

곡물배지를 이용한 번데기동충하초 재배기술

유영진 · 서경원 · 이공준 · 최동철 · 최정식 · 박정식¹⁾ · 성재모²⁾
전라북도농업기술원, ¹⁾농진청, ²⁾강원대 자원생물환경학부

Establishment of artificial cultivation technique of *Cordyceps militaris* using a grain media

Young-Jin Yu, Kyoung-Won Seo, Kong-Joon Lee, Dong-Chil Choi, Joung-Sik Choi,
Joung-Sik Park¹⁾ and Jae-Mo Sung²⁾

Jeollabuk-do Agricultural Research and Bio-Resources, Iksan, 570-704, Korea

¹⁾National Institute of Agricultural Science and Technology, Suwon 441-707, Korea

²⁾Department of Environmental Biology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

ABSTRACT : This study was carried out to investigate the conditions of liquid culture and fruiting body formation of *Cordyceps militaris* using grain media contained the brown rice and black purple rice. Liquid mycelial growth and density of *Cordyceps militaris* were the highest in the medium of malt extract 0.7% and pH 5.0~5.5.

The optimal condition of formation the fruiting bodies were shown to be temperature of 17°C, light intensity of 600 lux, CO₂ of 500ppm and humidity intensity of 95% produced highest amount of fruit bodies.

KEYWORDS : *Cordyceps militaris*, Artificial fruiting, Brown rice, Black purple rice

동충하초의 분류학적 위치는 자낭균문(Ascomycota), 핵균강(Pyrenomycetes), 육좌균목(Clavicipitaceae), 동충하초속(*Cordyceps*)에 속하며 한국을 비롯한 중국, 일본 등 전 세계적으로는 100속 300여종이 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). 동충하초균의 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(Brady, 1979; Kobayasi, 1982; Samson, 1995; Sung et al., 1993; 성, 1996; Sung 등, 1998). 이러한 동충하초의 대표종은 번데기동충하초(*Cordyceps militaris*)로 한국에 많이 자생하는 것으로 알려졌고 Seaver(1911)는 번데기동충하초를 *Cordyceps*속의 대표종(type species)으로 발표하였다.

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 자낭 안에 실모양의 자낭포자들이 존재 한다.

따라서 본 연구는 국내에서 채집된 번데기동충하초균을

공시균주로, 곡물배지를 사용하여 자실체 형성조건을 조사하고, 인공재배에 관련한 요인들을 구명하여 보다 안전한 배지자원을 이용한 번데기동충하초의 안전적 재배법을 확립하고자 수행하였다.

재료 및 방법

공시균주

본 시험에 사용한 균주는 농진청 응용미생물과 미생물보존연구소에서 채집, 보관중인 번데기동충하초를 분양 받아 사용하였다. 보관중인 모균주를 PDA(potato dextrose agar; Difco) 평판배지에 접종한 후 25°C의 항온기에서 15일간 배양한 후 접종원으로 이용하였다.

액체 접종원균 조사

자실체형성에 적합한 종균을 제조하기 위해 1,000ml 바이얼(Micro tube 1,800ml)에 감자배지, 대두박, 맥아추출물, 탈지분유, 감자부산물, 부존자원을 이용 각각 재료의 C/N율을 조사하여 가장 적합한 부재료를 액체 종균의 배지로 선발 하였다. 가장 효과적이었던 맥아배지의 적정농도를 구명하기 위하여 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0%로 농도를 조절하고, 배지의 pH를 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0으로 달리하여 기폭장치를 설치한 후 공기량은 1.8vvm, 25°C에서 14일간 배양하고 균사 건중량을 조사하였다.

곡물배지 준비

자실체 형성을 위한 곡물배지는 현미와 흑미를 사용하였는데, 곡물배지 내 이물질질을 제거하기 위해 배지를 수세하고 하루 동안 침지하였다. 침지 후 곡물배지를 걸러 체에 담고 유리수분을 제거하고자 3시간동안 실온에 방치하였다. 준비된 곡물배지를 850ml 배양병에 현미와 흑미를 70g 씩 담고, 수분을 조절한 다음 121°C, 90분 동안 고압살균 하고 냉각실에 하루정도 보관한 후 바로 접종하였다. 각 시험은 액체배양된 균사체를 접종하여 자좌길이, 발이수, 병당 자실체 수량을 조사하였다.

배양조건 조사

자실체 형성에 적합한 광도(lx)는 200lx, 400lx, 600lx의 광조건, 자실체 발생온도는 17°C, 20°C, 23°C의 조건으로 조절하였고, 배양실의 수분은 95%로 유지시켜 60일간 배양한 후 자좌길이, 발이수, 병당 자실체수량을 조사하였다.

인공재배 단계별 처리방법 조사

곡물배지를 이용한 번데기동충하초의 인공재배를 위하여 균사배양, 배지조제, 접종, 생육 등 각각의 단계별로 실험 결과에 준하여 적정 처리방법을 나열하여 대량생산 재배법을 도식화하였다.

결과 및 고찰

가. 액체종균 재료의 최적 C/N율

액체종균 제조를 위한 재료의 C/N율은 <표 1>에서 보는 바와 같다. 버섯은 탄소를 이용하여 단백질, 지질, 핵산 그리고 세포벽 다당류의 기본 구성물질을 만든다. 이들 물질

은 버섯내의 동화작용에 의해서 합성된다. 버섯은 광합성을 할 수 없기 때문에 탄소를 유기물을 분해해서 얻는다. 이러한 유기물은 단당류, 다당류, 유기산, 아미노산, 알코올, 그리고 리그닌, 셀룰로스 등이 있다. 질소원은 단백질, 퓨린, 피리미딘, 비타민 등의 합성에 필요할 뿐만 아니라 세포벽 구성 요소인 키틴에도 함유되어 있다. 그런데 질소원은 버섯의 종류마다 요구하는 성질이 서로 다르다. 공시 재료에서의 C/N율은 탈지분유와 대두박에서 각각 7/1, 8/1 이었고, 감자추출 배지는 65/1로 가장 낮게 조사되었다. 또한 맥아추출배지에서 28/1, 감자부산물물은 32/1로 조사되었다. 공시한 재료를 액체종균의 적합한 재료를 선발하고자 모든 배지를 천연상태로 액체배양을 하였을 때 맥아배지가 가장 양호하였다. 이것은 맥아추출배지가 균사를 생육하는데 가장 적합한 C/N율로 생각되었다. 하지만 버섯은 생장배지에 다른 성분을 넣지 않고 질소원만 첨가하면 생장이 되지 않으며, 아울러 버섯의 균사는 여러 형태로 질소를 흡수하고 이동하고 균사에는 물질수송을 방해하는 세포벽과 세포막이 존재하지만 분자량이 4500~4700 정도 되는 것은 세포벽을 통과해서 버섯균사가 생육에 관여한다고 보고(Sakamoto *et al*, 1978)하였는데 본 재료의 맥아추출배지는 다른 첨가물을 추가하지 않아도 균사생장에 적합한 것으로 판단되었다.

나. 맥아배지의 농도처리별 균사생장과 밀도

선발된 맥아배지 농도를 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0%로 조절 한 후 균사생육 및 밀도 조사 결과는 <표 2>에서 보는 바와 같이 0.7%에서 균사 건중량이 291.4mg/100ml로 가장 많았고 밀도도 가장 높았다. 하지만 맥아배지를 이용한 액체종균의 적합한 농도를 제시한다면 0.5~0.7%정도가 균사

Table 1. Comparison of C/N ratio of substrate

Substrate	Total carbon(%)	Total nitrogen(%)	C/N ratio
Potato extract	39.2	0.6	65/1
Bark of been	48.5	6.3	8/1
Malt extract	39.3	1.4	28/1
Removed fat milk	39.7	5.5	7/1
By-product of potato	38.7	1.2	32/1

Table 2. Effect of malt extract concentration on the growth of *Codyceps militaris*

(25°C/14days, Air : 1.8vvm)

Concentration(%)	Dry weight of mycelial(mg/100ml)	Mycelial Density
0.1	123.9	+
0.3	224.3	++
0.5	281.4	+++
0.7	291.4	++++
1.0	289.1	+++

※ Control : PDB(Potato Dextrose Broth, 0.3% : 1045mg/700ml)

를 생육시키는데 적합한 농도로 생각되었다.

다. 맥아배지의 pH와 군사생장 및 밀도

선발된 맥아배지 농도를 0.7%로 고정하고 번데기동충하초의 적정pH를 조사하기위하여 산도를 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0로 보정하여 군사생육을 조사한 결과는 <표 3>(그림1)과 같이 산도5.0과 5.5에서 군사 건중량이 각각 390.3mg/100ml, 406.0mg/100ml로 많았다. 산도 5.0이하에서는 번데기동충하초균의 생장과 밀도가 현저히 줄어드는 경향이 있었다. Sung(2004)는 pH범위는 pH 6.0~8.0에서 번데기동충하초의 군사생장이 양호한 것으로 발표한 것과는 다소 차이가 있었다. 또한 Kahlos 등(1990)은 검은혹버섯이 pH 5.9~6.1과 6.2~6.4에서 최적을 나타내며 1일당 약 4mm의 군사 콜로니를 나타낸다고 하였다. Rypacek(1996)은 목재부후균은 군사생장에 따라 산도(pH)가 변화하며 검은혹버섯 군사는 pH3.3이하에서는 군사생장이 되지 않는다고 보고하였다. 그런데 일반적으로 버섯의 군사는 물

에 용해되지 않은 염을 이용할 수 없기 때문에 배지의 pH가 영향을 미친다. 배지의 pH가 낮으면 양이온 투과성이 나쁘게 되고, 이와 반대로 pH가 높으면 음이온 투과성이 나쁘게 된다. 배지의 pH는 군사 세포내의 pH에 의해서 체내 pH가 변하게 되는데 이와 같이 pH는 군사생육에 많은 영향을 미치고 이 요인들이 군사생장을 제한한다. 버섯의 군사는 대부분의 경우 pH5-7인 약산성에서 생장이 양호한데, 본시험에도 군사의 적정 pH범위가 5.0-5.5의 약산성에서 군사생육 양호한 것으로 조사되었다.

라. 온도처리별 곡물배지종류별 번데기동충하초의 자실체발생

곡물은 일반현미와 흑미를 850cc 병당 입병량으로 70g을 첨가한 배양병에서 자실체를 형성하였고, 온도처리별 자실체 특성은 <표 4>에서 보는 바와 같이 17℃에서 번데기동충하초의 자좌의 길이 및 자실체 수확량이 높게 나타났다. 또한 곡물배지종류에서는 일반현미가 흑미 보다 자실체의 수량 및 자좌의 길이가 다소 양호하였다. 하지만 Sung 등(1999)은 자실체유도를 위한 온도조건을 20℃와 24℃의 온도를 비교하여 자실체형성을 보고한 바 있는데 이와는 다른 양상이었고, Basith와 Madelin(1968)는 20±2℃의 배양온도조건에서 자실체형성이 유도되었다고 보고 하였는데, 본 연구에서도 17℃에서 발이 및 자실체형성이 유도되어 고온보다는 저온으로 발이를 유도할 때 자실체가 형성됨을 알 수 있었다. 그런데 Basith와 Madelin(1968)는 현미배지에 탄소원으로 starch, sucrose, glucose를 첨가하여 자실체 형성을 유도하였는데 sucrose 10%에서 자실체 형성이 양호하여 탄소원 첨가효과로 사료된다.



Fig. 1. Effect of pH ranges on mycelial growth of *Cordyceps militaris* in Malt extract.

Table 3. Effect of initial pH on the mycelial growth of *Codyceps militaris* (25℃/14days, Air : 1.8vvm)

Initial pH	Dry weight of mycelia(mg/100ml)	Mycelial Density
4.0	79.6	+
4.5	83.7	++
5.0	390.3	++++
5.5	406.0	++++
6.0	314.0	+++

* Mycelial Density

Table 4. Effects of temperature on fruit body formation of *Codyceps militatis* (culture/60days)

Division	Brown Rice			Division	Black Purple Rice		
	LS*	NS	WF		LS	NS	WF
17℃	3.8	142	20.9	17℃	3.2	128	18.1
20℃	2.8	116	14.2	20℃	2.6	105	12.5
23℃	2.2	98	9.7	23℃	2.6	72	7.7

※ LS ; Length of stroma(cm), NS : Number of stroma, WF : Weight of fruiting body(g/bottle)

● Condition of growth : humidity(95%), light(1x) : 200, CO₂ : 500ppm

마. 자실체유도를 위한 최적 광도

버섯 발육에 대한 빛의 작용은 버섯의 형태를 결정하는데 있어서 많은 역할을 하는데 그역할은 자의 생장을 촉진하고 대의 생장을 정지한다. 곡물배지를 이용한 번데기동충하초의 광도에 의한 영향은<표 5>에서와 같이 600 lx에서 자실체 형성이 양호하였다. Shanor(1936)는 동충하초균의 자실체 형성에 22 이하의 온도와 높은 광조건의 필요성에 관하여 보고 한 바 있으며 Basith와 Madelin(1968)는 초발이의 유도시 최소 3lx의 광조건, 자낭각의 성숙은 15~90lx의 광조사가 필요하다고 보고하였다. Choi 등(1999)은 1000 lx의 광조건에서 번데기동충하초의 자실체 형성이 우수함을 보고하였지만 본 실험에서는 600 lx에서 자실체의 형성이 양호한 것으로 조사되었고, 특히 자실체를 형성 할 때 배지 내 수분 공급을 위해 매일 관수를 실시하는 것이 자실체의 수확을 높이는데 가장 중요한 요인으로 생각된다.

바. 곡물배지의 번데기동충하초 자실체형성의 최적조건

버섯의 자실체형성은 물리적 환경조건으로 온도, 습도,

pH(산도), 빛(lx)을 들 수 있다. 재배과정에서 온도는 최적온도보다 낮은 실온에서 배양하는 것이 보통이다. 그 이유는 균사 호흡에 의해 발생하는 열이 배양기 내에서는 외부보다 2-3℃정도 높은 상태이며, 고온에서 배양하면 균사의 생장은 증가하지만 과도한 호흡 증진에 의해, 영양분의 소비가 커져 균사체 내에 저장 물질을 축적하기가 어려워지기 때문이다. pH는 균사가 양분을 흡수할 때 세포막 투과성에 영향을 끼치는데, 배지의 pH가 낮으면 세포막의 양이온 투과성이 나빠지며, pH가 높으면 음이온 투과성이 나빠진다. 따라서 균이 요구하는 물질의 종류와 양에 따라 이들을 흡수하는 최적의 pH가 정해진다. 그리고 배지의 pH는 균사 세포 내 pH에 영향을 준다. 습도는 공기에 노출되어 생장하는 균사의 경우 일반적으로 공기가 95-100%의 상대 습도일 경우 균사는 양호한 생장을 하지만, 80-85%로 상대 습도가 저하하면 생장이 늦어진다. 따라서 적정 습도를 유지하는 것은 버섯을 생육하는데 중요한 요인이며, 균류는 광합성 능력이 없어, 햇빛에 노출되면 무용하거나, 유해하다고 보았으나, 균류는 빛을 받아 반응을 나타내는 성질이 있음을 알게 되었다. 균사는 세포막 중 빛을

Table 5. Effects of light intensity on fruit body formation of *Codyceps militaris* (culture/60days)

Division	Brown Rice			Division	Black Purple Rice		
	LS*	NS	WF		LS	NS	WF
0	-	-	7,1	0	-	-	2,9
400lx	5.7	174	20	400lx	3.3	145	17
600lx	6.4	278	23.8	600lx	5.2	210	20

* LS ; Length of stroma(cm), NS : Number of stroma), WF : Weight of fruiting body(g/bottle)

● Condition of growth : Humidity(95%), Temperature : 17℃, CO₂ : 500ppm

Table 6. Optimal condition for Fruiting body culture of *Codyceps militaris*

Brown Rice						Black Purple Rice					
IP※	IPP	FGP	LS	NS	WF	IP	IPP	FGP	LS	NS	WF
34	12	46	5.9	166	24.3	36	14	50	4.0	261	20.5

※ IP : Incubation period(days), IPP : Initial pinheading period(days),

FGP : Fruitbody growth period(days), LS : Length of stroma(cm),

NS : Number of stroma), WF : Weight of fruiting body(g/bottle)

Optimal condition : Humidity(95%), Temperature : 17℃, CO₂ : 500ppm, Light intensity : 600lx



Fig. 2. The fruiting body formation of the optimal condition of *Codyceps militaris* on grain media

받는 부분이 보다 빨리 성장하며, 원기 형성과 발육에 유효하고, 버섯의 형태를 결정하는데 많은 역할을 한다. 또한 빛은 버섯의 갓 성장을 촉진하며, 대의 성장을 억제한다. 본 연구의 결과 곡물배지를 이용한 번데기동충하초의 자실체형성을 위한 최적조건은 습도 95%, 온도 17 , 광 600 lx, pH 5.0-5.5, CO₂ 500ppm이며, 곡물배지로는 일반현미가 흑미보다 자실체생육이 다소 양호하였다(표 6).

적 요

본 연구는 번데기동충하초를 곡물배지를 이용하여 자실체를 형성하는 실험으로 액체종균제조에 적합한 조건은 맥아추출배지를 농도 0.7%, pH 5~5.5,으로 조정하였을 때 균사의 건중량은 3.9~4.1mg/ml로 양호 하였다. 자실체 발생 최적 환경조건은 습도 95%, 온도 17℃, 조도 600 lx, 이산화탄소농도 500ppm하였을 때, 곡물배지 일반현미와 흑미에서 24.3g/병, 20.5g/병의 자실체가 형성되었다.

감사의 글

이 연구는 농촌진흥청 국책기술개발사업(과제번호 : 20070201030017)의 지원에 의해 이루어진 기술개발 보고입니다. 농촌진흥청에 감사합니다.

참고문헌

성재모. 1996. 한국의 동충하초. 교학사. 62-90 pp.
 Basith, M. and Madelin, M. F. 1968. Studies on the production of perithecial stromata by *Cordyceps militaris* in artificial culture. Can. J. Bot. 46: 474-480.
 Brady, B. L. K. 1979. *Cordyceps militaris*. In: CMI Descriptions of pathogenic fungi and bacteria No. 605
 Choi, I. Y., Choi, J. S., Lee, W. H., Yu, Y. J., Jong, 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. Mukerji. 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 cademic Publishers.
 Kahlos K, Vares T, Hiltunen R. 1990 Optimization of pH lever and effect of pH on secondary metabolities of two strains of *Inonotus obliqua* in vitro. Planta Med. 56:627.
 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 *Torrubiella*. Trans. Mycol. Soc Japan 23: 329-364.
 Samson, R. A. 1974. *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. Studies in Mycology 6: 31-36.
 Samson, R. A. 1955. Constraints associated with taxonomy of biocontrol fungi. Can. J. Bot. 73(SI): S83-S88.
 Seaver, F. J. 1911. The Hypocreales of North America-IV. Mycologia 3: 207-230.
 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.
 _____. _____. 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.
 Rypack V. 1996, Biologie holzzerstrender Pilze. Fischer, Leipzig, 211.
 Zeng, M. and KINJO, n. 1998. Notes on the alpine *Cordyceps* of China and nearby nations. Mycotaxon 46: 215-229.