

Beauveria bassiana 대량배양을 위한 탄소원, 질소원 및 고체 기질 선발

김정준* · 한지희 · 이상엽

농촌진흥청 국립농업과학원 농업미생물과

Selection of Carbon, Nitrogen Source and Carrier for Mass Production of *Beauveria bassiana*

Jeong Jun Kim*, Ji Hee Han and Sangyeob Lee

Agricultural Microbiology Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Jeonju 565-851, Korea

ABSTRACT : For mass production of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* 149, isolated from moth larva, by two-phase fermentation, we performed selection of carbon and nitrogen sources for liquid culture and examined solid fermentation on carrier, ingredient, temperature, and water content. Spore production with rice powder, corn powder, and starch from sweet potato was higher than that of sucrose and dissolvable starch for liquid fermentation as first-phase fermentation. As a nitrogen source, addition of peptone and yeast powder showed higher spore production than NaNO_3 , fish powder, and soybean powder. The isolate produced more conidia in sawdust + wheat bran + corn powder, sawdust + wheat bran and rice shell + wheat bran as carrier and ingredient than vermiculite as carrier. Conidia production of *B. bassiana* 149 in solid-phase fermentation was twice higher at 30 than 20. Conidia yield was higher at 60% and 70% water content (26.9×10^8 and 38.6×10^8 conidia/g) than 40% and 50% (13.9×10^8 and 11.6×10^8 conidia/g), respectively.

KEYWORDS : Entomopathogenic fungi, Mass production, Two-phase fermentation, Water content

서 론

작물의 병해충 방제용 농약은 장기간 또는 과다사용 시 병해충의 저항성 발현과 환경오염 등의 부작용을 일으키는 것으로 알려져 있다. 이러한 문제 해결을 위해 미생물을 이용한 해충방제가 그 대안으로 제시되고 있고, 전 세계적으로 해충 방제용으로 등록된 곰팡이 살충제는 171 품목으로 나방류, 딱정벌레목, 진딧물, 가루이 등의 해충

방제에 많이 사용되고 있다[1]. 국내에는 3 종의 곰팡이 살충제가 등록되어 있다.

해충방제를 위해 곤충병원성 곰팡이를 작물에 살포할 때는 일반적으로 고농도의 포자를 살포한다[2]. 따라서 살충성 곰팡이 포자의 대량생산은 곰팡이 살충제를 개발하는데 우선적으로 해결되어야만 하는 핵심 사항이다. 곤충병원성 곰팡이 포자의 대량 배양에는 일반적으로 3가지 방법[고체 배양, 액체 배양, 액체-고체 배양의 2단계 배양법(two-phase fermentation)]이 사용되고 있다. 고체 배양은 곤충병원성 곰팡이의 포자 생산에 가장 많이 사용되는 방법으로 기질로 보리, 쌀 등의 곡물을 사용하고 있다. 액체 배양은 출아포자(blastospore) 생산에 주로 사용되는 방법이고, 배지에 glucose, lecithin 등을 첨가하면 곤충병원성 곰팡이의 포자 생산량이 증가되는 것으로 보고되어 있다[3-5]. *Beauveria brongniartii* 는 yeast extract와 peptone을 액체 배지에 첨가하였을 때 포자 생산이 증가되었으며[6], casamino acid를 첨가한 배지에서 *Metarhizium anisopliae*는 포자 생산이 증가될 뿐 만 아니라 포자의 병원성도 증진되었다[7]. 이와 같이 곤충병원성 곰팡이 포자는 기질과 첨가제의 조합에 따라 포자 생산량이 달라 각 균주에

Kor. J. Mycol. 2014 December, 42(4): 328-332
<http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2014.42.4.328>
pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
© The Korean Society of Mycology

*Corresponding author
E-mail: jjkim66@korea.kr

Received November 23, 2014
Revised December 9, 2014
Accepted December 13, 2014

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

대한 적절한 대량 배양 배지 및 배양 조건 선발이 필요하다. 또한 고체 배양에 의한 포자 생산량은 기질의 종류 [8], 수분 함량, 온도 [9] 등의 영향을 받는 것으로 보고되어 있다. 한편, 유용 미생물의 대량 배양을 위한 배지의 조건으로는 저렴하고 이용하기 쉬운 재료들이어야 한다.

따라서 본 연구에서는 나방류 해충 방제를 위해 병원성이 확인된 곰팡이 *B. bassiana* 균주의 실용화 연구의 준비 단계로 대량 배양을 위한 저렴하고 간편한 배지 선정을 위한 탄소원, 질소원 및 기질 선발 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

실험 균주

곰팡이에 감염된 나방 유충에서 분리된 *B. bassiana* 149 균주는 감자한천배지(Potato Dextrose Agar, PDA)에 도말하여 분생포자를 분리하여 10% 글리세롤 용액에 넣어 -80°C에 보관하였다. *B. bassiana* 149 균주는 PDA 배지에 접종하여 25±1°C, 10~14일 간 배양하여 형성된 분생포자를 실험에 사용하였다.

탄소원 및 질소원 선발

Beauveria bassiana 149 균주 대량 배양을 위한 적정 탄소원 선발을 위해 배양 10~14일된 분생포자 현탁액(1×10^5 conidia/mL) 2 mL을 탄소원으로 자당(sucrose), 쌀가루(rice powder), 옥수수 분말(corn powder), 전분(starch from sweet potato), 또는 수용성 전분(dissolvable starch)과 질소원으로 1% peptone가 혼합된 액체 배지(100 mL)에 접종하여 25±1°C, 150 rpm으로 3일간 1차 배양하였다. 1차 배양액은 100 g의 고체배지(6 쌀겨 : 4 밀기울)에 혼합하여 25±1°C, 12일간 배양한 후 고체배지 5 g을 수거하여 멸균된 5 mL 0.05% Tween 80에 넣고 1분간 현탁하여 혈구계수기를 이용하여 포자수를 계수하였다. 질소원 선발은 1% 질산나트륨(NaNO_3), 어분(fish powder), 효모분말(yeast powder), peptone, 또는 대두분말(soybean powder)과 탄소원으로 4% sucrose가 혼합된 액체 배지에 위와 동일한 방법으로 균을 접종, 배양하여 포자 생산량을 조사하였다. 이 실험은 3회의 각기 다른 시기에 수행되었으며, 매 실험마다 3개의 반복을 가지고 수행하였다.

고체배양용 carrier 및 첨가제 선발

고체 배지 기질 선발을 위해 1차 액체 배양은 4% 쌀가루 + 1% 대두분말의 액체배지에 위와 같은 방법으로 균을 접종하여 3일 동안 배양한 후, carrier와 첨가물이 6:4로 혼합된 고체배지(100 g)에 접종하여 10일간 배양한 후 생산된 포자수를 위와 같은 방법으로 조사하였다. 이 실험에 사용된 carrier는 쌀겨(rice shell), 질석(vermiculite), 톱밥(sawdust)이며, 첨가물로는 밀기울(wheat bran), 옥수수 분말(corn powder) 그리고 밀기울+옥수수 분말 혼합 가루가

사용되었다. 기질 선발 및 첨가제 선발을 위한 대조군으로 백미가 사용되었다. 모든 기질은 균 접종 전 멸균을 실시하였다. 이 실험은 3회의 각기 다른 시기에 수행되었으며, 매 실험마다 3 반복 수행하였다.

고체배양 적정온도 및 수분함량

고체배양을 위한 적정 온도 및 수분함량 선발을 위해 1차 액체 배양은 4% 쌀가루+1% 대두분말 배지에 3일 간 배양한 접종원을 쌀겨 6 : 밀기울 4 비율의 고체 배지에 수분함량이 40%, 50%, 60%, 70%가 되도록 접종한 후, 각각을 20°C, 25°C 그리고 30°C에 10일간 배양한 후 포자생산량을 위와 동일한 방법으로 조사하였다. 이 실험은 3회의 각기 다른 시기에 수행되었으며, 매 실험마다 3 반복 수행하였다.

통계 분석

처리간의 차이는 SAS사의 통계 패키지 중 PROC GLM을 이용하여 분석되었다. 분석은 각 반복을 종합하여 분석하였으며, 처리 간의 차이는 Fisher's LSD (Least Significant Difference)의 다중비교를 이용하여 분석하였다.

결 과

액체 배양을 위한 영양원

Beauveria bassiana 149 균주의 1차 액체 배양을 위한 적정 탄소원 선발 결과, 포자 생산량은 옥수수 분말, 전분 그리고 쌀가루를 이용한 배지가 자당이나 수용성 전분 보다 통계적으로 유의하게 높게 나타났다($F=6.43$; $df=4, 10$; $P > F=0.0079$)(Fig. 1). 질소원별 포자 생산량은 펩톤과 효모분말 배지에서 20.9×10^8 conidia/g와 17.8×10^8 conidia/g로

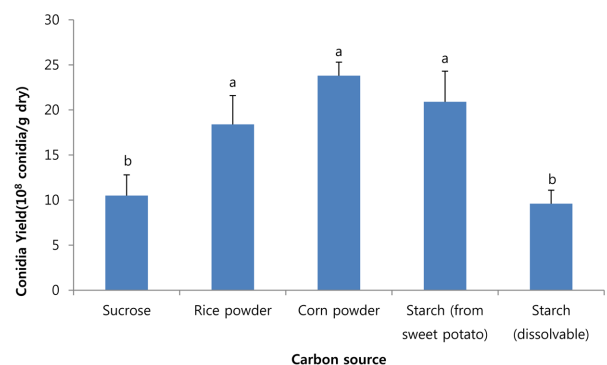


Fig. 1. Influence of different carbon sources on spore production of *Beauveria bassiana* 149. The *B. bassiana* 149 was cultivated in liquid media containing 1% peptone as nitrogen source and 4% of different carbon sources for 3 days and in solid media containing 6 rice shell : 4 wheat bran (v/v or w/w) for 12 days. Means ($\pm$ SE) followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$, LSD Test).

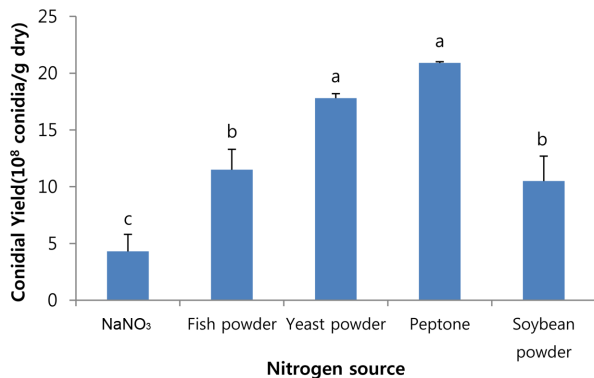


Fig. 2. Influence of different nitrogen sources on spore production of *Beauveria bassiana* 149. The *B. bassiana* 149 was cultivated in liquid media containing 4% sucrose as carbon source and 1% of different nitrogen sources for 3 days and in solid media containing 6 rice shell : 4 wheat bran (v/v or w/w) for 12 days. Means ($\pm$ SE) followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$, LSD Test).

가장 높았으며, 어분(11.5×10^8 conidia/g), 대두 분말(10.5×10^8 conidia/g) 그리고 질산나트륨(4.3×10^8 conidia/g) 순이었다($F=19.86$; $df=4, 10$; $Pr > F=0.0001$)(Fig. 2).

고체 배양을 위한 기질 및 첨가물

Beauveria bassiana 149 균주의 포자대량 생산을 위한 기질 및 첨가물 선발 실험을 수행한 결과, 포자 생산량은 톱밥+밀기울+옥수수 분말 혼합 배지에서 19.7×10^8 conidia/g로 가장 높았으며, 톱밥+밀기울과 쌀겨+밀기울 배지에서 15.2×10^8 conidia/g와 16.3×10^8 conidia/g이었다. 질석을 기질로 하는 처리에서 포자 생산량은 $6 \sim 8 \times 10^8$ conidia/g으로 가장 낮게 나타났다($F=10.96$; $df=8, 17$; $Pr > F=0.0001$)(Table 1). 실험에 사용된 세 가지 기질 모두 밀기울과 옥수수 분말 두 가지가 동시에 첨가된 경우 포자 생산량이 가장 높았으며, 밀기울 단독 첨가의 포자 생산량이 옥수수 분말 첨가보다 높았으며, 무처리 대조로 사용된 쌀의 생산량은 첨가제가 처리된 구에 비해 상당히 낮았다.

고체 배양을 위한 온도 및 기질 수분함량

Beauveria bassiana 149 균주의 포자 대량 생산을 위한

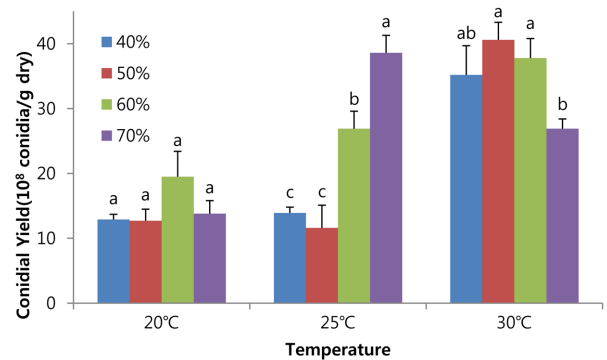


Fig. 3. Influence of temperature and water content on conidia production of *Beauveria bassiana* 149. The *B. bassiana* 149 was cultivated in liquid media including 4% rice powder + 1% soybean powder for 3 days and in solid media containing 6 rice shell : 4 wheat bran (v/v or w/w) for 10 days at different combination of 20°C, 25°C and 30°C and 40%, 50%, 60% and 70% water content. Means ($\pm$ SE) followed by different letters at the same temperature are significantly different ($p < 0.05$, LSD Test).

고체 배양 온도를 조사한 결과, 포자 생산량은 30°C 배양에서 $26 \sim 41 \times 10^8$ conidia/g로 20°C의 $12 \sim 20 \times 10^8$ conidia/g보다 2배 정도 높은 경향을 보였다. 30°C와 25°C 배양시 포자 생산량은 습도에 영향을 많이 받는 것으로 조사되었다. 149 균주의 포자 생산량은 25°C, 수분함량 60%와 70%에서 배양시 26.9×10^8 conidia/g와 38.6×10^8 conidia/g로 40%와 50%의 13.9×10^8 conidia/g와 11.6×10^8 conidia/g보다 상당히 높았다($F=24.15$; $df=3, 8$; $Pr > F=0.0002$)(Fig. 3). 30°C에서 균주 배양 시 포자 생산량은 20°C와 25°C와 달리 수분함량에 따라 차이가 없었다($F=3.56$; $df=3, 8$; $Pr > F=0.0669$).

고찰

친환경 해충 방제용으로 살충성 곰팡이를 사용하기 위해서는 고병원성 균주를 선발, 확보하는 것도 중요하지만 선발된 균주를 사용하기 위한 대량생산 방법을 확립하는 것도 중요하다. 곤충병원성 곰팡이의 대량배양을 위해서

Table 1. Conidia production of *Beauveria bassiana* 149 with different carriers and ingredients for solid-phase fermentation

Ingredient	Number of conidia ($\times 10^8$ conidia/g dry wt., mean $\pm$ SE)			
	Carrier			
	Rice	Rice shell	Vermiculite	Sawdust
-	4.2 $\pm$ 0.3 d	-	-	-
Wheat bran	-	16.3 $\pm$ 2.2 ab	7.1 $\pm$ 0.6 d	15.2 $\pm$ 0.5 ab
Corn powder	-	ND	6.1 $\pm$ 0.3 d	12.3 $\pm$ 2.1 bc
Wheat bran + corn powder	-	14.7 $\pm$ 0.9 b	8.3 $\pm$ 0.1 cd	19.8 $\pm$ 3.7 a

^aMeans ($\pm$ SE) followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$, LSD Test).

는 일반적으로 액체 배지에서 1차 배양한 곰팡이를 고체 기질에서 2차 배양하는 2단계 발효법(two-phase fermentation)이 이용되고 있다.

국내에서 선발된 진딧물 고병원성 곰팡이 *B. bassiana* 균주는 탄소원과 질소원으로 옥수수 분말과 옥수수 액을 사용한 액체배지에서 출아포자 생산량이 가장 높은 것으로 조사되었다[8]. Vega 등[3]은 *B. bassiana* 한 균주의 액체 배지 성분으로 sucrose와 casamino acid를 탄소원과 질소원으로 사용시 효과적인 것으로 보고하였다. 곤충병원성 곰팡이의 한 종인 *Metarhizium flavoviride*는 sucrose와 brewer's yeast를 탄소원과 질소원으로 사용하였을 때 포자 생산율이 높았다 [10]. 본 연구에 사용된 *B. bassiana* 균주는 sucrose를 탄소원으로 한 경우 포자 생산량이 가장 낮았고, 옥수수 분말이나 전분을 이용한 경우 포자 생산량이 가장 높았다. 질소원으로는 peptone이나 효모 분말을 사용한 처리에서 가장 많은 수의 포자를 생산하였다. 이 균주의 상업적 생산을 위해서는 탄소원과 질소원의 적정 비율 선발도 필요할 것으로 생각된다.

2차 고체배양을 위한 적절한 기질 선발도 대량 배양을 위한 중요한 요소이다. 진딧물에 고병원성인 *B. bassiana*의 경우 백미에서 포자 생산량이 현미보다 높았으며, 왕겨에서 포자 생산량은 매우 낮아 대량 생산 기질로는 적합하지 않았다[8]. *B. bassiana* 뉴질랜드 분리 균주는 백미에서 배양시 높은 포자 생산량을 보였다[11]. 이러한 결과들과 달리 본 연구에서는 백미만 기질로 이용한 처리보다 톱밥에 밀기울과 옥수수 분말이 포함된 배지의 포자 생산량이 5배 정도 높았으며 질석에 밀기울 또는 옥수수 분말이 포함된 경우에도 백미에서 보다 높은 포자 생산량을 보였다. 따라서 이 균주의 대량 배양을 위해 농산업 부산물을 이용하여 미생물 살충제 재료를 생산하는 1석 2조의 효과가 기대된다.

고체 기질을 이용한 대량배양에서 수분함량은 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[9]. 고체 배양을 위한 기질의 초기 수분 함량은 곰팡이 균주나 기질의 종류에 따라 다른데 일반적으로 35~80% 범위였다[12]. 진딧물 방제용으로 한국에서 선발된 *B. bassiana* 균주는 백미에서 배양시 수분함량 40%에서 가장 높은 포자생산을 보였으나[8], 본 연구에 사용된 *B. bassiana* 균주는 25°C, 수분함량 70%와 30°C, 수분함량 40~60%에서 포자 생산량이 높았다. 이는 수분의 증발과 대사량의 차이 그리고 기질의 종류에 따른 공극의 차이에 의한 것으로 생각된다.

요 약

Two-phase fermentation을 통한 *Beauveria bassiana* 149 균주의 대량 배양을 위한 탄소원, 질소원, 기질 그리고 배양 조건 선발 실험을 실시하였다. 1차 액체 배양을 위한 적정 탄소원으로는 옥수수 분말, 전분 그리고 쌀가루가,

질소원으로는 펩톤과 효모 분말을 첨가한 것에서 포자 생산량이 높았다. 포자 대량 생산을 위한 기질 및 첨가물로는 톱밥+밀기울+옥수수 분말, 톱밥+밀기울, 쌀겨+밀기울 혼합에서 포자 생산량이 높았다.

B. bassiana 149 균주의 포자 대량 생산을 위한 고체 배양 결과, 포자 생산량은 30°C 배양에서 20°C보다 2배 정도 높은 경향을 보였다. *B. bassiana* 149 균주의 포자 생산량은 25°C, 수분함량 60%와 70%에서 배양 시 26.9×10^8 conidia/g와 38.6×10^8 conidia/g로 40%와 50%의 13.9×10^8 conidia/g와 11.6×10^8 conidia/g 보다 상당히 높았다.

감사의 글

본 연구는 국립농업과학원의 공동연구 과제(PJ009979)의 지원에 의해 수행되었습니다.

REFERENCES

1. Faria MR, Wraight SP. Mycoinsecticides and mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol Control* 2007; 43:237-56.
2. Jackson MA, Dunlap CA, Jaronski ST. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. *Biol Control* 2010;55:129-45.
3. Vega FE, Jacson MA, Mercadier G, Poprawski TJ. The impact of nutrition on spore yields for various fungal entomopathogens in liquid culture. *World J Microbiol Biotechnol* 2003; 19:363-8.
4. Kleespies RG, Zimmermann G. Effect of additives on the production, viability and virulence of blastospores of *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Sci Technol* 1998;8:207-14.
5. Srikanth J, Santhalakshmi G. Effect of media additives on the production of *Beauveria brongniartii*, an entomopathogenic fungus of *Holotrichia serrata*. *Sugar Technol* 2012;14:284-90.
6. Shi Z, Li M, Zhang L. Effects of nutrients on germination of *Verticillium lecanii* (= *Lecanicillium* sp.) conidia and infection of greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*. *Biocontrol Sci Technol* 2006;16:599-606.
7. Maldonado-Blanco MG, Gallegos-Sandoval JL, Fernández-Peña G, Sandoval-Coronado CF, Elías-Santos M. Effect of culture medium on the production and virulence of submerged spores of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against larvae and adults of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Biocontrol Sci Technol* 2014;24:180-9.
8. Pham TA, Kim JJ, Kim K. Optimization of solid-state fermentation for improved conidia production of *Beauveria bassiana* as a mycopesticide. *Mycobiology* 2010;38:137-43.
9. Jenkins NE, Heviefio G, Langewald J, Cherry AJ, Lomer CJ. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol News Information* 1998;19:21-31.
10. Issaly N, Chauveau H, Aglevor F, Fergues J, Durand A. Influence of nutrient, pH and dissolved oxygen on the production of *Metarhizium flavoviride* Mf189 blastospores in sub-

merged batch culture. Process Biochem 2005; 40:1425-31.

11. Nelson TL, Low A, Glare TR. Large scale production of New Zealand strains of *Beauveria* and *Metarhizium*. In: Proceeding of the 49th New Zealand Plant Protection Conference: 1996 Aug 13-15; Nelson, New Zealand. Paihia: New Zealand Plant Protection Society; 1996. p. 257-61.
12. Rimbault M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. EJB Electron J Biotechnol 1998;1:1-20.