

백강잠(白僵蠶) 생산을 위한 *Beauveria bassiana*의 효율적인 접종법 및 백강잠의 간보호 활성 검정

정이연* · 홍인표 · 강필돈 · 남성희 · 김미자
농업과학기술원 농업생물부

Efficient Inoculation Method of *Beauveria bassiana* for Production of *Bombycis corpus* and Evaluation of Its Liver Protection Activity

I-Yeon Jung*, In-Pyo Hong, Pil-Don Kang, Sung-Hee Nam and Mi-Ja Kim

Department of Agricultural Biology, The National Institute of Agricultural Science and Technology, Suwon 441-100, Korea

ABSTRACT

When inoculating with *B. bassiana* 101A for the mass production of *B. corpus*, the infection ratio was high with regardless of the treating time with highly-humidity if the concentration of spore was 1.0×10^8 spores/ml, but that was low if the concentration was 1.0×10^7 spores/ml. In the study of the activities according to the conserving temperature and days of the *B. bassiana* spawn, the infection ratio of 90% was maintained for 12 days in the temperature of 4°C. However, the infection ratio was rapidly dropped to the below of 5% after conserved for 48 hours in the temperature of 25°C. Besides, the activities of the original isolate had no difference after conserved for 12 months in the temperature of 4°C, so that the infection ratio of 90% could be maintained. In the measure of liver-protecting activities of *B. bassiana* 101A, the recovering effect was 43.5% and 65.7% respectively in the poisonous treatment induced with galactosamine, compared with liver-protecting activities of Silymarin and DDB in the H₂O fraction. In the poisonous treatment induced with CCl₄, the recovering effect was 100% and 69.3% respectively, compared with liver-protecting activities of Silymarin and DDB in the EtOAc fraction.

Key words : *Bombyx mori*, Silymarin, *B. bassiana*

서 론

곤충병원성 곰팡이는 농림생태계에서 흔히 발견되는 균으로서 곤충에 질병을 유발하는 반면, 자연생태계에서 해충의 밀도를 자연적으로 감소시키는 역할을 하고 있다.

곤충병원성곰팡이는 현재까지 100여속 700여 종이 알려져 있으나(Roberts, 1989), 기타 곰팡이류에 비해 연구가 미흡한 편이다. 한편 곤충병원성 곰팡이는 중국, 한국, 일본 등에서 예로부터 훌륭한 한방약제로 이용되고 있으며, 최근에는 이러한 곰팡이 감염기주체로부터 유용물질 즉, 신기능성 생물소재나 생리활성물질을 개발하기 위한 연구를 한 바 있다(Kwon 등, 2000).

또한 균체 또는 물질을 이용하여 농업분야의 작물에 피해를 주는 충해에 대한 환경친화적인 생물적방제에 이용되고 있다. 이처럼 곤충병원성 곰팡이는 다양한 분야에서

유용하게 이용될 수 있기 때문에 국내 토착균주를 자원화하고 이들이 갖는 기능을 연구하여 활용하는 것은 의약품 및 생물 농약의 생산에 청정산업으로 역할을 할 것이며, 국제화, 개방화에 따른 국제경쟁력 제고에도 크게 기여할 것이다.

한편 *B. bassiana*는 곤충에 균음병을 일으키는 균으로, 이를 이용한 연구가 활발하게 이루어지고 있다(Tanada & Kaya, 1992). 균음병은 포도, 배, 과자 등의 향기를 뜻하는 이태리어에서 유래된 것으로(Steinhaus, 1949), 균음병에 감염된 곤충의 표피는 분생포자로 완전히 덮여진다. 본 균은 메뚜기목, 나비목, 딱정벌레목 등 넓은 기주범위를 가지는데 처음에는 *Botrytis bassiana*로 명명하였으나 그 후 *B. bassiana* 종으로 분류되었고(Steinhaus, 1949), 해충의 저항성 및 환경오염을 방지하기 위한 미생물 농약 개발 연구재료로 이용되어 왔다.

*Corresponding author. E-mail: iyjung@rda.go.kr

이 균은 기주곤충의 표피를 통하여 내부로 침입하여 곤충의 면역작용을 차단하거나 독성물질을 분비하여 기주를 치사시킨다. 이 균이 생성하는 독성물질과 기주곤충의 표피를 침투할 때 분비하는 곤충 큐티클 분해효소, 단백질 가수분해효소, 키틴 분해효소 및 esterase 등 각종 효소의 특성에 대한 연구(Bidochka and Khachatourians, 1987)가 수행되었다.

*B. bassiana*는 낮은 농도에서도 누에에 쉽게 감염된다. 어린누에때 *B. bassiana* 감염증이 보이면 누에농사를 지을 수 없을 정도로 빠르게 다른 누에에 전염된다. 누에 감염 경위를 보면 주로 뽕잎을 통하여 유입되기도 하고 사육자의 잦은 출입으로 옮기기도 한다.

균은 적당한 습도와 온도하에서 누에(*Bombyx mori*, 누에과 Bombycidae) 유충의 피부를 통하여 침투하며 침투 후 4~5일이면 누에 충체에 균사체가 형성되며 강직현상을 나타내고 결국에는 죽게 되는데 이 죽은 충체를 백강잠(*Bombycis corpus*)이라고 한다.

*B. bassiana*균에 감염된 백강잠(*Bombycis corpus*)은 고문헌에 보면 중풍으로 인한 구안와사, 어린아이의 경기치료, 두통의 치료, 폐결핵의 치료 등에 이용되어 왔고(김등, 1997) 임상적 보고로는 당뇨병 및 급성유선염 등에 이용된 예가 있다.

최근 국내에서도 백강잠(*B. corpus*)의 메탄올 엑기스의 헥산 및 클로로 포름 분획에서 2종의 스테롤 물질과 2종의 사이클로덱사펩타이드(cyclodepsipeptide)를 보고한 바 있으며(Kwon 등, 2000), 또한 백강잠(*Bombycis corpus*)의 헥산층과 부탄올층으로부터 9종의 활성물질을 분리하였다(Kwon 등, 2000).

곤충병원성곰팡이는 세계 여러곳에서 해충의 사체나 토양에서 분리·연구되고 있으나(Doberski and Tribe, 1980) 우리나라에서는 이에 대한 연구가 미진한 상태이다.

본 연구는 한약재로 사용되고 있는 백강잠(*B. corpus*)의 대량생산을 위한 *B. bassiana*의 누에에 대한 효율적인 접종법을 구명하고 백강잠의 성분과 간보호 활성을 조사하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

1. 균 분리 및 동정

본 시험에 공시한 백강균(*B. bassiana*)은 '01 춘잠기 농업과학기술원 잠사곤충부 누에사육실에서 균에 감염된 누에유충 치사체에서 분리하였다. 감염충 표피에 발생한 포자를 PDA(PD 24 g, 한천 15 g, 증류수 1000 ml) 배지상에 치상하여 10일간 배양하여 얻었다. 또한 접종원으로 사용한 분생포자를 현미배지(250 ml 삼각플라스크)에 재접종

하여 24°C 항온기에서 20일간 배양하였다.

B. bassiana 특성비교를 위한 대조균주는 분양은 농촌진흥청 농업생명공학연구원 미생물보존센터(KACC)에서 분양받아 23°C 항온에서 8일간 PDA배지상에서 배양한 것을 사용하였다.

분리균을 동정하기 위하여 한국생명공학연구원 유전자센터 유전자은행에 의뢰하여 기존의 *B. bassiana*균과의 ITS 염기서열을 비교분석 하였으며 그 결과 분리균이 *B. bassiana*임을 확인하였다(배, 1997).

2. 누에사육

1) 시험누에 사육

경기도 농업기술원 잠업농장에서 분양받은 칠보잠 누에 씨를 항온 항습실에서 최첨하여 표준누에 사육법에 따라 사육하였다. 소독은 누에사육 1주일 전에 포르말린(2~3%)으로 잠실, 잠구류에 평당 3 l 정도 충분히 뿌려준 다음 24시간 후 환기를 하고 표준누에사육법으로 사육하였다.

Table 1. Standard temperature and humidity for silkworm rearing

Instar	Temperature (°C)	Humidity (%)
1st	29~30	90
2nd	27~28	90
3rd	25~26	85
4th	23~24	75~85
5th	22~23	65~75

2) 접종원 조제 및 누에접종

공시균의 분생포자를 현미배지(250 ml 삼각플라스크)에 접종하여 24°C 항온기에서 20일간 배양된 분생포자를 Tween20(polyoxyethylene sorbitan monolaurate, 0.1 g/500 ml)으로 용해시킨 증류수로 희석하여 3000 rpm에서 5분간 원심하였으며, 얻어진 희석액을 혈구계수기(hemocytometer)로 측정하여 1.0×10^8 spores/ml 농도로 조정하여 5령 누에에(*Bombyx mori*)에 각 100두 3반복으로 처리구당 15 ml 을 살포하고 표준누에 사육법으로 사육하였다.

3. 집누에에 대한 *B. bassiana*의 효율적 접종법

대량 생산을 위한 최적 감염조건 구명을 위해 본시험을 실시하였다. 처리방법은 시험구당 50두 2반복의 5령 기잠 유충에 포자 농도를 1.0×10^7 spores/m과 1.0×10^8 spores/m로 하여 반복당 25 ml/을 살포하였다. 처리는 4개구로 나누어 살포한 후 27°C, 95%의 온·습도를 각각 1시간, 10시간, 15시간, 20시간 유지하였고 대조구는 살포 후 자연 온·습도(25°C, 65%) 상태로 유지하였으며 처리구와 대조구 모두 살포 24시간 후에 급상하였다. 감염율 조사

는 살포 후 24시간 간격으로 감염치사잠의 병징을 육안 및 현미경으로 관찰하였다.

한편 *B. bassiana*의 보존방법에 따른 활력검정을 위하여 PDA배지상 배양균 및 현미배지 배양균을 25°C에서 각각 14일, 20일간 정치 후 4°C, -20°C, -70°C에 3, 6, 9, 12 개월 보존한 후 접종원으로 사용하였다.

4. 농가현지실증시험

분리 배양된 백강균을 농가현지 사육환경조건하에서 5령 기잠때 분무기를 이용하여 12시간과 24시간 후에 각각 1.0×10^8 spores/ml, 1.0×10^7 spores/ml 농도로 1회와 2회 살포하고 감염잠을 조사하였다.

5. 백강잠의 간보호 활성 검정

1) 백강잠 추출물의 제조

백강잠(*B. corpus*) 건조분말 1.5 kg을 메탄올(MeOH)로 상온에서 5회, 60°C에서 3회 반복 추출한 후 추출액을 감압 농축하여 120 g의 메탄올 추출물을 얻었다. 메탄올 추출물을 물(H₂O)에 현탁시킨 후 헥산(hexane) 및 에틸아세테이트(EtOAc)로 분획하고 감압농축하여 헥산 분획(55 g), 에틸아세테이트 분획(6 g) 및 물분획(59 g)을 얻었다(Kwon 등, 2000). 각 분획의 간세포 보호여부는 CCl₄와 galactosamine을 처리한 흰쥐의 일차배양 세포에서 배양액으로 유리되는 glutamic pyruvic transaminase(GPT)의 활성을 각 분획이 얼마나 저해하는지를 측정하여 판단하였다.

2) 흰쥐의 간세포 일차배양

흰쥐의 간세포 분리는 collagenase 관류법을 이용하여 분리하였다. 흰쥐를 urethane(1 g/kg)으로 마취시키고 70% 에탄올로 복부를 소독한 후에 개복하였다. 간문맥에 21 gauge catheter를 삽관하고 신장맥 아래에서 하대 정맥을 자른 후, 0.2 mM EDTA의 HBSS 용액 55 ml를 30 ml/min의 속도로 관류시켜 간 조직내의 혈액을 제거하였다. 흰쥐의 흉강을 열어 상대정맥에 18 gauge catheter 삽관한 다음 하대정맥을 묶어 소화용액이 상대정맥을 통하여 공급용기로 되돌아오는 재순환이 이루어지도록 하였다. CO₂와 O₂ 혼합기체를 공급해주면서 0.05% collagenase(type IV)를 함유한 HBSS로 구성된 소화용액으로 10~15분간 재순환 시켜 간세포를 조직으로부터 분리시킨 다음, 간을 떼어내어 HBSS 80 ml를 가한 후 간막을 가위로 열어서 간세포가 유리되게 한 다음 거어즈로 여과하였다. 여과액을 50 g에서 2분간 2회 원심분리한 후 얻은 pellet을 배양액으로 같은 조건에서 원심분리하여 세포 현탁액을 얻었다. 이렇게 얻은 간세포 현탁액을 5×10^5 cells/ml 농도로 희석하여 collagen을 미리 도포시킨 배양 용기에 이식하

였다. 배양액으로는 Waymouth MB 752/1 medium, 5% fetal bovine serum, 2.0 mg/ml bovine serum albumin (fraction V), 10^{-6} M dexamethasone, 10^{-8} M insulin, 5.32×10^{-2} M L-serine, 4.09×10^{-2} M L-alanine, 2.67×10^{-2} M NaHCO₃, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin 및 50 µg/ml gentamycin sulfate로 구성된 것을 사용하였다. 세포는 37°C 및 5% CO₂ 조건에서 유지하였다.

3) CCl₄과 galactosamine에 의한 독성 유도 및 시료 투여 흰쥐의 간세포를 1.5시간 동안 배양한 후에 새로운 배양액으로 갈아주고 다시 24시간 동안 계속하여 배양한 후 CCl₄ 투여 1시간 전에 검색하고 dimethylsulfoxide(DMSO)로 용해시킨 후에 멸균수로 희석하고 millipore membrane (0.22 µm)을 이용하여 여과시켜 시료를 투여하고 6.6 mM CCl₄를 함유한 배양액으로 80분 동안 처리하여 독성을 유도하였다(Kiso, 1983). 새로운 media로 바꿔준 다음 5시간 후에 GPT 활성을 측정하였다. Galactosamine의 경우는 galactosamine 처리 1시간 전에 시료를 투여 하고 1.5 mM galactosamine를 포함한 media로 14시간 처리하였다. 새로운 media로 바꿔준 후 5시간 후에 GPT 활성을 측정하였다. 대조물질로는 현재 간보호 활성 물질로 사용되고 있는 silymarin과 DDB를 사용하였다. 대조물질 및 각 시료의 간보호 효과는 $100 \times (\text{reference GPT 활성} - \text{sample 처리 GPT 활성}) / (\text{reference GPT 활성} - \text{control GPT 활성})$ 식으로 구했고 대조물질인 silymarin 및 DDB 간보호 효과에 대한 시료의 비율로 표현했다.

4) 간세포의 GPT 활성측정

백강잠(*B. corpus*) 물 추출물을 CMC 0.5%에 현탁하여 20 mg/kg 및 200 mg/kg이 되도록 투여하고, 30분 후에 CCl₄를 olive oil에 20% 용액이 되도록 하고 1.5 ml/kg을 흰쥐 복강 내 투여하였다. 24시간 후에 흰쥐를 ether로 마취하고 개복한 다음 복부하 대정맥에서 채혈하여 혈청을 분리하였다. 이 혈청의 GPT 활성을 측정하여 간보호 효과를 판단하였다. GPT 활성 측정은 세포 독성이 유도된 간세포의 배양액을 취하여 GPT Kit를 사용하여 Reitman-Frankel의 방법(1957)으로 GPT 활성을 측정하였다.

5) 과산화지질 생성 억제

간조직의 분쇄물에 있는 malondialdehyde(MDA)의 량을 thiobarbituric acid(TBA) 방법으로 측정하여 과산화지질 생성 억제 효과를 판단하였다. 1,1,3,3-tetraethoxypropane을 표준물질로 사용하였다. 흰쥐의 간을 적출하여 Tris-HCl buffer(0.1 M)에서 씻어주고 1 g의 간조직을 10 ml의 homogenizing buffer(8 mM Na₂HPO₄, 12 mM NaH₂PO₄,

1.5% KCl, pH 7.4)에서 분쇄하였고, 4°C 및 105,000 g에서 20분간 원심분리 하였다. 500 µl에 1 ml의 10% TCA를 넣고 10분간 방치한 다음 10000 g에서 2분간 원심분리 하였다. 상등액 1 ml를 취하여 TBA(pH 7.0, 0.5%)를 넣고 가열하였다(100°C, 10 min). 상온에서 10분간 방치한 후 535 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 MDA의 양을 단백질의 양으로 나누어 표현하였으며 단백질은 bovine serum albumin을 표준물질로 하여 Bio-Rad 방법으로 측정하였다. 보호 효과는 100×(reference MDA 값 - sample 처리 MDA 값)/(reference MDA 값 - control MDA 값) 식으로 나타내었다.

결과 및 고찰

1. 백강잠 생산을 위한 효율적인 접종법 구명

1) *B. bassiana*의 적정 포자농도 및 습도 유지 시간 구명
본 시험은 백강잠의 대량생산을 위한 *B. bassiana* 101A의 효율적인 접종법을 구명하기 위하여 실시하였다. 이러한 조건을 구명하기 위해서 포자농도를 1.0×10⁸ spores/ml과 1.0×10⁷ spores/ml의 두 농도로 나누어 처리하였으며 접종후 고습도 유지조건(28°C, 95%)을 1시간, 10시간, 15시간, 20시간으로 나누어 처리한 결과 1.0×10⁸ spores/ml의 포자농도에서는 처리 유지시간에 관계없이 모두 97% 이상의 높은 감염율을 보였다. 반면 1.0×10⁷ spores/ml의 포자농도에서는 고습도 유지를 20시간 유지시킨 처리구의 감염율이 93%로 다른 처리 유지시간보다 감염율이 높았으며, 고습도를 1시간~15시간 유지시킨 처리구는 감염율이 73~79%로 낮았다(표 2). 따라서 백강잠 대량생산을 위해서는 1.0×10⁸ spores/ml의 포자농도로 접종함이 효과적이며, 1.0×10⁷ spores/ml 농도로 접종할 경우에는 고습도를 20시간 이상 유지하여야 효과적이었다. 백강잠 생산능가의 *B. bassiana*의 보존기간별 감염율은 접종농도를 1.0×10⁸ spores/ml로 하여 즉시 접종할 경우 99%의 높은 감염율을 보였으나, 혼합액체상태로 60일 보존할 경우

Table 2. Infection ratio of *B. corpus* by *B. bassiana* 101A according to the different concentration by preservation time after inoculation for the mass production

Conc. (spores/ml)	Time (hr.)	Preservation time (hr.) after inoculation			
		1	10	15	20
1.0×10 ⁸	-	98	97	100	100
	Control	97(100)			
1.0×10 ⁷	-	73	73	79	93(131)
	Control	71(100)			

※Times: The 5th instar (spray inoculation).

Table 3. Infection ratio of *B. corpus* (5th instar) by *B. bassiana* 101A according to the different preservation periods

Conc. (spores/ml)	Period (days)	Immediately	30 days preservation		60 days preservation	
			Hulled rice	Mixed liquid	Hulled rice	Mixed liquid
			1.0×10 ⁸	99%	97%	98%
1.0×10 ⁷	75	66	64	58	49	

- 1) Inoculated temperature and humidity : 27°C, 95%.
- 2) Preservation temperature : 4°C incubator.
- 3) Mixed liquid : liquid spawn.

에는 87%의 감염율을 나타내었다. 접종농도를 1.0×10⁷ spores/ml로 할 경우 즉시 접종하면 75%의 감염율을 나타내었으나, 혼합액체상태로 60일 배양하면 49%의 매우 낮은 감염율을 나타내었다(표 3). 따라서 가급적 배양 즉시 포자농도 1.0×10⁸ spores/ml의 현탁액을 조제하여 처리하는 것이 누에 감염율을 높이는 데 유리한 것으로 판단된다.

2) *B. bassiana*의 보존방법에 따른 활력 검정

보관온도 및 보관일수별 활력 검정에서 균주를 4°C에서

Table 4. Infection rate of *B. corpus* by liquid spawn of *B. bassiana* after different preservation periods

Division	Preservation periods				Control
	4°C		25°C		
	20 days	10 days	20 days	10 days	
<i>B. bassiana</i> 101A	79.9%	88.0	3.5	5.3	87.6

Table 5. Infection rate of *B. corpus* by *B. bassiana* preserved various method

Preservation method	Period (month)	Infection rate (%)
Cold preservation (4°C)	3	91(87*)
	6	91(85*)
	9	90(85*)
	12	88(83*)
Deep freezing (-20°C)	3	62
	6	56
	9	60
	12	48
Deep freezing (-70°C)	3	59
	6	47
	9	46
	12	44
Vacum freeze-drying	3	48
	6	51
	9	49
	12	47
Control	-	92

*: Hulled rice (preservation medium).

10일까지 보관시 감염율이 88%로 비교적 높았으나, 상온(25°C 내외)에서 10일 이상 보관시에는 감염율이 급격히 낮았다(표 4). 또한 모균주의 보존기간별 감염율은 4°C에 12개월 보존시에도 초기값과 활력에 차이가 없었으며 감염율 역시 90% 이상으로 균 보관은 4°C에서 12개월까지 보관하여도 활력에는 별 차이가 없었다(표 5).

2. 잠업농가에서의 백강잠 생산

농가 간이잠실 현지실증시험 결과 포자농도를 1.0×10^8 spores/m³으로 접종할 경우 누에의 감염율이 춘기 1회 접종시 62%, 2회 접종시 77%로 2회 접종 처리구에서 24% 높게 나타났다. 포자농도를 1.0×10^7 spores/m³로 하여 접종한 경우는 누에의 감염율이 저하하여 1회 접종시 45%, 2회 접종시 59%의 감염율을 나타내었다(표 6). 후기 접종시에는 춘기에 비하여 감염율이 약간 저하하였으나, 경향치는 춘기와 비슷하였다. 애누에사육실에서의 조사결과는 간이잠실보다는 대체로 높게 나타났으며, 포자농도를 1.0×10^8 spores/m³으로 할 경우 춘기 2회 처리구에서 83%, 후기 2회 처리구에서는 87%의 감염율을 나타내었다(표 7).

Table 6. Infection ratio of *B. corpus* by *B. bassiana* at handy silkworm-raising room of farmers

Conc. (spores/m ³)	Treat.	Infection ratio according to treating times (%)			
		One time		Two times	
		Spring	Autumn	Spring	Autumn
1.0×10^8		62(100)	58	77(124)	75
1.0×10^7		45	41	59	61

1) Inoculation amount : 15 ml/1000 num.

2) Temp.(min.: 12°C, max.: 36°C), Hum.(min.: 56%, max.: 88%).

Table 7. Infection ratio of *B. corpus* by *B. bassiana* at larvae silkworm-raising rooms of farmers

Conc. (spores/m ³)	Treat.	Infection ratio according to treating times (%)			
		One time		Two times	
		Spring	Autumn	Spring	Autumn
1.0×10^8		69(100)	62	83(120)	87
1.0×10^7		44	38	61	69

3. 백강잠의 일반성분 분석

B. bassiana 101A에 감염된 백강잠(*B. corpus*)의 일반성분을 분석한 결과 조단백질이 70.5%, 수분이 7.9%, 조지방이 5.9%, 조섬유가 6.7%, 조회분이 4.2%였으며, 조단백질이 대부분을 차지하였다(그림 1). 또한 17종의 아미노산 분석에서는 숙취해소와 간기능 보호에 좋은 효과가 있는 proline과 alanine이 많이 들어 있었고, 혈중 콜레스

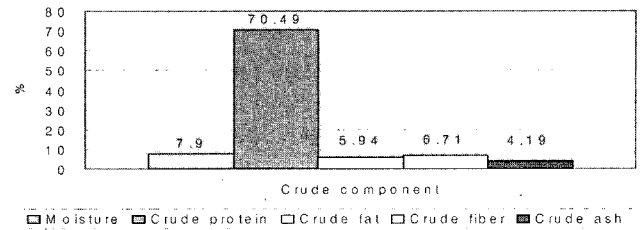


Fig. 1. Analysis of crude components of *B. corpus* infected by *B. bassiana* 101A.

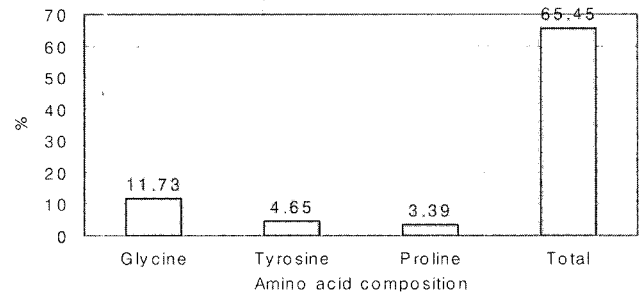


Fig. 2. Analysis of amino acids of *B. corpus* infected by *B. bassiana* 101A.

테롤 저하와 고혈압 및 뇌졸중 예방에 좋은 효과가 있는 glycine과 치매 및 파킨슨씨병 예방에 효과가 있는 tyrosine이 각각 11.7%, 4.7% 들어 있었다(그림 2). 누에와 백강잠의 일반적인 구성성분과 아미노산의 함량비에 대하여 어떠한 성분과 아미노산이 직접 기능성에 영향을 미치는 지에 대해서는 아직 밝혀진 것이 없는 실정이다. 따라서 누에와 백강잠의 어떠한 성분 또는 물질이 직접적으로 기능성 효과를 나타내는 지에 대하여는 앞으로의 연구가 요구되고 있다.

4. 백강잠의 간보호 활성 검정

간세포를 일차 배양하여 독성 유발물질인 CCl₄ 및 galactosamine으로 독성을 유발시키고 백강잠(*B. corpus*)을 투여하여 간보호활성을 측정하였다. Galactosamine으로 독성을 유발한 경우 methanol 총 추출물에서 대조물질인 silymarin과 DDB 대비 각각 24.8%와 45.9%의 보호효과가 있었고 메탄올 총추출물을 분획하여 측정한 결과 H₂O fraction에서 대조물질 대비 각각 43.5%와 65.7%의 간보호효과가 있었다(표 8). 사염화탄소(CCl₄)로 독성을 유발시킨 경우는 총 추출물에서 대조물질 대비 각각 64.8%와 35.8%의 효과가 있었으며 특히 에틸아세테이트분획층(EtoAc fraction)에서는 silymarin보다 간보호 활성이 높은 것으로 나타났다(표 9). *In vivo* 실험에서 백강잠의 물 추출물을 대상으로 하여 간보호 효과를 관찰하였다. CCl₄ 투여시 GPT의 값이 47.09±9.6(IU/L)에서 166.1로 상승하

였으나, 백강잠의 물 추출물을 20 및 200 mg/kg 투여했을 때 84.6±17.0과 72.8±20.8로 낮추어 각각 68% 및 78%의 보호효과를 보였다(표 10). CCl₄는 지질을 과산화 시켜 독성을 나타내는 것으로 알려져 있다. CCl₄ 투여한 흰쥐에서 백강잠의 간보호 효과가 지질의 과산화를 저해하기 때문인지 알기 위하여 간조직의 지질과산화 정도를 측정하였다. CCl₄를 투여했을 때 MDA의 양이 0.24±0.02

(μmole/mg protein)에서 0.69±0.10으로 약 3배 정도 늘었으나 백강잠의 물 추출물을 20 및 200 mg/kg 처리했을 때 0.38±0.05 및 0.36±0.01로서 68%와 73%의 MDA량의 과산화지질 억제 효과가 있었다(표 11).

적 요

이 연구는 백강잠(*B. corpus*)의 대량생산을 위한 *B. bassiana*의 효과적인 접종법을 구명하고 백강잠의 간보호 활성을 조사하기 위하여 실시하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 백강잠 대량생산을 위한 *B. bassiana*의 접종시험에서 포자농도를 1.0×10⁸ spores/ml로 할 경우 접종후 고습도 처리시간에 관계없이 높은 감염율을 나타내었으나, 1.0×10⁷ spores/ml의 농도에서는 감염율이 낮았다.

2. *B. bassiana* 종균의 보관온도 및 보관일수별 활력 검정에서 4°C에서는 12일까지 보관시 감염율 90% 이상 유지하였으나, 상온(25°C 내외) 보관시에는 48시간이 지나면 감염율이 급격히 저하(5% 이하)하였다. 또한 모균주 보존기간별 감염율은 4°C에 12개월 보존시에도 초기값과 활력에 차이가 없었으며 감염율 역시 90% 이상으로 균 보관은 4°C에서 12개월까지 보관하여도 활력에는 별 차이가 없었다.

3. *B. bassiana* 101A의 간기능 보호활성도 측정에서 galactosamine으로 독성을 유발한 처리구에서는 물분획층에서 대조물질 silymarin과 DDB 대비 각각 43.5%, 65.7%의 간보호 회복 효과를 나타냈으며 사염화탄소(CCl₄)로 독성을 유발한 처리구에서는 에틸아세테이트 분획층에서 대조 물질대비 각각 100%, 69.3%의 간보호 회복 효과가 있었다.

인용문헌

- Barnett, H. L. and B. B. Hunter (1986) Illustrated genera of imperfect fungi. Publishing company, New York. and Collier macmillan publishers, London 100~101.
- Doberski, J. W. and H. T. Tribe (1980) Isolation of entomogenous fungi from elm bark and soil with reference to ecology of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Trans. Br. Mycol. Soc., **74**(1): 95~100.
- Edsall, J. T. (1943) Raman spectra of amino acids and related compounds. VI. Sarcosine, ethanalamine, choline, betaine and betaine derivatives. J. Am. Chem. Soc., **65**: 1767.
- Ferron, P. (1967) Etude en la boratoire des conditions ecologiques favorisant le development de lamycose a *Beauveria. tenella* du ver Blanc. Entomophaga **12**(3): 257~293.
- Hefti, F. (1994) Neurotrophic factor therapy for nerve system degenerative diseases, J. Neurobiol., **25**: 1418.

Table 8. Protective effect of *B. corpus* on primary hepatocytes damaged by galactosamine

Fraction layer	Total extract	Hexane fraction	EtoAc fraction	H ₂ O fraction
Control				
Silymarin	24.8 ^{a)}	(-)	(-)	43.5 ^{a)}
DDB ^{b)}	45.9 ^{a)}	(-)	(-)	65.7 ^{a)}

^{a)}The number indicates the protective effect of each fraction relative to the that of Silymarin or DDB.

^{b)}Dimethyl-4,4'-dimethoxy-5,6,5',6'-dimethylenedioxybiphenyl-2,2' dicarboxylate.

Table 9. Protective effect of *B. corpus* on primary hepatocytes damaged by CCl₄

Fraction layer	Total extract	Hexane fraction	EtoAc fraction	H ₂ O fraction
Control				
Silymarin	64.8 ^{a)}	(-)	100 ^{a)}	15.4 ^{a)}
DDB ^{b)}	35.8 ^{a)}	(-)	69.3 ^{a)}	(-)

^{a)}The number indicates the protective effect of each fraction relative to the that of Silymarin or DDB.

^{b)}Dimethyl-4,4'-dimethoxy-5,6,5',6'-dimethylenedioxybiphenyl-2,2' dicarboxylate.

Table 10. The effect of water extract of *B. corpus* on GPT activity of rats treated with CCl₄

Treatment	GPT(IU/L) (%)
Control (Before CCl ₄ treated))	47.0±9.6(100)
Reference (After CCl ₄ treated))	166.1±33.0(0)
Silymarin (2 mg/kg)	69.2±14.1(81)
Water extract of <i>B. corpus</i> (20 mg/kg)	84.6±17.0(68)
Water extract of <i>B. corpus</i> (200 mg/kg)	72.8±20.8(78)

Table 11. The effect of *B. corpus* on MDA contents of liver in CCl₄-intoxicated rats

Treatment	MDA (μmole/mg protein)(%)
Control (Before CCl ₄ treated))	0.24±0.02(100)
Reference (After CCl ₄ treated))	0.69±0.10(0)
Silymarin (2 mg/kg)	0.32±0.03(82)
Water extract of <i>B. corpus</i> (20 mg/kg)	0.38±0.05(68)
Water extract of <i>B. corpus</i> (200 mg/kg)	0.36±0.01(73)

- Isobe, R., M. Inagaki, Y. Harano, H. Sakiyama and R. Higuchi (1997) Structural elucidation of glycosphingolipids by collision-induced dissociation of sodium ion complex. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **45**: 1611~1614.
- Jiang, H., X. Huang, K. Nakanishi and N. Berova (1999) Nanogram scale absolute configurational assignment of ceramides by circular dichroism. *Tetrahedron Letters* **40**: 7645~7649.
- Kiso, Y., M. Tohkin and H. Hikino (1983) Assay method for anti-hepatotoxic activity using carbon tetrachloride induced cytotoxicity in cultured hepatocytes. *Planta Med.* **49**(4): 189~222.
- Krivit, W. and S. Hammarstrom (1972) Identification and quantitation of free ceramides in human platelets. *Journal of Lipid Research* **13**: 525~530.
- Kwon, H. C., H. I. Moon, S. H. Choi, J. O. Lee, S. Y. Cho, I. Y. Jung, S. Y. Kim and K. R. Lee (2000) Cytotoxic constituents of *Bombycis corpus*. *Yakhak Hoeji*, **43**: 169.
- Kwon, H. C., E. J. Bang, S. U. Choi, W. C. Lee, S. Y. Cho, I. Y. Jung, S. Y. Kim and K. R. Lee (2000) Cytotoxic cyclodepsipeptides of *Bombycis corpus* 101A. *Yakhak Hoeji*, **44**: 115.
- Lecuona, R., G. Riba, P. Cassier and J. L. Clement (1991) Alterations of insect epicuticular hydrocarbons during infection with *Beauveria bassiana* or *B. brongniartii*. *J. Invertebr. Pathol.* **58**: 10~18.
- Leifer, A. and E. R. Lippincott (1957) The infrared spectra of some amino acids. *J. Am. Chem. Soc.*, **79**: 5098.
- Lindavall, O., Z. Kokaia, J. Bengzon, E. Elmer and M. Kokaia (1994) Neurotrophins and brain insults. *Trends Neurosci.*, **17**: 490.
- Motohashi, N., I. Mori and Y. Sugiura (1976) ¹³C-Nuclear magnetic resonance and raman spectroscopic studies on ionization and mercury complex of ergothioneine. *Chem. Pharm. Bull.*, **24**: 1737.
- Roberts, D. W. (1989) World picture of biological control of fungi. *Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* **84**(Supl. III): 89~100.
- Samsinakova, A. Y. and E. Hrabetova (1969) Respiration of blastospores of the fungus *Beauveria bassiana* during submersed cultivation in the presence of certain sugar. *J. Invertebr. Pathol.* **13**: 382~385.
- Samsinakova, A. (1966) Growth and sporulation of submersed cultures of the fungus *Beauveria bassiana* in various media. *J. Invertebr. Pathol.* **8**: 395~400.
- Samson, R. A., H. C. Erans and J. P. Latg (1988) *Atlas of Entomopathogenic Fungi*. Springer-Verlags, Berlin.
- Shimazu, M., W. Mitsuhashi and H. Hashimoto (1988) *Cordyceps brongniartii*. *Trans. Mycol. Soc. Japan.* **29**: 323~330.
- Steinhaus, E. A. (1949) *Principles of Insect Pathology*. McGraw-Hill Book, New York.
- Studdert, J. P. and H. K. Kaya (1990) Water potential, temperature, and soil type on the formation of *Beauveria bassiana* soil colonies. *J. Invertebr. Pathol.* **56**: 380~386.
- Tanada, Y. and H. Kaya (1992) *Insect pathology*, Academic press. 357~359.
- Vuillemin, P. (1912) *Beauveria*, nouveau genre de Verticilliacées. *Paris Soc. Bot. Fr. Bull.* **59**: 34~40.
- Bidochka, M. J. and G. G. Khachatourians (1987) Hemocytic defense responds to the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the migratory grasshopper *Melanoplus sanguinipes*. *Entomol. Exp. Appl.* **45**: 151~156.
- Ferron, P. (1985) Fungal control. In *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology*. (G. A. Kerkut and L. I. Gilbert) Vol. 12, pp. 313~346. Pergamon Press, Oxford.
- 島根孝典, 河上 清(1993) 곤충병원사상균 *Beauveria brongniartii*의 蠶および마우스 に対する安全性 について. *J. Seri. Sci. Jpn.* **62**(1): 30~37.
- 清水大典(1994) 原色冬蟲夏草圖鑑. 誠文堂新光社, pp.1~381.
- 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순(1997) *중약대사전*, 완역판, 도서출판 정담, pp.2015.
- 배경숙(1997) *미생물 동정 결과 보고서*. Korean Collection For Type Cultures.
- 조세연, 신국현, 송성규, 성재모(1999) 누에동충하초 생산 및 유용물질 개발. *농촌진흥청*, pp.42~64.