

백강균(*Beauveria bassiana*)의 균사체 최적 배양조건 및 효소활성

민응기¹ · 한영환*

동국대학교 자연과학대학 생물학과, ¹신화제약(주)

백강균(*Beauveria bassiana* DGUM 34001)은 24°C의 온도와 pH 7.0의 초기 pH에서 최적의 균사체 생육을 나타내었다. 사용한 복합배지 중 mushroom complex배지(MCM)에서 가장 우수한 균사 생육을 나타내었다. Czapek-Dox 한천배지를 최소배지로 각각 탄소원, 질소원 및 인산원의 영향을 조사한 결과, glucose, soytone 및 sodium phosphate (NaH_2PO_4)에서 가장 우수한 균사 생육을 보여주었다. MCM 액체배지에서 균사 배양 후 세포의 효소 활성을 측정된 결과, α -amylase, lipase, chitinase, CMCase 및 protease의 비효소활성은 각각 297.0, 0.058, 0.33, 0.21 및 22.8 units/mg protein이었다. Casein과 soluble chitosan을 첨가할 경우 세포의 분비 protease와 chitinase의 효소 활성이 증가되었다.

Key words □ *Beauveria bassiana*, enzyme activity, mycelial growth, stimulation

*Beauveria bassiana*는 여러 종류의 곤충(누에나방, 메뚜기과, 매미과 등)의 유충, 번데기, 성충의 몸에 기생하여 백색 분말상의 공중 균사와 분생 포자가 곤충의 몸체를 뒤덮는다. 생육시에는 백색이나 건조하면 회황색이 된다. 누에와 누에 번데기에 기생한 백강균을 각각 백강잠(*Bombyx batryticatus*)과 백강용이라 하여 한약재로 널리 사용되어 왔다(3).

지금까지 알려진 곤충병원성 진균은 *B. bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Hirsutella thompsonii*, *Paecilomyces fumosoroseus* 등 약 400여종이 보고되고 있다. 일반적으로 곤충 병원성 진균의 살충 기작은 포자가 곤충 외벽 표면에 달라붙어 적절한 조건에서 발아될 때 일어난다. 침입도구인 부착기로 큐티클층을 통과하거나 분생포자에서 발아한 발아관이 직접 큐티클층을 통과하여 곤충내부로 침입하게 되는데, 이때 물리적인 작용과 lipase, protease, chitinase 등 효소작용이 함께 일어난다. 곤충내부로 침입한 진균은 균사로 성장하여 출아포자를 형성한 후 독성 대사 물질을 분비, 숙주를 죽이게 되는데 *B. bassiana*의 경우 beauvericin이라는 독성물질을 분비한다(8). 현재 *B. bassiana*의 경우 이러한 독소 분비 조건에 대한 연구(5,9,11), protease 및 chitinase 효소의 특성과 분비에 관한 연구(6,12) 그리고 대량배양 및 포자를 생산하는 방법에 관한 연구(7) 등이 중점적으로 연구·보고 되고 있다.

본 연구는 감염된 곤충병원성 진균 *B. bassiana* DGUM 34001을 생물학적 살충제로 사용할 수 있는지 알아보기 위하여, 균사 생육 및 효소활성의 특징을 분석하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 재료

본 실험에서 사용한 균주는 경주시 석장동에서 채집한 사마귀에서 분리하여 동정된 *B. bassiana* DGUM 34001을 사용하였다(1). 실험에 사용한 배지용 시약은 Difco사에서, 효소활성 측정에 사용한 기질과 탄소원, 질소원, 인산원 등의 시약은 Sigma에서 특급 및 일반시약을 구입하여 사용하였다.

배양조건

균사 생육에 영향을 미치는 물리화학적 조건을 결정하기 위해 yeast-malt extract glucose 배지(YMG: 4% yeast extract, 10% malt extract, 4% glucose)를 이용하여 배양 온도 및 초기 pH 조건을 각각 결정하였다. 각 영양원 첨가에 따른 균사 생육의 영향을 알아보기 위해 Czapek-Dox 한천배지(CD: 3.0% glucose, 0.3% NaNO_3 , 0.1% K_2HPO_4 , 0.05% NaCl , 0.05% KCl , 0.001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)에 3.0%의 탄소원, 0.5%의 질소원, 0.1%의 인산원을 각각 첨가하여 사용하였다. 사용한 모든 배지는 121°C에서 20 분간 멸균하여 사용하였다.

균사 생육의 측정

YMG 한천배지에서 전 배양된 균사를 cork borer (직경, 8 mm)로 떼어내어 한천배지상에 올려 놓은 후, 24°C에서 7 일간 배양한 다음 성장한 균사의 직경을 측정하였다. 실험은 3회 이상 반복 수행하여 colony 직경의 평균 및 표준편차를 구하여 균사 생육의 최적 생장 조건을 결정하였다.

효소 활성의 측정

세포의 분비 효소의 특성을 알아보기 위해 전배양된 균사를

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 054-770-2213, Fax: 054-770-2515
E-mail: yhhan@dongguk.ac.kr

mushroom complex 배지(MCM)에 접종한 다음 24°C에서 10 일 간 진탕배양(120 rpm)하였다. 배양 후 여과지(Toyo No. 2)를 이용하여 균사와 배양액을 분리한 다음 배양여액을 조효소원으로 세포의 분비 α -amylase, β -glucosidase, xylanase, CMCase 및 chitinase의 효소활성을 측정하였다(4). 여러 종류의 유기질소원과 chitin류를 각각 첨가하여 배양한 후, 세포의 분비 protease 및 chitinase의 효소활성 증가를 측정하였다.

결과 및 고찰

균사체 최적 배양조건

B. bassiana DGUM 34001의 균사생장의 최적 온도 규명을 위하여 20~37°C에서 균사를 배양한 결과, 24°C에서 가장 우수한 균사 생장을 나타내었다(Fig. 1-A). 초기 pH의 영향은 pH 5.0~12 범위에서 결정하였다. 실험한 전범위의 초기 pH에서 균사생장에 큰 차이를 나타내지 않았다(Fig. 1-B).

실험에 사용된 복합배지에 따라 다양한 균사 생장을 나타내었

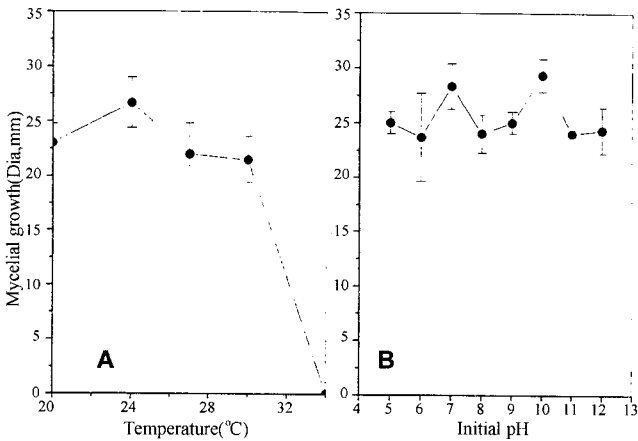


Fig. 1. Effect of temperature (A) and initial pH (B) on mycelial growth of *B. bassiana* DGUM 34001. The mycelia were cultivated for 7 days in YMG agar

Table 1. The mycelial growth of *B. bassiana* DGUM 34001 on various complex media

Source	Mycelial growth (Dia, mm)	Source	Mycelial growth (Dia, mm)
PDM ^a	19.5 ± 5.0	MMM	19.0 ± 0
CDM	15.0 ± 0	MCM	25.0 ± 1.7
YMGM	21.3 ± 1.2	SDPYM	24.0 ± 2.8
GYTM	22.0 ± 3.6	SM	21.3 ± 1.2

^aPDM; potato dextrose medium, CDM; Czapek-Dox medium, YMGM; yeast-malt extract glucose medium, GYTM; glucose-yeast extract-tryptone medium, MMM; mushroom minimal medium, MCM; mushroom complex medium, SDPYM; sabouraud dextrose peptone yeast extract medium, SM; starch medium.

Table 2. Utilization of carbon, nitrogen, phosphorus sources on mycelial growth *B. bassiana* DGUM 34001

Source	Mycelial growth (Dia, mm)	Source	Mycelial growth (Dia, mm)
Carbon source (3.0%)^a			
Starch	21.3 ± 1.2	Glucose	22.7 ± 1.6
Cellulose	20.0 ± 0	Galactose	12.0 ± 0
CMC	19.3 ± 0.6	Mannose	20.3 ± 0.6
Lactose	21.0 ± 0	Glycerol	20.3 ± 0.6
Maltose	22.0 ± 0.6	Fructose	18.0 ± 2.8
Sucrose	21.3 ± 1.2	Xylose	9.0 ± 0
Organic nitrogen source (0.5%)			
Soytone	32.3 ± 2.1	Malt extract	26.6 ± 2.3
Tryptone	31.0 ± 0	Yeast extract	30.3 ± 1.2
Peptone	31.0 ± 2.0	CSL	28.0 ± 1.0
Phosphorus source (0.1%)			
KH ₂ PO ₄	23.3 ± 1.5	Na ₂ HPO ₄	23.3 ± 1.5
K ₂ HPO ₄	27.0 ± 1.0	(NH ₄) ₂ PO ₄	20.0 ± 1.0
NaH ₂ PO ₄	28.3 ± 1.5	NH ₄ H ₂ PO ₄	23.3 ± 1.5

^aThe mycelia were growth at 24°C for 7 days in Czapek-Dox agar plate (pH 7.0) supplemented with 3.0% of each carbon source.

으며, 그 중 MCM에서 평균적으로 가장 우수한 균사생장을 나타내었다(Table 1). CD 한천배지를 최소배지로 탄소원을 3.0% 첨가하여 균사생장에 미치는 탄소원의 영향을 실험한 결과, 당당류에서는 glucose, 이당류에서는 maltose, 다당류에서는 starch가 균사생장에 가장 우수한 탄소원임을 나타내었다(Table 2). 유기질소원이 균사 생장에 미치는 영향을 실험한 결과, 사용된 유기질소원으로 soytone이 가장 우수하였으며(Table 2), 인산원으로 sodium phosphate (NaH₂PO₄)가 가장 우수하였다(Table 2). 각 첨가조건에 따르는 *B. bassiana* DGUM 34001 균사의 생육밀도는 유사하였다.

세포외 분비 효소활성

B. bassiana DGUM 34001이 생산하는 세포외 분비 효소의 활성은 다른 효소의 활성에 비해 α -amylase가 가장 우수하였으며(297.0 unit/mg protein), protease 효소활성 또한 우수하였다(22.8 unit/mg protein). 곤충병원성 진균인 녹강균(*M. anisopliae*)의 세포외 α -amylase 및 protease 효소의 활성이 우수하다는 박 등(2)의 결과와 유사하였다. 곤충의 감염시 protease, chitinase, lipase 효소는 곤충 외골격의 분해에 중요한 역할을 한다. 이러한 효소의 활성은 곤충병원성 진균의 병원성 결정에 중요한 요인이 된다. 분리균 *B. bassiana* DGUM 34001의 경우 protease의 비활성도는 높았으나 상대적으로 lipase, chitinase 효소활성은 미흡하였다(0.058, 0.33 unit/mg protein). CMCase 효소 비활성도는 0.21 unit/mg protein이었으나, β -glucosidase 효소의 활성은 나타나지 않았다(Fig. 2).

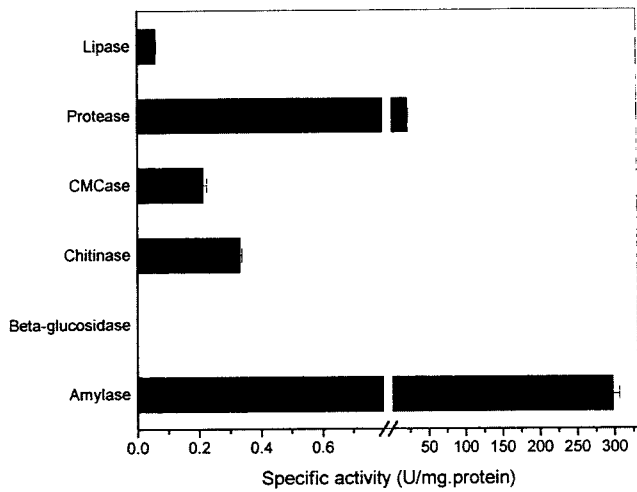


Fig. 2. The specific activity of extracellular enzyme in culture broth of *B. bassiana* DGUM 34001.

Table 3. Effect of organic nitrogen, chitin and DGUM chitosan on specific activity of extracellular enzyme of *B. bassiana* DGUM 34001

Enzyme	Source	Specific activity (unit/mg protein)
Protease	Control ^a	14.8
	Malt extract	14.7
	Gelatin	30.9
	Yeast extract	21.3
	Casein	59.2
	Peptone	14.5
	Tryptone	6.02
	Chitinase	Controla
Chitinase	Chitin	0.02
	Soluble chitosan	0.36
	Insoluble chitosan	0.01

^aNo supplementation to CD medium.

유기질소원과 chitin류를 첨가하여 세포외 분비 protease와 chitinase의 효소활성을 유도한 결과, yeast extract, casein 및 gelatin을 첨가하였을 때 protease 효소 활성이 증가하였다(Table 3). 이는 유기질소원 및 단백질 첨가에 따라 곤충병원성 진균류의 protease 효소 활성이 증가한다는 보고와 일치하였다(10). Chitin류를 첨가하여 chitinase 효소활성을 유도하여 실험한 결과, soluble chitosan을 첨가시 상대적으로 높은 chitinase 활성을 나타내었다(Table 3). 본 연구의 효소학 및 배양학적 특성은 추후 *B. bassiana* DGUM 34001를 이용하여 생물학적 방제제로서의

이용성과 균사체를 사용하는 생리활성 물질의 생산에 응용될 수 있다.

감사의 글

본 연구는 동국대학교 전문학술지 논문게재연구비 지원으로 이루어졌으며 연구비를 지원하여준 동국대학교에 감사드립니다.

참고문헌

- 김기영, 이재동, 민웅기, 한영환. 2001. 곤충병원성 진균 *Beauveria*속의 동정 및 계통분석에 관한 연구. 한국균학회지, manuscript to be submitted.
- 박영일, 한영환. 2000. 녹강균(*Metarhizium anisopliae*)의 최적 배양조건 및 효소활성. 미생물학회지. 36, 97-102.
- 박완희, 이호득. 1996. 한국약용버섯도감. 교학사.
- 이창윤, 홍운표, 정명준, 한영환. 1998. 송이균(*Tricholoma matsutake*) 배양액의 세포외 효소 활성. 한국균학회지. 26, 496-501.
- Boucias, D.G., I. Mazet, J. Pendland, and S.Y. Hung. 1995. Comparative analysis of the *in vivo* and *in vitro* metabolites produced by the entomopathogen *Beauveria bassiana*. *Can. J. Bot.* 73, 1092-1099.
- Bidochka M.J. and G.G. Khachatourians. 1987. Purification and properties of an extracellular protease produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl. Env. Microbiol* 53, 1678-1684.
- Campbell, R.K., G.L. Barnes, B.O. Cartwright, and R.D. Elkenbary. 1983. Growth and sporulation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in a basal medium containing various carbohydrate sources. *J. Inverteb. Pathol.* 41, 117-121.
- Goettel, M.S., R.J. St. Leger, N.W. Rizzo, R.C. Staple, and D.W. Roberts. 1989. Ultrastructural localization of a cuticle-degrading protease produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* during penetration of host (*Manduca sexta*) cuticle. *J. Gen. Microbiol.* 135, 2233-2239.
- Jeffs, L.B. and G.K. George. 1997. Toxic properties of *Beauveria bassiana* pigments on erythrocyte membranes. *Toxicol.* 35, 1351-1356.
- Kucera, M. 1971. Toxins of the entomophagous fungus *Beauveria bassiana* II. Effect of nitrogen sources on formation of the toxic protease in submerged culture. *J. Inverteb. Pathol.* 17, 211-215.
- Sumita, S., G.P. Agarwal, and R.C. Rajak. 1992. Effect of temperature, pH and light on toxin production by *Beauveria bassiana*. *Indian J. Exp. Biol.* 30, 918-919.
- Suresh, P.V. and M. Chandrasekaran. 1999. Impact of process parameters on chitinase production by an alkalophilic marine *Beauveria bassiana* in solid state fermentation. *Proc. Biochem.* 34, 257-267.

(Received November 27, 2001/Accepted February 28, 2002)

ABSTRACT: Optimal Condition for Mycelial Growth of *Beauveria bassiana* and Its Extracellular Enzyme Activity

Eung-Gi Min¹ and Yeong-Hwan Han* (Department of Biology, College of Natural Science, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Korea, ¹Shin-Hwa Pharm. Research Inst., Daegu 704-808, Korea)

The optimum temperature and pH for mycelial growth of *B. bassiana* DGUM 34001 were 24°C and pH 7.0, respectively. Among the complex media used, mushroom complex medium (MCM) was the most favorable for mycelial growth. When Czapek-Dox medium was used as a minimal medium, glucose was an excellent source for carbon and energy. Soytone and sodium phosphate were favorable constituent for culture medium as a source of organic nitrogen and phosphorus, respectively. When the fungus was grown in MCM broth, the specific activity of extracellular enzyme of α -amylase, lipase, chitinase, CMCase and protease were 297.0, 0.058, 0.33, 0.21 and 22.8 units/mg protein, respectively. When various sources of organic nitrogen and chitin were supplemented to determine the production of enzymes, casein and soluble chitosan enhanced the production of extracellular protease and chitinase.