389(1995)

ABSTRACT

Blood clots are formed through the conversion of fibrinogen into fibrin by the

proteolytic action of thrombin, and subsequently, insoluble fibrin clots are formed. The fibrin clots are dissolved by the hydrolytic action of plasmin, which is activated from plasminogen by tissue-type plasminogen activator(tPA). Generally, the hydrolysis of fibrin is called fibrinolysis. The fibrin clot formation and the fibrinolysis are well balanced in the biological system. However, when the fibrin is not hydrolyzed due to any disorder, thrombosis such as myocardial infarction can occur. Intravenous administration of urokinase (UK), streptokinase (SK), and tPA, which are capable of degrading fibrin, has been widely used for this thrombosis therapy.

Unfortunately, these enzymes have a low specificity for fibrin and are also expensive. Recently, an investigation was conducted on the isolation of fibrinolytic enzyme from natural extract, because the fibrinolytic proteases for thrombolytic therapy has been demanded high specificity for fibrin and are low price.

Therefore, we are reported that the fibrinolytic proteases isolated from medicinal mushrooms such as the *C. militaris* in this studies.

Purified fibrinolytic protease from *C. militaris* showed molecular mass of 52 kDa, respectively, on SDS-PAGE and fibrin zymography. It has been isolated and purified using a series of chromatographic column such as anion exchange. The protease from *C. militaris* showed a level of fibrinolytic activity that was about 1.5 fold higher than 1.0 unit of plasmin.

Heat and pH stabilities of the enzyme on fibrinolysis was highly dependent on temperature. The fibrinolytic activity was observed in temperature ranges between 30 °C and 80°C. Optimum temperature for fibrinolytic enzymes was in ranges of 35°C to 42°C and the optimum pH was pH 6.0 to pH 8.0.

Fibrinolytic protease from *C. militaris* was slightly inhibited by all metal ions, especially inhibited by PMSF, indicating that the enzyme is a serine protease.

The result showed that the fibrinolytic protease from the *C. militaris* has a fibrinolytic activity *in vivo* and *in vitro*. These might be developed as a therapeutic agent for the treatment of thrombic disease.

제4장 동충하초의 우량균주 개발과 대량재배

제1절 서론

버섯의 한 종류인 동충하초가 항암성분 및 성인병 예방에 효과가 좋다는 사실이 알려짐으로서 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.^{1,2,3)}

재배농가는 동충하초의 계대배양으로 활력이 떨어져서 동충하초 생산에 많은 애로가 있고 반면에 동충하초의 수요가 급증하르로서 동충하초 가격이 너무 비싸서 소비자에게 부담이 되고 있다. 이처럼 동충하초의 가격과 재배의 어려움을 동시에 해결할 방법이 강구 되어야한다.

우수균주를 선발하기 위하여 야생의 동충하초를 채집하여 정확한 동정이 이루어져야하는 데 전문가가 아니면 쉬운 일은 아니다. 동충하초 재배에 대한 연구는 외국의 학자⁴⁾와 최근에 한국의 여러학자에 의하여 시도되었다.^{5,6,7,8.)} 하지만 특허건등 여러 문제로 농가가 이용하기에는 어려움이 많다.

현재 동충하초의 2종류만 재배되어 이용되고 있지만 더 많은 균주의 개발이 요구되며 지금까지 재배에 관한 연구는 연구 는등이 있다.

본 연구는 야생의 동충하초로부터 우량균주를 선발하여 대량재배를 통하여 농가의 소득을 증대하고 소비자에게는 싼값으로 동충하초를 공급하여 국가경제에 기여하는 데 있다.

제2절 동충하초의 채집과 분류

1. 동충하초의 채집

가. 채 집

지리산, 설악산, 한라산, 소백산, 주완산, 월악산, 속리산, 북한산, 변산반도국립공원, 월출산, 내장산, 덕유산등을 비롯한 국립공원을 중심으로 활력이 왕성

한 여름철에 채집하여 동정하였고 겨울철에는 중국산 동충하초가 고산지대의 추운 곳에 발생하므로 겨울철에도 국립공원을 중심으로 채집하였다.

나. 동충하초의 정리

채집한 버섯은 외부관찰을 행하였고 실험실로 운반하여 포자문을 만들거나 자실체를 스카치테이프로 고정하여 포자를 분리하였다. 또 동충하초 두부의 일부를 PDA배지에 옮겨서 균사분리를 행하였고 나머지 동충하초는 채집봉투에 번호, 채집장소, 날짜 등을 기록하고 실리카겔과 나프탈렌을 넣어 우석대학교 균류유전자원 표본실에 보관하였다.

다. 동정 방법

야외현장에서 마이크로렌즈를 부착한 카메라로 생생한 사진 4~5장을 여러 각도에서 찍고 서식지의 생태적 특성을 기록하였다. 외부형태와 현미경관찰을 통하여 동충하초균과 눈꽃동충하초균을 분리하였는데 외부형태는 두부의 모양과 크기, 색깔을 조사하였고 자실체 전체의 크기도 측정하였다. 현미경 관찰은 자낭의 두부, 자낭, 자낭배열등을 관찰하고 크기를 측정하였다. 또 멜저액에 의한 생화적 반응을 통한 포자의 변색 유무도 실험하였다.

- 외부형태의 관찰 : 자실체의 모양과 크기를 측정하고 이들의 색깔을 관찰한다. 어떤 곤충에서 발생하는지를 조사하고 생태적 서식지를 조사한다.
- 현미경관찰 : 자낭포자와 2차 포자의 모양과 크기, 자낭의 두부 포자의 자낭에서의 배열상태의 모양과 크기를 관찰한 다음에 멜저액으로 염색하여 자세히 관찰하였다.

라. 동정에 사용된 문헌

清水大典⁹⁾의 동충하초도감과 중국대형진균원색도감을 이용하였다. 그 외 국내외에서 발행된 각종 문헌을 참조하였다.

2. 본 연구에서 사용된 동충하초의 특성

가. 동충하초류

1) 동충하초(*Cordyceps militaris*): 자낭균류의 동충하초과에 속하며 한방에서는 강장제로 쓰인다. 버섯은 전체가 곤봉모양이고 높이는 3~6 cm로 머리 부분과 자루부분으로 나눈다. 머리의 길이는 0.4~3 cm로 진한 주황색이고 표면에는 알맹이 모양의 돌기가 있다. 자루의 길이는 1~5 cm이며 굵기는 3~6 mm로 옅은 주황색이고 원주형이다. 술병모양의 자낭각은 머리의 표피아래에 묻힌다. 포자는 4~6×1 μm로 원주상의 방추형이다.

- 생태적특성 : 여름에서 가을에 걸쳐 숲속의 죽은나비, 나방 등의 번데기 부위에 1개가 나오는 것이 보통이고 간혹 2~5개가 나오는 것도 있다.
- 분포 : 소백산, 가야산, 속리산, 월출산, 만덕산, 모악산 등에서 자생하며 세계적으로는 일본 등 전세계에 분포한다.

2) 매미동충하초(*Cordyceps sobolifera*)

기주의 머리위에서 1개 또는 2~3개의 자좌를 형성한다. 두부는 곤봉상 또는 원주상이며 2~8 cm×2~6 mm이고 자루는 밋밋하고 연한 등갈색, 피자기는 완전 매물한다. 자낭은 400~470×5.6~6.3 μm이고 두부의 지름은 5.5 μm이며 포자의 크기는 6~12×1~1.5 μm이다.

- 생태적특성 : 여름에 땅속에 있는 죽은 매미유충에서 발견된다.
- 분포 : 한국, 일본.

3) 칸자스동충하초(*Cordyceps kanzashiana*)

스트로마는 숙주에서 하나 나오고 위에서 분지한다. 두부의 지름은 2~5 mm로 구상 또는 원주상, 황갈색, 피자기는 완전매물, 자루는 원주형 3 cm×3~5 mm, 혁질로서 구부러지고 밋밋하다. 피층은 유조직으로 되어있다. 포자는 3~5×1 μm, 자낭은 두께 3 μm, 필라멘트상, 두부의 지름은 3 μm, 자루표피의 균사는 10~12.5 μm이고 각진 구형, 자루속의 균사는 32.5×1.3 μm. 필라멘트형이다.

- 생태적 특성 : 발생은 여름에 매미에서 1개가 나온다.
- 분포 : 변산반도 국립공원 등에 분포한다.

4) 흰동충하초 *Cordyceps militaris* f. *albino* Kobayasi et Shimizu

높이가 2.8~5.2 cm이고 단단하며 두부의 지름은 7~17 mm이고 두부의 높이는 3~5 mm이다. 두부는 방추형, 전체가 백색이다. 2차 포자의 크기는 $1.8\sim 2\times 1\ \mu\text{m}$ 이고 자낭은 $7\sim 14\times 2.5\sim 3\ \mu\text{m}$ 이고 원통형이다.

- 생태적특성 : 여름에 *Dicytoploca japonica*의 번데기에 여러개가 발생한다. 주로 여름의 숲속에서 발견된다.
- 분포 : 한국, 일본

5) 벌동충하초 *Cordyceps sphecocephala* Kobayasi et Shimizu

기주의 머리와 가슴에서 1~3개의 자좌를 형성. 연한 노란색인 자좌의 크기는 $6\times 2\ \text{mm}$ 인 긴 타원형의 머리와 $60\times 12\ \text{mm}$ 자루로 이루어진다. 머리에는 비스듬히 문헌형의 자낭각이 조밀하게 분포되어 있고 자낭각의 크기는 $800\sim 1000\times 200\sim 320\ \mu\text{m}$ 이고 안에는 원통형의 자낭각이 분포되어 있다. 실모양의 자낭포자에 크기는 $700\sim 750\ \mu\text{m}$ 이며 분열하여 방추형의 2차 포자를 형성한다.

- 생태적특성: 여름에 낙엽 밑에 있는 죽은 벌레에서 발견된다.
- 분포 : 한국, 일본

6) 홍두깨동충하초 *Cordyceps yakushimensis* Kobayasi et Shimizu

높이가 1.5~3.0 cm이고 단단하며 두부의 지름은 3.5~6 mm이고 두부의 높이는 5~10 mm이다. 두부는 거의 원통형이고 황백색 또는 황갈색이다. 2차포자의 크기는 $5.5\sim 10\times 1\sim 2\ \mu\text{m}$ 이고 자낭의 지름은 $2.5\sim 3\ \mu\text{m}$ 이고 원통형이다.

- 생태적특성 : 초여름에 숲속의 썩는 나무 속의 곤충의 번데기에서군생한다.
- 분포 : 한국, 일본 등이다.

7) 방망이동충하초 *Cordyceps clavata* Kobayasi et Shimizu

높이가 1.5~3.0 cm이고 단단하며 두부의 지름은 3.5~6 mm이고 두부의

높이는 5~10 mm이다. 두부는 거의 원통형이고 황백색 또는 황갈색이다. 2차 포자의 크기는 $5.5\sim 10\times 1\sim 2\ \mu\text{m}$ 이고 자낭의 지름은 $2.5\sim 3\ \mu\text{m}$ 이고 원통형이다.

- 생태적 특성 : 초여름에 숲속의 썩은 나무 속에 곤충의 번데기에서 균생한다.
- 분포 : 한국, 일본 등이다.

8) 붉은곤봉동충하초 *Cordyceps ampullacea* Kobayasi et Shimizu

자좌는 2~4개로 머리와 자좌, 자루로 되어 있으며, 경계가 뚜렷하다. 자루는 긴 타원형이고, 길이는 10~15 mm이며, 머리는 곤봉형으로 붉은색이며, 길이는 4~6 cm이다. 머리에는 자낭각이 조밀하게 분포하며, 묻혀있다.

- 생태적특성 : 여름에 땅 속에 있는 죽은 번데기에서 발견된다.
- 분포 : 한국, 일본.

9) 가는유충동충하초 *Cordyceps gracilioides* Kobayasi et Shimizu

유충의 배에서 1개 또는 3개의 자좌를 형성한다. 자좌의 길이는 70 mm이고, 연한 황갈색이며, 머리는 구형으로 길이가 3.5~5 mm이다. 자낭각은 묻힌형이고, $750\sim 850\ \mu\text{m}\times 210\sim 270\ \mu\text{m}$ 이며, 조밀하게 분포한다. 자낭의 크기는 $620\sim 710\ \mu\text{m}\times 5.5\sim 6.5\ \mu\text{m}$ 로, 실 모양의 자낭포자를 가지며, 2차포자로 분열한다.

- 생태적특성 : 여름철 땅속에 있는 죽은 유충에서 발견된다.
- 분포 : 한국, 일본

10) 썩어나방동충하초(*Cordyceps coccidiocapitate*=7022)

자실체는 하나이며 곤봉형. 지상부의 높이는 3.5~8 cm, 두부는 부풀고 불규칙, 원통상의 방추형, 높이 2~6 cm, 지름 4~7 mm, 아름다운 자홍색, 자낭과는 나생이고 밀포한다. 포자는 $4\sim 5\times 1\ \mu\text{m}$, 자루는 원주형, 지름 2~5 mm. 두부와 자루경계 뚜렷. 탄력적인 육질. 지중부는 가늘게 분지한다.

- 생태적특성 : 여름에 곤충에 발생한다.

- 분포 : 한국, 일본

11) 노린재동충하초 (*C. nutans* Pat.)

자실체는 머리부분과 자루로 나뉜다. 머리부분은 5~6 cm×1.5~2 mm로 등황색의 긴타원형이며 표면은 매끄럽다. 자루의 길이는 4~5 cm×0.5~1 mm이다. 위쪽은 연한 황갈색이고 아래쪽은 흑색으로 반짝이며 단단한 철사모양으로 머리부분의 목에서 구부러진다. 포자의 크기는 6.5~10×1.4~1.6 μm 로 원주형이다.

- 생태학적특성 : 여름에서 가을 사이에 숲속의 죽은 가슴부위에서 1~2개가 나며 한약재료로 쓰인다.
- 분포 : 한국, 일본, 중국, 유럽, 북아메리카.

나. 눈꽃동충하초류

1) 눈꽃동충하초 (*Isaria japonica*)

자실체는 하나 또는 2~10개가 나며 가지는 불규칙하게 분지하며 수지상이다. 높이는 2~5 cm이며 포자는 위에 생긴다. 백색이고 백색의 분생포자를 만든다. 포자는 3.2~5×1.4~2 μm . 바람에 잘 날린다. 불완전 동충하초이다.

- 생태적특성 : 곤충의 유충 또는 성충에 난다.
- 분포 : 한국, 일본

2) 흰가루눈꽃동충하초 *Isaria sinclairii* (Berk.) Lyoyd

자실체의 크기는 2~4 cm이고 두부에 흰색의 포자가 있고, 자루는 원통형이고 편편하고 갈색이다. 밑은 백색, 포자의 크기는 4~9×1.5~3 μm 이고 난형이며 2차 포자는 이보다 훨씬 크다.

- 생태적특성 : 여름에 발생하며 *Meimuna opalifera*의 유충의 머리에 발생한다.
- 분포 : 한국, 일본.

3) *Isaria takamizusanensis* Kobayasi

높이 0.3~2 mm, 두부와 자루의 경계가 불분명하다. 타원형 또는 구형. 지름 0.3~1.5 mm 표면에 비회색의 분생 포자를 만든다. 분생포자는 타원형 2.5~4×1.4~8 μm . 바람에 날리면 연기처럼 나른다. 2차포자는 원주형이고 0.7~0.6 μm 이고 구형이다.

- 생태적특성 : 곤충에 발생하며 자실체는 가늘고 작다. 매미의 표 피를 완전히 덮는다.
- 분포 : 한국, 일본

4) 가루눈꽃동충하초 *Isaria farinosa* (Holm.)Fr.

자실체는 1~2개가 나며 때로는 8개가 나는 것도 있다. *I. japonica*보다. 단순한 나무가지 모양이고 높이는 1.2~3.5 cm, 두부는 위쪽에 생긴다. 백색이고 분상의 분생포자는 타원형이며 2~2.7×1.5~2 μm , 바람이 불면 비산한다. 자루는 불규칙한 원주형 어떤 것은 납작하다. 연한황색 또는 연한갈색이다.

- 생태적특성 : 곤충에 번데기에 발생하며 특히 유충에 난다. 지생형 어떤 것은 나무나 정개지에 난다.
- 분포 : 한국, 일본

다. 불완전 균류

1) 노린재동충하초덧붙이 *Hirsutella nutans* Kobayasi

자좌의 머리가 하얀 균사로 덮이면서 하얀 돌기들이 형성되고, 각각의 돌기들은 곤봉형으로 발달하는데, 크기는 2~3 mm×1 mm이다.

- 생태적 특성 : 노린재동충하초(*C. natans*)의 오래된 자좌가 다른 2차균에 의하여 감염, 형성된다.
- 분포 : 한국, 일본

라. 백강균류

1) 백강균 *Beauveria bassiana*

분생포자만으로 곤충의 성충을 덮는다.

- 분포 : 한국, 일본

3. 채 집 (1)

가. 동충하초의 수집 및 채집장소 : 한라산국립공원, 지리산, 모악산, 만 덕산, 연석산등을 비롯한 우리나라 전지역에서 채집하였다. 채집된 버섯은 바로 실험실로 운반하여 샤알레에 스카치테이프를 붙여 포자문을 만들었다. 또 두부의 일부를 예리한 칼로 잘라서 바로 PDB배지에 접종하였다.

나. 동충하초의 채집결과

1) 동충하초(*Cordyceps militaris* = 99-0007) : 1999. 5. 15 연석산

관찰 : 땅위의 번데기에서 자실체는 1개가 나온다. 주황색을 띤 머리와 노란색의 자루로 이루어진다. 경계가 명확하다. 두부에 자낭각이 반매몰 되어있다

2) 동충하초(*Cordyceps militaris* = 99-0004) : 1999. 5. 20, 만덕산

관찰 : 땅속에 죽은 번데기에서 발견되며 머리, 가슴에서 곤봉형의 자실체 3개가 발생되며 자낭각은 반 매몰되고 두부와 자루가 구분된다.

3) 눈꽃동충하초(*Isaria japonica* = 99-0001) :

관찰 : 곤충의 성충에 나며 자실체는 5~7개가 난다. 가지는 불규칙하게 분지하며 수지상이다. 백색이고 백색의 분생포자를 만든다. 포자는 3.2~5×1.4~2 μm. 바람에 잘 날린다. 불완전 동충하초이다.

4) 눈꽃동충하초(*Isaria japonica* = 99-0002) :

관찰 : 곤충의 성충에 나며 자실체는 10개 이상이며 가지는 불규칙하게 분지하는 수지상이다. 백색이고 백색의 분생포자를 만든다. 바람에 잘 날린다. 불완전 동충하초이다.

5) 눈꽃동충하초(*Isaria japonica* =99-0003) :

관찰 : 곤충의 성충에 여러개의 자실체가 불규칙하게 나와서 분지한다. 수지상. 백색이고 백색의 분생포자를 만든다. 바람에 잘 날린다. 불완전 동충하초이다.

6) 동충하초류(*Cordyceps sp.* = 99-0006)

관찰 : 곤충의 번데기에서 1개가 발생한다.

7) 매미동충하초(*Cordyceps sobolifera* = 99-0008)

관찰 : 땅속의 죽은 매미유충에서 발생하며 기주의 머리 위에서 1개의 자좌를 형성한다. 연한 황색이며 두부에는 매물형의 자낭각이 있다.

8) 칸자스동충하초(*Cordyceps kanzashiana* = 99-0009) : 변산반도

관찰 : 자실체는 기주에서 하나오고 위에서 분지한다. 두부의 지름은 2~5 mm로 구상 또는 원주상, 황갈색, 피자기는 완전매물, 자루는 원주형 3 cm×3~5 mm, 혁질로서 구부러지고 밋밋하다.

4. 채 집 (2)

가. 동충하초의 수집 및 채집장소 : 한라산, 지리산, 내장산 국립공원 만덕산, 모악산에서 채집.

나. 동충하초의 채집결과

1) 표본목록 : *Cordyceps*류 43개체, *Isaria* 30개체, *Hirustella* 2개체, 백강균 2개 등을 채집, 건조시켜서 표본 상자에 넣어 시라카겔과 나프탈린을 넣어 표본실에 보관하였다.

2) 균주목록 : *Cordyceps* 균주 30개, *Isaria* 균주 5개를 분리하여 냉장고에 보관하였다.

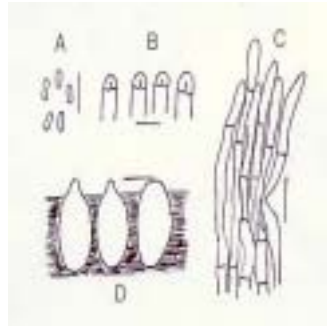
3) 미기록종의 기재 : 한국산 미 기록종으로 2종이 확인되었다.

가) 흰동충하초 *Cordyceps militaris* f. *albino* Kobayasi et Shimizu

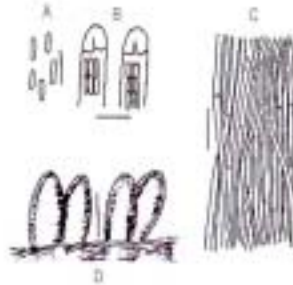
특성 : 기주에서 2개가 발생하며 두부는 단단하고 방추형, 전체가 백색이다. *Dicytoploca japonica*의 번태기에 발생한다. 주로 여름의 숲속에서 발견된다.

나) 흰가루눈꽃동충하초 *Isaria sinclairii* (Berk.) Lyoyd

특성 : 기주에서 자실체는 2개가 발생하고 두부에 흰색의 포자가 있고, 자루는 원통형이고 편편하며 갈색이다. 밑은 백색이다. *Meimuna opalifera*의 유충의 머리에 발생한다.



흰동충하초 (*Cordyceps militaris* f. *albina*)



흰가루눈꽃동충하초 (*Isaria sinclairii*)

Note : A : Secondary spores, B, Head of asci C, Hyphae D, Perithecium (bars : 10 μ m)



A



B



C



D



E



F

A : *Cordyceps militaris*

B : *C. sphecocephala*

C : *C. yakushimensis*

D : *C. clavata*

E : *C. ampullacea*

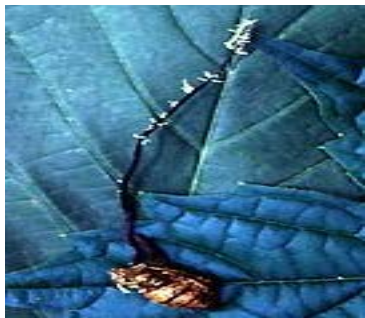
F : *C. gracilioides*



A



B



C



D



E



F

A : *Isaria japonica*

B : *I. sp.*

C : *Hirustella nutans*

D : *Isaria takamizusanensis*

E : *I. farinosa*

F : *Beauveria bassiana*

다) 벌둥충하초 (*C. sphecocephala* (Kl.) Sacc.)

관찰 : 낙엽 밑에 있는 죽은 벌레에서 발견되며 기주의 두부와 가슴에서 1

개의 자실체형성. 연한 노란색을 띠는 자좌는 크기 매우길다. 두부에는 비스듬히 매몰된 자낭각이 있다.

라) 홍두깨동충하초 (*C. yakushimensis* Kobayasi et Shimizu)

관찰 : 죽은 곤충의 몸에서 1개가 발생한다. 두부는 거의 원통형이고 황백색 또는 황갈색이다. 썩는 나무 속의 곤충의 번데기에서 발생한다.

마) 방망이동충하초 (*C. clavata* Kobayasi et Shimizu)

관찰 : 곤충의 번데기에서 1개가 나오며 두부는 거의 원통형이고 황백색 또는 황갈색이다. 흙속의 곤충의 번데기에서 단생한다.

바) 붉은곤봉동충하초 (*C. ampullacea* Kobayasi et Shimizu)

관찰 : 땅 속에 있는 죽은 번데기에서 발견된다. 자실체는 4개로 머리와 자루로 되어 있으며, 경계가 뚜렷하다. 자루는 긴 타원형이고, 두부는 곤봉형으로 붉은색이며, 두부에는 자낭각이 묻혀있다.

사) 가는유충동충하초 (*C. gracilioides* Kobayasi et Shimizu)

관찰 : 땅속에 있는 죽은 유충에서 발견되며, 유충의 배에서 1개가 발생한다. 자낭각은 매몰되고 실 모양의 자낭포자를 가지며, 2차포자로 분열한다.

아) 노린재동충하초덧붙이 (*Hirsutella nutans* Kobayasi)

관찰 : 노린재동충하초(*C. natans*)의 오래된 자좌가 다른 2차균에 의하여 감염, 형성된다. 자좌의 머리가 하얀 균사로 덮이면서 하얀 돌기들이 형성되고, 각각의 돌기들은 곤봉형으로 발달하는데, 크기는 2~3 mm×1 mm이다.

자) *Isaria takamizusanensis* Kobayasi

관찰 : 곤충에 발생하며 자실체는 가늘고 작다. 매미의 표피를 완전히 덮는다. 두부와 자루의 경계가 불분명하다.. 타원형 또는 구형. 바람에 날리면 연기처럼 나른다.

차) 가루눈꽃동충하초 (*I. farinosa* (Holm.)Fr.)

관찰 : 곤충에 번데기에 발생하며 어떤 것은 나무나 절개지에 난다. 자실체는 2개가 나왔다. 바람이 불면 비산한다. 자루는 불규칙한 원주형 어떤 것은 납작하다. 연한황색 또는 연한 갈색이다.

카) 백강균 (*Beauveria bassiana*)

관찰 : 분생포자만으로 곤충의 성충을 덮는다.

5. 채 집 (3)

가. 동충하초의 수집 및 채집장소 : 중국 광둥성 미생물연구소로부터 1군주 수집. 민주지산과 만뢰산, 한라산, 지리산, 설악산에서 수집.

나. 동충하초의 채집결과 (3개)

1) 동충하초 (*Cordyceps militaris* = 6712)

관찰 : 땅위의 유충에서 발생하며 자실체는 1개다. 주황색의 두부와 노란색의 자루로 된다. 두부와 자루의 경계가 명확하다.

2) 동충하초 (*Cordyceps* sp = 6047)

관찰 : 유충에서 나오며 자실체는 1개다. 자낭각은 두부에 반매몰 되어있다.

3) 썩어나방동충하초(*Cordyceps coccidiocapitate*=7022)

관찰 : 곤충에 발생하며 자실체는 하나이며 곤봉형. 두부는 부풀고 불규칙, 원통상의 방추형이다. 자낭과는 나생이고 밀포한다. 두부와 자루의 경계가 뚜렷하다.

4) 눈꽃동충하초 (*Isaria japonica* = 7109)

관찰 : 곤충의 유충에 나며 자실체는 하나 또는 여러 개가 나며 가지는 불규칙하게 분지한다. 수지상. 백색이고 백색의 분생포자를 만든다. 바람에 잘 날린다. 불완전 동충하초이다.

다. 광동미생물연구소

1) 눈꽃동충하초(*I. japonica*=M-001)

(군주로 된 것을 분양 받았기 때문에 외부적 특성은 기록하지 못 하였다.)

균주의 특성은 한국의 것과 비슷하였다.)

6. 채 집 (4)

전반기 2000. 12. 16에서 2001. 6. 16 까지 채집한 것을 종합한 것이다.

가. 동충하초의 수집 및 채집장소 : 중국 광둥성 미생물연구소로부터 1균주 수집. 한라산, 지리산, 설악산의 국립공원과 민주지산과 만뢰산 등에서 수집하였다.

나. 동충하초의 채집결과

1) 표본목록 : *Cordyceps*류 20개체, *Isaria* 10개체, 백강균 1개 등을 채집, 건조시켜서 표본 상자에 넣어 시라카겔과 나프탈린을 넣어 표본실에 보관하였다.

2) 균주목록 : *Cordyceps* 균주 10개, *Isaria* 균주 2개를 분리하여 냉장고에 보관하였다.

3) 미기록종의 기재 : 1차년도에 채집한 동충하초 가운데서 실험과 문헌을 조사한 결과 한국산 미기록종으로 2종이 확인되었다.

가) 방망이동충하초 *Cordyceps clavata* Kobayasi et Shimizu

특성 : 두부는 거의 원통형이고 황백색 또는 황갈색이다. 원통형이다. 흙속의 곤충의 번데기에서 2개가 균생한다. 초여름에 숲속에서 발견된다.

나). 홍두깨동충하초 *Cordyceps yakushimensis* Kobayasi et Shimizu

특성 : 자실체는 곤봉형이고 1개가 나온다. 두부는 약간 부풀고 원통형이다.



방망이동충하초



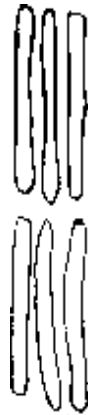
포자



자낭



홍두깨동충하초



포자



자낭

제 3절 동충하초의 자실체 발생실험

1. 실험방법

가. 균주분리

- 1) 야생에서 자생하는 동충하초를 채집한다.
- 2) 채집한 동충하초를 무균상에서 포자분리 및 조직분리 한다. (PDB배지 사용)
: 오염되지 않은 자실체를 이용한다. 포자분리는 포자가 PDA배지 위에 자유낙하 하는 방법을 이용하며 조직분리는 자낭각 부위를 메스를 이용하여 절개하여 그 절개한 부위를 PDA배지 위에 놓아두는 방법을 이용한다.
(모든 실험도구는 멸균한 것을 이용한다.)
- 3) 포자분리 및 조직분리를 통해서 얻어진 균주를 25℃ 항온기에서 암배양한다.
- 4) 항온기에서 균사배양이 완성된 균주는 오염여부를 확인 후 이를 계대배양한다.
- 5) 재배과정에 들어간다.

나. 재배과정

- 1) 액체종균을 만든다. (PDB배지에서 약 4~5일간 배양한다.)
: 항온기온도 → 25℃

※ PDB배지 만드는 방법

- 가) 증류수 1 ℓ에 감자(껍질을 벗겨서 체를 썰은 것)를 200 g 넣고 약 15~20분간 끓인다.
 - 나) 1)를 거즈로 걸러서 1 ℓ가 안 될 때는 증류수로 채우고, 여기에 Dextrose 20 g이나 황백당 30 g을 넣는다.
 - 다) 적당한 용량의 용기에 분주한다. (500 ml의 플라스크의 경우는 약 200 ml를 분주한다.)
 - 라) Autoclave에 넣고서 121℃, 15파운드에서 20분간 고압 멸균한다.
- 2) 배양병에 배지를 약 50 g정도 넣는다.

- 3) 배양병의 마개를 막은 후 Autoclave에서 121℃, 15파운드에서 약 15~20 분간 멸균한다.
- 4) 멸균이 끝나면 예냉실에서 식힌다.
- 5) 무균실에서 액체종균을 접종한다.
- 6) 배양실로 옮겨서 약 일주일 정도 암배양한다.
- 7) 균사배양이 완성되면 생육실로 옮겨서 약 100 Lux 정도의 빛을 가하고 습도도 약 95% 이상을 준다. (CO₂양을 조절하기 위해서 환기를 자주 시켜준다.) : 생육실 온도는 약 17~20℃를 유지해준다.
- 8) 균접종 후 1개월 경과후 자실체를 수확하게 된다.

2. 자실체 발생실험 (1)

균주 동충하초(*Cordyceps militaris* = 99-0007, 99-0004) 2균주.

눈꽃동충하초(*Isaria japonica* = 99-0001, 99-0002, 99-0003) 3균주.

Cordyceps sp.(99-0006) 1균주.

매미동충하초(*Cordyceps sobolifera* = 99-0008) 1균주.

칸자스동충하초(*Cordyceps kanzashiana* = 99-0009) 1균주.

가. 발생 실험 방법

1) 고체배지상의 시험

PDA(Potato Dextrous Agar) 평판배지 중앙에 10 mm 크기로 절취한 균총한 절편을 접종한 후 균사생장을 조사.

2) 액체종균상의 시험

1 ℓ용 내열성 플라스틱 종균 배양병에 각각 500 ml씩의 PDB(Potato Dextrous Brouth) 배지를 분주하였다. 여기에 PDA(Potato Dexterous Agar) 배지상에서 각각 1주 배양한 균주를 10 mm cork borer를 이용하여 동심원상의 가장 바깥쪽 균총 절편 3개씩 각각 PDB배지에 접종하였다. 1주일간 150 rpm으로 진탕 배양 후 이의 특징을 조사하였다. (배양온도 → 25±1℃).

3) 자실체 형성 실험

냉동상태의 누에번데기를 배지로 이용하였고, 이를 800 ml 분리형 내열성 플라스틱 병에 번데기를 각각 100 g씩 넣어 121℃, 15 psi의 Autoclave에서 20분간 살균하였다. 여기에 만들어진 액체종균을 누에번데기배지에 각각 5 ml씩 접종하여 배양하였다. 우량균주 선발은 평균적인 자실체의 길이, 직경, 중량, 자실체의 전체적인 모양을 기준으로 하였다.

나. 재 료

1) 야생에서 채집한 8개의 공시균주

동충하초(*Cordyceps militaris* = 99-0007, 99-0004) 2균주.

눈꽃동충하초(*Isaria japonica* = 99-0001, 99-0002, 99-0003) 3균주.

Cordyceps sp.(99-0006) 1균주.

매미동충하초(*Cordyceps sobolifera* = 99-0008) 1균주.

칸자스동충하초(*Cordyceps kanzashiana* = 99-0009) 1균주.

다. 실험성적

1) 각 균주의 고체배지상의 특징 시험

가) 눈꽃동충하초(*Isaria japonica* = 99-0001)

균사생장은 동심원을 그리면서 생장을 하였고 대체적으로 약간의 공중 균사를 제외하고는 배지바닥에 붙은 형태이다. 색은 흰색에 가깝다. 2일까지는 별다른 변화가 없다가 3일째부터서 균사생장의 특징이 보이기 시작하였다. 접종 후 3일째까지는 2.5 mm, 3일에서 4일은 2.0 mm, 4일에서 5일은 2.5 mm, 5일에서 6일은 2.5 mm으로 총 9.5 mm 성장하였다.

나) 눈꽃동충하초(*Isaria japonica* = 99-0002)

균사생장은 접종 후 3일째까지 5.0 mm, 3일에서 4일은 1.5 mm, 4일에서 5일은 2 mm, 5일에서 6일까지는 2.5 mm으로 총 11 mm가 성장하였다.

다) 눈꽃동충하초(*Isaria japonica* = 99-0003)

균사생장은 접종 후 3일째까지는 3 mm, 3일에서 4일은 1.5 mm, 4일에서 5일까지는 2.0 mm, 5일에서 6일까지는 1.5 mm으로 총 8 mm가 성장하였다.

라) 동충하초(*Cordyceps militaris* = 99-0004)

초기에는 균사의 색이 흰색을 띠지만 점점 동심원상에 곱이 생기며 여기에 얇은 검은색의 거미줄과 같은 것이 중앙에 나타난다. 접종 후 3일까지는 7.5 mm, 3일에서 4일은 6.5 mm, 4일에서 5일은 2.5 mm, 5일에서 6일은 2.5 mm가 성장하였다. 대체적으로 생장이 다른 균주보다는 현격히 빨랐다.

마) *Cordyceps* sp.(99-0006)

초기에는 흰색을 띠다가 점점 분홍빛을 띠기 시작하여 6일째에는 붉은색을 나타내었다. 3일째까지는 3.5 mm, 3일에서 4일 1.5 mm, 4일에서 5일은 1.5 mm, 5일에서 6일은 1.5 mm생장으로 총 8 mm생장하였다.

바) 동충하초(*Cordyceps militaris* = 99-0007)

초기에는 흰색을 띠다가 점점 주황색을 띤다. 3일까지는 3.0 mm, 3일에서 4일은 3.5 mm, 4일에서 5일은 2.5 mm, 5일에서 6일은 1.5 mm으로 총 10.5 mm 성장하였다.

사) 매미동충하초(*Cordyceps sobolifera* = 99-0008)

초기에는 흰색에서 3일 후부터 노란빛을 띤다. 3일까지는 3.5 mm, 3일에서 4일은 1.5 mm, 4일에서 5일은 1.5 mm, 5일에서 6일은 1.5 mm으로 총 8 mm가 성장하였다.

아) 칸자스동충하초(*Cordyceps kanzashiana* = 99-0009)

초기의 흰색에서 3일 후부터는 점점 살색을 나타내었다. 3일까지는 1.5 mm, 3일에서 4일은 1.5 mm, 4일에서 5일은 1 mm, 5일에서 6일은 1 mm으로 총 5 mm가 성장하였다.

Table1-1. Mycelium growth of *Isaria japonica*

Age at growth days Strains	first day	third day	fourth day	fifth day	Total
	~ third day	~ fourth day	~ fifth day	~ sixth day	
99-0001	2.5 mm	2.0 mm	2.5 mm	2.5 mm	9.5 mm
99-0002	5.0 mm	1.5 mm	2.0 mm	2.5 mm	11.0 mm
99-0003	3.0 mm	1.5 mm	2.0 mm	1.5 mm	8.0 mm

Table1-2 Mycelium growth of genus *Cordyceps*

Age at growth days Strains	first day	third day	fourth day	fifth day	Total
	~ third day	~ fourth day	~ fifth day	~ sixth day	
99-0004	7.5 mm	6.5 mm	2.5 mm	2.5 mm	19.0 mm
99-0006	3.5 mm	1.5 mm	1.5 mm	1.5 mm	8.0 mm
99-0007	3.0 mm	3.5 mm	2.5 mm	1.5 mm	10.5 mm
99-0008	3.5 mm	1.5 mm	1.5 mm	1.5 mm	8.0 mm
99-0009	1.5 mm	1.5 mm	1.0 mm	1.0 mm	5.0 mm

1) 각 균주의 액체배지상의 특징 시험

가) 눈꽃동충하초(*Isaria japonica* = 99-0001, 99-0002, 99-0003)

3일째부터 균사가 생장하는 것이 육안으로 확인되었다. 점차 병속의 균사의 밀도가 많아지고, 7일이 지난 후에 비로소 균사밀도가 가장 적당하게 자랐다. 균사의 색은 배지색 내지 우유빛을 띠었고, Pellet의 크기는 직경이 약 3 mm 정도였다.

나) 동충하초(*Cordyceps militaris* = 99-0004)

2일째부터 균사의 생장의 모습이 육안으로 식별되었다. 균사는 점차 밀도가 높아지고 7일 후에는 점도가 있는 끈적끈적한 정도에 이른다. Pellet은 육안으로도 식별할 수 없고 서로 뒤엉켜 있었다. 색깔은 배지색이 어둡게 되었다.

다) *Cordyceps sp.*(99-0006)

균사의 생장이 2일째부터 보이며 3일 후에는 분홍빛이며 4일째에는 보라색 5일째에는 붉은 색에 이르르게 되었다. pellet의 크기는 매우 작아 약 0.5 mm 정도였다.

라) 동충하초(*Cordyceps militaris* = 99-0007)

균사생장이 3일째에 먼지모양의 pellet이 생기기 시작하여 배양이 완성되는 7일째에 왕성하였다. 균사의 색은 배지색에서 점차 노란색을 띤다. 띠의 색은 노란빛을 나타낸다.

마) 매미동충하초(*Cordyceps sobolifera* = 99-0008)

균사생장이 3일째에 이르러 비로소 나타나기 시작하여 7일째에 비로소 배양이 완성된다. 색은 진한 배지색깔이다.

바) 칸자스동충하초(*Cordyceps kanzashiana* = 99-0009)

균사생장이 99-0008과 유사하게 나타났으며 배양이 완성되었을 때에는 점도가 높았으며 색은 99-0008과 유사하였다.

2) 자실체 형성에 있어서의 각 균주들의 특징

가) 눈꽃동충하초(*Isaria japonica* = 99-0001, 99-0002, 99-0003)

균사배양은 7일을 시키고 생식생장에 들어가면서 약 200 Lux를 조사하였고 가습하였다. 2일 후에 자실체 발생이 이루어졌는데 노란빛이 군데 군데 원형을 이루었고 이것이 마치 벌집처럼 보였다. 이러한 노란빛에서 자실체 발생이 이루어졌고 초기에는 커다란 크기의 변화가 없으나 중간 크기 이후에 상당히 빠른 성장을 하였다. 99-0001과 99-0002는 완전한 자실체의 모양에 있어서 약간의 차이는 있지만 커다란 차이점은 발견하지 못하였다. 이들 모양은 약간 질긴 느낌을 주며 자실체 직경이 99-0001은 약 1.3 mm이며 99-0002는 1.09 mm 정도이다. 99-0003은 색깔 면에서는 다른 두 균주보다는 더 노랗고 직경은 약 1.43 mm로 약간 크며 자실체의 길이는 약간 작다.

나) 동충하초(*Cordyceps militaris* = 99-0004)

균사배양은 하얀 우유빛을 띠지만 생식생장 이후 가습과 약 600 Lux의 조사 이후 검은색의 거미줄과 같은 것이 위를 덮고 노랗게 되면서 균사가 죽는다.

다) *Cordyceps* sp.(99-0006)

균사는 분홍색의 가루를 뿌린 것 같고, 자실체 발생은 약 20℃ 정도로 낮추고 600 Lux 정도에서 가습을 한 후 4일만에 발생되었다.

라) 동충하초(*Cordyceps militaris* = 99-0007)

접종 후 2일째부터 눈에 띄게 균사가 활착되는 것이 보여지고 이후 꾸준한 균사활착이 이루어져 9일이 경과하면 균사배양이 완성되게 된다. 이후 생식생장에 들어가는데 가습을 하고 약 600 Lux 이상을 조사하며 온도는 20℃ 정도 하온 시킨다. 균사배양이 모두 이루어진 상태의 균사의 색은 노란색과 하얀색이 혼합되어 있고 이후 생식생장이 2~3일 지난 후 점점 더 진한노란색이 되고 4~5일이 경과되면 자실체 발생이 시작된다.

이때의 균사색은 주황색을 띄고 1 cm정도 길이생장만 하는데 약 5일정도가 소요된다. 이후 계속적으로 길이생장과 부피생장을 같이하게 되어 접종 후 약 50~55일 후 자낭각을 형성한 자실체가 완성되게 된다. 자낭각은 야생형과는 약간 다르게 야생형이 반매생형인데 반해 이는 사출되어 있어서 이곳에서 다시 자실체가 발생하는 경우도 있다.

마) 매미동충하초(*Cordyceps sobolifera* = 99-0008)

균사배양을 7일간 하고 색은 노란빛과 하얀빛이 혼합되어있고 생식생장에 들어가 20℃로 하온하고 가습을 주고 약 600 Lux정도 조사하면 균사는 배지에 달라붙은 형태가 되다가 고동색이 군데군데 생기면서 자실체 발생이 이루어진다. 자실체의 형태는 통풍이 잘된 쪽은 침처럼 가늘게 나타나지만 통풍이 잘되지 않으면 납작한 주걱모양을 한다. 자실체 발생은 생식생장 후 5일이 지나면서 시작되었고 색은 주황색이 섞인 갈색이다.

바) 칸자스동충하초(*Cordyceps kanzashiana* = 99-0009)

99-0008과 비슷한 모양과 성상을 나타내었다.

Table 2-1. Stroma of *Isaria japonca* incubated on silkworm pupae

section strains	weight of stroma (g)	length of stroma (mm)	diameter of stroma (mm)	number of stroma	age at nutrition growth days	age at stroma initiation days	age at total growth days	weight of media (g)
99-0001	29.80	123	1.3	243	7	3	31	100
99-0002	26.73	115	1.09	341	7	4	32	100
99-0003	33.70	106	1.43	190	7	4	35	100

Table 2-2. Stroma of genus *Cordyceps* incubated on silkworm pupae

section strains	weight of stroma (g)	length of stroma (mm)	diameter of stroma (mm)	number of stroma	age at nutrition growth days	age at stroma initiation days	age at total growth days	weight of media (g)
99-0006	0.35	11.5	0.67	42	7	9	47	100
99-0007	24.9	103	7.8	53	9	5	54	100
99-0008	12.1	97	1.67	92	8	7	58	100
99-0009	10.2	76	1.94	78	8	8	62	100

라. 결 과

1) 20여종을 채집하여 2속 5종을 동정하였고, 그 가운데서 8균주를 실험에 사용하였다.

2) 그들 중 6균주가 우수균주로 선발되었다.

동충하초 (*Cordyceps militris* : 99-0007)

눈꽃동충하초 (*Isaria japonica* : 99-0001, 99-0002, 99-0003)

매미동충하초(*Cordyceps soborifera* : 99-0008)

칸자스동충하초(*Cordyceps kanzashiana* : 99-0009).



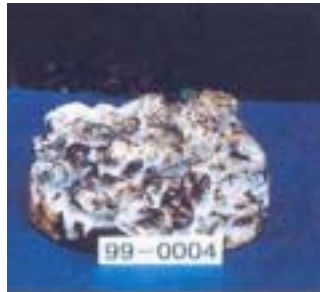
눈꽃동충하초(*Isaria japonica*)



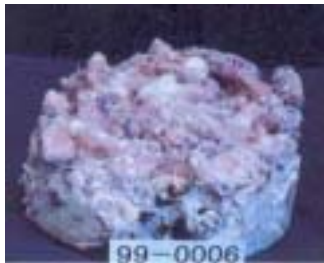
눈꽃동충하초(*Isaria japonica*)



눈꽃동충하초(*Isaria japonica*)



동충하초(*Cordyceps militaris*)



동충하초(*Cordyceps militaris*)



Cordyceps sp.



메미동충하초(*Cordyceps sobolifera*)



칸자스동충하초(*Cordyceps kanzashiana*)

3. 자실체 발생실험 (2)

가. 발생 실험 방법

1) 동충하초의 특성을 고려하여 눈꽃동충하초는 분생포자를 Petridish에 분주한 PDA(Potato Dextrous Agar) 배지상에 낙하하고 동충하초(Cordyceps)는 자실체를 PDA배지가 들어 있는 Petri-dish의 뚜껑에 테이프로 고정시켜서 배지상에 자낭포자가 떨어지도록 하거나 자실체의 일부조직을 분리하여 PDA배지상에 놓고 이를 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 의 항온기에서 배양하였고 이후 이들을 순수 분리하여 균주로 보관하였다.

2) 고체배지상의 시험

PDA(Potato Dextrous Agar) 평판배지 중앙에 10 mm 크기로 절취한 균총한 조각을 접종한 후 모양, 색깔과 균사 성장 속도를 조사하였다.

3) 액체종균상의 시험

1 ℓ용 내열성 플라스틱 종균 배양병에 각각 500 ml씩의 PDB(Potato Dextrous Broth) 배지를 분주하였다. 여기에 PDA(Potato Dextrose Agar) 배지 상에서 각각 1주일간 배양한 균주를 10 mm cork borer를 이용하여 동심원상의 가장 바깥쪽 균총의 절편 3개씩 각각 PDB배지에 접종하였다. 그리고 나서 1주일간 150 rpm으로 진탕 배양(배양온도 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$) 후 이의 특징을 조사하였다.

4) 자실체 형성 실험

냉동상태의 누에번데기를 배지로 이용하였고, 이를 800 ml 분리형 내열성 플라스틱 병에 번데기를 각각 100 g씩 넣어 121°C , 15 psi의 Autoclave에서 20분간 살균하였다. 여기에 만들어진 액체종균을 누에번데기 배지에 각각 5 ml씩 접종하여 어두운 곳에서 배양하였다.

나. 재료

1) 공시균주

야생에서 채집한 공시균주 중 자실체 유도에는 *Cordyceps militaris* f. *albino* (CHO-6715), *C. gracilioides* (CHO-6716, CHO-6717), *C. militaris* (CHO-7410), *Isaria japonica* (CHO-6713, CHO-7413)를 공시균주로 이용하였다.

2) 공시 균주의 분리 방법

각 균주의 특성을 고려하여 *Isaria japonica* (CHO-6713, CHO-7413)는 분생포자를 Petri-dish에 분주한 PDA(Potato Dextrous Agar)배지상에 떨어뜨렸고, *Cordyceps militaris* f. *albino* (CHO-6715), *C. gracilioides* (CHO-6716, CHO-6717), *C. militaris* (CHO-7410)는 자실체 자체를 PDA 배지가 들어있는 Petri-dish의 뚜껑에 tape로 고정시켜서 배지상에 자낭포자가 떨어지도록 하거나 자실체의 일부조직을 분리하여 PDA배지상에 치상하여 이를 25±1℃의 항온기내에서 배양하였고, 이후 이들을 순수 분리하여 균주로 보관 이용하였다.

다. 실험성적

1) 각 균주의 고체배지상의 특징 시험

가) *Cordyceps militaris* f. *albino*(CHO-6715)

균사생장은 동심원을 그리면서 생장을 하였고 대체적으로 약간의 공중균사를 제외하고는 배지바닥에 붙은 형태이다. 색은 노란색을 띠는 흰색에 가깝고 하루 단위로 0.5 mm, 2.5 mm, 2.0 mm, 3.0 mm, 6.0 mm 순으로 변화하였고, 총 14 mm균사 생장을 하였다.

나) *C. gracilioides*(CHO-6716, CHO-6717)

균사생장은 기중균사 없이 활착 되었고 색은 우유빛을 나타내었고, 하루 단위로 0.5 mm, 1.5 mm, 6 mm, 4 mm, 6 mm순으로 변화하였고, 총 18 mm생장 하였다.

다) *C. militaris*(CHO-7410)

균사생장의 형태가 기중균사 없이 딱 달라붙은 형태, 색은 노란빛을 띠는

흰색이고 성장이 더디게 진행되었다. 하루 단위로 측정한 군사 성장량은 0.5 mm, 0.5 mm, 1.5 mm, 2.5 mm, 1.0 mm 순으로 진행되었으며, 총 6.0 mm 성장하였다.

라) *Isaria japonica*(CHO-7413)

군사생장의 형태는 바닥에 붙은 형태이고 약간의 기중군사가 보인다. 색은 우유빛이고 성장이 더디게 진행되었다. 하루 단위로 측정한 군사 성장량은 0.3 mm, 0.5 mm, 1.8 mm, 0.8 mm, 1.4 mm 순으로 진행되었으며, 총 4.8 mm 성장하였다.

마) *I. japonica*(CHO-6713)

I. japonica(CHO-7413)와 군사 성장의 형태가 유사하며 하루 단위로 측정한 군사 성장량은 0.5 mm, 1.5 mm, 0.5 mm, 0.3 mm, 0.7 mm 순으로 진행되었으며, 총 3.5 mm 성장하였다.

Table 1. Mycelium growth of *Isaria japonca*

Age at growth days Strains	first day	second day	third day	fourth day	fifth day
	~ second day	~ third day	~ fourth day	~ fifth day	~ sixth day
CHO-6713	0.5 mm	1.5 mm	0.5 mm	0.3 mm	0.7 mm
CHO-7413	0.3 mm	0.5 mm	1.8 mm	0.8 mm	1.4 mm

Table 2. Mycelium growth of genus *Cordyceps*

Age at growth days Strains	first day	second day	third day	fourth day	fifth day
	~ second day	~ third day	~ fourth day	~ fifth day	~ sixth day
CHO-6715	7.5 mm	6.5 mm	2.5 mm	2.5 mm	19.0 mm
CHO-6716	3.5 mm	1.5 mm	1.5 mm	1.5 mm	8.0 mm
CHO-6717	3.0 mm	3.5 mm	2.5 mm	1.5 mm	10.5 mm
CHO-7410	3.5 mm	1.5 mm	1.5 mm	1.5 mm	8.0 mm

2) 각 균주의 액체종균상의 특징 시험

가) *Cordyceps militaris* f. *albino*(CHO-6715)

색은 보랏빛을 띠고 3일째부터 균사 생장의 징후가 발견되어 7일째 완성된다. Pellet은 보랏빛을 띠고 있다. Pellet의 크기는 먼지 크기에서 약 1 cm정도이다.

나) *C. gracilioides*(CHO-6716, CHO-6717)

색은 감자색이며, Pellet은 둥근형인데 여기에 가시처럼 돌기가 있고 크기는 1~3 cm정도이다. 군사 생장의 징후가 3일째부터 보이기 시작하여 7일째 군사 밀도가 가장 좋은 모양이 된다.

다) *C. militaris*(CHO-7410)

색은 연한 감자색으로 Pellet은 3일째부터 징후가 나타나 이때는 아주 작은 먼지 모양이다가 점점 커져서 약 1 cm정도의 둥근형을 이룬다. 7일째 군사 생장이 완성된다.

라) *Isaria japonica*(CHO-7413)

색은 우유빛이며, 3일째부터 군사생장의 징후가 나타나며 7일째 완성된다. Pellet의 크기는 1~3 cm정도이며 모양은 둥근형이다.

마) *I. japonica*(CHO-6713)

I. japonica(CHO-7413)와 유사한 모양을 나타낸다.

3) 자실체 형성에 있어서의 각 균주들의 특징

가) *Cordyceps militaris* f. *albino*(CHO-6715)

군사 배양 완성시까지 7일이 걸렸으며, 모양은 흰색에 밀가루를 뿌려놓은 듯하다. 냄새는 나프탈렌 냄새가 난다. 군사배양 후 생식 성장시에는 온도를 20℃로 하온하고, 가습은 90%이상, 광은 200 Lux 정도로 하였다. 하지만 자실체 유도에는 실패하였다.

나) *C. gracilioides*(CHO-6716, CHO-6717)

군사 배양 완성시까지 7일이 걸렸으며, 모양은 3일째가 되어서야 기미가 보이다가 4일째에는 거미줄과 같은 것이 군데군데 나타나는 형상이며 색은 회색이다. 7일째까지 군사배양을 실시하였고, 이후 온도를 20℃로 하온하고, 가습은 90%이상, 광은 200 Lux정도로 하였다. 하지만 자실체 유도에는 실패하였다.

다) *C. militaris*(CHO-7410)

균사 배양이 더디게 나타났으며, 3일째부터 징후가 나타나며, 색은 흰색에서 약간의 노란빛이 5일째부터 돌기 시작하였다. 하지만 흰색에 가깝다. 10일째 되어서야 균사배양이 완성되었으며 생식생장에 들어가 온도를 20℃로 하온하고, 가습은 90%이상, 광은 200 Lux로 하였다. 생식생장 후 3일째부터 군데군데 원기형성이 이루어지고 5일째부터 자실체가 발생하기 시작하였다. 이후 45일 후에는 두부가 거칠어지기 시작하여 58일째 거의 다 생장이 끝났다.

라) *Isaria japonica*(CHO-7413)

균사 배양은 3일째부터 징후가 나타나 7일간 배양하였으며, 이후 생식생장에 들어가 온도를 20℃로 하온하고 가습은 90%이상, 광은 200 Lux로 하였다. 원기형성은 이후 3일 후에 나타났으며 형태는 노란빛이 군데군데 벌집모양을 이루었다. 이후 6일째부터 자실체의 발생이 이루어졌으며 원기가 형성한 형태대로 무리를 지어 나타났다.

마) *I. japonica*(CHO-6713)

I. japonica(CHO-7413)와 비슷한 형태를 나타냈다.

Table 3. Stroma of *Isaria japonica* incubated on silkworm pupae

section strains	weight of stroma (g)	length of stroma (mm)	diameter of stroma (mm)	number of stroma	age at nutrition growth days	age at stroma initiation days	age at total growth days	weight of media (g)
CHO-6713	27.14	11.2	1.1	406	7	3	31	100
CHO-7413	26.73	10.5	1.03	313	7	3	32	100

Table 4. Stroma of genus *Cordyceps* incubated on silkworm pupae

section strains	wei ght of stroma (g)	len gth of stroma (mm)	diameter of stroma (mm)	number of stroma	a ge at nutrition growth days	a ge at stroma initiation days	a ge at total growth days	wei ght of media (g)
CHO-6715	•	•	•	•	•	•	•	•
CHO-6716	•	•	•	•	•	•	•	•
CHO-6717	•	•	•	•	•	•	•	•
CHO-7410	26.29	98	3.05	211	10	3	58	100

라. 실험요약

1999년 12월부터 2000년 12월 15일까지 한라산 국립공원을 비롯한 전국 각지의 곳에서 약 20여종의 동충하초를 채집하였다. 이중 2속 4종을 확인하였고, 이들 중 6균주를 자실체 유도에 이용하였고, 그 결과 *Cordyceps militaris*(CHO-7410), *Isaria japonica*(CHO-6713, CHO-7413)는 이용가치가 충분하다고 사료되어 우량균주로 선발하였다.

마. 결 과

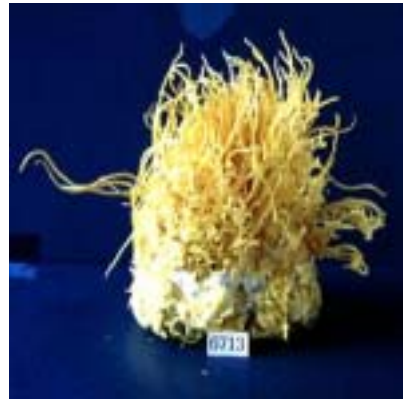
1999년 12월 16일일부터 2000년 6월15일까지의 연구결과와 2000년 6월16일

부터 2000년 12월 15일까지의 결과를 종합한 것은 다음과 같다.

- 1) 동충하초 표본 수 : *Cordyceps*류 43개, *Isaria* 30개, *Hirustella* 2개, 백강균 2개.
- 2) 분리된 균주 : *Cordyceps* 류 30개, *Isaria* 5개
- 3) 미기록종 : 2개(*Cordyceps militaris* f. *albino* : 흰동충하초, *Isaria sinclairii* : 흰가루눈꽃동충하초)
- 4) 논문발표 : 야생동충하초로부터 우량균주 선발(I) : 한국자원식물학회지 13권 3호
- 5) 자실체 발생이 우수한 균주
 - 가) *Cordyceps militaris* : 2개(99-0007, CHO-7410)
 - 나) *C. sobolifera* : 1개(99-0008)
 - 다) *C. kanzashina* : 1개(99-0009)
 - 라) *Isaria japonica* : 5개 (99-0001, 99-0002, 99-0003, CHO-6713, CHO-7413)



Cordyceps militaris(CHO-7410)



Isaria japonica(CHO-6713)



I. japonica(CHO-7413)



C. grocilioides(CHO-6717)



A



B



C



D



E



F



G



H



I

A : *Cordyceps militaris*(99-0007)

B : *C. militaris*(CHO-7410)

C : *C. sobolifera*(99-0008)

D : *C. kanazshina*(99-0009)

E : *Isaira japonica*(99-0001)

F : *I. japonica*(99-0002)

G : *I. japonica*(99-0003)

H : *I. japonica*(CHO-6713)

I : *I. japonica*(CHO-7413)

4. 자실체 발생실험 (3)

가. 발생실험방법

1) 고체배지에서의 실험

PDA(Potato Dextrous Agar)평판배지의 중앙에 10 mm 정도로 절취한 균총 한 조각을 접종 한 후 모양, 색깔과 균사 성장속도를 조사하였다.

2) 액체배지에서의 실험

1 ℓ 내열성 플라스틱 종균 배양병에 각각 500 mm씩 PDB(Potato Dextrous Brouth) 배지를 분주하였다. 여기에 PDA배지에서 각각 1주일간 배양한 균주를 10 mm cork borer를 이용하여 동심원상의 가장 바깥쪽 균총 의 절편 3개씩 각각 PDB배지에 접종하였다. 그리고 나서 1주일간 150 rpm으로 25℃에서 진탕 배양한 후에 이들의 특징을 조사하였다.

3) 자실체 발생 실험

냉동상태의 누에번데기를 배지로 이용하였고, 이를 800 ml 분리형 내열성 플라스틱 병에 번데기를 각각 100 g 씩 넣어 121℃, 15 psi의 Autoclave에서 20분간 살균하였다. 여기에 만들어진 액체종균을 누에 번데기배지에 각각 5 ml씩 접종하여 어두운 곳에서 배양하였다. 우량균주 선발은 평균적인 자실체의 길이, 직경, 중량, 자실체의 전체적인 모양을 기준으로 하였다.

나. 재 료

1) 야생에서 채집한 3개의 공시균주

동충하초 (*Cordyceps militaris* = 6712) : 1균주

동충하초 (*Cordyceps* sp = 6047) : 1균주

췌기나방동충하초(*Cordyceps coccidiocapitate*=7022):1균주

눈꽃동충하초 (*Isaria japonica* = 7109) : 1균주

눈꽃동충하초(*I. japonica*=M-001) : 1균주

다. 실험성적

1) 각 균주의 고체배지상의 특징 시험

가) 동충하초(*Cordyceps militaris*=6712)

균사생장은 동심원을 그리면서 성장하였으며 배지에 두껍게 붙어 있는 형태이며 색은 흰색에 옅은 살색이 섞여있다. 2일까지는 배지에 적응하는 시기이므로 생장이 없다가 3일째에 2 mm의 균사가 성장하였고 그 이후 규칙적으로 하루단위로 6 mm씩 성장하였다. 그래서 6일 동안 총 21 mm 성장하였다.

나) 동충하초 (*Cordyceps* sp = 6047)

균사는 동심원상을 그리면서 성장하였고 기중균사가 없이 배지 바닥에 두껍게 붙은 형태이며 옅은 살색을 나타내었고 2일까지는 적응기를 갖다가 3일째부터 성장을 하였으며 규칙적인 성장을 하였으며 6일 동안 총 12 mm 성장하였다.

다) 썩어나방동충하초 (*Cordyceps coccidiocapitata*=7022)

균사는 동심원상을 그리면서 성장하였고 기중균사가 솜처럼 있고 색은 흰색이다. 생장은 2일까지는 적응기를 갖다가 3일째부터 급속한 성장을 하였지만 불규칙하였고 총 38 mm 성장하였다.

라) 눈꽃동충하초(*Isaria japonica*=7109)

균사는 동심원을 그리면서 성장하였고 배지에 붙은 형태로 기중균사가 솜처럼 부풀었고 색은 흰색이었다. 3일부터 성장하여 비교적 빠른 속도로 6일간 20 mm 성장을 하였다.

마) 눈꽃동충하초(*Isaria japonica* = M-001)

균사는 동심원을 그리면서 성장하였고 배지에 붙은 형태로 기중균사가 솜처럼 부풀었고 색은 흰색이었다. 3일부터 성장하여 비교적 느린 속도로 6일간 9.8 mm 성장을 하였다.

바) 중국산 동충하초(*Cordyceps militaris* = C-001)

균사는 동심원상을 그리면서 성장하였고 기중균사가 없이 배지바닥에서 만 자라며 옅은 황색을 나타내었고 2일까지는 적응기를 거쳐 3일째부터 성장을 하였으며 불규칙적인 성장을 하였으며 6일 동안 총 10.5 mm 성장 하였다.

Table1. Mycelium growth of genus *Cordyceps* and *Isaria japonica*

(unit: mm)

생장일수 균주번호	1~3일	3~4일	4~5일	5~6일	1~6일
6712	2.0	6.0	6.0	7.0	21.0
6047	3.5	1.5	1.5	1.5	12.0
7022	4.0	9.0	13.0	12.0	38.0
7109	3	5	6	6	20
M-001	3.0	2.0	2.5	2.3	9.8
c-001	3.0	3.5	2.5	1.5	10.5

2) 각 균주의 액체배지상의 특징 시험

가) 동충하초(*Cordyceps militaris* = 6712)

2일까지는 적응기를 갖다가 3일째 비로소 균사가 성장하는 것이 육안으로 확인되었다. 점차 균사밀도가 늘어나고 1주일 이 경과되어서 비로소 균사가 완전하게 자랐다. 균사의 색은 감자색을 띠었고 균사 알갱이는 약 미세한 크기에서 약 1 cm 정도였다.

나) 동충하초 (*Cordyceps* sp = 6047)

2일까지는 적응기를 갖다가 3일째부터 육안으로 균사생장이 확인되었고 1주일 경과 후 완전한 균사생장을 보였다. 균사의 색은 밝은 감자색을 띠었고 균사의 알갱이는 약 0.5 cm 정도였다.

다) 썩어나방동충하초 (*Cordyceps coccidiocapitata*=7022)

2일까지는 적응기를 갖다가 3일째부터 육안으로 균사생장이 확인되었고 1주일 경과 후 완전한 균사생장을 보였다. 균사의 색은 어두운 청색이었으며 균사의 알갱이는 미세한 먼지 정도의 크기였다.

라) 눈꽃동충하초(*Isaria japonica*=7109)

2일까지는 적응기였다가 3일째부터 균사생장이 육안으로 보였고 1주일 동안 완전한 균사생장을 보였다. 균사의 색은 감자색을 띠었고 균사의 알갱이는 약 1 cm 정도였다.

마) 눈꽃동충하초(*Isaria japonica*=M-001)

2일까지는 적응기였다가 3일째부터 균사생장이 육안으로 보였고 1주일 동안 완전한 균사생장을 보였다. 균사의 색은 옅은 황색을 나타냈으며 균사의 알갱이는 약 0.5~1 cm 정도였다.

바) 중국산동충하초(*Cordyceps militaris* = C-001)

2일까지는 적응기를 갖다가 3일째부터 육안으로 균사생장이 확인되었고

1주일 경과 후 완전한 균사생장을 보였다. 균사의 색은 진한 감자색을 띠었고 균사의 알갱이는 0.5~1 cm 정도의 크기였다.

3) 자실체 형성에 있어서의 각 균주들의 특징

가) 동충하초(*Cordyceps militaris*=6712)

25℃에서 7일간 암배양하였으며 3일이 지나서 균사가 배지의 70% 이상까지 활착되었으며 색은 베지밀색을 나타내었다. 냄새는 연한 콩나물 냄새가 났다. 4일째에는 균사끼리 뭉치기 시작하였고 7일이 되어서야 균사가 완전하게 활착되었으며 7일 이후부터는 20℃로 하온하고 공중 습도를 90%이상 한 상태에서 배양을 계속하였으며 접종 후 13일이 지나서야 균사는 그대로 흰색을 유지하였으며 배양병속에 갈색물방울이 생기기 시작하였다. 26일이 지나서도 같은 상태가 계속유지 될 뿐이었다.

나) 동충하초 (*Cordyceps* sp = 6047)

25℃에서 7일간 암배양 하였으며 2일째부터 균사가 부분 부분 활착되어 있고 3일째에는 배지전체로 고르게 활착 됨. 색은 흰색이고 냄새는 없다. 4일째에는 전날보다 두껍게 균사가 활착 되었으며 7일에 비로소 균사가 배지전체에 골고루 활착 되었다. 7일 이후부터는 20℃로 하온하고 공중 습도를 90%이상 한 상태에서 배양을 계속하며 접종 후 13일이 지나서 전체적으로 균사가 연한 살색을 띠며 그 부분이 노란빛을 띄면서 불규칙적으로 자실체가 처음 발생되었다. 접종 후 26일째 약 3cm정도 자랐으며 균사의 색은 진한 주황색을 나타내었다. 접종 후 6일째 약 5 cm 정도에서 생장이 정지되었고 완전하게 자란 상태였다.

다) 췌기나방동충하초 (*Cordyceps coccidiocapitata*=7022)

25℃에서 7일간 암배양하였으며 2일까지는 적응기에 있다가 3일째부터 균사가 부분 자리를 잡았다. 색은 흰색이며 균사의 냄새는 강한 콩나물 냄새이다. 4일째에는 균사가 배지 전체적으로 얇게 활착하였으며 어떤 것은 배지에 붙은 형태 어떤 것은 숨처럼 부풀은 형태이다. 7일이 되어서야 완전한 균사배양이 이루어진 후 20℃로 하온하고 가습을 공중 습도

90%이상을 유지하였다. 접종 후 13일이 지나서 균사면이 울퉁불퉁하고 부분 부분 송화가루를 뿌려놓은 듯 보인다. 접종 후 26일째 그다지 발전된 모습은 없으며 진한 갈색은 물방울이 생기기 시작한다. 이후 균사가 성장이 멈추었다.

라) 눈꽃동충하초(*Isaria japonica*=7109)

25℃에서 7일간 암배양 하였으며 3일째 균사가 부분 부분 활착하였으며 냄새는 번데기 배지 냄새가 났다. 4일째 전날보다 진전된 균사생장을 보이다가 7일이 지나서야 비로소 균사가 완전하게 활착되었다. 7일 이후부터는 20℃로 하온하고 공중 습도를 90% 이상 유지한 상태에서 배양을 계속하였으며 접종 후 13일이 지나서는 벌집모양으로 자실체가 생겼으며 그 외 균사부위는 검은 흰색이다. 26일이 지나서는 자실체의 길이가 6 cm를 유지하였다. 35일이 지나서야 자실체가 완전하게 자랐으며 이때의 길이는 약 9 cm 정도였다.

마) 눈꽃동충하초(*Isaria japonica* = M-001)

25℃에서 7일간 암배양하였으며 3일째 균사가 원기를 형성하였으며 냄새는 번데기의 배지냄새가 났다. 4일째 전날보다 진전된 균사생장을 보이다가 7일이 지나서야 비로소 균사가 완전하게 활착되었다. 7일 이후부터는 20℃로 하온하고 공중 습도를 90%이상한 상태에서 배양을 계속하였으며 접종 후 13일이 지나서는 벌집모양으로 자실체가 생겼으며 그 외 균사부위는 검은 흰색이다. 26일이 지나서는 자실체의 길이가 5~6 cm를 유지하였다. 35일이 지나서야 자실체가 완전하게 자랐으며 이때의 길이는 약 7~8 cm 정도였다.

바) 중국산동충하초(*Cordyceps militaris* = C-001)

25℃에서 7일간 암배양 하였으며 3일이 지나서야 균사가 배지 표면을 덮었고 7일째에는 균사가 완전하게 활착하였다. 접종 후 7일 이후에는 20℃로 하온하고 공중 습도를 90%이상 한 상태에서 배양을 계속하였으

며 자실체의 형태는 끝이 뾰족하게 되는 것이 큰 차이점이었고 35일 정도에 완전히 자랐고 7~8 cm 정도였다.

Table 2. Stroma of genus *Cordyceps* spp. and *Isaris japonica* incubated on silkworm pupae

section strains	weight of stroma (g)	length of stroma (mm)	diameter of stroma (mm)	number of stroma	age at nutrition growth days	age at stroma initiation days	age at total growth days	weight of media (g)
6712	28.5	100	1.2	296	7	3	35	100
6047	27.5	53	1.53	285	7	3	35	100
7022	0	0	0	0	0	0	35	100
7109	25.9	97	1.07	332	7	4	35	100
M-001	27.6	88	1.35	290	7	3	32	100
c-001	26.8	88	1.01	283	7	3	35	100

마. 결 과

- 1) 동충하초(*Cordyceps militaris*=6712, 6047)의 2균주와 눈꽃동충하초(*Isaria japonica*=7109, M-001)의 2균주를 합하여 4균주를 우수균주로 선발하였다.
- 2) 중국산 동충하초 (*Cordyceps militaris*=C-001)도 한국산 동충하초와 배양 조건은 같았고 다만 끝이 가늘었다.



동충하초
(6712)



동충하초
(6047)



췌기내광
동충하초
(7022)



췌기동충하초
균사배양
(7022)



눈꽃동충하초
(7109)



동충하초
(6047)



눈꽃 동충하초
(M-001)



중국산
동충하초
(C-001)

5. 자실체 발생실험 (4)

가. 실험방법

1) 동충하초의 특성을 고려하여 눈꽃동충하초(*Isaria*)는 분생포자를 Petri-dish에 분주한 PDA(Potato Dextrous Agar) 배지상에 낙하하고 동충하초(*Cordyceps*)는 자실체를 PDA배지가 들어 있는 Petri-dish의 뚜껑에 테이프로 고정시켜서 배지상에 자낭포자가 떨어지도록 하거나 자실체의 일부조직을 분리하여 PDA 배지상에 놓고 이를 25±1℃의 항온기에서 배양하였고 이후 이들을 순수 분리하여 균주로 보관하였다.

2) 고체배지에서의 실험

PDA(Potato Dextrous Agar)평판배지의 중앙에 10 mm 정도로 절취한 균총 한 조각을 접종한 후 모양, 색깔과 균사 성장 속도를 조사하였다.

3) 액체배지에서의 실험

1 ℓ 내열성 플라스틱 종균 배양병에 각각 500 mm씩 PDB(Potato Dextrous Broth)배지를 분주하였다. 여기에 PDA배지에서 각각 1주일간 배양한 균주를 10 mm cork borer를 이용하여 동심원상의 가장 바깥쪽 균총의 절편 3개씩 각각 PDB배지에 접종하였다. 그리고 나서 1주일간 150 rpm으로 25℃에서 진탕 배양한 후에 이들의 특징을 조사하였다.

4) 자실체 발생 실험

냉동상태의 누에번데기를 배지로 이용하였고, 이를 800 ml 분리형 내열성 플라스틱 병에 번데기를 각각 100 g 씩 넣어 121℃, 15 psi의 Autoclave에서 20분간 살균하였다. 여기에 만들어진 액체종균을 누에 번데기배지에 각각 5 ml씩 접종하여 어두운 곳에서 배양하였다. 우량균주 선발은 평균적인 자실체의 길이, 직경, 중량, 자실체의 전체적인 모양을 기준으로 하였다.

나. 재료

1) 야생에서 채집한 공시균주

동충하초 (*Cordyceps militaris* = 7072, 7209) : 2균주

동충하초(*Cordyceps* sp. = 6047, 7110) : 2균주

눈꽃동충하초 (*Isaria japonica* = 7109, 7211) : 2균주

2) 문제점보완 실험을 한 공시균주

동충하초 (*Cordyceps militaris* = 6047) : 1균주

눈꽃동충하초 (*Isaria japonica* = 7109) : 1균주

다. 실험성적

1) 각 균주의 고체배지상에서의 특성

가) 동충하초(*Cordyceps militaris* = 7072)

균사생장은 동심원을 그리면서 성장하였으며 2일까지는 배지에 적응하는 시기이므로 생장이 없다가 3일째에 2 mm의 기중균사가 성장하였다가 배지에 두껍게 붙어 있는 형태이며 흰색에서 4일부터 중앙이 노랗게 된다. 그 이후 규칙적으로 하루에 3.5 mm, 7.5 mm, 3.5 mm, 6.0 mm, 10 mm 일씩 총 30.5 mm 성장하였다.

나) 동충하초 (*Cordyceps militaris* = 7209)

균사는 동심원상을 그리면서 성장하였고 처음은 솜같은 기중균사로 2일까지는 적응기를 갖다가 3.5 mm, 2.5 mm, 6.5 mm, 4.5 mm, 9.0 mm로 3일째부터 급속한 성장을 하였지만 불규칙하였고 총 26 mm 성장하였다.

다) 동충하초(*Cordyceps* sp. = 6047)

균사는 동심원을 그리면서 성장하였고 배지에 붙은 형태로 기중균사가 솜처럼 부풀었고 색은 흰색이었다. 생장은 3.0 mm, 3.0 mm, 3.5 mm, 3.0 mm, 10.5 mm로 처음은 고른 성장을 하다가 6일째 급성장하여 총 23 mm 성장하였다.

라) 동충하초(*Cordyceps* sp. =7110)

균사는 동심원상을 그리면서 성장하였고 처음은 기중의 균사로 2일까지는 적응기를 갖다가 3.5 mm, 2.5 mm, 4.5 mm, 6.0 mm, 4.5 mm로 계속적인 생장의 증가를 하였으며 총 21 mm 성장하였다.

마) 눈꽃동충하초(*Isaria* sp. = 7109)

균사는 불규칙한 동심원을 그리면서 성장하였고 배지에 붙은 형태로 기중균사가 솜처럼 부풀었고 색은 흰색이었다. 0.5 mm, 1.0 mm, 0.5 mm, 0.5 mm, 0.7 mm로 총 3.2 mm 성장을 하였다.

바) 눈꽃동충하초(*Isaria* sp. = 7211)

균사는 동심원상을 그리면서 성장하였고 기중균사가 없이 배지바닥에서만 자라며 옅은 황색을 나타내었고 2일까지는 적응기를 거쳐 3일째부터 성장을 하였으며 불규칙적인 성장을 하였으며 6일 동안 총 3.8 mm 성장하였다.

2) 각 균주의 액체배지상에서의 특성

가) 동충하초(*Cordyceps militaris*=7072)

2일까지는 적응기를 갖다가 3일째 비로소 pellet가 형성되고 균사가 성장하는 것이 육안으로 관찰되었다. 점차 균사밀도가 늘어나고 1주일 후에 비로소 균사가 완전하게 자랐다. 균사의 색은 황백색을 나타내었고 균사 크기는 약 1 cm 정도였다.

나) 동충하초 (*Cordyceps militaris* = 7209)

2일까지는 적응기를 갖다가 3일째부터 육안으로 균사생장이 확인되었고 1주일 경과 후 완전한 균사생장을 보였다. 균사의 색은 밝은 황백색을 띠었고 균사의 알갱이는 약 0.5 cm 정도였다.

다) 썩어나방동충하초 (*Cordyceps* sp.=6047)

2일까지는 적응기를 갖다가 3일째부터 육안으로 균사생장이 확인되었고 1주일 경과 후 완전한 균사생장을 보였다. 균사의 색은 황백색이었고 균사의 알갱이는 미세한 먼지 정도의 크기였다.

라) 눈꽃동충하초(*Cordyceps* sp.=7110)

2일까지는 적응기였다가 3일째부터 균사생장이 육안으로 보였고 1주일 동안 완전한 균사생장을 보였다. 균사의 색은 황백색을 나타냈고 균사의 알갱이의 크기는 약 1 cm 정도였다.

마) 눈꽃동충하초(*Isaria japonica*=7109)

2일까지는 적응기였다가 3일째부터 균사생장이 육안으로 보였고 1주일 동안 완전한 균사생장을 보였다. 균사의 색은 옅은 황색 또는 황백색이었고 균사의 알갱이는 1 cm 정도였다.

바) 눈꽃동충하초(*Isaria* sp. = 7211)

2일까지는 적응기를 갖다가 3일째부터 육안으로 균사생장이 확인되었고 1주일 경과 후 완전한 균사생장을 보였다. 균사의 색은 진한 황백색이었고 균사의 알갱이는 0.5~1 cm 정도의 크기였다.

3) 각 균주의 자실체 발생실험

가) 동충하초(*Cordyceps militaris*=7072)

25℃에서 7일간 암배양하였으며 3일이 지나서 균사가 배지의 75%이상 까지 활착되었으며 색은 연한 베이지색을 나타내었다. 약간 콩나물 냄새가 났다. 4일째는 균사끼리 뭉치기 시작하였고 9일이 되어서야 균사가 완전하게 활착되었으며 9일 이후부터는 20℃로 하온하고 공중 습도를 90%이상 한 상태에서 배양을 계속하였으며 접종 후 13일이 지나서야 균사는 황백색을 유지하였으며 배양병 속에 갈색 물방울이 생기기 시작하였으며 40일 후 10.8 cm 정도 성장하였다.

나) 동충하초 (*Cordyceps militaris* = 7209)

25℃에서 7일간 암배양하였으며 2일째부터 균사가 부분 활착되어 있고 3일째에는 배지전체로 고르게 활착되었다. 색은 흰색이고 냄새는 없었다. 4일째는 3일째보다 두껍게 균사가 활착되었으며 7일에 비로소 균사가 배지전체에 골고루 활착되었다. 7일 이후부터는 20℃로 하온하고 공중 습도를 90%이상 유지한 상태에서 배양을 계속하며 접종 후 14일이 지나서 전체적으로 균사가 연한 살색을 나타내며 원기 부분이 노란빛을 띄면서 불규칙적으로 자실체가 처음 발생되었다. 접종후 26일째 약 3 cm 정도 자랐으며 균사의 색은 진한 주황색을 나타내었다. 접종 후 40일째 약 12.5 cm 정도 성장하였다.

다) 동충하초 (*Cordyceps* sp. = 6047)

25℃에서 7일간 암배양하였으며 2일까지는 적응기에 있다가 3일째부터 균사가 흰색으로 냄새는 강한 콩나물 비슷한 냄새가 났다. 4일째 균사가 배지 전체적으로 얇게 활착하였으며 어떤 것은 배지에 붙은 형태, 또는 솜처럼 부풀은 형태였다. 7일이 되서야 원기가 형성되고 20℃로 하온하고 가습을 공중 습도 90%이상을 유지하였다. 26일째 진한 갈색의 물방울이 생기기 시작하며 40일이 지나서 자실체들은 완전히 자라서 12 cm 였다.

라) 동충하초 (*Cordyceps* sp. = 7110)

25℃에서 7일간 암배양 하였으며 2일째부터 균사가 성장하여 3일째에는 배지 전체로 고르게 활착되었다. 색은 흰색이고 냄새는 없었다. 4일째에는 두껍게 균사가 활착되었으며 7일에 비로소 균사가 배지전체에 골고루 활착되었다. 7일 이후부터는 20℃로 하온하고 공중 습도를 90%이상의 상태에서 배양을 계속하며 14일이 지나서 전체적으로 균사가 연한 백황색을 나타내며 원기 부분이 노란빛을 띄면서 불규칙적으로 자실체가 처음 발생되었다. 26일째 약 3 cm정도 자랐으며 균사의 색은 진한 주황색을 나타내었다. 접종 후 40일째 약 12.5 cm 정도 성장하였다.

마) 눈꽃동충하초(*Isaria japonica*=7109)

25℃에서 7일간 암배양 하였으며 3일째 균사가 부분 부분 활착되었으며 냄새는 번데기배지 냄새가 났다. 7일이 지나서야 비로소 균사가 완전하게 활착되었다. 온도를 20℃로 하온하고 습도는 90%이상 광도는 200 Lux로 조정하였다. 원기형성은 3일부터 나타났고 노란빛이었다. 6일부터 원기가 자실체로 성장하기 시작하여 28일에 11 cm로 성장하였다.

사) 눈꽃동충하초(*Isaria japonica*=7211)

25℃에서 7일간 암배양 하였으며 3일째 균사가 뻗기 시작하였으며 냄새는 번데기 냄새가 났다. 7일이 지나서야 비로소 균사가 활착되었다. 온도는 20℃로 하온하고 습도는 90%이상, 광도는 200 Lux로 조정하였다. 원기형성은 3일부터 나타났고 황갈색이었다. 7일부터 원기가 자실체로 성장하기 시작하여 28일에 11.5 cm로 성장하였다.

라. 실험요약

2001년 6월 16일부터 2001년 12월 17일까지 연구한 결과는 한국산 미기록 동충하초 2종(*Cordyceps clavata* Kobayasi et Shimizu (방망이동충하초), *Cordyceps yakushimensis* Kobayasi et Shimizu(홍두깨동충하초)을 확인하였고, 우수균주는 동충하초류(*Cordyceps* = 6047, 7072, 7110)의 3균주, 눈꽃동충하초류(*Isaria* = 7109,7211)의 2균주였다. 문체정보완 실험의 동충하초(*Cordyceps militaris*=6047)와 눈꽃동충하초(*Isaria* = 7109)와 전반기 실험과 동일한 결과를 얻었다.

마. 결 과

2000년12월116일부터 2001년 6월17일까지의 전반기연구와 2001년 6월17일부터 2001년 12월 12월 17일까지의 결과를 종합한 것이다.

- 1) 동충하초의 수집: *Cordyceps*류 20개체, *Isaria* 10개체, 백강균 1개체
- 2) 분리된 균주 : *Cordyceps* 균주 10개, *Isaria* 균주 2개.

- 3) 한국산 미기록 동충하초 : *Cordyceps clavata* Kobayasi et Shimizu (방망이동충하초), *Cordyceps yakushimensis* Kobayasi et Shimizu(홍두깨동충하초)의 2종류.
- 4) 동충하초 우수균주 : 동충하초류(*Cordyceps* = 6047, 6712, 7072, 7209, 7110)의 5균주, 눈꽃동충하초류(*Isaria* = 7109, M-001,7211)의 3균주.
- 5) 문제점보완실험은 동충하초(*Cordyceps militaris*=6047)와 눈꽃동충하초(*Isaria* = 7109)는 자실체 발생에 이상이 없었다.
- 6) 중국산 동충하초 (*Cordyceps militaris*=C-001)도 한국산 동충하초와 배양 조건은 같았고 다만 끝이 가늘었다.
- 7) 눈꽃동충하초(*Isaria japonica*=6540)의 산소공급에 따른 병마개 개방형과 밀폐형 실험에서 개방형은 포자채취에 좋았고 밀폐형은 상품성으로 좋았다.
- 8) 매미동충하초(*Cordyceps sobolifera* = 6233(99-008))를 자실체발생은 400 Lux가 최적이었다. 광도에 따라서 자실체의 생육기간, 초기 자실체 발생기간과 그리고 균사의 색이 자실체의 색에 영향을 미친다.
- 9) 논문게재 : 야생동충하초로부터 우량균주선발(II), 2001.한국자원식물학회지, 14(2):169-174



Cordyceps militaris=7072



Cordyceps militaris=7209



Cordyceps sp = 7110



Isaria japonica = 7109



Isaria sp = 7211

제4절 선발균주

1. 선발균주 (1)

가. 채집기간 : 1999. 12. 16~2000. 12. 16.

1999년 12월 16일일부터 2000년 6월15일까지의 연구결과와 2000년 6월16일부터 2000년 12월 15일까지의 결과를 종합한 것은 다음과 같다.

나. 자실체 발생이 우수한 균주

1) *Cordyceps* (4개)

Cordyceps militaris : 2개(99-0007, CHO-7410)

C. sobolifera : 1개(99-0008)

C. kanzashina : 1개(99-0009)

2) *Isaria* (5개)

Isaria japonica : (99-0001, 99-0002, 99-0003, CHO-6713, CHO-7413)

2. 선발균주 (2)

가. 채집기간 : 2000. 12. 16~2001. 12. 17.

2000년12월16일부터 2001년 6월17일까지의 전반기연구와 2001년 6월17일부터 2001년 12월 17일까지의 결과를 종합한 것이다.

나. 자실체 발생이 우수한 균주

1) *Cordyceps* (5개)

Cordyceps (동충하초류 : 6047, 6712, 7072, 7209, 7110)

2) *Isaria* (3개)

Isaria (눈꽃동충하초류 : 7109, M-001, 7211)

가) 동충하초의 수집 : *Cordyceps*류 20개체, *Isaria* 10개체, 백강균 1개체

나) 분리된 균주 : *Cordyceps* 균주 10개, *Isaria* 균주 2개.

다) 한국산 미기록 동충하초 : *Cordyceps clavata* Kobayasi et Shimizu (방망이동충하초), *Cordyceps yakushimensis* Kobayasi et Shimizu(홍

두깨동충하초)의 2종류.

- 라) 문제점보완실험은 동충하초(*Cordyceps militaris*=6047)와 눈꽃동충하초(*Isaria* = 7109)는 자실체 발생에 이상이 없었다.
- 마) 중국산 동충하초 (*Cordyceps militaris*=C-001)도 한국산 동충하초와 배양 조건은 같았고 다만 끝이 가늘었다.
- 바) 눈꽃동충하초(*Isaria japonica*=6540)의 산소공급에 따른 병마개 개방형과 밀폐형 실험에서 개방형은 포자채취에 좋았고 밀폐형은 상품성으로 좋았다.
- 사) 매미동충하초(*Cordyceps sobolifera* = 6233(99-008))를 자실체발생은 400 Lux가 최적이었다. 광도에 따라서 자실체의 생육기간, 초기 자실체 발생기간과 그리고 균사의 색 자실체의 색에 영향을 미친다.
- 아) 논문게재 : 야생동충하초로부터 우량균주선발(II), 2001. 한국자원식물학회지, 14(2):169-174

제5절 동충하초 비교 실험

1. 밀폐형과 개방형의 비교분석실험

가. 눈꽃동충하초 (*Isaria japonica*=6540)의 병마개의 개방형과 폐쇄형의 비교

고체배지상에서와 액체배지상에선 똑같은 조건을 주었고 자실체발생 실험에서 배양병 마개의 밀폐시와 병마개 개방시의 두 그룹으로 나누어 16개씩 실험하여 평균하였다.

1) 배양병마개의 밀폐시

배양병의 마개를 밀폐시킬 때는 전체적으로 완전하게 생장이 멈출 때까지의 시일이 개방했을 때보다는 연장되었으며 또한 포자 또한 늦게 생겼다. 자실체의 길이는 약 97 mm까지 자랐다.

2) 배양병마개의 개방시

배양병의 마개를 개방시킬 때는 초기 자실체가 생기기 시작할 때부터 자실체의 끝 부분이 갈라지기 시작하면서 포자가 생기기 시작하며 생장이 초기에는 빠르나 빠른 노화현상으로 생장일수가 밀폐시보다 약 10여일이 빠른 23일 정도가 걸렸다. 또한 자실체의 길이도 밀폐시의 97 mm보다 작은 73 mm정도에 그쳤다. 결국 상품성으로는 배양병 밀폐시가 좋은 결과를 얻었고 포자를 채취하는 데는 병마개 개방시가 좋은 결과였다.

나. 매미동충하초(*Cordyceps sobolifera* = 6233(99-008))의 자실체 발생에 있어서의 광도의 영향

⇒ 자실체 발생을 위한 생식성장시의 온도는 20℃, 가습은 공중습도 95%을 유지시킨 상태에서 100 Lux에서는 자실체 초기 발생기간이 생식성장 후 8일이 걸리고 균사의 색은 살색에 가깝고 자실체 또한 살색에 가까웠다. 생육기간은 총 59일이 걸리고 자실체의 길이는 약 47 mm 정도였다.

400 Lux시에는 초기 자실체 발생기간은 6일이며 균사의 색은 진한 빨간색을 나타내었고 자실체 또한 빨간색에 가까웠다. 총 생육기간은 61일이

며 자실체의 길이는 59 mm 정도였다. 1,000 Lux시에는 초기 자실체 발생 기간은 6일이며 초기에는 균사의 색과 자실체의 색이 진한 빨간색이지만 시일이 경과되면서 균사와 자실체의 색이 연한 살색을 나타낸다. 총 생육기간은 56일이며 자실체의 길이는 42 mm였다. 이것은 매미동충하초가 광도에 예민하게 반응하는 것으로 광도가 너무 강하거나 약하면 자실체 발생이 좋지 않았고 약 400 Lux에서 우수한 자실체가 발생한다는 것을 보여 주고 있다.

2. 결 과

가. 눈꽃동충하초(*Isaria japonica* = 6540)의 산소공급에 따른 병마개 개방형과 밀폐형 실험에서 개방형은 포자채취에 좋았고 밀폐형은 상품성으로 좋았다.

나. 매미동충하초 (*Cordyceps sobolifera* = 6233 (99-008))를 자실체 발생은 400 Lux가 최적이었다. 광도에 따라서 자실체의 생육기간, 초기자실체 발생기간과 그리고 균사의 색과 자실체의 색에 영향을 미친다.



눈꽃 동충하초(개방형)
(6540)



눈꽃 동충하초(폐쇄형)
(6540)



매미동충하초
광도 400 Lux



매미동충하초
광도 100 Lux

제6절 대 량 재 배

1. 대량재배의 목적

가. 목적 : 지금까지 농가에서 재배하는 병재배가 주여서 대량생산의 방법이 많이 연구되었다. 병재배에 의한 단위 면적당의 생산량은 많지만 병의 가격, 인건비 때문에 생산량은 많지만 수입이 상대적으로 적었다. 따라서 좁은 면적에서 쉽게 그리고 인건비등을 줄여서 수입을 증대시키기 위한 것이 요구된다.

2. 판재배에 의한 대량재배

가. 기구 : 플라스틱 판 : 가로 33 cm, 세로 25 cm, 높이 5 cm

가로 38 cm, 세로 25 cm, 높이 4.5 cm

(가로 9 cm, 세로 6 cm, 높이 4.5 cm로 칸막이 된 것)

나. 공시균주 : 2개(동충하초 공시균주 8194, 눈꽃동충하초 공시균주 8204)

(공시균주 8194는 판에 재배하고 공시균주 8204는 칸으로 구분된 것에 재배)

3. 실험 방법

가. 고체배지상의 시험

공시균주 8194(동충하초), 8204(눈꽃)를 각각의 평판배지의 중앙에 10 mm 크기로 절취한 균총 한 절편을 접종 후 균사를 성장시킨다.

나. 액체중균상의 시험

1 ml 내열성 플라스틱 종균 배양병에 각각 500 ml 씩의 PDB배지를 분주하였다. 여기에 PDA배지상에서 각각 1주 배양한 균주를 10 mm cork borer를 이용하여 동심원상의 가장 바깥쪽 균총 절편 3개씩 각각 PDB 배지에 접종하였다. 1주일간 150 rpm으로 진탕 배양 후 이의 특징을 조사하였다 (배양 온도 25°C±1°C)

다. 군사활착시험

냉동상태의 번데기를 배지오 이용하여 이를 800 ml 내열성 플라스틱병에 번데기를 각각 100 g 씩 넣어 121℃, 15 psi 의 오토우클래브에서 20분간 멸균하였다. 여기에 이미 만들어짐 액체종균을 누에 번데기 배지에 각각 5 ml 씩 접종하여 배양하였다.

라. 판에 동충하초의 배치 : 공시균주를 배양한 병을 약간 흔들어서 번데기를 판에 넣어서 골고루 퍼지도록 하였다.

마. 재배 상황

공시균주 8194의 실험 : 판에 옮긴 후 배양 3일째에 주황색의 원기가 번데기에서 두 세군데 발생하였으며, 길이는 A, B, C, D, E 그룹 중 C가 0.31 cm로 가장 많이 자랐고, 평균 길이는 0.25 cm에 지름은 0.23 mm 정도였다. 배양 6일째에도 C가 1.90 cm로 가장 많이 자랐고, 5그룹의 평균 길이는 1.44 cm에 지름은 0.4 mm 정도였다. 배양 9일째에도 C가 3.55 cm로 가장 많이 자랐고, 평균 길이는 3.05 cm에 지름은 0.52 mm 정도였다. 배양 12일째에도 C가 5.77 cm로 가장 많이 자랐고, 평균 길이는 4.80 cm에 지름은 0.71 mm 정도였다. 배양 15일째에도 C가 7.81 cm로 가장 많이 자랐고, 평균 길이는 7.05 cm에 지름은 0.85 mm 정도였다. 배양 18일째에도 C가 9.02 cm로 가장 많이 자랐고, 평균 길이는 8.28 cm에 지름은 0.98 mm 정도였다. 배양 21일째에도 C가 9.72 cm로 가장 많이 자랐고, 평균 길이는 9.12 cm에 지름은 1.07 mm 정도였다. 배양 24일째에도 C가 11.76 cm로 가장 많이 자랐고, 평균 길이는 10.96 cm에 지름은 1.21 mm 정도였다. 배양 27일째에도 C가 13.68 cm로 가장 많이 자랐고, 평균 길이는 12.35 cm에 지름은 1.38 mm 정도로 27일간의 배양 기간동안 총 12.35 cm만큼 자랐다.

Table 1. Growth of group A, B, C, D, E of strain 8194

unit(cm)

day	A	B	C	D	E	average
0	0	0	0	0	0	0
3	0.21	0.25	0.31	0.20	0.27	0.25
6	1.20	1.52	1.90	1.15	1.41	1.44
9	2.55	2.71	3.55	3.51	2.92	3.05
12	4.23	4.7	5.77	4.25	5.07	4.80
15	6.42	6.65	7.81	6.99	7.37	7.05
18	7.62	7.75	9.02	8.19	8.79	8.28
21	9.03	8.52	9.72	8.89	9.46	9.12
24	10.86	10.64	11.76	10.58	10.95	10.96
27	11.65	12.23	13.68	11.98	12.2	12.35
average	5.97	6.10	7.05	7.52	7.93	

바. 공시균주 8204의 실험 : 판에 옮긴 후 배양 3일째에 연한 노란색의 원기가 번데기에서 발생하였으며, 길이는 A, B, C, D 그룹 중 B가 0.31 cm로 가장 많이 자랐고, 평균 길이는 0.28 cm에 지름은 0.36 mm 정도였다. 배양 6일째에도 B가 1.53 cm로 가장 많이 자랐고, 평균 길이는 1.41 cm에 지름은 0.58 mm 정도였다. 배양 9일째에도 B가 3.34 cm로 가장 많이 자랐고, 평균 길이는 2.96 cm에 지름은 0.62 mm 정도였다. 배양 12일째에는 C가 5.42 cm로 가장 많이 자랐고, 평균 길이는 4.93 cm에 지름은 0.77 mm 정도였다. 배양 15일째에는 B가 7.46 cm로 가장 많이 자랐고, 평균 길이는 7.21 cm에 지름은 0.86 mm 정도였다. 배양 18일째에도 B가 8.48 cm로 가장 많이 자랐고, 평균 길이는 8.24 cm에 지름은 0.97 mm 정도였다. 배양 21일째에도 B가 9.13 cm로 가장 많이 자랐고, 평균 길이는 8.95 cm에 지름은 1.12 mm 정도였다. 배양 24일째에도 B가 10.78 cm로 가장 많이 자랐고, 평균 길이는 10.63 cm에 지름은 1.28 mm 정도였다. 배양 27일째에도 B가 13.18 cm로 가장 많이 자랐고, 평균 길이는 12.80 cm에 지름은 1.47 mm 정도로 27일간의 배양 기간동안 총 12.80 cm 만큼 자랐다.

Table 2. Growth of group A, B, C, D of strain 8204

unit(cm)

day	A	B	C	D	average
0	0	0	0	0	0
3	0.25	0.31	0.30	0.24	0.28
6	1.46	1.53	1.43	1.23	1.41
9	3.02	3.34	3.08	2.41	2.96
12	4.9	5.32	5.42	4.07	4.93
15	7.09	7.46	7.21	7.09	7.21
18	8.31	8.48	8.16	7.99	8.24
21	9.01	9.13	8.96	8.71	8.95
24	10.55	10.78	10.73	10.45	10.63
27	12.63	13.18	12.87	12.51	12.80
average	7.82	8.16	7.89	7.31	

사. 공시균주 8194의 길이와 갯수 (노랑색) : 공시균주 8194를 배양한 A, B, C, D 그룹 중 A그룹의 평균 길이는 5.97 cm이고, 지름은 약 1.3 mm였으며, 약 260개의 자실체가 나왔다. B그룹의 평균 길이는 6.10 cm이고, 지름은 약 1.5 mm였으며, 약 320개의 자실체가 나왔다. C그룹의 평균 길이는 7.05 cm이고, 지름은 약 1 mm였으며, 약 264개의 자실체가 나왔다. D그룹의 평균 길이는 7.52 cm이고, 지름은 약 1.4 mm였으며, 약 385개의 자실체가 나왔다. E그룹의 평균 길이는 7.93 cm이고, 지름은 약 1.3 mm였으며, 약 360개의 자실체가 나왔다.

이것들의 평균은 6.9 cm 이었고 자실체수는 4,334개체수였다.

4. 결 과

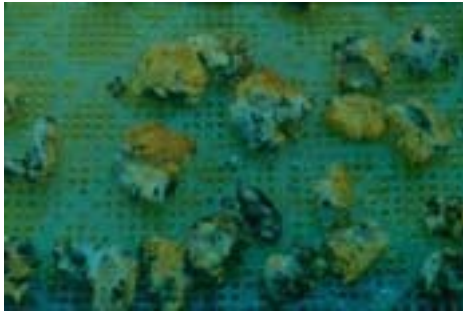
가. 판재배에 의한 것이 병재배에 의한 것보다 배양일수가 짧았으나 길이는 상대적으로 짧았다. 그러나 자실체의 숫자가 월등히 많아서 판재배가 전체 수확량은 많았다.

나. 판매배에 의한 동충하초의 종류는 동충하초(*Cordyceps militaris*)와 눈꽃동충하초(*Isaria japonica*)가 가능하다.

Table 3. Length and No. of strain 8194

단위(cm)

group	length	number
A	3.9	260
B	4.25	320
C	3.15	264
D	3.8	385
E	3.7	360
total	3.76	318



Cordyceps 8194



Cordyceps 8194



Isaria 8204



Isaria 8204

제7절 동충하초의 성분 분석 실험

1. 단백질 정량 및 아미노산 분석

조단백질 분석은 micro-Kjedahl법으로 실시 후 질소계수 5.7로 계산하였다. 아미노산 분석은 Biding-meyer등의 방법에 의해 일정량의 시료를 6C-HCl 용액과 혼합하여 질소충전 후 110℃에서 24시간 동안 가수분해한 후 50 ml로 정용하고 이를 0.45 μ m membran filter로 여과하여 24 μ l를 취하여 진공건조 하였다. 건조된 시료에 methanol : triethylamine(2 : 2 : 1)용액에 30 μ l를 첨가하여 2차 건조하여 이것에 유도체 시약(methanol : water : triethylamine : phenyl isothiocyanate = 7 : 1 : 1 : 1)을 30 μ l 가하여 20분간 방치한 후 3차 건조하였다.

Methanol 30 μ l를 첨가하여 다시 건조하고 Sodium acetate buffer(PH 6.4)로 재용해하여 HPLC로 분석하였다. 분석조건은 Table 1과 같다.

Table 1. Equipment and Condition for HPLC

Equipment	Jasco PU-980 pump Jasco HG-980-30 High pressure gradient module Jasco 851-AS autosampler Jasco UV-975 UV/VIS detector Jasco 807-IT integrator Colnmn oven(40℃)
Column	Water pico-tag column(3.9×150nm, 4 μ m)
UV range	254nm
Mobile phase	Eluent A : 0.14M sodium acetate trihydrate 0.05% triethylamine IL HPLC grade water Eluent B : 60% acetonitrile

2. 동충하초의 성분

동충하초의 성분은 채취된 지역에 따라 약간의 차이는 있으나 동충하초

(*Cordyceps militaris*)의 아미노산 함량분석은 다음과 같다.

Table 2. Compounds of amino acid

Arg	0.479%	Phe	0.479%
Val	1.634%	Pro	1.465%
Cys	0.333%	Met	0.543%
Ile	5.529%	His	0.680%
Tyr	0.384%	Leu	2.821%
Thr	1.715%	Ala	2.698%
Gly	1.886%	Ser	1.424%
Lys	2.114%	Asp	3.449%
Glu	4.172%	NH3	0.527%

제8절 결 론

1. 동충하초 채집

가. 동충하초류(*Cordyceps*) : 52개 채집

- 1) 동충하초 *Cordyceps militaris* = 99-0007, 6712, 8194, 6996, 7051, 7206, 7207, 7208, 7209, 7377
- 2) 매미동충하초 *Cordyceps sobolifera* = 99-0008
- 3) 칸자스동충하초 *Cordyceps kanzashiana* = 99-0009
- 4) 흰동충하초 *Cordyceps militaris* f. *albino* Kobayasi et Shimizu = 6715
- 5) 벌동충하초 *Cordyceps sphecocephala* Kobayasi et Shimizu = 7062, 7066, 7074, 7115
- 6) 홍두깨동충하초 *Cordyceps yakushimensis* Kobayasi et Shimizu = 7018
- 7) 망망이동충하초 *Cordyceps clavata* Kobayasi et Shimizu
- 8) 붉은곤봉동충하초 *Cordyceps ampullacea* Kobayasi et Shimizu
- 9) 가는유충동충하초 *Cordyceps gracilioides* Kobayasi et Shimizu = 6716, 6717
- 10) 썩어나방동충하초 *Cordyceps coecidiocapitate* = 7022
- 11) 노린재동충하초 *Cordyceps nutans* Pat. = 6712, 6784, 7039, 7040, 7061, 7073, 7113, 7116, 7316,
- 12) 동충하초 *Cordyceps* sp. = 99-0006, 6047, 7059, 7060, 7063, 7064, 7065, 7067, 7068, 7069, 7070, 7072, 7107, 7110, 7111, 7210
- 13) *Cordyceps juzumino-gayadoritake* = 6672
- 14) *Cordyceps purinosa* = 7108, 7347, 7396

나. 눈꽃동충하초류(*Isaria*) : 22개 채집

- 1) 눈꽃동충하초 *Isaria japonica* = 99-0001, 99-0002, 99-0003, 7109, M-001, 8204, 6713, 6714, 6718, 6718-1, 7109, 7177, 7321, 7348, 7395
- 2) 흰가루눈꽃동충하초 *Isaria sinclairii* (Berk.) Lyoyd

- 3) *Isaria takamizusanensis* Kobayasi
- 4) 가루눈꽃동충하초 *Isaria farinosa* (Holm.)Fr.
- 5) *Isaria* sp. = 7175, 7176, 7211, 7321-1

다. 불완전 균류 : 1개 채집

- 1) 노린재동충하초덧붙이 *Hirsutella nutans* Kobayasi

라. 백강균류 : 1개 채집

- 1) 백강균 *Beauveria bassiana*

마. 한국산 미기록종 : 4종류

흰동충하초 *Cordyceps militaris* f. albino

방망이동충하초 *Cordyceps clavata* Kobayasi et Shimizu

홍두깨동충하초 *Cordyceps yakushimensis* Kobayasi et Shimizu

흰가루눈꽃동충하초 *Isaria sinclairii*

2. 우수균주 선발

가. 동충하초 표본 수 : *Cordyceps*류 43개, *Isaria* 30개, *Hirustella* 2개, 백강균 2개.

나. 분리된 균주 : *Cordyceps* 류 30개, *Isaria* 5개

다. 자실체 발생이 우수한 균주

- 1) 동충하초 *Cordyceps*

Cordyceps militaris : 7개(99-0007, CHO-7410, 6047, 6712, 7072, 7209, 7110)

Cordyceps sobolifera : 1개(99-0008)

Cordyceps kanzashina : 1개(99-0009)

2) 눈꽃동충하초 *Isaria*

Isaria japonica : 8개 (99-0001, 99-0002, 99-0003, CHO-6713, CHO-7413, 7109, M-001, 7211)

라. 문제점보완실험은 동충하초 (*Cordyceps militaris* = 6047)와 눈꽃동충하초 (*Isaria* = 7109)는 자실체 발생에 이상이 없었다.

마. 중국산 동충하초 (*Cordyceps militaris* = C-001)도 한국산 동충하초와 배양 조건은 같았고 다만 끝이 가늘었다.

3. 동충하초 비교실험

가. 눈꽃동충하초(*Isaria japonica*=6540)의 산소공급에 따른 병마개 개방형과 밀폐형 실험에서 개방형은 포자채취에 좋았고 밀폐형은 상품성으로 좋았다.

나. 매미동충하초 (*Cordyceps sobolifera* = 6233 (99-008))는 자실체 발생은 400 Lux가 최적이었다. 광도에 따라서 자실체의 생육기간, 초기자실체 발생기간과 그리고 균사의 색이 자실체의 색에 영향을 미친다.

4. 대 량 재 배

가. 판재배에 의한 것이 병재배에 의한 것보다 배양일수도 짧았지만 길이도 상대적으로 짧았다. 그러나 자실체의 숫자가 월등히 많아서 판재배가 전체 수확량은 많았다.

나. 판재배에 의한 동충하초의 종류는 동충하초(*Cordyceps militaris*)와 눈꽃동충하초(*Isaria japonica*)가 모두 가능하다.

5. 동충하초의 성분 분석

1. 동충하초의 성분은 채집된 지역에 따라 약간의 차이는 있었다.

2. 동충하초(*Cordyceps militaris*)의 아미노산 함량분석은 많이 함유한 것부터 Ile, Glu, Asp, Leu, Ala, Lys, Gly, Thr, Val, Pro, Ser, His, Met, NH₃, Phe, Arg, Tyr, Cys 순으로 나타났다.

참 고 문 헌

1. 조덕현, 임용규, 이재일, 1998. 암에 도전하는 동충하초, 진솔
2. 임용규, 1997, 아가리쿠스버섯, 서일
3. 조세현. 2000. 건강장수 누에 동충하초, 도서출판 신일상사. PP. 76~102.
4. Basith, M. and Madelin, M. F. 1968. Studies on the Production of Perithecial Stroma by *Cordyceps militaris* in Artificial Culture. *Can, J, Bot.* 46: 473~480
5. 이희덕, 김용균, 김홍규, 이가순. 1999. 눈꽃 동충하초 배지별 인공 재배법과 성분분석에 관한 연구. 자원식물학회지 제 12권 제 2호 PP. 102~106.
6. 성재모, 최영상, 이현경, 김상희, 김용욱, 성기호, 1999b. 분리된 동충하초균주를 이용한 자실체 생산. 한국균학회지 27(1): 15~19.
7. 최인영, 최정식, 이왕휴. 1999a, *Paecilomyces japonica*의 인공 자실체 생산. 한국균학회지 27(2): 87~93.
8. 최인영, 최정식, 이왕휴, 유영진, 정기태, 주인옥, 최영근. 1999b. *Cordyceps militaris*의 인공 자실체 형성조건. 한국균학회지 27(4): 243~248.
9. 清水大典. 1994. 原色 冬蟲夏草 圖鑑. 誠文堂新光社