

흰곰곰병균 (*Beauveria bassiana*) 포자의 대량배양을 위한 고체배지의 개발

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

서울대학교 농업생명과학대학 농생물학과, *KIST 생명공학연구소, **산림청 임업연구소

Development of Solid Culture Media for the Mass Production of *Beauveria bassiana* Conidia

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

Department of Agricultural Biology, College of Agriculture & Life Sciences,
Seoul National University, Suwon 441-744, Korea.

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

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

Abstract

To develop a solid culture media for the mass culture of *Beauveria bassiana* conidia, wheat bran was selected as C source and N source. The pellet media were prepared without (P-I) and with (P-II) solidified ingredient. The moisture for the growth of *B. bassiana* was required over 4 : 2 of Media : D.W (W/V). The growth of *Beauveria bassiana* on the media type was more effective in media of pellet type than that of powder type. In addition, production of *Beauveria bassiana* conidia on the media size was more effective in media of S type (ϕ 3 mm) than that of L type (ϕ 7 mm). And the yield of *Beauveria bassiana* conidia at 20°C cultivation on 3 weeks post inoculation was similar to that of 25°C. Above-mentioned results showed that pellet medium (P-I) was effective to growth of *Beauveria bassiana*, suggesting that the pellet media may be useful in the mass production of *Beauveria bassiana* conidia.

Key Words : *Beauveria bassiana*, solid culture media, mass culture

서 론

흰곰곰병균 (*Beauveria bassiana*)은 누에 (*Bombyx mori*)에 흰곰곰병을 일으키는 곤충병원 진균으로 1834년 Agostino Bassi가 최초로 보고 하였으며, 그 후 곤충에 병을 일으키는 많은 종의 진균이 다양한 곤충목에서 분리, 동정되어 현재 약 750여종의 곤충병원 진균이 알려져 있으며, 이 중 불완전균류의 Hyphomycetes가 대부분을 차지한다 (Arora 등 1991). 그리고 대부분의 연구는 누에와 꿀벌등 유용 곤충에 대한 병원과 생물적 방제제로서의 가능성을 가진 진균에 집중되고 있으며 (Evans 1982), 이 중

Hyphomycetes의 *Beauveria* 속은 많은 곤충종에 대해 생물적 방제제로 널리 사용되는 곤충병원 진균이다 (岡田 1994). 진균을 이용한 제제화에 필수적인 대량 배양을 위하여 배양에 필요한 요구 영양소와 배양조건에 관한 연구가 활발히 수행되어졌으며 (Agudelo 1983, Thomas 1987), 일본에서는 울도하늘소 (*Psacotheta hilaris*) 방제를 위한 미생물 살충제의 개발에 필요한 *Beauveria tenella*의 대량생산을 위해서는 1차 액체배지에서 배양과 2차 고체배지에서의 배양을 통한 2단계 배양기술이 기간의 단축, 진균의 병원성 및 다른 미생물의 오염을 줄이는데 매우 효과적이라고 보고하였다 (Kawakami와 Shimane 1986).

흰군음병균 (*B. bassiana*)의 대량배양 체계 확립은 국내 산림의 주종인 소나무에 심각한 피해를 주고 있는 솔잎혹파리 (*Thecodiplosis japonensis*) 방제에 효과적인 진균 살충제 개발에 이용될 수 있다. 따라서 본 연구는 전보의 대량배양체계에 있어서 집중원인 단균사의 확보에 필수적인 1차 배지를 농가 부산물인 밀기울과 대두박을 이용한 배지 개발 (서 등 1995b)에 이어, 대량배양체계에서 가장 중요한 흰군음병균 포자의 대량배양을 위한 고체배지를 저가의 농가 부산물인 밀기울을 이용하여 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 공시 균주

본 실험에 사용된 흰군음병균, *B. bassiana*는 삼림 토양에서 분리한 SFB-168-2 (서 등 1995a)를 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 26°C, 130 rpm으로 3일간 진탕배양하여 4°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다. 그리고 집중원은 서 등 (1995b)이 선발한 1차 액체배지를 이용하여 26°C, 130 rpm으로 3일간 진탕배양하여 접종에 사용하였다.

2. 고체 배지의 선발

*B. bassiana*의 대량 배양을 위한 2차 고체 배지 배양 실험은 단기간에 배지 g당 포자 수를 가장 효율적으로 생산할 수 있는 고체 배지를 결정하기 위하여, 고체 배지의 조성별, 형태별, 크기별로 포자의 성장률을 조사하였다. 먼저 조성별은 저가의 농가 부산물인 밀기울을 이용하여 Powder과 Pellet형 두 가지 형태로 제조한 다음 포자의 성장률을 비교하였다. 그리고 조성별 포자의 성장률은 밀기울을 이용한 pellet형의 고체 배지에 고체 배지의 물성조건을 강화하기 위하여 약 10% 정도의 고품제를 첨가하지 않은 P-I배지와 첨가한 P-II 배지를 조제하여 비교하였다. 그리고 배지의 크기별 포자 생산량은 extruder를 사용하여 두 가지 크기의 pellet (S형; 직경 3 mm, 길이 5-7 mm과 L형; 10 mm × 15-17 mm의 원통형)을 제작하여 단균사를 접종한 뒤, 포자의 생산량을 조사하였다.

3. 고체 배지에서 *B. bassiana*의 성장률 조사

고체 배지에서 *B. bassiana*의 성장률의 비교는 각 조건별로 배양한 적당량 (1-2.5 g)의 고체 배지를 추출하고, 추출된 배지는 먼저 냉동 건조기에서 24-36

시간 동안 냉동 건조한 다음, 완전히 건조된 고체 배지의 순수 무게 (g)를 측정하고, 측정된 고체 배지는 Tween-80 (Sigma)이 포함된 증류수 40 ml을 첨가한 다음 잘 현탁하여 hemocytometer를 이용하여 ml 당 포자의 수를 조사하고, 이를 고체 배지 g 당 포자 형성수로 계산하여 비교하였다.

4. 고체 배지에서 습도에 따른 *B. bassiana*의 성장률 비교.

고체 배지에서 배양 조건 중 첨가된 수분량에 따른 *B. bassiana*의 성장도 조사는 polypropylene 봉투에 500 g의 S형의 pellet형 고체 배지당 1차 증류수를 W/V으로 4:1, 5:2, 4:2 및 4:3 비율로 첨가하고 멸균한 다음, 멸균된 피펫을 이용하여 50 ml의 접종액을 첨가하고, 플라스크를 잘 흔들어 접종액을 골고루 배지에 접종되게 한 다음, 26°C 1, RH 80% 이상의 조건에서 3주간 배양한 다음 배양된 pellet을 수거하여 냉동 건조한 다음 습도별 포자의 수거량을 조사하였다.

5. 고체 배지의 온도별 *B. bassiana*의 성장률 비교

고체 배지의 배양 조건 중 적절한 배양 온도를 알아보기 위해, 배양 온도별 진균의 성장도 조사는 polypropylene 봉투에 500 g의 S형의 pellet형 고체 배지를 넣은 다음 250 ml의 1차 증류수를 첨가한 후 멸균을 실시하였다. 그리고 멸균된 피펫을 이용하여 50 ml의 접종액을 첨가하고, 봉투를 잘 흔들어 접종액을 골고루 배지에 접종되게 한 다음, 10°C, 15°C, 20°C 및 25°C에서 22일간 배양한 다음 온도별 포자의 수거량을 조사 비교하였다.

결과 및 고찰

1. 고체 배지의 선발

유효한 곤충 병원 진균의 저가 대량 배양을 위한 2차 고체 배지를 개발하기 위하여, 저가의 농가 부산물인 밀기울을 주성분으로, 고품제로 밀가루 등을 이용하여 표 1의 조성으로 고체배지를 조제하였다. 배

Table 1. Composition of pellet culture media

	P-I	P-II
Major Ingredient	1 Kg	900 g
Solidified	-	100 g
Ingredient	trace	trace
Additive	500 ml	500 ml

Table 2. Effect of culture media type on the growth of *Beauveria bassiana*

Type	Growth ^{a)} (conidia/g)
Pellet	$5(\pm 4) \times 10^9$
Powder	$\ll 1 \times 10^9$

^{a)} *B. bassiana* was cultured at 25°C in the humidity condition of 5:2 of media:D. W. (W/V) and conidia were counted at 3 weeks pi.

Table 3. Effect of solid culture media composition on the growth of *Beauveria bassiana*

	P-I	P-II
Growth ^{a)} (conidia/g)	$5(\pm 4) \times 10^9$	$4(\pm 3) \times 10^9$

^{a)} *B. bassiana* was cultured at 25°C in the humidity condition of 5:2 of media:D.W.(W/V) and conidia were counted at 3 weeks pi.

양 시험은 단기간에 배지 g 당 포자의 수를 가장 효율적으로 생산할 수 있는 고체 배지의 형태, 조성 및 크기를 결정하기 위하여, 먼저 실제 진균 대량 배양의 공정과 다음 단계인 제제화 공정의 용이성 고려와 아울러 *B. bassiana* 성장을 위한 고체 배지의 표면적을 최대화하기 위한 실험으로, 배지의 형태를 powder 형과 pellet 형으로 제작하고, 배지 형태에 따른 *B. bassiana*의 성장 정도를 조사하였다 (표 2). 그 결과 표 2에서와 같이, powder 형과 pellet 형 (P-I)의 성장도 비교에서는 powder 형에 비해 pellet 형에서 *B. bassiana*의 성장이 훨씬 양호하였다. 이러한 결과는 배지에 수분이 첨가되어졌을 시 pellet형의 고체배지는 배지의 형태를 유지함으로써 *B. bassiana*의 성장을 위한 성장 공간이 제공되는 반면, powder 형 배지는 크게 덩어리지는 현상으로 인해 *B. bassiana*의 성장이 제한되는 것으로 나타났다.

따라서 pellet 형 고체배지의 물성에 따른 진균의 성장정도를 알아보기 위하여, 표 1과 같이 조제된 고체 배지에서 진균의 성장 정도를 조사하였다 (표 3). 그 결과, 표 3에서와 같이 P-I와 P-II의 g당 포자의 수는 별 차이를 나타내지 않아, 경제성면에서 유리한 P-I 배지를 선발하였다. 또 배지의 크기에 따른 *B. bassiana* 포자 생산성은, 그림 1에서와 같이 배지의 크기를 직경이 7 mm인 L형과 직경이 3 mm인 S형 두 종류의 pellet 배지를 만들어 *B. bassiana*를 접종하고 포자생산량을 비교하였다 (표 4). 그 결과 L형과 S형 역시 수분이 첨가되어졌을 때 pellet 배지의 형태

Table 4. Effect of pellet media size on the growth of *Beauveria bassiana*

Media size	Growth rate ^{a)} (conidia/g)
L ^{a)} type	$4(\pm 2) \times 10^9$
S ^{b)} type	$5(\pm 4) \times 10^9$

^{a)} 10 mm × 15-17 mm, ^{b)} 3 mm × 5-7 mm,

^{c)} *B. bassiana* was cultured at 25°C in the humidity condition of 5:2 of media : D. W. (W/V) and

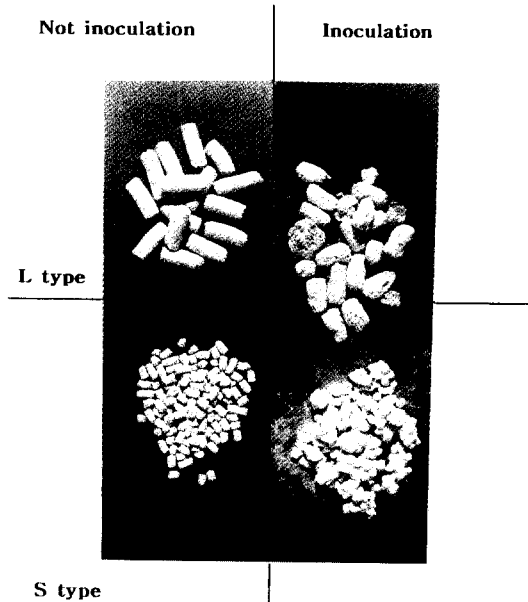


Fig. 1. Solid culture of *Beauveria bassiana* in pellet media.

L type; 10 mm × 15-17 mm

S type; 3 mm × 5-7 mm

를 유지했으며, *B. bassiana*의 포자생산은 S 형에서 다소 양호한 것으로 나타났다. 이는 고체 배지 g 당 *B. bassiana*의 성장을 위한 배지의 표면적이 S 형이 더 유리하기 때문인 것으로 생각되며, 아울러 L 형보다 S 형이 멸균의 효과도 다소 좋은 것으로 나타나, L 형보다는 S 형이 *B. bassiana*의 대량 배양에 더 효율적이었다.

2. 고체 배지에서 습도별 *B. bassiana*의 성장률 조사

고체 배지에서 최적 배양 조건의 선정을 위한 실험으로 진균의 성장에 온도와 함께 가장 중요한 요인인 습도 조건에 따른 *B. bassiana*의 성장을 조사하였다 (표 5). 표 5의 결과에서 고체배지당 수분의 비율을 W/V으

Table 5. Effect of humidity on the growth of *Beauveria bassiana*

Media : D.W (W/V)	Growth ^{a)} (conidia/g)
4 : 1	3 (± 2) $\times 10^9$
5 : 2	5 (± 4) $\times 10^9$
4 : 2	7 (± 2) $\times 10^9$

^{a)} *B. bassiana* conidia were counted at 3 weeks pi.

로 4:1인 습도 조건은 *B. bassiana*의 성장에 영향을 미친 것으로 보이며, 4 : 2와 4 : 3의 조건에서는 성장에 큰 차이가 없이 양호하였다. 따라서 습도 조건은 4 : 2 비율 이상이 요구되는 것으로 나타났으나, 4 : 3이상의 조건에서는, 고체 배지의 물성에 영향을 주어 pellet이 덩어리지는 경향이 나타났다.

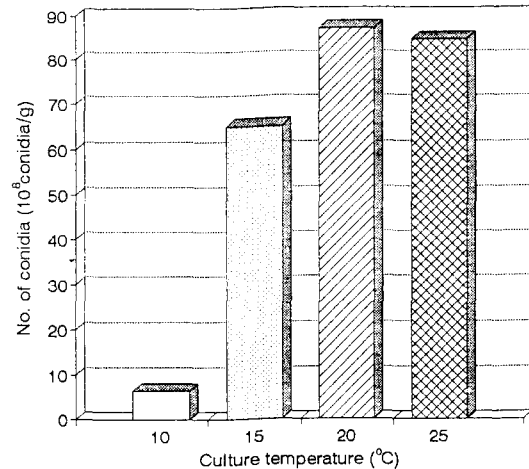
3. 고체 배지에서 배양 온도별 *B. bassiana*의 성장률 조사

대량 배양에서 온도는 매우 중요한 요인으로 본 실험에서는 선발된 고체 배지에서 *B. bassiana*의 성장율을 온도별 (10°C, 15°C, 20°C 및 25°C)로 조사하였다 (그림 2). 각각의 처리 온도에서 22일간 배양한 결과, 20°C와 25°C에서는 비슷한 높은 성장률을 나타냈으며, 15°C에서도 비교적 양호한 성장율을 나타내었다. *B. brongniartii*의 경우 분생자 발아, 균사의 생장 및 감염에 적절한 온도 범위는 24-27°C, 22-27°C와 20-25°C라고 보고한 결과와 유사하였다 (Shimane와 Kawakami 1994). 이러한 결과는 하절기와 동절기의 배양에 있어서 적절한 온도 조절에 따른 경제적인 배양에 이용될 수 있을 것이다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 흰곰팡이균 포자의 대량배양에 필수적인 경제적이고 효율적인 pellet 형의 고체 배지를 선발할 수 있었으며, 또한 선발된 S형의 P-I 고체배지에서 최적의 배양조건은 배지 : 물 (W/V) 이 4 : 2, 온도 20°C- 25°C에서 최고의 성장률을 나타내었다.

적 요

흰곰팡이균 (*B. bassiana*)을 이용하여 효과적인 진균살충제 개발을 위해, 진균의 대량배양 체계에서 가장 중요한 고체배지를 저가의 농가부산물인 밀기울을 이용하여 조제하고, 고체배지의 물성, 수분, 온도 조건, 고체배지의 형태 및 크기에 따른 *B. bassiana* 포자의 성장을 조사하였다. 그 결과, 고체배지는 powder 형보다 pellet 형이 포자의 성장에 효과적이었

**Fig. 2.** Growth of *Beauveria bassiana* conidia in pellet media according to culture temperature.

B. bassiana was cultured in humidity condition of 4 : 2 of media : D. W. (W/V) and conidia were counted at 22 days pi.

으며, 고형제가 첨가된 P-II 배지보다는 첨가되지 않은 P-I 배지가 효율적이었다. 또 수분 요구량은 배지 : 물 (W/V)의 비율이 4:2 조건 이상, 온도조건은 20°C와 25°C에서 높은 성장율을 보여주었다. 그리고 고체 배지의 형태에 따른 포자의 생산성은 S형 P-I 고체배지 (직경 3 mm)에서 효과적이었다. 이상의 결과, S형 P-I 고체배지는 흰곰팡이균 포자의 대량배양에 경제적이고, 효율적으로 이용될 수 있을 것이다.

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.
- Arora, D. K., L. Ajello and K. G. Mukerji. (1991) Handbook of Applied Mycology. Human, Animals, and Insects. Vol. 2. Marcel Dekker, Inc. New York. pp. 547-612.
- Evans, H. C. (1982) Entomogenous fungi in tropical forest ecosystems: An appraisal. Ecol. entomol. 6: 47-60.

- 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, *Psacotha hilaris* Pascoe (Coleoptera ; Cerambycidae), by an entomogenous fungus, *Beauveria tenella*. *J. Seric. Sci. Jpn.* 55: 227-234.
- King E. J. and M. F. Brown. (1983) A technique for preserving aerial fungal structures for scanning electron microscopy. *Can. J. Microbiol.* 29: 653-658.
- 岡田齊夫 (1994) 微生物的防除の現状と展望. 植物防疫. 48: 449-454.
- 서종복, 진병래, 신상철, 박호용, 이범영, 이창근, 강석권. (1995a) 삼림 토양으로부터 솔잎혹파리 감염 사상균의 분리. *한국응용곤충학회지* 34: 368-372.
- 서종복, 진병래, 신상철, 박호용, 이범영, 이창근, 강석권. (1995b) 흰균음병균 (*Beauveria bassiana*) 단균사의 대량배양생산을 위한 액체배지 개발. *한국잡사학회지* 37: 172-175.
- 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.