

번데기동충하초의 자실체 형성에 관한 연구

성재모* · 최영상 · 부산 쓰레스타 · 박영준

강원대학교 자원생물환경학부

Investigation on Artificial Fruiting of *Cordyceps militaris*

Jae-Mo Sung*, Young-Sang Choi, Bhushan Shrestha and Young-Joon Park

Department of Environmental Biology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

(Received October 15, 2001)

ABSTRACT: The isolates of *Cordyceps militaris* preserved in EFCC, Kangwon National University were investigated to form the fruiting bodies under artificial conditions. The fruiting bodies were observed to be better in the 1 l polyethylene bottle containing 60~80 gm of brown rice and 100~110 ml of water. Addition of 10~20 gm of pupae per bottle showed higher fruiting. Similarly, addition of sucrose, peptone or hemoglobin also had favorable effect on fruiting. 25°C and 20°C were favorable for mycelial growth and fruiting respectively. Light intensity of 500 lux and 12 h of light/dark period produced highest amount of fruit bodies.

KEYWORDS: Artificial fruiting, Brown rice, *Cordyceps militaris*, Environmental factors, Pupae

동충하초속균의 분류학적 위치는 자낭균문(Ascomycota), 핵균강(Pyrenomycetes), 육좌균목(Hypocreales), 맥각균과(Clavicipitaceae), 동충하초속(*Cordyceps*)에 속하며 한국을 비롯한 중국, 일본 등 전 세계적으로는 100속 1000종이 알려져 있다(Glare and Milner, 1991; Humber, 2000; Kobayasi, 1941, 1982; Mains, 1958; Samson, 1974; Seaver, 1911; Sung *et al.*, 1997; Zeng, 1998; 성, 1996). 동충하초속균의 생활사는 곤충의 유충, 번데기, 성충의 전 생육단계에 걸쳐 침입하여 기주의 표면에 분생포자를 형성하거나 곤충체 안에 내생균핵을 형성하여 월동하며 적합한 환경조건을 만나면 자실체를 형성하여 자낭포자를 분산한다. 이러한 동충하초의 대표종은 번데기동충하초(*Cordyceps militaris*)로 한국에 많이 자생하는 것으로 알려졌고 Seaver(1911)는 번데기동충하초를 *Cordyceps*속의 대표종(type species)으로 소개하였다.

번데기동충하초[*Cordyceps militaris* (L.) Link.]는 주로 나비목(Lepidoptera)의 유충 또는 번데기를 기주로 하여 주황색의 곤봉형 자좌를 형성하는 곤충기생균(Entomopathogenic fungi)의 일종이며 자낭각은 반돌출형이며 원통형의 자낭안에 실모양의 자낭포자들이 존재 한다.

따라서 본 연구는 국내에서 채집된 번데기동충하초균을 공시균주로 자실체 형성조건을 조사하고 인공재배에 관련된 요인들을 구명하여 번데기동충하초의 안정적인 재배를 위한 기초자료를 제공하고자 수행하였다.

재료 및 방법

공시균주

본 시험에 공시한 균주는 강원대학교 동충하초은행(Entomopathogenic Fungal Culture Collection)에서 채집, 보관중인 번데기동충하초를 사용하였다. 보관중인 모균주를 PDA 평판배지에 접종한 후 24°C의 incubator에서 10일간 배양한 후 접종원으로 이용하였다.

기초배양 실험

자실체형성에 적합한 배양병을 선발하기 위하여 850 cc, 1000 cc, 1100 cc, 2000 cc 배양병에 현미의 첨가량과 번데기의 첨가량을 조절하여 곡물 : 물의 첨가비를 1 : 1.2로 조절하여 현미배지를 조제하였으며 현미배지의 입병량을 조사하기 위하여 1000 cc polypropylene(pp) 병에 현미의 입병량을 20 g, 40 g, 60 g, 80 g, 100 g으로 달리하여 첨가한 후 수분의 첨가량을 조절하여 배지를 조제하였다. 또한 자실체 형성에 적합한 온도를 조사하기 위하여 18±2°C, 20±2°C, 24±2°C에서 배양을 실시하였다. 각 실험은 액체배양균사체를 접종하여 자실체 형성을 유도하였으며 접종된 배양병은 20±2°C의 배양실에서 45일간 배양한 후 자좌길이, 발아수, 자실체의 무게, 회수율을 조사하였다.

배지 조사

배지내의 sucrose 및 번데기의 첨가에 의한 자실체 형

*Corresponding author <E-mail: jmsung@kangwon.ac.kr>

성을 조사하기 위하여 번데기 10 g을 첨가한 현미배지에 sucrose가 첨가하지 않은 것을 기본배지로 10%, 20%, 30%, 40%, 50%로 첨가하였다. 또한 현미배지에 첨가되는 번데기의 첨가량을 0 g, 10 g, 20 g, 30 g, 40 g, 50 g으로 다르게 첨가하여 현미배지를 조제하였다. 첨가제의 상호작용에 의한 영향을 조사하기 위하여 번데기를 넣지 않은 현미배지를 기본배지로 건조누에 10 g, 번데기 10 g, sucrose 10%, peptone 2%, hemoglobin 5%의 첨가를 각각 다르게 하여 조제하였으며 현미배지의 공극률에 따른 영향을 알아보기 위하여 80 g의 현미와 번데기 10 g이 첨가된 1100 cc의 배양병에 수분의 첨가를 달리하여 현미배지내 공극률을 조절하였다. 각 실험은 액체배양 된 균사체를 접종하여 자작길이, 발아수, 병당 자실체 무게, 회수율을 조사하였다.

배양조건 조사

자실체 형성에 적합한 광도(lx) 및 광조사 시간은 조사하기 위하여 형광등의 설치간격을 달리하여 0 lx, 100 lx, 500 lx, 1000 lx, 그리고 500 lx의 광도로 광조사 시간을 6 hr, 12 hr, 18 hr, 24 hr/24 hr로 다르게 조절하였다. 조절되는 동일한 배양실에서 액체배양균사체를 번데기 10 g이 첨가된 현미배지에 접종하여 자실체형성을 유도하였으며 20±2°C의 배양실에서 45일간 배양한 후 자작길이, 발아수, 병당 자실체의 무게, 회수율을 조사하였다.

인공재배 단계별 처리방법 조사

번데기동충하초의 인공재배를 위하여 균사배양, 배지조제, 접종, 생육 등 각각의 단계별로 실험결과에 준하여 적정 처리방법을 나열하여 대량생산 재배법을 도식화하였다.

결 과

기초배양 실험

병당 자실체의 무게가 가장 높았던 배양병은 1100 cc 배양병으로 조사되었으며 병당 회수율에서는 850 cc와 1100 cc에서 높게 조사되었다(Table 1). 입병량 조사실험에서는 60~80 g을 첨가한 배양병에서 가장 양호한 자

Table 1. Effect of bottle volume on artificial cultivation of *Cordyceps militaris* C754

Volume	NS ^a	WF ^b
850 cc	30	33.9
850 cc	55	29.1
1000 cc	56	28.8
1100 cc	50	30.9
2000 cc	70	41.0

^aNS, Number of stroma.

^bWF, Weight of fruiting body (g/bottle).

Table 2. Effect of rice weight (g) on artificial cultivation of *Cordyceps militaris* 412

Rice wt.	LS ^a	DS ^b	NS ^c	WF ^d	BE ^e
20	60	6.5	41	34.9	268.4
40	65	7.0	45	50.7	211.2
60	60	6.5	109	63.0	180.0
80	70	9.0	70	90.4	180.8
100	50	10.0	50	88.5	140.4

^aLS, Length of stroma (mm).

^bDS, Diameter of stroma (mm).

^cNS, Number of stroma.

^dWF, Weight of fruiting body (g/bottle).

^eBE, Biological efficiency (%) = (fresh mushrooms/dry substrate) × 100.

실체를 형성하였다. 입병량이 적을수록 배지내의 균사생장 완료기간이 빠르게 진행되어 자실체의 발아도 빠르

Table 3. Effect of temperature on artificial cultivation of *Cordyceps militaris* C754

Temp. (°C)	LS ^a	NS ^b	WF ^c	BE (%) ^d
18	41.6	46	82.0	164.1
20	50.0	57	85.4	170.9
24	19.3	ND ^e	31.6	63.1
24→20	60.0	66	116.7	233.0

^aLS, Length of stroma (mm).

^bNS, Number of stroma.

^cWF, Weight of fruiting body (g/bottle).

^dBE, Biological efficiency.

^eND, not determined.

Table 4. Effect of sucrose on artificial cultivation of *Cordyceps militaris* C754

Sucrose (%)	WF ^a	BE (%) ^b
0	106.7	192.5
10	115.6	204.7
20	99.8	161.7
30	73.3	113.0
40	59.9	87.2
50	33.5	38.9

^aWF, Weight of fruiting body (g/bottle).

^bBE, Biological efficiency.

Table 5. Effect of pupae for artificial cultivation of *Cordyceps militaris* C412

Pupae (g)	LS ^a	DS ^b	NS ^c	WF ^d	BE (%) ^e
0	70	9.0	70	90.4	180.8
10	70	9.0	70	182.7	351.3
20	65	8.0	60	108.3	200.5
30	60	7.5	50	119.6	213.5
40	55	10.0	50	132.6	228.6
50	55	10.0	50	142.1	236.8

^aLS, Length of stroma (mm).

^bDS, Diameter of stroma (mm).

^cNS, Number of stroma.

^dWF, Weight of fruiting body (g/bottle).

^eBE, Biological efficiency.

Table 6. Effect of complex sources on artificial cultivation of *Cordyceps militaris* C412

	LS ^a	NS ^b	WF ^c	BE ^d
S ^e	35.0 ^f	40.0 ^g	42.5 ^h	15.0
P	45.0	40.0	42.5	30.3
H	40.0	37.5	22.5	66.1
S + P	42.5	42.5	55.0	55.1
S + H	30.0	37.5	50.0	37.6
P + H	35.0	35.0	30.0	61.7
S + P + H	30.0	30.0	42.5	61.5
				28.6
				32.3

^aLS, Length of stroma (mm).^bNS, Number of stroma.^cWF, Weight of fruiting body (g/bottle).^dBE, Biological efficiency.^eS, sucrose 10%; P, peptone 2%; H, hemoglobin 5%; S + P, sucrose 10% + peptone 2%; S + H, sucrose 10% + hemoglobin 5%; P + H, peptone 2% + hemoglobin 5%; S + P + H, sucrose 10% + peptone 2% + hemoglobin 5%.^fbrown rice medium.^gbrown rice larva medium.^hbrown rice pupa medium.

게 나타났으나 40 g 이하의 배지량에서는 자좌의 길이 성장이 저조하였으며 현미 100 g 첨가의 경우에는 자좌의 형태가 군사덩어리로 성장하였다(Table 2). 24°C에서 10일간 균사배양 시킨 후 20±2°C의 배양실에서 자실체 형성이 유도된 배양병에서 자실체의 수확량이 높게 나타났다. 20±2°C와 18±2°C에서도 자실체는 형성되었지만 24±2°C에서 균사배양한 배양병보다는 저조한 형성을 보였으며 24±2°C에서는 자좌의 형태가 아닌 솜털 모양의 균사체가 성장하였다(Table 3).

배지 조사

Sucrose의 첨가에 의한 영향을 보면 sucrose 10%가 가장 우수한 자실체 형성을 나타내었으며 30% 이상 첨가된 현미배지에서는 배지의 공극률도 낮았으며 자실체의 수확량도 낮게 조사되었다(Table 4). 번데기의 첨가는 10 g일 때 자좌의 발생이 가장 양호하였고 30 g 이상의 번데기를 첨가한 배양병에서는 균사의 생장이 왕성하였으며 자좌를 형성하기보다는 균괴형태로 성장하였다. 자낭각의 형성은 자좌의 초기발아가 빠른 자좌에서 형성되었다(Table 5).

첨가제의 상호작용에 의한 영향은 자좌의 길이는 번

데기를 첨가하고 sucrose와 peptone이 첨가된 배지에서 성장이 양호하였으며 발아수는 peptone과 hemoglobin이 첨가된 배지에서 양호하였다. 자실체의 회수율이 가장 높은 배지는 번데기와 sucrose를 첨가한 배지로 조사되었다(Table 6).

배양조건 조사

광도에 의한 영향은 500 lx에서 자실체 형성이 양호하였으며, 광조사가 없는 암상태에서의 자실체 형성은 전혀 발생되지 않고 균사상태로만 성장하였다. C754 균주는 500 lx에 비해 100 lx와 1000 lx에서 자좌길이, 발아수, 회수율이 낮게 나타났으나 C1741 균주의 경우에는 100 lx에서 자좌길이의 성장이 양호하였으며 회수율도 높게 조사되었다(Table 7). 광조사 시간은 12 hr/24 hr로 처리하였을 때 자좌의 길이가 양호하였으며 발아수와 병당 수확량, 회수율은 6 hr/24 hr에서 높게 조사되었다(Table 8).

고 찰

인공자실체 형성을 위한 접종원으로 Kobayasi(1941)

Table 7. Effect of light intensity on artificial cultivation of *Cordyceps militaris* C 754

Intensity (lx)	LS ^a	NS ^b	WF ^c	BE (%) ^d
0	—	—	12.7	25.4
100	51.0	42	36.7	73.4
500	66.0	66	60.3	120.6
1000	38.0	50	29.7	59.4

^aLS, Length of stroma (mm).^bNS, Number of stroma.^cWF, Weight of fruiting body (g/bottle).^dBE, Biological efficiency.^aLS, Length of stroma (mm).^bNS, Number of stroma.^cWF, Weight of fruiting body (g/bottle).^dBE, Biological efficiency (%) = (fresh mushrooms/dry substrate) × 100.**Table 8.** Effect of illumination period on artificial cultivation of *Cordyceps militaris* C754

Illumination (hr/day)	LS ^a	NS ^b	WF ^c	BE ^d
6	97	64	115.0	230.0
12	103	54	110.9	221.8
18	88	61	101.3	202.6
24	68	63	92.5	185.0

는 plate상의 포자를 현미배지의 표면에 직접 접종하였고 Basith와 Madelin(1968)는 포자현탁액을 현미배지에 접종하여 자실체형성을 유도한 바 있으며 Liang(1990)과 Pen(1995)은 곡물배지에서 자실체 형성실험을 실시하였다. 배양병의 선발시험에서는 Kobayasi(1941), Basith과 Madelin(1968), Sung(1993, 1999), 李(1996)는 삼각플라스크를 이용하여 자실체 형성을 유도하였으나 본 연구에서는 대량생산 체제의 확립을 위하여 멸균되는 버섯재배용 pp병을 시험하여 적정 배양병을 선발하였다. 배지의 입병량조사에서는 Kobayasi(1941)는 100 cc의 삼각플라스크에 10 g의 현미와 25 cc의 증류수를 첨가하여 배지를 조제하였으며 Basith와 Madelin(1968)는 100 ml의 삼각플라스크에 10 g의 long-grain polished rice와 25 ml의 증류수를 첨가한 후 하루동안 방치한 후에 멸균하여 조제하였다고 보고하였으며 성(1999)과 李(1996)는 쌀가루 5 g과 밀가루 5 g에 물 100 ml을 넣고 제조한 배지와 곡물 : 수분함량이 1 : 3.5의 비율일 때 자실체 생산이 왕성하였다고 보고한 바 있다. 본 실험에서는 선발된 1000 cc 배양병에 현미의 입병량을 20 g부터 100 g까지 다르게 첨가한 후 수돗물을 첨가하여 실험한 결과, 60~80 g의 현미입병량에서 자실체 형성이 양호하였다. 현미 20 g을 입병한 후 자실체 형성을 유도한 배양병에서 회수율은 높게 조사되었으나 40 g 이하의 입병량에서는 자자는 적립하지 못하며 성장이 불량하였다. 또한 현미 100 g 이상을 입병한 경우에는 자자의 형태가 불분명하며 균괴형태로 발아, 성장하여 상품성에서 낮을 것으로 생각되었다.

배양온도의 조사에서 Sung 등(1999)은 20°C와 24°C의 온도를 비교하여 자실체형성을 보고한 바 있으며 Basith와 Madelin(1968)는 20±2°C의 배양온도조건에서 자실체 형성이 유도되었다. 본 연구에서는 24°C에서 균사배양 후에 20°C에서 발아를 유도한 배양병에서 회수율이 가장 높게 조사되었다. 따라서 균사배양시기에는 24°C의 배양실 배양한 후 20°C의 배양실에서 발아를 유도하여 자실체 형성을 유도하는 것이 적합하리라고 사료된다.

현미배지의 조건을 조사하기 위하여 현미배지내에 sucrose의 첨가농도를 다르게 하여 실험한 결과, 10%의 sucrose를 첨가한 배양병에서 회수율이 204.7%로 높게 조사되었다. Basith and Madelin(1968)는 현미배지에 탄소원으로 starch, sucrose, glucose를 첨가하여 자실체 형성을 유도하여 sucrose 10%에서 자실체 형성이 양호함을 보고한 바 있으며 본 실험에서도 이와 일치하는 결과를 나타내었다. 번데기첨가에 따른 자실체의 영향을 조사하여본 결과, 번데기의 첨가량이 증가할수록 회수율이 증가되는 것으로 조사되었으나 번데기의 첨가량이 30 g 이상 일 때에는 자자의 형태가 불분명하며 균괴형태로 성장하였고 발아수는 감소되었다. Sung 등(1999)은 삼각플라스크내에 현미 20 g과 번데기의 첨가를 8개

씩을 넣어 자실체 형성을 유도한 바 있다. 본 실험에서 현미배지내의 번데기첨가량을 조사한 결과 10~20 g의 번데기첨가가 양호한 자실체를 형성하여 Sung 등(1999)의 번데기 8개의 첨가결과와 유사한 결과를 나타내었다.

상기의 결과를 기준으로 첨가불이 없는 현미배지, 건조누에 5 g이 첨가된 현미배지, 번데기 10 g이 첨가된 현미배지와 sucrose 10%, peptone 2%, hemoglobin 5% 씩을 각각 다르게 첨가하여 자실체 형성을 유도하여 비교조사한 결과, 번데기를 첨가한 후 sucrose 10%를 첨가한 현미배지에서 회수율이 66.1%로 가장 높게 나타났으며 무처리구의 회수율은 51.5%로 나타났다. 복합적인 첨가제에 의한 회수율면에서 수치적으로는 차이가 나지만 대량생산 체계에서는 첨가제를 넣지 않고 자실체 형성을 유도하거나 첨가제의 불리성과 첨가방법 등을 고려하여 처리공정을 줄이는 것이 필요하리라고 생각한다. 현미배지의 공극률에 따른 자실체 형성을 조사한 결과, 현미 80 g과 번데기 10 g이 첨가된 배지에 증류수의 첨가량을 100~110 ml 정도 첨가하여 공극률 0.59~0.63%의 비율일 때 높은 자실체의 형성을 나타내었다. 李(1996)는 곡물 : 수분함량이 1 : 3.5의 비율일 때 자실체 생산이 왕성하였다고 보고한 바 있으나 본 연구결과 배지 : 수분함량이 1 : 1.25~1.37의 비율에서 자실체 형성이 양호한 것으로 조사되었다.

Shanor(1936)는 동충하초균의 자실체형성에 22°C 이하의 온도와 높은 광조건의 필요성에 관한 보고 한 바 있으며 Basith와 Madelin(1968)는 초기발아의 유도시에 3 ft-c의 광조건과 자낭각의 성숙에 15~90 ft-c의 광조사가 필요하다고 보고하였다. Choi 등(1999)은 1000 lx의 광조건에서 번데기동충하초의 자실체 형성이 우수함을 보고한 바 있으나 본 실험에서는 500 lx에서 자실체의 성장이 양호한 것으로 조사되었다. 특히 번데기난을 이용하여 자실체 형성을 유도하는 경우에는 배지내의 수분첨가를 위하여 매일 관수를 실시하는 것이 자실체의 수확을 높이는데 가장 중요한 요인이라고 사료된다.

적 요

배양병의 선발시험에서는 1100 cc pp병에서 자실체 형성이 우수하였다. 경제성을 고려하여 1000 cc병을 이용한 자실체형성에서 현미의 입병량은 60~80 g이 적당하였다. 자실체 형성을 위한 배양온도는 24°C에서 균사배양한 후 20°C에서 발아를 유도하였을 때 자실체 형성이 우수하였다. 현미배지의 sucrose첨가량은 10%를 첨가하고 번데기첨가량은 병당 10 g을 첨가하였을 때 자실체 형성이 양호하였으며 peptone과 hemoglobin, 건조누에 등은 자실체의 수확량을 증가시키지 못하였다. 현미배지의 공극률에서는 0.59~0.63%의 공극률에서 자실체 형성이 양호하였다. 광조사의 시간은 500 lx, 12시간

정도가 적당하였다.

감사의 글

이 연구는 산업자원부에서 시행한 산업기반기술 개발 사업에 의해 실시한 기술개발보고입니다. 산업자원부에 감사를 드립니다.

참고문헌

- 성재모. 1996. 한국의 동충하초. 교학사.
 李賢卿. 1996. 韓國產 多蟲夏草의 分布와 分類 및 培養的特性에
 관한 研究. 江原大學校 碩士學位 論文.
- Basith, M. and Madelin, M. F. 1968. Studies on the production of perithecial stromata by *Cordyceps militaris* in artificial culture. *Can. J. Bot.* **46**: 473-480.
- Choi, I. Y., Choi, J. S., Lee, W. H., Yu, Y. J., Joung, G. T., Ju, I. O. and Choi, Y. K. 1999. The condition of production of artificial fruiting body of *Cordyceps militaris*. *Kor. J. Mycol.* **27**(4): 243-248.
- Glare, T. R. and Milner, R. J. 1991. Ecology of entomopathogenic fungi. In: *Handbook of Applied Mycology*. Vol. 2. Ed. D. K. Arora, L. Ajello, and K.G. Mukherji. Marcel Dekker, Inc.
- Humber, R. A. 2000. Fungal pathogens and parasites of insects. In: *Applied Microbial Systematics*. Ed. F. G. Priest and M. Goodfellow. Kluwer academic Publishers.
- Kobayasi, Y. 1941. The genus *Cordyceps* and its allies. *Sei. Rept. Tokyo Buntika Daigaku, sect. B.5*: 53-260.
- _____. 1982. Keys to the taxa of the genera *Cordyceps* and *Torribiella*. *Trans. Mycol. Soc. Japan* **23**: 329-364.
- Liang, Z. Q. 1990. Anamorph of *Cordyceps militaris* and artificial culture of its fruitbody. Southwest China *J. Agri. Sci.* **3**(2):1-6
- Mains, E. B. 1958. North American entomogenous species of *Cordyceps*. *Mycologia* **50**: 169-222.
- Samson, R. A. 1974. *Paecilomyces* and some allied Hypocreates. *Studies in Mycology* **6**: 31-36.
- Pen, X. 1995. The cultivation of *Cordyceps militaris* fruitbody on artificial media and the determination of SOD activity. *Acta Edulis Fungi*. **2**(3): 25-28.
- Seaver, F. J. 1911. The Hypocreales of North America- IV. *Mycologia* **3**: 207-230.
- Shanor, L. 1936. The production of mature perithecia of *Cordyceps militaris* (L.) Link in laboratory culture. *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.* **52**: 99-105.
- Sung, J. M., Choi, Y. S., Lee, H. K., Kim, S. H., Kim, Y. O. and Sung, G. H. 1999. Production of fruiting body using cultures of entomopathogenic fungal species. *Kor. J. Mycol.* **27**(1): 15-19.
- _____, Kim, C., H. Yang, K. J., Lee, H. K. and Kim, Y. S. 1993. Studies on distribution and utilization of *Cordyceps militaris* and *C. nutans*. *Kor. J. Mycol.* **21**(2): 94-105.
- _____, Lee, H. K., Choi, Y. S. Kim, Y. O. Kim, S. H. and Sung, G. H. 1997. Distribution and taxonomy of entomopathogenic fungal species from Korea *Kor. J. Mycol.* **25**(4): 231-252.
- Zeng, M and Kinjo, N. 1998. Notes on the alpine *Cordyceps* of China and nearby nations. *Mycotaxon* **46**: 215-229.