

눈꽃동충하초의 배양적 특성

강복희¹, 이상한³, 허상선⁴, 신용규⁵, 이동선⁶, 장홍배⁷, 송봉준⁸, 이진만^{1,2†}

¹호서대학교 식품기능안전연구센터 및 기초과학연구소, ²호서대학교 식품생물공학과,
³경북대학교 식품공학과, ⁴충부대학교 식품생명과학과, ⁵(주)바이온 생물공학연구소,
⁶제주대학교 생명공학부, ⁷한국폴리텍바이오대학교 바이오품질관리과, ⁸종근당건강(주)

The Cultural Characteristics of *Paecilomyces tenuipes*

Bok-Hee Kang¹, Sang-Han Lee, Sang-Sun Hur³, Yong-Kyu Shin⁴, Dong-Sun Lee⁵,
Hung-Bae Chang⁶, Bong-Jun Song⁷ and Jin-Man Lee^{1,2†}

¹Center for Food Function & Safety, and Basic Science Institute, Hoseo University, Asan 336-795, Korea

²Department of Food & Biotechnology, Hoseo University, Asan 336-795, Korea

³Department of Food Science & Technology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

⁴Department of Food Science & Biotechnology, Joongbu University, Kumsan 312-702, Korea

⁵Research Institute of Biotechnology, Bion Co., Ltd., Andong 760-380, Korea

⁶Faculty of Biotechnology, College of Applied Life Sciences, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

⁷Department of Bio Quality Control, Korea Bio Polytechnic College, Nonsan 320-905, Korea

⁸Chong Kun Dang Healthcare Corp. Research Center, Dangjin 343-827, Korea

Abstract

This study was conducted to investigate the cultural characteristics of *Paecilomyces tenuipes* PJ-1 separated from the nature. We investigated the effect of media, pH and temperature in growth of *Paecilomyces tenuipes* PJ-1 on solid culture media and the effect of inoculum size, glass beads in liquid culture condition. *Paecilomyces tenuipes* showed the most favorable growth on PDA among 5 different media. The optimum growth pH and temperature were at pH 6.0 and 25°C on solid culture. Mycelial growth of *P. tenuipes* decreased rapidly above 35°C and under 15°C. In liquid culture, the optimum inoculum size was 10.0% and the SED and PMV value were increased with adding glass bead and glass bead size in the range of glass bead 0~50 ea and size 3, 5 mm.

Key words : *Paecilomyces tenuipes*, cultural condition, media

서 론

동충하초는 다양한 곤충기생성 균류가 주로 곤충에 침입하여 이를 기주(host)로 자실체(fruit body)를 형성하거나 곤충 몸에 포자를 형성하는 균류의 일종으로 겨울에는 곤충의 체내에서 양분을 흡수하여 곤충을 죽게 한 후 여름이 되면 층체 밖으로 버섯을 형성한다는 뜻에서 붙여진 명칭이다(1). 즉, 동충하초는 곤충의 애벌레, 번데기, 성충에 포자가 침입하여 기주 안에서 내성 균핵을 만든 후 적절한 온도

와 습도에서 몸 밖으로 자실체를 형성하며 고대 중국에서부터 결핵, 천식, 마약중독 해독, 자양강장제 등의 한약재로 사용되어 왔다(2-4). 예로부터 동충하초는 증류본초와 본초 비요를 비롯한 중의학문헌에 보폐보신(補肺補腎, 폐를 보하고 몸의 영양을 보충함), 지혈화담(止血化痰, 피를 멎게 하고 담을 삭히게 함), 비정익기(秘精益氣, 정기가 빠져나가지 않도록 하며 허약한 원기를 도움) 등의 효능이 있으며 맛은 달(甘)고 따듯(溫)하며 향(香)이 있는 것으로 기록되어 있다(5,6).

동충하초는 자낭균강(Ascomycotina), 맥각균목(Clavicipitaceae)에 속하며 전세계적으로 약 300여종이 보고되어 있으며,

†Corresponding author. E-mail : jmlee@hoseo.edu,
Phone : 82-41-540-5645, Fax : 82-41-544-4151

국내에는 약 70여종이 알려져 있으며(7), 항균, 항산화능, 지질대사 개선작용, 면역증강 및 항암작용 등의 다양한 생리활성이 밝혀졌다(8). 동충하초의 가공 및 이용과 관련된 연구로는 동충하초를 이용한 고추장(8), 누에동충하초분말 함유 돈육 패티(9), 동충하초 첨가 증편(10) 등이 있으며, 시중에 판매되고 있는 제품으로는 동충하초 자실체 건조 제품, 분말, 환, 캡슐, 엑기스 등이 있다.

국내에서 생산되는 동충하초의 대부분은 눈꽃동충하초 (*Paecilomyces tenuipes*)이며, 최근에는 번데기 동충하초 (*Cordyceps militaris*)의 재배가 점차 늘어나고 있는 추세이다(11). 동충하초의 다양한 생리활성이 밝혀짐에 따라 관심이 고조되고 수요는 증가하고 있으나, 자연산 동충하초는 채집이 까다롭고 수량이 적어 대량확보가 어려운 실정이다(12). 이와 관련하여 동충하초의 인공재배 연구가 계속적으로 진행되어 왔으며, 배양과 관련된 연구로는 풍뎅이동충하초의 군사 생장 조건 규명(13), 눈꽃동충하초의 형태 및 배양조건(12), 눈꽃동충하초의 자실체 유도를 위한 배양조건(14), 눈꽃동충하초의 배양적 특성 및 생리활성(15) 등이 있으며 이외에도 번데기 동충하초, 붉은자루동충하초 등 다양한 동충하초의 배양특성 및 재배 최적화 연구가 진행중이다. 본 연구에서는 국내에서 채집된 눈꽃동충하초균의 인공재배를 위한 기초자료 확보를 위해 고체 및 액체배양 조건에서 군사 배양 조건에 따른 군사 생장 특성을 살펴보았다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 실험에 사용된 균주는 경북 봉화 및 청송 일대의 계곡 부근 및 야산에서 수집한 동충하초균로부터 순수분리하여 군사생장속도 및 군사 치밀도 등을 조사하여 비교적 생장력이 우수한 PJ-1 (*Paecilomyces tenuipes*)을 선발하여 공식균주로 사용하였다. 분리된 균주는 PDA (Potato Dextrose Agar, Difco, Co.) 사면배지에 1개월 간격으로 계대배양하였으며 4°C에 보관하면서 사용하였다.

고체 배지 제조 및 배양 조건

PJ-1의 계대 보관시에는 PDA배지를 사용하여 220 시험관에 사면배양하였으며, 눈꽃동충하초의 배양시에는 온도 24±1°C, 습도 60%의 growth chamber에서 배양하였다. 군사 배양에 적합한 조건을 알아보기 위해 pH, 온도, 배지 종류를 달리하여 다양한 배양조건에서의 생장 특성을 조사하였다. pH에 따른 군사생장을 알아보기 위해 1 N NaOH와 1 N HCl을 사용하여 배지의 pH를 5.0에서 7.0 사이로 조절하였으며, 온도 5, 10, 15, 20, 35, 30, 35, 40°C의 조건으로 10일간 암배양하면서 군사의 생장정도와 밀도를 조사하였다. 배지

종류에 따른 군사 생장을 살펴보기 위해 GPA (Glucose peptone agar), PDA (Potato dextrose agar), YM (Yeast malt agar), MCM (Mushroom complete media) 및 Czapek (Czapek-Dox agar) 배지를 사용하여 생육 정도를 관찰하였다.

액체 배지 제조 및 배양 조건

액체배양을 위해서는 PDB 배지를 100 mL와 500 mL 삼각플라스크에 각각 15 mL와 150 mL 씩 넣어 121°C에서 20분간 살균 후 사용하였다. 액체 배양시에는 고체평판배지 또는 사면배지로부터 버섯이식용 칼을 사용하여 군사체를 분취하여 5 mm glass bead 5개씩 넣은 18 mm 시험관에 첨가하여 voltex mixer에서 10분간 부분 마쇄한 군사체를 7일간 1차 전배양(Vision Scientific Co. Ltd. rotary shaker/25°C, 200 rpm)한 것을 종균 접종량을 5%로 하여 subculture 한 후 액체배양 실험용 종균으로 사용하였다. Glass bead 첨가에 따른 군사생육도를 알아보기 위해 3 mm, 5 mm 크기의 비이드를 각각 0, 10, 20, 30, 50개씩 500 mL 삼각플라스크 내 PDB 배지 150 mL와 함께 첨가하여 고압멸균한 후 눈꽃동충하초 균총 접종 후 25°C에서 배양하였다.

생육도 측정

버섯 군사체의 생육도의 측정에서 군사체의 침전상태 (Sedimentation, SED)는 액체배양물을 10 mL의 시험관에 분주하여 30분 경과 후 침전정도를 %로 측정하였으며, packed mycelia volume (PMV) 측정은 4,000 rpm에서 30분간 원심분리(Vision Scientific Co. Ltd. VS-5000, Horizontal Centrifuge)한 뒤 상등액의 부피를 측정하여 침전물의 부피를 상대적적인 %로 나타내어 생육도를 측정하였다.

결과 및 고찰

눈꽃동충하초의 군사 및 군사체 생육도 검토

분리한 동충하초 균의 생육도 조사를 위해 고체배지에서 일차별 생육도를 측정하였다. 25°C, 습도 60%에서 눈꽃동충하초균을 고체배양한 결과 초기 균체의 직경 12 mm에서 4일차에 군사체 직경이 36 mm이었으며, 배양 5일차에 45 mm로 급격한 군사신장이 일어나다가 8일차 이후부터는 생육속도가 둔화되는 경향을 보였다(Table. 1).

Table 1. The growth pattern of *Paecilomyces tenuipes* PJ-1 in solid medium (PDA)

Culture times (days)	0	2	4	5	6	7	8	9	10	11
Growth (mm)	12	12	36	45	68	75	80	84	87	89

눈꽃동충하초(*Paecilomyces tenuipes*)의 자실체(fruit body) 배양에서 액체배양균의 활착 성공여부는 기질의 친화성과 눈꽃동충하초버섯의 종균상태의 정도가 중요한 성공인자 중의 하나임을 감안할 때 종균의 질(quality)과 양(quantity)의 확보를 위해서는 우수한 종균배양은 필수적인 과정으로서 동충하초자실체 생산의 성공과는 밀접한 관계가 있다. PDB 액체배지에서 종균배양의 상태와 생육도를 검토한 결과, PMV가 배양일차에 따라 1일차에 1%, 3일차에 4%로 증가하다가 7일차 이후부터는 11%로서 최대의 생육을 나타내었다. 따라서, 균의 질(quality)과 양(quantity)적인 측면에서 7일차 생육이 가장 양호함을 알 수 있었다(Table. 2).

Table 2. The growth pattern of *Paecilomyces tenuipes* PJ-1 in liquid medium (PDB)

Culture times (Days)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SED (%)	5	5	20	70	90	100	100	100	100	100
PMV (%)	0	1	3	4	6	9	9	11.0	11.0	11.0

배지 종류, pH 및 온도에 따른 고체 배양특성 조사

눈꽃동충하초 균사체 생육을 위한 적정 배지를 알아보기 위해 Table 3과 같이 GPA, PDA, YM, MCM, Czapek 총 5가지 배지를 사용하여 고체배양을 실시한 결과 균사체 생육이 가장 양호한 배지는 PDA로 나타났으며, 다음으로 GPA, MCM, Czapek, YM 배지 순이었다(Table 4). 균사의 밀도는 PDA 배지에서 가장 높은 정도를 나타내었으며, Czapek 배지에서는 가장 낮은 밀도를 보였다.

Table 3. The composition of cultural media

Nutritional medium	Reagents (g/L)				
	GPA	PDA	YM	MCM	Czapek
Potato	-	200	-	-	-
Dextrose	40	20	10	-	-
Peptone	5	-	5.0	2.0	-
Sucrose	-	-	-	-	30
MgSO ₄ ·7H ₂ O	-	-	-	0.5	5.0
KH ₂ PO ₄	-	-	-	0.5	-
K ₂ HPO ₄	-	-	-	1.0	-
Yeast extract	-	-	3.0	-	-
Malt extract	-	-	3.0	2.0	-
NaNO ₃	-	-	-	-	2.0
KCl	-	-	-	-	0.5
FeSO ₄ ·7H ₂ O	-	-	-	-	0.01
Agar	15	5	15	5	115

GPA: Glucose Peptone Agar PDA: Potato dextrose agar, YM: Yeast malt agar, MCM: Mushroom complete media, Czapek: Czapek-Dox agar.

Table 4. Effect of mycelial growth of *Paecilomyces tenuipes* PJ-1 on different media at 25°C for 10 days

	Media				
	GPA	PDA	YM	MCM	Czapek
Colony diameter (mm/10 days)	60.5	68.3	56.5	59.0	57.0
Mycelial density ¹⁾	++	+++	++	++	+

¹⁾+: thin, ++: moderate, +++: compact.

²⁾Petri dish (8.7cm).

pH에 따른 눈꽃동충하초버섯의 생육정도를 알아보기 위해 배지의 pH를 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0으로 달리하여 10일간 배양한 결과 pH 6.0에서 85.0 mm/10일로 가장 양호하였으며, 중성영역보다는 산성영역인 pH 6.0이하에서는 균사생장과 밀도가 감소하는 경향을 보였다. 균사의 밀도는 pH 6.0 이상에서는 모두 높게 나타났으며 pH 5.5 이하부터는 약간 낮은 경향을 나타내었다.(Table 5). Lee 등(13)의 풍뎅이동충하초 실험에서 pH를 4.0~9.0 범위로 달리하여 균사생육을 시험한 결과, 풍뎅이 동충하초는 pH 7.5~9의 알카리성 범위에서 우수한 균사생장을 나타내었음을 보고한 바 있다.

Table 5. Effect of mycelial growth of *Paecilomyces tenuipes* PJ-1 on different pH at 25°C for 10 days

	pH				
	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0
Colony diameter (mm/10 days)	67.5	80.5	85.0	84.0	73.5
Mycelial density ¹⁾	++	++	+++	+++	+++

¹⁾+: thin, ++: moderate, +++: compact.

²⁾Petri dish (8.7cm).

³⁾PDA: Potato Dextrose Agar.

동충하초버섯균의 균사생장에 미치는 온도의 영향을 조사한 결과, 25°C에서 균사생장과 밀도가 가장 양호하였다. 균사생장은 30°C이상과 15°C이하의 저온에서도 생장은 되나 매우 미약하였으며, 40°C이상에서는 생육이 정지되는 경향을 나타내었다(Table. 6). Lee 등(13)의 풍뎅이동충하초 균사생장 조건 연구에서 온도를 10~35°C로 다르게 하여 11일간 고체배양하였을 때 25°C가 최적 배양온도인 것으로 보고되었다.

Table 6. Effect of mycelial growth of *Paecilomyces tenuipes* PJ-1 on different temperature for 10 days

	Temperature (°C)							
	5	10	15	20	25	30	35	40
Colony diameter (mm/10 days)	20.0	27.0	45.5	65.3	68.0	60.0	43.3	0
Mycelial density ¹⁾	+	+	++	++	+++	++	+	-

¹⁾+: thin, ++: moderate, +++: compact.

²⁾Petri dish (8.7cm)

³⁾PDA: Potato Dextrose Agar media

접종량 및 비드(Glass bead) 사용에 따른 액체배양특성 조사

배양시 종균의 질(quality)과 양(quantity)의 확보를 위해서는 우수한 종균배양은 필수적인 과정으로 동충하초 자실체 생산의 성공과 밀접한 관계가 있다. 따라서, 기본배지에서 1차적으로 접종량에 따른 종균배양의 상태와 생육도를 PDB 배지 상에서 검토한 결과 접종량(inoculum size) 10% 사용시 가장 양호한 결과를 나타냈다(Table 7.).

Table 7. Cultural characteristics of mycelia of *Paecilomyces tenuipes* PJ-1 on different inoculum volume

Inoculum size (%)	0	1	2.5	5.0	7.5	10.0	15.0
SED ¹⁾ (%)	5	5	20	70	90	100	100
PMV ²⁾ (%)	0	4	9	11	12	13	12

¹⁾SED: Sedimentation, ²⁾PMV: Packed mycelia volume.

비이드 첨가에 따른 균사체의 생육 및 형태를 알아보기 위하여 비이드의 크기를 직경 3 mm와 5 mm로 다르게 하여 PDB 배지에서 액체배양한 결과(Table 8), 비이드 첨가 개수가 0개에서 50개로 증가할수록 SED (Sedimentation, %)가 31%에서 56%로 증가하여 균사체의 생육이 양호한 것으로 나타났으며, 비이드 크기는 3 mm보다 큰 5 mm를 첨가하여 배양하였을 때 SED와 PMV (packed mycelia volume) 값이 모두 높은 결과를 나타내었다. 따라서, 균사체 배양시 적절한 양과 크기의 비이드 사용시 pulpy한 균사체의 생육을 유도할 수 있을 것으로 사료된다. Nam 등(17)에 의한 눈꽃동충하초균의 액체배양 실험에서 비이드를 1~10 mm로 사이즈를 다르게 첨가하여 배양을 실시한 결과 비이드 크기가 6 mm 일 때 최적 성장율을 나타내었다고 보고하였다. 또한, 비이드 크기가 6 mm 이상 커질수록 균사덩어리는 작아지는 경향을 나타내나 9 mm 이상인 경우 진탕배양시 비이드의 충격으로 플라스크가 깨질 우려가 있었으며 회전시 진동에 의한 소음이 심해 이용이 불가능하였다고 하였다.

Table 8. Effect of addition of the glass beads on morphological growth in liquid culture

Glass beads	Glass beads No. (3 mm)					Glass beads No. (5 mm)				
	0	10	20	30	50	5	10	20	30	50
SED ¹⁾ (%)	31	33	38	45	56	52	82	97	100	100
PMV ²⁾ (%)	8.5	8.5	9.0	9.5	9.8	10	10	9.5	12	13

¹⁾SED: Sedimentation, ²⁾PMV: Packed mycelia volume.

요 약

본 연구에서는 야생에서 분리한 눈꽃동충하초균의 배양

적 특성을 알아보기 위해 배양특성 시험을 수행하였다. 25°C, 습도 60%에서 눈꽃동충하초균을 고체배양한 결과 초기 균사의 직경 12 mm에서 4일차에 균사체 직경이 36 mm 이었으며, 배양 5일차부터 급격한 균사신장이 일어나다가 8일차 이후부터는 생육속도가 서서히 감소되는 경향을 보였다.

PDB 액체배지에서 종균배양의 상태와 생육도를 검토한 결과, PMV가 배양일차에 따라 1일차에 1%, 3일차에 4%로 증가하다가 7일차 이후부터는 11%로서 최대의 생육을 나타내었다. 따라서, 균의 질(quality)과 양(quantity)적인 측면에서 7일차 생육이 가장 양호함을 알 수 있었다. GPA, PDA, YM, MCM, Czapek 총 5가지 배지를 사용하여 고체배양을 실시한 결과 균사체 생육이 가장 양호한 배지는 PDA로 나타났다.

pH에 따른 눈꽃동충하초 버섯의 생육정도를 알아보기 위해 배지의 pH를 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0으로 달리하여 10일간 배양한 결과 균사체의 직경이 pH 6.0에서 85.0 mm/10일로 가장 양호하였으며, 중성영역보다는 산성영역인 pH 6.0 이하에서는 균사생장과 밀도가 감소하는 경향을 보였다. 동충하초버섯균의 균사생장에 미치는 온도의 영향을 조사한 결과, 25°C에서 균사생장과 밀도가 가장 양호하였다. 접종량에 따른 종균배양의 상태와 생육도를 검토한 결과 접종량 10% 사용시 가장 양호한 결과를 나타내었다. 비이드 첨가에 따른 균사체의 생육 및 형태를 알아보기 위하여 비이드의 크기를 직경 3 mm와 5 mm로 다르게 하여 PDB 배지에서 액체배양한 결과, 3 mm의 비드로 실험한 결과 비이드 첨가 개수가 0개에서 50개로 증가할수록 SED (%)가 31%에서 56%로 증가하여 균체의 생육이 양호한 것으로 나타났다. 비이드 크기는 3 mm보다 큰 5 mm를 첨가하여 배양하였을 때 SED와 PMV 값이 모두 높은 결과를 나타내었다.

감사의 글

본 논문은 호서대학교 2008년 교내 연구비 지원에 의하여 수행된 결과이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Park, J.S., Lee, D.H., Kim, J.H., Kim, N.M. and Lee, J.S. (2002) Manufacture and physiological functionality of Korean traditional liquors by using *Paecilomyces japonica*. Korean J. Mycol., 30, 142-146
2. Ying, J., Mao, X., Ma, Q., Zong, Y. and Wen, H. (1987) Icones of medicinal fungi from China. Science Press,

- Beijing, China. p.575
3. Zhu, J.S., Halpern, G.M. and Jones, K. (1998) The scientific rediscovery of an ancient Chinese herbal medicine: *Cordyceps sinensis* Part I. J. Altern. Complement Med., 4, 289-303
 4. Zhu, J.S., Halpern, G.M. and Jone, K. (1998) The scientific rediscovery of a precious ancient Chinese herbal regimen: *Cordyceps sinensis* Part II. J. Altern. Complement Med., 4, 429-457
 5. Jo, J.S. (1998) Study on the origin of Chinese caterpillar fungus. The Journal of East-West Medicines. 671-680
 6. Seo, Y.B. and Lim, J.K. (1998) A bibliographical study on the origin of chinese caterpillar fungus. Korean J. Herbology, 13, 181-187
 7. Cho, S.M., Park, H.J., Seo, G.S. and Hong, J.D. (2009) Effect of medis composition on the cordycepin and content nutritional components of *Cordyceps militaris*. Korean J. Mycol., 37, 161-166
 8. Park, C.S., Choi, M.A. and Park, G.S. (2004) Effect of *Paecilomyces japonica* in the microbiological quality and shelf-life of Jeungpyun. Korean J. Soc. Food Cookery Sci., 20, 561-567
 9. Kwon, D.J. (2004) Quality improvement of Kochujang using *Cordyceps* sp. Korean J. Food Sci. Technol., 36, 81-85
 10. Kim, I.S., Jin, S.K., Jo, C.R., Lee, M.H. and Jang, A.R. (2008) Quality characteristics of pork patties containing silkworm powder and vegetable worm (*Paecilomyces Japonica*) during cold storage. Korean J. Food Sci. Anim. Resour., 28, 521-528
 11. Park, G.S., Yun, G.S., Hwang, S.H., Jo, H.J. and Kim, J.S. (2003) Optimization for the preparation of Jeung-Pyun, with added *Paecilomyces japonica* powder, using a response surface methodology. Korean J. Soc. Food Cookery Sci., 19, 504-510
 12. Choi, Y.Y., Lee, Y.Y., Jung, Y.Y., Kwon, T.Y. and Chung, Y.J. (2004) Properties in formation of protein-binding polysaccharide in *Cordyceps militaris*. Korean J. Food Nutr., 17, 177-185
 13. Nam, S.H., Jung, I.Y., Ji, S.D. and Cho, S.Y. (1999) Cultural condition and morphological characteristics of *Paecilomyces japonica* for the artificial cultivation. Korean J. Seric. Sci., 41, 36-40
 14. Lee, J.K., Choi, Y.S. and Sung, J.M. (2000) Investigation on cultural characteristics of mycelial growth by *Cordyceps scarabaeicola*. Korean J. Mycol., 28, 81-87
 15. 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 japonicu*. Korean J. Mycol., 26, 380-386
 16. Ha, N.G., Kim, S.Y., Kang, J.H., Kang, P.D., Sung, G.B. and Hong, I.P. (2005) Biological activities and cultural characteristics of an entomogenous fungus, *Paecilomyces tenuipes* (Peck) Samson. Korean J. Seric. Sci., 47, 12-17
 17. Nam, S.H., Jung, I.Y., Cho, S.Y. and Han, M.S. (2001) Improvement of liquid culture methods of *Paecilomyces japonica*. Korean J. Seric. Sci., 43, 33-36

(접수 2010년 2월 9일, 수정 2010년 6월 2일, 채택 2010년 6월 11일)