

액체배지에서 눈꽃동충하초균(*Paecilomyces tenuipes*)의 계대증식에 따른 증식 특성

오정미 · 이재경 · 구현나 · 우수동*

충북대학교 농업생명환경대학 식물외과

Growth Characteristics of *Paecilomyces tenuipes* by the Passage in Liquid Media

Jeong-Mi Oh, Jae-Kyung Lee, Hyun-Na Koo and Soo-Dong Woo*

Department of Plant Medicine, College of Agriculture, Life & Environment Sciences, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

ABSTRACT : The growth characteristics of *Paecilomyces tenuipes* according to the passage in the two kind of liquid media were investigated by comparing the mycelium and conidium formation degrees. The potato dextrose broth medium and the silkworm larvae medium containing the silkworm powder were used as the liquid media, and the potato dextrose agar medium and the brown rice medium containing the powder of silkworm pupa were used as the solid media. The conidium formation degree in liquid media differed by the passages but that in solid media was not. This suggested that the passage in liquid media did not affect significantly the conidium formation in solid media. When the brown rice media were inoculated with the concentration of 1×10^{10} conidia/ml, 1×10^8 conidia/ml and 1×10^6 conidia/ml, respectively, the conidium formation degrees were similar. This indicated that the optimal inoculation concentration of conidium to the brown rice media is 1×10^6 conidia/ml.

KEY WORDS : *Paecilomyces tenuipes*, Silkworm larva medium, Brown rice medium, Passage, Growth characteristics

초 록 : 눈꽃동충하초균(*Paecilomyces tenuipes*)의 균사 및 포자 형성에 영향을 미치는 계대증식에서의 특성을 알아보기 위하여, 액체배지로서는 누에 유충분말이 함유된 SL배지와 일반적인 PD배지를 이용하였고, 고체배지로는 누에 번데기 분말을 넣은 현미배지상에서, 세대증식이 이루어진 각 균주에 대해서 조사하였다. 그 결과, 액체 배지에서의 포자 생산량은 세대에 따라 큰 차이를 보였으나, 현미배지에서의 포자 생성율은 세대간에 큰 차이를 보이지 않음으로써, 액체배지에서 계대증식이 고체배지에서의 포자생산량에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 또한 현미배지에 대한 최적 포자 접종량은 각각 1×10^{10} conidia/ml, 1×10^8 conidia/ml, 1×10^6 conidia/ml의 농도로 접종하였을 경우 농도에 따른 생산량에 차이가 나타나지 않아서 1×10^6 conidia/ml만으로도 충분한 것으로 나타났다.

검색어 : 눈꽃동충하초, SL 배지, 현미배지, 계대증식, 증식특성

세계적으로 걸쳐 자생하는 동충하초는 수백여 종에 달하며, 이에 대한 잠재된 가치가 높게 평가되어 그 관심이

현재까지 지속되고 있다. 종에 따라 약리효능이 매우 다양하여 중국의 *Cordyceps sinensis*는 면역증강 및 부신흔르

*Corresponding author. E-mail: sdwoo@cbnu.ac.kr

몬 분비 촉진작용이 있으며(Wang *et al.*, 1998), 동충하초에서 분리한 Cordycepin은 항세균 및 항암효과가 있다고 보고되고 있다(Cory *et al.*, 1965; Kuo *et al.*, 1994). 또한 국내에서 동충하초로 가장 많이 이용되고 있는 눈꽃동충하초(*Paecilomyces tenuipes*)역시 혈당강하작용, 면역기능 촉진효과 그리고 항피로 효과 등이 보고되고 있다(Cho *et al.*, 1999; Shim *et al.*, 2000).

동충하초는 이와 같은 우수한 약리 효능이 밝혀짐에 따라 수요가 급증하고 있으나 자원의 고갈과 대량 확보에 어려움이 있어 이러한 문제해결을 위해 인공증식기술 연구에 많은 관심이 모아지고 있다. 동충하초균 생육에 요구되는 영양물질에는 에너지원으로써 유기태탄소, 단백질이나 비타민 등의 합성을 위한 질소원, 수종의 무기물 및 특수한 분화단계 증식을 위한 특정 영양성분 등이 있으며(Deacon, 1997) 이러한 모든 영양성분을 함유한 배지를 통한 증식이 가능하다. 배지는 균사생장 및 자실체 형성에 중요한 요인으로 작용하며 그 종류는 균의 종류 및 용도에 따라 수십 종의 배지가 알려져 있다. 1911년 Sopp에 의해 인공배지 내에 적정 영양원을 첨가한 후 성숙한 자좌를 형성하였으며(Brady, 1979), 1932년 Yakusiji와 Kumazawa는 다양한 곡물배지를 이용하여 *C. militaris*, *C. takaomontana*, *C. pruinosa*의 인공배양에 성공하였다(Kobayasi, 1941). 국내에서는 번데기 분말 첨가 곡류배지를 이용하여 *C. militaris*, *C. scarabaeicola*의 자실체를 형성한 바 있다(Lee *et al.*, 2000; Sung *et al.*, 1999). 한편, 일반적으로 눈꽃동충하초균 배양 시 사용되는 감자한천배지(Potato dextrose agar medium; PDA 배지)는 균 생장이 14일간 32 mm로 생장이 늦을 뿐 아니라(Nam *et al.*, 2000) 계대증식에 따른 균의 병원력 감소 및 균 변이(Choi *et al.*, 2000)등 많은 문제점이 야기되어 왔다. 조 등(1999)은 살아 있는 누에 표면에 *P. tenuipes*의 균을 접종하여 인공 배양에 성공하였다. 현재 눈꽃동충하초는 액체배지에서 균사증식 또는 고체한천배지에서 증식을 통해 준비된 균을, 누에 번데기가 함유된 현미배지에 접종하여 충분한 양의 분생포자를 생산 후 누에에 직접 접종하여 동충하초

를 생산하고 있다. 그러나 액체배지에서 종균의 생산은 빠른 시간 내에 균의 활성이 낮아지는 문제점들이 있는 것으로 여겨져 많은 경우 고체한천배지에서의 증식을 선호하고 그마저도 1-2회 계대배양 후에는 누에 접종을 통해 활성을 높인 후 이용하는 번거로움이 있는 것으로 파악되고 있다. 최근에는 액체배지에서 이러한 활성의 감소를 억제하고자 누에가루가 함유된 배지(Silkworm larva medium; SL 배지)가 개발되어 어느 정도의 효과가 있는 것으로 보고되고 있다(Nam, 2003).

따라서 본 연구에서는 액체배지에서 계대증식의 어려움을 해결하고자 서로 다른 조성의 액체배지에서 눈꽃동충하초균의 계대증식에 따른 균사 및 포자 생성율을 비교 조사하여 적절한 배지와 계대증식 정도를 제시하고자 하며, 더불어 고체현미배지에서 포자 생산을 위한 적정 균 접종 농도를 결정하고자 하였다.

재료 및 방법

공시균주

본 실험에 사용한 *P. tenuipes*는 충북 균이시험장에서 분양받은 균주로서, 누에에서 형성된 자좌 및 분생자병속을 소독 후, water agar 배지의 페트리디쉬 뚜껑 내측에 멸균 테이프로 부착시킨 후 배지에 떨어진 자낭포자를 분리하여 PDA 배지에 이식한 상태로 분양 받아 이용하였다.

배지 조제 및 배양조건

1) 액체배지

누에유충액체배지(SL 배지)는 Nam (2003)의 방법에 따라 동결 건조시킨 5령 누에를 분말화하고, 누에 분말을 증류수에 최종 농도 2.4%가 되게 첨가하여 121°C에서 15분간 멸균한 다음 250 ml 삼각 flask에 100 ml씩 분주하여 조제하였다(표 1). 시판배지인 Potato dextrose broth

Table 1. Composition of media used in this study

Components	Medium (g/1000 ml)			Medium (g/500 ml flask)	
	SL ^a	PD ^b	PDA ^c	Brown rice medium	
Potato extract	-	4	4	Silkworm pupa	15
Dextrose	-	20	20	Sucrose	15
Agar	-	-	15	Brown rice	180
Silkworm larva	24	-	-	Distilled water	65 (ml)

^a Silkworm larva medium, ^b Potato dextrose broth, ^c Potato dextrose agar

(PD)는 관행에 따라 조제하였다. 균 접종 후, 24°C에서 150 rpm으로 10일간 진탕 배양 하였다.

2) 현미배지

Nam (2003) 방법대로 분생포자를 생산하기 위한 현미 배지는 500 ml 삼각 flask에 현미 180 g, 누에 번데기가루 15 g, sucrose 15 g, 증류수 65 ml을 넣고 121°C에서 30분간 멸균한 후 액체 접종원을 접종하였다(표 1). 배양은 24°C에서 20일간 배양하였고, 균이 뭉치는 것을 방지하고 균일하게 성장하도록 3~4일 간격으로 교반 작업을 하여 분생포자를 발생시켰다.

액체배지에서의 포자 생산량 및 colony 형성을 측정

분양받은 *P. tenuipes*를 직경 3 mm로 떼어 SL 및 PD 각각의 액체배지에서 배양하고 얻어진 균사체를 제 1세대로 하여 정하고, 배양을 통해 얻어진 균사체 1 ml을 각 액체배지에 다시 접종함으로써 균의 계대증식을 실행하였다. 이러한 방법으로 5세대까지 계대증식을 하였으며, 24시간마다 1 ml의 배양액을 수거하여 증류수에 희석 후, 혈구 측정계(hemocytometer)를 이용하여 각 세대의 포자수를 계수하였다. 또한 배양액을 수거하여 희석한 후, PDA배지에 50 µl씩 도말 후, 온도 25°C, 습도 60% 조건으로 3일 동안 배양하여 형성된 colony수를 측정하였다. PDA배지에서의 세대별 균사길이 변화량 측정은 PDA배지의 정 가운데에 멸균된 10 mm filter paper를 올려놓고 PD배지에서 세대별로 배양된 배양액 20 µl을 접종하여 24시간 마다 균사의 길이변화를 측정하였다.

현미배지에서의 포자 생산량 측정

현미배지에 대한 액체 접종원의 적정농도를 규명하기 위해 SL배지 또는 PD배지에서 배양된 포자를 1×10⁶ conidia/ml, 1×10⁸ conidia/ml, 1×10¹⁰ conidia의 농도로 현미배지에 접종하였다. 형성된 포자량 조사를 위해 접종 후, 72시간 간격으로 일정량의 현미 알을 취해 증류수를 가하여 분생포자를 수거하였다. 수거된 분생포자는 혈구 측정계를 이용하여 계수하였다.

종균 접종

시험에 공시한 누에는 충북 잠이연구소에서 분양 받아 표준 누에 사육법으로 사육하였다. 5령 3일째 되는 누에 기잠에 현미배지에서 생성된 분생포자를 1×10⁸ conidia/larva농도로 분무 경피 접종 하였고, 온도 25°C, 습도 90%에서 24시간

절식 처리한 후 표준 누에 사육법에 따라 사육하였다. 접종 1주 후, 고치를 수거하여 절건하고 계속 배양하여 감염양상을 조사하였다.

결과 및 고찰

액체배지에서의 포자 생산량 및 colony 형성을 비교

액체배지는 영양성분의 분포가 고르고, 종균이 영양체에 접촉하고 흡수할 수 있는 환경이 충분하게 제공되므로 균사생장을 촉진시키고 균사체 생산량을 높인다. 또한 균사체는 액체배지 내에서 궤를 형성하는데 이것은 배지 내 영양상태가 양호하여 단균사가 신장, 증식되면서 서로 엉키며 발생하는 것이다. PD배지를 대조구로 하여, SL배지에 *P. tenuipes*를 접종하고 24°C에서 10일간 150 rpm에서 진탕배양을 한 결과, SL배지에서 형성된 궤가 PD배지에서 형성된 궤보다 크기가 작고, 그 수가 더 많았다(실험실자료). 이러한 결과는 SL배지의 배양액 내에 누에유충 분말가루가 존재하여 균체와 마찰함으로써 균질화에 영향을 미친 것으로 보인다.

두 액체배지에서의 계대증식에 따른 포자수의 변화량을 측정한 결과, SL배지와 PD배지 모두 1세대와 2세대에서의 포자수는 큰 차이가 없었지만, 3세대 이후의 포자수는 평균 약 12배 정도 급격히 떨어지기 시작하였다(Fig. 1).

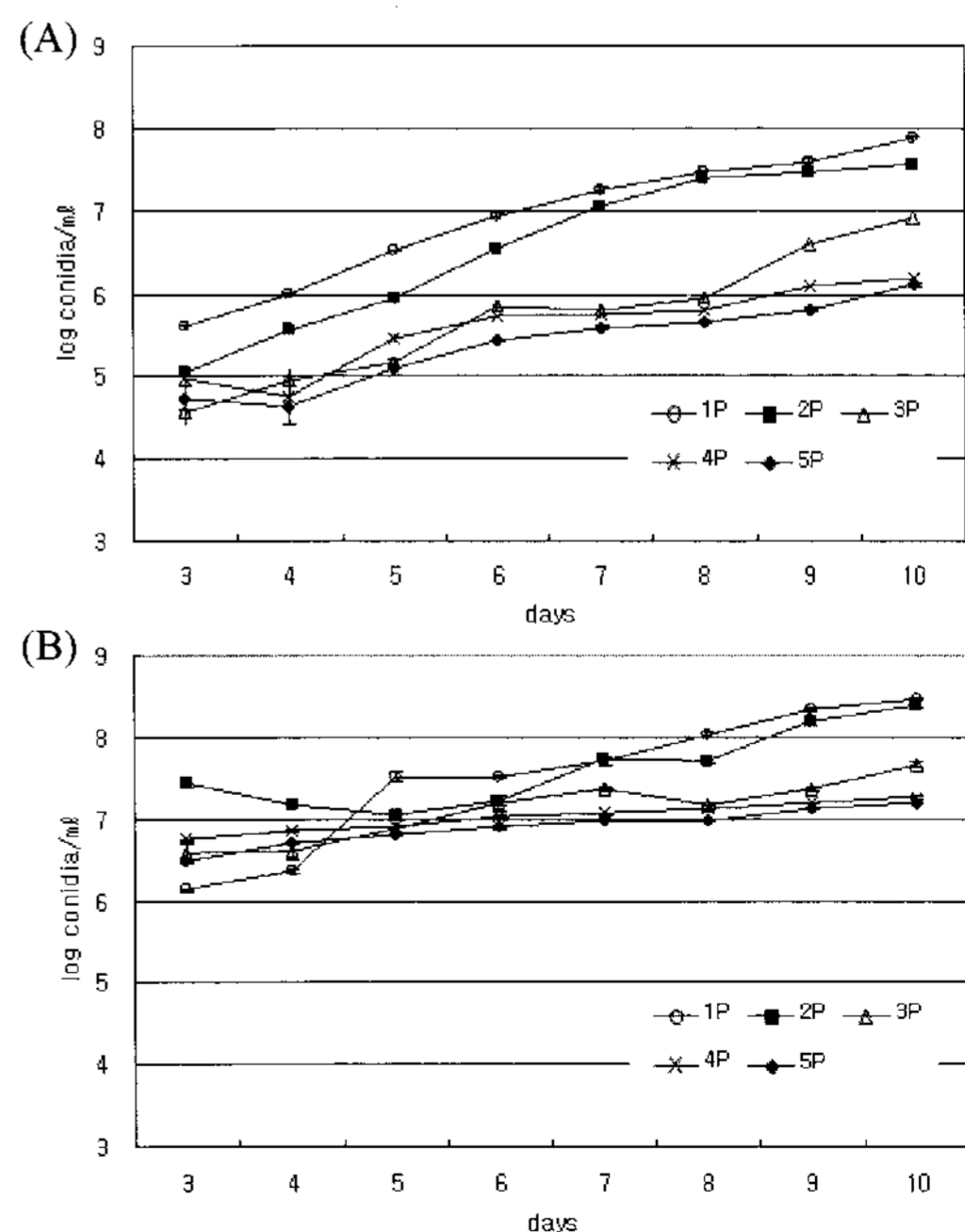


Fig. 1. Conidium formation degree of *P. tenuipes* on the PD (A) and SL media (B) by passage. P, passage.

또한 SL배지에서의 포자수가 PD배지보다 전 세대에 걸쳐 약 11.3 배정도 높게 나타남을 보였는데, 이는 누에유층을 분말화하여 조제함으로써 기존의 식물성 원료만을 이용한 PD배지에 비해, 곤충 기생균이라는 특성을 가진 눈꽃동충하초균이 필요로 하는 영양 요구량에 더욱 부합한 결과로 여겨졌다. Colony 측정 실험 결과에서는 포자 수 측정실험 결과와는 달리 두 액체배지 모두에서 1세대 이후 그 수가 약 12 배로 급격히 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 2). 또한 PDA배지에서의 세대별 균사길이의 변화량에서도 세대간에 비슷한 감소율을 보여주었다(Fig. 3).

이러한 결과는 colony 형성에 있어 균사 및 포자가 모두 관여함을 고려할 때, 포자 증식에 비해 균사 성장이 세대 증식에 따라 더 크게 영향 받음을 보여주는 것이었다.

현미배지에서의 포자 생산량

누에에 접종되는 분생포자는 현미배지에서 최종적으로 생산되므로, 각 액체배지에서 세대증식을 통하여 증식된 균을 현미배지에 접종하고 분생포자 생산량을 비교 조사하였다. 그 결과 액체배지 및 접종농도에 따른 차이는 크게 나타나지 않았으나, 세대에 따른 차이는 1.3배에서 10배까지 세대에 따라 다소 차이를 보였다(Fig. 4). 그러나 전체 포자 생산량이 최소 0.5×10^7 conidia이고 최대 1×10^9 conidia로써 전체 평균 0.8×10^8 conidia와 비교해 큰 차이를 보이지는 않았다. 접종농도를 고려하였을 때, 세농도 모두에서 유사한 포자 생산량을 나타내는 결과로 보아, 1×10^{10} conidia의 농도 접종은 너무 낮은 생산효율을 보여 가장 효율적인 접종농도는 1×10^6 conidia인 것으로 나타났다(Fig. 4). 또한 일반적으로 현미배지 배양기간은 약 20일(Nam et al., 2000)이나 본 연구의 결과, 배양을 시작한 후 9일~12일정도가 되면 분생포자의 수치가 최대치에 근접한 생산량을 보임으로써 10일정도 기간단축이 가능한 것으로 사료되었다. 이러한 결과는 현미배지에서의 포자 생산량이 세대 및 액체배지의 차이에 의해서는 큰 영향을 받지 않음을 보여주는 것으로써 현미배지에 대한 접종원의 준비에 있어 액체배지에서의 준비와 계대 증식이 가능함을 보여주는 것이었다.

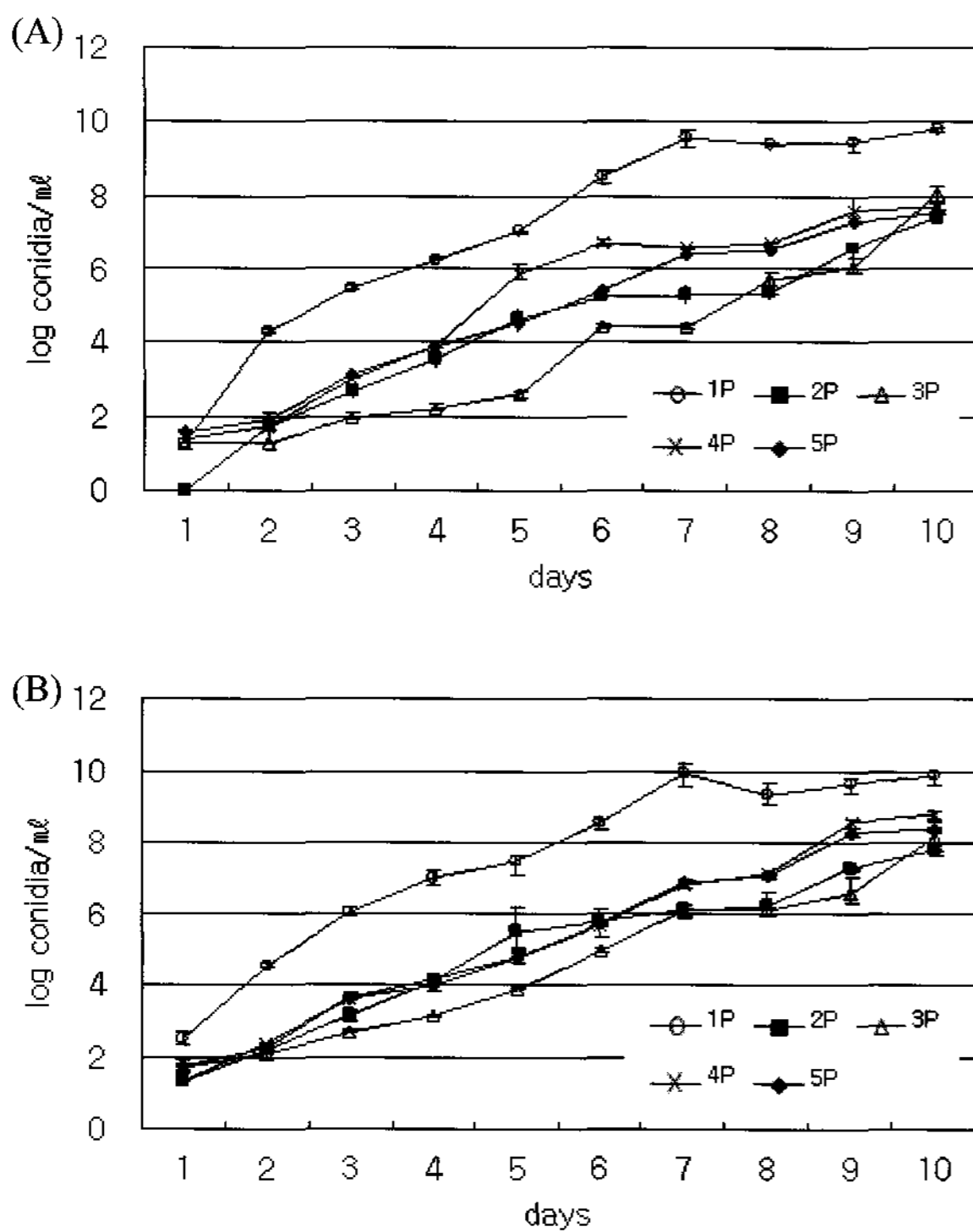


Fig. 2. Colony formation degree of *P. tenuipes* on the PD (A) and SL media (B) by passage. P, passage.

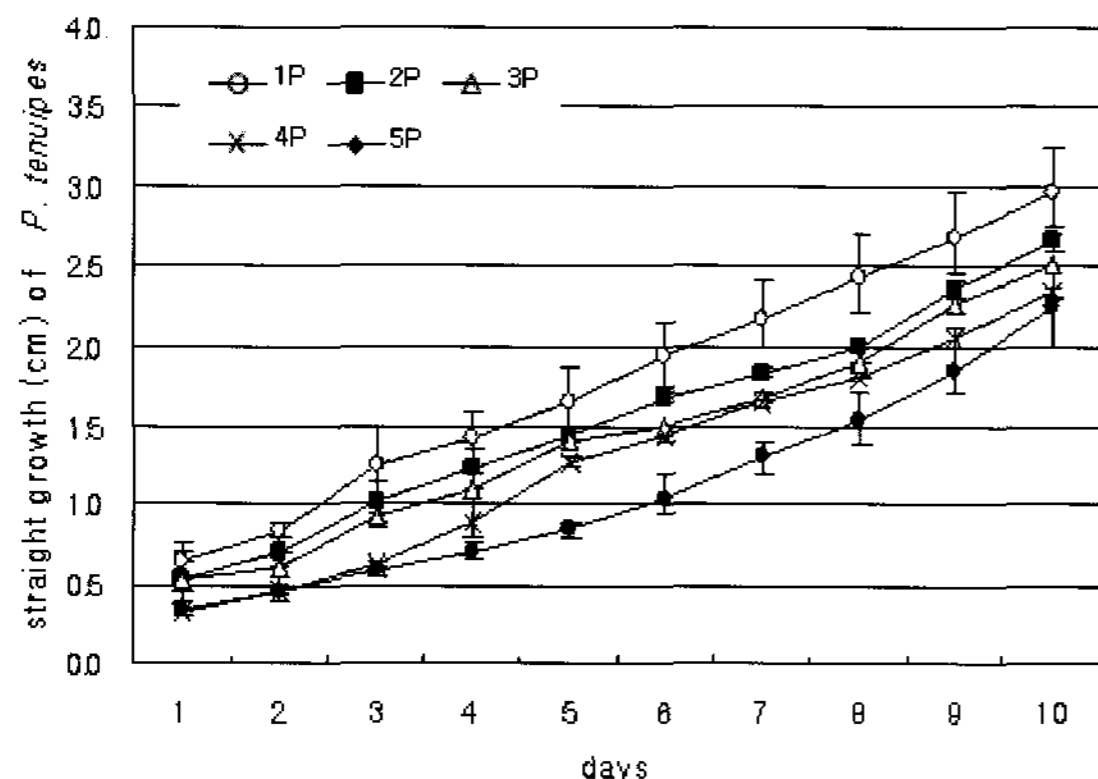


Fig. 3. Comparisons of the mycelia growth on the PDA media by passage in PD media. P, passage.

종균 접종

누에에서 정상적인 자실체 형성 유무를 확인하기 위하여, 각 계대증식을 통하여 현미배지에서 배양된 분생포자를 수거하여 5령 3일째인 누에에 1×10^8 conidia 농도로 분무 경피접종한 결과, 일주일 이 지나 감염된 번데기는 수분이 탈수되면서 표피가 경화되어 딱딱하게 굳어져 쉽게 식별이 가능하였으며, 감염잠에서 유발된 자실체 형태를 관찰한 결과, 정상적인 자실체 형성을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 이러한 결과는 계대증식을 통해 배양한 종균을 이용하여 정상적인 동충하초의 생산이 가능함을 제시해 주는 것이었다.

사 사

이 논문은 2007년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비지원에 의하여 연구되었음.

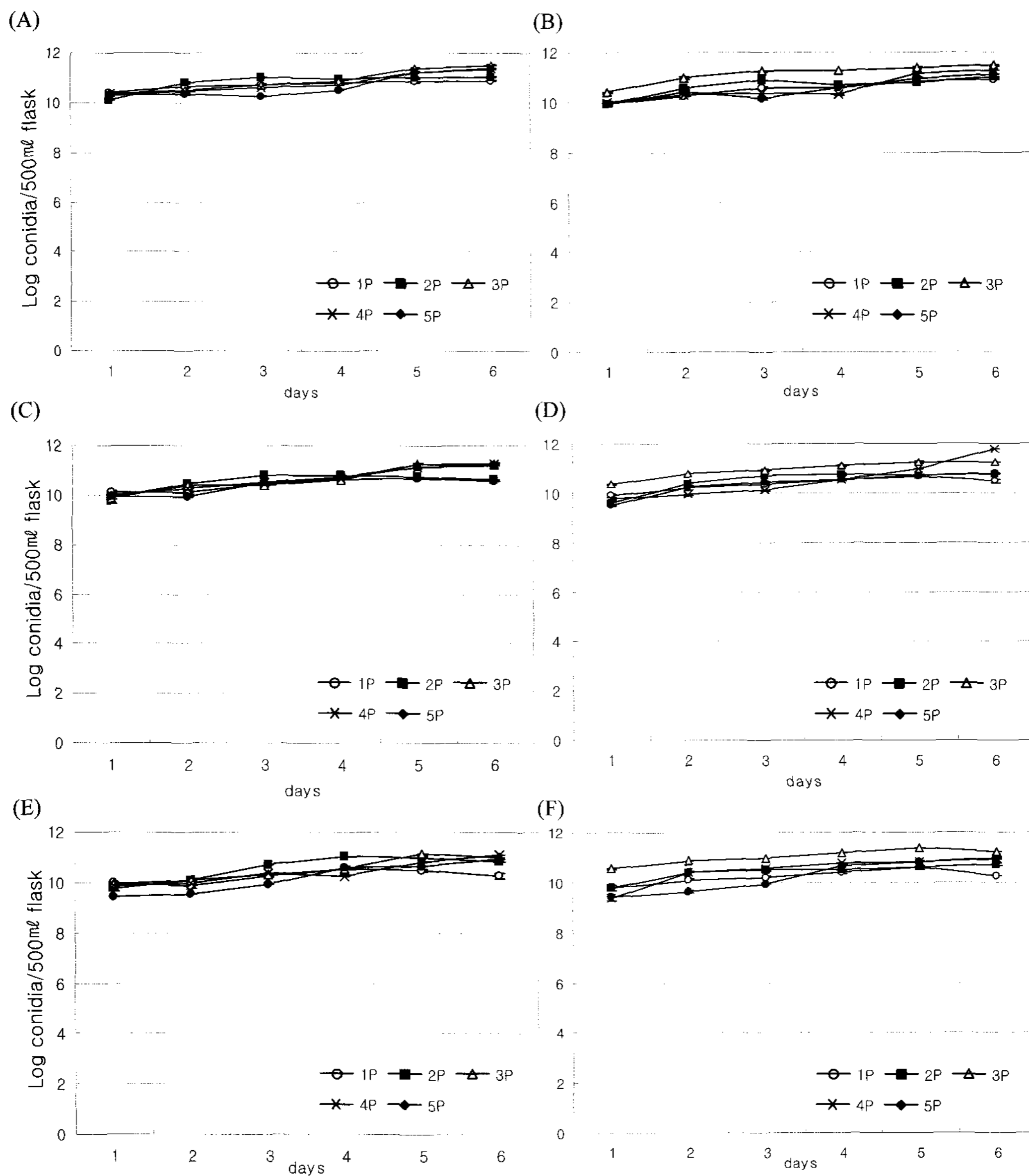


Fig. 4. Conidium formation degree of *P. tenuipes* on the brown rice media by passage in liquid media. A: Inoculated with 1×10^{10} conidia from PD media; B: Inoculated with 1×10^8 conidia from PD media; C: Inoculated with 1×10^6 conidia from PD media; D: Inoculated with 1×10^{10} conidia from SL media; E: Inoculated with 1×10^8 conidia from SL media; F: Inoculated with 1×10^6 conidia from SL media; P: passage.

Literature Cited

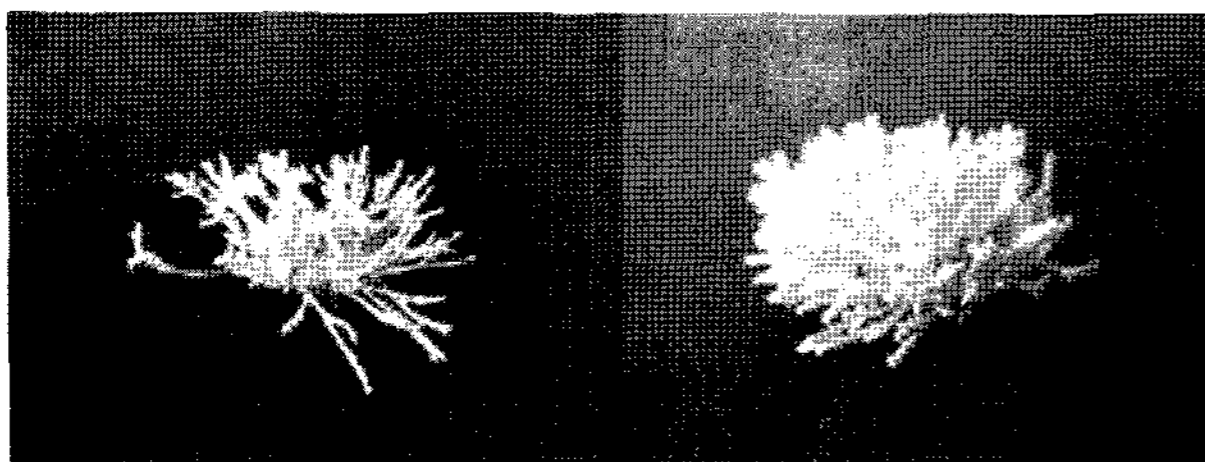


Fig. 5. Fruiting body formation of silkworm infected with *P. tenuipes*.

- Brady, B.L.K. 1979. *Cordyceps militaris*. In: CMI Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. (No. 61) 605.
- Cho, S.Y., K.H. Shin, S.K. Song and J.M. Sung. 1999. Mass production and useful material development of the entomopathogenic fungi (*Cordyceps*) growing on the silkworm, *Bombyxmori* L. Rural Development Agricultural. pp. 1-234. (In Korean).
- Choi, I.Y., J.S. Choi, W.H. Lee, Y.J. Yu, G.T. Joung, I.O. Ju and Y.K. Choi. 1999. The condition of production of artificial fruiting body of *Cordyceps militaris*. Kor. J. Mycol. 27(4): 243-248.

- Cory, J.G., R.J. Suhadolnik, B. Resnick and M.A. Rich 1965. Incorporation of cordycepin (3'-deoxyadenosine) into ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid of human tumor cells. *Biochem. Biophys. Acta.* 103: 646-653.
- Deacon, J.W. 1997. *Modern mycology*, Blackwell Science, Inc. 93-94.
- Kobayasi, Y. 1941. The genus *Cordyceps* and its allies. *Sci. Rept. Tokyo Bunrika Daikaku, Sect. B.5:* 53-260.
- Kuo, Y.C., C.Y. Lin, W.J. Tsai, C.L. Wu, C.F. Chen and M.S. Shiao. 1994. Growth inhibitors against tumor cells in *Cordyceps sinensis* other than cordycepin and polysaccharides. *Cancer Invest.* 12(6): 611-615.
- Lee, J.K., Y.S. Choi and J.M. Sung. 2000. Investigation on cultural characteristics of mycelia growth by *Cordyceps scarabaeicola*. *Kor. J. Mycol.* 28(2): 81-89.
- Nam S. H., 2003, Taxonomy of entomogenous fungi, *Cordyceps* and its allies, and cultivation of *Paecilomyces tenuipes* isolated in Korea, Kyungbuk University.
- Nam, S.H., C.S. Yoon, K.Y. Kim, S.Y. Cho and M.S. Han. 2000. Report on red muscardine (*Paecilomyces fumosoroseus*) of the silkworm (*Bombyxmori*) in Korea. *Kor. J. Seric. Sci.* 42(1): 28-30.
- Shim, J.Y., H.K. Lee, S.S. Leem, K.H. Shin, J.E. Hyen, S.Y. Kim and E.B. Lee. 2000. Pharmacological activities of *Paecilomyces japonica*, A new type *Cordyceps* ssp. *Kor. J. Pharm.* 31(2): 163-167.
- Sung, J.M., Y.S. Choi, H.K. Lee, S.H. Kim, Y.O. Kim and G.H. Sung. 1999. Production of fruiting body using culture of entomopathogenic fungal species. *Kor. J. Mycol.* 27: 15-19.
- Wang, S.M., L.J. Lee, W.W. Lin and C.M. Chang. 1998. Effect of a water-soluble extract of *Cordyceps sinensis* on steroidogenesis and capsular morphology of lipid droplet in cultured ratadrenocortical cell. *J. Cell Biochem.* 69(4): 483-489.

(Received for publication May 6 2008;
revised June 19 2008; accepted June 23 2008)