

노린재동충하초의 배양 최적화 및 NO 생성 저해 효과

이기만 · 이금선 · 남성희¹ · 임성실² · 강태진*

삼육대학교 약학대학 및 만성병연구소, ¹농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부, ²충북대학교 약학대학

Optimization for Mycelial Growth and Inhibitory Effect on Nitric Oxide Production of *Cordyceps nutans* Pat.

Ki Man Lee, Geum Seon Lee, Sung Hee Nam¹, Sung Cil Lim² and Tae Jin Kang*

College of Pharmacy and Institute of Chronic Disease, Sahmyook University, Seoul 139-742, Korea

¹Department of Agricultural Biology, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

²College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

ABSTRACT: *Cordyceps* (vegetable wasp and plant worm), an entomopathogenic fungi, has been used as a herbal medicine in Asian countries since ancient times. *Cordyceps nutans* is common but there is little research on this species. This study investigated the optimal culture conditions of *C. nutans* and the inhibitory effect on nitric oxide (NO) production in RAW 264.7 cell treated culture broth. The optimal conditions for the mycelial growth were 25°C and pH 7.0-8.0. Mycelial growth was highest on mushroom complete medium (MCM), V8 juice agar (V8A), and yeast malt dextrose (YMD) medium. Mycelial growth on mushroom minimal medium (MMM) did not occur, so nutrient source was essential. Dextrose and sucrose as carbon sources, and ammonium citrate as a nitrogen source were satisfactory for mycelial growth. Cytotoxicity of *C. nutans* culture broth was not found in RAW 264.7 cells. *C. nutans* culture broth suppressed NO production of lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 cell in a dose-dependent manner. Thus, our results provided the optimal conditions for cultivation of *C. nutans* and showed that *C. nutans* may have excellent physiological activities.

Key words: Mycelial growth, *Cordyceps nutans*, Cultivation, Cytotoxicity, Nitric oxide

초록: 동충하초는 예로부터 아시아권에서 한방약재로 사용되어 온 곤충병원성진균이다. 이 중 노린재동충하초(*Cordyceps nutans*)는 자연 상태에서 비교적 많이 발견되나 이에 대한 연구가 미미한 편이다. 따라서 본 실험에서는 *C. nutans* 균사체의 최적 배양 조건을 확립하고 배양액 처리 시 대식세포의 NO (nitric oxide) 생성 억제 효능을 조사하였다. 균사 생육 적정 온도는 25°C 이었으며 pH는 7.0~8.0 사이의 중성범위로 조사되었다. MCM (mushroom complete medium), V8A (V8 juice agar), YMD (yeast malt dextrose) 배지에서는 균사 생육이 우수하였으나 MMM (mushroom minimal medium) 배지의 경우 균사 생육이 이루어지지 않아 영양원이 필수적이었다. 영양원 선발에 있어 탄소원은 dextrose와 sucrose가 적합하였고 질소원은 ammonium citrate가 균사 생장에 적합하였다. RAW 264.7 세포에 대한 *C. nutans* 배양액의 세포 독성은 나타나지 않았으며 LPS (lipopolysaccharide)를 처리 한 세포의 NO 생성량은 농도 의존적으로 줄어들었다. 따라서 본 실험 결과는 *C. nutans* 배양 시 다량의 균사체를 확보할 수 있는 최적 조건을 제공할 뿐 아니라 *C. nutans*의 항염 관련 우수한 생리 활성이 있음을 보여준다.

검색어: 균사 생장, 노린재동충하초, 배양, 세포 독성, NO

일반적으로 동충하초(冬蟲夏草)라고 불리는 버섯은 겨울에는 벌레 상태로 있다가 여름에는 풀과 같이 나타난다고 하여 명칭이 붙여진 것이다. 즉, 곤충 외피에 동충하초의 분생포자가 부

착 후 침입하여 곤충을 죽이고 이를 영양분으로 증식하여 자실체를 형성시킨다. 이렇게 곤충을 숙주로 하여 성장하는 곰팡이를 곤충병원성진균(Entomopathogenic fungi)이라고 통칭한다(Ito and Hirano, 1997; Shah and Pell, 2003). 동충하초는 예로부터 중국, 한국, 일본 등 아시아에서 한방 약재로 이용하여 왔는데 원래 *Cordyceps sinensis*만을 지칭하는 것이었으며 서양에서는 vegetable wasp and plant worm이나 Cordyceps라고 불리어진

*Corresponding author: kangtj@syu.ac.kr

Received September 23 2011; Revised September 28 2011;

Accepted October 14 2011

다(Jianzhe *et al.*, 1989; Kneifel *et al.*, 1977; Kobayasi and Shimizu, 1983). 세계적으로는 약 100여 속 800여 종이 분포하는 것으로 알려지며 문헌에 기록된 종은 300여 종으로 국내에서는 70여 종만이 보고되고 있다(Kobayasi and Shimizu, 1983; Samson *et al.*, 1988; Sung *et al.*, 1997). 자낭균문(Ascomycota)의 *Cordyceps*속, *Shimzuomyces*속, *Torrubiella*속 등의 3속과 불완전균문(Deuteromycota)의 *Paecilomyces*속, *Hirsutella*속, *Isaria*속, *Beuveria*속, *Metarhizium*속 등이 동충하초에 포함되는데 불완전균문의 대부분이 *Cordyceps*속의 불완전세대로 알려져 있다(Kobayasi, 1982; Samson *et al.*, 1988).

중국 고서에서는 동충하초는 암을 비롯하여 간질환, 폐질환 등에 효과가 뛰어나며 만성 빈혈, 허약 체질 등도 치료한다고 보고되었다. 동충하초에 관한 연구로는 *C. sinensis*에 대하여 가장 활발히 진행 중인데, 이 종은 박쥐나방 유충을 기주로 하여 자실체를 형성하고 고산지역에만 서식하는 특징을 가지며 항암효과 등 다양한 생리활성을 나타내는 nucleoside 유도체인 cordycepin의 이화학적 특성이 구명되었다(Hubbel *et al.*, 1985). 또한 면역증강 및 부신피로젠 분비를 촉진시키는 작용이 보고되고 있다(Zhu *et al.*, 1998). *C. sinensis* 이 외에도 약용으로 사용되는 *Cordyceps*속 동충하초로는 *C. militaris*, *C. martialis*, *C. ophioglossoides*, *C. sobolifera* 등이 있는데, *C. sinensis*와 성분이 비슷하고 재배가 용이한 *C. militaris*에 관한 연구가 가장 활발히 진행 중이다(Sung *et al.*, 2002; Ju *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009). 이 외에도 동충하초의 혈당강하 효능, 항산화 작용, 항균 활성 등이 보고되고 있으며 우리나라에서는 누에동충하초 또는 눈꽃동충하초로 불리는 *P. tenuipes* (*I. japonica*)와 변태기동충하초로 불리는 *C. militaris*가 식품의 원료로 등재되어 있어 수요

가 계속 증가할 것으로 예상된다(Heo *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008; Shim *et al.*, 2000).

이렇듯 기능성 소재로서 동충하초에 관한 연구는 급증하고 있는 추세이지만 자연적으로 존재하는 동충하초는 채집과 동정이 용이하지 못하다. 따라서 채집된 동충하초를 이용하여 이를 순수 분리 후 보존하며 그 특성을 연구하는 것은 매우 중요하다. 본 연구에서는 동충하초 중 비교적 연구가 미미한 노린재동충하초(*C. nutans*) 균사체의 최적화된 배양적 특성 및 배양액을 통한 RAW 264.7 세포 상에서 NO (nitric oxide) 생성 억제 효과를 확인하여 기능성 소재로서 노린재 동충하초의 가능성을 알아보았다.

재료 및 방법

시험 균주 및 세포 배양

본 실험에 사용한 *C. nutans* J11는 충청북도 속리산에서 노린재목(Hemiptera)에 감염된 균을 채집하여 균 분리 후 보관한 농촌진흥청 잠사양봉소재과 보존주로 PDA(potato dextrose agar, Difco) 배지 상에 보존되었던 균주를 사용하였다(Fig. 1). 보존된 균주를 PDA 배지에 계대하여 암조건의 25°C에서 14일간 배양 후 4°C 항온기에 보관하며 실험에 사용하였다. 세포 독성 및 NO 생성 억제 효능 측정을 위하여 mouse의 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 사용하였다. 세포배양은 10% FBS (fetal bovine serum, Hyclone)와 1% P/S (penicillin-streptomycin, Sigma)를 포함하는 DMEM (dulbecco's modified eagle's medium, Hyclone) 배지를 사용하였으며 37°C의 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

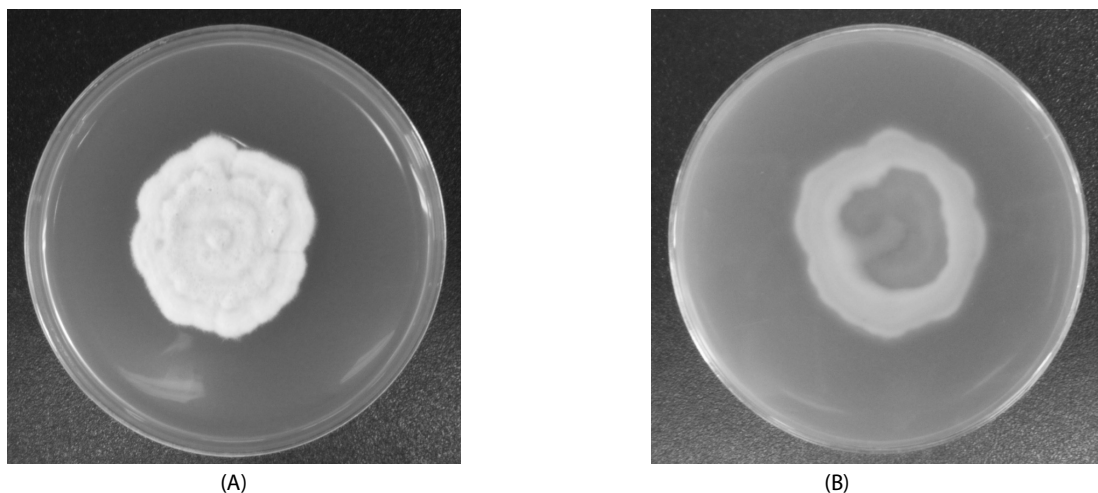


Fig. 1. Culture characteristics of *Cordyceps nutans* on PDA medium. (A) obverse of colony at 25°C for 14 days in dark conditions, (B) reverse.

Table 1. Composition of culture media

No.	Media ^a	Content (g/L)
1	CDA	Agar 20 g, FeSO ₄ 0.01 g, KCl 0.5 g, KH ₂ PO ₄ 1 g, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5 g, NaNO ₃ 2 g
2	LLA	Agar 20 g, Asparagine 2 g, KH ₂ PO ₄ 1 g, Maltose 9.5 g, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5 g
3	MCM	Agar 20 g, Dextrose 20 g, K ₂ HPO ₄ 1 g, KH ₂ PO ₄ 0.5 g, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5 g, Peptone 2 g, Yeast extract 2 g
4	MEM	Agar 20 g, Malt extract 20 g, Peptone 5 g
5	MMM	Agar 20 g, K ₂ HPO ₄ 1 g, KH ₂ PO ₄ 0.5 g, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5 g
6	MYP	Agar 20 g, Malt extract 30 g, Peptone 1 g, Yeast extract 2 g
7	PDA	Agar 20 g, Dextrose 20 g, Potato 200 g
8	SLA	Agar 20 g, Silkworm larva 24 g
9	V8A	Agar 20 g, V8 juice 180 ml
10	YMA	Agar 20 g, Dextrose 1 g, Malt extract 3 g, Peptone 5 g, Yeast extract 3 g
11	YMD	Agar 20 g, Dextrose 4 g, Malt extract 10 g, Yeast extract 4 g
12	YPD	Agar 20 g, Dextrose 20 g, Peptone 20 g, Yeast extract 10 g

^aCDA, czapek dox agar; LLA, lilly agar; MCM, mushroom complete medium; MEM, malt extract medium; MMM, mushroom minimal medium; MYP, malt yeast peptone; PDA, potato dextrose agar; SLA, silkworm larva agar; V8A, V8 juice agar; YMA, yeast malt agar; YMD, yeast malt dextrose; YPD, yeast peptone dextrose.

온도, pH 및 배지 조건

균사 생장에 적합한 온도 선발을 위하여 PDA 배지를 121°C에서 20분간 멸균 후 petri dish에 20 ml씩 만들어 조제하였다. 시험 균주를 5 mm cork borer를 이용하여 균사 선단 부분을 떼어내어 배지의 가운데 부분에 접종하였다. 시험 균주가 접종된 배지를 5°C 간격(15, 20, 25, 30, 35°C)으로 조절된 배양기에 14일간 배양 후 균사 성장 정도를 colony 직경으로 측정하였다. 또한, 균사 생장에 적합한 pH 선발을 위하여 PDA 배지에 1N HCl과 1N NaOH를 이용하여 초기 pH를 5, 6, 7, 8, 9, 10으로 각각 조절한 다음 고압 멸균 후 petri dish에 배지를 조제하였다. 이후 시험 균주를 접종하여 25°C에서 14일간 정치 배양하고 colony 직경을 측정하여 균사 생육 정도를 알아보았다. 균사 생장에 적합한 배지 선발을 위하여 Table 1과 같이 12종의 배지를 실험에 사용하였다. 각각의 배지는 121°C에서 20분간 고압 멸균하고 petri dish에 분주한 후 시험 균주의 균사 선단 부분을 5 mm cork borer를 사용하여 균총을 떼어내어 접종하였다. 접종균은 25°C 배양기에서 10일간 정치 배양한 후 colony 직경 및 균사 밀도를 측정하였다.

균주 영양원 선발

*C. nutans*의 균사 생육에 적합한 탄소원 선발 기본 배지는 KH₂PO₄ 1.0 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, KNO₃ 3.060 g, agar 20 g에 9가지 탄소원(dextrin, dextrose, fructose, galactose, glucose,

lactose, maltose, starch, sucrose)의 농도를 0.1 M로 동일하게 조절한 후 증류수 1 L에 용해시켰다. 또한 질소원 선발을 위한 기본 배지는 KH₂PO₄ 1.0 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, fructose 10 g, agar 20 g에 9가지 질소원(ammonium citrate, ammonium sulfate, ammonium tartrate, ammonium nitrate, asparagine, calcium nitrate, potassium nitrate, sodium nitrate, urea)의 농도를 0.02 M로 동일하게 조절한 후 증류수 1 L에 용해시켰다. 각각의 배지는 121°C에서 20분간 멸균 후 petri dish에 분주하여 제조하였고 시험 균주의 균사 선단 부분을 5 mm cork borer를 사용하여 균총을 떼어내어 접종 한 후 2주간 25°C 배양기에서 정치 배양하고 colony 직경 및 균사 밀도를 측정하였다.

Cytotoxicity 시험

*C. nutans*를 PDB (potato dextrose broth, Difco)배지에서 14일간 shaking 배양(25°C, 150 rpm)하고 배양액을 동결 건조 후 농도별로 증류수에 녹여 세포 독성 및 NO 생성 억제 실험에 사용하였다. 세포 독성 시험을 위해 96 well plate에 RAW 264.7 세포를 5×10⁴ cells/well가 되도록 200 µl씩 분주하고 24시간 배양하였다. 이후 동결 건조된 *C. nutans* 배양액이 농도별(0, 12.5, 25, 50, 100, 200 µg/ml)로 들어있는 새로운 배지로 교체하여 24시간 배양 후 상등액을 제거하고 5 mg/ml 농도의 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) solution 100 µl을 각각 첨가하였다. 이를 CO₂ 배양기 (5%, 37°C)에서 4시간 반응시킨 후 상등액을 제거하고 DMSO

(dimethyl sulfoxide) 100 μ l를 넣어 반응을 정지시켜 생성된 formazan을 용해시킨 뒤 540 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율(% of control)로 계산하였다.

NO 생성 억제

NO 생성량 억제 효과 측정을 위해 12 well plate에 RAW 264.7 세포를 1×10^6 cells/well이 되도록 1 ml씩 분주하고 24시간 배양하였다. 이후 LPS (lipopolysaccharide)가 100 ng/ml로 첨가된 배지와 첨가되지 않은 배지로 각각 교체하여 1시간 배양하고 동결 건조된 *C. nutans* 배양액을 농도별(0, 12.5, 25, 50, 100, 200 μ g/ml)로 처리한 후 24시간 배양하였다. 배양된 상등액 50 μ l에 5% H_3PO_4 가 포함된 1% sulfanilamide 50 μ l을 넣고 암실에서 5분간 반응시킨 후 0.1% NED (N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride)를 첨가하여 다시 암실에서 5분간 반응시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO의 농도는 $NaNO_2$ 를 사용하여 표준곡선을 작성한 후 나타내었다.

결과

배양 특성

15 $^{\circ}C$ 부터 35 $^{\circ}C$ 까지 5 $^{\circ}C$ 간격으로 조절된 6종류의 배양기에 접종균을 배양한 결과 *C. nutans*의 균사 생장은 25 $^{\circ}C$ 에서 가장 우수하였으며 35 $^{\circ}C$ 의 경우 균사체가 전혀 성장하지 못하였다 (Fig. 2). *C. nutans*의 균사 생장에 적합한 pH 조건을 조사하기 위하여 PDA 배지를 pH 5 ~ 10까지 조절하여 시험 균주를 접종 후 배양한 결과 대부분의 pH 조건하에서 균사 생육은 양호하였고 중성 부근의 pH에서 균사 생장이 특히 우수하였다(Fig. 3).

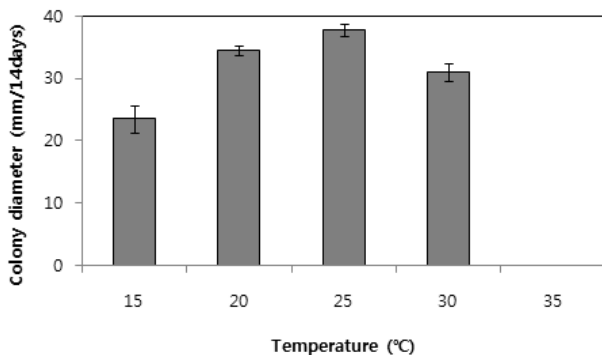


Fig. 2. Effect of different temperatures on mycelial growth of *Cordyceps nutans* on PDA medium for 14 days in dark conditions.

12종의 배지(Table 1)를 이용하여 시험 균주를 접종 후 colony 직경 및 균사 밀도를 측정된 결과는 Table 2와 같이 나타났다. *C. nutans*의 colony 직경은 MEM (malt extract medium) 배지와 YPD (yeast peptone dextrose) 배지에서 가장 우수하였으나 균사 밀도는 비교적 좋지 못하였다. 균사 밀도 고려 시 MCM (mushrom complete medium) 배지가 가장 우수하였고 V8A (V8 juice agar), YMD (yeast malt dextrose) 배지도 양호한 것으로 나타났으며 MMM (minimal minimal medium) 배지에서는 균사 생육이 전혀 이루어지지 않았다. 균사체의 모양은 배지에 따라 원형 이외에 불규칙한 모양이 나오는 특징을 보였다. 9종의 탄소원을 이용하여 측정된 *C. nutans*의 적정 탄소원 선발 실험 결과 colony 직경은 dextrin과 lactose가 가장 우수하였으나 균사 밀도 고려 시 dextrose와 sucrose가 *C. nutans*의 생장에 적합한 탄소원으로 나타났으며 fructose, galactose 및 starch는 균사 생장에 적합하지 않았다(Table 3). 질소원 선발은 ammonium nitrate와 urea에서 colony 직경은 우수하였으나 매우 저조한 균사 밀도를 나타내어 *C. nutans* 균사 생장의 질소원으로 적합하지 않았다(Table 4). 반면에 ammonium citrate가 colony 직경 및 균사 밀도에서 가장 적합하였으며 asparagine과 potassium nitrate에서도 비교적 좋은 균사 생장을 확인하였다.

세포 독성 및 NO 생성

동결 건조된 *C. nutans*의 배양액을 최종 농도가 12.5 ~ 200 μ g/ml 이 되도록 조절하여 RAW 264.7 세포에 대한 독성을 측정할 결과 모든 농도에서 세포 독성이 나타나지 않았고 세포 생존율은 약간 증가하는 경향이 나타났다(Fig. 4). RAW 264.7 세포를 이용하여 NO 생성 저해 효과를 측정된 결과 세포에 LPS를 처리 후 *C. nutans* 배양액을 처치하였을 때 RAW 264.7 세포가 분비하

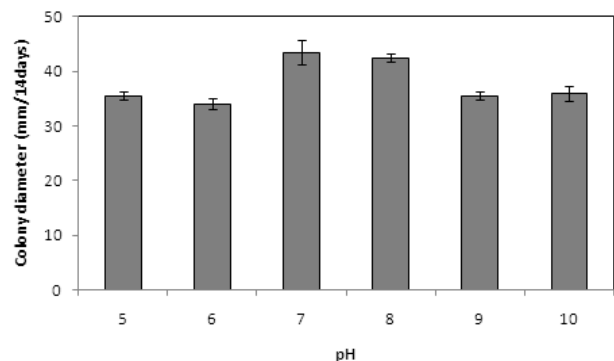


Fig. 3. Effect of different pH on mycelial growth of *Cordyceps nutans* on PDA medium at 25 $^{\circ}C$ for 14 days in dark conditions. The pH of PDA medium was adjusted to 5 to 10 with 1N HCl or 1N NaOH.

Table 2. Effect of different media on mycelial growth of *Cordyceps nutans* under dark conditions at 25°C for 10 days

Media ^a	Colony diameter (mm)	Mycelial density	Surface form
CDA	56.0±3.61	Moderate	Irregular
LLA	51.7±1.53	Moderate	Circle
MCM	73.0±2.65	Compact	Irregular
MEM	87.0±0.00	Moderate	Circle
MMM	- ^b	-	-
MYP	47.7±1.53	Compact	Irregular
PDA	35.7±2.08	Compact	Circle
SLA	51.0±2.00	Thin	Circle
V8A	65.7±3.21	Compact	Irregular
YMA	65.0±1.00	Thin	Circle
YMD	63.7±1.15	Compact	Irregular
YPD	87.0±0.00	Thin	Circle

^aCDA, czapek dox agar; LLA, lilly agar; MCM, mushroom complete medium; MEM, malt extract medium; MMM, mushroom minimal medium; MYP, malt yeast peptone; PDA, potato dextrose agar; SLA, silkworm larva agar; V8A, V8 juice agar; YMA, yeast malt agar; YMD, yeast malt dextrose; YPD, yeast peptone dextrose.

^bNo growth.

Table 3. Effect of carbon sources on mycelial growth of *Cordyceps nutans* on basal medium under dark conditions at 25°C for 14 days

Carbon source ^a	Colony diameter (mm)	Mycelial density
Dextrin	35.7±1.15	Moderate
Dextrose	29.3±1.53	Compact
Fructose	20.7±0.58	Compact
Galactose	19.0±1.73	Compact
Glucose	24.0±1.73	Compact
Lactose	30.3±1.53	Moderate
Maltose	23.0±1.73	Compact
Starch	20.7±1.15	Compact
Sucrose	27.7±1.53	Compact

^aEach carbon source was added to the basal media at the concentration of 0.1 M per liter and basal medium was KH₂PO₄ 1.0 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, KNO₃ 3.060 g, agar 20 g, and DW 1,000 ml.

Table 4. Effect of nitrogen sources on mycelial growth of *Cordyceps nutans* on basal medium under dark conditions at 25°C for 14 days

Nitrogen source ^a	Colony diameter (mm)	Mycelial density
Ammonium citrate	46.0±1.41	Compact
Ammonium nitrate	64.0±1.41	Thin
Ammonium sulfate	52.5±0.71	Moderate
Ammonium tartrate	28.5±0.71	Moderate
Asparagine	36.5±2.12	Compact
Calcium nitrate	22.5±2.12	Compact
Potassium nitrate	31.0±1.41	Compact
Sodium nitrate	26.5±4.95	Compact
Urea	56.5±2.12	Thin

^aEach nitrogen source was added to the basal media at the concentration of 0.02 M per liter and basal medium was KH₂PO₄ 1.0 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, fructose 10 g, agar 20 g, and DW 1,000 ml.

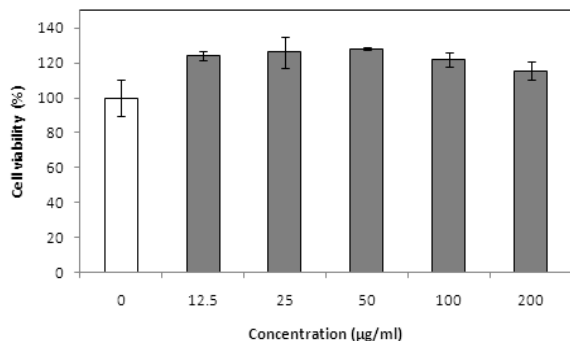


Fig. 4. Effect of different concentrations of *Cordyceps nutans* on RAW 264.7 cell viability. RAW 264.7 cells were treated with 12.5 to 200 µg/ml of *C. nutans* culture broth for 24 h.

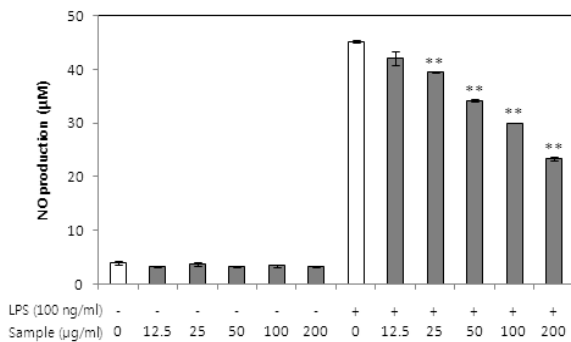


Fig. 5. Inhibitory effect of different concentrations of *Cordyceps nutans* on NO production in RAW 264.7 cell. RAW 264.7 cells were treated with 12.5 to 200 µg/ml of *C. nutans* culture broth. ** $p < 0.01$ versus LPS alone based on Student's t-test.

는 NO 생성량이 *C. nutans* 배양액 농도 의존적으로 감소하였다 (Fig. 5). 반면에 LPS를 처리하지 않았을 경우에는 NO 생성이 거의 나타나지 않아 *C. nutans*가 NO 생성 자체를 유도하지 않는 것으로 나타났다.

고찰

동충하초는 곤충병원성진균으로서 국내에는 약 70여 종이 보고되는데 이 중 본 연구에서는 *C. nutans*의 균사체 최적 배양 조건을 구명하고자 하였다. *C. nutans*는 자낭균문의 핵균강 (Pyrenomycetes), 육좌균목(Hypocreales), 맥각균과(Clavicipitaceae), *Cordyceps*속에 속하고 노린재의 죽은 성충에서 발견되며 분류학적으로 불완전세대의 *H. nutans*와는 구별된다(Hywel-Jones, 1995; Samson et al., 1988). *C. nutans*는 균사 상태보다는 포자 형태로 자라는 특성으로 인해 노린재가 존재하는 자연 상태에서 비교적 쉽게 발견되나 작은 크기로 인해 채집이 용이하지 않다(Sung et al., 1993). 또한 균주에 따라 두부를 형성하지 않고 붉은색의 가는 비늘 형태로 퇴화되는 경우도 있으며 발생 도중

자실체가 잘려 휴면 후 새로운 자실체를 형성하기도 한다 (Shimizu, 1994). 따라서 *C. nutans* 대량 확보를 위하여 *C. nutans*를 채집 후 이를 보존하기 위한 연구가 보고된다(Sasaki et al., 2004). 하지만 균의 배양적, 생리적 특성에 대한 연구는 미흡한 편이므로 본 실험을 실시하였다.

균사 생육 적정 온도에 있어 *C. nutans*는 온도가 높아질수록 균사 생육이 우수하였으며 가장 우수하였던 온도 조건은 25°C로 나타났다. 한편, 25°C보다 높은 온도에서는 균사 생장이 점차 줄어들어 35°C에서는 균사체가 전혀 생장하지 못하였다. 일반적으로 버섯류가 발생하는 자연적인 조건이 음지의 다소 서늘한 곳인데 본 실험 결과 *C. nutans* 역시 고온의 조건보다는 25°C 내외의 서늘한 온도 조건을 선호하였다. pH 범위에 있어 *C. nutans*는 pH 7과 8 내외의 중성 범위에서 균사 생장이 가장 우수하였는데 이는 *C. militaris*와 *C. pruinosa*에서 조사된 중성 부근의 pH의 균사 최적 조건과 유사한 결과였다(Sung et al., 2002; Shin et al., 2004). 그러나 중성 이외 범위의 pH에서도 균사 생육은 양호한 편이었으므로 pH는 *C. nutans* 생장에 큰 영향이 없을 것으로 판단된다. 배지 선발에 있어 MCM, V8A, YMD 배지에서 균사 생육이 우수하였는데 MCM 배지의 경우 대부분의 동충하초에서 균사 생장이 우수한 것으로 보고되었다(Lee et al., 2000; Lee et al., 2008). Nam et al. (2001)은 누에분말을 이용한 곤충병원성진균의 배지로서 SLA (silkworm larva agar) 배지를 개발하였으나 본 실험 결과 *C. nutans*의 생육 배지로서는 적합하지 않았다. 한편, MMM 배지는 영양원이 결핍된 배지로서 균사 생육이 저조한 것으로 보아 동충하초 생장에는 각종 영양원이 필수적이었다. 따라서 *C. nutans*의 적정 영양원 선발 실험을 실시하였다. 영양원 선발에 있어 *C. nutans*의 적정 탄소원은 dextrose와 sucrose로 나타났는데 sucrose의 경우 다른 탄소원에 비하여 가격 면에서 유리하여 대량 실험 시 유용하게 사용될 것으로 보인다. 반면에 다당류에서는 비교적 균사 생육이 좋지 못하였는데 선행 보고에 따르면 동충하초 균사 생육에는 다당류가 비교적 우수하였다고 하여 본 실험과는 다소 차이가 있었다(Shin et al., 2004; Lee et al., 2008). 따라서 이는 *C. nutans*만의 생리적 특성이라고 판단된다. 질소원 선발에 있어 ammonium citrate가 *C. nutans*의 균사 생육에 가장 적합하였으며 urea와 ammonium nitrate는 기중 균사 밀도가 매우 저조하였다. Sung et al. (2002)은 *C. militaris* 생육에는 유기태 질소원이 우수하다고 보고하였고 Lee et al. (2000)은 *C. scarabiaeicola*의 생육에는 무기태 질소원이 우수하다고 보고하였으나 본 실험 결과 질소원은 동충하초의 종에 따라 선택적으로 사용해야 할 것으로 보인다. 또한, Shin et al. (2004)의 보고에 의하면 urea의 경우 *C. pruinosa* 균사 생육이 전혀 이루어지지 않아 본 실험과 유사한

결과를 나타냈다. 이상의 결과로 미루어 볼 때, *C. nutans* 균사체를 대량으로 확보하기 위해서는 MCM, V8A, YMD 배지 또는 탄소원인 dextrose와 sucrose 그리고 질소원인 ammonium citrate를 이용한 배지를 중성의 pH로 조절 후 25°C 범위 내에서 배양하면 좋을 것으로 판단된다.

염증은 살아있는 결합조직에서 볼 수 있는데 세포 손상을 일으키는 내, 외부의 자극을 치유하기 위한 생체 반응이며 발적(redness), 종창(swelling), 발열(fever), 통증(pain) 및 기능의 상실(loss of function) 등 5대 징후를 동반한다(Kumar *et al.*, 2007). 항원이 몸에 침입하면 가장 먼저 항원제시세포(APC, antigen-presenting cell)인 대식세포(macrophage), B-세포 및 수지상세포(dendritic cell)가 인식하고 염증 반응과 같은 각종 면역 반응을 유도한다(Kindt *et al.*, 2007). 염증 반응은 IL-1 (interleukin-1), IL-6, IL-8, TNF (tumor necrosis factor)와 같은 cytokine에 의해 조절되며 활성화된 iNOS (inducible nitric oxide synthase)와 같은 각종 전사인자들이 NO를 생성하여 염증을 일으킨다(Chang *et al.*, 2009; Hwang *et al.*, 2011; Sae-Wong *et al.*, 2011). 따라서 *C. nutans* 배양액에 대한 NO 생성 억제 정도를 측정하여 *C. nutans*의 생리 활성 가능성을 알아 보았다. 본 실험에서는 APC 중 하나인 mouse 대식세포 RAW 264.7을 이용하여 NO 생성량 변화를 측정하였다. 먼저, 동결 건조된 *C. nutans*의 배양액이 세포에 미치는 독성 여부를 확인하기 위하여 세포 독성 실험을 실시하였다. 본 실험에서 사용한 세포 독성 측정 방법은 mitochondrial dehydrogenase에 의하여 MTT가 formazan으로 전환되는 것을 측정하는 것으로 비교적 간단하게 세포 독성을 측정할 수 있다(Hwang *et al.*, 2011; Sae-Wong *et al.*, 2011). 실험 결과 RAW 264.7에 대하여 *C. nutans* 배양액은 농도에 관계없이 독성이 나타나지 않았으며 세포의 생존율을 약간 증가시켰다. 이는 *C. nutans* 배양액에 의하여 세포가 자극을 받아 세포수가 일시적으로 증가한 것으로 판단된다. 따라서 NO 생성 억제 효과 측정은 세포 독성이 나타나지 않았던 농도인 12.5~200 µg/ml 사이에서 실시하였다. NO 생성 억제 실험에서 사용된 LPS는 gram (-) 세균 외막의 주성분으로서 세포의 toll-유사 수용체 4(TLR 4, toll-like receptor 4)와 결합하여 세포는 활성화되며 cytokine의 생성과 각종 면역 반응이 나타나게 된다(Kindt *et al.*, 2007). 실험 결과 LPS로 RAW 264.7을 자극하고 *C. nutans* 배양액을 처치할 경우 배양액의 농도가 높아질수록 배양액을 처치하지 않은 군에 비하여 NO 생성량은 농도 의존적으로 현저하게 줄어드는 경향이 나타났다. 따라서 NO 생성을 억제하는 *C. nutans*의 특정 성분 분석이 추후 요구된다.

다른 동충하초에 비하여 자연 상태에서 비교적 많이 존재하

지만 이에 대한 연구가 미미한 *C. nutans*에 대하여 연구한 본 결과는 균사체 대량 생산을 통한 관련 연구에 도움을 줄 수 있을 것이며 급증하고 있는 추세인 기능성 소재 관련 연구에 많은 기여를 할 수 있을 것으로 판단된다.

사사

이 논문은 서울장학재단 하이서울장학금 지원을 받아 연구되었음.

Literature Cited

- Chang, L.P., Y.S. Lai, C.J. Wu and T.C. Chou. 2009. Liquid perfluorochemical inhibits inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide formation in lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 macrophages. *J. Pharmacol. Sci.* 111: 147-154.
- Heo, J.C., S.H. Nam, S.W. Kang, I.P. Hong, K.K. Lee, J.Y. Park, K.H. Kim, S.Y. Han and S.H. Lee. 2007. Comparison of antioxidant, anticancer and immunomodulating activities of extracts from *DongChungXiaCao*. *Kor. J. Food Preserv.* 14: 681-687.
- Hubbel, H.R., E.C. Pequignot, D.H. Willis, C. Lee and R.J. Suhadolnik. 1985. Differential antiproliferative actions of 2', 5' oligo a trimer core and its cordycepin analogue on human tumor cells. *Int. J. Cancer.* 36: 389-394.
- Hwang, P.A., S.Y. Chien, Y.L. Chan, M.K. Lu, C.H. Wu, Z.L. Kong and C.J. Wu. 2011. Inhibition of lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses by *Sargassum hemiphyllum* sulfated polysaccharide extract in RAW 264.7 macrophage cells. *J. Agric. Food Chem.* 59: 2062-2068.
- Hywel-Jones, N. 1995. Notes on *Cordyceps nutans* and its anamorph, a pathogen of hemipteran bugs in Thailand. *Mycol. Res.* 99: 724-726.
- Ito, Y. and T. Hirano. 1997. The determination of the partial 18S ribosomal DNA sequences of *Cordyceps* species. *Lett. Appl. Microbiol.* 25: 239-242.
- Jianzhe, Y., M. Xiaoloan, M. Qiming, Z. Yichen and W. Huaan. 1989. Icons of medicinal fungi from China. Science Press. China.
- Ju, X, Y. Sun, X. Cao, J. Jiang, T. Zhang and Y. Ito. 2009. Two-step purification of cordycepin from *Cordyceps militaris* by high-speed countercurrent chromatography. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 32: 2417-2423.
- Kindt, T.J., R.A. Goldsby and B.A. Osborne. 2007. *Kuby immunology*. 6th ed., 14 pp. W.H. Freeman. United States.
- Kneifel, H., W.A. Konig, W. Loeffler and R. Muller. 1977. Ophiocordin, an antifungal antibiotics of *Cordyceps ophioglossoides*. *Arch. Microbiol.* 113: 121-130.
- Kobayasi, Y. 1982. Keys to the taxa of the genera *Cordyceps* and

- Torrubiella*. Trans. Myco. Soc. Jpn. 23: 329-364.
- Kobayasi, Y. and D. Shimizu. 1983. Iconography of vegetable wasps and plant worms. Hoikusha Publishing Company Ltd. Osaka. Japan.
- Kumar, V., A.K. Abbas, N. Fausto and R.N. Michell. 2007. Robbins basic pathology. 8th ed. Elsevier Inc. England.
- Lee, J.K., Y.S. Choi and J.M. Sung. 2000. Investigation on cultural characteristics of mycelial growth by *Cordyceps scarabaeicola*. Kor. J. Mycol. 28: 81-87.
- Lee, K.M., I.P. Hong, S.H. Nam, G.B. Sung and Y.H. Bae. 2008. The cultural characteristics and antibacterial activities of *Cordyceps militaris* and *Paecilomyces tenuipes*. Kor. J. Appl. Entomol. 47: 479-486.
- Nam, S.H., I.Y. Jung, S.D. Ji and S.Y. Cho. 2001. The medium development for entomopathogenic fungi by using silkworm powder. Kor. J. Seric. Sci. 43: 83-87.
- Park, B.T., K.H. Na, E.C. Jung, J.W. Park and H.H. Kim. 2009. Antifungal and anticancer activities of a protein from the mushroom *Cordyceps militaris*. Kor. J. Physiol. Pharmacol. 13: 49-54.
- Sae-Wong, C., H. Matsuda, S. Tewtrakul, P. Tansakul, S. Nakamura, Y. Nomura and M. Yoshikawa. 2011. Suppressive effects of methoxyflavonoids isolated from *Kaempferia parviflora* on inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in RAW 264.7 cells. J. Ethnopharmacol. 136: 488-495.
- Samson, R.A., H.C. Evans and J.P. Latge. 1988. Atlas of entomopathogenic fungi. Springer. Heidelberg.
- Sasaki, F., T. Miyamoto, Y. Tamai and T. Yajima. 2004. Isolation of vegetable wasps and plant worms, *Cordyceps nutans*, from fruit-body tissue. J. Invertebr. Pathol. 85: 70-73.
- Shah, P.A. and J.K. Pell. 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. Appl. Microbiol. Biotechnol. 61: 413-423.
- Shim, S.M., Y.S. Lee, S.S. Lim, K.H. Shin, J.E. Hyun, S.Y. Kim and E.B. Lee. 2000. Pharmacological activities of *Paecilomyces japonica*, a new type *Cordyceps* sp. Kor. J. Pharmacogn. 31: 163-167.
- Shimizu, D. 1994. Color iconography of vegetables wasps and plant worms. Seibundo Shinkosa. Japan.
- Shin, J.C., S. Bhushan, W.H. Lee, Y.J. Park, S.Y. Kim, G.R. Jeong, H.K. Kim, T.W. Kim and J.M. Sung. 2004. Distribution and favorable conditions for mycelial growth of *Cordyceps pruinosa* in Korea. Kor. J. Mycol. 32: 79-88.