

동충하초의 생리활성 기능

이준우

경북전문대학, 식품가공과

서 론

동충하초는 접합균강의 Entomophthorales목, 자낭균강의 Clavicipitales목, Laboulbeniales목, 불완전균강의 Moniliales목에 포함되며, 전세계에 800여종 우리나라에는 70여종이 알려지고 있고(Sung 등, 1998), 겨울에는 벌레(蟲)상태로 있다가 여름이 되면 버섯(草)이 된다는 뜻에서 유래되었으며, 서양에서는 plant worms and vegetable wasps 또는 *Cordyceps*로 불린다. 동충하초 균주는 누에, 번데기, 벌, 잠자리, 풍뎅이, 노린재 및 그들의 유충 등 기주에 따라 명명되고 있으나, 기주 특이성이 낮아 균주에 따라 여러 가지 기주에서 자실체 발생을 잘한다. 중국에서는 예로부터 동충하초가 불로장생, 강정강상약 뿐만 아니라 결핵, 황달의 치료, 아편중독의 해독제, 결핵균 및 폐렴균의 억제, 진균억제, 기관지 확장작용, 평활근억제, 혈압강하 등의 약리작용과 임상적으로는 허약증상, 만성기관지염, 거담과 천식, 각혈, 폐결핵, 빈혈, 양기부족 및 병후 허약에 유효한 것으로 알려졌다(진존인, 1982). 전통적인 약용으로 사용되고 있는 동충하초는 *Cordyceps sinensis*이며, *C. militaris*, *C. sobolifera*, *C. ophioglossoides*, *C. martilis*, *C. hawkesii* 및 *Beauveria bassiana* 등의 7가지가 알려져 있다. 최근에는 *Cordyceps cicade*와 *C. ophioglossoides*로부터 추출한 polysaccharides의 항암활성에 관한 보고가 있었으며(Kojino 등, 1996), *C. militaris*에서 분리된 cordycepin (3'-deoxyadenosin)이 m-RNA의 합성저해 작용과 항암, 항진균 및 항균 효과가 있는 것으로 알려졌다. 현재 우리나라에서는 누에동충하초가 유일하게 식품원료로 사용허가(1998. 7. 10)가 되어있는 상태이며, 민간에서는 이 균을 번데기에서 자실체 발생한 제품이 상당한 고가로 거래되고 있는 실정

이다. 동충하초 균사의 배양은 일반적인 담자균류 배지에서 배양이 잘되며, 자실체 형성은 누에동충하초(*Paecilomyces japonica*)에서 잘되는 것으로 알려져있다. 본 연구에서는 식품소재로서의 기능성을 알아보기 위해, 동충하초 균사의 배양적 특성, 약리활성 및 자실체 형성에 관한 내용을 소개하고자 한다.

방법 및 재료

균주의 분리 및 배양

본 실험에 사용된 *Cordyceps* sp. IY909 균주는 국내에서 자생하는 자실체로부터 균사를 분리하였으며, 자실체 형성을 위한 균주는 *Paecilomyces japonica*를 이용하였다. 액체배양에는 50g의 glucose, 20g의 peptone, 0.87g의 KH_2PO_4 , 0.5g의 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 과 20ml의 basal medium을 가해 1리터로 조정된 합성배지(pH 4.5)를 사용하여 25°C에서 5일 동안 진탕 배양하였다. Basal medium은 0.5% $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.36% $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.3% ZnCl_2 및 0.05% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 로 조성되었다 대량 배양은 배양용 배지 3리터가 들어있는 발효조에 5%의 종균을 접종하고 교반속도를 150rpm, 통기량을 0.2vvm으로 조정한 후 25°C에서 7일간 배양하였다.

다당류 분획의 조제

배양물을 6,000 x g에서 15분간 원심분리하여 균사체와 배양여액을 분리하였다. 배양 균사체에를 2N NaOH로 24시간 추출한 다음 빙초산으로 중화시켜 원심분리하여 상등액을 얻었다. 상등액에 3배량의 에탄올을 가해 4°C에서 24시간 방치 한 후, 원심분리하여 얻어진 침전물에 소량의 물을 가하여 불용성 분획(AI)와 수용성 분획(AS)을 얻었다. 배양여액은 투석, 에탄올 침전후 동결건조(M: media fraction)하였으며, 총 배양물을 100°C에서 30분간 추출한것(H: hot water fraction)은 상기 AS와 동일 조건으로 조제하였다.

물리화학적 특성 분석

총 당의 함량은 phenol-sulfuric acid 법(Dubois 등, 1956), 단백질 함량은 bicinchoninic acid(BCA) 단백질 정량 시약(Pierce Co., USA)(Smith 등, 1985)으로 측정하였다. 구성 당을 분석하기 위해 시료 10mg을 5ml의 0.1N HCl에 용해시켜 질소를 충전시킨 후, 100℃에서 5시간 동안 가수분해시켰다. 여기에 3배량의 ethanol을 가해 4℃에서 하룻밤 방치한 후 원심분리하여 얻은 상등액을 동결건조하여 GC를 이용하여 분석하였다. 시료 중의 아미노산은 Beckman system 6300 amino acid analyzer를 이용하여 분석하였다. 시료 4mg을 1ml의 6N HCl에 용해시켜, 질소를 충전한 후 밀봉하여 110℃에서 24시간 동안 가수분해시킨 후 여과하여 침전을 제거하고 감압농축하여 건조된 시료를 0.08M sodium citrate와 0.2N HCl이 함유된 완충용액 2ml에 용해시켜 이중 50 μ l를 분석에 이용하였다. IR absorption은 시료 10mg에 200배(w/w)의 KBr을 막자사발에 넣고 마쇄하여 pellet로 만든 다음, FT-IR(Bruker, IFS-48, Germany)를 이용하여 측정하였으며, 이때 β -1,3-glucan의 표준물질로 curdlan과 α 구조를 위해서 starch를 사용하였다. 분자량의 측정은 0.3N NaOH에 녹인 시료 200 μ l를 Sepharose CL-4B column(1.6cm \times 52cm)에 적용한 후, 1ml/10min 유속으로 fraction volume은 2ml씩 0.3N NaOH 용액으로 용출하여 gel permeation chromatography (GPC)를 행하였으며, 분자량 측정을 위한 표준물질로는 Sigma사의 dextran(2,000 kD, 500kD, 124kD, 9.3kD)을 사용하였으며, 당의 확인에는 phenol sulfuric acid법을 이용하여 발색시켜 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

면역활성 측정

항보체 활성은 Lee 등의 방법으로 측정하여 대조군 대비 총보체 용혈율(50% of total complement hemolysis, TCH₅₀, %)의 저지율(Inhibition of TCH₅₀, ITCH %)로 나타냈다. 탐식기능은 Kanari 등의 방법에 따라 carbon clearance rate($t^{1/2}$)로서 측정하였다. 용혈반형성 세포수의 측정은 Jerne 등의 방법, 면역 전기영동은 Shimura 등의 방법을 변형하여 행하였다.

항암활성 측정

In vivo 항암효과는 0.1ml(5×10^7 cells/ml)의 sarcoma 180을 ICR계 mouse의 우측 서혜부에 피하이식하고 72시간 후 부터 20mg/kg농도의 시료를 1일 1회씩 10일간 투여하였다. Trypan blue(25mg/kg) 및 EDTA(10mg/kg)는 시료투여와 동일한 방법으로 단독 또는 시료와 병용 투여하였다. 암세포 이식 30일째 되는 날에 mouse를 치사 시키고, 고형암을 적출하여 중량을 평량하였다. 증식 저지율은 생리식염수를 투여한 대조군과 비교하여 암증식 저지백분율(Percent Inhibition Ratio : I.R., %)로 계산하였다. Mouse leukemia L1210 및 P388에 대한 항암효과는 다음과 같이 측정되었다. L1210의 계대는 DBA/2 mouse를 사용하였으며, 약물의 복강내 투여에 의한 항암효과를 측정하기 위해 6주령 BDF₁ mouse 8마리를 한군으로 하여 leukemia L1210(1×10^6 cells/0.1ml)을 복강내로 이식하였다. 시료를 생리식염수에 녹여 암이식 후 1일후 부터 9일까지 1일 1회씩 연속하여 10mg/kg 및 100mg/kg의 농도로 각각 복강 또는 경구투여하였다. 대조군은 생리식염수를 주사하였다. Mouse를 매일 관찰하면서 생존시간을 측정하고 각 실험군의 평균 생존시간으로 부터 대조군에 대한 투여군의 평균 생존일의 증가된 비율(T/C %)을 계산하여 항암효과를 판정하였다.

Solid L1210에 대한 항암효과를 측정하기 위해, BDF₁ mouse 8마리를 한 군으로 하여 L1210세포 7.0×10^5 cells/0.1ml를 피하로 이식하였다. 암이식 후 1일후 부터 9일까지 연속하여 약물을 복강으로 주사하였다. 16일째에 mouse를 치사시킨 다음 고형종양을 적출하여 중량을 평량하였다. 암의 증식저지율은 생리식염수를 투여한 대조군과 비교하여 암저지 백분율(Percent Inhibition Ratio : I.R., %)을 계산하여 측정되었다.

P388의 계대는 DBA/2 mouse에서 실시했으며, 항암실험은 6주령 BDF₁ mouse를 사용하였다. 약물의 복강내 투여에 의한 항암효과의 측정은 6주령 BDF₁ mouse 8마리를 한 실험군으로 하여 DBA/2에서 계대 중인 P388 세포, 1×10^6 cells/0.1ml를 각각의 mouse의 복강내로 이식한 후 1일 이후부터 9일까지 약물을 연속하여 10mg/kg, 50mg/kg, 100mg/kg 및 200mg/kg의 용량으로 복강내로 주사하였다. 매일 mouse를 관찰하여 각 실험군의 평균 생존시간을 측정하여 대조군과의 비율(T/C, %)을 계산하였다.

항산화활성 측정

Microsome는 다음과 같은 방법으로 얻었다. Pentobarbital로 마취된 흰쥐를 개복하여 50ml용 주사기로 50 mM Tris-Cl buffer(pH 7.4) 30 ml를 portal vein에서 하대정맥으로 혈액이 흘러나오도록 관류를 행하였다. 이후 간을 적출하여 50 mM Tris-Cl과 150 mM KCl이 함유된 buffer(pH 7.4)로 세척하고 잘게 썰어, Homogenizer(Polytrone[®], PT 10/35, Switzerland)를 이용하여 빙냉하에서 균질화를 실시하였다. 균질화물은 8,000 x g에서 20분간 원심분리한 후 상등액을 얻었다. 상등액은 105,000 x g에서 60분 동안 초원심분리를 실시한 후, 침전 부분을 완충액으로 현탁시켜 단백질의 농도가 20 mg/ml되게 조정하였다. 분리된microsome은 -70℃에 보존하면서 실험목적에 따라 사용하였다. 효소적 비효소적 지질과산화 유발은 Kiso 등의 방법(1984), 지질 과산화 정도는 Ohkawa 등의 방법(1979)에 의하여 측정하였다. 지질과산화 억제 정도는 대조의 MDA값-시료의 MDA값/대조군의 MDA값 x 100%로 계산하여 표시하였다.

인공 자실체 형성

동충하초 인공 자실체 형성을 위해 사용한 균주는 *Paecilomyces japonica*를 사용하였다. 균사배양을 위한 액체 종균배지는 PDB(Potato dextrose broth)를 이용하였으며, 균사의 생육은 25℃에서 양호하였다. 자실체 형성을 위해서는 PP병에 번데기 또는 현미를 넣고 멸균한 후, 미리 배양된 종균을 접종하여 배양하였다. 균사가 전면에 활착된 다음 습도, 조도 및 온도를 조절하면서 자실체를 발생시켰다.

결과 및 고찰

균사체 배양

수종의 동충하초 자실체를 채집하여 약리활성이 우수한 균주를 선발하기 위해 항암활성 및 항보체활성을 측정한 결과, IY909 균주가 우수한 것으로 나타났다. 이 균주의 균사체 생육은 glucose 3%, yeast extract 1.5%, peptone 0.5%, KH_2PO_4 0.04%, MgSO_4 0.01%의 조성에서 최적이었으며, 최적배지를 이용하여 25°C, pH 5.5에서 5일간 배양할 때 균사체의 증식 및 다당류의 생산이 가장 우수함을 알 수 있었다. 배지중 환원당은 12시간후부터 감소하기 시작하여 2일째에는 급격히 감소함을 알 수 있었다.

다당류의 수율, 총당 및 단백질 함량

약리활성이 우수한 분획을 얻고자 분획하여 이들의 수율, 총당 및 단백질 함량을 알아본결과 이들 대부분 분획은 당과 단백질을 함유하고 있었으며, 다당류는 0.11~0.17%의 수율을 나타내었고, 당은 37.8~69.0%, 단백질은 26.4~32.4%를 함유하고 있는 것으로 나타났다.

이화학적 특성

구성당은 glucose와 galactose의 함량이 높았으며, 아미노산은 주로 Asp, Glu 등의 산성 아미노산과 Ala와 Leu 등의 중성아미노산이 다량 함유되어 있었다. *Cordyceps* sp. IY909로부터 추출한 다당류 AS는 약 20kD의 분자량을 가지며, IR 흡수피크는 8894.7cm^{-1} , core portion의 main chain은 1,3-glucan 결합을 갖는 β -glucan으로 추정되었다.

면역활성

Cordyceps sp. IY909로부터 얻은 조다당 AS, AI, 및 M 분획 사이에서 sarcoma 180에 대한 항암활성이 높은 것이 항보체활성도 높아 이들간에는 상관관계가 있는 것으로 나타났다. 다당류는 생체내에서 특정 serum protein을 증가시키는 것으로 알

려있다. 동충하초의 경우도 mouse에 투여시 특징적인 serum protein의 증가가 관찰되었다. 또한 탐식능과 관련이 있는 대식세포의 탐식능 증가 및 활성화가 이루어짐을 확인 할 수 있었다.

항암활성

909 AS 분획은 sarcoma 180에 직접적인 세포독성은 나타내지는 않았으나, sarcoma 180 암세포주에 대한 *in vivo* 실험에서는 IY 909 및 *Paecilomyces japonica*의 경우는 항암 보조제인 krestin 보다 우수한 효과를 나타내었다. Mouse leukemia P388 및 L1210이 이식된 inbred mouse, BDF₁에서 Krestin은 항암효과를 보이지 않았으나 909 AS에서는 수명연장 및 고형암 증식 억제 효과가 나타났다.

항산화활성

생체내에서 생성된 다량의 활성 산소종과 지질 과산화물이 혈전증, 심장병, 미숙아 망막증의 질병과 노화 및 암 등의 원인 물질로 규명되었고, 간장질환의 원인 물질로 알려짐에 따라 많은 관심을 받고 있다. Sawaki 등에 의하면 과산화 지질 생성의 지표인 malondialdehyde(MDA) 치는 급성간염, 약물에 의해 유발된 간염, 지방간, 간경화 등에서 증가한다고 보고하였다. 호기성 생물들은 산화제의 생성과 지질 과산화를 막고 산화에 의한 손상을 복구하기 위한 보호 기구를 갖고 있다고 알려졌다. 이 보호 기구에는 superoxide dismutase(SOD), Se-glutathione peroxidase와 같은 효소와 α -tocopherol 및 glutathione 등의 항산화제 또는 radical 소거제들이 포함된다. 그러나 이와 같은 항산화 물질들의 생성이 특정 질병이나 독성물질의 노출에 의해 균형을 잃게 되면 생체내의 산화적 손상이 유발된다고 알려져 있다. 그러므로 지질 과산화 반응은 생체의 산화적 손상에 대한 지표가 될 수 있으며, 항산화제들에 대한 상대적인 potential의 비교시 널리 이용되고 있다.

비효소적 지질과산화를 유발시킨 후 지질과산화 억제능을 측정한 결과, *Cordyceps* sp. IY909 및 눈꽃동충하초(*P. japonica*)는 각각 68.4%와 42.1%이었다. Lui 등은 동충하초가 활성 산소의 제거에 관여하는 superoxide dismutase 및 glutathione peroxidase 등의 효소생성을 증가시키므로써 산소 자유기에 의한 세포

막을 손상을 저하시킬 수 있다고 보고하였다. 따라서 현대의 많은 질병들이 자유기에 의해 야기되는 것으로 알려졌으므로 향후 동충하초의 항산화능 약리기전 규명을 위해서는 지질과산화 억제능과 관련이 있는 cytochrome p-450계 효소들의 활성 변화 및 약물대사와 관련된 효소들의 활성에 관한 연구가 수반되어야 할 것으로 생각된다.

결론

동충하초는 면역증강효과, 항암활성, 항산화활성, 혈당강하, 콜레스테롤저하 및 자양강정 효과 등이 있는 것으로 알려졌으므로 이들의 임상실험 확인 통하여 신기능성 식품 소재 및 의약품으로의 개발이 요구된다고 하겠다. 국내의 경우도 누에동충하초(눈꽃동충하초, *P. japonica*)가 식품재료로서 사용이 가능함에 따라 상기에 나타난 약리활성들을 이용하여 동충하초가 신기능성 식품 소재로서 이용이 가능할 것으로 생각된다.

참고문헌

- 陳存仁: 圖說漢方醫藥大事典(中國藥學大典)(권3), pp.170-173 講談社, 日本, 東京 (1982).
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Robers, P. A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Biochem.* **28**: 350~356.
- Jerner, N. K. and A. A. Nordin: Plaque formation in agar by single antibody producing cell. *Science*, **140**, 405-406(1963).
- Kanari, M., M. Tomoda, R. Gonda, N. Shimizu, M. Kimura, M. Kawaguchi and C. Kawabe: A reticuloendothelial system activating arabinoxylan from the bark of *Cinnamomum cassia*. *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 3191-3194(1989).
- Kiso, Y., Tohkin, M., Hikino, H., Hattory, M., Sakamoto, T. and Namba, T. :

- Mechanism of antihepatotoxic activity of glycyrrhizin. ; Effect on free radical generation and lipid peroxidation. *Planta Med.* **50**, 298~303(1984).
- Lee, J. W., Jeong, H., Jung, C. H. and Lee, K. H. 1990. Effects of Alkali Extract of *Ganoderma lucidum* IY007 on Complement and Reticuloendothelial System. *The Kor. J. Mycol.* **18**: 137~144.
- Lee, J. W., Jeong, H., Kim, K. N., Lee, S. M., Han, M. D., Lee, S. Y. and Kang, S. M. 1996. Effect of G009 on lipid peroxidation induced by peroxidizer in rats. *The J. Appl. Pharmacol.* **4**(3): 244~250.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. : Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.* **95**, 351-358(1979).
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goetze, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**: 76~85.
- Shimura, K., Ito, H. and Hibasami, H. : Screening of host-mediated antitumor polysaccharides by crossed immunoelectrophoresis using fresh human serum. *Japan. J. Pharmac.*, **33**, 403-408(1983).