



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0076770  
(43) 공개일자 2022년06월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01G 18/40 (2018.01) A01G 18/20 (2018.01)  
A01G 18/50 (2018.01) A01G 18/69 (2018.01)  
A01G 7/04 (2006.01) A23L 33/14 (2016.01)  
C12N 1/14 (2018.01) G06F 17/10 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A01G 18/40 (2018.02)  
A01G 18/20 (2018.02)

(21) 출원번호 10-2020-0165587

(22) 출원일자 2020년12월01일

심사청구일자 2020년12월01일

(71) 출원인

경상국립대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

양재경

경상남도 진주시 강변길 31, 103동 402호(가좌동, 가호 에일린의 뜰 아파트)

하시영

경상북도 구미시 형곡로 150, 205호(형곡동, 두산 빌라)

정지영

경상남도 창원시 마산회원구 양덕서로 30, 104동 1702호(양덕동, 메트로시티)

(74) 대리인

특허법인태백

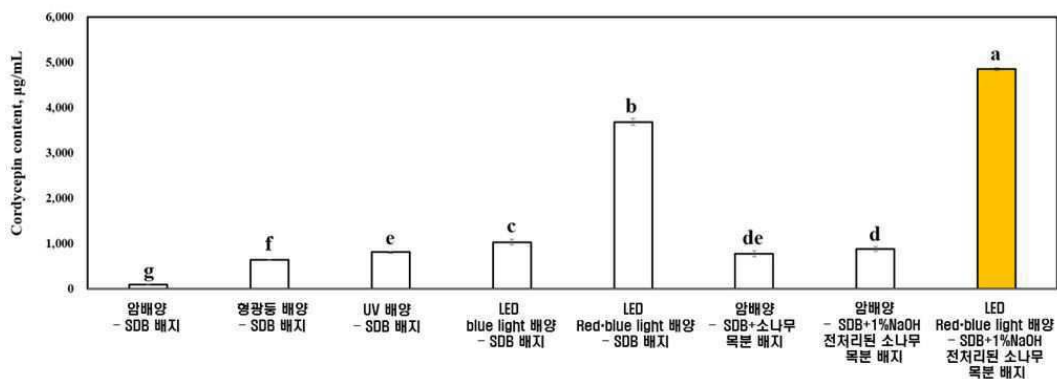
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 목질 액체배지와 LED를 이용한 밀리타리스 동충하초 균사체의 코디세핀 함량을 증대하는 배양 방법

(57) 요약

본 발명은 목질 액체배지와 LED를 이용한 밀리타리스 동충하초 균사체의 코디세핀 함량을 증대하는 배양방법에 관한 것으로, 밀리타리스 동충하초 균사를 목질원료가 투입된 배지에 접종하는 접종단계; 및 접종된 배지를 광조건에서 배양하여 배양된 밀리타리스 동충하초 균사체 및 배양액에서 코디세핀을 얻는 단계; 를 포함하는 밀리타리스 동충하초 균사체의 코디세핀 함량을 증대하는 배양방법으로 이루어져 배지 및 광조건에 따라 밀리타리스 동충하초 균사체로부터 최대 코디세핀 함량을 수득할 수 있음을 확인하였으며, 반응 표면 분석을 통하여 최적의 목질원료 분말도, 배지의 목질원료 함량 및 배양시간 조건을 도출하고, 이를 배양조건으로 이용함으로써 밀리타리스 동충하초 균사체로부터 최대 코디세핀 함량을 효율적으로 수득할 수 있다.

대표도 - 도13



(52) CPC특허분류

*A01G 18/50* (2018.02)  
*A01G 18/69* (2018.02)  
*A01G 7/045* (2013.01)  
*A23L 33/14* (2016.08)  
*C12N 1/14* (2021.05)  
*G06F 17/10* (2013.01)  
*C12N 2500/76* (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                                                   |
|-------------|---------------------------------------------------|
| 과제고유번호      | 1405004016                                        |
| 과제번호        | 2019132B10-1920-0001                              |
| 부처명         | 산림청                                               |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국임업진흥원                                           |
| 연구사업명       | 대학원생 창의도전 아이디어 지원 연구                              |
| 연구과제명       | 동충하초로부터 목질액체배지와 LED광을 동시 적용한 cordycepin 고도화 공정 개발 |
| 기 여 율       | 1/1                                               |
| 과제수행기관명     | 경상대학교 산학협력단                                       |
| 연구기간        | 2019.04.01 ~ 2020.03.31                           |

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

밀리타리스 동충하초 군사를 목질원료가 투입된 배지에 접종하는 접종단계; 및

접종된 배지를 광조건에서 배양하여 배양된 밀리타리스 동충하초 군사체 및 배양액에서 코디세핀을 얻는 단계; 를 포함하는 밀리타리스 동충하초 군사체의 코디세핀 함량을 증대하는 배양방법.

#### 청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 목질원료는 참나무, 소나무, 삼나무 및 백합나무로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 밀리타리스 동충하초 군사체의 코디세핀 함량을 증대하는 배양방법.

#### 청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 목질원료는 액체 배지에 20 내지 40 중량부로 포함되는 것을 특징으로 하는 밀리타리스 동충하초 군사체의 코디세핀 함량을 증대하는 배양방법.

#### 청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 목질원료는 100 내지 140 mesh의 분말도를 갖는 것을 특징으로 하는 밀리타리스 동충하초 군사체의 코디세핀 함량을 증대하는 배양방법.

#### 청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 목질원료는 1 내지 5% 농도의 NaOH로 전처리하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 밀리타리스 동충하초 군사체의 코디세핀 함량을 증대하는 배양방법.

#### 청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 광조건은 620 nm 내지 780 nm의 파장을 갖는 적색광과 380 nm 내지 500 nm의 파장을 갖는 청색광을 혼합한 LED 혼합광을 접종된 배지에 조사하여 군사체를 배양하는 것을 특징으로 하는 밀리타리스 동충하초 군사체의 코디세핀 함량을 증대하는 배양방법.

#### 청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 LED 혼합광을 1일 5 내지 15시간 동안 접종된 배지에 조사하여 군사체를 배양하는 것을 특징으로 하는 밀리타리스 동충하초 군사체의 코디세핀 함량을 증대하는 배양방법.

#### 청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 배양은 3일 내지 7일 동안 수행하는 것을 특징으로 하는 밀리타리스 동충하초 군사체의 코디세핀 함량을 증대하는 배양방법.

## 청구항 9

제 1항에 있어서,

상기 밀리타리스 동충하초 균사체의 코디세핀 함량은,

목질원료의 분말도, 배지의 목질원료 함량 및 배양시간과 하기의 수학적 식 1과 같은 상관관계를 가지는 것을 특징으로 하는 밀리타리스 동충하초 균사체의 코디세핀 함량을 증대하는 배양방법:

[수학적 식 1]

$$Y_1 = 755.3 - 58.6625X_1 + 4.79432E^{-14}X_2 - 46.6625X_3 - 5.66269E^{-14}X_1X_2 - 0.025X_1X_3 + 1.62475E^{-14}X_2X_3 - 160.6625X_1^2 + 0.0125X_2^2 - 206.9625X_3^2$$

(상기 수학적 식 1에서  $Y_1$ 은 밀리타리스 동충하초 균사체의 코디세핀 함량( $\mu\text{g/mL}$ ),  $X_1$ 은 목질원료의 분말도,  $X_2$ 는 목질원료의 함량 및  $X_3$ 는 배양시간을 의미함.)

## 청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 목질원료의 분말도, 배지의 목질원료 함량 및 배양시간의 배양조건은 각각 100 내지 140 mesh, 20 내지 40 g/L, 50 내지 100시간인 것을 특징으로 하는 밀리타리스 동충하초 균사체의 코디세핀 함량을 증대하는 배양방법.

## 청구항 11

제 10항에 있어서,

상기 목질원료의 분말도, 배지의 목질원료 함량 및 배양시간의 배양조건은 각각 113.759 mesh, 11.9722 g/L, 67.8519 시간인 것을 특징으로 하는 밀리타리스 동충하초 균사체의 코디세핀 함량을 증대하는 배양방법.

## 청구항 12

제 1항 내지 제 11항 중 어느 한 항의 방법에 따라 배양된 밀리타리스 동충하초 균사체로부터 수득된 코디세핀 조성물.

## 청구항 13

제 1항 내지 제 11항 중 어느 한 항의 방법에 따라 배양된 밀리타리스 동충하초 균사체로부터 수득된 코디세핀 조성물을 포함하는 건강기능식품.

## 청구항 14

제 1항에 따른 밀리타리스 동충하초 균사체의 코디세핀 함량을 예측하는 방법에 있어서,

(a) 박스 벤켄 계획법(Box-Behnken design)으로 목질원료의 분말도( $X_1$ ), 배지의 목질원료의 함량( $X_2$ ), 배양시간( $X_3$ )에 대하여, -1, 0 및 1로 코드화하여 실험범위를 설계하는 단계;

(b) 상기 단계 (a)의 설계된 실험범위로, 상기 목질원료의 분말도, 배지의 목질원료의 투입량 및 배양시간에 대한 실험값을 얻는 단계;

(c) 상기 단계 (b)의 실험값을 이용하여 하기 수학적 식 1로 표시되는 이차 회귀식 모델을 도출하는 단계; 및

(d) 상기 단계 (c)에서 도출된 수학적 식 1로 표시되는 이차 회귀식 모델을 변량분석(ANOVA)하여 상기 밀리타리스 동충하초 균사체의 코디세핀 함량을 예측하는 단계; 를 포함하는 것을 특징으로 하는 밀리타리스 동충하초 균사체의 코디세핀 함량 예측방법;

[수학적 식 1]

$$Y_1=755.3-58.6625X_1+4.79432E^{-14}X_2-46.6625X_3$$

$$-5.66269E^{-14}X_1X_2-0.025X_1X_3+1.62475E^{-14}X_2X_3-160.6625X_1^2+0.0125X_2^2-206.9625X_3^2$$

(상기 수학식 1에서  $Y_1$ 은 밀리타리스 동충하초 균사체의 코디세핀 함량( $\mu\text{g/mL}$ ),  $X_1$ 은 목질원료의 분말도(코드단위),  $X_2$ 는 목질원료의 함량(코드단위) 및  $X_3$ 는 배양시간(코드단위)을 의미함.)

## 청구항 15

제 14항에 있어서,

상기 목질원료의 분말도, 배지의 목질원료 함량 및 배양시간의 배양조건은 각각 100 내지 140 mesh, 20 내지 40 g/L, 50 내지 100시간인 것을 특징으로 하는 밀리타리스 동충하초 균사체의 코디세핀 함량 예측방법.

## 청구항 16

제 15항에 있어서,

상기 목질원료의 분말도, 배지의 목질원료 함량 및 배양시간의 배양조건은 각각 113.759 mesh, 11.9722 g/L, 67.8519 시간인 것을 특징으로 하는 밀리타리스 동충하초 균사체의 코디세핀 함량 예측방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 목질 액체배지와 LED를 이용한 밀리타리스 동충하초 균사체의 코디세핀 함량을 증대하는 배양방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 동충하초(冬蟲夏草)는 겨울에는 벌레, 여름에는 버섯으로 나온다는 뜻에서 이름이 붙여졌다. 대부분이 곤충병원성진균(entomopathogenic fungi)으로 약 800여종이 알려져 있으며, 기주 곤충에 감염되어 내부에서 균사 성장을 하여 자실체를 생성하는 것이 큰 특징이다. 이러한 동충하초는 아시아(중국, 한국, 일본 등)에서 예전부터 약초로 쓰여 왔다. 그 효능으로는 면역력 증강, 성인병 예방, 천식, 빈혈에 좋은 약재로 사용되어져 왔다.

[0003] 또한, 동충하초는 작물들 중 단백질 함량이 가장 높은 (건조함량의 28%이상) 군에 속하고, 면역력을 강화시키는 물질이 다량 함유되어 있다. 특히, 동충하초의 면역활성물질 중에는 키닉산(quinic acid)의 이성체로 밝혀진 '코디세핀(Cordycepin :3'-deoxy-adenosine)' 이 포함되어 있다. 코디세핀은 핵산 물질로서 세포의 유전정보에 관여하면서 저하된 면역기능을 활성화하여 정상세포가 암세포로 전환되는 것을 방지하는 작용을 한다. 동충하초를 투입한 임상실험에서 암세포를 죽이는 면역세포인 NK세포(natural killer cell/자연살해세포)와 면역세포에서 분비되는 사이토카인의 함량이 18%~25% 증가되는 것으로 확인되어 코디세핀이 혈액암치료용으로 활용되고, 건강기능식품으로서도 많은 관심을 받고 있다.

[0004] 이러한 결과를 토대로 국내에서는 코디세핀이 함유된 동충하초가 건강기능식품으로 식약처 인증을 받았으며, 코디세핀의 면역증강활성, 항암활성 외 항바이러스 효과와 항염증 효과 등 다양한 기능 등이 발표되고 있다.

[0005] 상기와 같은 코디세핀의 기능으로 인해 최근에는 동충하초로부터 코디세핀을 추출하는 연구가 많이 진행되고 있는데, 한국공개특허 제2001-0054264호에 동충하초로부터 분리 추출된 항암제용 코디세핀과 그 제조방법이 개시되어 있으나, 상기 한국공개특허 제2001-0054264호에 개시된 분리방법은 HPLC를 이용한 정제방법이기 때문에 소량으로밖에 활성물질을 분리하지 못해 상업적으로 적당하지 않은 문제점이 있어 왔으며, 현재까지 동충하초의 코디세핀 함량 증대에 적합한 최적 조건에 관한 연구는 미비한 실정이다.

[0006] 따라서 밀리타리스 동충하초 균사체의 코디세핀 함량을 증대시켜 코디세핀 수득량을 증가시키기 위한 최적 방법에 대한 연구가 필요한 실정이다.

## 선행기술문헌

## 특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 1. 대한민국공개특허 제10-2001-0054264호(2001.07.02.)

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 밀리타리스 동충하초의 최대 코디세핀 함량을 위한 최적의 밀리타리스 동충하초 균사체의 코디세핀 함량을 증대하는 배양방법을 제공하는 데에 있다.

[0009] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 방법에 따른 밀리타리스 동충하초로부터 수득된 코디세핀 조성물 및 이를 포함하는 건강기능식품을 제공하는 데에 있다.

[0010] 또한, 본 발명의 다른 목적은 밀리타리스 동충하초 균사체의 최대 코디세핀 함량 예측방법을 제공하는 데에 있다.

### 과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 밀리타리스 동충하초 균사를 목질원료가 투입된 배지에 접종하는 접종 단계; 및 접종된 배지를 광조건에서 배양하여 배양된 밀리타리스 동충하초 균사체 및 배양액에서 코디세핀을 얻는 단계; 를 포함하는 밀리타리스 동충하초 균사체의 코디세핀 함량을 증대하는 배양방법을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 밀리타리스 동충하초 균사체의 코디세핀 함량을 증대하는 배양방법에 따라 배양된 밀리타리스 동충하초 균사체로부터 수득된 코디세핀 조성물 및 이를 포함하는 건강기능식품을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 밀리타리스 동충하초 균사체의 코디세핀 함량을 예측하는 방법에 있어서, (a) 박스 벤켄 계획법(Box-Behnken design)으로 목질원료의 분말도( $X_1$ ), 배지의 목질원료의 함량( $X_2$ ), 배양시간( $X_3$ )에 대하여, -1, 0 및 1로 코드화하여 실험범위를 설계하는 단계; (b) 상기 단계 (a)의 설계된 실험범위로, 상기 목질원료의 분말도, 배지의 목질원료의 투입량 및 배양시간에 대한 실험값을 얻는 단계; (c) 상기 단계 (b)의 실험값을 이용하여 하기 수학적 1로 표시되는 이차 회귀식 모델을 도출하는 단계; 및 (d) 상기 단계 (c)에서 도출된 수학적 1로 표시되는 이차 회귀식 모델을 변량분석(ANOVA)하여 상기 밀리타리스 동충하초 균사체의 코디세핀 함량을 예측하는 단계; 를 포함하는 것을 특징으로 하는 밀리타리스 동충하초 균사체의 코디세핀 함량 예측방법을 제공한다.

[0014] [수학적 1]

[0015]  $Y_1 = 755.3 - 58.6625X_1 + 4.79432E^{-14}X_2 - 46.6625X_3$

[0016]  $-5.66269E^{-14}X_1X_2 - 0.025X_1X_3 + 1.62475E^{-14}X_2X_3 - 160.6625X_1^2 + 0.0125X_2^2 - 206.9625X_3^2$

[0017] (상기 수학적 1에서  $Y_1$ 은 밀리타리스 동충하초 균사체의 코디세핀 함량( $\mu\text{g/mL}$ ),  $X_1$ 은 목질원료의 분말도(코드단위),  $X_2$ 는 목질원료의 함량(코드단위) 및  $X_3$ 는 배양시간(코드단위)을 의미함.)

## 발명의 효과

[0018] 본 발명에 따라 밀리타리스 동충하초 균사체는 SDB(Sabouraud dextrose broth) 액체배지에 1% NaOH로 전처리된 목분을 첨가하고, 적색, 청색 혼합 LED 광을 조사하여 배양한 경우 최대 코디세핀 함량을 나타내었으며, 반응 표면 분석을 통하여 최적의 목질원료 분말도, 배지의 목질원료 함량 및 배양시간 조건을 도출하고, 이를 배양조건으로 이용함으로써 밀리타리스 동충하초 균사체로부터 최대 함량의 코디세핀을 효율적으로 수득할 수 있는 효과가 있다.

[0019] 또한, 본 발명에 따른 배양방법에 따라 수득된 밀리타리스 동충하초 균사체 및 배양액에는 면역증강활성, 항암활성, 항바이러스 및 항염증 효과가 뛰어난 코디세핀 함량이 높아 건강기능식품으로도 유용하게 사용될 수 있다.

## 도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*) 균사체를 나타낸 도면이다.
- 도 2는 액체배지에 사용된 목질원료를 나타낸 도면이다.
- 도 3은 액체배지에 투입된 목질원료의 수중에 따른 동충하초 배양액의 cordycepin 함량 변화를 나타낸 도면이다(데이터는 3번의 실험 결과를 평균±표준편차로 나타냈다).
- 도 4는 동충하초 균사체의 액체 배양에서 소나무 목분 투입량에 따른 cordycepin 함량 변화를 나타낸 도면이다(데이터는 3번의 실험 결과를 평균±표준편차로 나타냈다).
- 도 5는 목질원료의 분말도에 따른 소나무 목분을 나타낸 도면이다.
- 도 6은 액체배지에 투입된 소나무 목분의 분말도에 따른 동충하초 배양액의 cordycepin 함량 변화를 나타낸 도면이다(데이터는 3번의 실험 결과를 평균±표준편차로 나타냈다).
- 도 7은 다양한 용매로 전처리한 소나무 목분을 나타낸 도면이다.
- 도 8은 소나무 목분의 전처리 용매에 따른 동충하초 배양액의 cordycepin 함량 변화를 나타낸 도면이다(데이터는 3번의 실험 결과를 평균±표준편차로 나타냈다).
- 도 9는 전처리된 목분의 분말도에 따른 동충하초 배양액의 cordycepin 함량 변화를 나타낸 도면이다(데이터는 3번의 실험 결과를 평균±표준편차로 나타냈다).
- 도 10은 *C. militaris* 균사체의 cordycepin 함량 증대를 위한 1% NaOH 전처리된 소나무 목분의 최적 투입 조건을 나타낸 도면이다(A: 목질원료의 분말도; B: 목질원료의 함량; C: 배양시간).
- 도 11은 유도된 2차 다항방정식 회귀식 모델을 나타낸 도면이다.
- 도 12는 2차 회귀식 모델을 변량분석(ANOVA)하여 상기 밀리타리스 동충하초 균사체의 cordycepin 함량 예측 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 13은 전처리된 소나무를 이용한 목질 액체배지와 LED광의 복합 공정 적용에 따른 동충하초 *C. militaris* 배양액의 cordycepin 함량 변화를 나타낸 도면이다(데이터는 3번의 실험 결과를 평균±표준편차로 나타냈다).

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 이하에서는 본 발명을 구체적으로 설명한다.
- [0023] 본 발명자들은 SDB(Sabouraud dextrose broth) 액체배지에 1% NaOH로 전처리된 목분을 첨가하고, 적색, 청색 혼합 LED 광을 조사하여 배양한 경우, 밀리타리스 동충하초 균사체의 최대 코디세핀 함량을 나타냄을 확인하였으며, 반응 표면 분석을 통하여 최적의 목질원료 분말도, 배지의 목질원료 함량 및 배양시간 조건을 도출하고, 이를 배양조건으로 이용함으로써 밀리타리스 동충하초 균사체로부터 최대 함량의 코디세핀을 효율적으로 수득할 수 있음을 밝혀내어 본 발명을 완성하였다.
- [0025] 본 발명은 밀리타리스 동충하초 균사를 목질원료가 투입된 배지에 접종하는 접종단계; 및 접종된 배지를 광조건에서 배양하여 배양된 밀리타리스 동충하초 균사체 및 배양액에서 코디세핀을 얻는 단계; 를 포함하는 밀리타리스 동충하초 균사체의 코디세핀 함량을 증대하는 배양방법을 제공한다.
- [0026] 이때, 상기 배지는 SDB(Sabouraud dextrose broth) 액체배지일 수 있으며, 3일 내지 7일 동안 배양을 수행할 수 있다.
- [0027] 또한, 상기 목질원료는 참나무, 소나무, 삼나무 및 백합나무로 이루어진 군에서 선택되는 산림청 조림권장 수종인 것을 특징으로 하나, 바람직하게는 100 내지 140 mesh 분말도의 소나무 목분을 액체 배지에 20 내지 40 중량부로 첨가하여 배양하며, 상기 목분을 액체 배지에 첨가하기 전에 1 내지 5% 농도의 NaOH로 전처리하면 밀리타리스 동충하초 균사체로부터 수득되는 코디세핀 함량을 높일 수 있다.
- [0028] 또한, 상기 광조건은 620 nm 내지 780 nm의 파장을 갖는 적색광과 380 nm 내지 500 nm의 파장을 갖는 청색광을

혼합한 LED 혼합광을 집중된 배지에 조사하여 군사체를 배양하며, 상기 LED 혼합광을 1일 5 내지 15시간 동안 집중된 배지에 조사하여 군사체를 배양하는 것을 특징으로 한다.

[0029] 상기와 같이 액체배지에 첨가되는 목질원료조건으로 배양하면 최대 760.455  $\mu\text{g/mL}$ 를 수득할 수 있다. 또한 상기와 같이 액체배지에 첨가되는 목질원료 조건과 광조건을 동시에 적용하면 최대 4851.3  $\mu\text{g/mL}$ 를 수득할 수 있다.

[0030] 이때, 상기와 같은 배양조건 및 광조건을 벗어나면 본 발명에 따른 밀리타리스 동충하초 군사체의 코디세핀 함량이 증대되지 않아 코디세핀의 수득 수율이 현저히 낮아져 경제적이지 못한 문제가 야기될 수 있다.

[0031] 또한, 상기 밀리타리스 동충하초 군사체의 코디세핀 함량은 목질원료의 분말도, 배지의 목질원료 함량 및 배양시간과 하기의 수학적 식 1과 같은 상관관계를 가지는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0032] [수학적 식 1]

$$Y_1 = 755.3 - 58.6625X_1 + 4.79432E^{-14}X_2 - 46.6625X_3$$

$$- 5.66269E^{-14}X_1X_2 - 0.025X_1X_3 + 1.62475E^{-14}X_2X_3 - 160.6625X_1^2 + 0.0125X_2^2 - 206.9625X_3^2$$

[0035] (상기 수학적 식 1에서  $Y_1$ 은 밀리타리스 동충하초 군사체의 코디세핀 함량( $\mu\text{g/mL}$ ),  $X_1$ 은 목질원료의 분말도,  $X_2$ 는 목질원료의 함량 및  $X_3$ 는 배양시간을 의미함.)

[0036] 이때, 상기 밀리타리스 동충하초 군사체로부터 최대 코디세핀 함량을 얻기 위한 상기 목질원료의 분말도, 배지의 목질원료 함량 및 배양시간의 배양조건은 각각 100 내지 140 mesh, 20 내지 40 g/L, 50 내지 100시간인 것을 특징으로 하며, 바람직하게 상기 목질원료의 분말도, 배지의 목질원료 함량 및 배양시간의 배양조건은 각각 113.759 mesh, 11.9722 g/L, 67.8519 시간일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0038] 또한, 본 발명은 상기의 밀리타리스 동충하초 군사체의 코디세핀 함량을 증대하는 배양방법에 따라 배양된 밀리타리스 동충하초 군사체로부터 수득된 코디세핀 조성물을 제공한다. 상기와 같이 배양된 밀리타리스 동충하초 군사체로부터 수득된 코디세핀 조성물은 면역증강활성, 항암활성을 위한 건강기능식품으로도 이용될 수 있을 것이다. 이에, 본 발명은 상기의 밀리타리스 동충하초 군사체의 코디세핀 함량을 증대하는 배양방법에 따라 배양된 밀리타리스 동충하초 군사체로부터 수득된 코디세핀 조성물을 포함하는 건강기능식품을 제공한다.

[0039] 상기 건강기능식품은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽 또는 음료의 형태로 제공될 수 있으며, 상기 건강기능식품은 유효성분인 본 발명에 따라 배양된 밀리타리스 동충하초 군사체로부터 수득된 코디세핀 조성물 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적 예를 들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0040] 상기 건강기능식품 조성물에 함유된 밀리타리스 동충하초 군사체로부터 수득된 코디세핀 조성물의 유효용량은 상기 약학조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.

[0041] 상기 건강기능식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등을 들 수 있다.

[0043] 또한, 본 발명은 밀리타리스 동충하초 군사체의 코디세핀 함량을 예측하는 방법에 있어서, (a) 박스 벤켄 계획법(Box-Behnken design)으로 목질원료의 분말도( $X_1$ ), 배지의 목질원료의 함량( $X_2$ ), 배양시간( $X_3$ )에 대하여, -1, 0 및 1로 코드화하여 실험범위를 설계하는 단계; (b) 상기 단계 (a)의 설계된 실험범위로, 상기 목질원료의 분말도, 배지의 목질원료의 투입량 및 배양시간에 대한 실험값을 얻는 단계; (c) 상기 단계 (b)의 실험값을 이용하여 하기 수학적 식 1로 표시되는 이차 회귀식 모델을 도출하는 단계; 및 (d) 상기 단계 (c)에서 도출된 수학적 식 1로 표시되는 이차 회귀식 모델을 변량분석(ANOVA)하여 상기 밀리타리스 동충하초 군사체의 코디세핀 함량을 예측하는 단계; 를 포함하는 것을 특징으로 하는 밀리타리스 동충하초 군사체의 코디세핀 함량 예측방법을 제공한다

다.

[0044] [수학식 1]

[0045]  $Y_1 = 755.3 - 58.6625X_1 + 4.79432E^{-14}X_2 - 46.6625X_3$

[0046]  $-5.66269E^{-14}X_1X_2 - 0.025X_1X_3 + 1.62475E^{-14}X_2X_3 - 160.6625X_1^2 + 0.0125X_2^2 - 206.9625X_3^2$

[0047] (상기 수학식 1에서  $Y_1$ 은 밀리타리스 동충하초 균사체의 코디세핀 함량( $\mu\text{g/mL}$ ),  $X_1$ 은 목질원료의 분말도(코드단위),  $X_2$ 는 목질원료의 함량(코드단위) 및  $X_3$ 는 배양시간(코드단위)을 의미함.)

[0048] 이때, 상기 밀리타리스 동충하초 균사체로부터 최대 코디세핀 함량을 얻기 위한 상기 목질원료의 분말도, 배지의 목질원료 함량 및 배양시간의 배양조건은 각각 100 내지 140 mesh, 20 내지 40 g/L, 50 내지 100시간인 것을 특징으로 하며, 바람직하게 상기 목질원료의 분말도, 배지의 목질원료 함량 및 배양시간의 배양조건은 각각 113.759 mesh, 11.9722 g/L, 67.8519 시간일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0050] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0052] <참고예> 공시재료

[0053] 동충하초 균사체의 코디세핀(cordycepin) 함량을 평가하기 위하여 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*; *C. militaris*)(KCCM 60304)를 한국미생물보존센터(KCCM)로부터 분양받았다(도 1).

[0055] <실시예 1> 목질원료 첨가에 따른 동충하초 균사체의 액체배양기술 확립

[0056] 1. 목질 수중에 따른 동충하초 균사체의 액체배양기술 확립

[0057] 1-1. 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*)의 목질 액체배양 및 코디세핀 함량 분석

[0058] 동충하초 균사체의 코디세핀(cordycepin) 함량 증대를 위한 배양환경 조건을 확립하기 위하여 SDB(Sabouraud dextrose broth) 액체배양 배지 (pH 4.5; glucose 20 g/L; peptone 10 g/L)를 이용하였다.

[0059] 상기 KCCM으로부터 분양받은 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*) 균주를 PDA(Potato Dextrose Agar) 평판배지에서 4℃에 보존하면서 15일 간격으로 계대배양 하였으며, 균사 생장을 위해 PDA 평판배지를 이용하여 향온배양기에서 25℃로 7일간 배양하였다. 이후, 배양된 균사의 가장자리 부위를 직경 5 mm 코르크 보러를 사용하여 3core씩 액체배지에 접종하여 24℃에서 3일간 진탕배양 (100 rpm)하여 코디세핀 함량을 분석하였으며, 코디세핀 함량은 7일간 배양하여 분석하였다.

[0060] 상기 액체배지는 100 mL 삼각플라스크에 SDB 배지 50 mL와 목질원료를 20 g/L 투입 후 121℃에서 15분간 살균한 다음 실온에서 냉각시켜 사용하였으며, 상기 목질 원료는 참나무, 소나무, 삼나무, 백합나무이며, 목질 액체배지 제조를 위하여 4종 목질원료 목부의 분쇄 및 0.15 mm 이하 (100 mesh pass)의 목분을 조제하여 이용하였다(도 2).

[0061] 또한, 배양된 밀리타리스 동충하초 균사체 및 배양액의 코디세핀 함량은 Wang *et al.* (2005)의 비색법에 의해 하기의 방법으로 측정되었다.

[0062] ① 배양이 끝난 균사체 배양액을 펠콘 튜브(falcon tube)에 옮김.

[0063] ② 원심분리 (4000 rpm, 10 min, 2회, Union 32R Plus, HANIL, Korea)를 실시함.

[0064] ③ 배양액과 균사체 분리 후 배양액은 냉장보관, 균사체는 60 ℃에서 24시간 건조시킴.

[0065] ④ 60 ℃에서 24시간 건조된 균사체에 50% 에탄올 10 mL 를 투입함.

- [0066] ⑤ 1시간동안 50 ℃에서 초음파 처리(ultrasonication) (40 kHz 250 W, JINWOO 2010, Korea)를 실시함.
- [0067] ⑥ 1000 rpm으로 20분간 원심분리 (Union 32R Plus, HANIL, Korea)한 후 상등액을 코디세핀(cordycepin) 측정  
에 이용함.
- [0068] ⑦ 안트론(Anthron) 0.2g을 90% 황산 100 mL에 녹여 준비함 (Solvent A).
- [0069] ⑧ 냉장보관된 배양액과 균사체 에탄올 추출물 1mL에 Solvent A 5mL를 투입함.
- [0070] ⑨ 100 ℃ 워터 베스(water bath)에서 10분 동안 반응시킨 후 UV-spectrophotometer (7205, ZENWAY, UK)를 이  
용하여 460 nm에서 흡광도 측정.
- [0071] ⑩ 표준 시약 (cordycepin, sigma) 검량선  $y=0.0075x+0.0378$  ( $r^2=0.9913$ )에 대입하여 코디세핀(cordycepin) 함  
량 도출.
- [0072] 1-2. 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*)의 목질 수중에 따른 액체배양의 코디세핀 함량
- [0073] *C. militaris* 균사체의 목질 수중에 따른 코디세핀 함량은 도 3에 나타냈다.
- [0074] 결과적으로, *C. militaris* 균사체에서 cordycepin은 소나무>삼나무>미치리>참나무>백합나무 순으로 확인되었으  
며, 소나무 (817.6  $\mu\text{g/mL}$ ) 및 삼나무 (722.5  $\mu\text{g/mL}$ )의 경우 cordycepin 함량이 목분을 투입하지 않은 미치리  
구 (706.4  $\mu\text{g/mL}$ )보다 높은 것으로 확인되었다. 특히 소나무 목분이 투입된 액체배지를 이용했을 때, 코디세핀  
함량은 817.6  $\mu\text{g/mL}$ 으로, 미치리구(대조구) 코디세핀 함량인 706.4  $\mu\text{g/mL}$  보다 유의적으로 높은 코디세핀 함  
량을 나타냄을 확인하였다. 따라서 동충하초 균사체에서 cordycepin 함량을 증대시키기 위하여 소나무 목분 투  
입이 효과적인 것으로 판단된다.
- [0076] **2. 목질 첨가비율에 따른 동충하초 균사체의 액체배양기술 확립**
- [0077] 2-1. 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*)의 목질 액체배양 및 코디세핀 함량 분석
- [0078] 액체배지에 목질원료를 5 g/L, 10 g/L, 20 g/L 및 30 g/L로 혼합하였으며, 목분을 투입하지 않은 액체배지(미치  
리)를 대조구로 사용하였다. 목질원료는 동충하초 균사체의 코디세핀 함량 증대에 효과적인 것으로 확인된 소나  
무 (100 mesh pass)를 이용하였다.
- [0079] 상기 액체배지는 100 mL 삼각플라스크에 50 mL SDB 액체배지를 투입하고, PDA 평판배지에서 7일간 배양된 균사  
의 가장자리 부위를 직경 5 mm 코르크 보러를 사용하여 3core씩 집중하고, 액체배양은 24℃, 100 rpm의 shaking  
incubator에서 수행하였으며, 3일간 배양된 동충하초 배양액은 코디세핀 함량 분석에 이용하였다.
- [0080] 또한, 배양된 밀리타리스 동충하초 균사체의 코디세핀 함량은 상기 실시예 1-1과 동일한 방법으로  
측정되었다.
- [0081] 2-2. 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*)의 목질 첨가비율에 따른 액체배양의 코디세핀 함량
- [0082] *C. militaris* 균사체의 소나무 목분 (100 mesh pass)의 액체배지 투입량에 따른 코디세핀 함량은 도 4에 나타냈  
다.
- [0083] 결과적으로, *C. militaris* 균사체는 미치리구, 5 g/L, 10 g/L, 20 g/L 및 30 g/L의 목분 투입 시 각각 171.7  
 $\mu\text{g/mL}$ , 181.6  $\mu\text{g/mL}$ , 360.4  $\mu\text{g/mL}$ , 770.4  $\mu\text{g/mL}$  및 140.5  $\mu\text{g/mL}$ 의 cordycepin 함량을 나타냈다. 특히 소  
나무 목분을 20 g/L 투입했을 때 가장 높은 cordycepin 함량을 나타내는 것으로 확인되었으며, 30 g/L 투입 시  
오히려 감소하는 것으로 확인되었다.
- [0085] **3. 목질 분말도에 따른 동충하초 균사체의 액체배양기술 확립**
- [0086] 3-1. 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*)의 목질 액체배양 및 코디세핀 함량 분석
- [0087] 소나무 목분의 분말도는 100 mesh pass 120 mesh on, 120 mesh pass 140 mesh on 및 140 mesh pass로 조제하여  
사용하였다(도 5).
- [0088] 상기 100 mesh, 120 mesh 및 140 mesh는 각각 0.15 mm, 0.125 mm 및 0.105 mm의 sieve size를 의미하며, sieve

를 이용한 분급을 수행하기 전, 소나무 칩을 grinder를 이용하여 분쇄하여 이용하였다. Grinder를 이용하여 목분 제조시, grinder의 내부 온도가 과열되지 않도록 주의하여 사용하였으며, 소나무 칩은 grinder에 투입하기 전에 전정가위를 사용하여 2 cm × 2 cm 이하의 크기로 제조하였다. 목분 제조 후, 함수율을 측정하여 건 중량(dry weight)을 기준으로 액체배지에 투입하였다.

[0089] 상기 소나무 목분의 분말도 조건만 달리하여 실시예 1-1과 동일한 방법으로 액체배양 하였으며, 배양된 밀리타리스 동충하초 균사체의 코디세핀 함량 또한 실시예 1-1과 동일한 방법으로 측정되었다.

[0090] 3-2. 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*)의 목질 분말도에 따른 액체배양의 코디세핀 함량

[0091] *C. militaris* 균사체의 액체배지에 투입된 소나무 목분의 분말도에 따른 코디세핀 함량은 도 6에 나타냈다.

[0092] 결과적으로, *C. militaris* 균사체 배양액에서 cordycepin 함량은 소나무 목분 100-120 mesh에서 가장 높은 수치 (770.4 µg/mL)를 나타냈으며, 미처리구 (171.7 µg/mL)보다 4.5배 증가되는 것으로 확인되었으나, 120-140 mesh와 140 mesh pass의 소나무 목분 투입은 *C. militaris* 균사체에서 유의적 차이를 나타내지 않았다.

[0093] 따라서 동충하초 균사체 배양액에서 cordycepin 함량의 증대를 위한 소나무 목분의 분말도는 100-120 mesh인 것으로 판단된다.

[0095] **<실시예 2> 목질원료 전처리에 따른 동충하초 균사체의 액체배양기술 확립**

[0096] **1. 전처리된 목질 첨가에 따른 동충하초 균사체의 액체배양기술 확립**

[0097] 1-1. 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*)의 목질 액체배양 및 코디세핀 함량 분석

[0098] 액체배지에 투입된 전처리된 소나무 목분이 동충하초 균사체의 코디세핀 함량에 미치는 영향을 평가하였다. 소나무 목분(100 mesh pass)의 전처리 방법은 1% NaOH, hot water 및 에탄올(ethanol) 처리를 적용하였다.

[0099] 상기 1% NaOH와 ethanol 전처리는 소나무 목분(100 mesh pass)과 전처리액을 부피기준 1:20 비율로 혼합하여 30℃ shaking incubator에서 overnight로 반응시켰으며, 반응이 종료된 후 Whatman filter paper No. 2를 사용하여 감압여과 후 잔사를 60℃ 건조기에서 72시간 건조하여 사용하였다. 또한, 상기 Hot water 전처리는 소나무 목분(100 mesh pass)과 증류수를 부피기준 1:20으로 혼합 후 121℃ autoclave에서 1시간 동안 반응시킨 후 Whatman filter paper No. 2를 사용하여 감압 여과하였으며, 여과 후 잔사를 60℃ 건조기에서 72시간 건조하여 사용하였다. 전처리된 소나무 목분은 도 7에 나타내었다.

[0100] 상기 소나무 목분의 전처리 조건만 달리하여 실시예 1-1과 동일한 방법으로 액체배양 하였으며, 배양된 밀리타리스 동충하초 균사체의 코디세핀 함량 또한 실시예 1-1과 동일한 방법으로 측정되었다.

[0101] 1-2. 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*)의 목질 전처리에 따른 액체배양의 코디세핀 함량

[0102] *C. militaris* 균사체의 액체배지에 투입된 소나무 목분의 전처리 용매에 따른 코디세핀 함량은 도 8에 나타냈다.

[0103] 결과적으로, 소나무 분말을 1% NaOH로 전처리한 후 잔사를 동충하초 액체배지에 투입했을 때, hot water 및 ethanol 전처리한 소나무 분말을 투입했을 때 보다 높은 코디세핀 함량을 나타냄을 확인하였다.

[0104] 이러한 밀리타리스 동충하초 균사체에서 코디세핀 함량의 증대는 소나무 목분의 알칼리처리로 인하여 페놀 물질 제거를 유도하고, 이로 인하여 동충하초 균사체 배양액의 cordycepin 함량을 증대시켰을 것으로 추측된다.

[0106] **2. 전처리된 목질 분말도에 따른 동충하초 균사체의 액체배양기술 확립**

[0107] 2-1. 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*)의 목질 액체배양 및 코디세핀 함량 분석

[0108] 1% NaOH로 전처리된 소나무 목분의 분말도는 100 mesh pass 120 mesh on, 120 mesh pass 140 mesh on 및 140 mesh pass로 조제하여 사용하였다.

[0109] 상기 100 mesh, 120 mesh 및 140 mesh는 각각 0.15 mm, 0.125 mm 및 0.105 mm의 sieve size를 의미하며, sieve를 이용한 분급을 수행하기 전, 소나무 칩을 grinder를 이용하여 분쇄하였다. Grinder를 이용하여 목분 제조시, grinder의 내부 온도가 과열되지 않도록 주의하여 사용하였다. 목분 제조 후, 함수율을 측정하여 건 중량

(dry weight) 기준으로 액체배지에 투입하였다.

[0110] 상기 소나무 목분의 분말도 조건만 달리하여 실시예 1-1과 동일한 방법으로 액체배양 하였으며, 배양된 밀리타리스 동충하초 균사체의 코디세핀 함량 또한 실시예 1-1과 동일한 방법으로 측정되었다.

[0111] 2-2. 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*)의 목질 분말도에 따른 액체배양의 코디세핀 함량

[0112] *C. militaris* 균사체의 액체배지에 투입된 전처리된 소나무 목분의 분말도에 따른 코디세핀 함량은 도 9에 나타났다.

[0113] 결과적으로, 전처리된 소나무 목분의 사용이 100-120 mesh pass일 때 동충하초 균사체 배양액의 cordycepin 함량이 가장 높은 것으로 확인되었다.

[0114] 따라서, 전처리된 소나무 목분을 100-120 mesh pass 분말도로 액체배지에 투입했을 때 동충하초 균사체 배양액의 cordycepin 함량 변화에 영향을 미치는 것으로 확인되었다.

[0116] <실시예 3> 균사체의 최대 코디세핀 함량을 위한 액체배양 배지의 최적 제어 조건 도출

[0117] 상기 실시예 1 내지 2에서 도출된 결과를 이용하여 밀리타리스 동충하초 균사체의 코디세핀 함량 증대를 위한 1% NaOH로 전처리된 소나무 목분의 투입조건을 최적화하기 위하여 최적 배지 조성 제어 조건은 반응 표면 모델(Response Surface Model; RSM)의 박스 벤켄 계획법(Box-Benkhen design; BBD) 실험설계를 이용하였으며, 프로그램은 Design-Expert Software Version 12를 이용하였다.

[0118] 고정 인자는 밀리타리스 동충하초(*C. militaris*) 균사체이며, 변수는 목질 분말조건(Particle size;  $X_1$ ), 배지의 목질 투입량(Input weight;  $X_2$ ), 배양시간(Incubation time;  $X_3$ )으로 설정하였다. 이때, 변수의 범위는 예비 실험을 통하여 설정하였으며, BBD 실험 설계는 하기 표 1에서와 같이 총 17조건으로 설정하였다.

표 1

| Run                         | 독립변수(Independent variables)<br>(coded) |       |       | 독립변수(Independent variables)<br>(actual) |        |       | <i>C.militaris</i> 균사체 코디세핀<br>함량(cordycepin Content), $\mu\text{g/mL}$ |
|-----------------------------|----------------------------------------|-------|-------|-----------------------------------------|--------|-------|-------------------------------------------------------------------------|
|                             | $X_1$                                  | $X_2$ | $X_3$ | $X_1$                                   | $X_2$  | $X_3$ |                                                                         |
| 1                           | 0                                      | -1    | -1    | 120                                     | 5      | 24    | 595.0                                                                   |
| 2                           | 0                                      | 0     | 0     | 120                                     | 20     | 72    | 755.3                                                                   |
| 3                           | 0                                      | 0     | 0     | 120                                     | 20     | 72    | 755.3                                                                   |
| 4                           | -1                                     | 0     | 1     | 100                                     | 20     | 120   | 399.7                                                                   |
| 5                           | -1                                     | 1     | 0     | 100                                     | 10     | 72    | 653.3                                                                   |
| 6                           | 0                                      | 0     | 0     | 120                                     | 20     | 72    | 755.3                                                                   |
| 7                           | 1                                      | 0     | -1    | 140                                     | 30     | 24    | 375.7                                                                   |
| 8                           | 0                                      | 0     | 0     | 120                                     | 20     | 72    | 755.3                                                                   |
| 9                           | 1                                      | -1    | 0     | 140                                     | 30     | 72    | 536.0                                                                   |
| 10                          | -1                                     | 0     | -1    | 100                                     | 20     | 24    | 493.0                                                                   |
| 11                          | 0                                      | 0     | 0     | 120                                     | 20     | 72    | 755.3                                                                   |
| 12                          | 0                                      | -1    | 1     | 120                                     | 5      | 120   | 501.7                                                                   |
| 13                          | 0                                      | 1     | -1    | 120                                     | 10     | 24    | 595.0                                                                   |
| 14                          | 1                                      | 1     | 0     | 140                                     | 30     | 72    | 536.0                                                                   |
| 15                          | 1                                      | 0     | 1     | 140                                     | 30     | 120   | 282.3                                                                   |
| 16                          | 0                                      | 1     | 1     | 120                                     | 10     | 120   | 501.7                                                                   |
| 17                          | -1                                     | -1    | 0     | 100                                     | 10     | 72    | 653.3                                                                   |
| Independent variables       |                                        |       |       |                                         | Levels |       |                                                                         |
|                             |                                        |       |       |                                         | -1     | 0     | 1                                                                       |
| $X_1$ : Particle size, mesh |                                        |       |       |                                         | 100    | 120   | 140                                                                     |
| $X_2$ : Input weight, g     |                                        |       |       |                                         | 10     | 20    | 30                                                                      |
| $X_3$ : Incubation time, h  |                                        |       |       |                                         | 24     | 72    | 120                                                                     |

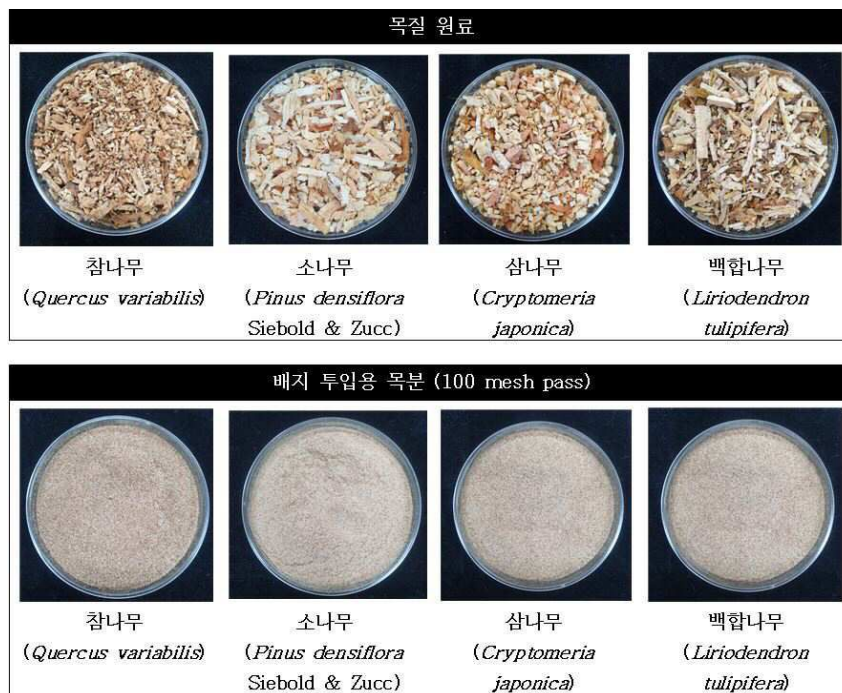
- [0121] 도 10은 각 인자간의 상호관계를 반응 표면으로 나타낸 3차원 반응 표면 그래프, 도 11은 유도된 2차 다항방정식 회귀식 모델 및 도 12는 상기 2차 회귀식 모델을 변량분석(ANOVA)하여 상기 밀리타리스 동충하초 균사체의 코디세핀 함량 예측을 나타낸 것으로, 결과적으로 밀리타리스 동충하초 균사체의 최대 코디세핀 함량은 760.455  $\mu\text{g/mL}$ 이며, 이때의 분말도는 113.759 mesh, 투입량은 11.9722 g/L, 배양 기간은 67.8519 시간인 것으로 확인되었다.
- [0122] 도출된 예측식을 이용하여 분말도, 투입량, 배양시간의 데이터로부터 동충하초 균사체의 코디세핀 함량을 예측할 수 있을 것으로 판단되며, 이때의 예측값은 실측값과 P value <0.0001의 신뢰도를 나타내는 것으로 확인되었다.
- [0124] <실시에 4> 동충하초 균사체의 목질 액체배지와 LED 광의 복합 배양 기술 확립
- [0125] 1. 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*)의 목질 액체배지 및 LED 광의 복합 배양 및 코디세핀 함량 분석
- [0126] 목질 액체배지와 LED 단일광의 복합 공정에 따른 동충하초 균사체 코디세핀 함량 변화를 평가하기 위하여 shaking incubator에 설치된 LED 복합광을 이용하였다.
- [0127] 상기 복합광은 red\*blue(660+450 nm) 3:7 비율을 사용하였으며, 광스펙트럼측정기 (LI-180)을 이용하여 단일광을 혼합(복합광 혼합은 LED 전문업체인 빛솔 LED에서 조절 및 검증)하였다. 광원은 배양액의 약 30 cm 높이에 설치되었으며, 광도는  $64.9\sim 108.0 \text{ pmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 로 설정하여 12 h/day로 조사하였다. 대조군으로 암배양, 형광등 및 UV-A 조건으로 배양하였다.
- [0128] 또한, 상기 목질 액체배지는 1% NaOH 처리된 소나무 목분(100-120 mesh)을 20 g/L 투입하였다.
- [0129] 상기 목질 액체배지 및 LED 광의 조건에 따라 실시예 1-1과 동일한 방법으로 액체배양 하였으며, 배양된 밀리타리스 동충하초 균사체의 코디세핀 함량 또한 실시예 1-1과 동일한 방법으로 측정되었다.
- [0130] 2. 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*)의 목질 액체배지 및 LED 광의 복합 배양에 따른 코디세핀 함량
- [0131] *C. militaris* 균사체의 전처리된 소나무가 투입된 액체배지 및 LED 광의 복합 배양에 따른 배양액의 코디세핀 함량은 도 13에 나타냈다.
- [0132] 결과적으로, Red\*blue 혼합광을 액체배양에 적용했을 때, 암배양, 형광등 및 UV-A보다 유의적으로 높은 cordycepin 함량을 나타내는 것으로 확인되었으며, 소나무 목분 및 1% NaOH 전처리된 소나무 목분을 액체배지에 투입했을 때 암배양, 형광등 및 UV-A 적용했을 때보다 cordycepin 함량이 높은 것으로 확인되었지만, red\*blue 혼합광보다는 낮은 cordycepin 함량을 나타내었다.
- [0133] 이로써, 1% NaOH 전처리된 소나무 목분을 액체배지에 투입했을 때보다 LED red\*blue 혼합광을 복합적용했을 때 배양액의 cordycepin 함량이 4851.3  $\mu\text{g/mL}$ 으로 유의적으로 증가하며, 1% NaOH 전처리된 소나무 목분을 이용한 목질 액체배지와 LED광의 복합 공정은 LED red\*blue 혼합광을 *C. militaris* 액체배양에 적용했을 때 보다 cordycepin 함량이 1.2배 증가하는 것으로 확인되었다.
- [0134] 따라서 전처리된 소나무를 이용한 목질 액체배지와 LED 광의 복합 배양 적용이 밀리타리스 동충하초의 코디세핀 함량 증대에 효과적임을 확인하였다.

## 도면

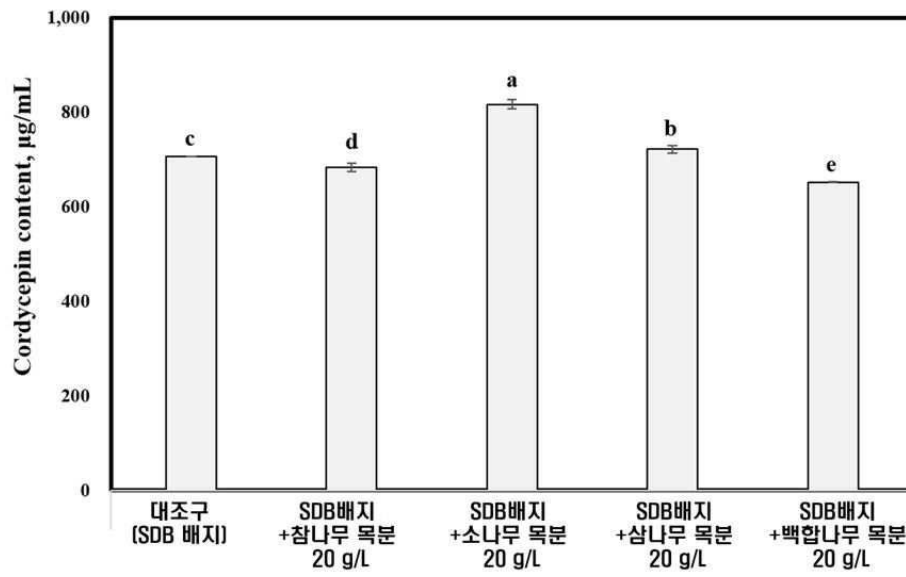
### 도면1



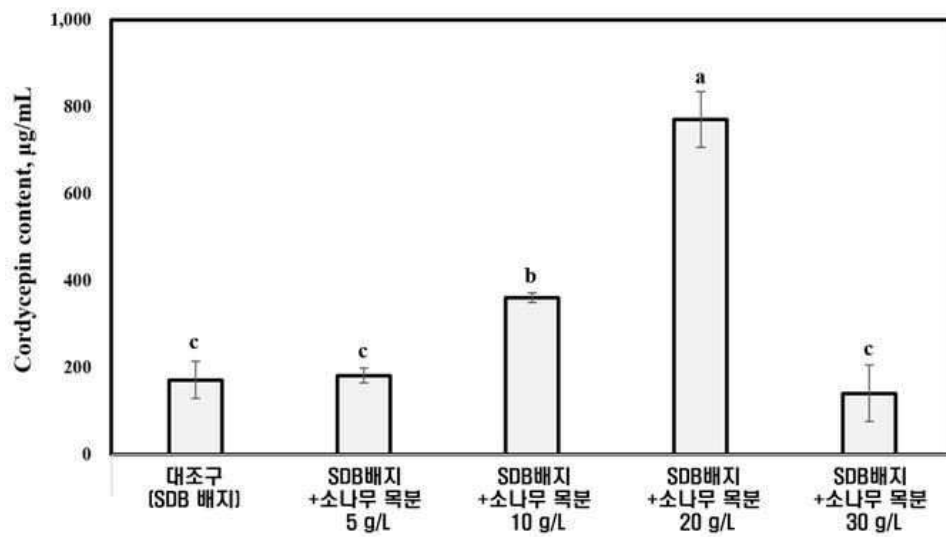
### 도면2



도면3



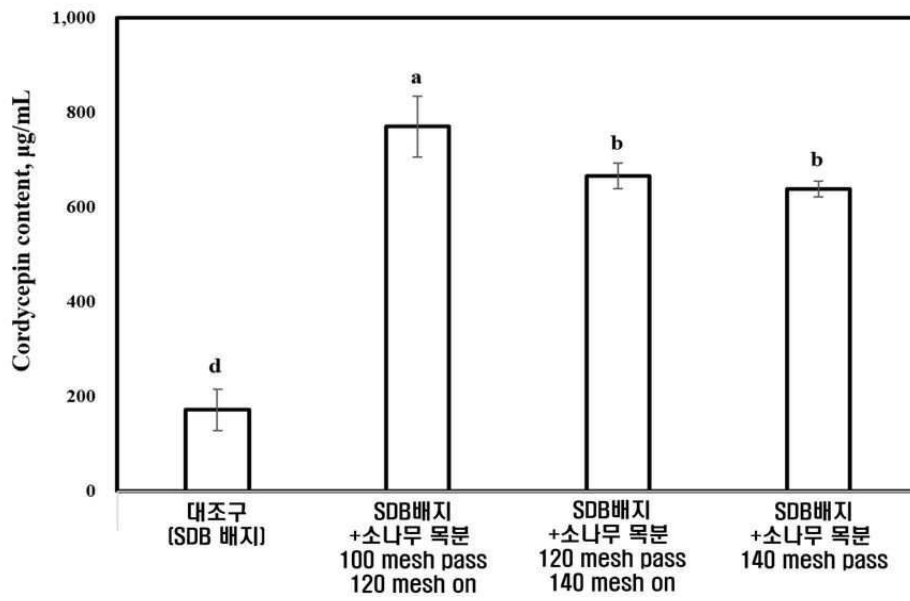
도면4



도면5



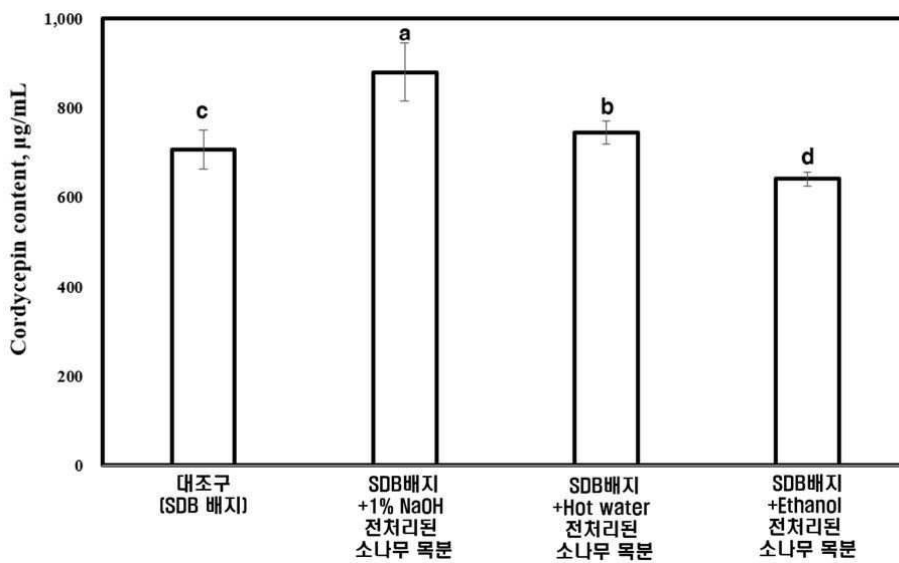
도면6



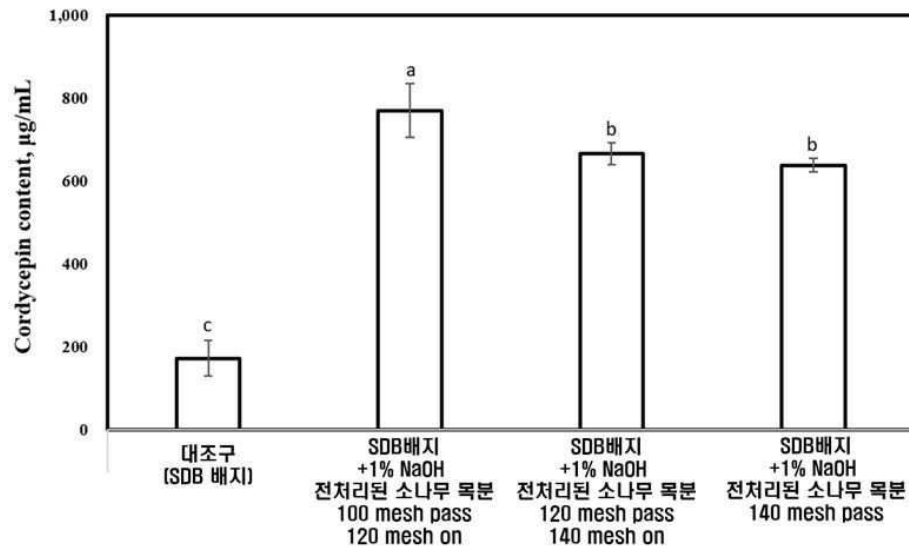
도면7



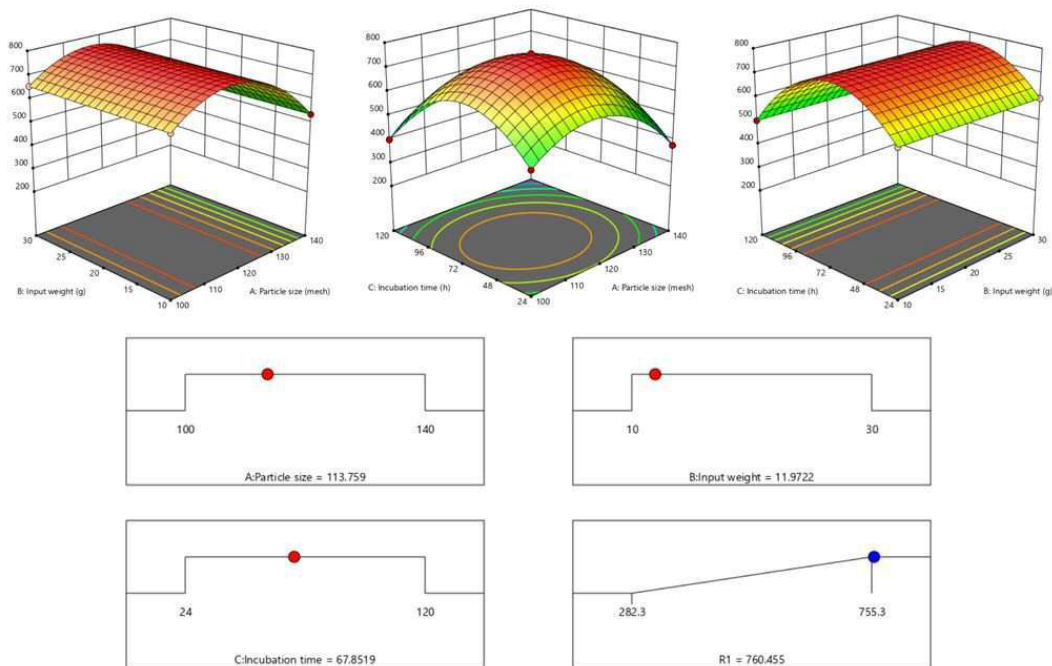
도면8



도면9



도면10



도면11

|              |                                   |
|--------------|-----------------------------------|
| R1           | =                                 |
| +755.30000   |                                   |
| -58.66250    | * Particle size                   |
| +4.79432E-14 | * Input weight                    |
| -46.66250    | * Incubation time                 |
| -5.66269E-14 | * Particle size * Input weight    |
| -0.025000    | * Particle size * Incubation time |
| +1.62475E-14 | * Input weight * Incubation time  |
| -160.66250   | * Particle size <sup>2</sup>      |
| +0.012500    | * Input weight <sup>2</sup>       |
| -206.96250   | * Incubation time <sup>2</sup>    |

도면12

| Source            | Sum of Squares | df | Mean Square | F-value   | p-value  |             |
|-------------------|----------------|----|-------------|-----------|----------|-------------|
| <b>Model</b>      | 3.513E+05      | 9  | 39036.72    | 1.093E+08 | < 0.0001 | significant |
| A-Particle size   | 27530.31       | 1  | 27530.31    | 7.708E+07 | < 0.0001 |             |
| B-Input weight    | 0.0000         | 1  | 0.0000      | 0.0000    | 1.0000   |             |
| C-Incubation time | 17419.11       | 1  | 17419.11    | 4.877E+07 | < 0.0001 |             |
| AB                | 0.0000         | 1  | 0.0000      | 0.0000    | 1.0000   |             |
| AC                | 0.0025         | 1  | 0.0025      | 7.00      | 0.0331   |             |
| BC                | 0.0000         | 1  | 0.0000      | 0.0000    | 1.0000   |             |
| A <sup>2</sup>    | 1.087E+05      | 1  | 1.087E+05   | 3.043E+08 | < 0.0001 |             |
| B <sup>2</sup>    | 0.0007         | 1  | 0.0007      | 1.84      | 0.2168   |             |
| C <sup>2</sup>    | 1.804E+05      | 1  | 1.804E+05   | 5.050E+08 | < 0.0001 |             |
| <b>Residual</b>   | 0.0025         | 7  | 0.0004      |           |          |             |
| Lack of Fit       | 0.0025         | 3  | 0.0008      |           |          |             |
| Pure Error        | 0.0000         | 4  | 0.0000      |           |          |             |
| <b>Cor Total</b>  | 3.513E+05      | 16 |             |           |          |             |

도면13

