(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0027876
(43) 공개일자 2021년03월11일

(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)
(52) CPC특허분류
A01G 18/40 (2018.02)
A01G 18/20 (2018.02)
(21) 출원번호 10-2019-0108889
(22) 출원일자 2019년09월03일
심사청구일자 2019년09월03일

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
양재경
경상남도 진주시 강변길 31, 103동 402호 (가좌동, 가호 에일린의 뜰 아파트)
정지영
경상남도 진주시 진주대로 501
하시영
경상북도 구미시 형곡서로 11-15, 102동 1507호 (형곡동, 형곡시영아파트)
(74) 대리인
특허법인태백

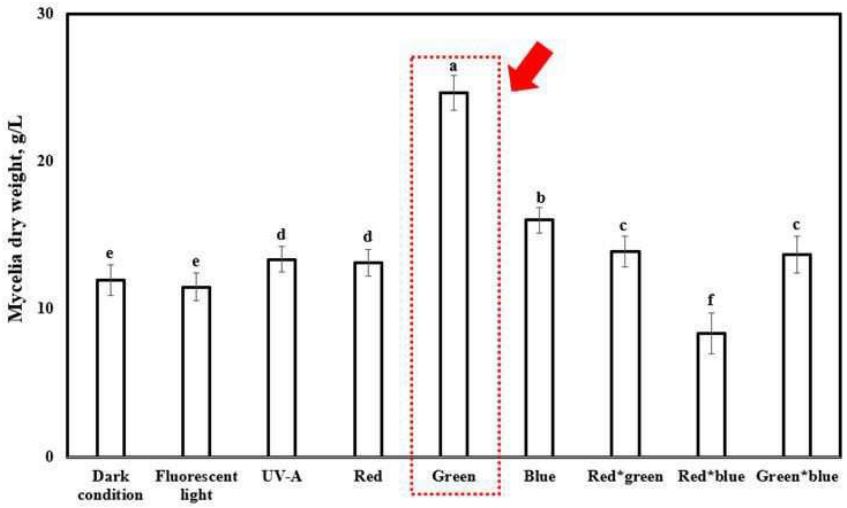
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **LED를 이용한 밀리타리스 동충하초 균사체의 함량을 증대하는 배양방법**

(57) 요 약

본 발명은 LED를 이용한 밀리타리스 동충하초 균사체의 함량을 증대하는 배양방법에 관한 것으로, 밀리타리스 동충하초 균사를 배지에 접종하는 접종단계; 및 접종된 배지를 광조건에서 배양하여 밀리타리스 동충하초 균사체를 얻는 배양단계; 를 포함하는 밀리타리스 동충하초 균사체의 함량을 증대하는 배양방법으로 이루어져 배지 및 광조건에 따라 밀리타리스 동충하초 균사체의 최대 생장량을 나타냄을 확인하였으며, 반응 표면 분석을 통하여 최적의 광량, 배지의 글루코스 함량 및 배양시간 조건을 도출하고, 이를 배양조건으로 이용함으로써 밀리타리스 동충하초 균사체의 최대 생장량을 효율적으로 수득할 수 있다.

대 표 도 - 도11



(52) CPC특허분류
A01G 18/50 (2018.02)
A01G 18/69 (2018.02)
A01G 7/045 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 AP00000466
부처명 산림청
과제관리(전문)기관명 한국임업진흥원
연구사업명 융복합 기반 임산업의 신산업화 기술 개발 사업
연구과제명 동충하초 균사체의 생장 및 cordycepin 함량 증대를 위한 LED(Light Emitting Diode) 적용 기술 연구
기 여 율 1/1
과제수행기관명 경상대학교 산학협력단
연구기간 2018.04.26 ~ 2019.04.25

명 세 서

청구범위

청구항 1

밀리타리스 동충하초 균사를 배지에 접종하는 접종단계; 및

접종된 배지를 광조건에서 배양하여 밀리타리스 동충하초 균사체를 얻는 배양단계; 를 포함하는 밀리타리스 동충하초 균사체의 함량을 증대하는 배양방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,

배지는 포테이토 덱스트로스 브로스(potato dextrose broth) 배지인 것을 특징으로 하는 밀리타리스 동충하초 균사체의 함량을 증대하는 배양방법.

청구항 3

제 1항에 있어서,

배양은 3일 내지 6일 동안 수행하는 것을 특징으로 하는 밀리타리스 동충하초 균사체의 함량을 증대하는 배양방법.

청구항 4

제 1항에 있어서,

광조건은 LED 단일광 또는 혼합광을 접종된 배지에 조사하여 균사체를 배양하는 것을 특징으로 하는 밀리타리스 동충하초 균사체의 함량을 증대하는 배양방법.

청구항 5

제 4항에 있어서,

LED 단일광은 500nm 내지 550nm의 파장을 갖는 녹색광이며, LED 혼합광은 500nm 내지 550nm의 파장을 갖는 녹색광과 620nm 내지 780nm의 파장을 갖는 적색광을 혼합한 광인 것을 특징으로 하는 밀리타리스 동충하초 균사체의 함량을 증대하는 배양방법.

청구항 6

제 5항에 있어서,

500nm 내지 550nm의 파장을 갖는 LED 녹색광이 밀리타리스 동충하초 균사체의 최대 생장량을 나타내는 것을 특징으로 하는 밀리타리스 동충하초 균사체의 함량을 증대하는 배양방법.

청구항 7

제 4항에 있어서,

LED 단일광 또는 혼합광을 1일 5 내지 15시간 동안 접종된 배지에 조사하여 균사체를 배양하는 것을 특징으로 하는 밀리타리스 동충하초 균사체의 함량을 증대하는 배양방법.

청구항 8

제 1항에 있어서,

밀리타리스 동충하초 균사체의 건중량은,

광량, 배지의 글루코스 함량 및 배양시간과 하기의 수학식 1과 같은 상관관계를 가지는 것을 특징으로 하는 밀

리타리스 동충하초 균사체의 함량을 증대하는 배양방법:

[수학식 1]

$Y_1=13.18-1.22X_1-1.08X_2+0.4438X_3$

$-1.00X_1X_2+0.7050X_1X_3+0.1975X_2X_3+2.60X_1^2+2.56X_2^2+2.55X_3^2$

(상기 수학식 1에서 Y_1은 밀리타리스 동충하초 균사체의 건중량(g/L), X_1은 광량, X_2는 배지의 글루코스 함량 및 X_3는 배양시간을 의미함.)

청구항 9

제 8항에 있어서,

광량, 배지의 글루코스 함량 및 배양시간의 배양조건은 각각 1000 내지 1500 lux, 1 내지 10 g/50mL, 10 내지 50 시간인 것을 특징으로 하는 밀리타리스 동충하초 균사체의 함량을 증대하는 배양방법.

청구항 10

제 9항에 있어서,

광량, 배지의 글루코스 함량 및 배양시간의 배양조건은 각각 1273.75 lux, 5.00853 g/50mL, 26.5176 시간인 것을 특징으로 하는 밀리타리스 동충하초 균사체의 함량을 증대하는 배양방법.

청구항 11

제 1항 내지 제 10항 중 어느 한 항의 방법에 따라 배양된 밀리타리스 동충하초 균사체.

청구항 12

제 1항에 따른 밀리타리스 동충하초 균사체의 건중량을 예측하는 방법에 있어서,

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

(b) 상기 단계 (a)의 설계된 실험범위로, 상기 광량, 배지의 글루코스 함량 및 배양시간에 대한 실험값을 얻는 단계;

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

(d) 상기 단계 (c)에서 도출된 수학식 1로 표시되는 이차 회귀식 모델을 변량분석(ANOVA)하여 상기 밀리타리스 동충하초 균사체의 건중량을 예측하는 단계; 를 포함하는 것을 특징으로 하는 밀리타리스 동충하초 균사체의 건중량 예측방법:

[수학식 1]

$Y_1=13.18-1.22X_1-1.08X_2+0.4438X_3$

$-1.00X_1X_2+0.7050X_1X_3+0.1975X_2X_3+2.60X_1^2+2.56X_2^2+2.55X_3^2$

(상기 수학식 1에서 Y_1은 밀리타리스 동충하초 균사체의 건중량(g/L), X_1은 광량(코드단위), X_2는 배지의 글루코스 함량(코드단위) 및 X_3는 배양시간(코드단위)을 의미함.)

청구항 13

제 12항에 있어서,

광량, 배지의 글루코스 함량 및 배양시간의 배양조건은 각각 1000 내지 1500 lux, 1 내지 10 g/50mL, 10 내지 50 시간인 것을 특징으로 하는 밀리타리스 동충하초 균사체의 건중량 예측방법.

청구항 14

제 13항에 있어서,

광량, 배지의 글루코스 함량 및 배양시간의 배양조건은 각각 1273.75 lux, 5.00853 g/50mL, 26.5176 시간인 것을 특징으로 하는 밀리타리스 동충하초 균사체의 밀리타리스 동충하초 균사체의 건중량 예측방법.

발명의 설명

기 술 분 야

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

배 경 기 술

[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 생장을 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 혈액암치료용으로 활용되고, 건강기능식품으로서도 많은 관심을 받고 있다.

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

[0005] 상기와 같은 기능들로 인해 동충하초는 버섯류 중에서도 많은 소비가 이루어지고 있지만 천연에서 채집되는 양은 매우 적어서 수요를 충당할 수 없으므로 전 세계의 많은 농가들이 인공재배법으로 재배사를 만들어서 대량재배하고 있다. 그러나 동충하초는 성장속도가 느리고, 외부환경에 민감하여 농약을 살포할 수 없는 식물이어서 재배가 매우 까다롭다. 또한, 대량재배에 성공하기는 하였지만 오랫동안 재배를 해온 농가에서도 동충하초 재배의 수확률은 저조한 것으로 알려져 있다. 즉, 10개를 배양하여 수확하면 1~2개 정도가 오염되거나 이상 균주가 성장하여 수확율이 낮아진다.

[0006] 최근, 동충하초의 자실체 생산보다 균사체 생산에 대한 연구가 주목받고 있으며, 균사체의 경우 자실체보다 단기간 재배가 가능하고 저비용으로 소규모 장소에서 배양이 가능하다는 장점을 가지고 있다. 뿐만 아니라, Feng *et al*. (2018)과 Tang *et al*. (2018)에 의하면 동충하초의 자실체와 균사체간의 성분에 대한 차이는 거의 없는 것으로 보고되었다. 따라서 자실체보다 단기간에 대량생산이 가능한 균사체를 배양하는 것이 경제적으로 유리하다고 판단된다. 하지만 현재까지 동충하초 균사체의 생산량 증대에 적합한 최적 조건에 관한 연구는 미비하다.

[0007] 따라서 코디세핀이 함유된 밀리타리스 동충하초 균사체의 생장량 증대를 위한 최적 배양방법에 대한 연구가 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 등록특허 제10-0465283호(2003.08.14.)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 밀리타리스 동충하초의 최대 생장량을 위한 최적의 밀리타리스 동충하초 균사체의 배양방법을 제공하는 데에 있다.

[0010] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 배양방법에 따른 밀리타리스 동충하초 균사체를 제공하는 데에 있다.

[0011] 또한, 본 발명의 다른 목적은 밀리타리스 동충하초 균사체의 최대 생장량 예측방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 밀리타리스 동충하초 균사를 배지에 접종하는 접종단계; 및 접종된 배지를 광조건에서 배양하여 밀리타리스 동충하초 균사체를 얻는 배양단계; 를 포함하는 밀리타리스 동충하초 균사체의 함량을 증대하는 배양방법을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 밀리타리스 동충하초 균사체의 배양방법에 따라 배양된 밀리타리스 동충하초 균사체를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 밀리타리스 동충하초 균사체의 건중량을 예측하는 방법에 있어서, (a) 박스 벤켄 계획법(Box-Behnken design)으로 광량(X_1), 배지의 글루코스(glucose) 함량(X_2), 배양시간(X_3)에 대하여, -1, 0 및 1로 코드화하여 실험범위를 설계하는 단계; (b) 상기 단계 (a)의 설계된 실험범위로, 상기 광량, 배지의 글루코스 함량 및 배양시간에 대한 실험값을 얻는 단계; (c) 상기 단계 (b)의 실험값을 이용하여 하기 수학식 1로 표시되는 이차 회귀식 모델을 도출하는 단계; 및 (d) 상기 단계 (c)에서 도출된 수학식 1로 표시되는 이차 회귀식 모델을 변량분석(ANOVA)하여 상기 밀리타리스 동충하초 균사체의 건중량을 예측하는 단계; 를 포함하는 것을 특징으로 하는 밀리타리스 동충하초 균사체의 건중량 예측방법을 제공한다.

[0015] [수학식 1]

[0016] $Y_1=13.18-1.22X_1-1.08X_2+0.4438X_3$

[0017] $-1.00X_1X_2+0.7050X_1X_3+0.1975X_2X_3+2.60X_1^2+2.56X_2^2+2.55X_3^2$

[0018] (상기 수학식 1에서 Y_1은 밀리타리스 동충하초 균사체의 건중량(g/L), X_1은 광량(코드단위), X_2는 배지의 글루코스 함량(코드단위) 및 X_3는 배양시간(코드단위)을 의미함.)

발명의 효과

[0019] 본 발명에 따라 밀리타리스 동충하초 균사체는 PDB(potato dextrose broth) 액체배지에서 녹색 LED 광을 조사하여 배양한 경우 최대 생장량을 나타내었으며, 반응 표면 분석을 통하여 최적의 광량, 배지의 글루코스 함량 및 배양시간 조건을 도출하고, 이를 배양조건으로 이용함으로써 밀리타리스 동충하초 균사체의 최대 생장량을 효율적으로 수득할 수 있는 효과가 있다.

[0020] 또한, 본 발명에 따른 배양방법에 따라 수득된 밀리타리스 동충하초 균사체는 면역증강활성, 항암활성, 항바이러스 및 항염증 효과가 뛰어난 코디세핀을 함유하고 있으므로 건강기능식품으로도 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*) 균사체를 나타낸 도면이다.

도 2는 밀리타리스 동충하초의 액체배지 종류에 따른 균사체 생장량을 나타낸 도면이다(데이터는 3번의 실험 결과를 평균±표준편차로 나타냈다).

도 3은 밀리타리스 동충하초의 배양기간에 따른 균사체 생장량을 나타낸 도면이다(데이터는 3번의 실험 결과를 평균±표준편차로 나타냈다).

도 4는 형광등 및 UV-A가 설치된 shaking incubator를 나타낸 도면이다.

도 5는 형광등 및 UV-A 광량 및 on/off 조절을 위한 컨트롤 박스를 나타낸 도면이다.

도 6은 형광등 및 UV-A의 조사에 따른 밀리타리스 동충하초 균사체 생장량 변화를 나타낸 도면이다(데이터는 3번의 실험 결과를 평균±표준편차로 나타냈다).

도 7은 LED 단일광(red, green, blue)이 설치된 shaking incubator를 나타낸 도면이다.

도 8은 LED 단일광 광량 및 on/off 조절을 위한 컨트롤 박스를 나타낸 도면이다.

도 9는 밀리타리스 동충하초의 LED 단일광(red, green, blue)조사에 따른 균사체 생장량 변화를 나타낸 도면이다(데이터는 3번의 실험 결과를 평균±표준편차로 나타냈다).

도 10은 LED green광의 조사시간에 따른 밀리타리스 동충하초 균사체의 생장량 변화를 나타낸 도면이다(데이터는 3번의 실험 결과를 평균±표준편차로 나타냈다).

도 11은 밀리타리스 동충하초의 LED 단일광 및 혼합광 종류에 따른 균사체 생장량 변화를 나타낸 도면이다(데이터는 3번의 실험 결과를 평균±표준편차로 나타냈다).

도 12는 밀리타리스 동충하초 균사체에서 혼합광 red*green의 조사시간에 따른 균사체 생장량 변화를 나타낸 도면이다(데이터는 3번의 실험 결과를 평균±표준편차로 나타냈다).

도 13은 밀리타리스 동충하초 균사체 배양 조건과 균사체 생장량간의 상관관계를 나타낸 도면이다.

도 14는 LED 제어조건과 밀리타리스 동충하초 균사체 생장량간의 fit model을 나타낸 도면이다.

도 15는 밀리타리스 동충하초 균사체의 최대 균사체량을 위한 최적 LED 제어조건을 나타낸 도면이다.

도 16은 밀리타리스 동충하초 균사체의 최대 균사체량을 위한 최적 LED 제어조건 반응 모델의 적합도를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 이하에서는 본 발명을 구체적으로 설명한다.

[0024] 본 발명자들은 PDB(potato dextrose broth) 액체배지에서 녹색 LED 광을 1일 12시간으로 4 내지 5일 동안 조사하여 배양한 경우, 밀리타리스 동충하초 균사체의 최대 생장량을 나타냄을 확인하였으며, 반응 표면 분석을 통하여 최적의 광량, 배지의 글루코스 함량 및 배양시간 조건을 도출하고, 이를 배양조건으로 이용함으로써 밀리타리스 동충하초 균사체의 최대 생장량을 효율적으로 수득할 수 있음을 밝혀내어 본 발명을 완성하였다.

[0026] 본 발명은 밀리타리스 동충하초 균사를 배지에 접종하는 접종단계; 및 접종된 배지를 광조건에서 배양하여 밀리타리스 동충하초 균사체를 얻는 배양단계; 를 포함하는 밀리타리스 동충하초 균사체의 함량을 증대하는 배양방법을 제공한다.

[0027] 이때, 상기 배지는 포테이토 덱스트로스 브로스(potato dextrose broth) 배지일 수 있으며, 상기 배양은 3일 내지 6일 동안 수행하는 것을 특징으로 하나, 바람직하게는 4일 내지 5일일 수 있다.

[0028] 또한, 상기 광조건은 LED 단일광 또는 혼합광을 접종된 배지에 조사하여 균사체를 배양하며, LED 단일광은 500nm 내지 550nm의 파장을 갖는 녹색광이며, LED 혼합광은 500nm 내지 550nm의 파장을 갖는 녹색광과 620nm 내지 780nm의 파장을 갖는 적색광을 혼합한 광인 것을 특징으로 하나, 바람직하게는 500nm 내지 550nm의 파장을 갖는 LED 녹색광을 이용할 수 있으며, 이때 밀리타리스 동충하초 균사체의 최대 생장량을 나타낼 수 있다.

[0029] 또한, 상기 LED 단일광 또는 혼합광을 1일 5 내지 15시간 동안 접종된 배지에 조사하여 균사체를 배양하는 것을 특징으로 하며, 바람직하게는 1일 12시간 동안 조사할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0030] 이때, 상기와 같은 배양조건 및 광조건을 벗어나면 본 발명에 따른 밀리타리스 동충하초 균사체가 제대로 수득되지 않거나, 밀리타리스 동충하초 수득 수율이 현저히 낮아져 경제적이지 못한 문제가 야기될 수 있다.

[0031] 또한, 상기 밀리타리스 동충하초 균사체의 건중량은 광량, 배지의 글루코스 함량 및 배양시간과 하기의 수학식 1과 같은 상관관계를 가지는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0032] [수학식 1]

[0033] $Y_1=13.18-1.22X_1-1.08X_2+0.4438X_3$

[0034] $-1.00X_1X_2+0.7050X_1X_3+0.1975X_2X_3+2.60X_1^2+2.56X_2^2+2.55X_3^2$

[0035] (상기 수학식 1에서 Y_1은 밀리타리스 동충하초 균사체의 건중량(g/L), X_1은 광량, X_2는 배지의 글루코스 함량 및 X_3는 배양시간을 의미함.)

[0036] 이때, 밀리타리스 동충하초 균사체의 최대 건중량을 얻기 위한 상기 광량, 배지의 글루코스 함량 및 배양시간의 배양조건은 각각 1000 내지 1500 lux, 1 내지 10 g/50mL, 10 내지 50 시간인 것을 특징으로 하며, 바람직하게 상기 광량, 배지의 글루코스 함량 및 배양시간의 배양조건은 각각 1273.75 lux, 5.00853 g/50mL, 26.5176 시간일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0038] 또한, 본 발명은 상기의 밀리타리스 동충하초 균사체의 배양방법에 따라 배양된 밀리타리스 동충하초 균사체를 제공한다.

[0039] 상기와 같이 배양된 밀리타리스 동충하초 균사체는 코디세핀이 함유되어 있으므로 면역증강활성, 항암활성을 위한 건강기능식품으로도 이용될 수 있을 것이다.

[0041] 또한, 본 발명은 상기 밀리타리스 동충하초 균사체의 건중량을 예측하는 방법에 있어서, (a) 박스 벤켄 계획법(Box-Behnken design)으로 광량(X_1), 배지의 글루코스(glucose) 함량(X_2), 배양시간(X_3)에 대하여, -1, 0 및 1로 코드화하여 실험범위를 설계하는 단계; (b) 상기 단계 (a)의 설계된 실험범위로, 상기 광량, 배지의 글루코스 함량 및 배양시간에 대한 실험값을 얻는 단계; (c) 상기 단계 (b)의 실험값을 이용하여 하기 수학식 1로 표시되는 이차 회귀식 모델을 도출하는 단계; 및 (d) 상기 단계 (c)에서 도출된 수학식 1로 표시되는 이차 회귀식 모델을 변량분석(ANOVA)하여 상기 밀리타리스 동충하초 균사체의 건중량을 예측하는 단계; 를 포함하는 것을 특징으로 하는 밀리타리스 동충하초 균사체의 건중량 예측방법을 제공한다.

[0042] [수학식 1]

[0043] $Y_1=13.18-1.22X_1-1.08X_2+0.4438X_3$

[0044] $-1.00X_1X_2+0.7050X_1X_3+0.1975X_2X_3+2.60X_1^2+2.56X_2^2+2.55X_3^2$

[0045] (상기 수학식 1에서 Y_1은 밀리타리스 동충하초 균사체의 건중량(g/L), X_1은 광량(코드단위), X_2는 배지의 글루코스 함량(코드단위) 및 X_3는 배양시간(코드단위)을 의미함.)

[0046] 이때, 밀리타리스 동충하초 균사체의 최대 건중량을 얻기 위한 상기 광량, 배지의 글루코스 함량 및 배양시간의 배양조건은 각각 1000 내지 1500 lux, 1 내지 10 g/50mL, 10 내지 50 시간인 것을 특징으로 하며, 바람직하게 상기 광량, 배지의 글루코스 함량 및 배양시간의 배양조건은 각각 1273.75 lux, 5.00853 g/50mL, 26.5176 시간일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0048] 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.

[0050] **<실시예 1> 동충하초 균사체의 액체배양기술 확립**

[0051] 1. 공시재료

[0052] 동충하초 균사체의 생장량을 평가하기 위하여 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*)(KCCM 60304)를 한국미생물보존센터(KCCM)로부터 분양받았다(도 1).

[0053] 2. 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*)의 액체배양 및 생장량 분석

[0054] 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*)의 생장량 증대를 위한 배양환경 조건을 확립하기 위해 하기 표 1의 배양조성을 갖는 3종(YMG(yeast extract, malt extract, glucose 배지), PDB(potato dextrose broth), SDB(Sabouraud dextrose broth)의 액체 배양배지를 이용하였다.

표 1

[0055]

배지 명	배지 pH	배지 조성(g/L)				
		Yeast extract	Malt extract	Glucose	Potato extract	Peptone
YMG	6.0	4	10	4	-	-
PDB	5.2	-	-	20	4	-
SDB	4.5	-	-	20	-	10

[0056] 상기 KCCM으로부터 분양받은 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*) 균사를 PDA(Potato Dextrose Agar) 평판배지를 이용하여 항온 배양기에서 25℃로 7일간 배양하였다. 이후, 배양된 균사의 가장자리 부위를 직경 5 mm 코르크 보러를 사용하여 3core씩 액체배지(YMG, PDB, SDB)에 접종하여 25℃에서 7일간 진탕배양(100 rpm)하여 액체 종균을 생산하였으며, 하루간격으로 배양된 액체 종균의 균사체 생장량을 측정하였다.

[0057] 상기 YMG, PDB 또는 SDB 배지는 100mL 삼각플라스크에 50mL 씩 각각 투입하고 121℃에서 15분간 살균한 다음 냉각시켜 사용하였다.

[0058] 또한, 배양된 밀리타리스 동충하초 균사체의 생장량은 Carvajal *et al*. (2012)의 건중량 측정법에 의해 하기의 방법으로 측정되었다.

[0059] ① 배양이 끝난 균사체 배양액을 falcon tube에 옮김.

[0060] ② 원심분리 (4000 rpm, 10 min, 2회, Union 32R Plus, HANIL, Korea)를 실시하여 배양액과 균사체 분리.

[0061] ③ 균사체에 담겨있는 falcon tube를 60℃에서 24시간 건조.

[0062] ④ 미리 측정한 falcon tube의 전건무게를 이용하여 균사체 무게 도출.

[0063] 3. 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*)의 액체배양 배지에 따른 생장량

[0064] 밀리타리스 동충하초 균사체의 액체배지 종류에 따른 균사체 생장량은 도 2에 나타냈다.

[0065] 결과적으로, 밀리타리스 동충하초 균사체의 생장량은 PDB (Potato Dextros Broth) 배지에서 배양했을 때 12.0 g/L의 생장량을 보여 가장 생장량이 높음을 확인하였다.

[0066] 또한, 배양기간에 따른 밀리타리스 동충하초의 생장량을 분석한 결과, 도 3과 같이 5일 이후 일정한 균사체 생장량을 나타내어 밀리타리스 동충하초의 균사체 배양기간은 5일로 고정하였다.

[0068] **<실시예 2> 형광등 및 UV-A가 동충하초 균사체 생장량에 미치는 영향 평가**

[0069] 1. 공시재료 및 밀리타리스 동충하초 균사체 배양방법

[0070] 형광등 및 UV-A의 조사에 따른 상기 <실시예 1-1>에서 분양받은 밀리타리스 동충하초 균사체의 생장량 변화를 평가하기 위하여 도 4와 같이 shaking incubator에 형광등과 UV-A (356 nm)를 설치하였다. 상기 광원은 배양액의 약 30cm 높이에 설치하였으며, 광도는 100pmol · m^{-2} · s^{-1} 로 설정하였다.

[0071] 또한, 상기 광원의 on/off를 위한 컨트롤 박스는 도 5와 같이 (주)이에스레즈의 식물생장용 LED 조명 브랜드인 빛솔 LED로부터 구매하여 설치하였으며, 배양은 상기 <실시예 1-2>와 같은 조건으로 PDB 배지에서 25℃로 7일간 진탕배양(100 rpm)하여 액체 종균을 생산하였고, 형광등 및 UV-A는 12 h/day로 5일 동안 조사하여 건중량 측정법에 의해 생장량을 측정하였다.

[0072] 대조군으로는 암배양 조건으로 배양된 밀리타리스 동충하초 균사체를 이용하였다.

[0073] 2. 밀리타리스 동충하초의 형광등 및 UV-A 광원에 따른 생장량

[0074] 도 6은 밀리타리스 동충하초의 형광등 및 UV-A 조사에 따른 균사체의 생장량을 나타낸 것으로, 밀리타리스 동충

하초는 암배양이나 UV-A보다 형광등 광원에서 배양했을 때 가장 많은 균사체 생장량을 나타냄을 확인하였으며, 암배양보다 약 2배 더 많은 균사체가 생산되는 것으로 확인되었다.

[0076] **<실시예 3> LED 단일광의 제어조건(파장 종류, 조사 시간)에 따른 동충하초 균사체 생장량 평가**

[0077] 1. 공시재료 및 밀리타리스 동충하초 균사체 배양방법

[0078] LED 단일광의 조사에 따른 밀리타리스 동충하초 균사체 생장량 변화를 평가하기 위하여 도 7과 같이 shaking incubator에 LED 단일광을 설치하였다. 단일광은 red, green, blue로 총 3종의 색을 설치했으며, 각 색상 당 120개의 수량으로 설치하였다(표 2). 상기 광원은 배양액의 약 30cm 높이에 설치하였으며, 광도는 64.9~108.0 $pmol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ 로 설정하였다.

[0079] 또한, 상기 LED 및 컨트롤 박스는 도 8과 같이 (주)이에스레즈의 식물생장용 LED 조명 브랜드인 빛솔 LED를 구매하여 설치하였으며, <실시예 1-2>와 같은 조건으로 PDB 배지에서 25℃에서 7일간 진탕배양(100 rpm)하여 액체 종균을 생산하였고, 단일광 3종은 12 h/day로 5일동안 조사하여 건중량 측정법에 의해 생장량을 측정하였다.

[0080] 대조군으로는 암배양, 형광등 및 UV-A 조건(실시예 2)으로 배양된 동충하초 균사체를 이용하였다.

표 2

[0081]

색상	파장(nm)	LED 수량	PCB 수량	PCB 한 개당 LED 수량
Red	650	120	10	12
Green	525	120	10	12
Blue	450	120	10	12

[0082] 2. 밀리타리스 동충하초의 LED 단일광 조건에 따른 생장량

[0083] 도 9는 밀리타리스 동충하초의 LED 단일광 조사에 따른 균사체의 생장량을 나타낸 것으로, 밀리타리스 동충하초는 green 광으로 조사했을 때, 25.3 g/L로 가장 많은 균사체 생장량을 나타냄을 확인하였으며, 이는 암배양보다 3.88배, 형광등보다 1.71배, UV-A보다 1.74배 높은 균사체 생장량을 나타내었다.

[0084] 따라서, LED green 광은 밀리타리스 동충하초 균사체의 생장량 증대에 효과적인 것으로 판단되며, 도 10은 LED 단일광 중 green광의 조사시간에 따른 균사체 생장량 변화를 나타낸 것으로, 하루에 12시간 green광을 조사했을 때 가장 높은 생장량을 나타냄을 확인하였다.

[0086] **<실시예 4> LED 혼합광의 제어조건(혼합광 종류, 조사 시간)에 따른 동충하초 균사체 생장량 평가**

[0087] 1. 공시재료 및 밀리타리스 동충하초 균사체 배양방법

[0088] LED 혼합광의 조사에 따른 밀리타리스 동충하초 균사체 생장량 변화를 평가하기 위하여 혼합광은 red*green (650+525nm), red*blue (650+450nm), green*blue (525+450nm)를 이용하였으며, 상기 광원의 광도는 64.9~108.0 $pmol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ 로 설정하였다.

[0089] 또한, 배양은 <실시예 1-2>와 같은 조건으로 PDB 배지에서 25℃에서 7일간 진탕배양(100 rpm)하여 액체 종균을 생산하였으며, 혼합광 3종은 12 h/day로 5일동안 조사하여 건중량 측정법에 의해 생장량을 측정하였다.

[0090] 2. 밀리타리스 동충하초의 LED 혼합광 조건에 따른 생장량

[0091] 도 11은 밀리타리스 동충하초의 LED 혼합광 조사에 따른 균사체의 생장량을 나타낸 것으로, red*green, red*blue, green*blue 혼합광을 조사했을 때, 각각 13.9 g/L, 8.3 g/L, 13.7 g/L를 나타내었다.

[0092] 따라서 혼합광 중 red*green을 동충하초 균사체에 조사했을 때, 균사체 생장량 증대에 가장 효과적인 것으로 확인되었다.

[0093] 그러나 상기 <실시예 3>에서와 같이, 밀리타리스 동충하초 균사체 생장량 증대에 가장 효과적이었던 단일광인 green광 (*C. militaris*: 25.3 g/L)과 비교했을 때, 단일광이 혼합광보다 동충하초 균사체의 생장량 증대에

효과적인 것으로 확인되었다.

[0094] 따라서, 밀리타리스 동충하초 균사체의 생장량 증대를 위한 LED 적용은 혼합광 보다 단일광이 효과적인 것으로 판단되며, 도 12는 밀리타리스 동충하초의 Red*green 혼합광 조사 시간에 따른 균사체 생장량 변화를 나타낸 것으로, 12 h/day 조사했을 때, 가장 높은 균사체 생장량을 나타내었다.

[0096] **<실시예 5> 균사체의 최대 생장량을 위한 LED의 최적 제어 조건 도출**

[0097] 1. LED 제어조건과 균사체 생장량간의 상관관계 도출

[0098] LED 제어조건을 포함한 동충하초 균사체 배양 조건과 균사체 생장량간의 상관관계 도출은 피어슨 상관계수(Hauke and Kossowski, 2001)와 히트맵(Wilf et al., 2016)을 이용하였으며, 통계 프로그램은 R program (version 3.4.3)을 이용하였다.

[0099] 밀리타리스 동충하초 균사체 배양조건 인자는 LED 파장, LED 광량, LED 조사 시간, 배지의 글루코스(glucose) 함량, 배지의 pH로 설정하였다.

[0100] 상기 피어슨 상관계수에서 계수가 높은 수치를 나타낼수록 배양 조건 인자와 생장량간의 상관관계가 높다고 평가하였으며, LED 제어조건과 동충하초 균사체의 생장량간의 회귀식을 도출하기 위하여 CurveExpert program (version 3.4.3)의 fit model을 이용하였다.

[0101] 결과적으로, 밀리타리스 동충하초 균사체 배양 조건과 균사체 생장량간의 상관관계를 도 13에 나타내었으며, 밀리타리스 동충하초 균사체 생장량에 가장 큰 영향을 미치는 배양 조건은 배지의 글루코스(glucose) 함량 및 LED 파장으로, 특히 LED 파장은 균사체 생장량과 양의 상관관계(0.40)를 나타내는 것으로 확인되었다.

[0102] 또한, LED 제어조건과 동충하초 균사체의 생장량간의 fit model은 도 14에 나타내었으며, LED 제어 조건과 균사체 생장량간의 가장 상관관계가 높았던 LED 파장은 'Sinusoidal' model인 것으로 확인되었다. 이를 이용한 회귀식은 표 3에 나타내었으며, 도출된 LED 제어조건과 균사체 생장량간의 회귀식을 통해 LED 제어조건(파장, 광량, 조사시간)만을 이용하여 생장량을 예측할 수 있을 것으로 판단된다.

표 3

[0103]

No.	χ	y	회귀식	상수
1	파장	균사체 생장량	$y=a+b\cos(c\chi+d)$	a=130.71; b=58.39; c=2.07; d=3.37
2	광량	균사체 생장량	$y=a+b\cos(c\chi+d)$	a=11.11; b=56.23; c=2.05; d=3.13
3	조사시간	균사체 생장량	$y=a+b\chi+c\chi^{2}+d$	a=-0.388035; b=0.313334; c=-0.001540; d=0.000003

[0104] 2. 균사체 생장량 증대를 위한 최적 LED 조건 확립

[0105] 밀리타리스 동충하초 균사체 생장량 증대를 위한 최적 LED 제어 조건은 반응 표면 모델(Response Surface Model;RSM)의 박스 벤켄 계획법(Box-Benkhen design;BBD) 실험설계를 이용하였으며, 프로그램은 Design-Expert Software Version 10을 이용하였다.

[0106] 고정 인자는 밀리타리스 동충하초(*C. militaris*) 균사체이며, 변수는 광량 조건, 배지의 글루코스 함량, 배양시간으로 설정하였다. 이때, 변수의 범위는 예비 실험을 통하여 설정하였으며, BBD 실험 설계는 하기 표 4에서와 같이 총 17조건으로 설정하였다.

표 4

[0107]

Run	독립변수(Independent variables) (coded)			독립변수(Independent variables) (actual)			균사체 건중량(Mycelia dry weight), g/L
	X_1	X_2	X_3	X_1	X_2	X_3	Y_1
1	1	0	-1	1338	7.5	24	16.12
2	0	0	0	669	7.5	72	13.16

3	1	0	1	1338	7.5	120	18.68
4	-1	1	0	0	10	72	20.17
5	0	0	0	669	7.5	72	13.55
6	0	-1	-1	669	5	24	19.65
7	-1	0	-1	0	7.5	24	19.38
8	1	-1	0	1338	5	72	18.51
9	-1	0	1	0	7.5	120	19.12
10	0	-1	1	669	5	120	19.88
11	1	1	0	1338	10	72	15.14
12	0	1	1	669	10	120	17.33
13	0	0	0	669	7.5	72	11.06
14	0	0	0	669	7.5	72	15.02
15	-1	-1	0	0	5	72	19.54
16	0	1	-1	669	10	24	16.31
17	0	0	0	669	7.5	72	13.11

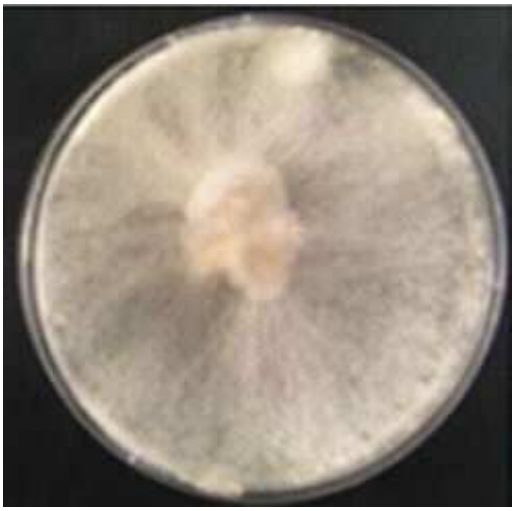
Independent variables	Levels		
	-1	0	1
X_1: 광량, lux	0	669	1338
X_2: 글루코스 함량, g/50 mL	5	7.5	10
X_3: 배양시간, h	24	72	120

[0109] 도 15는 각 인자간의 상호관계를 반응 표면으로 나타낸 3차원 반응 표면 그래프와 유도된 2차 다항방정식 회귀식 모델을 나타낸 것으로, 결과적으로 밀리타리스 동충하초 균사체의 최대 균사체량을 위한 최적 배양 조건이 광량 1273.75 lux, 배지의 글루코스 함량 5.00853 g/50mL, 배양기간 26.5176시간 일 때, 26.5176 g/L까지 균사체 생장량이 증대되는 것으로 확인되었다.

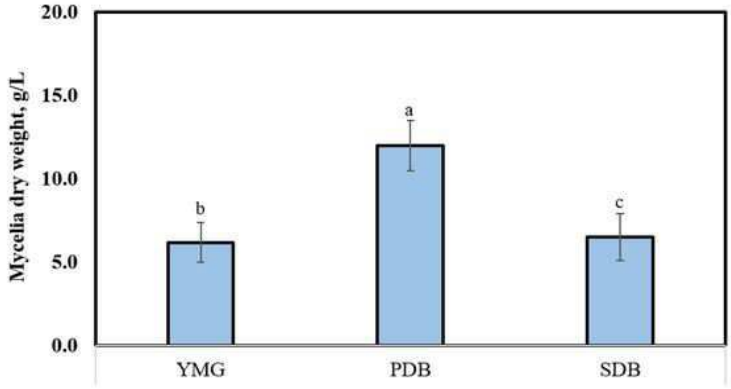
[0110] 또한, 상기 2차 다항방정식 회귀식 모델을 변량분석(ANOVA)하여 도 16에서와 같이 반응 모델의 적합도를 나타내는 R^2 (결정계수)를 얻었다. 그 결과 R^2 (결정계수)는 0.8567로 높은 신뢰성을 나타내었으며, 이에 따라 상기 도 15에서 유도된 2차 다항방정식은 밀리타리스 동충하초의 최대 균사체량을 위한 최적 배양 조건의 반응값 예측에 적합한 것으로 판단된다.

도면

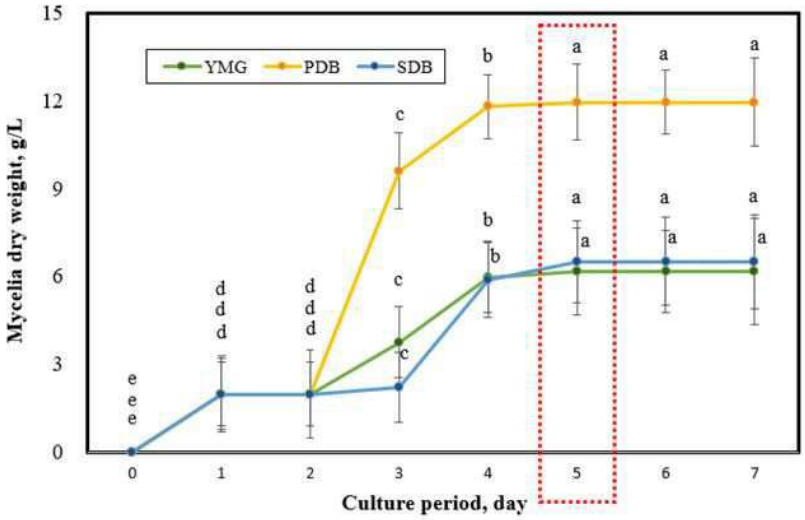
도면1



도면2


20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
Mycelia dry weight, g/L
a
b
c
YMG
PDB
SDB

도면3


YMG
PDB
SDB
Mycelia dry weight, g/L
Culture period, day
0
1
2
3
4
5
6
7
3
6
9
12
15

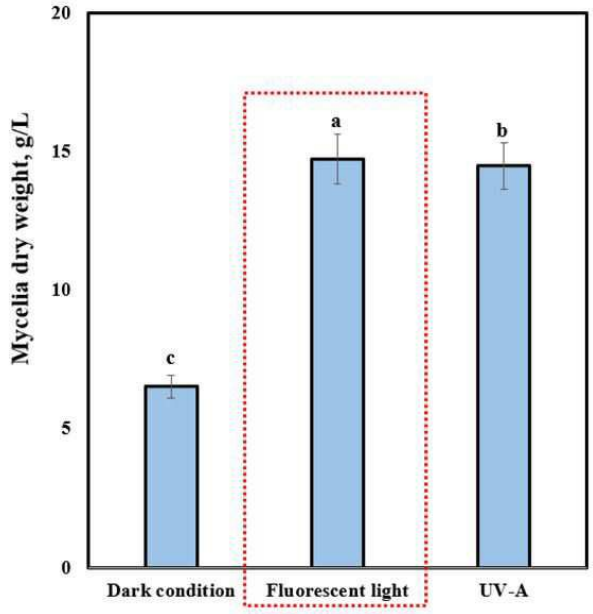
도면4


설치 전
설치 과정
설치 후

도면5



도면6


20
15
10
5
0
Mycelia dry weight, g/L
a
b
c
Dark condition
Fluorescent light
UV-A

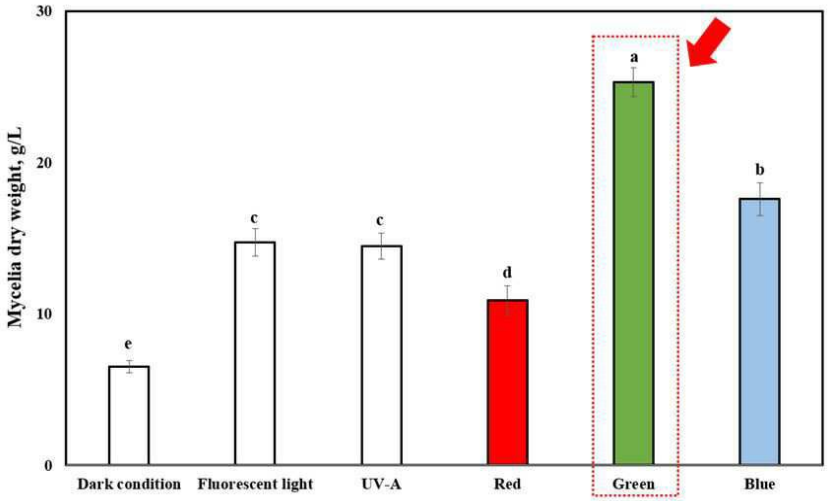
도면7


단일광 설치 전
단일광 설치 과정
단일광 설치 후

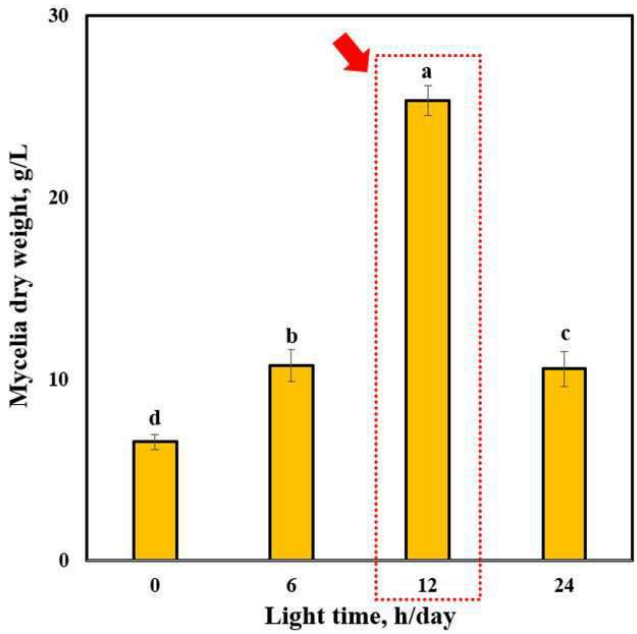
도면8


빛솔 LED CONTROLLER
BISSOL LED

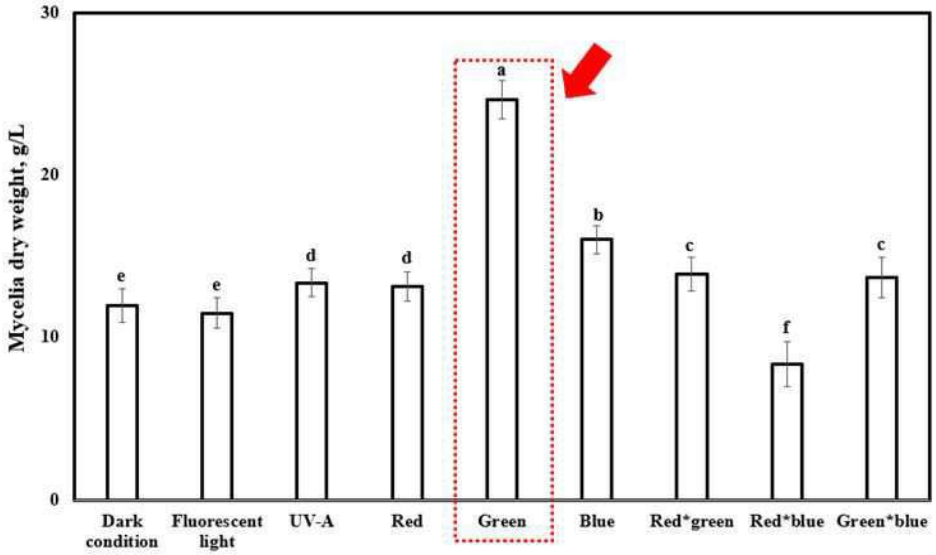
도면9


Mycelia dry weight, g/L
30
20
10
0
a
b
c
c
d
e
Dark condition
Fluorescent light
UV-A
Red
Green
Blue

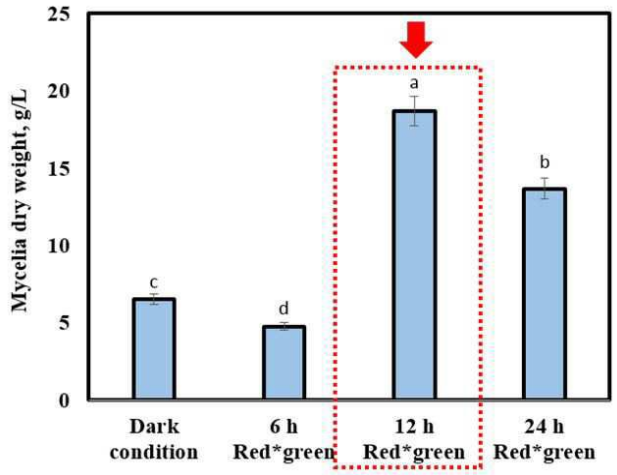
도면10


Mycelia dry weight, g/L
30
20
10
0
a
b
c
d
0
6
12
24
Light time, h/day

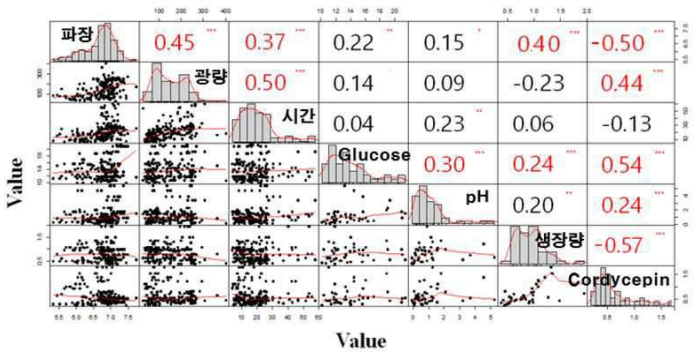
도면11



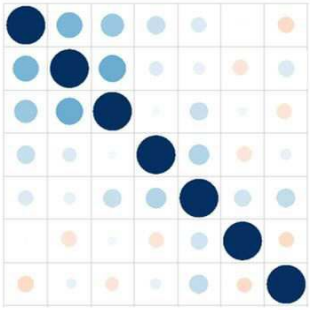
도면12



도면13

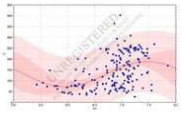


피어슨 상관계수



히트맵

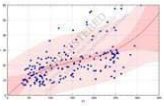
도면14



Model: Sinusoidal
파장 ↔ 균사체 생장량

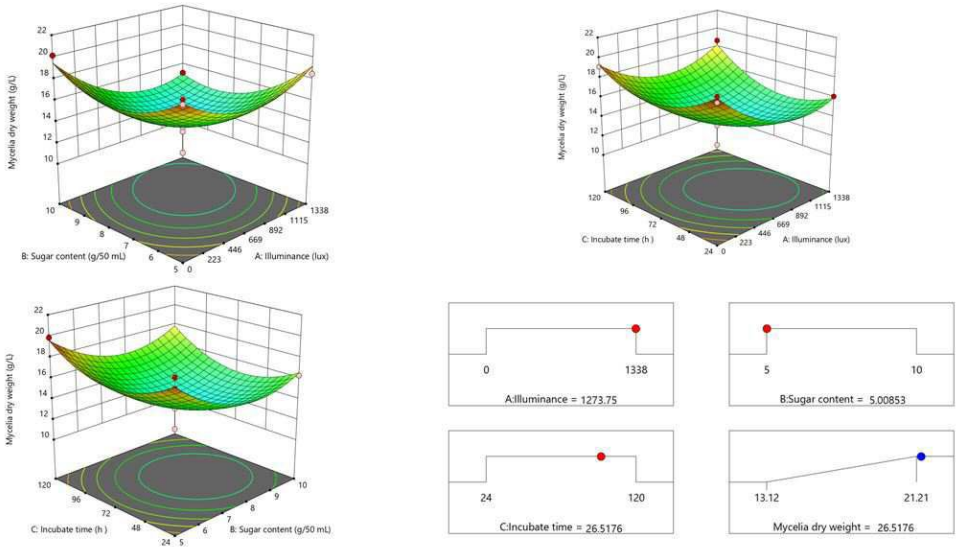


Model: Sinusoidal
광량 ↔ 균사체 생장량



Model: Polynomial
조사시간 ↔ 균사체 생장량

도면15



Second-order model equation:

$$\text{Mycelia dry weight, g/L} = 13.18 - 1.22X_1 - 1.08X_2 + 0.4438X_3 - 1.00X_1X_2 + 0.7050X_1X_3 + 0.1975X_2X_3 + 2.60X_1^2 + 2.56X_2^2 + 2.55X_3^2$$

도면16

