

인산가용화균 *Aspergillus* sp. PS-104의 액침배양중 Pellet 크기에 영향을 주는 요인

강선철* · 신승용

대구대학교 생명공학과

Factors Affecting Pellet Formation of Phosphate-solubilizing Fungus, *Aspergillus* sp. PS-104 in Submerged Culture

Sun-Chul Kang* and Seung-Yong Shin

Department of Biotechnology, Daegu University, Gyeongsan 712-714, Korea

Received February 21, 2007; Accepted March 19, 2007

In order to minimize the mycelial pellet size of a high phosphate-solubilizing fungus, *Aspergillus* sp. PS-104 in liquid media, one of the critical obstacles during the submerged culture of filamentous fungi, an investigation was focused on the culture conditions (media and inoculum size) and additives (different soils, surfactants and polyethylene glycol 200). When the fungus was cultured in PDB, SDB and YPD media, their pellet sizes decreased in the order of SDB = YPD > PDB. At the higher concentrations of initial inoculum ranging from 1×10^3 to 1×10^7 conidia/ml, the smaller size of pellet was formed in the PDB medium. In addition, the pellet size was effectively reduced by 1/6~1/4 by the addition of 0.1% soil containing zeolite, diatomite, loess, kaoline and talc, excluding bentonite. The addition of 0.1% Tween 80, Triton X-100 and PEG 200 also decreased the pellet size, but SDS completely inhibited the fungal growth.

Key words: pellet formation, phosphate-solubilizing fungus, *Aspergillus* sp., soil additives, PEG

서론

지금까지 우리 농업은 단위면적당 작물의 수확량을 극대화하기 위하여 다량의 화학비료와 유기물을 사용해 왔다. 특히 인산은 산성토양에서 철 및 알루미늄 이온과 그리고 알칼리성 토양에서는 칼슘이온과 쉽게 결합하여 불용화 됨으로써 토양의 지력 저하와 하천과 바다의 부영양화를 가져오는 주요 원인이 되었다.¹⁾ 이러한 문제를 해결하기 위해서 인산비료의 사용을 대체할 수 있고 환경오염 문제를 해결할 수 있는 방법이 절실히 요구된다. 결국 이러한 문제를 해결하기 위하여 가장 바람직한 방법은 인산가용화 미생물을 이용하여 토양 속에 다량으로 축적되어있는 불용성 인산태를 작물이 이용할 수 있는 유리인산으로 전환하는 것이다.

인산가용화 미생물을 이용한 환경친화형 생물비료(biofertilizers)의 개발노력은 1950년대부터 이루어져 왔으며 1980년대는 *Penicillium bilaji* 등의 사상균이 인산의 흡수를 증대시키는 것으로 밝혀졌다.²⁾ 최근에는 토양에 천연 인광석을 시비하거나

Bacillus megaterium,³⁾ *B. polymyxa*,⁴⁾ *Pseudomonas striata*,^{4,5)} *Pseudomonas* sp. (PI18/89),⁶⁾ *Penicillium simplicissimum*,⁷⁾ *P. aurantiogriseum*,⁸⁾ *P. bilaji*,²⁾ *Aspergillus awamori*,^{5,9)} *A. aculeatus*,¹⁰⁾ *A. niger*,⁷⁾ *Penicillium* sp. GL-101¹¹⁾ 등의 인산가용화균을 biofertilizers로 사용했을 때 곡물류, 콩과식물류, 감자류, 기타 작물들의 생산량이 증대하는 것으로 보고되고 있다.³⁾

미생물을 이용한 biofertilizer의 개발은 미국, 일본, 인도, 중국 등지에서 질소고정균인 VAM(vesicular-arbuscular mycorrhizae)과 Rhizobium이 주로 연구되어 세계 각지에서 생산되고 있으며, 특히 미국에서는 VAM과 인산가용화균의 혼용에 대한 연구가 이루어지고 있다.^{12,13)}

본 연구에서는 난용성 인산염을 효율적으로 분해하여 작물이 필요로 하는 인산질 비료성분을 충분히 공급해 줄 수 있는 biofertilizers의 개발의 일환으로, 인산염 분해능이 우수한 인산가용화 균을 토양으로부터 분리·동정하였다. 여기에서 분리된 사상균은 액침배양 시 tricalcium-phosphate, rock phosphate, aluminium phosphate, hydroxyapatite 등의 불용성 인산염을 분해하여 유리인산을 생성하였다.¹¹⁾ 이들 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 따

*Corresponding author

Phone: 82-53-850-6553; Fax: 82-53-850-6509

E-mail: sckang@daegu.ac.kr

른 산소 및 영양분 흡수를 감소, 성장을 감소 등과 같은 비효율적인 배양특성이 나타나는 것으로 보고되어 있다.¹⁴⁾ 이러한 문제점을 해결하기 위해 *Penicillium* 및 *Aspergillus* 등 산업적으로 중요한 사상균을 대량배양할 때, pellet의 형성을 억제하거나 pellet의 크기를 줄일 수 있는 몇 가지 방법들이 보고되어 있다. Adamek은 Tween 80을 배지에 첨가하여 pellet 형성을 억제하였으며,¹⁵⁾ Inch와 Trinci는 고농도의 glucose를 첨가함으로써 수분활성도(water activity)를 낮추어 pellet 형성을 억제하였다.¹⁶⁾ 또한 Humphreys 등은 배지에 polyethylene glycol 200 (PEG 200)을 첨가함으로써 수분활성도를 낮추어 pellet 형성을 억제하였으며,¹⁷⁾ Kleespies 등은 균주의 종류, 배양 pH, 배지 종류에 따라서 pellet 형성에 차이가 생길 수 있음을 보고하였다.¹⁸⁾ Kang 등은 다양한 점토광물을 첨가함으로써 pellet 형성을 억제하였다.¹⁹⁾ 그러나 이러한 연구 성과에도 불구하고 사상균의 발효공학에서 pellet 형성의 억제는 현재까지도 해결하기 어려운 과제로 남아있다. 본 연구에서는 *Aspergillus* sp. PS-104 균주를 생물비료화하기 위한 일환으로 이 균주의 액침배양시 mycelial pellet 형성을 억제할 수 있는 다양한 요인을 조사하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지. 공시균주는 본 연구실에서 인산가용화능이 우수한 균주를 탐색하여 토양으로부터 선발 및 동정한 *Aspergillus* sp. PS-104 균주를 사용하였다. 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 PDA 배지에서 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. *Aspergillus* sp. PS-104의 액침배양 중 mycelial pellet 형성을 억제하기 위하여 토양개량제로 이용되고 있는 점토광물을 배지에 첨가하였다. 응회암 변성물인 zeolite와 화산의 분출에 의한 암석의 퇴적물인 bentonite는 제주도산을 사용하였고, 규조토인 diatomite, 황토, 고령토인 kaoline과 활석인 talc를 사용하였다. 진처리 과정으로서 각각의 점토광물을 음지에서 1주일간 건조하여 잘게 분쇄한 다음, 체로 걸러서 0.01 mm 이내의 분말을 만들어 배지에 첨가하였다. 이외에 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.

***Aspergillus* sp. PS-104의 액침배양 및 pellet 크기 측정.** 배지종류별 *Aspergillus* sp. PS-104의 액침배양 중 mycelial pellet 형성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 100 ml 삼각플라스크에 PDB, SDB, YPD 배지를 각각 30 ml씩 넣고 이 균주의 분생포

자를 접종한 후 25°C에서 4일간 150 rpm으로 진탕배양하였다.

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

점토광물이 *Aspergillus* sp. PS-104의 mycelial pellet 형성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 30 ml의 PDB 배지에 zeolite, bentonite, diatomite, 황토, kaoline과 talc를 각각 0.1, 0.5 1.0% 농도(W/V)로 첨가한 후, 1×10^6 spore/ml의 분생포자를 접종하여 상기의 방법으로 배양하였다.

계면활성제와 PEG 200이 mycelial pellet 형성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 Tween 80, Triton X-100, SDS와 PEG 200을 각각 0.01, 0.1, 1.0% 농도로 첨가한 PDB 배지에 이 균주의 분생포자를 1×10^6 spore/ml씩 접종한 후, 상기의 방법으로 배양하였다. 이상의 방법으로 배양된 균체의 mycelial pellet 크기를 조사하기 위하여 이들 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 *Aspergillus* sp. PS-104의 액침배양 중 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 배지 순으로 pellet의 크기가 작게 형성되었다. 이는 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. 이와같은 결과로부터 이 균주는 질소원이 풍부한 배지에서 대체로 mycelial pellet을 크게 형성한다는 것을 알 수 있으며, pellet의 크기가 질소원의 종류 및 양과 밀접한 관련이 있을 것으로 사료된다. 이상의 결과를 바탕으로 본 연구에서는 PDB를 기본배지로 하여 다음 실험을 수행하였다.

분생포자의 초기접종농도가 mycelial pellet 형성에 미치는 영향. *Aspergillus* sp. PS-104의 분생포자를 각각 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 conidia/ml 농도로 PDB 배지에 접종한 후, 액침배양하여 형성된 mycelial pellet의 크기를 측정하였다(Table 2). 분생포자의 초기접종농도가 1×10^3 conidia/ml에서 1×10^7 conidia/ml까지는 농도가 높을수록 mycelial pellet은 작게

Table 1. Average pellet sizes after 4-days culture of *Aspergillus* sp. PS-104 in different media

Media	Pellet diameter (mm)
PDB	3.8±0.4
YPD	6.3±0.5
SDB	6.3±0.5

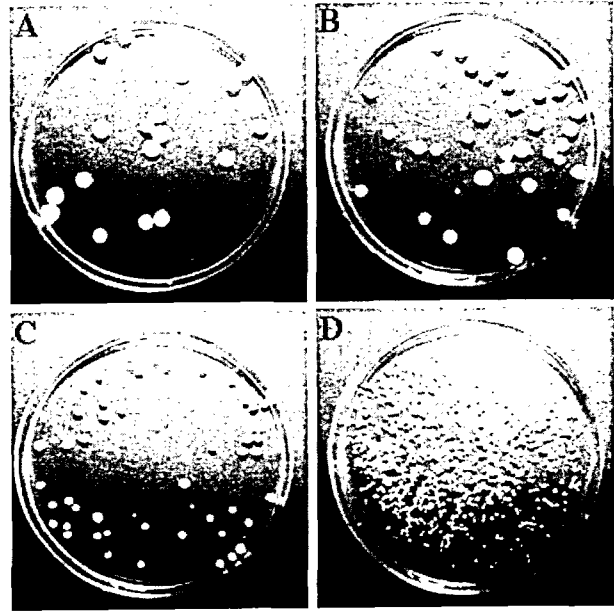
Table 2. Average pellet sizes after 4-days culture of *Aspergillus* sp. PS-104 in PDB medium inoculated with different concentrations of conidia

Inoculum concentration (conidia/ml)	Pellet diameter (mm)
1×10^3	8.1 ± 0.5
1×10^4	6.9 ± 0.4
1×10^5	4.4 ± 0.4
1×10^6	3.8 ± 0.4
1×10^7	3.8 ± 0.4

Table 3. Average pellet sizes after 4-days culture of *Aspergillus* sp. PS-104 in PDB medium with different concentrations of soil additives

Soil additives	Average pellet diameter (mm)
Zeolite (%)	
0	3.8 ± 0.4
0.1	5.0 ± 0.4
0.5	2.0 ± 0.2
1.0	1.0 ± 0.1
Diatomite (%)	
0	3.8 ± 0.4
0.1	1.9 ± 0.2
0.5	1.1 ± 0.1
1.0	0.6 ± 0.1
Bentonite (%)	
0	3.8 ± 0.4
0.1	1.0 ± 0.1
0.5	3.0 ± 0.3
1.0	6.0 ± 0.5
Loess (%)	
0	3.8 ± 0.4
0.1	2.1 ± 0.2
0.5	1.3 ± 0.1
1.0	1.0 ± 0.1
Kaoline (%)	
0	3.8 ± 0.4
0.1	2.0 ± 0.2
0.5	1.2 ± 0.1
1.0	1.0 ± 0.1
Talc (%)	
0	3.8 ± 0.4
0.1	2.3 ± 0.2
0.5	1.5 ± 0.2
1.0	0.8 ± 0.1

형성되었으며, 초기접종농도가 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ conidia/ml일 때 가장 작은 pellet이 형성되었으며 이때 크기는 3.8 ± 0.4 mm이었다. 액침배양 시 pellet 형성은 포자들 간의 상호작용, 균사와 고체입자간의 상호작용, pellet 간의 상호작용 등의 다양한 요인에 의하여 결정된다고 보고되어 있다.²⁰⁾ 포자의 초기접종량이 높아지면 spore의 agglomerate 수가 증가하고 이로 인해 pellet의 개수가 많아져 최종적으로 pellet의 크기가 작게 형성되는 것으로 보고된 바 있다.²¹⁾ 그리고 포자의 초기접종량이 너무 많아지면 배양초기에 많은 양의 균사가 생성되고, 이들 균사 간 상호작용으로 인해 불규칙적이고 무정형의 큰 pellet이 형성되는 것으로 보고된 바 있다.²⁰⁾ 이상의 결과부터 *Aspergillus* sp.

**Fig. 1.** Photographs showing the pellet sizes of *Aspergillus* sp. PS-104. The fungus was cultured at 30°C for 4 days in potato dextrose broth (PDB) supplemented with different concentrations (W/V) of zeolite. A: 0%, B: 0.1%, C: 0.5%, D: 1.0% zeolite.

PS-104의 액침배양 중 pellet 형성억제를 위한 최적 초기접종농도는 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ conidia/ml로 결정하였다.

점토광물이 pellet 형성에 미치는 영향. PDB 배지에 bentonite, zeolite, diatomite, 황토, kaoline, talc를 각각 0.1, 0.5, 1.0% 농도(W/V)로 첨가하고 *Aspergillus* sp. PS-104의 분생포자를 1×10^6 conidia/ml 농도로 초기접종하여 배양한 후, 형성된 mycelial pellet의 크기를 조사하였다(Table 3). 그 결과 bentonite를 제외한 zeolite, diatomite, 황토, kaoline, talc를 첨가하였을 경우 첨가물의 농도가 높아질수록 형성된 mycelial pellet의 크기가 감소하였으며 1.0% 농도로 처리했을 때 형성된 pellet의 크기가 가장 작았다(Table 3, Fig. 1). 그리고 bentonite의 경우에는 1.0% 농도로 처리했을 때 pellet의 크기가 오히려 증가하였다. 이것은 bentonite가 화산회의 유리 성분이 분해해서 생성된 점착력이 강한 산성백토이기 때문에, 이로 인해 분생포자들 사이의 상호인력이 증가되고 배양초기에 큰 agglomerate가 형성됨으로써 결국 mycelial pellet의 크기가 증가된 것으로 사료된다. 이에 비해 zeolite, diatomite, 황토, kaoline과 talc는 규산염과 알루미늄염이 주성분이므로 양이온 교환 기능을 가지고 있을 뿐만 아니라 이들 입자들이 가지고 있는 음전하가 *Aspergillus* sp. PS-104의 분생포자들 사이의 상호인력을 완화시켜 배양초기에 agglomerate가 작게 형성되도록 영향을 주었기 때문인 것으로 사료된다.

계면활성제와 PEG 200이 pellet 형성에 미치는 영향. Tween 80, Triton X-100, SDS와 같은 계면활성제 및 PEG 200을 각각 0.01, 0.1, 1% 농도로 첨가한 PDB 배지에 *Aspergillus* sp. PS-104의 분생포자를 1×10^6 conidia/ml 농도로 초기 접종하여 배양한 후, 형성된 mycelial pellet의 크기를 조사하였다(Table 4). 그 결과 Tween 80, Triton X-100 및 PEG 200을 0.1%

Table 4. Average pellet sizes after 4-days culture of *Aspergillus* sp. PS-104 in PDB medium with different concentrations of surfactants(SDS, Tween 80 and Triton X-100) and PEG 200

Surfactants and PEG 200	Average pellet diameter (mm)
SDS (%)	
0	3.8±0.4
0.01	no growth
0.1	no growth
1.0	no growth
Tween 80 (%)	
0	3.8±0.4
0.01	amorphous pellet
0.1	2.1±0.2
1.0	no growth
Triton X-100 (%)	
0	3.8±0.4
0.01	8.0±0.6
0.1	2.0±0.2
1.0	no growth
PEG 200 (%)	
0	3.8±0.4
0.01	7.1±0.5
0.1	1.5±0.2
1.0	2.8±0.3

농도로 배지에 첨가할 경우 형성된 pellet의 크기가 가장 작았다. 그리고 Tween 80과 Triton X-100을 1.0% 농도로 배지에 첨가하여 배양한 경우 mycelial pellet이 전혀 생성되지 않았는데 이것은 이들 계면활성제에 의한 균체 성장의 억제로 pellet 생성이 저해되었기 때문인 것으로 사료된다. 또한 SDS를 배지에 첨가한 경우 농도에 상관없이 mycelial pellet이 형성되지 않았다. 이와 같은 결과는 Elmayergi 등이 *A. niger*의 액침배양 시 SDS, Tergitol과 같은 계면활성제가 미생물의 성장을 저해한다는 보고와 동일하였다.²¹⁾ 이상의 결과로부터 계면활성제는 *Aspergillus* sp. PS-104 균주의 mycelial pellet 형성에 큰 영향을 주지 않는 것으로 사료되며 이는 *Mortierella vinacea* 균주의 경우 계면활성제의 효과가 관찰되지 않았다고 보고된 결과와 동일하였다.²²⁾ 그리고 PEG 200은 계면활성제보다 더 나은 pellet 크기 감소효과를 보였으며, *Metarhizium anisopliae*의 액침배양 시 이와 유사한 결과가 보고된 바 있다.¹⁵⁾ PEG 200이 계면활성제보다 pellet 크기 감소효과에 더 좋은 영향을 주는 것은 수분활성도를 낮추어 분생포자들 사이에 상호인력을 완화시켜주기 때문인 것으로 사료된다.

이상에서 배지 종류, 분생포자의 초기접종농도, 배지 첨가물의 종류와 농도가 인산가용화균 *Aspergillus* sp. PS-104의 액침배양 시 mycelial pellet 형성 및 크기에 영향을 줄 수 있음을 확인하였다. 이러한 연구결과는 이 균주를 이용한 생물비료 개발뿐 아니라 유용한 다른 종류의 사상균을 대량배양 할 때 발생할 수 있는 mycelial pellet 형성에 관한 문제해결의 기초 자료로 활용될 수 있을 것이다.

초 록

인산가용화균 *Aspergillus* sp. PS-104를 생물비료화하기 위하여 이 균주의 액침배양 시 mycelial pellet 형성을 억제하는 배양조건(배지 종류, 초기접종량)과 배지 첨가물(점토광물, 계면활성제, PEG 200)의 종류에 대하여 조사하였다. 그 결과 이 균주는 배지 종류를 달리하여 배양했을 때 SDB = YPD > PDB 순으로 pellet 크기가 감소하였다. 또한 이 균주는 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^7$ conidia/ml 범위의 초기접종농도에서는 농도가 높을수록 pellet의 크기가 감소하였다. 또한 bentonite를 제외한 점토광물인 zeolite, diatomite, 황토, kaoline과 talc를 0.1% 농도로 배지에 첨가하였을 경우 pellet 크기가 대조군에 비해서 1/6~1/4로 감소하였다. 계면활성제인 Tween 80과 Triton X-100 및 PEG 200을 0.1% 농도로 첨가하였을 경우 pellet의 크기가 감소하였고, SDS를 첨가한 경우에는 균의 성장이 완전히 저해되었다.

Key words: pellet formation, phosphate-solubilizing fungus, *Aspergillus* sp., soil additives, PEG

감사의 글

본 연구는 2002년도 대구대학교 학술연구비 지원에 의하여 수행된 연구결과이며 연구비 지원에 대하여 감사드립니다.

참고문헌

- Paul, E. A., and Clark, F. E. (1989) Soil microbiology and biochemistry. Academic Press. New York.
- 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.
- Dubey, S. K., and Billore, S. D. (1992) Phosphate solubilizing microorganism (PSM) as inoculant and their role in augmenting crop productivity in India-a review. *Crop Res. Hisar.* **5**, 11.
- 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. 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.
9. Varsha, N., T. 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.
 10. Varsha, N., T. Jugnu, T. and Patel, H. H. (1995) Mineral phosphate solubilization by *Aspergillus aculeatus*. *Ind. J. Exp. Biol.* **33**, 91-93.
 11. 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. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **40**, 329-333.
 12. Kim, H. O., Uo, Z. K. and Lee, S. C. (1984) Mycorrhizae distribution and rock phosphate dissolution by soil fungi in the citrus fields in Jeju-do. *Cheju Natl. Univ. J.* **17**, 45-50.
 13. 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.
 14. Byrne, G. S. and Ward, O. P. (1989) Effect of nutrition on pellet formation by *Rhizopus arrhizus*. *Biotechnol. Bioeng.* **33**, 912-914.
 15. Adamek, L. (1963) Submerged cultivation of the fungus *Metarhizium anisopliae* (Metch.). *Folia Microbiol.* **10**, 255-257.
 16. 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.
 17. Humphreys, A. Matewele, M., 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.
 18. Kleespies, R. G. and Zimmermann, G. (1992) Production of blastospores by three strains of *Metarhizium anisopliae* (Metch.) sorokin in submerged culture. *Biocontrol Sci. and Technol.* **2**, 127-135.
 19. Kang, S. C., Lee, D. G., Ha, C. G. and Lee, T. G. (1999) Culture conditions and additives affecting to the mycelial pellet size of *Penicillium* sp. GL-101 in the submerged culture. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **42**, 188-192.
 20. 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. II. On the two types of pellet formation in the shaking culture. *J. Agric. Chem.* **33**, 707-710.