농약과학회지 (Korean J. Pestic. Sci.)
Vol. 22, No. 4, pp. 393-400 (2018)
Open Access https://doi.org/10.7585/kjps.2018.22.4.393
ORIGINAL ARTICLES

Online ISSN 2287-2051
Print ISSN 1226-6183

곤충병원성 곰팡이 *Isaria fumosorosea* 균주의 대량배양을 위한 최적 조건

한지희* · 정혜주 · 이모란 · 김재윤 · 김다연 · 안성호 · 이상엽
농촌진흥청 국립농업과학원 농업미생물과

The Optimal Condition for Mass Production of Entomopathogenic Fungus, *Isaria fumosorosea*

Ji Hee Han*, Hye Ju Jeong, Moran Lee, Jae Yoon Kim, Dayeon Kim, Seongho Ahn and Sang Yeob Lee

Agricultural Microbiology Division, National Institute of Agricultural Sciences, RDA, Wanju 55365, Republic of Korea

(Received on November 7, 2018. Revised on December 15, 2018. Accepted on December 17, 2018)

Abstract As the demand of eco-friendly pesticide to control agricultural pest increases, does the need for mass culture to commercialize entomopathogen. In this study, we investigated mass production conditions for blasospore production of entomopathogenic fungi, *Isaria fumosorosea* FG340 which has high virulence against beet armyworm. Media containing 3% yeast extract and 3% dextrose (YD media, pH 9.0) inoculated with 5×10^4 conidia/ml of *I. fumosorosea* FG340 produced 1×10^9 blastospore/ml 4days after cultivation. Insecticidal activity to 3 instar larvae of beet armyworm of blastospore cultivated in YD media was 68.3~93.3% 3days after treatment which is similar to one of blasospore produced in PDB (60.0~83.3%). Therefore we expected that YD media will be used as cheap media to cultivate entomopathogenic fungi, *I. fumosorosea* FG340.

Key words Beet armyworm, Entomopathogenic fungi, *Isaria fumosorosea*, mass production

서 론

환경오염과 건강에 대한 관심이 높아짐에 따라 친환경농산물에 대한 수요가 빠른 속도로 증가하고 있다. 전문가들의 전망에 따르면 2017년 국내 친환경 시장의 규모는 1조 3,608억원으로 추정되며, 향후 친환경 농산물의 시장규모는 연평균 5.8% 성장하여 2025년에는 2조 1,360억원에 이를 것으로 전망되고 있다(Jeong et al., 2018). 그러나 국내 친환경농산물의 생산량은 2013~2015년에 크게 감소한 이후 정체되는 양상을 보이고 있다(Jeong et al., 2018). 조사에 따르면 친환경 농업을 실천하는데 있어 가장 큰 어려움으로 응답자의 39.9%가 친환경 농산물 생산기술이라고 답했으며 특히 고령화된 농가의 경우 잡초 및 병충해 발생이 친환경 농법의 가장 큰 애로사항으로 조사되었다(Kim et al., 2016). 국내의 친환경 작물 생산 과정에서 사용할 수 있는 등록된 천연식물보호제는 2018년 기준 26개 제품으로 16개의 살균제와 10품목의 살충제가 등록되어 있으며 살균제 중 3품목, 살충제 중 2품목이 수입에 의존하고 있어 친환경 농산물 생산에 필요한 작물의 병해충 방제 기술개발이 절실한 실정이다(Rural Developmental Administration, 2018).

해충을 친환경적인 방법으로 방제할 수 있는 수단으로 해충에만 선택적으로 병원성을 나타내는 곤충병원미생물을 이용할 수 있다. 곤충병원미생물로는 곤충병원세균과 곤충병원바이러스, 곤충병원곰팡이 등이 있다(Lawrence, 2012). 전세계 미생물살충제 시장의 90%를 차지하는 곤충병원세균 *Bacillus thuringiensis*는 나방류, 모기류 방제를 위해 많이 이용되고 있으나 반복처리에 의한 해충의 저항성 발현이 보고되어 있어 이를 피할 수 있는 방법으로 다른 기작의 살충활성이 있는 친환경 살충제와의 교호살포 방법이 권고되고 있다(Tabashnik et al., 2004; Singh et al., 2007). 또 다른 곤충병원미생물인 곤충병원바이러스는 활물 기생하는 특성으로 대량생산이 어려운 단점이 있어 국내에서는 상용화되지 못하고 있다. 곤충병원곰팡이는 대부분 불완전균류의

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

Hyphomycetes에 속하는 곰팡이로 현재 약 85속 750여종이 알려져 있으며 *Isaria, Metarhizium, Beauveria, Lecanicillium, Nomuraea* 등이 제품화되어 사용되고 있다(Hajek et al., 1994; Supakdamrongkul et al., 2010). 곤충병원곰팡이는 접촉에 의해 해충의 표피에 부착, 발아하여 해충의 체내로 침투하고 혈강에 이르러서는 대량으로 증식하여 해충의 영양분을 고갈시켜 치사에 이르게 한다. 또한 사체의 표면에 포자를 형성하여 2차 전염원으로 작용하는 장점을 가진다(Lawrence, 2012). 이러한 장점에도 불구하고 국내에 곤충병원곰팡이를 이용한 미생물제가 부족한 원인 중에 하나로 세균과 다른 배양조건을 들 수 있다. 곤충병원곰팡이 포자의 대량배양에는 출아포자(blastospore)를 생산하는 액체배양, 분생포자(aerial conidia)를 생산하는 고체배양법, 액체-고체 2단계 배양법(two-phase fermentation)이 사용되고 있다(Celso et.al, 2018). 이러한 배양 방법 중 미생물제를 생산하는 산업계에서는 공간적 용이성 때문에 곰팡이의 액상 배양을 선호하고 있으나, 세균과 달리 곰팡이는 7일 이상의 긴 배양 기간에도 불구하고 포자생산량이 충분하지 않아 우수한 균주의 제품화가 지연되고 있다. 따라서 국내에서 활발하게 연구되고 있는 우수한 곤충병원곰팡이를 제품화 하기까지는 이러한 배양적 어려움이 우선적으로 해결되어야 한다. 본 연구에서는 선행연구(Han et al., 2014)에서 선발된 파밤나방에 우수한 살충효과가 있는 곤충병원곰팡이 *Isaria fumosorosea* FG340균주의 포자를 짧은 배양기간 동안 대량생산 하기 위한 저렴한 배지를 선발하기 위해 산업용 탄소원과 질소원을 선발하고 최대 포자 생산을 위한 액체배양 조건에 대한 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

실험 균주

선행연구에서 분리된 곤충병원성 곰팡이 *I. fumosorosea* FG340균주(KACC93199P)는 감자한천배지(Potato Dextrose Agar, PDA)에 도말하여 분생포자를 분리하여 10% 글리세롤 용액에 넣어 -80°C에서 보관하였다. *I. fumosorosea* FG340 균주는 PDA에 접종하여 25 ± 1°C, 14일간 배양하여 형성된 분생포자를 실험에 사용하였다.

탄소원 및 질소원 선발

I. fumosorosea FG340 균주의 대량 배양을 위한 탄소원 선발을 위해 탄소원으로 glucose, dextrose, 당밀, fructose, sucrose와 질소원으로 1% yeast extract가 포함된 액체배지 20 ml에 균주의 포자 현탁액을 5×10^4 conidia/ml 농도로 접종하여 25 ± 1°C, 300 rpm, 4일간 배양하였다. 질소원 선발을 위해 질소원으로 1% cottonseed flour (Sigma, Cat No. C4898), 밀글루텐(이든타운에프앤비, 1 kg), 질산칼륨(대정, 1 kg), malt extract (Muntons, Cat No. 00189), yeast extract (Leiber, Cat No. 00205), acid hydrolysate of casein (Solabia, Cat No. 00002), 대두박, potato peptone (Solabia, Cat No. 00152), tryptone USP (Solabia, Cat No. 00198), soy peptone F (Solabia, Cat No. 00180), 황산암모늄(대정, 1 kg), 염화암모늄(대정, 1 kg), 대두분(삼진식품, 1 kg), 옥수수(Cherry fish, 380 g), cornsteep (Sigma, Cat No. C4648), 맥주박(홍천사료, 25 kg)과 탄소원으로 1% glucose가 포함된 액체배지에 위와 동일한 방법으로 균을 접종, 배양하였다. 배양액의 포자 생산량은 배양액을 희석하여 PDA배지에 도말, 25 ± 1°C에서 10일간 배양하여 조사하였으며 건조중량은 배양액을 여과지로 걸러 균사체를 드라이오븐에서 건조한 후 무게를 측정하여 조사하였다. 탄소원과 질소원 선발을 위한 배양은 50 ml bioreactor (SPL, Cat No. 50351)을 이용하여 수행하였다. 실험은 2회의 각기 다른 시기에 수행되었으며, 매 실험마다 3개의 반복을 가지고 수행하였다.

탄소원과 질소원의 최적 농도

I. fumosorosea FG340 균주의 대량배양을 위한 선발 질소원, 탄소원의 농도 조합에 따른 포자 생산량을 조사하기 위해 250 ml 삼각플라스크에 1.5, 2.0, 2.5, 3.0% dextrose와 1, 1.5, 2.0, 2.5, 3% yeast extract를 첨가한 배지 100 ml을 준비하고 *I. fumosorosea* FG340 균주의 포자 현탁액을 5×10^4 conidia/ml 농도로 접종하여 25 ± 1°C, 300 rpm, 4일간 배양하였다. 배양액 내의 포자 생산량과 포자 형성율을 조사하기 위하여 배양액 10 ul를 hemocytometer에 떨어뜨려 포자와 균사체의 개수를 조사하여 단포자 생산량과 포자 형성율을 나타냈다. 건조중량은 배양액을 여과지로 걸러 드라이오븐에서 건조한 후 무게를 측정하여 조사하였다.

최적 접종농도와 pH

I. fumosorosea FG340균주의 최대 포자 생산을 위한 미생물 접종농도 설정을 위해 250 ml 삼각플라스크에 3% yeast extract, 3% dextrose, 0.15% NaCl, 0.25% K_2HPO_4, 0.05% Na_2CO_3, 0.005% $MgSO_4$, 0.03% Sodium pyruvate 100 ml을 준비하고 *I. fumosorosea* FG340균주를 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5 conidia/ml 농도로 접종하여 25 ± 1°C, 300 rpm으로 4일간 배양한 뒤 위와 같은 방법으로 포자생산량을 조사하였다. *I. fumosorosea* FG340 균주의 대량배양을 위한 최적 pH를 조사하기 위해 250 ml 삼각플라스크에 위의 최적 배지를 준비하고 pH 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11로 맞춘 후 위와 같은 방법으로 포자생산량과 포자 형성율을 조사하였다. *I. fumosorosea* FG340균주의 최적 조건에서의 포자생산량을 조사하기 위해 250 ml 삼각플라스크에 3% yeast extract, 3% dextrose, 0.15% NaCl, 0.25% K_2HPO_4, 0.05% Na_2CO_3, 0.005% $MgSO_4$, 0.03% Sodium pyruvate 100 ml

(pH 9.0)을 준비하고 FG340균주를 5×10^4 conidia/ml 농도로 접종하여 25 ± 1°C, 300 rpm으로 배양하면서 1-4일간 위와 같은 방법으로 포자생산량을 조사하였다.

생물검정

최종 선발 배지에서 생산된 포자의 살충활성을 검정하기 위해 최적 조건에서 4일간 배양된 배양액을 거즈로 거른 후 hemocytometer를 이용하여 포자의 농도를 계수하여 1×10^5, 10^6, 10^7 blastospore/ml 농도의 포자현탁액을 제조하였다. 생물검정은 파밤나방 3령(부화 후 5일) 유충 10 마리가 투입된 직경 9 cm 배추 잎에 위의 포자 현탁액을 살포하여 실시하였다. Plexyglass 스프레이타워(50 × 50 × 50 cm, 100k PA, 직경 1.5 cm의 polyvinyl acetal cone nozzle 부착 airbrush)로 포자현탁액을 파밤나방 유충이 처리된 배추 잎 앞, 뒷면에 700 ul씩 살포하였다. 살포된 잎은 상온에서 한 시간 동안 건조한 후 500 ul의 멸균수로 적신 필터페이퍼가 깔린 디쉬(spl. cat No. 310102)에 넣고, 25°C, 광조건 16L: 8D, 습도 90% 이상으로 유지하여 6일 동안 매일 치사충 수를 관찰하였다. 치사충은 멸균수로 적신 필터페이퍼가 깔린 페트리디쉬에 옮겨 표피에서 곰팡이가 발생하는지 관찰하였다. 대조구에는 0.01% Tween80 용액만을 처리하였다. 균주 선발을 위한 생물검정은 1회, 3반복(10마리 유충/반복) 실시하였다.

통계처리

각 처리간의 차이를 비교하기 위하여 PROC GLM (SAS Institute, version 9.2)을 이용하여 분석하였다. 분석은 각 반복을 종합하여 분석하였으며, 처리간의 차이는 Tukey's Studentized Range (HSD) Test를 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

탄소원 및 질소원 선발

I. fumosorosea FG340 균주의 대량 배양을 위한 질소원 선발결과, soy peptone을 질소원으로 하였을 때 43.9×10^5 blastospore/ml의 포자를 생산하였고 yeast extract가 42.0×10^5 blastospore/ml의 포자를 생산 하였다(F=7.82; df=15, 284; P<0.0001). 배양액의 건조중량을 측정한 결과 yeast extract와 cottonseed flour를 질소원으로 배양하였을 때 (0.27 g/20 ml) 건조중량이 가장 무거운 것으로 나타났다(F=4.95; df=15, 47; P<0.0001) (Table 1).

미생물살충제의 대량배양을 위해서는 저렴하면서도 많은 포자를 생산하는 배지를 선발하는 것이 필수적이다. Mascarin (2015)의 결과에 따르면 basal media에 cottonseed flour를 질소원으로 첨가하여 *Isaria* 5균주를 3일간 배양하였을 때 $6.9\text{-}27.9 \times 10^8$ blastospore/ml의 포자를 생산하여 상대적으로 값비싼 acid hydrolyzed casein으로 배양하였을 때보다 포자의 생산량이 우수한 것으로 조사되었다. *P. fumosoroseus* ARSEF4491균주는 가수분해 대두박과 yeast extract를 질소원으로 4일간 배양하였을 때 1.1×10^9, 9.9×10^8 blastospore/ml의 포자를 생산하였다(Jackson et al., 2003). *I. fumosorosea* FG340 균주의 경우 최적 질소원 후보로 선발된 soy peptone과 yeast extract, cottonseed flour에 의해 생산된 포자생산량과 건조중량 결과를 종합하였을 때 yeast extract가 질소원으로 가장 적합할 것으로 판단되었다.

I. fumosorosea FG340 균주의 배양을 위한 최적 탄소원으로는 dextrose가 가장 많은 포자를(5.2×10^5 blastospore/ml) 생산하는 것으로 조사되었다(F=6.62; df=4, 44; P<0.0003) (Table 2).

Table 1. Blastospore production of *Isaria fumosorosea* FG340 on different nitrogen source with 1% glucose

Nitrogen source	Spore production (10^5 blastospore/ml)	Dry weight (g/20 ml)
Acid of casein	8.0 ± 1.4 c	0.14 ± 0.05 abc
Ammonium sulfate	1.9 ± 0.5 c	0.07 ± 0.01 abc
Ammonium chloride	2.3 ± 0.6 c	0.04 ± 0.02 cd
Brewers grain	2.1 ± 0.5 c	0.02 ± 0.01 c
Corn	0.5 ± 0.2 c	0.06 ± 0.02 bc
Cornsteep	15.6 ± 5.2 bc	0.23 ± 0.08 ab
Cottonseed flour	14.9 ± 2.2 bc	0.27 ± 0.04 a
Malt extracts	1.8 ± 0.4 c	0.06 ± 0.02 bc
Potato Peptone	5.7 ± 1.1 c	0.01 ± 0.00 c
Potassium nitrate	3.0 ± 0.9 c	0.01 ± 0.00 c
Soybean flour	19.8 ± 3.3 bc	0.18 ± 0.05 abc
Soybean meal	9.8 ± 2.0 bc	0.18 ± 0.00 abc
Soy Peptone F	43.9 ± 11.2 a	0.13 ± 0.06 abc
Tryptone USP	21.0 ± 2.2 bc	0.12 ± 0.02 abc
Wheat gluten	1.3 ± 0.4 c	0.04 ± 0.02 cd
Yeast extract	42.0 ± 13.6 ab	0.27 ± 0.08 a

Means (± SE) followed by different letters are significantly different (P<0.001, Tukey's Studentized Range (HSD) Test).

Table 2. Blastospore production of *Isaria fumosorosea* FG340 on different carbon source with 1% yeast extract

Carbon source	Spore production (10^5 blastospore/ml)	Dry weight (mg/20 ml)
Dextrose	5.2 ± 1.36 a	110.0 ± 37.8 a
Fructose	0.6 ± 0.18 b	180.0 ± 45.1 a
Glucose	2.3 ± 0.55 ab	146.7 ± 33.8 a
Molasses	1.0 ± 0.29 b	90.0 ± 0.0 a
Sucrose	1.6 ± 0.56 b	160.0 ± 68.1 a

Means (± SE) followed by different letters are significantly different (P<0.001, Tukey's Studentized Range (HSD) Test).

Table 3. Blastospore production of *I. fumosorosea* FG340 and rate of sporulation cultured with different concentration of nitrogen and carbon source for 4 days

Media	Spore production ($\times 10^8$ blastospore/ml)	Rate of sporulation (%)
1.5% Yeast extract + 1.0% Dextrose	2.36 gh	94.5
1.5% Yeast extract + 1.5% Dextrose	2.58 efgh	95.1
1.5% Yeast extract + 2.0% Dextrose	2.86 efgh	95.9
1.5% Yeast extract + 2.5% Dextrose	3.48 fgh	98.9
1.5% Yeast extract + 3.0% Dextrose	3.7 efgh	96.2
2.0% Yeast extract + 1.0% Dextrose	1.4 h	91.7
2.0% Yeast extract + 1.5% Dextrose	1.95 def	93.4
2.0% Yeast extract + 2.0% Dextrose	2.35 cde	96.0
2.0% Yeast extract + 2.5% Dextrose	3.5 bcde	97.2
2.0% Yeast extract + 3.0% Dextrose	7.38 b	97.0
2.5% Yeast extract + 1.0% Dextrose	2.36 bcd	94.8
2.5% Yeast extract + 1.5% Dextrose	2.77 de	96.7
2.5% Yeast extract + 2.0% Dextrose	3.95 bc	97.5
2.5% Yeast extract + 2.5% Dextrose	4.51 bcd	99.0
2.5% Yeast extract + 3.0% Dextrose	6.9 a	98.7
3.0% Yeast extract + 1.0% Dextrose	3.15 defg	96.8
3.0% Yeast extract + 1.5% Dextrose	3.9 bcd	97.0
3.0% Yeast extract + 2.0% Dextrose	5.14 efgh	98.1
3.0% Yeast extract + 2.5% Dextrose	5.05 b	97.8
3.0% Yeast extract + 3.0% Dextrose	10.61 a	98.5

Means (± SE) follwed by different letters are significantly different (P<0.001, Tukey's Studentized Range (HSD) Test).

탄소원과 질소원의 최적 농도

I. fumosorosea FG340 균주의 대량배양을 위해 선발된 질소원과 탄소원의 최적 농도를 조사한 결과 3% yeast extract와 3% dextrose를 첨가하여 배양하였을 때 10.6×10^8 blastospore/ml의 가장 많은 포자를 생산하였으며 포자형성율은 98.5% 였다(F=35.07; df=19, 59; P<0.0001) (Table 3).

Jackson (1997)의 결과에 따르면 *P. fumosoroseus* 균주는 탄소원으로 glucose의 농도가 높을수록(80 g/L) 포자의 생산이 증가하는 것으로 나타났으며, *P. fumosoroseus* strain Mycotech 612균주는 탄소원인 glucose농도보다 질소원인 casamino acid의 농도가 포자 생산량에 영향을 미치는 것으로 나타났다(Cliquet and Jacson, 2005). *I. fumosorosea* FG340 균주는 탄소원인 dextrose와 질소원인 yeast extract 모두 3%의 높은 농도일 때 포자의 생산량이 증가하여 질소원과 탄소원 모두 내생포자 생산에 관여하는 것으로 나타났다.

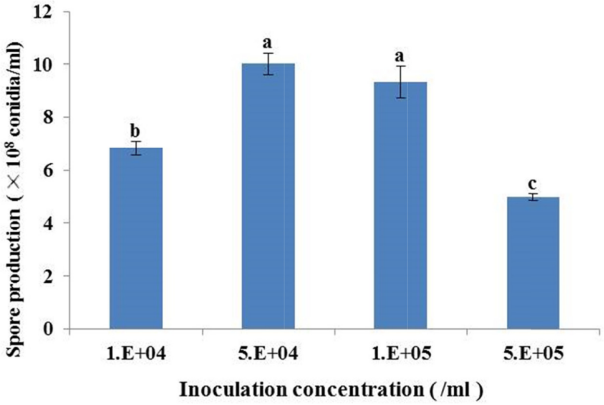

Fig. 1. Effect of inoculum concentration on blastospore production of *I. fumosorosea* FG340. Different concentration of *I. fumosorosea* FG340 was inoculated and cultivated in liquid media containing 3% yeast extract and 3% dextrose for 4 days. Letters on the bar indicate significant differences among inoculum concentration using Tukey's Studentized Range (HSD) Test (P<0.0001).

최적 접종농도와 pH

I. fumosorosea FG340 균주의 대량배양을 위한 최적 접종농도를 조사한 결과, 선발배지에 *I. fumosorosea* FG340 균주를 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5 conidia/ml 농도로 접종하였을 때 10.0×10^8, 9.3×10^8, 5.0×10^8 blastospore/ml를 생산하여 5×10^4 conidia/ml 이상의 농도로 접종하였을 때 포자의 생산량이 감소하는 경향을 나타냈다(F=35.59; df=3, 35; P< 0.0001) (Fig. 1).

Jackson (2003)의 결과에서는 담배가루이에서 분리된 *P.*

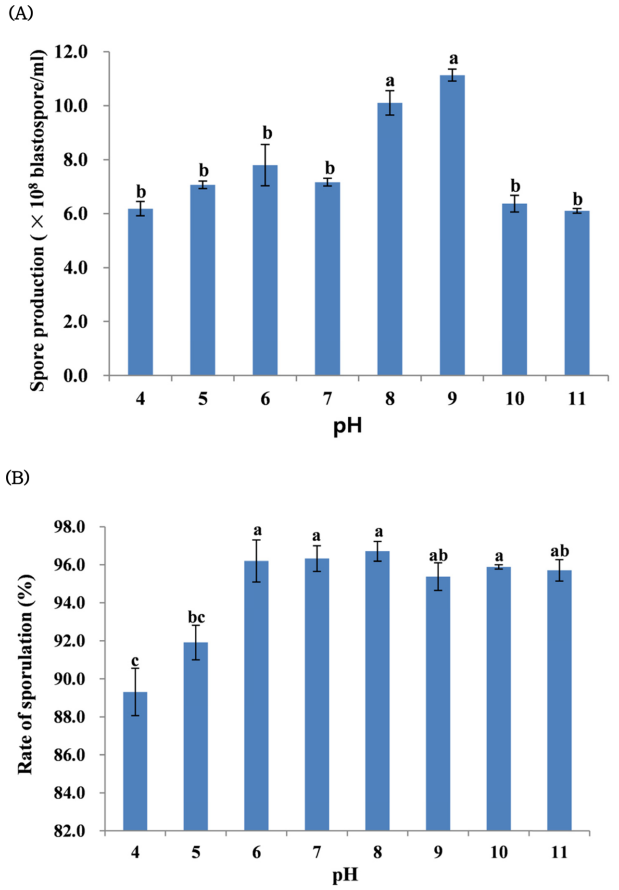

Fig. 2. Effect of pH on blastospore production (A) and dry weight (B) of *I. fumosorosea* FG340. *I. fumosorosea* FG340 was cultivated in different pH of liquid media containing 3% yeast extract and 3% dextrose for 4 days. Letters on the bar indicate significant differences among different pH using Tukey's Studentized Range (HSD) Test (P<0.0001).

fumosoroseus strain 612균주를 1×10^4, 10^5, 10^6, 10^7 conidia/ml 농도로 접종하였을 때 배양 3일 후의 포자 생산량이 6.9×10^5, 1.3×10^5, 1.3×10^5, 1.3×10^5 blastospore/ml로 최적 접종농도 보다 많은 양을 접종하여도 포자의 생산량이 더 이상 증가하지 않는 것으로 나타났다. 결과적으로 포자의 대량생산을 위한 미생물의 접종 농도는 균주마다 차이가 있으며 포자의 생산량은 접종농도와 비례하지 않았다.

대량 배양을 위한 선발배지의 최적 pH를 설정하기 위한 실험에서는 pH 8.0과 9.0의 선발배지에서 10.1×10^8 blastospore/ml, 11.1×10^8 blastospore/ml의 포자를 생산하였다(F=27.12; df=7, 23; P>0.001) (Fig. 2a). 최적 선발배지에서의 *I. fumosorosea* FG340 균주의 포자 형성율은 배지의 pH 4.0일 때 89.3%였으며 pH가 6.0 이상일 때 95% 이상을 나타내는 것으로 조사되었으며(F=10.79; df=7, 23; P< 0.0001) (Fig. 2b), *I. fumosorosea* FG340 균주 배양액의 pH는 배양 전 배지의 pH와 관계없이 배양 중 산성화 되는 것으로(pH 4.1-5.3) 나타났다(Table 4).

Table 4. Change of pH on media before and after fermentation of *I. fumosoroseus* FG340

pH of media	pH of culture fluid
4	4.1
5	5.3
6	5.2
7	5.3
8	4.9
9	5.1
10	5.05
11	4.97

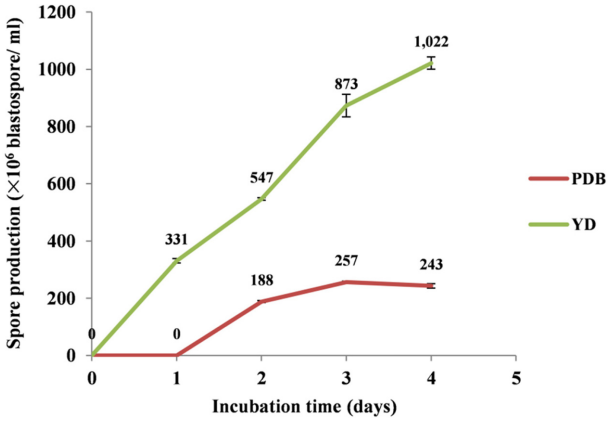

Fig. 3. Blastospore production of *I. fumosorosea* FG340 in optimal liquid media containing 3% yeast extract and 3% dextrose for 4 days. Letters on the line indicate number of conidia production (×10⁶ blastospore/ml).

pH는 곤충병원곰팡이의 배양에 매우 중요한 인자로 작용한다. 일반적으로 곤충병원곰팡이는 다른 곰팡이종에 비해 넓은 범위의 pH에서 잘 자라는 것으로 알려져 있으며 이러한 특징은 곤충병원곰팡이가 다른 곰팡이종들보다 세포질의 pH를 더욱 효과적으로 조절하기 때문인 것으로 설명된다 (Brown et al., 1988). Hallsworth and Magan (1996)의 연구에서도 곤충병원곰팡이 *B. bassiana, M. anisopliae, Isaria farinosus*는 pH 5.0-8.0으로 잘 자라는 것으로 나타났다. pH7.0이하에서도 잘 배양되는 곤충병원곰팡이의 특징은 배양과정 중에 세균과 같은 오염원의 생장을 억제할 수 있어 장점으로 작용할 수 있다(Bartlett and Jaronski, 1988). *I. fumosorosea* FG340 균주의 경우 pH 8.0 에서 우수한 포자생산과 포자형성율을 나타냈으며, 배지의 pH와 관계없이 배양액이 강한 산성(pH 4.1-5.3)을 나타내어 다른 오염원의 생장을 억제하는데 도움이 될 것으로 나타났다.

I. fumosorosea FG340 대량배양을 위한 최적 조건에서의 배양 2-4일차 포자생산량은 5.5×10^8, 8.7×10^8, 10.2×10^8 blastospore/ml로 PDB에서 생산된 포자 생산량 1.9×10^8, 2.6×10^8, 2.4×10^8 blastospore/ml 보다 많은 포자를 생산하

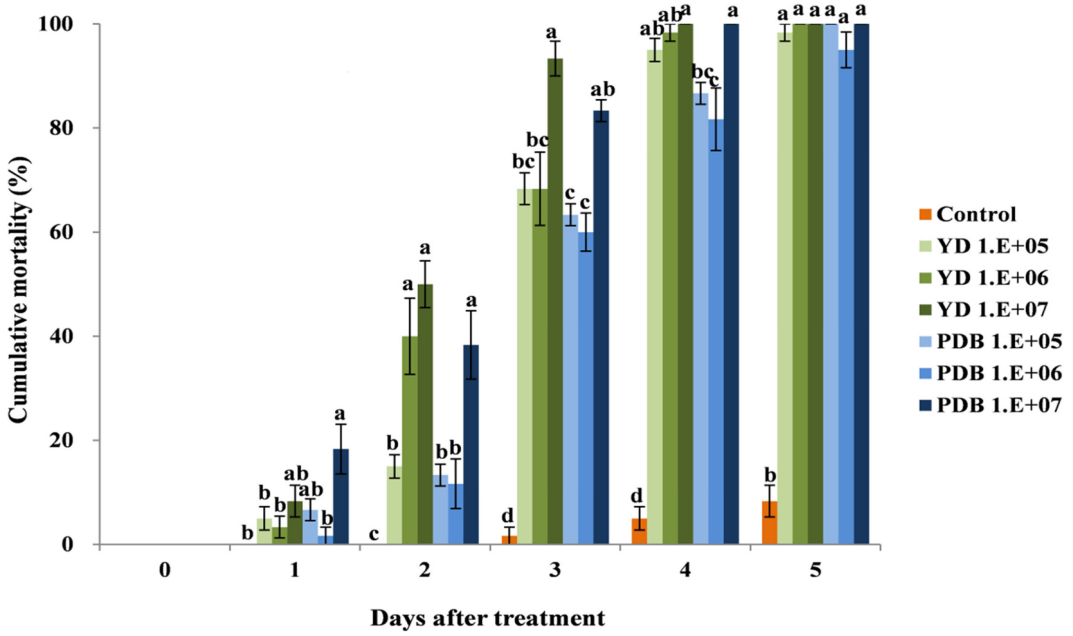

Fig 4. Cumulative mortality of *Spodoptera exigua* larvae by *I.fumosorosea* FG340 after treatment with different conidia concentration (1×10^5, 10^6, 10^7 blastospore/ml) cultivated in selected YD media and PDB media at leaf disc of Chinese cabbage. Control treated with 0.01% Tween80. Letters on the bar indicate significant differences among treatment using Tukey's Studentized Range (HSD) Test (P<0.0001).

Table 5. Medial lethal time (LT_{50}) of blastospore cultured at different media against 3 instar larvae of *Spodoptera exigua*

Culture media	Treatment concentration (blastospore/ml)	LT_{50} (days)
YD media	10^5	2.8 ± 0.1
	10^6	2.5 ± 0.1
	10^7	2.1 ± 0.1
PDB media	10^5	3.0 ± 0.1
	10^6	3.0 ± 0.1
	10^7	2.5 ± 0.1
Control		9.4 ± 3.0

여 미생물제 생산을 위한 대량 배양배지로 YD배지가 적합한 것으로 조사되었다(Fig. 3).

생물검정

최적 YD배지에서 생산된 포자의 살충효과를 검정하기 위해 파밤나방 3령 유충을 이용하여 생물검정하였다. 대조구로는 PDB에서 배양된 포자를 사용하였다.

YD배지에서 생산된 포자를 1×10^5, 10^6, 10^7 blastospore / ml 농도로 처리한 결과 처리 후 3일째 살충율은 68.3%, 68.3%, 93.3% 였으며 반수치사시간(Medial lethal time, LT_{50})은 2.8일, 2.5일, 2.1일(Table 5)이었으며 PDB에 배양한 포자의 살충율 63.3%, 60.0%, 83.3%, 반수치사시간 3.0일, 3.0일, 2.5일로 나타나 YD배지에서 배양된 포자의 살충효과가 PDB에서 생산된 포자보다 우수한 것을 알 수 있었다(F=63.37; df=4, 41; P<0.0001)(Fig. 4).

곤충병원곰팡이의 배양조건은 포자생산량뿐 아니라 포자의 살충활성에도 영향을 미친다. Glucose배지에서 배양된 *Lecanicillium* 포자는 sucrose, maltose, peptone배지에서 자란 포자보다 발아가 빠르고 발아관의 길이가 길었으며, 담배가루이에 대한 높은 살충활성을 나타내었다(Shi et al., 2006). Shah (2005)의 결과에 따르면 *Metarhizium anisopliae* 균주는 PDA (CN 10:1)보다 1% yeast extract (CN 3.6:1) 배지에 배양했을 때 포자를 더욱 많이 생산하였으며 살충활성 또한 우수한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 높은 질소비율이 균주의 발아관련 효소와 저장, 구조단백질에 기여하기 때문에 결과적으로 포자의 발아율과 살충율에 영향을 미친다고 설명하고 있다. 본 연구 결과에서는 선발 YD 배지에서 생산된 포자의 살충활성이 PDB 배지에서 자란 *I. fumosorosea* FG340포자보다 우수한 것으로 나타났다. 따라서 YD 배지는 곤충병원미생물 *I. fumosorosea* FG340을 이용한 미생물살충제를 배양하기 위한 저렴한 배지로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 국립농업과학원의 기관고유사업(PJ01250801)의 지원에 의해 수행되었습니다.

Literature cited

Bartlett, M. C. and S. T. Jaronski (1988) Mass production of entomogenous fungi for biological control of insects, In Microbial control of pests and plant diseases; Burges H. D, Eds.; Academic Press Inc.; New York, pp. 60-85.

Brown, A. D. (1988) The submerged culture of filamentous fungi, In Physiology of industrial fungi; Berray D. R, Eds; Blackwell Scientific Publications, Oxford; Boston, pp.219-248

Morales-Reyes, C., G. M. Mascarin, M. A. Jackson, D. Hall, S. R. Sanchez-Pena and S. P. Arthurs (2018) Comparison of aerial conidia and blastospores from two entomopahtogenic fungi against *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) under laboratory and greenhouse conditions. Biocontrol Sci. Technol. 28(8):737-749.

Cliquet, S. and M. A. Jackson. (1999) Influence of culture conditions and production and freeze-drying tolerance of *Paecilomuces fumosoroseus* blastospores. J. Ind. Micobiol. Biotechnol. 23(2):97-102.

Cliquet, S. and M. A. Jackson (2005) Impact of carbon and nitrogen nutrition on the quality, yield and composition of blasospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 32(5):204-210.

Hajek, A. E. and R. J. St. Leger (1994) Interactions between fungal pathogens and insect hosts. Annu. Rev. Entomol., 39:293-322.

Hallsworth, J. E. and N. Magan (1996) Culture age, temperature, and pH affect the polyol and trehalose contents of fungal propagules. Appl. Environ. Microbiol. 62(7): 2435-2442.

Han, J. H., B. R. Jin, J. J. Kim and S. Y. Lee (2014) Virulence of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* for the microbial control of *Spodoptera exigua*. Mycobiol. 42(4):385-390.

Jackson, M. A., S. Cliquet and L. B. Iten (2003) Media and fermentation process for the rapid production of high concentrations of stable blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. Biocontrol Sci. Technol. 13(1):23-33.

Jackson, M. A., M. R. Mcguire, L. A. Lacey and S. P. Wraight (1997) Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. Mycol. Res. 101(1):35-41.

Jeong, H. K., J. H. Sung and H. J. Lee (2018) Current status and challenges of domestic and international environmenta-friendly agricultural products markets. Report of Rural Economic Institute.

Kim C. G, H. K Jeong, Y. A. Lim and H. J. Kim (2016) Fostering environment-friendly agriculture and strengthening management of agri-environmental resources. Report of Rural Economic Institute.

Mascarin, G. M., M. A. Jackson, N. N. Kobori, R. W. Behle and I. D. Junior (2015) Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* strains. J. Invertebr. Pathol. 127:11-20.

Lawrence, L. A. (2012) Manual of techniques in invertebrate pathology. Second edition, Academic Press, pp. 179-180.

Rural Developmental Administration (2018) Natural plants protectant 2018. http://www.rda.go.kr/board/board.do?prgid=opp_openinfoboard Accessed 15 December 2019.

Shi, Z., L. Mei and L. Zhang (2006) Effect of nutrients on germination of *Verticillium lecanii* (=Lecanicillium sp.) conidia and infection of greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*). Biocontrol Sci. Technol. 16(6):599-606.

Shah, F. A., C. S. Wang and T. M. Butt (2005) Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. FEMS Microbiol. Lett. 251(2):259-266.

Supakdamrongkul, P., A. Bhumiratana and C. Wiwat (2010) Characterization of an extracellular lipase from the biocontrol fungus, *Nomuraea rileyi* MJ and its toxicity toward Spodoptera litura. J. Invertebr. Pathol. 105(3):229-235.

Singh, G., P. J. Rup and O. Kou (2007) Acute, sub lethal and combination effects of azadirachtin and *Bacillus thuringiensis* toxins on *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera; Noctuidae) larvae. B. Entomol. Res. 97(4):351-357.

Tabashnik, B. E. and Y. Carriere (2004) Scientific note Bt transgenic crops do not have favorable effects on resistant insects. J. Insect Sci. 4(1):1-4.

곤충병원성 곰팡이 *Isaria fumosorosea* 균주의 대량배양을 위한 최적 조건

한지희* · 정혜주 · 이모란 · 김재윤 · 김다연 · 안성호 · 이상엽
농촌진흥청 국립농업과학원 농업미생물과

요 약 해충 방제를 위해 이용될 수 있는 친환경 살충제에 대한 수요가 증가함에 따라 곤충병원미생물을 제품화하기 위한 대량배양 연구에 대한 필요성도 증대되고 있다. 따라서 본 연구에서는 파밤나방에 높은 살충활성을 가지는 곤충병원곰팡이 *Isaria fumosorosea* FG340균주의 포자 생산을 위한 대량배양 조건을 탐색하였다. 질소원과 탄소원으로 3% yeast extract, 3% dextrose (YD media, pH 9.0)을 포함하는 배지에 *I. fumosorosea* FG340균주 현탁액을 5×10^4 conidia/ml 농도로 접종하였을 때 배양 4일째 1×10^9 blastospore/ml의 포자를 생산하여 PDB (2.4×10^8 blastospore/ml) 보다 많은 포자를 생산할 수 있었다. 최적 YD media에서 생산된 포자(1×10^5~10^7 blastospore/ml)의 파밤나방 방제효과는 처리 3일째 68.3~93.3%로 PDB에서 배양된 포자와 유사한 살충율(60.0~83.3%)을 나타냈다. 따라서 YD media는 곤충병원미생물 *I. fumosorosea* FG340을 이용한 미생물살충제를 배양하기 위한 저렴한 배지로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

색인어 곤충병원곰팡이, 대량배양, 적강균, 파밤나방