

곤충 병원성 곰팡이 *Beauveria bassiana*로부터 Protease의 최적 생산

고휘진 · 김현규 · 강선철¹ · 권석태*

성균관대학교 유전공학과, ¹대구대학교 생물공학과

초록 : 곤충 병원성 곰팡이 *Beauveria bassiana*(ATCC7159)로부터 곤충 cuticle 분해 효소인 extracellular protease의 최적 생산 조건을 gelatin, bovine serum albumin(BSA), casein 및 polypeptone 등을 첨가하여 조사하였다. 이 효소의 최적 생산 배양 조건은 미량원소를 함유한 0.5% polypeptone, 50mM potassium phosphate pH 6.0이었다. 이 조건에서 protease의 생산은 배양 1일 후부터 급격히 상승하여 배양 3일 이후 최대로 생산되었으며 배양액의 pH가 7.0 이상이 되면 효소 생산효과가 거의 없었다. 이 proteases는 phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF)에 저해받는다. 효소 활성은 pH 8.5와 11.5에서 높게 나타났다. 또한 비변성 isoelectricfocusing gel 전기영동 후 각 gel 절편의 활성을 측정한 결과 protease 활성이 세부분에서 나타났다. 따라서 탄소원 및 질소원으로 polypeptone을 이용하여 생산되는 protease는 세종류 이상인 것으로 판단된다.(1996년 9월 20일 접수, 1996년 10월 10일 수리)

서 론

화학 농약의 이용은 놀라운 농업 생산성의 증대를 가져왔다. 하지만 지속적인 화학 농약의 사용은 약제 내성 곤충의 출현 및 익충의 소멸 등 생태계 파괴와 환경 오염의 문제를 야기하고 있다. 따라서 최근에는 생물적 방제에 큰 관심을 두고 있다. 생물적 방제는 환경 친화적 농법으로 자연생태계를 보존할 뿐 아니라 부작용 없이 지속적 이용이 가능하다. 생물적 방제에 가장 많이 이용되고 있는 것은 *Bacillus thuringiensis*로부터 생산되는 Bt toxin이다.¹⁾ Bt toxin은 숙주 곤충에 매우 특이적이며 곤충이 larva 상태에서만 작용한다. 또한 자외선과 건조 등에 약하여 자연환경에서 지속성이 짧다.^{2,4)} 반면 곤충병원성 곰팡이(Entomopathogenic Fungi)는 숙주 곤충 범위가 비교적 넓으며 자연환경에 매우 강하다는 장점이 있다. 이러한 곤충병원성 곰팡이로는 *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* 등이 가장 잘 알려져 있다. 이들 곰팡이의 감염은 보통 다음의 경로를 통해서 이루어지는 것으로 알려져 있다.^{5,7)} 곰팡이의 분생포자가 숙주 곤충의 외피에 부착하여 발아한 후 외피를 관통하여 체강 내에서 증식 및 독소물질 생산하여 최종적으로 숙주곤충을 사멸케 한다. 이러한 감염에 있어 가장 중요한 단계는 숙주 곤충의 외피를 관통하는 단계로 이는 곰팡이로부터 생산되는 분비 효소에 의해 일어나게 된다.^{8,10)} 곤충의 외피는 cuticle 층으로 구성되며 cuticle의 주성분은 chitin fibrils, protein matrix 및 lipids 등으로 되어있다. 곰팡이가 생산하는 cuticle 분해효소는 chitinase, protease, lipase 등으로 특히 protease가 일차적으로 cuticle 분해에 관여하여 곤충 병원성에 가장 중요 요인인 것으로 보고되어 있다.^{11,13)} 현재까지 곤

충 병원성 곰팡이의 protease에 관한 연구는 *Metarhizium anisopliae*에서 많이 수행되었다. *Metarhizium anisopliae*에서는 현재까지 4가지의 protease가 밝혀졌으며 Pr1 및 Pr2의 cDNA 및 genomic DNA 서열이 각각 밝혀졌다.^{14,15)} 반면 *B. bassiana*에서는 한가지 protease가 부분 정제되어 그 특성이 일부 밝혀졌다.¹⁶⁾ 본 연구에서는 생물적 방제에 이용될 수 있는 곤충 병원성 곰팡이 *B. bassiana*의 protease에 관한 연구 수행의 일환으로 protease 생산을 위한 최적 배양 조건에 관하여 기술 하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

이 실험에 쓰인 균주는 *Beauveria bassiana*(ATCC 7159)이다. 균주는 sabouraud dextrose agar에서 7일간 생육시킨 plate를 4°C에서 보관하던가 또는 0.02% Tween 80으로 plate상의 균체를 현탁시킨 후 이를 멸균한 glass wool에 통과시켜 얻은 conidia를 4°C에서 보관하였다. 액체 배양은 plate 상의 균체를 1×1 cm 정도로 잘라 접종 균체로 이용하였다. 250 ml 삼각 플라스크에 담긴 70 ml의 YPD배지(0.2% yeast extract, 1% pepton, 2% dextrose, pH 4.5)에 균체를 접종하고 28°C, 180 rpm으로 회전식 교반배양기에서 6일간 배양하여 protease의 최적 생산배지 탐색의 접종 균체로 이용하였다.

효소 활성 측정

각 생산배지에 따른 protease의 생산효과는 casein을 기질로 이용하여 효소 활성을 측정, 조사하였다. Protease 활

찾는말 : 곤충 병원성 곰팡이, *Beauveria bassiana*, Extracellular protease

*연락처자

성 측정은 Matsuzawa 등의 방법을 약간 변형하여 다음과 같이 수행하였다.¹⁷⁾ 각 시간별로 배양액을 500 μ l를 취하여 면솜으로 낀 1 ml tip을 이용하여 filtration하여 mycelia 등을 제거하였다. 이 배양액 100 μ l와 50 mM Tris-HCl (pH8.5)에 용해된 0.5% casein 500 μ l를 잘 혼합하여 37°C에서 20분간 반응시켰다. 반응액에 5% trichloroacetic acid(TCA) 500 μ l를 첨가하여 반응을 종결, 실온에서 10분간 방치후 15000 rpm, 15분 원심분리하여 상층액을 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 활성단위 1 unit은 효소액 1 ml이 1분간 흡광도 0.002를 생성하는 양으로 결정하였다.

기질에 따른 효소 생산효과

Protease는 영양분이 없는 상태에서 고분자 단백질을 생육에 필요한 단량체 또는 저분자 물질로 분해시키는 효소이다. 따라서 protease 생성을 위한 유일한 탄소원 및 질소원으로 BSA, gelatin, casein 및 polypeptone을 첨가하여 효소 생산 효과를 관찰하였다. 이들 기질을 각각 0.3%로 첨가한 70 ml의 액체배지(250 ml 삼각플라스크)에 YPD배지에서 키운 균주를 1%로 접종하여 28°C, 180 rpm 회전식 교반배양기에서 8일간 진탕배양하면서 24시간 간격으로 효소 활성을 측정하였다. 효소생산을 위한 액체배지는 기본적으로 trace elements(100X trace elements; 0.02% NaMoO₄ · 2H₂O, 0.02% CuSO₄ · 5H₂O, 0.02% MnCl₂ · 4H₂O, 1% ZnSO₄, 50 mM MES{2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid} pH6.2, 0.2% FeSO₄ · 7H₂O)와 basal salts(10X Basal Salts; 1% KH₂PO₄, 0.5% MgSO₄ · 7H₂O)를 포함한다. 또한 단백질 기질이 첨가된 배지와 비교를 위해 0.3% glucose 첨가배지에서도 효소의 생산여부를 관찰하였다.

효소 생산에 미치는 배지 pH의 영향

배지의 pH가 효소생산에 미치는 영향을 알아보기 위해서 pH를 5.5에서 0.5간격으로 7.5까지 조정된 각각의 액체 배지(최적 기질로 조사된 polypeptone을 0.3%로 첨가)에 YPD배지에서 키운 균주를 1%로 접종한 후 6시간 간격으로 효소의 활성도를 측정하여 최적 배지 pH를 조사하였다. 이 때 사용한 buffer는 50 mM potassium phosphate이며 basal salts의 potassium phosphate는 생략하였다. Havukala 등이 chitinolytic enzymes의 유도시에 이용한 50 mM MES(pH 6.0) buffer를 사용한 배지를 대조구로 사용하였다.¹⁸⁾

배지중의 phosphate 농도의 영향

배지 pH 조정을 위한 완충용액으로 potassium phosphate buffer를 최적 pH 6.0으로 고정하고 10 mM에서 100 mM까지 농도를 달리하여 phosphate의 농도가 효소 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 이는 potassium phosphate에 비하여 약 5배 가격이 비싼 MES buffer를 사용하지 않고 potassium phosphate를 사용하여 pH 유지를 위한 완충액 역할과 균체 생육에 필요한 phosphate 공급을 동시에 만족시키는 농도를 조사하기 위한 것이다. 이 때 위와 같이

50 mM MES buffer(pH6.0)를 대조구로 사용하였고 6시간 간격으로 효소의 활성도를 측정하였다.

최적 기질 농도에 따른 효소 생산효과

앞선 실험에서 *B. bassiana*로부터 protease의 최적 생산 기질로 조사된 polypeptone을 0.1에서 1.5%까지 농도를 다양하게 첨가하여 효소 생산의 최적 기질 농도를 조사하였다.

효소 활성에 미치는 저해제의 영향

대표적인 protease의 저해제를 이용하여 protease의 활성 저해 효과를 조사하였다. 사용한 protease의 저해제로는 EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid, metalloprotease inhibitor), DTT (dithiothreitol, thiolprotease inhibitor), PMSF(Phenylmethylsulfonyl fluoride, serineprotease inhibitor) 및 DFP(diisopropylfluorophosphate, serineprotease inhibitor)이며 반응액에 0.5 mM에서 10 mM까지 각각 첨가하여 얼음에서 10분, 실온에서 30분 방치한 후 앞서 언급한 활성 측정 방법과 동일한 효소 반응을 통해 저해효과를 측정하였다.

pH에 따른 효소 활성 측정

Polypeptone 배지에서 생산한 protease의 pH에 따른 활성 측정은 pH 5.0 ~12.0까지 0.5 간격으로 pH를 달리하여 반응액의 pH를 조정하여 조사하였다. 사용한 pH buffer는 50 mM sodium phosphate(pH 5.0~pH 7.5), 50 mM Tris-HCl(pH 7.5~9.0) 및 50 mM glycine-NaOH(pH 9.0~12.0)이다.

Isoelectricfocusing(IEF) Gel 전기영동

Protease의 pI값 및 생산되는 protease의 종류를 확인하기 위하여 최적 생산배지에서 4일간 배양한 배양액을 filtration하여 비변성 IEF를 수행하였다. 비변성 IEF gel 전기영동은 Robertson 등의 방법을 약간 변형하여 다음과 같이 수행하였다.¹⁹⁾

IEF polyacrylamide gel(7×8×0.15 cm)은 T=10%, C=3% stock solution 6.5 ml, Pharmalyte(Pharmacia) 0.312 ml, 10% ammonium persulfate 50 μ l, TEMED 20 μ l의 조성으로 13 ml를 제조하여 사용하였다. Sample buffer는 3X loading buffer(30% glycerol, 6% Pharmalyte)를 1X로 하여 사용하였으며 전기영동 buffer는 catholyte으로 20 mM NaOH 200 ml과 anolyte으로 10 mM phosphoric acid 300 ml를 사용하였다.

전기영동은 정전압으로 200V에서 1시간 30분 전개한 후 400V에서 2시간 30분간 더 전기영동을 수행하였다. 전기영동이 완료된 후 gel을 10% trichloroacetic acid(TCA)용액에서 15분간 고정을 시킨다음 1% TCA용액에서 10시간동안 담가두어 Pharmalytes를 제거하였다. 다음 단계로 ethanol : acetic acid : deionized water(33 : 10 : 57)에 0.25% sodiumdodesylsulfate(SDS)가 녹아있는 용액에 30분간 담근 후 0.1% coomassie blue 염색액으로 실온에서

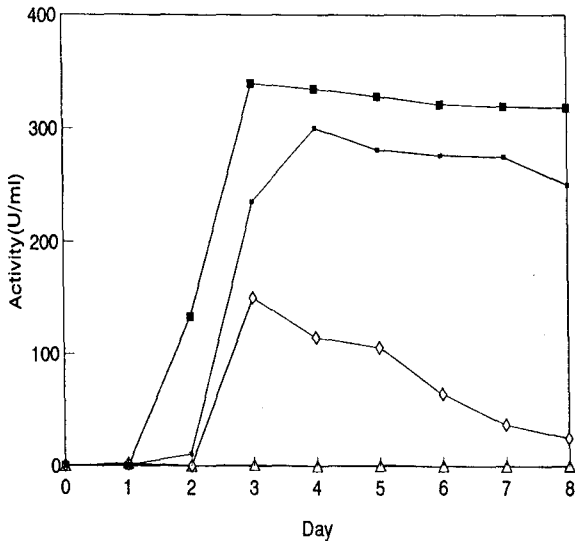


Fig. 1. Effects of different substrates on the production of extracellular protease from *B. bassiana*. Each Substrate was 0.3%. ■—■; BSA, ◇—◇; gelatin, △—△; casein, ■—■; polypeptide.

15분 염색하고 탈염색용액(35% methanol, 5% acetic acid)으로 50°C에서 탈염색하였다. pI값의 결정은 gel을 0.5 cm 간격으로 위에서 아래까지 순차적으로 절단하여 각 절편을 10 mM KCl용액 2 ml이 담긴 tube에 3시간 동안 넣어둔 후 pH를 측정하여 결정하였다.

결과 및 고찰

기질에 따른 생산효과

Trace element와 basal salt를 기본으로 한 배지에 BSA, casein, gelatin 및 polypeptide를 각각 0.3%가 되도록 첨가하고 0.3% glucose 첨가배지를 대조구로 하여 protease의 생산효과를 조사하였다. 그 결과를 Fig. 1에 나타내었다. Protease 활성은 BSA, gelatin 및 polypeptide를 첨가한 배지에서 보였으며 polypeptide이 gelatin보다 약 2배, BSA보다는 약 1.11배 높은 효소활성을 나타내었다. 반면 casein을 기질로 한 경우는 생육이 거의 일어나지 않았고 효소활성도 나타나지 않았다. 그 이유로는 배지멸균시 casein이 불용성 상태를 유지하기 때문에 균체가 잘 이용하지 못하는 것으로 추측된다. 또한 탄소원으로 glucose를 첨가한 경우에는 생육은 왕성하였으나 protease의 활성은 거의 보이지 않았다(data 생략). 따라서 이후 실험은 polypeptide를 첨가한 배지를 기본으로 하였다.

배지 pH에 따른 최적 효소 생산

배지의 pH에 따른 효소의 생산효과는 50 mM potassium phosphate buffer를 이용하여 pH 5.5에서 7.5까지 0.5간격으로 조사하였다. 그 결과 pH 7.0 이상에서는 거의 효소 생산 효과가 없었으며 pH 6.0 buffer를 사용시 효소 활성이 가장 높았으며, 배양 4일까지 배지내 pH가 거의 6.0을 유지하였다(Fig. 2). MES buffer(pH 6.0)를 사용한 경우에도 pH가

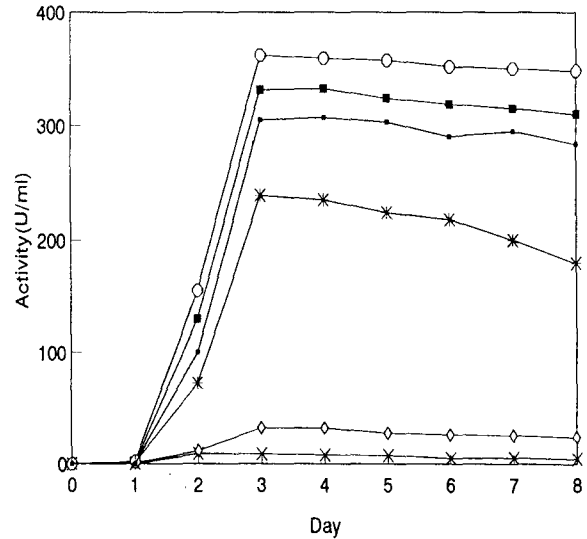


Fig. 2. Effect of pH on the production of extracellular protease from *B. bassiana*. 0.3% polypeptide was added to culture broth containing 50 mM potassium phosphate (■—■; pH 5.5, ○—○; pH 6.0, *—*; pH 6.5, ◇—◇; pH 7.0, ×—×; pH 7.5) or 50 mM MES (■—■; pH 6.0).

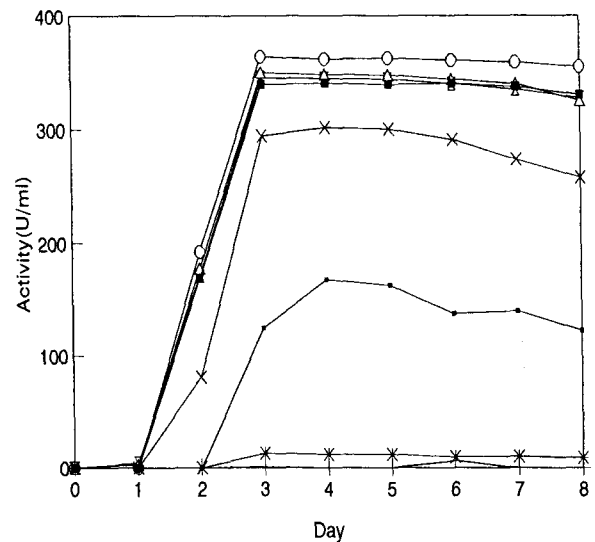


Fig. 3. Effects of phosphate concentrations on the production of extracellular protease from *B. bassiana*. Substrate was 0.3% polypeptide. ■—■; 50 mM MES, +—+; 10 mM phosphate buffer, *—*; 20 mM phosphate buffer, ■—■; 30 mM phosphate buffer, ×—×; 40 mM phosphate buffer, ○—○; 50 mM phosphate buffer, △—△; 75 mM phosphate buffer, X—X; 100 mM phosphate buffer.

잘 유지되었으며 효소 생산도 비교적 잘 되었으나 50 mM 이상의 phosphate buffer만큼 효소 생산은 되지 않았다.

Phosphate 농도에 따른 효소 생산효과

효소 생산을 위한 최적 pH 유지와 균체 생육에 필요한 phosphate 공급을 모두 만족시키는 최적 농도를 선정하기 위해 potassium phosphate(pH 6.0) buffer를 10 mM부터 100 mM 까지 달리하면서 효소활성을 조사하였다. 50mM

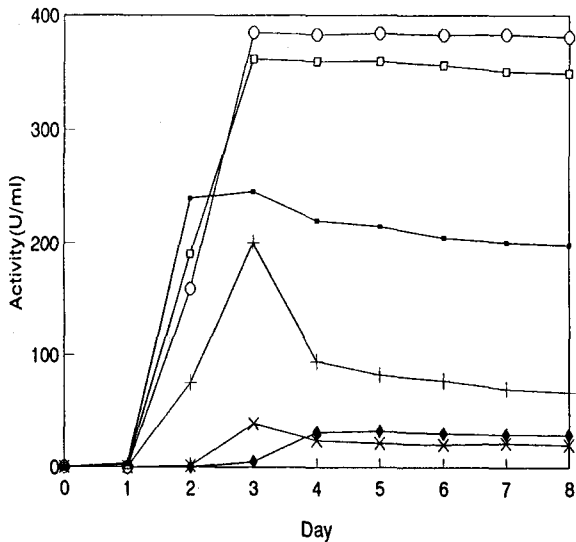


Fig. 4. Effects of polypeptone concentrations on the production of extracellular protease from *B. bassiana*. ■—■; 0.1%, □—□; 0.3%, ○—○; 0.5%, +—+; 0.7%, ×—×; 1.0%, ◆—◆; 1.5%.

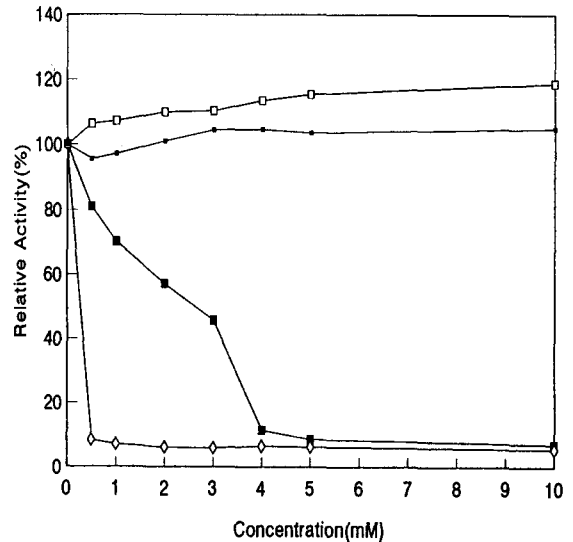


Fig. 5. Effects of various inhibitors on *B. bassiana* extracellular protease activity. Each inhibitor was added from 0.5 mM to 10 mM, respectively. ■—■; EDTA, □—□; DTT, ◇—◇; PMSF, ◆—◆; DFP.

MES buffer(pH 6.0)에 KH_2PO_4 (7.35 mM)를 첨가시킨 기본 배지를 대조구로 사용하여 비교한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 그 결과 potassium phosphate가 40 mM 이하의 농도로 첨가시에는 pH 완충작용과 phosphate 공급에 충분치 못하여 배양액의 pH가 7.0이상으로 올라갔으며 효소 생산 효과도 거의 나타나지 않았다. 또한 20 mM 이하인 경우는 균체 생육도 상당히 저해되었다. 효소의 생산은 potassium phosphate(pH 6.0)를 50 mM로 첨가하였을 때 가장 높았으며 그 이상의 농도에서는 오히려 약간 효소 생산이 감소하였다. 또한 control로 이용한 50 mM MES buffer에서도 효소 생산은 우수하였으나 50 mM potassium phosphate 첨가시 보다는 낮은 활성을 보였다. 이 결과로부터 균체 생육에는 10 mM 이상의 phosphate가 필요한 것으로 판단된다. 또한 MES buffer를 사용하여 phosphate 농도를 조절하는 것보다는 대량 배양시의 경제성(MES가 potassium phosphate보다 약 5배 가격이 비쌌) 및 실험의 편의성 면에서 potassium phosphate buffer를 이용하는 것이 바람직하다고 판단된다.

효소생산을 위한 polypeptone의 최적 농도

50 mM potassium phosphate (pH6.0) buffer를 이용하여 최적 기질로 조사된 polypeptone의 농도를 0.1에서 1.5%까지 각각 배지에 첨가하여 기질의 최적 농도를 조사하였다. 그 결과는 Fig. 4와 같다. 기질 농도가 낮은 경우는 효소 생산은 빨리 일어났으나 최대 생산되지 않았고 오히려 높은 농도로 첨가시에는 polypeptone의 일부 분해 산물이 균체 생육에 충분하여 효소 생산효과는 거의 나타나지 않는 것으로 판단되었다. 한편 0.7%로 첨가시에는 배양 4일째부터 효소 활성이 급격히 감소하는 경향을 보였으며 이는 수차례 실험에서도 같은 결과를 얻었다. 이 결과는 생산된 protease에 의해 분해된 산물이 균체 성장에 충분하고

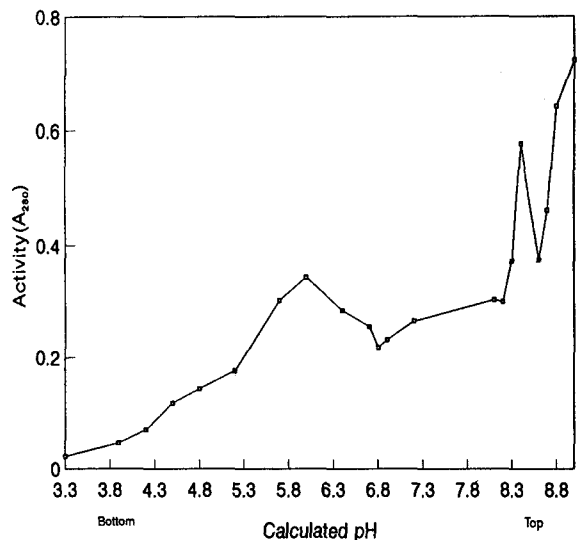


Fig. 6. Optimal pH of *B. bassiana* extracellular protease activity. Protease activities were high at both pH 8.5 and 11.5. This result suggests that proteases produced by *B. bassiana* using polypeptone are more than one. □—□; 50 mM potassium phosphate, ●—●; 50 mM Tris-HCl, ■—■; 50 mM Glycine-NaOH

오히려 효소 생산을 억제하는 것으로 판단된다. 이상의 결과에서 효소 생산 효과는 0.3~0.5%로 첨가시 높게 관찰되었으며 0.5% 첨가 배지에서 가장 높은 효소활성을 보였다.

효소 활성에 미치는 저해제의 영향

효소 활성을 metalloprotease의 inhibitor로 EDTA, serine계 protease inhibitor로 PMSF 및 DFP 그리고 thiol-protease inhibitor로 DTT를 사용하여 활성을 측정하였다. 각 inhibitor는 0.5~10 mM까지 농도를 달리 첨가하여 pH 8.5, 37°C에서 20분 반응시켜 조사하였다. 그 결과를 Fig.

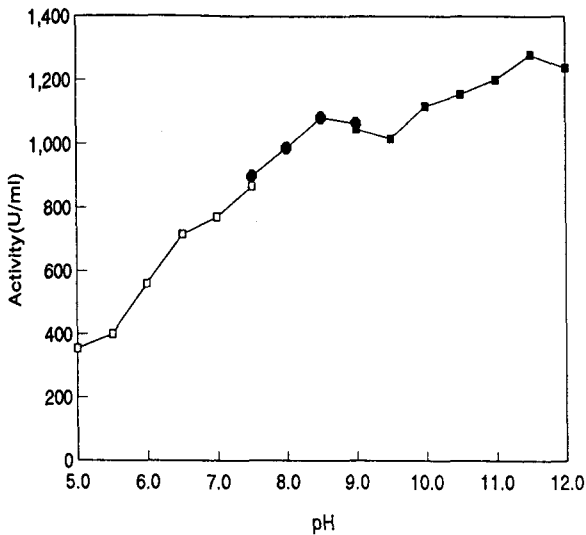


Fig. 7. Isoelectricfocusing gel electrophoresis profile and activity of gel slices. pH determination was carried out by reading 10 mM KCl solution containing gel slice. Activity of gel slice cutted by 4 mm was measured by introducing it into reaction solution(0.5% casein in 50 mM Tris-HCl, pH 8.5).

5에 나타내었다. *B. bassiana*로부터 생산되는 protease의 활성은 PMSF 및 DFP에 의해 저해되었고 DFP보다는 PMSF 첨가시 뚜렷한 저해를 가져왔다. 이로부터 *B. bassiana*가 생산하는 protease는 serine계 protease임을 알 수 있다. 한편 EDTA 및 DTT는 효소 활성에 미치는 영향이 없었다.

배양여액의 pH에 따른 효소활성

효소 생산의 최적 조건에서 4일간 배양한 배양액을 filtration하여 효소 반응에 이용하였다. pH를 5.0에서 12.0까지 달린 0.5% casein 기질용액 500 μl에 배양여액 30 μl를 첨가하여 37°C에서 20분간 반응시켜 효소 반응의 최적 pH 범위를 조사하였다(Fig. 6). 그 결과 pH 8.5에서 높은 활성이 나타났고 pH 9.5 부근에서 약간 낮은 상태를 유지하다가 pH 10.0 이상에서 다시 활성이 높아져서 pH 11.5에서 최대의 활성을 보였다. 따라서 *B. bassiana*는 pH 8.5와 pH 11.5 부근에서 각각 최적 활성을 갖는 중성 및 알칼리성의 두 종류 이상의 proteases를 생산하는 것으로 추측된다.

Isoelectric Focusing Gel 전기영동

배양여액의 pH에 따른 효소활성을 측정한 결과 두 종류 이상의 효소가 존재하는 것으로 추측되었다. 따라서 *B. bassiana*로부터 생산되는 protease의 종류를 확인하기 위하여 isoelectric focusing gel 전기영동을 수행하였다. pH 3.5~pH 10.3의 pH 범위로 전기영동을 수행한 후 약 4 mm 간격으로 gel을 절단하여 0.5% casein 기질 용액에 넣은 후 37°C에서 3시간 반응시켰다. 그 결과 pH 6.0, 8.4, 9.0에서 활성 peak를 보였다(Fig. 7). 이 결과로부터 *B. bassiana*가 polypeptone을 기질로 한 생산배지에서 세 종류 이상의 pro-

tease를 생산함을 알 수 있었다. 이는 gelatin 기질 배지로부터 한 종류의 protease가 생산됨을 보여준 것과는 다른 결과이다.¹⁶⁾ 배양여액의 효소 반응 pH 범위 및 온도조사에서 보여준 결과 및 IEF gel 전기영동의 결과는 여러 종류의 protease가 생산된다는 보고^{20),21)}를 뒷받침하는 결과이며 *Metarhizium anisopliae*에서 4가지의 protease가 생산된다는 결과²²⁾와도 일치한다.

감사의 글

본 연구는 96년도 농림수산 특정 과제(과제명 : 작물 병충해에 대한 살충성 사상균 유래의 생물 농약 개발 및 이용)에 의하여 수행된 연구결과 일부이며 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Agaisse, H. and D. Lereclus (1995) How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? *J. Bacteriol.* **177**, 6027-6032.
2. Feitelson, J. S., T. C. Quick and F. Gaertner (1990) Alternate hosts for *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin genes. In 'New directions in Biological Control', Baker, R. R. and Dunn, P. E., ed., pp. 561-571, Alan R. Liss, New York.
3. McGaughey, W. H. (1985) Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* **299**, 193-195.
4. McGaughey, W. H. (1990) Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. In 'New directions in Biological Control', Baker, R. R. and Dunn, P. E., ed., pp. 583-598, Alan R. Liss, New York.
5. Samsonet, R. A., H. C. Evans and Latge, J. P. (1988) 'Atlas of entomopathogenic fungi'. pp. 187, Springer-Verlag, Berlin.
6. Eilenberg, J., J. Bresciani and J. P. Latge (1986) Ultrastructural studies of primary spore formation and discharge in the genus Entomophthora. *J. Invertbr. Pathol.* **48**, 318-324.
7. Latge, J. P., L. Sampedro., P. Brey and M. Diaquin (1987) Aggressiveness of *Conidiobolus obscurus* against the pea aphid: Influence of cuticular compounds on spore germination. *J. Gen. Microbiol.* **133**, 1987-1997.
8. Brey, P., J. P. Latge and M. C. Prevost (1986) Integumental penetration of the pea aphid, *Acryrthosiphon pisum*, by *Conidiobolus obscurus*(Entomophthoraceae). *J. Invertbr. Pathol.* **48**, 34-41.
9. St. Leger, R. J., A. K. Charnley and R. M. Cooper (1986) Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Synthesis in culture on cuticle. *J. Invertbr. Pathol.* **48**, 85-95.
10. St. Leger, R. J., R. M. Cooper and A. K. Charnley (1987) Production of cuticle-degrading enzymes by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* during infection of

- cuticles from *Calliphora vomitoria* and *Manduca sexta*. *J. Gen. Microbiol.* **133**, 1371-1372.
11. St. Leger, R. J., M. Goettel., D. W. Roberts and R. C. Staples (1991) Prepenetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertbr. Pathol.* **58**, 168-179.
 12. St. Leger, R. J., P. K. Durrands., A. K. Charnley and R. M. Cooper (1988) The role of extracellular chymo-elastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. *J. Invertbr. Pathol.* **52**, 285-293.
 13. Bidochka, M. J. and G. G. Khachatourians (1990) Identification of *Beauveria bassiana* extracellular protease as a virulence factor in pathogenicity toward the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *J. Invertbr. Pathol.* **56**, 362-370.
 14. St. Leger, R. J., D. C. Frank., D. W. Roberts., and R. C. Staples (1992) Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle-degrading-protease structural gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Eur. J. Biochem.* **204**, 991-1001.
 15. Smithson, S. L., I. C. Paterson., A. M. Bailey., S. E. Screen., B. A. Hunt., B. D. Cobb., R. M. Cooper., A. K. Charnley and J. M. Clarkson (1995) Cloning and characterization of a gene encoding a cuticle-degrading protease from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Gene* **166**, 161-165.
 16. Bidochka, M. J. and G. G. Khachatourians (1987) Purification and properties of an extracellular protease produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 1679-1684.
 17. Matsuzawa, M., K. Tokugawa., M. Hamaoki., M. Mizoguchi., H. Taguchi., I. Terada., S.-T. Kwon and T. Ohta (1988) Purification and characterization of aqualysin I (a thermophilic alkaline serine protease) produced by *Thermus aquaticus* YT-1. *Eur. J. Biochem.* **171**, 441-447.
 18. Havukkala, I., C. Mitamura., S. Hara., K. Hirayae., Y. Nishizawa and T. Hibi (1993) Induction and purification of *Beauveria bassiana* chitinolytic enzymes. *J. Invertebr. pathol.* **61**, 97-102.
 19. Robertson, E.F., H. K. Dannelly., P. J. Malloy and H. C. Reeves (1987) Rapid isoelectric focusing in a vertical polyacrylamide minigel system. *Anal Biochem.* **167**, 290-294.
 20. Kucera, M. (1971) Toxins of the entomogenous fungus *Beauveria bassiana*. II. Effect of nitrogen sources on formation of the toxic protease in submerged culture. *J. Invertbr. Pathol.* **17**, 211-215.
 21. Kucera, M., and A. Samsinakova (1968) Toxins of the entomophagous fungus *Beauveria bassiana*. *J. Invertbr. Pathol.* **12**, 316-320.
 22. Paterson, I. C., A. K. Charnley., R. M. Cooper and J. M. Clarkson (1993) Regulation of production of a trypsin-like protease by the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **109**, 323-328.

Optimal Production of Protease from Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*

Hwi-Jin Ko, Hyun-Kyu Kim, Sun-Chul Kang¹ and Suk-Tae Kwon*²(¹Department of Genetic Engineering, Sung Kyun Kwan University; ²Department of Biotechnology, Taegu University)

Abstract : We investigated the optimal condition for the production of extracellular protease(a cuticle-degrading protease) from entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*(ATCC7159) in liquid medium by adding of gelatin, bovine serum albumin(BSA), casein and polypeptone. The optimal induction medium for production of extracellular proteases is composed of 0.5% polypeptone, trace elements and 50 mM potassium phosphate(pH 6.0). In this condition, the production of extracellular proteases increased rapidly after the 24hrs, peaking at the third day and there was little inductive effect in culture broth more than pH 7.0. The proteases were inhibited by phenyl methyl sulfonyl fluoride(PMSF). High activity of protease was showed both range of pH 8.5 and 11.5 and also detected by three different portions of slice gel derived from non-denaturing isoelectricfocusing gel. At least three different extracellular proteases are produced in optimal production medium when polypeptone is used as the sole carbon and nitrogen source.

*Corresponding author