

Penicillium sp. GL-101의 액침배양중 Mycelial Pellet 크기에 영향을 주는 배양조건 및 첨가물

강선철* · 이동규 · 하철규 · 이태근¹

대구대학교 생물공학과, ¹(사)흙살림연구소

초 록 : 유리인산 생성균 *Penicillium* sp. GL-101의 액침배양중 mycelial pellet 형성을 억제하기 위하여 배양 조건(배지 종류, 초기접종량)과 배지 첨가물(점토광물, 계면활성제, PEG 200)의 종류에 따라 pellet 형성에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 이 균주는 배지종류를 달리하여 배양했을 때 YPD > SBD > PDB 순으로 pellet 크기가 감소하였다. 또한 이 균주는 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ conidia/ml 범위의 초기접종농도에서는 농도가 높을수록 pellet의 크기는 감소하였으며, $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ conidia/ml 범위의 농도에서는 무정형의 불규칙적인 pellet을 형성하였다. 점토광물인 zeolite와 diatomite를 각각 1.0% 농도로 첨가하였을 경우에는 pellet이 3/4과 1/2로 감소하였으나, bentonite를 1.0% 첨가하였을 경우에는 오히려 pellet 크기가 2.5배 증가하였다. 계면활성제 역시 이 균주의 mycelial pellet 형성에 영향을 미쳤다. 즉 Triton X-100과 Tween 80을 각각 1.0%로 첨가하였을 경우 pellet 크기가 1/10과 1/4로 감소하였고, SDS를 첨가할 경우에는 이 균의 성장이 완전히 저해되었다. 그리고 PEG 200을 1.0% 농도로 첨가했을 경우에 직경 0.2 ± 0.1 mm의 pellet이 형성되었으며, 이는 대조군에 비하여 1/25의 크기로 이 실험에 사용된 배지 첨가물 중에서 가장 효과적으로 pellet 형성을 억제하였다. (1999년 5월 6일 접수, 1999년 6월 10일 수리)

서 론

지금까지 우리 농업은 단위면적당 작물의 수확량을 극대화하기 위하여 다량의 화학비료와 유기물을 사용해 왔다. 그러나 이들 대부분은 화학적, 생물학적 반응을 거쳐 비료성분의 불용화나 유실현상이 일어나게 된다. 특히 인산은 산성토양에서 철 및 알루미늄 이온과 그리고 알칼리성 토양에서는 칼슘이온과 쉽게 결합하여 불용화됨으로써 토양의 지력 저하와 하천과 바다의 부영양화를 가져오는 주원인이 되고 있다.¹⁾ 앞으로 우리가 지향해야 할 농업은 환경친화적이고 부가가치가 높은 무공해 농산물을 생산하는 영농 시스템이다. 따라서 인산비료의 사용을 대체할 수 있고 환경오염 문제를 해결할 수 있는 방법이 절실히 요구된다. 이러한 문제를 해결하기 위한 가장 바람직한 방법은 인산가용화 미생물을 이용하여 토양속에 다량으로 축적되어있는 불용성 인산대를 작물이 이용할 수 있는 유리인산으로 전환하는 것이다.

인산가용화 미생물을 이용한 환경친화형 생물비료(biofertilizers)의 개발노력은 부단히 이루어져 왔다. 이미 1950년대에 러시아와 동유럽에서 불용성 인산을 가용화시킬 수 있는 미생물(phosphobacteria)을 분리하여 토양에 처리한 결과 작물의 인산 흡수를 증대시킬 수 있었으며 평균 10%의 수량 증가를 보았다.²⁾ 1980년대는 *Penicillium bilaii* 등의 사상균이 인산의 흡수를 증대시키는 것으로 밝혀졌다.³⁾ 최근에는 토양에 천연 인광석을 시비하거나 *Bacillus megaterium*,²⁾ *B. polymyxa*,⁴⁾ *Pseudomonas striata*,^{4,5)} *Pseudomonas* sp.(PI18/89),⁶⁾ *Penicillium*

simplicissimum,⁷⁾ *P. aurantiogriseum*,⁸⁾ *P. bilaii*,³⁾ *Aspergillus awamori*,^{5,9)} *A. aculeatus*,¹⁰⁾ *A. niger*⁷⁾ 등의 인산가용화균을 biofertilizers로 사용했을 때 곡물류, 콩과 식물류, 감자류, 기타 작물들의 생산량이 증대하는 것으로 보고되고 있다.²⁾

미생물을 이용한 biofertilizer의 개발은 미국, 일본, 인도, 중국 등지에서 질소고정균인 VAM(vesicular-arbuscular mycorrhizae)과 *Rhizobium*이 주로 연구되어 세계 각지에서 생산하고 있으며, 특히 미국에서는 VAM과 인산가용화균의 혼용에 대하여 연구가 이루어지고 있다.¹¹⁾ 국내에서도 환경농업의 중요성이 인식되면서 여러 대학 및 연구소에서 미생물체제에 대한 연구를 시작하고 있으나 균주선발 및 배양특성 조사, 포장시험 등에 관한 폭넓은 연구의 부족으로 아직 실험실 수준의 초보적인 단계에 머무르고 있다.^{12,13)} 2,000년대에는 환경보존을 위한 갖가지 규제강화로 화학비료에 대한 제약이 심화될 것으로 판단되기 때문에 난용성 인산염을 효율적으로 분해하여 작물이 필요로 하는 인산질 비료성분을 충분히 공급해 줄 수 있는 biofertilizers의 개발은 중요한 과제가 될 것이다.

본 연구실에서는 이러한 노력의 일환으로 인산염 분해능이 우수한 인산가용화 균을 토양으로부터 분리·동정하였으며 이 균주가 *Penicillium* sp. GL-101임을 밝혔다.¹⁴⁾ 이 사상균은 액체배양시 tricalcium-phosphate, rock phosphate, aluminium phosphate, hydroxyapatite 등의 불용성 인산염을 분해하여 다량의 유리인산을 생성하였다.¹⁴⁾ 이 균주를 생물비료화하기 위한 다음 단계로 batch culture를 시도하였으나 배양용 배지에서 상당한 크기(직경 0.5 cm 이상)의 mycelial pellet이 형성되었다. 일반적으로 mycelial pellet이 형성되면 표면적 감소에 따른 산소 및 영양분 흡수율 감소, 성장률 감소 등의 비효율적 배양적 특성이 나타난다.¹⁵⁾ 따라서 이 균주의 배양균체를 액상

찾는말 : Mycelial pellet, 유리인산 생성균, *Penicillium* sp., 배지 첨가물
*연락처

으로 대량생산하기 위해서는 pellet의 형성을 억제하는 배양기법이 필수적으로 요구된다. *Penicillium* 및 *Aspergillus* 등 생물공학적으로 중요한 사상균을 대량배양할 때 pellet 형성을 억제하거나 pellet의 크기를 줄일 수 있는 몇 가지 방안들이 보고되었다. Amadek은 Tween 80을 배지중에 첨가하여 pellet 형성을 억제하였으며,¹⁶⁾ Inch와 Trinci는 고농도의 glucose를 첨가함으로써 수분활성도(water activity)를 낮추어 pellet 형성을 억제하였다.¹⁷⁾ 또한 Humphreys 등은 배지중에 polyethylene glycol 200(PEG 200)을 첨가함으로써 수분활성도를 낮추어 pellet 형성을 억제하였으며,¹⁸⁾ Kleespies 등은 균주의 종류, 배양초기 pH, 배지 종류에 의해서도 pellet 형성에서 차이가 생길 수 있음을 보고하였다.¹⁹⁾ 그러나 이러한 연구 성과에도 불구하고 사상균의 발효공학에서 pellet 형성의 억제는 여전히 해결하기 어려운 과제로 남아있다. 따라서 본 연구에서는 *Penicillium* sp. GL-101 균주를 생물비료화하기 위한 연구의 일환으로 이 균주의 액침배양중 mycelial pellet 형성을 억제할 수 있는 발효공학적인 기법들을 연구하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

공시균주는 본 연구실에서 인산가용화능이 우수한 균주를 탐색하여 토양으로부터 선발 및 동정한 *Penicillium* sp. GL-101 균주를 사용하였다.¹⁴⁾ 이 균주는 PDA(potato dextrose agar: potatoes infusion 200 g, dextrose 20 g, agar 15 g) 배지에서 배양하여 유지하였다. 실험에 사용된 분생포자는 공시균주를 PDA 배지에서 25°C로 10일간 배양하여 형성된 포자이고 hemocytometer를 이용하여 현미경 하에서 포자수를 측정하였으며, 각 실험마다 새롭게 형성된 포자를 사용하였다. 액침배양에는 PDA에서 agar를 제외한 PDB(potato dextrose broth) 배지와 SDB(Sabouraud dextrose broth: neopepton 10 g, dextrose 40 g), YPD(yeast extract 10 g, peptone 10 g, dextrose 20 g) 배지를 사용하였다.

배지 첨가물 및 시약

Penicillium sp. GL-101의 액침배양중 mycelial pellet 형성을 억제하기 위하여 토양개량제로 이용되고 있는 점토광물을 배지에 첨가하였다. 응회암 변성물인 zeolite와 화산의 분출에 의한 암석의 퇴적물인 bentonite는 제주도산을 사용하였고, 규조토인 diatomite는 고령산을 사용하였다. 각각의 점토광물을 음지에서 1주일간 건조하여 잘게 분쇄한 다음, 체로 걸러서 0.01 mm 이내의 분말을 만들어 배지에 첨가하였다. 기타 mycelial pellet 형성을 억제하기 위하여 배지에 첨가된 SDS(sodium dodecyl sulfate), Tween 80(polyoxyethylsorbitan), PEG 200(polyethylene glycol 200), Triton X-100 등의 시약은 Sigma Co.(USA) 제품을 사용하였다.

배양조건 및 mycelial pellet 크기 측정

배지 종류가 *Penicillium* sp. GL-101의 액침배양중 mycelial

pellet 형성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 100 ml 삼각플라스크에 PDB, SDB, YPD 배지를 각각 30 ml씩 넣고 이 균주의 분생포자(1×10^6 conidia/ml)를 접종한 후 25°C에서 4일간 150 rpm으로 진탕배양하였다.

분생포자의 초기접종농도가 mycelial pellet 형성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 30 ml의 PDB배지에 이 균주의 분생포자를 각각 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 conidia/ml의 농도로 접종한 후 25°C에서 4일간 150 rpm으로 진탕배양하였다.

점토광물이 *Penicillium* sp. GL-101의 mycelial pellet 형성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 30 ml의 PDB 배지에 zeolite, bentonite, diatomite를 각각 0, 0.1, 0.5, 1.0% 농도(w/v)로 첨가한 후, 1×10^6 conidia/ml의 분생포자를 접종하여 상기의 방법으로 배양하였다.

계면활성제와 PEG 200이 mycelial pellet 형성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 Tween 80, Triton X-100, SDS와 같은 계면활성제 및 PEG 200을 각각 0, 0.01, 0.1, 1.0% 농도로 첨가한 PDB배지에 이 균주의 분생포자를 1×10^6 conidia/ml로 접종한 후, 상기의 방법으로 배양하였다.

이상의 방법으로 배양된 균체의 mycelial pellet 크기를 조사하기 위하여 배양액 중에 형성된 pellet을 plate에 옮긴 다음, 해부현미경 하에서 pellet의 직경을 측정하였다. 이상의 실험은 3회 반복하여 그 평균값을 구함으로써 유의성을 높였다.

결과 및 고찰

배지 종류가 mycelial pellet 형성에 미치는 영향

배지 종류가 *Penicillium* sp. GL-101의 액침배양중 mycelial pellet 형성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 이 균주를 PDB, SDB, YPD 배지에서 4일간 액침배양한 후 형성된 pellet의 크기를 조사하였다(Table 1). 이 결과에 의하면 공시균주는 YPD > SDB > PDB 배지순으로 pellet의 크기가 작게 형성되었으며 그 상대적인 차이는 최대 1.5 mm 정도를 나타내었다. 이 같은 차이는 배지의 구성성분이 mycelial pellet 형성에 영향을 미칠 수 있음을 의미한다. 즉 미생물 성장의 질소원으로 사용되는 peptone이 첨가된 YPD와 SDB 배지에서 배양했을 때 peptone이 없는 PDB 배지에서 배양했을 때보다 더 큰 pellet이 형성되었다. 또한 다른 종류의 질소원인 yeast extract가 첨가된 YPD 배지에서 배양했을 때가 이것이 첨가되지 않은 SDB나 PDB 배지에서 배양했을 때보다 더 큰 pellet이 형성되었다. 이상의 결과에서 이 균주는 질소원이 풍부한 배지에서 대체로 mycelial pellet을 크게 형성한다는 것을 알 수 있으며, pellet 크기가 질소원의 종류 및 양과 밀접한 관련이 있을 것

Table 1. Average pellet sizes after 4-days culture of *Penicillium* sp. GL-101 at various media

Media	Average pellet diameter (mm)
PDB	4.9 ± 0.3
YPD	6.5 ± 0.3
SDB	5.8 ± 0.3

Table 2. Average pellet sizes after 4-days culture of *Penicillium* sp. GL-101 at various initial inoculum in PDB medium

Initial inoculum (conidia/ml)	Average pellet diameter (mm)
1×10^3	7.5 ± 0.3
1×10^4	6.3 ± 0.3
1×10^5	5.4 ± 0.2
1×10^6	4.9 ± 0.3
1×10^7	6.0 ± 0.2
1×10^8	8.5 ± 0.3

으로 추정할 수 있다.¹⁵⁾ 이상의 결과를 토대로 본 연구에서는 PDB를 기본배지로 설정하여 다음 실험을 수행하였다.

초기접종량이 mycelial pellet 형성에 미치는 영향

Penicillium sp. GL-101의 분생포자를 각각 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 conidia/ml 농도로 PDB 배지에 접종한 후, 액침배양하여 형성된 mycelial pellet의 크기를 측정하였다(Table 2). 이 결과에 의하면 분생포자의 초기접종량이 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ conidia/ml 범위까지는 그 농도가 높을수록 mycelial pellet은 작게 형성되었으나, 1×10^7 conidia/ml 이상으로 접종하였을 때는 오히려 pellet의 크기가 증가하거나 불규칙적인 무정형의 pellet을 형성하였다. 사상균의 액침배양에서 pellet 형성은 포자간의 상호작용, 균사와 고체입자간의 상호작용, pellet간의 상호작용 등의 다양한 요인에 의하여 결정된다고 보고되었다.²⁰⁾ 포자의 초기접종량을 높이면 spore의 agglomerate 수를 증가시키고, 이것은 pellet의 숫자를 많게 하여 최종적으로 pellet이 작게 형성되는 것으로 보고되고 있다.²¹⁾ 그러나 포자의 초기접종량이 너무 높으면 배양초기에 많은 양의 균사가 생성되고, 이들 균사가 서로 엉겨서 불규칙적이고 무정형의 큰 pellet이 형성되는 것으로 보여진다.²⁰⁾ 이상의 결과로부터 *Penicillium* sp. GL-101의 액침배양중 pellet 형성억제를 위한 최적 초기접종농도는 1×10^6 conidia/ml로 결정하여 다음 실험을 수행하였다.

점토광물이 pellet 형성에 미치는 영향

PDB 배지에 bentonite, zeolite, diatomite를 각각 0, 0.1, 0.5, 1.0%(w/v)로 첨가하고 *Penicillium* sp. GL-101의 분생포자를 1×10^6 conidia/ml로 초기접종하여 배양한 후, 형성된 mycelial pellet의 크기를 조사하였다(Table 3). 그 결과 bentonite의 경우에는 많이 첨가할수록 pellet 크기가 증가하였으나, zeolite와 diatomite의 경우에는 이들 첨가물의 농도가 높을수록 pellet 크기가 감소하였다. 이와 같은 현상은 bentonite가 화산회의 유리 성분이 분해해서 생성된 매우 점착력이 강한 산성백토이기 때문에 이것이 분생포자들 사이의 상호인력을 증가시켜 배양 초기에 큰 agglomerate가 형성되게함으로써 mycelial pellet의 크기가 증가되는 것으로 생각된다. 이에 비해 zeolite와 diatomite는 규산염과 알루미늄염이 주성분으로서 양이온 교환 기능을 가지고 있을 뿐만 아니라 이들 점토광물 입자들의 음전하가 *Penicillium* sp. GL-101의 분생포자들 사이의 상호인력을 완화시켜 배양초기에 agglomerate가 작게 형성되도록 영향을

Table 3. Average pellet sizes after 4-days culture of *Penicillium* sp. GL-101 at the various concentrations of soil additives in PDB medium

Soil additives	Average pellet diameter (mm)
Zeolite (%)	
0	4.9 ± 0.3
0.1	10.0 ± 0.5
0.5	5.5 ± 0.3
1.0	3.0 ± 0.2
Diatomite (%)	
0	4.9 ± 0.3
0.1	6.0 ± 0.3
0.5	3.3 ± 0.2
1.0	2.5 ± 0.1
Bentonite (%)	
0	4.9 ± 0.3
0.1	3.3 ± 0.3
0.5	6.0 ± 0.3
1.0	12.0 ± 0.5

주었기 때문인 것으로 생각된다.

계면활성제와 PEG 2000이 pellet 형성에 미치는 영향

Tween 80, Triton X-100, SDS와 같은 계면활성제 및 PEG 200을 각각 0, 0.01, 0.1, 1% 농도로 첨가한 PDB 배지에 *Penicillium* sp. GL-101의 분생포자를 1×10^6 conidia/ml 농도로 초기접종하여 배양한 후, 형성된 mycelial pellet의 크기를 조사하였다(Table 4). 이 결과에 의하면 배양배지중에 Tween 80과 Triton X-100을 0~0.1% 범위까지 첨가했을 때는 그 농도가 높을수록 mycelial pellet의 크기가 작아졌으나, 이들을 1.0%의 고농도로 첨가했을 때는 오히려 mycelial pellet의 크기가 증가하였다. 지금까지 보고된 결과에 의하면 계면활성제의 종류와 농도에 따라 사상균의 mycelial pellet 형성에 미치는 효과가 다를 수 있음을 보여주었다. 즉 Takahashi 등에 의하면 *A. niger*의 액침배양중 Span과 같은 hydroxyl group을 갖는 계면활성제는 pellet의 형성을 억제하는 반면에 polyoxyethylene group을 갖는 Tween은 pellet의 크기를 증가시켰다고 보고하였다.²²⁾ 그러나 *Mortierella vinacea*의 경우에는 계면활성제와 mycelial pellet 형성에 관련이 없는 것으로 보고 되었다.²²⁾ 본 연구에서는 Tween 80과 Triton X-100이 0~0.1%의 낮은 농도로 첨가될 시에는 배양초기에 작은 agglomerate가 형성되어 작은 크기의 mycelial pellet이 형성되었으나, 1.0%의 고농도로 첨가될 시에는 배양초기에 작은 agglomerate가 형성된다는 점에 있어서는 동일하지만 동시에 이들 계면활성제에 의하여 균체 성장이 저해됨으로써 pellet 분열이 저해되기 때문에 mycelial pellet의 크기는 오히려 증가하는 것으로 생각된다. 그런데 배지에 SDS를 첨가할 경우에는 농도에 관계없이 이 균주의 발아 및 균체성장이 전혀 일어나지 않았다(Table 4). 이것은 Elmayergi 등이 *A. niger*의 액침배양에서 SDS, Tergitol과 같은 계면활성제가 미생물의 성장을 저해한다고 보고한 것과 동일한 결과였다.²¹⁾

Table 4. Average pellet sizes after 4-days culture of *Penicillium* sp. GL-101 by adding the various concentrations of surfactants(SDS, Tween 80 and Triton X-100) and PEG 200 in PDB medium

Additives	Average pellet diameter (mm)
SDS (%)	
0	4.9 ± 0.3
0.01	no growth
0.1	no growth
1.0	no growth
Tween 80 (%)	
0	4.9 ± 0.3
0.01	1.8 ± 0.1
0.1	1.2 ± 0.1
1.0	2.3 ± 0.2
Triton X-100 (%)	
0	4.9 ± 0.3
0.01	0.9 ± 0.1
0.1	0.5 ± 0.1
1.0	1.5 ± 0.1
PEG 200 (%)	
0	4.9 ± 0.3
0.01	2.0 ± 0.1
0.1	0.6 ± 0.1
1.0	0.2 ± 0.1

한편 배지 중에 PEG 200을 첨가할 경우에는 그 농도가 높을수록 pellet의 크기가 작게 형성되었으며, 1% 농도에서 직경 0.2±0.1의 아주 작은 pellet을 형성하였다(Table 4). 이것은 대조군의 1/25의 크기로서 본 연구에서 시험된 모든 첨가제 중에서 가장 뛰어난 pellet 크기 감소효과를 보여주었으며, *Metarhizium anisopliae*의 액침배양에서도 유사한 결과가 보고되었다.¹⁶⁾ 이것은 PEG 200이 수분활성도를 낮추어 분생포자들 사이에 작용하는 상호인력을 완화시킴으로써 생긴 현상으로 해석된다.

이상에서 배지 종류, 분생포자의 초기집중농도, 배지 첨가물의 종류 및 농도가 유리인산 생성균 *Penicillium* sp. GL-101의 액침배양시 mycelial pellet 형성에 영향을 줄 수 있음을 보았다. 이상의 연구결과는 이 균주를 이용한 생물비료 개발뿐 아니라 농업적, 산업적으로 유용한 다른 종류의 사상균을 대량배양할 때 발생할 수 있는 mycelial pellet 형성에 관한 발효공학적 문제해결의 중요한 기초 자료로 활용될 수 있을 것이다.

참고문헌

- Paul, E. A. and Clark, F. E. (1989) Soil microbiology and biochemistry. Academic press. New York.
- Dubey, S. K. and Billore, S. D. (1992) Phosphate solubilizing microorganism (PSM) as inoculant and their role in augmenting crop productivity in India. *Crop Res. Hisar*, **5**, 11.
- Kucey, R. M. N. (1988) Effect of *Penicillium bilaji* on the solubility uptake of P and micronutrients from soil by wheat. *Can. J. Soil Sci.* **68**, 261-270.
- Tiwari, V. N., Pathak, A. N. and Lehri, L. K. (1993) Rock phosphate-superphosphate in wheat in relation to inoculation with phosphate solubilizing organism and organic waste. *Ind. J. Agr. Res.* **27**, 137-145.
- Agasimani, C. A., Mudlagiriappa and Sreenivasa, M. N. (1994) Response of groundnut to phosphate solubilizing microorganisms. *Groundnut News* **6**, 5.
- Illmer, P., Barbato, A. and Schinner, F. (1995) Solubilization of hardly-soluble $AlPO_4$ with P-solubilizing microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* **27**, 265-270.
- Sayer, J. A., Raggett, S. L. and Gadd, G. M. (1995) Solubilization of insoluble metal compounds by soil fungi: development of a screening method for solubilizing ability and metal tolerance. *Mycological Res.* **99**, 987-993.
- Illmer, P. and Schinner, F. (1995) Solubilization of inorganic calcium phosphates-solubilization mechanisms. *Soil Biol. Biochem.* **27**, 257-263.
- Varsha, N., Jugnu, T. and Patel, H. H. (1993) Solubilization of natural rock phosphates and pure insoluble inorganic phosphates by *Aspergillus awamori*. *Ind. J. Exp. Biol.* **31**, 747-749.
- Varsha, N., Jugnu, T. and Patel, H. H. (1995) Mineral phosphate solubilization by *Aspergillus aculeatus*. *Ind. J. Exp. Biol.* **33**, 91-93.
- Kim, K. Y., Jordon, D. and McDonald, G. A. (1988) Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Biol. Fertil. Soils* **26**, 79-87.
- Kim, H. O., Uo, Z. K., Lee, S. C. and Kucey, R. M. N. (1984) Mycorrhizae distribution and rock phosphate dissolution by soil fungi in the citrus fields in Jeju-do. *Cheju National University Journal* **17**, 45-50.
- Suh, J. S., Lee, S. K., Kim, K. S. and Seong, K. Y. (1995) Solubilization of insoluble phosphates by *Pseudomonas putida*, *Penicillium* sp. and *Aspergillus niger* isolated from Korean soils. *J. Korean Soc. Soil Sci. Fert.* **28**, 278-286.
- Choi, M. C., Chung, J. B., Sa, T. M., Lim, S. U. and Kang, S. C. (1997) Solubilization of insoluble phosphates by *Penicillium* sp. GL-101 isolated from soil. *Agric. Chem. Biotechnol.* **40**, 329-333.
- Byrne, G. S. and Ward, O. P. (1989) Effect of nutrition on pellet formation by *Rhizopus arrhizus*. *Biotechnol. Bioeng.* **33**, 912-914.
- Adamek, L. (1963) Submerged cultivation of the fungus *Metarhizium anisopliae*(Metch.). *Folia Microbiologia* **10**, 255-257.
- Inch, J. M. M. and Trinci, A. P. J. (1987) Effects of water activity on growth and sporulation of *Paecilomyces farinosus* in liquid and solid media. *J. Gen. Microbiol.* **113**, 247-252.
- Humphreys, A. M., Matewale, P., Trinci, A. P. J. and Gillespie, A. T. (1989) Effects of water activity on morphology, growth and blastospore production of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces farinosus* in fed-batch culture. *Mycol. Res.* **92**, 257-264.
- Kleespies, R. G. and Zimmermann, G. (1992) Production of blastospores by three strains of *Metarhizium anisopliae* (Metch.) sorokin in submerged culture. *Biocontrol Sci. Technol.* **2**, 127-135.
- Metz, B. and Kossen, N. W. F. (1977) The growth of molds in

- the form of pellets. *Biotechnol. Bioeng.* **19**, 781-799.
21. Elmayergi, H. (1975) Mechanisms of pellet formation of *Aspergillus niger* with an additive. *J. Ferment. Technol.* **53**, 722-729.
22. Takahashi, J. and Yamada, K. (1959) Studies on the effects of some physical conditions on the submerged mold culture.: On the two types of pellet formation in the shaking culture. *J. Agric. Chem.* **33**, 707-710.

Culture Conditions and Additives Affecting to the Mycelial Pellet Size of *Penicillium* sp. GL-101 in the Submerged Culture

Sun Chul Kang*, Dong Gyu Lee, Chul Gyu Ha and Tae Geun Lee¹(*Department of Biotechnology, Taegu University, Taegu, 712-714, Korea; ¹Heuksallim Research Institute, Goisan-gun, Chungbuk, 367-910, Korea*)

Abstract : In order to minimize the mycelial pellet formation, one of the critical obstacles during the fermentation processes of filamentous fungi, an investigation was focused on the culture conditions(media and initial inoculum) and additives(soils, surfactants and polyethylene glycol 200) when a high phosphate-dissolving fungus, *Penicillium* sp. GL-101, was cultured in liquid media. Culturing the strain in PDB, SDB and YPD media, their pellet sizes decreased to the order of YPD > SDB > PDB. And at the high concentrations of the initial inoculum in the range from 1×10^3 to 1×10^6 conidia/ml, the small sizes of pellet were formed in the PDB media. For the initial inoculum between 1×10^7 and 1×10^8 conidia/ml, however, an amorphous pellet or loose aggregate was formed. The addition of soils, zeolite and diatomite, up to 1.0% decreased the pellet sizes to 3/4 and 1/2, respectively, but the pellet was increased to 2.5 times by the addition of bentonite. Surfactants also affected on the size of pellet; the addition of Triton X-100 and Tween 80 up to 1.0% decreased the pellet sizes maximally to 1/10 and 1/4, respectively, while SDS completely inhibited the fungal growth. Among the four additives tested, polyethylene glycol 200 was the most effectively reduced the pellet sizes to 0.2 ± 0.1 mm that resulted in about 25- fold reduction compared to the control.

Key words : pellet formation, phosphate dissolving fungus, *Penicillium* sp., additives

*Corresponding author