

Metarhizium anisopliae ARS 978의 대량 배양을 위한 배지 조건

문기혁 · 윤정원 · 윤철식¹ · 김승욱²

수원대학교 이과대학 유전공학과, ¹농업과학기술원 작물보호부 곤충과, ²고려대학교 공과대학 화학공학과

요약 : 곤충 병원균을 미생물 살충제로서 이용하기 위한 대량배양 기술을 확립코자 미생물 살충제로 잠재성이 있는 *Metarhizium anisopliae* var. *majus* ARS 978의 대량배양을 위해 액체배양 조건을 확립하였다. 최적배양을 위한 온도와 pH는 각각 28°C와 pH 7.0 이었다. *M. anisopliae* ARS 978의 균체량, 효소들의 활성 및 포자의 생성에 1.0 %(v/v) molasses, 1.0 %(w/v) 주박, 0.3 %(w/v) CaCO₃가 가장 적합한 최적배지 조건이었다. (1998년 5월 22일 접수, 1998년 7월 30일 수리)

Key words : *Metarhizium anisopliae* ARS 978, mass culture, medium establishment.

서 론

미생물을 이용한 살충 수단은 생물학적 방제기술에 이용할 수 있는데, 특히 곤충 병원성균의 상업적 생산을 위하여 많은 연구가 진행되어 왔으며, 이에 대한 관심이 고조되고 있다(Quinlan과 Lisansky, 1983). 곤충 병원성 균을 해충방제에 이용할 경우 많은 이점들이 있는데, 위험물질의 축적이 없고, 살충효과의 선택성 및 지속성이 있으며, 비용이 적게드는 점 등을 들 수 있다. 곤충 병원성 곰팡이의 살충 기작은 외부에서의 침입형태이며(Hajek과 Leger, 1994), 곤충 병원성 균의 분생포자가 곤충 외벽에 붙어서 발아하면서 큐티클층을 뚫는 물리적인 작용을 하는데, 여기에는 곤충 외벽 큐티클층을 분해하는 chitinase, protease, 그리고 lipase 등의 효소들이 작용하는 것으로 알려져 있다(Rapp과 Backhaus, 1992). 이러한 효소들의 활성도는 실험실내에서 곤충 병원성 균의 살충능력 정도를 간접적으로 알 수 있는 좋은 지표가 될 수 있다(Havukkala 등, 1993). 곤충 내부에 침입한 곰팡이는 지속적인 성장을 하여 곤충 내부를 균사로 꽉 채워 미이러를 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(Moore와

Prior, 1993).

이들 곤충 병원성균을 해충방제에 이용할 경우 인간과 고등동물, 어류, 곡물 등에 직접적인 또는 위험물질의 축적 등과 같은 간접적인 위해 요소가 없어 안정성이 높고, 목적하는 해충만 선별적으로 제거할 수 있는 선택성이 있으며, 또한 살충효과의 지속성이 유지되어 반복적인 미생물제제의 살포를 최소한으로 줄일 수 있는 이점이 있다(Samuels 등, 1989; Milner 등, 1991; Zoberi, 1995).

미생물 살충제는 고체배양 또는 액체배양에서 포자, 균사체, 또는 포자와 균사체의 혼합체의 형태로 생산할 수 있다. 일반적으로 고체배양에서의 포자생산이 상당수 연구되고 있으나 대규모화의 문제점 때문에 액체배양도 시도되고 있다. 액체배양에서는 고농도 균체 배양을 위한 배지가 확립된 후 배지성분을 조절하여 포자를 대량생산할 수 있다.

Metarhizium sp.는 미생물 살충제의 용도로 오래 동안 지속적으로 연구되어 왔으며, 이러한 곤충 병원성 균을 산업적으로 이용하기 위해 가장 중요한 문제는 강한 살충성을 유지하면서 대량배양을 하는 것인데, 균사체 또는 포자의 고농도 배양을 위해 다양한 배양조건을 만족시켜야 하므로 균주에 적합한 온도와 pH를 확립하고, 성장에 알맞는 배지를 확립해야 한다(Sneh, 1991; Jenkin과 Prior, 1993; Butt 등, 1995).

따라서 본 연구에서는 *Metarhizium anisopliae* var. *majus* ARS 978을 이용하여 다양한 탄소원과 질소원, 무

* 연락처

기염류 등을 이용하여 액체배양에서 최적배지를 확립하여 최대의 균체량을 얻음과 동시에, 효소의 활성 및 포자의 농도를 고려하여 산업적 이용이 가능한 값싼 배지를 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배지

본 실험에서 사용한 균주는 곤충 병원성 곰팡이의 일종인 *Metarhizium anisopliae* var. *majus* ARS 978로서 농업과학기술원 곤충과로부터 분양받았다. 균주를 보관하기 위한 사면배지는 PDA 배지와 SDA 배지(Sabouraud's Dextrose Agar; 4%(w/v) dextrose, 1%(w/v) peptone, 1.5%(w/v) agar)를 사용하였다. 접종을 위한 종균배지로는 2%(w/v) dextrose와 1%(w/v) peptone을 사용하였다. 효소생산을 확인하기 위한 시험용 배지로는, 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 사용하였다(백, 1989). Colloidal chitin은 제조하여 이용하였다(문 등, 1997). Protease는 1%(w/v) dextrose와 1%(w/v) skim milk (서울탈지분유-단백질 35% 함유), 그리고 1.5%(w/v) agar를 혼합하여 만들었다. Lipase는 1%(w/v) tributyrin (Sigma Co.), 1%(w/v) potato dextrose broth (Difco Co.) 그리고 1.5%(w/v) agar를 잘 혼합 유화시켜 만들었다(Rapp 과 Backhaus, 1992).

배양조건 확립

최적성장온도 및 pH를 확립하기 위해 온도는 25, 28, 30°C에서, pH는 4.0~7.0으로 하여, 고체배지에서 성장상태를 관찰하고, 균총의 직경을 측정하여 균체의 성장정도를 조사하였다.

접종용 액체배양은, PDA사면배지에서 균체를 약 10일 배양한 후, 멸균수 10 ml를 이용하여 cap tube에 성장한 포자($10^8/ml$) 및 모든 균사체를 시험용 배지에 접종하여서 배양한 후 균체량을 측정하여 액체 배양에 가장 적합한 배지를 선별하였다. 삼각 플라스크에서의 액체 배양은 250 ml 삼각플라스크에 100 ml가 되도록 액체 배지를 만들어서 28°C, 180 rpm 으로 진탕배양 하였다.

균체량 측정

균체량 측정은 건조중량과 PMV(Packed mycelium volume)를 이용하여 측정하였다. 건조중량은 100 ml의 배양액을 여과지(Whatman No.1)를 이용하여 감압 여과한 후 증류수로 잔여 배지성분을 세척한 다음 dry oven에서 건조하여 질량을 측정하였다. Packed Mycelium Volume(PMV)은 균주의 배지성분에 불용성 기질이 포함될 때 측정하였다. 포자의 농도는 haemocytometer를 이용하여 측정하였다.

효소 활성도 측정

Chitinase, protease 그리고 lipase 측정용 배지 위에 멸균한 paper disk(ADVANTEC, 8mm diameter, thin, Toyo Co.)를 올려놓고, 배양물을 20 μl 씩 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 등의 종류와 농도가 균체의 성장 및 효소 활성 그리고 포자의 생성 능력에 미치는 영향을 조사하였다. 탄소원중 주박(distiller's dry solubles)은 수원시내의 탁주 제조공장에서 제공받아서 건조 후 마쇄하여 일정한 크기(mesh No. 35)의 체로 걸러서 사용하였다.

결과 및 고찰

배양온도의 영향

M. anisopliae var. *majus* ARS 978을 PDA와 SDA배지에서 배양했을때 자라는 형태와 포자의 생성정도가 차이가 있었다. *M. anisopliae* ARS 978은 두 배지에서 모두 좋은 성장을 보였고, 배양온도 25°C와 28°C에서는 약간의 성장의 차이는 있으나 큰 성장의 차이는 나타나지 않았다. 배지에 따른 영향은 PDA 배지에서는 포자의 생산이 더욱 활발하였으며, SDA 배지에서는 균체의 증식이 더욱 좋았다. 이러한 결과는 SDA 배지에는 PDA 배지에 비해 상대적으로 높은 농도의 dextrose와 peptone이 포함되어 있어 충분한 영양분이 공급되기 때문인 것으로 추정되었다. 실제로 임 등(1988)은 탄소원과 질소원의

종류에 따라 곤충기생균의 균사체 또는 포자 생성능이 달라진다고 보고하였으며, 또한 Jenkin과 Prior(1993)는 질소원이 고갈됨에 따라 곤충기생균의 포자생성이 활성화된다고 보고하였다. 최적 성장온도를 알아본 결과 25~28°C에서 큰 차이를 보이지 않았으나 두 배지 모두 28°C에서 최대 균총의 직경을 보였으므로 최적온도로 결정하였다(표 1).

Table 1. Growth of *M. anisopliae* ARS 978 at different temperatures in potato dextrose agar(PDA) and Sabouraud dextrose agar(SDA) medium

Temp.(°C)	Medium ^{a)}	
	PDA	SDA
25	++	+++
28	+++	+++
30	+++	++

^{a)}Colony diameter : +; ≤5.0 cm, ++; 5.0~6.0cm, +++; 6.0~7.0cm.

초기 pH의 영향

균주의 초기 pH에 관한 영향을 조사한 결과, pH 4.0에서는 저조한 성장을 보였으나, pH 5.0, 6.0 그리고 7.0에서 양호한 성장을 나타내었다(표 2). 실험의 결과를 토대로 균주의 배양시 특별히 초기 pH를 맞춰주지 않아도

될 것으로 판단되었으나, 다양한 기질을 사용하여 배지를 만들 경우 각각의 pH가 모두 달라질 수 있으므로 일반적으로 *Metarhizium* sp.에 많이 쓰이고 있는 pH 5.5로 맞추어 주었다.

Table 2. Growth of *M. anisopliae* ARS 978 at different pH in potato dextrose agar(PDA) medium

pH	Growth rate ^{a)}
4.0	++
5.0	+++
6.0	+++
7.0	+++

^{a)}Colony diameter : ++; 5.0~6.0 cm, +++; 6.0~7.0 cm

탄소원의 영향

적합한 탄소원을 선별하기 위해 값이 싼 농업폐기물 또는 식품산업부산물 등도 포함하여 이용 가능성을 살펴보았다. 표 3은 *M. anisopliae* ARS 978의 대량배양을 위해 다양한 탄소원을 이용하였을때 균체량, 효소의 활성 및 포자생성능의 결과를 보여준다. Molasses의 경우 5.39 g/L로 사용된 탄소원들 중 가장 높은 균체량을 보여주었고, 3가지 효소의 활성이 고루 나타났고, 포자는 6.23×10^6 /ml를 생산하였으며, 사용된 다른 기질들과 비교할 때 가장 우수한 기질로 나타났다. Rice straw, saw

Table 3. Effect of various carbon sources on mycelial mass, enzyme activity and sporulation in the cultivation of *M. anisopliae* ARS 978^{a)}

Carbon substrate	Mycelial mass	Diameter of halo ^{b)}			Sporulation (ml ⁻¹)
		Chitinase	Protease	Lipase	
Rice straw	ND ^{c)}	+	++++	+	1.10×10^5
Saw dust	ND ^{c)}	+	+++	-	3.00×10^6
Rice bran	ND ^{c)}	+	+++	-	9.00×10^4
Dextrose	2.29 g/L	+	+	+	1.50×10^5
Lactic acid	1.45 g/L	+	-	+++	1.00×10^4
Citric acid	2.42 g/L	+	-	+++	5.30×10^5
Sucrose	2.58 g/L	+	+	+	9.10×10^5
Molasses	5.39 g/L	+	+++	+++	6.23×10^6
DDS ^{d)}	ND ^{c)}	+	+++	+	5.00×10^4

^{a)}Culture was carried out at 28°C in the basal medium containing 1.0% (w/v) carbon source. ^{b)}+ and - mean halo size (-; 0 cm, +; ≤1.0 cm, ++; 1.0~1.5 cm, +++; 1.5~2.0 cm, ++++; ≤2.5~3.0 cm). ^{c)}ND : Not determined. ^{d)}DDS : distiller's dry solubles.

dust, rice bran, 그리고 주박 등에서는 성장한 균체량이 적어 측정하기 어려웠으나, 효소의 활성 및 포자의 생산은 나타났다. 따라서 탄소원으로서 적합치 않음을 알 수 있었다. 그외에 dextrose와 sucrose 는 균체량이 약 2.3~2.5 g/l정도로 비슷하여 molasses보다 낮았고, protease 및 lipase의 활성도 감소하였다. Sucrose의 경우는 배양중 wall growth가 매우 큰 것으로 관찰되었다. Lactic acid와 citric acid의 경우는 균체량도 낮고, 특히 protease의 활성이 나타나지 않았다. 따라서 이들 중 탄소원으로서 molasses를 선정하였는데, molasses는 가격이 싸며 주성분은 sucrose이고, 소량의 복잡한 질소원이 포함되어 일반적인 미생물 배양에 좋은 기질로 알려져 있다. 특히 sucrose 보다 훨씬 높은 균체량과 포자 생성을 보여주고 있다.

Table 4. Effect of molasses concentration on mycelial mass, enzyme activity and sporulation in the cultivation of *M. anisopliae* ARS 978^{a)}

Molasses % (v/v)	Mycelial mass (g/L)	Diameter of halo ^{b)}			Sporulation (ml ⁻¹)
		Chitinase	Protease	Lipase	
1	8.2	+	+++	++	3.30 × 10 ⁶
2	8.1	+	+++	++	4.55 × 10 ⁶
3	11.17	+	+++	++	4.25 × 10 ⁶
4	12.21	+	+++	++	8.75 × 10 ⁶

^{a)}Culture was carried out at 28°C in the basal medium.
^{b)}+ and - mean halo size (+; ≤1 cm, ++; 1.5~2.0 cm, +++; 3.0~3.5 cm).

표 4는 molasses 농도를 1~4%(v/v)로 변화시킨 결과이다. Molasses의 농도가 1~2%(v/v)일때는 균체량과 효소의 활성이 같았으나, 포자의 농도는 약 20% 증가함을 알 수 있었다. Molasses의 농도가 3~4%(v/v)로 증가함에 따라 균체량은 계속 증가하였으나, 효소의 활성은 1~2%(v/v)의 경우와 같았다. 특히 4%(v/v)의 경우는 포자의 농도가 다른 농도에 비해 약 2배 정도 증가함을 보여준다. 그러나 1%(v/v)의 농도에서만 정상적인 균체의 성장상태를 보여주었고, 2%(v/v)이상에서는 배양이 힘들 정도로 점도가 너무 높아 균체의 형태면에서 고농도 배양을 위한 농도로 적합치 않음을 알 수 있었다. 물론 4%(v/v)에서 가장 높은 12.21 g/l의 균체량을 보였으나,

앞에서 언급한 이유 때문에 수율면에서 가장 높고 정상적인 균체 성장형태를 나타낸 1%(v/v) molasses를 최적 농도로 선정하였다.

질소원의 영향

적합한 질소원을 선별하기 위해 무기질소원과 유기질소원의 영향을 살펴보았다. 표 5는 무기질소원의 영향을 보여준다. *Beauveria* sp.의 경우 무기질소원을 이용할 경우 일정한 균체량에서 포자의 생성을 증가시킨다고 보고되었다(Feng 등,1994).

Table 5. Effect of inorganic nitrogen sources on mycelial mass, enzyme activity and sporulation in the cultivation of *M. anisopliae* ARS 978^{a)}

Inorganic nitrogen	Mycelial mass	Diameter of halo ^{b)}			Sporulation (ml ⁻¹)
		Chitinase	Protease	Lipase	
None	8.2 g/L	+	+++	++	3.30 × 10 ⁶
(NH ₄) ₂ SO ₄	5.54g/L	+	-	+	9.90 × 10 ⁵
NH ₄ NO ₃	4.94g/L	+	+	-	7.00 × 10 ⁴
NaNO ₃	4.53g/L	+	+	-	2.30 × 10 ⁵
KNO ₃	6.04g/L	+	+	-	1.00 × 10 ⁵

^{a)}Culture was carried out at 28°C in the basal medium containing 1.0% (w/v) inorganic nitrogen source.
^{b)}+ and - mean halo size (-; 0 cm, +; ≤1.0 cm, ++; 1.5~2.0 cm, +++; 3.0~3.5 cm).

그러나 본 실험의 경우 (NH₄)₂SO₄, NH₄NO₃, NaNO₃, KNO₃ 등의 무기질소원을 첨가했을 때 균체량, 효소의 활성, 포자생성능이 모두 감소함을 알 수 있었다. 결과적으로 무기질소원의 첨가는 균체량 증가 및 포자생산에 오히려 나쁜 영향을 주는 것으로 나타났다. 일반적으로 무기질소원은 유기질소원에 비해 상대적으로 균체 성장에 크게 도움을 주지 못하는 것으로 알려져 있다.

표 6은 유기질소원의 영향을 보여준다. 균체량의 경우 유기질소원으로 tryptone을 이용했을 때 9.63 g/l로 가장 높게 나타났고 효소의 활성도 양호하였으나, 생산된 포자의 농도는 7.00 × 10⁴/ml로 매우 낮았다. Hydrolyzed casein의 경우는 균체량이 8.98 g/l로 높았고, 효소의 활성도 양호했으며, 포자의 농도는 1.00 × 10⁵/ml로 나타났다. 또한 주박의 경우도 균체량이 7.50 g/l로 우수하였으

Table 6. Effect of organic nitrogen sources on mycelial mass, enzyme activity and sporulation in the cultivation of *M. anisopliae* ARS 978^{a)}

Organic nitrogen	Mycelial mass	Diameter of halo ^{b)}			Sporulation (ml ⁻¹)
		Chitinase	Protease	Lipase	
None	8.2 g/L	+	++++	++	3.30 × 10 ⁶
Soybean meal	5.60 %	+	+	++	1.96 × 10 ⁶
Corn steep liquor	5.78 g/L	+	++	-	6.00 × 10 ⁴
Proteose peptone	7.34 g/L	+	-	++	3.00 × 10 ⁴
Bacto-peptone	5.70 g/L	+	+	++	4.00 × 10 ⁴
Tryptone	9.63 g/L	+	+++	+	7.00 × 10 ⁴
Hydrolyzed casein	8.98 g/L	+	++	+	1.00 × 10 ⁵
DDS	7.50 g/L	+	+	++	1.08 × 10 ⁷

^{a)}Culture was carried out at 28°C in the basal medium containing 1.0% (w/v) organic nitrogen source.

^{b)}+ and - mean halo size (-; 0 cm, +; ≤1.0 cm, ++; 1.5~2.0 cm, +++; 2.5~3.0 cm, ++++; 3.0~3.5 cm).

며, 효소의 활성도 양호하고 포자의 농도는 1.08 × 10⁷/ml로 가장 높게 나타났다. 그러나 tryptone과 hydrolyzed casein은 산업배지로 사용하기에는 너무 고가의 배지이므로 값싼 기질인 주박도 결과를 볼 때 가능성이 있으므로, tryptone과 함께 농도의 영향을 살펴보았다.

표 7은 tryptone의 농도에 따른 결과로 tryptone의 농도가 증가함에 따라 균체량이 증가하여 1.0%(w/v)에서 가장 높았고, 효소의 활성은 우수하였지만 포자의 농도는 여전히 낮은 수준이었다.

Table 7. Effect of tryptone concentration on mycelial mass, enzyme activity and sporulation in the cultivation of *M. anisopliae* ARS 978^{a)}

Tryptone % (w/v)	Mycelial mass (g/L)	Diameter of halo ^{b)}			Sporulation (ml ⁻¹)
		Chitinase	Protease	Lipase	
0.2	5.34	+	++	+	3.40 × 10 ⁵
0.4	6.98	+	++	++	2.40 × 10 ⁵
0.6	6.82	+	++++	++	1.90 × 10 ⁵
0.8	8.15	+	++++	+++	2.20 × 10 ⁵
1.0	8.25	+	++++	++	2.50 × 10 ⁵

^{a)}Culture was carried out at 28°C in 1%(v/v) molasses medium containing different tryptone conc.

^{b)}+ means halo size (+; ≤1.0 cm, ++; 1.5~2.0 cm, +++; 2.0~2.5 cm, ++++; 2.5~3.0 cm).

주박의 농도에 따른 결과는 표 8에 보여준다. 주박의

농도가 증가함에 따라 균체량이 증가하였고, 1.0%(w/v) 농도에서 약 9.12 g/l의 균체량을 얻었고, 효소의 활성과 포자의 생산도 양호하였다. 이러한 결과는 특히 균체량 및 포자의 농도가 tryptone의 경우보다 증가하였으므로, 값싼배지인 주박을 질소원으로 선정하였으며 적합한 농도는 1%(w/v)이었다.

Table 8. Effect of the concentration of distiller's dry solubles on mycelial mass, enzyme activity and sporulation in the cultivation of *M. anisopliae* ARS 978^{a)}

Distiller's dry solubles % (w/v)	Mycelial mass (g/L)	Diameter of halo ^{b)}			Sporulation (ml ⁻¹)
		Chitinase	Protease	Lipase	
0.2	5.26	+	++	+++	1.89 × 10 ⁶
0.4	5.70	+	+	++++	3.50 × 10 ⁶
0.6	6.90	+	+	++++	3.35 × 10 ⁶
0.8	7.70	+	+	++++	4.75 × 10 ⁶
1.0	9.12	+	+	++++	8.05 × 10 ⁶

^{a)}Culture was carried out at 28°C in 1%(v/v) molasses medium containing different distiller's dry solubles conc.

^{b)}+ and - mean halo size (-; 0 cm, +; ≤1.0 cm, ++; 1.0~1.5 cm, +++; 1.5~2.0 cm, ++++; 2.0~2.5 cm).

무기염류의 영향

선정된 탄소원과 질소원의 최적농도를 기본배지로 하여 다양한 무기염류를 첨가하여 살펴보았다(표 9). 다양

Table 9. Effect of various inorganic salts on mycelial mass, enzyme activity and sporulation in the cultivation of *M. anisopliae* ARS 978^{a)}

Inorganic salts	Mycelial mass(g/L)	Diameter of halo ^{b)}			Sporulation (ml ⁻¹)
		Chitinase	Protease	Lipase	
CoSO ₄ ·7H ₂ O ^{c)}	7.76	+++	+	+++	8.80 × 10 ⁶
ZnSO ₄ ·7H ₂ O ^{c)}	8.86	+	+++++	++++	7.60 × 10 ⁵
FeSO ₄ ·7H ₂ O ^{c)}	6.84	+	+++++	+++	1.17 × 10 ⁷
MgSO ₄ ·7H ₂ O ^{c)}	8.80	+	+++	+++	1.08 × 10 ⁷
KCl ^{d)}	7.66	+	+++++	++++	1.40 × 10 ⁷
CaCl ₂ ·2H ₂ O ^{d)}	7.64	++	+++++	+++	1.17 × 10 ⁷
CuCl ₂ ·2H ₂ O ^{c)}	4.38	-	-	-	4.65 × 10 ⁶
MgCl ₂ ·6H ₂ O ^{d)}	8.08	+	+++++	+++	5.80 × 10 ⁶
MnCl ₂ ·4H ₂ O ^{d)}	7.88	+	+++++	+++	7.85 × 10 ⁶
CaCO ₃ ^{c)}	10.94	+	+++++	+++	8.75 × 10 ⁶
NaCl ^{d)}	7.36	++	+++++	+++	5.75 × 10 ⁶
KH ₂ PO ₄ ^{d)}	8.34	+	+++++	+++	1.43 × 10 ⁷
K ₂ HPO ₄ ^{d)}	7.36	+	+++++	+++	6.70 × 10 ⁶
None ^{e)}	8.74	+	+++	+++	2.55 × 10 ⁶

^{a)}Culture was carried out at 28°C in 1%(v/v) molasses, 1.0%(w/v) distiller's dry solubles medium containing various inorganic salts.

^{b)}+ and - mean halo size (-; 0 cm, +; ≤1 cm, ++; 1.0~1.5 cm, +++; 1.5~2.0 cm, ++++; 2.0~2.5 cm, +++++; 2.5~3.0 cm).

^{c)}0.2 %(w/v) conc.

^{d)}0.5 %(w/v) conc.

^{e)}No inorganic salt was added.

한 무기염류들이 전반적으로 효소의 활성 및 포자의 생성에 좋은 효과가 있음을 알 수 있었다. 이들 중 CaCO₃, MgSO₄, ZnSO₄ 등은 대조구보다 높은 균체량과 효소의 활성을 나타내었다.

Table 10. Effect of the concentration of CaCO₃ on mycelial mass, enzyme activity and sporulation in the cultivation of *M. anisopliae* ARS 978^{a)}

CaCO ₃ (w/v)	Mycelial mass(g/L)	Diameter of halo ^{b)}			Sporulation (ml ⁻¹)
		Chitinase	Protease	Lipase	
None ^{c)}	7.12	+	++	++	3.55 × 10 ⁶
0.05	8.46	+	+++	++	3.00 × 10 ⁶
0.1	9.34	+	+++	++	4.75 × 10 ⁶
0.2	10.04	+	+++	++	7.45 × 10 ⁶
0.3	11.46	+	+++	++	7.40 × 10 ⁶

^{a)}Culture was carried out at 28°C in 1.0%(w/v) molasses, 1.0%(w/v) distiller's dry solubles medium containing different CaCO₃ conc.

^{b)}+ and - mean halo size (-; 0 cm, +; ≤1 cm, ++; 1.5~2.0 cm, +++; 3.0~3.5 cm).

^{c)}No inorganic salt was added.

그러나 CuCl₂의 경우는 균체량도 매우 낮고 효소의 활성도 전혀 나타나지 않았다. 이들 중 CaCO₃의 경우가 10.94 g/l로 가장 높은 균체량을 나타내었고, 효소의 활성 및 포자의 생성도 8.75 × 10⁶/ml로 우수하였다

표 10은 CaCO₃의 농도를 변화시킨 결과이다. CaCO₃의 농도를 0.05~0.3%(w/v)로 변화시켰을 때 CaCO₃ 농도가 증가함에 따라 균체량이 증가하였다. 0.3%(w/v) CaCO₃에서 가장 높은 11.46 g/l의 균체량을 얻었고, 효소의 활성 및 포자의 생성도 우수하여 0.3%(w/v)를 적합한 CaCO₃ 농도로 선정하였다.

결과적으로 *M. anisopliae* ARS 978의 대량배양을 위한 최적배지로서 1.0%(v/v) molasses, 1.0% (w/v) 주박, 그리고 0.3%(w/v) CaCO₃로 구성된 단순배지가 균체량, 효소의 활성 및 포자의 생성을 고려했을 때 적합한 배지로 선정되었다. 특히 이 배지의 성분들의 가격이 저렴하다는 것은 큰 장점이 될 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 농림수산부의 농림수산특정연구비에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Butt, T. M., L. Ibrahim, S. J. Clark and A. Beckett (1995) The germination behaviour of *Metarhizium anisopliae* on the surface of aphid and flea beetle cuticles. *Mycol. Res.* 99(8):945~950.
- 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.
- Hajek, A. E. and R. J. St. Leger (1994) Interaction between fungal pathogens and insect hosts. *Annu. Rev. Entomol.* 39:293~322.
- 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.
- Jenkins, N. E. and C. Prior (1993) Growth and formation of true conidia by *Metarhizium flavoviride* in a simple liquid medium. *Mycol. Res.* 97:1491~1494.
- Milner, R. J., R. J. Huppertz and S. C. Swaris (1991) A new method for assessment of germination of *Metarhizium* conidia. *J. Invert. Pathol.* 57:121~123.
- Moore, D. and C. Prior (1993) The potential of mycoinsecticides. *Biocontrol News and Inform.* 14:31N~40N.
- Quinlan, R. J. and S. G. Lisansky (1983) Microbial insecticides, *Biotechnology*(G. Reed and H. Dellweg, eds) Vol. 3, pp.233~254, Verlag Chemie, Weinheim.
- Rapp, P. and S. Backhaus (1992) Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeasts, and bacteria. *Enzyme Microb. Technol.* 14:938~943.
- Roberts, D. W. and R. A. Humber (1981) Entomogenous fungi, pp.201~236. In G. T. Cole and B. Kendrick, eds. *Biology of Conidial Fungi : Vol II.* Academic Press. New York.
- Samuels, K. D. Z., J. B. Heale and M. Llewellyn (1989) Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* toward *Nilaparvata lugens*. *J. Invert. Pathol.* 53:25~31.
- Sneh B. (1991) Isolation of *Metarhizium anisopliae* from insects on an improved selective medium based on wheat germ. *J. Invert. Pathol.* 58:269~273.
- Zoberi, M. H. (1995) *Metarhizium anisopliae*, a fungal pathogen of *Reticulitermes flavipes*. *Mycologia* 87(3):354~359.
- 문기혁, 김병혁, 윤정원, 성재모, 김승욱 (1997) *Beauveria* sp. C208의 대량배양을 위한 생산배지의 최적화. *산업미생물학회지* 25(6):606~611.
- 백무열 (1989) *Bacillus* sp. YE-1213이 생산하는 chitinase에 관한 연구. 연세대학교 석사학위논문.
- 임대준, 이문홍, R. M. Aguda, M. C. Rombach (1988) 배지의 영양원 및 pH가 수종 곤충기생균의 균체생장 및 포자생산에 미치는 영향. *한국응용곤충학회지* 27(1):41~46.

Selection of optimum medium for mass production of *Metarhizium anisopliae* ARS 978

Ki-Hyuk Moon, Jeong-Weon Yoon, Cheol-Sik Yoon¹, and Seung-Wook Kim²(*Dept. of Genetic Engineering, The University of Suwon, Suwon, Korea, ¹Division of Entomology, National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon, Korea, and ²Dept. of Chemical Engineering, Korea University, Seoul, Korea*)

Abstract : The purpose of this study is to investigate the liquid culture conditions for mass production of *Metarhizium anisopliae* var. *majus* ARS 978 which is a potential microbiological pesticide. The temperature and pH range for optimal cultivation were 28°C and pH 7.0, respectively. For *M. anisopliae* ARS 978, 1.0 %(v/v) molasses, 1.0 %(w/v) distiller's dry solubles, and 0.3 %(w/v) CaCO₃ were found to be the proper nutrients, considering cell mass, enzyme activities and spore concentration.

*Corresponding author