

눈꽃동충하초 배지별 인공재배법과 성분분석에 관한연구

이희덕, 김용균, 김홍규, 이가순
충남농업기술원

Study on analysis of components and artificial cultural practice on several culture media of *Paecilomyces japonica*

He-Duck Lee, Yong-Kyun Kim, Hong-Kyu Kim and Ga-Soon Lee
Chungnam Agricultural Research and Extension Service, Taejeon, 305-313, Korea

ABSTRACT

This experiment was carried out to find the method for mass production by artificial cultivation and to analyze the components of *Paecilomyces japonica* according to several media. Time of inoculation of the *Paecilomyces japonica* using silkworm was on first day of five molting and infection rate was 72.0%. Optium medium for mass production of the *Paecilomyces japonica* was known effective for increasing dry weight and fruitbody at brown rice 80g plus pupa powder 20g. Dry weight of *Paecilomyces japonica* using fungus of silkworm was 1.2g including pupa and length of fruitbody was appeared 3.0cm to 3.5cm. Content of β - glucan was very high as 40.5% at inoculation on the first day of the five molting while 16.4% at brown rice, 20.7% at pupa, 23.1% at brown rice plus pupa powder, and 28.7% at pine sawdust plus wheat bran. Mycelium was poor and pinkly conidiospore was formed on media of centipede, maggot and powder of silkworm.

Key words: cordycepins, *Paecilomyces japonica*, media, brown rice

서 언

동충하초는 전세계적으로 학자에 따라 100속 600~800여종으로 분류되고 있으며(Arora et al.,1991)

한국에서도 변데기동충(*Cordyceps militaris*)의 76종이 분류 동정 되었다(성, 1996). 동충하초는 중국의 서장, 운남, 귀주와 티베트, 히말라야에 이르는 해발 3,000~4,000m 되는 고지대 생존하는 박쥐나방유충에 기생하는 동충하초(*Cordyceps sinensis*)를 불로

장생의 비약으로 사용하였으며 약효에 대한 최초의 기록은 중국 청나라 본초종신에 처음 기록되어 있다(성 1996., Kobayasi et, Shimizu, 1983)

동충하초는 살아있는 곤충을 침입하여 기주 영양분을 자실체로 형성하거나 충체위에 포자과를 형성하는 곤충기생균으로 AD800년경 Fungus-born wasp로 서양서에 최초 기록으로 전해지고(Kobayasi et shimizu, 1983) 또한 동충하초균의 균사침입은 기주의 외피(cuticle)를 통하여 침입하며 균사는 충체내의 양분이 소비될때까지 생장을 지속한 후 단단하게

Corresponding author: 이희덕, 대전광역시 유성구 상대동, 충남농촌진흥원, 305-313

응축된 내생균핵(endosclerotium)을 형성한다.

최근에 동충하초 임상실험에서 항암효과가 있는 것으로 보고되고 면역증강, 마약중독해독, 동맥경화, 결핵, 황달 등 신장과 폐기능장애에 치료효과가 있는 것으로 보고되고 있는 동충하초중에서 눈꽃동충하초(*Paecilomyces japonica*)에 대한 저비용 배지 사용에 대한 인공재배법과 β -glucan 성분 에 대한 결과를 보고 하고자 한다.

재료 및 방법

가. 공시균주

본시험에 사용된 동충하초의 공시균주는 잠사곤충연구소에서 분양한 눈꽃동충하초(*Paecilomyces japonica*) 균주를 사용하였다.

나. 인공 배지 선발

1. 농산부산물을 이용한 배지선발

인공배지로 사용된 배지종류는 현미, 현미+번데기가루, 소나무톱밥+밀기울 3처리를 실시 하였으며 현미처리구는(현미100g), 현미+번데기가루처리구는 (현미80g +번데기가루20g), 소나무톱밥+밀기울처리구는(소나무톱밥70g+밀기울30g)을 각 처리구별 배지무게 100g을 정량한후 물 100cc에 잘혼합하여 1,000cc 용기에 입병한후 121℃(1.2kg/cm²)에서 90분 고압 살균한 배지를 20℃로 냉각시킨후 눈꽃동충하초균 PDA배지상에서 7일간 배양한 후 내경 6mm cork borer로 찍어낸 균종의 절편을 접종원으로 사용하였다.

눈꽃동충하초균의 접종된 배지는 각처리별 병입구를 막은후 23℃에서 25일간 균사배양을 실시하였으며 눈꽃동충하초 자실체발생을 위해서는 18~20℃ 온도에서 각처리별 병입구가 닫힌 상태의 전기조명 아래에서 자실체발생을 유도하였다.

2. 곤충을 이용한 배지선발

자연발생적인 동충하초 기주의 원형에 접근하기 위해서 지네, 굼벵이, 누에가루, 번데기, 번데기+PDA 5처리를 사용 하였으며 지네처리구, 굼벵이처

리구는 각각 살아있는 지네와 굼벵이를 각각100g씩 1000cc pp용기에 입병하고,누에가루는 깨끗한 물로 혼합하여 수분 65~70%조정후 100g정량하여 1,000cc,pp용기에 입병하고, 번데기는 1차 깨끗이 씻어 오염물질을 제거한후 2차 깨끗한물에 씻어 건져 10~20분후 번데기 100g 정량하여 1,000cc PP용기에 입병 하였으며 번데기+PDA처리구는 번데기80g에 PDA20cc을 혼합하여 1,000cc PP용기에 입병후 121℃(1.2kg/cm²)에서 90분 고압살균후 배지를 20℃로 냉각 시킨 후 눈꽃동충하초균을 PDA배지상에서 7일간 배양한 균을 내경 6mm cork borer로 찍어낸 절편을 접종원으로 사용하였다.

눈꽃동충하초의 접종된 배지는 각처리별 병입구를 막은후 23℃에서 25일간 균사배양을 실시 하였으며 눈꽃동충하초 자실체 발생을 위해서는 18~20℃ 온도에서 각처리별 병입구가 닫힌 상태로 전기조명 아래 자실체 발생을 유도하였다.

3. 누에를 이용한 자실체생산

5령 1일째 된누에를 기주로 눈꽃동충하초균농도(10%/ml)로 접종하고 접종후 24시간 동안 실내습도는 90~95%로 유지 하였다.

다. 성분분석

1. β -glucan 추출

β -glucan의추출방법은 Åman P.등의 방법에 의하였다. 즉 자실체 및 균사체를 냉동건조하여 정확히 10g을 취한후 마개달린 테프론 튜브에넣고 β -glucan을 추출하면서 효소를 불활성시키고 수용성 당류를 제거하기위해 80% 에탄올 50ml를 취한후 끓은수욕조에서 1시간동안 추출후 냉각,원심분리하였다 침전물을 회수한후 1N NaoH 20ml가하여 불용성 β -glucan을 16시간 동안 실온에서 추출 용해시켰다.

여기에 1N HCL를 가하여 중화시킨후 용액을 원심분리하여 그상등액을 총 β -glucan함량은 Jorgensen K.G등의방법에 따라 FIA(Flow Injection Analysis)에 의하여 정량하였다 이때 사용된 HPLC 조건은 다음과 같다.

pump : waters 510 HPLC pump

Integrator : young In D520B
 detector : water 470 scanning fluorescence detector)
 wavelength : exciting 300nm, emission 500nm
 column : stainless tube (2m × 0.2mmI. D.)
 mobile phase: 25ppm calcoflour/0.1M glycine, pH 9.0
 flow rate : 1.0ml/min

결과 및 고찰

가. 농산부산물을 이용한 배지선발

최근 동충하초의 임상실험에서 항암, 및 약효가 인정되어 국민의보건과 건강에 기여하고 건강식품으로 인기가 점점증가하고 있는 추세에 저비용 배지 개발에 의한 동충하초의 대량생산 체계를 구명하기 위해 현미, 현미+번데기가루, 소나무톱밥+밀기울 3 처리에 의한 균사배양과 자실체에 대한 실험 결과는 표1과 같다

본 시험에서는 눈꽃동충하초의 균사생장 및 자실체길이, 자실체 생육과 수량에서 현미+번데기가루 처리구에서 가장 양호 하였으며, 현미처리구에서도

균사생장, 자실체길이, 자실체 모두 양호 하였으나 소나무톱밥+밀기울 처리구에서는 균사생장, 자실체 길이, 자실체무게 등 배양 및 생육이 저조하였다.

나. 곤충을 이용한배지선발

표2에 의하면 번데기+PDA처리구, 번데기처리구에서는 균사생장이 양호하였으며 자실체 길이는 9.0 cm, 5.5cm, 자실체 중량은 26.3g, 18.5g 각각으로 두처리에서 저비용 배지에 의한 대량재배로 자실체 생산도 가능하였다.

그러나 살아있는 지네, 굼벵이, 각각 처리구와 누에가루를 인공배지로 사용시 균사생육이 저조하여 분생포자 균사배양만 가능하고 자실체 생산은 기대할 수 없어 금후 물리성과 통기성 및 배지성분에 대한 요구가 검토되고 있다.

다. 누에를 이용한 자실체생산

누에를 기주로 이용한 눈꽃동충하초의 재배체계 생산(조,1999)과 현미를이용한 재배기술(성,1999)

Table 1. Effect of Growth and yield of *Paecilomyces japonica* on several media

Division	Mycelium growth	Fruitbody length (cm)	Fruitbody weight (g/1000cc,bottle)
Brown rice	+++	10.5 ^{1)b}	31.6 ^b
Brown rice ⁺	+++	11.4 ^b	51.6 ^c
Pupa powder			
Pine sawdust ⁺	++	3.6 ^a	4.4 ^a
Wheat bran			

¹⁾Means within a column with,different letters are significantly different at 5% by the duncans Multiple Range Test

※ Mycelium Density : + Low, ++ Medium, +++ High

Table 2. Effect of growth and yield of *Paecilomyces japonica* on several insect media

Division	Mycelium growth	Fruitbody length (cm)	Fruitbody weight (g/1000cc,bottle)
Pupa+PDA	+++	9.0	26.3
Centipede	+	0	0
Maggot	+	0	0
Silkworm powder	+	0	0
Pupa	++	5.5	18.5

Table 3. Fruitbody and infection rate yield of *Paecilomyces japonica* use silkworm

Infection rate (%)			Fruit body	
Good	Common	poor	Length(cm)	Weight(g/No)
56	16	28	3.0~3.5	1.2

은 재배기술이 보급되고 있으나 1998년 누에를 기주 로한 눈꽃동충하초(*Paecilomyces japonica*) 농가재배 는 많은 농가가 재배에 실패한 사례가 있어 이에 대 한 문제점을 파악하여 재배법을 개선하기 위해 실험 한 결과는 표3과 같다.

눈꽃동충하초균에 감염된결과는72%, 자실체길 이도3.0~3.5cm, 자실체무게는1.2g으로 양호하였으 나 감염되지않은 28%의 누에번데기를 눈꽃동충하 초균의 높은 감염을 시키기 위해서는 접종시기, 균 사농도, 대기중습도,등의 환경관리가 조의 보고와 일치하였다(조, 1,999).

눈꽃동충하초를 이용한 누에동충하초의 자실체 는 그림1과같다.

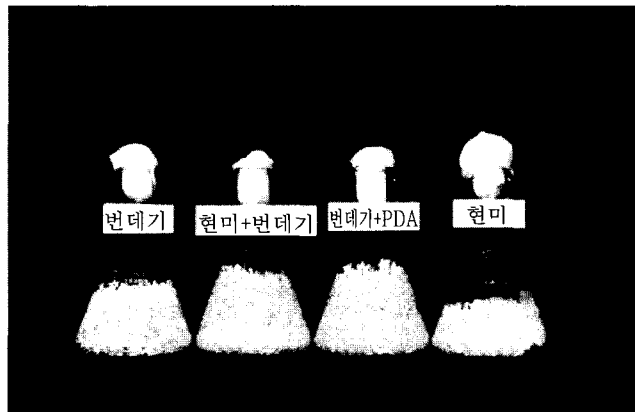
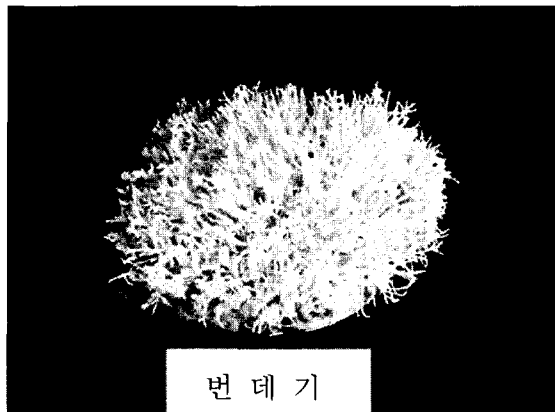


Fig. 1. The states of *Paecilomyces japonica* by several media

라. 성분분석

현미의 8처리에 대한 자실체, 균사체, 균사체+자 실체 부위별 β -glucan 성분분석 결과 부위별 뚜렷한 차이가 있었으며 누에 5령 1일째 기주를 사용한 자 실체+균사체에서 β -glucan함량이 40.5%로 가장 많

Table 3. β -glucan contents in each fruitbody and mycelium

divide	β -glucan (%)
Brown rice fruitbody	16.4
Brown rice +Pupa powder fruitbody	23.1
Pine sawdust +Wheat bran fruitbody	28.7
Pupa+PDA fruitbody	8.6
Centipede mycelium	33.3
Maggot mycelium	13.8
Silkworm powder mycelium	30.6
Pupa fruitbody + mycelium	20.8
<i>Paecilomyces japonica</i> of Silkworm fruitbody + mycelium	40.5

이 나타났고 지내와 누에가루 균사체에서도 33.3% 와 30.6% 각각 높게 나타났으나 자실체 발생은 전혀 나타나지 않았다 소나무톱밥+밀기울처리구와 현 미+번데기가루처리구의 자실체에서 28.7%, 23.1%, 각각 높게 나타나 눈꽃동충하초 자실체생산을 위해 서는 저비용 배지로 사료되었으며 소나무톱밥+밀

기울처리구의 자실체에서 β -glucan함량이 28.7%로 높게 나타나는 것은 소나무톱밥에 주로 함유된 cellulose, ligin함량이 눈꽃동충하초 자실체로 전이 된 것으로 사료 되었으며 번데기처리구의 혼합된 균 사체와 자실체의 β -glucan 성분 20.75%와 현미 처리 구의 자실체에서 16.4%로 저비용 배지 개발이 유리

할 것으로 기대된다.

적 요

1. 누에를 이용한 눈꽃동충하초 재배에서 평균접종은 누에 5령1일째 실시하였으며, 감염율은 72% 되었으며
2. 눈꽃동충하초 대량생산을 위한 인공재배 최적배지는 “현미80g+번데기가루20g” 처리구에서 자실체 길이 11.4cm, 무게 51.6g, 질노랑색으로 아주 양호했으며, 현미 처리구, 번데기+PDA처리구에서도 양호했음.
3. 누에동충하초에서 발생된 눈꽃동충하초는 번데기 1마리당 1.2g(번데기포함), 길이 3.0~3.5cm 정도 되었으며, 일부는 누에상태에서도 동충하초가 발생하였음.
4. β -glucan 함량은 누에 5령 1일 접종 처리구가 40.5%로 가장 높고 저비용 배지인 현미 16.4%, 번데기 20.7%, 현미+번데기가루 23.1%, 소나무 톱밥+밀기울 28.7%로 β -glucan 함량이 높았다.
5. 지네, 굼벵이, 누에가루처리구에서는 균사생육이 부진하였고 분생포자만 발생하였다.

인용문헌

Arora, D. K., Ajello, L. and Mukerji, K. G., Handbook of applied mycology. 1991. Marcel Dekker, Inc. 2: 547~663

Åman P. and Graham H. 1987. analysis of total and insoluble mixed-linked(1-3), (1-4)- β -D-glucans in barley and oats J. Agric. Food Chem, 35 : 704~709

Basith, M. and Madelin, M.F. 1968. Studies on the production of perithecial stomata by *Cordyceps militaris* in artificial culture. Can. J. Bot. 46: 473-480.

Bigelow, H.E. 1960, Unusal fruiting of *Cordyceps militaris*. Mycologia 52: 952~958

Cunningham, K. G., Huchinson. S. A., Manson, W., and Spring, F. S. 1951. Cordycepin, a metabolic product from culture of *Cordyceps militaris* (Linn) Link Pt, I. Isolation and characteristics, J. Chem Soc

1951: 2290~2300

Evans, H. C. and Samson, R. A. 1982 *Cordyceps* species and their anamoephs pathogen on ants (Formicidae) in tropical forest ecosystems 1. The *Cephalotes*(Myrmicinae) complex. Trans. Br. Mycl. soc 79(3): 431~453

조덕현, 임응규, 이재일. 1998, 암에 도전하는 동충하초, 도서출판 진솔 pp19~102

조세연. 1999. 누에동충하초의 생산, 버섯영농 과 삶 제2권 pp88~92

Jorgensen K. G. and astrup S. 1988. Quantfication of high molecular weight(1-3), (1-4)- β -D-glucan using Calcofluor coplex formation and flow injectin analysis. I. analytical principle and its standardization. II . determination of total β -glucans content of barleyand malt. Carysberg res. Commun., 53: 287~296

Kobayasi, Y 1940. The genus *cordyceps* and its allies. Sci. Rept. Tokyo Bunrika Daikaku, Sect. B., 5 : 53~260

이희덕, 김용균, 김홍규. 1998. 눈꽃동충하초 인공재배에 관한 연구. 자원식물학회지 11권 2호 pp126~128

Mains, E. B. 1937. A new species of *Cordyceps* with notes concerning other species. Mycologia 29: 674~677

Mains, E. B. 1940. *Cordyceps* species from British Honduras. Mycologia 32: 16~21

Mains, E. B. 1957. Information concerning species of *Cordyceps* and *Ophionectria* in the Lloyd Herbarium. Lloydia 204(4): 210~227

Mains, E. B. 1958. North American entomogenous species of *Cordyceps*. Mycologia 50: 169~222

Sung, J. M., Kim, C. H., Yang K. J., Lee, H. K. and Kim, y. s. 1993. Studies on disribution and utilization of *Cordyceps militaris* and *C. nutans*. Kor. J. Myco. 21: 94~105

성재모, 1999. 현미를 이용한 동충하초 생산, 버섯영농 과 삶 제2권 pp96~100

(접수일:1999.3.31)
(수리일:1999.5.30)