

Research Article



CrossMark

Open Access

## 천연제오라이트 세라믹볼을 이용한 곤충병원성 곰팡이 포자 생산 방법

이중복<sup>1</sup>, 김범수<sup>1</sup>, 주우홍<sup>2</sup>, 권기석<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>안동대학교 자연과학대학 생약자원학과, <sup>2</sup>창원대학교 자연과학대학 생물학과

### Culture Method of Spore for Entomopathogenic Fungus Using Natural Zeolite Ceramic Ball

Jung-Bok Lee<sup>1</sup>, Beaum-Soo Kim<sup>1</sup>, Woo-Hong Joo<sup>2</sup> and Gi-Seok Kwon<sup>1\*</sup> (<sup>1</sup>Department of Medicinal Plant Resources, College of Natural Sciences, Andong National University, Andong 35729, Korea, <sup>2</sup>Department of Biology, College of Natural Sciences, Changwon National University, Changwon 51140, Korea)

Received: 12 October 2015 / Revised: 21 March 2016 / Accepted: 26 March 2016

Copyright © 2016 The Korean Society of Environmental Agriculture

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.

#### ORCID

Jung-Bok Lee

<http://orcid.org/0000-0003-4919-9412>

Gi-Seok Kwon

<http://orcid.org/0000-0002-6098-2515>

#### Abstract

**BACKGROUND:** Entomopathogenic fungi have been studied to develop for biological control agents as an alternative to chemical control agents in insect pest management. This investigated to determine the optimal culture conditions in ceramic balls for maximal sporulation of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* M130 by use rice bran extract.

**METHODS AND RESULTS:** A culture of entomopathogenic fungi for 12day on rice bran extract(1:8, w/v) incubated in ceramic matrix at 28°C. Natural zeolite ceramic ball was high production of  $4.2 \times 10^8$  conidial/mL. The culture condition optimized initial pH, temperature, rice bran extract concentration, adhesives substance and concentration of NaCl, respectively. The high production of spore optimal conditions were temperature 28°C, initial pH 3, rice bran extract 3 mL, starch 33 g, 5 % NaCl and sopro suspension 7 mL, respectively.

**CONCLUSION:** This study was carried out for the mass production of entomopathogenic fungi conidia recover rate 65% in matrix of natural zeolite ceramic ball, and to develop ingredient-used formulation of *Beauveria bassiana* M130

conidia for biological control agents.

**Key words:** Biological control, Ceramic ball, Entomopathogenic fungi, Rice bran, Spore

#### 서론

최근 화학농약의 사용으로 인한 농산물의 안전성에 대한 문제점이 야기되고 이로 인하여 국내 농산물에 대한 소비자 들의 신뢰가 낮아지고 있다. 대부분의 국민들은 깨끗하고 안전한 농산물을 선호하기 때문에 친환경농산물에 대한 관심이 높아지고 있다. 하지만 친환경농산물을 재배하기 위해서는 경제적 독약과도 같은 화학농약의 사용량을 줄여야하고, 필수적으로 친환경농산물 재배에 필요한 병충해방제용 자재의 산업화가 필요하다. 하지만 친환경농산물 재배에 필요한 병충해 방제용 농자재 생산을 위해서는 원재의 공급이 매우 중요하다(Kim and Kim, 2009).

현재 사용하는 화학 살충제의 일부를 미생물농약으로 대체한다면 화학농약 사용량을 상당히 줄일 수 있을 것으로 예상된다. 해충방제에는 세균과 곰팡이가 일반적으로 많이 이용되는 미생물이며, 가루이류의 방제에 사용되는 병원성 곰팡이로는 *Beauveria* spp., *Isaria* spp., *Lecanicillium* spp., 와 *Aschersonia* spp. 등 다양한 종이 알려져 있다. 이 중 *Beauveria bassiana*는 온실가루이 등 주요 농업해충에 효과적인 방제제이며 현재 국내에서도 *B. bassiana*를 유효미생물로 하는 미생물살충제가 등록되어 있다. 하지만 곤충병원성

\*Corresponding author: Gi-Seok Kwon

Phone: +82-54-820-5909; Fax: +82-54-820-6252;

E-mail: [gskwon@andong.ac.kr](mailto:gskwon@andong.ac.kr)

곰팡이의 특성상 사용이 까다롭고 환경에 따른 효율성의 차이로 인해 농가에서의 사용은 미미하며 현장에서 활용성을 높일 수 있는 연구가 필요하다. 곤충병원성 곰팡이를 이용한 해충방제는 친환경적인 방제 수단으로 농업생태계 뿐만 아니라 환경에 영향을 주지 않으며 해충밀도 억제효과를 발휘할 수 있으므로 외국에서는 이를 이용한 친환경 미생물 살충제가 개발되어 이용되고 있다(Faria and Wraight, 2001).

곤충병원성 곰팡이가 액체 배양에 의해 포자생산의 가능성에도 불구하고 액체배양에서 생산되는 포자는 친수성이고 기름에 쉽게 제체화되지 않는다. 사출포자들도 액체 발효에서 비슷한 게 생산되지만 역시 친수성이고 저장하는 동안 상대적으로 빨리 생존능을 잃는다. 이러한 문제 뿐 만 아니라, 곰팡이 포자 살충제의 성공적인 상용화의 걸림돌은 포자에 의한 병발생의 속도가 느리다는 점과, 포자의 살충력이 온도, 습도 등과 같은 경작지 환경에 영향을 받아 그 살충효과가 변동이 크다는 점이다(Burges, 1998; Inglis *et al.*, 1997). 하지만, 곤충병원성 곰팡이는 대상곤충에 살충범위가 제한되어 있지만, 기주의 저항성 기작이 잘 발현되지 않아 난방제 해충의 생물적 방제를 위한 생물인자로 적합한 것으로 보고되었다(Lacey *et al.*, 2011).

곤충병원성 곰팡이를 생물자재로서 이용 시 통상적인 이러한 문제점들이 해결되며, 내구성의 포자를 저렴하면서 대량 생산할 수 있는 기술이 요망되고 있다(Silman *et al.*, 1991). 종래의 경우 곰팡이의 포자 생산방법으로 고체 배양이 많이 연구되었으며(Srikanth and Santhalakshmi, 2012; Kim *et al.*, 2014) 고체 배양을 행하는 경우에는 쌀, 보리, 옥수수 등의 곡물류나, 밀기울 등의 곡물에서 유래하는 고체 성분 등이 사용되었지만, 고체 배양을 멸균시키기 위해서는 장시간이 필요함과 동시에 무균 관리도 어렵고, 배양 중에 온도, 수분과 pH 등의 환경을 제어하는 것도 어렵다. 이들 불용성 고체 성분과 포자의 분리가 매우 어려우며 동시에 배양 시간이 길고 비용도 높은 단점을 가지고 있다. 또한 배지 내의 영양성분으로 쓰이지 않는 불필요한 불용성 배지 성분이 모든 공정단계에 포함되어 생산효율을 떨어뜨리고 생산 및 유통비용을 증가시키는 문제점도 있으며, 다량의 불용성 물질로부터 비롯되는 수화시 분산안정성 문제, 스프레이 노즐 통과 문제 등이 발생한다.

농업용 부산물 중 미강(rice bran)은 현미에서 정백미로 도정하는 과정에서 생기는 과피, 종피, 호분층 등의 분쇄혼합물을 말하며 영양소 및 유효성분 등에 대한 효능이 규명되어 다양한 산업적 이용가치가 매우 높아지고 있는 실정이다(Oh *et al.*, 2010; Faria and Wraight, 2001).

미강은 미생물 배양에 있어 대량배양에 적합하다고 알려져 있으며, 미강 뿐 만 아니라 여러 농업부산물 또한 다양한 미생물을 배양하는 배지 또는 영양소 첨가제로 이용되고 있다. *Arthrobotrys dactyloides*, *Streptomyces actuosus*, *Lactobacillus brevis*, *Rhizopus oryzae* 등에 관한 연구결과에서, 미강과 같은 농업부산물을 이용한 배지에서 미생물이 우수한 생장을 보인다고 알려져 있다(Wang *et al.*, 2003;

Kumar *et al.*, 2005; Sakamoto *et al.*, 2011; Schmidt and Furlong, 2012).

본 연구의 목적은 최근 친환경 농자재의 사용가능한 곤충병원성 곰팡이 *B. bassiana* M130 포자(Kim *et al.*, 2013; 2014) 상용화를 위한 대량생산 방법을 조사하여 저렴하고 간편하게 포자를 배양 및 회수하기 위한 방법을 연구하기 위해 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 곤충병원성곰팡이의 세라믹볼(천연제오라이트, 합성제오라이트, 천연활성탄)에서의 생육 유무

곤충병원성곰팡이 *B. bassiana* M130을 배양하기 위해 담체(matrix)를 이용하여 고체배양 가능성 여부를 조사하였다. 천연제오라이트, 합성제오라이트와 활성탄 3종류(K-산업, Korea)를 구입하여, 세라믹볼(ceramic ball)을 깨끗하게 세척한 후 121°C 조건에서 30분 동안 고압멸균을 하였다. 준비된 세라믹볼을 거즈가 깔린 petridish에 일정량을 펼친 후 그 위에 곤충병원성 곰팡이가 포함된 미강추출액 배지를 10 mL 스프레이 한 후 밀봉 후 항온항습기(Model: JKC-420C, JS Rearch Inc., Korea)를 이용하여 배양온도 28°C, 상대습도 40% 조건으로 담체에서 *B. bassiana* M130의 생육가능성을 조사하기 위해 3일간 배양하였다. 또한 본 실험에 사용한 미강추출액 조건과 배양조건은 Kim 등 (2013; 2014)의 연구결과에 따라 본 실험방법에 변형하여 사용하였다.

### 곤충병원성곰팡이의 세라믹볼(천연제오라이트, 합성제오라이트, 천연활성탄)에서의 포자 생산

곤충병원성곰팡이를 담체(matrix)를 이용하여 고체배양의 가능성 여부를 확인한 후, 천연제오라이트, 합성제오라이트와 활성탄 담체별 포자 생산량을 조사하였다. 각각의 세라믹볼 100 g을 세척 후 121°C 조건에서 30분 동안 멸균 하였고, 준비된 포자현탁액이 함유된 (미강추출물 3 mL + 포자현탁액 7 mL)을 각각의 세라믹볼과 혼합 표면처리한 후 거즈가 깔린 petridish에 일정량을 펼친 후 항온항습기(28°C, 40%)에서 12일간 배양하였다.

### 곤충병원성곰팡이의 세라믹볼 고체배지의 포자현탁액이 함유된 교착물질 내의 미강추출물에 따른 포자 생산

곤충병원성 곰팡이를 세라믹볼 담체(matrix)에 고체배지 흡착시키기 위해 일반적으로 고체배지에 사용하는 agar를 이용하여, 일반배지 agar 함유량인 1.8%와 starch 이용한 배양 시 탄소원 및 질소원의 공급원인 미강추출물 함량에 따른 포자 생산성을 조사하였다. 세라믹볼 100 g을 세척 후 121°C 조건에서 30분 동안 멸균 하였고, 준비된 포자현탁액이 함유된 각각의 교착물질을 스프레이 처리하여 세라믹볼에 코팅한 후 거즈가 깔린 petridish에 일정량 펼친 후 항온항습기(28°C, 40%)에서 12일간 동일한 배양조건으로 실험을 진행 하였다.

Table 1. Adhesives substance of composition ratio

	Composition Ratio
1	Rice Bran ext. <sup>a)</sup> 3 mL + Starch 33 g + Spore suspension <sup>b)</sup> 7 mL
2	Rice Bran ext. 6 mL + Starch 33 g + Spore suspension 7 mL
3	Rice Bran ext. 9 mL + Starch 33 g + Spore suspension 7 mL

<sup>a)</sup> Extract contents 1:8 (Rice Bran : H<sub>2</sub>O)

<sup>b)</sup> 10<sup>7</sup> conidium/mL

### 곤충병원성곰팡이의 천연제오라이트 세라믹볼 고체배지에 있어서 포자 유도 조절인자

일반적으로 모든 곰팡이의 생육적 특징 중 하나로 외부환경(영양원고갈, 물리적 충격손상, 화학적 변화, 온도, 빛, 습도)의 변화에 따라 포자 유도를 조절할 수 있다. 곤충병원성 곰팡이의 천연제오라이트 세라믹볼 고체배지에서 포자 유도를 통해 포자 생산성을 높이기 위하여 pH와 NaCl을 조절인자로 조사하였다. 천연제오라이트 세라믹볼 100 g을 세척 후 121°C 조건에서 30분 동안 멸균 하였고 준비된 포자현탁액이 함유된 교착물질(미강추출액 3 mL + 전분 33 g + 포자현탁액 7 mL)을 pH 3, 5, 7, 9, 11과 NaCl 1%, 3%, 5%를 각각의 세라믹볼과 혼합 표면처리한 후 거즈가 깔린 페트리 디쉬에 일정량 펼친 후 항온습습기(28°C, 40%)에서 12일간 배양하였다.

### 곤충병원성곰팡이의 천연제오라이트 세라믹볼 고체배지에서 대량 생산된 포자의 분리

천연제오라이트 세라믹볼 2 Kg 을 세척 후 121°C 조건에서 30분 동안 멸균하였고 준비된 포자현탁액이 함유된 교착물질(미강추출액 60 mL + 전분 330 g + 포자현탁액 150 mL)을 pH와 NaCl을 조정하여 천연제오라이트 세라믹볼과 혼합 표면처리한 후 거즈가 깔린 petridish에 펼친 후 항온습습기(28°C, 40%)에서 12일간 배양하였다. 배양 후 30°C에서 충분히 음건 시킨 후 포자분리 회수기(M-tech, 미상용제품)를 이용하여 물리적 방법을 통해 천연제오라이트 세라믹볼 표면에 붙어 있는 균체와 포자를 밀링커터기로 절단 후 사이클론 흡인방식에 의해 절단된 균체와 포자만을 회수하는 방법으로 포자를 회수하였다.

## 결과 및 고찰

### 곤충병원성 곰팡이의 세라믹볼(천연제오라이트, 합성제오라이트, 천연활성탄)에서의 생육

세라믹볼 담체 종류에 따라 *B. bassiana* M130의 배양여부를 조사한 결과 Fig. 1에서와 같이 대조구와 달리 처리구인 matrix에서 성장이 되는 것으로 조사되었다. 세라믹볼에는 다공체로 되어 미강추출물이 흡착이 되어 흡착된 영양성분을 이용하여 *B. bassiana* M130이 성장하는데 문제가 없이 세라믹볼을 담체로 이용하여 성장이 된 것으로 조사되었다. 담체를 이용한 배양방법은 활성탄(Jo et al., 2010), 활성탄과

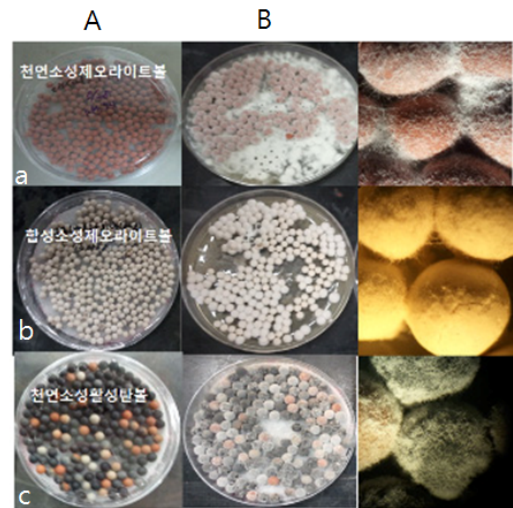


Fig. 1. Morphological growth type of *B. bassiana* M130 in matrix. (A: Without *B. bassiana* M130, B: With *B. bassiana* M130, a: Natural zeolite ceramic ball, b: Synthesis zeolite ceramic ball, c: Active carbon ball)

alginate(Pai et al., 2005)와 세라믹볼 등 다양한 담체를 이용하여 미생물을 배양하는 기술은 일반적으로 환경에 복원에 관한 연구(Rahman et al., 2006)가 지속적으로 진행되어 오고 있었으며, 이러한 담체 기술을 농업용으로 활용하기 위해 곤충병원성 곰팡이 포자 대량배양에 있어서 충분한 가능성을 보일 것으로 사료된다.

### 곤충병원성 곰팡이의 세라믹볼(천연제오라이트, 합성제오라이트, 천연활성탄)에서의 포자 생산

담체종류에 따른 곤충병원성 곰팡이의 생육 여부를 확인 후 담체에서 경시적 변화에 따른 최적 배양 시간을 조사하기 위해 각각의 담체를 배양 시기 별 포자의 생산량을 조사한 결과 Table 2에서와 같이 각각의 담체별로 차이를 보이는 것으로 조사되었다. 천연제오라이트볼이 배양 9일이 되는 시기에 4.7×10<sup>7</sup> conidium/mL, 합성제오라이트볼은 0.1~4.1×10<sup>7</sup>, 천연제오라이트볼은 0.2~4.7×10<sup>7</sup>과 활성탄볼은 0.5~4.3×10<sup>7</sup> conidium/mL로 각각 조사되었으나, *B. bassiana* M130의 담체로 포자 함량이 가장 우수한 천연제오라이트볼이 적합한 것으로 조사되었다. Kim 등(2013)의 보고에 의하면, 미강 추출물을 이용한 배양조건에서 2.15×10<sup>9</sup> spore/mL의 생산량을 보였으나, 담체를 사용하였을 경우 담체에

Table 2. *B. bassiana* M130 spore count of growth in ceramic ball matrix

	3day	6day	9day	12day
Synthesis Zeolite	$0.1 \times 10^7$	$1.3 \times 10^7$	$3.3 \times 10^7$	$4.1 \times 10^7$
Natural Zeplite	$0.2 \times 10^7$	$1.2 \times 10^7$	$4.7 \times 10^7$	$4.1 \times 10^7$
Active carbon	$0.5 \times 10^7$	$2.3 \times 10^7$	$4.3 \times 10^7$	$3.2 \times 10^7$

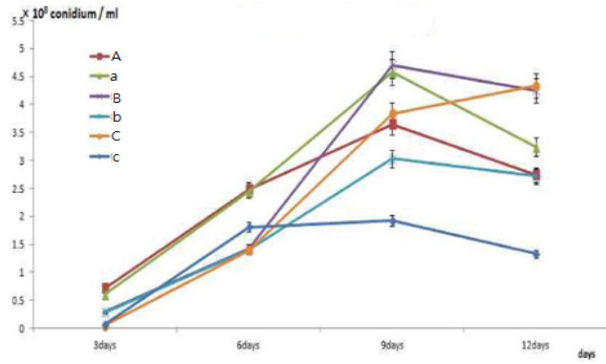


Fig. 2. Effect of adhesives substance(agar) concentration on spore production by *B. bassiana* M130 in ceramic ball matrix. (A: Active carbon ball with agar, a: Active carbon ball without agar, B: Natural zeolite ball with agar, b: Natural zeolite ball without agar, C: Synthesis zeolite ball with agar, c: Synthesis zeolite ball without agar, X axis: Growth Time, Y axis: Conidium/mL)

흡착된 추출물 양의 흡착정도에 의한 문제점으로 포자 생산량이 21.8% 정도 줄어든 것으로 보이나, 고체배양 방법으로는 우수한 것으로 사료된다.

천연소재의 세라믹볼의 포자 생성능은 거의 비슷한 포자수가 확인 되었으며, 합성제오라이트 세라믹볼과 다소 차이를 보이는 것으로 조사되었다. 이러한 포자생성능 차이는 합성제오라이트 세라믹볼 경우 소성시 높은 온도(800°C 이상)에 의해 합성물질인 벤토나이트, 규소, 고령토 성분(Mondragon *et al.*, 1990) 등에 의해 산도의 변화를 보여 곤충병원성 곰팡이의 생육이 잘 이루어지지 않았을 것으로 사료된다. 또한 Kim 등(1999)의 보고에 의하면 곤충병원성 곰팡이 포자 생산에 있어서 pH 5에서 포자 생산량이 가장 높은 것으로 보고되었으며, Pham 등(2014) 또한 *B. bassiana* 포자의 생산을 위한 조건으로 pH 5.2에서  $12.08 \times 10^9$  spores/mL을 생산하는 것으로 보고하였다.

**곤충병원성곰팡이의 세라믹볼 고체배지의 포자현탁액이 함유된 교착물질 내의 미강추출물에 따른 포자 생산**

*B. bassiana* M130 곤충병원성곰팡이 배양을 하는데 있어 세라믹볼에서 곤충병원성 곰팡이 포자의 흡착을 도와주기 위해 교착물질로 일반적으로 미생물 고체배지에서 사용되는 agar를 이용하여 배양을 확인하였다. 또한 영양원으로 이용가능성을 보이는 전분을 교착물질로 하여 비교하였다. Agar를 교착물질로 사용하여 세라믹볼을 배양한 결과 Fig. 2와 같

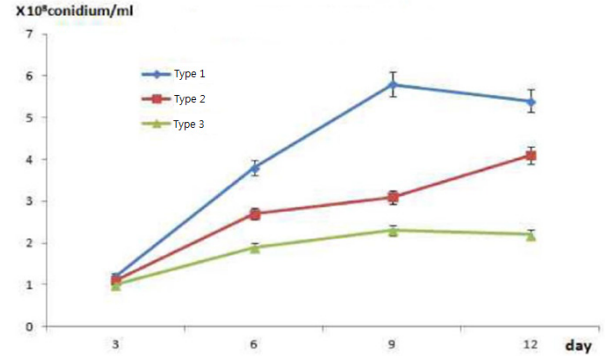


Fig. 3. Effect of adhesives substance(starch) concentration on spore production by *B. bassiana* M130 in ceramic ball matrix. (X axis: Growth Time, Y axis: Conidium/mL)

이 교착물질을 첨가 하지 않았을 때보다 포자의 생산량이 증가한 것으로 조사되었다. 특히 천연제오라이트의 경우 배양 9일 째에  $4.6 \times 10^8$  conidium/mL 까지 증가하는 것으로 조사되어 교착제 첨가 전보다 10% 이상 포자의 생산량이 증가 된 것으로 조사되었다. 이러한 결과로 보아 교착제 첨가에 따른 포자 생산량의 차이점이 큰 것으로 나타났다. 하지만 agar의 경우 산업화하는데 있어 경제성이 떨어지므로 agar를 대신하여 전분 33 g정도가 유사한 점도를 보이는 것으로 보여 교착물질을 전분 33 g으로 고정한 후 미강추출물 양을 조정하여 천연제오라이트를 이용하여 *B. bassiana* M130의 포자생산량을 조사한 결과 Fig. 3에서와 같이 9일 배양시  $5.8 \times 10^8$  conidium/mL로 20% 이상 증가 한 것으로 조사되었으나 미강추출물을 6 mL과 9 mL을 첨가 하였을 때는 포자의 생산효율이 떨어지는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 C/N비율과도 상관 관계가 있는 것으로 보이며, 탄소원 공급원으로 미강추출액 뿐 아니라 전분 역시 2차적 공급원이 되면서 자체 영양성분이 풍부해짐에 따라 균사체 생육도 진행되면서 포자수가 감소한 것으로 사료된다. 모든 곰팡이의 포자 유도의 조건은 외부환경이 열악한 조건에서 생산되는 것이 일반적이다. Kim 등(2014)보고에 의하면 *B. bassiana* 대량생산에 있어서 탄소원으로 starch를 이용하여 포자 대량생산 기질로 이용하는 것으로 조사되었으며, 본 결과에서도 starch 성분이 *B. bassiana* M130의 증식에 영향을 준 것으로 보인다.

**곤충병원성곰팡이의 천연제오라이트 세라믹볼 고체배지에 있어서 포자 유도 조절인자**

천연제오라이트 세라믹볼을 이용하여 *B. bassiana* M130

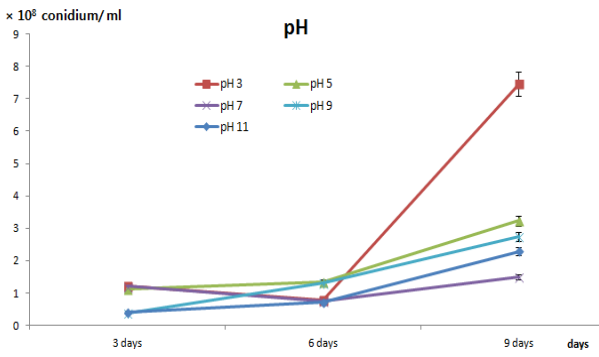


Fig. 4. Effect of initial pH on spore production by *B. bassiana* M130 in ceramic ball matrix. (X axis: Growth Time, Y axis: Conidium/mL)

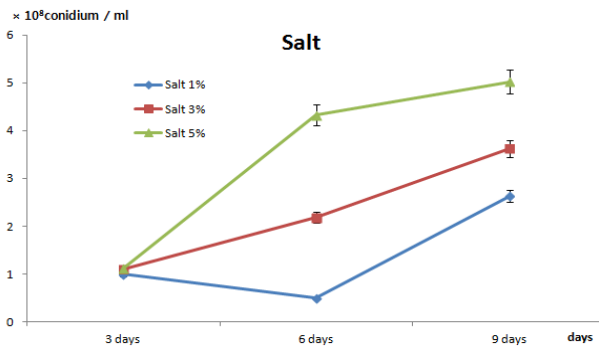


Fig. 5. Effect of NaCl concentration on spore production by *B. bassiana* M130 in ceramic ball matrix. (X axis: Growth Time, Y axis: Conidium/mL)

포자를 대량 생산하기 위한 최적의 pH 조사결과 Fig. 4에서와 같이 pH 3에서 9일에 생육이 가장 좋으며 생산된 포자량이  $7.1 \times 10^8$  conidium/mL로 조사되었다. Kim 등(2013)에 의하면 pH 3에서 포자를 전혀 생산하지 않은 것으로 조사되었으며, Min과 Han(2002)의 연구에 의한 *B. bassiana* 생육에 있어서는 pH 5~12까지 넓은 범위에서도 성장한다는 보고와는 달리 본 결과에서는 pH 3에서 생산량이 높음으로 조사되었다. 이러한 결과는 천연제오라이트의 내부에 치환 가능한 이온을 다량 포함(Erdem et al., 2004)하고 있어 담체의 성분중의 영향으로 담체 내부의 pH의 변화로 인해 pH 3에서도 증식이 가능한 것으로 사료된다.

NaCl의 농도 조건에 따른 조사 결과 Fig. 5에서와 같이 5%의 염농도 조건에서 가장 많은 포자  $4.8 \times 10^8$  conidium/mL을 생산하는 것으로 조사 되었다. 이러한 결과는 *B. bassiana* 배양에 있어 NaCl의 농도에 따른 다양한 범위에서의 배양 조건에 따라 배양을 하며, Suresh와 Chandrasekaran (1998)의 경우 갯벌로부터 호염성 *B. bassiana*를 분리하여 보고하였다. 미생물의 성장에 미치는 NaCl의 영향은 미생물의 종류에 따라 매우 차이가 많아 해양성 균류인 *Labyrinthula*는 NaCl 2.4%에서 생장이 가장 좋고(Sykes and Porter, 1973), Oomycetes의 *Thraustochytrium* 등

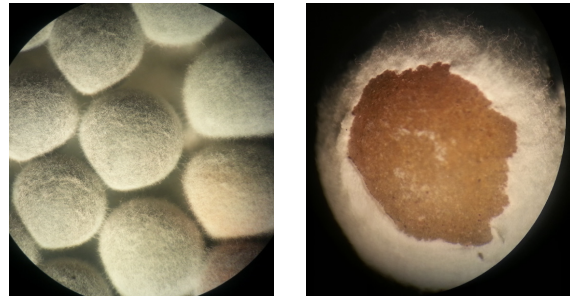


Fig. 6. Optimal culture condition of *B. bassiana* M130 in natural ceramic ball matrix.

몇 종들은  $\text{Na}^+$  없이는 전혀 생육하지 못하며 적정 NaCl 농도는 2.5%~3.0% 이고, 5% 이상에서 균사생육이 억제된다고 보고하였다.

### 곤충병원성곰팡이의 천연제오라이트 세라믹볼 고체배지에서 대량 생산된 포자의 분리

포자 대량생산을 위해 천연제오라이트 세라믹볼 2 kg을 이용하여 최적화된 조건인 미강추출물 3 mL, 전분 33 g, 포자현탁액 7 mL, NaCl 5%를 세라믹볼 용량비율에 맞춰 증가시킨 후 pH 3으로 조정하여 온도 28°C, 습도 40%로 배양 후(Fig. 6), 사이클론회수 방법을 통한 포자회수 결과 *B. bassiana* M130 담체로부터 양질의 포자를 63% 회수를 할 수 있었다. 본 연구는 담체를 이용하여 순수하게 포자만을 회수하기 위한 방법을 목적으로 하여 63%의 회수율은 부족할 수 있으나 회수방법에 대한 최적화를 통해 수율을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

### 요 약

본 곤충병원성곰팡이 *B. bassiana* M130의 포자를 대량 생산하기 위한 방안으로 천연제오라이트 세라믹볼, 합성제오라이트 세라믹볼과 활성탄볼을 이용한 담체배양을 실시하였다. 그 중 천연제오라이트 세라믹볼 이용한 포자생산방법이 가장 우수한 것으로 조사 되었으며, 배양 최적조건은 미강추출물(1:8, W/V) 3 mL, 전분 33 g, 포자현탁액 7 mL, pH 3과 NaCl 5%로 배양하였을 때 *B. bassiana* M130 포자를  $4.2 \times 10^8$  conidium/mL 생산하고, 사이클론 회수방법을 통해 순수포자만 63%의 회수율을 보였다. 향후 천연제오라이트 세라믹볼을 이용한 곤충병원성 곰팡이 *B. bassiana* M130 포자의 대량생산이 가능하며, 온실가라이제어용 친환경살충제로 제품생산 및 원제의 대량생산을 통해 국산화 가능성을 제안하고자 한다.

### Acknowledgment

This research was supported by Bio-industry Technology Development Program(112004-3), Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea.

## References

- Burges, H. D. (1998). Formulation of mycopesticides. pp. 131-186. In: Burges, H. D. (ed.), Formulation of microbial biopesticides biopesticides: Beneficial microorganisms, nematodes and seed treatment. Kluwer academic publisher, Dordrecht, The Netherland.
- Erdem, E., Karapinar, N., & Donat, R. (2004). The removal of heavy metal cations by natural zeolites. *Journal of Colloid and Interface Science*. 280(2), 309-314.
- Faria, M., & Wraight, S. P. (2001). Biological control of *Bemisia tabaci* with fungi. *Crop Protection*. 20(9), 767-778.
- Inglis, G. D., Johnson, D. L., & Goettel, M. S. (1997). Effect of temperature and sunlight on mycosis of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes:Symptomulosporea) of grasshoppers under field conditions. *Environmental Entomology*. 26(2), 400-409.
- Jo, M. S., Lee, J. B., Kim, J. E., Sohn, H. Y., Jeon, C. P., Choi, C. S., & Kwon, G. S. (2010). Biodegradation of endosulfan by *Klebsiella oxytoca* KE-8 immobilized on activated carbon. *Korean Journal of Environmental Agriculture*. 29(2), 176-183.
- Kim, P. H., Yoon, C. S., Hong, S. I., Kim, S. W., Kang, S. W., & Sung, J. M. (1999). Spore production of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* 726, using molasses. *Korean Journal of Biotechnology and Bioengineering*. 14(3), 365-370.
- Kim, C. S., Lee, J. B., Kim, B. S., Lee, M. H., Kang, K. M., Joo, W. H., Kim, J. W., Im, D. J., & Kwon, G. S. (2013). The optimal condition and enzyme activity of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* using extracted rice bran. *Journal of Life Science*, 23(8), 1010-1018.
- Kim, C. S., Lee, J. B., Kim, B. S., Shin, K. S., Kim, J. W., & Kwon, G. S. (2014). A study on prevention technique for the greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*) by using entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* M130. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24(1), 1-7.
- Kim, I. S., & Kim I. (2009). Status and future prospects of pest control agents in environmentally-friendly agriculture, and importance of their commercialization. *Korean Journal of Environmental Agriculture*. 28(3), 301-309.
- Kim, J. J., Han, J. H., & Lee, S. (2014). Selection of carbon, nitrogen source and carrier for mass production of *Beauveria bassiana*. *The Korean Journal of Mycology*. 42(4), 328-332.
- Kumar, D., Singh, K. P., & Jaiswal, R. K. (2005). Screening of different media and substrates for cultural variability and mass culture of *Arthrobotrys dactyloides* drechsler. *Mycobiology*. 33(4), 215-222.
- Lacey, L. A., Liu, T. X., Buchman, J. L., Munyaneza, J. E., Goolsby, J. A., & Horton, D. R. (2011). Entomopathogenic fungi (Hypocreales) for control of potato psyllid, *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Trioziidae) in an area endemic for zebra chip disease of potato. *Biological Control*. 56(3), 271-278.
- Min, E. G., & Han, Y. H. (2002). Optical condition for mycelial growth of *Beauveria bassiana* and its extracellular enzyme activity. *Korean Journal of Microbiology*. 38(1), 50-53.
- Mondragon, F., Rincon, F., Sierra, L., Escobar, J., Ramirez, J., & Fernandez, J. (1990). New perspectives for coal ash utilization: synthesis of zeolitic materials. *Fuel*. 69(2), 263-266.
- Oh, S. K., Kim, D. J., Chun, A. R., Yoon, M. R., Kim, K. J., Lee, J. S., Hong, H. C., & Kim, Y. K. (2010). Antioxidant compounds and antioxidant activities of ethanol extracts from milling by-products of rice cultivars. *Journal of The Korean Society of Food Science and Nutrition*. 39(4), 624-630.
- Pai, S. L., Hsu, Y. L., Chong, N. M., Sheu, C. S., & Chen, C. H. (1995). Continuous degradation of phenol by *Rhodococcus* sp. immobilized on granular activated carbon and in calcium alginate. *Bioresource Technology*. 51(1), 37-42.
- Pham, T. A., Kim, J. J., Kim, S. G., & Kim, K. (2009). Production of blastospore of entomopathogenic *Beauveria bassiana* in a submerged batch culture. *Mycobiology*. 37(3), 218-224.
- Rahman, R. N. Z. A., Ghazali, F. M., Salleh, A. B., & Basri, M. (2006). Biodegradation of hydrocarbon contamination by immobilized bacterial cells. *The Journal of Microbiology*. 44(3), 354-359.
- Sakamoto, N., Tanaka, S., Sonomoto, K., & Nakayama, J. (2011). 16S rRNA pyrosequencing-based investigation of the bacterial community in nukadoko, a pickling bed of fermented rice bran. *International Journal of Food Microbiology*. 144(3), 352-359.
- Schmidt, C. G., & Furlong, E. B. (2012). Effect of particle size and ammonium sulfate concentration on rice bran fermentation with the fungus *Rhizopusoryzae*. *Bioresource Technology*. 123, 36-41.
- Suresh, P. V., & Chandrasekaran, M. (1999). Impact of process parameters on chitinase production by an alkalophilic marine *Beauveria bassiana* in solid state

- fermentation. *Process Biochemistry*. 34(3), 257-267.
- Silman, R. W., Nelson, T. C., & Bothast, R. J. (1991). Comparison of culture methods for production of *Colletotrichum truncatum* spore for use as a mycoherbicide. *FEMS Microbiology Letters*. 79(1), 69-74.
- Srikanth, J., & Santhalakshmi, G. (2012). Effect of media additives on the production of *Beauveria brongniartii*, an entomopathogenic fungus of *Holotrichia serrata*. *Sugar Tech*. 14(3), 284-90.
- Wang, S. L., Yena, Y. H., Shih, I. L., Chang, A. C., Chang, W. T., Wu, W. C., & Chai, Y. D. (2003). Production of xylanases from rice bran by *Streptomyces actuosus* A-151. *Enzyme and Microbiology Technology*. 33(7), 917-925.