

흰곰곰병균(*Beauveria bassiana*) 단균사의 대량배양생산을 위한 액체배지 개발

서종복 · 진병래 · 신상철** · 박호용* · 이범영** · 이창근** · 강석권

서울대학교 농업생명과학대학

*KIST 생명공학연구소

**산림청 임업연구원

Development of Liquid Culture Media for the Mass Production of *Beauveria bassiana* Blastospore

Jong Bok Seo, Byung Rae Jin, Sang Chul Shin**, Ho Yong Park*,
Bum Young Lee**, Chang Keun Lee** and Seok Kwon Kang

College of Agriculture & Life Sciences, Seoul National University, Suwon, Korea

*Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, KIST, Taejeon, Korea

**Forestry Research Institute, Forestry Administration, Seoul, Korea

Abstract

To develop a liquid culture media for the mass culture of *Beauveria bassiana* blastospore, wheat bran and soybean cake were selected as a carbon and nitrogen source, respectively. The composition and final concentration of wheat bran and soybean cake in liquid culture media were determined by the growth of *B. bassiana* blastospore. The results showed that the growth of *B. bassiana* blastospore was effective in the rate of 3 wheat bran:2 soybean cake and in 5% of final concentration of the liquid culture media, suggesting that the liquid culture media using wheat bran and soybean cake are available.

Key words : *Beauveria bassiana*, liquid culture media

서 론

곤충병원 사상균은 700여종이 알려져 있으며, 그 중 10여종이 미생물 살충제로 개발되어 원예, 목초 및 산림해충의 방제에 이용되고 있다(Hajek와 St. Leger 1994). 이 중 Hyphomycete의 *Beauveria*속은 많은 곤충종에 대해 생물적 방제제로 널리 사용되는 곤충병원 사상균이다(岡田 1994). 이러한 곤충병원 사상균의 제제화에 필수적인 대량배양을 위하여 사상균의 배양에 필요한 요구 영양소와 배양조건에 관한 연구가 활발히 수행되어졌으며(Agudelo 1983, Thomas 1987), 특히 일본에서는 딱정벌레목의 울도하늘소(*Psacotheta hilaris*) 방제를 위한 미생물 살충제의 개발에 필요한

*Beauveria tenella*의 대량생산을 위해서는 1차 액체 배양과 2차 고체배지에서의 배양을 통한 2단계 배양 기술이 배양기간의 단축, 사상균의 병원성 및 다른 미생물의 오염을 줄이는 데 매우 효과적이라고 보고 하였다(Kawakami와 Shimane 1986).

한편 *B. bassiana*에 의해 감염된 누에인 백강잠은 한약재로서 주 효능으로 뇌졸중을 치료하며 그 증상의 일종인 강직성 마비 및 경련 질환, 고혈압, 해열에 효력이 탁월하며, 뇌졸중의 주 원인이 되는 痰飲을 제거하는 효과가 있어 널리 쓰여지고 있는 약제이다(이 1994). 그러나 아직 국내에서는 곤충병원 사상균의 대량배양에 의한 미생물 살충제 개발 및 백강잠 대량생산을 위한 백강균의 대량배양 체계에 관한 연구는

전무한 실정이다.

따라서 본 연구는 흰곰팡이균(*B. bassiana*)을 이용하여 국내 산림의 주종인 소나무에 심각한 피해를 주고 있는 솔잎혹파리(*Thecodiplosis japonensis*) 방제에 효과적인 사상균 살충제 개발과 한약재로 뇌졸중에 효력이 탁월한 백강잠의 대량생산을 위해, 사상균의 대량배양 체계에 있어서 대량의 접종원인 단균사 확보에 필수적인 1차 액체배지를 농가부산물인 저가의 밀기울과 대두박등을 탄소원과 질소원으로 선발하여 개발하였다.

재료 및 방법

1. 공시 균주

본 실험에 사용된 백강균 *B. bassiana*는 삼림토양에서 분리한 SFB-168-2를 솔잎혹파리 및 누에(*Bombyx mori*) 유충에 대한 병원성 검정을 통해 선발하였으며, 이렇게 선발된 균주는 Sabouraud Dextrose Broth(2% dextrose, 1% bacto-peptone, 0.2% yeast extract)에서 3일간 26°C, 130 rpm으로 진탕배양하여 4°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

2. 1차 액체배지 선발

농가부산물인 밀기울과 대두박을 이용한 저가 경제배지의 선발은 먼저 탄소원과 질소원으로 선발된 밀기울과 대두박을 분말형태로 분쇄하고, 적정농도를 결정하기 위해 3%, 4%, 5%와 6%의 농도에서 단균사의 성장을 조사하였다. 그리고 가장 효과적인 성분비의 결정은 밀기울과 대두박을 4:1, 3:2, 2:3 및 1:4의 비율로 구분하여 조사하였으며, 농도별, 성분비별 배지의 효율성은 단균사의 성장에 따른 생성수로 결정하였다. 이때 대조구는 SDB+Y 배지를 사용하였다.

3. 단균사 성장 조사

단균사 성장률의 조사는 ampicillin(50 µg/ml)이 포함된 SDA+Y(4% dextrose, 1% bacto-peptone, 0.2% yeast extract, 1.5% agar)를 직경 9 cm의 petri-dish에 두께 1cm가 되게 깔고, 배양하고 있는 각각의 1차 액체배지를 시간별로 채취하여, 멸균 증류수로 10³, 10⁴, 10⁵배 희석한 후, petri dish에 각각 100 µl씩 접종하고, 26°C, RH 80% 이상의 조건에서 배양하면서 성장하는 colony의 수를 조사하여 CFU(colony forming unit)로 단균사의 성장을 조사하였다. 또 위상차 현미경 관찰로 1차 액체배지내 단균사의 수를 확인하였다.

결과 및 고찰

흰곰팡이균(*B. bassiana*)을 이용하여 한약재로 뇌졸중에 효력이 탁월한 백강잠의 대량생산과 솔잎혹파리 방제에 효과적인 사상균 살충제 개발을 위하여, 사상균의 대량배양 체계에 있어서 접종원인 단균사의 대량 확보에 필수적인 1차 액체배지를 농가부산물인 저가의 밀기울을 탄소원으로, 질소원으로는 대두박을 선발하였다.

사상균 배양에 있어서 적합한 1차 액체배지의 최종농도를 결정하기 위하여, 밀기울과 대두박의 성분비를 1:1로 하고, 농도는 2%, 3%, 4%, 5% 및 6%로 구분하여, 대조구인 SDB+Y 배지에서의 단균사 성장과 비교하였다(Fig. 1, 2). 그 결과, SDB+Y 배지에서의 단균사 성장에 비해 밀기울과 대두박 배지에서도 배지의 농도가 높을수록 단균사의 성장이 양호하였으며, 이는 위상차 현미경 관찰에 의해 뚜렷히 확인할 수 있었다. 따라서 밀기울과 대두박 배지의 농도별 단균사 성장을 CFU로 조사하였다(Fig. 3). 밀기울과 대두박 배지의 최종농도가 6%에서 단균사의 성장이 가장 높게 나타났고, 그 다음이 5%, 4% 순이었으며, 3%는 성장이 대조구인 SDB+Y 배지에 비해서는 효과적이었으나, 본 밀기울과 대두박 배지의 공시 농도 중에서 비교적 낮았다. 이러한 점으로 볼때, 탄소원과 질소원으로 선발된 밀기울과 대두박을(NRC 1994) 이용한 1차 액체배지는 사상균의 단균사 배양에 상당히 효과적이었다. Smith와 Grula(1988)의 결과에 의하면, 탄소원은 *B. bassiana* 분생자(conidia)의 발

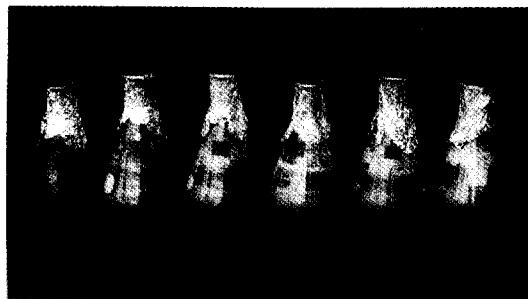


Fig. 1. The growth of *B. bassiana* blastospore in various concentration of liquid culture media. The *Beauveria bassiana* blastospore was cultured in 2% (B), 3% (C), 4% (D), 5% (E) and 6% (F) of final concentration of the liquid culture media using wheat bran and soybean cake, respectively. The SDB+Y media was used as a control (A).

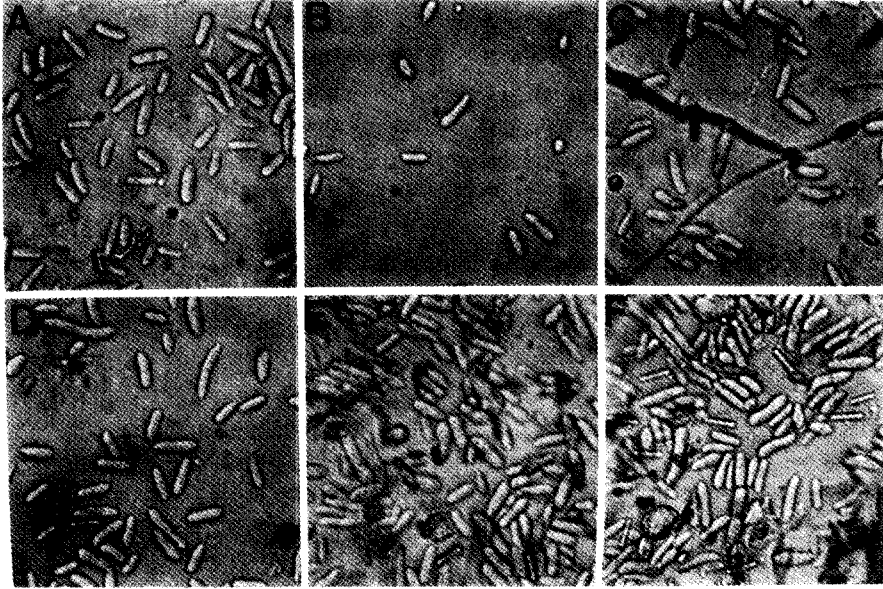


Fig. 2. Phase contrast micrographs of *Beauveria bassiana* blastospore in various concentration of liquid culture media. The *B. bassiana* blastospore was cultured in 2% (B), 3% (C), 4% (D), 5% (E) and 6% (F) of final concentration of the liquid culture media using wheat bran and soybean cake, respectively. The SDB+Y media was used as a control (A).

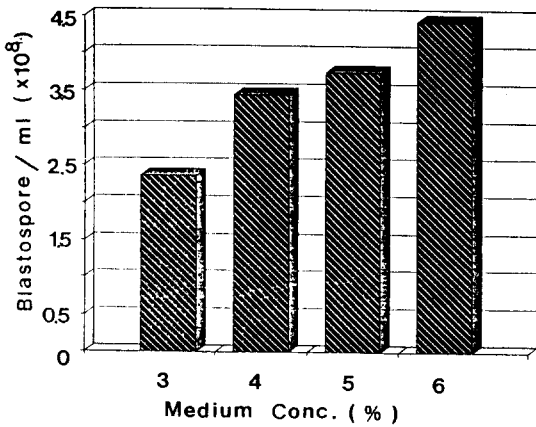


Fig. 3. The number of *Beauveria bassiana* blastospore in liquid culture media according to the final concentration. The number of *B. bassiana* blastospore in the cultured media was determined by colony forming unit.

아를 위해 필수적으로 요구되어지는 영양소이며, 질소원은 균사(hyphae)의 지속적인 성장과 autolysis를 막기 위해 외부에서 공급되어야 한다고 보고하였다. 따라서 밀기울과 대두박을 이용한 1차 액체배지를 개발하기 위하여, 배지의 최종농도는 단균사의 성장

면에서 6%가 가장 높게 나타났으나, 배양시간이 경과함에 따라 배지 자체의 점도가 매우 높아져 대량 배양 체계에서 집중원으로 사용될 1차 액체배지로는 부적합한 것으로 판단되어, 본 실험의 결과 5%를 최적농도로 결정하였다.

배지의 최종농도별 단균사 성장률 조사에서 선발된 최적농도 5%를 기초로, 최적의 1차 액체배지 성분비를 결정하기 위해 밀기울과 대두박을 4:1, 3:2, 2:3 및 1:4의 비율로 조성하여 단균사의 성장을 조사하였다(Fig. 4). 그 결과, Fig. 4의 SDA+Y 배지에서 형성된 콜로니 숫자에서 보여지듯이, 대조구인 SDB+Y 액체 배지에서 보다 밀기울과 대두박 배지에서 훨씬 높은 CFU를 관찰 할 수 있었다. 이를 배지 m²당 단균사로 분석한 결과, Fig 5에서 보여지는 것처럼 밀기울과 대두박의 비율이 3:2, 2:3 및 1:4에서 효과적이었으며, 4:1의 경우는 대조구인 SDB+Y 배지와 유사하였다. 본 실험의 결과 단균사의 성장과 경제성을 고려할 때, 밀기울과 대두박의 비율이 3:2에서 가장 효과적으로, 배양 4일째 배지 m²당 약 7.6 × 10⁸개의 단균사를 얻을 수 있었다.

이상의 결과를 종합할 때, *B. bassiana* 단균사 대량배양을 위한 1차 액체배지의 최적 조건은 탄소원으로 밀기울과 질소원으로 대두박을 3:2의 비율로

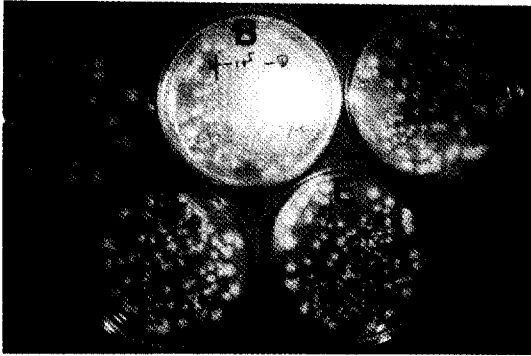


Fig. 4. The colony of *Beauveria bassiana* blastospore in various composition of liquid culture media. The *B. bassiana* blastospore was cultured in 4:1 (A), 3:2 (B), 2:3 (C) and 1:4 (D) of wheat bran: soybean cake, respectively. The SDB+Y medium was used as a control (E).

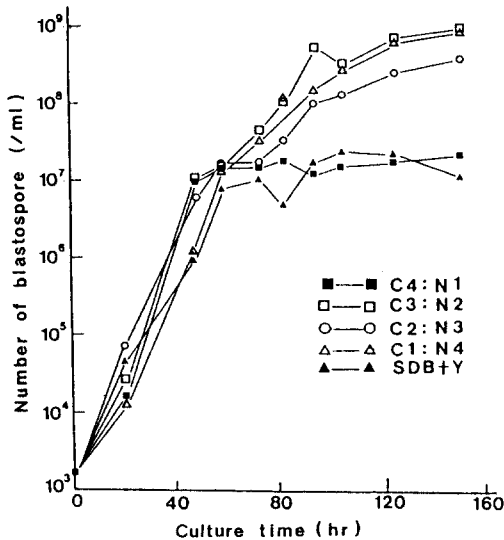


Fig. 5. The number of *Beauveria bassiana* blastospore in liquid culture media according to the composition. The number of *B. bassiana* blastospore in the cultured media was determined by colony forming unit.

최종배지 농도가 5% 되게 조성하였을 때 단균사의 성장과 경제성면에서 가장 효과적이었다.

적 요

흰곰팡이균(*B. bassiana*)을 이용하여 백강잡의 대

량생산과 효과적인 사상균 살충제 개발을 위해, 사상균의 대량배양 체계에 있어서 집중원인 단균사의 대량 확보에 필수적인 1차 액체배지를 개발하였다. 농가부산물인 저가의 밀기울을 탄소원으로, 질소원으로는 대두박을 선별하고, 이들의 조성비와 농도에 따른 밀기울·대두박 배지에서 단균사의 성장을 조사한 결과, 밀기울과 대두박을 3:2의 비율로 최종배지 농도가 5%되게 조성하였을 때, 배양 4일째 배지 ml당 약 7.6×10^8 개의 단균사를 얻을 수 있어, 단균사의 성장과 경제성면에서 가장 효과적이었다.

사 사

본 연구는 과기처 특정연구 개발과제의 연구비 지원에 의해 수행되었음.

인 용 문 헌

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.

Hajek, A. E. and R. J. St. Leger (1994) Interactions between fungal pathogens and insect hosts. Annu. Rev. Entomol. 39: 293-322.

Kawakami, K. and T. Shimane (1986) Microbial control of the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacotheta hilaris* Pascoe (Coleoptera; Cerambycidae), by an entomogenous fungus, *Beauveria tenella*. J. Seric. Sci. Jpn. 55: 227-234.

이원주 (1994) 蠶森産物の高附加價値用途開發現況과展望. 한국잠사학회지 36: 168-175.

岡田齊夫 (1994) 微生物的防除の現況と展望. 植物防疫. 48: 449-454.

NRC (1994) Nutrient requirement of poultry (9th Ed.). National Academic Press. Washington D. C. pp61-68.

Smith, R. J. and E. A. Grula (1981) Nutritional requirements for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. J. Invertebr. Pathol. 37: 222-230.

Thomas, K. C., G. G. Khachatourians and W. M. Ingledew (1987) Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. Can. J. Microbiol. 33: 12-20.