

눈꽃동충하초 (*Paecilomyces japonica* Yasuda) 의 형태 및 배양조건

남성희 · 정이연 · 지상덕 · 조세연
농촌진흥청 농업과학기술원 잠사곤충부

Cultural Condition and Morphological Characteristics of *Paecilomyces Japonica* for the Artificial Cultivation

Sung-Hee Nam, I-Yeon Jung, Sang-Duk Ji and Sae-Yun Cho
National Institute of Agricultural Science and Technology
Department of Sericulture and Entomology, R. D. A. Suwon, Korea.

ABSTRACT

The optimal condition for the production of the artificial fruiting bodies of *Paecilomyces japonica* in bulk was determined from the observation of the conidial, hyphal, and cultural condition and the medium. The colony was grown 32 mm diameter in 14 days on potato dextrose agar(PDA). Conidia was irregularly long oval-shaped and measured $4.07 \times 1.56 \mu\text{m}$ in average. The hyaline hyphae formed transparent bundles which branched out. The fruiting body on the insect surface was measured 30 to 50 mm in length and formed up to 55 branches. Potato dextrose(PD) broth was the most effective for the growth of *Paecilomyces japonica* among the liquid type media. About 3.1 mg mycelia in dry weight were produced in 50 ml PD broth. The best condition for the production of conidia under which condition 4.3×10^8 conidia/ml were harvested was pH 5.0 in acidity and 20°C following pre-culture at 24°C in temperature for 7 days.

Key words : Entomopathogenic fungi, *Paecilomyces japonica*, Silkworm

서 론

곤충기생균 중 최초 기록종인 동충하초(Steinhaus, 1956)는 이병 누에와 매미로부터 각각 *Cordyceps*와 *Isaria*속 균을 처음 분리하였다(McCoy et al., 1988).

예로부터 동충하초는 생리 활성물질이 있는 것으로 알려져 약리적 이용을 위해 연구되어 왔는데 그 결과 중국은 *Cordyceps*에 감염된 유충을 황달, 아편 중독, 결핵, 암치료 등 각종 질병치료에 이용하였으며(Gee, 1918) 일본에서는 동물시험을 통해 면역기능을 증강시키고 항암 효과가 있음을 입증하였다(矢萩信夫, 1996). 뿐만 아니라 동충하초에서 분리한 Cordycepin이 진균, 세균 등에 항생물질로 작용하며(Cunningham, 1951), 포유동물 암세포에 대해서도 핵산합성을 저해하여 생명연장 효과를 나타내는 것을 확인하였다(Madelin, 1996).

이외에도 동충하초는 미생물 방제제 개발(Deacon, 1998)과 곤충기생균 분류(清水大典, 1994) 연구에 폭

넓게 이용되어 왔다.

동충하초에 대한 관심이 고조되고 다양한 분야에서 연구가 진행됨에 따라 수요는 급증하고 있으나, 자연산 동충하초는 채집이 까다롭고 수량이 적어 대량확보가 점점 더 어려운 추세이다. 더욱이 중국 Szechwan 지방에서는 *Cordyceps* 균주가 일부계층에 한정, 고가로 판매되고 있는 실정임으로(Tanada, 1992) 이러한 문제점을 해결하기 위해 동충하초 생산 기술 연구가 요구되어 왔다.

동충하초 인공재배 연구는 1895년 Pettit에 의해 최초로 시도된 이후, *Cordyceps militaris* 균주를 이용한 인공재배 시험이 Shanor(1936)에 의해 실험실 수준에서 행해졌으며 Basith(1968) 등은 *Cordyceps militaris*의 균주의 배양을 위해 각종 영양원을 첨가하고 환경요인으로써 22°C 이하의 배양온도와 최적 광주조건을 구명하였다. 또한 암갈색 날개 잎벌레 성충 및 짚시나방 유충으로부터 분리한 *Paecilomyces farinosus*와 *Paecilomyces canadensis*를 누에에 접종

을 시도하였으며(Aoki *et al.*, 1975) 이화 명나방의 유충, 번데기, 성충을 *Paecilomyces farinosus* 균주의 포자를 처리한 후 감염을 유발시키는 방법 및 *Paecilomyces farinosus*의 액체 종균을 이용해 1령의 파밤나방에 경구 접종하여 감염을 유도한 예가 있다(Agudelo *et al.*, 1983).

그러나 지금까지의 인공재배 시험은 자실체의 발생은 가능하였으나 다량의 기주곤충 확보에 한계가 있고 약리적 이용 측면에서는 기주 곤충의 식용 가치가 구명되어야 하는 문제점이 있었다.

최근 농촌진흥청 잠사곤충부에서는 이러한 인공 재배상의 문제점을 해결하기 위해 대량사육이 용이한 가잠을 기주로 이용하여 눈꽃동충하초 균주를 접종함으로써 눈꽃동충하초의 대량 인공재배가 가능하게 되었으며 생산된 동충하초로부터 면역증강, 항피로, 항암 등 약리효능을 확인하였다(조 등, 1999).

따라서 본 실험에서는 눈꽃동충하초균의 배양형태를 조사하여 본 균주를 정확하게 분류, 동정하고 균의 최적 배양조건을 구명함으로써 고유 활력을 유지하는 우수 균주를 안정적으로 생산하여 대량 인공재배 기술체계를 확립코자 하였다.

재료 및 방법

1. 균분리 및 배양

본 시험에 공시한 눈꽃동충하초(*Paecilomyces japonica* Yasuda)균은 잠사곤충부 병해충연구실 보존주로서 '95년 9월 광고산에서 솔나방 번데기에 감염된 균을 채집하였으며 2~3% Sodium hypochloride로 소독한 자실체를 페트리디쉬 뚜껑에 멸균 테이프로 고정 후 water agar 상에 떨어진 포자를 이용하여 PDA(PD 24g, 한천15g, 증류수 1l)배지에서 25°C 14일간 정치 배양하여 분리하였다.

2. 전자현미경 시료

PDA 배지 상 균을 0.5x0.5 cm 크기로 떼어내어 2.5% Glutaraldehyde(0.1 M Milonig's phosphate 완충액, pH 7.4)로 고정한 후 0.1 M Milonig's phosphate 완충액으로 3회 세척하고 1% osmium tetroxide로 2차 고정하였다. 그 후 에탄올 50, 75, 90, 95, 100% 순으로 탈수하고 amlyacetate용액으로 40분간 2회 치환하여 critical point dryer로 건조한 후 gold-palladium으로 coating하여 주사전자현미경(LEO 440형)으로 관찰하였다.

3. 액체배지 조제 및 배양

최적 액체배지 선발을 위해 PD(PD 24g, 증류수 1l)를 기본배지로 하여 MM(malt extract media), V8(tomato juice media), MCM(mushroom complete media), NPD(peptone dextrose media), HM(hamada media) 등 영양배지 6종을 조제하고(표 1), 멸균된 100 ml의 삼각플라스크에 50 ml씩 분주한 다음 PDA 배지 상에 배양된 균총을 떼어 넣어 밀봉 후 진탕배양기(25°C, 150 rpm)에서 7일간 배양하였다. 배양 완료된 균사는 여과(Whatman No. 1)하여 증류수로 2회 세척하고 80°C에서 48시간 건조 후 중량을 측정하였다.

4. 분생포자 형성 및 누에접종

온도와 산도의 교호작용 검증을 통해 분생포자 형성을 조사하기 위해 현미배지는 pH 5.0, 5.5, 6.0, 7.0으로 조정된 증류수에 각각 48시간 불린 후 80g을 취해 250 ml 삼각플라스크에 넣어 멸균한 다음 1 ml의 액체종균을 현미배지에 접종하여 균이 고루 퍼지도록 흔들어 준다. 온도는 20°C, 24°C 및 7일간 24°C 정치 후 20°C로 변온조건 3가지로 처리하며 균사가 활착되는 7일째부터 배양 종료시까지 3일 간격으로 교반하여 35일간 배양하였다. 배양된 분생포자는 Tween 20을 첨가한 증류수에 희석 후 혈구측정계로 그 농도를 측정하여 1x10⁸ conidia/ml로 조정하고 5령

Table 1. Composition of Media used in this study
unit : g/1000ml

Components	Media(g/1000ml)					
	PD	MM	V8	MCM	NPD	HM
Dextrose	20			20	10	20
Ebiose						5
Hyponex						3
KH ₂ PO ₄				0.46		
K ₂ HPO ₄				1	1	
Malt ext		20				
MgSO ₄ ·7H ₂ O				0.5	0.5	
Peptone				2	5	
Potato	200					
Tomato juice			180			
Yeast ext				2		3

기잡에 경피접종하여 고온다습(28°C, 95%)조건에서 24시간 절식처리하였다. 그 후 표준 누에 사육법으로 사육하며 상족 7~8일째 수견하였으며 절건 후 20일간 20~24°C에서 보호하여 형성된 자실체를 관찰하였다.

결과 및 고찰

1. 균의 형태적 특성 및 자실체 형성

균사는 사면배지에서 14일 배양시 직경 32 mm로 성장하며, colony는 앞, 뒷면 각각 흰색 및 미백색을 띠었다(그림 1, a). 또한 주사전자현미경 하에서 관찰한 분생자병은 투명하며, 마디끝에는 투명한 분생포자가 여러개 부착되어 있는데 그 형태는 장타원형으로 (2.98~1.20) 4.07×1.56 (6.61×2.56)μm 이었다(그림 1, b).

한편 자실체는 성장기간이 경과할수록 기주 표피는 흰색 균사로 덮이고 기주 상층부를 중심으로 미백색 자실체가 형성되는데 지상부 높이는 30~50 mm이며 다발형태의 자실체는 약 55개로 그 끝마디는 평균 4개로 재분지되었다(그림 1, c). 이러한 결과는 자연 채집산 동충하초가 높이 70 mm, 자실체 수 20여개로 성장하는 것에 비교했을 때 인공재배시 자실체 수는 약 35개 증가하고 높이는 30 mm 감소되었다. 이것은 인공 재배시 고농도 분생포자를 인위 살포하여 기주 체적당 발생율은 높아졌으나 기주의 한정된 영양분으로 인해 더 이상 생장은 일어나지 않기 때문이다. 더욱이 인공재배시 재배기간이 경과되면 더 이상의 성장과 분지는 발생하지 않고 시들게 되는데, 자실체는 분생포자로 형성되어 작은 충격에도 쉽게 비산하는 경향을 나타내었다.

2. 액체배지 선발

액체배지는 영양성분의 분포가 고르고, 종균이 영양체에 접촉하고 흡수할 수 있는 이화학적 조건이 충분히 제공되므로 균사생장을 촉진시키고 균사체 생산량을 높인다. 또한 액체종균을 현미배지에 접종하면 현미의 넓은 면적에 걸쳐 발균중심을 형성하므로 배지에 따라서 배양기간을 약 15~20일 단축할 수 있다.

우수 배지선발을 위해 PD, MM, V8, MCM, NPD, HM 6종 배지를 공시하여 균사 성장속도를 비교하였다. 초기 배양액이 투명하며 종균의 결속(結束)이 일어났으며 배양이 진행될수록 균사체 조각과 파편의 분산도가 커지고 공시배지에 따른 종균결속의 양적 차이는 두드러지게 나타났다. 배양 종료

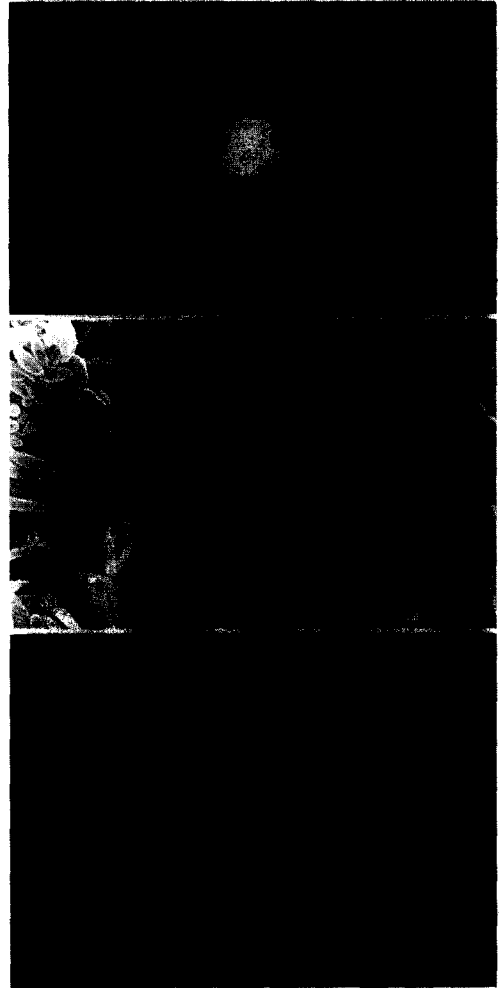


Fig. 1. Morphological features of *Paecilomyces japonica* a) Cultural characteristics on the PDA. b) Scanning electron microscopic view of conidia and hyphae. Scale bar: 6 μm. c) Artificial fruiting bodies.

후 생산된 균사체의 건중량을 측정하였다. 그 결과 PD배지에 대한 생산량은 3.15 ± 0.16 mg/50ml로서 최대를 나타내었으며(표 2) 다음은 MCM, HM, V8 배지 순으로 2.95 ± 0.14 , 2.60 ± 0.35 , 2.26 ± 0.28 mg/50 ml로 양호하였다. 그러나 NPD 및 MM배지 내 건중량은 1.64 ± 0.13 , 0.33 ± 0.06 mg/50ml로 배양량이 현저히 저조하였다. 위의 결과는 일반적인 동충하초균이 PD배지에서 생장이 우수하다는 성(1996)의 결과와 일치하였으며 *Cordyceps militaris*와 *Cordyceps nutans* 균은 배양에 관해서는 PD 배지보다 Hamada

Table 2. Dry weight of mycelia of *Paecilomyces japonica*

Medium	Dry weight(mg)
PD	3.15±0.16 ^{a)}
V-8	2.26±0.28
MM	0.33±0.06
MCM	2.95±0.14
NPD	1.64±0.13
HM	2.60±0.35

^{a)}Values are mean±SD

배지에서 2배 생장이 높은 것으로 조사된 성(1993)의 보고와 비교할 때 균 종에 따라 적정배지가 다른 것으로 인정할 수 있었다.

3. 분생포자 형성

균 배양시 환경조절은 분생포자 발생 유도를 위한 주요인으로 작용함으로 본 시험에서는 온도 및 산도 별 처리를 통해 포자형성 적정조건을 구명하였다(표 3). 배양온도는 20°C, 24°C 및 24°C~20°C의 처리와 산도는 pH 5.0, 5.5, 6.0 및 7.0으로 설정하고 배양시 3일 간격으로 교반하였는데 이는 배지와 균 사체의 엉킴을 방지하고 포자발아를 촉진시키는 역할을 하여 교반시 생산된 포자로 시험관 내부가 탁해지는 현상이 나타난다. 포자형성율은 상기 온도조건 하에서 산도 pH 5.0 처리시는 기타 처리구에 비해 포자형성율이 높은 경향을 띠었는데 온도 20°C, 24°C 정지 배양구에서는 각각 3.57±0.44, 2.62±0.40 ×10⁸ conidia/ml이었다. 특히 24°C~20°C 변온조건에서는 4.30±0.35×10⁸ conidia/ml로써 최대 포자생산량을 나타내었다. 산도 pH 5.5 처리에는 각각 2.24±0.37, 1.19±0.36, 2.67±0.37×10⁸ conidia/ml의 생산량을 나타내었으며 pH 6.0에서는 1.25±0.51, 1.66±0.78, 1.16±0.46×10⁸ conidia/ml이며 pH 7.0에서는 3.46±0.64, 1.22±0.42, 3.43±0.71×10⁸ conidia/ml로 나타났고 pH 5.0처리에 비해 생산량이 저하되었다.

따라서 본 시험은 약산성의 범위에서 진균발아, 균 사생장 및 자실체 형성이 가장 양호하다는 김 등(1995)의 보고와 동일한 결과를 얻었으며, 최적온도 조건은 분생포자 발아시 발생하는 자체열로 인해 일어나는 배지내 온도상승과 포자의 수명이 저온일수록 길어지는(박, 1997) 생리현상을 고려할 때 24°C에

Table 3. Conidial production in the hulled rice medium based on cultural condition

Temp. (°C)	pH			
	5.0	5.5	6.0	7.0
20	3.57±0.44 ^{a)}	2.24±0.37	1.25±0.51	3.46±0.64
24	2.62±0.40	1.19±0.36	1.66±0.78	1.22±0.42
24/20 ^{b)}	4.30±0.35	2.67±0.37	1.16±0.46	3.43±0.71

^{a)}Values are mean±SD

^{b)}Cultivating at 20°C, following preculture at 24°C for 7 days

서 균사가 활착된 후 20°C에서 포자발생을 유도하는 것이 분생포자 형성과 활력유지에 바람직한 조건이라 생각된다.

적 요

눈꽃 동충하초의 인공재배를 위한 최적배양조건을 구명하기 위해 본 시험을 수행하였으며 그 결과 colony는 직경 32 mm/14 days로 성장하였으며 분생포자는 불규칙한 장타원형으로 평균 4.07×1.56 μm 크기이며 분생자병은 투명다발의 분지형으로 발생하였다. 자실체는 지상부에서 30~50 mm로 다발형태로 발생하며 평균 55개의 분지를 형성한다.

종균배양 액체배지 선발결과 PD배지가 건중량 3.15±0.16 mg/50 ml로 균사생장에 가장 효과가 우수하였다. 분생포자 생산 최적 환경조건은 산도 pH 5.0 온도는 24°C에서 20°C로 변온을 가한 경우 4.30±0.35×10⁸ conidia/ml로 기타 처리구에 비해 포자형성율이 가장 우수하였다.

인용문헌

- Agudelo, F. and L. A. Falcon(1983) Mass Production, Infectivity, and Field Application Studies with the Entomogenous Fungus *Paecilomyces farinosus*. *J. Invertebr. Pathol.* **42**: 124-132.
- Aoki, J. Tanase, K. and Kusida, T.(1975) The pathogenicity to the silkworm and taxonomic considerations on some muscardine fungi. *J. Sericult. Sci. Japan.* **44**(5): 365-370.
- Basith, M., and Madelin, M. F. (1968) Studies on the production of perithecial stromata by *Cordyceps*

- militaris* in artificial culture. *Canadian J. Botany*. **46**: 473-480.
- 조세연 · 신국현 · 송성규 · 성재모 등(1999) 누에동충하초 생산 및 유용물질 개발. 농촌진흥청, pp. 162-166.
- Cunningham, K. G., Hutchinson. S. A., Manson, W., and Spring, F. S.(1951) Cordycepin, a metabolic product from culture of *Cordyceps militaris*(Linn.) Link. Pt. 1. Isolation and characteristics. *J. Chem. Soc.* **51**: 2290-2300.
- Deacon, J. W.(1998) Modern Mycology. Blackwell Science, pp. 262-265
- Gee, N. G.(1918) Notes on *Cordyceps sinensis*. *Mycol. Notes* **54**: 767-768.
- 김경수 · 유창현 · 차동렬(1995) 最新食用버섯栽培技術. 玄岩出版社, pp. 93-95.
- Madelin, M. F.(1996) Fungal Parasites of Insects. *Ann. Rev. Entomol.* **11**: 423-448.
- Mccoy, C. W., R. A. Samson and D. G. Boucias(1988) Entomogenous fungi. In "CRC Handbook of Natural Pesticides. Microbial Insecticides, Part A. Entomogenous Protozoa and Fungi" (C. M. Ignoffo. ed.), CRC Press. Boca Raton. 5th, pp. 151-236.
- 박용환(1997) 최신 버섯학. 한국버섯원균영농조합, pp. 107-108.
- 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.
- 清水大典(1994) 原色冬蟲夏草圖鑑. 誠文堂新光社, pp. 1-381.
- Steinhaus, E. A.(1956) Micorbial control-the emergence of an idea. A brief history of insect pathology through the nineteenth century. *Hilgardia* **26**: 107-160.
- 성재모 · 김천환 · 양근주 · 이현경 · 김양섭(1993) 동충하초속균의 분포 및 *Cordyceps militaris*와 *C. nutans*의 이용에 관한 연구. *Kor. J. Mycol.* **21**(2): 94-105.
- 성재모 · 이현경 · 양근주(1995) 동충하초(Cordyceps)속균의 형태적인 특징과 단백질 Pattern 에 의한 계통분류. *Kor. J. Mycol.* **23**(1): 92-104.
- Tanada, Y. and H. Kaya(1992) Insect pathology. Academic press, pp. 3-5.
- 失萩信夫, 尹丹仁期(1996) 日本冬蟲夏草末期ガンへの挑戦. 株式会社エフエクト, pp. 130-131.