

눈꽃동충하초균의 액체배양법 개선

남성희 · 정이연 · 조세연 · 한명세*
농촌진흥청 농업과학기술원 잠사곤충부

Improvement of Liquid Culture Methods of *Paecilomyces japonica*

Sung-Hee Nam, I-Yeon Jung, Sae-Yun Cho and Myung-Sae Han*

Department of Sericulture and Entomology, NIAST, RDA, Suwon 441-400, Korea

*College of agriculture, kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

ABSTRACT

This study was carried out to improve the liquid culture methods of *Paecilomyces japonica*. The results show that the size of granular mycelium is smaller when the shaking speed is increased. Especially, the granular mycelium is the smallest at the shaking speed of 150 rpm under the photoperiod of 12L-12D. Dry weight of mycelium was averagely 1.216 g in the Silkworm larva (SL) medium, and the weight was 2 times heavier than in the Potato dextrose (PD) medium. By adding 6 g of 6 mm beads in the SL medium, the dry weight is increased to 1.332 g. The optimal addition of silkworm larval powder to the culture medium for best harvest was 1.360±0.67 g in dry weight.

Key words : *Paecilomyces japonica*, Liquid medium, Mycelium

서 론

동충하초는 완전세대와 불완전세대의 두 가지 생활사를 가지는데, 완전세대는 유성생식기관으로서 자낭포자를 형성하며 불완전세대는 생육환경이 불량한 시기에 무성생식기관인 분생포자로 세대를 이어가는 특성을 지닌다(Hywell-Jones, 1995). 야생동충하초는 그 종류가 매우 다양하며 완전세대의 생활환은 종에 따라 일년에서 수년간 상당한 기간이 소요되므로(Evans *et al.*, 1982) 많은 학자들은 동충하초를 실내에서 단기간에 생산하여 그 생산물을 쉽게 이용하고자 인공재배 및 대량증식을 위한 연구를 수행해 왔다.

그 예로써 *Cordyceps militaris* 균을 이용하여 배양온도, 광주조건, 영양원 등의 최적조건을 구명하여 실내에서 자낭각을 형성하였으며(Basith & Madelin, 1968), 쌀, 옥수수 등 곡물을 배지원으로 하여 *C. militaris*의 인공자실체 형성에 성공하기도 했다(Pen, 1995). 또한 *Paecilomyces farinosus* 와 *P. canadensis*를 이용하여 인공자실체 형성을 시도하였으며(Aoki *et al.*, 1975), *P. farinosus* 액체종균을 파밤나방에 경구투여하여 감염을 유도한 예도 있다(Agudelo *et al.*, 1983). 그러나 국외의 많은 연구에도 불구하고 대량

생산에 대한 보고를 한 바 없다.

국내에서는 농업과학기술원 잠사곤충부에서 *P. japonica* 균을 5령 가잠에 접종한 후 적정환경을 설정한 결과 자실체 형성 및 대량생산에 성공하였으며, 가잠을 이용한 동충하초 대량생산기술을 농가에 보급하였다(조 등, 1999). 또한 동충하초 우량종균 증식과 생산성 증대를 위해 온도, 산도, 광 및 적정배지 등의 최적배양조건을 구명한 바 있다(남, 1999).

한편 현재 동충하초 재배기술 중 종균생산 과정은 액체 배양을 통해 종균을 증식시킨 후 현미배지로 이식하여 누에접종용 포자의 대량생산을 유도한다(류 등, 1999). 관행의 액체배양법은 조작이 간편하고 종균 생산기간이 단축되며 생산량을 증가시키는 장점이 있으며 산업적 용도로 많이 이용되고 있으나(김 등, 1999) 동충하초 종균 배양 시에는 균사체가 덩어리짐으로써 현미배지에 접종이 어렵고, 균사체 크기에 따라 접종량이 일정치 않으므로 재현성이 떨어지는 단점이 있다.

따라서 본 연구는 동충하초 균의 배양을 위한 적정 액체배지를 선별하고 최적 배양조건을 구명함으로써 기존 재배기술의 개선을 통해 농가 생산력을 증대시키고자 하였다.

재료 및 방법

1. 균주 및 배지

시험에 사용한 눈꽃동충하초(*Paecilomyces japonica*)균은 잠사곤충부 병해충연구실 보존주로서 PDA(Potato Dextrose Agar)배지 상에 순수배양된 균이다. 배지는 감자한천(Potato Dextrose broth, PD)배지를 대조로 하여 누에(Silkworm Larva, SL)배지, 탈지누에(Defated Silkworm Larva, DSL)배지, 번데기(Silkworm Pupa, SP)배지 및 탈지번데기(Defated Silkworm Pupa, DSP)배지 등 총 5종을 사용하였다.

2. 회전속도 및 광조건

PD(Potato Dextrose 24 g, 증류수 1 l)배지 조성물을 250 ml 삼각플라스크에 150 ml씩 분주하여 121°C에서 15분간 고압멸균하였다. 접종원으로는 PDA 배지상 균을 Cork bore를 이용하여 5 mm 크기로 잘라 PD 배지에 접종하였다. 광처리는 24시간 광 주사(24L), 12시간 광암 교차(12L/12D) 및 24시간 암(24D) 조건으로 하였으며, 배양기 내에 조사되는 광의 양은 조도계(Model : TES 1332, Digital lux meter)를 사용하여 500 lux로 조정하였다. 또한 회전속도는 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 rpm으로 하여 24°C에서 7일간 회전진탕 배양하여 배양균사체의 형태 및 크기를 측정하였다.

3. 적정 배지 및 비이드 선발

누에 및 번데기 각각 100 g을 분쇄기로 5분간 마쇄한 후 체를 이용하여 입자를 균일화하여, 얻어진 누에분말 및 번데기분말을 각각 SL, SP 배지원료로 하였다. SL, SP 분말 각 50 g을 Soxhlet 장치를 이용하여 99% 알콜로 48시간 추출하여(이, 1991) 얻어진 탈지분말을 DSL, DSP 배지원료로 하였다.

PD를 포함한 SL, SP, DSL, DSP 총 5종의 분말을 증류수에 0.24%를 용해시킨 다음 121°C에서 15분간 멸균하였으며, SL, SP, DSL, DSP 4종 배지 조성물은 다시 4겹의 가체에 1차 여과하여 불용해성 잔해물을 제거한 후 100 µm 크기의 체를 이용하여 2차 여과하였다.

250 ml 삼각플라스크에 5종 배지조성물을 각 150 ml씩 분주하여 크기 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mm의 비이드(Glastechnique Mfg.)를 6 g을 배지에 첨가하여 고압멸균한 후 PDA배지 균총을 5 mm 크기로 떼어 넣어 24°C, 150 rpm에서 7일간 진탕배양하였다. 배양종료된 액상균은 균사체 형성유무를 조사하고, 여과(Whatman No. 1, φ150 mm)한 후 증류수로 2회 세척하고 80°C에서 48시간 건조시켜 건중량을 측정하였으며, 여과지의 무게를 제외한 중량을 건중량으로 하여 SAS 프로그램을 이용한 Duncan의 다중검정에 의해 유의성을 검정하였다.

4. 최적배지 농도구명

증류수에 SL배지 분말을 각각 0.12, 0.24, 0.48, 0.96% 첨가하고 상기 배지조제법에 따라 여과 후 250 ml 삼각플라스크에 150 ml씩 분주한 후 고압멸균하였다. 액체배지에 PDA배지 균총을 5 mm 크기로 떼어 넣고 150 rpm에서 24°C, 7일간 배양하여 시험구별 배양 균사체 건중량을 상기법으로 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 회전속도 및 광조건에 따른 균사체 형성

진탕배양시 회전속도와 광은 배양 균사체의 형태 및 크기를 결정짓는 중요한 요인으로 작용한다. 즉 적정 회전수는 종균의 생산주기를 단축시키고 생산량을 증대시키며 적정 광을 주사하였을 때는 균사생장은 억제되고 포자 발생량이 증가된다. 따라서 배양액 내의 균사 엉킴현상이 감소되며 종균은 현탁배양되어 접종원으로써 효율을 극대화할 수 있다. 본 시험에서는 회전수 및 광의 교호작용이 균사체 형성에 미치는 영향을 조사하였다.

광처리 결과 12시간 광암 교차 처리(12L/12D)시 생산된 균사체는 직경 1~5 mm 크기로 다른 처리구에 비해 작게 형성되어 비교적 양호하였으며, 24시간 암처리(24D) 시에는 균사체 덩어리가 매우 크게 형성되었는데 특히 75 rpm 이하 교반 시에는 균사체가 직경 5 mm 크기 이상으로 배양되어 접종원으로 이용이 불가능하였다(Table 1).

한편 교반속도 영향 시험에서는 회전수가 낮을수록 균

Table 1. Effects of shaking speed and photoperiod for the growth of the mycelia

Photoperiod (light/dark)	Shaking speed (rpm)						
	50	75	100	125	150	175	200
24L	+++	+++	++	+	+	+	+
12L/12D	+++	++	+	+	+	+	+
24D	+++++	+++++	+++	+++	+	+	+

Paecilomyces japonica was cultured at 24°C in shaking incubator for 7 days.

The diameter of the granular mycelia : +++++, above 5 mm; +++, 3~5 mm; +, 1~3 mm.

사체 형태는 커지는 반면 회전수가 높을수록 크기가 작아지는 경향을 나타내었는데 특히 교반속도를 150 rpm 이상으로 설정한 경우는 광조건에 관계없이 배양된 균사체는 3 mm 이하로 배양되었다.

액체 배지내 배양 균사체 덩어리 형성은 영양상태가 양호하여 단균사가 신장되면서 다량증식되어 상호 엉키어 발생되는 현상으로, 이를 방지하기 위해 회전속도 및 광차리에 의해 균사생장을 억제하고 포자발생을 유도하였으나, 상기 두 작용만으로 균사체 형성을 완전히 억제할 수는 없었다.

2. 적정 비이드 및 배지선발

본 시험에서 SL, SP 배지는 누에 및 번데기 분말을 원재로 이용하였으나, DSL 및 DSP 배지는 SL, SP의 마쇄 분말로부터 지방을 제거 후 배지로 이용하였다. 이는 누에와 번데기는 체내 지방이 각각 10, 25% 이상 함유되어 있어(농촌진흥청, 00) 배지로 이용시 끈적이며 덩어리지는 현상으로 인해 분말화 및 여과 과정에 어려움이 따르므로 균생장에 영향을 미치지 않는 범위 내에서 지방을 제거하여 취급이 용이하도록 하였으며, 속슬렛 장치의 휘발용제로서 에테르 대신 인체에 해가 적은 에탄올을 사용하여 배지분말의 이용편의를 극대화하였다.

배지내 비이드는 1~10 mm 별로 첨가하여 7일간 배양 후 건중량을 측정한 결과 PD배지의 건중량이 평균 0.603 g인 것에 비해 SL배지 내에서 평균 1.216 g으로 2배 이상 성장량이 우수하였으며 다음으로 DSL, SP, DSP 배지 순으로 0.421, 0.274, 0.146 g이었다(Table 2).

한편 지방을 제거한 DSL, DSP는 분말화 및 배지조제 과정상 취급은 매우 용이하였으나 배양량이 매우 저조하였다. 일반적으로 속슬렛 처리시 일반성분에는 영향을 미치지 않는 것으로 알려져 있지만 본 시험에서는 균생장율이 낮은 것으로 보아 본 탈지과정은 지방 이외에 기타 성분에도 영향을 미친 것으로 추측된다.

비이드 첨가 시험에서는 비이드 크기가 5 mm 이하 일 경우는 균사체의 덩어리가 잔존하여 건중량 측정시 균사체로부터 비이드를 제거하는 과정이 용이하지 않았으며, 비이드 크기가 6 mm 이상 커질수록 균사덩어리는 작아지는 경향을 나타내었지만 9 mm 이상인 경우는 진탕배양시 비이드의 충격으로 플라스크가 깨질 우려와 회전시 진동에 의한 소음이 심해 이용이 불가능하였다(Table 3). 따라서 최적 비이드는 6 mm 크기를 첨가하였을 때 종균배양액이 고르게 현탁되면서 성장율은 1.322 g로 높게 나타났는데 Duncan의 다중검정 결과 유의성이 있는 것으로 나타났다.

Table 2. The dry weight (g) of the mycelia in various culture combination

Bead Size (mm) \ Media	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PD	0.612 ±0.016	0.542 ±0.017	0.610 ±0.048	0.570 ±0.049	0.543 ±0.058	0.516 ±0.031	0.642 ±0.057	0.658 ±0.122	0.695 ±0.043	0.641 ±0.038
SL	1.140 ±0.032	1.330 ±0.125	1.202 ±0.127	1.181 ±0.250	1.190 ±0.055	1.322 ±0.034	1.211 ±0.088	1.251 ±0.058	1.133 ±0.108	1.198 ±0.047
DSL	0.520 ±0.049	0.363 ±0.027	0.402 ±0.069	0.405 ±0.096	0.388 ±0.065	0.470 ±0.026	0.474 ±0.089	0.361 ±0.086	0.396 ±0.073	0.434 ±0.086
SP	0.327 ±0.028	0.306 ±0.050	0.263 ±0.047	0.351 ±0.031	0.229 ±0.014	0.241 ±0.012	0.295 ±0.074	0.195 ±0.057	0.267 ±0.014	0.266 ±0.021
DSP	0.062 ±0.021	0.181 ±0.074	0.224 ±0.054	0.095 ±0.085	0.043 ±0.010	0.166 ±0.083	0.160 ±0.087	0.186 ±0.058	0.211 ±0.012	0.128 ±0.094

Paecilomyces japonica was cultured at 24°C in shaking incubator(150 rpm) for 7 days.

The diameter of granular mycelia : +++++, above 5 mm; +++, 3~5 mm; +, 1~3 mm; -, none granule.

Table 3. Effect of addition of beads and media in the culture media for the growth of the mycelia

Bead size (mm) \ Media	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SL	++	++	+	+	+	-	-	-	-	-
DSL	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+	-
SP	+++	+++	-	-	-	-	-	+	+	-
DSP	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++	+	+	+	-

The diameter of the granular mycelia : +++++, above 5 mm; +++, 3~5 mm; +, 1~3 mm; -, none granule.

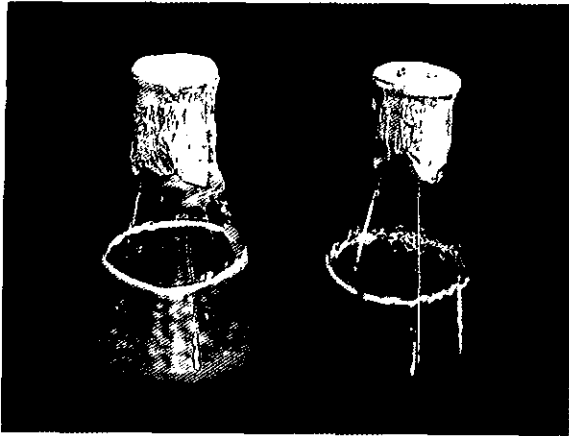


Fig. 1. The shape of mycelium by adding beads. *Paecilomyces japonica* was cultured at 24°C in shaking incubator (150 rpm) for 7 days. Left) PD media, None added beads, Right) SL media, 6 mm beads/6 g.

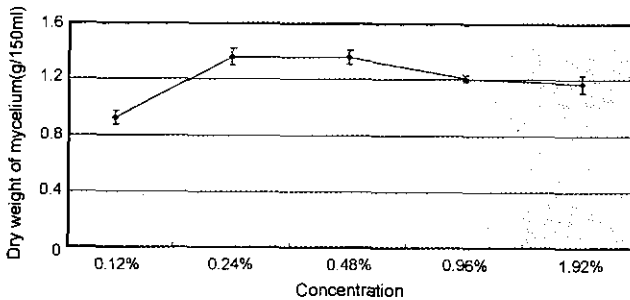


Fig. 2. Change of mycelia growth according to the concentration of the silkworm larval powder in the culture medium.

본 시험에서는 비이드를 무첨가한 관행의 PD배지 배양은 균사체 크기가 3~5 mm로 배양되었으나 선발된 SL배지 배양시에는 기존 배지보다 2배 이상 성장량이 우수할 뿐 아니라 비이드 6 mm, 6 g을 첨가시에는 진탕에 의한 충격도 발생하지 않으면서 건중량 측정시 균사체로부터 분리도 용이하고 균사체 엉킴이 전혀없는 현탁액으로 배양되어 액체종균 접종원으로 이용이 가장 적합할 것으로 판단된다(Fig. 1).

3. 누에배지 적정농도구명

상기 결과에 따라 SL배지를 동충하초 액체종균 배양을 위한 최적배지로 선발하여 최소량의 분말을 이용하여 최대성장 효과를 높이고자 본 시험을 수행하였다. 7일 배양 후 분말농도 0.12% 배지로부터 얻어진 건중량은 0.92±0.06 g이었으나 0.24% 첨가시에는 1.360±0.067 g로 성장량이 크게 증가하였다. 한편 농도를 0.48, 0.96, 1.92%로 상향 조정한 경우는 1.36±0.05 g, 1.21±0.025, 1.17±0.04%로 건중량이 점점 낮아지는 결과를 얻었다(Fig. 2).

따라서 본 시험에서는 SL배지 조제시 분말은 0.24% 첨가하는 것이 최적의 효과를 얻을 수 있으며, 적정농도 이상 첨가했을 때는 역효과를 나타내는 것으로 보아 다량의 성분을 첨가하는 것이 균생장의 최적조건은 아님을 알 수 있다.

적 요

동충하초 액체종균 배양법 개선을 위해 본 시험을 수행한 결과 액체배양시 회전속도가 높을수록 균사체 덩어리는 작아지며, 회전수 150 rpm 이상, 12L/12D 시간 처리시 균사체를 3 mm 이하로 작게할 수 있었다.

시험 배지 중 SL배지에서 건중량은 평균 1.216 g으로 대조에 비해 2배 이상 성장량이 우수하였으며, 비이드 6 mm, 6 g을 첨가하였을 때 건중량이 1.322 g로 가장 우수하였으며 엉킴현상 없이 균일하게 현탁배양되었다.

선발 SL배지 분말 농도는 0.24%일 때 1.360±0.67 g로 성장량이 가장 높았으며 적정농도 이상 첨가한 경우에는 건중량이 감소하는 경향을 나타내었다.

인용문헌

- Agudelo, F. and L. A. Falcon(1983) Mass Production, Infectivity, and Field Application Studies with the Entomogenous Fungus *Paecilomyces farinosus*. J. Invertebr. Pathol. **42** : 124-132.
- Aoki, J. Tanase, K. and T. Kusida(1975) The pathogenicity to the silkworm and taxonomic considerations on some muscardine fungi. J. Sericult. Sci. Japan. **44**(5) : 365-370.
- Basith, M and M. F. Madelin(1968) Studies on the production of perithecial stromata by *Cordyceps militaris* in artificial culture. Can. J. Bot. **46** : 473-480.
- 조세연 · 신국현 · 송성규 · 성재모(1999) 누에동충하초 생산 및 유용물질 개발. 농촌진흥청. pp. 162-166.
- Evans, H. C(1982) Entomogenous fungi in tropical forest ecosystem. an appraisal Ecological Entomology. **7** : 47-60.
- Hywell-Jones, N(1995) *Cordyceps sphecocephala* and a *Hymenostilbe* sp. infecting wasps and bee in Thailand. Mycol. Res. **99**(2) : 154-158.
- 김선희 · 이종숙 · 박경숙 · 이재성 · 이항우 · 박신(1999) 천연물을 이용한 담자균의 균사체 배양. Kor. J. Mycol. **27**(6) : 373-377.
- 이신경 · 신말식(1991) 탈지와 지방질 첨가에 따른 고구마 전분의 특성. 한국식품과학회지. **23** : 341-348.
- 남성희 · 정이연 · 지상덕 · 조세연(1999) 누꽃동충하초(*Paecilomyces japonica*)의 형태 및 배양 조건. Kor. J. Seric. Sci. **41**(1) : 36-41.
- Pen, X(1995) The cultivation of *Cordyceps militaris* fruitbody on artificial media and the determination of SDS activity. Acta Edulis Fungi. **2** : 25-28.
- 류강선 등(2000) 표준영농교본. 기능성 양잠. 농촌진흥청. pp. 130.