

한국에 자생하는 붉은자루동충하초(*Cordyceps pruinosa*)의 분포와 균사생장에 적합한 조건

신재철 · 부산 쓰레스타 · 이원호 · 박영진 · 김수영 · 정광열 · 김호경¹ · 김태웅² · 섬재모*

강원대학교 응용생물학과, ¹머쉬텍, ²강원대학교 생명과학부

Distribution and Favorable Conditions for Mycelial Growth of *Cordyceps pruinosa* in Korea

Jae-Chul Shin, Bhushan Shrestha, Won-Ho Lee, Young-Jin Park, Soo-Young Kim,
Gwang-Ryel Jeong, Ho-Kyung Kim¹, Tae-Woong Kim² and Jae-Mo Sung*

Department of Applied Biology and ²Division of Life Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea
¹Mushtech Co. Ltd., Chuncheon, Korea

(Received March 29, 2004)

ABSTRACT: *Cordyceps pruinosa* grows upon dead pupae of Lepidoptera and produces one or 3~4 club-shaped stromata per host. The stromata have distinct club-shaped head and long stalk. The length of stromata varies from 1~3 cm. Apical head consists of densely crowded semi-immersed perithecia, which are 360~400 × 180~200 μm in size. Asci are 150 μm in length and 2.8~3 μm in diameter. Ascospores, which are 124~141 μm in length, have thin thread-like structures in the middle with part-spores attached on both sides. Each ascospore does not separate into part-spores after dispersal, but each part-spore germinates and together develops a colony. The imperfect form produces phialides of 15~24 × 2~3 μm size, with spherical or spindle shaped conidia of 4~6 × 1.8~2.4 μm size. The anamorph was identified as *Mariannaea elegans* Samson. YMA and SDAY agar media with pH 7 was produced abundant mycelial growth with high density. Best mycelial growth was observed when dextrin was used as a carbon source. Lactose, saccharose and sucrose also produced high mycelial growth. Peptone, yeast extract and tryptone produced abundant mycelial growth, when used as nitrogen sources. Highest mycelial growth and density was observed when C/N ratio was 1 : 1 at the concentration of 12.5 g/l each. KH₂PO₄ was the best mineral source for mycelial growth. Highest mycelial dry wt. was produced in YM and SDAY broths. Optimum inoculum for 100 ml of liquid broth was 6 mycelial discs. Similarly, optimum liquid culture period was 7 days.

KEYWORDS: Carbon source, C/N ratio, *Cordyceps pruinosa*, Entomopathogenic, *Mariannaea elegans*, Nitrogen source

동충하초는 곤충의 애벌레, 번데기, 성충 단계에 침입하여 이를 기주로 자실체를 형성하는 곤충기생균(Entomopathogenic fungi)의 일종으로 전 세계에 약 1200여종이 분포하며, 그 중 동충하초는 100속 750여종이 분포하는 것으로 보고되었고(Kobayasi, 1941; Kobayasi and Shimizu, 1978; Mains, 1958; Petch, 1924, Samson, 1974) 한국에서도 70여종이 보고되었다(성, 1996; 이, 1996).

동충하초는 고대로부터 중국에서 불로장생의 비약으로 결핵, 천식, 황달의 치료 및 아편 중독의 해독제, 병후의 보양 및 강장제, 면역 기능 강화제로서 이용되어 왔으며, 최근 국내에서도 항균, 항암 효과가 있는 약리 성분의 발견으로 인하여 동충하초를 이용한 건강보조식품의 개발과 이를 이용한 유용 약품 개발 그리고 이를 위한 유전자원

의 수집 분류 동정에도 상당히 많은 연구가 이루어지고 있다(Cho *et al.*, 2003; Choi, 2003; 김, 2001; 성, 1996, 성 등, 1998; 이 1996; 진, 1998; 조, 2002; 최, 2000).

동충하초의 일종인 붉은자루동충하초(*Cordyceps pruinosa* Petch)는 최초로 Ceylon에서 채집되어(Petch, 1924), Berkeley and Broome(1873)에 의해 *C. militaris*라 처음으로 명명되었으나 그 후 Petch(1924)에 의해 기주가 고치나 번데기가 번데기동충하초와는 차이가 있다는 것을 현미경을 이용하여 자낭과, 자낭과 자낭포자에 대한 관찰을 통해 *C. militaris*와 달리 *C. pruinosa*로 개칭되어 현재까지 사용되고 있다.

붉은자루동충하초는 Kobayasi(1941)에 의해 *Cordyceps*의 분류 체계가 확립되면서부터 *Cordyceps pruinosa*는 Subgenus는 *Eucordyceps*, Section I인 *Racemella*, Sub-section은 *Pseudoimmersae*로 분류하였다. 풀썩이의 번데

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

기에서 나오는 동충하초로 다른 동충하초와는 달리 아주 작고 자루와 머리가 붉은 색이고 현미경을 통해 자낭각 및 자낭을 관찰하여 보면 자좌의 표면은 건조하고 자낭은 매우 가늘며 자낭포자 사이에 긴 가느다란 끈으로 연결되어 있는 것이 특징이다(Kobayasi, 1982; Sung *et al.*, 1997; 성, 1996).

그러나 한국에서는 이에 대한 연구가 아직은 미흡한 상태이므로 안정적인 인공 대량 재배의 기초자료를 제공하기 위하여 국내의 붉은자루동충하초의 분포 상황을 파악하고 채집된 동충하초의 균주를 분리하여 배양적 특성을 구명하였다.

재료 및 방법

붉은자루동충하초의 국내분포

붉은자루동충하초의 국내 분포조사는 강원대학교 동충하초은행 EFCC(Entomopathogenic Fungi Culture Collection)의 최근 2년간의 자료를 토대로 작성하였다. 조사지는 마이산, 화엄사, 범주사 박달재에서 조사하고 채집하였다. 동충하초의 채집은 2001년 6월부터 2002년 10월까지 실시하였으며, 채집시에는 채집장소, 채집년월일, 채집장소의 임상분포, 기주곤충의 종류와 상태 등을 기술하였다. 채집된 동충하초의 균 분리는 분생포자를 떼어내어 PDA 배지에서 발아시키어 분리하였다.

Table 1. List of *Cordyceps pruinosa* isolates used in this study

Isolate	Date	Locality	Host
C7357	7/27/01	Mt. Mai	Pupae
C7496	7/28/01	Mt. Mai	Pupae
C7925	8/03/01	Mt. Jiri	Pupae
C8016	8/11/01	Mt. Sogri	Pupae
C9080	8/05/02	Mt. Chundeung	Pupae

배양적 특성조사

공시 균주는 강원대학교 동충하초은행 EFCC에서 보존하고 있는 균주를 사용하였으며 보관중인 공시균주를 PDA(potato dextrose agar; Difco Co.) 평판배지에 접종한 후 25°C의 incubator에서 7일간 배양한 후 접종원으로 C7357 균주를 포함하여 5개 균주를 이용하였다(Table 1). 적정배지를 선발하기 위하여 PDA를 비롯한 18종의 배지를 이용하였다(Table 2). 각각의 배지는 121°C(1.2 psi). 20 분간 멸균한 후 87 mm Petri-dish에 분주하여 균 배양에 사용하였으며 공시균주의 균사선단 부분을 5 mm cork borer로 균총을 떼어내어 적정배지 선발을 위한 18종의 배지에 접종하였다. 접종된 배지는 25°C의 배양실에서 7일간 배양한 후 균사의 직경과 균사배양 밀도를 측정하였다. 배양 적정 온도를 선발하기 위하여 PDA를 이용하여 5°C에서 35°C까지 공시균의 균사생장을 조사하였으며 배양 적정 pH 조사는 0.1 N HCl과 0.1 N NaOH로 pH 4.0

Table 2. Composition of culture media used for this experiment

Nutritional reagents	Medium (g/l)																		
	PDA	SDAY	YMA	HA	MEA	MYA	SA	MA	ES	MPDA	MCM	MMM	MMN	YPG	YPD	YTM	YM	OMA	
Potato	200																		
Dextrose	20	20	10	20	20	4	20			10	20	20	10		20				
Glucose														20				10	
Malt extract			3		20	10		20					3						
Sucrose									20										
Oatmeal ground																			30
Peptone		5	5		1		10			5	2			10	20			5	
Yeast extract		5	3			4					2			5	10	5		3	
Tryptone																10			
di-asparagine												2							
MgSO ₄ · 7H ₂ O									0.5	0.5	0.5	0.15							
NaCl													0.025		10				
CaCl ₂ · H ₂ O													0.067						
FeCl ₃ (1%)													1.2 ml						
KH ₂ PO ₄										1	0.46	0.46	0.5						
K ₂ HPO ₄											1	1							
(NH ₄) ₂ HPO ₄													0.25						
Hyponex				3															
Ebiose				5															5
Thiamine HCl												120 µg	0.1 mg						
Agar	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

PDA, Potato dextrose agar; SDAY, Sabourand's dextrose agar yeast extract; YMA, Yeast extract malt extract agar; HA, Hamada agar; MEA, Malt extract agar; MYA, Malt extract yeast agar; SA, Sabourand's agar; MA, Maltose agar; ES, Ebiose medium; MPDA, Martin's peptone dextrose medium; MCM, Mushroom complete medium; MMM, Mushroom minimal medium; MMN, Modified melin-norkrance medium; YPG, Yeast extract peptone glucose medium; YTM, Yeast tryptone medium; YM, yeast extract glucose medium; OMA, Oatmeal medium.

부터 pH 10.0까지 조절된 MPDA 배지를 87 mm Petri-dish에 분주하여 접종한 배지는 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 배양실에서 14일간 배양한 후 균사의 생장과 밀도, 색을 조사하였다 (Table 2).

균사생장을 위한 생리적 특성조사

균사생장에 적합한 탄소원은 합성배지인 MPDA를 기본배지로 하여 Xylose 등 이당류 5종, Maltose를 포함한 이당류 4종, Starch를 포함한 다당류 2종 등 총 11종의 탄소원을 이용하여 실시하였다. 배지를 조성할 때 탄소원의 농도는 2%로 고정하였으며 agar만을 첨가하여 조제하였다. 액체배지는 탄소원만으로 배지를 조제하여 250 ml Erlenmeyer flask에 100 ml씩 분주하여 silicon plug로 flask의 입구를 막아 조제하였다. 질소원은 odium Nitrate를 포함한 무기태 질소원 4종, Peptone를 포함한 유기태 질소원 4종류, Asparagine을 포함한 아미노산류 3종 등 총 11종의 질소원 농도를 2%로 고정하여 배지를 조제하였다. 액체배지는 질소원만으로 배지를 조제하여 250 ml Erlenmeyer flask에 100 ml씩 분주하여 silicon plug로 flask의 입구를 막아 조제하였다. 탄소원과 질소원의 비율을 알아보기 위하여 선발된 탄소원과 질소원의 비율을 20:1, 10:1, 5:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:20으로 배지를 조제하였다. 균사생장에 가장 적합한 무기염류를 선발하기 위하여 CaCO_3 을 포함한 10가지의 무기염류를 이용하여 0.25%, 0.5%, 0.75%, 1.0%의 농도로 배지를 조제하였다. C/N비 적정 질량 조사 탄소원과 질소원의 적정질량을 알아보기 위해 C/N비 조사에서 가장 좋게 나온 비율을 이용하여 탄소원과 질소원의 양을 1g~20g까지 9단계로 나누어서 배지 조제하였다. 조제된 배지는 121°C , 1.2 psi에서 20분간 고압 살균한 후 40°C 전후로 배지를 식힌 다음 무균상에서 petri-dish에 15~20 ml씩 분주한 후 PDA 배지에서 14일간 배양된 접종원의 선단을 직경 5 mm의 cork borer로 절단한 후 조제된 배지의 중앙에 접종하였다. 접종된 배지는 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 배양실에서 약 14일간 배양하면서 균사의 직경 및 밀도, 색을 조사하였다. 액체배양에서는 선단부분을 직경 5 mm cork borer로 절단한 후 각각의 flask에 5개씩의 절편을 접종하였다. 접종 후 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 배양실에서 7일간 정지 배양한 후 배양된 균사체는 filter paper(Whatman No. 2)에 거른 후 55°C ~ 60°C 인 dry oven에서 24시간 건조 후 건조 균체량을 조사하였다.

액체배양을 위한 배지, 접종량과 배양기간 구명

액체 배지 선발을 통한 대량 배양을 위하여 PDA(Potato dextrose agar)를 포함한 8가지의 배지에서 Agar를 제외한 배지를 조제하였다. 또 적당한 접종량과 적정배양기간을 알기 위하여 선발된 배지에 250 ml Erlenmeyer flask에 100 ml씩 분주하여 silicon plug로 flask의 입구를 막은 후

호일을 씌워 121°C , 1.2 psi에서 20분간 고압 살균 후 하루 간 상온에서 배지를 식혔다. 조제한 배지에 PDA에서 14일간 배양된 접종원의 균사 선단부분을 직경 5 mm cork borer로 절단한 후 각각의 flask에 5개씩의 절편을 접종하였다. 접종 후 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 배양실에서 7일간 정지 배양하였으나 배양기간 선발은 1~10일 간격으로 조사하였다. 배양된 균사체는 filter paper(Whatman No. 2)에 거른 후 55°C ~ 60°C 인 dry oven에서 24시간 건조 후 건조 균체량을 조사하였다.

결 과

붉은자루동충하초의 국내분포

붉은자루동충하초의 수집은 자연 상태에서 본 균이 발생하는 시기인 주로 7~9월 사이에 하였으며 발생장소는 계곡을 끼고 양옆으로 발달한 습지를 이루는 침엽수림보다는 활엽수림이 발달한 지대로 공중습도가 높고 외부의 교란이 없으며 잡초가 비교적 적은 지역에서 주로 채집되었다. 채집당시의 형태는 번데기는 토양속에 있으며 자실체만이 외부로 나타난 형태를 갖추고 있었다. 자실체의 형태는 1개~여러 개의 자좌를 형성하며 자좌는 자루와 곤봉형의 머리로 되어 있다. 충청북도 청등산에서 가장 많이 채집되었으며 마이산, 지리산, 소백산을 비롯하여 17개의 산에서 채집되었으며 외국에서는 네팔에서 채집되었다. 채집시기로는 7월, 8월 9월에 채집이 많이 되었다 (Table 3, 4).

동충하초는 원전세대의 유성생식 기관으로서 자낭포자를 형성할 뿐만 아니라 생활환의 일부로서 무성생식 기관

Table 3. Geographic distribution of *Cordyceps pruinosa* isolated from 1990 to 2003

Site	No. of stroma collected
Mt Chungdeung	135
Mt. Mai	62
Mt. Jiri	25
Mt. Sobaeg	17
Mt. Gujcol	7
Mt. Chilsung	6
Guryungryung	5
Mt. Chiag	4
Mt. Yongmoon	4
Mt. Chilgab	4
Mt. Halla	4
Mt. Chungryung	4
Mt. Samag	2
Mt. Sogri	2
Mt. Daeryung	1
Mt Odae	1
Mt. Scolag	1
Nephal	66
Total	350

Table 4. Seasonal distribution of *Cordyceps pruinosa* isolated from 1990 to 2003

Year	Month				Total
	6	7	8	9	
1990			1		1
1991		1			1
1992		1		1	2
1993	1	1	2	1	5
1994					
1995			1	2	3
1996					
1997					
1998		1	64	2	67
1999				86	86
2000		29	17	3	49
2001		88	4	4	96
2002		3	14	2	19
2003		2	13	6	21
Total	1	126	116	107	350

인 분생포자를 형성하는 불완전세대를 갖게 되는데 붉은 자루동충하초는 자연 상태에서는 불완전세대는 나타나지 않고 자낭세대인 붉은자루동충하초만을 채집할 수 있다.

붉은자루동충하초의 형태적 특징

붉은자루동충하초는 썩어나방의 번데기를 기주로 하며 1~3개의 자좌를 형성한다, 자좌는 머리와 자루로 나누어 지고, 붉은색을 나타내며 크기는 1~3 cm이며 머리는 긴 곤봉형이다. 자낭각의 크기는 360~400×180~200 μm이며, 자낭은 150 μm의 크기를 가지며, 둘레는 2.8~3.5 μm이다. 자낭포자는 포자가 실모양의 끈으로 연결된 특이한 포자를 형성하며, 크기는 124~141 μm의 크기를 가진다 (Fig. 1a, b, c, d). 불완전세대는 *Mariannaea*속으로 분생자경의 4개~5개의 파일라이드를 가졌고 크기가 15~24 × 2~3 μm이며 분생포자가 둥근 방추형이며 크기가 4~6 × 1.8~2.4인 것으로 보아 *Mariannaea elegans*로 동정하였다 (Fig. 1e, f).

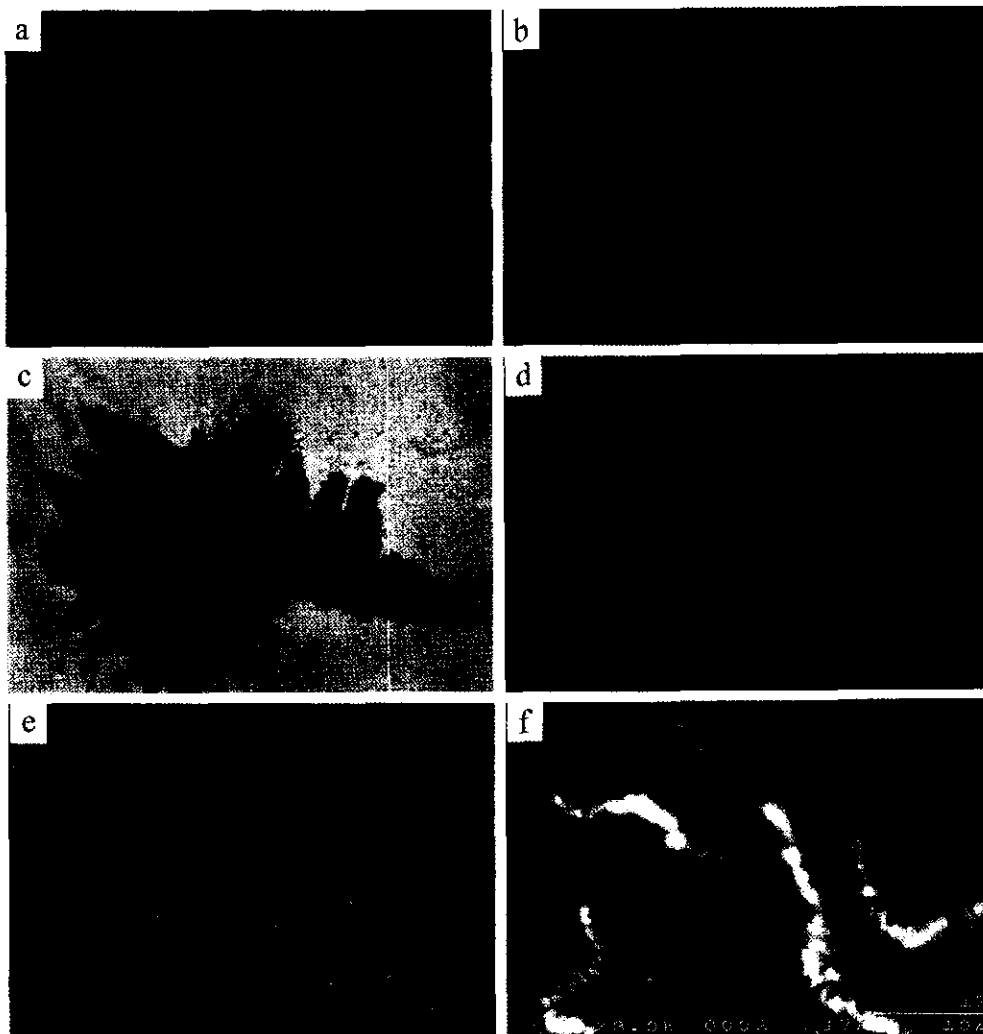


Fig. 1. Microscopic characteristics of the *Cordyceps pruinosa*. a. Natural fruit body, b. stroma, c. perithecia (×100), d. ascospore (×1000). e. conidial stage (×1000), f. conidial stage of SEM.

Table 5. Effect of cultural medium on mycelium growth of *Cordyceps pruinosa* C7357, 7496, 7925 and 8016

Isolate	Colony diameter (mm/14 days) and density ^a																	
	PDA	SDAY	YMA	HA	MEA	MYA	SA	MA	ES	MPDA	MCM	MMM	MMN	YPG	YPD	YTM	YM	OMA
C-7357	3.6	3.8	3.9	3.7	3.1	3.5	2.9	3.7	3.5	3.8	3.0	3.4	2.9	3.5	3.5	3.0	3.9	4.3
	++	+++	+++	++	++	++	+	++	+	++	++	+	+	++	++	++	++	+
C-7496	3.4	3.4	3.6	3.3	3.6	3.1	2.3	2.4	3.4	3.2	3.4	3.3	3.6	2.7	2.9	2.7	3.3	4.8
	++	++	+++	++	++	++	++	++	+	++	++	+	+	+++	+++	++	++	+
C-7925	2.1	3.5	3.8	2.2	2.4	2.3	2.4	2.3	2.4	2.1	2.7	3.4	2.4	2.3	2.4	3.0	3.6	4.1
	++	++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+++	++	++	++	++
C-8016	3.2	3.1	3.4	2.3	2.7	1.7	1.6	2.0	3.0	1.9	2.1	3.1	1.6	2.2	2.3	2.1	2.4	4.1
	++	+++	+++	++	++	++	+	++	++	++	++	+	+	+++	++	++	++	++

^a+: thin, ++: moderate, +++: compact.

균사생장에 적절한 배지 선발

붉은자루동충하초가 적합한 균사생장은 OMA, YMA, SDAY 배지 순으로 좋게 나타났으며, SA 배지에서 가장 균사의 생장이 저조하게 나타났다. 균사의 밀도는 YMA, SDAY, YPG 배지 순으로 좋게 나타났으며, MMM, MMN 배지에서 균사의 밀도가 낮게 나타났다(Table 5, Fig. 2). 온도는 25°C에서 균사 성장 및 밀도가 가장 양호하였으며, 5°C에서는 균사 생장이 거의 이루어지지 않는 것을 확인할 수 있었다. 또한 30°C를 넘었을 경우에는 균

사의 생장이 더딘 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 산도는 pH 7에서 건조 균체량을 많이 얻을 수 있었으며, pH 8 이상으로 갈수록 건조 균체량이 적어짐을 알 수 있었다 (Fig. 4).

균사생장에 적합한 탄소원, 질소원과 무기염류의 선발

탄소원: 붉은자루동충하초균의 균사 생장에 가장 적합한 탄소원은 Dextrin이며 그 다음은 Saccharose와 Starch로 비교적 좋은 성장과 밀도를 나타내었다. 반면 Xylose에서는 다른 탄소원에 비해 좋지 않은 결과가 나타났다. 액체 배지의 경우 고체배지와 동일하게 Dextrin에서 가장 높은 건조 균체량을 얻을 수 있었으며, 다른 탄소원에서 는 0.01~0.05 g의 건조 균체량을 얻을 수 있었다(Table 6,

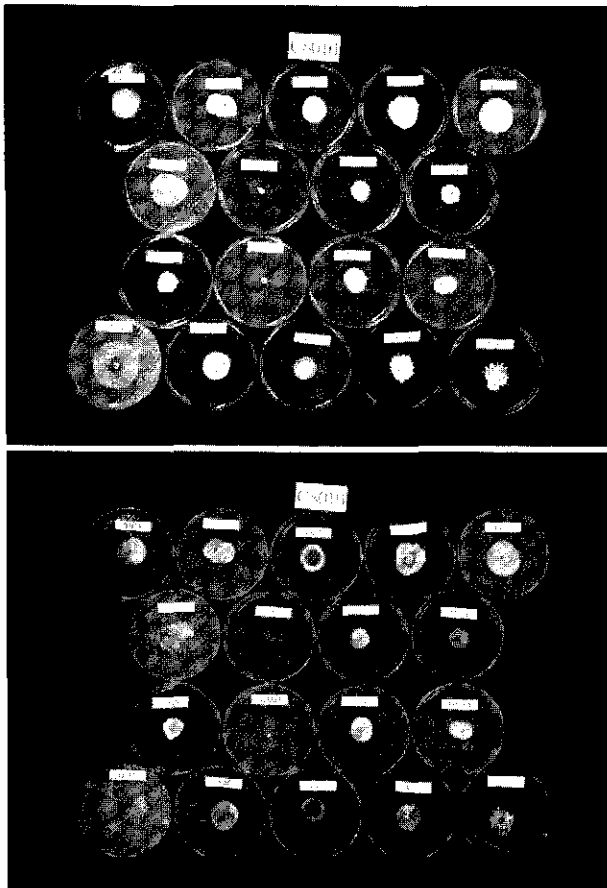


Fig. 2. Effect of cultural media on mycelial growth of *Cordyceps pruinosa* C-8016.

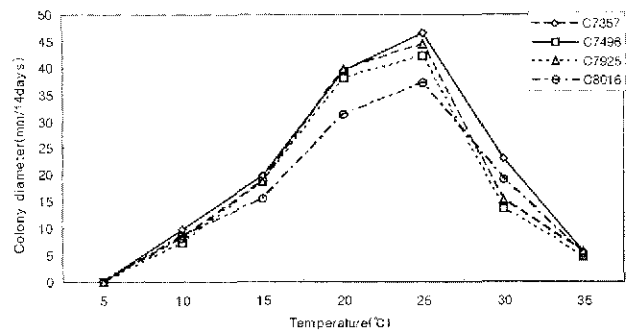


Fig. 3. The effect of temperature on mycelial growth of *Cordyceps pruinosa*.

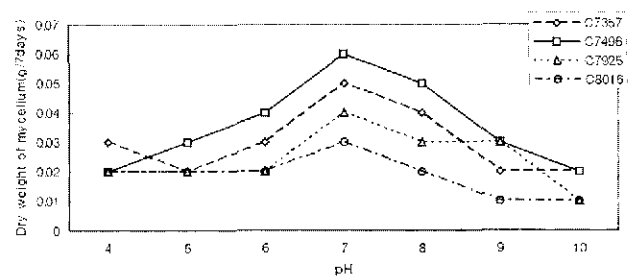


Fig. 4. Effect of pH range on mycelial growth of *Cordyceps pruinosa*.

Table 6. Effect of carbon source on mycelial growth of *Cordyceps pruinosa* C7357, 7496, 7925 and 8016

	Colony diameter (mm/14 days) and density ^b											
	N ^a	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	C-11
C7357	33.1	34.2	16.2	44.2	47.2	39.2	48.2	46.3	43.2	26.3	46.3	46.2
	+	+	++	+	+	+	++	+	+	+	+	+
C7496	39.2	39.6	13.5	46.2	47.3	40.5	47.9	44.2	46.2	25.3	42.6	41.2
	+	+	++	+	+	+	++	+	+	+	+	+
C7925	36.2	44.5	21.6	47.5	44.2	37.6	48.5	45.2	43.6	42.4	47.2	42.5
	+	+	++	+	+	+	++	+	+	+	+	+
C8016	33.5	39.6	16.5	40.5	44.8	32.6	47.6	41.2	41.3	36.2	46.1	45.9
	+	+	++	+	+	+	++	+	+	+	+	+

^aN: None, C-1: Maltose, C-2: Xylose, C-3: Starch, C-4: Glucose, C-5: Arabinose, C-6: Dextrin, C-7: Lactose, C-8: Mannose, C-9: Fructose, C-10: Saccharose, C-11: Sucrose.

^b+: thin, ++: moderate, +++: compact.

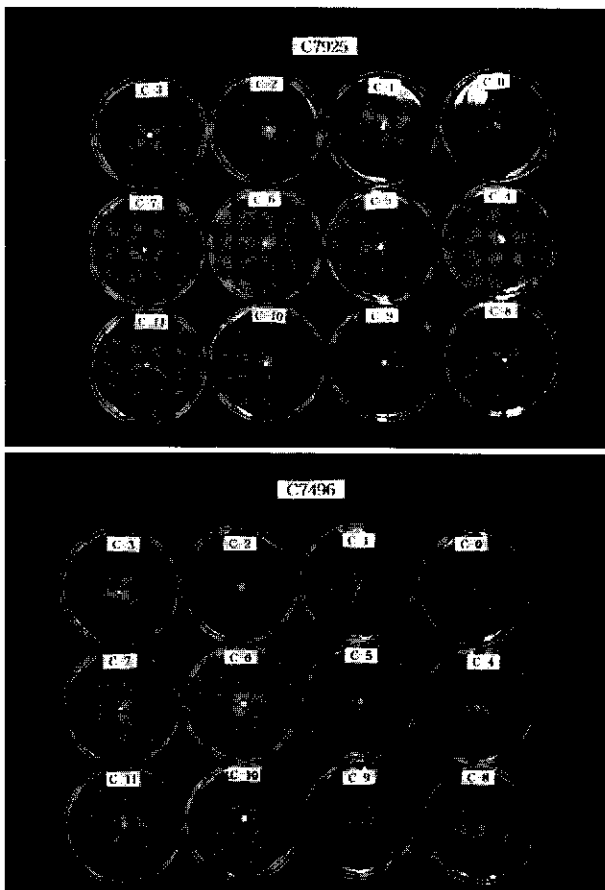


Fig. 5. Effect of carbon source on mycelial growth of *Cordyceps pruinosa*.

Fig. 5~6).

질소원: 붉은자루동충하초의 균사 성장에 적합한 질소원은 yeast extract에서 가장 좋은 균사생장을 볼 수 있었으며, peptone과 tryptone에서도 좋은 균사 생장을 볼 수 있었다 하지만 urea에서는 모든 균주에서 균사생장을 볼 수 없었으며, potassium nitrate에서는 C7496에서만 균사생장이 이루어지는 것을 확인할 수 있었다. 액체 배지의 경우 고체 배지와 동일하게 yeast extract에서 가장 많

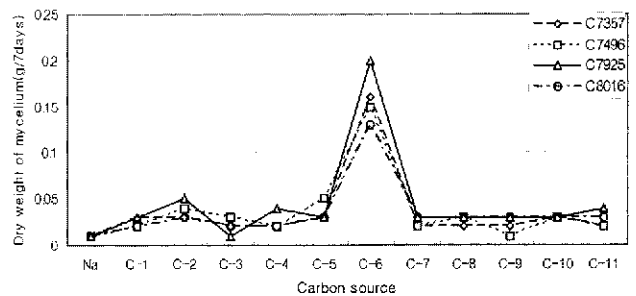


Fig. 6. Effect of carbon source on mycelial growth of *Cordyceps pruinosa* in liquid culture.

은 건조 균체량을 얻을 수 있었으며, peptone과 tryptone에서도 좋은 건조 균체량을 얻을 수 있었다. 고체배지와 마찬가지로 urea에서는 건조 균체량을 얻을 수 없었다 (Table 7, Fig. 7~8).

C/N비: 붉은자루동충하초에 적합한 탄소원과 질소원을 선별한 후 적합한 비율을 조사하기 위하여 탄소원과 질소원의 비율을 1 : 20, 1 : 10, 1 : 5, 1 : 2, 1 : 1, 2 : 1, 5 : 1, 10 : 1, 20 : 1로 조절하여 실험을 실시한 결과 균사생장과 밀도 면에서 다른 비율에 비해 1:1에서 양호하게 나타났으며, 1 : 20에서는 균사의 성장보다는 밀도가 높게 나타났고, 20 : 1에서는 반대로 밀도보다는 균사의 생장이 좋게 나타났다(Table 8, Fig. 9).

무기염류: 붉은자루동충하초에 적합한 무기 염류를 조사하기 위하여 CaCO₃을 포함한 10가지의 무기염류를 이용하여 0.25%, 0.5%, 0.75%, 1.0%의 4가지 조건하에서 실험을 실시한 결과 모든 조건하에서 KH₂PO₄에서 균사의 생장이 좋게 나타났으며, 다른 무기염류에 비해 4균주 모두 K₃PO₄에서는 저조한 균사생장을 확인할 수 있었다. 이외에 다른 무기염류는 비슷한 균사 생장을 나타냈다(Fig. 10).

합성배지: 생리실험에서 선별된 영양원을 확인하기 위하여 Dextrin 12.5 g과 Yeast extract 12.5 g, KH₂PO₄ 0.75%로 합성배지를 제조하였다. 제조한 배지와 YMA 배지에 동시에 접종원을 접종하여 14일간 24±1°C인 항온

Table 7. Effect of nitrogen source on mycelial growth of *Cordyceps pruinosa* C7357, 7496, 7925 and 8016

Isolate	Colony diameter (mm/14 days) and density ^b											
	N ^a	N-1	N-2	N-3	N-4	N-5	N-6	N-7	N-8	N-9	N-10	N-11
C7357	29.6	30.2	35.6	27.5	20.3	22.1	13.6	.	35.8	29.6	.	30.5
	+	++	++	++	+	+	++	.	+	+	.	+
C7496	30.3	31.5	37.6	43.5	37.1	26.3	26.5	.	37.2	39.6	0.8	36.2
	+	++	++	++	+	+	+	.	+	+	+	+
C7925	31.2	35.6	40.2	33.2	24.1	34.2	23.5	.	26.5	36.4	.	30.5
	+	++	++	++	+	+	+	.	+	+	.	+
C8016	32.1	34.2	35.8	36.2	24.5	21.0	25.3	.	35.6	40.2	.	25.8
	+	++	++	++	+	+	++	.	+	+	.	+

^aN: None, N-1: Peptone, N-2: Yeast extract, N-3: Tryptone, N-4: Asparagine, N-5: Glycine, N-6: Sodium Nitrate, N-7: Urea, N-8: Ammonium Sulfate, N-9: Ammonium Sulfate, N-10: Potassium Nitrate, N-11: Ammonium Phosphate.

^b+: thin, ++: moderate, +++: compact.

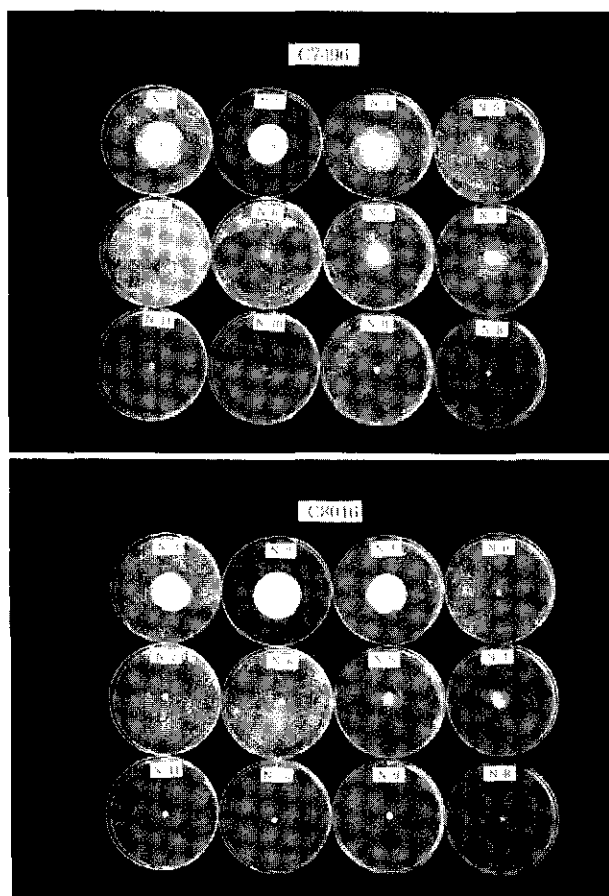


Fig. 7. Effect of nitrogen source on mycelial growth of *Cordyceps pruinosa*.

기에서 배양하였다. 접종원은 C7354를 이용하였으며, 1차, 2차 계대까지 실시하여 균사의 성장과 밀도, 색을 확인하였다. 실험을 통하여 YMA 배지보다 합성배지에서 균사 활력이 감소되지 않는 것을 확인할 수 있었다. 원균을 배지에 접종하였을 때 균사의 성장, 밀도, 색에는 많은 차이를 나타내지는 않았으며, 1차 계대할 때는 균사의 성장에는 합성배지가 YMA에 비해 우수하였으며, 밀도와 색에서는 차이가 나타나지 않았다. 또한, 2차 계대

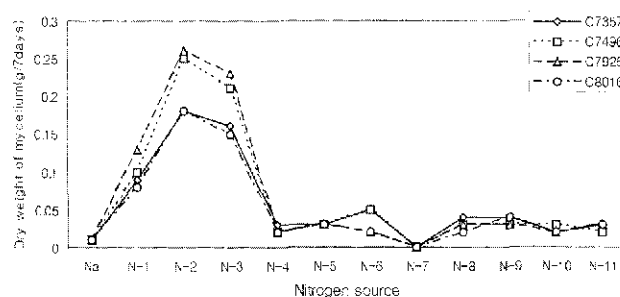


Fig. 8. Effect of nitrogen source on mycelial growth of *Cordyceps pruinosa* in liquid culture.

Table 8. Effect of C/N ratio on mycelial growth of *Cordyceps pruinosa* C7357

	Colony diameter (mm/14 days) and density ^a									
	1:20	1:10	1:5	1:2	1:1	2:1	5:1	10:1	20:1	1
C7357	21.3	30.1	28.5	31.3	32.4	22.7	18.7	15.7	23.3	+++
	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++
C7496	23.1	23.3	23.3	32.1	35.2	33.6	22.7	27.6	30.2	+++
	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++
C7925	24.3	30.7	32.7	35.3	36.2	33.0	32.1	30.7	33.3	+++
	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++
C8016	25.3	26.5	29.7	28.3	29.9	28.4	23.0	20.1	28.3	+++
	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++

^a+: thin, ++: moderate, +++: compact.

할 때는 균사의 성장과 밀도는 비슷한 수준을 나타냈으나, 색에서 합성배지는 주황색에 가까운 색으로 YMA는 완전히 백색은 아니지만 백색에 가까운 색이 나타났다 (Table 9).

대량 배양을 위한 액체 배양

붉은자루동충하초를 배양하는데 가장 적합한 액체 배지를 조사하기 위하여 PDA를 포함한 9가지의 배지를 이용하여 실험을 실시한 결과 YMA에서 다른 배지에 비해 많은 건조 균체량을 얻을 수 있었으며, SDAY에서도 좋은

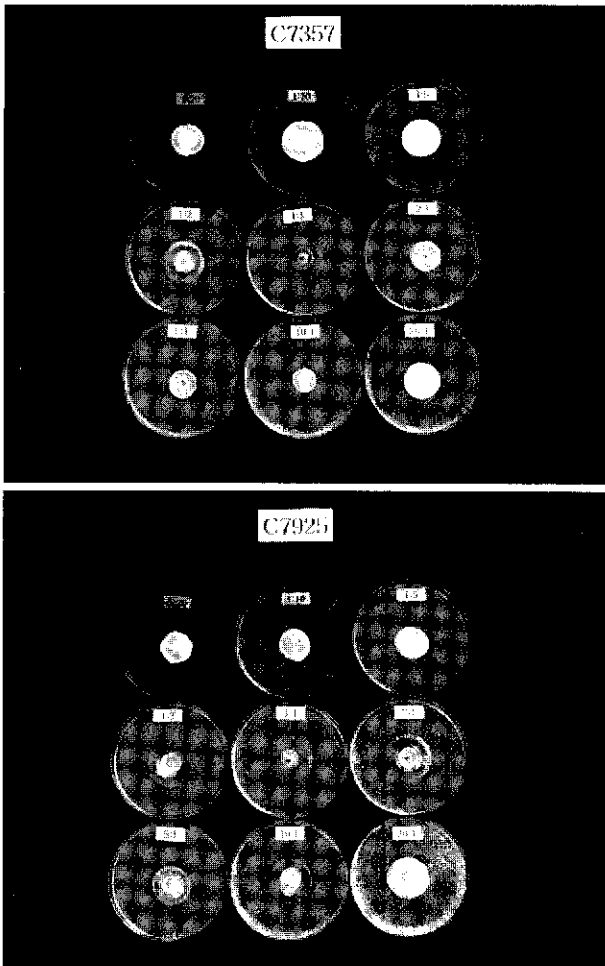
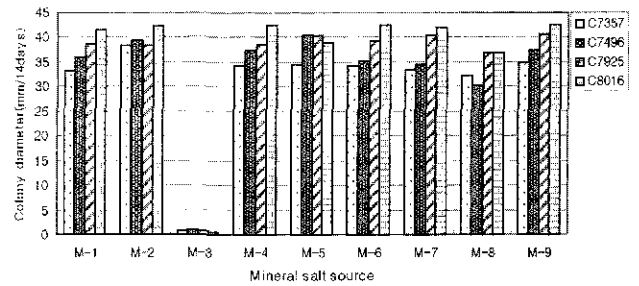


Fig. 9. Effect of C/N ratio on mycelial growth of *Cordyceps pruinosa*.

건조 균체량을 얻을 수 있었다. 하지만, MCM에서는 다른 배지에 비해 적은 건조 균체량을 얻을 수 있었다(Fig. 11). 붉은자루동충하초의 배양시 적정 접종량을 조사하기 위하여 절편을 1~8개까지 1개 간격으로 접종을 실시한 결과 절편을 3개까지 접종하였을 때 건조 균체량에 변화가 나타나지 않았으나, 6개의 절편을 접종하였을 때 많은



M-1: CaCO₃, M-2: KH₂PO₄, M-3: K₂PO₄, M-4: NaCl, M-5: MnSO₄, M-6: CuSO₄ · 5H₂O, M-7: MgSO₄, M-8: FeSO₄ · 7H₂O, M-9: ZnSO₄ · 7H₂O, M-10: MgCl₂ · 6H₂O

Fig. 10. Effect of mineral salts (0.25%) on mycelial growth of *Cordyceps pruinosa*.

건조 균체량을 얻을 수 있었다. 또한 7개와 8개를 접종하였을 때에 6개에 비해 적은 건조 균체량을 얻을 수 있었다(Fig. 12). 붉은자루동충하초의 배양 일수를 조사하기 위하여 1~10일까지 배양을 실시한 결과 4일까지는 변화가 없었으며, 7일을 배양하였을시에 가장 많은 건조 균체량을 얻을 수 있었다. 7일 배양을 정점으로 건조 균체량이 적어지는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 13).

고 찰

붉은자루동충하초는 풀췌기번데기에서 형성되는 동충하초로 분류학적으로 자낭균문(Ascomycota), 자낭각균강(Pyrenomycetes), 육좌균목(Hypocreales), 맥각균과(Clavicipitaceae), 동충하초속(*Cordyceps*)에 속한다. 동충하초속 균에 이병되어 땅속에서 죽은 원형의 번데기를 기주로 하여 1개 또는 3~4개의 곤봉형 자좌를 형성하는 동충하초로 자좌의 크기가 1~3 cm로 아주 작고 자좌부분이 붉은색을 가지고 있기 때문에 붉은자루동충하초라고 불리어졌다(성, 1996; Kobayasi, 1941; Petch, 1924). 이 동충하초는 근래의 연구결과에 의하면 알코올 해독작용과 항암과 항당뇨 효과가 있는 것으로 알려졌으나 본 속균에 대하여서는 아직 연구가 초기 단계에 머무르고 있다.

붉은자루동충하초를 제일 처음 Petch(1924)가 명명한

Table 9. Effect of composed medium on mycelial growth of *Cordyceps pruinosa* C7357

		C7357	
		YMA	Synthetic media
Original isolate inoculation	Colony diameter (mm/14 days)	32.6	34.1
	Density ^a	+++	+++
	Color	orange red	orange red
First subculture inoculation	Colony diameter (mm/14 days)	29.5	33.7
	Density	+++	+++
	Color	reddish orange	reddish orange
Second subculture inoculation	Colony diameter (mm/14 days)	30.1	34.1
	Density	+++	+++
	Color	yellow white	dark orange

^a+: thin, ++: moderate, +++: compact.

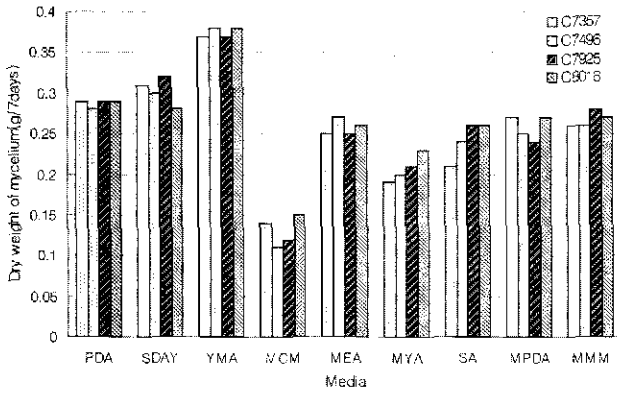


Fig. 11. Mycelial growth of *Cordyceps pruinosa* on different liquid culture media.

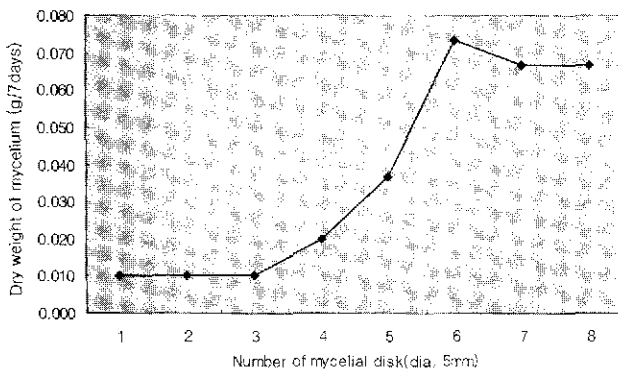


Fig. 12. Effect on number of mycelium disk on mycelial growth *Cordyceps pruinosa*.

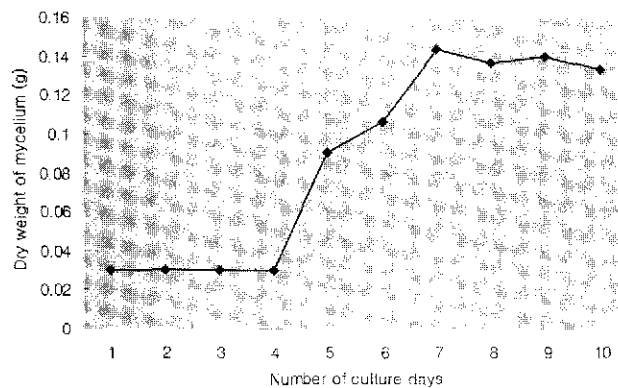


Fig. 13. Effect of culture period on mycelial growth of *Cordyceps pruinosa*.

이후 일본에서도 Kobayasi(1941)와 연구자들에 의하여 보고되었다(Shimizu, 1997; Kobayasi and Shimizu, 1983). 그 후에 *Cordyceps pruinosa*의 불완전세대가 다른 *Cordyceps*속과는 차이가 있어 미세 구조적으로 관찰하여 Samson(1974)에 의하여 동정된 것과 차이가 없어 *Mariannaea elegans*로 동정하였다. 이 동충하초는 매우 작고 풀썩기의 번데기에서만 형성되는 기주의 특이성이

있으므로 채집하기가 어려우나 7월, 8월 9월 3개월이 걸쳐 발생하며 지역적으로도 널리 분포하는 종이다(성, 1996). 본 조사에서는 충청북도 청등산에서 가장 많이 채집되었으며 마이산, 지리산, 소백산을 비롯하여 17개의 산에서 채집되었으며 외국에서는 네팔에서 채집되었다. 동충하초는 완전세대의 유성생식 기관으로서 자낭포자를 형성할 뿐만 아니라 생활환의 일부로서 무성생식 기관인 분생포자를 형성하는 불완전세대인 *Mariannaea*를 갖게 되는데 붉은자루동충하초는 자연 상태에서 불완전세대는 나타나지 않고 자낭세대인 붉은자루동충하초만을 채집할 수 있다.

붉은자루동충하초는 잘 알려지지 않은 동충하초로 이에 대한 생리활성을 구명하여 산업화하려면 인공자실체를 대량생산하는 것이 매우 중요하다. 그러나 이에 대한 기초 실험은 매우 미흡하여 붉은자루동충하초에 대한 배양적 특성을 보면 OMA, YMA 배지에서 균사의 생장이 좋았으나 YMA와 SDAY 배지에서 백백하게 성장하였다. 균총의 색에서도 YMA, YTM 배지가 선명한 붉은색을 나타내었다. 균사 생장은 25°C에서 잘 성장하였으며 pH 7인 중성에서 균사의 생장이 양호하였다. 이 결과에서 SDAY에서 가장 우수한 성장을 나타내는 것은 번데기동충하초를 비롯한 다른 동충하초에서도 같은 결과를 얻었으므로(Shrestha, 2003; Sung *et al.*, 2002; 박, 2003; 성, 1996; 이 1996) 기본 배지로 이용하는 것이 바람직하다고 생각된다. 균사 생장의 최적온도는 24°C이며 균사생육 pH는 7.0으로 발표한 내용과 거의 일치하는 것으로 나타났다(Ban *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 1999; Yamanaka *et al.*, 1998; 이, 1996, 1999).

붉은자루동충하초가 필요로 하는 탄소원은 Dextrin에서 가장 좋은 균사 생장과 균체량이 많고 붉은색이 변하지 않았지만 dextrin은 값이 비싸 대량 시험을 할 때는 사용하기가 어려울 것 같다. 유기태 질소원인 peptone, yeast extract, tryptone에서 균사 생장과 액체배지의 균사량이 많은 것은 다른 동충하초도 같은 결과를 얻었다(Sung *et al.*, 2002). 붉은자루동충하초는 C/N비는 1:1의 비율에서 균사의 생장과 밀도가 양호한 것은 다른 버섯이 탄소원과 질소원의 비율이 10:1의 비율과는 달리 같은 비율을 나타내나 이것이 자실체 형성에 미치는 영향에 대하여서는 앞으로 연구하여 밝혀야 될 것이다. 무기염류에서도 KH_2PO_4 가 다른 균과 같이 좋게 나타난 것으로 보아 배지를 만들 때 필요하면 이 무기염류를 사용하는 것이 좋다.

그러므로 붉은자루동충하초를 배양하려면 기본배지인 YMA(yeast extract agar)에 dextrin과 yeast extract의 비율을 같이하고 일정량의 KH_2PO_4 를 첨가하여 배양하므로 균사생장이 양호하다는 기초자료를 얻었으므로 붉은자루동충하초를 대량생산하려면 이 연구 결과로 선발된 배지를 이용하는 것이 바람직하다.

적 요

붉은자루동충하초는 땅속의 죽은 풀썩기 원형 번데기를 기주로 하여 1개 또는 3~4개의 곤봉형 자좌를 형성한다. 붉은색을 띠는 자좌는 머리와 자루의 경계가 명확하며 머리는 곤봉형이다. 크기는 1~3 cm의 크기로 반분헌형의 자낭각이 조밀하게 분포하며, 자낭각의 크기는 360~400×180~200 μm이다. 자낭은 150 μm의 크기를 가지며, 둘레는 2.8~3.5 μm이다. 중앙에 실모양의 끈으로 연결되어 있는 양끝에 자낭포자를 형성하며, 크기는 124~141 μm의 크기를 가진다. 자낭포자는 2차 포자로 분열하지 않으며, 자낭포자의 각 세포들이 직접 발아하여 균사로 된다. 불완전세대는 *Mariannaea*속으로 분생자경의 4개~5개의 과일라이드를 가졌고 크기가 15~24×2~3 μm이며 분생포자가 둥근 방추형이며 크기가 4~6×1.8~2.4인 것으로 보아 *Mariannaea elegans* Samson으로 동정하였다. 균사의 생장은 YMA와 SDAY에 pH 7로 맞추고 25°C로 배양하면 균사의 생장도 좋았고 균총의 밀도도 높았다. 탄소원은 Dextrin에서 가장 좋은 균사 생장과 균체량이 많았으며 다음으로 Lactose, Saccharose와 sucrose에서 균사 생장이 좋았으며 질소원은 peptone, yeast extract, tryptone에서 균사 생장과 액체배지의 균사량도 많았다. C/N비는 1:1의 비율에서 균사의 생장과 밀도가 양호하였으며 적정량은 12.5 g/l에서 균사의 생장과 밀도가 양호하였다. 무기염류에서는 KH₂PO₄가 다른 무기염류에 비해 좋게 나타났다. 붉은자루동충하초의 대량 배양을 위하여 액체배지로는 YMA와 SDAY 배지에서 가장 많은 건조 균체량을 얻을 수 있었으며, 이 배지에 6개의 절편을 넣고 7일간 배양하면 많은 건조 균체량을 얻을 수 있었다.

감사의 말씀

본 연구는 과학기술부 국책연구개발사업인 유전자원지원활용사업단의 연구비와 농촌진흥청 바이오그린 21사업 연구비 지원으로 수행된 연구로 과학기술부와 농촌진흥청 바이오그린 사업단에 감사를 드립니다.

참고문헌

- 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 fruiting-body of *Isaria japonica*. *Kor. J. Mycol.* **26**: 380-386.
- Berkeley, M. J. and Broome, C. E. 1873. The fungi of Ceylon. *Journ. Linn. Soc.* XIV. pp110.
- Cho, M. A., Lee, D. S., Kim, M. J., Sung, J. M. and Ham, S. S. 2003. Antimutagenicity and cytotoxicity of Cordycepin isolated from *Cordyceps militaris*. *Food Sci. Biotechnol.* **12**(5): 472-475.
- Choi, K. E. 2003. Purification of physiologically effective compounds from *Cordyceps militaris*. Kangwon National University. thesis for the Degree of Master. pp58.
- Choi, I. Y., Choi, J. S., Lee, W. H., Yu, Y. J., Joung, 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.
- Kobayasi, Y. 1941. The genus *Cordyceps* and its allies. *Sci Rept Tokyo Bunrika Daigaku Sect. B.* **5**(84): 53-260.
- _____. 1982. Keys to the taxa of the genera *Cordyceps* and *Toruella*. *Trans. Mycol. Soc. Japan* **23**: 329-364.
- _____. and Shimizu, D. 1978. *Cordyceps* species from Japan. *Bull. Nat. Sci. Mus. Ser., B.* **4**: 43-63.
- _____. and _____. 1978. *Iconography of vegetable wasps and plant worms*. Hoikusha Publishing Co., LTD. pp280.
- Mains, E. B. 1958. North American entomogenous species of *Cordyceps*. *Mycologia* **50**: 169-222.
- Petch, T. 1924. Studies in entomogenous fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **10**: 28-38.
- Samson, R. A. 1974. *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. *Studies in Mycology.* **6**: 31-36.
- Shrestha, B. 2003. Growth characteristics of somatic mycelium and mating system of *Cordyceps militaris* (L. ex Fr.) Link. Kangwon National University. thesis for the Degree of Doctor. pp82.
- Shimizu, D. 1997. *Illustrated Vegetable Wasps and Plant Worms in colour*. IE-No-HIRAKARI ASSOCIATION. pp446.
- Sung, J. M., Choi, J. M., Shrestha, B. and Park, Y. J. 2002. Cultural characteristics of mycelial growth by *Cordyceps militaris*. *Kor. J. Mycol.* **30**(1): 1-5.
- _____, 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.
- _____, _____. Kim, Y. O., Kim, S. H. and Sung, G. H. 1997. Distribution and taxonomy of entomopathogenic fungi from Korea, with special reference to the genus *Cordyceps*. 1997 BCPC Symposium Proceedings No 68: *Microbial Insecticides: Novelty or Necessity.* 293-301.
- Yamanaka, K., Inatomi, S. and Hanaoka, M. 1998. Cultivation characteristics of *Isaria japonica*. *Mycoscience* **39**: 43-48.
- 김미남. 2001. 번데기동충하초(*Cordyceps militaris*) 추출물의 생리활성 탐색에 관한 연구. 강원대학교 석사학위논문. p 80.
- 박기범. 2002. 눈꽃동충하초(*Paecilomyces tenuipes*(Peck) Samson)의 배양의 특성과 인공배양에 관한 연구. 강원대학교 석사학위논문.
- 성재모. 1996. 한국의 동충하초. 교학사. 62-90, p 299.
- 성재모, 유영복, 차동렬. 1998. 버섯학. 교학사. 95-111.
- 이재근. 1999. 풍뎡이동충하초의 배양의 특성과 자실체 형성에 관한 연구. 강원대학교 석사학위논문.
- 이현경. 1996. 한국산 동충하초의 분포와 분류 및 배양의 특성에 관한 연구. 강원대학교 석사학위논문.
- 전철민. 1998. 동충하초 추출물의 생리활성 탐색에 관한 연구. 강원대학교 석사학위논문. p 51.
- 조미애. 2002. 번데기동충하초에서 분리한 화합물의 생리활성에 관한 연구. 강원대학교 석사학위논문. p 49.
- 최영상. 2000. 번데기동충하초의 배양의 특성과 인공배양에 관한 연구. 강원대학교 석사학위논문.
- 최인영. 2000. 동충하초속균(Entomopathogenic fungi)의 유연관계 분석 및 인공배양. 전북대학교 박사학위논문.