

GOVP1199906420

632.952

L2937

v.3

제 3 차 년도
최 종 보 고 서

곤충기생균을 이용한 무공해 미생물 살충제 개발

Development of microbial insecticide without pollution using
the entomopathogenic fungi

강원대학교 농과대학

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “근충기생균을 이용한 무공해 미생물 살충제 개발” 과제의 최종 보고서로 제출합니다.

1998 . 12 . 15 .

주관연구기관명 : 강원대학교

총괄연구책임자 : 성 재 모

협동연구책임자 : 이 정 운

협동연구책임자 : 임 성 렬

협동연구책임자 : 김 승 욱

연 구 원 : 유 재 기

윤철식, 유영진, 이영욱,

김상희, 김용욱, 성기호,

박현수, 김일기, 진태은,

박승원, 김병혁

협동연구기관명 : 농업과학기술원

협동연구기관명 : 한림대학교

협동연구기관명 : 고려대학교

요 약 문

I. 제 목

근충기생균을 이용한 무공해 미생물 살충제 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

최근 지구 환경생태계 보전 차원의 생물적 다양성 보전을 위한 세계적인 움직임과 함께, 유전자원의 확보 및 생물소재 개발이라는 산업적, 경제적 측면에서 유용생물자원의 확보를 위한 국가간의 자원확보 경쟁이 세계적으로 치열해지고 있다. 특히 최근에는 유기합성 농약에 의한 환경오염의 심각성으로 인하여 환경 친화적인 미생물농약 개발에 많은 노력을 하고 있으며 또한 이를 위하여 자국에서 자생하는 곤충병원성 미생물의 유전자원 확보에 박차를 가하고 있는 실정이다. 미생물 농약 중에서 가장 대표적인 것이 미생물 살충제인데, 미생물 살충제는 미생물 자체를 직접 이용하거나 미생물을 포함한 제제를 이용하여 농작물에 해를 주는 곤충, 응애, 선충 등의 해충등을 방제하는데 쓰이는 살충제라 할 수 있다. 곤충 기생균은 세계적으로 무공해 미생물 농약 개발에 많이 이용되고 있다. 이러한 미생물 살충제의 개발은 환경보호의 중요성에 대한 인식 증대와 함께 사회적으로도 많은 관심의 초점이 되고 있다. 그리하여, 선진국들을 중심으로 새로운 미생물 살충제 개발을 위해 곤충 기생균에 대한 관심과 이용에 대한 연구에 많은 연구비를 투자하고 있는 상황이다. 그러나 국내에서는 진균 분류학자의 수가 극히 소수에 불과하여, 농업해충에 병을 유발하는 곰팡이 분류가 거의 전무한 상태이며 환경 친화적인 미생물 농약개발을 위해서는 국내 자연환경에 적응된 토착 농업해충 병원성균의 자원확보가 시급한 상황이다. 따라서 본 연구에서는 국내에 분포하는 곤충 기생균 및 유용 유전자원에 대한 수집, 분리, 분류 및 분포조사를 수행하여 국내 자생하는 곤충 기생균의 발생양상을 조사함으로써 미생물 살충제의 개발 및 사용에 있어서 중요한 기초자료의 구축을 첫 번째

목적으로 두었으며 국내환경에 적합하며 중요 농업해충에 대하여 우수한 살충력을 지닌 균주를 선발하여 미생물 살충제를 개발함에 그 두 번째 목적을 두었다. 또한 곤충 기생균의 형질 전환에 의한 살충력 향상에 대한 연구는 국내는 물론 국외에서도 아직 연구가 잘 되어져 있지 않은 분야이다. 본 연구에서는 유전 공학적인 방법을 이용하여 곤충기생균의 형질을 전환시킴으로서 살충력 범위의 확대등을 통한 살충력 향상을 세 번째 목적으로 두었다. 이러한 곤충 기생균의 형질 전환에 관한 연구는 국내와 같이 보유된 균주 수도 적고 인력과 연구비 투자도 부족한 상태에서 새로운 살충제 개발을 할 수 있으며, 새로운 기술력을 확보 할 수 있다는 측면에서 매우 중요한 연구라고 할 수 있다. 일부 선진국에서는 곤충기생균을 천연 생물농약으로 개발하여 실용화 단계에 있으나, 국내에서는 생물농약으로서 개발 가능성이 있는 곤충기생균의 포자 대량배양 기술이 확립되어 있지 않다. 따라서 국내 자체에서 대량배양 기술을 개발함으로써 수입대체 효과 및 생산성을 높여야 한다. 본 연구에서는 곤충기생균을 미생물 살충제로 산업화에 이용하기 위해 액체배양, 고체배양, 그리고 이단계배양에 의한 대량배양기술을 확립함이 네번째 목적이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 효율적인 연구 수행을 위하여 네 개의 세부과제로 구성되어 있다. 제 1 세부과제는 곤충기생균 유전자원 수집 및 분리동정에 관한 연구로써 국내에 분포하는 곤충기생균 및 유용 유전자원의 수집, 분리와 형태학 및 분자수준의 분류동정을 수행하여 정확한 국내 자생종의 분포현황을 조사하였다.

제 2 세부과제인 미생물 살충제 효능검정에 관한 연구에서는 원활한 시험해충 제공 및 생물검정을 위하여 주요 나방의 적합한 인공사육배지를 개발하였으며, 국내에서 수집된 녹강균(*Metarhizium anisopliae*; *Nomuraea rileyi*)과 백강균(*Beauveria bassiana*)을 대상으로 채소 및 화훼류에 심각한 피해를 주고 있는 파밤나방, 담배거세미나방, 배추좀나방, 과수의 약제로 방제가 어려운 점박이 응애, 벼에 있어서 주요한 해충인 벼멸구 등에 대하여 우수한 살충력을 지닌 균주를 탐색하였다. 또한 배추좀나방에 대하여 우수한 살충력을 지닌 균주를 선발하여 증체표면에

붙은 포자수와 살충력과의 연관성, 온실과 포장에서의 방제효과를 조사하였다.

제 3 세부과제인 유전공학기법을 이용한 곤충기생균 살충력 향상에 관한 연구에서는 곤충 기생균의 살충력 향상을 위해서 우선 곤충 기생균의 최적 배양조건 확립을 하였고, 곤충 기생균의 protoplast 제조 방법 개발 및 곤충 기생균의 형질전환을 위한 재조합 plasmid 제조를 하였다. 그리고, 전기 충격법에 의한 곤충 기생균의 형질 전환 기술을 개발하였다. 이러한 방법에 의해 형질 전환된 균주들의 분자 생물학적 분석을 위해 형질 전환 균주로부터 chr. DNA분리를 하여, PCR 분석을 하였으며, 이들 균주로부터 total protein을 분리하여, protein의 SDS-PAGE 분석을 하였다. 그리고, 형질 전환된 곤충기생균 제제의 살충력 시험을 실시하였다. 끝으로, 현재 살충제로 많이 개발되어져 있는 *Beauveria bassiana* 균주의 형질을 전환시켰다.

제 4 세부과제인 곤충기생균의 대량배양 기술개발에서는 곤충기생균으로서 *Metarhizium* sp.와 *Beauveria bassiana* 726을 이용하여 성장조건을 확립하고, 특히 포자의 활성이 높은 것으로 밝혀진 *B. bassiana* 726을 이용하여 값싼 배지인 벃짚과 전처리된 당밀을 탄소원으로 하여 배지를 최적화하였고, 액체배양(회분식 및 유가식 배양), 고체배양, 이단계배양에 의한 균체의 대량배양과 포자생성을 위한 공정의 최적화에 이용될 모델을 제시하였다. 또한 생산된 포자를 제형화 하였다.

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

국내에서 수집된 11속 63종의 곤충기생균 중 우수한 살충력을 가진 *Beauveria bassiana*와 *Metarhizium anisopliae* 의 경우 *Beauveria bassiana*가 살충력이 우월하였으며 본 연구 수행 중 319개체를 수집, 분리함으로써 향후 미생물 살충제 개발에 충분한 소재를 확보할 수 있었다. 또한 형태 및 분자생물학적 특성을 이용한 정확한 분류, 동정을 시행하여 한국산 곤충기생균의 명확한 분류체계를 확립하였다. 또한 주요 나방의 적합한 인공사육배지를 개발함으로써 생물검정을 위한 실험에 시험해충을 원활히 제공할 수 있게 되었으며, 국내에서 수집된 녹강균 (*Metarhizium anisopliae*; *Nomuraea rileyi*)과 백강균 (*Beauveria bassiana*)을 대상으로 파밤나방, 담배겨세미나방, 배추좀나방, 점박이 응애, 벼멸구 등에 대하여 우수한 살충력을 지닌 균주를 탐색한 결과, *Metarhizium anisopliae*(녹강균) 경우 시험해충에 대

한 살충력이 저조하여 녹강균을 이용한 미생물살충제 개발의 가능성이 희박하였으며, *Nomuraea rileyi* 925균주의 파밤나방에 대한 살충율은 61%로 보다 우수한 살충력을 지닌 균주선발을 위해서는 지속적인 균주 수집이 요구된다. *Beauveria bassiana*(백강균) 경우 백강균 726균주가 배추좀나방에 대하여 86.2%의 살충율과 반수치사시간(LT₅₀) 1.63일로 가장 강력한 살충력을 보였다. 따라서 백강균 726 균주를 이용한 미생물살충제로의 개발을 목적으로 실내뿐만 아니라 온실과 포장에서의 배추좀나방에 대한 방제능력을 조사하였다. 실내조건에서 충체표면에 붙는 포자수와 살충율과의 연관성을 조사한 결과, 86%의 살충율을 위해서는 약 9800개의 포자가 충체표면에 붙어야함을 확인하였고, 온실환경 조건에서는 66.5%의 살충력과 반수치사시간 3.61일로 실내에서보다는 높은 수치이지만 실외 조건을 감안할 때 역시 높은 살충력을 나타냄을 알 수 있었다. 또한 백강균 726균주의 포장환경 조건에서의 살충력 실험을 한 결과 60%의 살충력과 반수치사시간 4.9일로 실내와 온실에서보다는 높은 수치이지만 야외 조건과 1회 분무를 감안할 때 역시 높은 살충력을 나타냄을 알 수 있었다.

백강균 726균주가 미생물살충제로서의 제 기능을 다하기 위해서, 혹은 상품화를 위해서는 세 가지의 보완 실험이 절실히 요구된다. 첫째, 포장에서 포자의 지속성(viability)이 현격하게 낮아지는 것을 본 실험에서 확인하였다. 따라서 포자를 UV로부터 보호할 수 있는 제제화 기술개발이 필요하다. 둘째, 실제 농가에서는 대량의 살균제를 살포하므로 사상균인 726균주에게는 치명적이라고 할 수 있다. 따라서 유전공학적인 방법으로 726균주의 살균제에 대한 저항성을 강화시키는 것이 요구된다. 셋째, 포자의 대량생산을 위해서는 배지개발도 중요하지만, 생산된 포자를 안전하고 효율적으로 수확하는 방법도 중요하다. 이를 위해서는 특수 제작된 포자수확 기계와 열처리 기계가 필요하지만 아직 국내에서는 전무한 상태이다. 백강균 726균주를 이용하여 미생물살충제의 상품화를 위해서는 전술한 세 가지 추가적인 실험이 보완되어야만 함으로 기업체와 공동연구를 위한 추가적인 연구지원을 건의한다.

유전공학기법을 이용한 살충력 향상을 위한 연구에서 곤충 기생균의 protoplast를 제조하였으며, 세포의 원형질체를 -70°C에 보관 할 수 있었다. 또한 SDS를 이용하여 처리하여, 원형질체의 순수 분리를 확인하였다. 곤충 기생균의 각종 항생제 저

항성 실험을 통하여 곤충 기생균은 Hygromycin 약 60ug/ml에서부터 형질 전환체를 선발 할 수있음을 확인하였다. 방법으로는 electroporation방법을 확립하여 실시하였다.

곤충 기생균의 살충력 향상을 위한 새로운 vector 개발을 위하여 균주들의 형질 전환을 위해서 hygromycin 저항성 유전자를 지니고 있는 형질 전환 벡터 pGPD-tt를 제작하였다. 형질 전환된 곤충 기생균주의 독소 유전자 확인을 위하여 형질 전환체로부터 chr. DNA를 분리하여 PCR 분석에 의한 형질 전환을 확인하였다. 또한 SDS-PAGE 및 western blot 분석을 통하여 독소 유전자의 발현을 검증하였으며 형질 전환 곤충 기생균주 제제의 독소 발현 분석을 위하여 진탕 배양을 한 균주들을 걸러 내어 건조시킨 가루를 SDS-PAGE에 분석하였다. 이로부터 형질전환 곤충기생균 제제 내에 독소 단백질이 형성되어 있음을 확인하였다. 형질전환 곤충기생균 제제의 살충력 시험을 통하여 제조된 제제를 감자 잎에 바른 다음 유충들로 하여금 섭취하게 하였다. 섭취 후 유충들이 모두 죽어 있음을 확인하였다.

본 연구를 통하여 새로운 유전자를 이용한 미생물 살충제 품질 개량의 기반을 구축하였으며 개량된 곤충 기생균을 유전 자원화함으로써 국내 농산물 수출력 강화 및 국제 경쟁력 강화에 도움을 줄 것이며 산업체 기술 이전 및 상품화함으로써 국내 자생종을 이용한 환경 친화형 미생물 살충제의 보급에 이바지할 것으로 확신한다. 또한 곤충기생균의 대량배양 조건의 확립을 위한 본 연구의 결과를 바탕으로 하여 앞으로 pilot scale에 적용하는 단계가 필요할 것이고, 이 단계에서 공정을 최적화한다면, industrial scale로 실용화가 가능할 것으로 사료된다.

SUMMARY

(영문요약문)

A survey of entomopathogenic fungi was conducted in Korea from 1990 to 1998. A total of fungal-infected cadavers of insects and spiders were collected from varied habitats in different altitudinal zones. From these specimens, 11 genera consisting of 67 species Ascomycota and Deuteromycota were isolated and identified on selecting media. Among them, there was new species *Cordyceps yongmunensis* Sung & Humber and 37 newly recorded species from Korea. The newly recorded species are described and illustrated. Of these arthropod fungal pathogens, the genus *Cordyceps*, *Beauveria* and *Paecilomyces* was most prevalent, 192, 319 and 256 specimens in order, followed in descending order by the genera *Metarhizium*, *Hirsutella*, *Verticillium*, *Gibberella*. These arthropod fungal pathogens usually had a relatively broad but differential host range, except *Hirsutella* which selectively attacks scale insects, while *Gibellula* strictly parasitizes spider(Arachnida). For clear identification and classification, PCR-RFLPs, Isoelectric Focusing and Sequencing method were conducted. Also, ecological research on seasoning and geographical distribution for development and use of mycoinsecticide was discussed.

In order for development of mycoinsecticide, various isolates of entomopathogenic fungi including *Metarhizium anisopliae*, *Nomuraea rileyi* and *Beauveria bassiana* were screened to select the most virulent isolate against domestic insect pests(*Spodoptera exigua*, *Spodoptera litura*, *Plutella xylostella*(DBM), *Teranychus urticae*, and *Nilaparvata lugens*). Isolates of *M. anisopliae* used in the study showed low mortality against all test insect pests. *Nomuraea rileyi* 925 with 61% mortality against *S. exigua* has the capability to infect larvae of Noctuidae, but continuous collection of this

species is necessary for higher virulent isolate. Among isolates used, *B. bassiana* 726 revealed the highest virulence against *X. plutella* with 86.23% and LT₅₀ of 1.63 days under the laboratory condition. In order to examine its potential as mycoinsecticide, intensive investigation was made under laboratory, greenhouse and field environments.

Treatment of conidial suspensions at various concentrations indicated that the LC₅₀ was 4.3×10^6 conidia/ml under the laboratory condition. Assessment of rigorous dose-response showed that at least 9,800 conidia of the strain 726 should adhere to a single DBM larva to induce successful infection. In the greenhouse assay, corrected mortality at 1×10^8 conidia/ml was 66.5% with LT₅₀ of 3.61 days.

The efficacy of the strain *B. bassiana* 726 in the field was 60.5% mortality with LT₅₀ of 4.91 days at 10^8 conidia/ml. Persistence of conidia was equally short on both leaves and larvae due to unfavorable environmental conditions. Nevertheless, treatment of *B. bassiana* 726 potentially reduced larval populations, indicating that the strain 726 has the potential to use as mycoinsecticide against DBM larvae.

An insect parasite fungi is recently being interested for the development of microbial insecticide. In this report, we have focussed on the improvement of insecticidal activity in the fungi through the increasing the insecticidal spectrum by using the transformation with *B. t. t.*-toxin gene. For the purpose, the culture conditions for the fungi, at first, were established. The pure isolation of the protoplasts was successfully undertaken from the fungi. The plasmid vector pGDP-Btt and electroporesis method for the transformation were also developed. The transformed fungi could be selected on the PDB solid agar containing the hygromycin with 100ug/ml, and the expression of the gene in the transformed cells was identified by using the molecular biological assays. The transformed cells were cultured in the liquid medium for 7 days and harvested for the prepare of the cell powder. A series of biotests with Coleopteran

larvae were undertaken by using the cell powder spreaded on the leaf surface. The biotests showed that the transformed cell had the insecticidal activity against the insect larvae. The results indicated that the insecticidal activity was improved in comparison with the wild type of the fungi. In addition to the results, we have transformed *Beauveria* sp. isolated in Korea by using the method above easily. The transformation results have proved that the method above may be useful for the development of fungi showing the new insecticidal activity by using the genetical transformation.

In some developed countries, a biological pesticides made by entomopathogenic fungi were developed for a practical application. However, in Korea, it was not established for mass culture technique of a biological pesticide. This technique should be developed in this country for improving the productivity and saving the cost. In this study, mass culture techniques by liquid culture, solid culture, and diphasic cultures were established for the application of entomopathogenic fungi as a biological pesticide.

In this study, growth conditions of entomopathogenic fungi, *Metarhizium* sp. and *Beauveria bassiana* 726, were determined. Especially, media optimization and culture conditions in liquid culture(batch and fed-batch cultures), solid culture, and diphasic cultures were established for the production of cell mass and conidia, using very cheap substrates such as rice straw and molasses. Also, the model was suggested for the optimization of mass culture process.

Based on these results of the study, the process for the pilot scale should be applied and optimized, thus applicable to the industrial scale.

CONTENTS

(영 문 목 차)

I. Introduction -----	24
II. Studies on Collection, Isolation and Identification of entomopathogenic fungi -----	27
1. Introduction-----	27
2. Materials and Methods -----	28
2.1 Collection and isolation of entomopathogenic fungi -----	28
2.1.1 Studies on collection, isolation and identification of <i>Cordyceps</i> --- -----	28
2.2 Taxonomy and Biochemistry of entomopathogenic fungi -----	29
2.1.1 Identification of Korean entomopathogenic fungi -----	29
2.1.1.1 Taxonomy according to microscopic morphological characters ---	29
2.1.2 Research on ecology of entomopathogenic fungi -----	30
2.1.2.1 Occurrence and distribution of Korean entomopathogenic fungi ---- -----	30
2.1.3 Search and collection of <i>Cordyceps</i> -----	30
2.1.4 Cultural characteristics of entomopathogenic fungi -----	31
2.1.5 Molecular systematics of Korean entomopathogenic fungi -----	31
2.1.5.1 Molecular analysis using Isoelectric Focusing -----	31
2.1.5.1.1 Generic relationships of entomopathogenic fungi using IEF -	31
2.1.5.1.2 Generic relationships of <i>Metarhizium</i> , <i>Beauveria</i> and <i>Cordyceps</i> -----	32
2.1.5.2 Molecular systematics using Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism -----	37
2.1.5.2.1 Search of genetic marker on <i>Metarhizium anisopliae</i> group using	

PCR-RFLPs -----	37
2.1.5.2.2 Molecular taxonomy of <i>Beauveria</i> using PCR-RFLPs -----	40
2.1.5.2.3 Sequencing of varieties on <i>Metarhizium anisopliae</i> group----	40
2.3 Developments of Long-term preservation Methods of cultures -----	43
2.3.1 Freeze-drying preservation -----	43
2.3.2 Vaccume-drying preservation -----	43
3. Result and discussion -----	44
3.1 Collection and isolation of entomopathogenic fungi -----	44
3.1.1 Studies on collection, isolation and identification of <i>Cordyceps</i> ---	
-----	44
3.2 Taxonomy and Biochemistry of entomopathogenic fungi -----	53
3.1.1 Identification of Korean entomopathogenic fungi -----	53
3.1.1.1 Taxonomy according to microscopic morphological characters ---	53
3.1.2 Research on ecology of entomopathogenic fungi -----	67
3.1.2.1 Occurrence and distribution of Korean entomopathogenic fungi--	67
3.1.3 Search and collection of <i>Cordyceps</i> -----	67
3.1.4 Cultural characteristics of entomopathogenic fungi -----	68
3.1.5 Molecular systematics of Korean entomopathogenic fungi -----	73
3.1.5.1 Molecular analysis using Isoelectric Focusing -----	73
3.1.5.1.1 Generic relationships of entomopathogenic fungi using IEF -	73
3.1.5.1.2 Generic relationships of <i>Metarhizium</i> , <i>Beauveria</i> and <i>Cordyceps</i>	
-----	74
3.1.5.2 Molecular systematics using Polymerase Chain Reaction-Restriction	
Fragment Length Polymorphism -----	75
3.1.5.2.1 Search of genetic marker on <i>Metarhizium anisopliae</i> group using	
PCR-RFLPs -----	75
3.1.5.2.2 Molecular taxonomy of <i>Beauveria</i> using PCR-RFLPs -----	76
3.1.5.2.3 Sequencing of varieties on <i>Metarhizium anisopliae</i> group ---	77
3.3 Developments of Long-term preservation Methods of cultures -----	91

4. Overall discussion -----	93
5. Abstract-----	96

**III. Screening of mycoinsecticide agent and research of mortality on
agricultural pest ----- 97**

1. Introduction -----	97
2. Materials and Methods -----	98
2.1 Culture of entomopathogenic fungi -----	98
2.2 Insect rearing -----	98
2.3 Bioassay in laboratory -----	98
2.4 Bioassay in greenhouse -----	100
2.5 Bioassay in field -----	100
3. Results and Discussion -----	101
3.1 Bioassay in laboratory -----	101
3.2 Bioassay in greenhouse -----	107
3.3 Bioassay in field -----	109
4. Overall Discussion -----	113
5. Abstract -----	114

**IV. Studies on improvement of pest mortality using genetic engineering
----- 115**

1. Introduction -----	115
2. Material and methods -----	117
2.1 Preparation of protoplast -----	117
2.2 Identification of isolated protoplast -----	117
2.3 Transformation of entomopathogenic fungi -----	117
2.3.1 General method -----	117
2.3.2 Electrophoresis -----	118
2.4 DNA fragment endfilling -----	118

2.5 Mini preparation of genomic DNA isolation -----	118
2.6 Check of Chromosomal DNA of fungi -----	118
2.7 PCR analysis -----	119
2.8 Western Blot Analysis -----	119
2.9 Insect mortality test -----	119
3. Results and Discussion -----	120
3.1 Reserch of optimal cultural condition of entomopathogenic fungi -----	120
3.2 Construction of protoplast for entomopathogenic fungi -----	120
3.3 Identification of protoplast -----	122
3.4 Experiment of resistance for various antibiotics -----	123
3.5 Isolation of chromosomal DNA from entomopathogenic fungi -----	126
3.6 Transformation of entomopathogenic fungi -----	126
3.7 Construction of vector for improvement of insect mortality -----	128
3.8 Construction of recombinant plasmid from transformed entomopathogenic fungi -----	130
3.9 Transformation of entomopathogenic fungi by electroporation -----	132
3.10 Isolation of chromosomal DNA of entomopathogenic fungi -----	132
3.11 Identification of the <i>B. t. t.</i> -toxin gene by using the PCR-method ---	132
3.12 Detection of the <i>B. t. t.</i> -toxin protein by using the weatern blot assay-- -----	134
3.13 Analysis of toxin gene expression from entomopathogenic fungi -----	135
3.14 Test of insect mortality using transformed fungal agent -----	136
3.15 Transformation of <i>Beauveria</i> sp.-----	137
4. overall discussion -----	140
5. Abstracts-----	141
V. Studies on mass production of entomopathogenic fungi -----	143
1. Introduction -----	143
2. Materials and Methods -----	146

2.1 Strain -----	146
2.2 Media -----	146
2.2.1 Basal Media -----	146
2.2.2 Inoculum -----	147
2.3. Culture conditions -----	147
2.3.1 Optimal culture temperature -----	147
2.3.2 pH measurement -----	147
2.4 Culture method -----	148
2.4.1 Liquid culture -----	148
2.4.2 Solid culture and Diphasic culture -----	148
2.5 Pretreatment of substrate -----	148
2.5.1 Preparation of colloidal chitin -----	148
2.5.2 Molasses pretreatment -----	148
2.5.3 Rice straw pretreatment -----	148
2.6. Analysis -----	149
2.6.1 Sugar analysis -----	149
2.6.2 Enzyme activities -----	149
2.6.3 Cell mass measurement -----	149
2.6.4 Measurement of conidia concentration -----	149
2.7. Growth curve and specific growth rate -----	150
2.8. Effect of various substrates -----	151
2.8.1 Effect of carbon source -----	151
2.8.2 Effect of inorganic nitrogen source -----	151
2.8.3 Effect of organic nitrogen source -----	151
2.8.4 Effect of inorganic salts -----	151
2.9. Cultures in the stirred tank reactor -----	152
3. Results and Discussion -----	154
3.1 Establishment of media and culture condition of entomopathogenic fungi in liquid culture -----	154

3.1.1 Media optimization for mass culture of <i>Metarhizium anisopliae</i> ARS 978	-----	154
3.1.1.1 Effect of culture temperature	-----	154
3.1.1.2 Effect of initial pH	-----	154
3.1.1.3 Effect of carbon source	-----	156
3.1.1.4 Effect of nitrogen source	-----	159
3.1.1.5 Effect of inorganic salts	-----	164
3.1.2 Media optimization for mass culture of <i>Metarhizium anisopliae</i> ARS 2231	-----	167
3.1.2.1 Effect of culture temperature	-----	167
3.1.2.2 Effect of initial pH	-----	167
3.1.2.3 Effect of carbon source	-----	167
3.1.2.4 Effect of nitrogen source	-----	172
3.1.2.5 Effect of inorganic salts	-----	177
3.1.3 Establishment of media and culture condition for mass culture of <i>Beauveria bassina</i> 726	-----	180
3.1.3.1 The case the substrate is a rice straw	-----	180
3.1.3.1.1 Establishment of growth conditions	-----	180
3.1.3.1.2 Effect of initial pH	-----	180
3.1.3.1.3 Inoculum	-----	180
3.1.3.1.4 Effect of carbon source	-----	183
3.1.3.1.5 Effect of nitrogen source	-----	186
3.1.3.1.6 Effect of inorganic salts	-----	190
3.1.3.1.7 Production of cell mass and conidia in the stirred tank reactor	-----	193
3.1.3.2 The case the substrate is a molasses	-----	196
3.1.3.2.1 Growth	-----	196
3.1.3.2.2 Determination of optimal concentration of molasses	-----	196
3.1.3.2.3 Determination of optimal nitrogen source and concentration	-----	

-----	196
3.1.3.2.3.1 Effect of organic nitrogen source -----	196
3.1.3.2.3.2 Effect of inorganic nitrogen source -----	202
3.1.3.2.3.3 Effect of Hydrolyzed casein -----	202
3.1.3.2.3.4 Effect of Corn steep liquor -----	202
3.1.3.2.3.5 Effect of concentration of inorganic nitrogen source -----	203
3.1.3.2.3.6 Effect of inorganic salts -----	208
3.1.3.2.4 Composition of optimal media -----	214
3.1.3.2.5 Shake-flask culture in an optimal media -----	214
3.1.3.2.5.1 The case the nitrogen source is a hydrolyzed casein--	214
3.1.3.2.5.2 The case the nitrogen source is a corn steep liquor -	215
3.1.3.2.6 Production of cell mass and conidia in the stirred tank reactor -----	222
3.1.3.2.6.1 The case the nitrogen source is a hydrolyzed casein - Batch culture and Fed-batdh culture	222
3.1.3.2.6.2 The case the nitrogen source is a corn steep liquor - Batch culture and Fed-batch culture	229
3.2. Establishment of culture conditions of <i>Beauveria bassiana</i> 726 in solid and diphasic cultures -----	236
3.2.1 Production of conidia by solid culture -----	236
3.2.1.1 Optimization in the shake-flasks -----	236
3.2.1.2 Optimization in the bench-scale -----	236
3.2.2 Production of conidia by diphasic culture -----	237
3.2.3 Formulation of conidia -----	238
4. Overall discussion -----	242
5. Abstract -----	243
 VI. References -----	 245

목 차

제 1 장 서 론 -----	24
제 2 장 곤충기생균의 수집 및 분리동정에 관한 연구-----	27
제1절 서론 -----	27
제2절 재료 및 방법 -----	28
1. 곤충기생균의 수집과 분리 -----	28
가. 곤충기생균 유용유전자원 수집 및 분리동정에 관한 연구 -----	28
2. 채집된 곤충기생균의 분류, 동정 및 생리 실험 -----	29
가. 채집된 곤충기생균의 분류동정 -----	29
1) 미세구조적 형태학상의 특성에 따른 분류 -----	29
나. 곤충기생균의 생태적 환경 조사 -----	30
1) 한국산 곤충기생균의 분포상과 발생빈도 조사 -----	30
다. 고부가성 유전자원의 탐색 -----	30
라. 곤충기생균의 배양적 특성 조사 -----	31
마. 분자수준의 분류체계 확립 -----	31
1) 동위효소분석장치(IEF)를 이용한 분자수준의 분석 -----	31
가) 곤충기생균 속 간의 동위효소 분석 -----	31
나) <i>Metarhizium</i> 속, <i>Beauveria</i> 속, <i>Cordyceps</i> 속간의 동위효소 분석 -----	32
2) PCR-RFLPs기법을 이용한 분자분류 -----	37
가) PCR-RFLPs기법을 이용한 곤충기생균 유전적 지표탐색 -----	37
나) PCR-RFLPs기법을 이용한 <i>Beauveria</i> 속균의 분자 분류 -----	40
3) 염기서열 분석을 통한 <i>Metarhizium anisopliae</i> 의 종내 변이주간의 분류 -----	40
3. 균주의 장기보존법 개발 -----	43
가. 동결건조를 이용한 보존방법 개발 -----	43
나. 진공건조를 이용한 보존방법 개발 -----	43

제3절 결과 및 고찰 -----	44
1. 곤충기생균의 수집과 분리 -----	44
가. 곤충기생균 유용유전자원 수집 및 분리동정 -----	44
2. 채집된 곤충기생균의 분류, 동정 및 생리 실험 -----	53
가. 채집된 곤충기생균의 분류동정 -----	53
1) 미세구조적 형태학상의 특성에 따른 분류 -----	53
가) 다양한 곤충기생균의 미세구조적 특징 -----	53
나) <i>Verticillium</i> 속의 불완전세대를 갖는 <i>Cordyceps</i> 속균 -----	53
다) <i>Beauveria</i> , <i>Metarhizium</i> 속균의 형태학적 고찰 -----	53
라) <i>Metarhizium</i> 속균의 형태적 특성 -----	53
마) <i>Cordyceps specpcephala</i> 에 대한 형태적 특성 및 불완전세대와의 관계	
바) <i>Cordyceps</i> 속균와 <i>Beauveria</i> 속균간의 관계 -----	53
나. 곤충기생균의 생태적 환경 조사 -----	67
1) 한국산 곤충기생균의 분포상과 발생빈도 -----	67
다. 고부가성 유전자원의 탐색 -----	67
라. 곤충기생균의 배양적 특성 -----	68
마. 분자수준의 분류체계 확립 -----	73
1) 동위효소분석장치(IEF)를 이용한 분자수준의 분석 -----	73
가) 곤충기생균 속 간의 동위효소 분석 -----	73
(1) Esterase처리 -----	74
(2) Acid phosphatase처리 -----	74
(3) Malate dehydrogenase처리-----	74
나) <i>Metarhizium</i> 속, <i>Beauveria</i> 속, <i>Cordyceps</i> 속간의 동위효소 분석	
(1) Esterase(EST; E. C. 3. 1. 1. 1) -----	74
(2) Acid phosphatase(ACP; E. C. 3. 1. 3. 2) -----	75
2) PCR-RFLPs기법을 이용한 분자분류 -----	75
가) PCR-RFLPs기법을 이용한 곤충기생균 유전적 지표탐색 -----	75
(1) PCR 증폭 -----	75
(2) 제한효소의 절단다형질(RFLPs) -----	75

나) PCR-RFLPs기법을 이용한 <i>Beauveria</i> 속균의 분자 분류 -----	76
3) 염기서열 분석을 통한 <i>Metarhizium anisopliae</i> 의 변종간의 분류-	77
3. 균주의 장기보존법 개발 -----	91
제4절 종합고찰-----	93
제5절 적요 -----	96
제 3 장 미생물살충제 효능검정에 관한 연구 -----	97
제1절 서론 -----	97
제2절 재료 및 방법 -----	98
1. 곤충병원성 곰팡이의 배양 -----	98
2. 시험곤충의 사육 -----	98
3. 실내 생물검정 -----	98
4. 온실 실험 -----	100
5. 포장 실험 -----	100
제3절 결과 및 고찰 -----	101
1. 실내 생물검정 -----	101
2. 온실 실험 -----	107
3. 포장 실험 -----	109
제4절 종합고찰 -----	113
제5절 적요 -----	114
제 4 장 유전공학기법을 이용한 곤충기생균 살충력 향상에 관한 연구 ---	115
제1절 서론 -----	115
제2절 재료 및 방법 -----	117
1. 원형질체 제조 -----	117
2. 원형질체의 순수분리 확인 -----	117
3. 곤충기생 곰팡이 균주의 형질전환 -----	117
가. 일반적인 방법 -----	117
나. Electrophoresis 방법 -----	118

4. DNA fragment endfilling -----	118
5. Mini preparation of genomic DNA isolation -----	118
6. Chromosomal DNA of fungi -----	118
7. PCR 분석 -----	119
8. Western Blot 분석 -----	119
9. 살충성 test -----	119
제3절 결과 및 고찰 -----	120
1. 곤충기생균의 최적 배양조건 확립 -----	120
2. 곤충기생균의 protoplast 제조 방법 -----	120
3. Protoplast 확인 -----	122
4. 곤충기생균의 각종 항생제 저항성 실험 -----	123
5. 곤충기생균으로부터 chromosomal DNA의 분리 -----	126
6. 곤충기생균주의 형질전환 -----	126
7. 곤충 기생균의 살충력 향상을 위한 새로운 vector의 개발 -----	128
8. 형질 전환 곤충기생균에서의 유전자 발현 재조합 plasmid 제조 -----	130
9. Electrophoration에 의한 곤충기생균의 형질전환 -----	132
10. 곤충기생균주의 chromosomal DNA분리 -----	132
11. PCR 분석에 의한 독소 유전자 확인 -----	132
12. 독소 유전자의 발현 검증 -----	134
13. 형질전환 곤충 기생균주 제재의 독소 발현 분석 -----	135
14. 형질전환 곤충기생균 제재의 살충력 시험 -----	136
15. <i>Beauveria</i> sp. 균주의 형질 전환 -----	137
제4절 종합고찰 -----	140
제5절 적요 -----	141
제 5 장 곤충기생균 대량배양 기술개발 -----	143
제1절 서론 -----	143
제2절 재료 및 방법 -----	146
1. 사용 균주 -----	146

2. 배지 -----	146
가. 기본배지 확립 -----	146
나. 종균 배양배지 조건 확립 -----	147
3. 배양조건 확립-----	147
가. 최적 배양온도의 확립 -----	147
나. 최초 초기 pH 측정 -----	147
4. 배양방법-----	148
가. 액체배양 -----	148
나. 고체배양 및 이단계배양 -----	148
5. 기질전처리-----	148
가. Colloidal chitin의 제조 -----	148
나. 당밀의 전처리 -----	149
다. 벧짚의 전처리 -----	148
6. 분석-----	149
가. 당농도의 분석 -----	149
나. 효소 역가 측정 -----	149
다. 균체량 측정 -----	149
라. 포자농도 측정 -----	149
7. 생장곡선 및 비생장속도 측정-----	150
8. 다양한 기질에 대한 영향조사 -----	151
가. 탄소원의 영향 -----	151
나. 무기질소원의 영향 -----	151
다. 유기질소원의 영향 -----	151
라. 무기염류의 영향 -----	151
9. 교반식 반응기에서의 배양 -----	152
제3절 결과 및 고찰 -----	154
1. 액체배양에서 곤충기생균의 배지 및 배양조건의 확립 -----	154
가. <i>Metarhizium anisopliae</i> ARS 978의 대량배양을 위한 배지최적화 --	154
1) 배양온도의 영향 -----	154

2) 초기 pH의 영향 -----	154
3) 탄소원의 영향 -----	156
4) 질소원의 영향 -----	156
5) 무기염류의 영향 -----	159
나. <i>Metarhizium anisopliae</i> ARS 2231의 대량배양을 위한 배지최적화 -	167
1) 배양온도의 영향 -----	167
2) 초기 pH의 영향 -----	167
3) 탄소원의 영향 -----	167
4) 질소원의 영향 -----	172
5) 무기염류의 영향 -----	177
다. <i>Beauveria bassiana</i> 726의 대량배양을 위한 배지최적화 및 배양조건 확	
립-----	180
1) 벧짚을 기질로 한 경우 -----	180
(1) 균주의 성장조건 확립 -----	180
(2) 초기 pH의 영향 -----	180
(3) 종균배양 조건의 확립 -----	180
(4) 탄소원의 영향 -----	183
(5) 질소원의 영향 -----	186
(6) 무기염류의 영향 -----	190
(7) 교반식 반응기에서 균체 및 포자의 생산 -----	193
2) 당밀을 기질로 한 경우 -----	196
(1) 균주의 성장 -----	196
(2) 최적 당밀농도의 결정 -----	196
(3) 최적 질소원 및 농도의 결정 -----	196
(가) 유기질소원의 영향 -----	196
(나) 무기질소원의 영향 -----	202
(다) Hydrolyzed casein 농도의 영향 -----	202
(라) Corn steep liquor 농도의 영향 -----	202
(마) 무기질소원의 농도별 영향 -----	203

(바) 무기염류의 영향 -----	208
(4) 최적배지의 조성 -----	214
(5) 최적배지에서 삼각플라스크 배양 -----	214
(가) Hydrolyzed casein이 질소원인 경우 -----	214
(나) Corn steep liquor가 질소원인 경우 -----	215
(6) 교반식 배양기에서 균체 및 포자의 생산 -----	222
(가) Hydrolyzed casein이 질소원인 경우 -----	222
① 회분식 배양 -----	222
② 유가식 배양 -----	222
나) Corn steep liquor가 질소원인 경우 -----	229
① 회분식배양 -----	229
② 유가식 배양 -----	229
2. 고체배양 및 이단계배양에서 <i>Beauveria bassiana</i> 726의 배양조건 확립	
가. 고체배양에 의한 활성포자 생산 -----	236
1) 삼각플라스크에서 최적화 -----	236
2) Bench-scale에서 최적화 -----	236
나. 이단계배양에 의한 활성포자 생산 -----	237
다. 미생물 살충제 제조 -----	238
제4절 종합고찰 -----	242
제5절 적요 -----	243
제 6 장 참고문헌 -----	245

제 1 장 서 론

제1절 연구개발의 목적과 범위

최근 지구 환경생태계 보전 차원의 생물적 다양성 보전을 위한 세계적인 움직임과 함께, 유전자원의 확보 및 생물소재 개발이라는 산업적, 경제적 측면에서 유용생물자원의 확보를 위한 국가간의 자원확보 경쟁이 세계적으로 치열해지고 있다. 특히 최근에는 유기합성 농약에 의한 환경오염의 심각성으로 인하여 환경친화적인 미생물 농약 개발에 많은 노력을 하고 있으며 또한 이를 위하여 자국에서 자생하는 곤충병원성 미생물의 유전자원 확보에 박차를 가하고 있는 실정이다. 미생물 농약 중에서 가장 대표적인 것이 미생물 살충제인데, 미생물 살충제는 미생물 자체를 직접 이용하거나 미생물을 포함한 제제를 이용하여 농작물에 해를 주는 곤충, 응애, 선충 등의 해충등을 방제하는데 쓰이는 살충제라 할 수 있다. 곤충 기생균은 세계적으로 무공해 미생물 농약 개발에 많이 이용되고 있다. 이러한 미생물 살충제의 개발은 환경보호의 중요성에 대한 인식 증대와 함께 사회적으로도 많은 관심의 초점이 되고 있다. 그리하여, 선진국들을 중심으로 새로운 미생물 살충제 개발을 위해 곤충 기생균에 대한 관심과 이용에 대한 연구에 많은 연구비를 투자하고 있는 상황이다. 그러나 국내에서는 진균 분류학자의 수가 극히 소수에 불과하여, 농업해충에 병을 유발하는 곰팡이 분류가 거의 전무한 상태이며 환경친화적인 미생물 농약개발을 위해서는 국내 자연환경에 적응된 토착 농업해충 병원성 곰팡이의 자원확보가 시급한 상황이다.

따라서 본 연구에서는 국내에 분포하는 곤충기생균 및 유용 유전자원에 대한 수집, 분리, 분류 및 분포조사를 수행하여 국내 자생하는 곤충기생균의 발생양상을 조사함으로써 미생물 살충제의 개발 및 사용에 있어서 중요한 기초자료의 구축을 첫 번째 목적으로 두었으며 국내환경에 적합하며 중요 농업해충에 대하여 우수한 살충력을 지닌 균주를 선발하여 미생물 살충제를 개발함에 그 두 번째 목적을 두었다. 또한 곤충 기생균의 형질 전환에 의한 살충력 향상에 대한 연구는 국내는 물론 국외에서도 아직 연구가 잘 되어져 있지 않은 분야이다. 본 연구에서는 유전 공학적인 방법을 이용하여 곤충기생균의 형질을 전환시킴으로서 살충력 범위의 확대등을 통한

살충력 향상을 세 번째 목적으로 두었다. 이러한 곤충 기생균의 형질 전환에 관한 연구는 우리나라와 같이 보유한 균주 수도 적고 인력과 연구비 투자도 부족한 상태에서 새로운 살충제 개발을 할 수 있으며, 새로운 기술력을 확보 할 수 있다는 측면에서 매우 중요한 연구라고 할 수 있다. 일부 선진국에서는 곤충기생균을 천연 생물농약으로 개발하여 실용화 단계에 있으나, 국내에서는 생물농약으로서 개발 가능성이 있는 곤충기생균의 포자 대량배양 기술이 확립되어 있지 않다. 따라서 국내 자체에서 대량배양 기술을 개발함으로써 수입대체 효과 및 생산성을 높여야 한다. 본 연구에서는 곤충기생균을 미생물 살충제로 산업화에 이용하기 위해 액체배양, 고체배양, 그리고 이단계배양에 의한 대량배양기술을 확립함이 네번째 목적이다.

본 연구는 효율적인 연구 수행을 위하여 네 개의 세부과제로 구성되어 있다. 제 1 세부과제는 곤충기생균 유전자원 수집 및 분리동정에 관한 연구로써 국내에 분포하는 곤충기생균 및 유용 유전자원의 수집, 분리와 형태학 및 분자수준의 분류동정을 수행하여 정확한 국내자생종의 분포현황을 조사하였다. 제 2 세부과제인 미생물 살충제 효능검정에 관한 연구에서는 원활한 시험해충 제공 및 생물검정을 위하여 주요 나방의 적합한 인공사육배지를 개발하였으며, 국내에서 수집된 녹강균 (*Metarhizium anisopliae*; *Nomuraea rileyi*)과 백강균 (*Beauveria bassiana*)을 대상으로 채소 및 화훼류에 심각한 피해를 주고 있는 파밤나방, 담배거세미나방, 배추좀나방, 과수의 약제로 방제가 어려운 점박이 응애, 벼에 있어서 주요한 해충인 벼멸구 등에 대하여 우수한 살충력을 지닌 균주를 탐색하였다. 또한 배추좀나방에 대하여 우수한 살충력을 지닌 균주를 선발하여 증체표면에 붙은 포자수와 살충력과의 연관성, 온실과 포장에서의 방제효과를 조사하였다. 제 3 세부과제인 유전공학기법을 이용한 곤충기생균 살충력 향상에 관한 연구에서는 곤충 기생균의 살충력 향상을 위해서 우선 곤충 기생균의 최적 배양 조건 확립을 하였고, 곤충 기생균의 protoplast 제조 방법 개발 및 곤충 기생균의 형질전환을 위한 재조합 plasmid 제조를 하였다. 그리고, 전기 충격법에 의한 곤충 기생균의 형질 전환 기술을 개발하였다. 이러한 방법에 의해 형질 전환된 균주들의 분자 생물학적 분석을 위해 형질 전환 균주로부터 chr. DNA분리를 하여, PCR 분석을 하였으며, 이들 균주로부터 total protein을 분리하여, protein의 SDS-PAGE 분석을 하였다. 그리고, 형질 전환된 곤충기생균 제

재의 살충력 시험을 실시하였다. 끝으로, 현재 살충제로 많이 개발되어져 있는 *Beauveria* sp. 균주의 형질을 전환시켰다. 제 4 세부과제인 곤충기생균의 대량배양 기술개발에서는 곤충기생균으로서 *Metarhizium* sp.와 *Beauveria bassiana* 726을 이용하여 성장조건을 확립하고, 특히 포자의 활성이 높은 것으로 밝혀진 *B. bassiana* 726을 이용하여 값싼 배지인 벧짚과 전처리된 당밀을 탄소원으로 하여 배지를 최적화하였고, 액체배양(회분식 및 유가식 배양), 고체배양, 이단계배양에 의한 균체의 대량배양과 포자생성을 위한 공정의 최적화에 이용될 모델을 제시하였다. 또한 생산된 포자를 제형화 하였다.

제2장 곤충기생균의 수집 및 분리동정에 관한 연구

제1절 서론

곤충기생균은 전세계에 널리 분포하나 국내 곤충기생균에 관한 조사는 전문 인력 부족과 기술부족으로 미비한 실정이며 국내 자생종에 대한 분포 및 발생양상에 관한 조사가 시급하다. 또한 곤충기생균과 고부가성 유전자원의 탐색 및 수집은 생물자원의 보존차원에서 그리고 산업적, 의학적 이용가치로 그 요구도가 증가하므로 원활한 소재 공급을 위한 기반 확립이 요구된다. 그러므로 본 연구에서는 차후 개발제의 실용적 사용과 보존 및 살충능력을 향상시키기 위하여 균에 대한 형태학적 정보 및 생리, 생태학적 정보 축적하고 곤충기생균을 비롯한 국내 분포하는 미생물 유전자원을 수집, 분리 및 정확한 동정을 통하여 환경오염으로 인한 생물다양성 연구 및 자원을 확보하며 미생물 살충제의 소재개발 및 그 사용에 대한 기초자료의 구축을 목적으로 수행되었다. 또한 채집된 곤충기생균의 분리방법이 체계화 되어 있지 않은 관계로 좀더 신속하고 정확한 분류동정을 뒷받침해 줄 수 있는 분리방법 개발이 요구된다. 분리방법으로는 일반적으로 antibiotics나 detergents, dodine을 이용하는 방법이 사용되고 있으나 곤충기생균만을 효과적이고 선택적으로 분리하기 위하여 곤충기생균에 있어서 특이적 생리적 특성인 구리저항성을 응용한 분리용 선택배지의 이용효과를 조사하였다. 또한 채집된 곤충기생균의 분류 동정 체계가 확립되어 있지 않아 이들 균주에 대한 형태적, 미세구조적인 연구를 통하여 국내산 곤충기생균의 분류 동정 체계의 확립이 시급하며 최근 식품, 의학적으로 산업적 가치가 인정되고 있는 곤충기생성 곰팡이의 완전세대인 동충하초의 분리, 수집을 통한 유용 유전자원 보존이 필요하다. 그러므로 보존자원의 정확한 정보체계를 구축하기 위한 방편으로 곤충기생균의 미세구조의 형태학적 검경을 통하여 정확한 곤충기생균의 분류체계를 구명하였다. 또한 불완전세대 균의 다형화 현상으로 인하여 형태적 분류에 많은 어려움이 있으므로 생화학적 특성중 동위효소 분석장치(Iso Electric Focusing)을 이용하여 곤충기생균 상호간의 유사성과 다양성을 비교, 동정하였다. 곤충기생균의 분류에 어려움을 주고 있는 종의 하나인 녹강균의 분류는 분생포자의 포자크기에 의존

하는 분류체계로 인하여 변종간의 많은 혼란을 초래하고 있으므로 PCR-RFLPs를 통하여 두 개의 종내 변종인 *M. anisopliae* var. *anisopliae*와 *M. anisopliae* var. *majus*의 변종 특이적인 유전자 지표를 탐색하여 녹강균의 분류체계를 확립하였다. 곤충기생균은 생활환의 대부분을 불완전세대형이 차지하고 있으나 불완전세대 균의 다형화 현상으로 인하여 형태적 분류에 많은 어려움이 있으므로 생화학적 특성중 동위효소전기영동(IEF)을 이용하여 곤충기생균 상호간의 유사성과 다양성을 비교 동정하였다. 곤충기생균의 장기 보존을 위해서는 포자 저장법과 균사체 저장법이 있으나 일반적으로 포자저장법을 선호하는 경향으로 다량의 포자를 인위적으로 발생 유도하기 위한 효과적인 배양적 특성이 구명되어야 한다. 미생물 제제에 사용되고 있는 곤충기생균은 대부분이 활발한 포자형성 능력을 가지고 있고 이러한 사실은 해충에 대한 살충력과도 연관이 있으므로 실내 복합배지 실험을 통하여 포자형성 우수배지를 선발하고 수집된 균주의 보존 실험을 실행하였다.

제2절 재료 및 방법

1. 곤충기생균의 수집과 분리

가. 곤충기생균 유용유전자원 수집 및 분리동정에 관한 연구

곤충기생균의 수집과 고 부가성 유전자원의 탐색 및 수집은 연중 강원지역을 중심으로 전국 53개 채집지에서 이루어졌다. (Fig. 1) 채집된 균주의 분리는 SDAY을 기본배지로하여 각각 200mg의 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Shinyo chemical Co.)와 100mg의 Gentamicin sulfate(Ilyang Co.)를 첨가한 배지와 물한천배지(agar 18g/L), 감자한천배지(PDA; Difco.)를 사용하였으며 균체에서 사출된 포자를 제조한 배지에 직접 받거나 층체에서 분리한 후 26°C에서 균주별 선택 배지상에서 배양 후 분류 동정하였다. 채집된 곤충기생균의 분리를 위한 선택배지 개발 실험의 공시균주로 국내에서 채집된 불완전균류인 *Paecilomyces tenuipes*(C1601, C1604, C1614) 3균주, *Beauveria bassiana*(C1622, C1614, C1625) 3균주, 자낭균류인 *Cordyceps bifusispora*(C1602) 1균주를 이용하였다. 실험에 사용된 배지로는 50% Sabouraud Dextrose Agar Yeast-extract(SDAY; Dextrose 20g/L, Yeast Extract 5g/L, Peptone 5g/L, Agar 18g/L)를 기본 배지로 하여 각각 200mg의 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Shinyo chemical

Co.)와 100mg의 Gentamicin sulfate(Dong shin Co.)를 첨가하였으며 비교구로 물한 천배지(agar 18g/L)와 Potato Dextrose Agar(Bacto.)를 사용하여 균체에서 사출된 포자를 제조한 배지에 직접 받아서 26℃에서 5일간 배양시킨 후 세균에 의한 오염율은 배지위에 형성된 콜로니의 개수로 잡균에 의한 오염율은 잡균의 개수와 직경으로 측정하여 배지간 오염율을 백분율로 비교 분석하였다

2. 채집된 곤충기생균의 분류, 동정 및 생리 실험

가. 채집된 곤충기생균의 분류동정

1) 미세구조적 형태학상의 특성에 따른 분류

곤충기생균의 형태적 분류는 광학현미경(Axioskop, Carl Zeiss, ×1000)과 해부현미경(Stemi SV-8, Carl Zeiss, ×50), 주사전자현미경(SEM: Scanning electron microscope, Leo, Carl Zeiss)을 이용, 불완전균강의 균의 경우 포자의 형태와 크기, 색깔, 분생자경의 형태 및 균사의 특징, 배양적 특성등에 따라 분류하고 자실체를 형성하는 자낭균강의 균의 경우 기주의 종류, 자실체의 크기, 형태, 색깔, 그리고 미세구조적인 특징인 자낭의 형태, 크기와 두께, 병의 두께와 조직, 결실부의 경계, 2차포자의 분열여부, 2차포자의 크기, 자낭각의 형태 등을 그 기준으로 하였다.

또한 국내 불완전균류중 쉽게 발견되고 생물농약으로 높은 이용성이 있어 구미선진국에서는 이미 시판되고 있는 종인 *Beauveria*속균중 *B. caledonica*(C1044), *B. brongniartii*(C1043), *B. velata* (C1045), *B. bassiana*(C331) 4종을 주사전자현미경을 이용하여 그 형태적 특징을 관찰하였고 동위효소 분석이나 PCR-RFLPs를 이용하여 본 과제의 분자분류를 수행한 갑충을 비롯한 과수해충의 방제제로 개발되고 있는 대표적 곤충기생균인 *Metarhizium*속균의 종간, 종내의 광학현미경(×1000) 관찰결과를 국내 채집종의 검경을 통하여 그 미세구조적 특징을 관찰하였다.

또한 국내 채집된 *Cordyceps*속의 관련 불완전세대를 조사하기 위하여 국내 채집된 *Cordyceps*속균중 *C. ochraceostromata*(C535), *C. opioglossoides*(C735), *C. scarabaeicola*(C252), *C. matialis*(C1283), *C. militaris*(C1281), *C. roseostromata*(C228), *C. pruinosa*(C628), *C. kyushuensis*(C133), *C. agriota*(C550), *C. oxycephala*(C263), *C. spechocephala*(C840), *C. ishikariensis*(C1471), *C. gracilioides*(C1352), 번데기 흰고무등충하초(한국명:C1192), *C. sp*(C1451)등 16종의

불완전세대를 광학현미경(Mag ×1000)과 주사전자현미경을 통하여 분류동정 하였다. 지난 10년간 가장 많이 채집된 국내 곤충기생균중 우월종인 벌동충하초(*C. sphecocephala*)의 광학현미경과 SEM검경을 통한 분류학적인 특징을 명확히 제시하였다.

주사전자현미경 관찰을 위해 SDAY, MEA배지상에서 26℃ 14일간 배양한 공시균을 포자가 많은 부분을 선택하여 사방 1cm으로 절취한 후 Karnovsky's fixative에서 4℃ overnight하여 전고정한다. 후고정을 위하여 1% Osmic acid로 3시간처리하되 전고정과 후고정의 사이에 0.05M의 Sodium cacohydrate buffer, pH 7.2로 3회 washing한 후 고정을 완료한 시료는 50%, 75%, 90%, 95%, 100%의 Ethanol로 각각 1시간씩 탈수시키고 Amyl Acetate로 1시간씩 2회 탈수시켰다. 제작된 시료를 Critical point dryer(BIO-RAD, E-3000)로 CO₂를 이용하여 건조시킨 후 Gold ion coater로 도금하여 관찰을 위한 시료제작을 완성하였다. 관찰시 EHT는 8kV로 하였고 배율은 2000배에서 11000배로 하여 관찰하였다.

나. 곤충기생균의 생태적 환경 조사

1) 한국산 곤충기생균의 분포상과 발생빈도 조사

곤충기생균 및 동충하초의 국내 지리적 분포상과 연중 시기별 발생빈도를 조사하기 위하여 1980년부터 1997년까지 12년간 전국 53개소의 채집지에서 채집된 균주의 정보와 채집시기, 기주, 채집 장소 등을 데이터베이스하여 다양한 환경적 요인에 따른 균주별 지역적 발생빈도를 조사하였다. 또한 연중 축적된 자료를 수집하여 총괄적이고 연차적으로 자료를 축적해 나가는 동시에 농지와, 산림 등 생태환경이 각기 다른 일련의 지역구를 선정하여 연중 다양한 시기적 발생빈도를 반복 조사함으로써 특정균의 정확한 생리, 생태적 요구도와 시기에 따른 발생양상을 규명하여 차후 미생물살충제의 대량생산과 실제적이용을 위해 요구되는 기초 자료조사를 수행하였다.

다. 고부가성 유전자원의 탐색

식품, 의학적으로 산업적 가치가 높아가는 동충하초의 탐색 및 수집은 5월 상순부터 10월 초순까지 강원지역을 중심으로 전국 총 53개 채집구에서 이루어졌으며 채

집된 표본은 온도와 습도 광조절이 가능한 배양실에서 후배양한 후 적절한 시기에 분출된 자낭포자를 분리용 선택 배지를 이용하여 분리하였다. 분리는 SDAY을 기본배지로 하여 각각 200mg의 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (Shinyo chemical Co.)와 100mg의 Gentamicin sulfate (Ilyang Co.)를 첨가한 배지와 물한천배지(agar 18g/L)를 사용하였으며 균체에서 사출된 자낭포자를 제조한 배지에 직접 받거나 층체에서 분리한 후 26℃에서 배양시켰다. 불완전세대의 분류동정 방법으로는 moisture culture를 제작하여 광학 현미경(Axioskop, Carl Zeiss)과 해부현미경(Stemi SV-8, Carl Zeiss)를 이용하여 Kobayasi와 Main의 분류체계에 입각하여 수행하였다.

라. 곤충기생균의 배양적 특성 조사

미생물 제제에 이용되고 있는 곤충기생성 균류는 대부분이 활발한 포자형성 능력을 가지고 있고 이러한 사실은 해충에 대한 살충력과도 연관되며 채집된 곤충기생균의 장기 보존을 위해서도 포자 저장법을 선호하는 경향이 있어서 우수한 분생포자형성율을 보이는 최적 배지를 선별하기 위하여 *B. bassiana*(C331, C817) 2균주, *P. tenuipes*(C810) 1균주, *M. anisopliae* var. *anisopliae*(C1068) 1균주를 공시균주로 하여 PDA, MEA, MCM, HMA, OA, Czapeks, CMA, PPLO, SDAY, DMEA등의 11개의 복합배지를 조제하여 PDA배지상에서 배양중인 5개의 균주를 7mm cork borer를 이용하여 배지상에 1개씩의 disk를 접종하였다.(Table. 1) 24℃ 광조건에서 14일간 배양후 멸균수 1ml을 넣은 microtube에 포자형성이 가장 좋은 곳의 균사를 7mm cork borer를 이용하여 disk 1개를 취한 후 1시간동안 현탁한 후 Hemacytometer를 이용하여 포자수를 측정하였다

마. 분자수준의 분류체계 확립

1) 동위효소분석장치(IEF)를 이용한 분자수준의 분석

가) 곤충기생균 속 간의 동위효소 분석

분류를 위한 생화학적 방법으로 대상균주들에 대한 동위효소 양상을 조사하였다. 균주는 34균주를 사용하여 PDB에서 15일간 배양 한것으로부터 단백질을 추출하여 동위효소 분석을 위하여 Esterase, Acid phosphatase, Malate dehydrogenase를 사용하였다.

나) *Metarhizium*속, *Beauveria*속, *Cordyceps*속간의 동위효소 분석

본 연구를 위하여 우리 나라에서 자생하고있는 곤충기생균 *Metarhizium* spp. 5균주와, Brazil, France, India, Indonesia, Japan, Mexico, New Guinea, Poland, Philippines, Thailand, Western Samoa, USA등 12개국의 *Metarhizium*속균를 각 나라에서 분양 받고, 또 *Beauveria*속도 본 실험에 재료로 사용하였는데 10균주중 Canada, Spain 등 5개국과 우리 나라 자생균을 본 실험에 활용하였다.(Table 2,3) 배양조건으로 모든 균주는 PDA plate 상에서 접종한 것을 25℃에서 15일간 배양하고 지름 4mm cork borer를 사용하여 균총을 낸후 다시 현탁배양을 하였다. 현탁배양액은 SDB(sarbouraud dextrose broth) 배지에 접종한 후 25±2℃ 암상태에서 100rpm으로 7일간 배양하였다. 배양된 균의 단백질 추출을 위하여 100rpm에서 7일간 현탁배양한 균주를 1차 증류수로 2회 세척한 후 여과지로 잔여 증류수를 제거한 다음 cell을 얻기 위해서 4℃, 3000rpm, 15분간 원심분리 하여 균사체를 수거한 후 -70℃ 냉장고에 2일간 보관한 후 동결 건조한 다음 액체질소로 균사를 고르게 마쇄한 다음 3차 증류수를 0.1g/0.5ml 가한 다음 4℃, 12000rpm에서 30분간 원심 분리한 다음 상등액을 취하여 전기영동 시료로 사용하였다. 전기영동은 Stegmann방법을 변형한 등전점 전기영동(Isoelectric Focusing:IF)으로 동위효소를 분석하였고 6% polyacryamide에 phamalytes를 첨가하여 pH 범위를 조절한 다음 수평형 전기영동법으로 8cm x 23 cm x 0.6mm slab gel를 사용하였다. 동위효소 분석을 위하여 음극에는 (Ca(OH)₂) 포화용액, 양극에는 1M Phosphoric acid를 사용하여 100v에서 1시간 전기영동한후 약 3시간 동안 200-600v 범위에서 전기영동을 시행한 다음 표준염색법에 준하여 동위효소를 발색시켰다. Esterse(EST: E.C.3.1.1.1): 0.2M phosphate buffer pH7.0:100ml, a-naphtyl acetate 1.5g/100ml: 1ml, Fast blue RR salt 0.01g을 전기영동이 끝난 gel에 붓고 암상태 37℃ 항온기에서 발색될 때까지 유지하였다. Acid phosphatase(ACP: E.C.3.1.3.2): Na acetate buffer 50mM pH5.5:100ml, Mgcl₂6H₂O1M:1ml, Fast black K salt 100mg, B-Naphtylacid phospate1%:3ml, 을 전기영동이 끝난 gel에 붓고 암상태 37℃ 항온기에서 발색하였다.(Table 4, Fig.2)

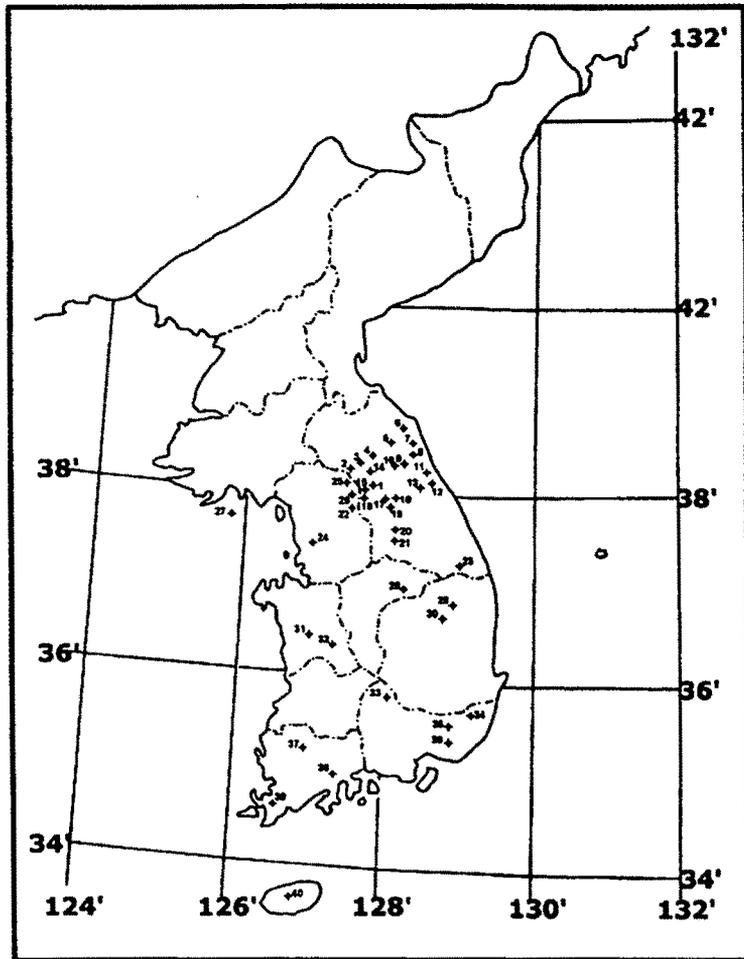


Fig. 1 . Map of 56 collecting areas

(1. Chuncheon KNU Ex. Farm, Bongmyung Ri, Chuncheon;Kangwon Nat'l Univ.,Chuncheon ;Hwupyung Dong, Chuncheon Sangbang Dong, Seo Myun, Chuncheon;Wonpyung Ri, Chuncheon ;Jungjok Ri, Chuncheon;Kamjung Ri, Chuncheon;Mt. Keumbyung, Chuncheon;Mt. Daeryong, Chuncheon:2. Jiam Ri, Chuncheon:3. Chugok, Buksan Myun, Chuncheon:4. Chungpyung temple, Buksan Myun, Chuncheon:5. Yongdae Ri, Yinje Kun:6. Mt. Sorak, Sokcho:Sinheung temple, Mt. Sorak, Sokcho:Osae, Mt. Sorak, Yinje Kun:7. Galcheon, Yangyang Kun:8. Guryongryung, Yangyang Kun:9. Mt. Odae, Pyungchang Kun:Sangwon temple, Mt. Odae, Pyungchang Kun:10. Wunduryung, Hongcheon Kun:11. Sokeumkang, Chunghak Dong,Kangneung ;12. Daekwalryung, Kangneung:13. Sambong Forest, Yinje Kun:14. Mt. Obong,Chuncheon:15. Mt. Samak, Chuncheon:16. Kangchon, Chuncheon:17. Mt. Kujoi, Dongsan Myun,Chuncheon:18. Chuljung, Hongcheon Kun :19. Hongcheon KNU Ex. Forest, Bukbang;Myun:Nae Myun,Hongcheon Kun:20. Chuneun temple, Wonju:21. Mt. Chiak, Wonju:22. Mt. Yongmaun, Yangpyung Kun:23. Mt. Taebaek, Taebaek:24. Suwon:25. Mt. Myungji, Kapyung Kun:26. Mt. Homyung, Kapyung Kun:27. Baekryung island, Kanghwa Kun:28. Mt. Wolak, Jecheon:29. Mt. Cheongryang, Bonghwa Kun:30. Pungcheon, Andong:31. Mt. Chilgap, Chungyang Kun:32. Mt. Kyuryong, Kongju:33. Haeyin temple, Keuchang Kun:34. Tongdo temple, Yangsan Kun:35. Samrangjin, Milyang:36. Kimhae:37. Kwangju:38. Songkwang temple, Mt. Chokye, Seungju Kun:39.Haenam

Table 1. 곤충기생균의 분생포자 형성 우수배지 선발을 위한 배지조성(PDA: Potato Dextrose Agar, CDA: Czapek -Dox Agar, MEA: Malt Yeast Agar, CMA: Corn Meal Agar, MCM: Mushroom Complete Medium, PPLO: PPLO Agar, MMM: Mushroom Minimal Medium, SDAY: Sabouraud Dextrose Yeast Agar, HMA: Hamada medium, DMEA: Dextrose Malt Yeast Agar, OA: Oatmeal Agar)

(단위 : g/1000ml)

배 지 조 성	PDA	MEA	MCM	MMM	HMA	OA	CZAP	CMA	PPLO	SDAY	DMEA
Beef Extract									50		
Dexrose	20		20	20	20					20	20
Ebiose					5						
FeSO ₄ 7H ₂ O							0.01				
Hyponex					3						
K ₂ HPO ₄			1	1			1				
KCl							0.5				
KH ₂ PO ₄			0.46	0.46							
Malt extract		20									20
MgSO ₄ · 7H ₂ O			0.5	0.5			0.5				
NaCl									5		
NaNO ₃							3				
Oat meal						75		30			
Peptone			2						10	5	
Potato	200										
Sugar				20			30				
Yeast extract		2	2		3					5	2
부엽토추출액											1 ℓ

Table 2. Isolates of *Metarhizium* species studied

No.	Code	Isolates	Origin	Host
1	396	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Wundulong	Walkingstick
2	835	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Mt. samak	Walkingstick
3	642	<i>Metarhizium</i> sp.	Mt. samak	Walkingstick
4	842	<i>Metarhizium anisopliae</i>	ARS	
5	843	<i>Metarhizium anisopliae</i>	ARS	
6	538	<i>M. anisopliae</i> var <i>anisopliae</i>	Thailand	Coleoptera
7	1448	<i>M. anisopliae</i> var <i>anisopliae</i>	Brazil	Hemiptera
8	1968	<i>M. anisopliae</i> var <i>anisopliae</i>	USA	Coleoptera
9	2106	<i>M. anisopliae</i> var <i>anisopliae</i>	indonesia	Homoptera
10	2156	<i>M. anisopliae</i> var <i>anisopliae</i>	Newguinea	Coleoptera
11	2231	<i>M. anisopliae</i> var <i>anisopliae</i>	India	Coleoptera
12	2469	<i>M. anisopliae</i> var <i>anisopliae</i>	Mexico	Coleoptera
13	3148	<i>M. anisopliae</i> var <i>anisopliae</i>	France	Coleoptera
14	3187	<i>M. anisopliae</i> var <i>anisopliae</i>	Philippines	Coleoptera
15	297	<i>M. anisopliae</i> var <i>majus</i>	Western Samoa	Coleoptera
16	978	<i>M. anisopliae</i> var <i>majus</i>	France	Coleoptera
17	1015	<i>M. anisopliae</i> var <i>majus</i>	Japan	Lepidoptera
18	1858	<i>M. anisopliae</i> var <i>majus</i>	Poland	Coleoptera
19	1859	<i>M. anisopliae</i> var <i>majus</i>	Poland	Coleoptera
20	1914	<i>M. anisopliae</i> var <i>majus</i>	Philippines	Coleoptera
21	1946	<i>M. anisopliae</i> var <i>majus</i>	Philippines	Coleoptera
22	3145	<i>M. anisopliae</i> var <i>majus</i>	France	Coleoptera

Table 3. Isolates of *Beauveria* species & *C. scarabaeicola* studied

No.	Code	Isolates	Origin	Host
1	251-1	<i>Cordyceps scarabaeicola</i>	Galchon	Gold bug
2	1092	<i>Cordyceps scarabaeicola</i>	Galchon	Gold bug
3	251	<i>Cordyceps scarabaeicola</i>	Galchon	Gold bug
4	829	<i>Beauveria</i> sp.	Baklim suenwon	Cicada
5	730	<i>Beauveria bassiana</i>	Brazil	Hymenoptera
6	149	<i>Beauveria bassiana</i>	France	Coleoptera
7	317	<i>Beauveria bassiana</i>	Mt. seolak	Larva
8	331	<i>Beauveria bassiana</i>	KNU Forest	Weevil
9	751	<i>Beauveria bassiana</i>	Vietnam	Coleoptera
10	886	<i>Beauveria bassiana</i>	Spain	Hemiptera
11	208	<i>Beauveria</i> sp.	Mt. Youngmun	
12	501	<i>Beauveria bassiana</i>	China	Lepidoptera
13	1017	<i>Beauveria bassiana</i>	Canada	Coleoptera

Table 4. Electrophoresis gel composition

Stocking solution	PAGIF 6% (ml)
1) Acry-Bis(30%T-3%C) 29.2-0.8g/100ml	6
2) Distilled water	21.6
3) Carrier Pharmalytes	1.2
4) TEMED 2.2ml/19.8ml	0.8
5) Ammonium Persulfates 0.1g/5ml	0.4
	Total 30.0

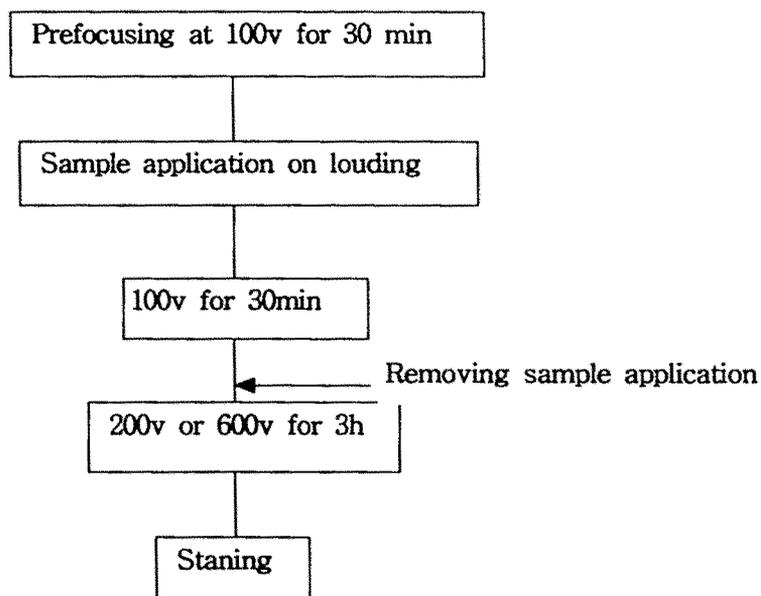


Fig. 2 Procedure of electrophoretic condition

2) PCR-RFLPs기법을 이용한 분자분류

가) PCR-RFLPs기법을 이용한 곤충기생균 유전적 지표탐색

본 실험에 사용한 균주로는 국내에서 수집한 3 균주와 미국 농무성으로부터 분양 받은 25 균주를 사용하였다.(Table 5) 배지로는 Sabouraud yeast (SDY)(40g dextrose, 10g peptone, 10g yeast extract, 15g agar, pH 6.5/L)를 사용하였으며 24℃에서 배양하였다. 균주들은 SDY agar 배지에서 24℃에서 3-7일간 배양하여 포자 형성이 일어나도록 하여, 멸균한 Tween 80 (0.005% in water)용액을 넣고 포자현탁액을 만들었다. 이를 SDY broth에 106 spores/ml로 접종하여 24℃에서 3일간 200 rpm으로 교반 배양하였으며 배양한 균사체로부터의 DNA분리는 Yoon과 Glawe의 방법에 따라 수행하였다. 배양이 끝난 균사체는 filter paper (Whatman No.1)와 vacuum filtration으로 수확한 후, 액체질소와 함께 막자사발로 고운 가루로 갈았다. 약 300mg을 500µl의 lysis buffer (50mM Tris-Cl, pH 7.2, 50mM EDTA, 3% SDS, 1% 2-mercaptoethanol)와 함께 1.5ml tube에 넣고 65℃에서 1시간동안 incubation한 후, 약 700µl의 chloroform/isoamyl alcohol (24:1)을 넣은 후 15분간 원심 분리하여 상층액을 취하였다. Isopropanol 400µl와 3M sodium acetate 40µl를 첨가하여 5분간 원심 분리한 후 DNA를 침전시켰다. 이를 70% ethanol로 씻어내고 말린 후 100µl의 RNase용액을 넣고 37℃에서 약 2시간 배양시켰다. 이 용액에 100mg의 CsCl를 첨가한 후 원심 분리하여 DNA를 재 회수하였다. DNA pellet을 100µl의 멸균 증류수에 녹인 후 λDNA를 이용하여 전기영동에서 정량 하였다. PCR 증폭과정으로 ITS와 28S rDNA 전반부위를 증폭하기 위하여 primer, ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') 과 LR3 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG AC-3')를 사용하였다. 총 28 균주들로부터 분리한 DNA를 대상으로 PCR 증폭하였다. PCR 반응은 10mM Tris-Cl (pH 8.8), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.001% gelatin, 0.1% Triton X-100, 100µM의 dNTPs (USB), 50pmol의 각각의 primer, 약 50ng의 genomic DNA, 2.5 units의 Taq DNA polymerase를 사용하였으며 멸균수를 사용하여 최종 반응용액 부피를 100 µl로 하였다. 또한, 사용된 균주로부터 증폭된 PCR 단편들과 오염에 의하여 증폭된 PCR 단편들을 구분하기 위하여 template DNA를 넣지 않은 반응용액을 함께 PCR 증폭시켰다. 수분의 증발을 방지하기 위하여 각 반응용액에 약 50 µl의 mineral oil을 첨가한 후 MJ Research DNA thermal cycler (Model PTC-100-60)에서 PCR 반응을 하였다. PCR 반응은 94℃에서 5

분간 predenaturation한 후 94℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 1분간하는 cycle을 35회 반복하였고 마지막으로 72℃에서 4분간 extension을 하였다. 증폭된 DNA 단편들을 0.8% agarose gel (Sigma)에서 100 bp DNA ladder와 함께 전기영동으로 분리한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV transilluminator에서 Polaroid camera(Model DS-34, black and whit film (Type 667, Polaroid Corp.))를 이용하여 촬영하였다. PCR 증폭된 단편들에 대해서 12종의 제한효소(HaeIII, AluI, HpaII, CfoI, Hsp92II, MboI, RsaI, TaqI, Tru9I, EcorI, and EcorV) 각각을 Promega Biotech의 방법에 의하여 처리하였다. 제한효소에 의하여 절단된 DNA단편들을 3% agarose gel (2.25% FMC NuSieve GTG agarose and 1.75% Seakem GTG agarose)에서 100bp DNA ladder와 함께 전기영동으로 분리한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV transilluminator에서 Polaroid camera(Model DS-34, black and whit film (Type 667, Polaroid Corp.))를 이용하여 촬영하였다.

Table 5. Isolates of *Metarhizium anisopliae* used for this study (a. Obtained from Department of Agricultural biology, Kangwon national university, b. Obtained from Dr. Richard A. Humber, ARSEF. Plant Protection Research Unit U.S Plant, Soil & Nutrition Laboratory

Isolate	host	Origin
<i>M. anisopliae</i>		
C 396	<i>Walkingstick</i>	Korea
C 835	<i>Walkingstick</i>	Korea
C 642	<i>Walkingstick</i>	Korea
<i>M. anisopliae</i> var.<i>anisopliae</i>		
ARSEF 538	<i>Oryctes rhinoceros</i> (Coleoptera) ^b	Thailnad
ARSEF 1448	<i>Scaptores castanea</i> (Hemiptera)	Brazil
ARSEF 1968	<i>Strigoderma arboricola</i> (Coleoptera)	USA
ARSEF 2080	<i>Nilaparvata lugens</i> (Homoptera)	Indonesia
ARSEF 2106	<i>Nephotettix virescens</i> (Homoptera)	Indonesia
ARSEF 2140	Larva (Lepidoptera)	Canada
ARSEF 2156	<i>Oryctes sp</i> (Coleoptera)	New Guinea
ARSEF 2231	<i>Zygogramma bicolorata</i> (Coleoptera)	India
ARSEF 2469	Larva (Coleoptera)	Mexico
ARSEF 2974	<i>Aedes crinifer</i> (Diptera)	Argentina
ARSEF 3148	<i>Haphochelus marginalis</i> (Coleoptera)	France
ARSEF 3187	<i>Tenebria molitor</i> (Coleoptera)	Philippines
ARSEF 3329	<i>Popillia japonica</i> (Coleoptera)	Portugal
<i>M. anisopliae</i> var. <i>majus</i>		
ARSEF 297	<i>Xyloryctes jamaicensis</i> (Coleoptera)	Western Samo
ARSEF 298	<i>Xyloryctes jamaicensis</i> (Coleoptera)	Western Samo
ARSEF 978	<i>Oryctes rhinoceros</i> (Coleoptera)	France
ARSEF 988	<i>Bombyx mori</i> (Lepidoptera)	Japan
ARSEF 1015	<i>Bombyx mori</i> (Lepidoptera)	Japan
ARSEF 1092	Soil	Japan
ARSEF 1858	Coleoptera	Poland
ARSEF 1859	Coleoptera	Poland
ARSEF 1914	<i>Oryctes sp</i> (Coleoptera)	Philippines
ARSEF 1946	<i>Oryctes rhinoceros</i> (Coleoptera)	Philippines
ARSEF 2151	<i>Oryctes rhinoceros</i> (Coleoptera)	Indonesia
ARSEF 3145	<i>Oryctes rhinoceros</i> (Coleoptera)	France

나) PCR-RFLPs기법을 이용한 *Beauveria*속균의 분자 분류

미생물 살충제재로 전세계적으로 사용되고 있는 백강균(*Beauveria bassiana*)의 균주간의 유전적 변이를 관찰하기 위하여 국내에서 수집되어 *Beauveria bassiana*으로 동정된 14균주(C-208, 829, 317, 331, 332, 149, 152, 501, 505, 566, 730, 751, 886, 1017)와 미국 농무성(USDA)에서 분양받은 4균주(C-290, 291, 292, 294)를 대상으로 하였다. *Beauveria*속균의 분류에 있어서 포자의 형태적구조는 분류에 있어서 상당히 중요하며 그 종간의 경계가 분류에 어려움이 있으므로 ribosomal DNA내의 ITS(internal transcribed spacer)지역을 대상으로 접근을 하였다. PCR증폭과정으로 ribosomal DNA내의 ITS와 28S rDNA 전반부위를 증폭시키기 위하여 primer, ITS1(5'-TCC GTA GGT GAA GCG G-3')과 LR3(5'-GGT CCG TGT TTC AAG AC-3')을 사용하였고 PCR증폭 후 확인된 DNA산물에 절단 인식부위를 가지고 있는 제한효소를 선별하기 위해 CfoI, Hsp92II, AluI, TaqI, MboI, RsaI, HaeIII, HpaII 총 8종의 제한효소를 사용하였다.

3) 염기서열 분석을 통한 *Metarhizium anisopliae*의 종내 변이주간의 분류

녹강균(*Metarhizium anisopliae*)은 백강균(*Beauveria bassiana*)과 함께 전세계적으로 미생물 살충제재로 사용되고 있는 곰팡이로 많은 변종을 가지고 있으며 그 형태적 다양성으로 인하여 분류에 어려움을 주고 있는 종이다. 기존의 PCR-RFLPs를 통한 *Metarhizium*속균의 변이주간의 분석을 보완하고 형태적인 변이가 심하여 변종으로의 분류를 어렵게 하는 *Metarhizium*속 균주의 정확한 동정을 위하여 수행하였다. 공시 균주로는 미국농무성에서 분양받은 *Metarhizium anisopliae* 12균주와 국내에서 채집된 *M. anisopliae* 2균주 그리고 비교그룹으로 *Cordyceps scarabaeicola* 1균주와 *Beauveria bassiana* 1균주를 대상으로 하였다. (Table 6) 배양된 균주로부터 DNA를 추출하여 염기서열 분석을 위하여 ribosomal DNA내의 ITS I, ITSII(internal transcribed spacer)지역을 대상으로 하였다. PCR증폭과정으로 ribosomal DNA내의 17S와 25S rDNA 전반부위를 증폭시키기 위하여 primer, ITS1(5'-TCC GTA GGT GAA OCT GCG G-3')과 ITS4(5'-TTC TTC GCT TAT TGA TAT GC-3')을 사용하였다. (Figure 3) 다음으로 증폭된 단편의 ITS I, II 지역을 pGEM-T벡터에 Cloning하였다. Cloning유무를 확인하기 위하여 제한 효소 Ecor I 을 사용하여 절단하였다. Cloning유무를 확인한 후 이것을

이용하여 nucleotide sequencing을 수행하였다. 또한 Sequencing데이터를 이용한 유사집단 수렴을 위하여 Mapmaker program을 이용하여 ITS I, II 지역의 염기서열을 바탕으로 한 유사도표를 작성하였다.

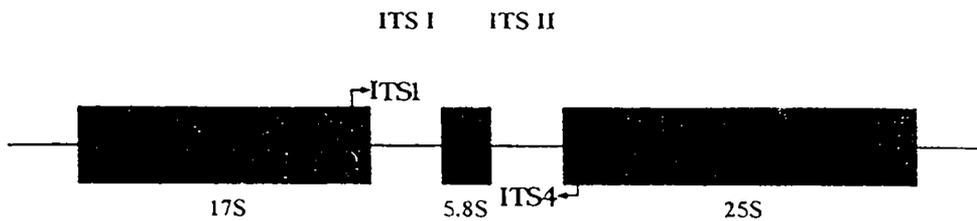


Fig. 3 Primer sites used in amplification of the ITS in the repetitive rDNA of Genus *Metarhizium*. To amplify the ITS region, the following two oligonucleotides were synthesized and used

ITS1 : 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'

ITS4 : 5'-TTC TTC GCT TAT TGA TAT GC-3'

Table 6. Isolates of *Metarhizium anisopliae* used for ITS region sequencing analysis

Isolate	Host	Origin
<i>M. anisopliae</i>		
C-835	Walking stick	Korea(Mt.Samak)
C-642	Walking stick	Korea(Mt.Samak)
	Coleoptera	Thailand
C-842	Hemiptera	Brasil
C-843		
<i>M. anisopliae</i>		
<i>var. anisopliae</i>	<i>Oryctes rhinoceros</i> ; Coleoptera	Thailand
ARSEF 538	<i>Scaptorea castanea</i> ; Hemiptera	Brasil
ARSEF 1448	<i>Oryctes</i> ; Coleoptera	New Guinea
ARSEF 2156	<i>Zygogramma bicolorata</i> ; Coleoptera	India
ARSEF 2231	<i>Haphochelus marginalis</i> ; Coleoptera	France
ARSEF 3148		
<i>M. anisopliae</i>		
<i>var. anisopliae</i>	<i>Xyloryctes jamaicensis</i> ; Coleoptera	Western Samoa
ARSEF 297	<i>Oryctes rhinoceros</i> ; Coleoptera	Western Samoa
ARSEF 978	<i>Bombyx mori</i> ; Lepidoptera	Japan
ARSEF 1015	<i>Oryctes</i> sp.; Coleoptera	Philippines
ARSEF 1914	<i>Oryctes rhinoceros</i> ; Coleoptera	France
ARSEF 3145	Scarabaeidae; Scarabaeidae	Korea(Galcheon)
C-1092	Othoptera; Hymenoptera	Brasil
C-730		

3. 균주의 장기보존법 개발

가. 동결건조를 이용한 보존방법 개발

균사체가 배양된 앰플을 skim milk 12%와 혼합 후 -20°C 까지 분당 -1°C 로 냉동 후 -70°C 까지 급속 동결 후 동결건조를 한후 진공상에서 앰플을 용봉 후 1개의 앰플을 재생하여 생존 유무를 판단하였다. 시험한 방법은 앰플에 PD $300\mu\text{l}$ 를 넣고 균사의 현탁액 $100\mu\text{l}$ 접종하여 2주간 배양하였다. 이 배양액에 Skim milk 12%인 $300\mu\text{l}$ 를 첨가하여 -20°C 까지 동결($-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$)시킨 후 바로 -70°C 로 냉각시킨다. 이것을 건조시키기 위하여 동결건조기를 이용하여 건조시킨후 진공상태에서 용봉하고 진공도를 측정후 재생시험하였다.

나. 진공건조를 이용한 보존방법 개발

앰플내의 고체배지상에 배양된 균사체를 냉각 및 동결 없이 진공상태에서 건조 후 진공상에서 용봉 후 재생하여 생존 유무를 판단하였다. 그방법으로 앰플에 PDA $300\mu\text{l}$ 를 넣고 균사 현탁액을 $100\mu\text{l}$ 접종시켜 2주간 배양한 후 진공상태에서 건조시킨 후 용봉하여 진공도를 측정하고 재생시험하였다.

제3절 결과 및 고찰

1. 곤충기생균의 수집과 분리

가. 곤충기생균 유용유전자원 수집 및 분리동정

본 연구 수행중 수집된 곤충기생균은 전국 56개 채집지역에서 약 11속 67종 1795개체를 수집하였다. (Fig. 4) 채집된 곤충기생균은 1785개체가 곤충류를 기주로하고 있었으며 10개체는 거미류를 기주로 하고 있었다. 불완전균류중 대표적인 *B. bassiana*는 1997년의 경우 6월에서 이듬해 1월까지 전국 29개 지역에 걸쳐 319개체가 채집되었고 홍천군 북방면에서 164개체로 집중적으로 다수 채집되었다. 기주는 Coleoptera, Othoptera, Homoptera를 비롯한 13개 곤충 목과 1개의 다족류문의 광범위한 기주범위를 가지고 있었으며 Coleoptera목 내에도 *Cerambycidae*, *Chrysomelidae*, *Curculionidae*를 비롯한 14개 곤충과를 기주로 갖는 것으로 조사되었다. (Fig. 5, 6) 춘천군 원평리, 강원도 홍천군 북방면, 경기도 양평군 용문산 일대에서는 딱정벌레목, 메뚜기목, 매미목에 걸쳐 동일 지역에서 집단사한 모습이 발견되었다. 채집된 표본들을 조사한 결과 모두 *B. bassiana*로 동정되었다. *M. anisopliae*의 경우 춘천근교에서 대벌레, 혹은 인시목의 유충을 기주로 51개체가 채집되었으며 *Paecilomyces*속은 전역에 걸쳐 한국명 눈꽃동충하초인 *P. tenuipes*가 255개체로 가장 많이 채집 되었는데 국내에는 *P. tenuipes* 255개체, *P. farinosus* 57개체, *P. amoenoroseus* 1개체, *P. fumoroseus* 5개체로 4종이 주로 분포하는 것으로 조사되었다. 10년간의 데이터베이스를 근거로 하여 *Paecilomyces*속의 국내 우점종인 *P. tenuipes*와 *P. farinosus*의 시기별 분포를 조사한 결과 다른 종에 비하여 넓은 발생양상을 갖는 것으로 조사되었다. (Fig. 5, 6) 곤충기생균의 완전세대를 형성하는 동충하초의 자실체에 주로 기생하며 두부에 구형의 포자 덩어리를 형성하는 *Polycephalomyces*속균의 경우 34개체가 채집되었으며 *P. ramosus* 33개체, *P. cylindroporus* 1개체로 동정되었다. 또한 그 시기별의 분포양상은 기주가 되는 *Cordyceps*속균의 분포양상과 밀접한 관련이 있음을 알 수 있었다. (Fig. 7, 8) 그 밖에 *Hirsutella*속으로 *H. clavulata*, *H. clvispora*를 비롯하여 5개체가, *Verticillium*속으로 *V. indicum*, *V. lecanii*를 비롯하여 3개체가 채집되었고 *Nomuraea*속으로 *N. rileyi* 1개체 채집되는 등 총 37종이 본 연구수행과정 중에 새

롭게 조사되었다.

채집된 곤충기생균의 분리를 위한 선택배지 개발결과로 타 곰팡이에 의한 배지 오염을 막아주는 위한 첨가제의 농도로는 200mg의 CuSO_4 를 첨가하였을 때 *Cordyceps* 속을 비롯한 다른 불완전세대형의 선택적 분리가 가능하였고 세균에 의한 배지오염을 막아주는 방법으로 보통 penicillin이나 streptomycin을 사용하나 고온에 약한 단점이 있으므로 고압살균이 가능한 gentamicin을 사용하였다. (Fig. 9) 세균과 곰팡이에 대한 배지의 오염율을 각 배지별로 살펴보면 SDAY에 gentamicin을 첨가한 배지는 6%의 오염율을 가짐으로써 타배지의 오염율에 비해 세균의 오염이 현저히 낮았으나 곰팡이에 대한 오염율이 25%로 높았고 SDAY에 Cu를 첨가한 배지는 4%의 곰팡이 오염율을 가짐으로써 타배지의 오염율에 비해 현저히 낮았으나 세균에 대한 오염율이 23%로 높았다. SDAY에 CuSO_4 와 gentamicin을 첨가한 배지는 세균과 곰팡이 오염으로부터 각각 3%, 8%의 오염율을 가지므로써 최적의 곤충기생균 분리용 선택배지로 채택할 수 있었다. (Fig. 10)

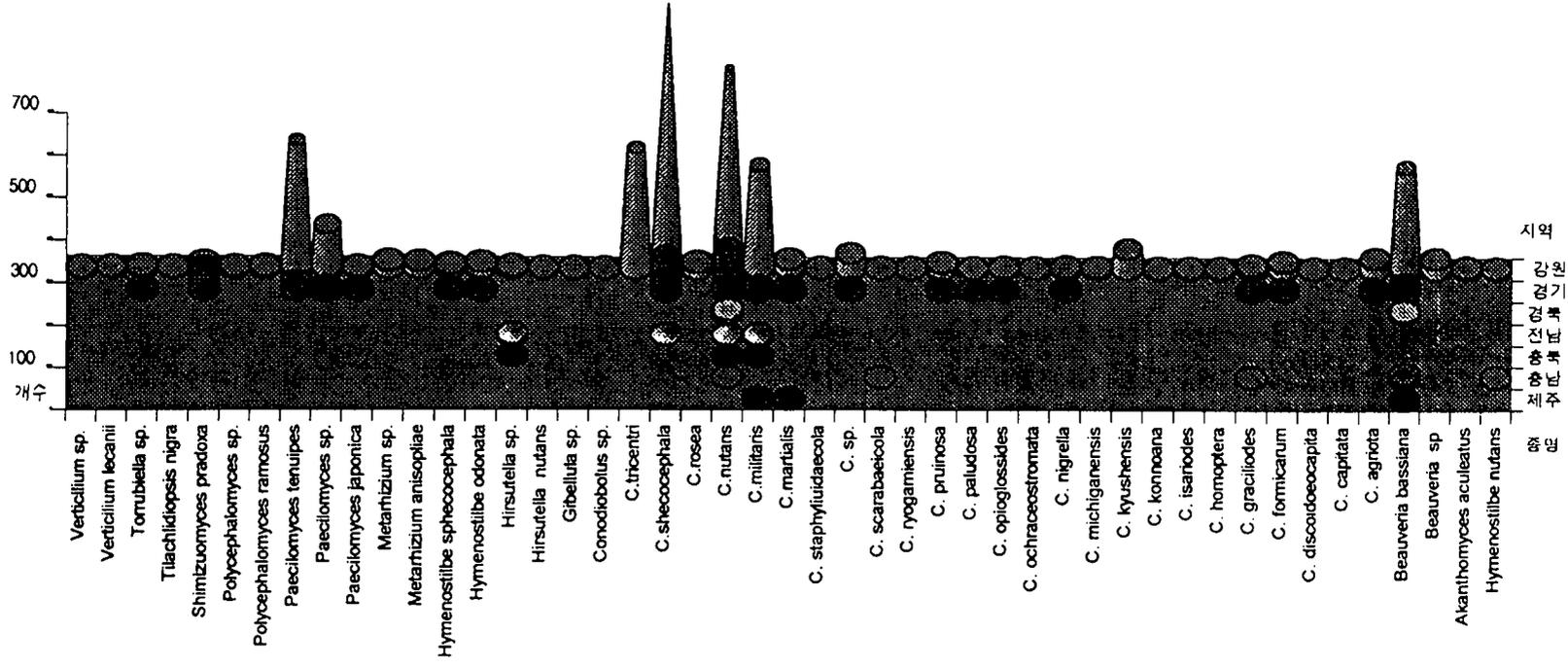


Fig. 4. 강원도 핵 중심에 위치한 한국산 애향하초 및 전충기생균의 지역적 분포상과 분포우위의 종

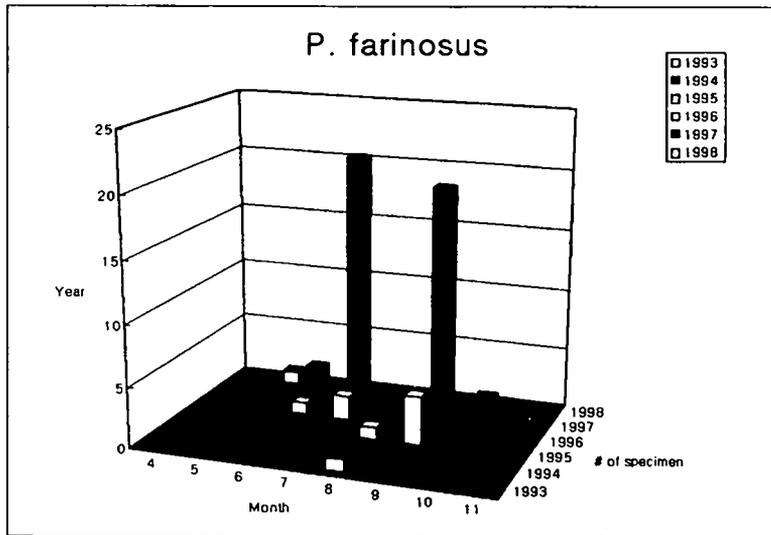


Fig. 5 Annual & Seasoning occurrence of *Paecilomyces farinosus*

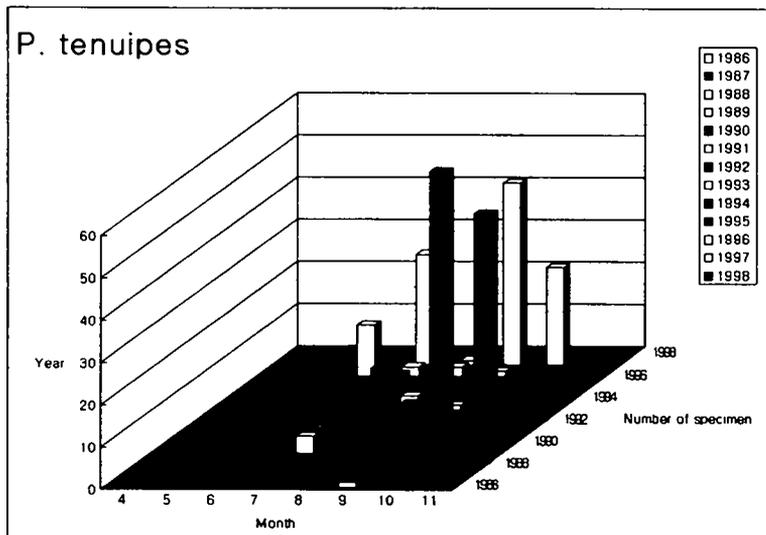


Fig. 5 Annual & Seasoning occurrence of *Paecilomyces tenuipes*

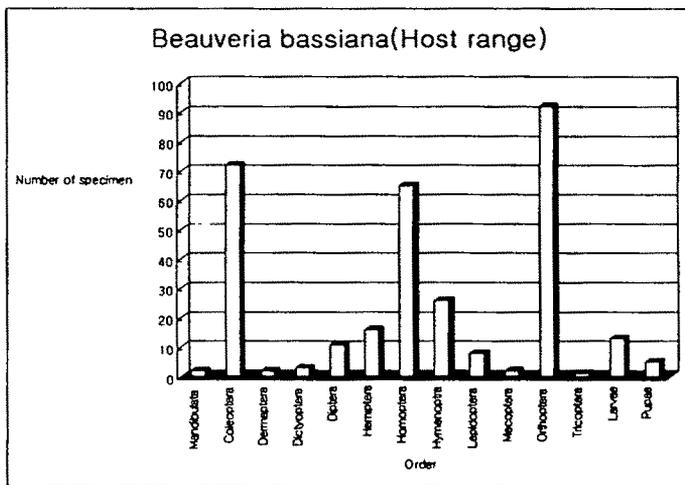


Fig. 6 Host range of *Beauveria bassiana*

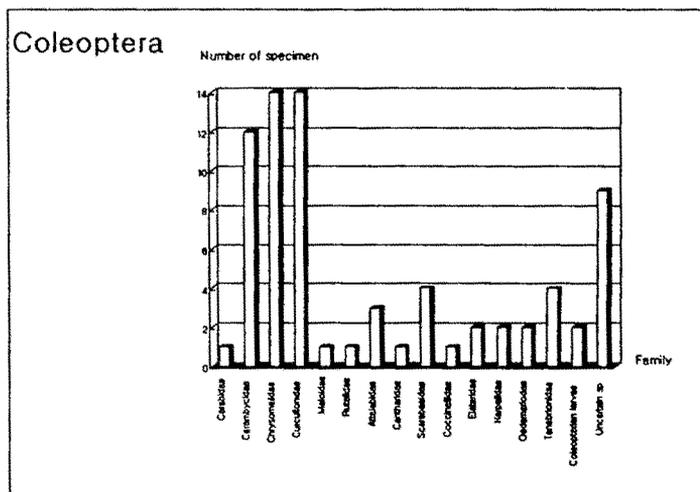


Fig. 6 Coleopteran Host range of *Beauveria bassiana*

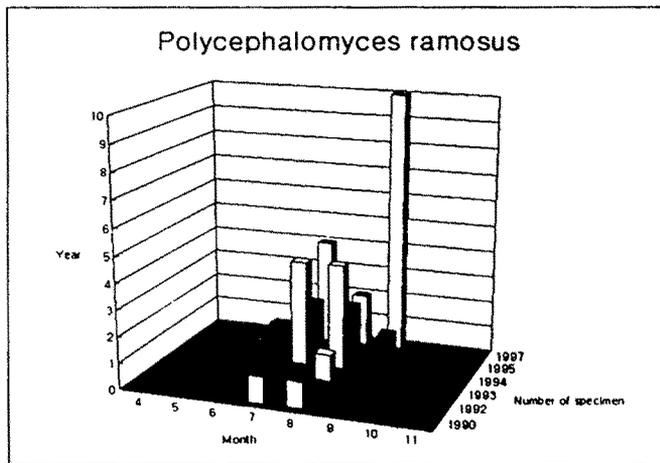


Fig. 7 Annual & Seasoning occurrence of *Polycephalomyces ramosus*

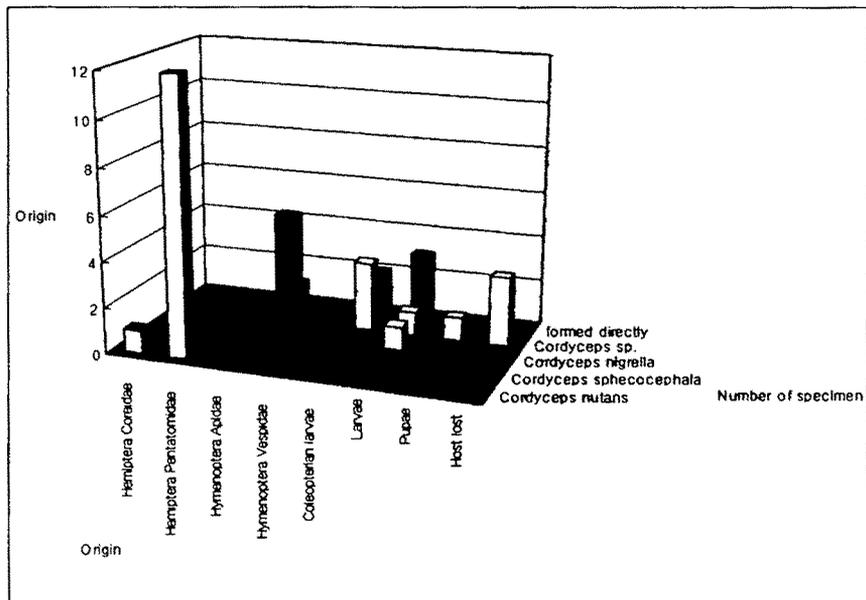


Fig. 8 Host range of *Polycephalomyces ramosus*

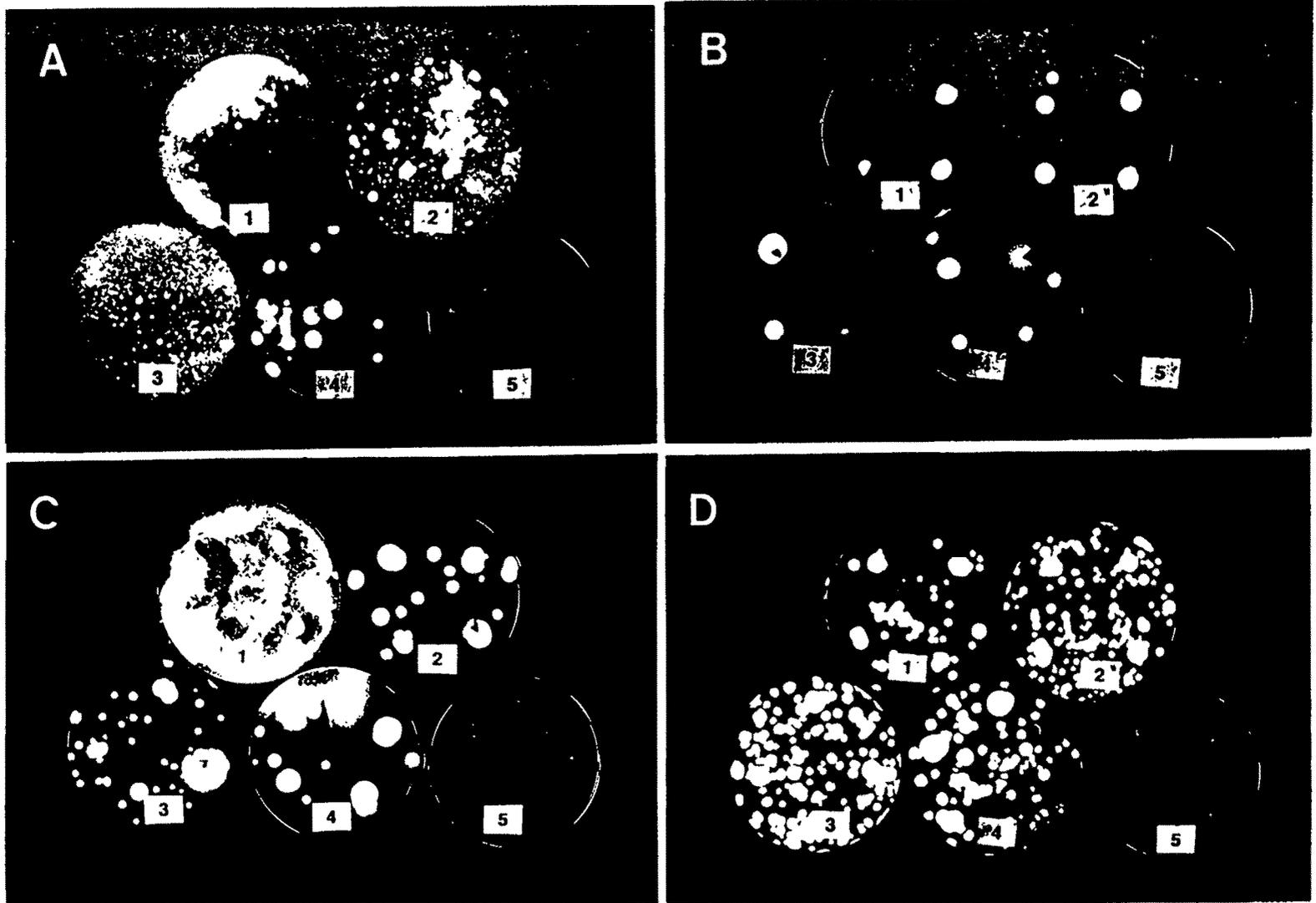
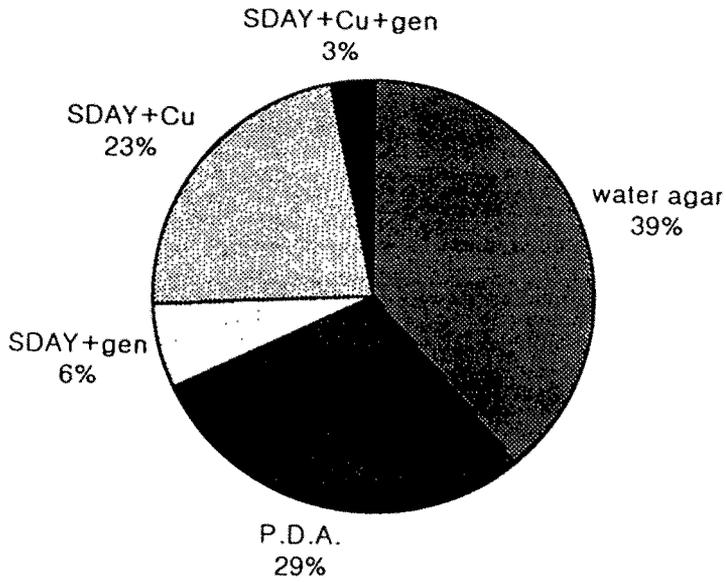


Fig. 9 채집된 곤충기생균의 효율적 분리를 위한 선택배지 개발 시험 A. *Paecilomyces tenuipes*(KNU1601), B. *Cordyceps bifusispora*(KNU1602), C. *Beauveria bassiana*(KNU1622), D. *Beauveria bassiana*(KNU1625) (1.gen, 2.gen+Cu, 3.Cu, 4.PDA, 5.WA)

세균에 대한 각 배지의 오염률



곰팡이에 의한 각 배지의 오염률

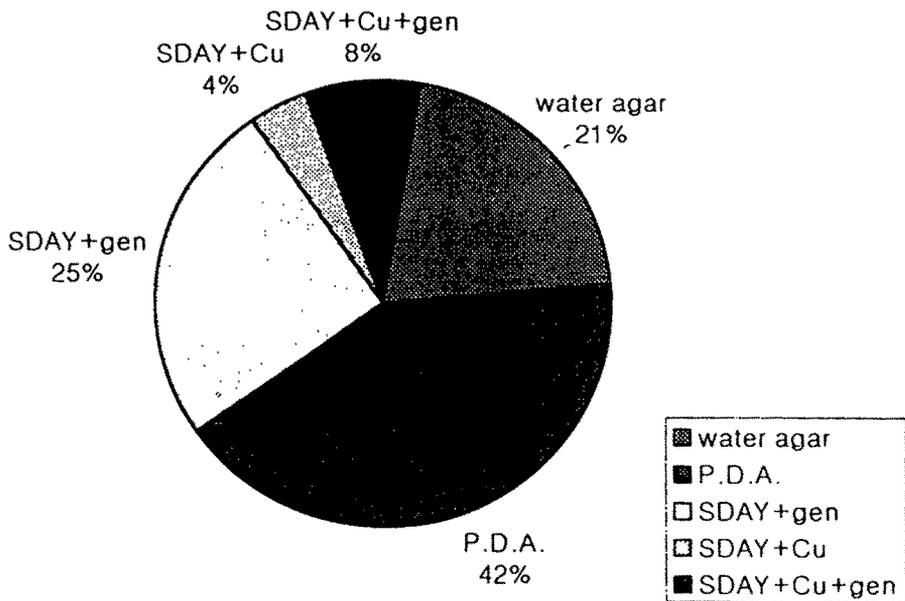


Fig. 10 세균과 곰팡이 오염원에 의한 공시배지의 오염률

2. 채집된 곤충기생균의 분류, 동정 및 생리 실험

가. 채집된 곤충기생균의 분류동정

1) 미세구조적 형태학상의 특성에 따른 분류

가) 다양한 곤충기생균의 미세구조적 특징

채집된 균을 동정한 결과 곤충기생균은 다양한 속에 걸쳐 발생하였는데 *Cordyceps* 균의 불완전세대를 관찰해 본 결과 대표적으로 *Paecilomyces*, *Beauveria*, *Hirsutella*, *Verticillium*, *Hymenostilbe*, *Akanthomyces* 등의 속에 관련되어 있는 것으로 분류 동정되었다.(Fig. 11, 13, , 16, 17, 18)

나) *Verticillium*속의 불완전세대를 갖는 *Cordyceps*속균

*Verticillium*속은 분생자병이 영양균사체와 구분되지 않으며 분생포자형성세포는 단생하거나 나선형으로 균사상에 부착되어 있다. 분생포자형성세포의 옆이나 끝에 2개에서 6개의 분생포자를 형성하며 분생포자는 무색이고 단세포이며 끈끈한 점액으로 둘러싸여져 있는 형태적 특징을 가지고 있는데 *C. militaris*, *C. kyushuensis*, *C. roseostromata*, *C. martialis*에서 *Verticillium*속의 불완전세대가 관찰되어 하나의 형태학적 분류군으로 묶을 수 있었으나 주사전자현미경 관찰에서 미세한 형태적인 차이를 발견할 수 있었다. 분자생물학적 연구가 요구된다.(Fig. 12, 15, 16;G,H)

다) *Beauveria*, *Metarhizium*속균의 형태학적 고찰

*Beauveria*속균중 *B. caledonica*(C1044), *B. brongniartii*(C1043), *B. velata*(C1045), *B. bassiana*(C331)등 4종과 *Metarhizium* 4종을 주사전자현미경을 이용하여 그 형태적 특징을 관찰한 결과 *Beauveria*속은 기부가 등글거나 플라스크모양이고 이빨모양의 분생자병을 만드는 특성을 가지고 있었다. *Beauveria bassiana*의 분생포자는 공모양이거나 반구형, 직경 3.5 μ m이하 이었다. *B. brongniartii*는 포자가 긴 난형으로 실린더 형, 직경 2.5-4.5 μ m였다. *B. velata*는 SEM검경 결과 포자에 주름이 있고 젤라틴 같은 물질로 덮여 있었다. *B. caledonica*는 타원형에서 원통형의 분생포자를 일정한 각을 만들면서 형성하였다.(Fig. 14, 17, 18)

라) *Metarhizium*속균의 형태적 특성

균사체는 스펀지모양이고 분생자경은 뭉뭉하게 clump을 이루며 들어서 있다. 흔히 촛대모양으로 분생포자 형성세포는 그 끝이 둥글다. 색은 녹색에서, 올리브색, 노란색에 이르기까지 다양하다. 이 속의 종은 포자의 형태와 그 크기에 따라 종과 변종을 구분한다. *M. anisopliae* var. *anisopliae*의 분생포자는 $9\mu\text{m}$ 이하이며 길고 분생포자 형성세포는 끝이 둥글다. *M. anisopliae* var. *majus*는 분생포자가 $11\mu\text{m}$ 이하이고 기주가 흔히 풍덩이류이다. *M. flavoviride*는 분생포자가 회녹색으로 난형이고 $7-11\mu\text{m}$ 의 범위를 갖는다. 분생자병은 방망이모양으로 타원형이다. (Fig. 20) 채집된 *Metarhizium*속군은 51개체로 대벌레와 인시목의 유충을 기주로 하였는데 모두 *M. anisopliae* var. *anisopliae*로 동정되었으며 춘천시 감정리, 강원도 홍천군, 춘천시 봉명리, 삼악산, 춘천시 원평리 등지에서 주로 8, 9월에 걸쳐 채집되었다.

마) *Cordyceps sphecocephala*에 대한 형태적 특성 및 불완전세대와의 관계

지난 10년간 가장 많이 채집된 국내 곤충기생균중 우월종인 *C. sphecocephala*의 광학현미경과 SEM검경을 통하여 이종은 *C. oxycephala*와 형태적 분류에 있어서 동일한 종으로 취급되어 지기도 하고 다른 종으로 나누어 지기도 하는데 배양배지상에서는 포자를 형성함으로써 불완전세대를 형성하지 않고 *Cordyceps*와 같은 혁질의 자루를 길게 만들어 *Hymenostilbe*속의 불완전세대를 형성한다. 그러나 일반적인 *Hymenostilbe*속군과는 달리 분생자병에 돌기를 갖지 않는 것이 특징이다. 분류학상 *C. nutans*, *C. formicarum*, *C. tricentri*와 근연의 그룹으로 추측되는데 주사전자현미경 검경 결과 분생포자 및 분생자병의 형태, 크기에서 차이를 발견할 수 있었다. (Fig. 19)

바) *Cordyceps* 속군과 *Beauveria*속군간의 관계

본 연구과제 수행을 통하여 *C. scarabaeicola*(C251, C252, C1092)이 *Beauveria*속의 불완전세대를 갖는다는 사실을 증명하였고 SEM검경을 통하여 *Beauveria*속군의 형태적인 다형화현상을 관찰할 수 있었다. 또한 *B. bassiana*집단을 조사한 결과 분생포자의 크기는 $3.5\mu\text{m}$ 이하로 형태는 광학현미경 검경시 globose, subglobose, discoid형의 그룹과 혈구형의 두가지 형으로 관찰되어지나 혈구형 포자의 존재는 임계점 건조로 인한 형태적인 변이에 기인한 것으로 사료된다. 또한 *C. staphylindaecola*

(C783)의 경우 *Beuveria*속균의 불완전세대를 갖는 것으로 밝혀졌다. 이는 *B. brongniartii*에 이어 새로운 *Beuveria*속균의 완전세대형으로 최초로 보고 되었다. (Fig. 21)

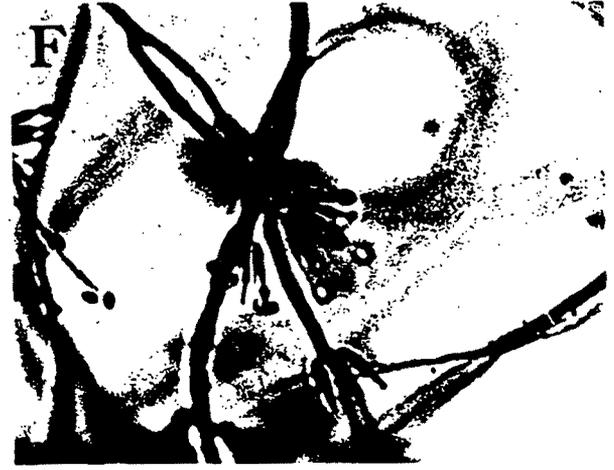
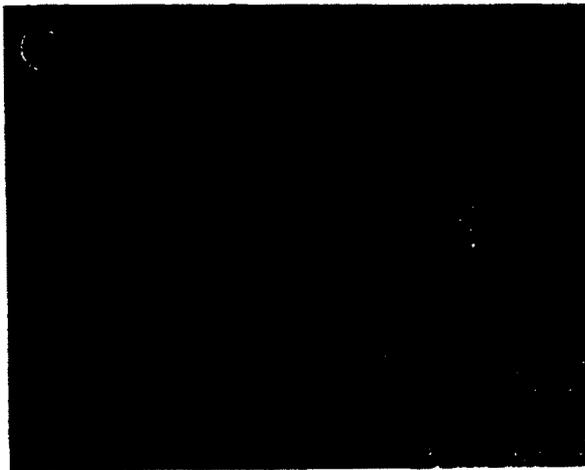
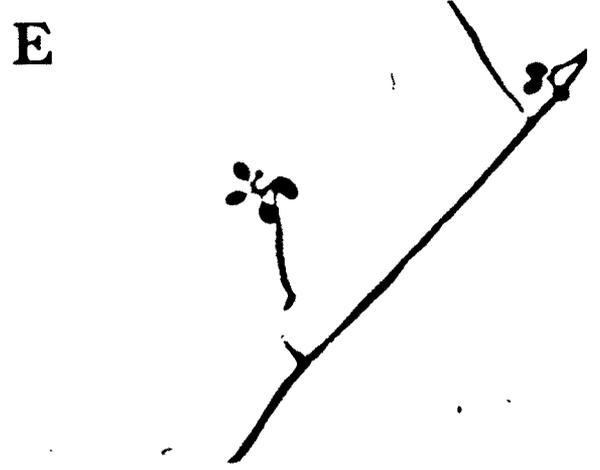
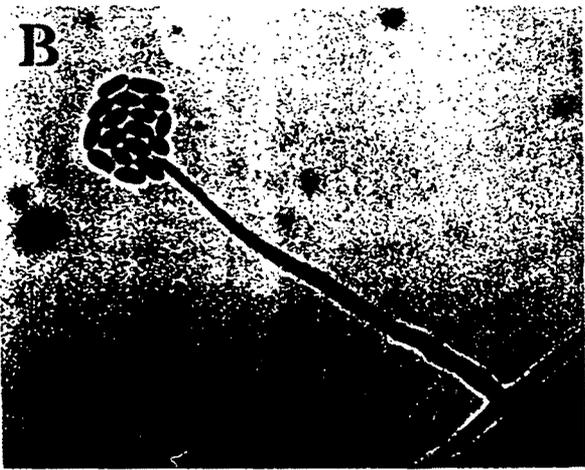
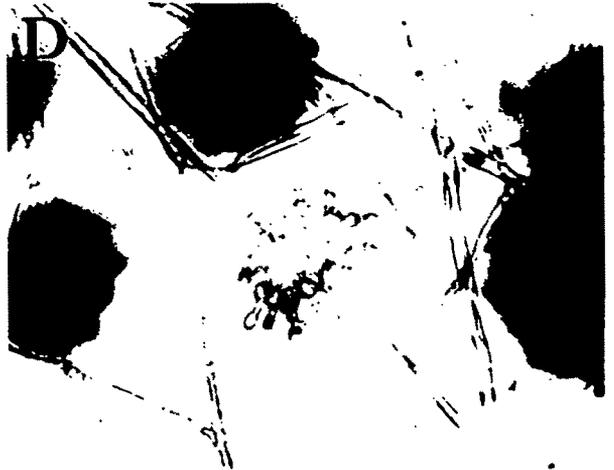
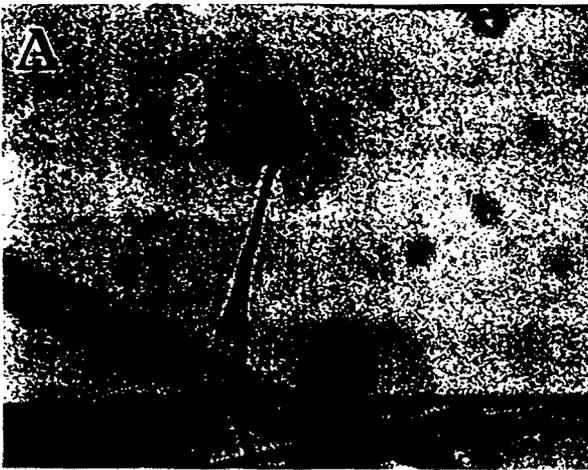


Fig. 11 곤충기생균의 다양한 모습 A. *Hirsutella rhossiliensis* (KNU1048), B. *Acremonium berkelyanum* (KNU1040), C. *Verticillium fusisporum* (KNU1062), D. *Beauveria brongniartii*. (KNU1043), E. *Beauveria bassiana* (KNU1495), F. *Paecilomyces tenuipes* (KNU757) Mag 1000×

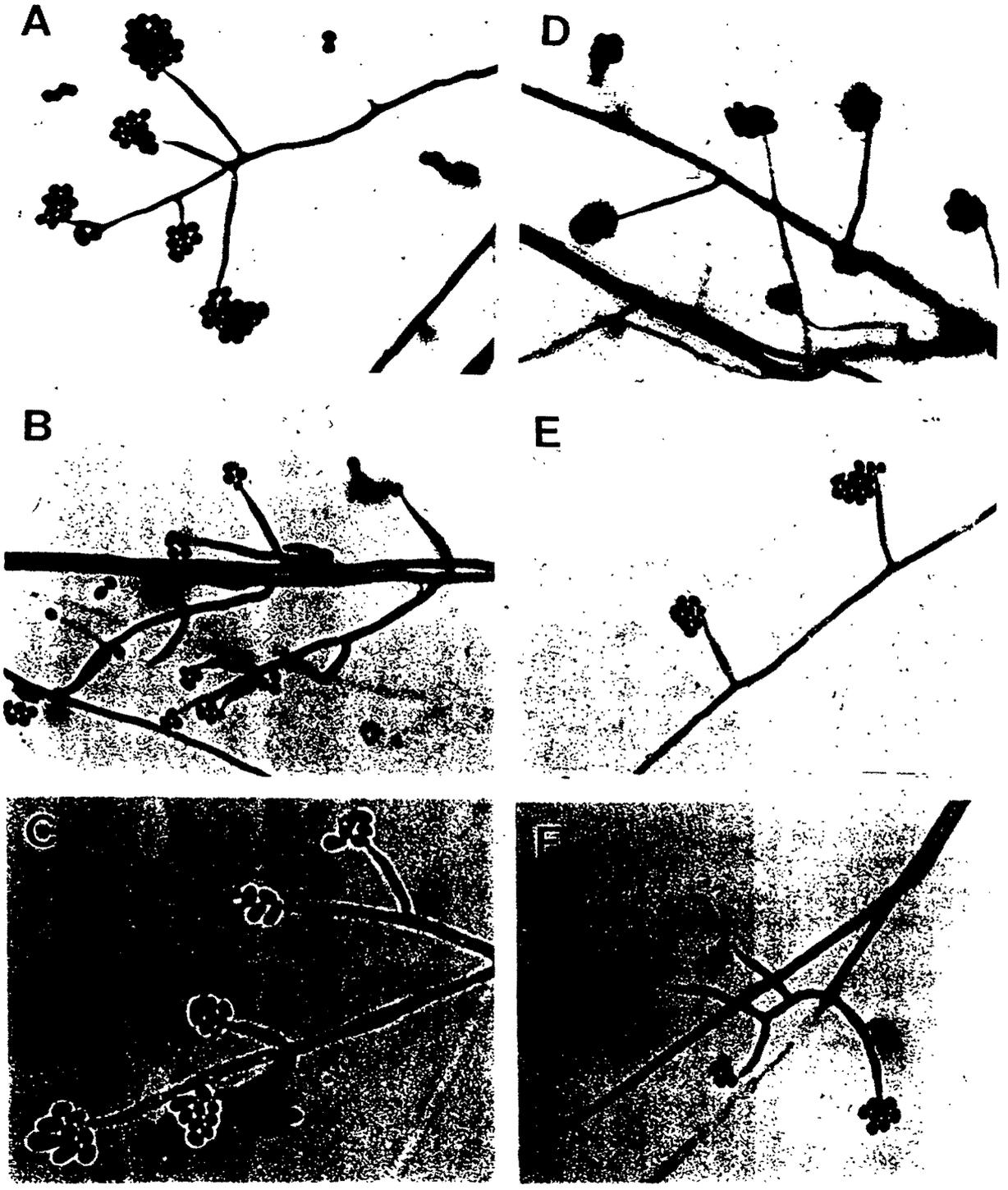


Fig. 12 Verticillium속의 형태적 특징을 갖는 Cordyceps속군의 Anamorph A. *C. militaris* (KNU1281), B. *C. kyushuensis* (KNU133), C. *C. roseostromata* (KNU228), D. *C. sp.*(KNU1192), E. *C. kyushuensis* (KNU133), F. *C. matialis* (KNU1283) · Mag 1000×

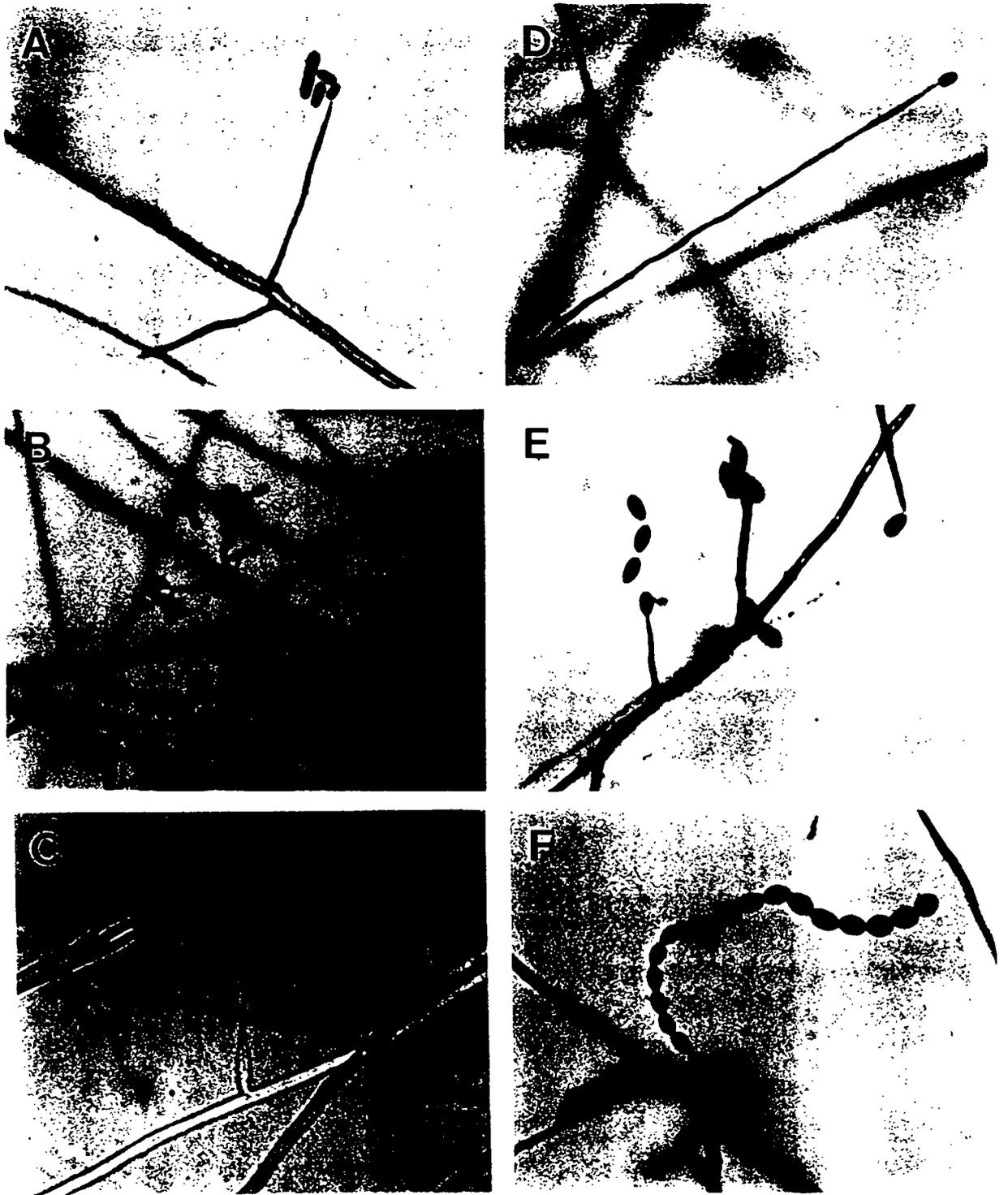


Fig. 13 Cordyceps속군의 다양한 불완전 세대형 A. *C. pruinosa* (KNU628), B. *C. scarabaeicola* (KNU252), C. *C. agriota* (KNU550), D. *C. opioglossoides* (KNU735), E. *C. sp.* (KNU1451), F. *C. ochraceostromata* (KNU535) Mag 1000×

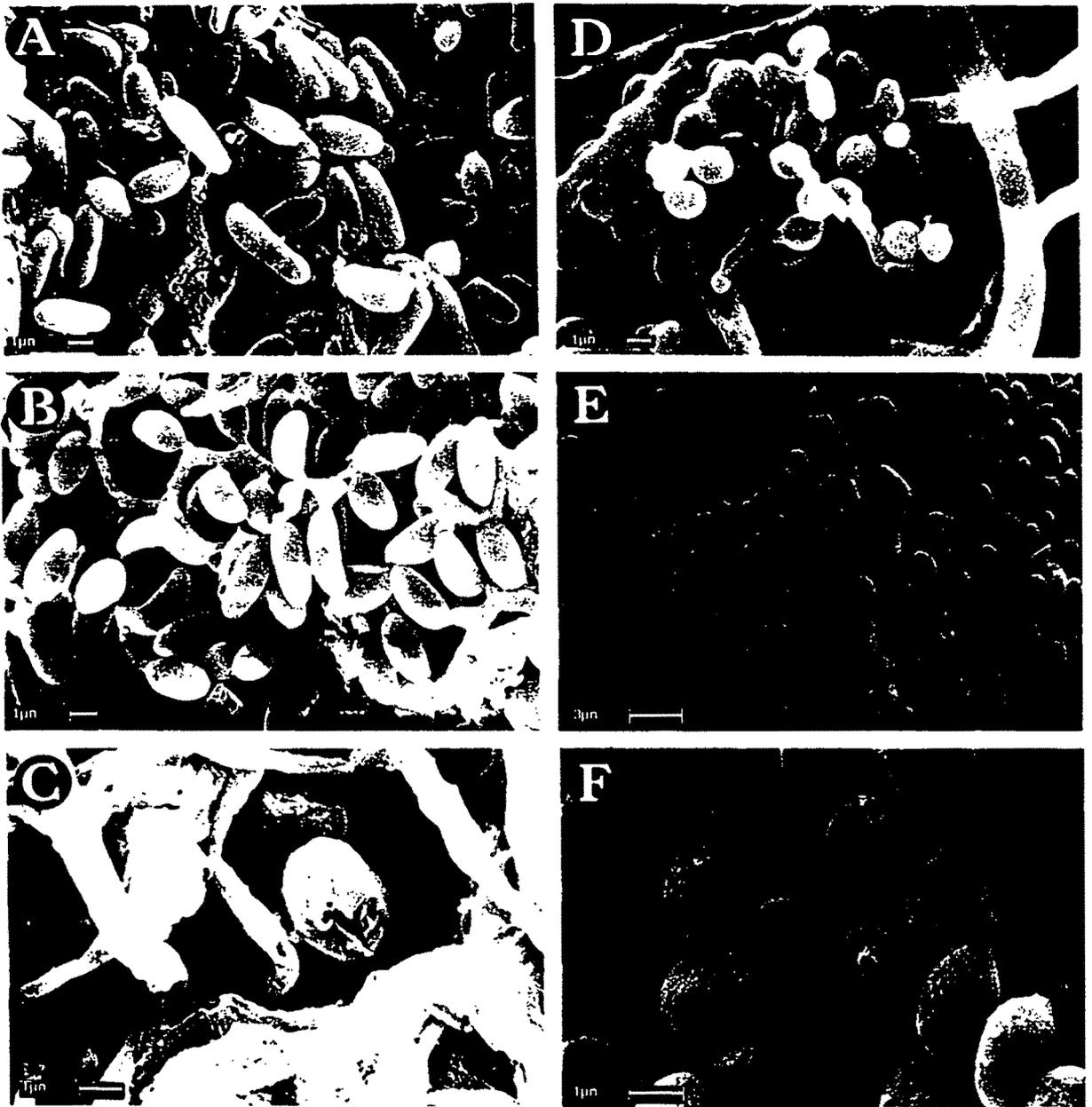


Fig. 14 Scanning electron microscope of Beauveria A. *B. caledonica* (KNU1044; × 4000), B. *B. brongniartii* (KNU1043; ×4500), C. *B. velata* (KNU1045; ×7000), D. *B. bassiana* (KNU841; ×4000), E. *B. bassiana* (KNU331; ×3000), F. *B. bassiana* (KNU331; ×9000)

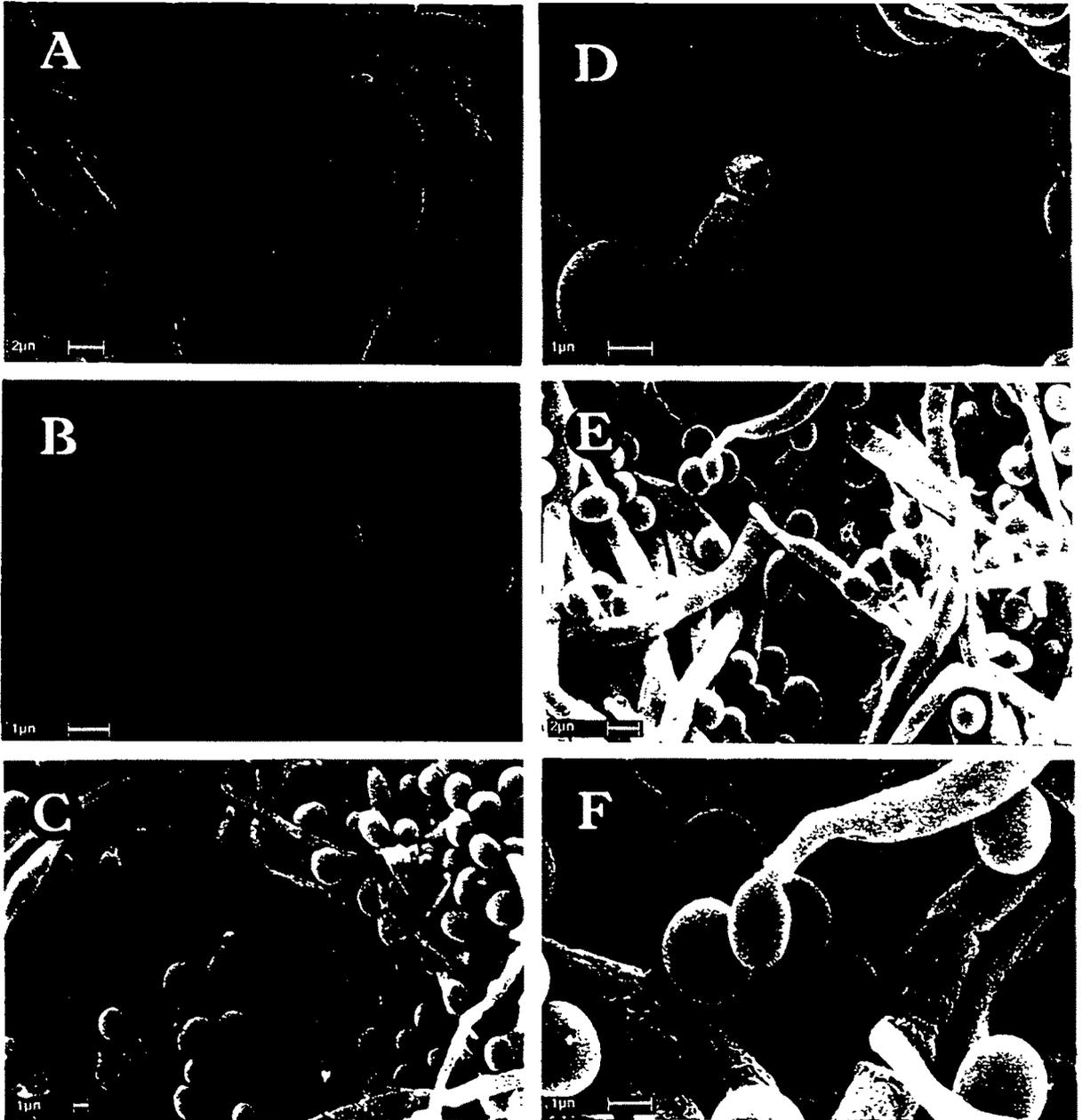


Fig. 15 Scanning electron microscope of *Cordyceps* (*Verticillium* Anamorph) A. *C. kyushuensis* (KNU133; $\times 3000$), B. *C. kyushuensis* (KNU133; $\times 7000$), C. *C. roseostromata* (KNU228; $\times 2500$), D. *C. roseostromata* (KNU228; $\times 7000$), E. *C. matialis* (KNU1283; $\times 2500$), F. *C. matialis* (KNU1283; $\times 7000$)

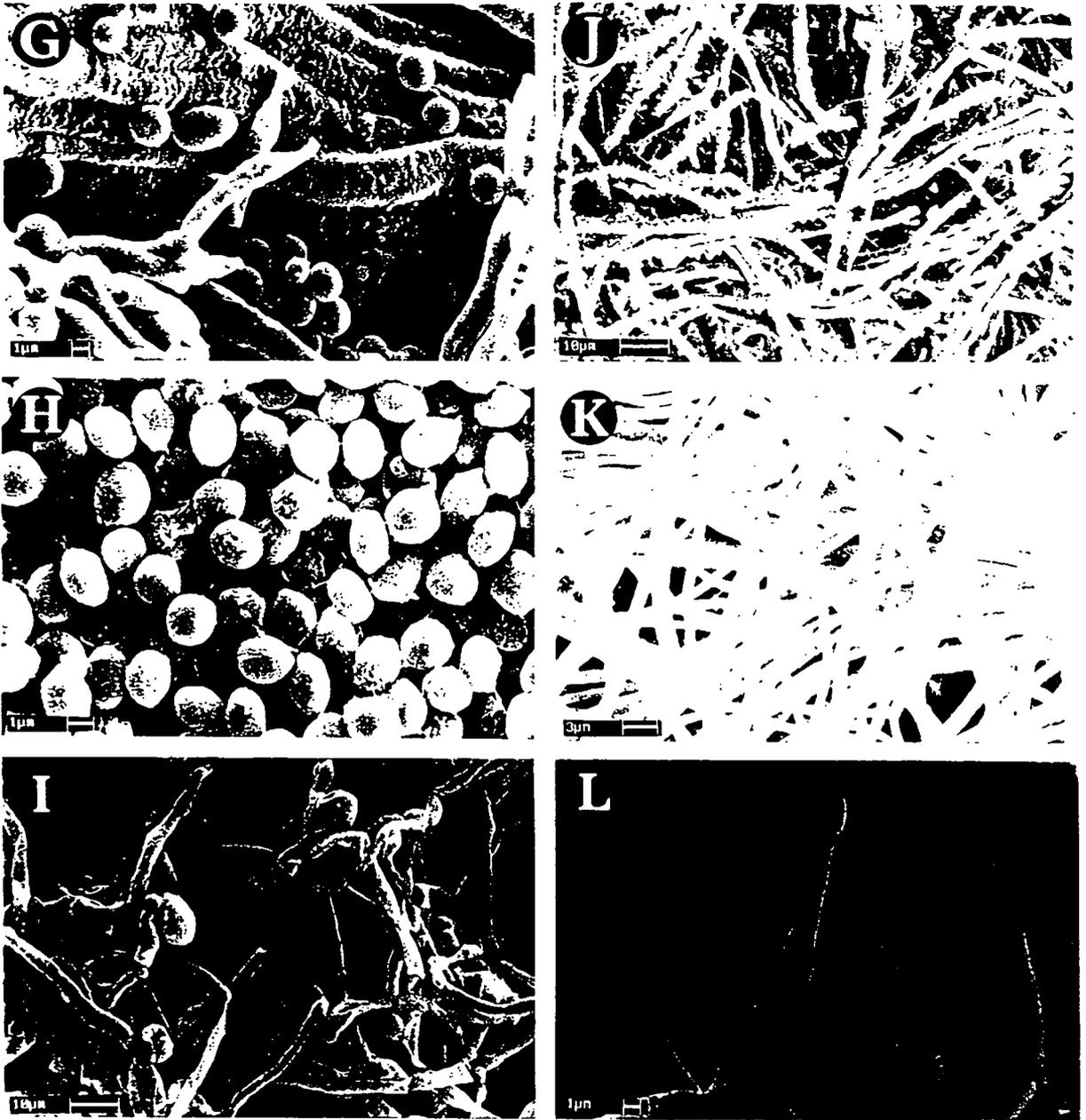


Fig. 16 Scanning electron microscope of *Cordyceps* (Various Anamorph) . G, *C. militaris* (KNU1281; ×3000), H, *C. militaris* (KNU1065; ×4500), I, *C. oxycephala* (KNU263; ×820), J, *C. sphecocephala* (KNU726; ×840), K, *C. ishikariensis* (KNU1471; ×3500), L, *C. opioglossoides* (KNU735; ×2000)

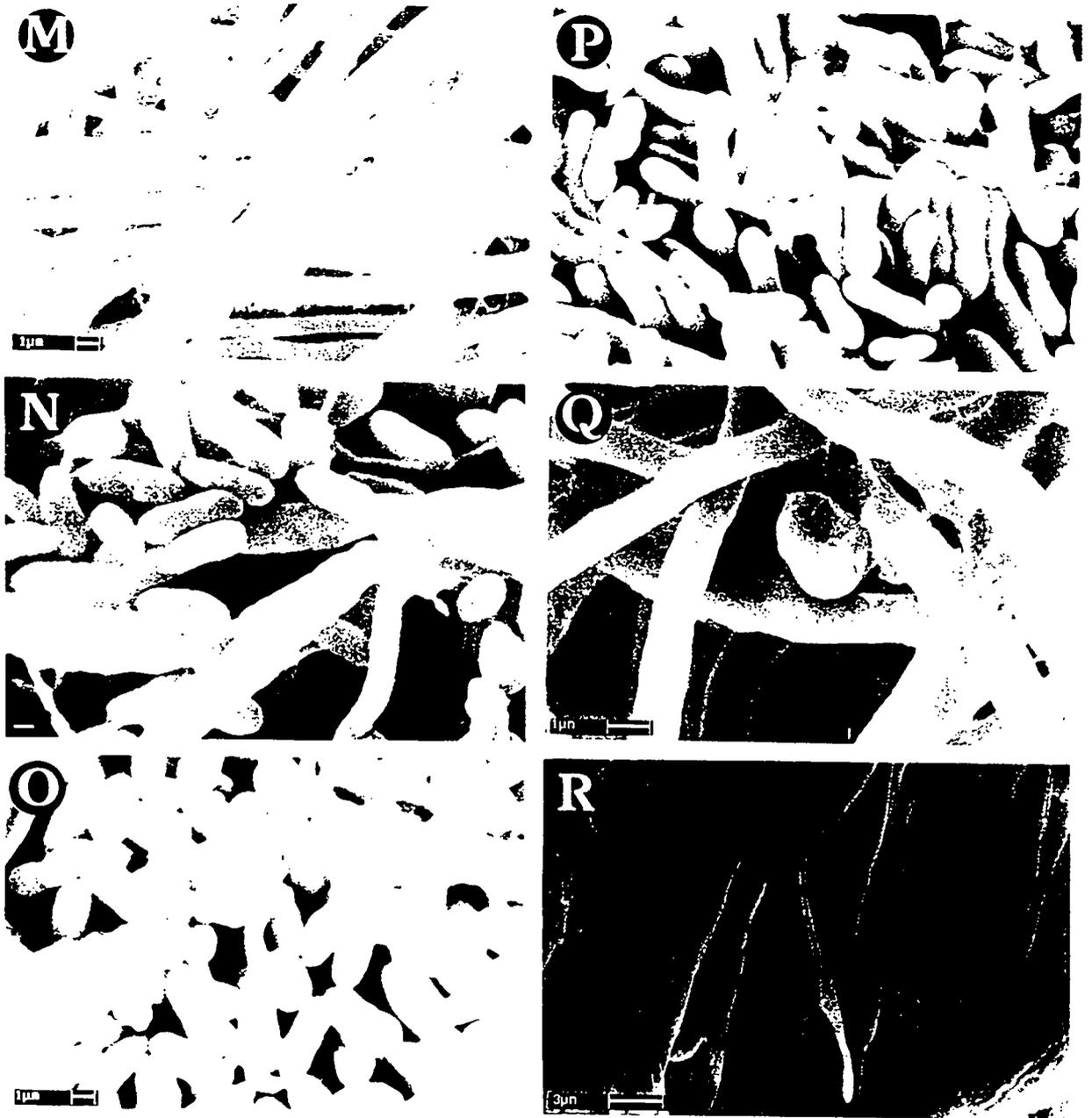


Fig. 17 Scanning electron microscope of entomopathogenic species M. *C. opioglossoides* (KNU735; $\times 4000$), N. *C. gracilioides* (KNU1352; $\times 4000$, bar $1\mu\text{m}$), O. *Acremonium berkelyanum* (KNU1040; $\times 4000$), P. *Acremonium roseum* (KNU1042; $\times 4000$, bar $1\mu\text{m}$), Q. *Verticillium balanoides* (KNU1059; $\times 7000$), R. *Verticillium lecanii* (KNU470; $\times 3000$)

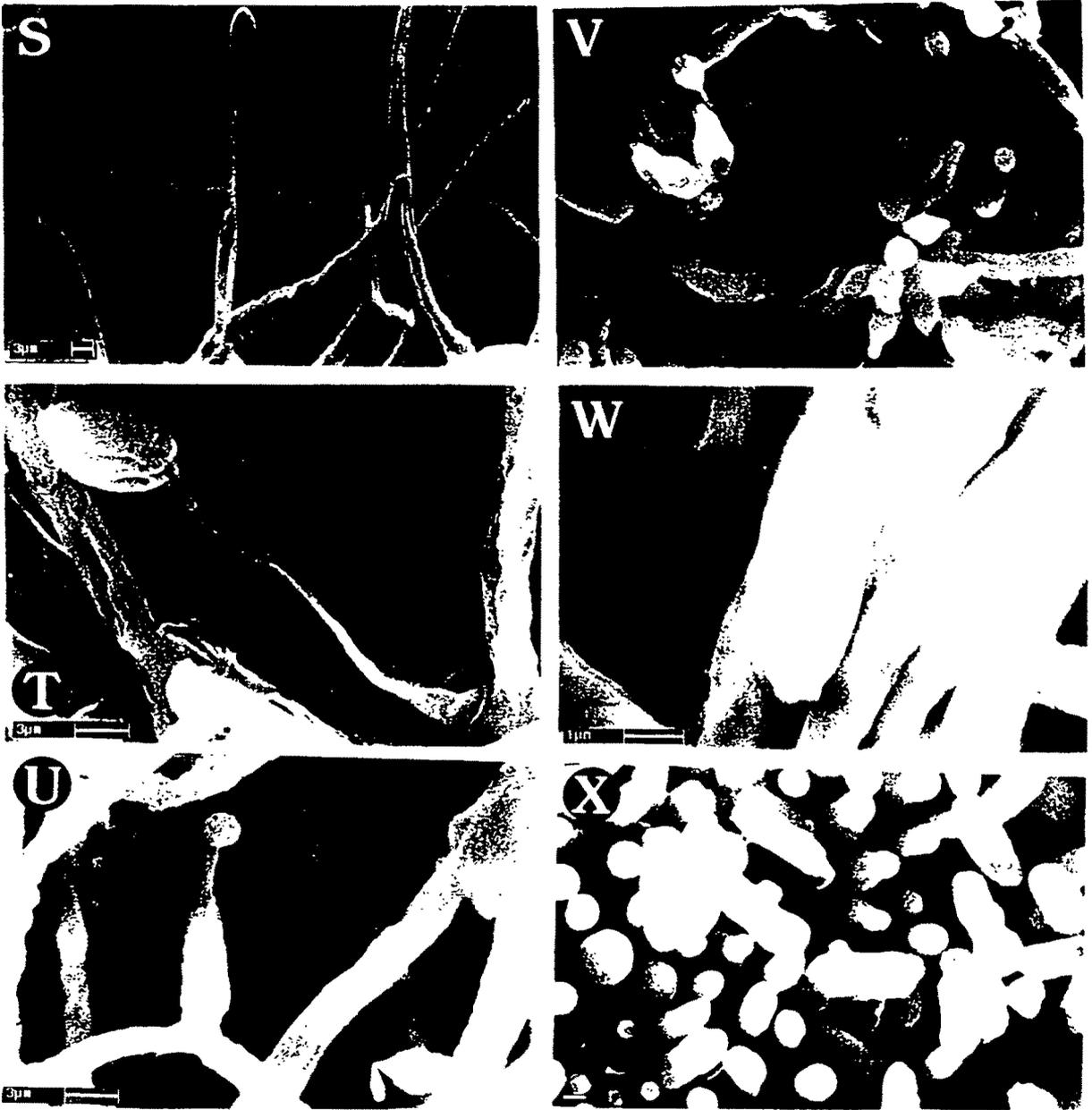


Fig. 18 Scanning electron microscope of entomopathogenic species *S. Hirsutella rhossiliensis* (KNU1048; $\times 1200$), *T. C. rhossiliensis* (KNU1048; $\times 3300$), *U. Hirsutella thompsonii* (KNU1049; $\times 3300$), *V. Paecilomyces farinosus* (KNU1054; $\times 4000$, bar $1\mu\text{m}$), *W. Paecilomyces tenuipes* (KNU879-1; $\times 11000$), *X. Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (KNU1068; $\times 4000$, bar $1\mu\text{m}$)

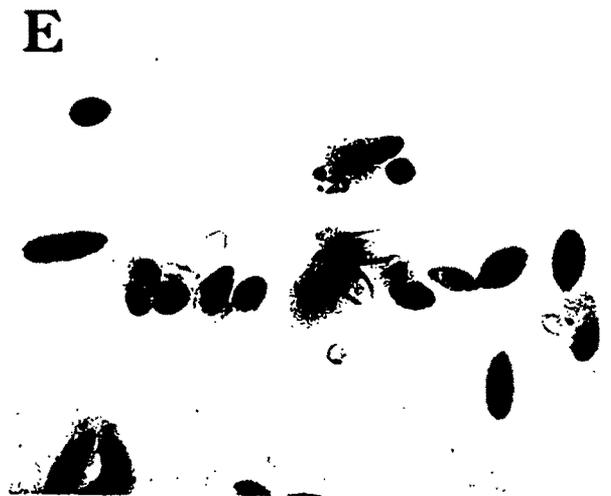
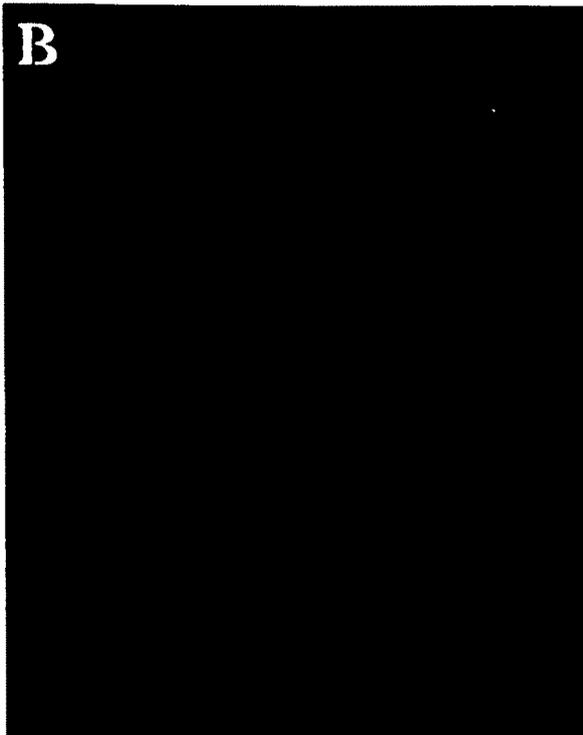
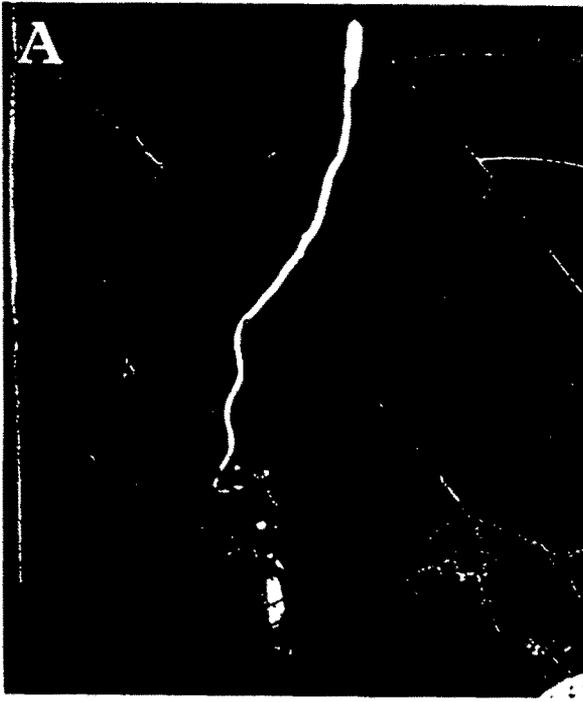


Fig. 19 *Cordyceps sphecocephala*의 형태적 특성 A. *Cordyceps sphecocephala*의 성숙한 자실체 B. 자낭각 (Mag 200×) C. 불완전세대인 *Hymenostilbe sphecocephila*의 모습 D. *H. sphecocephila*의 분생자방 (Mag 1000×) E. 분생포자 (Mag 1000×)

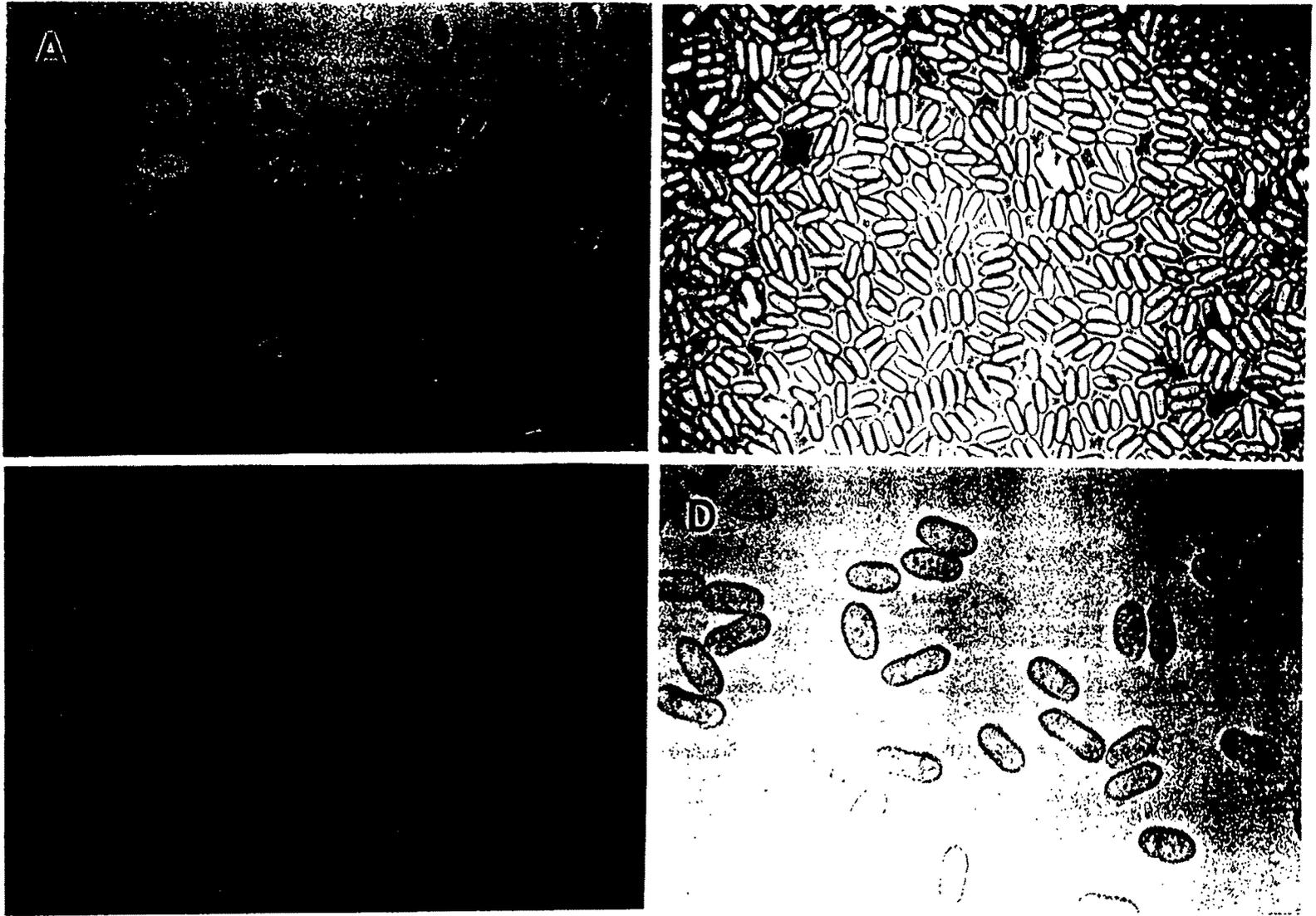
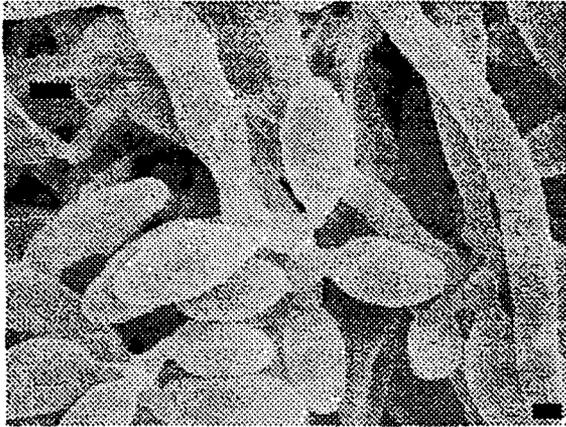


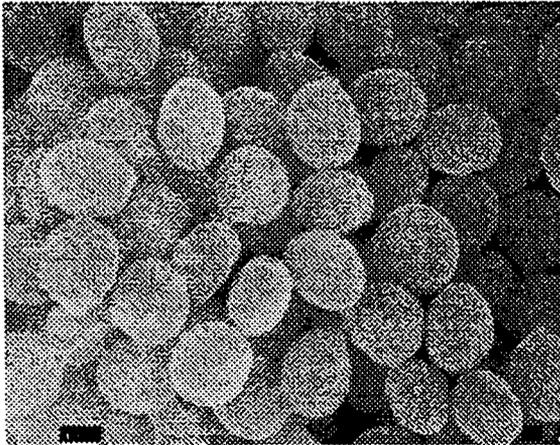
Fig. 20 Metarhizium속균의 분생포자 A. *M. album* (KNU1050), B. *M. anisopliae* var. *anisopliae* (KNU1068), C. *M. anisopliae* var. *majus* (KNU860), D. *M. flavoviride* (KNU1051) Mag 1000×



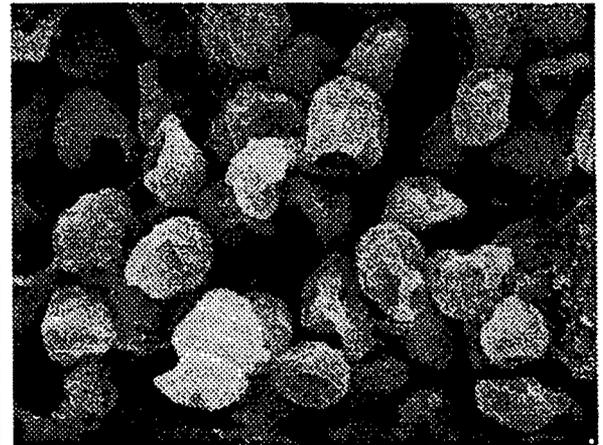
(A) *Beauveria* anamorph of *Cordyceps scarabaeicola* C-1290 on SDAY culture



(B) The appearance of *Beauveria* rachis of *Cordyceps scarabaeicola* C-252 on SDAY culture



(C) The appearance of typical *B. bassiana* conidia by SEM observation



(D) The SEM photograph of different conidial shape of *B. bassiana*

Fig. 21. Photograph of Scanning Electron Microscopy of Genus *Beauveria* allies and conidial characteristics of *B. bassiana*

나. 곤충기생균의 생태적 환경 조사

1) 한국산 곤충기생균의 분포상과 발생빈도

곤충기생균은 완전세대의 균일 경우 우기인 7월에서 8월 사이에 높은 발생빈도를 보였고, 불완전균일 경우 우기를 전후로 해서 9월에서 10월 사이에 높은 발생빈도를 보였다. (Fig. 22) 또한 국내에서는 전국에 걸쳐 *C. spechocephala*, *C. nutans*, *C. militaris*의 분포율이 높았으며 *C. tricornis*의 경우 오대산, *C. yongmunensis*의 경우 용문산을 중심으로 특정지역에서 다수 발견되는 모습을 보였다. *C. martialis*의 경우 제주 한라산에서 상당수의 표본이 채집되었다. *C. gracilioides*의 경우 충남 칠갑산 계곡과 춘천근교인 원평리에서만 수집되었다. 불완전 균일 경우 *B. bassiana*와 *P. tenuipes*의 분포 밀도가 가장 높았는데 공중습도가 높고 수종이 다양한 계곡을 중심으로 발생하는 동충하초의 경우 자실체 형성에 특별한 환경이 요구되므로 특정지역에 집중적으로 채집된 반면 곤충기생균은 강한 포자형성과 환경적 내성으로 전국에 걸쳐 다수 채집되었다.

다. 고부가성 유전자원의 탐색

식품, 의학적으로 산업적 가치가 높아가는 동충하초의 탐색 및 수집은 5월 상순부터 10월 초순까지 강원지역을 중심으로 전국 총 56개 지역에서 *Cordyceps*속 40종 984개체를 수집하였고 *Torrubiella*속 2종 4개체를 수집하였다. 또한 본 연구의 수행 과정에서 신종인 *Cordyceps yongmunensis*(한국명: 번데기흰고무동충하초)를 수집할 수 있었다. 본 종은 경기도 양평군 용문산에서만 채집되는 희귀한 종으로 7개체가 채집, 분리되었다. 동충하초속군 중 가장 많이 채집된 종은 노린재목의 곤충을 그 기주로 하는 *C. nutans* 321개체, 번데기나 유충을 기주로 하는 *C. militaris* 192개체, 벌목의 곤충을 기주로 하는 *C. spechocephala* 184개체이며 매미충을 특정 기주로 갖는 *C. tricornis* 30개체, 풍뎡이류를 기주로 하는 *C. scarabaeicola* 11개체, 고치에 싸여 있는 특정 곤충의 번데기를 기주로 하는 *C. pruinosa* 11개체, 번데기를 기주로 하는 *C. martialis* 11개체, 딱정벌레 유충을 기주로 하는 *C. gracillioides* 16개체, 개미류를 그 특정기주로 하는 *C. formicarum* 11개체 등이 수집되었다. 동충하초 속에는 *C. sinensis*, *C. militaris*, *C. martialis*, *C. solbolifera*, *C. opioglossoides* 같이 항생물질을 추출하는 균이 있어서 최근 많은 주목을 받고 있

으며 그 2차 산물의 약리적 성질에 관하여 많이 보고되어 있다. 비록 채집의 어려움과 인공배양이 까다로운 문제가 있으나 이미 본 연구실에서는 인공재배에 성공한 바가 있어 향후 다양한 동충하초의 약리실험을 통하여 새로운 고부가가치의 소재를 개발할 계획이다. (Fig. 23)

라. 곤충기생균의 배양적 특성

미생물 제제에 이용되고 있는 곤충기생성 균의 포자형성 능력시험 결과 최적 배지는 Hamada배지로 14일 후 분생포자 형성율이 6.0×10^8 에 이를 정도로 가장 우수하였고 합성배지인 SDAY에서도 높은 포자형성율이 관찰되었으므로 제한된 범위내의 순수 포자 확보가 가능하게 되었다. (Fig. 24, 25) 이로 인하여 향후 장기 보존 실험이나 살충력 실험등의 순수 분생포자를 이용하는 실험에 효율적으로 이용할 수 있게 되었다. 또한 배지에 따라 배양중에 생성되는 결정의 유무와 다형화현상 조사결과 *B. bassiana*, *B. brongniartii*(USDA)의 *Beauveria*속 2종에서는 PDA와 Malt배지에서 모두 Cubic, Bipyramid형의 결정이 관찰되었고 *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. anisopliae* var. *majus*, *M. album*, *M. flavoviride*, 그리고 중국에서 분양받은 *M. taii*의 5균주 전체가 모두 PDA에서는 Styloid형의 Malt배지에서는 Cubic, Bipyramid형의 결정체가 관찰되었다. 두 속간의 차이는 분명했으며 개체간의 변이도 발견할 수 없었다. 이러한 방법을 통하여 곤충기생성 곰팡이에 대해 결정생성 유무실험이 최초로 이루어 졌으며 곤충기생균의 생리적인 특성에 의한 새로운 분류체계의 개발이 가능하리라 사료된다. 또한 SDAY배지상에서 26℃의 온도로 2-3개월 배양하였을때 종에 따라 다양한 분생자경을 발생시켰다. 대표적인 분생자경 형성속으로 *Hirsutella*, *Paecilomyces*, *Akanthomyces*, *Tilaclidium*등이 조사되었다.

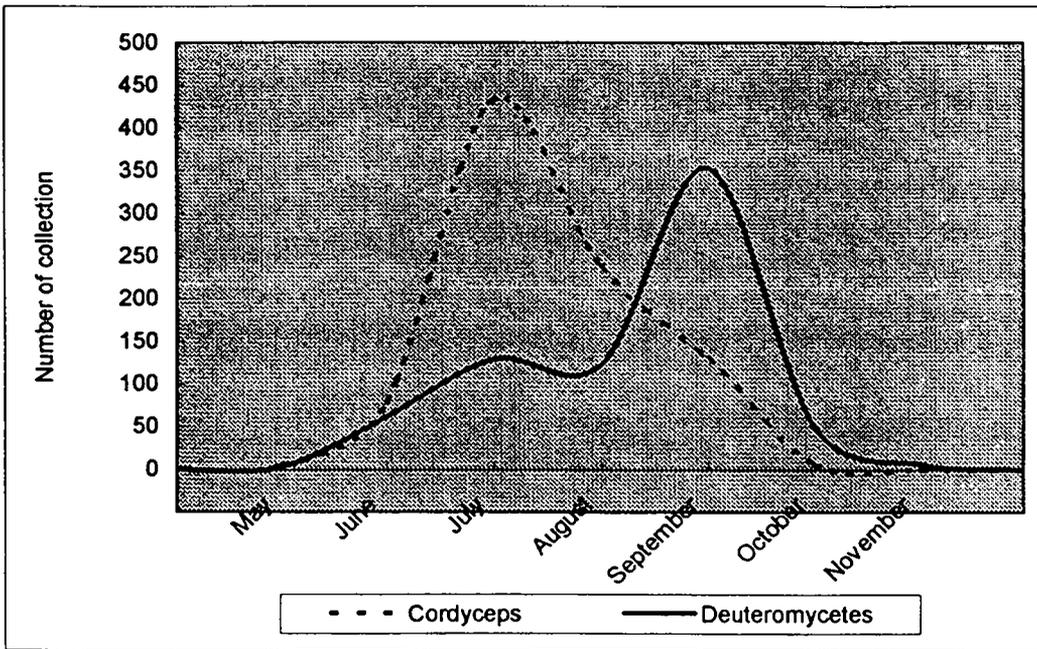


Fig. 22 연중 동충하초 및 근충기생균의 시기별 발생양상

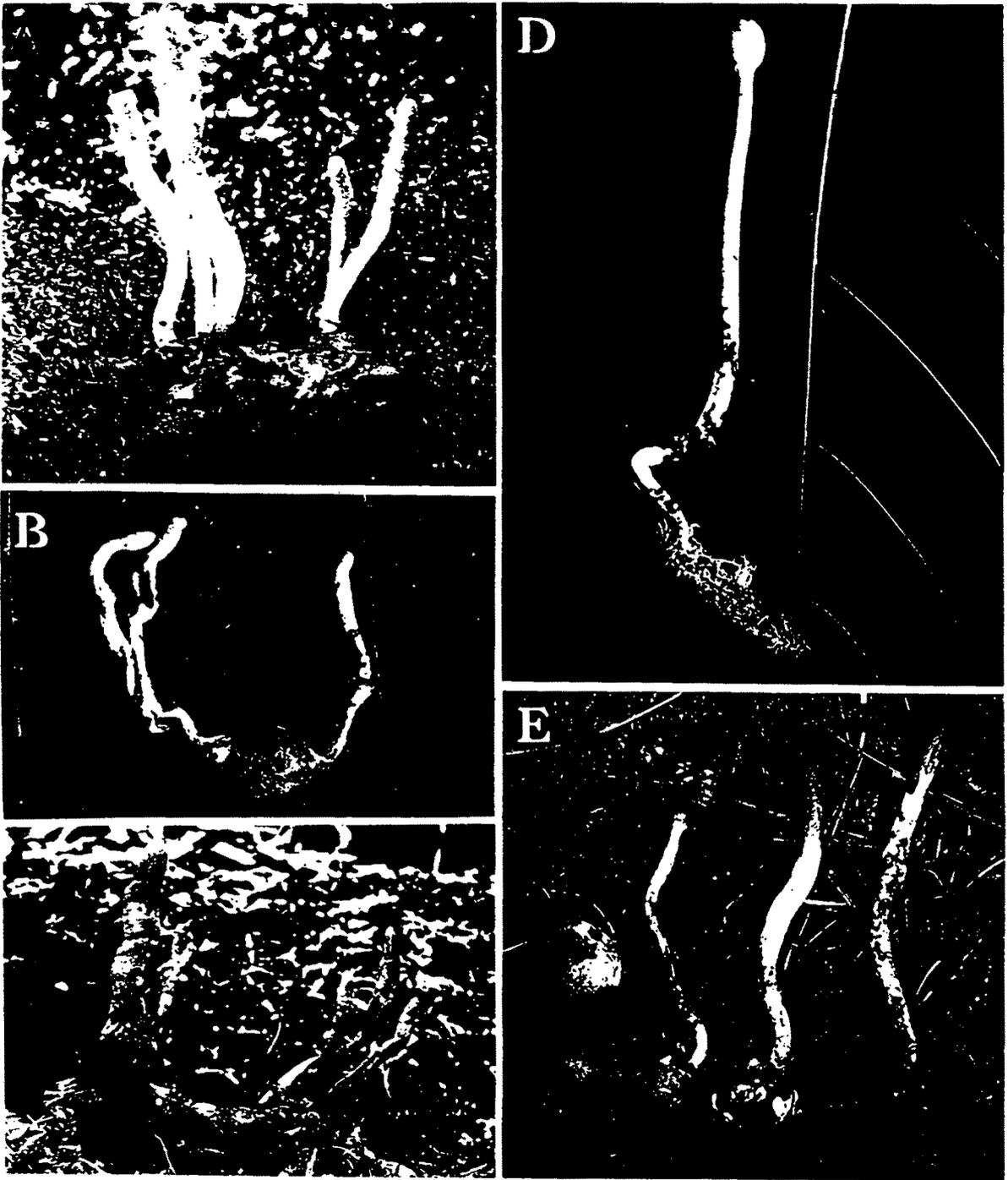


Fig. 23 채집된 동충하초의 모습 A. *Cordyceps militaris*, B. *Cordyceps pruinosa*, C. *Cordyceps matialis*, D. *Cordyceps gracilioides*, E. *Cordyceps opioglossoides*

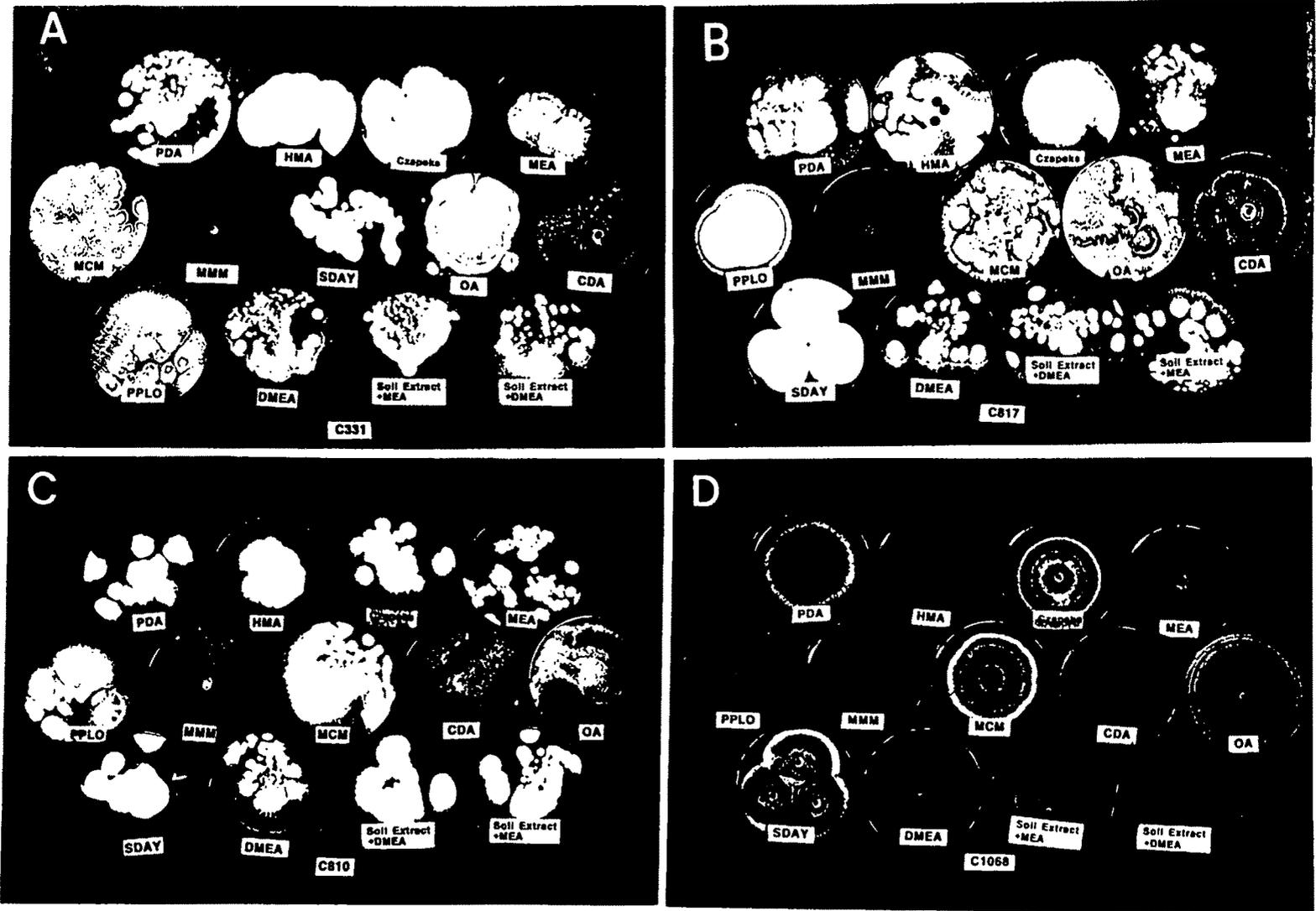


Fig. 24 분생포자 형성 우수배지 선발 시험 A. *Beauveria bassiana*(KNU331), B. *Beauveria bassiana*(KNU817), C. *Paecilomyces tenuipes*(KNU810), D. *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*(KNU 1068)

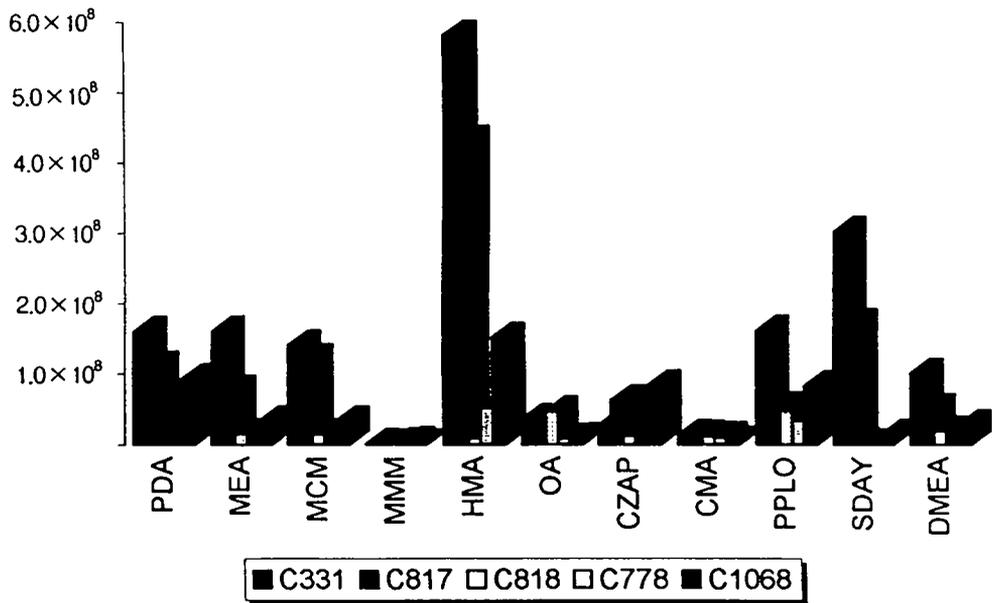


Fig. 25 다양한 복합배지에서의 곤충기생균 분생포자 형성율 KNU331,817 (*Beauveria bassiana*), KNU810,818 (*Paecilomyces tenuipes*), KNU1068 *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*)

마. 분자수준의 분류체계 확립

1) 동위효소분석장치(IEF)를 이용한 분자수준의 분석

가) 곤충기생균 속 간의 동위효소 분석

(1) Esterase처리

동충하초의 경우에 esterase에서는 다양한 형태의 밴드가 관찰되었으며 매우 높은 다양성을 나타내었다. (Figure 26) 각 균주들은 1-13개의 밴드를 나타내었으나, 특이하게 *B. bassiana* (USDA M162B)과 *V. lecanii* (USDA 3257)의 경우 밴드가 전혀 나타나지 않았고 각 속간에는 뚜렷한 다양성을 보였다. *B. bassiana* 균주들의 esterase 밴드 양상을 비교했을때 동일한 종인데도 불구하고 밴드양상이 다양하여 13개의 밴드가 관찰되었다. 각 종간에서는 동일한 양상은 나타나지 않았지만 C317, C829는 유사성이 있는 것으로 관찰되었다. C642와 C643는 *Metarhizium*속만으로 동정되었던 것인데 C762와 C835의 *M. anisopliae*와 밴드양상이 같게 나타났다. 0419B, 0420B, 0422B, 0423B, 0426B은 모두가 USDA에서 분양된 *Metarhizium*속균으로 다양한 밴드양상을 보였다. *Paecilomyces*속 내에서도 다양한 밴드가 나타났고 동일한 종으로 판명되지는 못하였지만 기주가 번데기인 C825, C709, C710은 약간의 유사성을 보였다.

(2) Acid phosphatase

Acid phosphatase 역시 esterase와 동일하게 각 속간에 다양한 밴드 양상을 나타내었는데 적은것은 1개, 많게는 9개까지 밴드양상을 보였다. (Figure 27) 특히 *P. neoaphid*(USDA 3459), *Tolyocladium geodes*(USDA 3276), *Arthrotrrys oligospora* var. *oligosp*(USDA 3369), *A. amerospora*(USDA 4808)의 경우는 밴드가 전혀 나타나지 않았다. *B. bassiana*종 내에서도 esterase와 같이 C317, C829은 서로 유사성을 조금 보였지만 특별히 동일하다 할만한 밴드양상은 보이지 않았다. 또한 *Metarhizium*속의 C396, C642, C643은 밴드가 동일하게 나타났는데 이러한 양상은 *Metarhizium*속으로만 판명되었던 것이 C396과 동일한 밴드양상을 보인 것으로 보아 *M. anisopliae*일 수 있다는 추측을 할 수 있다. 하지만 *Metarhizium*속에서 밴드가 1개만 나타난 것이 있었고, 속 내에서는 높은 다양성을 보였으며, 특히 미국에서 도입된 *Metarhizium*은 모두가 다양한 밴드양상을 보였다. *Paecilomyces*속 내에서도 다

양한 밴드양상을 보였는데, esterase와 동일하게 숙내에 번데기를 숙주로한 것들이 유사한 밴드양상을 보일 뿐 다른 것들은 다양성이 높았다. 또한 중국에서 분양받은 *P. cicada* C475는 C825, C709와 비슷한 밴드양상을 보였다.

(3) Malate dehydrogenase

Malate dehydrogenase은 esterase 보다는 단순한 밴드양상을 보였다.(Fig. 28) *B. bassiana*종 내에서의 밴드양상은 단순하였지만, 동일한 밴드양상은 보이지 않았으며 *Cordyceps*속 내에서도 *C. nutans*, *C. scarabaeicola*은 다양성이 많았다. *Metarhizium*속 내에서는 많은 유사성이 보였는데 동일한 밴드양상은 보이지 않았다. *Paecilomyces*속 내에서는 1개의 밴드가 나온것과 음극쪽으로 치우친 밴드양상을 보였으며, 1개의 밴드로 나타난것은 C828, C827, USDA 3458로 밴드 위치는 차이를 보였다. 하지만 중국에서 도입된 *P. cicada*의 경우는 C825, C709, C710과 음극쪽에서 비슷한 밴드양상을 보였다. 특히, *V. lecanii*은 본 효소에서는 활성을 보이지 않았고 나머지 속들에서는 다양한 밴드 양상을 보였다.

나) *Metarhizium*속, *Beauveria*속, *Cordyceps*속간의 동위효소 분석

(1) Esterase(EST:E.C.3.1.1.1)

Metarhizium spp. 경우 esterase 에서는 다양한 밴드가 관찰 되었는데 그 밴드 수가 1-16개 정도의 밴드가 보여 다양성이 높았다.(Fig. 29) 한국에서 채집된 C642 경우는 *M. anisopliae*로 동정된 것과 비교했을 때 매우 유사한 밴드양상이 보여 같은 종으로 판단되며 C842, C2419 는 *M. anisopliae* var. *anisopliae*로 숙주가 coleoptera 인데 동일한 밴드가 나타났고, 나머지 *M. anisopliae* var. *anisopliae*은 다양한 밴드 양상이 보였다.(Figure 30) 하지만 *M. anisopliae* var. *majus* 8균주는 숙주가 coleoptera, lepidoptera 에 기생한 균주로 esterase에서 모두가 동일한 밴드양상이 보였다. 또한 *C. scarabaeicola* 인 C251, C251-1, C1092 경우도 esterase 에서 같은 밴드양상이 보였으며, *B. bassiana* 은 유사밴드가 보이나 모든 균에서 매우 높은 다양성이 나타났다.

(2) Acid phosphatase(ACP: E. C. 3.1.3.2)

Metarhizium spp 에서는 ACP 효소는 전혀 나타나지 않았고, *B. bassiana* 경우 밴드 양상은 그리 다양하지 않고 단순한 양상을 보였다. (Figure 31) *C. scarabaeicola* 경우 3균주 모두가 동일한 밴드양상이 보여, esterase와 같은 결과로 나타나 모두가 동일한 균으로 생각되고, *B. bassiana*에서는 C829, C317, C331, 은 같은 밴드양상이 보이고, C149, C751, C886 도 같은 밴드양상으로 보였으며, C208, C501, C1017 또한 동일한 밴드 양상이 나타나 동일한 균으로 추측할 수 있었다. 하지만 C730은 같은 *B. bassiana*인데 아주 특이한 밴드 양상이 나타났다. 본 실험을 수행해본 결과 곤충 기생균의 효소활성이 나타나지 않은 이유와 보다 많은 동위효소를 선별하여 생화학적 분류동정에 유사성과 유연관계에 대한 보다 많은 시험을 수행할 필요가 있다고 생각된다

2) PCR-RFLPs기법을 이용한 분자분류

가) PCR-RFLPs기법을 이용한 *Metarhizium*속내의 변종 간의 유전적 지표탐색

(1) PCR 증폭

M. anisopliae 총 28 균주 (*M. anisopliae* 3 균주: *M. anisopliae* var, *anisopliae* 13 균주: *M. anisopliae* var. *majus* 12 균주)로부터 추출된 DNA를 primer, ITS1과 LR3을 이용하여 PCR 증폭시켰다. 증폭된 PCR 단편들의 크기는 100 bp DNA ladder와 비교해본 결과 약 1.2 kb이었으며 변종간 또는 변종 내에서 차이가 없었다. 또한 PCR 증폭된 단편들에 대하여 12종의 제한효소 처리시 평균 2-4개의 절편들이 나타났다. 이와 같이 균주간에 PCR 단편들의 크기가 일정함은 증폭된 DNA 부위 내에서의 length mutation이 거의 없다는 것을 나타내는 것이므로 데이터 분석 시 정확한 유전적 연관성을 비교할 수 있었다.

(2) 제한효소의 절단다형질(RFLPs)

PCR 증폭된 단편들에 대하여 12종의 제한효소를 처리한 결과 11종의 제한효소에서 변종간 또는 변종 내에서 유전적 변이가 거의 나타나지 않았다. 하지만 MboI 처리시 변종간의 뚜렷한 유전적 양상을 볼 수가 있었다. (Figure 32) 국내수집 균주와 *M. anisopliae* var. *anisopliae*는 4개의 절편(161, 180, 306, 541 bp)을 나타낸 반면,

*M. anisopliae var. majus*는 5개의 절편(48, 113, 180, 306, 541 bp)을 나타내었다. 비록 180, 306, 541 bp 절편들이 28균주 모두에서 보였지만 161 bp 절편은 국내균주와 *M. anisopliae var. anisopliae*에서만 나타났으며 *M. anisopliae var. majus*에서는 그 대신 48과 113 bp 절편이 보였다. 이러한 사실을 미루어 볼 때 *M. anisopliae var. majus*에서만 나타난 113과 48 bp 절편들은 *M. anisopliae var. anisopliae*의 161 bp 절편 내에 또 하나의 추가된 MboI site에 기인한다고 할 수가 있다. 이러한 양상은 본 연구에 사용된 균주의 채집된 장소나 기주에 관계없이 일정하게 나타났다. 그러므로 *M. anisopliae var. majus*에서만 나타난 113과 48 bp 절편들을 *M. anisopliae var. majus* 특이적인 유전자지표로 간주할 수가 있다. 하지만 48 bp 절편은 전기영동상에서의 해상도가 좋지 않기 때문에 113 bp 절편이 더 유익한 지표라고 사료된다. 이상과 같이 본 연구기간 세계 여러 지역과 다양한 기주에서 확보된 *M. anisopliae*의 변종 특이적인 유전자지표 탐색을 위하여 ribosomal DNA (ITS-28S rDNA) 유전자에 대한 PCR-RFLPs를 실시한 결과 MboI 제한효소에서 *M. anisopliae var. majus* 특이적인 유전자지표를 탐색하는데 성공하였다. 이러한 결과는 미생물상 통제개발을 위하여 *M. anisopliae*에 속하는 변종들의 정확한 사용에 많은 보탬이 되리라 기대된다.

나) PCR-RFLPs기법을 이용한 *Beauveria*속균의 분자 분류

중폭된 PCR 단편들의 크기는 100bp DNA ladder와 비교해본 결과 약 1180bp이었으며 속내에 차이는 발견할 수 없었다. 또한 PCR 단편들에 대하여 8종의 제한효소 처리시 평균 2-5개의 절편들을 발견할 수 있었다. 이들 중 MboI, RsaI, HaeIII, HpaII의 처리구에서 *Beauveria*속균의 특이적인 밴드양상을 관찰할 수 있었다. 광학현미경과 주사전자현미경 검정 결과 실험에서 사용된 C-332균주는 딱정벌레목 무당벌레과(Coleoptera: Coccinellidae) 성충을 기주로 하여 춘천군 강원대학교 연습림에서 채집되었는데 *B. bassiana*로 동정되었으나 제한효소 처리 결과 특이적 밴드양상을 관찰할 수 있었다. 이 균주는 향후 Sequencing등의 다른 분자기법의 접근이 요구되어야 할 것으로 사료된다. C-332와 C-251균주를 제외한 *B. bassiana*균주에서는 동일한 밴드양상을 관찰할 수 있었다. 또한 HpaII처리시 선별적으로 *C. scarabaeicola*와 *B. bassiana*그룹을 구분할 수 있었으며 향후 분류에 어려움이 따르는 균주의 분석에 유

용하게 사용될 것으로 사료된다.(Fig. 33)

3) 염기서열 분석을 통한 *Metarhizium anisopliae*의 종내 변이주간의 분류

증폭된 PCR 단편들의 크기는 약 500bp로 확인 되었으며, 분석결과 *M. anisopliae* var. *anisopliae*는 그 유사도가 매우 높았으나 *M. anisopliae* var. *majus*의 경우 그룹간에 상당히 낮은 유사도를 보여주었다. 이러한 결과는 *Metarhizium*속군의 변종이 완전히 분화되지 않은 집단이라는 사실을 증명하고 있으며 이로 인한 분류체계의 난점을 확인할 수 있었다. 본 실험결과는 *M. anisopliae*에 속하는 변종들의 정확한 분류동정과 그 사용에 있어서 많은 보탬이 되리라 기대되며 향후 더 많은 균주와 DNA지역을 대상으로 접근을 할 가치가 있다고 사료된다.(Fig. 34, 35, 36, 37)

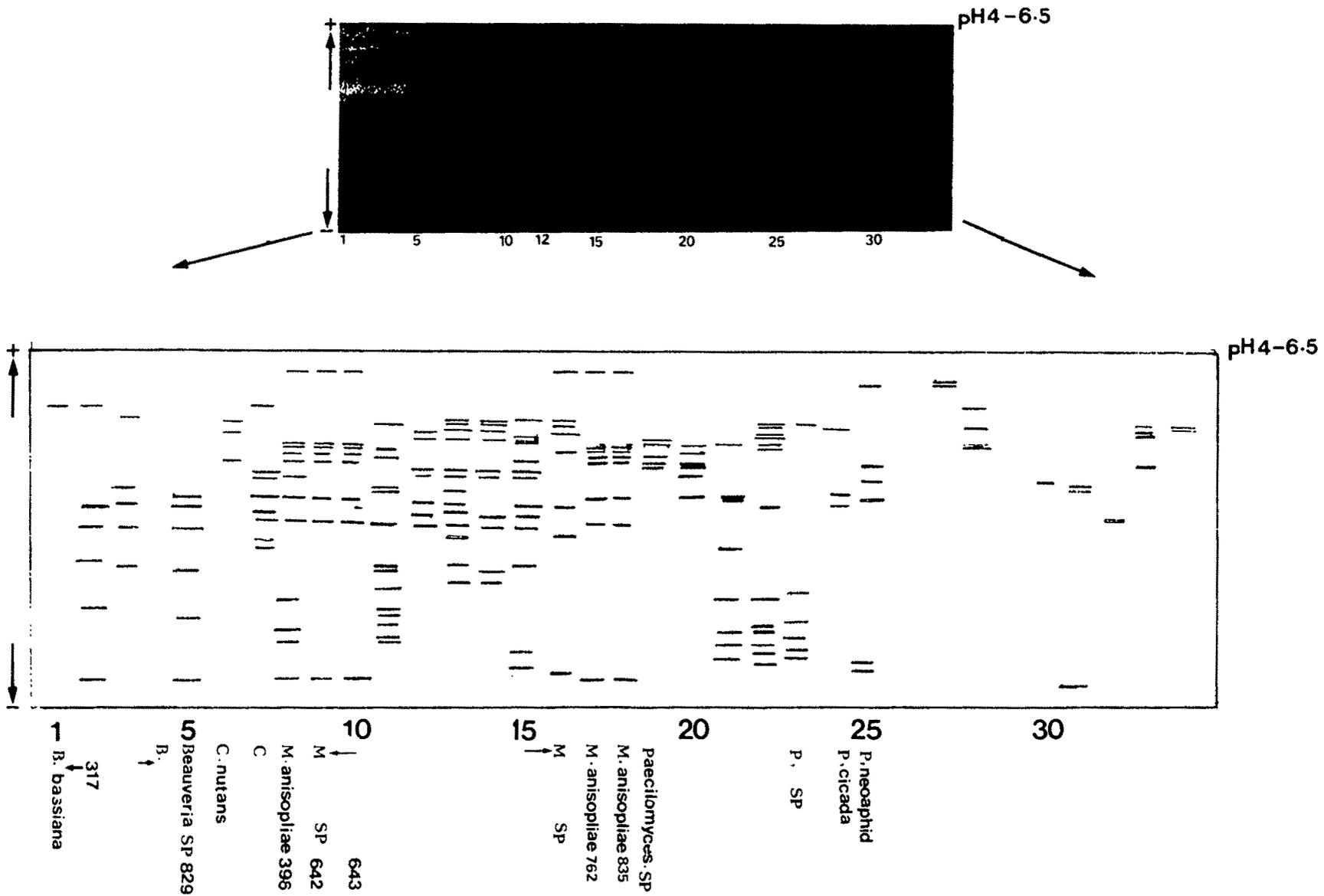


Fig. 26 Esterase isoenzyme patterns of entomopathogenic. The number noted above corresponding to table 1.

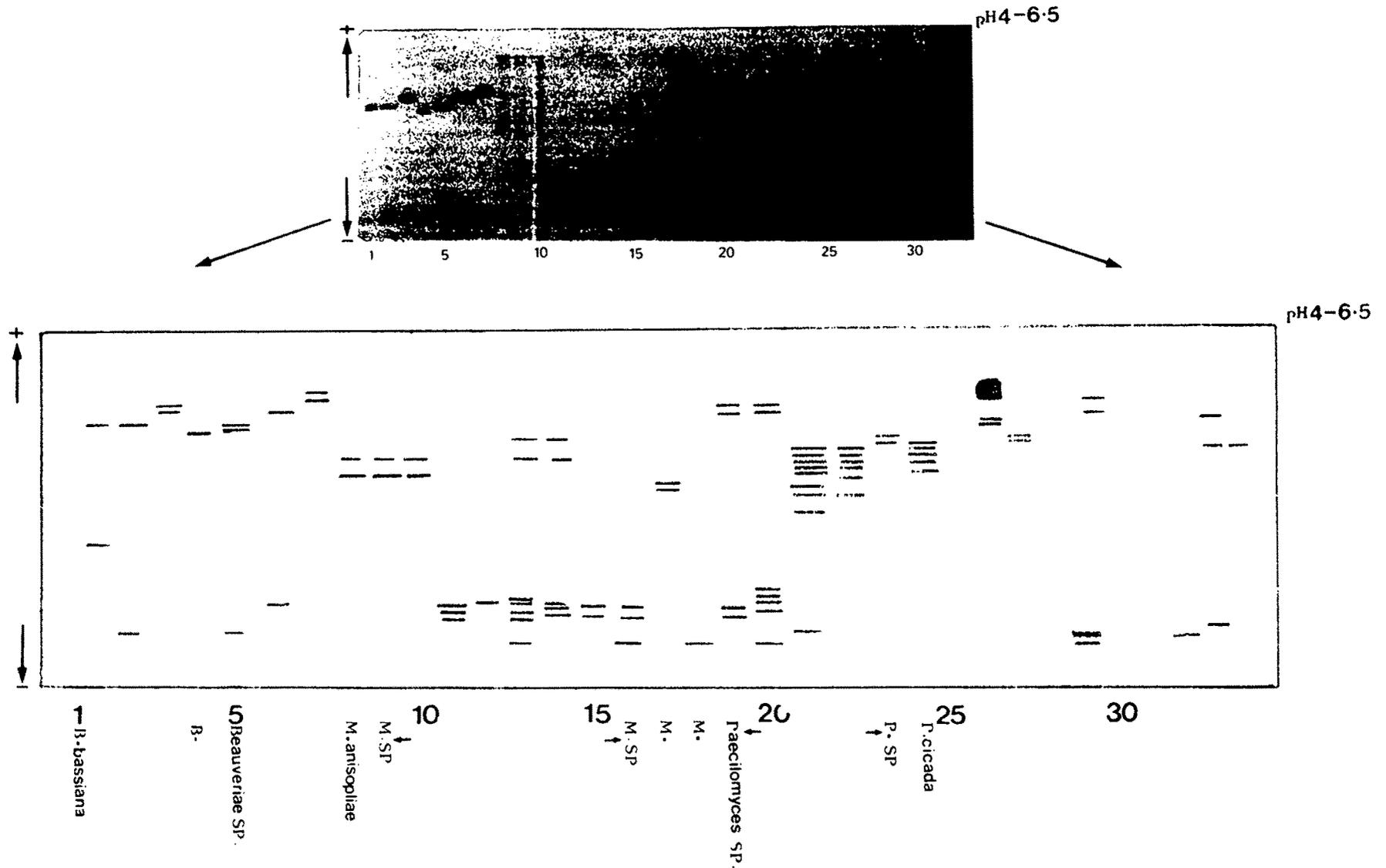


Fig. 27 Acid phosphatase isoenzyme patterns of entomopathogenic.
The number noted above corresponding to table 1.

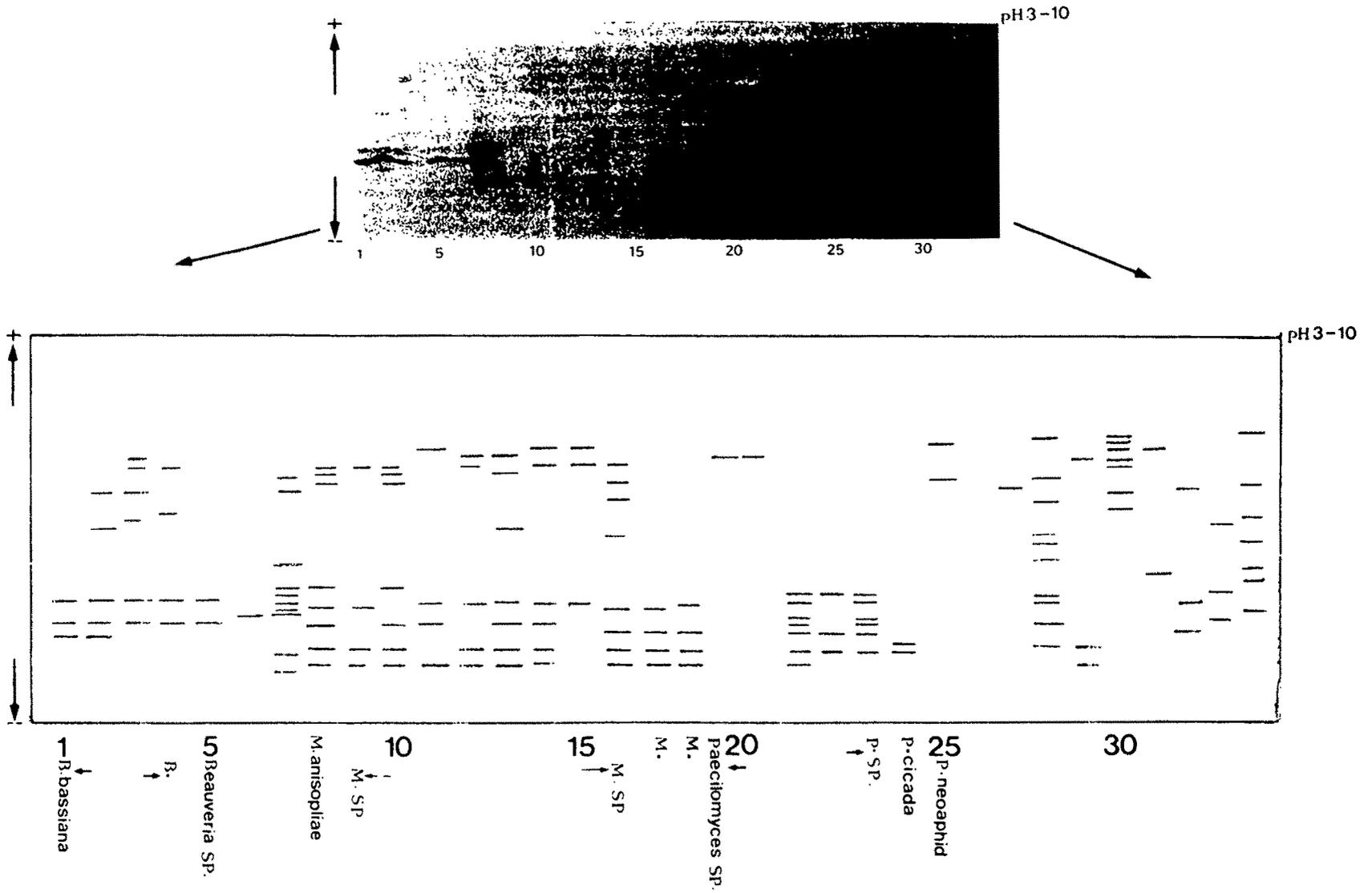


Fig. 28 Malate dehydrogenase isoenzyme patterns of entomopathogenic.
The number noted above corresponding to table 1

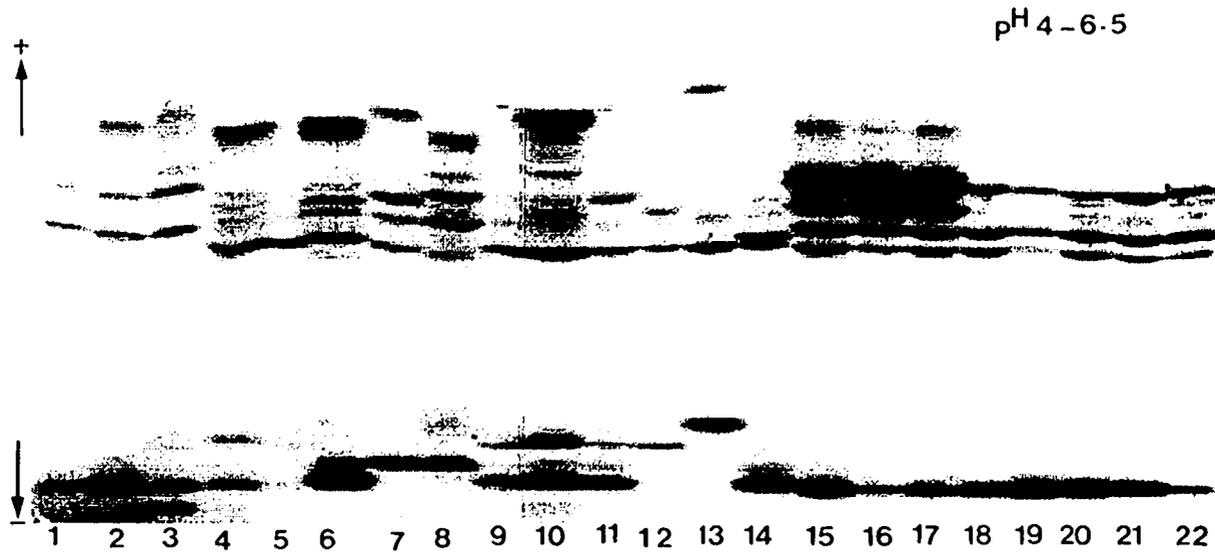


Fig. 29 Isozyme profiles obtained from representative isolates of *Metarhizium* species after IEF and staining with esterase

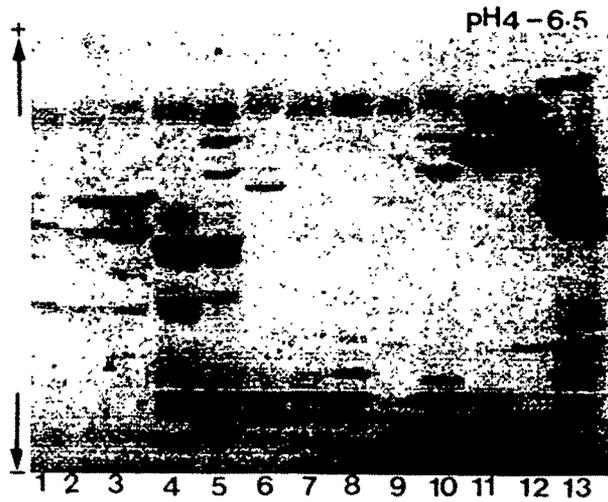


Fig. 30 Isozyme profiles obtained from representative isolates of *Beauveria* species after IEF and staining with esterase

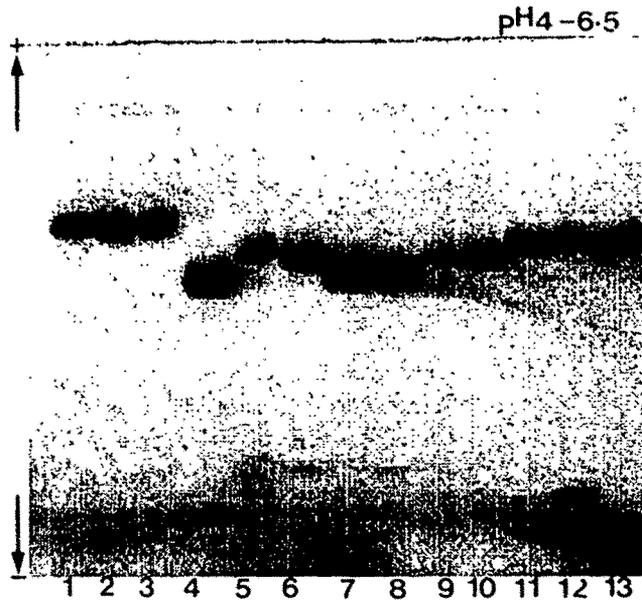


Fig. 31 Isozyme profiles obtained from representative isolates of *Beauveria* species after IEF and staining with acid phosphatase

Metarhizium anisopliae
var. *anisopliae*

Metarhizium anisopliae
var. *majus*

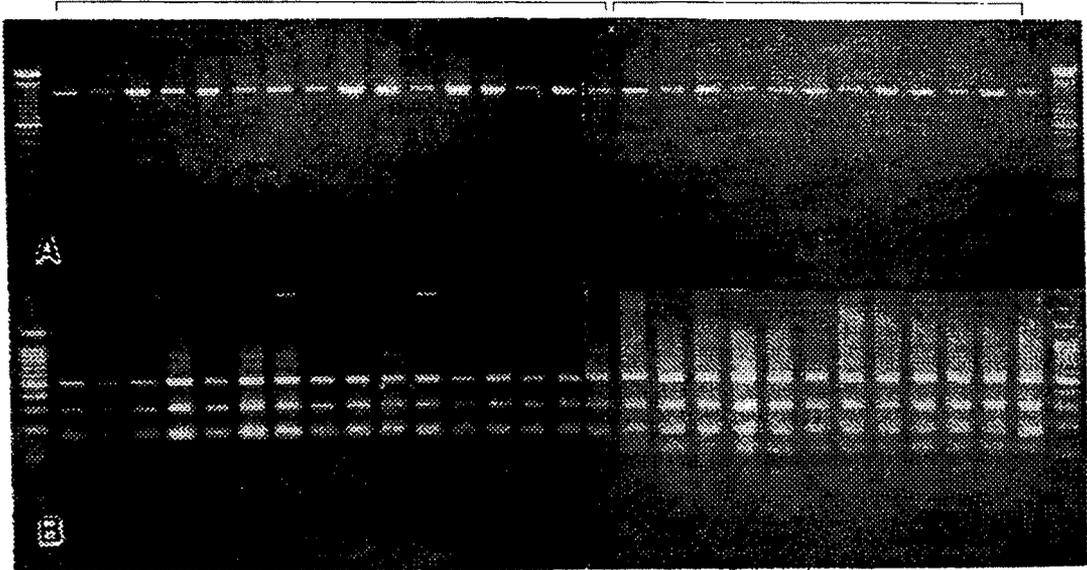
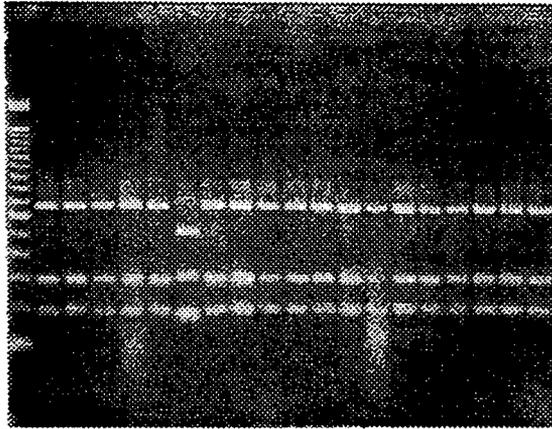
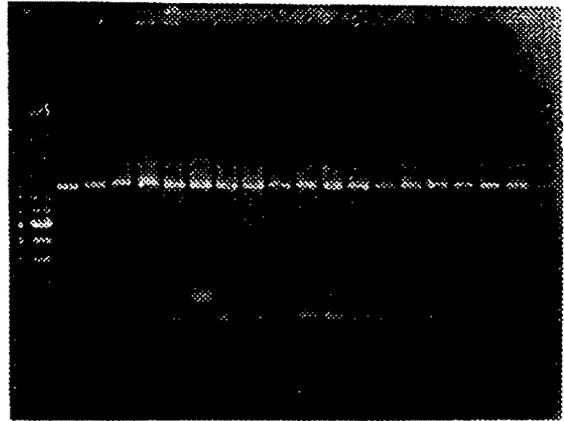


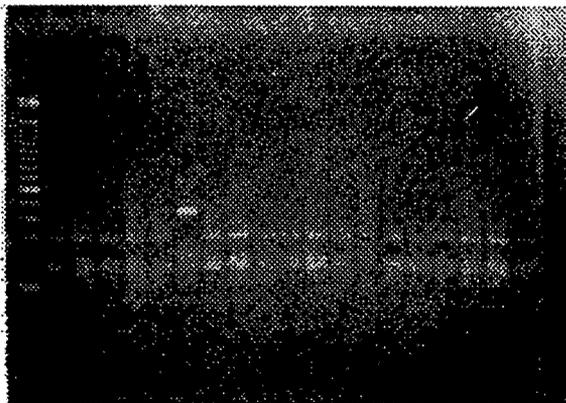
Fig. 32 PCR products and RFLPs of rDNA from 28 isolates of *M. anisopliae*. (A) primers ITS1 and LR3 were used to amplify the region corresponding from 5' end of ITS to approximately 600 bp upstream from 5' end of 28S rDNA. The size of the PCR product is approximately 1,188 bp. Size variations were not observed in all isolates. (B) PCR products from the 28 isolates were digested with *Mbo*I. Restriction patterns of *M. anisopliae* var. *majus* isolates were distinguished from *M. anisopliae* var. *anisopliae* isolates. The arrows indicate the 113 and 48 bp fragments specific to isolates of *M. anisopliae* var. *majus*. The 161 and 180 bp fragments in *M. anisopliae* var. *anisopliae* are not clearly separated due to similar size and limited resolution of a agarose gel. The left- and rightmost lanes contain 100 bp DNA ladder.



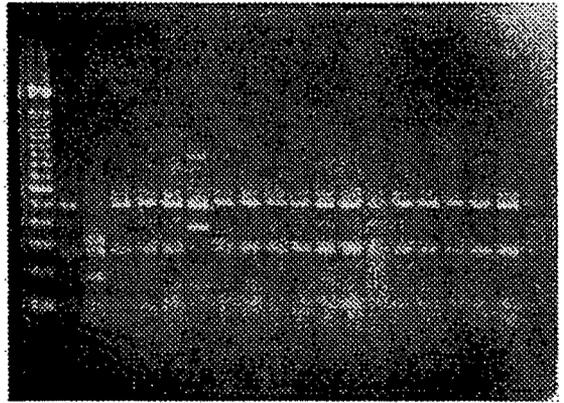
(A) Restriction polymorphism of PCR product of ITS region from Genus *Beauveria* using restriction enzyme *Mbo*I



(B) Restriction polymorphism of PCR product of ITS region from Genus *Beauveria* using restriction enzyme *Rsa*I



(C) Restriction polymorphism of PCR product of ITS region from Genus *Beauveria* using restriction enzyme *Hae*III



(D) Restriction polymorphism of PCR product of ITS region from Genus *Beauveria* using restriction enzyme *Hpa*II

Fig. 33. Restriction polymorphism of PCR product of ITS region from Genus *Beauveria* using four restriction enzyme. From left to right side : DNA ladder, lane1;208, lane2;251, lane3;829, lane4; 317, lane5;331, lane6;332, lane7;290, lane8;291, lane9;292, lane10;294, lane11;149, lane12;152, lane13;501, lane14;505, lane15;566, lane16;730, lane17;751, lane18;886, lane19;1017

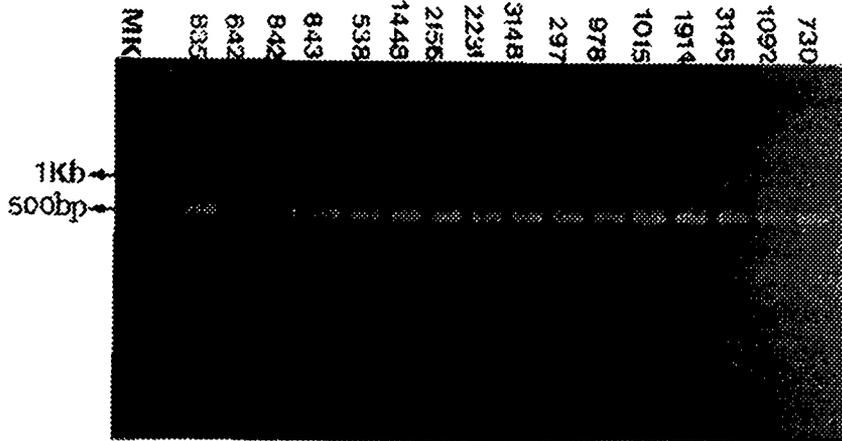


Fig. 34. Amplification of ITS I and ITSII region of *Metarhizium* species

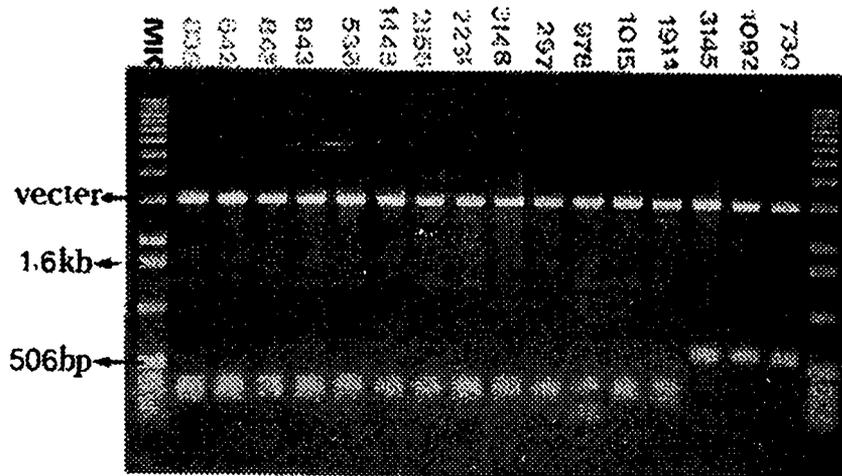


Fig. 35. Cloning of ITS I,II regions of *Metarhizium* species in pGEM-T vector

..T.A.C...T..TC..AC.C..A..C...GT..A...T. Consensus #1
 CATTACCGAGTTATCCAACCTCCCAACCCCTGTGAATTATA Majority

130 140 150 160

84 CATTACCGAGTTATCCAACCTCCCAACCCCTGTGAATTATA L10.SEQ
 81 CATTACCGAGTTATCCAACCTCCCAACCCCTGTGAATTATA L11.SEQ
 80 CATTACCGAGTTATCCAACCTCCCAACCCCTGTGAATTATA L13.SEQ
 82 CATTACCGAGTTATCCAACCTCCCAACCCCTGTGAATTATA L15.SEQ
 60 CATTACCGAGTTATCCAACCTCCCAACCCCTGTGAATTATA L16.SEQ
 75 CATTACCGAGTTATCCAACCTCCCAACCCCTGTGAATTATA L17.SEQ
 62 --TCAAGCGGGTAGTCCCTAC--CTGATTTCGAGGTCAAACTATA L2.SEQ
 117 --TCAAGCGGGTAGTCCCTAC--CTGATTTCGAGGTCAAACTATA L20.SEQ
 80 --TCAAGCGGGTAGTCCCTAC--CTGATTTCGAGGTCAAACTATA L22.SEQ
 83 --TCAAGCGGGTAGTCCCTAC--CTGATTTCGAGGTCAAAGTTC L24.SEQ
 106 --TCAAGCGGGTAGTCCCTAC--CTGATTTCGAGGTCAAAGTTC L27.SEQ
 85 --TCAAGCGGGTAGTCCCTAC--CTGATTTCGAGGTCAAACTATA L3.SEQ
 117 CATTACCGAGTTATCCAACCTCCCAACCCCTGTGAATTATA L4.SEQ
 119 --TCAAGCGGGTTNTCCCTAC--CTGATTTCGAGGTCNACTATA L5.SEQ
 61 CATTACCGAGTTATCCAACCTCCCAACCCCTGTGAATTATA L6.SEQ
 62 CATTACCGAGTTATCCAACCTCCCAACCCCTGTGAATTATA L7.SEQ

...A.T.G...T...CGG...T...C.C.CG.CGG Consensus #1
 CCTTTAATTGTTGC-TTCGGCGGGACTTTCGCGCGCGCCGG Majority

170 180 190 200

124 CCTTTAATTGTTGC-TTCGGCGGGACTTTCGCGCGCCGG L10.SEQ
 101 CCTTTAATTGTTGC-TTCGGCGGGACTTTCGCGCGCCGG L11.SEQ
 109 CCTTTAATTGTTGC-TTCGGCGGGACTTTCGCGCGCCGG L13.SEQ
 122 CCTTTAATTGTTGC-TTCGGCGGGACTTTCGCGCGCCGG L15.SEQ
 100 CCTTTAATTGTTGC-TTCGGCGGGACTTTCGCGCGCCGG L16.SEQ
 115 CCTTTAATTGTTGC-TTCGGCGGGACTTTCGCGCGCCGG L17.SEQ
 99 AA--AAAGTTGGGGGGTTTTCAGTGGAC--CGCGCGCG L2.SEQ
 154 AA--AAAGTTGGGGGGTTTTCAGTGGAC--CGCGCGCG L20.SEQ
 117 AA--AAAGTTGGGGTTTTCAGTGGAC--CGCGCGCG L22.SEQ
 120 AG--AAAGTTGGGG-TGTTTTCAGTGGAC--CAGTTCGG L24.SEQ
 143 AG--AAAGTTGGGG-TGTTTTCAGTGGAC--CGCGTTCGG L27.SEQ
 122 AA--AAAGTTGGGGGGTTTTCAGTGGAC--CGCGCGCG L3.SEQ
 157 CCTTTAATTGTTGC-TTCGGCGGGACTTTCGCGCGCCGG L4.SEQ
 156 AA--AAAGTTGGGGGGTTTTCAGTNGAC--CGCGCGCG L5.SEQ
 101 CCTTTAATTGTTGC-TTCGGCGGGACTTTCGCGCGCCGG L6.SEQ
 162 CCTTTAATTGTTGC-TTCGGCGGGACTTTCGCGCGCCGG L7.SEQ

G...C...C...T...TA.T...A...G. Consensus #1
 GGACCCAAACCTTCTGAATTTTTTAATAAGCATCTTCTGA Majority

210 220 230 240

163 GGACCCAAACCTTCTGAATTTTTTAATAAGTATCTTCTGA L10.SEQ
 140 GGACCCAAACCTTCTGAATTTTTTAATAAGTATCTTCTGA L11.SEQ
 139 GGACCCAAACCTTCTGAATTTTTTAATAAGTATCTTCTGA L13.SEQ
 161 GGACCCAAACCTTCTGAATTTTTTAATAAGTATCTTCTGA L15.SEQ
 135 GGACCAAAACCTTCTGAATTTCTTTAATAAGATCTTCTGA L16.SEQ
 154 GGACCCAAACCTTCTGAATTTTTTAATAAGTATCTTCTGA L17.SEQ
 136 GCTCCTGTTGCGAGTGT-TTTACTACTGCGCAGAGGAGGG L2.SEQ
 191 GCTCCTGTTGCGAGTGT-TTTACTACTGCGCAGAGGAGGG L20.SEQ
 154 GCTCCTGTTGCGAGTGT-TTTACTACTGCGCAGANGAGGG L22.SEQ
 154 GGTTCCTGGTGCAGAGT--TGGATTACTACTGCGCAGANGTCG- L24.SEQ
 177 GGTTCCTGGTGCAGAGC--TGTATTACTACTGCGCAGAGGTCG- L27.SEQ
 159 GCTCCTGTTGCGAGTGT-TTTACTACTGCGCAGANGAGGG L3.SEQ
 195 GGACCCAAACCTTCTGAATTTTTTAATAAGTATCTTCTGA L4.SEQ
 193 GCTCCTGTTGCGAGTGT-TTTACTACTGCGCAGAGGAGGG L5.SEQ
 140 GGACCCAAACCTTCTGAATTTTTTAATAAGTATCTTCTGA L6.SEQ
 141 GGACCCAAACCTTCTGAATTTTTTAATAAGTATCTTCTGA L7.SEQ

Fig. 36 Continued

. . . . G T . . . T . . . A Consensus #1
 GT - GGT T A A A A A A A A C A - T G A A T C A A A A C T T T C A A C A A G C Majority

250 260 270 280

203 GT - GGT T A A A A A A A A N - T A A N T C A A A A C T T N C A A C A A - C L10.SEQ
 180 GT - GGT T A A A A A A A A - - T G A A T C A A A A C T T T C A A C A A - C L11.SEQ
 179 GT - GGT T A A A A A A A A A - T G A A T C A A A A C T T T C A A C A A - C L13.SEQ
 201 GT - GGT T A A A A A A A A A A - T G A A T C A A A A C T T T C A A C A A - C L15.SEQ
 178 N T T GGT T A A A A A A A A A A A T G A A T C A A A A C T T T C A A C A A C G L16.SEQ
 194 GT - GGT T A A A A A A A A A A - T G A A T C A A A A C T T T C A A C A A - C L17.SEQ
 175 C C A C G G C G A G A C C G C C A A T C A A T T T A A G G G A C G G C T G T G C L2.SEQ
 230 C C A C G G C G A G A C C G C C A A T C A A T T T A A G G G A C G G C T G T G C L20.SEQ
 193 C C A C G G C G A G A C C G C C A A T C A A T T T A A G G G A C G G C T G T G C L22.SEQ
 190 C C G C G G A G G G C C G C C A C T C C A T T T C A G G G C C G G C G G T G - L24.SEQ
 213 C C G C G G A C G G G C C G C C A C T C C A T T T C A G G G C C G G C G G T G - L27.SEQ
 198 C C A C G G C G A N A C C G C C A A T C A A T T T A A G G G A C G G C T G T G C L3.SEQ
 236 GT - GGT T A A A A A A A A - - A - T G A A T C A A A A C T N T C A A C A A - C L4.SEQ
 232 C C A C G G C G A G A C C G C C A A T T A A T T T A A G G G A C G G C T G T G C L5.SEQ
 180 GT - GGT T A A A A A A A A - - T G A A T C A A A A C T T T C A A C A A A C L6.SEQ
 181 GT - GGT T A A A A A A A A - - T G A A T C A A A A C T T T C A A C A A - C L7.SEQ

. G G C A . . . C . . . C . A . . Consensus #1
 GGATCTCTTGGTTCTGGCATCCATGAACAACGCAGCGAAA Majority

290 300 310 320

239 G G N T C T C T T G G T T C T G G C A T C A A T A A A A A A C N C A N C A A A A L10.SEQ
 215 G G A T C T C T T G G T T C T G G C A T C N A T G A A G A A C G C A G C G A A A L11.SEQ
 215 G G A T C T C T T G G T T C T G G C A T C G A T G A A N A A C G C A G C G A A A L13.SEQ
 238 G G A T C T C T T G G T T C T G G C A T C G A T G A A N A A C G C A G C G A A A L15.SEQ
 218 G G A T C T C T T G G T T C T G G C A T C N A T A A N A A C G C N G C G A A A L16.SEQ
 231 G G A T C T C T T G G T T C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A L17.SEQ
 215 T G G T A A A A C A G C C T C G C C G A T C C C C A A C A C C A A G T C C A C A L2.SEQ
 270 T G G A A A A C A G C C T C G C C G A T C C C C A A C A C C A A G T C C A C A L20.SEQ
 233 T G G A A A A C A G C C T C G C C G A T C C C C A A C A C C A A G T C C A C A L22.SEQ
 229 T G C T - - G C C G G T C C C - - C A A - C G C C A A C C T C - - - C T A A A L24.SEQ
 252 T G C T - - G C C G G T C C C - - C A A - C G C C G A C C T C - - - C C A A G L27.SEQ
 236 T G G T A A A A C A G C C T C G C C G A T C C C C A A C A C C A A G T C C A C A L3.SEQ
 271 G G A T C T C T T G G T T C T G G C A T C G A T G A A C A A C G C A T C G A A L4.SEQ
 272 T G G A A A A C A G C C T C G C C G A T C C C C A A C A C C A A G T C C A C A L5.SEQ
 215 G G A T C T C T T G G T T C T G G C A T C N A T G A A N A A C G C A G C G A A A L6.SEQ
 216 G G A T C T C T T G G T T C T G G C A T C G A T G A A N A A C G C A G C G A A A L7.SEQ

. . G . . T G . . A G C . . A Consensus #1
 - T G C G A T - A A G T A A T G T G A - A T T G C A G A A T T C A G T - G A A T Majority

330 340 350 360

275 - T G C H A T - A A H T N N T G T G A - A T T G C A G A A T T C A G T - G A A T L10.SEQ
 205 - T G C G A T - A A G T A A T G T G A - A T T G C A G A A T T C A G T - G A A T L11.SEQ
 255 - T G C G A T - A A G T A A T G T G A - A T T G C A N A A T T C A G T - G A A T L13.SEQ
 278 - T G C G A T - A A G T A A T G T G A - A T T G C A G A A T T C A G T - G A A T L15.SEQ
 258 A T G C C A T A A N T A T T G T G A - A T T G C A G A A T T C A G T T G A A T L16.SEQ
 271 - T G C G A T - A G G T A A T G T G A - A T T G C A G A A T T C A G T - G A A T L17.SEQ
 255 G G G G A C T T G A G G G G C G T A A T G A C G C T C G A C A N G C A T G C C L2.SEQ
 310 G G G G A C T T G A N G G G C G T A A T G A C G C T C G A A C A G G C A T G C C L20.SEQ
 272 G G G G A C T T G A G G G G C G T A A T G A C G C T C G A A C A G G C A T G C C L22.SEQ
 261 G G G A A G T C A A G G G T T G A A A T N A C G C T C G A A C A G G C N T G C C L24.SEQ
 264 G G G A G G T C G A G G G T T G A A A T G A C G C T C G A A C A G G C A T G C C L27.SEQ
 279 G G G G A C T T G A G G G G C G T A A T G A C G C T C G A A C A G G C A T G C C L3.SEQ
 311 - T G C G A T - A N G T A A T G T G A - A T T G C A G A A T T C A N T - G A A T L4.SEQ
 312 G G G G A C T T G A G G G G C G T A A T G A C G C T C G A A C G G G C A T G C C L5.SEQ
 256 - T G C G A T - A A G T A A T G T G A - A T T G C A G A A T T C A G T - G A A T L6.SEQ
 256 - T G C G A T - A A G T A A T G T G A - A T T G C A G A A T T C A G T - G A A T L7.SEQ

Fig. 36 Continued

C . . . C . . . A G G C . C . . T . . G C A T . C Consensus #1
 C A T C A A A T C T T T G A A - C G C G C A T T G C G C C C G T C A G T A T T C Majority

370 380 390 400

315 C N T C A A A T C T T T G A A - C G C N C A T T G C G C C C G T C A G T A T T C L10.SEQ
 291 C A T C G A A T C T T T G A A - C G C A C A T T G C G C C C G T C A G T A T T C L11.SEQ
 291 C A T C G A A T C T T T G A A - C G C A C A T T G C G C C C G T C A G T A T T C L13.SEQ
 314 C A T C G A A T C T T T G A A - C G C A C A T T G C G C C C G T C A G T A T T C L15.SEQ
 297 C N T C G A A T C T T T G A A A C G C N C N T T G C G C C C G T C A G T A T T C L16.SEQ
 307 C A T C G A A T C T T T G A A - C G C A C A T T G C G C C C G T C A G T A T T C L17.SEQ
 295 C A C C A G A A T A C T G A C G G G C G C A A T G T G C G T T C A A A G A T T C L2.SEQ
 350 C G C C A G A A T A C T G A C G G G C G C A A T G T G C G T T C A A A G A T T C L20.SEQ
 313 C G C C A G A A T A C T G A C G G G C G C A A T G T G C G T T C A A A G A T T C L22.SEQ
 301 C G C C A A A A T G C T G G C G G G C G C A A T N T G C N T T C A A A A A T N C L24.SEQ
 324 C G C C A G A A T G C T G G C G G G C G C A A T G T G C G T T C A A A G A T T C L27.SEQ
 318 C G C C A G A A T A C T G A C G G G C G C A A T G T G C G T T C A A A N A T T C L3.SEQ
 347 C A T C G A A T C T T T G A A - C G C A C A T T G C G C C C G T C A N T A T T C L4.SEQ
 352 C G C C A G A A T A C T G A C G G G C G C N A T G T G C G T T C A A A G A T T C L5.SEQ
 292 C A T C G A A T C T T T G A A - C G C A C A T T G C G C C C G T C A G T A T T C L6.SEQ
 292 C A T C N A A T C T T T G A A - C G C A C N T T G C G C C - G T C A G T A T T C L7.SEQ

. . . T C T . C C . T . . C C . C A Consensus #1
 - - T G G C G G G C A T G C C T G T T C G A T C G T C A T T A C G C C C C T C A Majority

410 420 430 440

354 - - T G G C G G G C A T G C C T G T T C N A G C G T C N T T A C G C C C C T C A L10.SEQ
 330 - - T G G C G G G C A T G C C T G T T C G A G C G T C A T T A C G C C C C T C A L11.SEQ
 330 - - T G G C G G G C A T G C C T G T T C G A G C G T C A T T A C G C C C C T C A L13.SEQ
 353 - - T G G C G G G C A T G C C T G T T C G A G C G T C A T T A C G C C C C T C A L15.SEQ
 337 - - T G G C G G G C A T N C C T G T T C N A C C G T C N T A A C G C C C C T C A L16.SEQ
 346 - - T G G C G G G C A T G C C T G T T C G A N C G T C A T T A C G C C C C T C A L17.SEQ
 325 G A T G A T T C A C T G A A T T C T G C A A T T C A C A T T A C T T A T C G C A L2.SEQ
 389 N A T G A T T C N C T G A A T T C T G C A A T T C A C A T T A C T T A T C G C A L20.SEQ
 352 G A T G A T T C A C T A A A T T C T G C A A T T C A C A T T A C T T A T C G C A L22.SEQ
 341 A A T A A T C C A C T G N A T N C T N C A A T N C A C A T T A C T T A T C N C A L24.SEQ
 364 G A T G A T T C A C T G G A T T C T N C T N T T C A C A T T A C T T A T C G C A L27.SEQ
 358 G A T G A T T C A C T G A A T T C T G C A A T T C A C A T T A C T T A T C G C A L3.SEQ
 336 - - T N G C G G G C A T G C C T G T T C G A G C G T C A T T A C G C C C C T C A L4.SEQ
 392 G A T G A T T C A C T G A A T T C T G C N A T T C A C A T T A C T T A T C G C A L5.SEQ
 331 - - T G G C G G G C A T G C C T G T T C G A G C G T C A T T A C G C C C C T C A L6.SEQ
 330 - - T G G C G G G C A T G C C T G T T C G A G C G T C A T T N C G C C C C T C A L7.SEQ

. . . C . C T C T C C Consensus #1
 A T T C C C C - T G T G G T A C - T T G G T G T T G G G G A T C A G C A A A G C Majority

450 460 470 480

392 A G T C C C C - T G T G G - A C - T T G G T G T T G G G G A T C G G C G A A G C L10.SEQ
 368 A G T C C C C - T G T G G G A C - T T G G T G T T G G G G A T C G G C G A A G C L11.SEQ
 388 A G T C C C C - T G T G G - A C - T T G G T G T T G G G G A T C G G C G A A G C L13.SEQ
 391 A G T C C C C - T G T G G - A C - T T G G T G T T G G G G A T C G G C G A A G C L15.SEQ
 375 A T T C C C C - T G T G G - A C - T T G G T G T T G G G G N T C G G N A A G G C L16.SEQ
 384 A G T C C C C - T G T G G - A C - T T G G T G T T G G G G A T C N G C G A A G C L17.SEQ
 375 T T T C G C T G C G T T C T T C A T C G A T G C C A G A A - C C A A G A G A T C L2.SEQ
 429 T T T C G C T G C G T T C T T C A T C G A T G C C A G A A - C C A A G A G A T C L20.SEQ
 392 T T T C G C T G C G T T C T T C A T C G A T G C C A G A A - C C A A G A G A T C L22.SEQ
 381 T T N C G C T H C N T N C I A N C A A T G C C A A A A N C C A A A A A A T C L24.SEQ
 404 T T T C G C T G C G T T C T T C A T C N A T G C C A N A - G C C A A G A G A T C L27.SEQ
 398 T T T C G C T G C G T T C T T C A T C G A T G C C A G A A - C C A A G A G A T C L3.SEQ
 424 A G T C C C C - T G T G G G A C - T T G G T G T T G G G G A T C C G C G A N G C L4.SEQ
 432 T T T C G C T G C G T T C T T C A T C G A T N C C A G A A - C C A A G A G A T C L5.SEQ
 369 A G T C C C C - T G T G G G A C - T T G G T G T T G G G G A T C G G C G A A G C L6.SEQ
 368 A G T C C C C - T G T G G - A C - N T G G T G T T G G G G A T C N G C N A A G C L7.SEQ

Fig. 36 Continued

Percent Similarity

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
1	█	92.0	93.7	90.2	74.7	89.5	22.0	18.7	21.1	19.4	22.5	21.8	88.0	20.6	90.9	89.4	1	L10.SEC
2	1.7	█	96.7	94.6	75.6	94.1	23.1	21.6	23.4	24.3	23.8	22.4	94.6	22.1	97.2	93.9	2	L11.SEC
3	1.7	0.0	█	95.6	77.0	95.3	23.2	21.5	23.0	20.6	21.8	22.7	92.0	22.0	94.6	93.9	3	L13.SEC
4	2.4	1.0	0.9	█	76.1	95.6	23.9	20.4	22.7	24.1	23.4	23.4	90.4	22.7	92.7	91.5	4	L15.SEC
5	4.6	4.5	4.5	4.0	█	75.4	19.8	20.5	21.8	20.0	19.0	19.1	73.9	19.8	76.6	75.0	5	L16.SEC
6	3.2	1.2	1.2	0.7	4.5	█	21.5	19.0	20.4	23.7	23.4	20.8	89.7	21.8	91.8	92.0	6	L17.SEC
7	47.4	45.7	45.7	45.3	47.1	44.5	█	93.5	95.6	59.4	67.1	98.4	22.8	94.2	22.9	21.7	7	L2.SEQ
8	47.9	46.0	46.0	45.6	47.4	44.8	1.4	█	97.0	56.3	64.2	92.8	21.8	90.0	19.6	20.8	8	L20.SEC
9	49.4	47.9	48.1	48.1	50.1	47.4	1.4	0.5	█	51.0	53.8	95.1	22.8	91.4	22.9	22.2	9	L22.SEC
10	52.7	50.6	50.6	50.5	51.7	50.1	17.9	17.8	22.8	█	75.1	59.9	23.0	56.0	22.2	22.4	10	L24.SEC
11	51.0	48.8	48.7	48.7	50.5	48.1	15.0	15.0	19.9	8.8	█	66.7	22.8	64.0	24.5	22.6	11	L27.SEC
12	47.8	45.8	45.8	45.4	47.3	44.6	0.2	1.2	1.2	17.3	14.8	█	22.5	93.7	22.9	21.5	12	L3.SEQ
13	2.5	1.4	1.2	1.7	4.8	2.2	45.2	45.8	48.1	51.1	48.6	45.6	█	21.8	93.0	89.2	13	L4.SEQ
14	47.6	45.7	45.7	45.4	46.9	44.5	1.5	1.2	2.4	20.0	16.5	1.2	45.3	█	22.4	21.5	14	L5.SEQ
15	1.0	0.0	0.0	1.0	4.3	1.2	45.7	46.0	48.3	50.6	49.1	45.8	1.0	45.5	█	92.2	15	L6.SEQ
16	1.0	0.0	0.0	1.0	3.8	1.2	45.9	46.3	48.1	50.7	48.8	46.1	0.7	45.9	0.0	█	16	L7.SEQ
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		

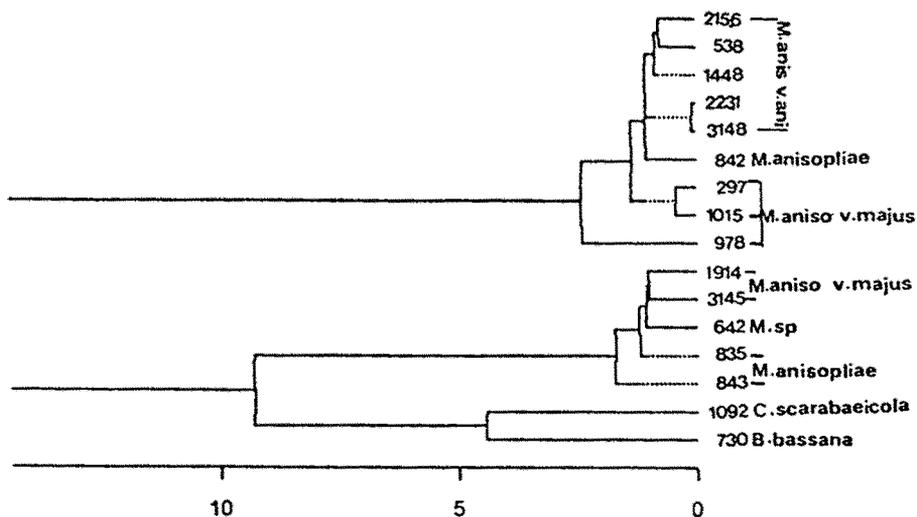


Fig. 37 Comparison of nucleotide sequence at ITS I and II region of Metarhizium species

3. 균주의 장기보존법 개발

저장기간, 저장방법에 따라 균주의 회복력을 검정, 최적의 저장방식을 개발, 채택하여 동충하초속균 235균주의 보존을 다음과 같이 동결건조 및 진공건조를 실시하여 동결건조는 235균주 중 213균주가 보존에 성공하여 90%의 성공률을 진공건조는 235균주 중 222균주가 보존에 성공하여 94%의 성공률을 얻을 수 있었다.(Table 7) 동결건조방법이 진공건조 방법보다 생존율이 낮은 것은 예비동결시 -20℃까지의 냉각시간이 생존율에 영향을 주는 것으로 판단되며, 각 속별로 분산매의 사용 종류 (skim milk, DMSO, 말혈청) 및 농도(10% 15%, 20%)를 달리하여 최적 분산매의 선발과 예비냉각의 속도도 달리하여 보다 높은 생존율과 균주의 보존안정성을 높일 수 있으리라 생각되며, 진공건조 방법은 초기의 생존율에서는 동결건조 보다 높은 생존율을 나타내고 있지만 보존의 기간 즉 장기간의 보존에서는 동결건조방법이 더 높은 기간의 생존율을 나타낼 것으로 판단된다. 특히 *Paecilomyces* 속의 경우 두가지 방법 모두에서 가장 낮은 생존율을 보임으로써 이속에 대해서는 기존의 처리 방법보다는 다른 처리 방법의 모색이 필요하다고 사료된다.

Table 7. Results of experiment of long-term preservation methods of entomopathogenic fungi

	총실험균주	사 멸	생 존 율(%)	보관 균주
<i>Cordyceps</i> sp.	96	8	95	88
<i>Paecilomyces</i> sp.	71	11	84	60
<i>Metarhizium</i> sp.	44	2	95	42
<i>Beauveria</i> sp.	24	1	95	23
총 계	235	12	90 %	213 균주

	총실험균주	사 멸	생 존 율(%)	보관 균주
<i>Cordyceps</i> sp.	91	2	97	89
<i>Paecilomyces</i> sp.	75	8	90	67
<i>Metarhizium</i> sp.	43	1	97	42
<i>Beauveria</i> sp.	26	2	92	24
총 계	235	13	94 %	222 균주

제4절 종합고찰

본 연구 수행중 수집된 곤충기생균은 전국 56개 채집지역에서 약 11속 67종 1795 개체를 수집하였다. 채집된 곤충기생균은 1785개체가 곤충류를 기주로 하고 있었으며 10개체는 거미류를 기주로 하고 있었다. 불완전균류중 대표적인 *B. bassiana*는 Coleoptera, Othoptera, Homoptera 등 광범위한 기주범위를 가지고 있었다. 그외에도 녹강균(*M. anisopliae*)은 인시목의 유충을 기주로 51개체가 채집되었으며 *Paecilomyces*속은 전역에 걸쳐 한국명 눈꽃동충하초인 *P. tenuipes*가 255개체로 가장 많이 채집 되었다. 곤충기생균의 완전세대를 형성하는 동충하초의 자실체에 주로 기생하며 두부에 구형의 포자 덩어리를 형성하는 *Polycephalomyces*속균의 경우 34개체가 채집되었으며 *P. ramosus* 33개체, *P. cylindroporus* 1개체로 동정되었다. 또한 그 시기별의 분포양상은 기주가 되는 *Cordyceps*속균의 분포양상과 밀접한 관련이 있음을 알 수 있었다. 그 밖에 *Hirsutella*속으로 *H. clavulata*, *H. clvispora*를 비롯하여 5개체가, *Verticillium*속으로 *V. indicum*, *V. lecanii*를 비롯하여 3개체가 채집되었고 *Nomuraea*속으로 *N. rileyi* 1개체 채집되는 등 총 37종이 본 연구수행과정 중에 새롭게 조사되었다. 이들은 본 연구를 통하여 채집되고 동정된 종으로 이들 연구를 기초로하여 앞으로 연구가 활발하게 진행되리 본다.

채집된 곤충기생균의 분리를 위하여 첨가제인 CuSO_4 를 200mg와 gentamicin를 첨가하면 *Cordyceps*속을 비롯한 다른 불완전세대형의 선택적 분리가 가능하였고 세균에 의한 배지오염을 막아주었다. 이제까지는 세균의 오염을 막기위하여 penicillin이나 streptomycin을 사용하여 왔으나 고온에 약한 단점이 있었는데 곤충기생균을 분리하고 배양하는데 SDAY에 CuSO_4 와 gentamicin을 첨가한 배지는 세균과 곰팡이 오염으로부터 각각 3%, 8%의 오염율을 가지므로써 최적의 곤충기생균 분리용 선택배지로 채택할 수 있었다.

채집된 곤충기생균은 다양한 속에 걸쳐 발생하였는데 *Cordyceps*속의 불완전세대는 *Paecilomyces*, *Beauveria*, *Hirsutella*, *Verticillium*, *Hymenostilbe*, *Akanthomyces* 등의 속에 관련되어 있는 것이 밝혀졌다. *Cordyceps*속균중 *C. militaris*, *C. kyushuensis*, *C. roseostromata*, *C. martialis*에서 *Verticillium*속의 불완전세대가 관찰되어 하나의 형태학적 분류군으로 묶을 수 있었다.

*Beaveria*속균 중에 *B. bassiana*의 분생포자는 공모양이거나 반구형, 직경 $3.5\mu\text{m}$

이하 이었다. *B. brongniartii*는 포자가 긴 난형으로 실린더 형이고 직경 2.5-4.5 μ m였다. 그외에도 형태적인 특징에 따라 *B. velat*와 *B. caledonica*로 나눌수 있고 *Metarhizium*속균에서도 *M. anisopliae* var. *anisopliae*와 *M. anisopliae* var. *majus*로 분류 할 수 있어 이러한 형태적 차이로 곤충기생균을 분류하고 동정하므로써 이에 대한 전문가의 양성이 필요하다고 생각된다.

Cordyceps 속균과 *Beauveria*속균간의 관계는 퐁뎡이동충하초(*C. scarabaeicola*)는 *Beauveria*속의 불완전세대를 갖는다는 사실을 증명하였고 SEM검경을 통하여 *Beauveria*속균의 형태적인 다형화현상을 관찰할 수 있었다. *C. staphylindaeicola*의 경우 *Beauveria*속균의 불완전세대를 갖는 것으로 밝혀졌다. 이는 *B. brongniartii*에 이어 새로운 *Beauveria*속균의 완전세대형으로 최초로 보고로 본 연구에서 얻은 커다란 업적으로 평가 된다.

곤충기생균의 배양적 특성은 Hamada배지로 14일 후 분생포자 형성율이 6.0×10^8 에 이를 정도로 가장 우수하였고 합성배지인 SDAY에서도 높은 포자형성율이 관찰되었으므로 제한된 범위내의 순수 포자 확보가 가능하게 되었다. 이로 인하여 향후 장기 보존 실험이나 살충력 실험등의 순수 분생포자를 이용하는 실험에 효율적으로 이용할 수 있게 되었다. 또한 배지에 따라 배양중에 생성되는 결정의 유무와 다형화현상 조사결과 *B. bassiana*, *B. brongniartii*(USDA)의 *Beauveria*속 2종에서는 PDA와 Malt 배지에서 모두 Cubic, Bipyrmid형의 결정이 관찰되었고 *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. anisopliae* var. *majus*, *M. album*, *M. flavoviride*, 그리고 중국에서 분양받은 *M. taii*의 5균주 전체가 모두 PDA에서는 Styloid형의 Malt배지에서는 Cubic, Bipyrmid형의 결정체가 관찰되었다. 두 속간의 차이는 분명했으며 개체간의 변이도 발견할 수 없었다. 이러한 방법을 통하여 곤충기생성 곰팡이에 대해 결정생성 유무실험이 최초로 이루어 졌으며 곤충기생균의 생리적인 특성에 의한 새로운 분류체계의 개발이 가능하리라 사료된다. 또한 SDAY배지상에서 26 $^{\circ}$ C의 온도로 2-3개월 배양하였을때 종에 따라 다양한 분생자경을 발생시켰다. 대표적인 분생자경 형성속으로 *Hirsutella*, *Paecilomyces*, *Akanthomyces*, *Tilaclidium*등이 조사되었다.

분자수준의 분류체계 확립으로 동위효소분석장치(IEF)를 이용한 분자수준의 분석으로 Esterase처리에서 *Beauveria*, *Verticillium*, *Metarhizium*와. *Paecilomyces*속 내에서도 다양한 밴드가 나타났고 동일한 종으로 판명되지는 못하였지만 기주가 번

데기인 C825, C709, C710은 약간의 유사성을 보였다. Acid phosphatase와 Malate dehydrogenase에서도 같은 결과를 얻었다.

PCR-RFLPs기법을 이용한 *Metarhizium*속내의 변종 간의 유전적 지표탐색을 하였는데 *M. anisopliae* var. *majus*에서만 나타난 113과 48 bp 절편들은 *M. anisopliae* var. *anisopliae*의 161 bp 절편 내에 또 하나의 추가된 MboI site에 기인한다고 할 수가 있다. 이러한 양상은 본 연구에 사용된 균주의 채집된 장소나 기주에 관계없이 일정하게 나타났다. 이상과 같이 본 연구기간 세계 여러 지역과 다양한 기주에서 확보된 *M. anisopliae*의 변종 특이적인 유전자지표 탐색을 위하여 ribosomal DNA (ITS-28S rDNA) 유전자에 대한 PCR-RFLPs를 실시한 결과 MboI 제한효소에서 *M. anisopliae* var. *majus* 특이적인 유전자지표를 탐색하는데 성공하였다. 이러한 결과는 미생물상 통제개발을 위하여 *M. anisopliae*에 속하는 변종들의 정확한 사용에 많은 보탬이 되리라 기대된다.

염기서열 분석을 통한 *Metarhizium anisopliae*의 종내 변이주간의 분류는 증폭된 PCR 단편들의 크기는 약 500bp로 확인 되었으며, 분석결과 *M. anisopliae* var. *anisopliae*는 그 유사도가 매우 높았으나 *M. anisopliae* var. *majus*의 경우 그룹간에 상당히 낮은 유사도를 보여주었다. 이러한 결과는 *Metarhizium*속균의 변종이 완전히 분화되지 않은 집단이라는 사실을 증명하고 있으며 이로 인한 분류체계의 난점을 확인할 수 있었다. 본 실험결과는 *M. anisopliae*에 속하는 변종들의 정확한 분류 동정과 그 사용에 있어서 많은 보탬이 되리라 기대되며 향후 더 많은 균주와 DNA지역을 대상으로 접근을 할 가치가 있다고 사료된다.

균주의 장기보존법 개발에서는 저장기간, 저장방법에 따라 균주의 회복력을 검정, 최적의 저장방식을 개발, 채택하여 동충하초속균 235균주의 보존을 다음과 같이 동결건조 및 진공건조를 실시하여 동결건조는 235균주 중 213균주가 보존에 성공하여 90%의 성공률을 진공건조는 235균주 중 222균주가 보존에 성공하여 94%의 성공률을 얻을 수 있었다. 낮은 생존율을 나타내는 *Paecilomyces*의 경우에는 다른 나라에서 사용하고 있는 액체질소를 이용한 보존법이 바람직하지 않나 생각되어 진다.

본 연구를 통하여 국내 곤충기생균의 정확한 분포 및 생태에 관한 자료를 확보할 수 있었으며 다수의 소중한 유전자원의 분리에 성공하여 향후 수행될 연구에 유용하게 사용될 수 있을 것이다. 또한 점차 감소해가고 있는 한국산 유전자원의 수집 및

보존을 위하여 지속적인 관심과 지원을 희망한다.

제5절 적요

본 연구에서는 차후 개발계의 실용적 사용과 보존 및 살충능력을 향상시키기 위하여 균에 대한 형태학적 정보 및 생리, 생태학적 정보 축적하고 곤충기생균을 비롯한 국내 분포하는 미생물 유전자원을 수집, 분리 및 정확한 동정을 통하여 환경오염으로 인한 생물다양성 연구 및 자원을 확보하며 미생물 살충제의 소재개발 및 그 사용에 대한 기초자료의 구축을 목적으로 수행되었다. 또한 채집된 곤충기생균의 분리방법이 체계화 되어 있지 않은 관계로 좀더 신속하고 정확한 분류동정을 뒷받침해 줄 수 있는 분리방법을 개발하였다. 채집된 곤충기생균의 분류 동정 체계가 확립되어 있지 않아 이들 균주에 대한 형태적, 미세구조적인 연구를 통하여 국내산 곤충기생균의 분류 동정 체계의 확립이 시급하며 최근 식품, 의학적으로 산업적 가치가 인정되고 있는 곤충기생성 곰팡이의 완전세대인 동충하초의 분리, 수집을 통한 유용 유전자원 보존이 필요하다. 그러므로 보존자원의 정확한 정보체계를 구축하기 위한 방편으로 곤충기생균의 미세구조의 형태학적 검경을 통하여 정확한 곤충기생균의 분류체계를 구명하였다. 또한 불완전세대 균의 다형화 현상으로 인하여 형태적 분류에 많은 어려움이 있으므로 생화학적 특성중 동위효소 분석장치(Iso Electric Focusing)와 PCR-RFLPs를 통하여 곤충기생균 상호간의 유사성과 다양성을 비교, 동정하였다. 곤충기생균의 장기 보존을 위해서는 포자 저장법과 균사체 저장법이 있으나 일반적으로 포자저장법을 선호하는 경향으로 다량의 포자를 인위적으로 발생 유도하기 위한 효과적인 배양적 특성이 구명되어야 한다. 미생물 제제에 사용되고 있는 곤충기생균은 대부분이 활발한 포자형성 능력을 가지고 있고 이러한 사실은 해충에 대한 살충력과도 연관이 있으므로 실내 복합배지 실험을 통하여 포자형성 우수배지를 선발하고 수집된 균주의 보존 실험을 실행하였다.

제 3 장 미생물 살충제 효능검정에 관한 연구

제1절 서론

화학 공업의 발달과 함께 고속 성장 해온 것이 바로 유기합성 농약이다. 이 유기합성 농약은 금세기 초부터 엄청난 인구 증가로 감당하기 어려웠던 식량자원의 생산량을 늘이는데 큰 공헌을 해왔다. 그러나 유기합성 농약의 과다한 사용의 폐해는 이미 알려진 바와 같이 자연계에서의 난분해성 성분의 잔류와 잔류성분에 포함된 중금속에 의한 농산물 및 지하수의 오염으로 인하여 인간 생존권에 대한 위협뿐만 아니라 생물들을 무분별하게 치사하게 함으로써 생태계를 파괴하고있다. 이러한 이유로 1992년 6월 Rio 환경 회의를 시발로 2004년까지 유기합성농약의 사용량을 반으로 줄이기로 국가간 협약을 체결하였다. 따라서 일부 선진국가에서는 환경친화적인 생물농약 개발에 많은 연구를 수행 중에 있으며, 일부 병해충에 대한 생물농약 개발을 완성하여 시판 중인 국가도 있다. 그러므로 생물농약 개발을 무시하고 유기합성 농약에만 의존하는 국가들은 향후 생물농약을 이미 개발한 국가들의 횡포성 규제에 큰 타격을 입을 것으로 예상된다. 이러한 국제적 동향에 대처하기 위해서는 국내 자연환경에 잘 적응된 토착 병해충 병원성 미생물의 자원확보가 시급한 실정이다.

지금까지 선진국에서 개발한 무공해 농약 중 가장 대표적인 것이 미생물 살충제인데, 포자를 포함하는 미생물 자체를 직접 이용하거나 미생물이 분비하는 물질을 이용하여 농작물에 피해를 유발하는 온실가루이, 응애, 진딧물 등의 해충을 방제하는데 큰 효과가 있는 것으로 보고되었다. 대표적인 곰팡이 균주로는 *Metarhizium*, *Aschersonia*, *Verticillium*, *Beauveria*에 속하는 종들을 사용하고 있으며, 일부 선진국에서는 이러한 곰팡이를 이용하여 미생물 농약을 개발하여 상품화한 상태이다. 하지만 실제로 미생물 살충제로 사용되고있는 곤충병원성 곰팡이는 10여종에 불과하다. 이렇게 적은 수의 종만이 산업적으로 이용되는 주원인은 다양한 곤충병원성 곰팡이자원의 조사 및 수집이 미진하기 때문이다. 현재 지구상에는 약 5,000여종의 곤충병원성 곰팡이가 자생한다고 추정되나 문헌에 기록된 수는 약 800종에 불과하다. 국내의 곤충병원성 곰팡이에 관한 연구는 채집의 어려움과 분류의 난점

등으로 인하여 국내 토착 농업해충 병원성 곰팡이에 대한보고는 수 종에 불과한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 국내외에서 수집된 곤충병원성 곰팡이 균주 중 채소 및 화훼류에 심각한 피해를 주고 있는 파밤나방, 담배거세미나방, 배추좀나방, 과수의 약제로 방제가 어려운 점박이 응애, 벼에 있어서 주요한 해충인 벼멸구 등에 우수한 살충력을 지닌 균주를 실내검정에서 선발한 후 그 균의 방제효과를 온실 및 포장에서 조사하였으며, 또한 원활한 시험해충 제공 및 생물검정을 위하여 주요 나방 사육에 적합한 인공사육배지를 개발하였다.

제2절 재료 및 방법

1. 곤충병원성 곰팡이의 배양

생물검정에 사용된 *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* 균주는 강원대학교 농생물학과 성재모 박사로부터 분양 받았고 *Nomuraea rileyi*는 농과원 농업해충과에서 파밤나방으로부터 분리하였다. 곰팡이의 배양은 Sabouraud dextrose yeast agar(SDY) 배지(40g dextrose, 10g yeast, 10g peptone, 15g agar/L)에 균사체를 접종한 후 25℃에서 포자가 형성될 때까지 하였다.

2. 시험곤충의 사육

생물검정에 사용된 벼멸구(*Nilaparvata lugens*)는 농업과학기술원에서 1990년부터 추청벼를 기주로 약제에 노출되지 않게 25±2℃, 상대습도 60±5%, 광주기 16L:8D 조건하에서 누대 사육해온 계통을 사용하였다. 점박이응애(*Tetranychus urticae* Koch)는 1993년 일본 Chiba 대학의 Motoyama 박사로부터 분양 받은 것으로서, 강남콩을 기주로 약제에 노출시키지 않고 25±1℃, 상대습도 40-60%, 광주기 16L:8D, 조명 2500-5000 Lux 조건하에서 누대 사육한 계통을 사용하였다. 배추좀나방은 유채 유묘를 기주로 하여 25±1℃, 상대습도 40-60%, 광주기 16L:8D, 조명 2500-5000 Lux 조건에서 누대 사육하였으며, 담배나방, 담배거세미나방, 파밤나방은 인공사료를 이용하여 25±1℃, 상대습도 60±5%, 광주기 16L:8D 조건하에서 사육하였다.

3. 실내 생물검정

가. 우수균주 선발

생물검정은 대상층에 따라서 각기 다른 방법을 사용하였다. 포자현탁액은 0.03% Triton X-100 용액으로 포자를 균일하게 섞은 후, hemacytometer를 이용하여 원하는 포자 농도로 제조하였다. 벼멸구와 점박이용애는 10^6 conidia/ml 포자현탁액 2ml을 간이 spray tower를 이용하여 분무 처리하였으며, 생물검정에 사용된 포자현탁액은 포자를 0.03% Triton X-100 용액으로 현탁한 다음 hemacytometer를 이용하여 농도를 10^6 conidia/ml이 되게 하였다. 배추좀나방, 담배나방, 담배거세미나방, 파밤나방은 2-3령 중 50마리당 10^6 conidia/ml 포자현탁액 30ml을 휴대용 분무기로 분무 처리하였다. 배추좀나방의 사료로는 배추를 사용하였으며 그 외 나방은 인공사료를 사용하였다. 포자 현탁액이 접종된 시험층은 사육상에서 25℃와 상대습도 85%이상에서 사육을 하였으며, 각각의 처리구를 매일 조사하여 사충 수를 기록하였다.

나. 선발된 균주의 LC_{50} , 총체표면의 포자 수와 살충율과의 연관성, LT_{50}

예비 실험에서 배추좀나방에 우수 살충력을 지닌 백강균 726균주의 LC_{50} 을 계산하기 위하여 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 conidia/ml 포자현탁액을 제조한 후, 각각 15ml을 분무 처리하였다. 처리된 층의 수는 농도별 2령중 28마리이었으나 25마리만을 사육상에서 사육을 하였다. 나머지 3마리는 총체표면에 붙은 포자 수와 살충율과의 연관성 조사를 위하여 사용하였다. 이를 위하여 각각의 층을 0.01 M buffer-Tween 0.5 ml과 함께 마쇄하여 oatmeal-dodine agar 배지에 도말한 후 25℃에서 균총(colony)이 나타날 때까지 배양하였으며, 나타난 총 균총 수를 포자 수로 간주 하였다.

백강균 726균주의 배추좀나방에 대한 정확한 살충율과 LT_{50} 을 계산하기 위하여 포자현탁액 50 ml을 2령중 100마리에 분무한 후 위와 동일한 방법으로 생물검정을 2회 실시하였다. 모든 생물검정 실험에서의 무처리구는 포자를 제외한 0.03% Triton X-100 용액을 사용하였으며, 살충율은 무처리 대비 보정살충율을 다음과 같은 Abbott's식을 이용하여 구하였다.

Abbott's corrected mortality

$$\text{mortality of treatment} - \text{mortality of control} \\ = \frac{\text{mortality of treatment} - \text{mortality of control}}{100 - \text{mortality of control}} \times 100$$

4. 온실 실험

우수 균주로 선발된 백강균 726의 온실환경에서의 배추좀나방에 대한 방제효과를 조사하기 위하여 1997년 7월 초순에 온실 실험을 수행하였다. 이를 위하여 각각의 포트에서 재배한 배추 5주에 배추좀나방 난을 접종한 후 2령충이 될 때까지 온실에서 사육하였다. 충의 수는 포자현탁액 분무 전에 조사였으며 배추 1주당 50ml의 포자현탁액(10^8 conidia/ml)을 휴대용 분무기로 분무한 후 1, 3, 5일마다 생충수를 조사하였다. 무처리구는 포자를 제외한 0.03% Triton X-100 용액을 사용하였으며, 이와 같은 실험을 2회 실시하였다.

5. 포장 실험

백강균 726의 포장에서 방제효과를 검정하기 위하여 1998년 9월 13일부터 7일간 농과원 시험포장에서 실험을 실시하였다. 시험포장 면적은 처리구와 무처리구 각각 5 x 6 m이었으며 두 구간의 거리는 약 50 m이었고 각각의 구에서 배추 60주씩을 재배하였다. 또한 각각의 배추에 배추좀나방 난을 접종하여 2령충이 된 후 각각의 구에서 무작위로 배추 30주를 선택하여 충의 밀도를 조사하였다. 포자현탁액(10^8 conidia/ml)은 1.5% (v/v) 대두유, 2% 점토와 혼합하였으며, 0.55 L/3.3 m²의 양으로 분무 처리한 후 1, 3, 5, 7일에 생충수를 조사하였다.

포장에서의 포자 지속성을 조사하기 위하여 분무 처리 후 즉시 그리고 1, 3, 5, 7일에 처리구에서 배추좀나방 유충 9마리와 배추잎 3장을 채취하여 위와 동일한 방법으로 균총 수를 조사하였다. 또한 포장과 실내에서의 살충율을 비교하기 위하여 분무 처리 후 처리구와 무처리구 각각에서 60마리씩 취하여 위와 동일한 방법으로 실내검정을 실시하였다. 실험기간 중 시간당 총 일사량(300-2800 nm), 온도, 상대습도 등을 농과원 기상대에서 기록하였다.

제3절 결과 및 고찰

1. 실내 생물검정

가. 나방류의 인공사육기술 개발 및 우수균주 선발

주요 나방의 적합한 인공사육배지를 표1에서와 같이 개발함으로써 생물검정을 위한 실험에 시험해충을 원활히 제공할 수 있게되었다. 국내외에서 수집된 곤충병원성 곰팡이 균주 중 채소 및 화훼류에 심각한 피해를 주고 있는 파밤나방, 담배거세미나방, 배추좀나방, 과수의 약제로 방제가 어려운 점박이 응애, 벼에 있어서 주요한 해충인 벼멸구 등에 우수한 살충력을 지닌 균주를 실내검정에서 선발한 결과 백강균(*B. bassiana*)의 벼멸구, 점박이 응애, 파밤나방, 담배나방, 담배거세미나방에 대한 살충력이 전반적으로 저조하였으나, 백강균 726균주는 배추좀나방에 대해서는 86.2%의 살충율과 1.63일의 반수치사시간(LT₅₀)을 보였고 파밤나방과 담배거세미나방에 대하여 처리 후 10일째에 각각 64%, 25.8%의 살충율을 보였다(표 2). 따라서 백강균 726균주가 배추좀나방 방제용 미생물살충제의 가능성을 보였다.

녹강균(*M. anisopliae*)은 본 시험에 사용된 모든 시험해충에 대한 살충력이 백강균보다 저조하여 녹강균을 이용한 미생물살충제 개발의 가능성이 희박함을 알 수 있었다. 그 중에서 녹강균 C455, C457, C458균주가 점박이응애에 대하여 약 40%의 살충력을 나타내었다(표 3). *Nomuraea rileyi* 925균주의 경우 파밤나방에 대한 살충율이 61%로 백강균과 비슷하였으나 녹강균보다는 높았다(표 4). *Nomuraea rileyi*를 이용하여 담배거세미나방 방제용 미생물살충제 개발을 위해서는 우수균주 수집이 필요하리라 사료된다.

나. 선발된 균주의 LC₅₀, 증체표면의 포자 수와 살충율과의 연관성, LT₅₀

예비 실험에서 배추좀나방에 우수 살충력을 지닌 백강균 726균주의 LC₅₀을 계산하기 위하여 포자현탁액을 농도별($10^4 \sim 10^7$ conidia/ml) 처리한 결과 LC₅₀이 6.4×10^6 conidia/ml 이었으며 농도별 살충율은 표 5에 나타내었다. 각각의 농도에서 증체표면에 붙는 포자 수와 살충율과의 관계를 Duncan test로 분석한 결과 표 5에서와 같이 $10^4 \sim 10^6$ conidia/ml 농도간에는 살충율 또는 증체표면에 붙는 포자 수가 차이가 없었으나 10^7 conidia/ml에서는 살충율이 68%로 현저히 증가하였으며 이러한 결과

는 10^7 conidia/ml에서 총체표면에 붙는 포자 수가 1800개로 급격히 증가하기 때문임을 알 수 있었다. 또한 실험실 조건에서 88%의 살충율을 얻기 위해서는 적어도 9800개의 포자가 붙어야 하며 배추좀나방의 효과적인 방제를 위해서는 포자농도가 적어도 10^8 conidia/ml이 되어야함을 본 실험에서 알 수 있었다. 포자현탁액 농도 10^8 conidia/ml에서의 반수치사시간(LT_{50})을 조사하기 위하여 배추좀나방 2령충 200마리에 대한 살충율을 일수별 조사한 결과 표 5와 그림 1에서와 같이 살충율은 86.2%이었고 반수치사시간은 1.63일임을 알 수 있었으며 이러한 수치는 백강균 726균주가 신속하게 충을 감염시킬 수 있는 강한 병원성을 지님을 의미하였다.

Table 1. 파밤나방 및 담배거세미나방 인공사료 조성

배지성분	적정량
강낭콩	150.0 g
맥아	150.0 g
Agar	28.0 g
Ascorbic acid	20.0 g
Distilled water	1400.0 ml
Formalin	4.5 ml
M.P.H	6.0 g
Salt mixture	10.0 g
Sorbic acid	3.0 g
Vitamin mixture	20.0 g
Yeast	80.0 g

Table 2. *B. bassiana* 균주의 살충 효과

균주	살 충 율(%)				
	점박이용애	벼멸구	파밤나방	담배거세미나방	배추좀나방
C726	0	0	64	25.8	86.2
C149	20.5	0	0	0	0
C290	2.9	0	0	0	-
C291	13.2	1.9	0	-	14.1
C292	9.9	0	0	-	-
C294	0	8.4	0	1.6	-
C317	7.1	0	1.8	0	0
C331	0	2.0	1.6	31.5	-
C332	0	23.7	0	0	-
C829	7.6	4.0	5.2	0	11.5

Table 3. *M. anisopliae* 균주의 주요 나방류 해충의 유충에 대한 살충 효과

균주	살 충 율(%)				
	점박이응애	벼멸구	파밤나방	담배거세미나방	배추좀나방
C396	10.8	16.7	0	0	-
C454	28.7	5.1	3.5	0	0
C455	44.7	3.4	1.6	16.7	-
C456	34.1	5.1	0	0	-
C457	47.6	0	0	-	-
C458	42.7	4.0	1.8	0	-
C642	27.9	0	0	42.9	0
C643	16.5	15.7	0	35.3	11.0
C728	39.5	5.9	0	0	13.2
C835	22.1	6.0	1.8	35.6	0

Table 4. *N. rileyi* 925 균주의 살충 효과

균 주 명		살 충 율(%)			
		배추좀나방	파밤나방	담배나방	담배거세미나방
<i>N. rileyi</i>	925	23.5	61	25.8	10.3

Table 5. Corrected mortalities of DBM larvae and the number of conidia adhering to a single larva at various conidial concentrations of the *B. bassiana* 726 (mean \pm SD)

Concentrations (Conidia/ml)	Corrected Mortality(\pm SD)	No. of conidia adhering to singel larvae(\pm SD)
Control	4.00 \pm 5.6	-
10 ⁴	33.33 \pm 5.89a	18.75 \pm 22.16a
10 ⁵	33.33 \pm 17.68a	36.11 \pm 35.60a
10 ⁶	25.00 \pm 11.79a	83.33 \pm 33.07a
10 ⁷	68.75 \pm 2.95b	1813.89 \pm 39.50b
10 ⁸	88.37 \pm 3.29b	9861.11 \pm 3623.08c

Numbers within the same column followed by the same letter are not significantly different at $p \geq 0.05$ as determined by ANOVA Procedure for corrected mortality and by GLM Procedure for the number of conidia adhering to single larvae. The means were separated by Duncan's multiple range test.

Table 5. Corrected mortalities of DBM larvae by *B. bassiana* 726 in laboratory and greenhouse assays

	Control		Treatment		Corrected Mortality (%)	LT ₅₀ (day)
	No. of sample	No. of cadaver	No. of sample	No. of cadaver		
Laboratory	200	33	200	177	86.23	1.63
Greenhouse	154	10	230	157	66.46	3.61

2. 온실 실험

우수 균주로 선발된 백강균 726균주의 온실환경에서 배추좀나방의 방제효과와 실내에서의 살충율을 비교하기 위하여 10^8 conidia/ml 농도로 실험한 결과 표 5와 그림 1에서와 같이 온실환경에서도 상당한 방제효과를 입증할 수 있었다. 온실에서의 보정살충율과 반수치사시간은 각각 66.5%와 3.61일이었다. 이러한 결과는 온실에서 백강균 726에 의한 감염속도가 실내에서 보다 느리며 서서히 진행됨을 알 수 있었는데, 이는 온실환경이 곰팡이의 생육에 적합하지 않기 때문임을 추정할 수 가있다. 곤충병원성 사상균의 감염능력은 일반적으로 포자 발아의 신속성에 많은 영향을 받는다 고 알려져 있다. 이러한 포자 발아의 속도는 상대습도와 온도에 의해서 결정된다. 백강균의 경우 높은 살충효과를 위해서는 약90% 이상의 상대습도가 요구되나 본 실험을 수행하는 동안 온실내의 습도가 주간에는 약40%이었으며 온도 또한 곰팡이 생육에 불리하였다. 곰팡이 생육에 적합한 온도는 종마다 혹은 아종마다 다를 수 있겠지만 일반적으로 25℃로 알려져 있으며 본 실험 중 온실내의 온도는 20℃-35℃로 주야간 변이가 컸으며 더욱이 주간에는 35℃까지 상승하여 포자발아에 적합하지 않은 온도였다. 이러한 불리한 습도와 온도가 온실에서 백강균 726균주의 포자발아를 지연하였으며 결과적으로 살충율 저조를 초래하였다고 사료된다. 하지만 비록 온실에서의 살충율이 실내보다는 저조하였지만 무처리구에 비해 상당한 살충율을 보이기 때문에 미생물살충제로의 잠재력을 본 실험에서 확인 할 수 있었다.

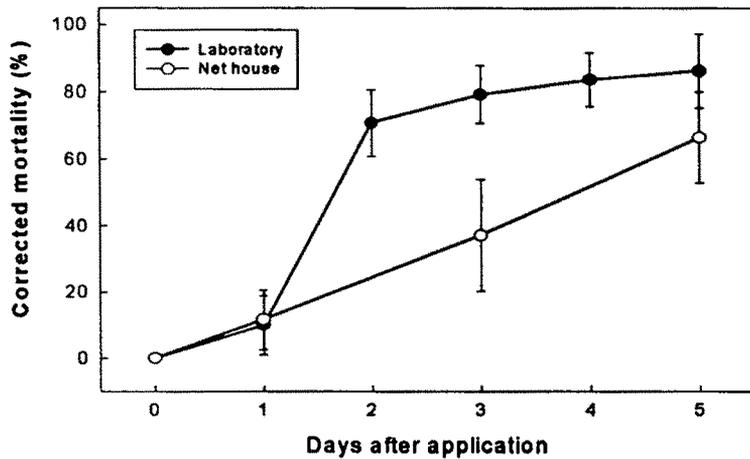


Fig. 1. Cumulative mortalities of DBM larvae in laboratory and greenhouse after application of 10^8 conidia/ml of *B. bassiana* 726. Vertical lines represent standard deviations of means

3. 포장 실험

가. 기상조건

포장 실험 중의 기상조건은 그림 2와 같이 맑고 주간 온도가 38℃까지 올라가는 무더운 날씨가었으며 상대습도는 야간에는 100%까지 올라갔으나 주간에는 30%까지 내려가는 건조한 조건이었다. 비록 평균 온도, 습도가 각각 25℃와 80%에 가까웠지만 곰팡이 생육에 불리한 시간대가 더 많았다.

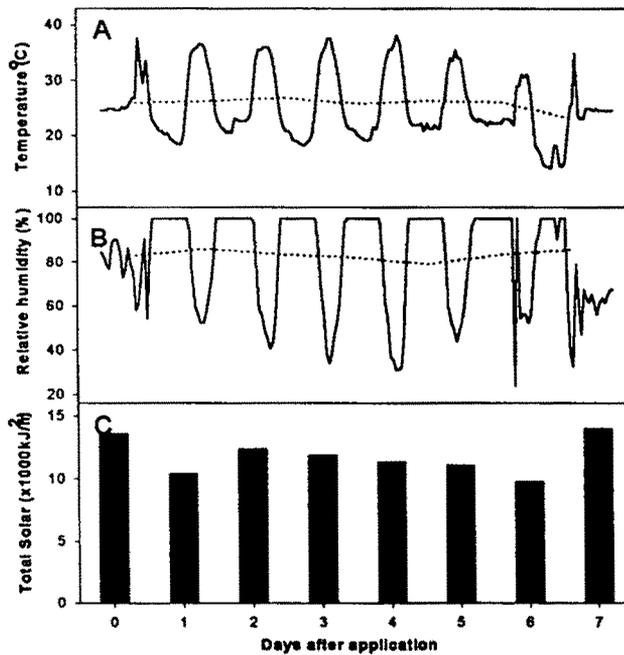


Fig. 2. Weather during the field experiment. Hourly and mean temperature(A), relative humidity(B), and total daily radiation(C) were recorded at the NIAST weather station. Dot lines represent average temperature and average humidity.

나. 포자의 지속성

그림 3은 처리 후 1, 3, 5, 7일째에 배추잎과 충체표면의 포자의 지속성을 보여 준다. 포장에서 포자의 지속성은 각각의 조사일 마다 급격하게 감소함을 알 수 있었다. Duncan test결과 배추잎 표면의 포자 지속성이 1, 3, 5일 후에 상당한 차이를 보일 만큼 급격하게 감소하였으며(PROC ANOVA; $F = 233.46$, $df = 4$, $P \leq 0.05$), 충체 표면에서도 동일한 유형의 결과를 얻었다(PROC ANOVA; $F = 166.55$, $df = 4$, $P \leq 0.05$). 배추잎과 충체 표면에서의 포자 지속성은 충체 표면에서 더 짧았으며 7일 후 충체 표면에는 포자가 더 이상 남아있질 않음을 알 수 있었다. 포장에서 이처럼 포자의 지속성이 짧은 이유는 대부분 UV의 영향이며 더욱이 실험기간 중 청명하고 무더운 날씨로 인해 이러한 영향이 더 심화되었다고 사료된다.

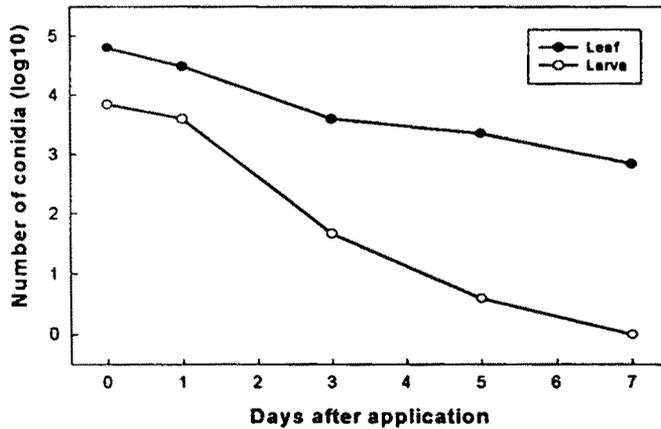


Fig. 3. Persistence of conidia of *Beauveria bassiana* 726 on leaves and larvae. The mean cfu population on leaves and larvae were calculated per 19.625 mm^2 and per mg.

다. 백강균 726균주의 포장에서의 방제효율

백강균 726균주의 포장에서 방제가는 7일간 서서히 증가하여 60.56%이었으며 반수치사시간은 4.96일이었다(그림 4). 비록 실내와 온실에서의 수치보다는 낮지만 야외에서 1회만 살포한 것을 감안할 때 백강균 726균주의 배추좀나방에 대한 방제효율이 높다는 것을 알 수 있었으며 미생물 살충제로의 개발 가치가 충분하다고 할 수가 있다.

실내 또는 온실보다 낮은 방제효율은 불리한 환경으로 인한 포자 수명의 단축 또는 포자 발아의 지연이 중요한 원인 중의 하나였다. 전술한 바와 같이 실험기간 중의 온도가 30℃이상 머무는 시간이 많았으며 UV에 의한 증체표면의 포자 생명력이 접종 후 1일에 약 70%가 감소하였다. 보다 향상된 방제 효율을 위해서는 불리한 환경과 UV의 영향을 줄일 수 있는 새로운 포자 제형방법을 개발하는 것이 시급하다고 하겠다. 모든 미생물은 환경에 아주 예민하다. 특히 포자의 지속성에 대한 UV의 영향은 치명적이라 할 수 있으며, 포자의 신속한 발아 및 감염을 위해서는 적당한 습도가 포자주위에 유지가 되어야만 한다. 이러한 문제점을 해결할 수 있는 것이 제형화 기술이라 할 수 있다. 따라서 UV를 차단할 수 있으며 보습효과를 주는 제형화 기술 개발이 시급하다고 사료된다. 또한 살균제에 대한 내성균주의 개량이 시급하다. 왜냐하면 미생물 살충제는 살균제에 민감한 사상균이기 때문에 실제로 농가에서 살균제와 병행하여 사용하기 위해서는 살균제에 대한 내성이 강한 균주 개량이 시급하다. 또한 일반 농약 살포방식처럼 2-3일 간격으로 2회 살포한다면 보다 빠르게 배추좀나방의 밀도를 감소할 것으로 사료된다.

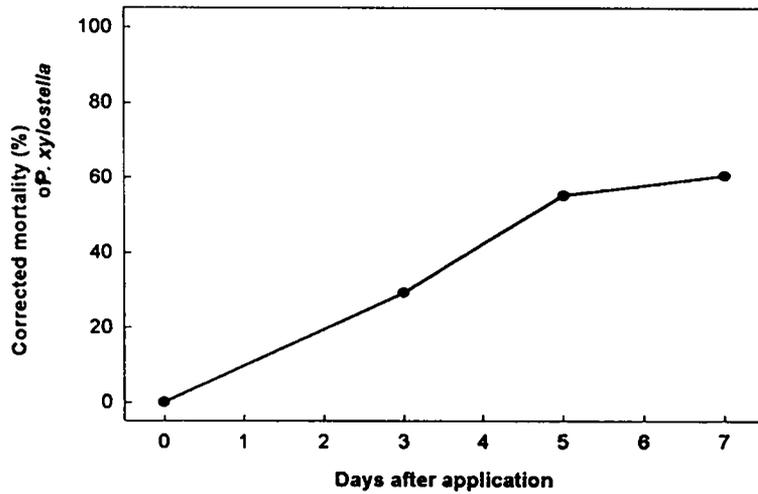


Fig. 4. Corrected mortality of DBM larvae after treatment of 1×10^8 conidia/ml suspension of *B. bassiana* 726 in field trial.

제4절 종합고찰

본 연구는 국내환경에 적합하며 중요 농업해충에 대한 우수한 살충력을 지닌 균주를 선발하여 미생물 살충제를 개발하기 위하여 수행하였다. 본 연구를 통해서 주요 나방의 적합한 인공사육배지를 개발함으로써 생물검정을 위한 실험에 시험해충을 원활히 제공할 수 있게되었으며, 국내에서 수집된 녹강균 (*Metarhizium anisopliae*; *Nomuraea rileyi*)과 백강균 (*Beauveria bassiana*)을 대상으로 파밤나방, 담배거세미나방, 배추좀나방, 점박이 응애, 벼멸구 등에 대하여 우수한 살충력을 지닌 균주를 탐색한 결과, 백강균 726균주가 실내, 온실, 포장에서 배추좀나방에 대하여 상당한 살충력을 지니는 것을 알 수 있었다. 하지만 포장에서의 살충율이 실내 또는 온실에서의 살충율보다 낮게 나타났다. 이는 불리한 환경으로 인한 포자 수명의 단축 또는 포자 발아의 지연이 중요한 원인 중의 하나였다. 이러한 결과를 볼 때 백강균726 균주가 미생물살충제로서의 제 기능을 다하기 위해서, 혹은 상품화를 위해서는 세 가지의 보완 실험이 절실히 요구된다. 첫째, 포장에서 포자의 지속성(viability)이 현격하게 낮아지는 것을 본 실험에서 확인하였다. 따라서 포자를 UV로부터 보호할 수 있는 제제화 기술개발이 필요하다. 둘째, 실제 농가에서는 대량의 살균제를 살포하므로 사상균인 726균주에게는 치명적이라고 할 수 있다. 따라서 유전공학적인 방법으로 726균주의 살균제에 대한 저항성을 강화시키는 것이 요구된다. 셋째, 포자의 대량생산을 위해서는 배지개발도 중요하지만, 생산된 포자를 안전하고 효율적으로 수확하는 방법도 중요하다. 이를 위해서는 특수 제작된 포자수확 기계와 열처리 기계가 필요하지만 아직 국내에서는 전무한 상태이다. 726균주를 이용하여 미생물살충제의 상품화를 위해서는 전술한 세 가지 추가적인 실험이 필요하다고 사료된다.

제5절 적요

본 연구에서는 주요 나방의 적합한 인공사육배지를 개발함으로써 생물검정을 위한 실험에 시험해충을 원활히 제공할 수 있게되었으며, 국내에서 수집된 녹강균 (*Metarhizium anisopliae*; *Nomuraea rileyi*)과 백강균 (*Beauveria bassiana*)을 대상으로 파밤나방, 담배거세미나방, 배추좀나방, 점박이 응애, 벼멸구 등에 대하여 우수한 살충력을 지닌 균주를 탐색한 결과, *Metarhizium anisopliae*(녹강균) 경우 시험해충에 대한 살충력이 저조하여 녹강균을 이용한 미생물살충제 개발의 가능성이 희박하였다. *Nomuraea rileyi* 925균주의 파밤나방에 대한 살충율은 61%로 보다 우수한 살충력을 지닌 균주선발을 위해서는 지속적인 균주 수집이 요구된다. *Beauveria bassiana*(백강균) 경우 백강균 726균주가 배추좀나방에 대하여 86.2%의 살충율과 반수치사시간(LT₅₀) 1.63일로 가장 강력한 살충력을 보였다. 따라서 백강균 726균주를 이용한 미생물살충제로의 개발을 목적으로 실내뿐만 아니라 온실과 포장에서의 배추좀나방에 대한 방제능력을 조사하였다. 실내조건에서 충체표면에 붙는 포자수와 살충율과의 연관성을 조사한 결과, 86%의 살충율을 위해서는 약 9800개의 포자가 충체표면에 붙어야됨을 확인하였고, 온실환경 조건에서는 66.5%의 살충력과 반수치사시간 3.61일로 실내에서보다는 높은 수치이지만 실외 조건을 감안할 때 역시 높은 살충력을 나타냄을 알 수 있었다. 또한 백강균 726균주의 포장환경 조건에서의 살충력 실험을 한 결과 60%의 살충력과 반수치사시간 4.9일로 실내와 온실에서 보다는 높은 수치이지만 야외 조건과 1회 분무를 감안할 때 역시 높은 살충력을 나타냄을 알 수 있었다.

제 4 장 유전공학기법을 이용한 곤충기생균 살충력 향상에 관한 연구

제1절 서 론

화학 공업의 발달과 함께 고속 성장 해온 것이 바로 유기합성 농약이다. 이 유기 합성 농약은 금세기 초부터 엄청난 인구 증가로 감당하기 어려웠던 식량자원의 생산량을 늘리는데 큰 공헌을 해왔다. 그러나, 유기합성 농약의 과다한 사용의 폐해는 이미 널리 알려진 바와 같이 자연에서의 난분해성 성분의 잔류와 잔류성분에 포함된 중금속에 의한 농산물 및 지하수의 오염으로 인한 인간 생존권 위협 및 광범위한 생물 종들을 무분별하게 치사하게 함으로써 일어나는 환경 파괴와 이에 따른 생태계 파괴등이 계속된 인류의 공존 공영까지 위협하게되어 이제 인간은 지구 환경 문제를 심각하게 고려해 보아야 하는 시점에 와 있다. Rio 환경 회의를 시발로 앞으로 환경을 해치는 물질에 대해 각 국가 간의 강력한 규제 협정이 있을 것으로 예상된다. 특히 무공해 신물질을 먼저 개발한 일부 선진 국가의 황포성 규제가 예상되어, 이 방면에 대한 기술 개발에 총력을 다하여야 할 때이다. 이제 머지않아 유기합성 농약의 생산 및 사용에 대한 규제도 시작되면 그 때는 이미 늦을 것이 예상된다. 그러므로, 현시점에서 유기 합성 농약을 대체할 수 있는 새로운 무공해 농약 개발에 대한 연구는 매우 중요하다고 여겨 진다. 세계적으로 무공해 농약중 가장 대표적인 것이 미생물 살충제인데, 미생물 살충제는 미생물 자체를 직접 이용하거나 미생물을 포함한 제제를 이용하여 농작물에 해를 주는 곤충, 응애, 선충등의 해충등을 방제하는데 쓰이는 살충제라 할 수 있다. 미생물 살충제는 주로 박테리아, 곰팡이, 바이러스, 선충등을 이용하여 해충을 방제하는 농약이다. 미생물 살충제에 사용되는 박테리아는 대부분 포자를 형성하는 세균으로서 해충 방제를 위해 사용되는 것으로는, 대표적으로 *Bacillus thuringiensis*(B. t.)등이 있고, 곰팡이 균주로는 *Hirsutella thompsoni*, *Paecilomyces farinosus*등 사상균을 포함한 곤충 기생균을 이용하는 것 등이 있다. 곤충 기생균은 최근들어 미생물 살충제로서의 개발에 많은 관심의 대상이 되고 있는 균이다. 이 균의 특징은 모든 곤충균의 유충, 번데기, 성충

등의 전시기를 침입하며 곤충을 죽게한후 이를 기주로 하여 충체 전반에 걸쳐 자실체를 형성 하거나 포자과를 형성하는데, 전 세계적으로 분포하며 현재 800여종이 보고되고 있다. 대표적인 곤충 기생균으로는 *Cordyceps*균이 이에 속하며 주로 사상의 자낭 포자를 생산하는 자실체를 형성하며 전 세계적으로 분포한다. 일부 선진국에서는 최근 곤충 기생균을 이용하여 주요 농작물 해충의 방제를 목적으로 천연 미생물 농약을 개발 상품화하여 실용화 단계에 접어들었으며 미국 농무성(USDA) 부설 연구 기관에서는 현재 곤충 기생 3736균주를 확보하고 있는 실정이다. 이와 관련하여 국내에서의 곤충 기생균에 관한 연구는 채집의 어려움과 분류의 난점등으로 인하여 *Cordyceps*속의 몇 종만이 보고되었을 뿐 이에관한 연구자도 극히 부족한 실정이다. 이는 외국에서 채집되어 보고된 800종에 비하면 본 균에 관한 국내의 연구수준은 초기단계라고 하겠다. 환경 보호에 대한 인식과 무공해 농약 개발에 있어서 곤충 기생균에 대한 관심이 높아져, 이 균들에 대한 유전공학적 연구가 선진 외국 연구 기관을 중심으로 이제 착수하기에 이르렀다. 이러한 유전 공학적 연구는 균주의 살충력 향상 및 살충력 범위의 확대, 그리고 균주 생산량 증가등에 매우 커다란 영향을 미칠 것으로 예상되고 있다. 특히 우리나라와 같이 분리 보유된 균주 수도 적고 인력이 부족한 경우에는 현재 많은 기술 축적이 이루어진 유전 공학적 기법을 이용한 균주 개량이 미생물 살충제 개발에 있어서 중요하다고 판단된다.

제2절 재료 및 방법

1. 원형질체의 제조

접종할 10^7 포자를 70ml of PD broth에서 균을 22°C에서 200rpm 40시간 자라게 한 후 균사를 살균된 Bunchner funnel를 이용하여 수확하였다. OM buffer(1.2M $MgSO_4$, 10mM Na_2HPO_4 , pH5.8)로 세척하여 15ml OM buffer/Novozyme234 10mg/ml 혼합하였다. 80rpm으로 30°C에서 2-3시간 배양하여 배양균사체를 Corex centrifuge tube에 넣고 2ml ST buffer(0.6M sorbitol, 100mM Tris-HCl, pH 8.0)를 첨가한다. 그후 750g (1800-2000 rpm사이)로 5분간 시키면 Protoplast층이 생기는데 이층을 Pasteur pipette를 이용하여 꺼내었다. 이추출물을 5ml STC buffer(1M sorbitol, 50mM $CaCl_2$, 50mM Tris-HCl, pH8.0)에 혼합하였고 750g (1800-2000 rpm)에 5분동안 회전시켰다. 그후 5ml STC buffer에 2번 세척하였고 STC buffer(2-3ml) to a final con. of 1.25×10^8 /ml에 Resuspended하여 -70°C에 보존하였다.

2. protoplast의 순수 분리 확인

분리된 원형질체를 0.1% SDS에 처리하여 보았다. 약 1시간 정도 배양한다음, 위상차 현미경으로 관찰하여 보았다. 원형질체는 위 처리과정에서 모든 세포가 파괴되어 없어졌다.

3. 곤충 기생 곰팡이균주의 형질 전환

가. 일반적인 방법

200 ul of 5×10^6 and 1×10^8 protoplast, 2 - 4ug DNA in TE(10/1)에 50 ul 25% PEG 6000 in (50mM $CaCl_2$, 10mM Tris-HCl, pH7.5)첨가하였다. 얼음속에서 20분간 배양시켜 2ml 25% PEG sol. 넣고 RT 10min배양시켰다. 그후 8000g에 4°C에서 5분동안 원심분리한 후 2-4ml (1.2M sorbitol, 10mM $CaCl_2$, 10mM Tris-Cl, pH7.5)로 세척하였다. 100-200ul on 1.2M sorbitol, 100ug/ml Hyg B에 Plate하였으며 28°C.에서 2-3일간 배양하였다.

나. Electroporesis 방법(total volume of 400 ul)

protoplast cells: 5×10^8 를 Applied to the cells with DNA of 10 ug하여 Electrical shock condition: $V=2,500$ $C=40$ $R=700$ $T=28$ 로 유지한후 5 ml of PDB-medium첨가하였다. 10 min분동 얼음에서 배양하였고 the agar-plates(hyg: 100 ug/ml)에 세포를 plating시키었다.

4. DNA fragment endfilling:

kleow fragment 4 unit, dNTP'S 1.25 mM, $10 \times$ Buffer, DNA: 1ug와 합하여 30℃에서 15초동안 배양시키었다..

5. Mini preperation of gemomic DNA isolation

막자와 막자사발은 미리 -20℃로 얼려서 사용하여 Liquid nitrogen으로 같은 후 Eppen. tube로 옮긴다. 간 Fungal extraction buffer(FEB) 500ul, 200mM tris-Cl(PH 8.5), 200mM NaCl, 2.5mM EDTA, 0.5% SDS에 넣고 30분간 부드럽게 흔든다. 그후 11600 × g에서 30분간 원심분리하고 Aqueous phase를 새로운 effen tube옮긴다. 37℃에서 15분동안 RNase 25ul,에 배양시킨 후 Chloroform: isoamylacohol(24:1) 500ul로 15분동안 천천히 흔든다. 구후 11600 × g에서 15분동안 원심분리하고 Aqueous phase를 새로운 effen. tube를 이용하여 옮긴다. 그후 0.6 vol isopropanol 로 11600 × g 로 10분동안 원심분리하였고 Isopropanol로 완전히 제거하였다. 70% EtOH 1ml로 세척하고 Pellet을 말린후 TE(10/1) PH8.0 500ul for 12h에 Dissolve시킨다. Purified FEB-equilibrated phenol 500ul에 5분동안 진탕하여 Centrifuge 11600 × g로 15분동안 수행하였다. Aqueous phase를 새로운 effen. tube를 사용하여 옮기고 2 vol EtOH(100%)첨가하여 11600 × g에서 10동안 원심분리하였다. 70% EtOH 1ml에서 두 번 세척한후 말린후 TE(10/1) 100ul resuspention에서 12시간 놓은후 -20℃에서 보존하였다.

6. Chromosomal DNA of Fungi 확인

상기 방법에 따라 분리해낸 4개의 cromosomal DNA 를 각각 EcoRI으로 처리하였

다. 각각의 control (restriction enzyme처리 하지 않은것)과 처리한 것을 각각 0.8% Gel상에서 전기영동한다음 U.V. transmittor로 확인하였다.

7. PCR 분석

실험 수행은 일반적으로 알려진 방법(Sambrook et al.,1989)으로 수행 하였다. 다만, primer는 *B. t. t.*-toxin gene의 3' 과 5'의 DNA 염기서열을 읽어 내어 15 base 정도를 합성 정제하여 사용하였다. 위에서 얻어진 genomic DNA의 양약 0.1 ug을 template로 하여 25 회전시켜 증폭하였다.

8. Western Blot 분석

실험 수행은 통상 사용되는 방법으로 실시하였다. 즉, 위에서 얻어진 기생 곰팡이균 분말 1g을 우선 SDS-PAGE sample buffer 1 ml에 녹인뒤 열을 가하여 변성시킨 후, 약 50ul를 SDS-Polyacrylamide Gel에서 분리한 후 nitrocellulose filter paper에 옮긴 후, 독소 단백질 항체를 이용하여 발현을 검증하였다.

9. 살충성 test.

형질 전환된 곰팡이균의 제재를 물에 희석한 다음, 살균처리된 어린 감자잎에 접착시켰다. 그리고, 갓 깨어난 감자 잎벌레에게 약 3일간 먹여 보아 살충력에 대한 시험을 실시하였다.

제3절 연구 결과 및 고찰

1. 곤충 기생균의 최적 배양 조건 확립

공여된 곤충 기생균들을 LB, Standard I, Standard II, PDB(Difco) 배지등 여러 배지에 배양하여 본 결과 PDB 배지가 가장 적절한 것으로 판단되었다. 이 PDB(Difuco) 배지 24g 을 1L 물에 잘 녹인 다음, 멸균하고 70ml씩 분주하여 배양액으로 사용하였다. 공여받은 동충하초 균주들을 각각 약 10^7 spores를 접종하여 22°C에서 200rpm으로 약 40 시간을 키워 protoplast의 제작에 사용하였다.

2. 곤충 기생균의 protoplast 제조 방법

70 ml의 PDB broth에 10^7 spores 정도의 동충하초 균주를 접종한다음, 22°C에서 200rpm 으로 40시간 진탕 배양한다. 멸균된 Bunchner funnel을 이용하여 균주를 걸러낸다. OM buffer(1.2mMgSO₄, 10mM Na₂HPO₄, pH5.8) 와 멸균된 2차 증류수로 잘 씻어준다. Novozyme 234(10mg/ml)이 함유된 15ml OM buffer로 잘 혼합한다.

o. 30°C에서 80rpm 으로 2-3 시간 정도 진탕배양 한다. 용액이 맑아지면 corex cetrifuge tube로 옮겨 담는다. 2 ml 정도의 ST buffer(0.6M sorbitol, 100mM Tris-Cl, pH8.0)를 가한다. 750×g로 5분 동안 원심 분리 시킨다. Protoplast가 튜브의 안쪽 면에 응집하게 되면 pasteur pipette를 이용하여 분리해 낸다. 5 ml STC buffer(1M sorbitol, 50mM CaCl₂, 50ml Tris-치, pH8.0)로 잘 섞어 준다. 750×g로 5분간 원심 분리 시킨다. STC buffer 로 최종 농도가 1.25×10^8 /ml되게 녹인다. 사용할때까지 -70°C에 보관한다. 위와 같이 제조된 세포의 원형질체를 phasecontrast 광학 현미경(1,000x) 으로 관찰하여 본 결과 두 균주의 원형질체 사이에 형태적으로 다른점이 없다는 것을 알 수 있었다. 이것으로 미루어 보아 오랜 동안 세포의 원형질체를 -70°C에 보관 할 수 있는 가능성이 있음을 알 수 있었다(그림 1)

A: -70°C 보관 전의 원형질체



B: -70°C 보관 후의 원형질체

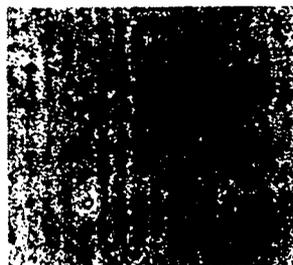


Fig. 1. 제조된 곤충 기생균의 원형질체

3. Protoplast 확인

0.1% SDS를 분리된 각각의 protoplast에 처리한 다음, 현미경($\times 1000$)으로 관찰하였다. 위에서 만들어진 protoplast는 0.1% SDS에 의해 파괴되어 보이지 않았으며, control로 사용한 protoplast는 filamentous형태의 방사체가 온전히 관찰되었다. 이 결과로 제조된 세포는 원형질만 유지하고 있음을 알 수 있었다. 사용된 Novozyme의 농도는 10 mg/ml이었다(그림 2).

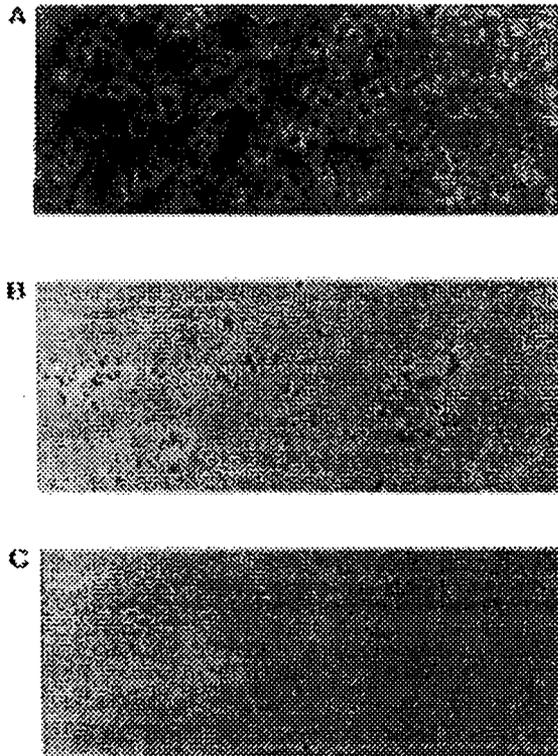


Fig. 2. 제조된 곤충 기생균주의 protoplast 확인

A: control 원형질 세포 B: 0.1% SDS 처리한 원형질 세포
C: 0.5% SDS 처리한 원형질 세포

4. 곤충 기생균의 각종 항생제 저항성 실험

기생 곰팡이 균주 자체의 항생제 저항성 여부를 알아 보기위해서, 먼저 Ampicilin, Streptomycin, Carbenicilin, Tetracyclin, Kanamycin, Chloramphenicol, 및 Hygromycin 등을 여러 농도로 하여 선발한 결과 Hygromycin 약 60 ug/ml에서부터 저항성이 없음을 알 수 있었다(표 1, 그림 3). 이는 곤충 기생균 형질 전환시 형질 전환된 균주들을 Hygromycin(60 ug/ml)에서 선발 할 수 있다는 것을 의미 하는 것이다. 또한 이는 형질 전환 벡터를 개발하는데 선발 표지 유전자로 hygromycin 저항성 유전자를 사용 할 수 있다는 자료를 동시에 제공하고 있다.

Table 1. 제조된 각각의 protoplast 100 μ l를 아래와 같은 항생제 농도가 함유된 고체 배지위에 도말한 다음, 28°C에서 4일간 배양하여 항생제 저항성 실험을 실시하였다.

균주명		20	40	60	80	100	120
<i>Metarhizium</i>	728	++	++	++	++	++	++
" "	455	++	++	++	++	++	++
<i>Beauveria</i>	208	++	++	++	++	++	++
" "	294	++	++	++	++	++	++
<i>Paecilomyces</i>	827	++	++	++	++	++	++

A: Ampicillin, Streptomycin, Tetracyclin, Kanamycin, Carbenicilin, Chloramphenicol(μ g/ml)를 각각함유한 agar plate에서의 성장 정도

균주명		20	40	60	80	100	120
<i>Metarhizium</i>	728	++	++	-	-	-	-
" "	455	++	++	-	-	-	-
<i>Beauveria</i>	208	++	++	-	-	-	-
" "	294	++	++	-	-	-	-
<i>Paecilomyces</i>	827	++	++	-	-	-	-

B: Hygromycin B(μ g/ml)를 함유한 agar plate에서의 성장정도

(++) : Normal growth (+) Slow growth (-) No growth

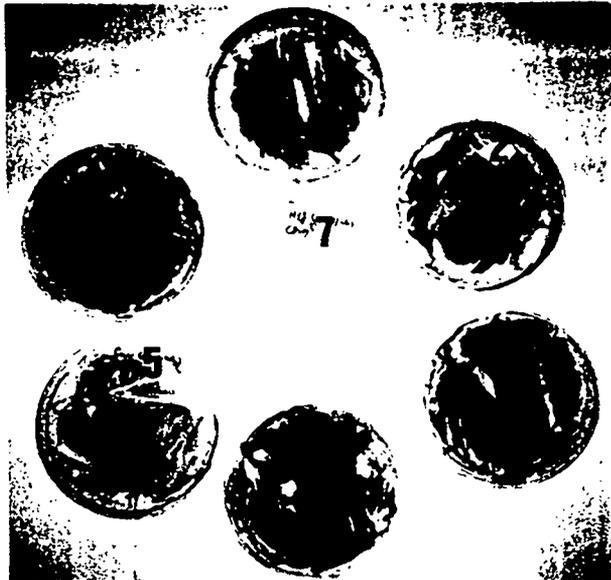


Fig. 3. 곤충 기생균의 항생제 저항성 test

1: Cm, 2: Tet, 3: Amp, 4: Km, 5: Cm, 6: Str, 7: Hyg

5. 곤충 기생균으로 부터 chromosomal DNA의 분리

다음 단계의 실험들에서 매우 중요한 분자생물학적 연구를 위해서 각 기생균주 들로부터 DNA를 분리하는 방법을 확립 시켜 놓기 위해서, 위에 적혀진 방법에 따라 분리해낸 4개의 chromosomal DNA를 각각 *EcoRI*으로 처리하여 agarose gel 상에서 확인하여 보았다. 동시에 control로써 restriction enzyme 처리 하지 않은 것을 각각 같이 분리하여 U.V. transilluminator로 확인하였다. 이 결과는 곤충 기생균으로부터 DNA를 쉽게 보통의 방법으로 분리 할 수 있으며, 다음에 이어서 실시될 southern blot 분석에 의한 DNA detection에 많이 사용 되어 질 수 있으리라 여겨진다.

6. 곤충 기생균주의 형질 전환

공여된 균주들의 형질 전환 방법을 확립하기위해서 우선 hygromycin 저항성 유전자를 지니고 있는 plasmid인 pCSN43(그림 5)을 이용하여 형질 전환을 시도 하였다. 우선 일반적으로 사용되고 있는 PEG를 이용한 형질 전환 방법으로, 이는 균주와 플라스미드의 접합에 의하여 DNA가 세포내로 삽입되어지는 현상을 이용한 것인데, 이 방법은 다른 여러 균주들에게서도 널리 사용되고 있으나, 아직 이 방법이 곤충 기생 곰팡이균에도 적용 되어 질 수 있는지 알려져 있지 않고 있다. 또, 다른 방법으로 이 방법 역시 식물, 동물, 미생물등 넓은 분야의 생물에 분자 생물학적 연구를 위해서 사용되어 지고 있는 방법이다. 이 두방법을 이용하여 공시 균주인 C807 균주를 형질 전환하여 hygromycin(30 - 100 ug/ml)이 함유된 고체 배지위에서 선발 한 결과 아래 그림 4와 같이 30ug/ml이 포함된 배지에서는 많은 성장이 있는 것을 볼 수 있는 반면에, 100 ug/ml에서는 거의 성장하지 못하고 있으며, 60ug/ml일 경우 선발하기 적당한 수의 균주들이 자라고 있음을 알 수 있었다. 이 결과는 위에서 실시된 hygromycin 저항성 살해 결과와 비교해서, 원래 균주가 같은 농도의 hygromycin에서 성장을 못하고 있는 반면, 같은 조건의 상황에서 성장하는 균주들은 pCSN43으로 형질 전환이 되었다고 할 수 있겠다. 또한, 이 결과로부터 형질 전환된 균주의 선발을 위해서는 hygromycin 농도가 60ug/ml가 적당하다는 것을 알 수 있었다.

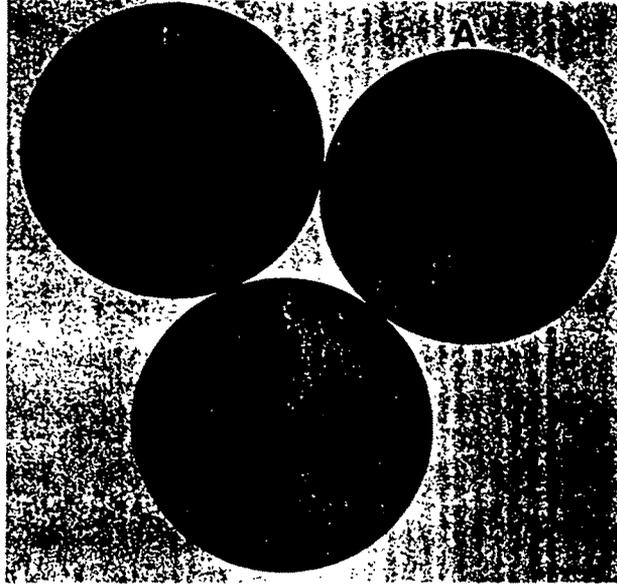


Fig. 4. 전기 충격 방법에 의해 형질 전환된 근충 기생 곰팡이균들의 hygromycin 배지 위에서의 선발

A: Hygromycin(30ug/ml), B: hygromycin(60ug/ml), C: Hygromycin(100ug/ml)

7. 곤충 기생균의 살충력 향상을 위한 새로운 vector의 개발

곤충 기생 곰팡이균주의 살충력 향상을 위한 형질 전환 벡터를 개발하기 위해서, 우선 공시 플라스미드로써 pCSN43과 pBARGPE1을 이용하였다(그림 5). 즉, pCSN43으로부터는 hygromycin 저항성 유전자를 분리하였고, 이 유전자. 절편을 pBARGPE1의 bar gene 대신 대치하여 hygromycin에서 선발이 가능하게 하였다. 그리고, 곰팡이 균주에서 유전자 발현을 가능하게하기 위해 제조된 multicloning site에는 Btt-toxin gene을 subcloning하여 곤충 기생균에서 발현 할 수 있도록 조작하였다. 여기에서 중요한 것은 hyg.-gene의 절편에 적당한 subcloning site가 존재하지 않기 때문에 일단 이 절편 및 pBARGPE1를 일단 *Pml* I 및 *Ssi*I으로 절단한 다음, klenow fragment를 이용하여 3'-end filling을 실시한다음, ligation시켜 올바르게 연결된 plasmid를 선발하여야만 하였고, Btt-toxin gene에도 promoter 부위를 제거하기 위해선 우선 point mutation을 실시하여 적당한 절단 부위를 만든 다음, 형질 전환 벡터가 올바르게 구성되었는지 알아보기 위해서 몇가지 절단 효소로 절단하여 agrose gel 상에서 확인하여 보았다(그림 6). 이 결과 완성된 살충력 향상을 위한 형질 전환 벡터는 올바르게 구성되어 있음을 확인 할 수 있었다. 이 형질 전환 벡터는 다음 단계의 연구 실험에서 실시될 살충력이 향상된 곤충 기생균 개발에 매우 중요한 부분을 차지하리라 고 여겨진다.

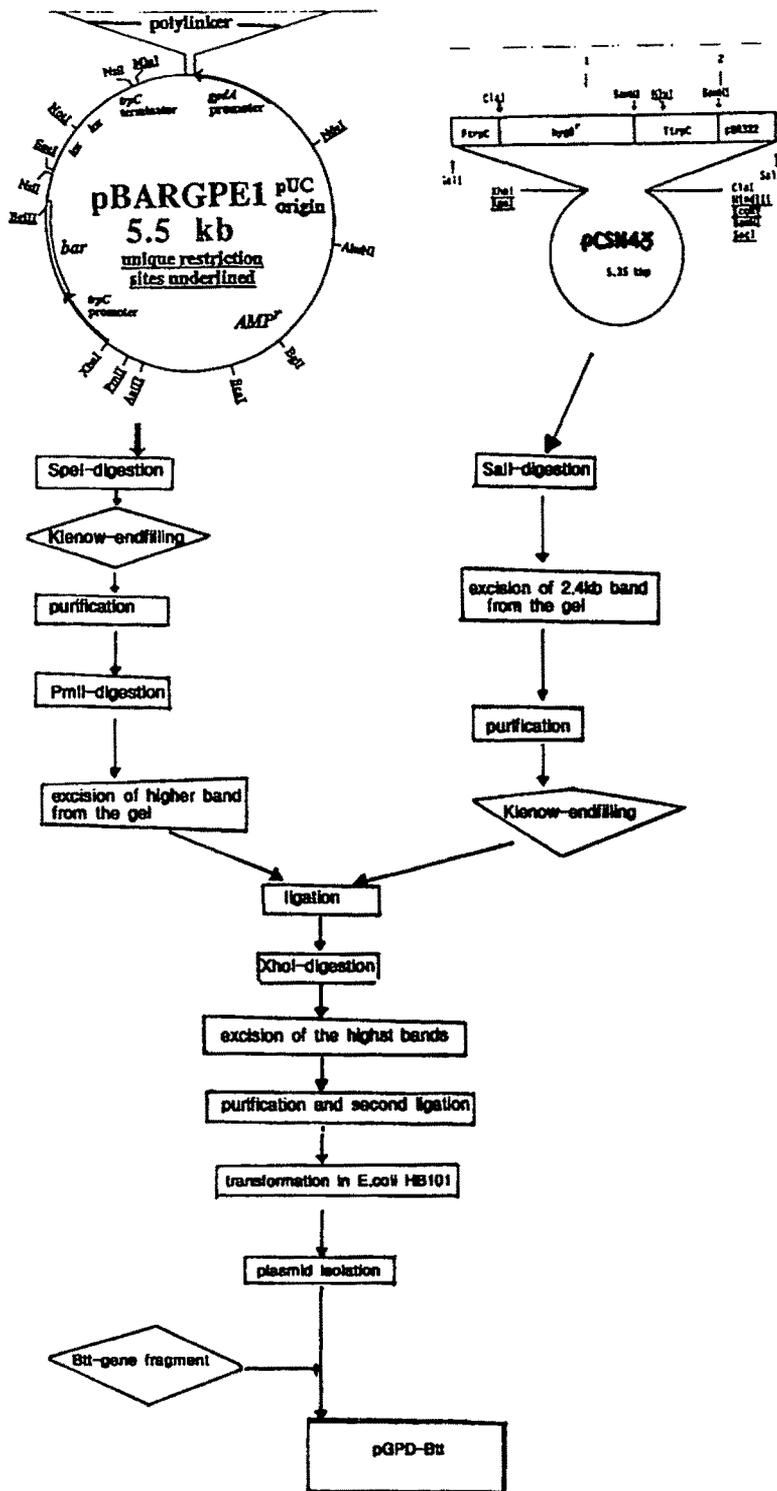


Fig. 5. 형질 전환 벡터 pGPD-Btt의 제작 과정

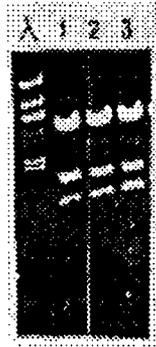


Fig. 6. pGPD-Btt의 DNA 제한 효소에 의한 절편 확인

8. 형질 전환 곤충 기생균에서의 유전자 발현 재조합 plasmid 제조

곤충 기생균 형질 전환 및 형질 전환체 선발을 위하여 우선 항생제 저항성을 시험해 본 결과 hygromycin에서 민감성을 보였다. 이를 토대로 hygromycin 저항성 유전자와 기생균 발현 *trpC*-promoter를 연결하고, 기생균의 살충력 범위와 역가 향상을 위해 Btt-toxin 유전자에 강한 promoter인 *gpdA*-promoter를 연결 시켰다. 그리고, 벡터의 세포내 삽입 후 chr. DNA상에 integration 될 수 있도록 *lox*-site를 부착하였다. 이와 아울러 *E. coli*에서 plasmid의 증폭을 위하여 pUC18으로 부터 *colE1*-replicon을 부착하여, *E. coli*에서의 형질 전환 선발 항생제로 ampicillin을 사용 할 수 있도록 하였다(그림 7). 제조된 plasmid의 확인을 위해서 몇가지 제한 효소로 절단 하여 전기 영동 분석을 통하여 확인하였다(그림8).

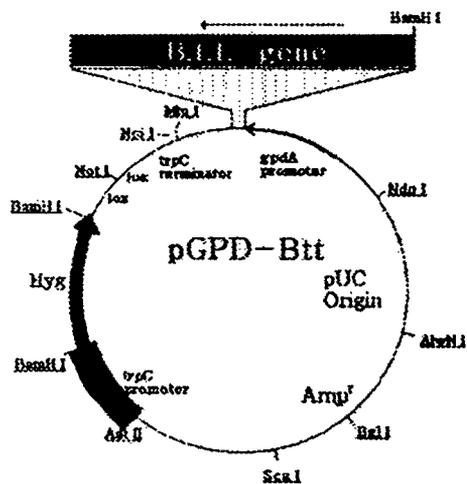
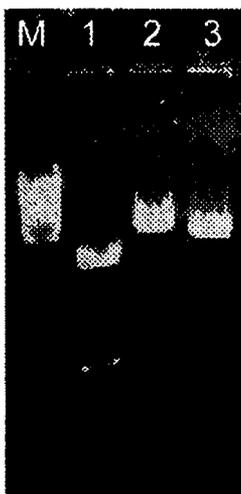


Fig. 7. Restriction site of the transformation vector pGPD-Btt



- 1: pGPD-Btt digested with *Bam*HI
- 2: " " " *Hind*III
- 3: " " " *Eco*RI

Fig. 8. M: λ /*Hind*III marker

9. Electroporation에 의한 곤충 기생균의 형질 전환

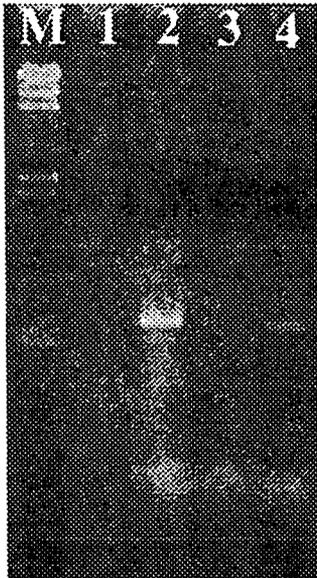
Electroporation에 의한 곤충 기생균의 형질 전환을 위해 우선 기생균의 원형질체를 제조하였고, 위에서 개발한 형질 전환용 plasmid를 이용하여 곤충 기생균의 electroporation에 의한 형질 전환 조건을 확립하였다. 이 조건으로 형질 전환 시킨 곤충 기생균을 hygromycin 함유 PDB 배지에서 선발한 결과 약 100 균주/plate/ug DNA 효율을 얻을 수 있었다.

10. 곤충 기생균주의 chr. DNA 분리

일반적으로 널리 사용되는 genomic DNA 분리 방법에서 약간의 변형을 하여 분리 하였다. 변형된 부분은 우선 액체 질소로 세포들을 얼린다음, phenol/chloroform/FEB-buffer로 처리하고, RNase 등을 이용하였다. 여기에서 분리된 chr. DNA를 agarose gel상에서 분석해 본결과 약 2ug/ul 정도이고, 다음에 이어질 분자 생물학적 실험에 아무런 지장없이 사용되어 질 수 있을 것으로 확인 되었다.

11. PCR 분석에 의한 독소 유전자 확인

형질 전환체 균주의 chr. DNA를 분리하여, 독소 유전자가 기생균주에 삽입 되었는지 확인하기 위해서 PCR 방법을 이용하여 독소유전자 존재를 확인하였다. 우선 0.1 ug chr. DNA을 template로 하여, 독소 유전자 특이 부분 약 1.0 kb 부분을 증폭하였다. 그림 9 에서 보는 바와 같이 독소 유전자 자체를 증폭 한 것과 같은 위치에 기생균 DNA 에서도 독소 유전자 band를 확인 할 수 있었다.



- lane M: λ /*Hind*III marker
lane 1: PCR with only buffer
lane 2: PCR with the DNA fragment of
 B. t. t.-toxin gene(marker)
lane 3: PCR with DNA of wild type of the fungi
lane 4: PCR with DNA of the fungi transformed
 with pGPD-Btt

Fig. 9. Identification of the *B. t. t.*-toxin gene by using the PCR-method

12. 독소 유전자의 발현 검증

형질 전환 기생균체에 삽입된 독소 유전자의 발현을 확인하기 위해서, total protein을 분리한 다음, 이중 약 50ug을 취하여 SDS-PAGE을 실시하였다. 그리고, semi dry blot 방법을 이용하여 nitrocellulose filter paper에 protein을 옮긴 후, 독소 단백질 항체와 결합 시켜 독소 단백질 유전자의 발현을 확인 하였다. 그림 10에서 보는 바와 같이 형질 전환 곤충 기생균에서 B.t.t-toxin 유전자 특이적 발현체인 독소 단백질이 생성 되고 있음이 확인 되었다.

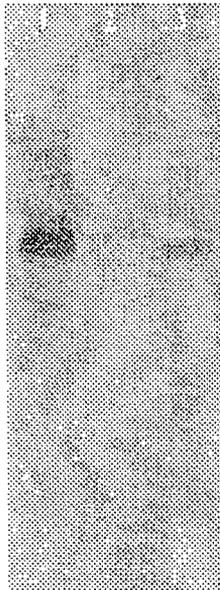


Fig. 10. Detection of the *B. t. t.*-toxin protein by using the western blot assay.

- lane 1: *B. t. t.*-toxin protein (marker)
- lane 2: Wild type of the fungi
- lane 3: The fungi transformed with the plasmid pGPD-Btt

13. 형질전환 곤충 기생균주 제재의 독소 발현 분석

형질전환 곤충기생균을 100ml 배양액에 진탕 배양을 한후 균주들을 걸러내어 건조시킨 다음, 막자 사발을 이용하여 가루로 제조하였다. 가루로 제조된 제재에서 독소 단백질을 확인하기 위해서, 위에서와 같이 total protein을 분리한 다음, 10mg/ml을 적정 시킨 후 SDS-PAGE을 실시하였다. 이 결과 형질전환 곤충기생균 제재내에 독소 단백질이 형성되어 있음을 확인하였다(그림 11).

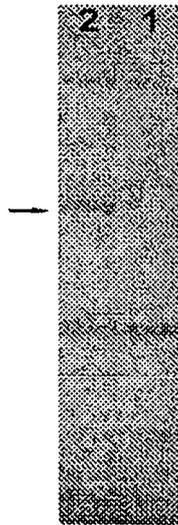


Fig. 11. SDS-PAGE를 이용한 형질 전환 균주의 제재에서 독소 단백질 확인

lane 1: Wild type of the fungi

lane 2: Total protein of the fungi transformed with pGPD-Btt

14. 형질전환 곤충기생균 제재의 살충력 시험

형질 전환 곤충 기생균의 살충력을 시험하기 위해서 딱정벌레목 유충들을 수집하여 test를 실시하였다. 기생균을 100ml 배양액에 진탕 배양을 한후 균주들을 걸러내어 건조 시킨 다음, 막자 사발을 이용하여 가루로 제조하였다. 제조된 제재를 약 10mg/ml로 적정 시킨 후 감자 잎에 바른 다음, 유충들로 하여금 섭취하게 하였다. 섭취 후 2일 후에 살충성을 시험 한 결과 시험 유충들이 모두 죽어 있음을 확인하였다(그림 12).



Fig. 12. 형질 전환 곤충 기생균제재를 이용한 살충력 시험

A: 형질 전환된 균주의 제재를 이용한 시험

B: 원래 공시균주의 제재를 이용한 시험

15. *Beauveria sp.* 균주의 형질 전환

현재 세계적으로 미생물 살충제로 잘 개발되어진 *Beauveria sp.* 균주를 이용하여 위에서 개발된 형질 전환 방법의 실용성을 확인해보고자 하였다. 아울러, 본 형질 전환 방법이 용이하게 실시되어 질 경우, 이 균주의 형질 전환을 통하여 새로운 살충력을 지닌 *Beauveria sp.* 균주를 개발하는데 큰 도움이 되리라 여겨진다. 이 실험을 하기 위해서 본 연구팀이 국내에서 분리된 *Beauveria sp.* 균주를 사용하였다. 우선 위에서 언급된 방법대로 원형질체를 순수 분리한 후, 전기 충격법에 의한 형질 전환을 실시하였다. 이 실험 결과 본 연구에서 개발된 형질 전환 방법으로 *Beauveria sp.* 균주를 아주 용이하게 형질 전환 시킬 수 있음을 알 수 있었다(그림 13 및 14). 그러므로, 본 연구에서 얻어진 형질 전환 방법은 앞으로 곤충 기생균을 포함한 새로운 곰팡이 균주를 형질 전환하여 새로운 특성을 개발하는데 매우 유용하게 사용되어 지리라 여겨진다.

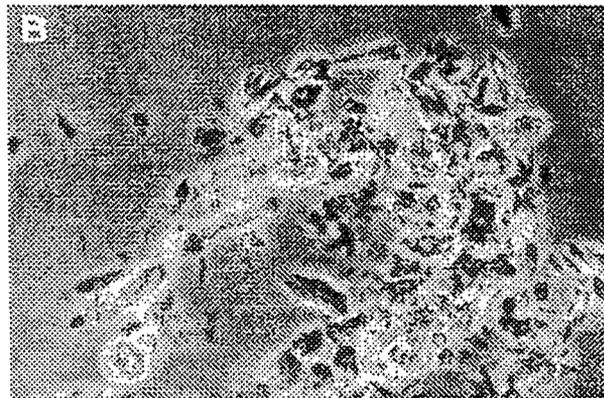
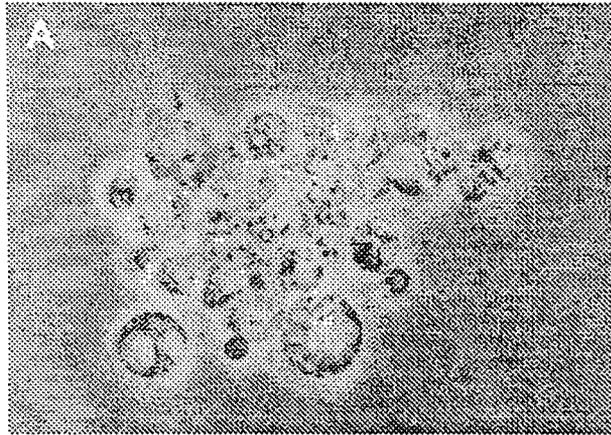


Fig. 13. 국내 *Beauveria sp.* 균주의 원형질체 순수 분리 확인

A: 분리된 *Beauveria sp.* 균주의 원형질체,

B: 0.5% SDS를 처리 하였을 때 원형질체

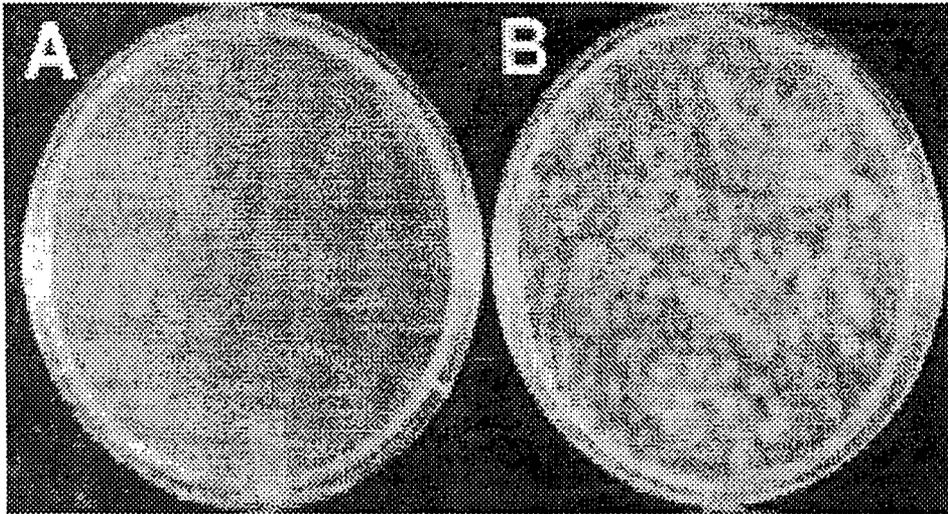


Fig. 14. 국내에서 분리된 *Beauveria sp.* 균주의 전기 충격 방법에 의한 형질 전환체의 선발(hyg.:100ug/ml).

A: *Beauveria sp.* 균주의 wild type, B: 형질 전환된 *Beauveria sp.* 균주.

제4절 종합 고찰

곤충 기생균은 최근들어 미생물 살충제로서의 개발에 많은 관심의 대상이 되고 있는 균이다. 본 연구에서는 이 곤충 기생균에 현재 박테리아 독소 살충제로 잘 알려진 *B. t. t.*-toxin gene을 삽입하여 살충성 범위 확대를 통한 살충력을 향상시키고자 하였다. 이를 위해 우선 곤충 기생균주의 배양 조건을 확립하였고, 형질 전환 벡터의 개발 및 전기 충격 방식에 의한 형질 전환 방법을 확립하였다. 이는 사용된 균주들이 한국에서 분리된 것들이고, 아직 정확한 동정이 안되어 있는 관계로 plate 상에서의 배양에 관한 기본 자료가 필요했던 것이다. 더욱이나, 형질 전환 방법의 선택은 이미 잘 알려진 PEG를 사용한 방법등을 이용 할 수 있었으나, 위에서 언급한 바와 같이 국내에서 발견된 생소한 균주이며, 동충하초에 대한 형질 전환 연구보고서가 없는 상태에서 형질 전환하기에는 미흡한 점등이 많은 관계로 일반적으로 손쉽게 이용 할 수 있는 방법인 전기 충격 방법을 선택 하였다. 형질 전환된 균주 선발을 위한 선발 배지는 hygromycin이 함유된 PDB 배지가 적당한 것으로 나타났다. 형질 전환된 균주의 분자 생물학적 분석을 통하여 형질 전환 벡터에 포함된 *B. t. t.*-toxin gene과 유전자의 발현을 확인하였다. 확인된 균주를 배양한 후, 건조한 다음, 분말로 제재하였다. 이 분말 제재를 물에 희석하여 감자 잎에 바른 후, 감자 잎벌레(딱정 벌레목) 유충을 대상으로 살충력 시험을 실시하였다. 이 결과 곤충 기생균 자체의 분말 제재에서는 나타나지 않았던 감자 잎벌레 유충에 대한 살충력이 형질 전환된 균주의 제재에서는 나타나고 있음이 확인되었다. 이로서 곤충 기생균의 살충력이 유전 공학적 방법에 의해 향상되었음을 알 수 있었다. 그러나, 형질 전환된 균주들의 외래 유전자 발현 정도가 배양 시간이 길어짐에 따라 점점 감소하는 것을 알 수 있었으며, 유전자 자체도 몇 세대를 이어 나가 지 못하고 있다는 것을 알 수 있었다. 이는 아마도, 도입된 유전자가 염색체 DNA에 integration이 안되어 있다는 것을 간접적으로 암시하는 것이라 여겨진다. 즉, 균주 내에서의 도입 유전자의 안정성이 아직은 미흡하다는 점이다. 이러한 유전자의 안정성에 대하여서는 별도로 많은 연구가 필요하리라 여겨진다. 이와 아울러 본 연구에서 확립된 형질 방법의 효율성을 확인하기 위해서

국내에서 분리된 새로운 다른 *Beauveria sp.* 균주를 형질 전환 시켰다. 이 실험에서 *Beauveria sp.* 균주가 아주 용이하게 형질 전환되어 질 수 있음을 알았다. 이는 본 연구에서 개발되어진 방법으로 곤충 기생균을 포함한 다른 곰팡이 균주를 형질 전환하여 새로운 특성을 개발하는데 매우 유용하게 사용되어 지리라 여겨진다. 위에서 언급된 여러 연구 결과들을 연구 계획서와 종합적으로 비교하여 살펴 볼 때, 원래 예상했던 것보다 많은 연구 결과를 얻었다고 볼 수 있겠다. 그리고, 이러한 연구 결과들은 새로운 유전자를 이용한 미생물 살충제 품질 개량 기반 구축과 개량된 곤충 기생균의 유전 자원화, 국내 농산물 수출력 강화 및 경쟁력 강화, 그리고 산업체에 기술을 이전하여 상품화하는데 활용 할 수 있으리라 여겨진다.

제5절 적 요

곤충 기생균은 최근들어 미생물 살충제로서의 개발에 많은 관심의 대상이 되고 있는 균이다. 본 연구에서는 이 곤충 기생균에 현재 박테리아 독소 살충제로 잘 알려진 *B. t. t.*-toxin gene을 삽입하여 살충성 범위 확대를 통한 살충력을 향상시키고자 하였다. 이를 위해 우선 곤충 기생균주의 배양 조건을 확립하였고, 형질 전환 벡터의 개발 및 전기 충격 방식에 의한 형질 전환 방법을 확립하였다. 형질 전환된 균주 선발을 위한 선발 배지는 hygromycin이 함유된 PDB 배지가 적당한 것으로 나타났다. 형질 전환된 균주의 분자 생물학적 분석을 통하여 형질 전환 벡터에 포함된 *B. t. t.*-toxin gene과 유전자의 발현을 확인하였다. 확인된 균주를 배양한 후, 건조한 다음, 분말로 제재하였다. 이 분말 제재를 물에 희석하여 감자 잎에 바른 후, 감자 잎벌레(딱정 벌레목) 유충을 대상으로 살충력 시험을 실시하였다. 이 결과 곤충 기생균 자체의 분말 제재에서는 나타나지 않았던 감자 잎벌레 유충에 대한 살충력이 형질 전환된 균주의 제재에서는 나타나고 있음이 확인되었다. 이로서 곤충 기생균의 살충력이 유전 공학적 방법에 의해 향상되었음을 알 수 있었다. 또한, 본 연구에서 개발

된 형질 전환 방법으로 *Beauveria sp.* 균주의 형질 전환이 아주 용이하게 되어 질 수 있음을 알았다. 이는 본 연구에서 개발되어진 방법으로 곤충 기생균을 포함한 새로운 곰팡이 균주를 형질 전환하여 새로운 특성을 개발하는데 매우 유용하게 사용되어 지리라 여겨진다. 이러한 연구 결과는 새로운 유전자를 이용한 미생물 살충제 품질 개량 기반 구축과 개량된 곤충 기생균의 유전 자원화, 그리고 산업체에 기술을 이전하여 상품화하는데 활용 할 수 있으리라 여겨진다.

제 5 장 곤충기생균 대량배양 기술개발

제1절 서론

농업 생산성 향상을 위한 화학적 방제 기술은 해충이나 잡초 등을 방제하기 위해 현재 전 세계적으로 널리 사용되고 있다. 우리나라도 1970년 후반부터 농업의 발전에 따라 살충제의 사용량이 계속 증가하고 있고, 이로 인한 살충제의 미분해 유해성분의 잔유량도 증가하여 인간 및 타 생물계에 만성적인 유해 요소로 작용하고 있다. 그러나 이 기술은 수질오염, 수중생태계 파괴 등 여러 가지 환경문제를 유발시키고 있다. 이러한 살충제는 대부분 살포 후 다양한 물리 화학적 경로를 통하여 이동하거나, 변환되어서 생태계에 유해한 물질로 전환된다. 뿐만이 아니라 광범위한 살충범위로 인해 먹이사슬에 의한 자연적이고 환경 친화적인 조절은 더욱 어려워질 수밖에 없다. 또한 살충제를 사용할수록 해충의 살충제 내성이 증가하여 강력한 살충제를 사용하여야 하고, 잦은 방제를 통해 병충해를 조절해야 한다. 그러나 미생물에 의한 살충방법을 이용하면 이러한 문제를 해결할 수 있을 것으로 생각된다.

미생물을 이용한 살충 수단으로서 곤충 병원성균의 상업적 생산을 위하여 많은 연구가 진행되어 왔으며, 이에 대한 관심이 고조되고 있다(Quinlan et al., 1983). 곤충 병원성 균을 해충방제에 이용할 경우 많은 이점들이 있는데, 위험물질의 축적이 없고, 살충효과의 선택성 및 지속성이 있으며, 비용이 적게드는 점등을 들 수 있다. 곤충 병원성 곰팡이의 살충 기작은 외부에서의 침입형태이며(Kajek et al., 1994), 곤충 병원성 균의 분생포자(conidia)가 곤충 외벽에 붙어서 발아하면서 큐티클층을 뚫는 물리적인 작용을 하는데, 여기에는 곤충 외벽 큐티클층을 분해하는 chitinase, protease, 그리고 lipase 등의 효소들이 작용하는 것으로 알려져 있다(Rapp et al., 1992). 이러한 효소들의 활성도는 실험실내에서 곤충 병원성 균의 살충능력 정도를 간접적으로 알 수 있는 좋은 지표가 될 수 있다(Havukkala et al., 1993). 곤충 내부에 침입한 곰팡이는 지속적인 성장을 하여 곤충 내부를 균사로 팽창시켜 미이러를 형성하고, 수분이나 온도등 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(Moore et al., 1993).

이들 곤충 병원성균을 해충방제에 이용할 경우 다음과 같은 잇점들이 있다. 인간과 고등동물, 어류, 곡물 등에 직접적인 또는 위험물질의 축적 등과 같은 간접적인 유해요소가 없어 안전성이 높고, 목적하는 해충만 선별적으로 제거할 수 있는 선택성이 있으며, 또한 살충효과의 지속성이 유지되어 반복적인 미생물 제제의 살포를 최소한으로 줄일 수 있다(Samuels et al., 1989; Milner et al., 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 대량 생산할 수 있다.

미생물 살충제를 산업적으로 이용하기 위해서는 아직도 해결해야 할 문제가 많이 있다. 성공적인 상업적 생산과 미생물 살충제의 상용화를 위한 필수적인 조건은 다음과 같다(Roberts et al., 1992). 첫번째는 대량배양에 적합한 곰팡이를 선별해야 한다. 대량배양에 적합한 곰팡이의 특징은 빠른 성장, 풍부한 포자생성과 목표로 하는 해충에 강한 살충성을 보여야 한다. 두번째는 미생물 살충제 생산비용을 최소화해야 한다. 이를 위해 값싼 배지의 선정이 필요하고, 배지는 조성이 간단하고, 대량으로 이용이 가능하고, 생산공정이 쉽게 설계될 수 있는 배지이어야 한다. 세번째로 목적하는 해충들만 죽일수 있도록 제형화되어야 한다. 마지막으로 자연상태나 이와 유사한 환경에서 감염성이나 활성을 크게 잃지 않고 장기간 저장이 가능하도록 제형화되어야 한다는 점이다. Roberto 등(1993)은 *Metarhizium anisopliae*를 배양하여 균사체를 분리한 후 maltose, sucrose 또는 dextrose 10% 용액을 균사체에 분사한 후 건조시켜서 4℃에 45일간 보관한 후 건조중량 1g당 $3.59 - 5.32 \times 10^{10}$ 의 높은 분생포자의 수율을 얻었고, *Beauveria bassiana*에 maltose를 분사하여 건조시킨후 4℃에 45일간 보관한 후 8.62×10^{10} 의 분생포자를 얻었다고 보고하였다. Stephan 등(1998)은 액체배양에서 생성된 포자를 spray-drying 기술을 이용하여 제형화하였으며, Hassan 등(1989)은 포자를 살포하기 전에 미리 반나절 정도를 물에 담가 놓음으로써

germination time을 줄이고 이를 통해 mortality를 높일 수 있다고 보고하였다. 앞에서 언급한 4가지 조건 중에서 현재 가장 중요한 것은 강한 살충성을 갖고 있는 곤충기생균을 대량배양을 하는 것이다.

일반적으로 곤충기생균의 대량배양을 위해 고체배양과, 액체배양 그리고 이단계배양(diphasic fermentation)이 주로 이용되고 있다. 고체배양은 살충성이 강한 분생포자를 많이 생성한다는 장점을 가지고 있다. 그러나 현재 액체배양도 많이 연구되고 있는데, 이는 고체배양에 비해 액체배양이 상대적으로 쉽게 scale-up 할수 있는 장점이 있기 때문이다. 액체배양의 단점으로는 상대적으로 환경에 불안정한 blastospore가 얻어진다는 점이다. 이를 극복하기 위해 sporulation을 유도하려는 많은 연구가 있었다. Delatorre 등(1996)은 유기질소원이 결핍된 상태에서는 균체의 성장이나 포자의 생성이 매우 느리다고 보고하였고, microcyclic sporulation을 이용하여 포자중 분생포자의 비율을 88.8%까지 증가시켰다. Roberto 등(1990)은 발효 조건이나 사용된 균주에 따라 액체배양시 conidia를 생산할 수 있다고 주장하였다. 그리고 호기상태로 균사체의 환경을 바꿔주거나, 배지내의 당농도를 증가시키거나, calcium, copper등을 첨가시키거나, 균사체를 부분적으로 건조시키거나, 균사체를 질소원이 없는 배지로 이동시키거나 하는 방법으로 sporulation이 증가함을 입증하기도 했다(Claude et al., 1965). Kleespies 등(1998)은 adamek 배지에 lecithin, collagen, lactic acid, polyethylen glycol을 첨가하여서 포자의 수율을 높이기도 하였다. 또한 blastospore를 환경에 적응하게 하려는 연구로 blastospore를 동결건조하여 7개월 동안 4℃에서 보관 후에 60%이상의 viability를 확인하였고, 이 포자를 air-drying 한 경우에는 같은 온도에서 90일 저장 후에 25%이하의 viability를 관측하였다(Jackson, 1997). 이와 같은 연구를 통해 blastospore도 살충의 목적으로 사용할 수 있게 되었다. 이단계배양은 액체배양과 고체배양 방식을 모두 이용하는 것으로서, 액체배양에서 성장한 균사체를 고체배지나 얇은 판 위에 옮겨서 포자의 생성을 유도하는 방법이다.

Beaveria sp와 *Metarhizium* sp는 미생물 살충제의 용도로 오래동안 지속적으로 연구되어 왔으나, 이러한 곤충 병원성 균을 산업적으로 이용하기 위해 가장 중요한 문제는 강한 살충성을 유지하면서 대량배양을 하는 것인데, 균사체 또는 포자의 대량배양을 위해 다양한 배양조건을 만족시켜야 하므로 균주에 적합한 온도와 pH를 확립

하고, 성장에 알맞는 배지와 대량배양 조건을 확립해야 한다(Sneh, 1991; Jenkin and Prior, 1993; Butt et al., 1995)

본 연구에서는 곤충 기생균을 미생물 살충제로 산업화에 이용하기 위해 액체배양, 고체배양 그리고 이단계배양에 의한 대량배양기술을 확립함이 그 목적이다. 이를 위해 *Metarhizium* sp와 *Beauveria bassiana* 726의 성장조건을 확립하고 값싼 배지인 벧짚과 전처리된 당밀을 이용하여 균체의 대량배양과 포자생성을 위한 배지를 최적화하고 군사체의 대량생산 공정에 대한 동력학적 모델을 제시하고 반응기의 scale-up이나 디자인 그리고 공정의 최적화 등에 이용될 모델을 제시하였다.

제2절 재료 및 방법

1. 사용균주

곤충 병원성 곰팡이의 일종인 *Beauveria bassiana* 726, *Metarhizium* sp. ARS 2231 그리고 ARS 978 등 3 균주를 강원대학교 농생물학과 및 농촌진흥청으로부터 분양을 받아 본 실험에서 사용하였다.

2. 배지

균주보관시 사용한 사면배지는 DPA (dextrose 2.0%, peptone 1.0%, agar 1.5%) 배지를 사용하였고, 종균배지로는 DPA 배지에서 agar를 제거한 액상배지를 사용하였다. 살충성 확인을 위한 시험용 배지로는 chitinase 확인을 위해서는 Table 2와 같은 조성으로 만들었으며, protease 확인 배지로는 dextrose 1.0%와 skim milk (서울탈지분유-단백질 35% 함유) 1.0% 그리고 agar 1.5%를 혼합하여 만들었다. Lipase의 확인배지는 tributyrin (Sigma Co.) 1.0%, potato dextrose broth (Difco co.) 1.0% 그리고 agar 1.5%를 잘 혼합하여 충분히 녹여준 후 homogenizer를 이용하여 유화시켜서 만들었다(Rapp, 1992). 모든 배지는 121℃, 15기압에서 15분간 멸균해서 1회용 petri dish에 4 mm의 두께로 분주하여 사용하였다.

가. 기본배지 확립

분양 받은 3종의 곤충 병원성 곰팡이의 성장에 적합한 기본배지 확립과 최적 배양온도를 알아보기 위하여 곰팡이의 가장 일반적인 사용배지인 PDA (potato dextrose agar - Difco) 배지와 SDA (Sabouraud's Dextrose agar - dextrose 4.0%, peptone 1.0%, agar 1.5%) 배지 위에 같은 균주를 백금선을 이용하여 접종하였다.

나. 종균 배양 배지 조건 확립

DP broth를 peptone 은 1%(w/v) 로 고정해 놓고, dextrose 를 1% (w/v) 부터 5% 까지 1% 단위로 달리 만든다. 여기에 PDA 사면배지(cap tube, 16.5 × 125 mm) 에 배양 중이던 균을 멸균수 10 ml를 이용하여 포자 및 균사체를 분리하고, 이를 접종하여서 배양한 후 균체량을 측정하여 종균 배양에 가장 적합한 배지를 선별하였다.

3. 배양조건 확립

가. 최적 배양 온도의 확립

세 균주를 agar배지에 접종하여 25℃, 28℃ 그리고 30℃ 조건마다 2개씩 배양하여 14일째 까지 성장상태를 관찰하였고, 균총의 직경을 측정하여 균체의 성장을 정량하였다. 또 전처리한 당밀을 기질로 한 *Beauveria bassiana* 726의 경우는 23℃, 28℃ 그리고 33℃에서 당농도 5.0%, bacto peptone 1.0%의 액체 배지에 접종하여 균체의 농도를 정량하였다.

나. 최적 초기 pH 측정

몇 가지 선정된 기본배지의 초기 pH를 달리하여, 각각의 선정된 최적온도에서 배양하여 곰팡이 균사체의 성장정도를 측정하여 최적 pH를 측정하였다.

4. 배양방법

가. 액체 배양

세 균주의 성장곡선 측정과 다양한 기질의 영향을 조사하는 삼각 플라스크에서의 액체배양은 250 ml 삼각플라스크에 조업부피가 100 ml이 되도록 액체배지를 만들어서 28℃, 180 rpm 으로 진탕배양 하였다. 전처리한 당밀을 기질로 한 경우에는 250 ml 삼각플라스크에서 조업부피를 50 ml로 하여 28℃, 180 rpm으로 진탕배양하였다.

나. 고체배양 및 이단계배양

삼각플라스크에서의 고체배양은 2.5g과 5.0g 기질을 기준으로 수분함량을 70%, 80%, 90%로 맞추어서 250 ml 삼각플라스크에서 28℃에서 배양하였다. 이 때 접종량은 5ml 로 사용하였다.

Bench-scale 고체배양과 이단계배양을 위한 기질로서는 ground 벧짚, chopped 벧짚 그리고 밀기울 을 단독 또는 혼합하여 사용하였으며, 수분함량은 물, 당밀 그리고 tryptone 용액으로 조절하였다. 고체배양의 접종액으로는 종균배양배지에서 성장한 균액을 사용하였으며, 이단계배양은 종균배양배지에서 성장한 균액을 액체배양 배지에 10%로 접종하여 배양한 균액을 사용하였다. 기질에 수분함량을 조절하여 멸균한 후 각각의 균액을 10%로 접종하여 28℃에서 6 - 10일간 배양하였다.

5. 기질전처리

가. 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) 100g에 진한 염산 2,000 ml를 가하여 4℃에서 24시간 동안 교반시키고 glass wool로 여과하였다. 여과액을 4℃ 중류수에 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 5N NaOH로 중화시킨다. 위의 과정에서 생성된 NaCl을 제거하기 위해서 3~4회 증류수로 세척한 후 원심분리하여 침전물을 회수, colloidal chitin을 제조하였다.

나. 당밀의 전처리.

본배양 기질로는 제일제당 인천공장에서 제공받은 당밀을 사용하였다. 본 실험에 사용한 당밀의 조성은 30 - 35%의 sucrose, 10 - 15%의 전화당(포도당과 과당) 그리고 시럽내의 고형분의 농도는 70%(w/w)이었고 회분의 농도는 10.4%였다. 기질의 농도 및 균체량의 측정을 하기 위해 이를 전처리 하여 *Beauveria bassiana* 726의 배양에 사용하였다. 이를 증류수를 이용하여 4배로 희석하고 황산으로 pH 4.0으로 맞춘 후 121℃, 1.5기압에서 30분간 열처리 하였다. 열처리된 당밀을 15,000 rpm에서 30분간 원심분리 후 얻어낸 액을 농축하여서 실험에 사용하였다.

다. 볏짚의 전처리

기질은 두 가지 방법으로 전처리 하였다. 하나는 길이가 약 1cm정도로 잘려진 chopped straw였고 다른 하나는 액체배양에 사용되었던 것과 같은 ground straw였다.

6. 분석

가. 당농도의 측정

환원당과 sucrose의 농도는 Modified DNS Method(Miller et al., 1959)로 측정하였다

나. 효소 역가 측정

Chitinase, protease 그리고 lipase 측정용 배지 위에 멸균한 paperdisk(ADVANTEC, 8mm, thin, Toyo Co.)를 올려놓고, 배양물을 20 μ l 씩 접종하여 28℃에서 배양한 후, 각 배지 위의 halo의 직경을 2일째와 4일째 두 번 측정하여

살충성의 정도를 간접적으로 확인하였다.

다. 균체량 측정

균체량 측정은 dry weight 와 PMV (Packed mycelium volume)를 사용하여 측정하였다. Dry weight는 배양액을 filter paper (Whatman No.1, Whatman Microfibre Filter GF/C)를 이용하여 감압 여과한 후 증류수로 잔여 배지 성분을 세척한 다음 80℃에서 항량이 될 때까지 건조하여 질량을 측정하였다. PMV 는 불용성 기질을 사용하였을 때 측정하였다. 똑같은 배지를 만들어서 하나는 균을 접종하지 않은 상태에서, 다른 하나는 균을 배양한 후 각각 30 ml 씩 정확히 같은 양을 취하였다. 15,000 rpm 으로 20분간 원심분리를 한 후 상층액의 부피를 측정하여 침전물의 부피를 구한다. 침전물의 부피를 백분율 한 후, 균을 배양한것에서 배양하지 않은 것을 빼주어서 늘어난 부피를 측정, 균체량을 구하였다.

$$PMV (\%) = A - B$$

A : 배양액내의 기질과 균체의 부피(%)
B : 배지내의 기질만의 부피(%)

라. 액체배양에서 생성된 포자 농도 측정

혈구계수기(haemocytometer)를 이용하여 배양물내의 포자농도를 측정하였다.

마. 고체배양과 이단계배양에서의 포자 농도 측정

포자를 분리해내서 분석할 때는 고체배양물에 멸균수 100ml을 가해서 rotary shaker에서 약 300 rpm정도로 30분 정도 교반시킨 후 sampling하여서 혈구계수기로 분석하였다.

7. 성장 곡선 및 비성장 속도(Specific growth rate) 측정

선정된 최적 배양 조건으로 250 ml 삼각 플라스크에 100 ml의 액체배지를 만든 다음 고체 배지 위의 균주를 가로 1 cm × 세로 1 cm 크기로 메스로 절단하여 여러 개의 같은 배지에 무균적으로 접종하였다. 이를 180 rpm으로 진탕 배양하여 일정기간 마다 균체량을 측정하여 성장 곡선 및 비성장 속도를 구하였다.

$$\text{비성장 속도 } (\mu) = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$$

(X: 균체의 농도, t : 시간)

8. 다양한 기질에 대한 영향 조사

각기 다른 다양한 탄소원, 질소원, 무기염류 등이 균의 성장 및 효소 역가 그리고 포자의 생성 능력에게 미치는 영향을 조사하였다. 이러한 실험은 시험 기질이 바뀔 때마다 계속 반복적으로 실시되었다.

가. 탄소원의 영향

균주의 대량배양에 적합한 탄소원을 선별하기 위하여 Table 1에 나타나 있는 다양한 탄소원을 이용하였다. 이중 술찌끼 건조물(distiller's dry solubles)은 수원시내의 탁주 제조공장에서 제공받아서 건조 후 마쇄하여 일정한 크기(mesh No. 35)의 체로 걸러서 사용하였으며, 황백당(yellow sugar)과 옥수수 전분(corn starch), 밀가루(wheat flour) 등은 시중에서 구입하여 사용하였다. DP broth의 조성에서 dextrose 대신 각 탄소원을 1.0%씩의 농도로 배지를 만들어서 배양한 후 균체량, 살충성 그리고 포자의 농도를 측정하여 적합한 탄소원을 선별한다. 각 균주마다 선별된 탄소원은 다시 농도를 달리해서 배양하여 최적의 탄소원의 농도를 확립하였다. 질소원은 peptone 1.0%(w/v)로 고정하였다. 본배양은 250 ml의 삼각플라스크에 100 ml의 조업부피로 실시하였으며, 종균의 접종량은 10%로 하였다. 전처리한 당 밀을 기질로 사용한 배양에서는 250 ml 삼각플라스크에 50 ml조업부피로 실시하였으며 종균의 접종량은 10%로 하였다.

나. 무기 질소원의 영향

선별된 탄소원에 Table 1에 나타난 다양한 무기질소원을 첨가하여 배양한 후 균체량, 살충성, 포자의 농도를 측정하여 무기 질소원의 영향을 살펴보았다. 각 균주마다 선별된 질소원의 농도를 달리 배양한 후 최적 유기 질소원의 농도를 확립하였다. 본배양 조건은 배지 조성을 제외하고는 탄소원의 영향을 조사한 실험과 모두 같은 조건으로 하였다.

다. 유기 질소원의 영향

선별된 탄소원에 Table 1에 나타난 다양한 유기질소원을 첨가하여 배양한 후 균체량, 살충성, 포자의 농도를 측정하여 적합한 유기 질소원을 선별하였다. 각 균주마다 선별된 질소원의 농도를 달리 배양한 후 최적 유기 질소원의 농도를 확립하였다. 시험 질소원 중 슬러지 건조물은 탄소원뿐 아니라 질소원으로도 작용하므로 포함시켰다. 배양조건은 무기질소원과 같다.

라. 무기염류의 영향

탄소원과 질소원의 종류 및 농도가 확립된 배지에 Table 1의 무기염류를 첨가하여 배양에 미치는 영향을 각각 측정하였다. 이때 좋은 효과를 나타내어 선별된 무기염류들의 농도를 배양하여 그 영향을 측정하였다.

9. 교반식 반응기에서의 배양

반응기(한국발효기 및 B.brown Ltd.) 배양시 온도는 28℃, 배양액의 초기 pH는 5.0으로 맞추어서 300rpm, 1vvm의 조건으로 배양하였다. Hydrolyzed casein을 포함한 최적배지의 경우, fed-batch 실험시 공급배지로 두가지를 사용하였고, 배지는 간헐적으로 첨가해 주었다. 한가지는 환원당(10%)만 포함한 것이고, 다른 한가지는 환원당(10%), CSL(2.5%), KH_2PO_4 (0.5%)를 포함한 것을 사용하였다. Corn steep liquor를 포함한 최적배지의 경우, fed-batch 실험시 공급배지로 두가지를 사용하였고, 배지는 간헐적으로 첨가해 주었다. 한가지는 환원당(10%)만 포함한 것이고, 다른 한가지는 환원당(10%), CSL(2.5%), KH_2PO_4 (0.5%)를 포함한 것을 사용하였다. Ground 벧짚을 포함한 최적배지인 경우, Fed-batch 실험시 공급배지로 탄소원과 질소원이 함유된 것과 질소원만 함유된 공급배지를 간헐적으로 첨가하였다.

Table 1. List of various carbon, organic, inorganic nitrogen sources and inorganic salts for liquid cultures

Carbon source	Organic nitrogen sources	Inorganic nitrogen sources	Inorganic salts
rice straw (mesh No. 35)	bacto peptone	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
distiller's dry solubles (mesh No. 35)	proteose peptone	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
saw dust	corn steep liquor	KNO_3	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
rice bran	tryptone	NaNO_3	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
wheat flour	hydrolyzed casein	NH_4NO_3	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
corn starch	yeast extract	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
dextrose		NH_4Cl	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
lactic acid			$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
citric acid			$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
sucrose			$\text{FeCl}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$
molasses			K_2HPO_4
yellow sugar			KH_2PO_4
pretreated molasses			KCl
			NaCl
			CaCO_3
			ZnCl_2

제3절 결과 및 고찰

1. 액체배양에서 곤충기생균의 배지 및 배양조건의 확립

가. *Metarhizium anisopliae* ARS 978의 대량배양을 위한 배지최적화

1) 배양온도의 영향

M. anisopliae var. *majus* ARS 978을 PDA와 SDA배지에서 배양했을 때 자라는 형태와 포자의 생성정도는 배지의 종류에 따라 차이가 있었다. *M. anisopliae* ARS 978은 두 배지에서 모두 좋은 성장을 보였고, 배양온도 25℃와 28℃에서는 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 Im 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℃에서 큰 차이를 보이지 않았으나 두 배지 모두 28℃에서 최대 균총의 직경을 보였으므로 최적온도로 결정하였다(Table 2).

2) 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(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 일반적으로 많이 쓰이고 있는 pH 5.5로 맞추어 주었다.

Table 2. Growth of *M. anisopliae* ARS 978 at different temperatures in Potato dextrose agar(PDA) and Sabouraud dextrose agar(SDA) medium.

Temp	Medium	
	PDA	SDA
25°C	++	+++
28°C	+++	+++
30°C	+++	++

colony diameter : +: ≤5.0cm, ++: 5.0 - 6.0cm, +++: 6.0 - 7.0cm

Table 3. Growth of *M. anisopliae* ARS 978 at different pH in potato dextrose agar(PDA) medium.

pH	Growth rate
4.0	++
5.0	+++
6.0	+++
7.0	+++

colony diameter : ++: 5.0 - 6.0cm, +++: 6.0 - 7.0cm

3) 탄소원의 영향

적합한 탄소원을 선별하기 위해 값이 싼 농업폐기물 또는 식품산업부산물 등도 포함하여 이용 가능성을 살펴보았다. Table 4는 *M. anisopliae* ARS 978의 대량 배양을 위해 다양한 탄소원을 이용하였을 때 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 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 sucrose는 균체량이 약 2.3 - 2.5 g/l 정도로 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 주 성분은 sucrose이고, 소량의 복잡한 질소원이 포함되어 일반적인 미생물 배양에 좋은 기질로 알려져 있다. 특히 sucrose 보다 훨씬 높은 균체량과 포자 생성을 보여주고 있다.

Table 5는 molasses 농도를 1 - 4 %(v/v)로 변화시킨 결과이다. Molasses의 농도가 1 - 2 %(v/v)일 때는 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 최적농도로 선정하였다.

Table 4. Effect of various carbon sources on mycelial mass, enzyme activity and sporulation in the cultivation of *M. anisopliae* ARS 978

Carbon substrate	Mycelial mass	Diameter of halo			Sporulation (ml ⁻¹)
		Chitinase	Protease	Lipase	
rice straw	ND	+	++++	+	1.10 × 10 ⁹
saw dust	ND	+	+++	-	3.00 × 10 ⁹
rice bran	ND	+	+++	-	9.00 × 10 ⁸
dextrose	2.29 g/L	+	+	+	1.50 × 10 ⁹
lactic acid	1.45 g/L	+	-	+++	1.00 × 10 ⁸
citric acid	2.42 g/L	+	-	+++	5.30 × 10 ⁹
sucrose	2.58 g/L	+	+	+	9.10 × 10 ⁹
molasses	5.39 g/L	+	+++	+++	6.23 × 10 ⁹
DDS*	ND	+	+++	+	5.00 × 10 ⁸

Culture was carried out at 28°C in the basal medium containing 1.0% (w/v) carbon source.

+ and - mean halo size (-: 0cm, +: ≤1.0cm, ++: 1.0 - 1.5cm, +++: 1.5 - 2.0cm, ++++ ≤2.5 - 3.0cm)

ND : Not determined

*DDS : distiller's dry solubles

Table 5. Effect of molasses concentration on mycelial mass, enzyme activity and sporulation in the cultivation of *M. anisopliae* ARS 978

Molasses %(v/v)	Mycelial mass	Diameter of halo			Sporulation (ml^{-1})
		Chitinase	Protease	Lipase	
1	8.2 g/L	+	+++	++	3.30×10^9
2	8.1 g/L	+	+++	++	4.55×10^9
3	11.17 g/L	+	+++	++	4.25×10^9
4	12.21 g/L	+	+++	++	8.75×10^9

Culture was carried out at 28°C in the basal medium.

+ and - mean halo size (+: $\leq 1\text{cm}$, ++: 1.5 - 2.0cm, +++: 3.0 - 3.5cm)

4) 질소원의 영향

적합한 질소원을 선별하기 위해 무기질소원과 유기질소원의 영향을 살펴보았다. Table 6은 무기질소원의 영향을 보여준다. 무기질소원을 이용할 경우 일정한 균체량에서 포자의 생성을 증가시킨다고 보고되었다(Feng *et al.*, 1994). 그러나 본 실험의 경우 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , NaNO_3 , KNO_3 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.

Table 7은 유기질소원의 영향을 보여준다. 균체량의 경우 유기질소원으로 tryptone을 이용했을 때 9.63 g/l로 가장 높게 나타났고 효소의 활성도 양호하였으나, 생산된 포자의 농도는 $7.00 \times 10^4/\text{ml}$ 로 매우 낮았다. Hydrolyzed casein의 경우는 균체량이 8.98 g/l로 높았고, 효소의 활성도 양호했으며, 포자의 농도는 $1.00 \times 10^5/\text{ml}$ 로 나타났다. 또한 주박의 경우도 균체량이 7.50 g/l로 우수하였으며, 효소의 활성도 양호하고 포자의 농도는 $1.08 \times 10^7/\text{ml}$ 로 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.

Table 8은 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. 주박의 농도에 따른 결과는 Table 9에 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 6. Effect of inorganic nitrogen sources on mycelial mass, enzyme activity and sporulation in the cultivation of *M. anisopliae* ARS 978

Inorganic nitrogen	Mycelial mass	Diameter of halo			Sporulation (ml ⁻¹)
		Chitinase	Protease	Lipase	
None	8.2 g/L	+	+++	++	3.30 × 10 ⁹
(NH ₄) ₂ SO ₄	5.54 g/L	+	-	+	9.90 × 10 ⁹
NH ₄ NO ₃	4.94 g/L	+	+	-	7.00 × 10 ⁹
NaNO ₃	4.53 g/L	+	+	-	2.30 × 10 ⁹
KNO ₃	6.04 g/L	+	+	-	1.00 × 10 ⁹

Culture was carried out at 28°C in the basal medium containing 1.0% (w/v) inorganic nitrogen source.

+ and - mean halo size (-: 0cm, +: ≤1.0cm, ++:1.5-2.0cm, +++:3.0-3.5cm)

Table 7. Effect of organic nitrogen sources on mycelial mass, enzyme activity and sporulation in the cultivation of *M. anisopliae* ARS 978

Organic nitrogen	Mycelial mass	Diameter of halo			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

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

+ and - mean halo size (-: 0cm, +: ≤1.0cm, ++: 1.5 - 2.0cm, +++:2.5 - 3.0cm, ++++:3.0-3.5cm)

ND : Not determined

Table 8. Effect of tryptone concentration on mycelial mass, enzyme activities and sporulation in the cultivation of *M. anisopliae* ARS 978

Tryptone %(w/v)	Mycelial mass	Diameter of halo			Sporulation (ml^{-1})
		Chitinase	Protease	Lipase	
0.2	5.34 g/L	+	++	+	3.40×10^9
0.4	6.98 g/L	+	++	++	2.40×10^9
0.6	6.82 g/L	+	++++	++	1.90×10^9
0.8	8.15 g/L	+	++++	+++	2.20×10^9
1.0	8.25 g/L	+	++++	++	2.50×10^9

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

+ means halo size (+: $\leq 1.0\text{cm}$, ++: 1.5 - 2.0cm, +++: 2.0 - 2.5cm, ++++: 2.5 - 3.0cm)

Table 9. Effect of the concentration of distiller's dry solubles on mycelial mass, enzyme activity and sporulation in the cultivation of *M. anisopliae* ARS 978

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

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

+ and - mean halo size (-: 0cm, +: $\leq 1.0\text{cm}$, ++: 1.0 - 1.5cm, +++: 1.5 - 2.0cm, ++++: 2.0 - 2.5cm)

5) 무기염류의 영향

· 선정된 탄소원과 질소원의 최적농도를 기본배지로하여 다양한 무기염류를 첨가하여 살펴보았다(Table 10). 다양한 무기염류들이 전반적으로 효소의 활성화 및 포자의 생성에 좋은 효과가 있음을 알 수 있었다. 이들 중 CaCO_3 , MgSO_4 , ZnSO_4 , 등은 대조구보다 높은 균체량과 효소의 활성을 나타내었다. 그러나 CuCl_2 의 경우는 균체량도 매우 낮고 효소의 활성화도 전혀 나타나지 않았다. 이들 중 CaCO_3 의 경우가 10.94 g/l로 가장 높은 균체량을 나타내었고, 효소의 활성화 및 포자의 생성도 $8.75 \times 10^6/\text{ml}$ 로 우수하였다.

Table 11은 CaCO_3 의 농도를 변화시킨 결과이다. CaCO_3 의 농도를 0.05 - 0.3 % (w/v)로 변화시켰을 때 CaCO_3 농도가 증가함에 따라 균체량이 증가하였다. 0.3 % (w/v) CaCO_3 에서 가장 높은 11.46 g/l의 균체량을 얻었고, 효소의 활성화 및 포자의 생성도 우수하여 0.3 % (w/v)를 적합한 CaCO_3 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) CaCO_3 로 구성된 단순배지가 균체량, 효소의 활성화 및 포자의 생성을 고려했을 때 적합한 배지로 선정되었다. 특히 이 배지의 성분들의 가격이 저렴하다는 것은 큰 장점이 될 것으로 생각된다.

Table 10. Effect of various inorganic salts on mycelial mass, enzyme activity and sporulation in the cultivation of *M. anisopliae* ARS 978

Inorganic salts	Mycelial mass	Diameter of halo			Sporulation (ml ⁻¹)
		Chitinase	Protease	Lipase	
CoSO ₄ . 7H ₂ O ^a	7.76 g/L	+++	+	+++	8.80 × 10 ⁹
ZnSO ₄ . 7H ₂ O ^a	8.86 g/L	+	+++++	++++	7.60 × 10 ⁹
FeSO ₄ . 7H ₂ O ^a	6.84 g/L	+	+++++	+++	1.17 × 10 ⁹
MgSO ₄ . 7H ₂ O ^a	8.80 g/L	+	+++	+++	1.08 × 10 ⁹
KCl ^b	7.66 g/L	+	+++++	++++	1.40 × 10 ⁹
CaCl ₂ . 2H ₂ O ^b	7.64 g/L	++	+++++	+++	1.17 × 10 ⁹
CuCl ₂ . 2H ₂ O ^a	4.38 g/L	-	-	-	4.65 × 10 ⁹
MgCl ₂ . 6H ₂ O ^b	8.08 g/L	+	+++++	+++	5.80 × 10 ⁹
MnCl ₂ . 4H ₂ O ^b	7.88 g/L	+	+++++	+++	7.85 × 10 ⁹
CaCO ₃ ^a	10.94 g/L	+	+++++	+++	8.75 × 10 ⁹
NaCl ^b	7.36 g/L	++	+++++	+++	5.75 × 10 ⁹
KH ₂ PO ₄ ^b	8.34 g/L	+	+++++	+++	1.43 × 10 ⁹
K ₂ HPO ₄ ^b	7.36 g/L	+	+++++	+++	6.70 × 10 ⁹
None ^c	8.74 g/L	+	+++	+++	2.55 × 10 ⁹

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

a : mean 0.2 %(w/v) conc.

b : mean 0.5 %(w/v) conc.

c : No inorganic salt was added.

+ and - mean halo size (-: 0cm, +: ≤1cm, ++: 1.0 - 1.5cm, +++: 1.5 - 2.0cm, ++++: 2.0 - 2.5cm, +++++: 2.5 - 3.0cm)

Table 11. Effect of the concentration of CaCO₃ on mycelial mass, enzyme activity and sporulation in the cultivation of *M. anisopliae* ARS 978

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

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.

a : No inorganic salt was added.

+ and - mean halo size (-; 0cm, +; ≤1cm, ++; 1.5 - 2.0cm, +++; 3.0 - 3.5cm)

나. *Metarhizium anisopliae* ARS 2231의 대량배양을 위한 배지최적화

1) 배양온도의 영향

Metarhizium anisopliae ARS 2231의 보존 및 접종에 효율적인 성장조건을 알아보았다. Table 12는 온도에 따른 균체의 성장 결과를 보여준다. PDA 배지와 SDA 배지에서 균총의 직경에 의한 성장상태를 비교해 보면 28℃에서는 거의 차이가 없었지만, 25℃에서는 SDA 배지에서 성장률이 PDA 배지보다 더 좋았다. 배지의 종류에 따른 영향은 PDA 배지에서는 포자의 생산이 활발하였으며, SDA 배지에서는 균체량의 성장이 좋았다. 최적성장온도는 각 온도에서 크게 차이는 보이지 않았으나 28℃에서 최대 균총의 신장 직경을 나타내어서 최적성장온도로 정하였다.

2) 초기 pH의 영향

Table 13는 PDA 배지에서 초기 pH에 따른 균체의 성장을 보여준다. pH 5.0, 6.0 그리고 7.0에서는 성장이 양호했으나, pH 4.0에서는 상대적으로 낮은 성장을 보여주었다. 이러한 결과로 볼 때 균체 배양시 5.0-7.0범위에서는 초기 pH를 맞추지 않아도 될 것으로 판단되었으나, 다양한 기질을 이용할 경우 pH가 각각 달라질 수 있으므로, 일반적으로 많이 쓰이고 있는 pH 5.5로 맞추었다.

3) 탄소원의 영향

일반적으로는 미생물 살충제 대량배양을 위한 탄소원으로는 glucose, sucrose, lactose, corn syrup, corn flour, dextrin, whey등이 이용되고 있다 (Soper and Ward, 1981). 좋은 탄소원은 쉽게 구할 수 있고 가격이 저렴하며, 높은 수율을 나타내고, 전처리 등의 복잡한 과정을 생략할 수 있어야 한다. 이러한 조건들과 함께 *M. anisopliae* ARS 2231이 버섯균주임을 감안할 때 셀룰로오스 구조를 갖고 있는 기질도 충분히 사용할 수 있으리라 판단되었다.

M. anisopliae ARS 2231의 대량배양을 위해 적합한 탄소원을 선별하였다. 기본적으로 값이 싸고 높은 수율을 나타낼 수 있는 농업폐기물 등에 중점을 두었다. Table 14은 탄소원의 종류에 따른 균체량, 효소의 활성화도 및 포자생성능을 보여준다. Rice bran을 이용한 경우 균체량은 11.30%(PMV)로 가장 높았고, 3개의 효소활성

은 모두 우수하게 나타났고 포자의 농도는 $3.5 \times 10^6/\text{ml}$ 이었다. 그밖에 균체량은 distiller's dry solubles, rice straw, molasses등에서도 성장이 좋았으며 효소의 활성도도 대체로 좋은 편이었다. 그러나 포자의 농도는 전체적으로 낮은 경향을 보여주고 있다. 균체량과 포자의 농도, 그리고 균체량과 효소의 활성도와는 서로 비례하지 않음을 보여준다. 사용된 기질중 corn starch, saw dust, wheat flour, dextrose, lactic acid등은 효소의 활성도 어느정도 나타내고 포자형성도 되고 있지만, 균체량이 2.0%(PMV)이하로 나타나 적절한 탄소원이 아님을 알 수 있다. 다양한 탄소원중 rice bran이 가장 우수하였으므로 농도에 따른 영향을 살펴보았다(Table 15). 균체량, 효소활성도 및 포자의 생성능을 고려할 때 3%(w/v) rice bran이 적합한 것으로 나타났다. 균체량은 21.50%(PMV)이었으며, 3가지 효소도 고루 분비함을 보여주며, 포자의 농도는 $3.72 \times 10^6/\text{ml}$ 이었다. *M. anisopliae* ARS 2231의 경우 고체배양에서 boiled rice를 탄소원으로 하여 포자를 약 10^6 conidia/ml로 얻었다는 보고가 있었고, 액체배양에서 corn steep liquor, glucose, yeast extract 등을 이용한 시도는 보고되었지만 결과는 알려져 있지 않다(McCoy et al., 1988). 그러나 대체로 사용되고 있는 탄소원이 값비싼 기질인 반면에, 본 실험에서 얻은 rice bran은 값싼 배지로서 중요성이 있다 하겠다.

Table 12. Growth of *M. anisopliae* ARS 2231 at different temperatures in potato dextrose agar (PDA) and Sabouraud dextrose agar (SDA) media.

Strain	Growth					
	PDA			SDA		
	25°C	28°C	30°C	25°C	28°C	30°C
<i>M. anisopliae</i> ARS 2231	++	+++	++	+++	+++	++

+ : means the diameter of cell growth(+: ≤ 5.0cm, ++: ≤ 6.0cm, +++: ≤ 7.0cm)

Table 13. Growth of *M. anisopliae* ARS 2231 at different pH in potato dextrose agar (PDA) media

Strain	Growth			
	pH4.0	5.0	6.0	7.0
<i>M. anisopliae</i> ARS 2231	++	+++	+++	+++

+ : means the diameter of cell growth(+: ≤ 5.0cm, ++: ≤ 6.0cm, +++: ≤ 7.0cm)

Table 14. Effect of various carbon sources on cell mass, enzyme activities, and sporulation in the cultivation of *M. anisopliae* ARS 2231

Carbon substrate	Cell mass (% PMV)	Enzyme activity			Sporulation (1/ml)
		Chitinase	Protease	Lipase	
*rice straw	7.00	+	+++	++ ⁺	9.30×10^9
*distiller's dry solubles	9.18	+	+++	++	5.50×10^9
*saw dust	1.00	+	+++ ⁺	++	1.13×10^9
*rice bran	11.30	+	+++	+++	3.50×10^9
*wheat flour	1.00	+	+++	++	2.70×10^9
*corn starch	ND	+	+++	+++	9.20×10^9
dextrose	1.93	+	+++	++	3.75×10^9
lactic acid	1.72	+	++	++	3.87×10^9
citric acid	2.24	+	+	++	1.10×10^9
sucrose	2.00	+	++	++	9.10×10^9
molasses	7.25	+	+++	++	6.90×10^9
yellow sugar	5.55	+	++	++	2.33×10^9

Culture was carried out at 28°C in the basal medium containing 1.0% (w/v) carbon source. + means halo size(+; ≤ 1.0cm, ++; ≤ 2.0cm, ++⁺; ≤ 2.5cm, +++; ≤ 3.0cm, +++⁺; ≤ 3.5cm). ND : Not Determined. * : Insoluble substrate. Cell mass was measured by Packed Mycelium Volume (PMV).

Table 15. Effect of rice bran concentration on cell mass, enzyme activities and sporulation in the cultivation of *M. anisopliae* ARS 2231

Rice bran (%, w/v)	Cell mass (%PMV)	Enzyme activity			Sporulation (1/ml)
		Chitinase	Protease	Lipase	
* 1	11.30	+	+++	++	3.86×10^6
* 2	11.34	+	++++	++	2.47×10^6
* 3	21.50	+	+++	++	3.72×10^6
* 4	11.34	+	+	++	3.96×10^6

Culture was carried out at 28°C in the basal medium. + means halo size (+: ≤1 cm, ++: ≤2.0cm, +++: ≤3.0cm, ++++: ≤4.0cm). *: Insoluble substrate. Cell mass was measured by Packed Mycelium Volume (PMV).

4) 질소원의 영향

본 실험에서는 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , NaNO_3 , KNO_3 등의 무기질소원을 첨가하여 균체량, 효소의 활성, 포자생성능을 살펴보았다(Table 16). $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 , KNO_3 를 첨가한 경우 균체량이 감소하였으며, 효소의 활성도도 protease와 lipase가 낮아짐을 보여주고 있다. NH_4NO_3 는 균체량은 높아졌으나 효소의 활성도가 감소하였다.

미생물 살충제 생산을 위한 복잡한 유기질소원으로는 soybean meal, corn steep liquor, brewer's yeast 등이 많이 이용되었는데, 이들 및 다양한 유기질소원을 배양에 이용해 보았다. Table 17은 유기질소원의 영향을 보여준다. 사용된 유기질소원중 hydrolyzed casein의 경우 균체량이 17.37%(PMV)로 가장 높게 나타났으며, 효소의 활성들도 양호하였다. Tryptone의 경우도 균체량이 16.87%(PMV)로 높게 나타났으나, lipase의 활성이 나타나지 않았으며 포자의 농도도 감소하였다. 그밖에 distiller's dry solubles과 corn steep liquor의 경우는 균체량이 각각 12.17%(PMV)로 나타났다. Yeast extract도 균체량이 13.17%(PMV)로 양호하였으나, lipase의 활성이 없음을 보여준다.

따라서 적합한 유기질소원으로 hydrolyzed casein을 선정하였고, hydrolyzed casein 농도에 따른 영향을 살펴보았다(Table 18). 0.2%(w/v)와 0.4%(w/v) hydrolyzed casein에서는 균체량과 포자생성능이 낮았으나, 효소의 활성은 정상적으로 유지하였다. 특히 0.8%(w/v)에서 균체량이 26.84%(PMV)로 매우 높게 나타났으며 효소의 활성 및 포자생성능도 적절하였다. 그러나 1.0%(w/v)에서는 균체량이 16.50%(PMV)로 0.8%(w/v)에 비해 약 40% 감소함을 보여준다. 유기질소원중 hydrolyzed casein 다음으로 균체량, 효소활성이 적절하고 값이 매우 싼 distiller's dry solubles를 농도별로 실험하였으나 Table 19에서 보는 바와 같이 hydrolyzed casein에 비해 포자생성능은 증가하였으나 균체량, 효소활성이 급격하게 감소함을 알 수 있었다. 따라서 0.8%(w/v) hydrolyzed casein을 적합한 질소원으로 선정하였다.

Table 16. Effect of inorganic nitrogen sources on cell mass, enzyme activities and sporulation in the cultivation of *M. anisopliae* ARS 2231

Inorganic nitrogen	Cell mass (%PMV)	Enzyme activity			Sporulation (1/ml)
		Chitinase	Protease	Lipase	
(NH ₄) ₂ SO ₄	4.47	+	++ ⁺	++	5.58 × 10 ⁷
NH ₄ NO ₃	16.17	+	++	++	4.17 × 10 ⁷
NaNO ₃	7.47	+	++ ⁺	++	1.28 × 10 ⁷
KNO ₃	8.47	+	+++	++	1.33 × 10 ⁷

Culture was carried out at 28°C in the basal medium containing 1.0%(w/v) inorganic nitrogen source. + means halo size (+: ≤1cm, +⁺: ≤1.5cm, ++: ≤2.0 cm, ++⁺: ≤2.5cm, +++: ≤3.0cm). Cell mass was measured by Packed Mycelial Volume(PMV).

Table 17. Effect of organic nitrogen sources on cell mass, enzyme activities and sporulation in the cultivation of *M. anisopliae* ARS 2231

Organic nitrogen	Cell mass (%PMV)	Enzyme activity			Sporulation (1/ml)
		Chitinase	Protease	Lipase	
*soybean meal	7.37	+	+	-	2.44×10^7
corn steep liquor	12.17	+	++ ⁺	++ ⁺	3.62×10^7
proteose peptone	1.17	+	++	++ ⁺	4.84×10^7
bacto-peptone	7.47	+	+++	++	4.12×10^7
tryptone	16.87	+	+++	-	1.86×10^7
yeast extract	13.17	+	+++ ⁺	-	5.16×10^7
*hydrolyzed casein	17.37	+	+++ ⁺	++	1.53×10^7
*distiller's dry solubles	12.17	+	++	++	3.65×10^7

Culture was carried out at 28°C in the basal medium containing 1.0%(w/v) organic nitrogen source. + means halo size (-: 0cm, +: ≤1cm, +⁺: ≤1.5cm, ++: ≤2.0cm, ++⁺: ≤2.5cm, +++: ≤3.0cm, +++⁺: ≤3.5cm). * : Insoluble substrate. Cell mass was measured by Packed Mycelium Volume (PMV).

Table 18. Effect of the concentration of hydrolyzed casein on cell mass, enzyme activities and sporulation in the cultivation of *M. anisopliae* ARS 2231

Hydrolyzed casein(%w/v)	Cell mass (%PMV)	Enzyme activity			Sporulation (1/ml)
		Chitinase	Protease	Lipase	
0.2	14.84	+	+++	++	5.15×10^9
0.4	12.84	+	+++	++ ⁺	5.80×10^9
0.6	20.84	+	+++	++ ⁺	1.24×10^9
0.8	26.84	+	+++	++ ⁺	1.52×10^9
1.0	16.50	+	+++	++ ⁺	1.21×10^9

Culture was carried out at 28°C in 3%(w/v) rice bran medium containing different hydrolyzed casein concentration. + means halo size (+: ≤1cm, +⁺: ≤1.5cm, ++: ≤2.0cm, ++⁺: ≤2.5cm, +++: ≤3.0cm). Cell mass was measured by Packed Mycelium Volume (PMV).

Table 19. Effect of the concentration of distiller's dry solubles on cell mass, enzyme activities and sporulation in the cultivation of *M. anisopliae* ARS 2231

* Distiller's dry solubles (% w/v)	Cell mass (%PMV)	Enzyme activity			Sporulation (1/ml)
		Chitinase	Protease	Lipase	
0.2	4.00	+	+ ⁺	++	1.28×10^9
0.4	8.17	+	+	++ ⁺	3.68×10^9
0.6	7.00	+	+	++ ⁺	2.36×10^9
0.8	4.50	+	+	++ ⁺	2.15×10^9
1.0	11.84	+	+	++ ⁺	2.31×10^9

Culture was carried out at 28°C in 3%(w/v) rice bran medium containing different distiller's dry solubles concentration. + and - mean halo size (+: ≤ 1cm, +⁺: ≤1.5cm, ++: ≤2.0cm, ++⁺: ≤2.5cm). * : Insoluble substrate. Cell mass was measured by Packed Mycelium Volume (PMV).

5) 무기염류의 영향

Table 20는 앞에서 선정된 3%(w/v) rice bran과 0.8%(w/v) hydrolyzed casein을 기본배지로 하여 다양한 무기염류들을 첨가했을 때의 결과를 보여준다. KCl과 K_2HPO_4 를 첨가했을 때 무기염류를 첨가하지 않은 경우에 비해 균체량이 증가함을 보여준다. K_2HPO_4 의 경우가 34.17% (PMV)로 가장 높았고, KCl의 경우는 32.17%(PMV)이었다. 반면에 CuCl₂는 균체농도가 매우 낮아 균체성장을 저해하는 것으로 나타났다. 효소활성 중 chitinase와 lipase는 무기염류의 종류에 따라 거의 영향이 없었으나, protease의 활성은 영향을 받는 것으로 나타났다. KCl과 MgCl₂의 경우 효소활성이 가장 높게 나타났고, 그 다음이 K_2HPO_4 로 나타났다. Protease의 활성과 포자농도는 K_2HPO_4 보다 KCl의 경우가 높았으나, 커다란 차이가 없었고 현 단계에서는 균체량의 농도가 가장 중요하므로 K_2HPO_4 를 배지성분으로 선정하였다. 따라서 K_2HPO_4 를 농도별로 실험한 결과를 Table 21에 나타내었다. 균체량을 비교해 볼 때 0.3%(w/v)보다 0.5%(w/v)가 약간 높았으나 protease의 활성은 0.3%(w/v)의 경우가 높았다. 그러나 배지가격을 고려할 때 0.3%(w/v)가 타당한 것으로 보인다.

결론적으로 3%(w/v) rice bran, 0.8%(w/v) hydrolyzed casein, 0.3%(w/v) K_2HPO_4 가 대량배양을 위한 적합한 배지로 선정되었다. 확립된 배지는 기존의 연구자들이 값비싼 탄소원들을 이용한 반면에, 값싼 rice bran을 이용함으로써 균체량을 약 30%(PMV)까지 올릴 수 있었다. 이는 현재 대량생산을 위해 많이 연구되고 있는 *Beauveria bassiana* 726의 배지최적화를 통해 얻은 6%(PMV)에 비하면(Moon et al., 1997) 약 5배 정도 높은 균체량으로 균체 및 포자를 직접 이용하거나, 또는 이 확립된 배지를 이용하여 유가식 배양을 수행함으로써 포자만을 대량생산할 수 있는 기술이 확립될 수 있을 것이다.

제2절의 1과 2에서 *Metarhizium anisopliae* ARS 978과 ARS 2231의 배양을 위한 배지를 최적화하였고, 다음 제2절의 3에서는 *Beauveria bassiana* 726을 이용하여 배지최적화 및 대량배양조건을 확립하였다. 앞의 실험과정 중 농업과학 기술원에서 3균주 중 *B. bassiana* 726이 가장 살충성이 높은 것으로 판명되어 액체배양, 고체배양 그리고 이단계배양을 이용하여 대량배양 조건을 확립하였고 포자를 제형화하였다.

Table 20. Effect of various inorganic salts on cell mass, enzyme activities and sporulation in the cultivation of *M. anisopliae* ARS 2231

Inorganic salts	Cell mass (%PMV)	Enzyme activity			Sporulation (1/ml)
		Chitinase	Protease	Lipase	
CoSO ₄ . 7H ₂ O ^a	19.50	+	+	++	5.70 × 10 ⁶
ZnSO ₄ . 7H ₂ O ^a	27.50	+	+	++	2.37 × 10 ⁷
FeSO ₄ . 7H ₂ O ^a	25.17	+	+++	++	2.00 × 10 ⁷
MgSO ₄ . 7H ₂ O ^a	26.84	+ ⁻	++	++	1.44 × 10 ⁷
KCl ^b	32.17	+ ⁺	++++	++	1.85 × 10 ⁷
CaCl ₂ . 2H ₂ O ^b	16.84	+ ⁻	++	++	1.39 × 10 ⁷
CuCl ₂ . 2H ₂ O ^a	1.50	+	+	++	6.90 × 10 ⁶
MgCl ₂ . 6H ₂ O ^b	22.84	+	++++	++	1.24 × 10 ⁷
MnCl ₂ . 4H ₂ O ^b	10.84	+	++	++	3.86 × 10 ⁷
CaCO ₃ ^a	23.50	+	++ ⁺	++	9.50 × 10 ⁶
NaCl ^b	23.34	+	+++	++	1.43 × 10 ⁷
KH ₂ PO ₄ ^b	22.17	+ ⁺	+ ⁺	++	1.48 × 10 ⁷
K ₂ HPO ₄ ^b	34.17	+ ⁻	+++ ⁺	++	4.80 × 10 ⁶
None ^c	31.00	+	+++	++ ⁺	3.70 × 10 ⁶

Culture was carried out at 28°C in 3%(w/v) rice bran, 0.8%(w/v) hydrolyzed casein medium containing various inorganic salts. a : mean 0.2 %(w/v) conc. b : mean 0.5 %(w/v) conc. c : No inorganic salt was added. + means halo size (+: ≤1cm, +⁻: ≤1.25cm, +⁺: ≤1.5cm, ++: ≤2.0cm, ++⁻: ≤2.5cm, +++: ≤3.0cm, +++⁻: ≤3.5cm, +++⁺: ≤4.0cm).

Cell mass was measured by Packed Mycelium Volume (PMV).

Table 21. Effect of the concentration of K_2HPO_4 on cell mass, enzyme activities and sporulation in the cultivation of *M. anisopliae* ARS 2231

K_2HPO_4 (%, w/v)	Cell mass (%PMV)	Enzyme activity			Sporulation (1/ml)
		Chitinase	Protease	Lipase	
0.1	20.17	+	+++ ⁺	++	1.38×10^7
0.2	25.67	+	+++ ⁺	++	1.81×10^7
0.3	29.17	+	++++	++	1.81×10^7
0.4	27.50	+	++++	++	2.88×10^7
0.5	30.17	+	+++ ⁺	++	5.54×10^7

Culture was carried out at 28°C in 3.0%(w/v) rice bran, 0.8%(w/v) hydrolyzed casein medium containing different K_2HPO_4 concentrations. a : No inorganic salt was added. Cell mass was measured by Packed Mycelium Volume (PMV). + means halo size (+: ≤1cm, +⁺: ≤1.5cm, ++: ≤2.0cm, ++⁺: ≤2.5cm, +++: ≤3.0cm, +++⁺: ≤3.5cm, ++++: ≤4.0cm)

다. *Beauveria bassiana* 726의 대량배양을 위한 배지최적화 및 배양조건 확립

1) 벧짚을 기질로 한 경우

(1) 균주의 성장조건 확립

Beauveria bassiana 726의 보존 및 접종에 효과적으로 사용하기 위하여 성장에 적합한 조건을 찾아보았다. 곰팡이 균주이므로 PDA 와 SDA 배지에서 균체량은 큰 차이 없이 성장하는 것을 관찰할 수 있었으나, 자라는 형태와 포자의 생성 정도는 배지의 종류에 따라 차이가 있었다. PDA 배지에서 더 좋은 성장을 보이며, 배양온도 25℃와 28℃에서는 큰 성장차이를 보이지 않았다. 배지에 따른 영향은 PDA 배지에서는 포자의 생산이 더욱 활발하였으며, SDA 배지에서는 균체량의 증식이 더욱 좋았다. 이러한 결과는 SDA 배지에는 탄소원으로 사용되는 glucose의 농도가 높아 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 22).

(2) 초기 pH의 영향

균주의 초기 pH에 관한 영향을 조사한 결과, pH 4.0에서는 저조한 성장을 보였으나, pH 5.0, 6.0 그리고 7.0에서는 양호한 증식을 나타내었다(Table 23). 실험의 결과를 토대로 균주의 배양시 특별히 초기 pH를 맞춰주지 않아도 될 것으로 판단되었으나, 다양한 기질을 사용하여 배지를 만들 경우 각각의 pH가 모두 달라지므로 PDA 와 SDA 배지를 제외하고는 모든 시험 배지의 pH를 5.5로 맞추어 주었다.

(3) 종균 배양 조건의 확립

종균 배양에 접종할 균주가 SDA 사면배지에서 성장할 경우 풍부한 양의 배지성분 때문에 포자의 생성이 잘 일어나지 않았다. 그러므로 DPA 사면배지 (dextrose 2.0%, peptone 1.0%, agar 1.5%)를 사용하였다. 또한 DPA 사면배지에 균을 접종한 후에도 10일 이상의 배양기간을 두어서 충분히 포자가 생성되도록 한 후 종균 배양용 배지에 접종을 하였다. Dextrose의 농도를 달리하여 종균 배양한 결과

는, 1%부터 5%까지 농도가 증가할수록 균체량도 증가하였으나 1.0-4.0%까지는 큰 차이는 나타나지 않았으므로 dextrose의 농도는 지나치지 않으면서 충분하게 탄소원을 공급할 수 있는 농도인 2%로 결정하였다. 정해진 조성의 배지로 종균을 배양할 때에는 균체량의 농도를 높일 목적으로 사면배지의 포자만 멸균수로 분리하지 않고 균사체까지 작은 약수저를 이용하여 분리, 접종하였다. 이 결과 포자만으로 배양하였을 때 보다 3.5배의 균사체 증가를 얻을 수 있었다.

Table 22. Growth of *B. bassiana* 726 at different temperatures in potato dextrose agar (PDA) and Sabouraud dextrose agar (SDA) media

Strain	Growth					
	PDA			SDA		
	25°C	28°C	30°C	25°C	28°C	30°C
<i>B. bassiana</i> 726	++	++	+	+	++	+

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

Table 23. Growth of *B. bassiana* 726 at different pH in potato dextrose agar (PDA) media

Strains	Growth			
	pH4.0	5.0	6.0	7.0
<i>B. bassiana</i> 726	++	+++	+++	+++

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

(4) 탄소원의 영향

곤충 기생균의 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 두루 갖추어야 하였다. 이러한 조건들과 함께, 대상균주가 버섯균주인 점을 감안할 때 cellulose구조를 가지고 있는 기질도 충분히 사용할 수 있으리라 판단되었다.

Table 24는 다양한 탄소원을 사용하여 배양한 결과를 보여준다. 볏짚을 이용한 경우 균체량 및 효소의 활성도를 고려할 때 다른 기질에 비해서 3개의 효소 활성이 모두 우수하게 나타났고, 포자의 농도도 1.96×10^8 으로 나타났다. *B. bassiana* 726은 모든 기질에서 pellet이 아닌 배지 전체에 고루 퍼져서 자랐으며, 특이한 사항은 saw dust와 corn starch에서는 foam이 매우 많이 발생하였고, foam에는 포자가 많이 있었다. 균체량은 rice straw, 술찌끼 건조물, rice bran, molasses, wheat flour 그리고 yellow sugar 등이 많이 증식했으며, 균체량이 증가하면 포자의 농도도 증가함을 관찰할 수 있었다. 그러나 균체량과 효소의 활성도와는 무관하였다. 효소의 활성도는 기질의 종류와 연관이 있었다. Dextrose와 sucrose는 거의 성장이 미비하였으며, 포자의 농도도 적었으며, lactic acid 와 citric acid도 탄소원으로는 부적절하였다. 이들 중 탄소원으로 rice straw와 molasses를 선정하여 최적 농도를 측정한 결과 rice straw 2%가 결정되었다(Table 25). 당밀의 경우 효소의 활성도가 너무 낮게 나타나서 탄소원으로 사용하기에는 부적합하였다(Table 26).

Table 24. Effect of various carbon sources on cell mass, enzyme activities and sporulation in the cultivation of *B. bassiana* 726

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 solubles	dry 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 (-: 0cm, +: ≤1cm, ++: ≤2.0cm, ++': ≤2.5cm, +++: ≤3.0cm,)

ND : Not determined

* : Insoluble substrate. Cell mass was measured by Packed Mycelium Volume (PMV).

Table 25. Effect of rice straw concentration on cell mass, enzyme activities and sporulation in the cultivation of *B. bassiana* 726

Rice straw %(w/v)	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 (+: ≤1cm, +⁺: ≤1.5cm, ++: ≤2.0cm, ++⁺: ≤2.5cm,)

* : Insoluble substrate. Cell mass was measured by Packed Mycelium Volume (PMV).

Table 26. Effect of molasses concentration on cell mass, enzyme activities and sporulation in the cultivation of *B. bassiana* 726

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 (-: 0cm, +: ≤1cm, +⁺: ≤1.5cm, ++: ≤2.0cm, ++⁺: ≤2.5cm,)

(5) 질소원의 영향

Feng등(1994)은 무기 질소원을 이용할 경우 *B. bassiana* 726은 균체량의 증가보다는 포자의 생성에 도움을 준다고 보고하였다. 그래서 본 실험에서는 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , NaNO_3 , KNO_3 와 같은 무기질소원을 첨가하여 균체량, 효소의 활성, 포자생성능을 살펴보았다. Table 27에서 보는 바와 같이 전반적으로 무기질소원을 첨가할 때 균체량 및 효소의 활성이 오히려 감소함을 알 수 있었다. 결과적으로 무기 질소원은 그것이 유일한 질소원이라면 균체량 증가 및 포자 생산에 크게 도움이 되지 않는 것을 알 수 있었다.

Table 28은 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 solubles등은 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 29). Tryptone의 농도와 관계없이 전반적으로 효소 활성도와 포자생성능이 우수한 것이 특징이었고, 포자생성능은 0.2%의 경우가 더 좋았으나 궁극적으로 포자의 대량 생산을 위한 균체량을 고려할 때 0.6% tryptone의 경우가 적합한 것으로 나타났다.

Table 27. Effect of inorganic nitrogen sources on cell mass, enzyme activities and sporulation in the cultivation of *B. bassiana* 726

*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 (-: 0cm, +: ≤1cm, ++: ≤2.0cm) ND : Not determined

* : Insoluble substrate. Cell mass was measured by Packed Mycelium Volume (PMV).

Table 28. Effect of organic nitrogen sources on cell mass, enzyme activities and sporulation in the cultivation of *B. bassiana* 726

*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	+	++	++	4.80×10^8 /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 (-: 0cm, +: ≤1cm, ++: ≤2.0cm)

ND : Not determined

* : Insoluble substrate. Cell mass was measured by Packed Mycelium Volume (PMV).

Table 29. Effect of tryptone concentration on cell mass, enzyme activities and sporulation in the cultivation of *B. bassiana* 726

*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 trypton conc.

+ and - mean halo size (++: ≤2.0cm, ++^{*}: ≤2.5cm, +++: ≤3.0cm,)

ND : Not determined

* : Insoluble substrate. Cell mass was measured by Packed Mycelium Volume (PMV).

(6) 무기 염류의 영향

선정된 탄소원과 질소원의 최적 농도를 기본 배지로 하여 다양한 무기 염류들을 첨가하여 그 영향을 살펴보았다(Table 30). 전반적으로 무기염류가 *B. bassiana* 726의 성장을 방해하는 것으로 나타났다. 배양 상태를 보면 $MgCl_2$, KCl 등과 함께 $MgSO_4$ 가 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 $5.76 \times 10^7/ml$ 로 다소 낮은 편이었다. 그 밖의 무기 염류들이 성장에는 별 도움을 주지 못하는 것으로 판단된다. $CuCl_2$ 는 배양 결과 오히려 균체의 성장과 함께 효소 생산등을 저해하는 것으로 나타났다. 무기 염류등을 첨가하여 가장 좋은 결과가 나왔던 $MgSO_4$ 를 농도별로 시험 배양해 본 결과도 마찬가지로 균체량, 효소의 활성화도, 포자생성능을 고려할 때 대조구보다 크게 향상되지 않았다(Table 31). 결과적으로 *B. bassiana* 726의 대량배양을 위한 최적배지로서 2.0% rice straw와 0.6% tryptone으로 구성된 단순배지가 균체량, 효소활성도 및 포자의 생성능을 고려할 때 적합한 배지로 결정되었다. 이 결과에서 미생물의 포자생산을 위해 값싼 rice straw가 적합한 탄소원으로 나타난 것은 흥미로운 결과이다. 이 결과를 토대로 교반식 반응기에서 회분식 및 유가식 배양을 수행하였다.

Table 30. Effect of various inorganic salts on cell mass, enzyme activities and sporulation in the cultivation of *B. bassiana* 726

*Inorganic salts	Cell mass (x)	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 ⁸ /ml
CuCl ₂ . 2H ₂ O ^a	1.67	-	-	-	4.00 × 10 ⁸ /ml
MgCl ₂ . 6H ₂ O ^b	5.67	+	++ ⁺	++	2.01 × 10 ⁹ /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.

a : mean 0.2 %(w/v) conc.

b : mean 0.5 %(w/v) conc.

c : No inorganic salt was added.

+ and - mean halo size (-: 0cm, +: ≤1cm, +⁺: ≤1.5cm, ++: ≤2.0cm, ++⁺: ≤2.5cm, +++: ≤3.0cm,)

ND : Not determined

* : Insoluble substrate. Cell mass was measured by Packed Mycelium Volume (PMV).

Table 31. Effect of the concentration of $MgSO_4$ on cell mass, enzyme activities and sporulation in the cultivation of *B. bassiana* 726

* $MgSO_4$ %(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	+	+++ ⁺	++	5.84×10^7

Culture was carried out at 28°C in rice straw 2%(w/v), tryptone 0.6%(w/v) medium containing different $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ conc.

a : No inorganic salt was added.

+ mean halo size (+: ≤1cm, ++: ≤2.0cm, +++: ≤3.5cm)

* : Insoluble substrate. Cell mass was measured by Packed Mycelium Volume (PMV).

(7) 교반식 반응기에서의 균체 및 포자의 생산

삼각플라스크 배양에서 선정된 *B. bassiana* 726의 최적배지 조성인 2.0% 벧짚, 0.6% tryptone을 이용하여 교반식 반응기에서 활성포자 생산을 검토하였다. 유동층 반응기(Airlift)에서는 급격한 균체의 성장에 의해 배양액 점도가 너무 높아져 포자의 대량생산을 위한 반응기로 적합치 않았다.

교반식 반응기(1.5 L, 2.5 L)에서 300 rpm, 28 °C, 1.0 vvm의 조건으로 배양한 결과 배양개시 후 48시간 만에 포자의 농도가 약 1.85×10^8 /ml로 나타났으나 이후 배양이 끝날 때 까지 포자농도 변화가 크지 않았다. 이 결과는 삼각플라스크 배양에 비해 교반식 반응기에서 생산성이 훨씬 높음을 보여준다. 또한 벧짚을 이용하여 포자를 대량생산하는데 균체의 성장에 따른 점도등의 문제점도 없어 가격도 저렴하고 생산성이 높은 우수한 기질로 증명되었다.

포자농도를 증가시키기 위하여 2.0% 벧짚과 10% tryptone을 공급배지로 사용하여 유가식 배양을 수행하였다. 공급배지의 공급초기에는 포자농도가 약간 감소하였지만 이후 포자농도가 급격히 증가하였다. 회분식 및 유가식 배양에서의 시간에 따른 포자생성은 Fig. 1에서 보여준다. 유가식 배양을 함으로써 회분식 배양에 비해 생산된 최대 포자농도를 약 3배 정도 증가시킬수 있었다. 또한 10% tryptone만을 공급배지로 사용한 유가식 배양에서도 벧짚과 tryptone을 공급배지로 사용한 유가식 배양보다 포자농도가 다소 높았다(Fig. 2). 이러한 결과로 볼 때 포자농도를 증가시키기 위한 유가식 배양은 탄소원보다도 유기질소원이 큰 영향을 미친다. 그러므로 포자 생산공정은 유기질소원 만으로도 조절될 수 있는 단순화된 공정으로 큰 장점을 지닌다.

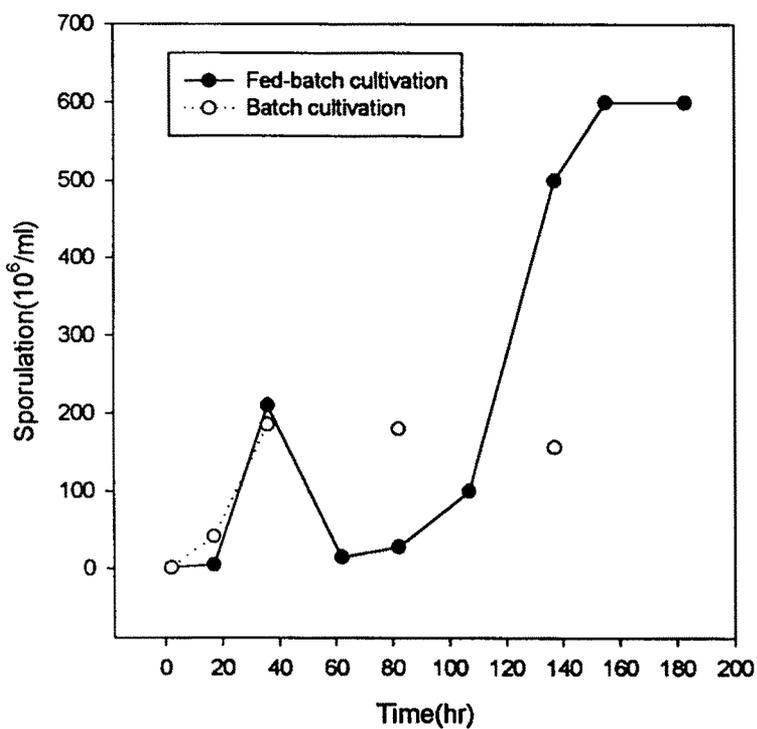


Fig. 1. Batch and fed-batch cultures in the optimized medium containing 2.0% rice straw and 0.6% tryptone in the stirred tank reactor (arrow: addition time of 100ml feeding medium containing 2.0% rice straw and 10% tryptone)

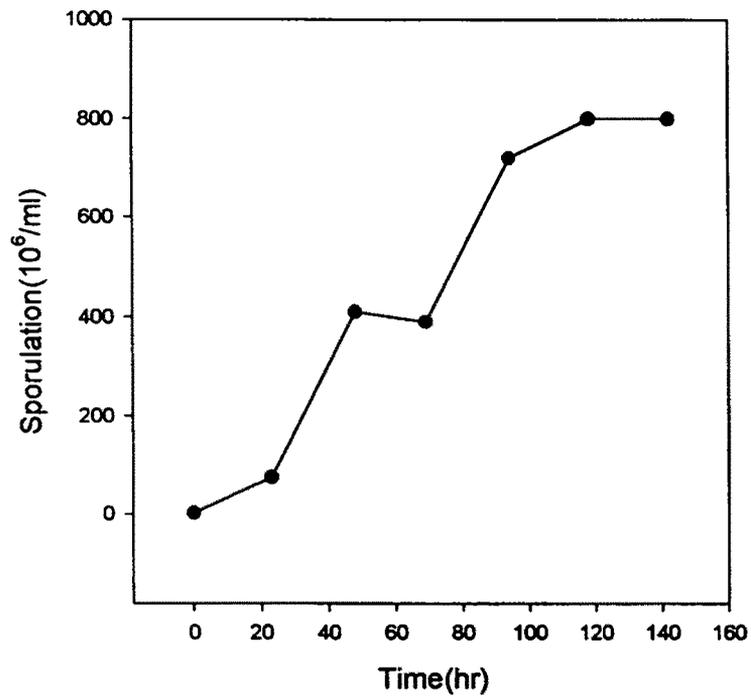


Fig. 2. Fed-batch culture in the optimized medium containing 2.0% rice straw and 0.6% tryptone in the stirred tank reactor (arrow: addition time of 100ml feeding medium containing 10% tryptone)

2) 당밀을 기질로 한 경우

(1) *Beauveria bassiana* 726의 성장

PDA 배지에서 보관중이던 균체를 DP(2% dextrose, 1% peptone)배지에 접종하여 시간에 따른 균체의 성장을 관측한 결과(Fig. 3), lag phase가 거의 없음을 나타냈다. 이런 결과는 lag time을 줄이기 위한 종균배양이 잘 이루어졌음을 나타낸다. 균체 성장을 관찰한 사진은 Fig. 4와 같다. 균체는 대략 5 - 6 일 사이에 stationary phase에 도달하였다. 6시간째는 거의 접종당시의 포자가 주로 있으나, 포자가 발아해서 생성된 균사체를 보여주며, 24시간째는 균사체가 왕성한 성장을 보여준다. 생성되는 포자의 수를 보면(Fig. 5), 처음부터 하루까지는 포자가 감소하는데 이때는 포자가 균사체로 성장하는 과정이므로 포자의 수가 감소한다. 그러다가 균사가 성장한 후 sporulation을 하면서 36 시간 쯤 부터는 포자생성이 시작되고, 5 일 정도 배양 후에는 포자의 수가 거의 균일하게 유지가 된다. 이때 포자의 수는 1.49×10^7 /ml이었다. 최대의 균체농도는 126시간째 나타났으며, 이때의 세포농도는 10.97 g/L였다.

(2) 최적 당밀농도의 결정

전처리한 당밀의 당농도를 1% - 4%로 맞추어 1.0% bacto peptone를 투입하여 실험하였다. Table 32에서 보여주는 바와 같이, 최대 균체농도와 포자농도 면에서는 당농도가 2%인 경우(12.57g/L)에 가장 좋은 결과를 보였다. 수율면에서는 당농도가 1%인 경우가 0.94로 가장 높은 값을 보여주었다. 균체의 수율은 1% 농도에서 가장 높게 나왔으나, 2%인 경우에서 최대의 균체와 포자의 농도를 보이고, 수율도 크게 차이가 나지 않았으므로 이 실험을 통해 최적 초기 당농도는 2%로 결정하였다.

(3) 최적 질소원 및 농도의 결정

(가) 유기질소원의 영향

Table 33에서 보여주는 바와 같이 hydrolyzed casein을 이용한 경우는 다른 유기질소원을 사용한 경우보다 균체농도가 19.55g/L로 약 2배 정도 높았다. 가

장 좋은 성장을 보인 유기질소원은 hydrolyzed casein이었고, 값싼 corn steep liquor는 배양의 경제성을 생각하여 질소원으로 채택하였다. Bacto peptone, proteose peptone, corn steep liquor와 yeast extract도 균체농도가 10g/L이상으로 좋은 결과를 보여주었다.

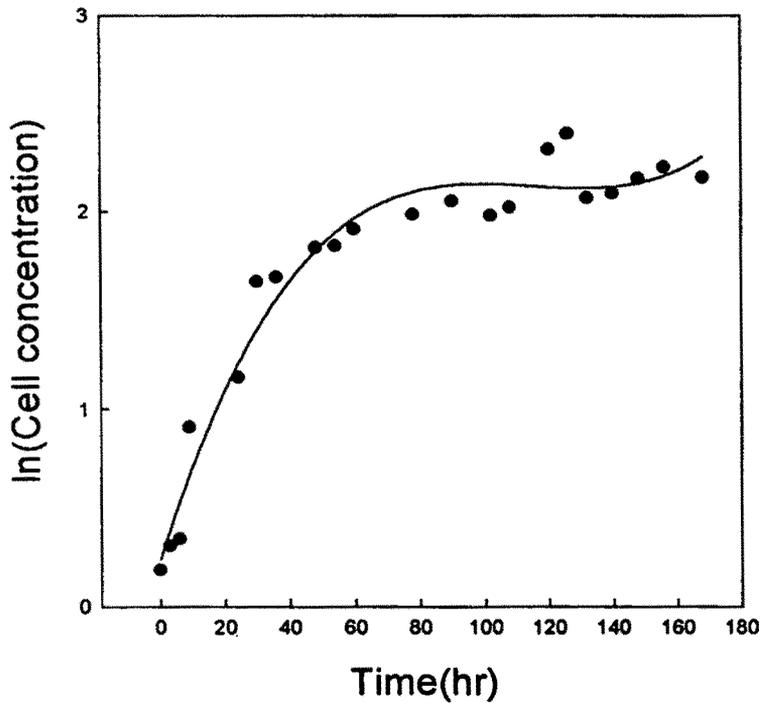


Fig. 3. Spore concentration during cultivation of *Beauveria bassiana* 726 in DP medium

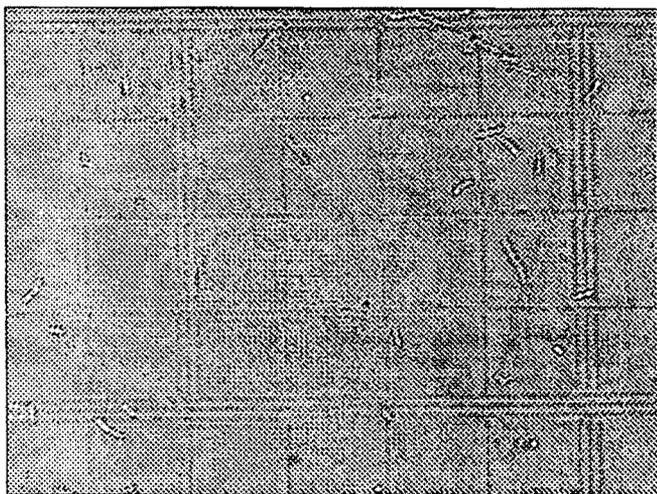
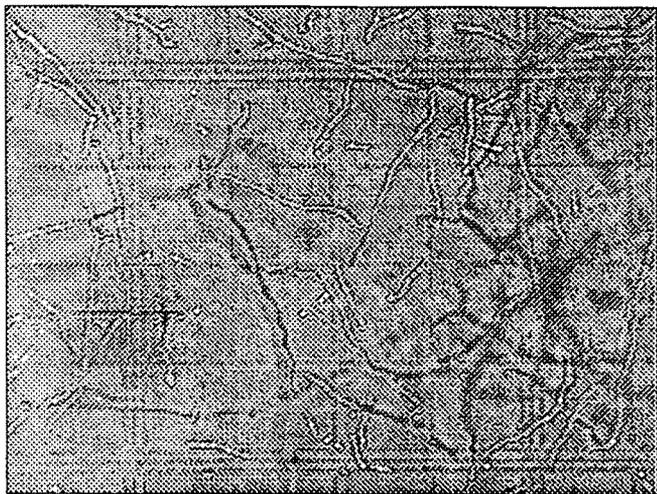


Fig. 4. Microscopic photographs of *Beauveria bassiana* 726 after 6 hours (upper photograph) and 24 hours (lower photograph)

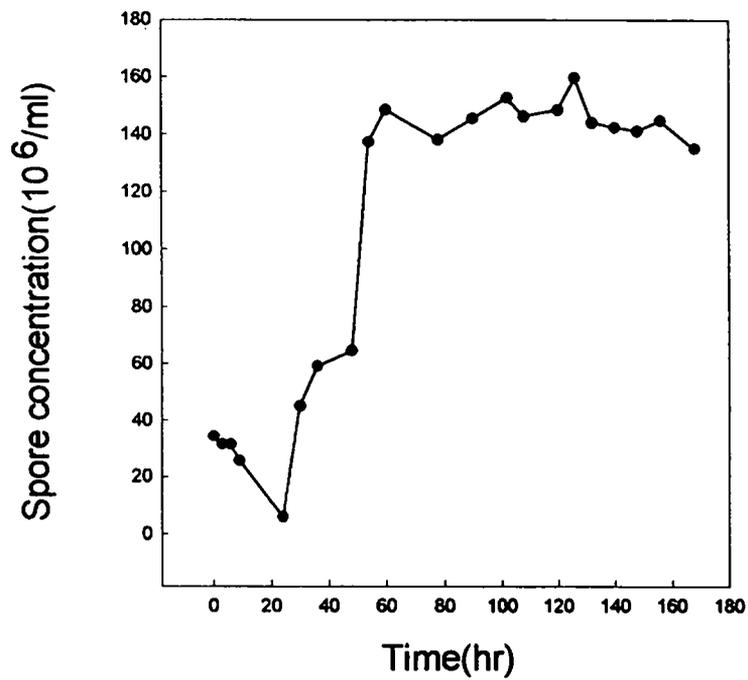


Fig. 5. Spore concentration during cultivation of *Beauveria bassiana* 726 in DP medium

Table 32. Effect of total sugar concentration on cell concentration, sporulation and cell yield of *Beauveria bassiana* 726.

	Initial Total sugar(g/L)	pH	Sporulatio n ($\times 10^8$ /ml)	Cell conc. (g/L)	Residual Total sugar (g/L)	$^*Y_{x/s}$
1%	10	6.92	1.04	7.35	2.22	0.94
2%	20	6.50	1.88	12.57	3.96	0.78
3%	30	5.23	0.69	9.43	8.84	0.48
4%	40	5.35	0.80	8.60	20.38	0.44

Culture was carried out in the medium containing 1% bacto peptone as a nitrogen source.

$^*Y_{x/s}$: cell yield(g dry cell weight/g carbon source used).

Table 33. Effect of various organic nitrogen sources on cell concentration, sporulation and cell yield of *Beauveria bassiana* 726.

	pH	cell conc (g/L)	spore ($\times 10^7$ /ml)	$^*Y_{x/s}$
Control	4.52	4.72	6.56	4.72
Bacto peptone	4.23	10.81	0.44	10.81
Proteose peptone	4.18	10.32	1.58	10.32
Corn steep liquor	5.06	11.68	3.92	11.68
Tryptone	4.75	6.75	0.68	6.75
Hydrolysed casein	4.76	19.55	2.8	19.55
Yeast extract	4.47	14.26	0.74	14.26

Culture was carried out in the medium containing 2% total sugar and 1% organic nitrogen source.

$^*Y_{x/s}$: cell yield(g dry cell weight/g nitrogen source).

Control : nitrogen source was not added.

(나) 무기질소원의 영향

$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 과 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 의 경우 균체농도가 각각 8.33, 8.41 (g/L)로 다른 무기질소원을 사용한 배양에 비해 훨씬 높은 균체의 성장을 보였다. $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 과 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 을 제외한 다른 무기질소원을 사용한 배양에서는 대조군에 비해 낮은 균체농도를 보여준다(Table 34). 포자의 생성면에서는 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 을 사용한 경우가 다른 무기질소원에 비해 1.56×10^8 /ml로 월등히 많은 포자를 생산하였다. Feng등(1994)은 무기질소원이 균체량의 증가보다는 포자의 생성에 도움을 준다고 하였으나 본 실험에서는 일부 무기질소원에서만 포자의 생성이 증가하여 이 보고와 일치하지는 않았다. 따라서 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 을 최적의 무기질소원으로 선정하여 무기질소원의 농도의 영향을 실험하여 최적질소원의 농도를 결정해야 할 것으로 생각되었다.

(다) Hydrolyzed casein 농도의 영향

다양한 hydrolyzed casein의 농도에 따라 균체량이 크게 차이가 났다(Table 35). 그 중 가장 좋은 균체의 성장을 보인 초기 hydrolyzed casein의 농도는 1.5%였고, 포자가 가장 많이 생성된 농도는 0.5%였다. 균체의 수율을 보면 초기 농도가 1.0%인 배양에서 가장 높은 균체의 수율을 보였다(39.3g DCW/g nitrogen source). 포자의 생성면에서는 hydrolyzed casein의 농도가 0.5%인 경우에 약 4.36×10^8 /ml로서 가장 높은 포자의 생성을 보였다. 0.5%의 초기 농도로 배양한 곳에서의 균체의 수율과 큰 차이가 나지 않고, 0.5%의 초기 농도로 배양한 경우에서 포자의 농도가 매우 높게 나왔다. 균체의 수율과 포자의 생성을 고려하여, hydrolyzed casein을 질소원으로 한 배양에서의 최적질소원의 초기농도는 0.5%로 결정하였다.

(라) Corn steep Liquor 농도의 영향

다양한 corn steep liquor의 농도에서 거의 비슷한 균체의 농도를 보였다(Table 36). 그 중 가장 좋은 균체의 성장을 보인 초기 corn steep liquor의 농도는 3.0%였고, 가장 좋은 포자의 생성은 초기의 농도가 0.5%인 배양에서 0.76×10^8 /ml로 나타났다. 포자의 생성을 보면 hydrolyzed casein에 비해 꽤 저조함을 알 수 있었다. 균체의 수율을 보면 초기농도가 0.5%인 배양에서 가장 높은 균체의 수율

을 보였다(44.64g DCW/g Nitrogen source). 따라서 corn steep liquor를 질소원으로 한 배양에서 최적의 초기 질소원농도는 0.5%로 결정하였다.

(마) 무기질소원의 농도별 영향

최적의 무기질소원으로 선정된 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 을 질소원으로 하여 초기 농도를 달리하여 배양한 결과(Table 37), 다양한 초기 농도에서 거의 같은 균체의 농도와 포자의 생성을 나타냈다. 가장 높은 포자의 생성은 초기 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 의 농도가 0.5%인 곳에서 $1.7 \times 10^8/\text{ml}$ 로 나타났다. 그리하여 균체의 수율과 포자의 농도가 가장 높은 0.5%가 최적의 초기 질소원 농도로 나타났다.

Table 34. Effect of various inorganic nitrogen sources on cell concentration, sporulation and cell yield of *Beauveria bassiana* 726.

	pH	Cell conc (g/L)	Spore ($\times 10^7$ /ml)	*Y _{x/s}
Control	4.52	4.72	6.56	4.72
NH ₄ H ₂ PO ₄	3.22	8.33	15.6	8.33
(NH ₄) ₂ H ₂ PO ₄ · 12H ₂ O	6.38	8.41	1.84	8.41
KNO ₃	5.92	5.13	5.4	5.13
NH ₄ NO ₃	6.22	4.59	2.88	4.59
(NH ₄) ₂ SO ₄	4.52	4.58	5.98	4.58
NH ₄ Cl	4.50	4.53	3.78	4.53
NaNO ₃	5.80	5.55	5.36	5.55

Culture was carried out in the medium containing 2% total sugar and 1% inorganic nitrogen source.

*Y_{x/s} : cell yield(g dry cell weight/g nitrogen source).

Control : nitrogen source was not added.

Table 35. Effect of concentration of hydrolyzed casein on cell concentration, sporulation and cell yield of *Beauveria bassiana* 726.

Hydrolysed casein	pH	Cell conc. (g/L)	Spore ($\times 10^7$ /ml)	*Y _{x/s}
0.5%	6.27	9.36	43.6	37.44
1.0%	6.56	19.65	0.44	39.30
1.5%	6.26	19.68	2.64	26.24
2.0%	5.21	14.57	0.90	14.57
2.5%	4.84	13.73	0.50	10.98
3.0%	4.94	14.40	0.60	9.60

Culture was carried out in the medium containing 2% total sugar and various concentrations of hydrolyzed casein.

*Y_{x/s} : cell yield(g dry cell weight/g nitrogen source).

Table 36. Effect of concentration of corn steep liquor on cell concentration, sporulation and cell yield of *Beauveria bassiana* 726.

CSL	pH	Cell conc. (g/L)	Spore ($\times 10^7$ /ml)	*Y _{x/s}
0.5%	5.08	11.16	7.60	44.64
1.0%	4.65	11.85	0.12	23.70
1.5%	5.16	13.65	0.32	18.20
2.0%	4.57	14.03	0.48	14.03
2.5%	4.51	13.11	0.20	0.16
3.0%	4.55	14.83	0.38	0.25

Culture was carried out in the medium containing 2% total sugar and various concentrations of corn steep liquor.

*Y_{x/s} : cell yield(g dry cell weight/g nitrogen source).

Table 37. Effect of concentration of $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ on cell concentration, sporulation and cell yield of *Beauveria bassiana* 726.

$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	pH	Cell conc. (g/L)	Spore ($\times 10^7/\text{ml}$)	$^*Y_{x/s}$
0.5%	2.94	8.43	17.00	33.71
1.0%	3.55	6.52	12.40	13.03
1.5%	3.69	6.84	10.50	9.12
2.0%	3.75	6.80	13.34	6.80
2.5%	3.84	7.15	1.60	5.72
3.0%	3.89	7.24	7.98	4.828

Culture was carried out in the medium containing 2% total sugar and various concentrations of $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$.

$^*Y_{x/s}$: cell yield(g dry cell weight/g nitrogen source).

(바) 무기염류의 영향

① Hydrolyzed casein을 질소원으로 한 배양의 경우

2% 당과 0.5% hydrolyzed casein에 여러 가지 무기염류를 0.1% 농도로 투입하여 균체의 성장과 포자의 생성을 관찰하였다. Table 38에서 보여주듯이 가장 높은 균체의 농도를 보인 배양은, K_2HPO_4 를 사용한 경우였고(10.98g/L), 무기염류를 사용하지 않은 배양(9.91g/L)과 거의 비슷한 결과를 나타냈다. 포자의 농도는 무기염류를 넣지 않은 대조군에서 더욱 좋은 결과가 나왔다(4.07×10^8 /ml). 그리하여 hydrolyzed casein을 질소원으로 한 배양에서는 무기염류가 균체의 생성에는 별 도움을 주지 못하고, 포자의 생성을 방해한다는 결론을 내릴수 있었다.

② Corn steep liquor를 질소원으로 한 배양의 경우

2% 당과 0.5% corn steep liquor에 다양한 무기염류를 0.1% 농도로 투입하여 균체의 성장과 포자의 생성을 관찰하였다(Table 39). 균체의 농도는 K_2HPO_4 , KH_2PO_4 를 투입한 경우에서 각각 11.19, 9.15(g/L)로 높게 나타났다. 포자의 생성면에서는 대조군(1.01×10^8 /ml)이 가장 좋은 포자의 생성을 나타냈으나, K_2HPO_4 (0.98×10^8 /ml), KH_2PO_4 (0.64×10^8 /ml)를 투입한 경우와 큰 차이가 나지 않았다. 따라서 K_2HPO_4 , KH_2PO_4 를 농도별로 실험하여 최적의 농도를 결정하였다.

②-1 KH_2PO_4 의 최적의 농도의 결정

0.05% - 0.2% KH_2PO_4 를 배양한 결과(Table 40), 균체의 농도는 8.4 - 8.8(g/L)로 무기염류의 농도에 따라 크게 변하지 않았고, 포자의 생성도 $1.36 - 1.75 \times 10^8$ /ml으로 무기염류의 농도에 따라 크게 변하지 않았다. 그래서 KH_2PO_4 의 최적의 농도는 이중 가장 좋은 균체의 성장과 포자의 생성을 보인 0.05%로 나타났다.

②-2 K_2HPO_4 의 최적의 농도의 결정

0.05% - 0.2% K_2HPO_4 를 농도별로 배양한 결과(Table 41), 역시 균체의 농도는 6.0 - 8.4(g/L)로 무기염류의 농도에 따라 크게 변하지 않았다. 포자

의 생성도 $1.49 - 2.00 \times 10^8 / \text{ml}$ 으로 무기염류의 농도에 따라 크게 변하지 않았다. 그래서 K_2HPO_4 의 최적의 농도는 이중 가장 낮은 균체의 생성과 포자의 생성을 보인 0.05%로 나타났다.

Table 38. Effect of inorganic salt on cell concentration and sporulation of *Beauveria bassiana* 726 in the medium containing hydrolyzed casein.

Hydrolyzed casein(0.5%)	pH	Cell conc (g/L)	Spore ($\times 10^7$ /ml)
Control	6.02	9.91	40.70
ZnSO ₄ .7H ₂ O	6.55	10.32	16.95
FeCl ₂ .nH ₂ O	4.88	5.68	1.65
NaCl	5.45	9.76	9.10
ZnCl ₂	5.01	10.66	7.80
CuSO ₄ .5H ₂ O	4.53	2.77	0.90
CaCl ₂ .2H ₂ O	4.14	1.46	7.00
CaCO ₃	5.85	7.64	2.55
MgSO ₄ .7H ₂ O	4.93	10.03	7.10
FeSO ₄ .7H ₂ O	5.26	6.07	3.15
Na ₂ CO ₃	7.16	8.04	5.90
K ₂ HPO ₄	4.63	10.98	6.70
CoSO ₄ .7H ₂ O	4.01	4.97	0.60
CuCl ₂ .7H ₂ O	4.90	10.72	0.30
KCl	4.53	10.56	6.05
MgCl ₂ .6H ₂ O	4.73	10.22	9.05
KH ₂ PO ₄	7.00	8.83	35.50

Culture was carried out in the medium containing 2% total sugar, 0.5% hydrolyzed casein and 0.1% inorganic salt source.

Control : inorganic salt source was not added.

Table 39. Effect of inorganic salt on cell concentration and sporulation of *Beauveria bassiana* 726 in the medium containing corn steep liquor.

corn steep liquor 0.5%	pH	Spore ($\times 10^8$ /ml)	Cell conc. (g/L)
Control	4.18	1.01	7.75
K ₂ HPO ₄	4.15	0.98	11.19
KH ₂ PO ₄	4.31	0.64	9.15
CoSO ₄ . 7H ₂ O	3.97	0.11	6.61
ZnCl ₂	4.13	0.66	8.50
CuCl ₂ . 7H ₂ O	4.27	0.02	0.95
MgSO ₄ . 7H ₂ O	4.69	0.59	7.41
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	4.22	0.45	10.24
NaCl	4.45	0.59	8.95

Culture was carried out in the medium containing 2% total sugar, 0.5% corn steep liquor and 0.1% inorganic salt source.

Control : inorganic salt source was not added.

Table 40. Effect of concentration of KH_2PO_4 on cell concentration and sporulation of *Beauveria bassiana* 726 in the medium containing corn steep liquor.

KH_2PO_4	pH	Cell conc. (g/L)	Spore ($\times 10^8/\text{ml}$)
0.05%	4.44	8.46	1.75
0.10%	4.53	8.45	1.40
0.15%	4.70	8.53	1.75
0.20%	5.02	8.82	1.36

Culture was carried out in the medium containing 2% total sugar, 0.5% corn steep liquor and various concentrations of KH_2PO_4 .

Table 41. Effect of concentration of K_2HPO_4 on cell concentration and sporulation of *Beauveria bassiana* 726 in the medium containing corn steep liquor.

K_2HPO_4	pH	Cell conc. (g/L)	Spore ($\times 10^8/ml$)
0.05%	5.25	8.08	1.71
0.10%	4.76	6.20	1.58
0.15%	4.98	8.03	2.00
0.20%	4.86	8.41	1.49

Culture was carried out in the medium 2% total sugar, 0.5% corn steep liquor and various concentrations of KH_2PO_4

(4) 최적배지의 조성

최종적으로 2가지의 최적배지가 결정되었다.

Carbon source	Pretreated molasses 1%	Pretreated molasses 1%
Nitrogen source	Hydrolyzed casein 0.5%	Corn steep liquor 0.5%
Inorganic salt	None	KH ₂ PO ₄ 0.05%

(5) 최적 배지에서 삼각플라스크 배양

가) Hydrolyzed casein이 질소원인 경우

앞에서 결정된 두 가지의 최적배지에서 시간에 따른 균체농도, 포자생성 정도 등을 보기위해 삼각플라스크에서 배양하였다. Fig. 6에서 보는 것과 같이 hydrolyzed casein을 질소원으로 한 경우 약 50시간 정도에서 균체의 성장은 stationary phase에 도달하였고, 가장 높은 균체의 농도는 10.44g/L였다. 포자의 농도는 80 - 120시간 사이에서 최고의 농도(1.67×10⁸/ml)를 나타냈다. 기질은 거의 시간에 따른 1차의 감소 경향을 보였고, 균체의 농도를 로그값을 취하면 시간에 따라서 3차의 경향으로 증가함을 알수 있었다(Fig. 7). 이를 토대로 기질의 농도와 비

$$\mu = \mu_{\max} e^{\frac{-K_s}{s}}$$

성장속도를 fitting한 결과 아래의 모델과 일치함을 알수 있었다(Fig. 8).

s : Substrate concentration(g/L) μ : Specific growth rate(/hr)

μ_{max} : Maximum specific growth rate(/hr)

K_s : Utilization constant(g/L)

나) Corn steep liquor가 질소원인 경우

Fig. 9는 crn steep liquor를 질소원으로 한 배양에서의 시간에 따른 profile을 보여준다. 약 50시간 정도에서 균체의 성장은 stationary phase에 도달하였고, 포자의 농도는 120시간 정도에서 최고의 농도를 나타냈다. 기질은 거의 시간에 따라 1차의 감소 경향을 보였고, 균체의 농도를 로그값을 취하면 시간에 따라서 3차의 경향으로 증가함을 알수 있었다(Fig. 10). 이를 토대로 기질의 감소와 비성장 속도를 fitting한 결과 위의 모델과 일치함을 알수 있었다(Fig. 11)

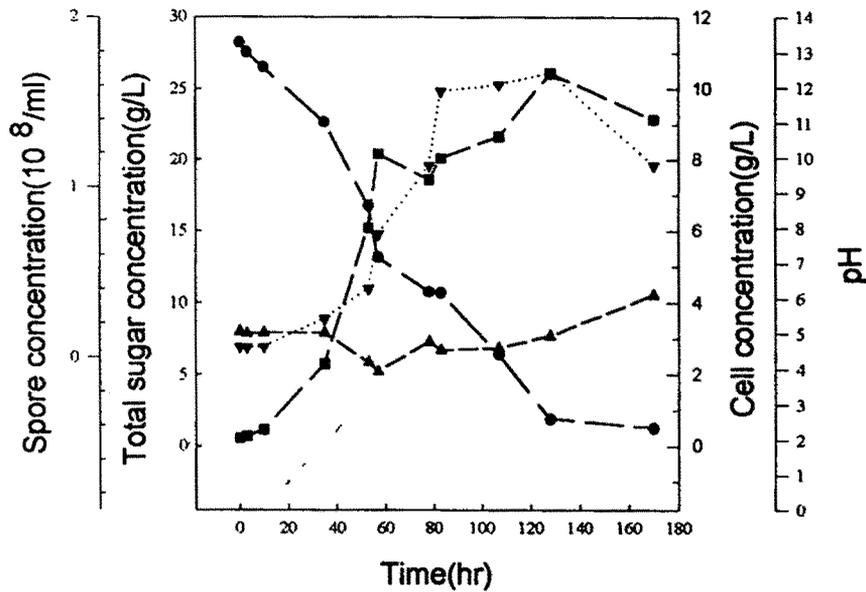


Fig. 6 Batch culture in the optimized media containing 0.5% hydrolyzed casein in the shake flasks.

- Time(hr) vs Total sugar
- ▲- Time(hr) vs pH
- ...▼... Time(hr) vs spore
- Time(hr) vs Cell conc.

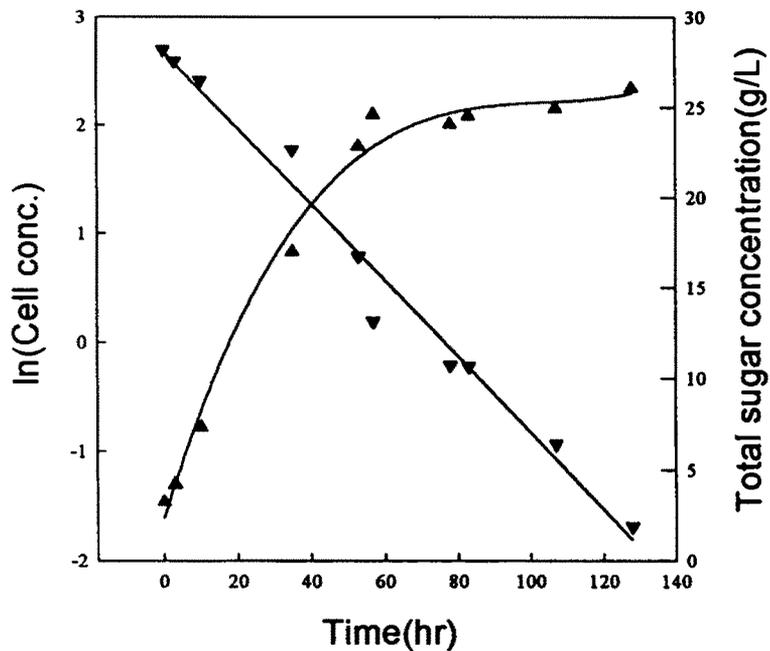


Fig. 7 Cell growth and substrate utilization of the batch culture in the optimized medium containing 0.5% hydrolyzed casein in the shake flask.

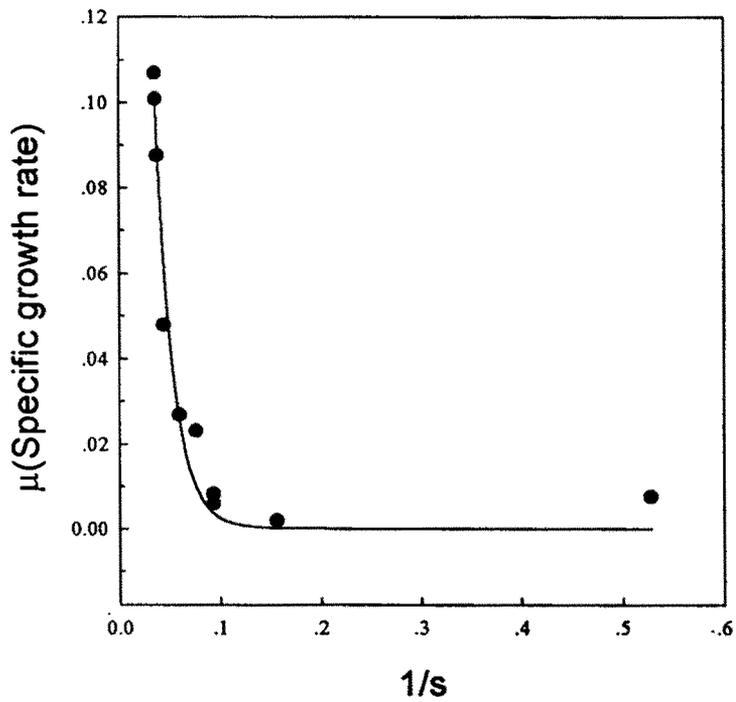


Fig. 8 μ vs $1/s$ of the batch culture in the optimized medium containing 0.5% hydrolyzed casein in the shake flask

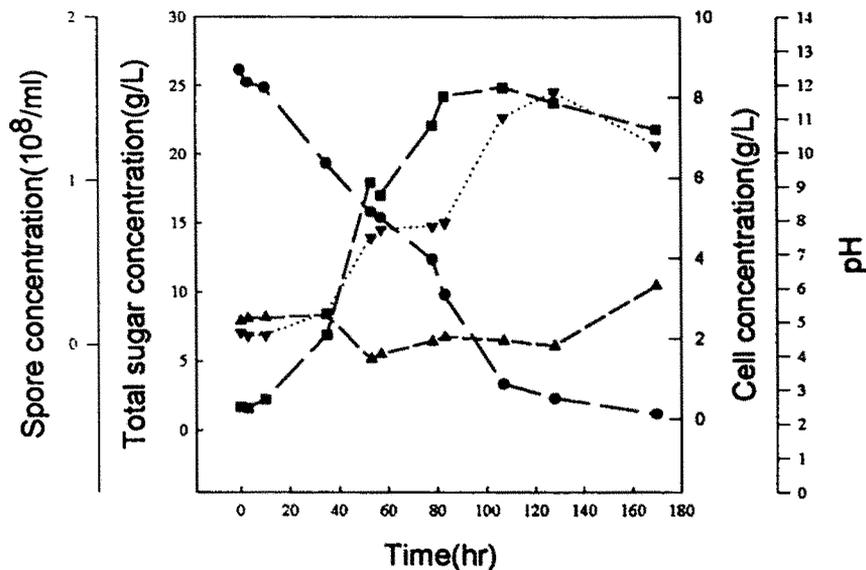


Fig. 9 Batch culture in the optimized media containing 0.5% com steep liquor in the shake flask.

- Time(hr) vs Total sugar
- ▲ Time(hr) vs pH
- ▼ Time(hr) vs spore
- Time(hr) vs Cell conc.

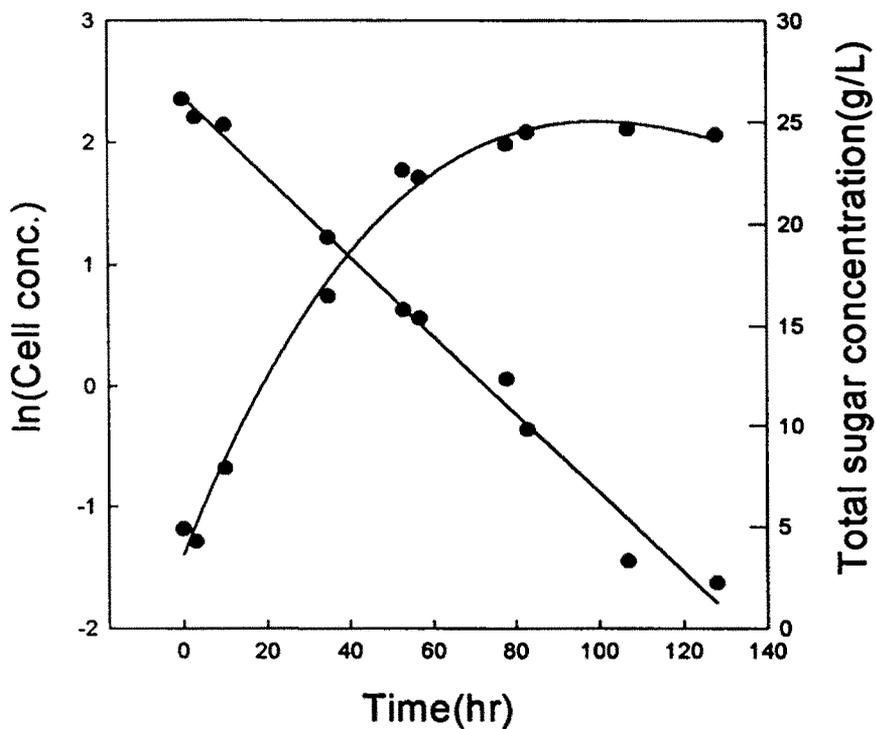


Fig. 10 Cell growth and substrate utilization of the batch culture in the optimized medium containing 0.5% corn steep liquor in the shake flask.

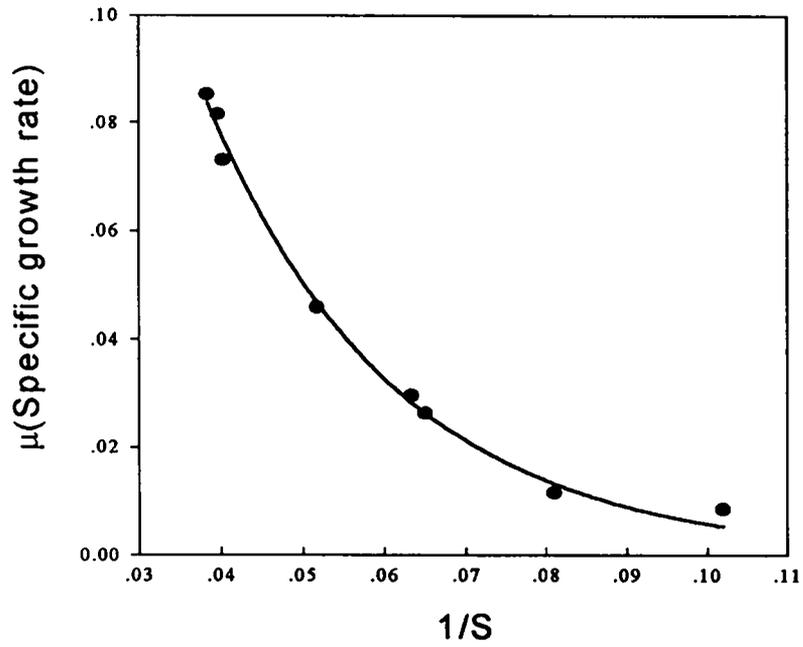


Fig. 11 μ vs $1/s$ of the batch culture in the optimized medium containing 0.5% corn steep liquor in the shake flask

6) 교반식 반응기에서의 균체 및 포자의 생산

가) Hydrolyzed casein을 질소원으로 한 경우

① 회분식 배양에서 Hydrolyzed casein을 질소원으로 한 경우

Fig. 12에서 교반식 반응기에서 시간에 따른 배양액내의 변화를 보여준다. 기질은 약 50시간 정도에서 고갈됨을 알 수 있었고 균체와 포자의 최대 농도는 각각 8.80(g/L), 2.8×10^8 /ml이었다. 균체의 농도는 삼각플라스크에서 실험했을 때에 비해 떨어졌고, 포자의 농도는 삼각플라스크에서 실험했을 때에 비해서 약 1.5배 정도 높게 나왔다. 기질은 농도는 삼각플라스크 실험에 비해 급격하게 감소하는데 이는 삼각플라스크 배양보다 훨씬 산소가 잘 공급되었기 때문인 것 같았다. 이 때의 기질의 감소 profile을 보면 대략 50시간 정도까지는 거의 시간에 따라서 1차로 감소함을 알 수 있었다. 회분식 배양에서 균체의 농도와 기질의 감소를 3차와 1차로 fitting 하여 보았다(Fig. 13). 이를 통해 삼각플라스크 배양에서의와 같은 모델과 잘 맞음을 알 수 있었다(Fig. 14).

② 유가식 배양에서 탄소원만을 포함한 공급배지를 사용한 경우

앞의 회분식 배양에서 측정한 기질의 감소속도를 이용하여 기질의 농도를 4 - 6(g/L)로 유지하였다. 이 배양에서는 61시간째 기질의 농도를 원하는 농도로 유지하기 위하여 47ml의 공급배지를 투입해 주었다. 한 번만 공급해 준 이유는 기질의 농도가 원하는 농도수준으로 감소하지 않았기 때문이었다. 결과를 보면(Fig. 15), 균체의 증가는 회분식 배양에서와 마찬가지로 50시간이후에는 균체의 농도가 5.78(g/L)로 증가하지 않았음을 알 수 있었다. 그리고 포자의 생성도 0.79×10^8 /ml로 증가하지 않았음을 알 수 있었다. 결과적으로 균사체와 포자의 생성에는 질소원도 필요할 것이라고 생각할 수 있었다.

③ 유가식 배양에서 탄소원과 질소원을 포함한 공급배지를 사용한 경우

Fig. 16에서 탄소원과 질소원을 포함한 공급배지를 이용한 유가식 배양의 결과는 탄소원만을 공급배지로 한 유가식 배양에 비해 훨씬 좋은 결과를 보

였다. 이 배양에서는 69.5시간이후에 약 12시간마다 기질의 농도를 원하는 농도로 유지하기 위하여 47ml의 공급배지를 투입해 주었다. 우선 균체량 면에서는 탄소원만을 공급배지로 한 경우(5.78g/L)에 비해 9.84g/L로 약 2배 가량의 높은 균체의 성장을 보였고, 포자의 생성면에서도 4.05×10^8 /ml로 더 좋은 결과를 나타냈다. 탄소원만을 공급한 유기식 배양에서 균체와 포자의 농도가 증가하지 않고, 탄소원과 질소원을 공급한 유기식 배양에서 균체와 포자의 농도가 증가한 것은 탄소원과 질소원을 공급한 유기식 배양에서 유기질소원이 충분하게 공급되었기 때문이라고 생각할 수 있었다. 결과적으로 *B. bassiana* 726의 균체와 포자의 생성에는 질소원의 영향이 매우 중요함을 알수 있었다.

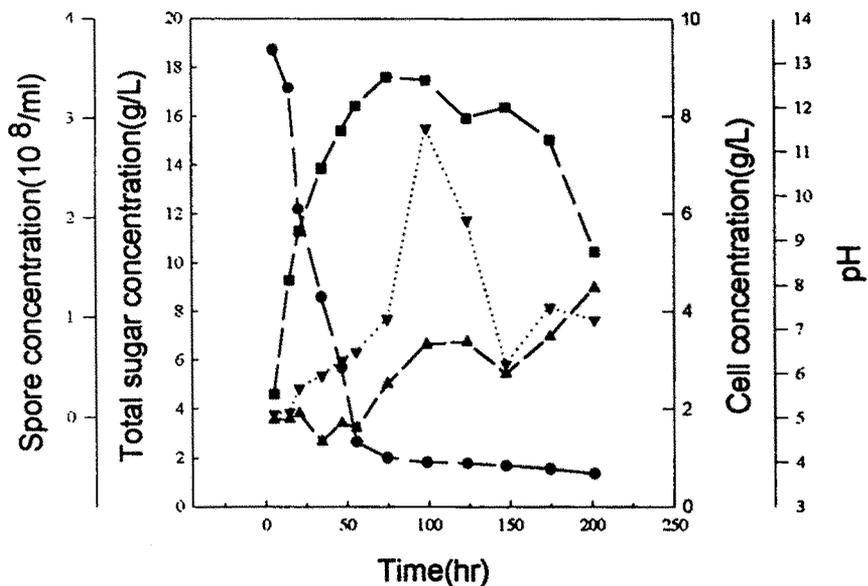


Fig. 12 Batch culture in the optimized media containing 0.5% hydrolyzed casein in the stirred tank reactor.

- Time(hr) vs Total sugar
- ▲ Time(hr) vs pH
- ▼ Time(hr) vs Spore
- Time(hr) vs cell conc (g/L)

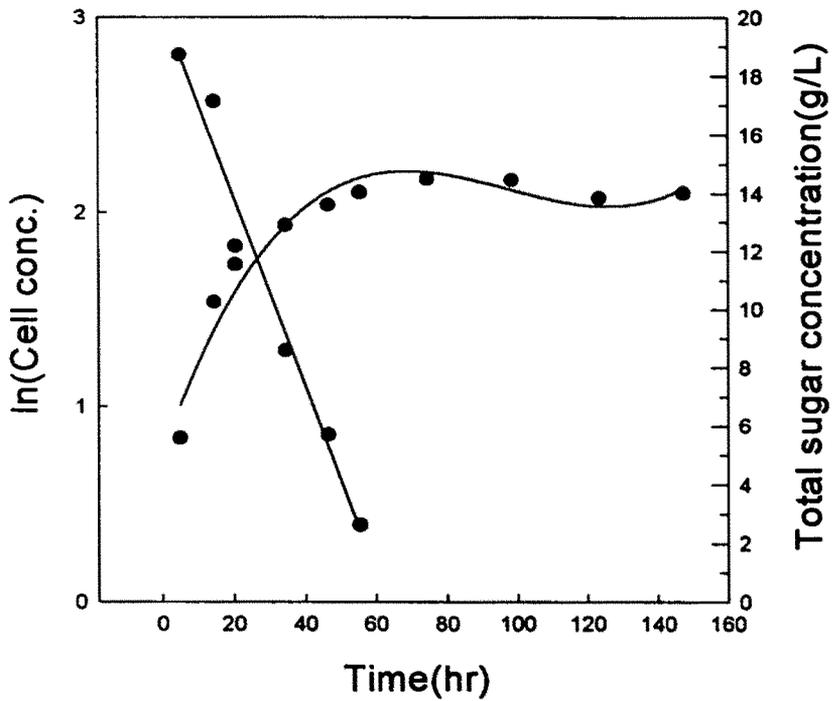


Fig. 13 Cell growth and substrate utilization of the batch culture in the optimized medium containing 0.5% hydrolyzed casein in the stirred tank reactor.

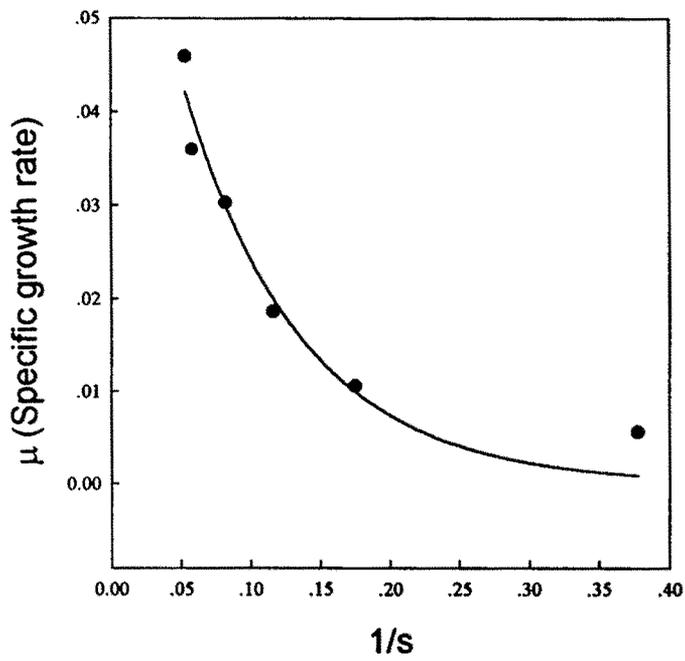


Fig. 14 μ vs $1/s$ of the batch culture in the optimized medium containing 0.5% hydrolyzed casein in the stirred tank reactor

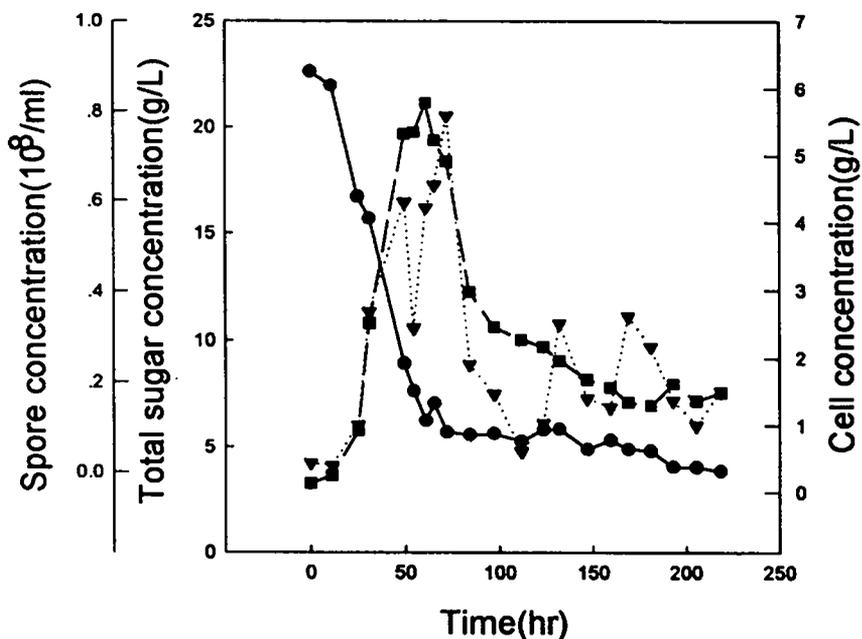


Fig. 15 Fed-batch culture in the optimized medium containing 0.5% hydrolyzed casein in the stirred tank reactor. Feeding medium containing only carbon source was added at 61 hrs.

- Time(hr) vs Total sugar
- ▼···· Time(hr) vs spore
- Time(hr) vs cell conc.

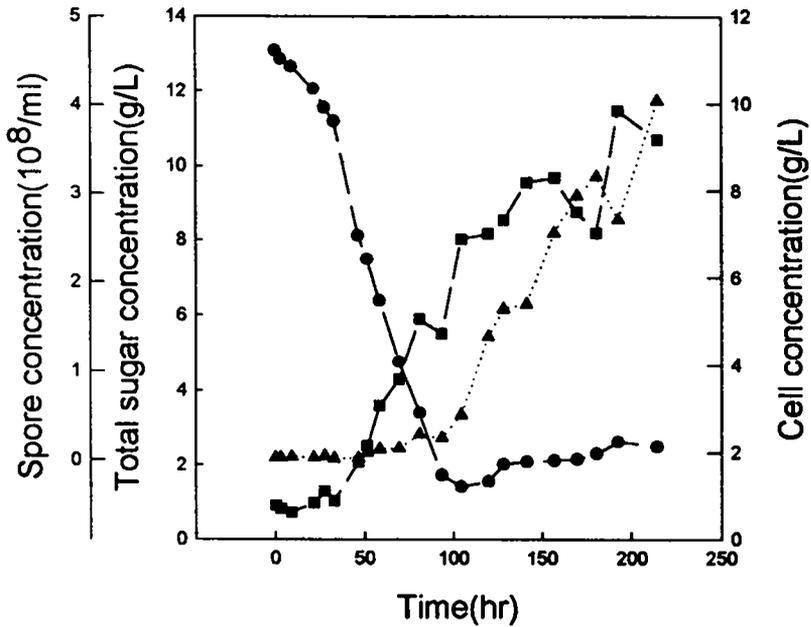


Fig. 16 Fed-batch culture in the optimized medium containing 0.5% hydrolyzed casein in the stirred tank reactor. Feeding medium containing carbon and nitrogen sources was added every 12 hrs after 69.5 hrs.

- Time(hr) vs Total sugar
- Time(hr) vs cell cone
- ...▲... Time(hr) vs spore

나) Corn steep liquor를 질소원으로 한 경우

① 회분식 배양에서 corn steep liquor를 질소원으로 한 경우

Fig. 17에서 기질은 약 72시간 정도에서 고갈되었고 균체의 최고농도는 6.03(g/L)로 나타났으며 포자의 최고 농도는 2.80×10^8 /ml로 나타났다. 균체의 농도는 삼각플라스크에서 실험했을 때에 비해 떨어졌고, 포자의 농도는 삼각플라스크에서 실험했을 때에 비해서 약 1.5배 정도 높게 나왔다. 기질의 농도는 hydrolyzed casein을 질소원으로 한 회분식 배양에서와 같이 삼각플라스크 실험에 비해 급격하게 감소하는 경향을 보였다. 이 때의 기질의 감소 profile을 보면 대략 60시간 정도까지는 거의 시간에 따라서 1차로 감소함을 알 수 있었다. 회분식 배양에서 균체의 농도와 기질의 감소를 3차와 1차로 fitting 하여 보았다(Fig. 18). 이를 통해 삼각플라스크 배양에서의와 같은 모델과 잘 맞음을 알 수 있었다(Fig. 19).

② 유가식 배양에서 탄소원만을 포함한 공급배지를 사용한 경우

기질의 농도를 원하는 농도로 유지하기 위하여 46.5시간째 34ml의 공급배지를 투입해 주었다. Fig. 20에서 보여주는 바와 같이 균체와 포자의 최대농도는 각각 5.45(g/L), 1.65×10^8 /ml로 회분식 배양에 비해 증가하지 않았다. 그리고 hydrolyzed casein을 질소원으로 한 유가식 배양에서와 같이 탄소원만을 공급해 줄 경우 균체나 포자의 증가가 나타나지 않음을 알 수 있었다. 이를 통해 *B. bassiana* 726의 균체의 성장과 포자의 생성을 위해서는 질소원의 영향이 중요함을 다시 한 번 확인할 수 있었다.

③ 유가식 배양에서 탄소원, 질소원, 무기염류를 포함한 공급배지를 사용한 경우

Fig. 21는 탄소원, 질소원, 무기염류를 포함한 공급배지를 사용한 유가식 배양의 결과를 보여준다. Hydrolyzed casein을 질소원으로 한 유가식 배양에서와 같이 feeding후 시간에 따라 계속적으로, 균체의 농도 및 포자의 농도가 증가함을 알 수 있었다. 가장 높은 균체의 농도는 약 12.69g/L였고, 포자의 농도는 5.34×10^8 /ml이었다. Hydrolyzed casein을 질소원으로 한 유가식 배양에서 탄소원과 질

소원을 투입하였을 경우 가장 높은 균체의 농도는 9.84g/L였고, 포자의 농도는 4.05×10^8 /ml이었다. 이를 통해 유가식 배양시 질소원으로는 값이 싸고, 균체와 포자의 생성이 좋은 corn steep liquor를 선택하는 것이 바람직하다는 결론을 내릴 수 있었다. 결과적으로 포자와 균체의 대량생산에는 corn steep liquor를 질소원으로 한 유가식 배양이 가장 우수하다는 결론을 내릴 수 있었다.

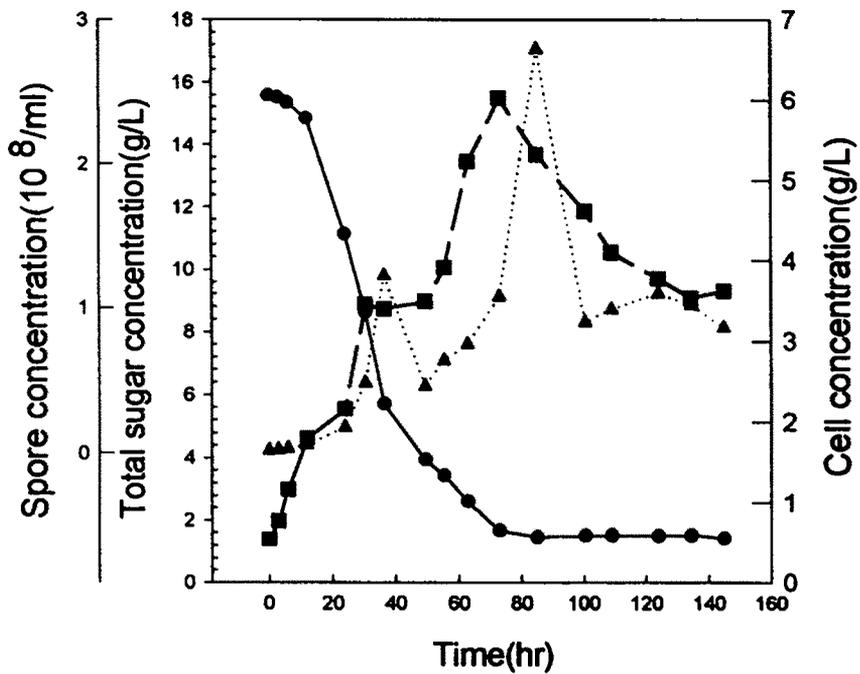


Fig. 17 Batch culture in the optimized media containing 0.5% corn steep liquor in the stirred tank reactor.

- Time(hr) vs Total sugar
- ▲ Time(hr) vs spore($e+8$)
- Time(hr) vs cell conc.

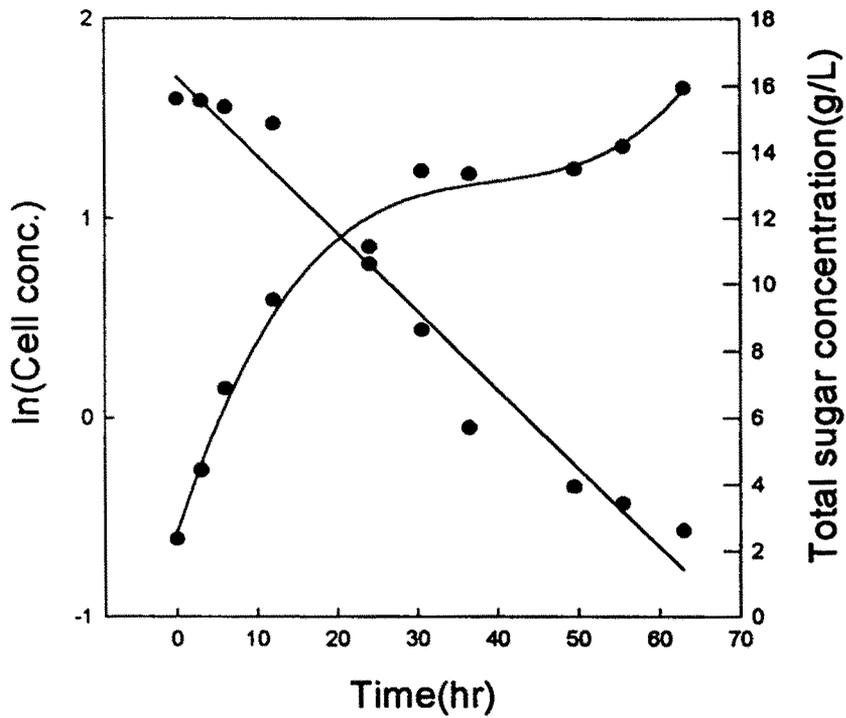


Fig. 18 Cell growth and substrate utilization of the batch culture in the optimized medium containing 0.5% corn steep liquor in the stirred tank reactor.

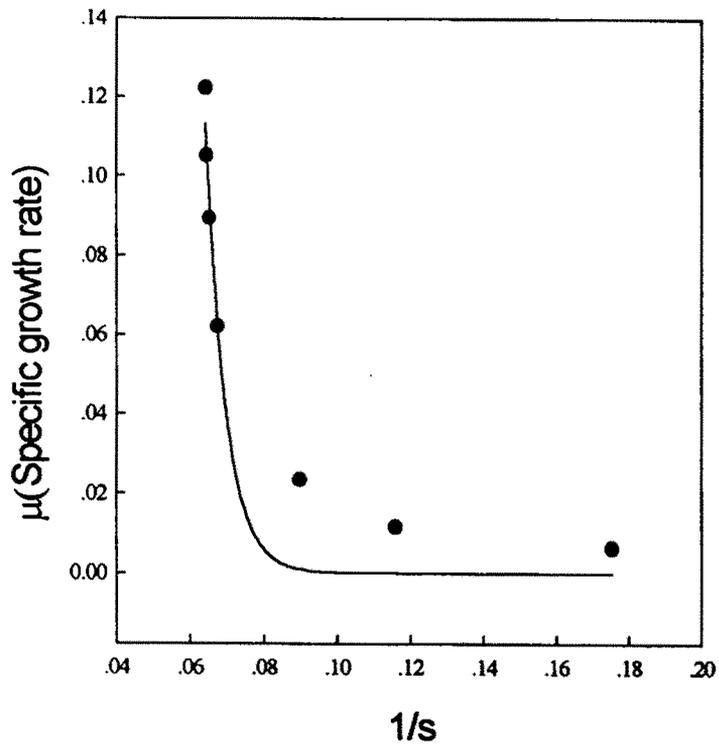


Fig. 19 μ vs $1/s$ of the batch culture in the optimized medium containing 0.5% corn steep liquor in the stirred tank reactor.

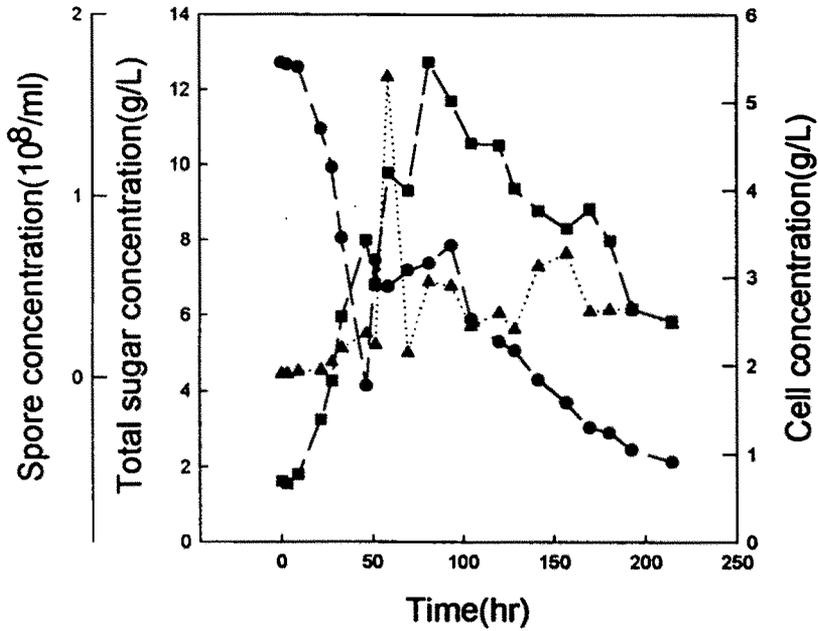


Fig. 20 Fed-batch culture in the optimized medium containing 0.5% corn steep liquor in the stirred tank reactor. Feeding medium containing only carbon source was added at 61 hrs.

- Time(hr) vs Total sugar
- Time(hr) vs cell conc.
- ...▲... Time(hr) vs spore

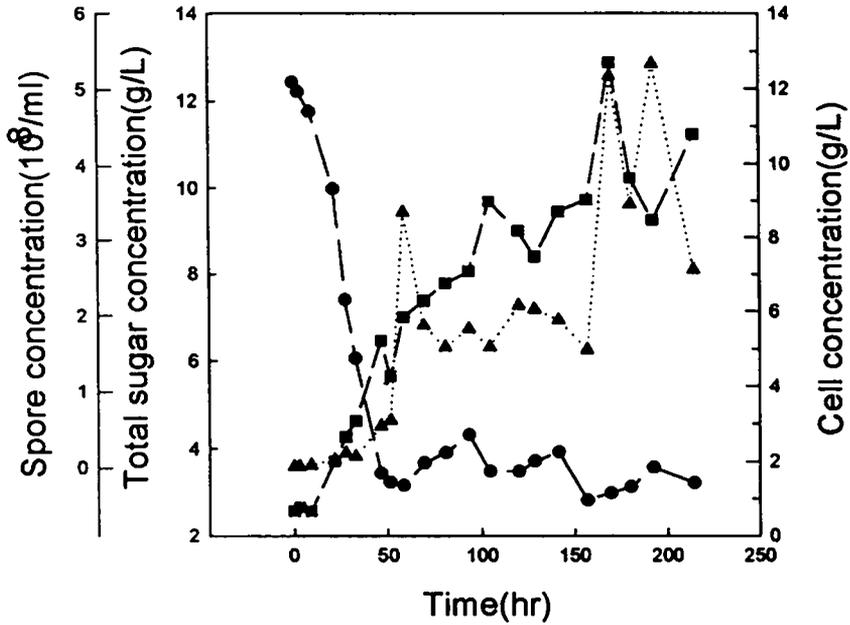


Fig. 21 Fed-batch culture in the optimized medium containing 0.5% corn steep liquor in the stirred tank reactor. Feeding medium containing carbon, nitrogen and inorganic salts sources was added every 12 hrs after 46.5hrs.

—●— Time(hr) vs Total sugar
 - - -■- - Time(hr) vs cell conc.
 ...▲... Time(hr) vs spore

2. 고체배양 및 이단계배양에서 *Beauveria. bassiana* 726의 배양조건 확립

가. 고체 배양에 의한 활성포자 생산

1) 삼각플라스크에서의 최적화

최우수 균주로 선정된 *B. bassiana* 726을 배양조건에 따른 활성포자 생산성의 변화를 보기 위해 chopped straw를 기질로 하고 액체 배양과 비슷하게 C/N ratio를 3:1로 맞추고 초기 수분함량을 다르게 하여 포자 생산성을 비교하였다. 기질은 2.5g과 5g을 기준으로 하고 이때 초기 수분함량은 70%, 80%, 90%로 맞추어서 삼각플라스크에서 28℃에서 배양하였다. 이 때 접종량은 5ml 로 사용하였다. 이 때의 각 조건에 따라 최대 포자 생산을 보면 6일째 거의 최대 포자 생산을 보이는데 2.5g의 기질을 사용한 경우 80%에서 1.14×10^6 /g이, 90%에서는 2.05×10^6 /g이 생산되었다. 5g의 기질을 사용한 경우는 70 %에서는 6.29×10^6 /g이, 80%에서는 1.27×10^6 /g이, 90%에서는 3.57×10^6 /g이 생산되었다(Table 42). 활성포자 생산을 위한 최적조건이 chopped straw 5g을 초기 수분함량 70%으로 맞춘 조건으로 결정되었다. 여기서 생산된 포자를 비교하면 수분함량이 70%인 경우는 주로 conidia가 생산되었고, 90%인 경우는 액체배양조건에 가까워져서 주로 blastospore가 생산되었다. 여기서 구해진 최적 초기 수분 함량을 가지고 ground straw에 적용해 본 결과 10일째 9.49×10^6 /g이 얻어졌다. 이 결과 ground straw가 chopped straw보다 약간 더 활성포자 생성에 유리한 것으로 판명되었다. 그러나 대규모의 배양에서는 ground straw의 경우 기질의 입자사이가 너무 촘촘해서 통기가 수월치 않을 것으로 예상되어, 미세한 chopped straw가 유리할 것으로 판단되었다.

2) Bench-scale에서의 최적화

삼각플라스크 배양에서 확립된 벧짚을 탄소원으로 하여 bench-scale에서의 활성포자의 생산은 수분 함량을 변화시켜서 결과를 비교하였다. 이들은 벧짚을 100g을 기질로 하여 수분함량을 50 - 80%로 변화시켜서 활성포자의 생산성을 관찰하였다. 수분함량은 물로 맞춘 조건과 액체배양에서의 배지로 맞춘 경우(diphasic culture)의 두 가지로 하였다. 가장 좋은 활성포자의 생산을 보인 조건은 물로 수

분함량을 맞추었을 때는 60%에서 가장 좋은 활성포자의 생산과 균의 성장을 보였고, diphasic culture의 경우에는 배지로서 molasses를 이용했을 때 70%의 수분함량에서 여러 조건 중 가장 좋은 균의 성장과 활성포자의 생산을 보였다. 하지만 액체배지의 가격과 최대 포자농도에 이르는 시간(약 2주)을 고려한다면 값싼 쌀겨같은 기질도 이용해 보는 것이 미생물살충제 제조가격을 낮출 수 있는 한 방법으로 생각되었다 (Table 43).

액체배양과는 달리 chopped straw를 고체배양에 사용할 때는 몇 가지 문제점이 대두된다. 첫째, 다른 기질과 동량으로 비교했을 때 부피가 너무 커서 단위 면적당 생산성이 떨어진다. 둘째, 부피가 커진 만큼 배양물의 안쪽에 공간이 커져서 수분증발이 쉽게 이루어지므로 수분조절이 힘들다. 셋째, 탄소원인 chopped straw의 이용이 힘들므로 배양기간이 길어진다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 chopped straw에 밀기울을 첨가하여 포자생산을 검토하였다. Chopped straw와 밀기울의 비율을 1:2로 맞춘 후 수분함량을 50, 60%로 조절하여 배양하였을 때 60%에서 더 좋은 포자생성을 보였으므로 이후 실험에서는 60% 수분농도를 기준으로 하였다. Chopped straw와 밀기울의 비율(1:1, 1:2, 1:4)을 맞춘 후 수분함량을 60%로 조절하여 배양하였을 때, 배양물이 3일만에 균사로 뒤덮였으며 5일만에 배양이 끝나 배양기간이 절반이하로 단축되었으며 수분증발이 크게 일어나지 않았다. 그리고 포자생산은 1:2의 비율이 2×10^9 conidia/g으로 우수하였으며 특히 공기공급을 하지 않고 배양했을 때 7.6×10^9 conidia/g이 생산되어 매우 잠재성있는 결과로 나타났다(Table 44).

나. 이단계배양에 의한 활성포자 생산

이단계배양은 접종균액을 종균배양배지에서 자란 배양물을 이용하는 것이 아니라, 일차적으로 종균배지에서 3일간 배양한 배양물을 앞에서 최적화한 액체배양배지에 10%로 접종하여 3일간 배양한 배양물을 접종균액으로 이용한다.

벼짚 또는 당밀이 함유된 액체배양배지에서 자란 접종균액을 수분함량 60%로 조절된 chopped 벼짚과 밀기울의 혼합물에 접종한 후 28℃에서 배양하였다. 벼짚에서 자란 접종균액을 사용하였을 때는, 3일만에 균사체가 고체배양물을 뒤덮였으며 5일간 배양했을 때 3.8×10^9 conidia/gram으로 종균배지에서 자란 접종균액을 이용했을 때 보다 포자생산이 증가하였다. 당밀에서 자란 접종균액을 사용했을 때는 2일만

에 균사체가 배양물을 뒤덮었으며 5일간 배양했을 때 5.4×10^9 conidia/gram으로 가장 좋았다. 이러한 결과로 부터 고체배양시 접종균액이 많은 blastospore을 포함할 수록 포자생산이 우수하다고 사료된다.

다. 미생물 살충제 제조

액체배양의 경우 생물반응기에서 대량 배양된 포자 및 균사체, 그리고 불용성 기질인 벚짚을 액체배양액과 분리한 후 건조하고 powder로 분쇄하여 일정 크기의 mesh로 거르면, 고운 입자의 미생물 제재를 제조할 수 있었다. 고체배양에 의한 결과물도 같은 방법에 의해 제조할 수 있었다. Powder는 불용성 기질인 벚짚가루가 포함되어 있어 포자 및 균사체를 위한 좋은 담체가 되었으며, powder 단위 g당 10^8 이상의 포자가 존재하였다.

Fig. 22는 고체배양으로 제제화한 실물사진이다

Table 42. Conidia production by solid culture in the shake-flask

Straw	Moisture content(%)	Maximum spore conc. ($\times 10^9$ /g)	
		Chopped straw	Ground straw
2.5g	80	1.14	
	90	4.21	
5.0g	70	6.29	9.49 *4910
	80	1.27	
	90	3.57	

* Initial moisture content was 70% and adjusted with only inoculum
(inoculum size of the others' : 5ml)

Table 43. Conidia production by solid culture in a bench-scale

Straw	Moisture content	$\times 10^9$ conidia/gram
100g	70% with molasses medium ^a	6.4
	50% only with water	1.7
	60% only with water	2.7
	70% only with water	0.2
	80% only with water	1.1
	50% with DP medium ^b	1.0
	60% with DP medium ^b	0.3

^a : Pretraeted molasses(6.0 % reducing sugar) and 2.5 % tryptone

^b : 2.0 % dexrose and 1.0 % peptone

Table 44. Effect of wheat bran on conidia production in a scale of solid culture (moisture content : 60%)

Chopped straw : whet bran	conidia/gram
1 : 1	8×10^8
1 : 2	2×10^9
1 : 4	8×10^8
1 : 2 (No aeration)	7.6×10^9



Figure. 22. Photographs of a formulated conidia

제4절 종합고찰

앞의 결과와 고찰로 부터 다음과 같이 종합적인 결론을 내릴수 있다.

1. *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 생성정도를 고려할 때 적합한 최적배지로서 1.0 %(v/v) molasses, 1.0 %(w/v) 주박, 0.3 %(w/v) CaCO₃가 결정되었다.

2. *Metarhizium anisopliae* ARS 2231의 대량배양을 위한 액체배양 조건을 확립하고자 하였다. 최적 배양을 위한 온도와 pH는 각각 28°C와 pH 5.0-7.0이었다. *M. anisopliae* ARS 2231의 균체량, 효소활성, 그리고 포자의 생성정도를 고려할 때 적합한 영양분으로서 3%(w/v) rice bran, 0.8%(w/v) hydrolyzed casein, 0.3%(w/v) K₂HPO₄가 결정되었다.

3. 농업과학기술원에서의 실험결과에 따라 높은 살충성과 다양한 숙주의 범위를 가지고 있는 *Beauveria* 속의 근충 병원성 곰팡이를 선정하여 액체배양 조건을 확립하였다. 균주의 온도별 균체 증식에의 영향은 25°C와 30°C등에서도 균체증식에 큰 저해는 없었으나, 28°C가 가장 최적의 온도로 결정되었다. 초기 pH는 4.0을 제외한 5.0에서 7.0까지의 넓은 범위내에서 별 다른 차이없이 정상적인 성장을 하였다. *Beauveria bassiana* 726의 균체량, 효소 활성도, 그리고 포자의 생성 정도 등을 고려할때 대량 배양을 위한 첫 번째 배지로서 2% rice straw와 0.6% tryptone이 결정되었다. 두 번째 배지로서는 2% total sugar(pretreated molasses), 0.5% hydrolyzed casein, 그리고 세 번째 배지로서 2% total sugar, 0.5% corn steep liquor, 0.05% KH₂PO₄를 결정하였다.

4. 앞에서 최적화된 첫 번째 배지를 이용하여 교반식 반응기에서 회분식 및 유가식 배양을 수행하였다. 첫 번째 배지에서 유가식 배양을 함으로써 회분식 배양에 비해 약 4배정도의 최대 포자농도(8×10^8 /ml)를 얻을 수 있었다. 공급배지로서 typtone 만을 공급하는 것이 straw와 tryptone을 함께 공급하는 것보다 훨씬 효율적임을 알 수 있었다.

5. 두 번째 및 세 번째 배지를 이용하여 삼각플라스크와 교반식 반응기에서 배양한 결과, 각 최적배지에서의 *B. bassiana* 726의 균체의 성장속도와 기질의 감소는 아래와 같은 수식으로 나타낼 수 있었다.

$$\mu = \mu_{\max} \exp(-K_s/s)$$

6. 두 번째 및 세 번째 배지를 이용하여 포자와 균체의 대량생산을 위해 교반식 반응기에서 회분식 및 유가식 배양을 한 결과, 탄소원과 질소원 등의 영양원을 투입해 준 경우 두 번째 배지에서는 회분식 배양에 비해 균체와 포자의 생산이 각각 10%와 40% 향상되었고, 세 번째 배지에서는 회분식 배양에 비해 역시 85%, 110% 향상됨을 알 수 있었다. 따라서 세 번째 배지의 경우 유가식 배양에서 균체와 포자의 농도가 각각 12.69 g/L, 5.34×10^8 /ml로 매우 높게 나타났다.

7. 볏짚을 이용한 고체배양에서 최적수분함량은 60%, chopped straw와 밀기울의 비는 1:2로 결정되었고, 이 조건을 이용하여 볏짚 100g을 기준으로 하여 고체배양했을 때, 배양물이 3일만에 균사로 뒤덮였으며 5일만에 배양이 끝나 배양기간이 절반이하로 단축되었다. 포자생산은 2×10^9 conidia/g으로 우수하였으며, 특히 공기공급을 하지않고 배양했을 때 7.6×10^9 conidia/g이 생산되어 매우 흥미로운 결과로 나타났다.

8. 볏짚 또는 당밀이 함유된 액체배지에서 자란 접종균액을 고체배양에서 최적화된 배지에서 배양하는 이단계배양을 수행하였다. 볏짚에서 자란 접종균액을 이용했을 때 3일만에 균사체가 배양물을 뒤덮였으며 5일간 배양했을 때 3.8×10^9 conidia/g으로 순수 고체배양에 비해 약 2배 증가하였다. 당밀에서 성장한 접종균액을 이용했을 때 2일만에 배양물을 뒤덮였으며 5일간 배양했을 때 5.4×10^9 conidia/g으로 가장 좋았다.

9. 볏짚을 탄소원으로 한 경우 액체배양, 고체배양, 그리고 이단계배양에 의한 배양물을 분리하여 건조한후 분쇄하여 일정크기의 mesh로 거르면 고온입자의 미생물제제를 제조할 수 있었다. 당밀을 탄소원으로 한 경우도 볏짚가루와 섞어 제제를 제조할 수 있었다. Powder 단위 g당 10^9 이상의 포자를 갖고 있었다.

제5절 적 요

본 연구에서는 곤충기생균을 미생물살충제로 이용하기 위해, 산업화의 기본단계인 대량배양기술의 확립을 위한 곤충기생균의 액체배양, 고체배양, 그리고 이단계배양을 수행하여 최적조건 및 배양방법을 도출하였다, 또한 배양된 포자를 제형화 하였다.

Metarhizium anisopliae var. *majus* ARS 978, *Metarhizium anisopliae* ARS 2231, 그리고 *Beauveria bassiana* 726의 대량배양을 위한 최적배지를 결정하였는데, 농업과학기술원에서의 실험결과에 따라 살충성이 다른 균주에 비해 뛰어난 *B.*

bassiana 726을 선정하여 이 후의 실험을 진행하였다. *B. bassiana* 726의 대량배양을 위한 최적배지로 값싼배지인 볏짚과 당밀을 탄소원으로 하는 배지가 결정되었다. 볏짚을 이용한 배지는 2% rice straw와 0.6% trypton이 결정되었다. 또한 전처리한 당밀을 이용한 경우는 두 가지의 배지가 확립되었는데, 2% total sugar, 0.5% hydrolyzed casein과 2% total sugar, 0.5% corn steep liquor, 0.05% KH_2PO_4 로 나타났다.

이 세가지 배지를 이용하여 회분식 및 유가식 배양을 반응기에서 수행한 결과를 보면 모든배지에서 회분식 배양보다 유가식 배양이 효율적인 것으로 나타났다. 볏짚 배지에서 유가식 배양을 한 경우 최대포자농도가 8×10^8 /ml로 회분식 배양보다 약 4배가 증가하였다. 당밀을 이용한 두배지중 질소원으로 corn steep liquor가 포함된 배지에서도 유가식 배양을 한 경우 포자농도가 5.34×10^8 /ml로 나타나 회분식 배양에 비해 약 2배가 향상되었다. 이러한 당밀배지에서 균체의 성장속도와 기질의 감소는 제시된 모델과 잘 맞음을 알 수 있었다.

볶짚을 이용한 고체배양에서 최적수분함량은 60%, 최적배지는 볏짚조각과 밀기울을 1:2로 섞었을 때로 나타났고, 볏짚만을 이용하였을 때 보다 배양기간이 반으로 줄었으며(약 5일) 포자는 2×10^9 conidia/g이 생산되었다. 특히 공기공급을 하지 않을 경우 7.6×10^9 conidia/g이 생산되었다. 이단계배양에서는 배양기간을 고체배양보다 더 감소시킬 수 있다는 사실을 알 수 있었으며, 볏짚과 당밀을 접종균액으로 쓴 경우 포자의 생산이 각각 3.8×10^9 conidia/g, 5.4×10^9 conidia/g로 나타나 같은 조건에서 실험한 경우 고체배양보다 포자생산이 2배이상 증가함을 알 수 있었다.

앞의 배양물들을 분리, 건조, 분쇄하여 미생물제제를 제조하였는데, Powder 단위 g당 10^9 이상의 포자를 갖고 있었다.

제 6 장 인용문헌

- Abbott, W. S. (1925) A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265.
- Anderson, J. B., D. M. Petsche, and M. L. Smith. (1987) Restriction fragment length polymorphisms in biological species of *Armillaria mellea*. *Mycologia* 79: 69-76
- A. Herrera-Estrella (1990) High-efficiency transformation system for the biocontrol agents, *Trichoderma* spp. *Molecular Microbiology* 4(5): 839-843
- A. C. L. Churchill (1990) Transformation of the fungal pathogen *Cryphonectria parasitica* with a variety of heterologous plasmides, *Curr Genet* 17: 25-31
- Baath, E. Tolerance of copper by entomogenous fungi and the use of copper-amended media for isolation of entomogenous fungi from soil.
- Bateman, R. P., M. Carey, D. Moore, and C. Prior (1993) The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locusts at low humidities. *Annals of Appl. Biol.* 122: 145-152.
- Balazy, S. and Bujakiewicz A. (1986) A new entomogenous species of *Cordyceps*: *Cordyceps ithacensis* sp. nov. *Mycotaxon*, 25(1):11-14.
- Bing, Lori Anderson and Lewis, Leslie C. (1993) Occurrence of the entomopathogen *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in different tillage regimes and in *Zea mays* L. and virulence towards *Ostrinia nubilalis* (Hubner). *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 45: 147-156.
- Bissett, J. (1983) Notes on *Tolypocladium* and related genera. *Can. J. Bot.* 61:1311-1329.
- Bissett, J. and Widden, P. (1986) A new species of *Beauveria* isolated from Scottish moorland soil. *Can. J. Bot.* 66:361-362.

- Brady, B. L. K. (1926) *Beauveria brongniartii*. In: CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No.603.
- 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.
- Castle, A. J. , P. A. Horgen, and J. B. Anderson, (1987) Restriction fragment length polymorphisms in the mushrooms *Agaricus brunnescens* and *Agaricus bitorquis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 816-822.
- Churchill A.C.L. et al. (1990) Transformation of the fungal pathogen *Cryphonectria parasitica* with a variety of heterologous plasmides. *Curr Genet* **17**: 25-31
- De Hoog, G. S. (1972) The Genera *Beauveria*, *Isaria* *Tritirachium* and *Acrodontium* Gen. Nov.Pp.1-41.
- 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.
- Fiona R Murray et al.,(1992) Surrogate transformation of perennial rye grass, *Lolium perenne*, Using genetically modified *Acremonium endophyte*. *Mol Gen Genet***233**: 1-9
- Garber, R. D., B. G. Turgeon, E. U. Selker, O. C. Yoder. (1988) Reviewed for fungi. *Curr. Genet.* **14**: 573-582.
- Goldman G.H.(1990) Transformation of *Trichoderma harzianum* by high-voltage electric pulse. *Curr Genet* **17**: 1699-1174
- Glare, T. R., Jackson, T.A. and Cisternas A. E. (1993) *Beauveria vermiconia* is an entomopathogenic fungus. *Mycol. Res.* **97(3)**:336-338.

- 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.
- Hajek, A. E. and R. J. St. Ieger (1994) Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annu. Rev. Entomol.* 39: 293-322.
- Hall, R. A. and B. Papierok (1982) Fungi as biological agents of arthropods of agricultural and medical importance. *Parasitology* 84: 205-240.
- Hama, H. (1992) Insecticide resistant characteristics of the diamondback moth. pp 455-463, In Management of Diamondback Moth and Other Crucifer Pests (ed. N. S. Talekar), Proc. of the Second International Workshop. Shunhua, Taiwan: Asian Vegetable Research and Development Center.
- Hamada W. et al., (1994) Transformation of *Botrytis cinerea* with the hygromycin B resistance gene, hph. *Curr Genet*(1994) 26: 251-255
- Herrera-Estrella A et al., (1990) High-efficiency transformation system for the biocontrol agents, *Trichoderma* spp. *Molecular Microbiology* 4(5) 839-843
- Humber R. A. Identification of Fungi Entomopathogens. pp 1-10.
- Ibrahim, Y. B. and W. Low (1993) Potential of mass-production and field efficacy of isolates of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* against *Plutella xylostella*. *Int. J. Pest Manage.* 39: 288-292.
- Im, D. J., Lee D. H., Aguda, R. M. and Rombach, M. C., (1988), Effect of Nutrients and pH on the Growth and Sporulation of Four Entomogenous Hypomycetes Fungi (Deuteromycotina). *Korean. J. Appl. Entomol.* 27 (1), 41-46.
- Inglis, G. D., M. S. Goettel, and D. L. Johnson (1993) Persistence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, on phylloplanes of crested wheatgrass and alfalfa. *Bio. Cont.* 3: 258-270.

- Inglis, G. D., D. L. Johnson, and M. S. Goettel (1997) Field and laboratory evaluation of two conidial batches of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin against grasshoppers. *Can. Entomol.* 129: 171-186.
- 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.
- Joan Tiburn et al.,(1986) Transformation by intergration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 26: 205-221
- Jones, F. G. W. and M. G. Jones (1981) *Pest of Field Crops.* 3rd ed. pp. 82-83, Edward Arnold Ltd, London.
- Klich, M. A., and E. J. Mallaney. (1987) DNA restriction enzyme fragment polymorphisms as a tool for rapid differentiation of *Aspergillus flavus* from *Aspergillus oryzae*. *Exper. Mycol.* 11: 170-175.
- Kobayasi, Y. (1982) Keys to the taxa of the genera *Cordyceps* and *Torrubiella*. *Trans. mycol. Soc. Japan* 23:329-364
- Kobayasi, Y. and Shimizu, D. Some species of *Cordyceps* and its allies on spiders. *Kew Bulletin Vol.31(3)* : 557-566
- Lee, J.-O, C.-S. Yoon, J.-K. Yoo, Y.-W. Lee, S.-G. Lee, K.-H. Moon, and G.-H. Sung (1997). *Beauveria bassiana* strain CS-1 isolated from domestic silkworm larvae and its utilization for DBM larvae control. Republic of Korea Patent 51035.
- Li, W.-H., and D. Graur. (1991) *Fundamentals of molecular evolution.* Sinauer Associates, Inc., Massachusetts. 284p.
- MacLeod, D. M. (1954) Investigations on the Genera *Beauveria* Vuill. and *Tritirachium* Limber. *Canadian Journal of Botany* 32:818-890.
- McDonald, B. A., and J. P. Martinez. (1990) DNA restriction fragment length

polymorphisms among *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*) isolates collected from a single wheat field. *Phytopathology* 80: 1368-1373.

Marcandier, S., and G. G. Khachatourians (1987) Susceptibility of the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes* (Fab.) (Orthoptera: Acrididae), to *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin (Hyphomycetes): Influence of relative humidity. *Can. Entomol.* 119: 901-907.

McCoy, C. W. (1981) Pest control by the fungus *Hirsutella thompsonii*. In: *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980* Ed. by H. D. Burges. London & New York: Academic Press, 449-512.

McCoy, C.W., R.A. Samson, and D.G. Boucias, (1988), Entomogeneous fungi, in *Handbook of Natural Pesticides, Vol. 5., Microbial Insecticides. Part A. Entomogeneous protozoa and fungi*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp 151-236.

Michael J et al.,(1994) Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplication of polymorphic DNA. *Curr Genet* 25: 107-113

Miller, G.L., (1959), Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.*, 31(3), 426-428.

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.

Ming Peng et al.,(1992) Recovery of recombinant plasmids from *Pleurotus ostreatus* trnasformants. *Curr Genet* 22: 53-59

Moon, K.H., P.H. Kim, J.W. Yoon, C.S. Yoon, and S.W. Kim, (1997), Optimization of production medium for mass culture of *Beauveria* sp. C208. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 25(6), 606-611.

Moore, D., and C. Prior, (1993), The potential of mycoinsecticides. *Biocontrol*

News and Inform. 14: 31N-40N.

M. Melanie Yelton et al., (1984) Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a TrpC plasmid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81: 1470-1474

Nei, M. (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 3321-3323.

O'Donnell K. (1992) Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*). Curr. Genet. 22: 213-220.

Pekrul, S. and E. A. Grula (1979) Mode of infection of the corn earworm (*Heliothis zea*) by *Beauveria bassiana* as revealed by scanning electron microscopy. J. Invert. Pathol. 34: 238-247.

Petch, T. (1931) Notes on entomogenous fungi. Trans. Brit. Mycol. Soc. 209-245.

Petch, T. Notes on entomogenous fungi. Trans. Brit. Myc. Soc. 27:81-93

Quedraogo, R. M. (1993) Investigations on the Use of the Fungus, *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) for Control of the Senegales Grasshopper, *Oedaleus senegalensis* (Orthoptera: Acrididae). M.P.M. thesis. Simon Fraser University, Burnaby, BC. Canada.

Quinlan, R. J., and S. G. Lisansky, (1983), Microbial insecticides, Biotechnology (G. Reed and H. Dellweg, eds) Vol. 3, p.p. 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.

Raymond, M. (1985) Presentation dun programme danalyse log-probit pour micro-ordinateur. Cah. ORSTOM, Ser. Ent. Med. et Parasitol. 22: 117-121.

- Reichelderfer, C. F. (1988) Biological assays with insect pathogens. In: CRC Handbook of Natural Pesticides, Vol. 1, Theory, Practice, and Detection. Boca Raton: CRC Press, 489-516.
- SAS Institute Inc. (1988) SAS/Stat Users Guide, Release 6.03 ed. Cary, NC : SAS Institute Inc.
- Sambrook et al., (1989) Molecular cloning
- 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.
- Selman, B. J, M. Saaid Dayer, and M. Hassan (1997) Pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. to the larvae of diamondback moth, *Plutella xylostella* L. (Lep., Yponomeutidae). J. Appl. Entomol. 121: 47-49.
- Shimazu, M., Kushida, T. and Katagiri, K. (1984) *Beauveria amorpha* Samson et Evans Isolated from *Anomala* spp. Jap.J.appl.Ent.Zool.28:30-32.
- Shimazu, M., Mitsuhashi, W. and Hashimoto, H. (1988) *Cordyceps brongniartii* sp. nov., the teleomorph of *Beauveria brongniartii*. Trans. mycol. Soc. Japan 29:323-330.
- Sneh B., (1991), Isolation of *Metarhizium anisopliae* from insects on an improved selective medium based on wheat germ. J. Invert. Pathol., **58**, 269-273.
- Soper, R.S., and M.G. Ward, (1981), Production, formation and application of fungi for insect control, biological control in crop production. *Beltsvlli. Symp. Agric. Res.*, **5**, 161-180.
- Steven J, et al., (1986) Efficient cloning of genes of *Neurospora crassa*, Proc Natl. Acad. Sci. USA **83**: 4869-4873.
- Talekar, N. S., A. M. Shelton (1993) Biology, ecology, and management of the diamondback moth. Annu. Rev. Entomol. **38**: 275-301.

- Von Arx, J. A. (1986) *Tolypocladium*, A synonym of *Beauveria*. *Mycotaxon*, 25(1):153-158.
- Von Arx, J.A. (1988) Notes On *Beauveria*. *Persoonia* Volume 13(4): 467-469.
- W. Hamada (1994) Transformation of *Botrytis cinerea* with the hygromycine B resistance gene, *hph* *Curr Genet* 26: 251-255
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Eds., M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White. Academic Press, New York.
- Winston, P. W. and D. H. Bates (1960) Saturated solutions for the control of humidity in biological research. *Ecology* 41: 232-237.
- Yasuo Itoh et al., (1994) Intergative transformation of the mycotoxin-producing fungus, *Penicillium paxilli* *Curr Genet* 25: 508-513
- Zoberi, M.H., (1995), *Metarhizium anisopliae*, a fungal pathogen of *Reticulitermes flavipes*. *Mycologia*, 87(3), 354-359.