

눈꽃동충하초의 생리활성에 관한 연구

허현¹ · 이민웅¹ · 홍인표^{2*}

¹동국대학교 생물학과, ²농업과학기술원 잠사양봉소재과

Biological activities of an entomogenous fungus, *Paecilomyces tenuipes* grown on silk worm

Hyeon Hur¹, Min-Woong Lee¹ and In-Pyo Hong^{2*}

¹Dept. of Applied Biology, Dongguk University, Seoul 100-715

²Department of Sericulture and Entomology, National Institute of Agricultural Science and Technology, R.D.A. Suwon 441-707, Korea

ABSTRACT : This study was carried out to investigate the biological activities of *P. tenuipes* formed on silkworm (*Bombyx mori*) variety. The mean content of total amino acid in the fruiting bodies of *P. tenuipes* was 1.03 μ mole/g. The distribution rate of amino acid components decreased in the order of Arginine(12.2%) > Glycine(10.5%) > Proline(9.6) > Tyrosine(8.9%) > Serine > Leucine > Threonine. The most abundant amino acid in the fruiting bodies of the Baegokjam, Chilbojam and Hachojam infected with *P. tenuipes* was arginine, while Yangwonjam was Glycine. The most abundant fatty acid in *P. tenuipes* was Oleic acid on a dry weight basis. The unsaturated fatty acids such as Oleic acid, Linoleic acid and Linolenic acid accounted for more than 78% of the total fatty acids.

KEYWORDS : Amino acid, Fatty acid, *Paecilomyces tenuipes*. Silkworm

서 론

동충하초는 곤충의 애벌레, 번데기, 성충에 침입하여 체 내에 내생 균핵을 형성하고 체외로 자실체(자좌)를 형성하는 곤충기생성균(Entomopathogenic fungi)으로 대부분의 동충하초는 분류학상 자낭균문(Ascomycota), 핵균강(Pyrenomycetes), 맥각균목(Clavicipitales), 맥각균과(Clavicipitaceae), *Cordyceps* 속에 속하며 전세계적으로 300여종이 분포하며, 국내에는 약 70여종이 자생하는 것으로 보고되어 있다(Kobayasi, 1940; 성 등, 1998).

동충하초는 원래 중국의 티벳 등 히말라야의 해발 3,000~5,000m의 고산지대 인시목 박쥐나방(*Endoclyta excres* Butler; Hepialidae armoricanus)의 유충에서 발생하는 *Cordyceps sinensis* (Bereley) Sacc.를 지칭하였으나, 최근에는 곤충뿐만 아니라 거미, 균류 등에서 발생하는 자실체를 총칭한다(조 등, 1999).

동충하초의 약리효능은 종에 따라 매우 다양하여 중국의 *C. sinensis*는 면역증강 및 부신흔르몬 분비 촉진 작용이 있으며(Wang 등, 1998), *C. militaris*의 생리활성물질인 Cordycepin은 RNA와 DNA의 합성 억제 작용이 있으며(Kuo 등, 1994), *C. cicadae*의 Galactomannan은 항종양

효과가 있으며(Huang 등, 1997), *C. pruinosa*의 HEA(N⁶-(2-hydroxyethyl)-adenosine)는 근육 수축 작용(Furuya 등; 1983), *Paecilomyces tenuipes*로부터 항암, 면역증강, 항피로 등의 효과가 보고되었다(조 등, 1999).

동충하초는 이와 같은 우수한 약리 효능이 밝혀짐에 따라 수요가 급증하고 있으나 자연산 동충하초는 수량이 제한되어 있고 또한 대량 수집 점차 어려워짐에 따라 안정적 인공 자실체 형성에 관한 연구가 요구되고 있다. Pettit(1895)는 감자배지에서 최초로 *C. militaris*의 자좌를 형성시켰으며, 1932년 Yakusiji와 Kumazawa는 *C. militaris*의 자좌를 곡류(쌀)배지에서 형성시켰으며(Kobayasi, 1940), Shanor(1936)는 나방 번데기에서 *C. militaris*의 자낭각 형성을 유도하였으며, Harada 등(1995)은 *C. militaris* 균을 *Mamestra brassicae*의 번데기에 접종하여 자실체 형성을 유도하였다.

국내에서는 곡물과 번데기배지를 이용하여 *C. militaris*와 *Isaria japonica*의 자실체를 형성시켰으며(Yamanaka 등, 1998; Ban 등, 1998), 조 등(1999)은 살아 있는 가잠누에에 *Paecilomyces tenuipes* 균을 접종하여 인공재배에 성공하였다.

본 연구에서는 경제적 가치가 높은 눈꽃동충하초를 누에 품종별로 생리활성에 관한 연구를 수행하였다.

*Corresponding author: <iphong20@rda.go.kr>

재료 및 방법

공시재료

균주 : 본 실험에 사용한 눈꽃동충하초(*Paecilomyces tenuipes*)의 자실체는 2002년 제주도 한라산에서 채집하였으며, 균 분리는 자실체를 2~3% Sodium hypochloride 로 소독한 다음 water agar를 분주한 Petri-dish 뚜껑 내측에 자실체를 멸균 테이프로 부착시킨 후 배지에 떨어져서 발아한 자낭포자를 분리하였으며, 감자천천배지(Potato dextrose agar; PDA)에 이식하여 25℃에서 계대 배양하여 모균주로 이용하였다.

누에 품종 : 농업과학기술원 농업생물부에서 백옥잠, 양원잠, 하초잠, 칠보잠을 분양 받아 시험에 공시하였다.

배양적 특성

현미배지 조제

분생포자를 생산하기 위한 현미 배지는 500 ml 삼각 flask에 현미 150 g, 누에 번데기가루 15 g, Dextrose 15 g, 증류수 70 ml을 넣고 121℃에서 40분간 살균한 후 평판배지에서 자란 동충하초 균사 선단부분을 3 mm cork borer로 균총을 떼어내어 접종하였다. 접종이 완료된 배지는 25℃의 incubator에서 20일간 배양하면서 균이 뭉치는 것을 방지하고 균일하게 성장하도록 3~4일 간격으로 흔들기 작업을 하여 분생포자를 발생시켰다.

분생포자 수확

배양이 완료된 현미배지는 Tween 20(Polyoxyethylene sorbitan monolaurate, 0.1g/100ml)을 첨가한 증류수를 가하여 분생포자를 수확하였다. 수확한 분생포자는 혈구 계수기(hemocytometer)로 측정하여 1×10^8 conidia/ml 농도가 되도록 증류수로 희석하여 조절하였다.

동충하초 감염

5령 누에 기잡에 1×10^8 conidia/ml 농도로 조절된 분생포자 액체중균을 12시간 간격으로 각각 1회, 2회, 3회 분무 접종한 다음 누에를 보호하고 감염을 유도하기 위해 사육실을 고온다습한 조건(28℃ · 95%)에서 24시간 유지한 후 급상하고 표준누에사육법에 따라 사육하였다. 상족 1주일 후 고치를 수건하여 1주간 20~25℃ 온도에서 고치를 보호한 다음 동충하초를 발생시켰다.

동충하초 발생

감염된 번데기는 온도 20~24℃, 습도 90%, 광 1500~1700lx로 조절된 생육실에서 배양하여 자실체 형성을 유도하였다. 배양 15~20일 후 자실체의 두부가 팽대해지고 자낭각이 형성되기 시작될 때 수확하여 시험 재료로 이용하였다.

탄수화물 분석

탄수화물은 자실체를 동결 건조하여 분말화한 건조시료 1g에 85% ethanol 10ml을 가하여 상온에서 24시간 추출한 다음 원심분리(3,000rpm, 10 min.)하여 얻은 상등액을 분석시료로 사용하였다. 분석은 HPLC(high performance liquid chromatography), 검출기는 RI-410(refractive index), 컬럼은 high performance carbohydrate column(4.6×250mm, Waters Co.)을 사용하였으며, 용매는 75% acetonitrile을 사용하여 유속을 1 ml/min로 하였다. 유리당은 Millenium 2010 program(Waters Co.)을 이용하여 측정하였다.

단백질 분석

건조시료 0.1g을 6N HCl로 105℃에서 24시간 동안 완전 가수분해한 후 농축하여 20mM HCl로 일정 농도로 조정된 다음 AccQ-Tag system(Waters Co.)을 이용하여 형광 유도체화 시켰다. 분석은 HPLC(Waters Co.), 검출기는 Waters 형광검출기 474, 컬럼은 Waters AccQ-Tag column(3.9×150 mm, Waters Co.)을 사용하였다. 아미노산은 Millenium 2010 program(Waters Co.)을 이용하여 retention time을 측정하여 표준물질의 값과 비교하여 계산하였다.

지방산 분석

지방 성분중 함유된 지방산 성분을 조사하기 위하여 가장 보편적으로 사용되는 분리법(Modified Folch method)과 유도체화(Methylation: BF₃-methanol) 방법을 사용하여 gas chromatography(GC)로 측정하였다. GC 조건은 1) column은 supelco sp-2560 fused silica capillary column 100m, 0.25mm ID., 0.20 m film을 사용하였으며, 2) 분석 조건은 detector: FID, injection volume: 1μl, carrier gas: He, detector temp.: 260℃, injector temp.: 260℃, oven temp: initial temp. 140℃ for 5min., 140℃ to 240℃ at 4 /min, final temp. 240℃ for 15min., split: 100:1, flow rate: 20cm/sec 으로 조정하여 분석하였다. 유리지방산의 정량은 표준물질로 SP-37 component FAME Mix (Supelco Co.)를 사용하여 각각의 화합물에 대한 검량곡선을 도식한 다음 retention time을 측정하여 표준물질의 값과 비교하여 계산하였다.

결과 및 고찰

성분 분석

탄수화물

눈꽃동충하초의 유리당 함량을 누에 품종별로 조사한 결과는 표 1에서와 같이 백옥잠과 하초잠에서는 Glucose 함량이 높았으며, 칠보잠과 양원잠에서는 Mannitol 함량이 많았다. Glycerol 함량은 양원잠에서 가장 많았으며,

Table 1. Carbohydrate composition of *Paecilomyces tenuipes*

Species	Silkworm variety	Content of carbohydrate (mg/g dry weight)			
		Glycerol	Glucose	Mannitol	Sucrose
<i>Paecilomyces tenuipes</i>	Baegokjam	3.71 ± 0.44	9.21 ± 1.31	8.40 ± 0.58	2.67 ± 0.81
	Chilbojam	3.12 ± 0.08	9.08 ± 0.37	10.06 ± 0.18	2.00 ± 0.08
	Hachojam	2.55 ± 0.05	9.27 ± 0.30	7.72 ± 0.00	1.72 ± 0.22
	Yangwonjam	4.80 ± 0.37	8.76 ± 0.98	9.40 ± 0.84	1.79 ± 0.42

Glucose는 백옥잠과 하초잠, Sucrose는 백옥잠, Mannitol 함량은 칠보잠에서 가장 많았다. 이러한 결과는 담자균류와 자낭균류의 자실체에 Mannitol 함량이 가장 많다는 Lewis 등의 보고와 일치한다(Lewis & Smith, 1967). 버섯은 Mannitol 함량이 많아서 다이어트 식품으로 유용하게 이용된다.

단백질

눈꽃동충하초에 함유된 아미노산의 총 평균 함량은 10.3 μmole/g이며, 백옥잠이 10.7 μmole/g로 가장 높았으며, 하초잠과 칠보잠이 10.5 μmole/g, 양원잠이 0.96 μmole/g로 가장 낮은 함량을 나타내었다(표 2). 16종의 구성 아미노산 분포비율은 Arginine이 12.2%로 가장 높았으며, 다음으로 Glycine(10.5%) > Proline(9.6%) > Tyrosine(8.9%) 순이었으며, Methionine이 2.1%로 가장 낮게 분포하였다(그림 1). 누에 품종별로는 백옥잠, 칠보잠, 하초잠에서는 Arginine 함량이 시료 1g당 각각 2.21 μmole, 2.17 μmole,

1.98 μmole로 가장 많았으며, 양원잠은 Glycine 함량이 1.75 μmole로 가장 많았다(표 2).

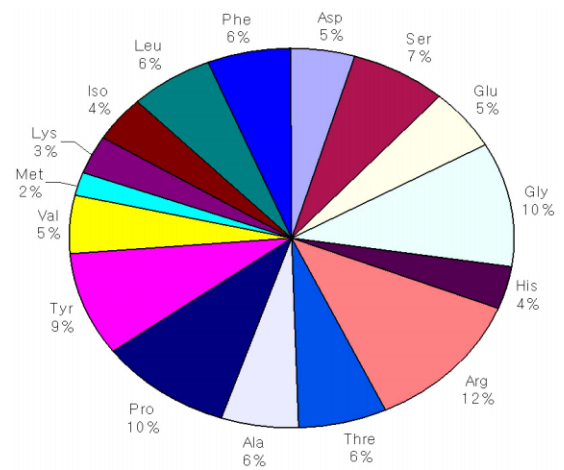


Fig. 1. Distribution of amino acids in *P. tenuipes*.

Table 2. Amino acid composition of *Paecilomyces tenuipes*

Amino acid	Content of amino acids (μmole/g dry weight)			
	Variety			
	Baegokjam	Chilbojam	Hachojam	Yangwonjam
Aspartic acid	0.76	0.73	0.83	0.86
Serine	1.19	1.15	1.15	1.04
Glutamic acid	0.85	0.80	0.91	0.90
Glycine	1.77	1.68	1.70	1.75
Histidine	0.61	0.62	0.63	0.50
Arginine	2.21	2.17	1.98	1.69
Threonine	1.07	1.06	1.03	0.96
Alanine	0.97	0.91	0.94	0.94
Proline	1.68	1.67	1.49	1.49
Tyrosine	1.51	1.58	1.52	1.27
Valine	0.87	0.83	0.85	0.77
Methionine	0.36	0.36	0.35	0.29
Lysine	0.53	0.48	0.58	0.62
Isoleucine	0.64	0.63	0.62	0.54
Leucine	1.08	1.06	1.08	0.97
Phenylalanine	0.99	1.07	1.07	0.83

산성아미노산인 Aspartic acid의 평균 함량은 0.795 $\mu\text{mole/g}$ 이며, 분포비율은 전체 아미노산의 약 4.8%를 차지하였으며, 양원잠에서 0.86 $\mu\text{mole/g}$ 로 가장 높게 나타났다. 한편, Glutamic acid는 전체 아미노산의 약 5.3%를 차지하였으며, 하초잠에서 0.91 $\mu\text{mole/g}$ 로 가장 높게 나타났다.

히드록시(수산기)아미노산인 Serine은 전체 아미노산의 6.9%이며, 백옥잠에서 1.19 $\mu\text{mole/g}$ 로 가장 높게 나타났다. 인체에서 합성이 되지 않는 필수아미노산인 Threonine은 공시누에 품종에 모두 분포하였으며, 전체 아미노산의 6.2%를 차지하였다.

염기성아미노산인 Arginine이 12.2%로 16종의 구성 아미노산중 구성비율이 가장 많았으며, 누에 품종별로는 백옥잠에 2.21 $\mu\text{mole/g}$ 가장 많이 분포하였다. Histidine은 평균 0.59 $\mu\text{mole/g}$ 이 포함되어 있으며, 인체에서 생합성이 되지 않는 필수아미노산인 Lysine은 평균 함량은 0.55 $\mu\text{mole/g}$ 로 공시 누에 품종에 모두 존재하였다.

황 함유 필수아미노산인 Methionine은 평균 함량 0.34 $\mu\text{mole/g}$ 로 16종의 분석아미노산중 구성비율(2.1%)이 가장 낮았다.

중성아미노산인 Glycine의 평균함량은 1.73 $\mu\text{mole/g}$ 이며, 전체아미노산중 10.5%의 구성비를 차지하여 Arginine 다음으로 눈꽃동충하초에 많이 분포하였다. Alanine은 평균 함량 0.94 $\mu\text{mole/g}$ 로 구성비율은 5.7% 이었다. 한편, 체내에서 합성이 되지 않는 필수아미노산인 Valine, Leucine, Isoleucine의 평균함량은 각각 0.83 $\mu\text{mole/g}$, 1.05 $\mu\text{mole/g}$, 0.61 $\mu\text{mole/g}$ 이었으며, 16종의 아미노산중 각각 5.0%, 6.3%, 3.7%의 비율을 나타내었으며, 누에 품종별로는 백옥잠에 가장 많이 분포하였다.

방향족아미노산인 Tyrosine의 평균 함량은 1.47 $\mu\text{mole/g}$ 이며, 16종의 분석아미노산중 8.9%로 눈꽃동충하초에서 높은 구성비율을 나타냈다.

Proline은 알칼에 녹는 유일한 아미노산으로 평균 함량은 1.58 $\mu\text{mole/g}$ 이며, 9.6%의 구성비율로 눈꽃동충하초에 Arginine, Glycine이 3번째로 많이 분포하였다.

지방산

눈꽃동충하초의 유리 지방산 조성은 누에 품종에 관계없이 Oleic acid 함량이 가장 높았으며, 다음이 Linolenic acid, Palmitic acid, Linoleic acid 순이었다. 포화지방산은 주로 Palmitic acid와 Stearic acid이며, 필수 지방산인 Linolenic acid 와 Linoleic acid의 함량은 백옥잠과 양원잠이 40%로 가장 많았으며, 칠보잠, 하초잠이 각각 38%, 34%로 나타났다. 포화지방산에 대한 불포화지방산의 조성비는 백옥잠과 하초잠이 80%로 가장 많았으며, 칠보잠 77%, 양원잠 76% 이었다 (표 3).

적 요

경제적 가치가 매우 높은 눈꽃동충하초를 누에 품종별로 생리활성에 관한 연구를 수행한 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 눈꽃동충하초의 유리당 함량은 백옥잠과 하초잠에서는 Glucose함량이 가장 높았으며, 칠보잠과 양원잠에서는 Mannitol 함량이 많았다.
2. 눈꽃동충하초에 함유된 아미노산의 총 평균 함량은 10.3 $\mu\text{mole/g}$ 이며, 백옥잠이 10.7 $\mu\text{mole/g}$ 로 가장 높았으며, 하초잠과 칠보잠이 10.5 $\mu\text{mole/g}$, 양원잠이 0.96 $\mu\text{mole/g}$ 로 가장 낮은 함량을 나타내었다. 16종의 구성 아미노산 분포비율은 Arginine이 12.2%로 가장 높았으며, 다음으로 Glycine(10.5%) > Proline(9.6%) > Tyrosine(8.9%) 순이었으며, Methionine이 2.1%로 가장 낮게 분포하였다.
3. 눈꽃동충하초의 유리 지방산 조성은 누에 품종에 관계없이 Oleic acid 함량이 가장 높았으며, 다음이 Linolenic acid, Palmitic acid, Linoleic acid 순이었다.

인용문헌

Ban KW, Park DK, Shim JO, Lee YS, Park CH, Lee JY, Lee TS, Lee SS and Lee MW. 1998. Cultural characteristics for inducing fruiting-body of *Isaria japonica*. Kor. J. Mycol.

Table 3. Fatty acid composition of the fruiting body of *Paecilomyces tenuipes*

Fatty acid	% of total FA content			
	Variety			
	Baegokjam	Yangwonjam	Chilbojam	Hachojam
Palmitic (C16:0)	17.08	18.88	18.2	16.5
Palmitoic (C16:1)	0.76	0.71	0.69	0.77
Stearic (C18:0)	3.16	4.67	4.45	3.05
Oleic (C18:1)	38.35	35.13	38.4	45.85
Linoleic (C18:2)	12.35	12.64	12.9	11.89
Linolenic (C18:3)	28.3	27.96	25.37	21.93

- 26(3) : 380-386.
- Kobayasi, Y. 1940. The genus *Cordyceps* and its allies. *Sci. Rept. Tokyo Bunrika Daikaku, Sect. B* 5 : 53-260.
- Kuo YC, Lin CY, Tsai WJ, Wu CL, Chen CF and Shiao MS. 1994. Growth inhibitors against tumor cells in *Cordyceps sinensis* other than *cordycepin* and polysaccharides. *Cancer Invest.* 12(6) : 611-615.
- Furuya T, Hirotsu M and Matsuzawa M. 1983. N⁶-(2-hydroxyethyl) adenosine, a biologically active compound from cultured mycelia of *Cordyceps* and *Isaria* species. *Phytochemistry.* 22 : 2509-2512.
- Harada, Y., Aliyama, N., Yamamoto, K. and Shirota, Y. 1995. Production of *Cordyceps militaris* fruit body on artificially inoculated pupae of *Mamestra brassicae* in the laboratory. *Mycol. Soc. Japan.* 36 : 67-72.
- Huang BM, Stocco DM and Norman RL. 1997. The cellular mechanism of corticotropin-releasing hormone (CRH) stimulated steroidogenesis in mouse Leydig cells are similar to those for LH. *J. Androl.* 18(5) : 528-534.
- Lewis, D.H. and Smith, D. C. 1967. Sugar alcohols(polyols) in fungai and green plants. *New Phytologist.* 66, 331-334
- Pettit, R. H. 1895. Studies in artificial cultures of entomogenous fungi. *Cornell univ. Agr. Expt. Sta. Bull.* 97 : 417-465.
- Shanor, L. 1936. The production of mature perithecia of *Cordyceps militaris* (Linn) Link in laboratory culture. *J. Elisha Mitchell Sci.* 52 : 99-104.
- Yamanaka, K. Inatomi, S. and Hanaoka, M. 1998. Cultivation characteristics of *Isaria japonica*. *Mycoscience.* 39 : 43-48.
- Wang SM, Lee LJ, Lin WW and Chang CM. 1998. Effect of a water-soluble extract of *Cordyceps sinensis* on steroidogenesis and capsular morphology of lipid droplet in cultured rat adrenocortical cell. *J Cell Biochem.* 69(4) : 483-489.
- 조세연, 신국현, 송성규, 성재모. 1999. 누에동충하초 생산 및 유용물질 개발. 농촌진흥청. 5-230.
- 성재모, 이현경, 유영진, 최영상, 김상희, 김용욱, 성기호. 1998. 단백질 분석을 기초로 한 속 동충하초의 분류. 한국균학회지 26(1) : 1-7.