

눈꽃동충하초 (*Paecilomyces tenuipes*)의 분생자경속 형성

박기범 · 박기병 · 부산 쓰레스타 · 성재모*

강원대학교 농업생명과학대학 응용생물학과

Optimal medium and cultural conditions for synnemata formation of *Paecilomyces tenuipes*

Gi-Beom Park, Gi-Byung Park, Bhushan Shrestha and Jae-Mo Sung*

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

ABSTRACT : Potato dextrose broth was the best inoculation medium to produce *in vitro* synnemata of *Paecilomyces tenuipes*. The optimum temperature for synnemata formation of *P. tenuipes* was 20°C under 500 lx of light intensity. Highest synnemata production was observed at 18 hr of light period per day. The medium containing 50 g of each silkworm pupae and brown rice produced highest number of synnemata. The optimum ratio of brown rice to distilled water was found as 1:1. Mycelial growth and synnemata production of *P. tenuipes* was faster and higher in medium containing grinded pupae as compared to whole pupae. The optimum inoculum amount per bottle of medium was 15ml. The highest synnemata production of *P. tenuipes* was obtained by incubating rice pupae medium at 24°C until mycelium grows sufficiently after inoculation and then transferring it to 20°C chamber till harvest.

KEYWORDS : entomopathogenic, *Paecilomyces*, *Paecilomyces tenuipes*, synnemata

눈꽃동충하초 (*Paecilomyces tenuipes*)는 곤충을 기주로서 하여 분생자경속을 형성하는 곤충기생균(entomopathogenic fungi)의 일종으로 거의 모든 곤충의 성충과 유충에 걸쳐 침입하여 분생자경속을 형성한다. 눈꽃동충하초는 불완전균문(Deuteromycota), 불완전균사균강(Hyphomycetes), 선균목(Moniliales) 분생자경속과(Stilbaceae)에 속하며 완전세대로는 동충하초(*Cordyceps*)를 형성한다(Pacioni and Frizzi, 1977; Petch, 1936). 눈꽃동충하초 (*Paecilomyces*)속은 동충하초속의 불완전세대에 속하는 균으로 분생자경속에 포자를 형성한다(Samson, 1974; Samson *et al* 1949). 이 속균의 생활사는 거의 모든 곤충군의 유충, 번데기, 성충 등의 전 생육 단계에 걸쳐 기주의 외피(external cuticle)를 통하여 침입하여 균사는 중체내의 모든 기관의 영양이 소비될 때까지 생장을 지속한 후 단단하게 응축된 내생균핵(endosclerotium)을 형성하여 월동한 후 적합한 환경 조건을 만나면 곤충의 외부로 분생자경속을 형성하여 분생포자를 분산하는데 이 포자는 곤충에 병원성을 갖으며 또 다른 곤충으로 침입을 하게 된다(Cheng *et al.*1998; Chew *et al.*1997; Fukatsu *et al.*1997; Humber, 1990; Kobayasi, 1982; Samson, 1995; Sung *et al.*1993, 1998; Sung, 1996).

동충하초는 고대로부터 중국을 비롯한 다른 국가에서도

불로장생의 비약으로 결핵, 천식, 황달의 치료 및 아편 중독의 해독제, 병후의 보양 및 강장제, 면역 기능 강화제로서 이용되어 왔으며(Cunningham *et al*, 1951; Ying *et al.* 1987) 최근 국내에서도 동충하초를 이용한 건강보조식품의 개발과 향균, 항암 효과가 있는 약리 성분의 발견으로 인하여(Kim *et al*, 1994, 2000, 2001; Yun, *et al.* 2000) 이를 이용한 유용 약품 개발 등에도 상당히 많은 연구가 진행 중에 있다. 하지만 동충하초는 자연 상태에서 채집이 어려우며, 채집되는 양이 매우 적기 때문에 수확만으로는 제품 개발과 유용 약리 성분의 분석, 의약품 소재로서의 신물질 개발이 현실적으로 어려운 실정이며, 이를 충족하기 위하여 동충하초의 인공 대량 생산을 위하여 많은 연구가 활발히 진행되고 있다. 국내의 동충하초속에 관한 연구는 김(1998), 성(1996), 성 등(1998) 이(1996), 최(2000) 등에 의해 인공배양에 관한 연구가 발표된 바 있다.

동충하초속균을 이용한 인공분생자경속 형성은 번데기 동충하초를 가지고 실시하여 현재의 대량생산을 하게 되었다(Basith and Madelin, 1968; Bigelow, 1960; Kobayasi, 1941; Petit, 1895). 현재까지는 번데기동충하초를 대량생산을 하는데 번데기를 이용하여 재배하였으나 곤충을 이용하지 않고 다른 배지를 이용하여 대량생산을 하는 기틀을 마련하여 현재 대량으로 생산하고 있다(Harada *et al*, 1995; Pen, 1995; 성, 1996; 성등, 1993; Yamanaka 등, 1998).

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

눈꽃동충하초도 분생자경속 형성에 대한 일반적인 연구가 수행되어 대량재배를 하고 있으나(Ban 등, 1998; 최, 2000) 본 연구에서는 향후 의약용으로서 경제적 가치가 인정되는 곤충기생균인 눈꽃동충하초의 대량생산을 위한 기초 자료를 제공하기 위하여 분생자경속의 형성 조건에 대하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

공시균주

강원대학교 동충하초은행 EFCC(Entomopathogenic Fungi Culture Collection)에서 보존하고 있는 균주를 사용하였으며 보관중인 공시균주를 PDA(potato dextrose agar; Difco Co.) 평판배지에 접종한 후 25°C의 배양기에서 7일간 배양한 후 접종원으로 이용하였다(Table 1).

Table 1. List of *Paecilomyces tenuipes* used in this experiment

Isolate	Date(m/d/y)	Locality	Host
C240	8/14/93	Mt. Chiak	Pupae
C4403	9/01/99	Mt. Gujeol	Pupae
C4740	7/02/00	Mt. Chiak	Pupae
C5235	7/23/00	Mt. Hiryang	Pupae
C6261	3/28/01	Mt. Mai	Pupae

분생자경속 형성을 위한 액체배양

분생자경속을 형성하기 위한 최적 액체배지의 선발은 Table 2에 나타난 배지에서 agar를 제외한 성분을 250ml 삼각플라스크에 100ml씩 분주하여 멸균한 후 C240균주를 접종하여 행하였다. 또한 액체배양 시 최적배양시간의

검토는 250ml 삼각플라스크에 PDB배지 100ml를 넣고 멸균한 다음 PDA에서 배양된 C4403, C5235균주의 균총을 5 mm 길이 절편을 5개씩 접종한 후 25°C의 배양실에서 7일간 배양하면서 행하였다. 배양중인 삼각플라스크 내의 균체량은 배양액을 filter paper (Whatman No.2)로 여과시킨 다음 60°C의 dry oven에서 24시간 건조한 후 그 중량을 측정하였다.

분생자경속 형성의 최적조건

눈꽃동충하초의 분생자경속 형성이 우수한 균주, 생육에 최적 온도, 최적 광도(lx) 및 광 조사시간을 검토하기 위하여 1000ml pp (polypropylene)병에 번데기 100g를 넣은 후 121°C 15psi (1.1kg/cm²)에서 60분간 살균하여 번데기 배지를 조제하였다. 접종원으로는 PDA배지에서 7일간 배양된 각각의 균총을 5 mm 길이 절편을 5개씩 접종한 후 떼어낸 후 PDB배지 100ml가 첨가된 250ml 삼각플라스크에 5개씩 접종하여 25°C/125rpm으로 7일간 진탕 배양한 다음 번데기 배지에 접종하여 분생자경속 형성을 유도하였다. 접종된 배양병은 20±2°C의 배양실에 옮겨 40일간 배양한 후 분생자경속의 수, 병당 분생자경속의 무게, 분생자경속의 길이를 조사하였다.

번데기와 현미량에 따른 분생자경속 형성

번데기의 양을 달리하여 분생자경속 형성을 조사하기 위하여 1000ml pp병에 번데기를 각각 20g, 40g, 60g, 80g, 100g씩과 기존에 사용하고 있는 현미 100g에 증류수 120 ml를 첨가하였다. 현미가 분생자경속 형성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 번데기량을 50g로 고정된 후 현미를 각각 0g, 10g, 20g, 30g, 40g, 50g를 첨가하였다. 또한 번데기가 분생자경속 형성에 미치는 영향을 조사하기 위하여

Table 2. Composition of culture media

Nutritional reagents	medium(g/ℓ)								
	PDA ¹⁾	SDAY	YMA	HMA	MEA	MYA	SA	MA	MPDA
Potato	200								
Dextrose	20	20	10	20	20	4	20		10
Malt extract			3		20	10		20	
Peptone		5	5		1		10		5
Yeast extract		5	3	3		4			
MgSO ₄ · 7H ₂ O									0.5
KH ₂ PO ₄									1
Hyponex				3					
Ebiose				5					
Agar	20	15	20	20	20	15	20	20	20

¹⁾PDA, potato dextrose agar; SDAY, sabouraud's dextrose agar plus yeast extract; YMA, yeast malt agar; HMA, hamada media; MEA, malt agar; MYA, malt extract yeast agar; SA, sabouraud's agar; MA, maltose agar; MPDA, matins's peptone dextrose agar;

여 현미량을 50g로 고정한 후 번데기를 각각 0g, 10g, 20g, 30g, 40g, 50g로 첨가하였다. 증류수는 현미량에 1:1비율로 첨가하여 121°C 15psi (1.1kg/cm²)에서 60분간 살균하여 배지로 사용하였다.

조제된 배지에 C4403균주와 C5235균주의 액체배양균 사체를 접종하여 20±2°C의 배양실에서 40일간 배양한 후 분생자경속의 길이, 병당무게, 발이수를 측정하였다.

중균점종량에 따른 분생자경속 형성

눈꽃동충하초의 최적 접종량을 알아보기 위하여 1000ml pp병에 번데기 100g를 첨가하고 121°C 15psi (1.1kg/cm²)에서 60분간 살균한 다음 조제된 번데기배지에 C4403균주와 C5235균주의 액체배양균사체를 각각 5ml, 10ml, 15ml, 20ml씩 접종하여 20±2°C의 배양실에서 40일간 분생자경속 형성을 유도한 후 분생자경속의 길이, 병당무게, 발이수를 측정하였다.

번데기의 형태에 따른 분생자경속 형성

번데기 배지를 조제할 때 번데기의 세척유무가 분생자경속 형성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 번데기 100g씩을 흐르는 물에 3회씩 세척한 군과 세척하지 않은 상태의 군으로 나누어 배지를 조성하였다. 번데기배지에서의 번데기의 해동상태와 냉동상태가 분생자경속형성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 번데기 100g씩을 냉동상태의 군과 전자레인지를 이용한 해동을 통해 해동시킨 군으로 나누어 번데기배지를 조성하였다. 번데기배지에서의 번데기의 원형상태와 분쇄상태가 분생자경속 형성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 번데기 100g씩을 원형상태의 군과 믹서를 이용한 완전 분쇄군으로 나누어 번데기배지를 조성하였다. 조성된 배지에 C4403균주와 C5235균주의 액체 배양 균사체를 각각 접종하여 20±2°C의 배양실에서 40일간 분생자경속 형성을 유도한 후 분생자경속의 길이, 병당 무게, 발이수를 측정하였다.

결 과

분생자경속 형성을 위한 액체배양

눈꽃동충하초의 인공재배에 사용할 최적액체배지를 선 발하기 위하여 C240균주를 이용하여 실험한 결과 SDAY, PDB, HM 배지에서 가장 높은 건조균체량을 나타냈다. 이를 이용하여 분생자경속 형성은 PDB배지에서 가장 고른 성장을 나타냈다(Fig. 1) 눈꽃동충하초의 분생자경속 형성에 적합한 액체배양원의 적정 배양기간은 10일의 건조 중량이 가장 높게 나타났지만 배지상에 분생자경속이 형성되고 균사의 뭉침 현상으로 접종하기에는 적합하지 않았다. 6일에서 7일의 배양기간에서 가장 양호한 형태를 나타내었다(Fig. 2). 접종량은 15mm를 접종하였을 때 분생자경속 형성이 좋았다(Fig. 3)

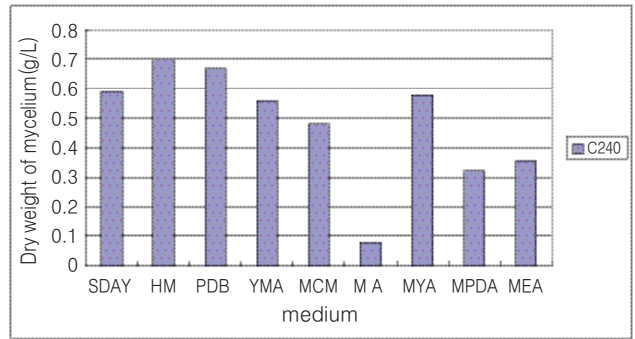


Fig. 1. Effect of liquid culture media on mycelial growth of *Paecilomyces tenuipes* C-240 at 25°C

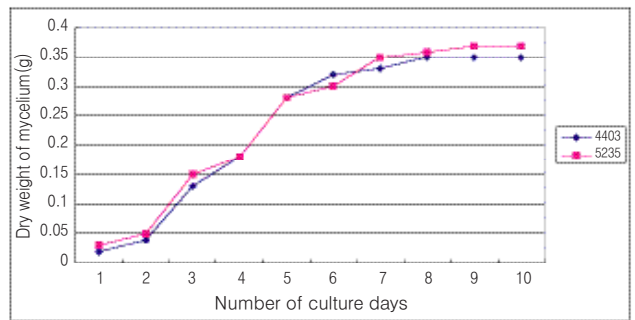


Fig. 2. Effect of culture period on mycelial growth of *Paecilomyces tenuipes* C4403 and C5235 in PDB medium.

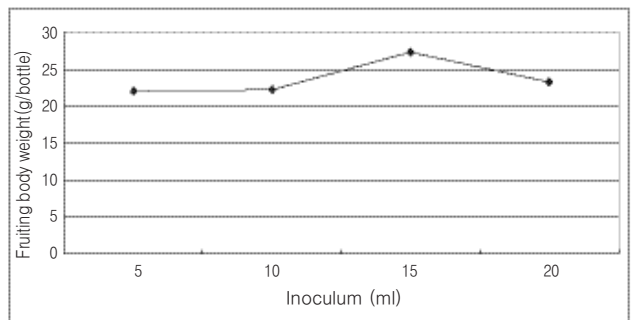


Fig. 3. Effect of inoculum amount on synnemata formation of *Paecilomyces tenuipes* C4403.

분생자경속 형성의 최적 조건

균주 별로 눈꽃동충하초를 접종하여 20±2°C의 배양실에서 40일간 배양하였을 때 분생자경속 형성을 위한 배지로는 PDB(Potato Dextrose Broth)에서 액체 배양한 것이 SDAY에서 배양한 것보다 분생자경속 형성이 좋았다(Fig. 4). 균주별 분생자경속 형성은 C240, C4403, C5235, C6261균주 모두에서 분생자경속이 형성되었으나, C4740에서는 다른 균주에 비하여 분생자경속 수와 무게에서 형성이 좋지 않았다(Table 3, Fig. 5).

눈꽃동충하초의 인공분생자경속 형성은 20°C의 배양온도에서 가장 높게 나타났으며, 나머지 15°C, 25°C에서도



Fig. 4. Effect of liquid culture media on synnemata formation of *Paecilomyces tenuipes* C5235 in pupae medium.

Table 3. Artificial synnemata formation of *Paecilomyces tenuipes* C240, C4403, C4740, C5235 and C6261 in pupae medium

<i>Paecilomyces tenuipes</i>	synnemata length (cm)	synnemata number (No)	synnemata weight (g/bottle)	Total weight (g/bottle)
C240	6.3	230	17.3	83.1
C4403	6.4	240	19.2	85.2
C4740	3.9	96	0.5	82.3
C5235	6.3	230	18.7	84.7
C6261	6.6	267	25.0	85.6

분생자경속 형성은 이루어지지만 수확량이 낮게 나타났다. 특히 15℃에서는 아주 낮은 수치를 나타내었다(Table 4). 적합한 광도(lx)를 측정하기 위하여 형광등을 이용하여 각

Table 4. Effects of temperature on synnemata formation of *Paecilomyces tenuipes* C4403 and C5235 in pupae medium

Temp.(℃)	LS*		NS		WF		TW		DF	
15	4.0 ^a	4.6 ^b	30	49	1.1	1.9	83.2	89.2	0.3	0.4
20	9.9 ^a	9.6 ^b	355	304	29.8	23.7	83.3	86.7	4.2	3.5
25	7.8 ^a	9.9 ^b	133	158	11.3	13.8	75.5	75.6	2.1	2.9

*LS, Length of stroma(cm); NS, Number of stroma; WF, Weight of synnemata(g/bottle); TW, Total weight(g/bottle); DF, Dry Weight of synnemata.

^aC4403, ^bC5235.

Table 5. Effects of light intensity on synnemata formation formation of *Paecilomyces tenuipes* C4403 and C5235 in pupae medium

Intensity (lx)	LS*		NS		WF		TW		DF	
0	6.7 ^a	6.5 ^b	333	334	15.0	16.7	92.1	93.3	2.9	2.2
100	4.6 ^a	6.4 ^b	294	424	20.8	21.3	89.7	92.7	2.7	3.9
500	6.9 ^a	6.8 ^b	472	386	23.6	22.3	88.3	84.0	5.6	4.5
1000	6.1 ^a	6.7 ^b	429	371	21.5	18.6	95.2	90.4	4.5	4.0

*LS, Length of stroma(cm); NS, Number of stroma; WF, Weight of synnemata(g/bottle); TW, Total weight(g/bottle); DF, Dry Weight of synnemata.

^aC4403, ^bC5235.



Fig. 5. Artificial synnemata formation of 5 different isolates of *Paecilomyces tenuipes* cultured for 25 days in pupae medium.

기 다른 광도로 조절하여 실험한 결과, 500lx에서 가장 양호한 성장을 보였다. 빛이 없이 분생자경속 형성이 되는 것은 *C. militaris*의 실험과는 대조적인 것으로 나타냈다(Table 5). 눈꽃동충하초의 배양에 적합한 광조사 시간을 규명하기 위하여 6hr, 12hr, 18hr, 24hr로 각기 다르게 배양하여 실험한 결과, 18hr상태에서 가장 높은 분생자경속 수확율을 나타냈으나, DF에서는 24hr에서 높은 수확율을 나타냈다. 또한 6hr에서는 가장 저조한 생육을 나타냈다(Table 6).

번데기와 현미량에 따른 분생자경속 형성

번데기배지를 조제할 때 최적 번데기 첨가량을 규명하기 위하여 번데기 첨가량을 달리하여 배지를 조제한 후 배양된 액체종균을 접종하여 40일간 배양한 결과 80~100g의 번데기 첨가배지에서 가장 높은 분생자경속 수확율을 얻었다. 나머지 조건에서도 분생자경속 형성은 유도되었

으며, 수확율은 번데기의 첨가량에 비례하여 나타났다 (Table 7). 번데기배지의 대체배지로 현미100g과 증류수 120ml를 넣고 조제한 현미배지에 액체종균을 접종하여 분생자경속 형성을 유도한 결과, 번데기배지에서 보다 조금 낮은 수확률을 나타내기는 하였으나 포자형성도 많지 않으며 분생자경속 색깔도 노란색을 띄며 단단하게 분생자경속이 형성되는 것으로 나타났다. 향후 대체배지로 현미

배지가 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.(Table 8). 번데기와 현미를 혼합한 혼합배지가 분생자경속 형성에 미치는 영향을 검토하기 위하여 번데기 첨가량을 50g로 고정하고 현미의 첨가량을 0, 10, 20, 30, 40 및 50g 씩 조정하여 배지를 조제한 후 20℃ 배양실에서 40일간 분생자경속 형성을 유도한 결과 50 : 50의 혼합배지 비율에서 분생자경속 형성이 가장 우수하게 나타났다(Table 9와 10).

Table 6. Effects of illumination hours on synnemata formation of *Paecilomyces tenuipes* C4403 and C5235 in pupae medium

Illumination (hr/day)	LS*		NS		WF		TW		DF	
6	6.5 ^a	6.7 ^b	429	371	16.8	18.1	93.8	94.6	3.2	3.3
12	7.2 ^a	7.3 ^b	494	491	24.8	24.6	92.9	99.7	5.1	4.7
18	7.6 ^a	8.3 ^b	573	490	28.7	24.5	101.7	92.5	5.3	4.8
24	7.9 ^a	8.2 ^b	563	469	28.2	23.5	97.7	90.7	5.9	4.8

*LS, Length of stroma(cm); NS, Number of stroma; WF, Weight of synnemata(g/bottle); TW, Total weight(g/bottle); DF, Dry Weight of synnemata.

^aC4403, ^bC5235.

Table 7. Effects of pupae concentration on synnemata formation of *Paecilomyces tenuipes* C4403 and C5235

Amount of pupae(g)	LS*		NS		WF		TW		DF	
20	3.3 ^a	3.2 ^b	102	65	7.0	3.1	19.2	14.4	0.7	0.6
40	4.8 ^a	4.2 ^b	111	94	9.6	8.4	40.5	36.4	1.4	1.2
60	7.6 ^a	7.7 ^b	236	200	18.7	16.4	48.5	55.0	2.8	2.3
80	7.1 ^a	6.8 ^b	305	273	23.7	20.9	70.6	72.3	3.7	3.1
100	6.3 ^a	6.5 ^b	286	260	22.5	19.9	83.5	85.4	3.4	3.0

*LS, Length of stroma(cm); NS, Number of stroma; WF, Weight of synnemata(g/bottle); TW, Total weight(g/bottle); DF, Dry Weight of synnemata.

^aC4403, ^bC5235.

Table 8. Effects of pupae and brown rice media on synnemata formation of *Paecilomyces tenuipes* C4403 and C5235

Medium	LS*		NS		WF		TW		DF	
pupae	6.8 ^a	9.1 ^b	253	239	19.8	18.3	79.9	79.9	4.1	4.2
brown rice	7.7 ^a	7.5 ^b	226	245	17.1	18.3	189.9	194.6	3.9	4.0

*LS, Length of stroma(cm); NS, Number of stroma; WF, Weight of synnemata(g/bottle); TW, Total weight(g/bottle); DF, Dry Weight of synnemata.

^aC4403, ^bC5235.

Table 9. Effects of brown rice concentration added to pupae medium on synnemata formation of *Paecilomyces tenuipes* C4403 and C5235

Brown rice (g)	LS*		NS		WF		TW		DF	
0	5.2 ^a	5.7 ^b	268	237	13.4	11.9	47.8	40.9	2.7	2.3
10	7.7 ^a	8.8 ^b	361	349	18.1	17.5	59.2	56.2	4.0	3.9
20	9.0 ^a	8.8 ^b	450	428	22.5	21.4	77.3	75.3	4.3	4.5
30	8.8 ^a	9.4 ^b	509	535	25.1	26.8	89.4	89.9	5.6	5.5
40	10.6 ^a	9.9 ^b	781	660	39.1	33.0	138.8	126.7	6.6	6.3
50	10.8 ^a	10.5 ^b	716	665	35.8	33.3	143.7	146.0	7.8	6.4

*LS, Length of stroma(cm); NS, Number of stroma; WF, Weight of synnemata(g/bottle); TW, Total weight(g/bottle); DF, Dry Weight of synnemata.

^aC4403, ^bC5235.

Table 10. Effects of pupae concentration added to brown rice medium on synnemata formation of *Paecilomyces tenuipes* C4403 and C5235

Pupae (g)	LS*		NS		WF		TW		DF	
0	7.8 ^a	7.5 ^b	205	188	10.3	9.4	81.9	73.9	2.3	2.1
10	7.8 ^a	9.2 ^b	319	391	16.0	19.1	95.6	94.9	3.4	4.2
20	8.7 ^a	7.9 ^b	467	425	23.4	20.8	105.4	103.7	5.0	4.6
30	9.3 ^a	9.1 ^b	511	477	25.6	23.9	132.3	128.3	5.2	5.1
40	9.5 ^a	9.4 ^b	540	571	27.0	27.8	135.6	139.0	5.7	5.9
50	9.8 ^a	9.7 ^b	550	592	28.5	29.7	140.7	144.5	6.3	6.4

*LS, Length of stroma(cm); NS, Number of stroma; WF, Weight of synnemata(g/bottle); TW, Total weight(g/bottle); DF, Dry Weight of synnemata.

^aC4403, ^bC5235.

번데기의 형태에 따른 분생자경속 형성

번데기배지를 조제할 때 번데기의 세척상태와 비세척상태의 차이를 알아보기 위해서 본 실험을 실행하였다. 40일간 배양한 후 분생자경속 회수율을 조사하였다. 세척한 번데기배지의 회수율이 다소 높게 나타났다(Table 11, Fig. 6). 번데기의 해동과 냉동상태에서 나타나는 분생자경속 형성을 조사하고자 냉동번데기와 해동번데기를 나누어 배지를 조제한 후 액체중균을 접종하여 40일간 배양한 결과 냉동번데기 보다 해동번데기에서 더 높은 수확율을 나타냈다(Table 12). 이는 많은 양의 수분이 함유된 상태에서는 살균효과도 떨어지며 다른 이물질의 함량이 높아 분생자경속 형성에 불리한 조건을 형성하는 것으로 사료된다. 번데기배지 조제할 때 번데기의 상태에 따른 차이를 알아보기 위하여 번데기를 원형 상태와 분쇄한 상태로 나누어 접종하였다. 40일간 배양하여 측정한 결과 분쇄한 번데기에서 분생자경속 수확율이 높게 나타났다. 이는 분쇄상태



Fig. 6. Effect of washing and non washing treatment of pupae on synnemata formation of *Paecilomyces tenuipes*.

의 번데기배지가 공극률이 높아 균사의 생장이 유리한 결과로 사료된다(Table 13).

Table 11. Effect of washing and non washing treatment of pupae on synnemata formation of *Paecilomyces tenuipes* C4403 and C5235

Pupae condition	LS*		NS		WF		TW		DF	
non washed	6.7 ^a	9.1 ^b	253	239	19.8	18.3	79.9	79.9	4.1	4.2
washed	8.4 ^a	7.2 ^b	274	282	20.8	21.4	76.8	74.3	4.6	4.5

*LS, Length of stroma(cm); NS, Number of stroma; WF, Weight of synnemata(g/bottle); TW, Total weight(g/bottle); DF, Dry Weight of synnemata.

^aC4403, ^bC5235.

Table 12. Effects of frozen and unfrozen treatment of pupae on synnemata formation of *Paecilomyces tenuipes* C4403 and C5235

Pupae condition	LS*		NS		WF		TW		DF	
frozen	6.8 ^a	9.1 ^b	253	239	19.79	18.34	79.87	79.91	4.12	4.16
unfrozen	8.0 ^a	9.3 ^b	290	277	21.68	20.99	84.45	81.05	4.51	4.64

*LS, Length of stroma(cm); NS, Number of stroma; WF, Weight of synnemata(g/bottle); TW, Total weight(g/bottle); DF, Dry Weight of synnemata.

^aC4403, ^bC5235.

Table 13. Effects of pulverized and non-pulverized treatment of pupae on synnemata formation of *Paecilomyces tenuipes* C4403 and C5235

Pupae condition	LS*		NS		WF		TW		DF	
non pulverized	6.8 ^a	9.1 ^b	253	239	19.8	18.3	79.9	79.9	4.1	4.2
pulverized	8.2 ^a	8.5 ^b	283	249	21.4	18.4	77.4	79.4	4.8	4.2

*LS, Length of stroma(cm); NS, Number of stroma; WF, Weight of synnemata(g/bottle); TW, Total weight(g/bottle); DF, Dry Weight of synnemata.

^aC4403, ^bC5235.

고 찰

곤충을 기주로 하여 자실체를 형성하는 곤충기생균(entomopathogenic fungi)의 일종인 눈꽃동충하초(*Paecilomyces tenuipes*)는 인시목의 유충이나 번데기, 성충에 이르기까지 폭넓게 발생하는 동충하초로 한국에서 분생자경속 형성이 성공하여 산업적으로 이용되고 있는 버섯이다(최, 1999, 조등, 1999). 동충하초속균의 인공배양은 곤충기생균을 가지고 Pettit(1895)는 인공배지를 이용하여 분생자경속의 형성이 가능함을 보인 이후 번데기 동충하초를 가지고 분생자경속 형성에 기본 배지와 분생자경속 형성 방법에 대한 연구를 보고된 바 있다(Basith and Madelin, 1968; Kobayasi 1941; Sung *et al.* 1993 1999; 성, 1996; 성등 1998; 이, 1996; 최, 2000) 등에 의하여 연구, 보고된 바 있다. 눈꽃동충하초는 누에를 이용하여 분생자경속을 형성하는 방법이 개발되어 산업화 되고 형성된 분생자경속을 가지고 약리작용을 밝혀내므로 앞으로 연구가 이루어지지만(Kim *et al.* 1994, 2000, 2001; Yun *et al.* 2000; 조등 1999) 번데기와 현미를 이용한 분생자경속 형성에 대한 체계적인 연구는 미흡한 편이다.

공시균주인 5개의 균주를 가지고 각각의 인공분생자경속 형성은 잘 되나 안 되는 것도 있어 분생자경속의 균주간에 형성 차이가 있으므로 앞으로 동충하초의 유전자원 수집이 중요한 것으로 판단된다. 동충하초를 재배하려면 액체배양이 포자의 비산도 막을 수 있고 또 균일하게 접종시킬 수 있다는 보고가 있으므로(성과 정, 1997; Han *et al.* 2001) 눈꽃동충하초 분생자경속을 형성시키기 위하여 배지로는 균체량이 많은 SDAY배지와 PDB배지에서 배양하여 15ml씩 접종하였을 경우 분생자경속을 잘 형성하므로 이들 배지를 사용하며 보통 곤충기생균의 배지로는 SDAY를 사용하는데 같은 결과를 얻었다(Humber, 1990). 분생자경속 형성의 적합한 온도는 배지실험과는 달리 20℃에서 가장 높은 형성을 보이는 것은 균사생장보다는 분생자경속 형성이 낮은 온도에서 잘 형성되는 것과 같은 경향을 보이는 것과 같다. 조명에서도 다른 버섯과 같이 암상태보다는 18시간 조명을 하는 것이 분생자경속 형성이 양호하였다. 눈꽃동충하초는 다른 동충하초와 달리 자실체의 형성이 잘 되는 편이나 번데기동충하초에서와 같이 암상태에

서는 흰균사가 퍼지는 것이 특징이다(최, 2000; 최, 2000).

동충하초는 대부분 번데기만을 이용하여 자실체를 형성하는 것으로 알고 있으나 현미에서도 자실체를 형성시킬 수 있다. 번데기량은 세척하지 않은 번데기를 분쇄하여 80g-100g에서 잘 형성되며 현미에서도 같은 분량을 넣었을 때 분생자경속의 형성은 발육은 약간 떨어졌으나 분생자경속의 형태는 우수하고 단단하며 건조 후의 분생자경속 무게도 비교적 안정적으로 나타났다. 번데기배지와 현미배지에서의 분생자경속 형성은 번데기배지에서는 분생자경속이 흰색을 띄는 반면 현미배지에서의 분생자경속은 약간의 밝은 노란색을 띄는 것으로 나타났다. 육안으로 보기에 분생자경속의 성장이 매우 건전해 보이며, 분생자경속의 활력도 우수한 것으로 나타났고, 번데기배지에 비해 포자의 비산율도 현저히 줄어들어 이러한 문제를 해결하기 위하여 현미와 번데기를 혼합하여 분생자경속을 형성시키면 앞으로 제품화 단계에서는 높은 잠재적 가치가 있는 것으로 판단된다.

따라서 본 연구를 통하여 번데기배지의 대체 배지로 현미배지가 유용하게 사용하여 눈꽃동충하초를 대량 생산시킴으로 이 눈꽃동충하초를 이용하여 여러 가지의 약리성분이 밝혀지어 거기에 항암작용에 뛰어난 효과를 보이고 있으므로 눈꽃동충하초를 이용한 유용 약리성분의 연구와 신물질 개발에 이용가능성에 있으리라 본다.

적 요

눈꽃동충하초 분생자경속을 형성하는데 액체배양을 이용한 접종원의 배지는 PDB가 가장 우수하였으며, 분생자경속 형성에 유리한 배양온도는 20℃로 나타났다. 조명은 500lx에서 가장 양호한 성장을 하였으며 광주사 시간은 18hr이 가장 유리한 분생자경형성 조건을 나타내었다. 알맞은 배지 조건은 번데기와 현미를 50 : 50의 비율에 증류수를 현미에 1 : 1비율로 첨가한 혼합배지에서 높게 나타났다. 번데기배지는 원형상태와 분쇄상태 중에서는 분쇄된 상태에서 번데기배지의 공극률이 높아 균사의 침입이 용이하여 분생자경속 회수율과 균사의 배지내에 형성이 원형상태의 번데기보다 더욱 높게 나타났으며, 균사의

생장도 역시 분쇄한 번데기에서 더욱 빠르고 고르게 나타났다. 종균 접종량은 15mℓ의 종균을 접종하면 분생자경속이 잘 형성되었다. 눈꽃동충하초 재배에 가장 안정하게 재배하려면 분쇄한 번데기에 현미와 혼합한 배지에 종균 15 mℓ를 접종하여 24 에서 발이를 시킨 후 20℃의 배양실에서 재배하는 것이 가장 좋은 것으로 나타났다.

감사의 글

이 논문은 과학기술부에서 시행하는 한국생명공학연구원 유전자원활용사업단의 동충하초은행연구결과로 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

성재모. 1996. 한국의 동충하초. 교학사. 202-222 pp.
 성재모, 유영복, 차동렬. 1998. 버섯학. 교학사. 556-568 pp.
 성재모, 정성모. 1997. 느타리버섯 액체종균을 이용한 느타리버섯 생산에 관한 연구. 농림부 보고서. pp136
 이재근. 1999. 풍뎡이冬蟲夏草의 培養의 特性과 자실체 形成에 關한 研究. 江原大學校 碩士學位 論文.
 이현경. 1996. 韓國產 冬蟲夏草의 分布와 分類 및 培養의 特性에 關한 研究. 江原大學校 碩士學位 論文. pp96
 조세연, 신국현, 송성규, 성재모. 1999. 누에동충하초 생산 및 유용물질 개발. 농촌진흥청 보고서. pp234.
 최영상. 2000. 번데기冬蟲夏草의 培養의 特性과 人工栽培에 關한 研究. 江原大學校 碩士學位 論文. pp63
 최인영. 2000. 冬蟲夏草屬菌의 類緣關契 分析 및 人工培養. 全北大學校 博士學位 論文. pp112.
 Ban, K. W., Park, D. K., Shim, J. O., Lee, Y. S., Park, C. H., Lee, J. Y., Lee, T. S., Lee, S. S. and Lee, M. W. 1998. Cultural characteristics for inducing fruition-body of *Isaria japonica*. Kor. J. Mycol. 26(3): 380-386
 Basith, M. and Madelin, M. F. 1968. Studies on production of perithecial stromata by *Cordyceps militaris* in artificial culture. Can. J. Bot. 46: 473~480.
 Bigelow, H. E. 1960. Unusual fruiting of *Cordyceps militaris*. Mycologia, 52:958
 Choi, I. Y., Choi, J. S., Lee, W. H. Yu, J., Joung, G. T., Ju, I. O., Choi, Y. K. 1999. The condition of production of artificial fruiting body of *Cordyceps militaris*. Kor. J. Mycol. 27(4): 243-248.
 Cho, S. Y., Ji, S. D., Jung, I. Y., Nam, S. H. 1999. Cultural condition and morphological characteristics of *Paecilomyces japonica* for the artificial cultivation. Kor. J. Seric. Sci. 41(1): 36-40.
 Cunningham, K. G., Hutchinson, S. A. Manson, W. and Spring, F. S. 1951. Cordycepin, a metabolic product from cultures of *Cordyceps militaris*(Linn.)Link. Nature 166:949.
 Fukatsu, T., Sato, H. and Kuriyama, H. 1997. Isolation, inoculation to insect host, and molecular phylogeny of an entomogenous fungus *Paecilomyces tenuipes*. J. Invertebr. Pathol. 70: 203-208.
 Han, M. S., Nam, S. H., Jung, I. Y., and Cho, S. H. 2001.

Improvement of liquid culture methods of *Paecilomyces japonica*. Kor. J. Seric. Sci. 43(1): 33-36.
 Harada, Y., Akiyama, N., Yamamoto, and K., Shiota, Y. 1995. Production of *Cordyceps militaris* fruit body on artificially inoculated pupae of *Mamestra brassicae* in the laboratory. Trans. Mycol. Soc. Japan 36: 67-72.
 Humber, R. A. 1990. Identification of fungal entomopathogens USDA-ARS. Plant, Soil & Nutrient Lab. pp 1-10.
 Kim, H. W., Nam, K. S., Jo, Y. S., Kim, and Y. H., Hyun, J. H. 2001. Cytotoxic activities of acetoxyscirpenediol and ergosterol peroxide from *Paecilomyces tenuipes*. Life Sciences 69: 229-237.
 Kim, Y. H., Park, Y. H., Mon, E. K., Shin, Y. K., Bae, M. A., and Kim, J. G. 2000. Antitumor activity of *Paecilomyces japonica* is mediated by apoptotic cell death. J. Microbiol. Biotechnol. 10(1): 16-20.
 Kim, Y. S., Park, K. S., Park, H. K. and Kim, S. W. 1994. Compositional suger analysis of antitumor polysaccharides by high performance liquid chromatography and gas chromatography. Arvh. Pharm. Res. 17(5): 337-342.
 Kobayasi, Y. 1941. The genus *Cordyceps* and its allies. Sei. Rept. Tokyo Buntika Daigaku, Sect. B,5: 53-260
 Kobayasi, Y. 1982. Keys to the taxa of the genera *Cordyceps* and *Torrubiella*. Trans. Mycol. Soc. Japan 23: 329-364.
 Pacioni, G. and Frizzi, G. 1977. *Paecilomyces farinosus*, the conidial state of *Cordyceps memorabilis*. Can J. Bot. 56: 391-394.
 Pen, X. 1995. The cultivation of *C. militaris* fruit body on artificial media and the determination of SOD activity. Acta Edulis Fungi 2: 25-28. (In Chinese).
 Petch, T. 1936. *Cordyceps militaris* and *Isaria farinosa*. Trans. Brit. Mycol. Soc. 20: 216-224.
 Pettit, R. H. 1895. Studies in Artificial Cultures of Entomogenous Fungi. Bot. and Ento. Division. Bulletin 97: 345-350.
 Samson, R. A. 1974. *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. Studies in Mycology 6: 31-36.
 Samson, R. A., Evans, H. C. and Latge J. P. 1949. Atlas of Entomopathogenic fungi. Springer-Verlag Pp: 18-133.
 Samson, R. A. 1995. Constraints associated with taxonomy of biocontrol fungi. Can. J. Bot. 73(S1): S83-S88.
 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.
 Sung, J. M., 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.
 Sung, J. M., Lee, H. K., Choi, Y. S., Kim, Y. O., Kim, S. H., and Sung, G. H. 1997. Distribution and taxonomy of entomopathogenic fungi species from Korea. Kor. J. Mycol. 25(4): 231-252.
 Sung, J. M., Lee, H. K., Yoo, Y. J., Choi, Y. S., Kim, S. H.,

- Kim, Y. O. and Sung, G. H. 1998. Classification of *Cordyceps* species based on protein banding pattern. Kor. J. Mycol. 26(1): 1-7.
- Yamanaka, K., Inatomi, S. and Hanaoka, M. 1998. Cultivation characteristics of *Isaria japonica*. Mycoscience, 39: 43-48.
- Ying, J., Mao, X., Ma, Q., Zong, Y. and W. H. 1987. Icons of medicinal fungi from China. Science Press, Beijing, China. pp575
- Yun, J. W., Bae, J. T., Jayanta, S., Park, J. P., and Chi, H. S. 2000. Optimization of submerged culture conditions for Exo-biopolymer production by *Paecilomyces japonica*. J. Microbiol. Biotechnol. 10(4): 482-487.
- 느타리버섯 (*Pleurotus* spp.)은 온대지방의 활엽수 고사