

Beauveria sp. C208의 대량 배양을 위한 생산배지의 최적화

문기혁¹ · 김병혁³ · 윤정원¹ · 성재모² · 김승욱^{3*}

¹수원대학교 유전공학과, ²강원대학교 농생물학과, ³고려대학교 화학공학과

Optimization of Production Medium for Mass Culture of *Beauveria* sp. C208. Ki-Hyuk Moon¹, Pyong-Hyok Kim³, Jeong-Weon Yoon¹, Jae-Mo Sung² and Seung-Wook Kim^{3*}. ¹Department of Genetic Engineering, The University of Suwon, Suwon 445-743, Korea, ²Department of Agricultural Biology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea, ³Department of Chemical Engineering, Korea University, Seoul 136-701, Korea - Entomogenous fungi which attack living insects are powerful means for microbiological insecticide. The purpose of this study is to establish the culture conditions and media for mass production of *Beauveria* sp. C208 which has a broad host range as a potential microbiological pesticide. The temperature and pH range for optimal cultivation of this strain were 28°C and pH 5.0-7.0. For *Beauveria* sp. C 208, 2% rice straw and 0.6% tryptone were found as the proper carbon and nitrogen sources, considering cell mass, enzyme activities such as chitinase, protease and lipase, and spore concentration.

근대농업에 있어서 생산성 향상을 위해 병충해 예방 및 잡초 제거를 위한 많은 기술들이 시도되었고, 그 중 생물학적 또는 물리적 방제기술 보다도 화학적 방제기술이 해충과 잡초제거에 매우 효과적이고 경제적이어서 가장 많이 사용되어 왔다. 그러나 화학적 방제기술에서 주로 사용되는 살충제는 광범위한 살충 범위로 인한 생태계의 파괴와 오염 문제를 유발시킨다. 또한 잦은 살충제의 사용으로 인한 해충의 내성 유발과 이에 따른 더욱 강력한 살충제 사용이라는 악순환이 발생된다. 이런 문제점을 감안할 때에 화학적 살충제를 대신 할 수 있는 방제기술의 개발이 필요하였고, 미생물에 의한 해충 방제기술이 이와 같은 문제점들을 해결할 수 있다고 여겨진다.

미생물을 이용한 살충 수단은 최근의 새로운 개념이 아니며, 이미 오래전부터 상업적 생산이 시작된 것들이다. 대표적으로는 *Bacillus thuringiensis*(Bt)를 들 수 있으며, Bt 유전자를 식물 유전자에 형질전환 시키려는 노력(1)과 함께 아직도 Bt에 관한 많은 연구가 지속적으로 이루어지고 있다(2, 3). 이와 함께 곤충 병원성 곰팡이를 이용한 해충 방제도 매우 강력하고 유용한 수단이므로 이에 대한 관심이 고조되고 있으나 아직 국내에서는 그 연구정도가 미미한 상태이다.

곤충 병원성 곰팡이의 살충 기작은 외부에서의 침입형태이다(4). 곤충 기생균의 분생포자(conidia)가 곤충 외벽에 붙어서 발아하면서 침입도구인 appressorium을 사용하여 큐티클층을 뚫는 물리적인 작용이 있고, 이와함

께 곤충 외벽 큐티클층을 분해하는 chitinase, protease, 그리고 lipase 등의 효소가 작용하는데, 이들 효소의 활성 정도는 실험실내에서 곤충 기생균의 살충능력 정도를 간접적으로 알 수 있는 좋은 지표가 된다(5-7). 이렇게 곤충 내부에 침입한 곰팡이는 독소를 생산하여 곤충을 죽인 후, 지속적인 성장을 하여 곤충 내부를 균사로 꽉 채워 미이사를 형성하고, 수분이나 온도 등 성장하기 좋은 조건이 되면 곤충의 큐티클층을 뚫고 밖으로 나와서 성장한다. 성장한 곰팡이는 다시 침입 가능한 형태인 분생포자를 생산하여 바람이나 물 등의 주위환경을 이용하여 부근지역의 다른 곤충들을 감염시킨다(8).

불완전균류인 *Beauveria*, *Metarhizium*, 그리고 *Aspergillus* 등은 자연 상태에서 자주 접할 수 있는 균주이므로 미생물 살충제 생산을 위하여 많은 연구가 시도되고 있다. 특히 *Beauveria* sp.와 *Metarhizium* sp.는 가장 넓은 숙주범위를 가지고 있고(9), 지난 20여년 간 지속적으로 연구되어 왔으나, 아직도 곤충 기생균을 미생물 살충제로써 산업적 단계의 수준으로 사용하기에는 해결해야 하는 많은 문제점들이 있다. 가장 중요한 문제는 강한 살충성을 유지하면서 대량 배양을 하는 것인데, 세포의 고농도 배양을 위해서는 다양한 배양조건을 만족시켜야 하므로 각 균주마다 적합한 탄소원, 질소원, 무기염류 그리고 다양한 첨가제 등의 기질을 선택하여야 할 뿐만 아니라 온도와 pH도 성장에 알맞는 범위를 설정해 주어야 한다.

따라서 본 연구에서는 가장 넓은 숙주 범위를 가지고 있는 *Beauveria* sp.를 이용하여 성장 조건을 확립하고, 이들 균주를 다양한 기질의 탄소원과 질소원, 무기염류 등을 이용하여 배양한 후 균체량, 효소의 역가 그리고 포자의 농도를 측정하여 산업적 이용이 가능한 적정배지를

*Corresponding author

Tel. 82-2-3290-3300, Fax. 82-2-926-6102

E-mail: swkim@prosyst.korea.ac.kr

Key words: *Beauveria* sp. C208, Mass culture, Medium Optimization

선별함에 그 목적이 있다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배지

곤충 병원성 곰팡이의 일종인 *Beauveria* sp. C208은 강원대학교 농생물학과에서 국내의 용문산으로부터 분리한 균주로서, 이를 분양받아 본 실험에서 사용하였다. 균주보관시 사용한 사면배지는 DPA(2%(w/v) dextrose, 1%(w/v) peptone, 1.5%(w/v) agar) 배지와 SDA 배지(Sabouraud's Dextrose Agar; 4%(w/v) dextrose, 1%(w/v) peptone, 1.5%(w/v) agar)를 사용하였고, 종균배지로는 DPA 배지에서 agar를 제거한 액상배지(DP 배지)를 사용하였다. 효소들의 생산확인을 위한 시험용배지로는, chitinase 확인을 위해서 0.6%(w/v) colloidal chitin, 0.05%(w/v) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.03%(w/v) KH_2PO_4 , 0.07%(w/v) K_2HPO_4 , 0.001%(w/v) $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.0001%(w/v) $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.0001%(w/v) $MnCl_2$, 그리고 1.5%(w/v) agar를 혼합하여 만들었으며, protease 확인 배지로는 1%(w/v) dextrose와 1%(w/v) skim milk(서울탈지분유-단백질 35% 함유) 그리고 1.5%(w/v) agar를 혼합하여 만들었다. Lipase의 확인 배지는 1%(w/v) tributyrin(Sigma Co.), 1%(w/v) potato dextrose broth(Difco Co.) 그리고 1.5%(w/v) agar를 잘 혼합하여 충분히 녹여준 후 homogenizer를 이용하여 유화시켜서 만들었다(10). 모든 배지는 멸균 후 1회용 petri dish에 4 mm의 두께로 분주하여 사용하였다.

Colloidal chitin의 제조

Chitin은 비수용성이며 분자내 수소결합으로 인하여 매우 단단한 구조를 가지고 있기 때문에 산이나 효소에 의해서 쉽게 분해되지 않는다. 그러므로 chitin의 미립자를 물에 분산시켜 chitinase가 작용할 수 있는 colloidal chitin을 제조하여 효소의 기질로 사용하였다. Crude chitin(Practical grade from Crab shells, Sigma) 100 g에 진한 염산 2,000 ml를 가하여 4°C에서 24시간동안 교반시키고 glass wool로 여과하였다. 여액을 4°C 증류수에 가하고 교반시키면 흰색의 colloidal chitin이 생성되며 상온에서 colloidal chitin이 가라앉을 때까지 방치하여 상등액을 버린다. 이를 7,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 침전물을 다시 증류수에 분산시킨 후 5 N NaOH로 중화시킨다. 위의 과정에서 생성된 NaCl을 제거하기 위해서 3~4회 증류수로 세척한 후 원심분리하여 침전물을 회수, colloidal chitin을 제조하였다.

배양조건 확립

최적성장온도 및 pH를 확립하기 위해 온도는 25, 28,

30°C에서, pH는 4.0-7.0으로 하여 성장상태를 관찰하고, 균총의 직경을 측정하여 균체의 성장을 정량하였다. 종균배양배지는 DP broth를 사용하였다. PDA사면배지에서 균체를 약 10일 배양한 후, 멸균수 10 ml를 이용하여 cap tube에 성장한 포자($10^8/ml$) 및 모든 균사체를 분리하고, 이를 시험용 배지에 접종하여서 배양한 후 균체량을 측정하여 종균 배양에 가장 적합한 배지를 선별하였다. 삼각 플라스크에서의 액체배양은 250 ml 삼각플라스크에 100 ml가 되도록 액체배지를 만들어서 28°C, 180 rpm으로 진탕배양 하였다.

균체량 측정

균체량 측정은 dry weight와 PMV(Packed mycelium volume)를 사용하여 측정하였다. Dry weight는 100 ml의 배양액을 filter paper(Whatman No.1)를 이용하여 감압 여과한 후 증류수로 잔여 배지성분을 세척한 다음 80°C에서 항량이 될 때까지 건조하여 질량을 측정하였다. PMV는 균주의 영양원으로 불용성 기질을 사용하였을 때 측정하였다. 포자의 농도는 haemocytometer를 이용하여 측정하였다.

효소 활성도 측정

Chitinase, protease 그리고 lipase 측정용 배지 위에 멸균한 paper disk(ADVANTEC, 8 mm, thin, Toyo Co.)를 올려놓고, 배양물을 20 μ l씩 접종하여 28°C에서 배양한 후, 각 배지 위의 halo의 직경을 2일째와 4일째 두 번 측정하여 효소의 생산 정도를 간접적으로 확인하였다.

다양한 기질에 대한 영향 조사

다양한 탄소원, 질소원, 무기염류 등(Table 1)의 종류와 농도가 균체의 성장 및 효소 역가 그리고 포자의 생성 능력에 미치는 영향을 조사하였다. 탄소원 중 distiller's dry solubles는 수원시내의 탁주 제조공장에서 제공받아 건조 후 마쇄하여 일정한 크기(mesh No. 35)의 채로 걸러서 사용하였으며, yellow sugar와 corn starch, wheat flour등은 시중에서 구입하여 사용하였다. DP broth의 조성에서 dextrose대신 각 탄소원을 1%의 농도로 배지를 만들어서 배양한 후 균체량, 효소의 활성, 그리고 포자의 농도를 측정하여 적합한 탄소원을 선별하였다. 선별된 탄소원은 다시 1-5%까지 농도를 달리해서 배양하여 최적의 탄소원의 농도를 확립하였다. 질소원은 1% peptone으로 고정하였다.

다양한 무기질소원 및 유기질소원을 첨가하여 배양한 후 균체량, 효소의 활성, 포자의 농도를 측정하여 적합한 무기 및 유기질소원의 영향을 살펴보았다. 선별된 질소원은 0.2-1.0%의 농도로 첨가한 후 배양하여 최적 질소원의 농도를 확립하였다.

Table 1. List of various substrates as carbon sources, nitrogen sources, and inorganic salts for the cultivation of *Beauveria* sp. C208

| Carbon source | Nitrogen source | Inorganic salts |
|--|--|--|
| rice straw (mesh No.35) | (NH ₄) ₂ SO ₄ | CoSO ₄ · 7H ₂ O |
| distiller's dry solubles (mesh No.35) | NH ₄ NO ₃ NaNO ₃ | ZnSO ₄ · 7H ₂ O FeSO ₄ · 7H ₂ O |
| saw dust | KNO ₃ | MgSO ₄ · 7H ₂ O |
| rice bran | soybean meal | KCl |
| wheat flour | corn steep liquor | CaCl ₂ · 2H ₂ O |
| corn starch | proteose peptone | CuCl ₂ · 2H ₂ O |
| dextrose | bacto-peptone | MgCl ₂ · 6H ₂ O |
| lactic acid | tryptone | MnCl ₂ · 4H ₂ O |
| citric acid | yeast extract | CaCO ₃ |
| sucrose | hydrolyzed casein | NaCl |
| molasses | distiller's dry | KH ₂ PO ₄ |
| yellow sugar | solubles | K ₂ HPO ₄ |

탄소원과 질소원의 종류 및 농도가 확립된 배지에 다양한 무기염류들을 각각 첨가하여 실험하였다. 이때 선별된 무기염류들 중에서 0.5%로 초기농도를 정한 것은 0.1-0.5%의 농도로 첨가한 후 배양하였고, 0.2%로 초기 농도를 정하여 배양한 것은 0.05-0.3%의 농도로 첨가한 후 실험하였다.

결과 및 고찰

균주의 성장 조건 확립

Beauveria sp. C208의 보존 및 접종에 효과적으로 사용하기 위하여 성장에 적합한 조건을 찾아보았다. 성장 상태는 균총의 직경을 측정하여 균체의 성장을 정량하였다. 곰팡이 균주이므로 PDA와 SDA배지에서 균체량은 큰 차이 없이 성장하는 것을 관찰할 수 있었으나, 자라는 형태와 포자의 생성 정도는 배지의 종류에 따라 차이가 있었다. *Beauveria* sp. C208은 PDA배지에서 더 좋은 성장을 보이며, 배양 온도 25℃와 28℃에서는 큰 성장차이를 보이지 않았다. 배지에 따른 영향은 PDA배지에서는 포자의 생산이 더욱 활발하였으며, SDA배지에서는 균체량의 증식이 더욱 좋았다. 이러한 결과는 SDA배지에는 탄소원으로 사용되는 glucose의 농도가 높아서 충분한 영양분이 공급되기 때문인 것으로 추정되었다. 최적 성장 온도를 알아본 결과 25℃와 30℃에서 큰 차이를 보이지 않았으나 28℃에서 최대 균총의 신장 직경을 보였으므로 최적 성장온도로 결정하였다(Table 2).

초기 pH의 영향

균주의 초기 pH에 관한 영향을 조사한 결과, pH 4.0에서는 저조한 성장을 보였으나, pH 5.0, 6.0 그리고 7.0에

Table 2. Growth of *Beauveria* sp. C208 at different temperatures in potato dextrose agar (PDA) and Sabouraud dextrose agar (SDA) media

| Strain | Growth | | | | | |
|---------------------------|--------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | PDA | | | SDA | | |
| | 25℃ | 28℃ | 30℃ | 25℃ | 28℃ | 30℃ |
| <i>Beauveria</i> sp. C208 | ++ | ++ | + | + | ++ | + |

+: means the diameter of cell growth (+; ≤5.0 cm, ++; ≤6.0 cm).

Table 3. Growth of *Beauveria* sp. C208 at different pH in potato dextrose agar (PDA) media

| Strains | Growth | | | |
|---------------------------|--------|-----|-----|-----|
| | pH4.0 | 5.0 | 6.0 | 7.0 |
| <i>Beauveria</i> sp. C208 | ++ | +++ | +++ | +++ |

+: means the diameter of cell growth (++; ≤6.0 cm, +++; ≤7.0 cm).

서는 양호한 증식을 나타내었다(Table 3). 실험의 결과를 토대로 균주의 배양시 특별히 초기 pH를 맞춰주지 않아도 될 것으로 판단되었으나, 다양한 기질을 사용하여 배지를 만들 경우 각각의 pH가 모두 달라지므로 PDA와 SDA배지를 제외하고는 모든 시험 배지의 pH를 5.5로 맞추어 주었다.

종균 배양 조건의 확립

종균 배양에 접종할 균주를 SDA사면배지에서 배양할 경우 풍부한 양의 배지성분 때문에 포자의 생성이 잘 일어나지 않아 DPA사면배지(2% dextrose, 1% peptone, 1.5% agar)를 사용하였다. 또한 DPA사면배지에 균을 접종한 후에도 10일 이상의 배양기간을 두어서 충분히 포자가 생성되도록 한 후 종균 배양용 배지에 접종을 하였다. 종균 배양용 배지의 dextrose 농도는 2%로 하였다.

정해진 조성의 배지로 종균을 배양할 때에는 균체량의 농도를 높일 목적으로 사면배지의 포자만 멸균수로 분리하지 않고 cap tube에 성장한 모든 균사체까지 작은 약수저를 이용하여 분리, 접종하였다. 이 결과 포자만(10⁸/ml)으로 배양하였을 때 보다 3.5배의 균사체 증가를 얻을 수 있었다.

탄소원의 영향

곤충 병원균의 대량 배양을 위해서 적합한 탄소원을 선별하였다. 좋은 탄소원은 쉽게 구할 수 있고 가격이 저렴하며, 높은 수율을 나타내고, 전처리 등의 복잡한 과정을 생략할 수 있어야 하며, 배양 후 잔여 폐기물의 처리가 용이하여야 하는 등의 다양한 조건을 갖추어야 한다. 이러한 조건들과 함께, cellulose구조를 가지고 있는 기질도 충분히 사용할 수 있으리라 판단되었다. Table 4는 다양한 탄소원을 사용하여 배양한 결과를 보여준다. Rice

Table 4. Effect of various carbon sources on cell mass, enzyme activities and sporulation in the cultivation of *Beauveria* sp. C208

| Carbon substrate | Cell mass | Enzyme activity | | | Sporulation |
|--------------------------|-----------|-----------------|----------|-----------------|------------------------|
| | | Chitinase | Protease | Lipase | |
| *rice straw | 3.00% | ++ | ++ | ++ | 1.96×10^8 /ml |
| *saw dust | ND | ++ | + | +++ | 9.32×10^7 /ml |
| *rice bran | ND | + | - | ++ | 2.96×10^8 /ml |
| *wheat flour | 3.00% | ++ | - | + | 4.28×10^7 /ml |
| *corn starch | 2.00% | ++ | - | ++ | 2.95×10^8 /ml |
| dextrose | 1.17 | ++ | - | ++ | 2.75×10^7 /ml |
| lactic acid | 1.41 | + | - | ++ | 5.50×10^7 /ml |
| citric acid | 1.63 | + | - | ++ | 1.81×10^7 /ml |
| sucrose | 0.90 | ++ | + | ++ | 3.72×10^7 /ml |
| molasses | 5.51 | ++ | - | ++ ⁺ | 2.63×10^8 /ml |
| distiller's dry solubles | 4.00 | + | - | ++ | 6.51×10^8 /ml |
| yellow sugar | 3.81 | ++ | - | ++ | 8.32×10^7 /ml |

Culture was carried out at 28°C in the basal medium containing 1.0% (w/v) carbon source. + and - mean halo size (-; 0 cm, +; ≤1 cm, ++; ≤2.0 cm, +++; ≤2.5 cm, +++; ≤3.0 cm). ND: Not determined, *: Insoluble substrate. Cell mass was measured by Packed Mycelium Volume (PMV).

straw를 이용한 경우 *Beauveria* sp. C208의 균체량 및 효소의 활성도를 고려할 때 다른 기질에 비해서 3개의 효소 활성이 모두 우수하게 나타났고, 포자의 농도도 1.96×10^8 으로 나타났다. *Beauveria* sp. C208은 모든 기질에서 pellet이 아닌 균사체로 고루 퍼져서 자랐으며, 특이한 사항은 saw dust와 corn starch에서는 foam이 매우 많이 발생하였고, foam에는 포자가 많이 있었다. 균체량은 rice straw, distiller's dry solubles, rice bran, molasses, wheat flour 그리고 yellow sugar 등에서 많이 증식했으며, 균체량이 증가하면 포자의 농도도 증가함을 관찰할 수 있었다. 그러나 균체량과 효소의 활성도와는 비례하지 않았고, 효소의 활성도는 기질의 종류에 의해 영향을 받았는데, rice straw를 제외하고는 protease의 활성도가 거의 나타나지 않음을 볼 수 있다. Dextrose와 sucrose는 거의 성장이 미비하였으며, 포자의 농도도 적었으며, lactic acid와 citric acid도 탄소원으로는 부적절하였다.

이들 중 탄소원으로 rice straw와 molasses를 선정하여 최적 농도를 측정한 결과 2% rice straw가 결정되었다(Table 5). Rice straw의 경우가 균체량, 효소 활성도, 포자의 생성능 등이 가장 우수하였고, 균체량은 3% rice straw를 이용했을 때 2%의 경우보다 조금 높았으나 포자의 농도(3.80×10^8 /ml)를 고려할 때 2%의 농도가 적합하였다. 또한 3가지 효소가 고루 분비됨을 알 수 있었다. 그러나 당밀의 경우는 효소의 활성도가 너무 낮게 나타나서 탄소원으로 사용하기에는 부적합하였다(Table 6).

Table 5. Effect of rice straw concentration on cell mass, enzyme activities and sporulation in the cultivation of *Beauveria* sp. C208

| Rice straw | Cell mass (%) | Enzyme activity | | | Sporulation |
|------------|---------------|-----------------|----------|-----------------|------------------------|
| | | Chitinase | Protease | Lipase | |
| *1 | 3.17 | + | + | ++ ⁺ | 3.01×10^8 /ml |
| *2 | 7.00 | + | ++ | ++ | 3.80×10^8 /ml |
| *3 | 8.17 | + | + | ++ | 1.44×10^8 /ml |
| *4 | 4.83 | + | + | ++ | 1.50×10^8 /ml |

Culture was carried out at 28°C in the basal medium. + and - mean halo size (+; ≤1 cm, ++; ≤1.5 cm, ++; ≤2.0 cm, +++; ≤2.5 cm,). *Insoluble substrate. Cell mass was measured by Packed Mycelium Volume (PMV).

Table 6. Effect of molasses concentration on cell mass, enzyme activities and sporulation in the cultivation of *Beauveria* sp. C208

| Molasses % (w/v) | Cell mass (g/L) | Enzyme activity | | | Sporulation |
|------------------|-----------------|-----------------|----------|-----------------|------------------------|
| | | Chitinase | Protease | Lipase | |
| 1 | 4.70 | - | + | ++ ⁺ | 1.06×10^8 /ml |
| 2 | 5.30 | - | + | ++ | 1.00×10^8 /ml |
| 3 | 6.40 | - | + | ++ | 5.69×10^8 /ml |
| 4 | 6.90 | - | + | ++ | 1.47×10^8 /ml |

Culture was carried out at 28°C in the basal medium. + and - mean halo size (-; 0 cm, +; ≤1 cm, ++; ≤1.5 cm, ++; ≤2.0 cm, +++; ≤2.5 cm,).

질소원의 영향

Feng 등(11)은 무기 질소원을 이용할 경우 *Beauveria* sp.는 균체량의 증가보다는 포자의 생성에 도움을 준다고 보고하였다. 그래서 본 실험에서는 (NH₄)₂SO₄, NH₄NO₃, NaNO₃, KNO₃와 같은 무기질소원을 첨가하여 균체량, 효소의 활성, 포자생성능을 살펴보았다. Table 7에서 보는바와 같이 전반적으로 무기질소원을 첨가할 때 균체량 및 효소의 활성이 오히려 감소함을 알 수 있었다. 결과적으로 무기 질소원은 그것이 유일한 질소원이 라면 균체량 증가 및 포자 생산에 크게 도움이 되지 않는

Table 7. Effect of inorganic nitrogen sources on cell mass, enzyme activities and sporulation in the cultivation of *Beauveria* sp. C208

| *Inorganic nitrogen | Cell mass (%) | Enzyme activity | | | Sporulation |
|---|---------------|-----------------|----------|--------|------------------------|
| | | Chitinase | Protease | Lipase | |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 0.97 | + | + | ++ | 3.04×10^8 /ml |
| NH ₄ NO ₃ | 0.47 | + | - | ++ | 1.15×10^8 /ml |
| NaNO ₃ | ND | + | - | - | 1.03×10^8 /ml |
| KNO ₃ | 5.87 | + | ++ | - | 3.17×10^8 /ml |

Culture was carried out at 28°C in the basal medium containing 1.0% (w/v) inorganic nitrogen source. + and - mean halo size (-; 0 cm, +; ≤1 cm, ++; ≤2.0 cm) ND: Not determined. *Insoluble substrate. Cell mass was measured by Packed Mycelium Volume (PMV).

Table 8. Effect of organic nitrogen sources on cell mass, enzyme activities and sporulation in the cultivation of *Beauveria* sp. C208

| *Organic nitrogen | Cell mass (%) | Enzyme activity | | | Sporulation |
|--------------------------|---------------|-----------------|----------|--------|------------------------|
| | | Chitinase | Protease | Lipase | |
| soybean meal | 2.20 | + | - | ++ | 7.16×10^7 /ml |
| corn steep liquor | 4.97 | + | - | - | 2.43×10^8 /ml |
| proteose peptone | 0.97 | + | ++ | ++ | 4.80×10^6 /ml |
| bacto-peptone | 1.37 | + | ++ | - | 2.19×10^8 /ml |
| tryptone | 7.67 | + | ++ | ++ | 1.57×10^8 /ml |
| yeast extract | 2.97 | + | + | + | 1.60×10^8 /ml |
| hydrolyzed casein | 2.37 | + | - | + | 2.37×10^8 /ml |
| distiller's dry solubles | 1.97 | + | + | - | 2.28×10^8 /ml |

Culture was carried out at 28°C in the basal medium containing 1.0% (w/v) organic nitrogen source. + and - mean halo size (-; 0 cm, +; ≤1 cm, ++; ≤2.0 cm). ND: Not determined. *Insoluble substrate. Cell mass was measured by Packed Mycelium Volume (PMV).

것을 알 수 있었다.

Table 8은 유기질소원의 영향을 보여준다. 사용된 유기질소원중 tryptone의 경우 균체량이 7.67%(PMV)로 가장 높게 나타났고, 효소의 활성도 및 포자생성능을 고려할 때 적합한 유기질소원으로 나타났다. 그러나 corn steep liquor, bacto-peptone, hydrolyzed casein 및 distiller's dry solubles 등은 포자생성능이 양호한 편이었으나, 균체량이 낮았고 효소활성도도 만족스럽지 못하였다. 반면에 proteose peptone을 사용한 경우는 효소 활성도는 좋은편이었으나 균체량이 0.97%(PMV)로 매우 낮았고 포자생성능도 가장 낮게 나타났다. 따라서 적합한 유기질소원으로 tryptone을 선정하였고, tryptone의 농도에 따른 영향을 살펴보았다(Table 9). Tryptone의 농도와 관계없이 전반적으로 효소 활성도와 포자생성능이 우수한 것이 특징이었고, 포자생성능은 0.2%의 경우가 더 좋았으나 궁극적으로 포자의 대량생산을 위한 균체량을 고려할 때 0.6% tryptone의 경우가 적합한 것으로 나타났다.

무기 염류의 영향

선정된 탄소원과 질소원의 최적 농도를 기본 배지로

Table 9. Effect of tryptone concentration on cell mass, enzyme activities and sporulation in the cultivation of *Beauveria* sp. C208

| *Tryptone % (w/v) | Cell mass (%) | Enzyme activity | | | Sporulation |
|-------------------|---------------|-----------------|----------|--------|------------------------|
| | | Chitinase | Protease | Lipase | |
| 0.2 | 3.67 | ++ | +++ | ++ | 3.49×10^8 /ml |
| 0.4 | 1.34 | ++ | +++ | ++ | 2.70×10^8 /ml |
| 0.6 | 6.00 | ++ | +++ | ++ | 2.56×10^8 /ml |
| 0.8 | 2.50 | ++ | +++ | ++ | 1.39×10^8 /ml |
| 1.0 | 5.00 | ++ | +++ | ++ | 2.58×10^8 /ml |

Culture was carried out at 28°C in 2% (w/v) rice straw medium containing different tryptone conc. + and - mean halo size (++; ≤2.0 cm, +++; ≤2.5 cm, +++; ≤3.0 cm). ND: Not determined. *Insoluble substrate. Cell mass was measured by Packed Mycelium Volume (PMV).

하여 다양한 무기 염류들을 첨가하여 그 영향을 살펴보았다(Table 10). 전반적으로 무기염류가 *Beauveria* sp. C 208의 성장을 방해하는 것으로 나타났다. 배양 상태를 보면 MgCl₂, KCl 등과 함께 MgSO₄가 6.67%의 가장 높은 균체량을 보였고, 이 결과는 무기염류를 첨가하지 않은 경우에 비해 약 0.67%의 약간 높은 성장을 보였다. 그러나 포자의 농도는 5.76×10^7 /ml로 다소 낮은 편이었다. 그 밖의 무기 염류들이 *Beauveria* C208의 성장에는 별 도움을 주지 못하는 것으로 판단된다. CuCl₂는 배양 결과 오히려 균체의 성장과 함께 효소 생산 등을 저해하는 것으로 나타났다. 무기 염류들을 첨가하여 가장 좋은 결과

Table 10. Effect of various inorganic salts on cell mass, enzyme activities and sporulation in the cultivation of *Beauveria* sp. C208

| *Inorganic salts | Cell mass (%) | Enzyme activity | | | Sporulation |
|---|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------------|
| | | Chitinase | Protease | Lipase | |
| CoSO ₄ ·7H ₂ O ^a | 4.34 | ++ | ++ ⁺ | ++ ⁺ | 9.28×10^6 /ml |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O ^a | 6.00 | + | ++ ⁺ | ++ | 1.07×10^7 /ml |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O ^a | 3.67 | + | +++ | ++ | 6.32×10^7 /ml |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O ^a | 6.67 | + | +++ | ++ | 5.76×10^7 /ml |
| KCl ^b | 5.84 | + | + | ++ | 2.02×10^8 /ml |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O ^b | 4.84 | + | ++ ⁺ | ++ | 6.59×10^5 /ml |
| CuCl ₂ ·2H ₂ O ^a | 1.67 | - | - | - | 4.00×10^4 /ml |
| MgCl ₂ ·6H ₂ O ^b | 5.67 | + | ++ ⁺ | ++ | 2.01×10^8 /ml |
| MnCl ₂ ·4H ₂ O ^b | 0.34 | + | +++ | ++ ⁺ | 3.74×10^7 /ml |
| CaCO ₃ ^a | 5.00 | + | +++ | ++ | 9.68×10^7 /ml |
| NaCl ^b | 3.00 | + | + | ++ ⁺ | 1.31×10^8 /ml |
| KH ₂ PO ₄ ^b | 1.84 | + | ++ ⁺ | ++ | 1.90×10^7 /ml |
| K ₂ HPO ₄ ^b | 4.17 | + | +++ | ++ | 3.10×10^7 /ml |
| None ^c | 6.00 | ++ | +++ | ++ ⁺ | 2.56×10^8 /ml |

Culture was carried out at 28°C in rice straw 2% (w/v), tryptone 0.6% (w/v) medium containing various inorganic salts. ^amean 0.2% (w/v) conc. ^bmean 0.5% (w/v) conc. ^cNo inorganic salt was added. + and - mean halo size (-; 0 cm, +; ≤1 cm, ++; ≤1.5 cm, +++; ≤2.0 cm, +++; ≤2.5 cm, +++; ≤3.0 cm). ND: Not determined. *Insoluble substrate. Cell mass was measured by Packed Mycelium Volume (PMV).

Table 11. Effect of the concentration of MgSO₄ on cell mass, enzyme activities and sporulation in the cultivation of *Beauveria sp. C208*

| *MgSO ₄ % (w/v) | Cell mass (%) | Enzyme activity | | | Sporulation |
|-------------------------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------------|
| | | Chitinase | Protease | Lipase | |
| None | 6.00 | ++ | +++ | ++ ⁺ | 2.56 × 10 ⁸ |
| 0.05 | 3.67 | + | +++ ⁺ | ++ | 1.29 × 10 ⁸ |
| 0.1 | 4.67 | + | +++ ⁺ | ++ | 2.20 × 10 ⁸ |
| 0.2 | 6.34 | + | +++ ⁺ | ++ | 1.84 × 10 ⁸ |
| 0.3 | 5.50 | + | +++ ⁺ | ++ | 5.84 × 10 ⁸ |

Culture was carried out at 28°C in rice straw 2% (w/v), tryptone 0.6% (w/v) medium containing different MgSO₄·7H₂O conc. *No inorganic salt was added. + mean halo size (+; ≤1 cm, ++; ≤2.0 cm, ++++; ≤3.5 cm). *Insoluble substrate. Cell mass was measured by Packed Mycelium Volume (PMV).

가 나왔던 MgSO₄를 농도별로 시험 배양해 본 결과도 마찬가지로 균체량, 효소의 활성도, 포자생성능을 고려할 때 대조구보다 크게 향상되지 않았다(Table 11). 결과적으로 *Beauveria sp. C 208*의 대량배양을 위한 최적배지로서 2% rice straw와 0.6% tryptone으로 구성된 단순 배지가 균체량, 효소활성도 및 포자의 생성능을 고려할 때 적합한 배지로 결정되었다. 이 결과에서 미생물의 포자생산을 위해 값싼 rice straw가 적합한 탄소원으로 나타난 것은 흥미로운 결과이다.

요 약

곤충 병원균을 생물학적 방제 수단인 미생물 살충제로 이용하기 위해서는 대량 배양 기술이 확립되어야 한다. 이에 따라 높은 살충성과 다양한 숙주의 범위를 가지고 있는 *Beauveria*속의 곤충 병원성 곰팡이를 선정하여 성장조건을 확립하였다. 균주의 온도별 균체 증식에의 영향은 25°C와 30°C 등에서도 균체증식에 큰 저해는 없었으나, 28°C가 가장 최적의 온도로 결정되었다. 초기 pH는 4.0을 제외한 5.0에서 7.0까지의 넓은 범위내에서 별다른 차이없이 정상적인 성장을 하였다. *Beauveria sp. C208*의 균체량, 효소 활성도, 그리고 포자의 생성 정도 등을 고려할 때 대량 배양을 위한 배지로서 2% rice straw와 0.6% tryptone이 결정되었다.

감사의 글

본 연구는 농림수산부의 농림수산특정연구비(1996)에

의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Lee, H. H., S. H. Hwang and Y. S. Park. 1990. Transfer of insecticidal toxin gene in plant: cloning of insecticidal protein gene in *Bacillus thuringiensis*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 647-652.
2. Quinlan, R. J. and S. G. Lisansky. 1983. Microbial insecticides, p.p. 233-254. In H. J. Rehm, G. Reed and H. Dellweg, Eds. *Biotechnology*, 3, Verlag Chemie, Weinheim.
3. Lee, J. Y., G. J. Park and H. H. Lee. 1993. Growth and production of endotoxin of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 193-199.
4. Hajek, A. E. and R. J. St. Leger. 1994. Interaction between fungal pathogens and insect hosts. *Annu. Rev. Entomol.* **39**: 293-322.
5. Gupta, S. C., T. D. Leathers, G. N. Er-Sayed and C. M. Ignoffo. 1992. Insect cuticle-degrading enzymes from the entomogenous fungus *Beauveria bassiana*. *Exp. Mycol.* **16**: 132-137.
6. Havukkala, I., C. Mitamura, S. Hara, K. Hirayae, Y. Nishizawa, and T. Hibi. 1993. Induction and purification of *Beauveria bassiana* chitinolytic enzyme. *J. Invertebr. Pathol.* **61**: 97-102.
7. Gupta, S. C., T. D. Leathers, G. N. Er-Sayed and C. M. Ignoffo. 1994. Relationships among enzyme activities and virulence parameters in *Beauveria bassiana* interactions of *Galleria mellonella* and *Trichoplusia ni*. *J. Invertebr. Pathol.* **64**: 13-17.
8. Roberts, D. W. and R. A. Humber. 1981. Entomogenous fungi, p.p. 201-236. In G. T. Cole and B. Kendrick, Eds. *Biology of Conidial Fungi: Vol II*. Academic Press. New York.
9. Moore, D. and C. Prior. 1993. The potential of mycoinsecticides. *Biocontrol News and Inform.* **14**: 31N-40N.
10. Rapp, P., and S. Backhaus. 1992. Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeasts, and bacteria. *Enzyme Microb. Technol.* **14**: 938-943.
11. Feng, M. G., T. J. Poprawski and G. G. Khachatourians. 1994. Production, formation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol Sci. Technol.* **4**: 3-34.

(Received 27 May 1997)