

Beauveria bassiana Bb08의 살충성 물질 생산을 위한 배양조건의 통계적 최적화

고은수¹, 임영훈¹, 정형철², 최재필³, 박인서³, 김정준⁴, 이동진⁵, 김근^{1*}

¹수원대학교 생명공학과

²수원대학교 통계정보학과

³(주)고려바이오 연구소

⁴농촌진흥청 국립농업과학원

⁵단국대학교 식량생명공학과

Received: September 27, 2013 / Revised: November 24, 2013 / Accepted: November 25, 2013

Statistical Optimization of Culture Conditions for the Production of Aphicidal Metabolites of *Beauveria bassiana* Bb08. Go, Eunsu¹, Younghoon Lim¹, Hyeongchul Jeong², Jaepil Choi³, Inseo Park³, Jeong Jun Kim⁴, Dong-Jin Lee⁵, and Keun Kim^{1*}. ¹Department of Bioscience and Biotechnology, ²Department of Applied Statistics, The University of Suwon, Gyeonggi-do 445-743, Korea, ³KoreaBio Co., Ltd., Gyeonggi-do 445-966, Korea, ⁴Agricultural Microbiology Division, National Academy of Agricultural Science, Gyeonggi-do 441-707, Korea, ⁵Department of Crop Science and Biotechnology, Dankook University, Chungnam 330-714, Korea

For the maximal production of aphicidal metabolites produced by the *Beauveria bassiana* Bb08, statistical methods such as the Box-Behnken experimental design and response surface methodology were used. The fungal culture filtrate was sprayed towards 3-star aphids and the mortality was examined. After the statistical analysis of the aphid mortality, the optimal culture conditions were found to be a culture temperature of 26.2°C, medium pH 5.9, flask shaking speed of 209.0 rpm, and culture time of 5.9 days. The expected mortality on days 4, 5, and 6 after spraying the filtrate on to the aphids were 76.8%, 84.9%, and 89.4%, respectively. All 4 factors of the culture conditions significantly affected the production of the aphicidal metabolites, and the order of significance was temperature, pH, culture time and shaking speed.

Keywords: *Beauveria bassiana*, statistical optimization, culture condition, aphicidal metabolites, culture filtrate

서 론

병원성곰팡이(entomopathogenic fungi)는 미생물살충제로 사용되는데, 그 장점으로 사람에게 무해하고, 다른 천적들과도 같이 사용할 수 있으며, 독성잔류물이 없고, 미생물 증식에 의해 지속적인 방제를 할 수 있다는 점을 들 수 있다 [22]. 여러 병원성곰팡이들 중에서 *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin은 자연에서 넓은 지역에 분포하고 70종류의 해충을 방제할 수 있으며 [21], 현재 세계적

로 효과적인 상업적인 미생물살충제로 판매되고 있다.

진딧물은 국내에서 특히 오이, 고추, 토마토를 비롯한 많은 작물에 큰 피해를 주고 있다 [12]. 진딧물은 식물 영양분을 섭취하기 때문에 잎이 말리고, 변형되며, 당분을 분비하기 때문에 식물병원균을 성장시키고, 많은 식물 병원성 바이러스를 전파한다 [10].

곤충병원성 곰팡이 살충제는 주로 곰팡이 포자(conidia)를 이용하는데, 이 포자 살충제는 전체 살충제 시장에서 차지하는 비중이 작다 [23]. 그 이유로 이 곰팡이 포자 살충제의 성공적인 상용화의 걸림돌은 포자에 의한 병발생의 속도가 느리다는 점과, 포자의 살충력이 온도, 습도 등과 같은 경작지 환경에 영향을 받아 그 살충효과가 변동이 크다는 점이다 [4, 8].

이러한 포자살충제의 살충력을 높여 줄 수 있는 가능성은 병원성 곰팡이 배양액에서 찾아볼 수 있는데, 병원성 곰팡이

*Corresponding author

Tel: +82-31-220-2344, Fax: +82-31-220-2344

E-mail: kkim@suwon.ac.kr

© 2013, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

의 배양액은 곤충에 살포 후에 바로 포자의 살충율을 높여 줄 수 있다. 병원성 곰팡이의 배양액내의 살충성 물질로는 효소와 독성대사산물을 들 수 있다. 대사산물들 중에서 효소들은 곤충에서의 발병에서 중요한 역할을 한다[5], 특히 chitinase, Pr1-protease, Pr2-protease들은 곤충의 cuticle 층을 뚫는데 결정적인 역할을 한다[13, 14]. 대사산물내의 분비된 독성대사산물은 대부분은 저분자 cyclic peptide [18, 22]이며, 고분자 단백질성 물질[16]도 알려졌다.

발효공정의 최적화는 많은 생물공정의 생산수율을 높이기 위해 사용되어왔다. 하나의 변수를 고정하고 다른 변수를 변화시키는 전형적 방식의 공정최적화는 시간과 노동을 소모하는 단점이 있는데, 특히 변수가 많을수록 더욱 그렇다. 그런데, 보다 더 효율적인 방법은 통계적 모형을 활용한 최적화 방법이다. 반응표면분석(response surface methodology; RSM)은 최적발효조건을 찾을 때, 예상되는 처리조합 근처에서 반응값들에 대한 함수식, 이른바 반응표면(response surface)을 구하고 이를 이용하여 최적 반응값을 찾아 처리조합을 분석하는 통계적 방법이다[3, 6]. 한편, 박스벤켄(Box-Behnken) 디자인은 인자가 계량인자이고 3 수준인 경우에 2차 회귀방정식도 구하고 최적조건을 찾을 수 있는 실험계획법이다. 이 계획법은 인자의 수가 k 개 경우에 3^k 요인배치법보다는 실험점의 수가 많지 않으면서도 직교블록(orthogonal blocking)을 만들기 용이하고, 2차 회귀방정식으로 교호작용과 이차효과를 동시에 탐색할 수 있기에 반응표면분석에서 널리 사용된다[7].

본 연구에서는 *Beauveria bassiana* Bb08에서 분비하는 살충성 대사산물을 연구하기 위해 살충성 대사산물을 최대 생산할 수 있는 배양조건을 Box-Behnken 실험설계로 설계하였으며 반응표면분석을 사용하여 최적화하였다.

재료 및 방법

균주

B. bassiana Bb08 균주를 20% glycerol 용액에 혼합하여 -80°C 에서 보관하였다. 균배양액의 접종균 준비를 위해 potato dextrose agar(PDA)에서 25°C , 7-10일간 배양 후 4°C 에 저장하여 사용하였다.

목화진딧물(*Aphis gossypii*)

실험에 사용된 목화진딧물은 농촌진흥청 작물보호과에서 분양받아 온도 25°C , 광조건 16 L : 8 D, 상대습도 70% 조건으로 사육하였다.

균 액체배양

액체 배양액을 준비하기 위해서는 potato dextrose

agar (PDA)에서 7일간 배양한 것을 사용하였으며 mycelia plug를 1×1 cm 크기로 잘라 100 ml 액체배지를 담은 250 ml Erlenmyer flask에 접종하고 25°C 에서 rotary shaking incubator에서 200 rpm의 속도로 5일간 배양하였다. 여기에서 사용된 액체배지로는 potato dextrose broth (PDB); 3% corn meal, 2% corn steep powder, 2% rice bran(CCR); CCR + 0.2% chitin (Sigma, C7170); 3% starch, 1% soybean flour, 1% dextrose, 0.1% yeast extract, 0.2% KH_2PO_4 , 0.1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (CDS)의 4종류이었다.

진딧물 살충력 측정

균 배양액내의 살충물질의 살충력을 측정하기 위해 배양액을 원심분리하여 그 상등액을 $0.2 \mu\text{m}$ membrane filter로 여과하여 균체와 포자를 제거한 뒤 살충력 측정에 사용하였다. 살충력은 detached leaf assay로 하였고, 이를 위해 배추를 구입하여 잎을 수돗물로 3분 동안 세척 후 laminar flow hood에서 건조시켰다. 직경 9 cm로 절단한 배추 잎을, 뚜껑에 4 cm의 통기를 위한 나일론 망을 갖추고 있고 통 내부 바닥에 물로 적신 여과지를 깔은 곤충사육통(100×40 mm)의 바닥에 넣었다. 3령의 30마리의 진딧물을 곤충사육통내의 배추 잎 위에 올려놓고, 5 ml의 균배양 여과액을 핸드-스프레이 하였다. 이 처리된 샘플은 온도 25°C , 광조건 16 L : 8 D, 상대습도 70% 조건으로 배양하였다. 사멸한 진딧물을 6일 동안 매일 계수하여 살충율(%)을 계산하였다.

통계적 방법

본 실험에서는 4가지 요인에 대해 3개의 직교블록이 존재하는 Box-Behnken(B-B) 실험 계획을 사용하여 실험을 실시하였다. 인자의 수가 $k = 4$ 인 경우 3^4 요인배치법은 81회의 실험이 요구되나, B-B 실험에서는 27회의 실험이 요구됨으로 실험점이 적어서 경제적이다. 또한, B-B 실험으로 이차 회귀방정식을 만들 수 있기 때문에 최적점 탐사에 매우 용이하다.

본 연구에서 사용한 2차 다항식은 다음과 같다.

$$Y = \beta_0 + \sum_i \beta_i X_i + \sum_i \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

여기서, Y 는 예측된 반응값, X_i 및 X_j 는 부호화된 인자(coded factor), β_0 는 절편항(intercept), β_i 는 1차 회귀계수, β_{ii} 는 2차 회귀계수, β_{ij} 는 X_i 와 X_j 의 교호작용계수이다. 한편, 주의할 점은 X_i 들에 대해

$$X_i = \frac{x_i - x_0}{\Delta x_i}$$

의 관계가 성립하는데, X_i 는 부호화된 값(coded value), x_i 는

Table 1. Coded and actual levels of the factors for four factor Box-Behnken design.

Independent variables	Symbols	Coded and actual levels		
		-1	0	+1
Temperature (°C)	X ₁	20	25	30
pH	X ₂	4	5.5	7
Shaking speed (rpm)	X ₃	150	200	250
Culture time (day)	X ₄	3	5	7

Table 2. Box-Benken experiment for the 4 variables and experimental results.

Run	Actual experimental point				Aphid mortality (%) after							Block
	Temperature (°C)	pH	Shaking (rpm)	Culture time (day)	1 day	2	3	4	5	6	Predicted	
1	20	4	200	5	3.3	13.3	16.6	26.6	36.6	40.0	36.51	1
2	20	7	200	5	6.6	10.0	26.6	36.6	43.3	46.6	47.01	
3	30	4	200	5	6.6	16.6	23.3	43.3	53.3	53.3	50.94	
4	30	7	200	5	13.3	23.3	36.6	56.6	63.3	66.6	68.14	
5	25	5.5	150	3	10.0	26.6	40.0	46.6	60.0	63.3	64.28	
6	25	5.5	150	7	10.0	33.3	53.3	63.3	76.6	80.0	77.63	
7	25	5.5	250	3	13.3	33.3	46.6	63.3	70.0	70.0	70.43	
8	25	5.5	250	7	13.3	43.3	56.6	73.3	80.0	83.3	80.38	
9	25	5.5	200	5	13.3	40.0	56.6	76.6	83.3	86.6	85.94	
10	20	5.5	200	3	6.6	13.3	26.6	36.6	43.3	46.6	45.08	
11	20	5.5	200	7	6.6	16.6	33.3	46.6	53.3	56.6	53.43	
12	30	5.5	200	3	13.3	26.6	43.3	53.3	60.0	60.0	59.57	
13	30	5.5	200	7	13.3	26.6	40.0	60.0	73.3	76.6	74.52	
14	25	4	150	5	6.6	30.0	33.3	53.3	60.0	60.0	57.35	2
15	25	4	250	5	10.0	26.6	33.3	46.6	56.6	60.0	60.15	
16	25	7	150	5	13.3	36.6	50.0	66.6	73.3	73.3	69.55	
17	25	7	250	5	16.6	40.0	53.3	60.0	73.3	76.6	75.65	
18	25	5.5	200	5	16.6	43.3	60.0	73.3	80.0	86.6	85.94	
19	20	5.5	150	5	3.3	16.6	30.0	36.6	43.3	43.3	48.31	
20	20	5.5	250	5	6.6	16.6	30.0	40.0	46.6	50.0	52.76	
21	30	5.5	150	5	10.0	16.6	40.0	56.6	63.3	63.3	66.09	
22	30	5.5	250	5	16.7	33.3	46.3	63.3	70.0	70.0	70.54	
23	25	4	200	3	6.6	26.6	36.6	43.3	50.0	50.0	51.68	3
24	25	4	200	7	6.6	30.0	36.6	46.6	53.3	56.6	63.28	
25	25	7	200	3	16.6	33.3	46.6	53.3	63.3	66.6	65.48	
26	25	7	200	7	16.6	30.0	43.3	53.3	66.6	73.3	77.18	
27	25	5.5	200	5	13.3	36.6	50.0	73.3	83.3	86.6	85.94	
28	25	5.5	200	5	16.6	36.6	53.3	73.3	80.0	83.3	85.94	
29	25	5.5	200	5	16.6	36.6	53.3	76.6	83.3	86.6	85.94	

실제 값(actual value), x_0 는 중심값, 그리고 Δx_i 는 증분값을 의미한다. 위의 (1)식은 부호화된 변수에 대한 회귀식으로 B-

B 실험에 의하면, X_i 는 ± 1 과 0으로 3개의 값으로 부호화된 다. Table 1은 본 연구에서 사용한 4가지 인자에 대한 실제

값과 부호화된 값이다.

B-B 실험에서는 모두 27개의 실험(run)이 존재하나, 본 실험은 모두 29회로 구성되었다. 그 이유는 네 인자의 중심점(0)에서 2회의 반복실험을 실시했기 때문이다(Table 2의 28, 29번 실험). Table 2는 B-B 실험점에서 6일 동안 사멸되는 진딧물의 비율(%)를 보여준다.

결과 및 고찰

배지선정

여러 배지에서 배양한 *B. bassiana* Bb08의 배양 여과액의 진딧물에 대한 살충력을 살포 후 6일 동안 관찰하였고, 그 결과를 Fig. 1에 나타내었다. PDB와 CDS의 경우 CDS가 3, 4일째 살충율이 높았으나 5일 째는 PDB가 살충율이 높았고, 6일째에는 두 배지 모두 56.7%로 살충율이 같았다. CCR의

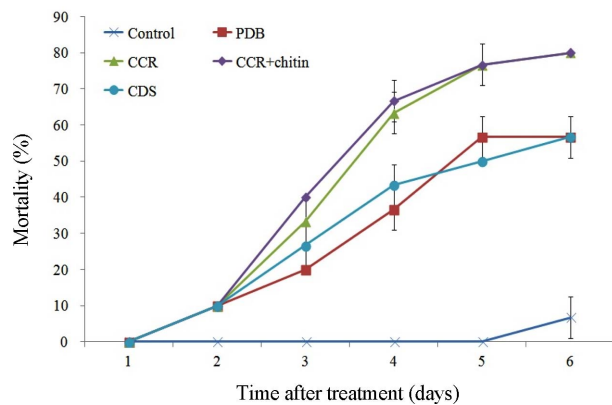


Fig. 1. Effect of different culture media for *B. bassiana* Bb08 on the mortality of aphid.

경우는 살충력에 기여하는 chitinase의 증산 효과가 있는 chitin [9, 20]을 배지에 첨가한 경우가 3, 4일째 살충율이 조금 더 높았으나, 5, 6일째에는 살충율이 같았다. Chitin의 배지로의 첨가가 살충력에 크게 영향을 끼치지 않는 것으로 보아 *B. bassiana* Bb08배양액의 주 살충물질은 chitinase가 아닌 다른 물질로 사료되었다. 결국 6일째 살충력이 80%로 가장 높고, chitin을 첨가하지 않아도 되는 CCR을 배양조건 연구에 사용할 배지로 선정하였다.

분산분석

진딧물 사멸과 관련되어 6일 동안 진딧물 사멸에 단위 증분량의 변화의 정도에 따라 영향력이 큰 변수를 파악하고자 분산분석을 실시하였다. 배양액 살포 후 6일째의 진딧물 사멸의 정도가 최종적 결과이므로 6일째의 결과를 제공하기로 하였다(Table 3). 한편, B-B 실험에 의해 각 인자의 수준이 3수준이므로 선형효과(linear)와 곡선효과(quadratic) 검정을 위해 대비(contrast) 제공함을 계산하였다(Table 3).

Table 3에서 네 가지 인자 모두 단위 증분량의 변화에 따라 진딧물의 사멸에 유의한 영향을 미치고 있음을 볼 수 있다. 특히, 단위 증분량의 변화의 정도에 민감한 반응을 보이는 인자는 평방함의 순서로 보면, 온도, pH, 배양시간, 교반의 순으로 나타나며, 이들 모두 통계적으로 유의하다($p < 0.05$). 이제, 각 인자들이 모두 세 수준인 관계로 대비제공함의 크기를 통해 선형효과가 존재하는지 곡선효과가 존재하는지를 살펴보기로 한다. 네 인자 모두 선형대비와 곡선대비가 통계적으로 유의하다($p < 0.05$)(Table 3). 한편, 온도와 pH의 곡선대비 효과가 강하다. 이는 온도와 pH가 살충력에 영향을 미치는 최적점 발견에 크게 기여한다는 점을 의미한다. 한편, 교반속도(shaking speed)는 단위증분간 선형

Table 3. Analysis of variance and contrast for four factors on 6 day after spray of culture filtrate.

Parameter (Contrast)	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	F value	p-value
Temperature	2	3746.97	1873.48	173.99	<.0001
linear	1	948.74	948.74	88.11	<.0001
quadratic	1	2798.22	2798.22	259.88	<.0001
pH	2	1943.02	971.51	90.23	<.0001
linear	1	575.47	575.47	53.44	<.0001
quadratic	1	1367.55	1367.55	127.01	<.0001
Shaking speed	2	273.49	136.75	12.70	0.0003
linear	1	59.41	59.41	5.52	0.0292
quadratic	1	214.09	214.09	19.88	0.0002
Culture time	2	726.82	363.41	33.75	<.0001
linear	1	407.17	407.17	37.81	<.0001
quadratic	1	319.66	319.66	29.69	<.0001

효과보다는 곡선평과가 상대적으로 크지만, 배양시간(culture time)은 선형효과가 상대적으로 곡선평과보다 커서 시간에서 단위증분 정도를 조금 확대하여 살충력을 관찰할 필요가 약간 정도 요구된다. 하지만, 분산분석 결과 모든 인자가 유의하며, 모든 인자에서 곡선평과가 존재하였으므로 네 인자별 살충력을 최대화 하는 최적점 발견이 가능하리라 판단된다.

반응표면분석에 의한 최적점 탐색

6일간 진딧물 살충력을 관찰하였으므로, 전일에 대한 최적점을 반응표면분석 하였다(Table 4). 그 결과, 시간이 흐를수록 진딧물 살충력이 증가하였으므로 최종일 6일을 중심으로 진딧물 살충력을 최대화하는 분석을 실시하였다.

6일째의 진딧물 살충력에 대한 2차 회귀방정식은 다음과 같다(Table 4).

$$Y = 85.940 + 8.892X_1 + 6.925X_2 + 2.225X_3 + 5.825X_4 + 1.675X_1X_2 + 0.000X_1X_3 + 1.650X_1X_4 + 0.825X_2X_3 + 0.025X_2X_4 - 0.850X_3X_4 - 20.770X_1^2 - 14.520X_2^2 - 5.745X_3^2 - 7.020X_4^2 \tag{2}$$

Table 5에 의하면, 선형효과와 곡선평과의 유의확률이 $p < 0.0001$ 로 통계적으로 매우 유의하나, 교호효과는 통계적으로 유의하지 않는 것으로 나타난다. 한편, 모형의 결정계수(R^2)는 0.968로 적합력이 매우 높음을 볼 수 있다. 이는 모형이 실제 자료와 잘 일치한다는 것을 나타낸다. 한편, 적합결여(lack of fit)의 유의확률이 0.029로 추가적으로 모형식에 포함될 식이 더 필요하다는 것을 알려준다. 하지만, 최적반응식을 유도하기에는 2차 회귀식이면 충분하므로 최종모형에서는 교호작용 항을 삭제하지 않고 (2)의 식으로부터 최적점을 유도하기로 하였다. Fig. 2는 6일째 2차회귀식에 대한 삼차원 그래프이다. 해당 그림은 모두 6개로 주어지는데,

Table 4. Estimate of the response function to predict mortality(Y) from Eq. (2) by regression analysis on 6 day after spray of culture filtrate.

Parameter	DF	Estimate	SE	t Value	Pr > t
Intercept	1	85.940	1.637	52.49	<.0001
X1	1	8.892	1.057	8.41	<.0001
X2	1	6.925	1.057	6.55	<.0001
X3	1	2.225	1.057	2.11	0.0538
X4	1	5.825	1.057	5.51	<.0001
X1*X1	1	-20.770	1.437	-14.45	<.0001
X2*X1	1	1.675	1.830	0.92	0.3756
X2*X2	1	-14.520	1.437	-10.10	<.0001
X3*X1	1	0.000	1.830	0.00	1.0000
X3*X2	1	0.825	1.830	0.45	0.6591
X3*X3	1	-5.745	1.437	-4.00	0.0013
X4*X1	1	1.650	1.830	0.90	0.3826
X4*X2	1	0.025	1.830	0.01	0.9893
X4*X3	1	-0.850	1.830	-0.46	0.6495
X4*X4	1	-7.020	1.437	-4.88	0.0002

Table 5. Analysis of variance for quadratic model on 6 day after spray of culture filtrate.

	Sources	DF	Sum of Squares	R-square (MS)	F Value	Pr > F
Regression	Linear	4	1990.783	0.345	37.14	<.0001
	Quadratic	4	3566.417	0.618	66.53	<.0001
	Crossproduct	6	27.728	0.005	0.34	0.901
	Total Model	14	5584.928	0.968	29.77	<.0001
Residual	Lack of Fit	10	178.912	17.891	8.21	0.029
	Pure Error	4	8.712	2.178		
	Total Error	14	187.624	13.402		

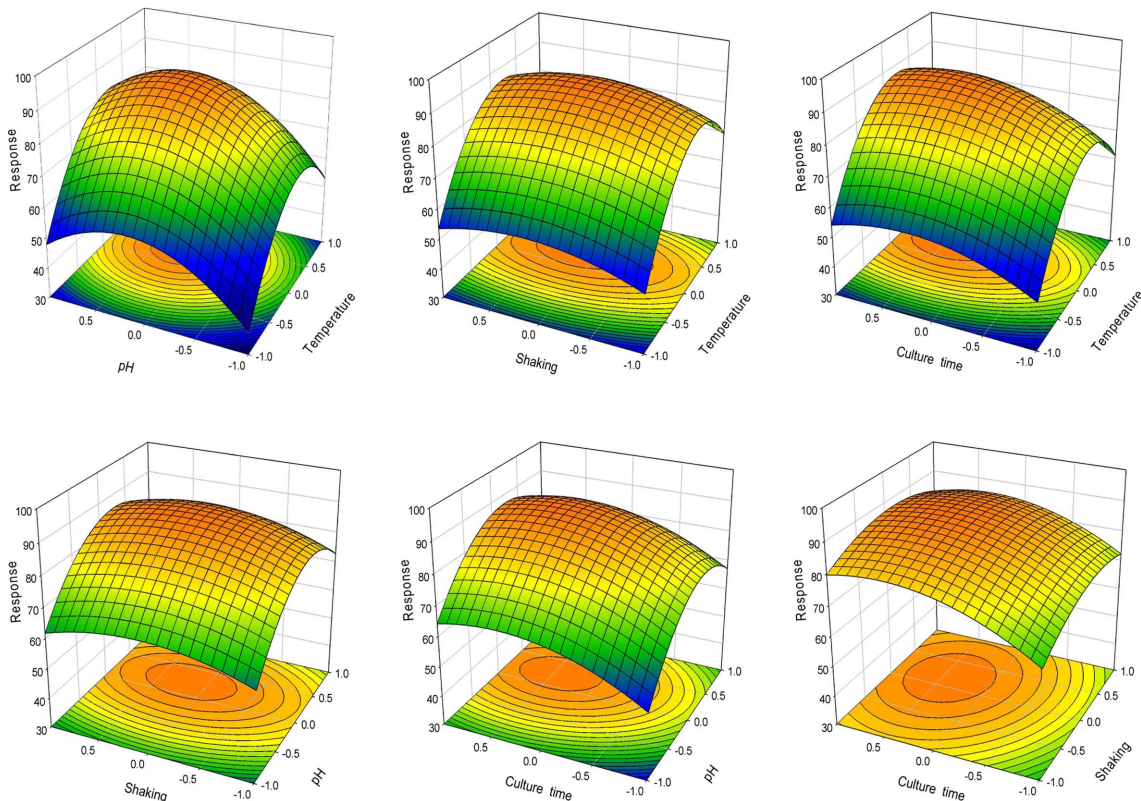


Fig. 2. Response surface plot and the corresponding contour plot for mortality(Y).

(Temperature, pH), (Temperature, Shaking speed), (Temperature, Culture time), (pH, Shaking speed), (pH, Culture time), (Shaking speed, Culture time) 간의 살충력 (response) 정도를 나타내며, 그림에서 보는 바와 같이 각 인자의 수준 변화에 대해 2차 곡선효과가 존재하여 최적점을 유도할 수 있음을 볼 수 있었다. 6일째 살충력을 최대화하기 위한 반응표면분석 모형식에 의하여 유도된 최적점은 temperature 26.208°C, pH 5.887, shaking speed 209.007 rpm, culture time 5.866 days이다. 한편, Table 2의 실험자료에 (2) 식에 의한 6일째 살충력 예측값을 제시하였다. 본 실험 결과는 다른 실험보고에서도 유사하였는데, Pham 등[15]은 *B. bassiana*의 액체배양에서 포자를 생산하기 위한 최적 배양 온도는 25°C와 shaking speed는 200 rpm으로 보고하였다. *B. bassiana*와 같이 역시 중온성(mesophilic) 사상균인 *Aspergillus niger*도 최적 발효온도가 25°C로 보고되었다[1].

일별 최적점 변화

6일 동안의 진딧물 살충력에 대해 최대로 하는 최적점이 일별로 어떻게 변화하는지 살펴보았다. 이를 위해 6일 동안의 진딧물 살충력을 반응표면분석을 실시하였다. 6일 동안

유도된 최적점은 정준형분석(canonical analysis)을 통해 살충력을 최대로 유도하는 값으로 판정되었다. Table 6과 Fig. 3은 6회의 반응표면분석 결과에 따른 최적점들의 변화를 보여준다. 관찰일이 길어질수록 진딧물의 살충력이 상승하게 되는데, 4일 이후로 최적점에 큰 변화가 없다는 점을 볼 수 있다. 즉, 4일 이후부터 temperature는 26.2-26.3°C, pH는 5.7-5.9, shaking speed는 209.0-209.8 rpm, culture time은 5.3-5.8 days 수준에서 최적점이 결정되며, 일별 최적점의 변화가 크지 않았다.

일별 최적점의 살충력 예측값은 1일째 18.23%, 2일째 46.94%, 3일째 56.80%, 4일째 76.83%, 5일째 84.92%, 6일째 89.37%로 나타났다. 또한, 이들 최적 실험조건은 B-B 실험에서 실시한 실험점 내부에 존재하는 것으로 나타나 유의한 실험 결과가 유도된 것으로 판단되었으며 끝으로 본 연구에서는 6일째 살충력의 최대화 수준을 최적점으로 제시하였다.

살충력비교

본 연구에 사용된 *B. bassiana* Bb08 배양여과액의 살충력을 다른 논문과 비교하고자 하였다. 그러나 대부분의 다른

Table 6. Optimal points for four factors and predicted response of second-order regression model on optimal points for 6 days after spray of culture filtrate.

Time (day)	Value	Optimal points				Predicted response of mortality (%)
		Temperature (°C)	pH	Shaking speed (rpm)	Culture time (day)	
1	Coded	0.502	0.791	0.705	0.000	18.233
	Actual	27.510	6.686	235.265	5.000	
2	Coded	0.672	0.870	3.742	0.516	46.936
	Actual	28.362	6.806	387.075	6.032	
3	Coded	0.195	0.311	0.632	0.119	56.801
	Actual	25.973	5.966	231.604	5.237	
4	Coded	0.247	0.186	0.197	0.190	76.833
	Actual	26.237	5.778	209.858	5.380	
5	Coded	0.266	0.231	0.190	0.331	84.916
	Actual	26.329	5.846	209.506	5.662	
6	Coded	0.242	0.258	0.180	0.433	89.368
	Actual	26.208	5.887	209.007	5.866	

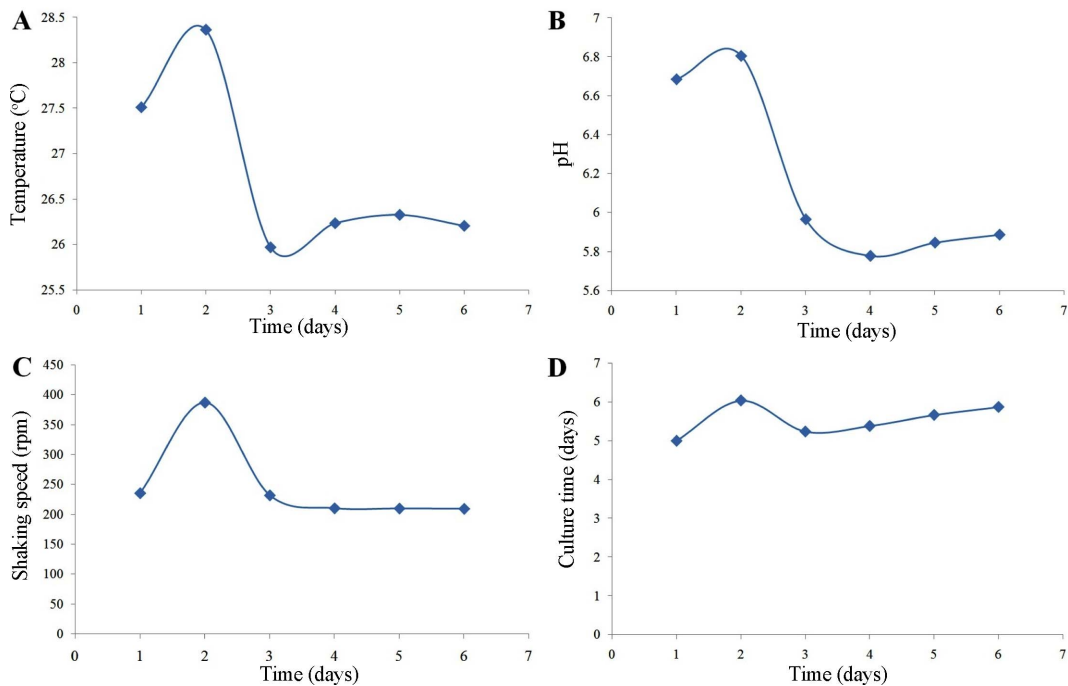


Fig. 3. Optimal points for four factors and predicted response of second-order regression model on optimal points for 6 days observation. (A) temperature, (B) pH, (C) shaking speed, (D) culture time.

논문들은 배양여과액을 직접 살충력 측정에 사용하지 않고, 균배양액으로부터 정제된 대사산물을 사용하였고, 대상 곤충이 진딧물이 아닌 다른 곤충들이었거나, 살충력을 측정하기 위한 생물검정 방법이 상이하여[2, 16, 18], 본 연구의 *B. bassiana* Bb08 배양여과액의 살충력과 비교할 수 없었다. 한

편 배양여과액으로 직접 살충율을 측정한 다른 논문들의 경우를 보면, *B. bassiana* SF205균주의 배양여과액을 목화진딧물을 대상으로 살충력을 측정한 결과, 배양여과액의 희석 배수에 따라 31.5-94.3%의 살충율을 보였다[11]. 그러나 이 경우 사용한 살충력 측정방법은 본 논문의 경우와 상이하

고, *B. bassiana* SF205균주의 주된 살충물질은 chitinase이었다. 또 다른 경우는 *Lecanicillium lecanii*의 배양여과액으로 어린 선충(*Heterodera glycines* Ichinohe의 second stage juvenile)으로 살충력을 측정 한 결과 *L. lecanii* 균주에 따라 2.0-20.7%의 살충력을 보였다[17].

본 논문의 통계적 최적화 후 *B. bassiana* Bb08 배양여과액은 살충력 89.368%이었으며, 배양여과액내의 살충물질은 chitinase가 아닌 다른 물질로 사료되며, 그 물질 규명은 앞으로 흥미로운 연구가 될 것으로 기대된다.

요 약

본 연구에서는 *B. bassiana* Bb08가 생산하는 진딧물 살충 대사산물의 최대 생산을 위하여 박스벤켄(Box-Behnken) 디자인과 표면반응분석을 이용한 통계적 방법을 사용하였다. 균 배양을 위한 배지는 옥수수분말, 미강, 옥수수침지액분말로 구성되었다. 균배양액은 원심분리 후 상등액을 0.45 µm 막 여과지로 여과한 후 3령의 목화진딧물에 살포하였고, 6일 동안 매일 죽은 진딧물 수를 계수하여 살충율을 계산하였다. 통계분석한 결과 최적의 배양조건은 온도 26.2°C, 배지 초기 pH 5.9, 플라스크 진탕 속도 209.0 rpm, 그리고 균배양 시간은 5.9일로 나타났다. 여과액 살포 후 4, 5, 그리고 6일째 기대 살충율은 각각 76.8, 84.9, 그리고 89.4%이었다, 배양조건 4가지 모두 살충성 대사산물 생산에 유의한 영향을 미쳤고, 영향이 큰 요인 순서는 온도, pH, 배양시간, 진탕속도의 순서로 분석되었다.

Acknowledgments

This work was carried out with the support of "Cooperative Research Program for Agriculture Science & Technology Development (Project No. PJ008980032013)", Rural Development Administration, Republic of Korea.

References

- Amenaghawon NA, Nwaru KI, Aisien FA, Ogbeide SE, Okieimen CO. 2013. Application of Box-Behnken design for the optimization of citric acid production from corn starch using *Aspergillus niger*. *Br. Biotechnol. J.* **3**: 236-224.
- Bandani AR, Khambay BPS, Faull JL, Newton R, Deadman M and Butt TM. 2000. Production of efrapeptins by *Tolypocladium* species and evaluation of their insecticidal and antimicrobial properties. *Mycol. Res.* **104**: 537-544.
- Box GEP, Hunter JS. 1957 Multi-factorial designs for exploring response surfaces. *Ann. Math. Stat.* **28**: 195-241.
- Burges HD. 1998. Formulation of mycopenesticides. pp. 131-186. In: Burges, H. D. (ed.), *Formulation of Microbial Biopesticides: Beneficial Microorganisms, Nematodes and Seed Treatment*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands.
- Charnley AK. 2003. Fungal pathogens of insects: cuticle degrading enzymes and toxins. *Adv. Bot. Res.* **40**: 241-321.
- Farid MA, Ghoneimy EA, El-Khwwaga MA, Negm-Eldein A, Awad GEA. 2013. Statistical optimization of glucose oxidase production from *Aspergillus niger* NRC9 under submerged fermentation using response surface methodology. *Ann. Microbiol.* **63**: 523-531.
- Ferreir SLC, Bruns RE, Ferreira HS, Matos GD, David JM, Brandao GC, daSilva EGP, Porugal LA, Reis PS, Souza AS, dos Santos WNL. 2007. Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. *Anal. Chim. Acta.* **597**: 179-186.
- Inglis GD, Johnson DL, Goettel MS. 1997. Effect of temperature and sunlight on mycosis of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Symptodulosporae) of grasshoppers under field conditions. *Environ. Entomol.* **26**: 400-409.
- Kao PM, Chen CI, Huang SC, Lin KM, Chang YC, Liu YC. 2009. Preparation of fermentation-processed chitin and its application in chitinase affinity adsorption. *Process Biochemistry* **44**: 343-348.
- Kim HY, Lee HB, Kim YC, Kim IS. 2008. Laboratory and field evaluations of entomopathogenic *Lecanicillium attenuatum* CNU-23 for control of green peach aphid (*Myzus persicae*). *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 1915-1918.
- Kim JS, Je YH, Yu YM. 2011. Mass production of aphicidal *Beauveria bassiana* SFB-205 supernatant with the parameter of chitinase. *J. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 604-612.
- Kim SH, Kim IS, Lee MH. 1986. Aphid species and their seasonal fluctuations in vegetable crops. *Korean J. Plant Prot.* **25**: 129-131.
- Khan S, Guo L, Maimalti Y, Mijit M, Qiu D. 2012. Entomopathogenic fungi as microbial control agent. *Molecular Plant Breeding*. **3**: 63-79.
- Moraes CK, Schrank A, Vainstein MH. 2003. Regulation of extracellular chitinase and proteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*. *Curr. Microbiol.* **46**: 205-210.
- Pham TA, Kim JJ, Kim SG, Kim K. 2009. Production of blastospore of entomopathogenic *Beauveria bassiana* in a submerged batch culture. *Mycobiology* **37**: 218-224.
- Quesada-Moraga E, Vey A. 2004. Bassiacridin, a protein toxic for locusts secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Mycol. Res.* **108**: 441-452.
- Shinya R, Aiuchi D, Kushida A, Tani M, Kuramochi K, Koike K. 2008. Effects of fungal culture filtrates of *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium* spp.) hybrid strains on *Heterodera glycines* eggs and juveniles. *J. Invertebr. Pathol.* **97**: 291-297.
- Strasser H, Vey A, Butt T. 2000. Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to bioactive metabolites of *Metarhizium*, *Tolypocladium*

- and *Beuveria* species? *Biocontrol Sci. Technol.* **10**: 717-735.
19. Srivastava CN, Maurya P, Sharma P, Mohan L. 2009. Prospective role of insecticides of fungal origin: Review. *Entomol. Res.* **39**: 341-355.
 20. Suresh PV, Chandrasekaran M. 1999. Impact of process parameters on chitinase production by an alkalophilic marine *Beuveria bassiana* in solid state fermentation. *Process Biochem.* **34**: 257-267.
 21. Thomas KC, Khachatourians GG, Ingledew WM. 1987. Production and properties of *Beuveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. *Can. J. Microbiol.* **33**: 12-20.
 22. Vey A, Hoagland R, Butt TM. 2001. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. pp. 311-346. In: Butt TM, Jackson CW, and Magan N (eds.), *Fungi as Biocontrol Agents Progress: Problems and Potential*, CABI publishing, Wallingford, CT, U.S.A.
 23. Yatin BT, Venkataraman NS, Parija TK, Panneerselvam D, Govindanayagi P, Geetha K. 2006. The new biopesticide market. Business Communications Research, Denver, CO, U.S.A.