

백강균의 분생자병속 형성 조건

이기만 · 남성희^{1*} · 윤철식 · 전지영 · 여주홍¹ · 이광길¹
주마이코플러스, ¹농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부

Conditions for Formation of Synnemata from *Beauveria bassiana*

Ki-Man Lee, Sung-Hee Nam^{1*}, Cheol-Sik Yoon, Ji-Young Jeon, Joo-Hong Yeo¹ and Kwang-Gill Lee¹
Mycoplus Co., Ltd., Uiwang 437-753; ¹Department of Agricultural Biology, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-707, Korea

ABSTRACT: This study was conducted to investigate optimal conditions for formation of synnemata from *Beauveria bassiana*. The strain of *B. bassiana* was isolated from a host of *Oncotympana fuscata* in Halla mountain of Jeju island. The yield of synnemata was the highest at application of brown rice (90%) and silkworm pupae (10%) media. On the other hand, the other media did not result in formation of synnemata. The highest formation of synnemata was achieved at conditions of moderate air inflow and 20°C. The optimal moisture and light intensity for formation of synnemata were 60% and 300 lux, respectively. In addition, inoculation of the liquid spawn resulted in higher yield than that of asexual spore.

Key words: *Beauveria bassiana*, Synnemata, Culture, Media

초 록: 백강균(*Beauveria bassiana*)의 분생자병속 형성 조건 구명을 위해 본 실험을 수행하였다. 균은 제주도 설악산 일대에서 치사한 참매미로부터 분리되었다. 분생자병속 형성 유도 배지는 현미와 누에번데기를 원료로 하여 90:10 비율로 조제한 경우가 가장 효과적이었으며, 기타 배지 상에서는 분생자병속 발생이 관찰되지 않았다. 분생자병속은 공기 유입량이 최소일 때 형성이 효과적이었으며, 분생자병속 발생의 최적 온도는 20°C, 배지 수분함량은 60% 및 조도 300 lux이었다. 또한, 증식에 활용한 종균은 액체배양균이 무성포자보다 분생자병속 형성에 더욱 효과적이었다.

검색어: 백강균, 분생자병속, 배양, 배지

동충하초를 포함하는 곤충병원성 진균은 겨울에는 벌레 상태로 있다가 여름에 자좌가 돌아나는 특징을 가진다. 즉, 포자 또는 균사가 곤충에 침입한 후 기주 내에 있는 영양원을 이용하여 증식 후 내생균핵을 만든 후 체외로 자좌를 형성한다(Shah and Pell, 2003). 곤충병원성 진균은 세계적으로 약 100속 800여종이 분포하는 것으로 알려져 있다(Kobayasi and Shimizu, 1983; Samson et al., 1988). 그 중 완전세대를 형성하며 자낭균문(Ascomycota)에 속하는 진균으로는 *Cordyceps*속, *Shimizuomyces*속, *Torrubiella*속 등 3속이 알려져 있고, 일명 동충하초라고 할 수 있는 대표적

인 속은 *Cordyceps*이다(Kobayasi, 1982).

*Cordyceps*속은 현재 전 세계적으로 300여종이 분포하는 것으로 알려져 있으며, 백강균(*Beauveria bassiana*), 녹강균(*Metarhizium anisopliae*)과 같은 불완전균문(Deuteromycota)에 속하는 대부분의 곤충병원성진균이 *Cordyceps*속의 불완전세대로 알려져 있다. 이 중 *Paecilomyces tenuipes*는 불완전균류로 자실체는 형성하지 않지만 야생 혹은 인공 배양시 분생자병속(Synnemata)이 용이하게 발생하므로 현재 누에동충하초라는 보급 종으로 국내 대량생산되고 있다(Nam et al., 1999; Ha et al., 2005). 반면 백강균은 자실체 또는 분생자병속을 형성하지 않고 나비목 등의 곤충 기주표면에 균사체와 분생포자 형태로만 성장하기 때문에 현재까지 누에동충하초와 같이 분생자병속 형성에 따른 산업화는

*Corresponding author: creative716@korea.kr
Received February 22 2010; revised March 17 2010;
accepted March 15 2010

어려운 실정이었다.

예로부터 자실체를 형성하는 일부 *Cordyceps*속 동충하초와 이와 관련된 불완전균류들은 중국, 한국, 일본 등 아시아권역에서 한방제로 이용되어 왔다(Jianzhe *et al.*, 1989). 그 대표적인 종은 *C. sinensis*로 박쥐나방 유충을 기주로 하여 자실체를 형성하는데 티베트 등지의 고산지역에서만 발견된다. 이 밖에도 *C. militaris*, *C. martialis*, *C. ophioglossoides*, *C. soborifera*, *C. hawkesii*, *Tolyptocladium* sp. 등이 약용으로 이용되고 있다(Cunningham *et al.*, 1950). 최근에는 생명공학의 발달로 이러한 한방제로부터 생리활성물질 탐색에 관한 연구가 수행되고 있으며, 그 결과 항암 효과 등 다양한 생리활성을 나타내는 nucleoside 유도체인 cordycepin(3'-deoxyadenosin)의 이화학적 특성이 구명되었다(Cunningham *et al.*, 1950, 1951; Hubbel *et al.*, 1985). 또한 *C. sinensis*로부터 D-mannitol, stearic acid, mycose, ergosterol, uracil, adenine, adenosine이 확인되었고 *C. cicadae*로부터 sarcoma 180의 성장을 억제하는 다당류인 galactomannan이 분리되었다. 이 외에도 *C. ophioglossoides*로부터도 항암 활성이 있는 다당류가 분리되었다(Ohmori *et al.*, 1986).

한편 *Cordyceps*속 동충하초에 관한 연구는 다양한 분야에서 수행되어 왔으나, 백강균에 관한 보고는 동의보감 등에서 항암제, 중풍치료제, 항생제, 강장제로 특효가 있다고 전하나 분생자병속 형성이 자연계뿐만 아니라 인공적으로 형성할 수 없었기 때문에 균사체에만 국한되어 왔다. 따라서 백강균 분생자병속의 생리활성 효과와 물질에 관한 체계적 연구가 어려운 실정이었다. 이에 본 연구는 백강균으로부터 분생자병속 형성조건을 구명함으로써(대한민국 특허 제 0468556호) 추후 백강균을 이용한 기능성 연구의 소재로써 다양하게 활용코자 하였다.

재료 및 방법

균 분리 및 접종원

본 실험에 사용한 백강균은 2001년 6월 제주도 한라산에서 참매미(*Oncotympana fuscata*)에 감염된 균을 채집하여 균 분리를 실시하여 사용하였다. 채집된 기주의 일부를 절삭하여 2~3% sodium hypochlorite로 표면 소독을 하고 멸균수로 3회 세척 후 petri dish(SPL, 90×15 mm) 뚜껑에 멸균 테이프고 고정하여 WA(Water Agar) 배지에 포자를 떨어뜨렸다. 분리된 포자는 PDA(Potato Dextrose Agar, Difco)

배지에 접종하여 25°C 배양기에서 14일간 정치 배양 후 4°C 항온기에 보존하였다. 접종원은 PDA 배지에 배양된 분생포자를 PDB(Potato Dextrose Broth, Difco) 배지가 들어있는 250 ml 삼각플라스크에 접종하여 진탕배양기(25°C, 150 rpm)에서 5일간 배양 후 homogenizer(Omni)하여 사용하였다.

배지선발 및 균 접종

백강균의 분생자병속 형성에 적합한 배지 선정을 위해 850 cc PP(polypropylene)병에 현미와 누에번데기, 꿀보리와 누에번데기 그리고 백미와 누에번데기를 혼합하여 총 중량 80 g이 되도록 각각 90:10, 80:20, 70:30으로 조절하고 물 140 ml를 첨가하였다. 배지를 고압멸균기에서 121°C, 30분간 멸균 후 접종원을 접종하여 25°C에서 7일 간 배양하였으며 균사체와 배지의 건조중량을 측정하였다. 이 후 20°C로 조절된 배양기에 30일 간 배양하여 분생자병속의 건조중량을 측정하였다.

배양 조건 조사

호기조건에 따른 분생자병속의 변화를 조사하기 위해 통기량을 일정하게 유지시킨 PP병에 현미와 누에번데기를 72 g 8 g가 되도록 기본배지를 조제 후 물 140 ml를 첨가하고 고압멸균기에서 121°C, 30분간 멸균하였다. 이 후 접종원을 접종하여 25°C에서 7일 간 배양하고 20°C로 조절된 배양기에 30일 간 배양하여 분생자병속의 형태를 관찰하였다. 적정 온도 선발을 위해 기본배지에 접종원을 접종하여 25°C에서 7일 간 배양 후 온도를 10~30°C범위에서 5°C 간격으로 조절하고 30일간 배양하여 분생자병속의 건조중량을 측정하였다. 적정 수분 함량 측정을 위해 기본배지의 수분함량을 50~90%(w/v)범위에서 10% 간격으로 조절하여 접종원을 접종하고 25°C에서 7일간 배양 후 20°C에서 30일간 배양하여 분생자병속의 건조중량을 측정하였다. 광조건 측정을 위해 균사의 배양이 완료된 25°C에서 형광등의 빛을 조도계로 측정하고 900, 600, 300, 0 lux의 빛을 조사(L:D=12:12)하여 20°C에서 30일간 배양 후 분생자병속의 건조중량을 측정하였다.

종균 생산 방법

무성포자의 접종에 의한 분생자병속 형성은 250 ml 삼각플라스크에 수분함량 50%~90%(w/v)까지의 현미 20 g배지에 포자현탁액 2.00×10^8 conidia/ml을 접종하여 25°C에

서 7일간 배양하였다. 이 후 100 ml 멸균수를 첨가하여 shaking 후 포자수를 측정하고 기본배지에 접종하여 분생자병속의 건조중량을 측정하였다. 액체배양으로 생산된 균사체 접종에 의한 분생자병속 형성은 250 ml 삼각플라스크에 100 ml PDB 배지를 만들어 포자현탁액 2.00×10^8 conidia/ml 을 접종하여 25°C 에서 10일간 배양하며 배양기간에 따른 균사체 형성량을 검토하고 이를 평균으로 사용했을 때 분생자병속의 생산성을 측정하였다.

결과 및 고찰

형태적 특성

분리된 균은 Samson *et al.*(1988)이 보고한 백강균의 전형적인 특성을 가진다. 균사에서 분생자병속을 형성하고 그 위에 둥근 플라스크 모양의 phialide를 만들며 그 상단에 긴 목을 형성하는 여러 개의 마디를 형성한다. 분생포자는 이러한 마디의 끝부분에 한개 씩 지그재그 모양으로 발달하여 포도송이와 유사한 형태를 지니며 색깔은 무색이다(Fig.

1 left). 배지 상에서 많은 포자가 생성되기 때문에 육안으로는 밀가루처럼 보이는 것이 특징이다. 분생자병속은 그 길이가 10 cm 이상이며 끝부분에서 가지처럼 갈라진다(Fig. 1 right). 일정한 배양기간이 지나면 그 끝에서 다시 흰색의 균사체가 형성되며 분생포자를 형성한다.

분생자병속 형성 배지

배지로서 현미, 겉보리, 백미를 사용하여 백강균의 균사체와 분생자병속 형성 여부를 알아본 결과는 Table 1과 같이 나타났다. 현미, 겉보리, 백미 모두 누에번데기와의 혼합 비율에 상관없이 균사체 생장이 나타났으며 현미와 겉보리의 균사체 생장이 백미에 비하여 우수하였다. 특히, 현미와 누에번데기, 겉보리와 누에번데기의 혼합 비율이 90:10인 조건에서 균사체가 가장 많이 생산되는 결과가 나타났다. 분생자병속의 경우 겉보리와 백미에서는 전혀 형성되지 않았고 현미에서만 형성되는 결과가 나타났다. 실험 결과 백강균의 분생자병속 생산에 가장 적합한 배지는 현미와 누에번데기의 혼합비율이 90:10인 경우로 나타났다.

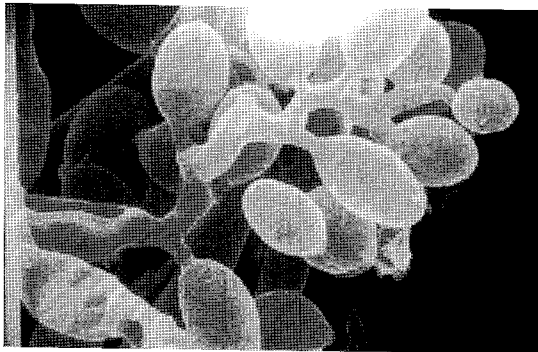


Fig. 1. Scanning electron micrographs (left) and morphological characteristics of synnemata (right) from *Beauveria bassiana*.

Table 1. Effect of different cultural media on the yield of mycelia and synnemata from *Beauveria bassiana*

Media ^a	Rate (%)	Dry weight (g)	
		Mycelia and media	Synnemata
BR+SP	90:10	68.1	25.5±0.50
	80:20	68.9	19.8±1.28
	70:30	54.3	17.2±0.89
HB+SP	90:10	70.2	-
	80:20	66.4	-
	70:30	59.6	-
WR+SP	90:10	45.1	-
	80:20	40.2	-
	70:30	41.9	-

^aBR, Brown rice; HB, Hulled barley; WR, White rice; SP, Silkworm pupae.

최적 배양 조건

통기량이 백강균 분생자병속의 형성에 미치는 영향을 검토한 결과 공기유입량이 많으면 분생자병속을 형성하지 못하고 공기유입량이 적은 경우는 분생자병속을 형성하는 결과가 나타났다. 이는 공기의 유입량이 많을수록 배지 속의 수분이 증발하여 분생자병속의 유발이 저해된 것으로 보인다. 분생자병속 형성 적정 온도에 있어 배양 온도가 10°C, 15°C, 25°C, 30°C의 경우 분생자병속 형성이 되지 않았고 균사체만 자라는 결과가 나타났으며 단, 20°C 하에서만 분생자병속이 형성되었다. 이는 Pen(1995), Choi *et al.*(1999b) 등이 보고한 완전세대사를 가지는 *Cordyceps*속의 자실체 형성 적정온도인 25°C 내외 보다 낮은 온도로서 불완전세대사를 대표하는 백강균의 고유 생리적 특성으로 판단된다. 배지 수분 함량을 50%~90%(w/v) 범위에서 배양한 경우, 수분 60%에서 분생자병속 최대 형성량을 나타내었다(Table 2). 수분함량이 50%, 70%, 80%인 경우 분생자병속 형성이 적었으며 90%의 수분함량에서는 분생자병속을 전혀 형성하지 않았다. 최적의 분생자병속 생산 광조건은 조사량이 300 lux일 경우였으며 조사량이 클수록 분생자병속 생산량이 저하되었다(Table 3). 또한 암조건에서는 분생자

병속은 형성되지 않았다. Basith and Madelin(1968)와 Pen(1995)은 *C. militaria*의 인공자실체 형성에 적합한 조도는 300 lux라고 보고하였으며, Choi *et al.*(1999a)은 *P. tenuipes*의 자실체 형성에는 100~400 lux의 조사량이 요구된다고 보고하였다. 따라서 곤충병원성진균의 배양은 조사량 300 lux 내외의 범위에서 이루어져야 할 것으로 판단된다.

효과적인 종균 생산

현미배지 내 생산된 무성포자 농도는 배지수분 함량이 70%일 때 포자 농도가 4.08×10^8 conidia/ml로 가장 높았고, 이를 종균으로 사용하여 분생자병속의 생산성을 비교한 결과 무성포자 생산 배지의 수분함량이 60%일 때 최대 생산량을 나타내었다(Table 4). 백강균의 액체배양은 PDB 배지에서 배양 시, 배양 기간에 비례하여 균사체 생산량이 증가하였고 균사체 증식량에 따라 분생자병속의 생산량은 비례하였다(Table 5). 백강균 분생자병속 생산용 종균은 액체배양균을 이용한 경우가 무성포자를 이용한 경우보다 분생자병속의 생산량이 증대된 것을 확인하였으며, 이는 동충하초 생산을 위해서는 액체배양이 필수적이라고 보고한 Carilli and Pacioni(1977)의 결과와 일치하였다. 액체배

Table 2. Effect of different moisture content on the yield of synnemata from *Beauveria bassiana*

Moisture content (%)	Dry weight of synnemata (g)
50	5.5±1.23
60	25.5±0.50
70	7.3±1.01
80	6.1±0.44
90	-

Table 3. Effect of different light intensity on yield of synnemata from *Beauveria bassiana*

Light intensity (lux)	Dry weight of synnemata (g)
900	3.0±0.20
600	4.5±0.38
300	25.5±0.50
0	-

Table 4. Effect of inoculation of the asexual spore on the yield of conidia and synnemata.

Moisture content (%)	Yield of conidia (conidia/ml)	Dry weight of synnemata (g)
50	3.57×10^8	2.2±0.32
60	4.01×10^8	3.5±0.13
70	4.08×10^8	2.6±0.21
80	1.97×10^8	1.8±0.11
90	1.65×10^8	1.8±0.09

Table 5. Effect of inoculation of the liquid spawn on the yield of mycelia and synnemata.

Culture period (days)	Dry weight (g)	
	Mycelia	Synnemata
3	0.48	18.5±0.12
4	0.41	18.0±0.18
5	0.72	22.3±0.21
6	0.65	21.0±0.12
7	0.70	24.6±0.07
8	0.89	25.0±0.06
9	0.82	23.9±0.14
10	0.96	24.7±0.26

양에 의한 균사체 접종은 배지 표면에 균일하게 접종되므로 균이 일정하게 증식되면서 분생자병속의 형성이 더 안정적으로 되기 때문으로 판단된다.

백강균은 1838년 Bassi에 의해서 동충하초를 포함하는 곤충병원성진균 중 최초로 발견되었으며(Hawksworth *et al.*, 1995), 지금까지 전 세계에서 백강균에 대한 많은 연구가 진행되고 있으나 균사체로부터 분생자병속 형성에 관한 보고는 없었다. 본 실험은 분생자병속의 유도 및 증식을 확인함으로써 추후 백강균의 기능 탐색을 위한 소재로써 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다. 또한 백강균으로부터 동충하초를 대량 생산할 수 있는 가능성을 마련하게 되어 국내 농가의 소득향상에도 큰 기여를 할 수 있을 것으로 판단된다.

Literature Cited

- Basith, M. and M.F. Madelin. 1968. Studies on the production of perihelical stigmata by *Cordyceps militaris* in artificial culture. *Can. J. Bot.* 46: 473-480.
- Carilli, A. and G. Pacioni. 1977. Growth and sporulation of *Cordyceps militaris* (Linn. Ex Fr.) Link in submerged culture. *Br. Mycol. Soc.* 68: 237-243.
- Choi, I.Y., J.S. Choi and W.H. Lee. 1999a. The production of artificial fruiting body of *Paecilomyces japonica*. *Kor. J. Mycol.* 27: 87-93.
- Choi, I.Y., J.S. Choi, W.H. Lee, Y.J. Yu, G.T. Joung, I.O. Ju and Y.K. Choi. 1999b. The condition of production of artificial fruiting body of *Cordyceps militaris*. *Kor. J. Mycol.* 27: 243-248.
- Cunningham, K. G., W. Manson, F.S. Spring and S.A. Hutchinson. 1950. Cordycepin, metabolic product isolated from cultures of *Cordyceps militaris* (Linn.) Link. *Nature* 166: 949p.
- Cunningham, K. G., S.A. Hutchinson, W. Manson and F.S. Spring. 1951. Cordycepin, a metabolic product from cultures of *Cordyceps militaris* (Linn.) Link. Part I. Isolation and characterization. *J. Chem. Soc.* pp. 2299-2300.
- Ha, N.G., J. H. Kim, J. H. Kang, P. D. Kang, G. B. Sung and I. P. Hong. 2005. Biological activities and cultural characteristics of an entomogenous fungus, *Paecilomyces tenuipes* (Peck) Samson. *Kor. J. Seric. Sic.* 47: 12-17.
- Hawksworth, D. L., P. M. Kirk, B. C. Sutton and D. N. Pegler. 1995. *Dictionary of the fungi*. CAB international. UK. 51p.
- Hubbel, H. R., E. C. Pequignot, D. H. Willis, C. Lee and R.J. Suhadolnik. 1985. Differential antiproliferative actions of 2', 5' oligo a trimer core and its cordycepin analogue on human tumor cells. *Int. J. Cancer* 36: 389-394.
- Jianzhe, Y., M. Xiaoloan, M. Qiming, Z. Yichen and W. Huaan. 1989. *Icons of medicinal fungi from China*. Science Press. China. 575pp.
- Kobayasi, Y. 1982. Keys to the taxa of the genera *Cordyceps* and *Torrubiella*. *Trans. Mycol. Soc. Japan* 23: 329-364.
- Kobayasi, Y. and D. Shimizu. 1983. *Iconography of vegetable wasps and plant worms*. Hoikusha Publishing Company Ltd. Osaka. 280pp.
- Nam, S.H., I.Y. Jung, S.D. Ji and S.Y. Cho. 1999. Cultural condition and morphological characteristics of *Paecilomyces japonica* for the artificial cultivation. *Kor. J. Seric.* 41: 36-40.
- Ohmori, T., K. Tamura, S. Tsuru and K. Nomota. 1986. Antitumor activity of protein-bound polysaccharide from *Cordyceps ophioglossoides* in mice. *Jpn. J. Cancer Res.* 77: 1256-1263.
- Pen, X. 1995. The cultivation of *C. militaris* fruitbody on artificial media and the determination of SOD activity. *Acta Edulis Fungi* 2: 25-28.
- Samson, R.A., H.C. Evans and J.P. Latge. 1988. *Atlas of Entomopathogenic Fungi*. Springer. Heidelberg.
- Shah, P.A. and J.K. Pell. 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61: 413-423.