

작물병해충에 대한 살충성 사상균
유래의 생물농약 개발 및 이용

Development of microbial pesticides
using entomopathogenic fungi

대 구 대 학 교

농 림 부

632.95
L2932

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 "작물 병해충에 대한 살충성 사상균 유래의 생물농약 개발 및 이용" 과제의 최종보고서로 제출합니다.



1998 . 12 . 20 .

주관연구기관명 : 대구대학교
총괄연구책임자 : 강 선 철
연 구 원 : 황 철 원
연 구 원 : 최 명 철
연 구 원 : 이 동 규
협동연구기관명 : 한국삼공(주)
협동연구책임자 : 정 창 국
위탁연구기관명 : 성균관대학교
위탁연구책임자 : 권 석 태

요 약 문

I. 제 목

작물 병해충에 대한 살충성 사상균 유래의 생물농약 개발 및 이용

II. 연구개발의 목적 및 중요성

70년대부터 집약농법에 의한 유기합성농약의 과다한 사용으로 농산물의 수확량 증대에는 크게 기여해 왔지만, 천적과 같은 익충의 소멸·생태계 파괴 등 심각한 환경 문제를 초래했고, 또한 이러한 화학 농약에 저항하는 응애, 진딧물, 파밤나방, 배추좀나방 등의 새로운 계통이 출현하여 문제 해충으로 등장했으며, 인간에게도 적지 않은 피해를 주었다. 따라서 화학적 농약 방제의 대안으로 병해충에 대한 새로운 방제법이 필요하게 되었다. 생물적 방제는 환경보존형/친화성 농법으로 자연생태계를 보존할 수 있으며 부작용 없이 지속적 이용이 가능할 것으로 기대되고 있다.

미생물을 이용한 병해충 방제는 포식성이나 기생성 천적을 이용한 방제보다 개발이용 가능성이 크나, 그 동안 화학적 방제의 그늘에 가려 소홀히 되어 왔고, 또한 자연 생태계에 존재하는 몇 가지 균주를 개발없이 단순 분리·선별하여 이용해 왔기 때문에 효과가 크지 못했다.

최근 10년동안 곤충 병원균의 침투와 병원기작에 대한 생화학 및 생리학적인 연구가 활발하게 이루어졌다. 곤충의 표피(cuticle)는 chitin으로 구성되어 있으며 곤충 병원균이 곤충 표피에 도달하면 표피에 흡착하여 발아한 다음, cuticle을 용해하는 효소를 생성하여 침투하고, 혈구에서 colonization과정을 거쳐 곤충을 죽게 한다. 표피 침투시 분비되는 효소로는 chitinase, protease, lipase 등이 있는데 그 중에서 chitinase와 protease가 표피 침투에 가장 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다.

본 연구팀은 우리나라의 토양으로부터 곤충병원균인 *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* 등의 균주를 순수 분리하여 문제해충에 대한 살충효과 탐색, 균체 혹

은 포자(conidia)를 대량생산하기 위한 발효공정 개발, 장기보존법 개발, 농약에 대한 안정성 연구, 살충성과 관련된 효소의 정제(chitinase, protease) 및 유전자의 cloning, 유전자의 사상균 내 고효율 발현 등에 관하여 체계적으로 연구함으로써 최종적으로 개발된 균주를 환경적응형 방제 수단으로 이용하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구에서는 살충성 사상균 유래의 생물농약을 개발하기 위하여 우리나라 중남부 일대의 토양을 채취하여 끝벌부채명나방의 유충을 치사시킬 수 있는 사상균 균주(주로 *Metarhizium* sp.와 *Beauveria* sp.)를 선발하였다. 다음은 선발된 균주를 이용하여 문제해충(배추좀나방, 파밤나방, 벼멸구, 벼물바구비)에 대한 살충효과를 검정하였다. 이상의 연구를 효율적으로 수행하기 위하여 문제해충의 사육체계를 확립하였으며, 인공사료 개발, 실내 살충효과 검정, 시설원예하우스 및 포장에서의 살충효과 검정 등을 시도하였다.

한편 살충성 사상균 *Metarhizium anisopliae*와 *Beauveria bassiana*의 cuticle-degrading 효소(chitinase, protease 등)의 최대 생산조건을 확립하기 위하여 기질, 배지 조성, 배양환경 등을 달리하여 연구하였다. 또한 이들 효소를 정제하기 위하여 효소 생산이 최대가 되는 조건에서 균체를 배양한 후 ammonium sulfate와 각종 chromatography를 거쳐 살충성 관련효소를 순수 정제하였다. 그리고 정제된 효소를 이용하여 효소의 특성(온도, pH, 기질특이성 등)과 N-terminal amino acid의 서열을 결정하였다. 이상의 결과를 토대로하여 살충성 관련 유전자를 genomic 및 cDNA cloning하였으며, 이들의 염기서열을 결정하였다. 또한 분리된 유전자를 효율적으로 사상균내에 도입하기 위하여 selection marker로서 *ura5* 영양요구성 유전자와 *benomyl* 약제저항성 유전자를 이용한 host-vector계를 확립함과 동시에 최적의 형질전환 조건을 확보하기 위하여 protoplast법, bombardment기법 등의 다양한 형질전환 기술을 비교, 검토하였다. 또한 *E. coli*와 사상균 균체 내에서 살충성 유전자를 고효율로 발현하기 위하여 다양한 vector에 연결하여 각각의 생물체에서의 발현양상과 발현효율을 검정하였다.

한편 살충성 사상균을 공업적으로 대량생산하여 생물농약으로 이용하는 것과 관련된 다양한 기술에 대하여서도 연구하였다. 즉 살충성 사상균의 포자(blastospore)를 액체배지에서 효

올직으로 배양하기 위한 배지조건 및 발효공정의 최적화, conidia를 생산하기 위한 고체배지에서의 배양 조건 및 배지조건의 최적화, 생산된 포자를 희석 및 장기보존하기 위한 증량제 개발 및 환경조건 확립, 살충성 사상균의 화학농약에 대한 안정성 검정, 생물농약의 제재화 등에 관하여 연구하였다.

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

우리나라의 토양으로부터 살충성 사상균을 screening하여 총 11종의 우수균을 분리하였으며, 표준균주와의 포자 및 균사의 형태를 비교한 결과 선발균주중 5균주는 *Metarhizium* sp.이었으며, 나머지 6균주는 *Beauveria* sp.로 확인되었다. 이때 선발된 균주를 이용하여 문제해충에 대한 살충효과를 검토하기 위하여 배추좀나방, 담배거세미나방, 파밤나방, 점박이 응애, 차면지 응애, 은실가루이, 복숭아혹진딧물, 벼물바구미 등은 필요시 상시 공급이 가능하도록 실내사육 체계를 확립하였다. 특히 파밤나방에 대해서는 본 연구팀에 의하여 새로운 인공사료를 개발하였다. 또한 spray법, 엽침지법 등의 실내 살충력 검정 기법을 활용하여 연구한 결과 배추좀나방에 대해서 1.0×10^8 conidia/ml의 농도로 포자를 감염시켰을 때 3일내에 89.3%의 높은 방제효과를 보였다. 또한 쌀바구미에 대해서는 55.2%, 점박이 응애에 대해서는 46.04% 등의 순서로 방제효과를 보였다. 또한 시설원예하우스에서는 복숭아혹진딧물에 대해서 39.51%, 배추좀나방에 대해서 46.97%의 방제효과를 보였다. 한편 본 연구진에 의하여 살충성 사상균 *M. anisopliae*와 *B. bassiana*는 살충효과뿐만아니라 식물병원균인 *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* 등에 대하여 강력한 항진균 활성을 나타냄을 밝혔다. 따라서 본 연구에서 개발된 균주들은 살충제와 살균제로 동시 사용이 가능하기 때문에 복합적 용도의 생물농약으로 개발이 가능할 것이다.

한편 살충성 사상균으로부터 살충성 관련효소의 최적 생산조건을 검토한 결과 *M. anisopliae*에서 chitinase 생산은 chitin을 함유한 basal salts medium에서 가장 효율적임을 확인하였다. Chitinase의 정제는 ammonium sulfate 침전, DEAE-Sephacel, CM-Sephacel ion exchange chromatography, FPLC Superose 12HR gel filtration을 통하여 순수 정제하였다. 효소의 특성을 조사한 결과 이 효소는 분자량이 60KDa이고 특이

하계도 endochitinase와 exochitinase 활성을 동시에 갖고 있으며, 최적 pH는 5.0, N-terminal amino acid 서열은 N-T-G-G-S-W-N-N-E-V-N-V-Q이었다. 또한 *B. bassiana*에서 protease 생산은 0.5% polypeptone 첨가 배지, pH는 6.0, 50mM potassium phosphate 첨가 시 가장 높은 효소생산량을 보였다. 효소의 순수 정제는 ammonium sulfate 침전, DEAE-sephadex A-50, CM-cellulose, hydroxyapatite column chromatography의 순서로 이루어졌다. 이상에서 생산된 효소의 특성을 조사한 결과 분리된 protease (Bassiasin I)는 serine계였으며, 분자량이 28KDa이었고, N-terminal amino acid 서열은 A-I-V-R-Q-P-G-A-P-W-G-L-G-R-I-S-H-R이었다. 또한 *M. anisopliae* chitinase의 cDNA cloning 결과 약 2Kb의 nucleotide를 포함하고 있었으며, open reading frame은 1,569개의 nucleotide(522 amino acid)로 구성되어 있었고 이로부터 추정된 분자량은 약 58KDa이었다. 다른 사상균의 chitinase와 상동성을 비교한 결과 상동성이 20% 내외로 매우 낮았지만 active site 부근에는 30-50%로 다소 높았다. 특히 serine 307, glycine 309와 310, aspartic acid 342와 344, glutamic acid 346은 모두 공통적으로 갖고 있었다. 또한 *B. bassiana* protease(Bassiasin I)의 cDNA cloning 결과 1,629bp로 구성되어 있었으며 precursor-Bassiasin I은 1,137bp(379 amino acid), mature 형태는 840bp(280 amino acid)로 되어 있었다. 지금까지 보고된 각종 alkaline serine계 protease들과 본 연구에서 cloning된 유전자의 상동성 비교 결과 약 70% 내외의 높은 상동성을 보였다. 또한 이 유전자의 genomic DNA cloning 결과 이것은 3개의 intron으로 구성되어 있었으며, 각각의 크기는 71, 62, 68 NT로 구성되어 있었다. 그밖에 *M. anisopliae*에서도 protease(Metalysin I)의 genomic DNA와 RT-PCR에 의한 cDNA를 cloning하여 염기서열을 완료하였다. 또한 살충성 사상균의 영양요구성 host-vector system을 개발하기 위하여 *M. anisopliae*를 UV와 FOA로 처리하여 uracil 영양요구성 mutant를 확보하였으며, 이에 상응하는 vector의 marker로서 약 1Kb의 ura5 유전자를 cloning하여 염기서열을 밝혔다. 사상균의 형질전환을 위해서는 protoplast 제조 후 주로 benomyl 약제저항성 유전자를 갖는 pBRG-4 plasmid와 본 연구를 통하여 clonig된 살충성 관련 유전자(chitinase, protease)를 동시에 co-transformation하여 성공적으로 이들 유전자를 도입할 수 있었다. 이때 도입된 유전자가 효과적으로 발현되도록 사상균 발현용으로는 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A(gpd A) 유전자 promoter를 갖는 pAN8-1 혹은 trpC promotor와 terminator를 갖는 pBF101 vector 등에 연결하였으며, 대장균에서의 발현을 위해서는 pET-32a(+) 및 pET-3a 등의 vector에 연결하여 발현효과를 검정하였다. 그 결과 *E. coli*

에서 뿐만아니라 살충성 사상균 내에서도 살충성 유전자가 효율적으로 발현될 수 있음을 확인하였다.

한편 살충성 사상균 *B. bassiana*와 *M. anisopliae*를 상업적으로 대량생산하기 위하여 값싼 공업용 배지를 개발하였다. 그 결과 액체배양을 위해서는 농산폐기물인 배추의 즙액을 이용한 배추즙액배지를 새로 개발하였으며, 이때 mycellial pellet size를 최소화시켜 발효효율을 높이기 위해서 황토가 이용될 수 있음을 밝혔다. 또한 conidia 생산을 위한 고체배지용으로는 보리, 옥수수, 밀 등의 곡물배지가 이용될 수 있음을 확인하였다. 또한 살충성 사상균의 포자를 희석 및 장기보관하기 위하여 개발된 carrier로서는 4℃에서는 균주, 증량제 및 성장배지의 종류에 관계없이 6개월간 90% 이상의 높은 생존율을 보였다. 그러나 25℃에서는 *B. bassiana*에서는 증량제로는 diatomite에서, 성장배지로는 쌀겨 혹은 밀에서 배양했을 때 가장 보존안정성이 높은 것으로 나타났다. 그리고 *M. anisopliae*의 경우에는 증량제로는 bentonite와 diatomite에서, 성장배지로는 쌀과 보리에서 배양했을 때 가장 안정한 것으로 나타났다. 살충성 사상균의 화학농약에 대한 안정성은 *B. bassiana*의 경우 시험된 9종의 살충제에서 키텐다를 제외하고는 80% 이상의 높은 생존율을 보였다. 그리고 살균제와 제초제는 시험된 11종의 농약 전부에서 80% 이상의 높은 안정성을 보였다. *M. anisopliae*에서도 시험된 대부분의 농약에서 유사한 정도의 높은 안정성을 보였다. 따라서 살충성 사상균을 이용한 생물농약은 단독 혹은 화학농약과의 혼용시에도 사용이 가능할 것으로 생각된다.

SUMMARY

Entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*, are a natural pathogen to many insect pests, so it can be used as biological control means, alternative to chemical insecticides. In this research a chitinase, presumably recognized as a virulence factor in insect mycosis, was investigated and transformation systems for *M. anisopliae* were developed to improve mycoinsecticidal activity by recombinant DNA techniques.

A novel chitinase was detected in extracellular culture fluids of *M. anisopliae* grown in liquid medium containing chitin as a sole carbon source. The chitinase was purified to near homogeneity by DEAE-Sephacel, CM-Sepharose CL-6B ion-exchange chromatography and gel filtration through Superose 12HR. The molecular weight of the enzyme determined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was approximately 60 KDa and the optimum pH of the enzyme was 5.0. The high chitinolytic activity against colloidal and crystalline chitin of crab shells as well as several chemical compounds, *p*-nitrophenyl- β -D-N-acetylglucosamide (pNP-NAG1), *p*-nitrophenyl- β -D-N, N'-diacetylchitobiose (pNP-NAG2), and *p*-nitrophenyl-N, N', N"-triacetylchitotriose (pNP-NAG3), indicates that the purified enzyme has both endo- and exochitinase activity. Thirteen N-terminal amino acid sequences of the chitinase were determined as N-T-G-G-S-W-N-N-G-V-N-V-Q. Comparison of the N-terminal amino acid sequence of the purified enzyme with those of other chitinases pointed out that this enzyme seems to be a new chitinase of *M. anisopliae*.

And then a chitinase was characterized at a molecular level. For this, the cDNA library was constructed with RNAs isolated from *M. anisopliae* mycellia collected from 24-hours culture broth. The chitinase clones were directly screened from cDNA library grown on NZY agar media containing glycol chitin [0.01%(w/v)] by staining with Calcofluor white M2R. The chitinase gene, which was fused into the *lacZ* gene, was functionally expressed in *Escherichia coli* and

the molecular weight of the fusion protein was about 70 KDa judged on 10% SDS-polyacrylamide gel. And the chitinase gene appears to be a single copy in the *M. anisopliae* genome by the result of Southern analysis. It was found that this gene had one open reading frame which could make a chitinase including 522 amino acid with a calculated molecular weight of about 58 KDa. The amino acid sequence of the chitinase showed low sequence identity with those of *Bacillus circulans* chitinase AI (36.4%) and *Saccaropolyspora erythroea* 1,4- β -N-acetylglucosaminidase (22.4%), but has remarkably conserved regions at two middle parts of the protein (residue 295 to 314, and 337 to 356).

We investigated the optimal condition for the production of extracellular protease from entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (ATCC7159). The optimal induction medium is composed of 0.5% polypeptone, trace elements and 50mM potassium phosphate (pH 6.0). In this condition, the production of extracellular proteases increased rapidly after the 24hrs, peaking at the third day. We purified the extracellular alkaline serine protease, Bassiasin I from the culture filtrate of *B. bassiana* by precipitation with ammonium sulfate followed by DEAE-sephadex A-50, CM-cellulose and hydroxyapatite column chromatography. The enzyme has an optimal pH for activity at 10.5 and is stable over pH 5 - 11. The maximum activity of the enzyme was at 60 - 65°C, and approximately 20% activity remained at 60°C after 120min. The protease was inhibited by phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). This Bassiasin I cDNA was cloned from the cDNA library by hybridization with oligonucleotide probes on the basis of N-terminal amino acid sequence determined from the purified Bassiasin I. And also the genomic DNA was cloned from the genomic library by hybridization with the cDNA. The Bassiasin I-coding regions were interrupted 3 introns consisting of 69, 62 and 68 NT. An ORF, contained between the first ATG and the termination codon, is 1,140 bp long and encodes 379 amino acid residues. The amino acid sequence deduced from the DNA sequence is highly homolog with those of the subtilisin-like proteases. The calculated molecular masses of the precursor-bassiasin I and mature protease are 39 and 28 KDa, respectively. When the Bassiasin I cDNA was expressed in *E. coli* under *tac* promoter, a halo around the

colony on the LB-skimmed milk agar plate was observed.

We also cloned Metalysin I gene from another entomopathogenic fungus *M. anisopliae*. The Metalysin I-encoding gene is contained a 96 NT intron as a result of analysis with the cDNA cloned by RT-PCR. The ORF is 1,599 bp long and encodes 533 amino acid residues.

In this view, we have developed transformation system in *M. anisopliae* for molecular breeding of *M. anisopliae*. To establish the host system in *M. anisopliae*, we have tried to isolate auxotrophic mutants(*Ura5*⁻) in *M. anisopliae*. we had to treat the cell with mutagen(U.V., 5-FOA) under quite severe conditions. In the cell, 5-FOA chemical was known as a mutagen which induced the mutation in *URA5* locus of pyrimidin synthesis genes. Thus, we were able to isolate lower growth mutants than wild type strain in minimum medium(uracil⁻). And then, we have cloned a gene from gene library of *M. anisopliae* that complements the mutants(*Ura5*⁻). Using PCR method, a *URA5* gene encoding orotate phosphoribosyl transferase (OPRTase) of *M. anisopliae* was cloned and sequenced. Entire nucleotide sequences were determined and analyzed as compared with other fungus *URA5* genes. The *ura5* gene was identified to be a single copy in the *M. anisopliae* genome by the Southern analysis. The 1.1 Kb of *ura5* gene had one coding region, 702 nucleotides, which could make a polypeptide including 234 amino acids with a molecular weight of about 25 KDa. And deduced amino acid sequence of the *ura5* gene showed high sequence homology (83.7-87.5%) with those of other fungal organisms. There was no intron sequence between ATG starting codon and TGA ending codon.

M. anisopliae would be transformed to be benomyl-resistant by introducing pBRG-4, which contains a β -tubulin gene of *Aspergillus flavus* conferring resistance to benomyl and a *pyr4* gene of *Neurospora crassa*. Transformants occurring at a frequency of 10 colonies per 50 μ g DNA, grew on the 5 μ g/ml concentrations of benomyl, while the wild type was inhibited by 2.5 μ g/ml. From the Southern analysis using genomic DNAs isolated from *M. anisopliae* transformants, the positive signals suggested that the β -tubulin gene had

integrated in the *M. anisopliae* genome by homologous recombination.

To express the cloned chitinase and protease genes of *B. bassiana* and *M. anisopliae* in fungi, we constructed the expression vectors containing the cDNAs and genomic DNAs and could express those genes in *M. anisopliae*.

This research was also conducted to study the screening of entomopathogenic fungi and the development of microbial pesticide using it. Several subjects were studied : (1) the mass cultivation of entomopathogenic fungi in liquid or solid media, (2) the isolation of their spores, (3) breeding and feeding of pests(Diamond back moth, Two-spotted spider mite, Brown plant hopper, Rice weevil, etc.) in artificial breeding room(temperature : $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, humidity : $50\pm 5\%$), and (4) the biological efficacy test in laboratory, greenhouse and field.

Entomopathogenic fungi were cultivated on artificial agar media(PDA, SDAY) in incubator(temperature : 28°C , incubating period : 2 weeks). The spores of fungi were isolated by manufactured solution. This solution was composed with 0.1% Tween 80 and 0.0025% surfactant contained polyoxyethylene alkyl ether and filtered off impurities to the paper(Kim wipers) and were recovered by centrifugation (Hitachi centrifuge CR21, rpm : 4,000, time : 10 min., temperature : 4°C). In consequence, several diluted spore suspension were prepared and their pest control activities were evaluated. The results were as follows : (1) Two strains (No. 310 and No. 520) were finally screened from among the 11 entomopathogenic fungi strains and the activities of pest control were tested extensively for the all pests prepared. (2) The direct spray method by sprayer was more than effective than the leaf dipping method in spore suspension.

CONTENTS

Chapter 1. Purpose and importance -----	15
Chapter 2. Subjects and range -----	18
[1] 1st year -----	18
[2] 2nd year -----	19
[3] 3rd year -----	20
Chapter 3. Results -----	21
[1] Screening of entomopathogenic fungi -----	21
[2] Optimum production of cuticle-degrading enzymes -----	21
1. Optimum production of <i>M. anisopliae</i> chitinase -----	21
2. Optimum production of <i>B. bassiana</i> protease -----	21
[3] Purification and characterization of cuticle-degrading enzymes -	31
1. Purification and characterization of <i>M. anisopliae</i> chitinase -----	31
2. Purification and characterization of <i>B. bassiana</i> protease -----	40
[4] cDNA cloning of <i>M. anisopliae</i> chitinase gene -----	47
[5] Genomic DNA cloning of <i>M. anisopliae</i> chitinase gene -----	51
[6] Cloning of <i>B. bassiana</i> protease gene -----	61
[7] Cloning of <i>M. anisopliae</i> protease gene -----	68
[8] Preparation of protoplast and transformation -----	74
[9] Expression of <i>M. anisopliae</i> chitinase gene -----	79
1. Gene expression in <i>E. coli</i> -----	82
2. Gene expression in <i>M. anisopliae</i> -----	82
A. Construction of expression vector by using <i>trpC</i> promoter -----	82
B. Construction of expression vector by using <i>gdpA</i> promoter -----	86
[10] Expression of protease gene -----	86

1. Gene expression of Bassiasin I in <i>E. coli</i> -----	90
2. Gene expression of Bassiasin I in <i>M. anisopliae</i> -----	90
3. Gene expression of <i>M. anisopliae</i> protease in <i>M. anisopliae</i> -----	94
[11] Host-vector system for <i>M. anisopliae</i> -----	96
[12] Fermentation for entomopathogenic fungi -----	102
[13] Effect of loess on the reduction of mycellial pellet size ----	105
[14] Solid cultures of entomopathogenic fungi -----	105
[15] Effects of loess on the production of conidia -----	119
[16] Storage and formulation of entomopathogenic fungi -----	145
[17] Stability to organo-pesticides -----	145
[18] Breeding of pests -----	167
1. Breeding of pests -----	167
2. Development of artificial fodder -----	174
[19] Evaluation of pesticidal activities in laboratory -----	174
1. Evaluation of pesticidal activity to <i>Pulutella xylostella</i> -----	174
A. Evaluation of pesticidal activity by spray (Method-1) -----	174
B. Evaluation of pesticidal activity by spray (Method-2) -----	176
C. Evaluation of pesticidal activity by leaf dipping method -----	176
2. Evaluation of pesticidal activity to <i>Sitophilus oryzae</i> -----	176
3. Evaluation of pesticidal activity to two-spotted mite -----	180
4. Evaluation of pesticidal activity to <i>Myzusa persicae</i> -----	180
5. Evaluation of pesticidal activity to <i>Lissorhoptrus oryzophilus</i> -----	180
[20] Evaluation of pesticidal activities in greenhouse -----	184
1. Pot test against <i>Myzusa persicae</i> -----	184
2. Pot test against <i>Pulutella xylostella</i> -----	187
3. Greenhouse and field test against <i>Pulutella xylostella</i> -----	187
[21] Fungicidal activities of entomopathogenic fungi -----	187
Chapter 4. References -----	201

목 차

제 1 장. 연구개발의 목적 및 중요성 -----	15
제 2 장. 연구개발 내용 및 범위 -----	18
제1절. 1차년도 -----	18
제2절. 2차년도 -----	19
제3절. 3차년도 -----	20
제 3 장. 연구개발 결과 -----	21
제1절. 살충성 사상균 균주선발 -----	21
제2절. Cuticle-degrading 효소의 최적 생산 -----	21
1. <i>M. anisopliae</i> chitinase의 최적 생산 -----	21
2. <i>B. bassiana</i> protease의 최적 생산 -----	21
제3절. 살충성관련 효소의 분리정제 및 특성 -----	31
1. <i>M. anisopliae</i> chitinase의 분리정제 및 특성 -----	31
2. <i>B. bassiana</i> protease의 분리정제 및 특성 -----	40
제4절. <i>M. anisopliae</i> chitinase 유전자의 cDNA cloning -----	47
제5절. <i>M. anisopliae</i> chitinase 유전자의 genomic DNA cloning -----	51
제6절. <i>B. bassiana</i> protease 유전자의 cloning -----	61
제7절. <i>M. anisopliae</i> protease 유전자의 cloning -----	68
제8절. 원형질체 (protoplast) 제조 및 형질전환 -----	74
제9절. <i>M. anisopliae</i> chitinase 유전자의 발현 -----	79
1. <i>E. coli</i> 내에서의 발현 -----	82
2. 사상균 내에서의 발현 -----	82
가. <i>TrpC</i> promoter를 이용한 사상균 발현 vector 제작 -----	82
나. <i>GdpA</i> promoter를 이용한 사상균 발현 vector 제작 -----	86
제10절. Protease 유전자의 발현 -----	86

1. <i>E. coli</i> 내에서의 Bassiasin I 유전자의 발현 -----	90
2. 사상균 내에서의 Bassiasin I 유전자의 발현 -----	90
3. 사상균 내에서의 <i>M. anisopliae</i> protease 유전자의 발현 -----	94
제11절. 살충성 사상균의 host-vector system 개발 -----	96
제12절. 발효공정 개발 -----	102
제13절. Mycellial pellet size 감소에 미치는 황토의 영향 -----	105
제14절. 살충성 사상균의 고체배양 -----	105
제15절. Conidia 형성에 미치는 황토의 영향 -----	119
제16절. 사상균의 장기보관 및 제재화를 위한 증량제 개발 -----	145
제17절. 사상균의 화학농약에 대한 안정성 -----	145
제18절. 곤충사육 -----	167
1. 문제해충 사육 -----	167
2. 인공사료 개발 -----	174
제19절. 실내 살충성 검정 -----	174
1. 배추좀나방에 대한 살충력 검정 -----	174
가. Spray에 의한 살충력 검정(방법-1) -----	174
나. Spray에 의한 살충력 검정(방법-2) -----	176
다. 엽침지법에 의한 살충력 검정 -----	176
2. 쌀바구미에 대한 살충력 검정 -----	176
3. 점박이용애에 대한 살충력 검정 -----	180
4. 복숭아혹진딧물에 대한 살충력 검정 -----	180
5. 벼물바구미에 대한 살충력 검정 -----	180
제20절. 시설원예하우스에서의 살충력 검정 -----	184
1. 복숭아혹진딧물에 대한 pot 시험 -----	184
2. 배추좀나방에 대한 pot 시험 -----	187
3. 배추좀나방에 대한 시설하우스 및 포장시험 -----	187
제21절. 살충성 사상균의 항진균 활성 -----	187
 제 4 장. 참고문헌 -----	 201

제 1 장. 연구개발의 목적 및 중요성

좁은 경지 면적에서 최대 수확을 거두기 위한 집약농법이 70년대부터 이루어진 이후 오랜 숙원인 식량자급이 해결되었다. 이와 같은 집약농법은 유기합성농약의 살포로 인하여 수확량 증대에 크게 기여해 왔지만, 천적과 같은 익충의 소멸·생태계 파괴 등 심각한 환경 문제를 초래했고, 또한 이러한 화학 농약에 저항하는 응애, 진딧물, 파밤나방, 배추좀나방 등의 새로운 계통이 출현하여 문제 해충으로 등장했으며, 인간에게도 적지 않은 피해를 주었다. 화학농약에 의한 병해충 방제는 더 이상 이로운 수단이 아니며 부작용이 더 문제가 되고 있다. 따라서 화학적 농약 방제의 대안으로 병해충에 대한 새로운 방제법이 필요하게 되었다. 생물적 방제는 환경보존형/친화성 농법으로 자연생태계를 보존할 수 있으며 부작용 없이 지속적 이용이 가능할 것으로 기대되고 있다.

미생물을 이용한 병해충 방제는 포식성이나 기생성 천적을 이용한 방제보다 개발이 용 가능성이 크나, 그 동안 화학적 방제의 그늘에 가려 소홀히 되어 왔고, 또한 자연 생태계에 존재하는 몇 가지 균주를 개발없이 분리선별하여 이용해 왔기 때문에 효과가 크지 못했다.

최근 분자생물학의 발달로 유전공학의 기법을 이용한 작물의 형질 전환 및 유전자 도입을 통한 새로운 생물 방제법이 개발되고 있다. 일본 동경대 Takagi 그룹에서 세포막을 녹이는 단백질을 사상균인 *Rhizopus oligosporus*로부터 분리하여 그 유전자(chitinase gene)를 클론한 다음(Takagi, 1992), 작물에 형질전환하여 식물병원균에 대한 효과를 확인한 바 있다.

최근 10년동안 곤충 병원균의 침투와 병원기작에 대한 생화학 및 생리학적인 연구가 활발하게 이루어졌다. 곤충의 표피(cuticle)는 chitin으로 구성되어 있으며 곤충 병원균이 곤충 표피에 도달하면 표피에 흡착하여 발아한 다음, cuticle을 용해하는 효소를 생성하여 침투하고, 혈구에서 colonization과정을 거쳐 곤충을 죽게 한다(Samon et al, 1988; Eilenberg et al, 1986; Latge et al, 1987). 표피 침투시 분비되는 효소로는 chitinase, protease, lipase 등이 있는데 그 중 특히 chitinase가 표피 침투에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다(Samuels, 1989).

한편 B.t 독소가 농약으로 생산된 것은 1938년으로 57년의 역사를 가지고 있지만, 자연상태에서 지속기간이 짧고 자외선과 건조 등에 불안정한점 등 단점보완이 쉽지 않아

보급에는 애로가 있었다(Feitelson et al, 1990; McGaughey, 1985, 1990).

따라서 곤충 병원균인 *Bacillus thuringiensis*로부터 살충성 활성을 갖고 있는 B.t 독소유전자를 분리하여, 형질전환을 통한 내충성 작물 개발이 시도되고 있다. 또한 말라리아 열병과 뇌염을 매개하는 모기를 방제하기 위해 B.t 독소를 *Bicillus* 속의 균뿐만 아니라 새로운 숙주 기생균에 유전자를 도입하여 보다 강력한 살충효과를 나타내는 형질전환 균체의 개발이 시도되고 있다(Poter et al, 1993; Thanabalu et al, 1992). 그러나 *B. thuringiensis*는 세균이기 때문에 자연상태에서는 여전히 자외선·건조등 야외환경에 불안정하여 이용상에 많은 한계를 갖고 있다. 따라서 세균이 아닌 곰팡이를 *B. thuringiensis* 대신 혹은 이를 보완할 수 있는 생물적 방제 수단으로 이용하려는 노력이 고조되고 있다.

본 연구팀은 곤충 기생병원균인 *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*로부터 살충성 활성을 나타내는 chitinase, protease 등을 분리하고, 그 유전자를 탐색하여 살충성 곰팡이 내에서 고효율로 발현함으로써 우수한 균주를 개발할 수 있으며, 결과적으로 환경적응형 방제 수단으로 이용할 수 있는 것으로 예상된다.

1. 기술적 측면

- 화학적 해충 방제로부터 벗어나 생물적 방제를 이용하면 종 다양성을 유도함과 더불어 환경 보존형 친화성을 높임으로써 무공해 농산물 생산이 가능함.
- 최근 발전하는 유전공학의 기법을 도입하여 환경보존형 미생물을 이용한 해충방제가 실용화 될 수 있음.
- 유기합성 농약의 과다한 사용으로 천적의 몰살과 해충의 약제저항성 증대로 생물적 방제의 기술축적이 절실함.
- 세균 천적 미생물 (*B. thuringiensis* 등)의 단점을 개선하기 위해 곰팡이를 이용하여 종합적 방제를 효과적으로 할 수 있음.
- 곤충병원균인 *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Hirsutella*

thonysonii 등은 발효조에서 생산할 수 있고, 기주 범위가 넓으며, 자연계에도 많이 분포하는 균주으로써 host가 아닌 일반 곡류를 배지로 이용하여 대량 생산이 가능함이 최근에 보고됨으로써 개발 성공 가능성이 높음.

- *Metarhizium anisopliae*는 곤충기생효과 이외에 식물병원균 성장을 억제시키는 효과가 있음.

2. 경제·산업적 측면

- 농약 사용의 절감으로 생산비 절감과 무공해 농산물 생산.
- 새로운 균주 개발로 특허 획득 및 수출 증대 기여.
- 농촌 인구 감소로 인한 노동력 부족을 해소.

3. 사회·문화적 측면

- 농약 살포의 중독 위험으로부터 농민 건강 보호.
- 무공해 농산물을 생산하여 소비자로부터 환영받음.
- 먹이사슬 보호와 농약의 토양 및 생물체내 농축 저하를 통한 자연 생태계 보호 및 자연 환경 보호.

제 2 장. 연구개발 내용 및 범위

제 1절. 1차년도

- 포장에서 실충성 곰팡이의 수집 및 선발
- 선발 균주에 대한 문제해충(배추좀나방, 파밤나방, 버벌구, 벼물바구미)의 실충효과 검정
- 실충성 사상균(entomopathogenic fungi)으로부터 곤충 cuticle층 분해와 관련된 효소 (chitinase, protease) 활성 측정
- Cuticle-degrading 효소의 생성을 위한 실충성 사상균의 최적 성장조건 확립
- 실충성과 관련된 효소의 분리 정제
- 실충성 효소 단백질의 N-terminal amino acid의 서열결정
- 실충성 곰팡이 genomic library작성 및 probe 작성
- 실충성과 관련된 유전자(chitinase, protease)의 cloning
- 곤충사육기술 개발 및 실내 약효검정: 배추좀나방, 파밤나방 등
- 사상균을 위한 cloning vector의 구축
- 대장균 및 사상균에 대한 shuttle vector 구축
- Host-vector system의 개발 : auxotrophic host 개발 및 selection marker로서 ura5 gene 의 cloning

- 살충성 사상균의 효율적 배양을 위한 배지조건 및 발효공정의 최적화

제 2절. 2차년도

- *M. anisopliae* chitinase 유전자의 cDNA cloning 및 DNA 염기서열 결정
- *M. anisopliae* chitinase 유전자의 genomic DNA cloning 및 염기서열 결정
- *B. bassiana* protease의 N-말단 아미노산 서열 결정과 BNPS-skatole 절단단편의 아미노산 서열 결정 및 DNA probe를 이용하여 protease 유전자의 cloning
- *B. bassiana* protease의 활성부위 primer를 합성하여 PCR 방법으로 DNA probe 작성 및 DNA 염기서열 결정.
- Protease 생산조건에서 배양 후 mRNA 분리 및 *B. bassiana* cDNA library 제작
- *M. anisopliae* genomic DNA library로부터 *pr1* 유전자 cloning 및 염기서열 결정
- *M. anisopliae*의 원형질체 제조 및 형질전환 기술 개발
- Selection marker gene으로서 *ura5* 유전자의 cloning 및 염기서열 결정
- 살충성 사상균의 포자생산(conidia) 체계 확보 및 발효공정 최적화
- 문제해충의 대량 실내사육 체계 수립
- 살충성 사상균의 실내 살충력 검정

- 살충성 사상균의 시설원예하우스에서의 살충력 검정

제 3절. 3차년도

- 살충성 사상균 균주개량을 위한 살충효소 유전자의 사상균내 고발현 기술 개발
- 재조합 균주의 발효공정 최적화
- 약제 저항성 해충에 대한 약효조사
- 살충성 사상균의 장기보관을 위한 안정성 기술 개발
- 살충성 사상균의 화학농약에 대한 안정성 검정
- 시설원예하우스에서 문제해충(응애, 온실가루이 등)에 대한 방제효과 시험
- 포장에서 약제 저항성 문제 해충에 대한 방제효과 시험
- Carrier 분자의 선정 및 제재화 연구

제 3 장. 연구개발 결과

제 1절. 살충성 사상균 균주선발

팔공산, 계룡산, 금정산, 지리산 등 중남부 일대의 토양을 채취하여 꿀벌부채명나방 (*Galleria mellonella*)의 유충과 섞은 후 1주일 정도 실온에서 방치한다. 이 유충이 살충성 사상균에 감염되면 유충의 표피에 균사가 생성된다. 이 균사를 순수 분리하여 균을 선별한다. 2차선별을 위해서 Petri dish에 1차선별된 균주의 분생자(conidia)를 1.0×10^7 spores/ml 농도로 조절하여 filter paper (Whatman No. 1)가 충분히 젖도록 넣어 준다. 이 위에 꿀벌부채명나방의 유충을 넣고 재감염 실험을 실행하여 유충이 치사하면 이 균주를 2차선별한다(Fig. 1, Fig. 2). 이상에서 설명한 실험방법에 따라 균주선발을 수행하여 살충성 사상균 11균주를 토양으로부터 분리하였다. 표준균주인 *B. bassiana* (ATCC 7159), *M. anisopliae* (ATCC 20500) 등과 포자 및 균사의 형태를 비교한 결과 선발균주 중에서 5 균주는 *Metarhizium* sp. 이었으며, 나머지 6균주는 *Beauveria* sp.로 확인되었다.

제 2절. Cuticle-degrading 효소의 최적 생산

1. *M. anisopliae* chitinase의 최적 생산

*M. anisopliae*는 다른 완전 배지보다 유일한 탄소원과 질소원으로 chitin을 함유하는 basal salts medium 속에서 균사체 성장은 저하되지만 chitinase를 다량 생산함을 Table 1과 Fig. 3.의 결과를 통하여 알 수 있다.

2. *B. bassiana* protease의 최적 생산

Beauveria bassiana protease의 최적 생산은 trace element와 basal salt에 50mM



Fig. 1. For second screening *Metarhizium* sp. 101, entomopathogenic fungus isolated from soil, was infected to *Galleria mellonella* larva. The photograph was showing that *G. mellonella* larva was killed by the fungal infection and covered with green mycellium.



Fig. 2. For second screening *Beauveria* sp. 102, entomopathogenic fungus isolated from soil, was infected to *Galleria mellonella* larva. The photograph was showing that *G. mellonella* larva was killed by the fungal infection and covered with green mycellium.

Table 1. Effects of carbon and nitrogen source on the production of *M. anisopliae* chitinase.

Media	Cell dry weight (mg/10ml)	Chitinase activity (mU/ml)
2% colloidal chitin + basal salt medium	42	8.66
1% yeast extract + 1% peptone + 2% dextrose	98	1.25
2% colloidal chitin + 2% dextrose	20	0.16
2% colloidal chitin + 1% yeast extract	73	0.55
2% colloidal chitin + 1% peptone + 2% dextrose	89	2.05
2% colloidal chitin + 1% yeast extract + 2% dextrose	67	0.42
2% colloidal chitin + 1% yeast extract + 1% peptone + 2% dextrose	87	2.24

* *M. anisopliae* was grown at 28°C for 4 days in each medium. Chitinase activity was measured with the culture supernatant.

* Basal salt medium contained 0.5% NaH₂PO₄ and 0.05% MgSO₄ · 7H₂O.

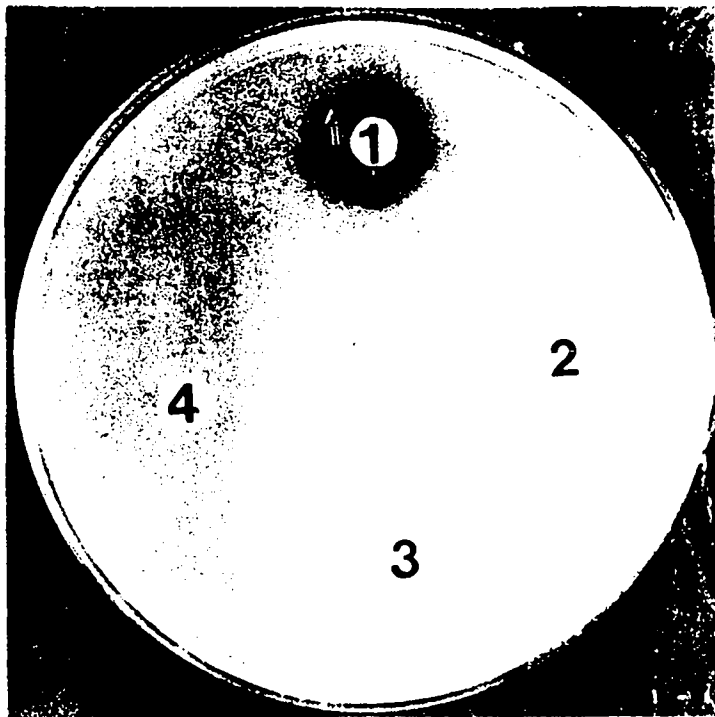


Fig. 3. Chitinolytic activity of enzymes secreted by *M. anisopliae*(1, 4), *Rhizopus oligosporus*(2), *Beauveria bassiana*(3). 1, 2 and 3 were cultivated on the medium composed of KH_2PO_4 5g, MgSO_4 0.5g and chitin 200ml per liter, 4 on PDA medium.

MES(pH 6.0) buffer를 첨가한 것을 기본으로 하여 기질로 BSA, casein, gelatin 및 polypeptone을 각각 0.3%로 첨가하여 protease의 활성을 비교한 결과 polypeptone 첨가시 가장 높은 효소활성을 나타내어 BSA의 경우보다 약 1.11배, gelatin보다는 약 2배 높은 효소 활성을 얻을 수 있었다(Fig. 4). 또한 glucose를 첨가시에는 균체 생육은 왕성하였지만 protease의 활성은 거의 나타나지 않았다. 이 후 실험은 polypeptone을 기질로 하여 수행하였다.

배지의 pH에 따른 효소의 생산효과는 50mM potassium phosphate buffer를 이용하여 pH 5.5에서 7.5까지 0.5 간격으로 조사하였다. 그 결과 pH 7.0 이상에서는 거의 효소 생산효과가 없었으며 pH 6.0 buffer를 사용시 효소 활성이 가장 높았으며, 배양 4일까지 배지내 pH가 거의 6.0을 유지하였다(Fig. 5). MES buffer(pH 6.0)를 사용한 경우에도 pH가 잘 유지되었으며 효소 생산도 비교적 잘 되었으나 50mM 이상의 phosphate buffer만큼 효소 생산은 되지 않았다.

효소 생산을 위한 최적 pH 유지와 균체 생육에 필요한 phosphate 공급을 모두 만족시키는 최적 농도를 선정하기 위해 potassium phosphate(pH 6.0) buffer를 10mM부터 100mM 까지 달리하면서 효소활성을 조사하였다. 50mM MES buffer (pH 6.0)에 KH_2PO_4 (7.35mM)를 첨가시킨 기본 배지를 대조구로 사용하여 비교한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 그 결과 potassium phosphate가 40mM 이하의 농도로 첨가시에는 pH 완충작용과 phosphate 공급이 충분치 못하여 배양액의 pH가 7.0 이상으로 올라갔으며 효소 생산효과도 거의 나타나지 않았다. 또한 20mM 이하인 경우는 균체 생육도 상당히 저해되었다. 효소의 생산은 potassium phosphate(pH 6.0)를 50mM로 첨가하였을 때 가장 높았으며 그 이상의 농도에서는 오히려 약간 효소 생산이 감소하였다. 또한 control로 이용한 50mM MES buffer에서도 효소 생산은 우수하였으나 50mM potassium phosphate 첨가시 보다는 낮은 활성을 보였다. 이 결과로부터 균체 생육에는 10mM 이상의 phosphate가 필요한 것으로 판단된다. 또한 MES buffer를 사용하여 phosphate 농도를 조절하는 것보다는 대량 배양시의 경제성(MES가 potassium phosphate보다 약 5배 가격이 비쌌) 및 실험의 편의성 면에서 potassium phosphate buffer를 이용하는 것이 바람직하다고 판단된다. 50mM potassium phosphate (pH6.0) buffer를 이용하여 최적 기질로 조사된 polypeptone의 농도를 0.1에서 1.5%까지 각각 배지에 첨가하여 기질의 최적농도를 조사하였다. 그 결과는 Fig. 7과 같다. 기질 농도가 낮은 경우는 효소생산은 빨리 일어났으나 최대로 생산되지 않았고 오히려 높은 농도로 첨가시에는 polypeptone의 일부 분해 산물이 균체 생육에 충분하여 효소

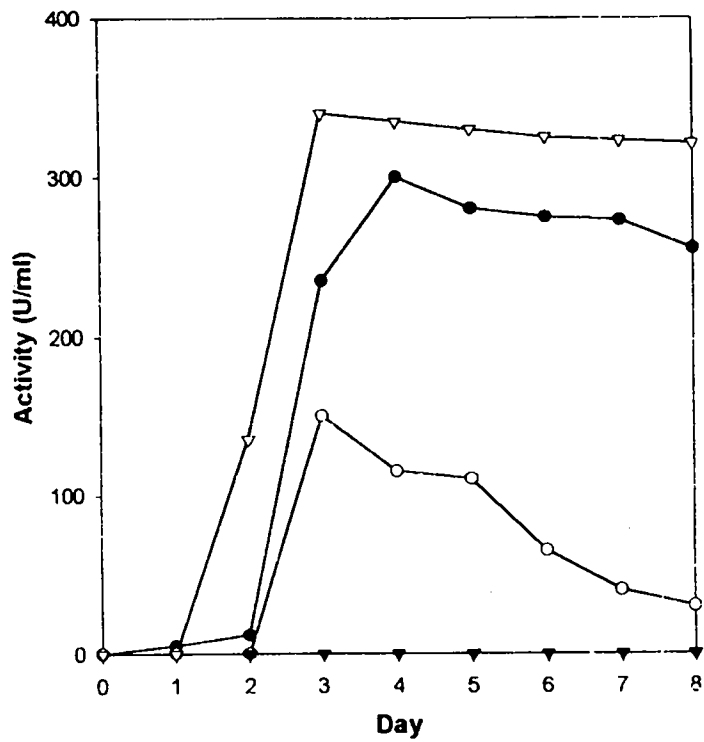


Fig. 4. Effects of different substrates on the production of extracellular protease from *B. bassiana*. Each substrate was 0.3%. ∇ - ∇ ; polypeptone, \bullet - \bullet ; BSA, \circ - \circ ; gelatin, \blacktriangledown - \blacktriangledown ; casain.

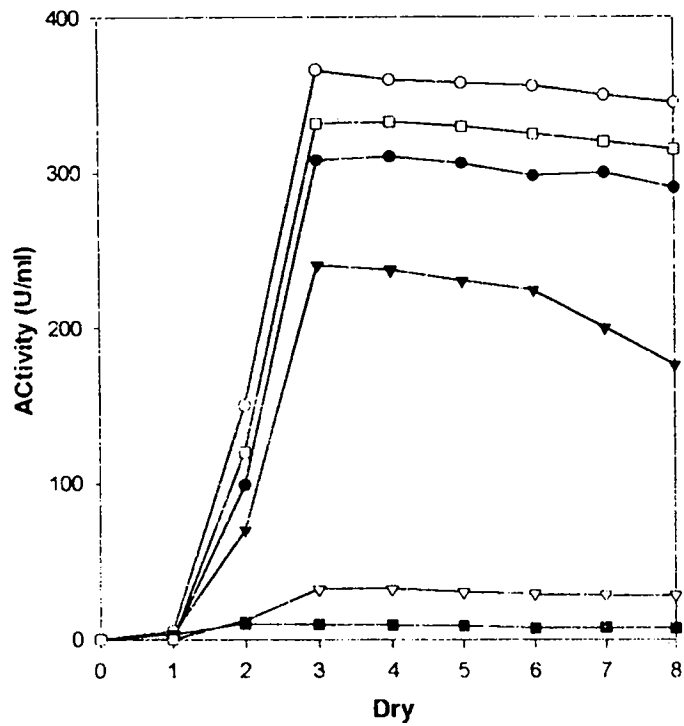


Fig. 5. Effects of pH on the production of extracellular protease from *B. bassiana*. 0.3% polypeptone was added to culture broth containing 50mM potassium phosphate (●-●; pH 5.5, ○-○; pH 6.0, ▼-▼; pH 6.5, ▽-▽; pH 7.0, ■-■; pH 7.5) or 50mM MES (□-□; pH 6.0).

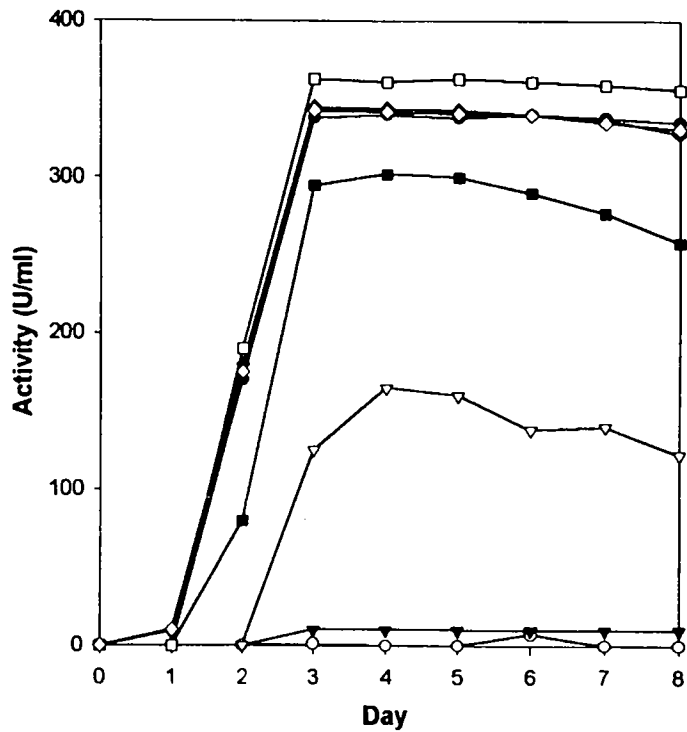


Fig. 6. Effects of phosphate concentrations on the production of extracellular protease from *B. bassiana*. Substrate was 0.3% polypeptone. ●-●; 50mM MES, ○-○; 10mM phosphate buffer, ▼-▼; 20mM phosphate buffer, ▽-▽; 30mM phosphate buffer, ■-■; 40mM phosphate buffer, □-□; 50mM phosphate buffer, ◇-◇; 75mM phosphate buffer, ◆-◆; 100mM phosphate buffer.

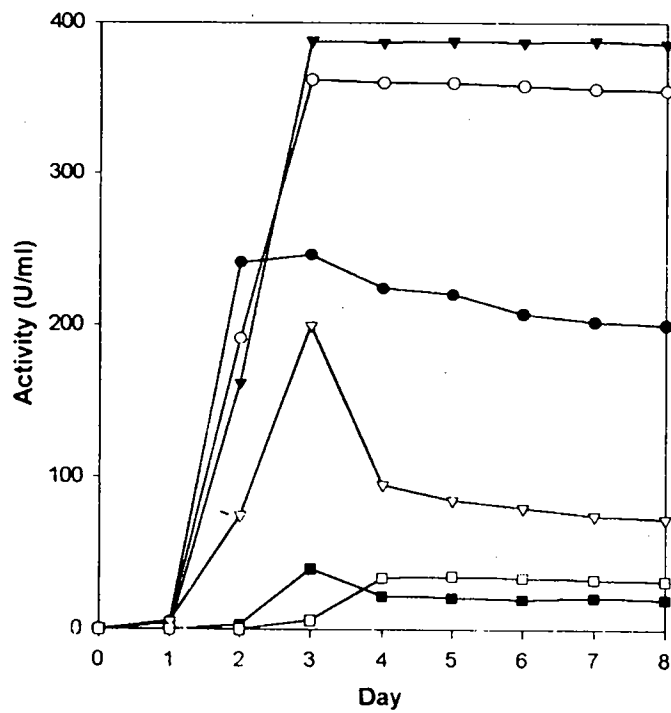


Fig. 7. Effects of polypeptone concentrations on the production of extracellular protease from *B. bassiana*. ●-●; 0.1%, ○-○; 0.3%, ▼-▼; 0.5%, ▽-▽; 0.7%, ■-■; 1.0%, □-□; 1.5%.

생산효과는 거의 나타나지 않는 것으로 판단되었다. 한편 0.7%로 첨가시에는 배양 4일째 부터 효소 활성이 급격히 감소하는 경향을 보였으며 이는 수차례 실험에서도 같은 결과를 얻었다. 이 결과는 생산된 protease에 의해 분해된 산물이 균체생장에 충분하고 오히려 효소 생산을 억제하는 것으로 판단된다. 이상의 결과에서 효소 생산 효과는 0.3 - 0.5%로 첨가시 높게 관찰되었으며 0.5% 첨가 배지에서 가장 높은 효소활성을 보였다.

배양여액의 효소 활성을 metalloprotease의 inhibitor로 EDTA, serine계protease inhibitor로 PMSF 및 DFP 그리고 thiol protease inhibitor로 DTT를 사용하여 활성을 측정하였다. 각 inhibitor는 0.5 - 10mM까지 농도를 달리 첨가하여 pH 8.5, 37℃에서 20분 반응시켜 조사하였다. 그 결과를 Fig. 8에 나타내었다. *B. bassiana*로부터 생산되는 protease의 활성은 PMSF 및 DFP에 의해 저해되었고 DFP보다는 PMSF 첨가시 뚜렷한 저해를 가져왔다. 이로부터 *B. bassiana*가 생산하는 protease는 serine계 protease임을 알 수 있다. 한편 EDTA 및 DTT는 효소 활성에 미치는 영향이 없었다.

제 3절. 살충성관련 효소의 분리정제 및 특성

1. *M. anisopliae* chitinase의 분리정제 및 특성

M. anisopliae chitinase를 80% saturated ammonium sulfate precipitation, DEAE-Sephacel(Fig. 9), CM-Sephrose CL-6B ion exchange chromatography (Fig. 10)와 FPLC Superose 12HR gel filtration(Fig. 11)을 통하여 순수하게 분리하였다. 정제과정의 전체적인 요약은 Table 2와 같다.

M. anisopliae chitinase는 SDS-PAGE에서 60KDa의 분자량을 나타냈으며, gel filtration 결과와 비교했을 때 monomer로 사료된다 (Fig. 12). 정제된 효소의 특성을 살펴보면 이 효소는 pH 5.0에서 최대활성을 나타내고 pH 4.0과 pH 6.0에서도 높은 활성을 유지함을 Fig. 13에서 보여주고 있다. 또한 chitinase의 기질특이성을 조사한 결과(Table 3) 이 효소는 chitin 중합체와 oligosaccharide인 chitobiose와 chitotriose에도 높은 활성을 갖고 있는 것으로 보아 endochitinase와 exochitinase 활성을 동시에 갖는 것으로 사료된다.

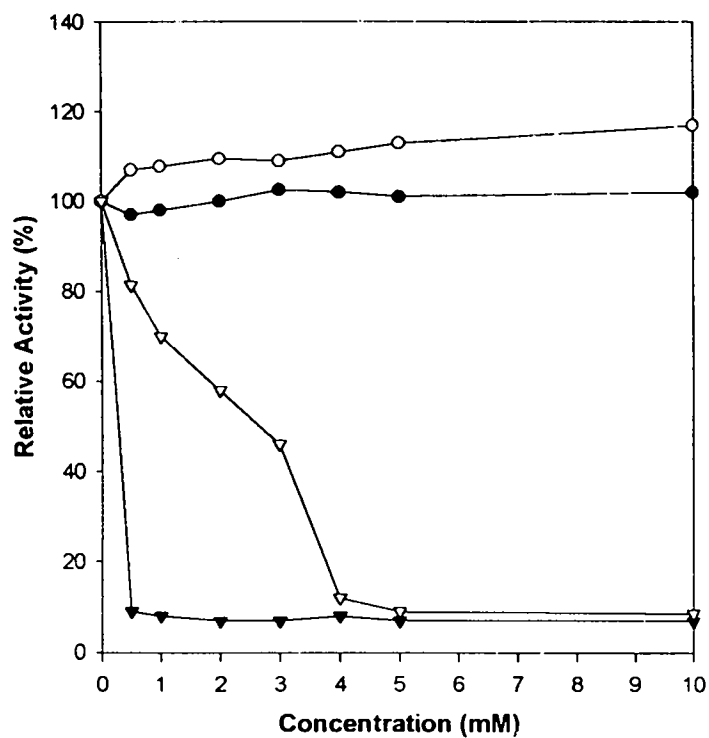


Fig. 8. Effects of various inhibitors on *B. bassiana* extracellular protease activity. Each inhibitor was added from 0.5mM to 10mM, respectively. ●-●; EDTA, ○-○; DTT, ▼-▼; PMSF, ▽-▽; DFP.

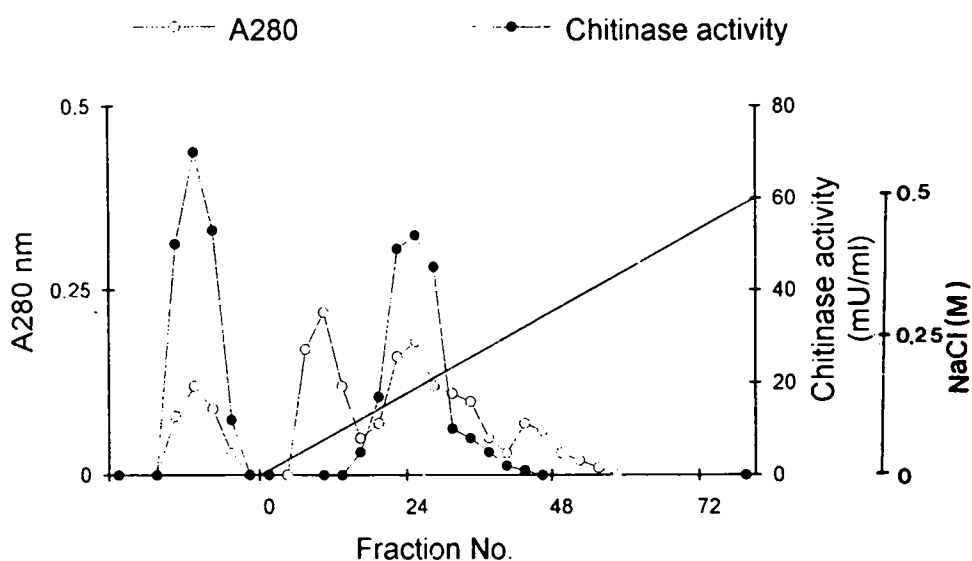


Fig. 9. Elution profile of chitinase activity in a column of DEAE-Sephacel. A sample(5.15 mg) of the concentrated and dialyzed extract from *M. anisopliae* was applied to the column(2.5×15 cm). Elution was performed with a 0–0.5 M gradient of NaCl for 300 ml. Flow rate was 100 ml/h. Activity fractions of the former peak were pooled for next purification.

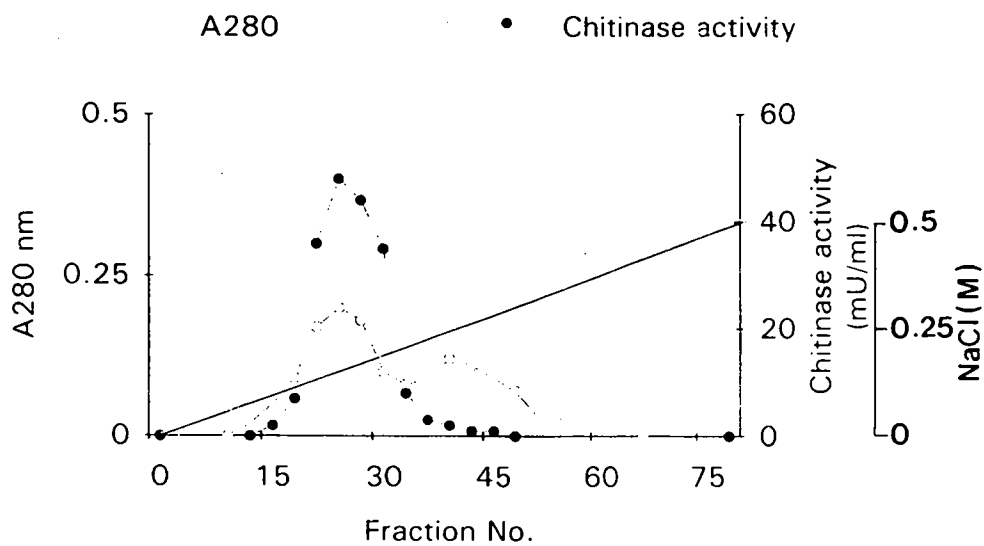


Fig. 10. Elution profile of chitinase activity in a column of CM-Sepharose CL-6B. The former activity fraction(1.14 mg) from DEAE-Sephacel column was concentrated to 20 ml and applied to the column(1.5×15 cm). Elution was performed with a 0-0.5 M gradient of NaCl for 150 ml. Flow rate was 100 ml/h. Activity fractions corresponding to 80-150 mM NaCl were pooled for next purification.

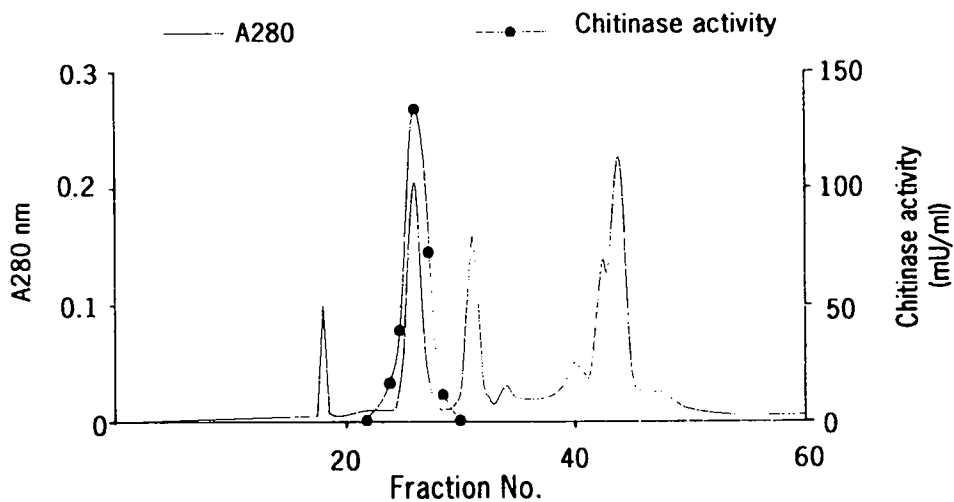


Fig. 11. Separation of chitinase by FPLC gel filtration. The activity fraction from CM-Sepharose CL-6B column was concentrated to 2 ml. An aliquot (90 μ g) of the concentrate was injected into Superose 12HR column. Flow rate was 24 ml/h. Fraction size was 1 ml. Activity fractions were pooled for subsequent analysis.

Table 2. Purification table of chitinase isolated from *M. anisopliae*.

Purification step	Protein (mg)	Total mU	Specific activity(mU/mg)	Yield (%)	Purification fold
1. Culture fluid	18.07	8,659	463		
2. Ammonium sulfate precipitation	5.15	5,272	1,024	60.7	2.21
3. DEAE-Sephacel	1.14	2,081	1,825	24.0	3.94
4. CM-Sephacel CL-6B	0.35	807	2,307	9.3	4.98
5. FPLC Superose 12Hr gel filtration	0.11	564	5,127	6.5	11.03

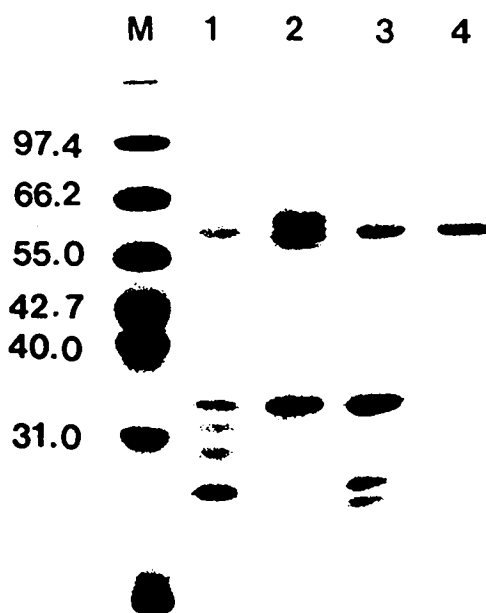


Fig. 12. SDS-PAGE of activity fraction from each purification step. Lane: 1, ammonium sulfate precipitation; 2, DEAE-Sephacel column chromatography; 3, CM-Sephadex CL-6B column chromatography; 4, Superose 12HR gel filtration by FPLC; M, molecular weight standards from top to bottom, phosphorylase B(97,640), bovine serum albumin(66,200), glutamate dehydrogenase(55,000), ovalbumin(42,700), aldolase(40,000), carbonic anhydrase(31,000).

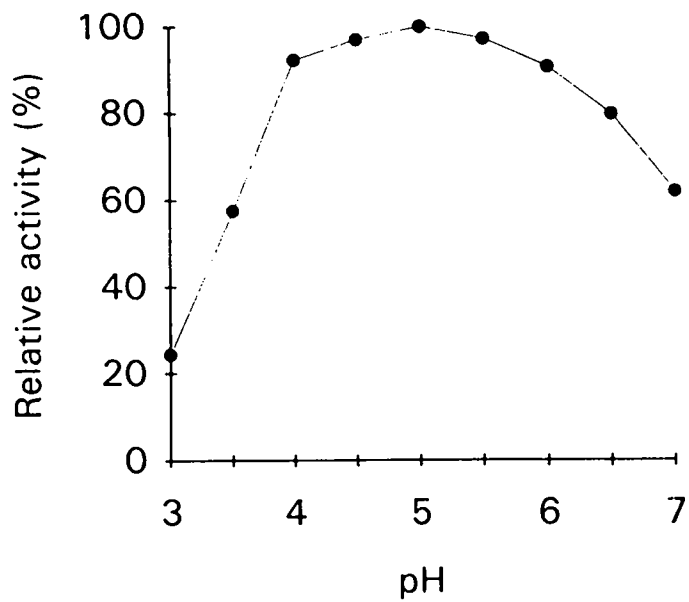


Fig. 13. Effects of pH on chitinase activity.

Table 3. Enzyme action of the purified chitinase from *M. anisopliae* on chitin and chitin oligosaccharides.

Substrate	endochitinase activity ^a (NAG nmol $\mu\text{g}^{-1}\text{min}^{-1}$)	exochitinase activity ^b (μNP nmol $\mu\text{g}^{-1}\text{min}^{-1}$)
colloidal chitin	5.14	
crystallin chitin	1.32	
μNP - β - <i>N</i> -acetylglucosamide		3.63
μNP - β - <i>N,N'</i> -diacetylchitobiose		7.8
μNP - β - <i>N,N',N''</i> -triacetylchitotriose		4.53

^aEnzyme activity was assayed by method of Tagaki et al. (1992).

^bEnzyme activity was assayed by method of Havukkala et al. (1993).

2. *B. bassiana* protease의 분리정제 및 특성

Beauveria bassiana protease를 정제하기 위하여 선행 실험에서 검토한 최적 생산배지에서 3일간 배양(9.1ℓ)후 균체를 filtration하여 제거하고 그 배양여액 (8.49ℓ)을 ammonium sulfate를 95% saturation하여 원심분리 후 침전물을 현탁하여 5mM potassium phosphate(pH 6.0) buffer로 투석하여 DEAE sephadex A-50 column (2.5×10cm)에 loading하고 그대로 elution된 protease 활성액(185ml)을CM-cellulose column(2.5×18cm)에 loading하여 pH gradient(10mM Borax, pH6.0 - 10.6)후 10mM Borax, pH 10.6 step, pH 11.0 step을 걸어주었다. 이를 통하여 6개의 단백질 분획[F I (pH 8부근), F II (pH 8.8부근), F III (pH 9.5부근), F IV, F V (pH 10.6 step), F VI (pH 11 step)]을 얻었고 이중 F V 분획에서 가장 높은 protease 활성을 보였다(Fig. 14). 이들 각 fraction을 protease inhibitor로 DTT(thiol protease), EDTA(metallo protease) 및 PMSF(serin protease)를 첨가하여 활성을 조사하여 보았다(Table 4). 그 결과 모든 fractions는 PMSF에 의해 모두 활성이 감소하는 특성을 보였으며 F II의 경우 DTT첨가에 의해 활성이 크게 증가하는 특성을 보였다. 또한 각 fraction sample을 0.1% gelatin SDS-PAGE를 수행하여 활성 염색을 한 결과 F V에서 뚜렷한 proteolytic activity를 보였으며 이와는 다른 활성 band를 다른 fraction에서 확인하였다(Fig. 15). 즉, F I에서 저분자량의 protease를 비롯한 2종류의 protease를 확인하였고 F III 및 F IV에서 고분자량의 protease가 있는 것으로 판단되었다. 따라서 이러한 chromatography pattern과 활성염색의 결과로부터 *B. bassiana*는 여러 종류의 protease를 생산하는 것을 알 수 있었다. 이들 활성 분획중에서 가장 높은 활성과 단백질양을 갖는 F V분획을 취하여 hydroxyapatite column (2.5×2.2cm, 1mM MgCl₂) chromatography를 수행하였다. 이 과정에서 대부분의protease 활성은 그대로 elution되어 나오지만 일부는 1M MgCl₂에서 elution되었다. 이 두 부분은 전기영동상으로는 동일한 것으로 판단되었다. Hydroxyapatite column에서 바로 elution된 sample은 SDS-PAGE를 통하여 완전히 정제되었음을 확인하였으며 분자량은 약 28kDa이었다. 이러한 정제과정은 Fig. 16 및 Table 5에 나타내었다.

정제된 protease(Bassiasin I)의 여러 가지 생화학적인 특성을 조사하였다. Bassiasin I의 최적 반응 pH를 결정하기 위해서 pH 5.0에서 pH 12.0의 다양한 pH완충용액에서 수행한 효소활성의 측정 결과는 Fig. 17에 나타내었다. 산성 pH에서는 대체로 효소활성이 낮으며 알칼리성 pH에서 높은 활성을 보였다. pH 10.5에서 최적활성을 가지며, pH 7.5의 경

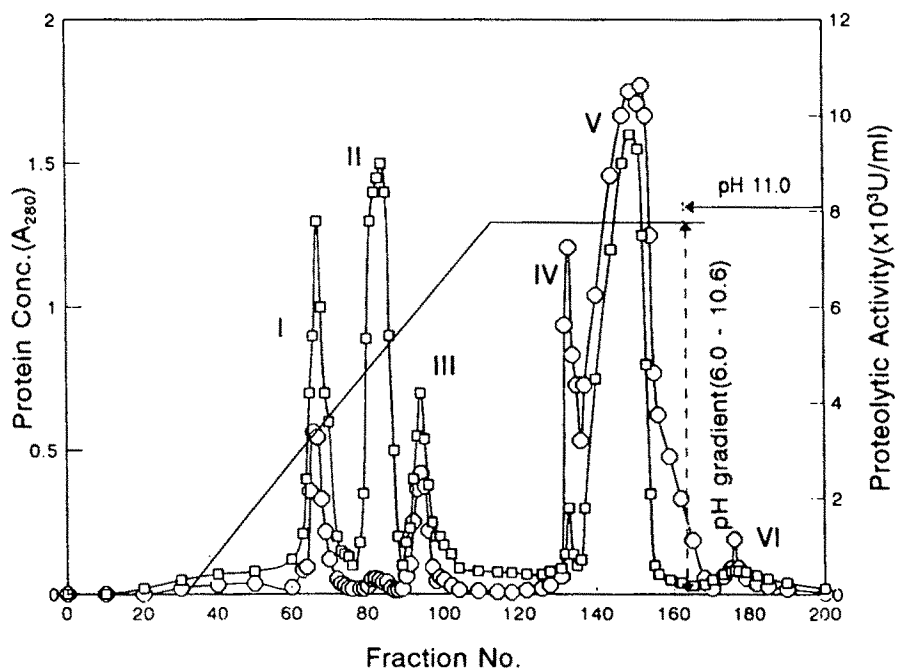


Fig. 14. CM-cellulose column chromatography profile. ○-○; proteolytic activity, □-□ protein concentration.

Table 4. Effects of protease inhibitors on the proteolytic activity of *B. bassiana* proteases derived CM-cellulose column chromatography with pH gradient.

Inhibitor		Relative activity (%)				
		F I	F II	F III	F IV	F V
None		100	100	100	100	100
DTT	1 mM	100	200	100	142	100
	10 mM	193	1,000	100	152	100
EDTA	1 mM	100	104	89	107	93
	10 mM	100	144	88	166	94
PMSF	1 mM	36	26	71	0.5	0.3
	10 mM	8	4	54	0.1	0.09

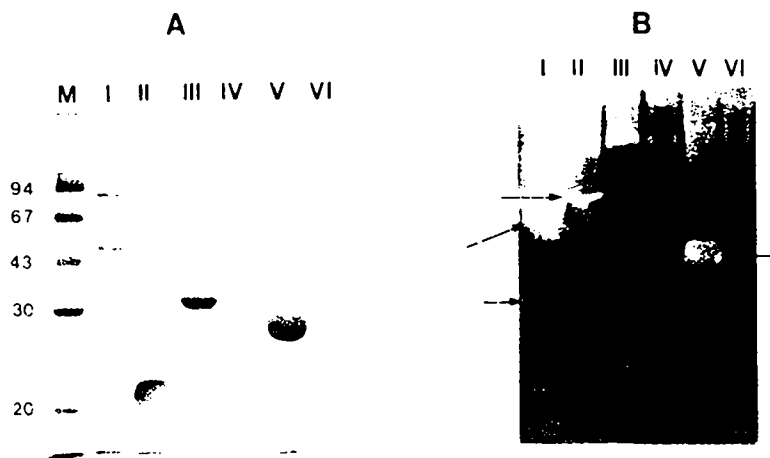


Fig. 15. SDS-PAGE(A) and gelatin SDS-PAGE(B) analysis of the CM-cellulose fractionated proteases. $10\mu\text{l}$ of fractions were loaded in a 12% polyacrylamide gel containing 0.1% gelatin in the gel matrix, and electrophoresis was performed at 5°C for 3.5 hrs. The gelatin SDS-gel was soaked in 2.5% Triton X-100 for 30 min, washed with distilled water for 1 hr, and incubated in 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5) for 5 hrs at 37°C . The gel was stained with 0.1% amido black. [Ref. Lee S. H. Yi, Christine M. Runion, and Kenneth L. Polakaoski (1992) Demonstration of a boar testicular protein band that is immunoreactive to proacrosin and proacrosin binding protein antibodies. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 184, 760-764.]

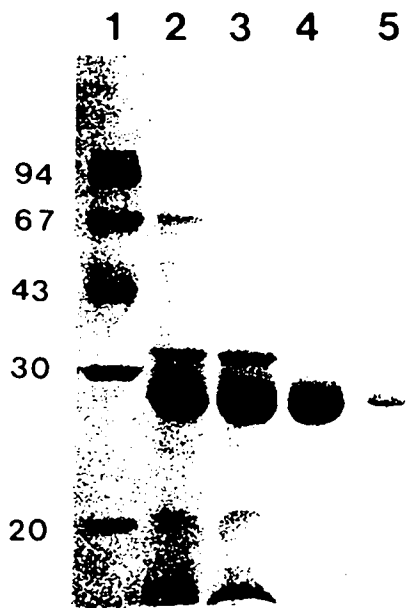


Fig. 16. SDS-PAGE analysis of the samples of purification steps. lane 1; protein standard marker, 2; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3; DEAE sephadex A-50, 4; CM-cellulose, 5; Hydroxyapatite.

Table 5. Purification of *B. bassiana* protease(FV)

	Volume (ml)	Protein (mg)	Total Activity (U)	Specific Activity (U/mg)	Recovery (%)
Medium supernatant	8,490	28,300	5,310,495	187.6	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	155	1,224.5	2,691,188	2,197.8	50.7
DEAE sephadex A-50	185	573.5	2,270,875	3,959.7	42.8
CM-cellulose	98.5	364.5	1,896,125	5,202.7	35.7
Hydroxyapatite	30	93	720,501	7,747.3	13.6

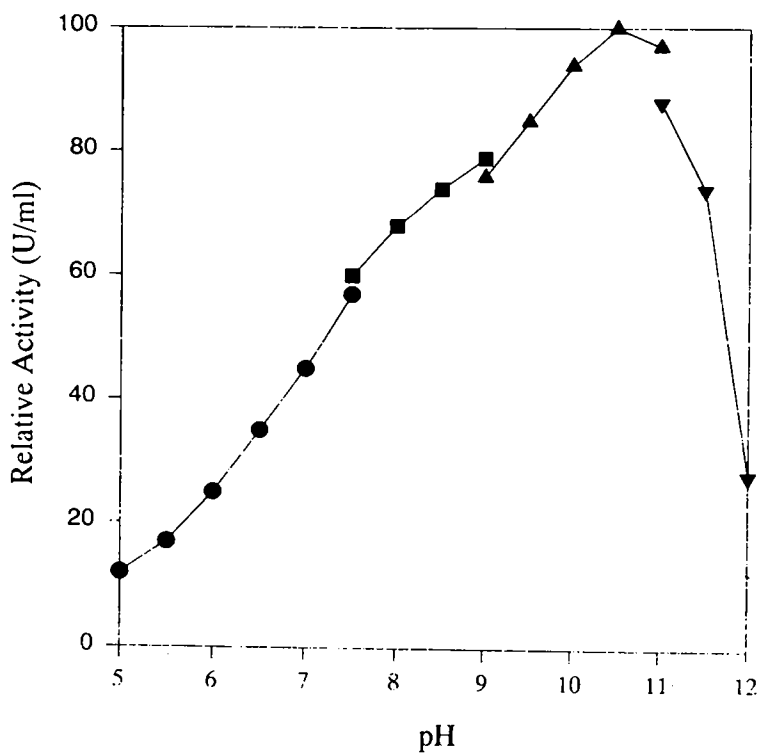


Fig. 17. Effects of pH on the proteolytic activity of Bassiasin I. The reaction was carried out at 37°C in the following buffers. ●-●; 50mM potassium phosphate, ■-■; 50mM Tris-HCl, ▲-▲; 50mM glycine-NaOH, ▼-▼; 50mM phosphate-NaOH.

우 최적활성의 50%를 나타내었다.

Bassiasin I의 pH에 대한 안정성 실험은 각각의 pH에서 28℃에서 2 시간, 4℃에서 48 시간 동안 각각 방치한 후 잔존 효소활성을 측정된 것이며 결과가 Fig. 18이다. pH 5.0 - 11.0의 범위에서 잔존활성의 90% 이상을 유지하므로 이 pH 범위에서는 상당히 안정하였다. 하지만 pH 11.0이상에서는 잔존효소의 활성이 20%이하로 급격히 저하되었다.

Bassiasin I의 최대 효소 활성온도를 알아보기 위해 20 - 70℃ 범위에서 10℃ 간격으로 효소활성을 측정된 결과를 Fig. 19에 나타내었다. 최대활성은 60 - 65℃이며 70℃에서는 활성이 급격히 감소하는 것으로 나타났다.

Bassiasin I의 열안정성을 조사하기 위해 20mM potassium phosphate 완충용액 (pH 6.0)에서 30 - 60℃까지 10℃ 간격으로 열처리하면서 경과시간에 따른 효소활성을 측정된 결과는 Fig. 20과 같다. 본 효소는 40℃에서 120분 처리하여도 효소활성을 그대로 유지하나, 60℃에서 50분 처리시에 최초 활성의 50%가 감소되고 120분 처리하였을 때 최초 활성의 약 80%가 감소되었다.

Bassiasin I에 2가 양이온의 효소활성에 대한 영향은 CaCl₂, CuCl₂, MgSO₂, MnCl₂, ZnCl₂, FeSO₄ 등을 최종농도 1 mM과 10 mM로 효소액에 첨가하여 조사하였다. 37℃에서 1시간 처리한 후 효소활성을 측정된 결과 효소 활성에 영향이 없었다.

제 4절. *M. anisopliae* chitinase 유전자의 cDNA cloning

살충성 사상균의 살충성은 곤충의 cuticle층을 분해하는 과정이 가장 중요한 것으로 알려져 있다. Cuticle층의 분해는 chitinase, protease 등의 extracellular enzyme에 의해 일어난다. 따라서 살충성 사상균의 유전공학적 육종을 위해서는 곤충 cuticle 분해 효소의 분리 및 유전자 cloning 등의 과정이 필요하며 궁극적으로는 이들 유전자를 살충성 사상균에서 과잉발현시켜 살충효과를 높이는 데 있다. 본 연구를 수행하기 위한 주 대상 균주로는 *M. anisopliae* (ATCC 20500), *Beauveria bassiana* (ATCC 7159) 등의 균주를 이용하였다. *M. anisopliae*의 곤충표피 침투시 특이적으로 발현하는 chitinase 유전자를 분리하기 위해 cDNA 유전자 은행을 작성하였다. cDNA 유전자 은행의 efficiency는 5.8×10^5 (pfu)이었으며 chitin 가수분해에 관련된 효소를 포함할 것으로 사료된다. cDNA 유전자

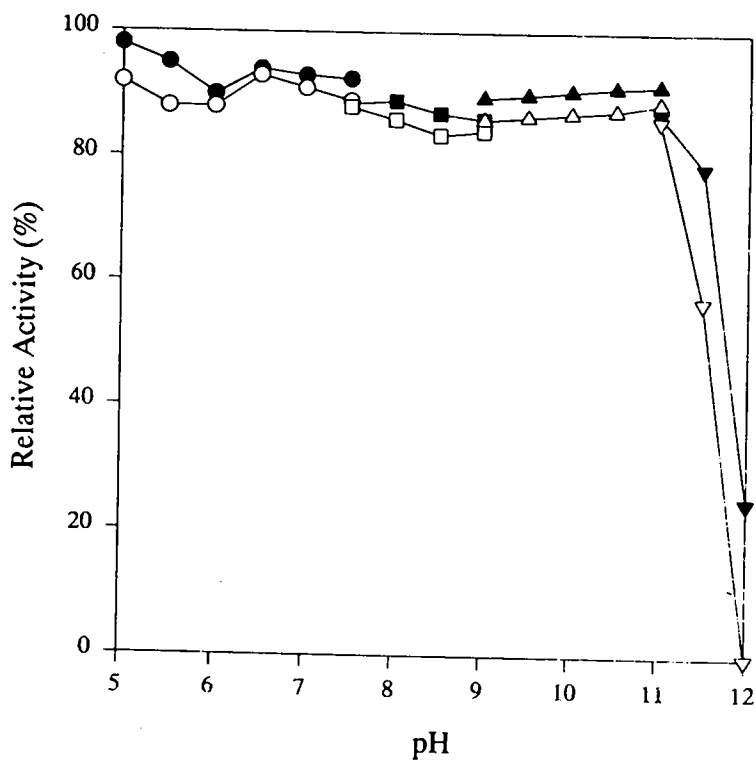


Fig. 18. Effects of pH on the stability of Bassiasin I. The pH treatment was carried out in the following buffers for 48hrs at 4°C (closed symbols) or for 2hrs at 28°C (open symbols). 25mM potassium phosphate (●-●, ○-○), 25mM Tris-HCl (■-■, □-□), 25mM glycine-NaOH (▲-▲, △-△), 25mM phosphate-NaOH (▼-▼, ▽-▽).

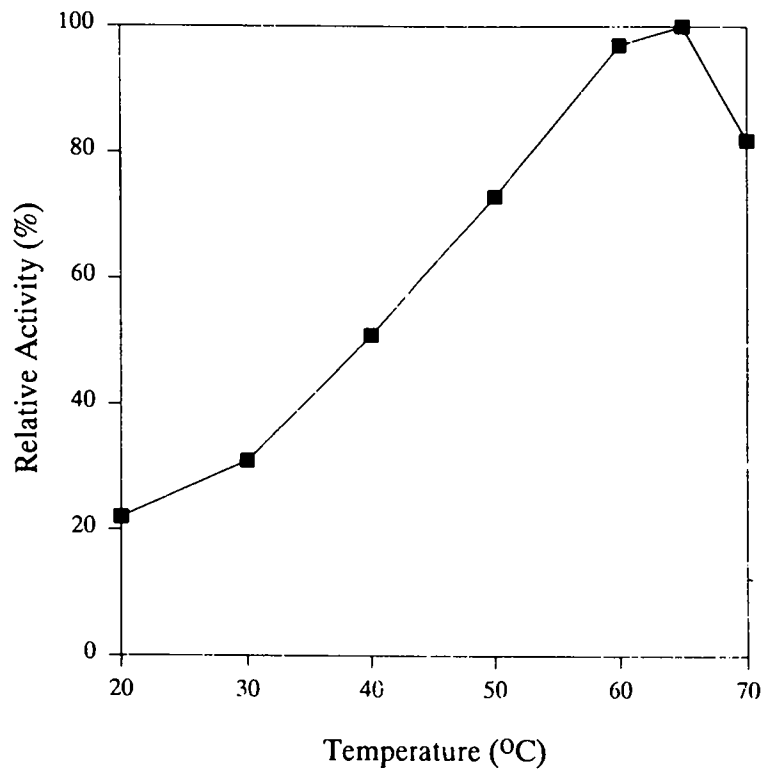


Fig. 19. Effects of temperature on the proteolytic activity of Bassiasin I. The enzyme activity was assayed at indicated temperature in 50mM glycine-NaOH (pH 10.5) for 10min.

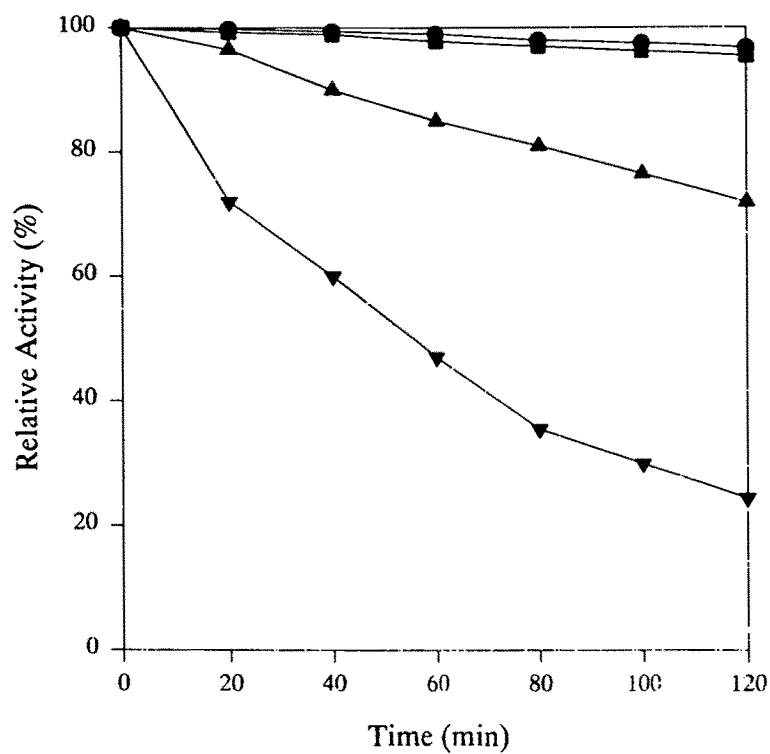


Fig. 20. Effects of heat stability of Bassiasin I. The enzyme was diluted at the concentration of 1.0ug/ml in 20mM potassium phosphate buffer (pH 6.0). After incubation at 30°C(●-●), 40°C(■-■), 50°C(▲-▲) and 60°C(▼-▼) for the indicated times, the remaining activity was assayed.

은행으로부터 glycol chitin을 분해하는 chitinase를 direct screening 방법으로 cloning 하였으며(Fig. 21), 이 clone을 pCHI 11로 명명하였다. pCHI 11을 *E. coli* XL1-Blue에 형질전환하였을 때, IPTG에 의하여 유도되었으며, 2.5% SDS 용액에서 100℃로 5분동안 증탕했을 때 chitinase 활성을 유지하였지만 2% β -mercaptoethanol로 증탕하였을 때 chitinase 활성이 현저히 저하되었다(Fig. 22). pCHI 11은 restriction mapping과 DNA sequencing 결과(Fig. 23, Fig. 24) 약 2Kb의 nucleotide를 포함하고 있었으며, open reading frame은 1,569개의 nucleotide, 522개의 아미노산으로 구성되어 있었고 이로부터 추정된 분자량은 58 kDa이었다.

M. anisopliae chitinase는 다른 사상균의 chitinase들과 상동성을 비교한 결과(Table 6, Fig. 25) 상동성이 20% 내외로 매우 낮았다. 그러나 active site 부근에서는 다소 높은 30~50%의 상동성을 갖고 있었으며 특히 serine 307, glycine 309, glycine 310, aspartic acid 342, aspartic acid 344, glutamic acid 346를 모두 공동으로 갖고 있었다. 또한 다양한 제한효소를 처리하여 *M. anisopliae* genomic DNA를 Southern analysis한 결과 clone 된 chitinase는 *M. anisopliae* genome 상에 1 copy로 존재함이 확인되었다(Fig. 26).

제 5절. *M. anisopliae* chitinase 유전자의 genomic DNA cloning

1차년도에 순수 분리 정제한 chitinase의 N-terminal 아미노산 서열로부터 degenerated oligonucleotides(A1, A2)를 합성하여 primers로 사용하였다(Fig. 27).

반대쪽 primer로는 아래와 같은 ZAP express vector의 T7 promoter primer를 이용하였다.

T7 primer: 5' - CGGGATATCACTCAGCATAA - 3'

이들 primers로부터 *M. anisopleae*의 genomic library에서 분리한 DNA를 주형으로 하여 PCR을 수행한 결과(Fig. 28) 300bp의 M1 및 580bp의 M2 bands를 확인할 수 있었다.

각각의 band를 Sanger의 dideoxy chain termination 방법에 따라 DNA sequencing한 결과는 Fig. 29, Fig. 30에 나타내었다.

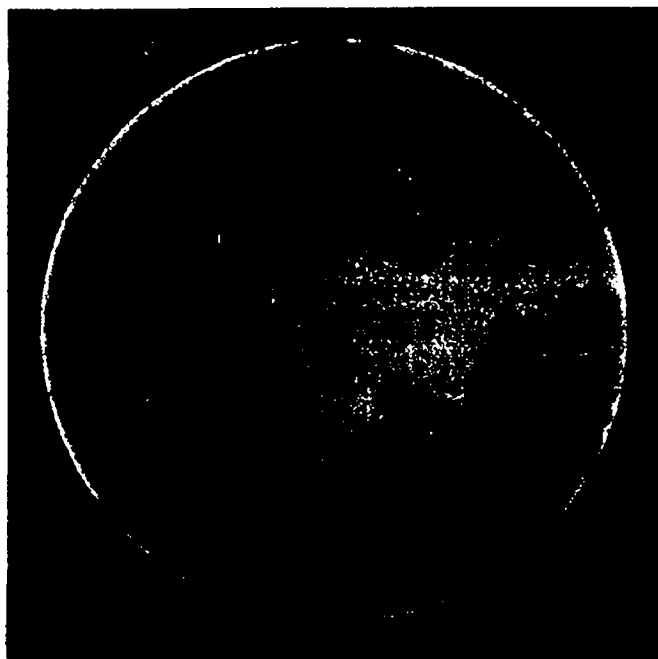


Fig 21. Screening of chitinase clone from *M. anisopliae* cDNA library. The phages of cDNA library were grown on NZY Agar plate containing 0.01% glycol chitin and 20mM IPTG at 37 °C for 8 hours. The plate was incubated in 500mM Tris-HCl (pH 8.9) containing 0.01%(w/v) Calcofluor White M2R for 5 min, destained with water for 1 hour at room temperature. Lytic zones were visualized by placing the plate on UV transilluminator.

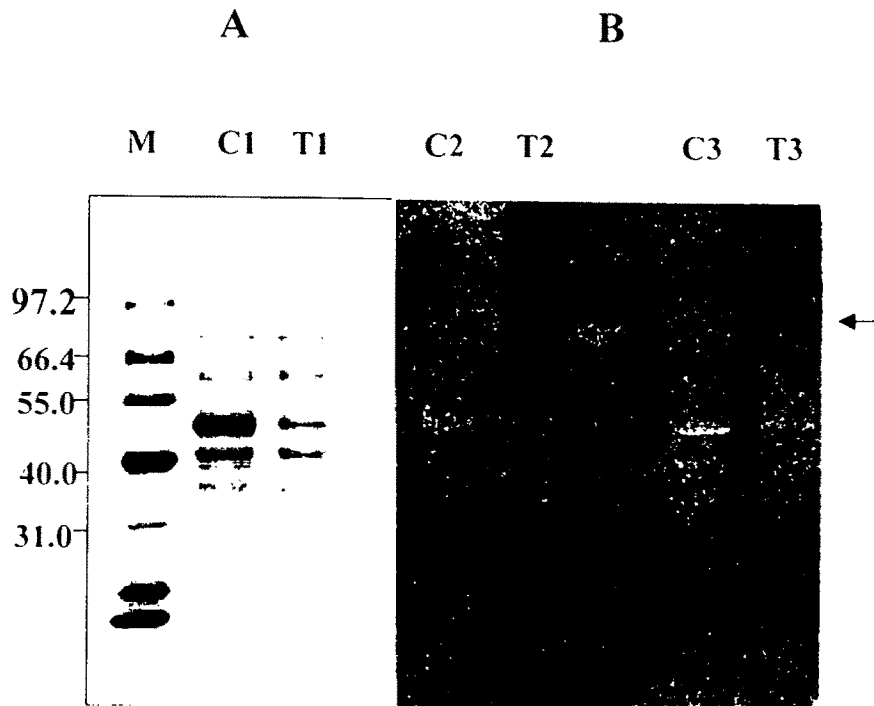


Fig 22. Chitinase activity after electrophoresis in a 10%(w/v) polyacrylamide gel. C₁, C₂, C₃ were extracted from *E. coli* XL1-Blue(host), T₁, T₂, T₃ from *E. coli* X11-Blue transformated with pCHI 11(transformant). Samples were boiled for 5min in 15%(w/v) sucrose and 2.5%(w/v) SDS in 125mM Tris-HCl (pH 6.7) with (C₃, T₃) or without (C₂, T₂) 2%(w/v) β -mercaptoethanol. A, stained with Coomassie blue R-250. 00B, after staining with Calcoflour White M2R. Band with lytic activity appeared as dark zones on UV transilluminator.

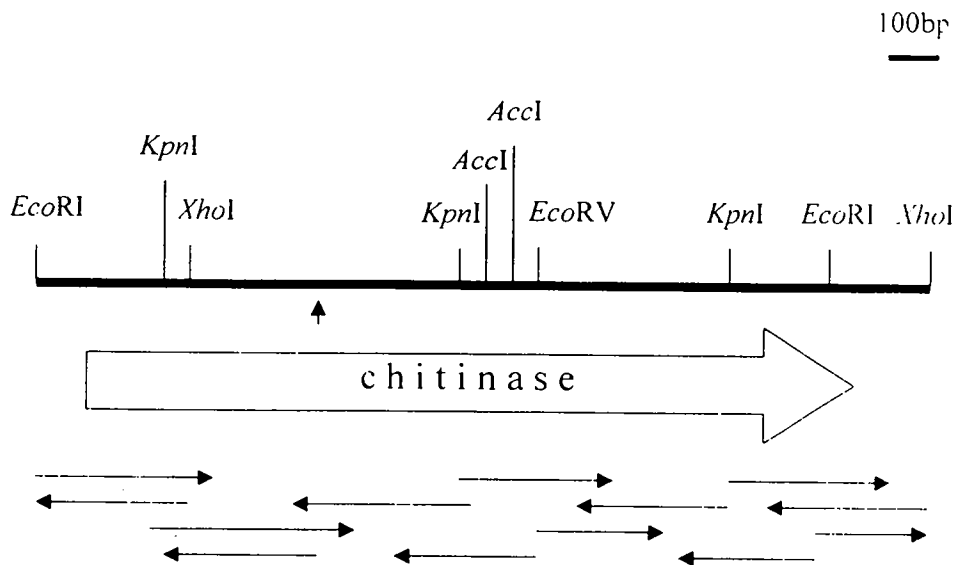


Fig 23. Restriction endonuclease map and sequencing strategy for chitinase gene of *M. anisopliae* (pCHI 11). Arrows indicate the length and direction of sequencing. (↑), deletion point.

tcctgtttccgттааgсcттатаатаатggcggtgctg -145
 tgactccggttgatccaactccggaaacaccggtgacccaactccggataacagcgagccatcaac - 68
 accagcggataggcttaacgattactcattgcaagtgtggagcgccaggaaggtagcgaatttacc - 1
 ATG TTA TTT TCA ATG GTA ATG TTT ACA GAG CGC TGG TGG GTT GGG TCT AAA 51
 M L F S M V M F T E R W W V G S K 17
 GAT TGC CCA CGG GTA CCA GCG CTA GAA AAC TCC AAT AAC CCA TGG CGT CTC 102
 D C P R V P A L E N S N N P W R L 34
 GAG CGT ACA GCT ACC GCT GCG GAA TTG AGT CAG TAC GGT AAC CCG ACT ACC 153
 E R T A T A A E L S W Y G N P T T 51
 TGT GAA ATT GAT AAC GGC GGC GTC ATT GTT GCG GAT GGT TTC CAG GCC AGC 204
 C E I D N G G V I V A D G F Q A S 68
 AAA GGC TAC ACC GGT GAC AGC ATC GTA GAT TAT AAC GAT GCA CAT TAT AAA 255
 K G Y T G D S I V D Y N D A H Y K 85
 ACT TCT GTC GAT CAA GAC GCA TGG GGC TTT GTC CGG GCG GCC TAT AAC CGT 306
 T S V D Q D A W G F V R A A Y N R 102
 GGA AGA AAT ACG AAC CGC CAA AGC AGT GGT CCG CAT CCA CTG TGT ACG AGA 357
 G R N T N R Q S S G P H P L C T R 119
 AAG TGT ATC GCG TGG TTG TTG ATG GGC AGG CTT ATG AAC GCT GTT CTG ACG 408
 K C I A W L L M G R L M N A V L T 136
 CAA AGT GAC AAC CCT GCT CTG GTG CCC AAC CAA AAC GCC ACC GGT AGC AAT 459
 Q S D N P A L V P N Q N A T G S N 153
 AGC CGC CCG TGG AAG CCG TTA GGT AAG GCT CAG AGC TAT AGC AAC GAA GAG 510
 S R P W K P L G K A Q S Y S N E E 170
 CTG AAT AAT GCG CCG CAG TTT AAT CCA GAA ACG CTT TAT GCC AGC GAT ACG 561
 L N N A P Q F N P E T L Y A S D T 187
 CTG ATT CGC TTT AAC GGT GTG AAC TAC ATT TCT CAG AGT AAA GAG CAG AAA 612
 L I R F N G V N Y I S Q S K E Q K 204
 GTT TCT CCT TCT GAC AGC AAC CCG TGG CGT GTT TTT GTT GAC TGG ACC GGA 663
 V S P S D S N P W R V F V D W T G 221
 ACC AAA GAG CGC GTA GGT ACG CCG AAG AAA GCG TGG CCG AAA CAC GTT TAT 714
 T K E R V G T P K K A W P K H V Y 238
 GCA CCG TAT GTC GAC TTT ACG CTG AAT ACG ATC CCG GAT CTG CGT GCG CTG 765
 A P Y V D F T L N T I P D L R A L 255
 GCT AAG AAT CAT AAC GTC AAC CAC TTC ACG CTG GCG TTT GTG GTG AGT AAA 816
 A K N H N V N H F T L A F V V S K 272
 GAT GCG AAC ACC ACA TGT GGT ACC GCT TAC GGT ATG CAG AAT TAC GCT CAG 867
 D A N T T C G T A Y G M Q N Y A Q 289

TAC AGC AAA ATC AAA GCT CTG CGT GAG GCT GGC GGC GAT GTG ATG CTG TCT	918
Y S K I K A L R E A G G D V M L S	306
ATC GGT GGT GCT AAC AAC GCT CCG CTG GCT GCT TCC TGT AAG AAC GTA GAC	969
I G G A N N A P L A A S C K N V D	323
GAT CTG ATG CAG CAT TAT TAT GAC ATC GTT GAT AAC CTG AAC CTC AAA GTC	1020
D L M Q H Y Y D I V D N L N L K V	340
CTG GAC TTC GAT ATC GAA GGC ACC TGG GTT GCG GTA CAG GCA TCT ATT GAA	1071
L D F D I E G T W V A V Q A S I E	357
CGT CGT AAC CTT GCT GTG AAG AAA GTG CAG GAT AAA TGG AAG TCA GAA GGC	1122
R R N L A V K K V Q D K W K S E G	374
AAA GAT ATT GCT ATC TGG TAC ACC TTG CCA ATT CTC CCG ACT GGC CTG ACG	1173
K D I A I W Y T L P I L P T G L T	391
CCG GAA GGG ATG AAT GTC CTG AGC GAT GCC AAA GCG AAA GGT GTT GAG CTG	1224
P E G M N V L S D A K A K G V E L	408
GCG GGT GTG AAC GTG ATG ACA ATG GAC TAC GGT AAC GCG ATT TGT CAG TCT	1275
A G V N V M T M D Y G N A I C Q S	425
GCA AAT ACC GAA GGC CAG AAC ATT CAC GGT AAG TGT GCA ACG TCT GCG ATT	1326
A N T E G Q N I H G K C A T S A I	442
GCC TTC CTG CAT TCA CAA TTG AAA GGC CTC CAT CCC AAT AAG AGC GAT GCA	1377
A F L H S Q L K G L H P N K S D A	459
GAA ATT GAC GCT ATG ATG GGT ACC ACG CCG ATG GTT GGC GTG AAC GAC GTT	1428
E I D A M M G T T P M V G V N D V	476
CAG GGC GAG GTG TTC TAT CTC TCT GAT GCT CGT CTG GTC ATG CAG GAT GCG	1479
Q G E V F Y L S D A R L V M Q D A	493
CAG AAG CGT AAT CTC GGT ATG GTT GGT ATC TGG TCA ATC GCG CGC GAC CTG	1530
Q K R N L G M V G I W S I A R D L	510
CCG GCC GCA CTA ACC TGT CTC CGG AAT TCC AGC GCC TGA <u>ctaaagaacaggctc</u>	1584
P A A L T C L R N F T A *	522
<u>cgaagtacgcatttagcgaaatcttcggccgtttactaagcaataaatgtgttggcgataccttcca</u>	1651
<u>gtatccggcattttttgtcaatgggctacttttggtagcattatttttattcatatttcttattctt</u>	1718
<u>tgcttaaaaaaaa</u>	1731

Fig 24. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the chitinase of *M. anisopliae*. Amino acid sequence is shown in one-letter code beneath the coding sequence. Lower-case letters indicates 5' and 3' untranslated regions. Putative polyadenylation signal sites are underlined. Termination codon is represented as asterisk.

Table 6. Comparison of deduced amino acid sequence of chitinase from *M. anisopliae* and other microbial chitinase.

Chitinase	Organism	Best match(%)
1.4- β -N-acetylglucosaminidase	<i>Saccharopolyspora erythroea</i>	24.4%
Serratia chi A	<i>Serratia macescens</i>	25.0%
Bacillus chi A 1	<i>Bacillus criculans</i>	36.4%
Str. Oli chitinase	<i>Streptomyces olivaceoviridis</i>	33.9%

	position	10	20-----	70	80	
<i>M. anisopliae</i>	295	ALREAGGDVMLSIGGANNAP-----	NLKVLD	FDIEGTWVAVQASI	413	
<i>Saccharomyces</i>	95	TCQSLGKKVLLSLGGASGSY-----	VVDGFD	FDIENNNEVGYSAL	167	
<i>Rizopus</i> Chi I	105	KCQDKGVKVLISLGGAGVY-----	VIDGVD	LDIEGGASTGYAAF	176	
<i>Serratia</i> ChiA	260	KQAHPDLKILPSIGGWTLSD-----	FFDGVD	IDWEFPGGKGANPN	325	
<i>Serratia</i> ChiB	82	KAHNPSLRIMFSIGGWYYSN-----	GFDGVD	IDWEYPQAAEVDGF	154	
<i>Alteromonas</i>	258	KQRYPD	LKILPSVGGWTLSD-----	FYDGVD	IDWEFPGGDGPNPD	323
<i>Bacillus</i> ChiD	251	YLQSQGKKVLISMGGANCRI-----	GFNGLD	IDLEGSSLSLNAGD	313	
<i>Str. ery</i>	65	AIRGAGGDVIPSIGGYSGSK-----	GLKAID	VDI EATEFENDASE	126	
Killer α	434	FLKVTSSKKIPSGGWDFST-----	NLDGID	LDWEYPGAPDIPDI	505	

Fig 25. Amino acid sequence similarities between chitinase of *M. anisopliae* and other microbial chitinase, sequence segments shown here are from *Saccharomyces cerevisiae* chitinase, *Rhizopus oligosporus* chitinase I, *Serratia macescens* chitinase A and chitinase B, *Alteromonas* sp. chitinase 85, *Bacillus circulans* chitinase D, *Streptomyces erythraeus* chitinase and *Kluyveromyces lactis* Killer toxin α subunit.

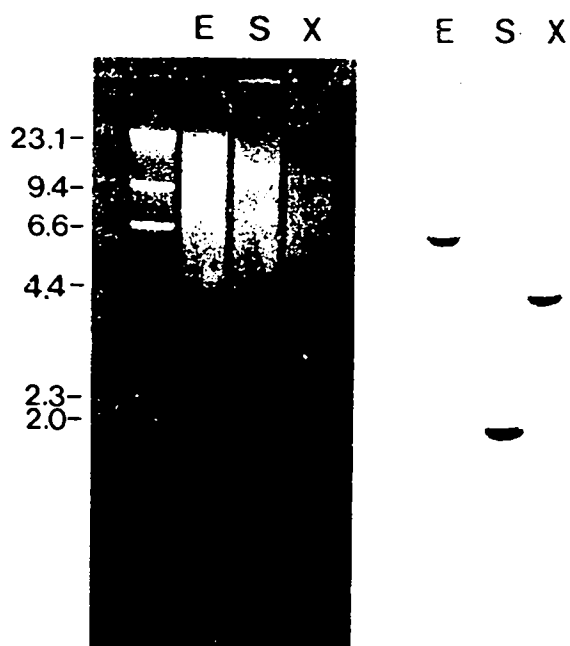


Fig. 26. Southern blot analysis of genomic DNA isolated from *M. anisopliae*. DNA samples were digested with *EcoR* I (E), *Sal* I (S) and *Xho* I (X), separated on 0.7% agarose gel(left) and hybridized with [³²P]-labelled 0.5Kb *Kpn* I fragment of the chitinase(right).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
 N - T - G - G - S - W - N - N - E - V - N - V - Q

A1

A2

A1 : 5' - GGNWSYTGGAAAYAAYGA - 3'

A2 : 5' - TGGAAYAAYGARGTNAAYGT - 3'

R: (A, G), Y: (C, T), W: (A, T), S: (G, C), N: (G, A, T, C)

Fig. 27. N-terminal amino acid sequence of *M. anisopliae* chitinase and nucleotide sequences of synthetic oligonucleotides

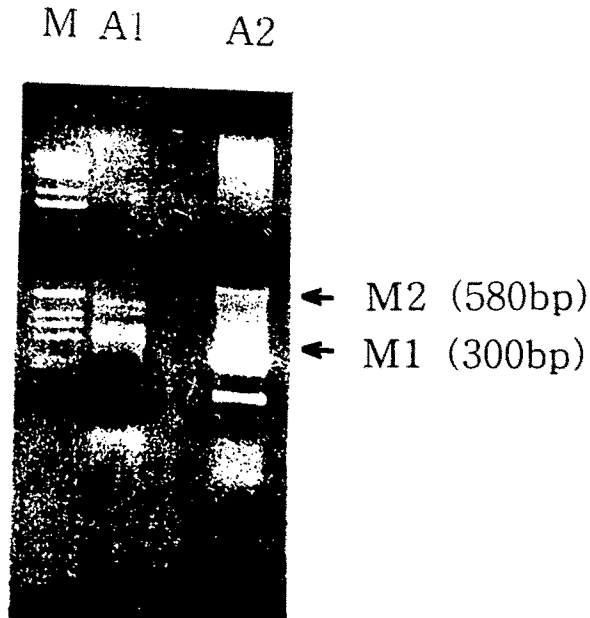


Fig. 28. Gel electrophoresis pattern of PCR product with *M. anisopliae* genomic DNA by using A1 primer(lane A1) and A2 primer(lane A2). Lane M is 100bp ladder and the arrows indicate major PCR products.

```

1  TGG AAT AAT GAG GTT AAC GTC CAG CCC AGC AAG GTC ATA CCA TTC GTT
1  W  N  N  E  V  N  V  Q  P  S  K  V  I  P  F  V

49  ATA GAG GAG CAC GAT CTG CAA AGA ATC GAC TCA CGA CGG CGT CCA ATT
17  I  E  E  H  D  L  Q  R  I  D  S  R  R  R  P  I

97  GTA CGC AAT AAG AGA TGT TTC TCC AGA AGG TCT ATA GTA GGG AGA ATT
33  V  R  N  K  R  C  F  S  R  R  S  I  V  G  R  I

145 CGA TC
49  R

```

Fig. 29. Nucleotide sequence of M1 fragment and deduced amino acid sequence.

1	GGG	AGC	TGG	AAC	AAC	GAG	GTC	AAC	GTA	CCC	AGT	GGA	TGG	CTG	CAG	GAT
1	G	S	W	N	N	E	V	N	V	P	S	G	W	L	Q	D
49	AGC	CTG	AGG	CTT	CTG	AGT	ATA	CTT	GGA	TGC	AAG	GAT	ATC	TCG	AAC	GCT
17	S	L	R	L	L	S	I	L	G	C	K	D	I	S	N	A
97	GTT	CAA	GAG	CTC	GAC	ATA	GCT	CTG	CTT	AGG	GTT	CTG	TTT	AAG	AGC	AGT
33	V	Q	E	L	D	I	A	L	L	R	V	L	F	K	S	S
145	AAT	GAA	AGC	CCA	AGA	CAT	GGC	ACC	AGT	TGC	CTG	GTT	GGC	AAT	TGT	GGC
49	N	E	S	P	R	H	G	T	S	C	L	V	G	N	C	G
193	ATC	GGC	ACT	GAA	AAC	ACA	CGG	GTT	AGA	ACG	TAT	AAC	TGC	GGC	TGG	TCG
65	I	G	T	E	N	T	R	V	R	T	Y	N	C	G	W	S
241	CAT	TCC	ATG	TGG	AAC	TTA	CGA	TGT	CTG	GTC	GTC	CTT	GCT	TCC	GGA	CCA
81	H	S	M	W	N	L	R	C	L	V	V	L	A	S	G	P
289	CAT	AAT	CAC	ATC	GGC	AGG	CGA	CGT	TCG	GGT	CTC	CAT	GGT	CTT	GTT	GTA
97	H	N	H	I	G	R	R	R	S	G	L	H	G	L	V	V
337	TGC	ATC	ATC	TCC	CTT	GAA	TGC	AGT	CTT	TGC	GAA	ACC	AAA	GAC	AGT	GCT
113	C	I	I	S	L	E	C	S	L	C	E	T	K	D	S	A
385	TGC	AAC	CCC	TGC	CAT	GTC	GCC	ACG	TGC	ATA	GGA	TCC				
129	C	N	P	C	H	V	A	T	C	I	G	S				

Fig. 30. Nucleotide sequence of M2 fragment and deduced amino acid sequence.

결과에서 알 수 있듯이 M1은 chitinase의 N-terminal과 100%일치하였으나, M2에서는 chitinase의 N-terminal로부터 13번 위치의 아미노산 Q가 P로 치환된 것을 제외한 나머지 부분이 완전히 일치하였다. *M. anisopliae*는 여러 종류의 chitinases를 생산할 수 있기 때문에 본 실험에서는 상동성이 매우 높은 두 종류의 PCR products를 전부 최종 screening을 위한 probes로 활용하였다. M1, M2를 각각 probes로 이용하여 *M. anisopliae*의 genomic DNA를 Southern blot analysis했을 때의 결과는 Fig. 31, Fig. 32와 같다. Southern 분석방법은 genomic DNA를 제한효소 처리 후 0.8% agarose gel에서 전기영동한 후 나일론 막에 전이시켰다. DNA가 전이된 나일론 막을 hybridization 용액 (6×SSC, 0.5% SPS, 5×Denhardt's solution, 100 µg/ml denatured salmon sperm DNA)에서 2시간 전처리후 [³²p]로 표지된 probe DNA를 첨가시켜 65°C에서 20시간 반응시켰다. Fig. 31과 Fig. 32에서 보여 주는 바와 같이 M1에 대해서는 처리한 제한효소의 종류에 따라 3-4개의 fragments가 확인되었으며, M2에 대해서는 1개의 fragment만 확인되었다.

Southern 분석에서 positive signals을 갖는 각각의 DNA fragment를 ZAP express vector에 연결한 다음, Gigapack II packaging extract로 시험관 내에서 packaging하여 *E. coli* XL1-Blue MRF'에 infection하였다. 이로부터 plaque hybridization을 수행하여 *M. anisopliae* chitinase gene을 screening 하였으며 그 결과는 Fig. 33에 나타내었다. 각각의 λ clone들을 제한효소 처리하여 전기영동 및 Southern blot analysis를 수행하여 이 중에서 M1-1 clone을 선발하였다. 이 clone을 Apa I, Kpn I, Hind III, Sal I, Sac I, Xba I으로 절단하여 Southern 분석한 결과는 Fig. 34와 같다.

M1-1 clone에 대한 부분적인 DNA sequencing의 결과는 Fig. 35와 같으며, 나머지 부분에 대한 염기서열 결정이 진행중에 있다. 또한 isozymes의 가능성이 높은 다른 종류의 clones에 대해서도 DNA sequencing을 실시할 예정이다.

제 6절. *B. bassiana* protease 유전자의 cloning

본 연구를 위해 *B. bassiana* (ATCC 7159)로부터 새로운 protease인 Bassiasin I을 분리, 정제하여 N-말단 아미노산 서열을 결정하였다. 현재까지 *B. bassiana*의 다른 strain인 *B. bassiana* (USDA 331275)에서 Pr1 protease가 정제되었으며 cDNA가 cloning

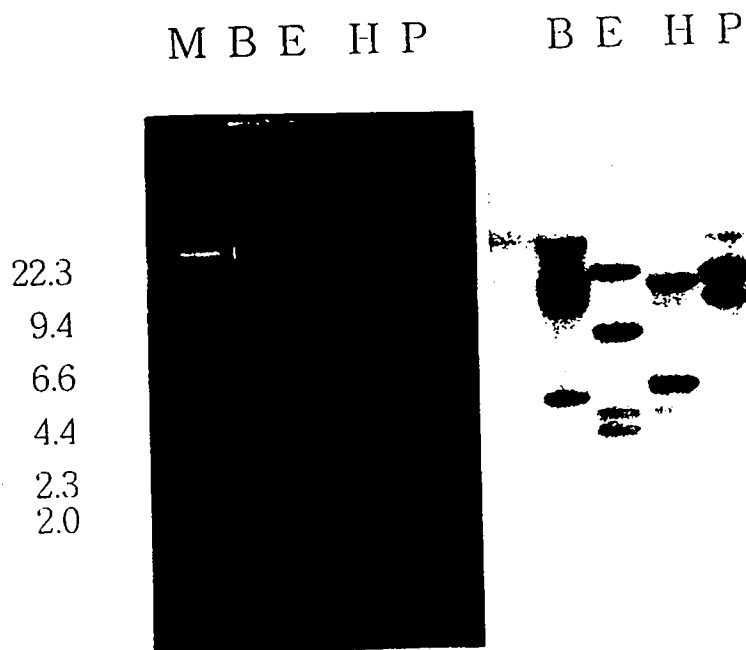


Fig. 31. Southern analysis of *M. anisopliae* genomic DNA digested with restriction enzymes by using M1 fragment(300bp) as a probe. B; BamHI, E; EcoRI, H; HindIII, P; PstI, M; size marker. M; size marker.

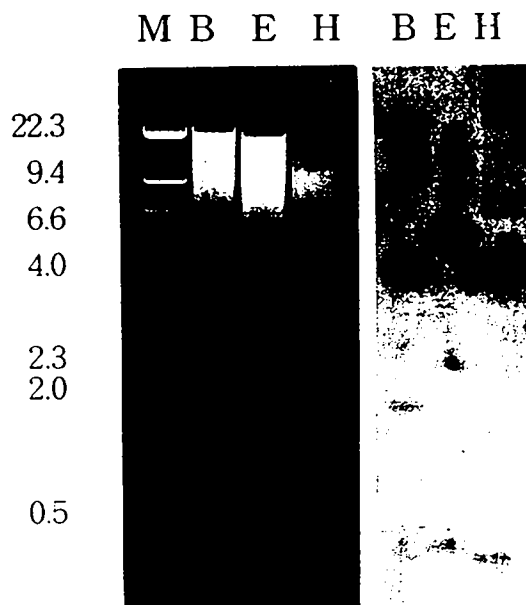


Fig. 32. Southern analysis of *M. anisopliae* genomic DNA digested with restriction enzymes by using M2 fragment(580bp) as a probe. B; BamHI, E; EcoRI, H; HindIII, M; size marker.

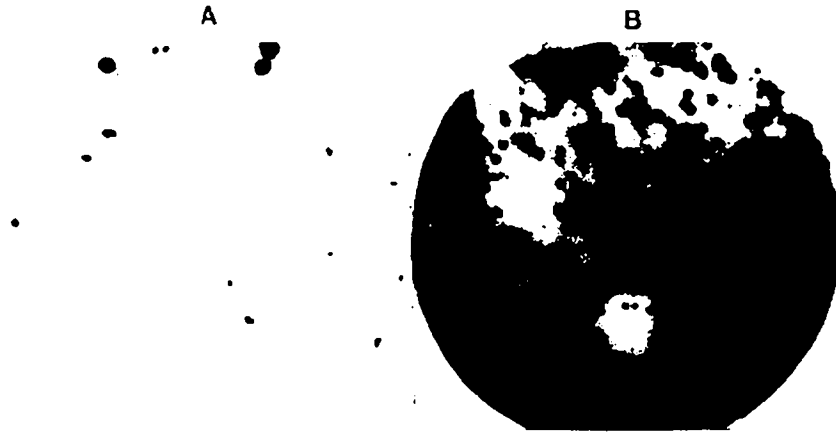


Fig. 33. Plaque hybridization to identify the λ phage recombinant clone containing chitinase gene. Genomic DNA library of *M. anisopliae* was plated, plaques were lifted onto nylon membrane, and hybridized with a [32 P]-labelled M1 fragment(300bp) or M2 fragment(580bp) as a probe. A, first screening, B, second screening.

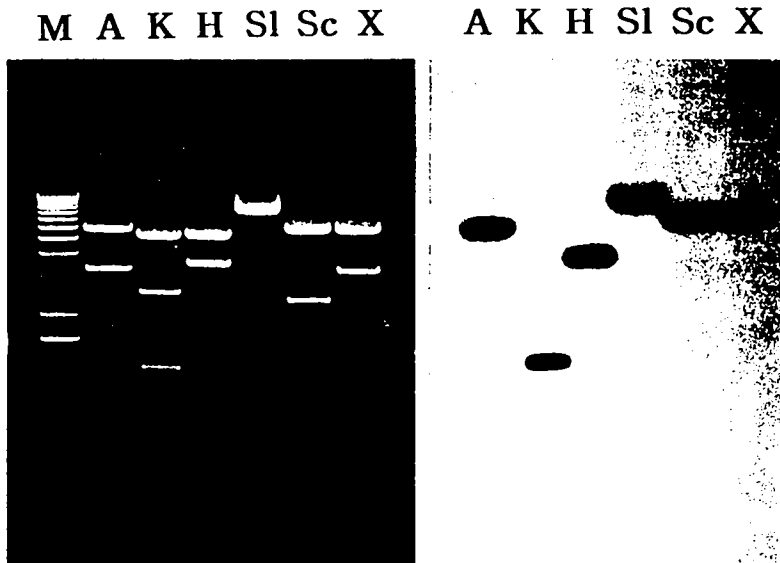


Fig. 34. Southern analysis of M1-1 clone digested with restriction enzymes by using M1 fragment(300bp) as a probe. A; ApaI, K; KpnI, H; HindIII, SI; Sall, Sc; SacI, X; XbaI, M; 1kb size marker.


```

      10           20           30           40           50           60
5' CCACCGCGCG GCCGCTCTAG AACTAGTGGA TCCCCCGGGC TGCAGGTCGA CACTAGTGGA
      70           80           90          100          110          120
TCATCTGTAT AAAATGATGT AGAACATGGG ACCCTAGCAA GTGTTGTAG ATCTTGTAGA
      130          140          150          160          170          180
TACTAATTTT AAGATTAATA CCGAAAAGAA CAAGAATGCT ATTATTTCTA GAGTGTGCGA
      190          200          210          220          230          240
TTGCACGAGA AGCAGTATGG CAATGCCCTA GTTTTGCATT CTGGAAAACC GCTCAAATCA
      250          260          270          280          290          300
AAGTAAAGAA AGAAAAGTGG CAAGCATGGC TGTGTAAACT CCGATTTCCG CCAGAAATAC
      310          320          330          340          350          360
CCTTCAGTGT GTCACAAGAA TAGAGAAAAG CCCAATAAAC CCCACTCGTC AACGCCCAGC
      370          380          390          400          410          420
CCAGCAAGGT CATACCATAC CATTCGTTAT AGAGGTGCAC GATCTCGAAA GCAATCGACT
      430          440          450          460          470          480
CACGACGGCG TCCAATTGTA CGCAATAAGA GATGTTTCTC CAGAAGGTCT ATAGTAGAGA
      490
GAATTCGATC 3'

```

Fig. 35. Partial nucleotide sequence of the chitinase gene from M1-1 clone.

되어 있다. *B. bassiana* (ATCC 7159)로부터 새로 분리한 효소의 N-말단 아미노산 서열을 결정된 결과 Ala-Ile-Val-Arg-Gln-Pro-Gly임을 확인하였다. 이상의 결과를 L. Joshi 등에 의해 보고된 *B. bassiana* (USDA 331375) protease와 비교한 경우 Ile와 Pro를 제외한 나머지 아미노산 서열이 완전히 일치(71.4%)하였다(Fig. 36). 또한 *B. bassiana*(B. b) protease는 *M. anisopliae* (M. a) Pr1 및 proteinase K와도 상당히 유사하다는 것이 판명되었다.

B. bassiana Bassiasin I 유전자의 cloning을 위해서 먼저 순수 정제한 *B. bassiana* Bassiasin I의 N-말단 아미노산 서열을 바탕으로 하여 mixed oligonucleotide를 합성하고 이를 Bassiasin I 유전자를 탐색하기 위한 probe DNA로 이용하였다. 합성한 oligonucleotide의 염기서열은 Fig. 37과 같다.

한편 genomic DNA library 제작을 위해 먼저 *B. bassiana* genomic DNA를 YPD 배지에서 3일간 배양한 mycellium으로부터 추출하였다. 100ug의 genomic DNA를 제한효소 *Sau3AI*으로 부분절단하였다. *Sau3AI* 부분절단은 제한효소의 serial dilution 방법을 이용하였으며 부분절단한 genomic DNA를 sucrose gradient(10-40%)로 초고속 원심분리(25,000rpm, 24hrs, 20°C)하여 약 10-20kb 절단단편만을 회수하였다. 이 부분절단한 단편을 λ DASHII 벡터의 Bam HI site와 ligation(4°C, 20hrs)한후 *in vitro* packaging하여 *E. coli* XL1-Blue MRA(P2)에 infection하였다. 이로부터 1.8×10^6 pfu/ml의 library를 제작하였다.

또한 cDNA library는 protease의 최적생산조건으로 배양한 균체의 mycellium으로부터 제작하였다. 이 mycellium에서 LiCl/Urea 방법으로 total RNA를 추출하고 oligotex bead를 이용하여 mRNA를 분리하였다. 분리한 mRNA에서 Stratagene사의 cDNA 합성 및 packaging kit를 이용하여 cDNA를 λ ZAPII 벡터에 ligation하여 *in vitro* packaging한 후 *E. coli* MRF'에 infection하여 약 3.5×10^5 pfu/ml의 library를 제작하였다.

이때 genomic DNA 및 cDNA clone을 탐색하기 위해 합성한 probe DNA를 방사성 동위원소 [γ - 32 P]ATP (7000Ci/mmol)로 T4 polynucleotide kinase를 이용하여 kination으로 표식한 후 Sep-Pak C₁₈ cartridges로 정제하여 사용하였다. LB 배지상에 plaque을 형성시킨 후 nylon membrane에 lift하여 plaque hybridization을 수행한 결과 cDNA library에서 5개의 clone을 선별할 수 있었다. cDNA clones은 *in vivo* excision을 통해 plasmid 상태로 분석하였다. 이때 선별한 5개의 cDNA clone중 가장 insert size가 긴 clone을 pEXBSN-2라고 명명하고 이로부터 여러 가지 제한효소를 이용하여 제한효소 지도를 작성하였다. 이는 Fig. 38에 나타내었다.

B. b.(ATCC 7159) protease FV	A I A R Q P G
B. b.(USDA 331275) protease	A V A R Q A G
M. a. PR1	G I T E G S G
Proteinase K	A A Q T N A G

Fig. 36. Alignment of N-terminal amino acid sequence with the related enzymes.

	A ¹	I	V	R	Q	P	G	A	P	W	G	LGRISHR ¹⁶
primer 1:	5'-GCI	ATC	GTI	CGI	CAA	CCI	GG-3'					
			T		G							
primer 2:	5'-CAA	CCN	GGA	GCG	CCN	TGG	GG-3'					
		G		T	T							
				C	C							

Fig. 37. Mixed oligonucleotides based on N-terminal amino acid sequence of Bassiasin I

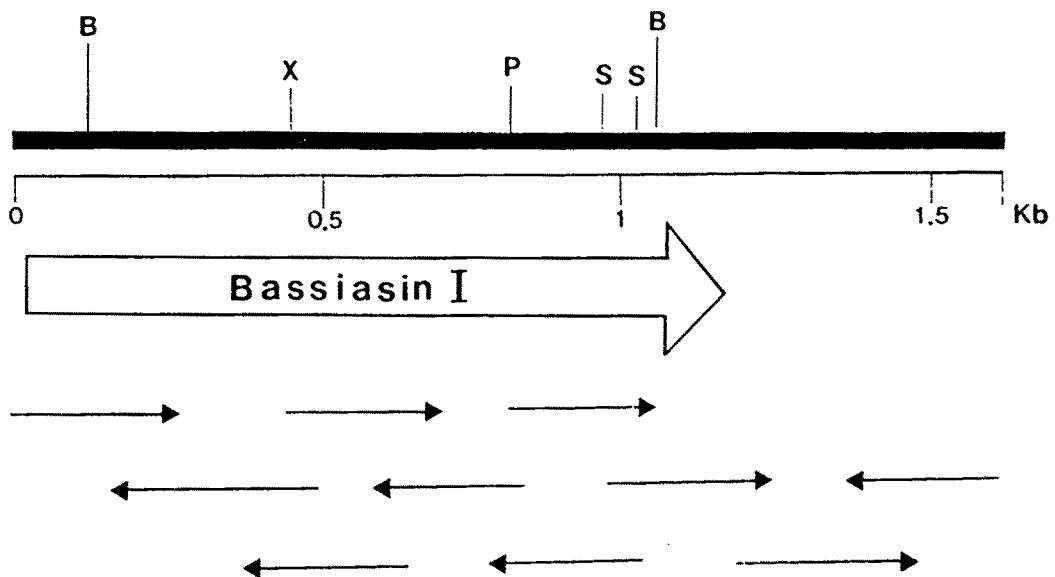


Fig. 38. Restriction endonuclease map and sequencing strategy for the Bassiassin I cDNA clone, pEXBSN-2. Arrows indicate the length and direction of sequencing. B, Bal I; P, Pst I; S, Sal I; X, Xho I.

이 제한효소 지도를 기초로 sequencing을 위한 subcloning을 수행하였다. 각 subclone은 Sanger의 dideoxy 방법으로 DNA 염기서열을 결정하였으며 이를 Fig. 39에 나타내었다. cloning된 cDNA는 1629 bp로 구성되어 있었으며 precursor-Bassiasin I은 1137bp로 379 aa로 구성되어 있고 mature 형태는 840bp의 280 aa로 구성되어 있다. Bassiasin I의 아미노산 서열을 alkaline serine계 protease와 상동성 비교한 결과 precursor 상태로는 *B. bassiana* (isolate 252) Pr1과 82.6%, *M. anisopliae* ME1 Pr1과는 64.6%, *T. album* proteinase K와는 62%의 상동성을 보였으며, mature 상태로는 각각 76.8%, 73.2%, 64.6%의 상동성을 보였다. 이를 Fig. 40에 나타내었다.

한편 genomic DNA 유전자의 cloning은 *B. bassiana* genomic library로부터 clone된 cDNA를 probe로 하여 screening하였다. 이로부터 12개 clone을 선발하였으며 이중 3개 clones의 λDNA를 분리하여 southern hybridization을 한 결과 공통적으로 약 0.7kb의 *XhoI* 절단단편과 각각 약 2.8kb, 1.5kb 및 1.3kb의 *EcoRI/XhoI* 절단 단편에 hybridization하였다(Fig. 41). 이중 약 1.5kb의 *EcoRI/XhoI* 절단단편과 0.7kb의 *XhoI* 절단단편을 다시 cloning하여 분석하였다.

이때 cloning한 약 1.5kb의 *EcoRI/XhoI* 절단단편과 0.7kb의 *XhoI* 절단단편을 적당한 제한효소를 이용하여 다시 subcloning하고 sequencing을 수행하였다. DNA sequencing 결과는 Fig. 42에 cDNA 서열과 같이 나타내었으며 cDNA sequence와 비교한 결과 3개의 intron이 존재하며 이는 각각 71, 62, 68NT로 구성되어 있었으며 이 유전자의 intorn들은 대부분의 eukaryotic gene과 유사한 [5' (exon) / GTANYAG / (exon) 3']의 경계 서열을 가지고 있었다.

제 7절. *M. anisopliae* protease 유전자의 cloning

*M. anisopliae*에서는 현재까지 4가지 protease가 보고되었다. 이 중에서 Pr1 protease가 cuticle 분해에 직접적으로 관여하는 것으로 알려져 있으며 그 cDNA 염기서열도 보고되었다. 따라서 본 연구에서는 먼저 Pr1 유전자를 cloning 하였으며, 이를 위해서 PCR 방법을 이용하였다. 즉 Leger 등이 발표한 Ma Pr1 protease 유전자의 cDNA 염기서열을 바탕으로 PCR primer pr1-N 및 pr1-C를 각각 합성하였다(Fig. 43). Primer pr1-N은 Pr1의

```

cttcatccagcaagcaaaagtcttttcgacaacttacttacaaaaatcctcaaatctcatcaccttgtcaaat -298
M R L S I I A A A L P L A I A A P V V E - 80
ATG CGT CTA TCA ATC ATC GCT GOC GCT CTT OCC CTG GCC ATT GCG GCT COG GTC GTT GAG -238
P A P L I E A R G Q T I A G K Y I V K L - 60
OCT GCT OCT CTC ATC GAG GOC OGC GGG CAG ACT ATT GOC GGC AAG TAC ATT GTC AAG CTC -178
K D T A T I G I M D A A S K V P N T E H - 40
AAG GAC ACC GOG ACC ATT GGT ATC ATG GAT GCT GOG TOC AAG GTT COC AAC AOC GAA CAC -118
V Y E N V L K G F S A T L N Q E Q L D R - 20
GTC TAT GAA AAT GTC CTC AAG GGA TTC TOG GOC AOC CTT AAC CAA GAA CAA CTT GAC CGT - 58
L R H D P D V E S I E Q D A I V S I N A +1
CTC OGC CAC GAC OCT GAT GTC GAG TOC ATC GAG CAG GAT GOC ATT GTT AGC ATC AAC GCC 3
I V R Q P G A P W G L G R I S H R A R G ↑
ATT GTC OCG CAA OCC GGA GCT OCC TGG GGT CTA GGT OGC ATC TOG CAC AGG GCA CGA GGC 21
A T T Y D Y D S S A G A G T C V Y V I D 41
GCG ACC ACG TAT GAC TAC GAC TOG AGC GOC GGC GOG GGT ACA TGC GTA TAT GTC ATT GAC 123
T G V Y D S H P E F E G R A K Q I K T F 61
ACT GGC GTC TAT GAC TCT CAC OCT GAG TTT GAA GGA CGT GCC AAG CAA ATC AAA ACC TTT 183
V S G T T D G H G H G T H C A G T I G S 81
GTC AGT GGC ACT ACA GAT GGT CAC GGC CAC GGC ACA CAC TGC GCC GGA ACT ATT GGC TOC 243
K T Y G V A K K A S I L G V K V L E D S 101
AAG ACT TAC GGC GTA GOG AAG AAG GOG TOC ATT TTG GGC GTC AAG GTG CTC GAA GAC AGT 303
G S G S L S G V I A G M D F V A T D R K 121
GGC TCG GGT TOG CTC AGC GGC GTC ATT GOC GGA ATG GAC TTT GTC GCT ACG GAC OCG AAA 363
S R P C S K G T V A S M S L G G G Y S A 141
TOC CGT OCA TGC AGC AAA GGC ACC GTC GOC AGC ATG TOC CTT GGC GGT GGC TAC TOG GOC 423
T V N Q A A A R L Q A S G V F V A V A A 161
ACC GTG AAC CAG GOC GOC GOG CGT CTG CAG GCT TOG GGC GTT TTT GTC GOC GTC GOC GOC 483
G N D N R D A A Q T S P A S E P S V C T 181
GGC AAC GAC AAT AGG GAT GOC GOC CAG ACC TOG OCC GOC TOG GAG COG TOC GTC TGC ACC 543
V G A T D S S D R R S T F S N F G K A V 201
GTC GGA GCT ACC GAC TOG TCT GAC OGC OGC TOC ACC TTC TOC AAC TTT GGA AAA GCT GTC 603
D I F A P G T G I L S T W N N G G T N T 221
GAC ATT TTC GCA OCT GGC ACT GGC ATT CTG TOG ACC TGG AAT AAT GGC GGC ACT AAT ACC 663
I S G T S M A T P H I A G L G A Y L L A 241
ATC TCG GGC ACT TOG ATG GOC ACT OCC CAC ATT GOC GGT CTC GGT GOC TAC CTT TTG GCT 723
L G K G T A G N L C Q T I Q T L S T K N 261
CTC GGC AAA GGC ACT GOC GGC AAC CTC TGC CAA ACT ATC CAG ACT CTC TOC ACC AAG AAT 783
V L T G V P S G T V N Y L A F N G A T * 280
GTC CTT ACT GGC GTT OCT TCA GGC ACC GTC AAC TAC CTG GCA TTT AAC GGC GOC ACC TAA 843

tattgactagcagagtgtttctcagccagataaaggcggttttgatgcctcttccccggcgtcggccgttccaatg 922
tagctacagaacctcacagacctcgtggttacctgggaatcaggacgggtatcatcttttctttcatcttttgcta 1001
cacattgattttcgaaataagattgctttcagttatactatgactgtgaattagtggaccttgggaaagtactatat 1080
tgtcgccacaactgcgctgtcgtcgttgaggggatcatgcatcatttggttatataccggtggaaataaaggcgtgtt 1159
tactacgagttaaatacaagaatcaatgagttttgttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 1238
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 1260

```

Fig. 39. Nucleotide sequence of the cloned cDNA and the deduced amino acid sequence of Bassiasin I. putative signal-sequence cleavage site, ↓ ; prosequence cleavage site, ↑.

BsnI	MRLSIIAAALPLAIAAPVVEPAPLIEARGQT-----IAGKYIVKDKDTATIGIMDAASK	-46
Bpr1	MRLSIIAAALPLAIAAPVVEPAPLIEARGQT-----IAGKYIVKDKDTATIGIMDAASK	-46
Mpr1	MHLSALLTLLPAVLAAPATIGRRAEPAPLFTPQAESIIADKYIVKFKDDIARIATDDTVS	-48
Prok	MRLSVLLSLLPLALGAPAVEAAPLIEARGEM-----VANKYIVKFKEGSALSALDAAME	-48
	+1	
BsnI	VPNTEH--VYENVLKGF SATLNQEQLDRLRHDPDVESIEQDAIVSINAVRQPGAPWGLG	13
Bpr1	VPNTEH--VYENVLKGF SGTLNQEQLDRLRHDPDVESIEQDAIVSINAVVRQAGAPWGLG	13
Mpr1	ALTSKADFVYEHAFHGFAGSLTKEELKMLREHPGVDFIEKDAVMRISGITEQSGAPWGLG	13
Prok	KISGKPDHVYKNVFSGFAATLDENMVRVLRHPDVEYIEQDAVVTINAAQTNAGAPWGLA	13
	↑	
BsnI	RISHRARGATTYDYDSSAGAGTCVYVIITGVYD SHPEFEGRAKQIKTFVSGT-TDGHGIG	72
Bpr1	RISHRARGATTFDYDSSAGAGTCVYVIITGVDASHPNFDGRAKQIKTFVTGDS-DGHGIG	72
Mpr1	RISHRSKGSTTYRYDSSAGQGTCTVYIITGIEASHPEFEGRATFLKSFISQNTDGHGIG	73
Prok	RISSTSPGTSTYYYDESAGQGSCVYIITGIEASHPEFEGRAQMVKTYYYSSR-DGNIGIG	72
BsnI	THCAGTIGSKTYGVAKKASILGVKVL EDSGSGSLSGVIAGMDFVATDRKSRPCSKGTVAS	132
Bpr1	THCAGTIGSKSYGVAKKASILGVKVL EDSGSGSLSGVIAGMDFVATDRKSRPCRKGTVAS	132
Mpr1	THCAGTIGSKTYGVAKKAKLYGVKVL DNGSGSYSGIISGM DYVAQDSKTRGCPNGAIAS	133
Prok	THCAGTVGSR TYGVAKKTQLFGVKVL DNGSGQYSTIIAGMDFVASDKNNRNC PKGVVAS	132
BsnI	MSLGGGYSATVNQAAARLQASGVFVA VAAGNDRDAAQTSPASEPSVCTVGATDSSDRRS	192
Bpr1	MSLGGGYSVTVNQAAARLKASGVLVA VAAGNENKDAAQISPA SEPSVCTVGATDSSDRRS	192
Mpr1	MSLGGGYSASVNQAAAALVNSGVFLA VAAGNDRDAQNTSPASEPSACTVGASAENDSRS	193
Prok	LSLGGGYSVVNSAAARLQSSGVMVA VAAGNNDARNYSPASEPSVCTVGASDRYDRRS	192
BsnI	TFSNFGKAVDIFAPGTGILSTWNNGGTNTISGTS MATPHIAGLGAYLL-AL-GKGTAGNL	250
Bpr1	SFSNYGRVVDIFAPGTGILSTWIGGGTNTISGTS MATPPELRRDPLDVAL-RFRRPREN	251
Mpr1	SFSNYGRVVDIFAPGSNVLSTWIVGRTNSISGTS MATPHIAGLAAYLS-ALQGKTPAAL	252
Prok	SFSNYGSVLDIFGPGT SILSTWIGGSTRSISGTS MATPHVAGLAAYLMT-L-GKTTAASA	250
BsnI	CQ-TIQTLSTKNVLTGVPSGT VNYLAFNGAT	280
Bpr1	ELSTI--LSRRG	261
Mpr1	CKK-IQDTATKNVLTGVPSGT VNYLAYNGA	281
Prok	CRY-IANTANKGDL SNIPFGTVNLLAYNNYQA	281

Fig. 40. Homology between precursor-Bassiasin I (BsnI) and the cuticle-degrading proteases *B. bassiana* Pr1(Bpr1), *M. anisopliae* Pr1(Mpr1) and Poteinase K(Prok). Arrows indicate cleavage sites for the signal and pro-sequences. Identical amino acids between Bassiasin I and other proteases are indicated by grey boxes. Dark-shaded boxes indicate the active-site residues.

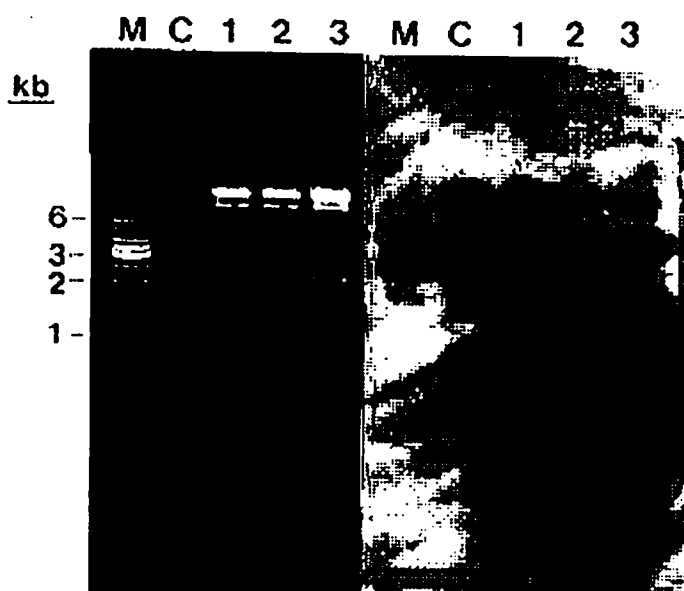


Fig. 41. Southern hybridizaion pattern of *B. bassiana* λ genomic clone. λ DNA was digested with *Eco*RI and *Xho*I. 1.5kb *Eco*RI and *Xho*I fragment and 0.7kb *Xho*I fragment of lane 2 was subcloned. Lane M ; 1kb ladder, lane C ; *Bba* genomic DNA, lane 1-3 ; λ genomic clone.


```

cttcatccagcaagcaaagtcttttggacaacttacttacaaaaatcctcaaatctcatcaccttgtcaaat 72
ATGOGTCTATCAATCATOGCTGCOGCTCTTTOCCCTGGCCATTGCGGCTCCGGTGTGTAGGCTGCTCCTCTCATOGAGGCCOOGCGGGCAG 162
M R L S I I A A A L P L A I A A P V V E P A P L I E A R G Q - 70
ACTATTGCGGCAAGTACATTGTCAAGCTCAAGGACACCGGACCAATTGGTATCATGGATGCTGGTCCAAGGTTCOCCAACACCGAACAC 252
T I A G K Y I V K L K D T A T I G I M D A A S K V P N T E H - 40
GTCTATGAAAATGTCTCAAGGGATCTCGGCCACCOCTTAACCAAGAACAACCTTGACCGTCTCCGCCACGACCOCTGATgtaactgctgt 342
V Y E N V L K G F S A T L N Q E Q L D R L R H D P D _____ - 14
tctoctoggactttttgtgactcttttactaatgaaatogtgtcccaagogaatagGTGAGTCCATGAGCAGGATGCCATTGTTAGC 432
_____ intron 1 _____ V E S I E Q D A I V S - 3
+1
ATCAAGGCCATTGTCCGGCAACCGGAGCTCCCTGGGGTCTAGGTGCACTCTGCGACAGGGCACGAGGCGGCAACCGTATGACTACGAC 522
I N A I V R Q P G A P W G L G R I S H R A R G A T T Y D Y D 28
↑
TOGAGCGCGGCGGGTACATGOGTATATGTCATTGACACTGCGGCTATGACTCTCAOCTTgtaagocacacatacttgoggtgoc 612
S S A G A G T C V Y V I D T G V Y D S H P _____ 49
ccccagagaagocactaataggagcatcaatagGAGTTTGAAGGAGCTGCCAAGCAAATCAAAACCTTTGTGAGTGGCACTACAGATG 702
_____ intron 2 _____ E F E G R A K Q I K T F V S G T T D 67
GTCAAGGCCACGGCACACTGCGCGGAACTATTGGCTCCAAGACTTACGGGTAGCGAAGAAGGGTCCATTTTGGGCGTCAAGGTGC 792
G H G H G T H C A G T I G S K T Y G V A K K A S I L G V K V 97
TCGAAGCAGTGGCTCCGGTTOGCTCAGCGGGTCAATTGCGGAAATGACTTTGTGCTACGGACCGGAAATCCCGTCCATGACGAAAG 882
L E D S G S G S L S G V I A G M D F V A T D R K S R P C S K 127
GCACCGTCCGACGATGTOCCTTGGCGGTGGCTACTCGGCCACCGTGAACAGGCGCGGCGGCTGTCAGGCTTCGGGCGTTTTGTGCG 972
G T V A S M S L G G G Y S A T V N Q A A A R L Q A S G V F V 157
CCGTCCGCGCGGCAACGACAATAGGGATGCGGCCAGACCTGCGCGGCTCGGAGCGTCCGCTGCGACCGTCCGAGTACCGACTCGT 1062
A V A A G N D N R D A A Q T S P A S E P S V C T V G A T D S 187
CTGACCGCGCTCCACCTTCTCCAACCTTGGAAAAGCTGTGCAATTTTOSCACTGGCACTGGCACTCTGTCGACCTGGAATAATGGCG 1152
S D R R S T F S N F G K A V D I F A P G T G I L S T W N N G 217
GCACTgtgagtttctgtttttgcatcagcoggttcaataaaaactcagagcttactttttttgcatccttagAATACCATCTCGGGCAC 1242
G T _____ intron 3 _____ N T I S G T 223
TTGATGGCCACTOCCCAATGTGCGGCTCTGGTGOCTACCTTTTGGCTCTCGGCAAGGCACTGCCGGCAACCTCTGCAAACTATCCA 1332
S M A T P H I A G L G A Y L L A L G K G T A G N L C Q T I Q 253
GACTCTCCACCAAGAATGTCTTACTGGGCTTCTTCAAGCACCGTCAACTACCTGGCAITTAACGGCGCACTAAatttgactagc 1422
T L S T K N V L T G V P S G T V N Y L A F N G A T * 278
agagtgtttctcagocagatataagggtgggtttttgatgocctcttccocggcgtggocgttccaatgtagctacagaaocctcacagacc 1512
togtggttacctgggaaatcaggacgggtatcatctttttgcttcatcttttctacacattgattttcgaaataagattgctttcagt 1602
tatactatgactgtgaattagtgagaccttgggaaagtgaactatattgtgocacaactgogctgtcgtcgttgaggggatcatgcattc 1692
atttggttatatacoggtggaataaaggcgtgtttactacgagttaaatacaagaatcaatgagtttttgtt 1765

```

Fig. 42. Nucleotide sequence of the gene encoding-Bassiasin I and its deduced amino acid sequence. The Bassiasin I cDNA was cloned from the cDNA library by hybridization with ³²P-radiolabeled oligonucleotide probes on the basis of N-terminal amino acid sequence. With the cDNA clone as probe DNA, the genomic DNA was cloned from the genomic library. Nucleotide sequences were determined by the dideoxy chain termination method using an automated DNA sequencer. The nt sequence of the protein-coding region are given in capital letters. The putative signal sequence and the prosequence cleavage site are indicated by a downward arrow and an upward arrow, respectively. A possible polyadenylation signal in the 3'-noncoding region is underlined.

Primer pr1-N(25mer) : 5'-ATACAGAATTCACTGAGCAGAGCGG-3'

Primer pr1-C(21mer) : 5'-GGGAGTAGCCATGGAGGTACC-3'

Fig. 43. Sequence of the PCR primers.

mature form의 N-말단 DNA 염기서열과 일치하며 pr1-C는 C-말단에 위치하는 효소의 활성 부위의 DNA 염기서열에 상보적인 서열이다. 이 두 PCR primers를 이용하여 94℃ 1분, 56℃ 1분, 72℃ 1분의 순서로 30 cycles 수행하였다. 이 결과 약 750bp의 PCR product가 생성됨을 확인하였다. 참고로 5'-말단 및 3'-말단의 noncoding region을 바탕으로 합성한 primers로는 PCR product가 생성되지 않았기 때문에 새로 coding region에서 primers를 합성하였다. 약 750bp의 PCR product를 plasmid pUC18에 blunt-end ligation 후 *E. coli* JM107 균주에 transformation하여 cloning하였다. 이 PCR product clone을 부분 DNA 염기서열을 결정하여 보고된 pr1 cDNA sequence와 비교하였다. 그 결과 5'-말단으로부터 148bp(49 aa)는 정확히 일치하였고 그 이후 염기서열은 intron 서열로 판단되었으나 3'-말단은 58bp, 53bp, 29bp가 일치하였으나 intron 부분이 아닌 18bp, 38bp가 일치하지 않았다. 따라서 이 PCR product는 isozyme의 유전자이거나 pseudogene일 가능성이 있다. 이러한 문제로 PCR product를 전체 Pr1 protease의 genomic DNA 유전자를 얻기 위한 probe DNA로 이용할 수 없었다. 따라서 cDNA fragment를 probe DNA로 이용하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR은 total RNA 또는 mRNA로부터 reverse transcriptase로 1st strand를 합성하고 이를 바로 PCR의 template로 이용하는 기법이다. 본 실험에서는 total RNA를 이용하였으며 total RNA는 protease 생산배지에서 1일간 배양한 mycelia로부터 분리하였다. Reverse transcriptase에 의한 반응은 PCR에 사용한 primer pr1-C를 이용하여 42℃에서 1시간 수행하고 전체 20 μ l 반응액중 3 μ l를 PCR 반응액에 첨가하여 primer pr1-N 및 pr1-C를 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. 이 결과 예상한 크기인 약 700bp의 단일 cDNA fragment를 확인하였다.

그러나 이 단편 역시 대장균에 cloning하여 염기서열을 확인한 결과 염기서열의 일

부가 다른 iosenzyme이거나 pseudogene처럼 보였다. 따라서 alkaline serine계 protease의 활성부위 염기서열을 바탕으로 새로 primer [PR1-His(F)와 PR1-Ser(R)]를 제조하였으며, 이를 이용하여 약 500bp의 PCR product를 획득하였다. 각각의 primer의 염기 서열은 아래 Fig. 44과 같다.

위에서 작성한 primer를 이용하여 *M. anisopliae* genomic DNA로부터 PCR로 증폭한 약 500bp의 serine계 protease의 histidine과 serine 활성부위 사이의 유전자 단편을 [α - 32 P]dATP로 random priming 방법으로 표식한 후 이를 probe로 이용하여 plaque hybridization을 수행하였다(Fig. 45). 그 결과 2개의 positive clone을 얻었고 이를 여러 제한효소로 절단한 결과 동일한 clone으로 확인되었으며 λ Manpro라 명명하였다. λ Manpro로부터 protease 유전자를 포함하는 약 2.2kb의 *Bam* HI 단편과 약 3.5kb의 *Bam* HI/*Hind* III 단편을 cloning한 후 이를 여러 가지 제한효소를 이용하여 제한효소 지도를 작성하고(Fig. 46) DNA 염기서열을 결정할 수 있도록 subcloning을 수행하였다. 이 gene의 DNA 염기서열 분석결과 및 추정된 protein coding region은 Fig. 47에 나타내었다.

또한 cDNA를 cloning 하기 위하여 이상에서 결정된 Pr1 genomic DNA 염기서열로부터 5'-영역의 primer와 3'-영역의 primer를 각각 합성하였다. 이들 primer의 DNA 서열은 Fig. 48과 같다. 이 두 primer를 이용하여 *M. anisopliae*의 mycelium으로부터 추출한 mRNA를 RT-PCR을 통해 약 1.5kb의 cDNA를 cloning 하였으며, 이로부터 DNA 염기서열을 결정한 결과 Fig. 47의 exon 부위와 정확히 일치하였다.

제 8절. 원형질체(protoplast) 제조 및 형질전환

Cloning된 유전자를 살충성 사상균 *M. anisopliae* 균주에 안정적으로 도입, 발현시키기 위하여 benomyl 약제 저항성을 갖는 *Aspergillus flavus* 유래의 β -tubulin 유전자를 갖는 pBRG-4 plasmid를 이용하여 이 균주에 대한 형질전환계를 확립하였다. 실험방법은 *M. anisopliae*의 conidia($\times 10^8$)를 YPD(Yeast Extract 20g, Bacto peptone 1g, Dextrose 20g/L) 배지 100ml (250ml conical flask)에 접종하여 28°C에서 48시간 배양 후 균사체를 멸균한 Mira cloth(Calbiochem)로 여과하여 수확한 다음 0.6M KCl로 두 번 세척하였다. 세척된 균사체를 8mg/ml Novozyme 234(Novo Biolabs)를 포함하는 35ml의 0.6M KCl속에 현탁하여

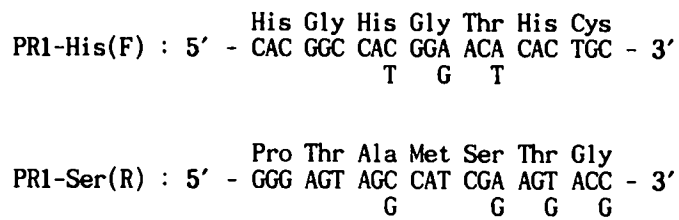


Fig. 44. The sequence of PCR primers on the basis of active sites of alkaline serine proteases.

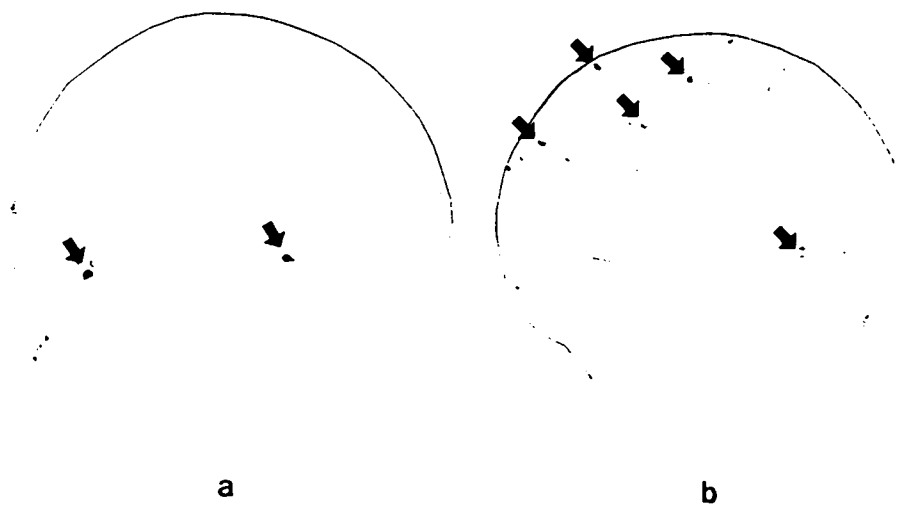


Fig. 45. Plaque hybridization with *M. anisopliae* genomic DNA library in λ DASHII.
 (a) 1st screening (b) 2nd screening

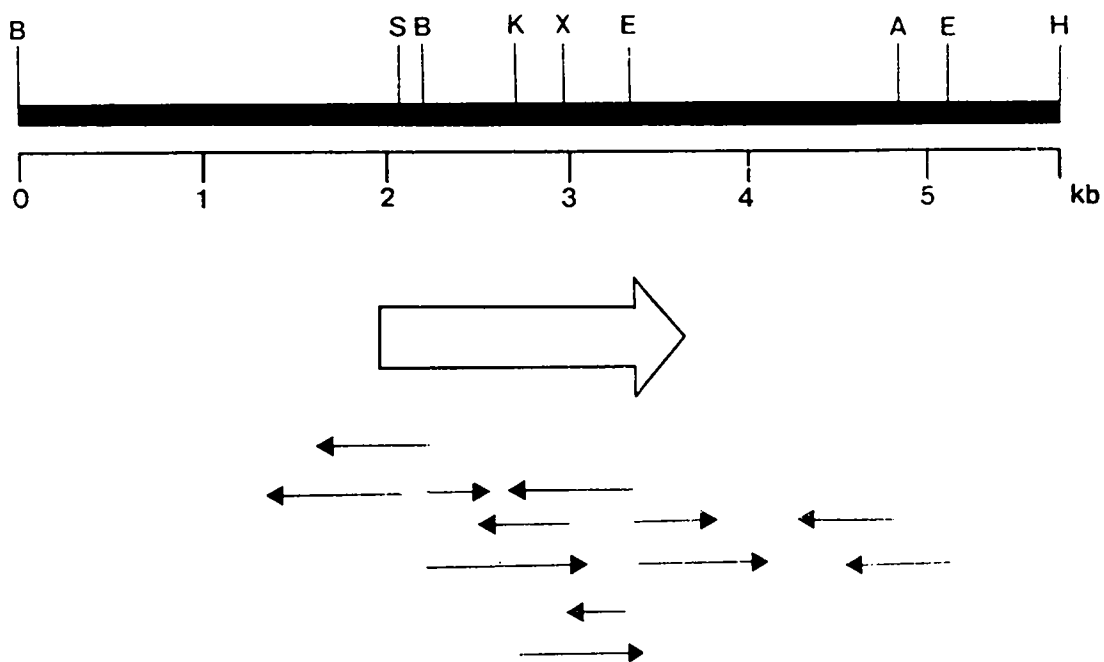


Fig. 46. Restriction endonuclease map and sequencing strategy for the genomic DNA encoding alkaline serine protease of *M. anisopliae*. Arrows indicate the length and direction of sequencing. A, *Apal* ; B, *BamHI* ; E, *EcoRI* ; H, *HindIII* ; S, *SalI* ; X, *XbaI*.

tcacgcagcctttgcaacctgttttgcttcgctcgcaggtagaaccaac 50

gctcggcggtttgagcagcttgcocgattctcgctcctaccaagacaatcagcatcacttcaccagcttctcagcaaccatactcatc 140

ATGCACACTCTCGTTTGOOGGGTGGCACTCTCOGTGGTGGGTGGCTCAGGCGGGATTAGCACTGAGAACATCCACAGGGAATCAGCT 230
M H T L V A A V A L S V V G V A Q A G F S T E T I H R E S A 30

CCGATTCTCACCCATGTGGAAGCTGAAGTGGTTCCTGACTCTACATCATCAAGTTCAAGGACCAAGTCAAGGAAGCGGGTCAACGAC 320
P I L T H V D A E V V P D S Y I I K F K D H V N E A A V N D 60

CAOCATAGCTGGATTCAAAGCATCCACAAGGATGGCGAGGAGCAGCGTTTGGAACTTCGCAAGCGAAGTCTGGGATCTCACAGTGGAG 410
H H S W I Q S I H K D G E E Q R L E L R K R S L G S S P V E 90

GCTTTGCGCGCTTGAAGCACAGTACAACATTGOCACCGCTTCAAGGGCTATTCGGTCACTTCCATGAGTGGTTCATGAGAAGGTC 500
A F A G L K H T Y N I A N G F K G Y S G H F H E S V I E K V 120

CGAAATCATGGCGACgtaagctctggcatocatttccatgagcagagactccatgatgcacatgacgcttctcggccatccaatcattgc 590
R N H G D ----- intron ----- 125

tgatctaaccctgctgaatagGTGAGTTCATTGAGAAGGATACCATTTGCTGCATTCTGGGCGCTGTGCGCCCGAAGAGTCTGTGCAG 680
----- V E F I E K D T I A R I L R P V A P D E S V Q 148

GAGGACTGCACTCCCGAGAACGAGAAGCAGGCCCCGTGGGGCCTTCTCGTGTCTCCCATGCAAGGGTCTTTCCCTTGGCACTACAAC 770
E D C T P E T E K Q A P W G L A R V S H R K G L S F G T Y N 178

AAGTACTTGTATGCTGCGAAGCGGGCGAGGGCGTTGATGCTTACGTTATTGATAACGGTACCAACACCGATCATGTGGACTTTGAAGGT 860
K Y L Y A A D G G E G V D A Y V I D T G T N T D H V D F E G 208

CGTGCCAAATGGGGTAAGAACATTCOCGCTGGAGATGCGGATGAGGATGGCAACGGCCACGGTACTCACTGCTCTGGAACCATTTGCGGC 950
R A K W G K T I P A G D A D E D G N G H G T H C S G T I A G 238

AAGATGTACGGTGTGCCAAGAAGGCAAAAGTCTATGCGGTCAAGGTTCTCCGCTCCAATGGCTCTGGCACCATGGGCGATGTGTCAG 1040
K M Y G V A K K A N V Y A V K V L R S N G S G T M A D V V K 268

GGTGTGAGTTGCTGOCACCAAGOCATGTTGAACAGGCTTTGGTGGCAAGAGCGGTAAGGAAAGGGATTCAAGGGTTCCGTTGOCAC 1130
G V E F A A T S H V E Q V L R A K D G K R K G F K G S V A N 298

ATGTCOCTGGTGGTGGTAAGACACAGGCTCTAGACGCTGCAGTGAATGCTGCGGTCAAGGCTGGTATTCACTTTGCGGTGGTGGGGT 1220
M S L G G G K T Q A L D A A V N A A V K A G I H F A V A A G 328

AAGGATAAGCGGATGCGTGTAACTATTCOCCGTGGGCGGCTGAGCTTCOCCGCTCACTGTGGTGGCTCTGCTTTGATGACAGCGGTGCC 1310
N D N A D A C N Y S P A A A E L P V T V G A S A F D D S R A 358

TACTTCTCCAATATGGCAAGTGCAGTACATCTTTGOCCTGGTCTCAACATCTGTCACCTGGATTGGCTCCCGACTGCTGTCAAC 1400
Y F S N Y G K C T D I F A P G L N I L S T W I G S P T A V N 388

ACCATCTGGGCACTCCATGGCCTCTCCACATCTGGGCGCTCTGGCTACTATCTCTCTCCAGCGGCTGGTGACTCTGAATTC 1490
T I S G T S M A S P H I C G L L A Y Y L S L Q P A G D S E F 418

TCTGTGCGCTCAGTCAACCCATAGCAGCTCAAGGATCTCTCATTGAGATCTCCACTCAGGGTGTCTGACTGACATTCOCCATGACACC 1580
S V A S V T P K Q L K D T L I E I S T Q G V L T D I P N D T 448

CCCAACAAGCTGGCCTGGAATGGTGGGGTTGCAGCACTACTOCAAGATTGTTGCTGCGGGTGGCTATATTGGCAAGCCCAAGACTTCT 1670
P N K L A W N G G G C S N Y S K I V A A G G Y I G K P K T S 478

GAGCCGAAGCGGTTGGGAACGCTGTCCAGGAAGAGATGAAGGTTCTTTCCAACAAGGTCTCACAGGGGTCAAGGACTTGGGGACAAA 1760
 E P K P V G N A V Q E E M K V L S N K V S Q G V K D L G D K 508

ACGGAGAAGTTTGTGCGAAAAGATCCAGCGTGGTGGATAAGGAGATTGAGCACTTCATCTCCGAGATCTCCATGTAAgagctagacttc 1850
 T E K F V E K I H D V V D K E I E H F I S E I S M * 533

cactttgactgggttttattattattatttggcagggattacacatgatatgcagcatagggatcgggtttggccttattttgggtaacgc 1940

gatgtgtattgaggcctaagtgttggatgacattatttcattgggtctggcctttatggttccaatctggataacaatcgtcagaaggc 2029

Fig. 47. Nucleotide sequence of the gene encoding alkaline serine protease of *M. anisopliae* and its deduced amino acid sequence. About 10000 plaques from the genomic library inserted into λ DASHII were screened by hybridization with 32 P-radiolabeled probes containing the *M. anisopliae* protease gene fragment(500bp). This DNA fragment was amplified by PCR with the mixed primers on the basis of the sequences of the active sites of an alkaline serine protease. Two positive clones were selected and Southern-blot analysis of these clones showed a common restriction map. The *M. anisopliae* protease appeared to be located in a 2.2kb *Bam*HI fragment and a 3.5kb *Bam*HI/*Hind*III fragment, which were subcloned into pBluescript SK-. The cDNA gene was cloned by the RT-PCR with the primers designed with the sequences of the translation initiation site and the termination site. Analysis of the nucleotide sequences of genomic DNA and cDNA revealed that the gene contained the only one intron by the size 96nt. The nt sequence of the protein-coding region are given in capital letters.

Manpro-FN : 5'-TCATGCACACTCTCGTTGCC-3'

Manpro-FC : 5'-TTATAAGCTT**GATCATT**ACATGGAGATCTC-3'
*Fba*I

Figure 48. PCR primers of *M. anisopliae* protease gene. Bold letters are the translation initiation codon(ATG) and stop codon.

28℃에서 4~6시간 반응한 후 현미경을 통하여 원형질체가 제조되었는지를 확인하였다(Fig. 49). 균사체 현탁액으로부터 원형질체를 분리하기 위해 멸균된 Mira cloth를 4겹으로 하여 여과하고, 여액을 3,000×g로 5분 동안 원심 분리하여 0.6M KCl, 10mM CaCl₂와 10mM Tris-HCl(pH 7.5) 용액 속에 1×10⁸/ml 농도로 현탁하였다. 그리고 pBRG-4 plasmid DNA[50μg/50μl TE buff(pH 8.0)]와 50μl의 25% polyethylene glycol 8000, 50mM CaCl₂와 10mM Tris-HCl (pH7.5)(PTC)를 균사체 현탁액 200μl속에 혼합하여, 15분 동안 얼음 속에서 방치하였다. 이 원형질체는 2.5ml의 PTC를 첨가하여 상온에서 30 분간 방치한 후 원심분리 한 후 500μl의 0.6M KCl에 현탁하여 100μl씩 나는 다음 5~10ml의 용해된 선발 한천배지(선발배지+0.9% Agar, 0.6M KCl)에 섞어 petri dish에 부어 굳힌 다음 28℃에서 4~5일 동안 배양하였다. 그 결과 5개의 transformants를 획득하였으며, 이 transformants의 chromosomal DNA를 추출하여 β-tubulin 유전자를 probe로 사용하여 Southern analysis로 재확인한 결과 Fig. 50에서 보여주는 바와 같이 positive band가 확인되었다. 따라서 pBGR-4 plasmid는 *M. anisopliae*의 protoplast로 도입되어 host 내에서 안정적으로 발현될 수 있음이 확인되었다.

또한 electroporation을 이용하여 곰팡이 형질전환을 수행하였다. 제조된 원형질체를 1.2M sorbitol 용액으로 2회 세척한 다음 1.2M sorbitol과 1% PEG 용액속에 현탁하여 1.0 ml cuvette(Bio-Rad: inter-electrode distance of 0.2cm)속에 400μl를 넣고, 1.5kV/cm field strength와 25μF capacitance, 800Ω interal resistant의 조건으로 형질전환한 후 원형질체를 재생 배양액(YPD와 1.2 M sorbitol) 1ml속에 현탁하여 28℃에서 2시간 배양하여 선발한천 배지로 옮겼다.

제 9절. *M. anisopliae* chitinase 유전자의 발현

이 유전자를 사상균과 대장균내에서 효율적으로 발현하기 위하여 먼저 다양한 expression vectors를 구축하였다. 이때 사용한 vectors는 Fig. 51과 같으며 사상균 발현 vector로서는 *Aspergillus nidulans* 유래의 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A(*gdp A*) 유전자 promoter를 갖는 pAN8-1 및 *A. nidulans* 유래의 *trpC* promoter 와 terminator를 갖는 pBF101을, 대장균 발현 vector로서는 pET-32a(+) 및 pET-3a 등의 vector를 이용하였다.

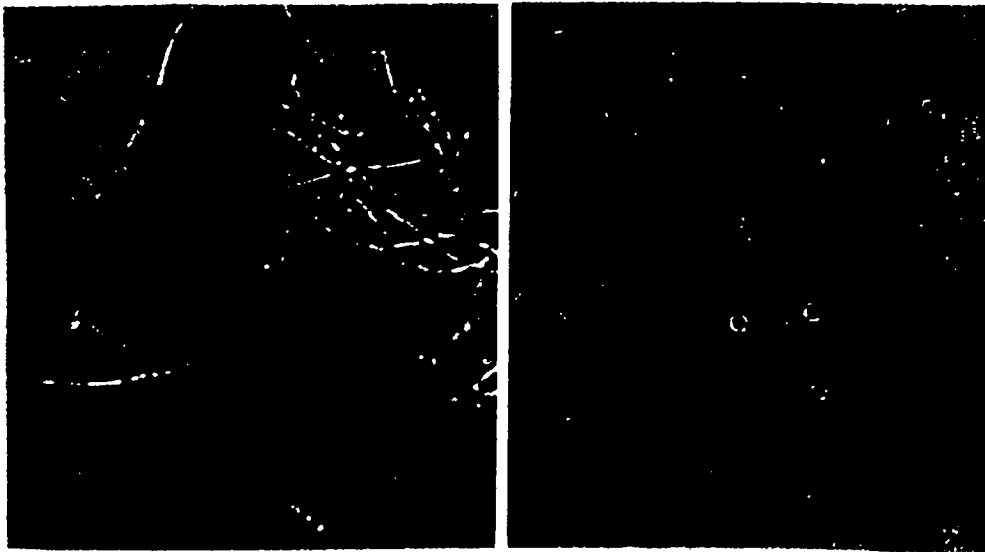


Fig. 49. Preparation of protoplast ($\times 400$). Left; before enzyme treatment, right; after enzyme treatment.

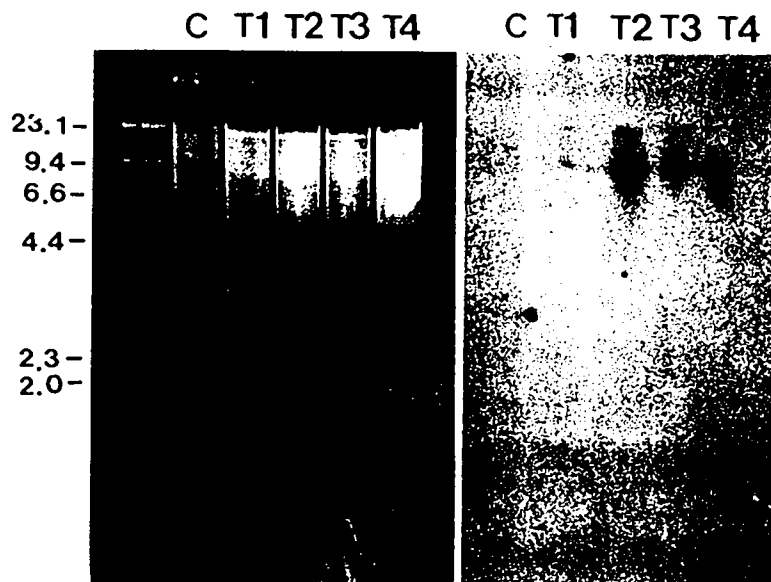


Fig. 50. Southern blot analysis of genomic DNA isolated from transformants. DNA samples were digested with *EcoR* I (C, control; T1, T2, T3 and T4, transformants) and hybridized with *Kpn* I-*Hind* III fragment of pBRG-4, a vector containing β -tubulin gene of *A. flavus*.

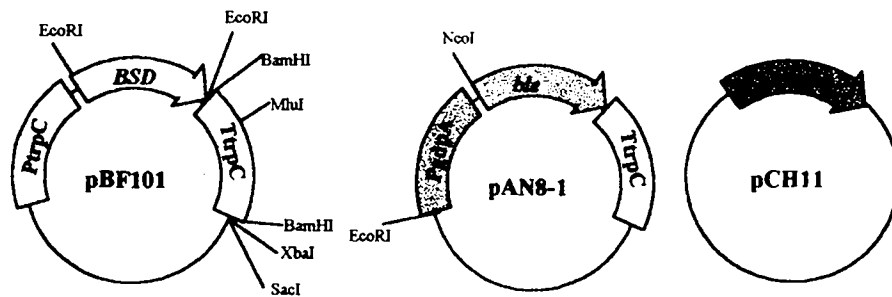


Fig. 51. Vectors used in this experiment for the gene expression of *M. anisopliae* chitinase gene.

1. *E. coli* 내에서의 발현

Chitinase 유전자의 대장균 발현을 위한 vector 제작: Chitinase 합성의 개시 코돈부터 종결 코돈까지 유전자를 증폭하기 위하여 CH1, CH2, CH3 primer를 제조(Fig. 52)하여 PCR 법으로 증폭하였다.

이상에서 증폭된 chitinase 유전자를 blunting한 다음 각각 pUC119의 *Sma* I 자리에 연결하였다(pDG31, pDG32). pDG 32에 *Bam*H I와 *Nde* I, *Bam*H I을 처리한 chitinase 단편 각각을 PET-32a(+) *Bam*H I 자리와 pET-3a *Nde* I, *Bam*H I 자리에 연결하였다(pDG33, pDG34). 이상의 전체적인 expression vector 구축과정은 Fig. 53에 요약하였다.

이상에서 제조한 pDG32와 pDG33을 *E. coli* BL21(DE3)pLysS에 형질전환하였다. 형질 전환된 대장균을 IPTG로 유도한후 초음파 분쇄기로 대장균 추출물을 얻은 다음, 0.01% glycol chitin을 포함하는 10% polyacrylamide gel에 전개한 후 Calcofluor white로 염색하여 chitinase 활성을 검정하였다(Fig. 54).

2. 사상균 내에서의 발현

가. *TrpC* promoter를 이용한 사상균 발현 vector 제작

Blasticidin S 저항성 유전자(*BSD*)를 포함하는 vector pBF101로부터 *Eco*R I을 처리하여 *BSD* 유전자를 제거하였다(pDG11). pDG11에 *Bam*H I을 처리하여 *TtrpC*를 제거한 후 다시 연결하였다(pDG12). 위에서 잘라낸 *TtrpC*를 blunting한 다음, pUC119 *Sma* I 자리에 연결하여 방향을 결정하였다(pDG13). pDG13을 *Xba* I, *Sac* I을 처리하여 *TtrpC*를 절단한 다음 pDG12의 *Xba* I, *Sac* I 자리에 연결하였다(pDG14). 이상의 전체적인 expression vector 구축과정은 Fig. 55에 요약하였다.

최종적으로 *trpC* promoter를 이용한 chitinase 발현 vector를 제작하기 위하여 pDG31로부터 *Bam*HI으로 chitinase 유전자를 절단한 다음 pDG14의 *Bam*HI 자리에 연결한후 방향을 결정하였다.

CH 1 : 5'-GGA TCC CAT ATG TTA TTT CAA TGG-3'
 BamH I Nde I

CH 2 : 5'-GGA TCC CAT ATG AAC ATG ATT ACG CAA A-3'
 BamH I Nde I

CH 3 : 5'-GGA TCC GTG ATA CCA TTA CAA AG-3'
 BamH I

Fig. 52. PCR primers for the amplification of a cDNA encoding *M. anisopliae* chitinase

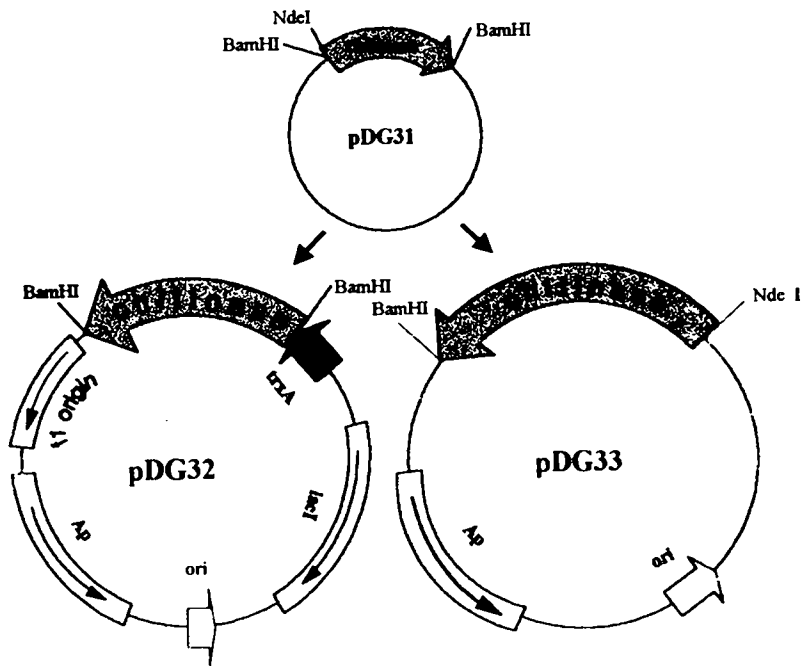


Fig. 53. Construction of pDG32 and pDG33 for *E. coli* expression.

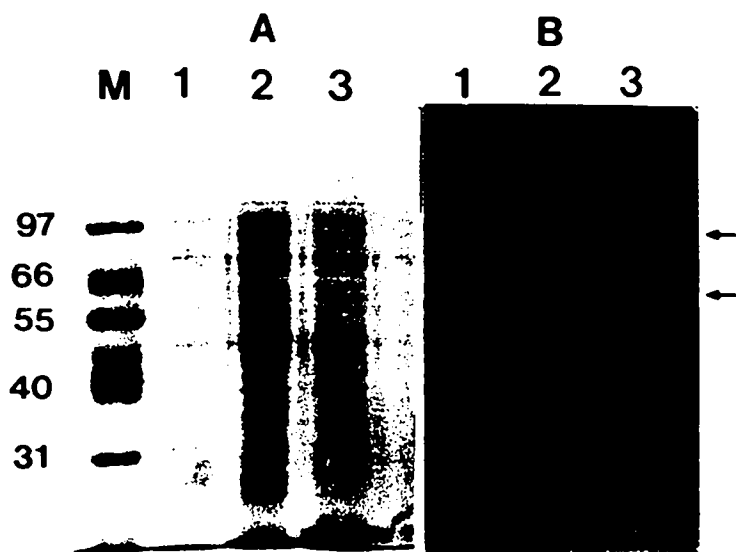


Fig. 54. Chitinase activity after electrophoresis in a 10%(w/v) polyacrylamide gel. Lane 1, 2 and 3 were extracted from *E. coli* BL21 containing pET32a(+), pET32 and pET33, respectively. A, stained with Coomassie blue R-250; B, stained with Calcofluor white. Band with lytic activity appeared as dark zones on UV-illuminator.

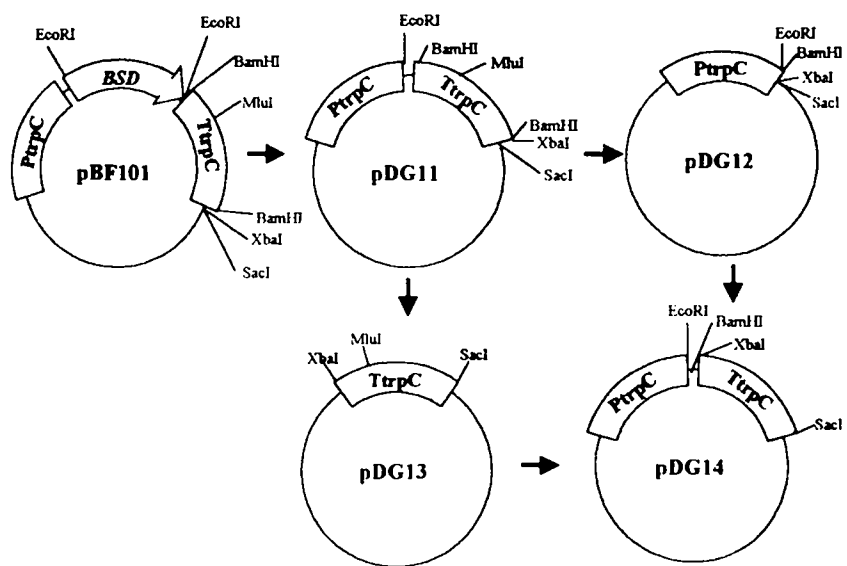


Fig. 55. Construction of fungal expression vector using *trpC* promoter.

나. *GdpA* promoter를 이용한 사상균 발현 vector 제작

pAN8-1의 *gdpA* promoter 3'말단에 단백질 개시코돈인 ATG를 제외하고 *EcoR* I 자리를 만들기 위하여 G1, G2 oligonucleotide를 제작(Fig. 56)한 다음, PCR 법으로 증폭하였으며 그 결과는 Fig. 57과 같다.

위에서 증폭한 약 2.3kb DNA 단편을 blunting한 다음 pUC119의 *Sma* I 자리에 연결하였다(pDG21). pDG21에서 *Hind* III, *EcoR* I을 처리하여 *pgdpA*를 절단한 다음, pBluescriptSK(+) *Hind* III, *EcoR* I 자리에 연결하였다(pDG22). pDG13에 *Xba* I, *Sac* I을 처리하여 *TtrpC*를 절단한 다음 pDG22의 *Xba* I, *Sac* I 자리에 연결하였다(pDG23). 이상의 전체적인 expression vector 구축과정은 Fig. 58에 요약하였다.

최종적으로 *gdpA* promoter를 이용한 chitinase 발현 vector를 제작하기 위하여 pDG31로부터 *Bam*HI으로 chitinase유전자를 절단한 다음 pDG22의 *Bam*HI 자리에 연결한 후 방향을 결정하였다.

이상에서 제조한 chitinase 유전자의 발현 vector들을 사상균 내에서 형질전환하기 위하여 benomyl 저항성 유전자를 포함하는 pBRG-4와 chitinase 발현을 위한 vector pDG19 혹은 pDG25를 3:1 비율로 섞은 다음 PEG법과 전기충격장치로 cotransformation 하였다(Fig. 59).

그 결과 PEG법으로 형질전환하였을 때는 1-2(transformants per μ gDNA)의 형질전환 효율을 나타내었고, electroporation으로 형질전환 하였을 때는 7-13의 효율을 나타내었다. 따라서 PEG법으로 형질전환하였을 때 보다 electroporation을 이용했을 때 약 7배 더 많은 형질전환체를 얻었다.

이상에서 얻은 형질전환체의 chitinase 활성 측정을 위해 야생형의 *M. anisopliae*와 각 형질전환체들의 conidia를 0.5% yeast extract와 1% glucose를 포함하는 배지에서 48 시간 배양한 후 chitinase 활성을 조사한 결과 *trpC* promoter를 이용한 chitinase의 형질전환체들은 야생형과 비슷하였고 *gdpA* promoter를 이용한 chitinase 형질전환체의 23.5%가 야생형보다 2-3배의 높은 활성을 나타내었다(Table 7).

제 10절. Protease 유전자의 발현

G 1 : 5'-AAG CTT CTT GTA TCT CTA CAC ACA-3'
Hind III

G 2 : 5'-GAA TTC GGT GAT GTC TGC TCA AGC-3'
EcoR I

Fig. 56. PCR primers for the amplification of *gpdA* promoter.

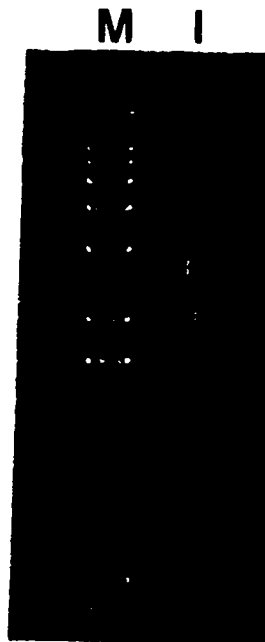


Fig. 57. Amplified *gpdA* promoter from pAN8-1 using G1, G2 primer(lane 1)

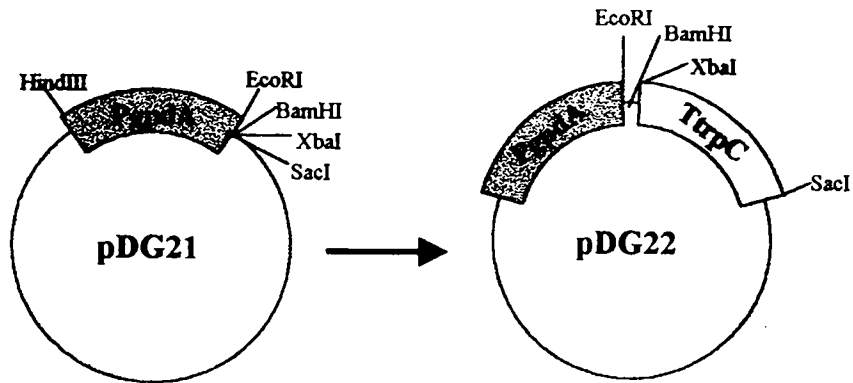


Fig. 58. Construction of fungal expression vector using *gdpA* promoter.

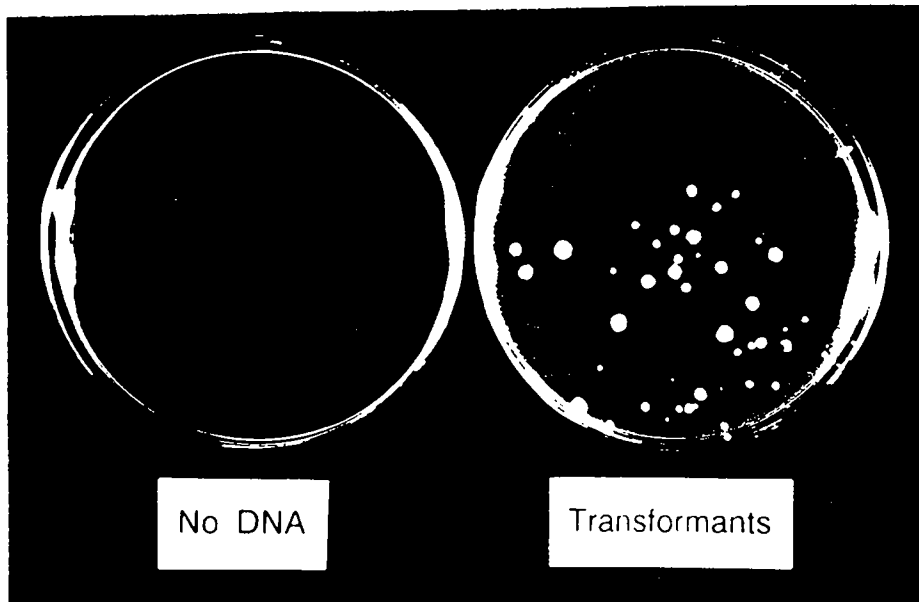


Fig. 59. Selection of benomyl-resistant transformants.

Table 7. Comparison of chitinase activity of wild type and transformants

Promoter	Strains	Chitinase activity (mU/ml)
	wild type	0.25
gpdA promoter	A1	0.34
	A2	0.29
	A3	0.27
	A4	0.59
	A5	0.48
	A6	0.68
	A7	0.38
	A8	0.45
	A9	0.24
	A10	0.28
trpC promoter	C1	0.27
	C2	0.19
	C3	0.32
	C4	0.34
	C5	0.23

1. *E. coli* 내에서의 Bassiasin I 유전자의 발현

Bassiasin I cDNA의 *E. coli* 내에서의 발현양상을 검토하기 위하여 precursor-Bassiasin I cDNA 유전자를 Fig. 60의 primer를 이용하여 PCR로 증폭하고 제한 효소 *Eco* RI과 *Hind* III로 절단한 후 이를 *lacI*^q 유전자를 포함하며 *tac* promoter를 갖는 plasmid pKSP의 동일 위치에 ligation하여 발현벡터 pBSN을 구축하였고 이의 모식도는 Fig. 61에 나타내었다. 이 pBSN을 *E. coli* DH5α에 transformation 하여 100μg/ml의 ampicillin과 1mM의 IPTG를 포함하는 LB-skim milk agar plate 상에서 protease 활성을 조사하였다. 그 결과 skim milk protein을 분해하여 형성된 투명대가 관찰되었으며 이를 Bassiasin I 유전자를 포함하지 않은 pKSP만 형질전환된 *E. coli* DH5α와 비교하여 Fig. 62에 나타내었다. 참고로 IPTG를 함유하지 않은 배지에서도 IPTG를 함유한 배지에서와 비슷하게 protease 활성을 보였다. 액체 배양에서의 발현 정도를 조사하기 위하여 1.5% bactotryptone / 1% glucose / 0.5% NaCl 배지에서 O.D 600에서 1.0까지 배양한 균체를 LB 배지로 옮겨 배양하여 total cell, periplasmic space, membrane, cytoplasm 및 배양액 fraction의 protease 활성을 casein을 기질로 조사한 결과 배양액에서는 protease 활성이 없었고 각각의 cell 분획에서도 Bassiasin I 유전자를 포함하지 아니한 cell과 비교 시 큰 차이는 보이지 않았으나 전체 total cell lysate에서는 약 2배 높은 protease 활성을 보였다. 따라서 Bassiasin I의 *E. coli* 내에서 발현되는 것은 확인하였으나 어떤 형태로 processing되어 어느 부분에 위치하는지는 더 조사해야 한다.

2. 사상균 내에서의 Bassiasin I 유전자의 발현

사상균 내에서의 발현을 위해 fungi 벡터로서 pAN7-1 및 pAN 8-1을 사용하였다. 이 벡터는 *A. nidulans* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase의 promoter(*Pgpd*)를 포함하고 있다. Bassiasin I cDNA는 Fig. 63의 primer를 이용하여 PCR로 증폭한 후 제한효소 *Nco* I과 *Bam* HI으로 절단하여 pAN7-1의 약 3.4kb의 *Eco* RI/*Bam* HI 단편, pAN8-1의 약 2.3kb의 *Nco* I/*Eco* RI 단편을 동시에 ligation하여 pANBSN를 구축하였다(Fig. 64). 이를 다시 제한효소 *Nco*I으로 절단하고 mung bean nuclease를 처리하여 벡터 자체에 포함된

BSN-N : 5'-AGACGAATTCATGCGTCTATCAATCATCGCTG-3'
EcoRI

BSN-C : 5'-TGCTAAGCTTAGGTGGCGCCGTTAAATGC-3'
HindIII

Fig. 60. PCR primers for expression of a cDNA encoding Bassiasin I in *E. coli*. Bold letters are the translation initiation codon(ATG) and stop codon.

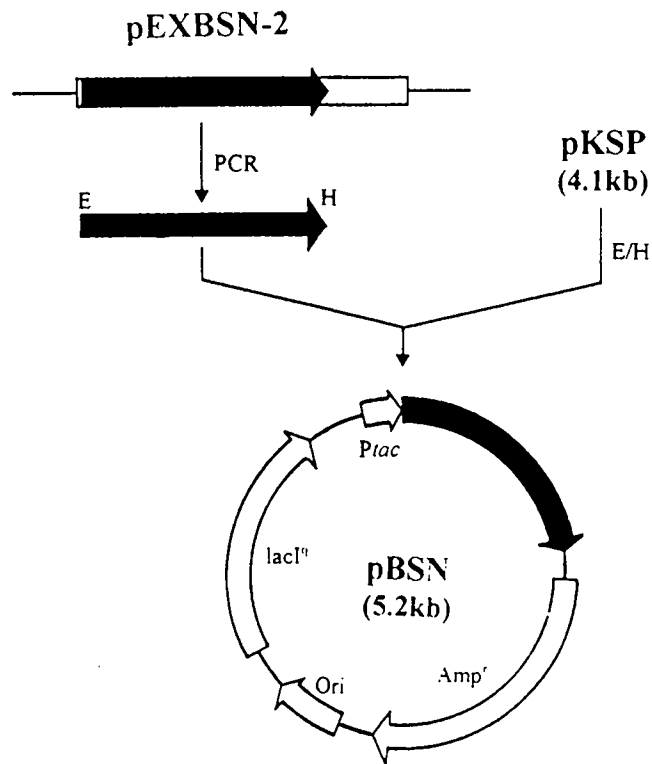


Fig. 61. Construction of expression vector for *E. coli* system. E, *EcoRI* ; H, *HindIII*

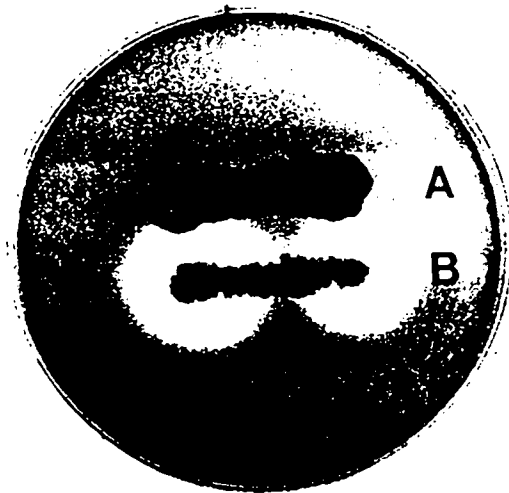


Fig. 62. Expression of a cDNA encoding Bassiasin I in *E. coli* DH5 α on the LB-skim milk agar plate. (A) *E. coli* DH5 α harboring plasmid pKSP (B) *E. coli* DH5 α harboring plasmid pBSN containing the cDNA encoding Bassiasin I.

BSN-FN : 5'-GGGGCCATGGATGCGTCTATCAATCATCGCTG-3'
*Nco*I

BSN-FC : 5'-ATTAGGATCCTGCTAGTCAATATTAGGTG-3'
*Bam*HI

Fig. 63. PCR primers for expression of a cDNA encoding Bassiasin I in *M. anisopliae*. Bold letters are the translation initiation codon(ATG) and stop codon.

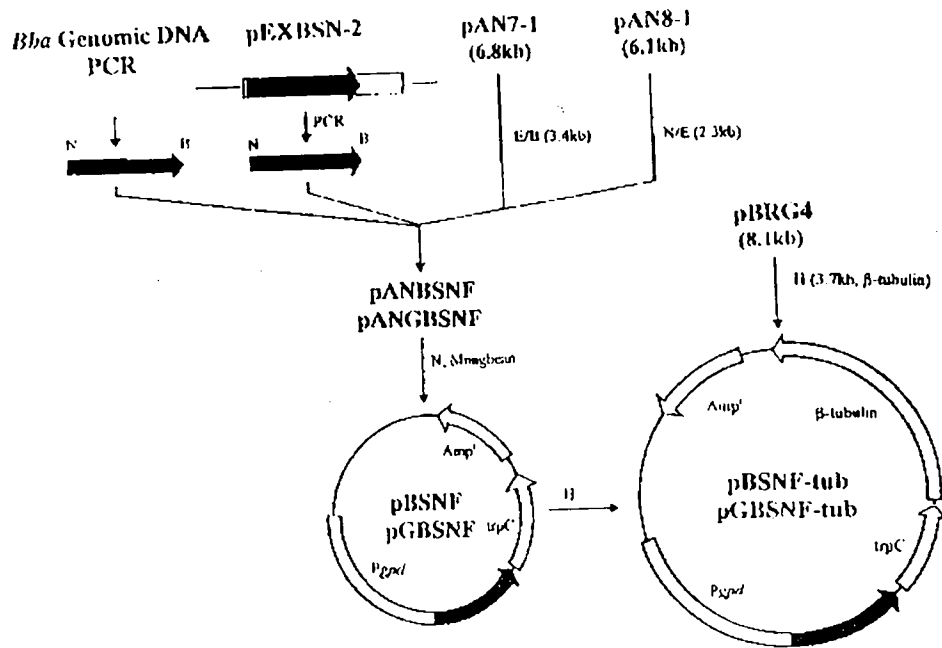


Fig. 64. Construction of Bassiasin I gene expression vector for fungi system. B, *Bam*HI ; E, *Eco*RI ; H, *Hind*III, N, *Nco*I.

Pgpd 다음의 ATG codon을 제거하여 발현벡터 pBSNF를 구축하였다(Fig. 64). 또한 선발 marker로 이용할 benomyl 내성 유전자인 β -tubulin 유전자를 pBRG-4 plasmid로부터 분리하여 발현벡터 pBSNF와 하나의 벡터 (pBSNFtub)로 구축하여 형질전환에 이용하였다. 또한 genomic 유전자도 같은 방법으로 하여 pGBSNF-tub를 construction하였다(Fig. 64).

Bassiasin I cDNA 및 genomic 유전자를 포함하는 발현벡터 pBSNF-tub와 pGBSNF-tub의 transformation는 PEG/CaCl₂ 방법을 사용하였다. 즉 *M. anisopliae*를 7일간 PDA plate에서 배양 후 추출한 conidia 2X10⁸을 yeast extract, malt extract 및 bacteriological peptone을 각각 0.2%로 첨가한 Czapek-Dox 배지에서 27°C에서 20시간 배양하여 germ tube를 형성시켰다. 이를 mira cloth로 회수 후 0.7M KCl solution에 현탁하여 Novozyme 234(8mg/ml)로 28°C에서 3시간 반응시켜 protoplast를 형성시켰다. 이 protoplast를 1X10⁸의 농도로 0.7M KCl, 10mM CaCl₂, 10mM Tris-HCl (pH 7.5) 용액으로 현탁하였다. DNA 60ug(60ul)과 50ul의 PTC 용액(25% PEG 8000, 50mM CaCl₂, 10mM Tris-HCl(pH 7.5))과 섞어준 후 200ul의 protoplast를 첨가하여 20분간 얼음에 두었다. 다시 2.5ml의 PTC 용액을 첨가하여 실온에서 30분간 더 방치 후 3개로 나누어 0.7M KCl이 포함되고 5ug/ml의 benomyl이 첨가된 0.5%의 Czapek-Dox agar 10ml과 섞어 동일 배지(1.2% agar)에 부어 배지를 굳힌 후 27°C에서 transformants가 나올 때까지 배양하였다. 현재까지 cDNA와 genomic 유전자의 benomyl 저항성 형질전환체는 각각 3개와 1개를 확보하였으며 Bassiasin I 유전자의 insertion과 발현을 확인중에 있다.

3. 사상균 내에서의 *M. anisopliae* protease 유전자의 발현

M. anisopliae protease의 genomic DNA 유전자의 fungi 내로의 도입은 *B. bassiana* Bassiasin I 유전자의 fungi 발현벡터 구축에 사용한 pAN7-1과 pAN8-1을 사용하였다. Fig. 65의 Manpro-FN과 Manpro-FC의 primers를 이용하여 PCR을 통해 약 1.65kb의 genomic 유전자의 증폭 DNA를 vector에 insertion하여 Bassiasin I의 발현벡터와 동일하게 구성하여 genomic 유전자의 발현벡터 pGMPro-tub를 구축하였다(Fig. 66). 또한 cDNA의 발현벡터도 동일하게 구성하였다. 현재 이들 발현벡터는 *M. anisopliae*에 transformation하여 유전자 발현여부를 조사중에 있다.

Manpro-FN : 5'-TCATGCACACTCTCGTTGCC-3'

Manpro-FC : 5'-TTATAAGCTTGATCATTACATGGAGATCTC-3'
Fba I

Fig. 65. PCR primers of *M. anisopliae* protease gene.

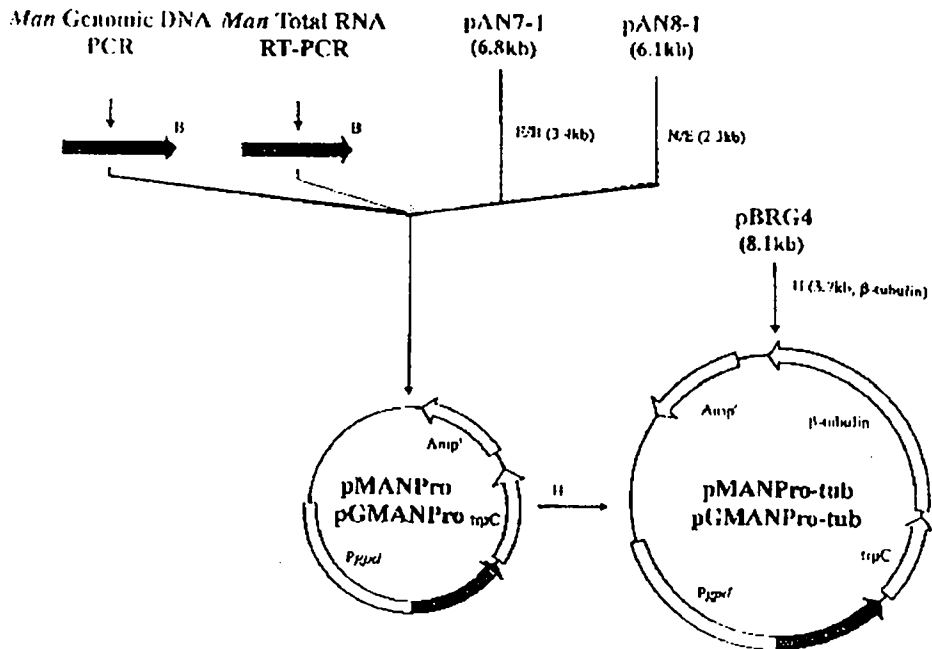


Figure 66. Construction of *M. anisopliae* protease gene expression vector for fungi system. B, *Bam*HI ; E, *Eco*RI ; F, *Fba*I ; H, *Hind*III ; N, *Nco*I.

제 11절. 살충성 사상균의 host-vector system 개발

살충성 사상균의 분자생물학적 육종과 육종된 fungi의 현장에서의 응용에 대비해 안전하고 안정하게 사상균의 세포내에 존재할 수 있는 vector개발이 필요하며, 이를 위해 먼저 외부 유전자가 vector 내에 실려서 host사상균에 존재할 수 있도록 host-vector의 개발은 필수적이라 하겠다. 따라서 *M. anisopliae*를 host로 이용하기 위해서 UV 및 FOA (Fluoroorotic Acid) 처리에 의해 살충성 사상균에 대한 uracil 요구성 mutants균주를 획득하였다(Fig. 67). 또한 mutants에 상응하는 vector를 개발하기 위하여 선택유전자(ura5 gene)를 cloning하였다. 이 과정에서 cloned gene의 선별을 위해서 PCR을 이용하여 probe를 제조하였다. 이 probe를 이용하여 *M. anisopliae*의 genomic library로부터 plaque hybridization에 의해 positive clone(λMAU3)을 선별하였다(Fig. 68). 이 clone을 Southern blotting에 의해 분석한 결과 insert의 존재를 확인하였으며(Fig. 69), 최종적으로 insert를 DNA sequencing함으로써 ura5 gene임을 확인하였다. URA5의 clone에 대한 DNA 염기서열을 결정하기 위하여 먼저 이 clone에 대한 restriction map을 결정함과 동시에 DNA sequencing 전략을 설정하였다(Fig. 70). 이 전략에 따라 약 1kb의 URA5에 대한 전체 DNA sequence를 밝힌 결과는 Fig. 71에 나타내었다. 이로부터 유추한 아미노산 배열을 기존에 보고된 다른 사상균의 URA5 gene products와 비교한 결과는 Fig. 72과 같다. 결과에서 보여주는 바와 같이 *M. anisopliae*의 URA5 아미노산 서열은 *Trichoderma reesei*와는 83.7%, *Colletorichum graminicola*와는 76.9%, *Sordaria macrospora*와는 74.4%, *Podospora anserina*와는 67.5%의 높은 상동성을 보였다.

한편 host로 사용할 영양요구성 돌연변이체(mutant)의 개발은 UV에 의한 DNA 손상균주를 선발하여 이 집단을 다시 특수시약(5-FOA)에 노출시키는 선발방법으로 mutant를 선발하였다. 그러나 상보성 돌연변이 균주는 reversion이 자주 발생하여 host로서 사용하기에 부적합한 것으로 판단된다. 이와같은 결과가 발생하는 주된 이유는 *M. anisopliae*에서도 효모에서의 pyrimidin 생합성 경로(The molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces* Metabolism and Gene expression p264-271, Cold Spring Harbor Lab.)와 마찬가지로 ura5 gene product를 사용하는 경로외에도 이를 우회하는 경로가 존재할 수 있음을 강력히 시사해 준다. 따라서 기존에 영양요구성 돌연변이 균주선발 방식인 UV 처리 후 이것을 다시 특수시약(5-FOA)에 노출시키는 선발방법을 지양하고 UV에 의한 DNA 손상균주를 확보하고자 하였다. 실험방법은 먼저 plate의 뚜껑에 1.0×10^6 conidia/ml 농도로 포자를 증류수에 현탁하여, 크린벤치의 UV를 이용하여 10, 20, 30분간 각각 노출하였다. 이것을 PDA

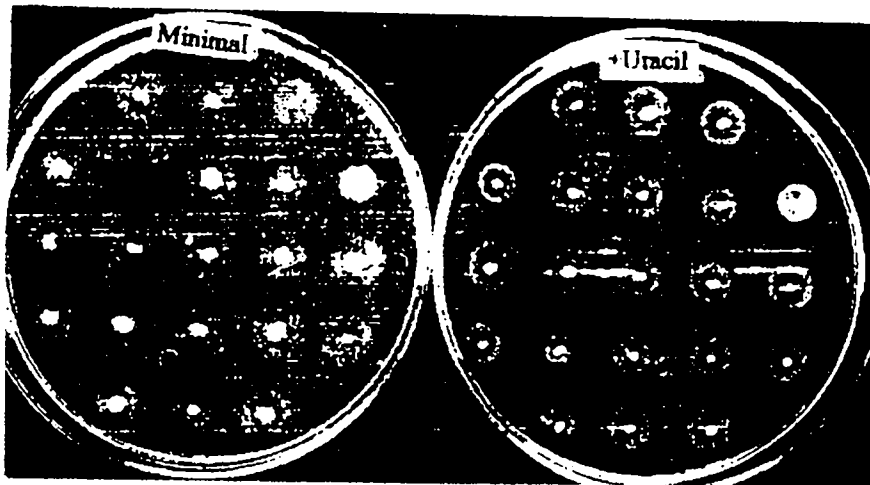


Fig. 67. Screening of *M. anisopliae* mutated to uracil auxotroph after treating UV or FOA.

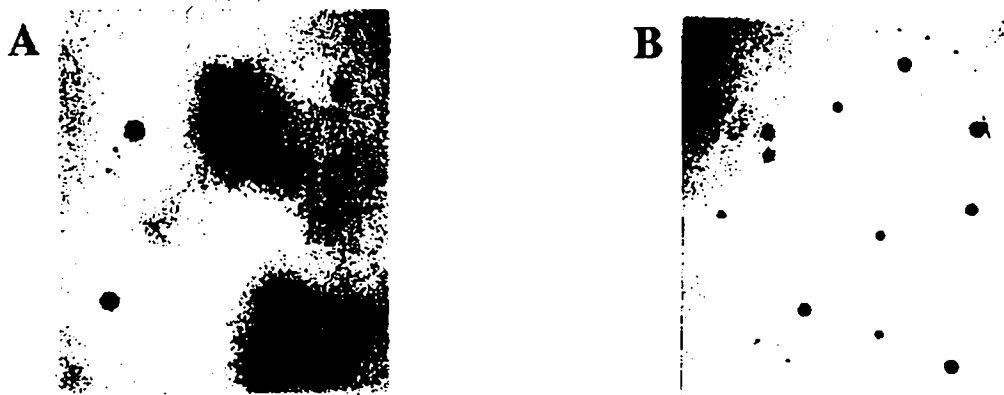


Fig. 68. Plaque hybridization to identify the λ phage recombinant clone containing *ura5* gene. Genomic DNA library of *M. anisopliae* was plated, plaques were lifted onto nylon membrane, and hybridized with a [32 P]-labelled *ura5* probe. A, first screening; B, second screening.

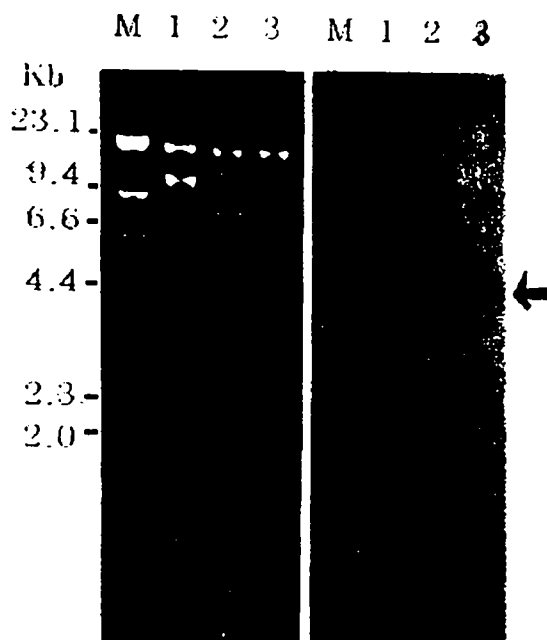


Fig. 69. Southern blot analysis of the λ MAU3 clone, which had *ura5* insert using for a marker gene of *M. anisopliae*. The clone was digested with *Bam* HI (lane 1), *Eco* RI (lane 2) and *Sal* I (lane 3), separated on 1% agarose gel (left), and hybridized with a [32 P]-labelled *ura5* probe (right).

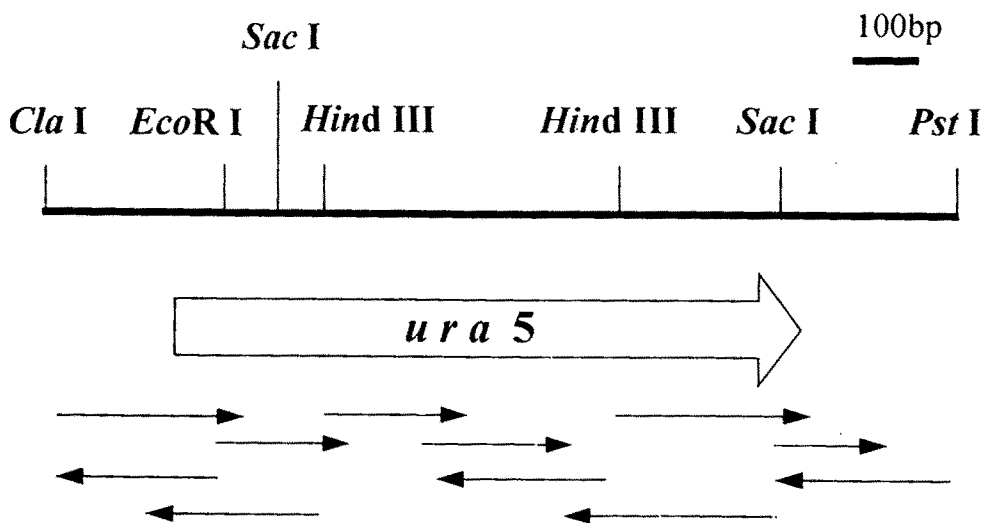


Fig. 70. Restriction enzyme map and sequencing strategy for *ura5* of *M. anisopliae*. Arrows indicate the length and direction of sequencing.

```

                                     gggggca -205
ttcgacagactcgtaaagcgtaaatccttgaatctctttatccttgacatatgcccaaacataataca -137
tttctaattttgcaaacatcccctctttcttcccagacggcgttataaccgtattgagctgccctgtca -69
atcgactcaagtagictgttccctgaaccctaactacttgtgtttcttctcaaccataaaaccaac -1
ATG TCT GGC CAA CTT GCG TCC TAC AAG CAA GAG TTC CTC AAG GCA GCC ATC 51
M S G Q L A S Y K Q E F L K A A I
GAA GGC GGC GTC CTG AAG TTC GGA AGC TTC GAG CTC AAG TCC AAG AGA ATA 102
E G G V L K F G S F E L K S K R I
TCC CCT TAC TTC TTT AAT GCT GGA GAA TTC CAC ACT GCT CAT CTC GCC GGT 153
S P Y F F N A G E F H T A H L A G
GCT ATT TCG TCC GCC TTT GCC AAG ACT ATT ATT GAC GCT CAG CAA AAT GCC 204
A I S S A F A K T I I D A Q Q N A
GGC CTA GAC TTT GAC ATT ATC TTT GGC CCC GCA TAC AAG GGA ATC CCT CTC 255
G L D F D I I F G P A Y K G I P L
TGC TCT GCC ATC ACC ATT AAG CTG GGT GAG ATT TCC CCC CAG AAT TTG GAC 306
C S A I T I K L G E I S P Q N L D
AAG GTC TCC TAC TCC TTC GAC AGA AAA GAA GCC AAG GAC CAT GGT GAG GGC 357
T V S Y S F D R K E A K D H G E G
GGC AAC ATT GTC GGC GCC TCT CTC AAG GGC AAG AAA ATA CTC ATT GTT GAT 408
G N I V G A S L K G K K I L I V D
GAT GTT ATC ACT GCT GGT ACT GCA AAG AGA GAA GCC ATT GAC AAG ATC AGA 459
D V I T A G T A K R E A I D K I R
AAG GAG GGT GGT ATT GTC GCG GGC ATC GTT GTT GCC CTC GAC CGC AAG GAG 510
K E G G I V A G I V V A L D R K E
AAG CTG CCT GCC GCA GAT GGT GAC GAC TCC AAG CCT GGA OCT AGC GCT ATT 561
K L P A A D G D D S K P G P S A I
GGC GAG CTG AGA AAG GAG TAT GGT ATT CCG ATC TTT GCT ATC CTC ACG TTG 612
G E L R K E Y G I P I F A I L T L
GAT GAT ATT ATC GCG GGT ATG AAA AGC TTC GCT TCT GAC GAC GAC ATC AAG 663
D D I I A G M K S F A S D D D I K
CGG ACC GAG GAG TAC CGC CAG AAG TAC AAG GCT ACC GAT TAG ataaagaaatcg 737
R T E E Y R Q K Y K A T D *
ttagctatgtggatgtccgggagctcaaaccaaaaataatataaaaaaaaaaacggggagattgga 804
tatcgatggcgggtttatgcccgtgtctagggtacaataaataatggaccgcacttcaccaacctacc 871
gtaggatctttgtaggagagcttgttatctagattttattctcttcagggttagatgtagatcctagg 938
taattacgtttcgttagttctgaaaacgtcacctagctttgtttgacacgtagatcgggtcccctggc 1005
tgacag 1010

```

Fig. 71. Nucleotide and deduced amino acid sequence of *ura5* of *M. anisopliae*. The open reading frame contained between ATG and the termination codon(TAG) is 705bp and encodes 234 amino acids. Boxed sequences correspond to binding site for designed primers.

```

Ma URAS      M S G Q D I A S Y R K D E F T R K G A A H E G E Y A R R I S Y R S P A I
Tr (83.7%)   T T S Q D I P A Y R K D E F T R S A A D G E Y A R R I S Y R S P A I
So (74.4%)   M A A L R Y R A D E F T R A S I D G E Y A R R I S Y R S P A I
Co (76.9%)   M A S Q I P P Y R K D E F T R K A A A A G - V A R R I S Y R S P A I
Po (67.5%)   M S E - I P Q Y R K D E F T R S A A D G N I L R R I S Y R S P A I

Ma          K S R R F S P Y D E N A G D E H R H P G A S S A F A K Q A I
Tr          K S R R F S P Y D E N A G D E Y R A D I L Q A S S A F A R C I M
So          K S R R F S P Y D E N A G D E H R R L R R R A S A F A R T I S I
Co          K S R R F S P Y D E N A G D E Y R A D I L R A S S L Y A H I V I
Po          K S G R F S P Y D E N A G D E Y R A D I L N S S T A Y A L I I I

Ma          D A Q N A G A D E H R H P G A Y K G H P A S A A H K C E P
Tr          E A H K S G Q L A D E H R H P G A F A T A I D G B A Q
So          E A G E K A G H E P H V F P A Y K G A P A G S A A H K C G D
Co          E A R E A T G A D E H V V F P A Y K G A P A T S T D K R A A
Po          - - - S L P I Q Y D E H R H P G A Y K G H P A T A T H K C G Q

Ma          I S E D N I G D Y V S S S P R K K E K G H L E E N D D G A S R R
Tr          L D E T Y G K I C D S T E R K E K A G R E C E N D D G A P R R
So          V A P A A R R V S S S P R K K E K G H L E E N D D G A S R R
Co          L D E A R Y G I T C Y S S P R K E K G H L E E N D D G A P R R
Po          R P R A K Y A V G R V L V R D S S S P R K K E K G H L E E N D D G A P R R

Ma          K R R I F A A D D E D S R P E S A T G I L R K R E
Tr          K R R I F A A D D E D S R P E S A T G I L R K R E
So          K R R V E A A D D E D S R P E S A T G I L R K R R R G
Co          K Q Q V L A A D D E D S R P E S A T G I L R K R A A A
Po          K R R V L R A A D D E D S R C P A K R A A A A S E K E G G E A W A G

Ma          F Y A A D E R K E R I P A A D G D S K P E S A T G I L R K R E
Tr          F Y A A D E R M E R I P A A D G D S K P E S A M V S S A R S T
So          F Y A A D E R M E R I P A A D G D S K P E S A T G E D L R A K S Y
Co          F Y A A D E R M E R I P A A D G D S K P E S A L G E I K K E S Y
Po          F Y A A D E R M E R I P A K I G D D S R P E S A I G E I K K E S Y

Ma          E I P A F A S G E P L D D E H A G I K S E P A S V D D H I R R E T E E N G R
Tr          A R P A R A D I E P L D D E H E G I R G L A S P E I V E K T A F A S R R
So          G I P E E A S G E P L D D E H D G I R G E A T P E D H R N I E D Y R
Co          G I P E E S R A D I D D E H E G I K S S E A S A E O H R R E E E H R
Po          N L E T Y A L I L T A D D E H E G I K G L V G E E O H R R R E E E H R

Ma          Q E N K A A T D
Tr          A K Y K A A T D
So          A K Y K A A T D
Co          A K Y K A A T D
Po          E K N K A A T D

```

Fig. 72. Protein homology between deduced amino acid sequence of *M. anisopliae* URA5 and other fungal URA5s. Ma; *M. anisopliae*, Tr; *Trichoderma reesei*, So; *Sordaria macrospora*, Co; *Colletorichum graminicola*, Po; *Podospora anserina*.

배지에 도달하여 치사율 95-98%의 포자집단이 형성되는 조건에서의 변이주를 선발하였다. 그 결과를 요약하면 Table 8과 같다.

본 연구에서 계획한 치사율 범위(95-98%)에 도달하도록 계속해서 20-30분 사이의 조건에서 반복실험을 수행하여 안정한 mutant를 확보하였다. 그러나 결과에서 보여주듯이 (Fig. 73) 본 사상균의 돌연변이 균주의 성장은 wild type 균주에 비해 매우 느린 것으로 확인되었으며, *ura5* gene에 mutation이 정확히 도입된 것으로 사료된다. 따라서 이 mutant를 host로 사용할 경우 성장속도에 의해 selection이 가능할 것으로 사료된다.

이상의 연구를 통하여 최종적으로 안정적 변이주가 얻어졌으므로 *ura* 유전자를 marker로하여 이미 cloning한 살충성 관련 chitinase와 protease 유전자를 도입, 발현함으로써 새로운 host-vector계로 활용할 계획이다.

제 12절. 발효공정개발

살충성 사상균 *B. bassiana*, *M. anisopliae* 등을 상업적으로 생산하기 위해서는 포자 (conidia, blastospore) 혹은 균사(mycellium)의 생산이 필수적이다. 지금까지 보고된 것을 종합해보면 이 균들의 포자가 주로 살충성을 갖고 있으며, 또한 장기 보관시에 균사에 비해 포자의 viability가 높기 때문에 균체배양의 목표는 포자의 생산 yield를 높이는 데 있다. 포자를 많이 생산하기 위해서는 균사의 증식이 전제조건이지만 균사가 많이 생성되더라도 포자형성은 일어나지 않는 경우도 흔히 발생한다. 살충성 사상균의 발효공정은 고체배양을 통한 conidia의 생산 혹은 액체배양을 통한 blastospore의 생산 등이 보고되었다. 그렇지만 고체배양은 배양시일이 길고 (1-3주), 오염의 위험성이 크며, 포자 생성 yield가 낮다는 단점이 있기 때문에 최근에는 액체배양 쪽으로 연구가 활발한 추세이다. 따라서 본 연구에서는 살충성 사상균의 액체배양을 위한 값싼 공업용배지를 개발하여 살충성사상균의 포자를 대량생산하기 위한 연구를 수행하였다. 그 결과 농산폐기물인 배추의 즙액을 이용한 배추액즙배지를 새로 개발하였다. 이 배지는 높은 수준의 포자 yield ($2-5 \times 10^7$ spores/ml)를 보였으며, 특히 농산폐기물을 재활용하는 것이기 때문에 배지생산 비용이 전혀 들지 않는 큰 장점을 갖고 있다. 지금까지의 중요 연구결과로는 *M. anisopliae*의 포자생성능과 관련하여 배추즙액의 농도 결정(Fig. 74), 개발된 배지와 기

Table 8. Survival number of *M. anisopliae* conidia after the treatment of UV irradiation for the different time.

Time of UV irradiation (min)	0	10	20	30
No. of conidia	1.0×10^9	5.0×10^4	1.0×10^3	0

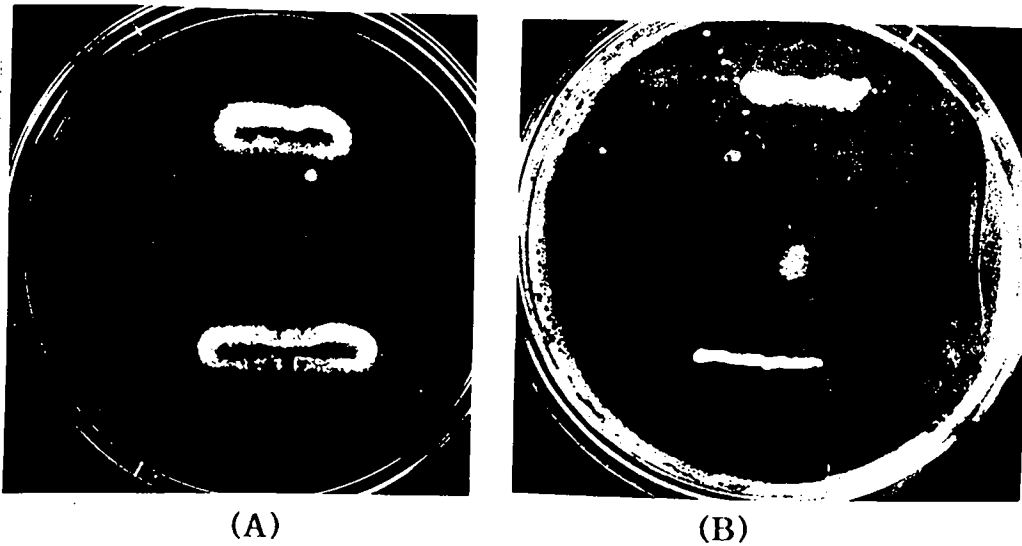


Fig. 73. Comparison of growth of wild type and URA^- mutant in 5 days on complete medium (A) or minimal medium without uracil (B).

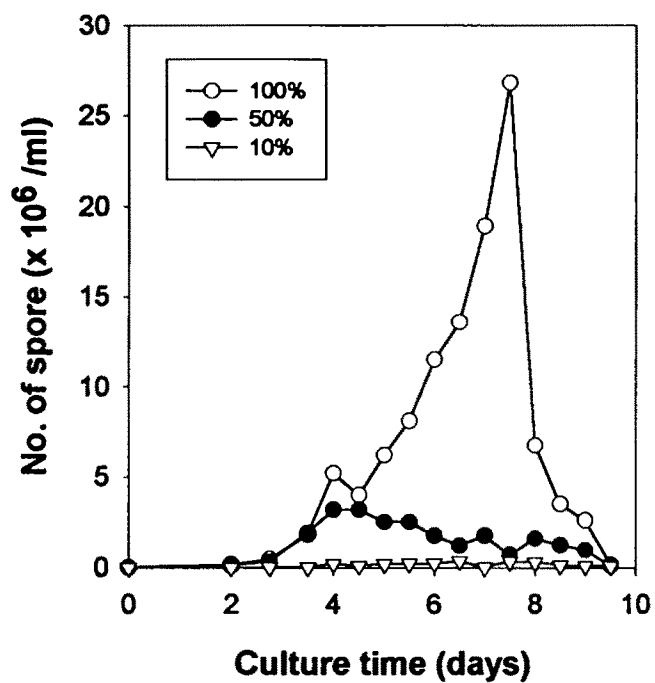


Fig. 74. Spore formation of *M. anisopliae* during the culture at various concentrations of Cabbage juice media.

존 배지와와의 비교 (Fig. 75), dry weight 결정(Fig. 76), 포자형성과 관련된 초기 배양 pH 효과(Fig. 77), 배양액의 pH변화(Fig. 78), 포자형성과 관련된 배양온도의 효과 (Fig. 79) 등을 결정하였다. 똑같은 방식으로 *B. bassiana*에 대한 실험을 수행하여 Fig. 80-85의 결과를 얻었다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 배추즙액배지는 값싸면서 포자형성능이 뛰어난 배지임이 밝혀졌다. 또한 이미 결정된 배양환경외에 다양한 탄소원, 질소원, 미량 원소, 성장인자 등을 적절한 배합으로 첨가할 경우 포자 형성시간의 단축과 포자형성능의 증가가 가능할 것이다.

제 13절. Mycellial pellet size 감소에 미치는 황토의 영향

배추즙액 배지 혹은 PDB 배지 등을 이용하여 살충성 사상균을 액상배양할 경우 배양 3 일째부터 mycellial pellets이 형성되기 시작하여 5-7일 경에는 직경 1cm 이상의 pellets 형성이 관찰되었다(Table 9). 뿐만아니라 배양 1주일 경에 pellet size가 최대가 된 후 1 개월 동안 배양하더라도 pellet size의 증가 혹은 감소가 관찰되지 않았다. 이것은 mycellial pellet 내의 균체성장이 정지 혹은 사멸하기 때문인 것으로 생각된다. 이와같은 예측은 이들 사상균은 1주일 전후에서 균체량과 포자수의 최대값을 보인 후 배양시간의 경과에 따라 그 값이 감소한다는 상기의 연구결과와 잘 일치하였다. 이러한 현상이 생기는 근본적인 이유는 *B. bassiana*와 *M. anisopliae* 등을 액상 배양할 때 이들이 형성하는 mycellial pellets이 pellet 내부로의 산소전달, 영양분 전달 등을 차단하기 때문에 기인하는 것으로 생각된다. 따라서 이러한 문제점을 극복하기 위한 새로운 방법으로서 배지 중에 황토(loess)를 첨가함으로써 mycellial pellet size의 감소를 유도하였다(Table 9 및 Fig. 86). 이때 사용한 황토는 대구, 경북 일대의 3지역에서 채취한 것을 사용하였으며, 이들에 대한 성분분석 결과는 Table 10과 같다.

제 14절. 살충성 사상균의 고체배양

살충성 사상균 *M. anisopliae*와 *B. bassiana*는 이들을 액상배양하여 얻은 blastospore

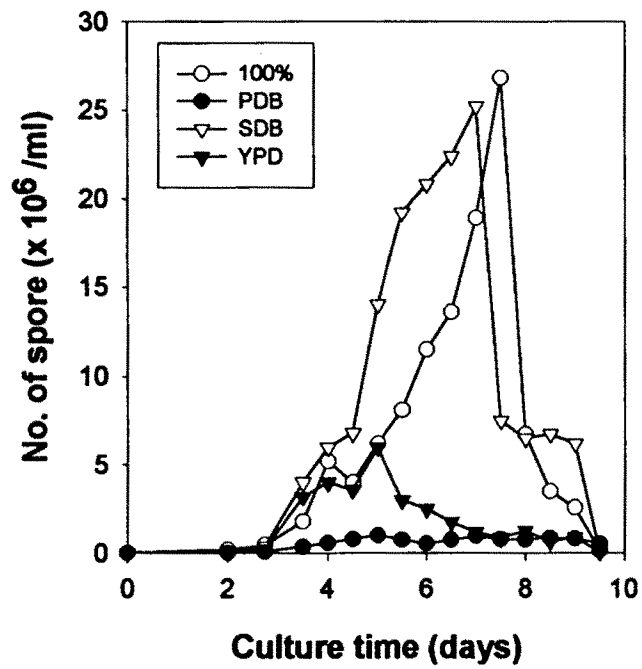


Fig. 75. Media effect on the spore formation of *M. anisopliae*.

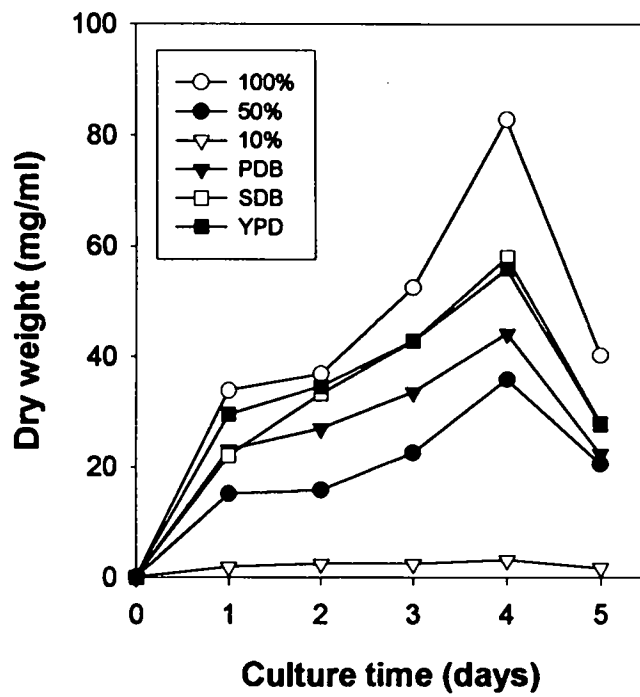


Fig. 76. Dry weights of *M. anisopliae* cultures according to the culture time on different media.

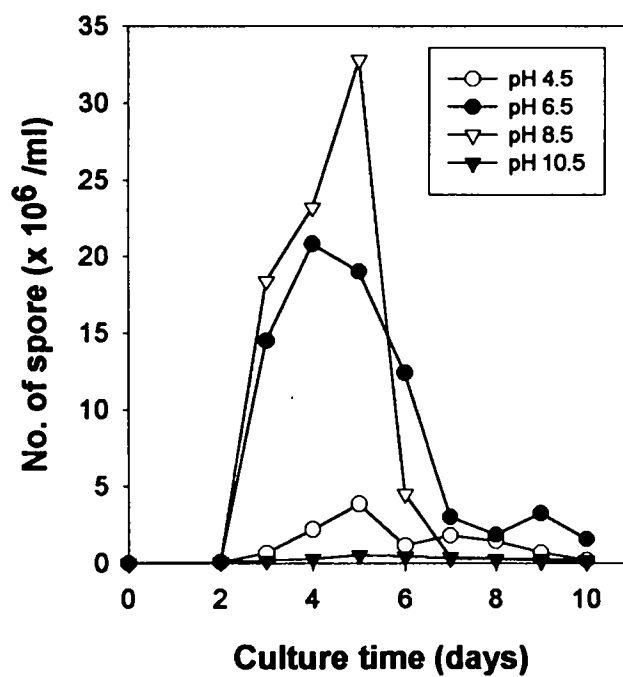


Fig. 77. Spore formation of *M. anisopliae* during the culture at various initial pHs of 100% Cabbage juice media.

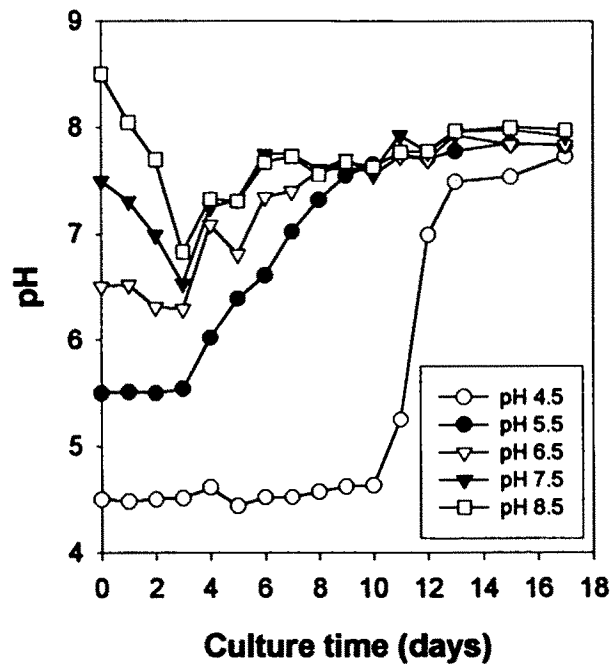


Fig. 78. pH changes during the *M. anisopliae* cultures at various initial pHs

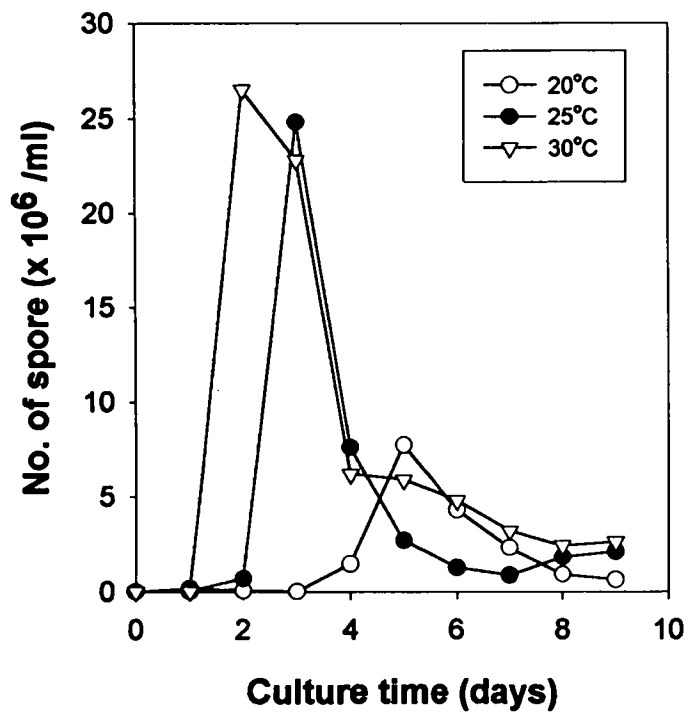


Fig. 79. Temperature effect on the spore formation during the *M. anisopliae* culture.

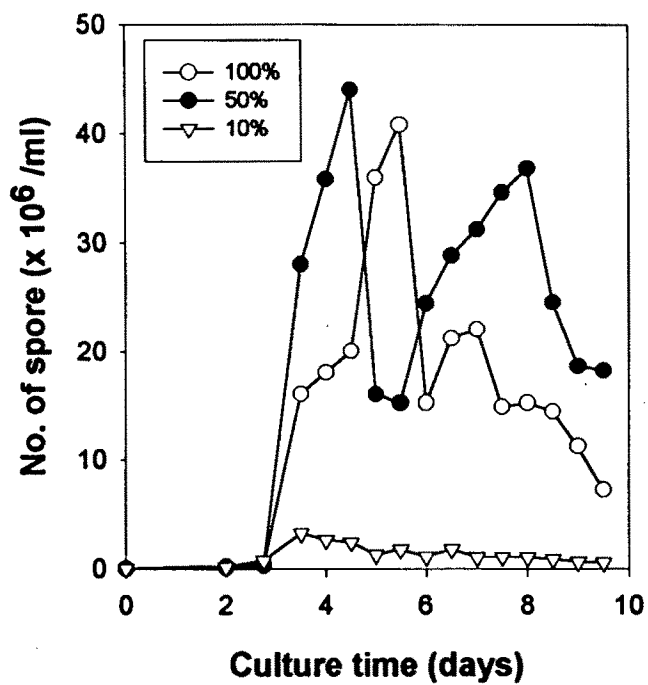


Fig. 80. Spore formation of *B. bassiana* during the culture at various concentrations of Cabbage juice media.

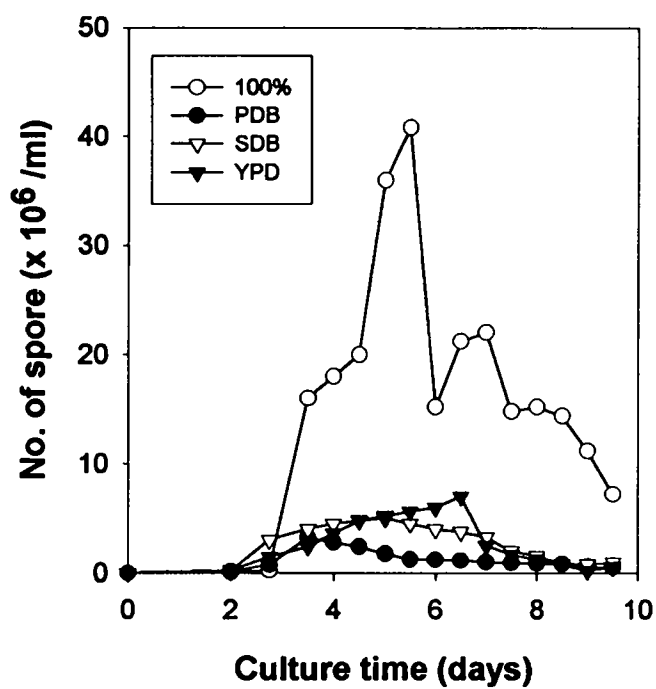


Fig. 81. Media effect on the spore formation of *B. bassiana*.

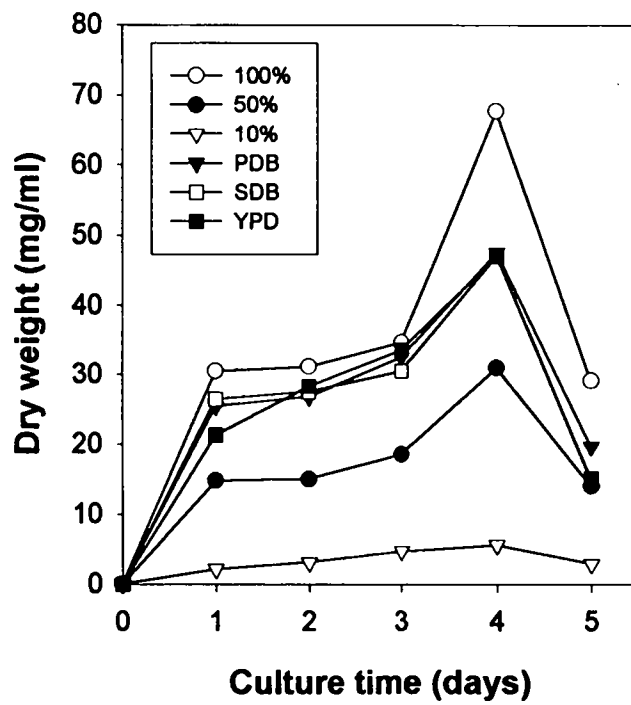


Fig. 82. Dry weights of *B. bassiana* cultures according to the culture time on different media.

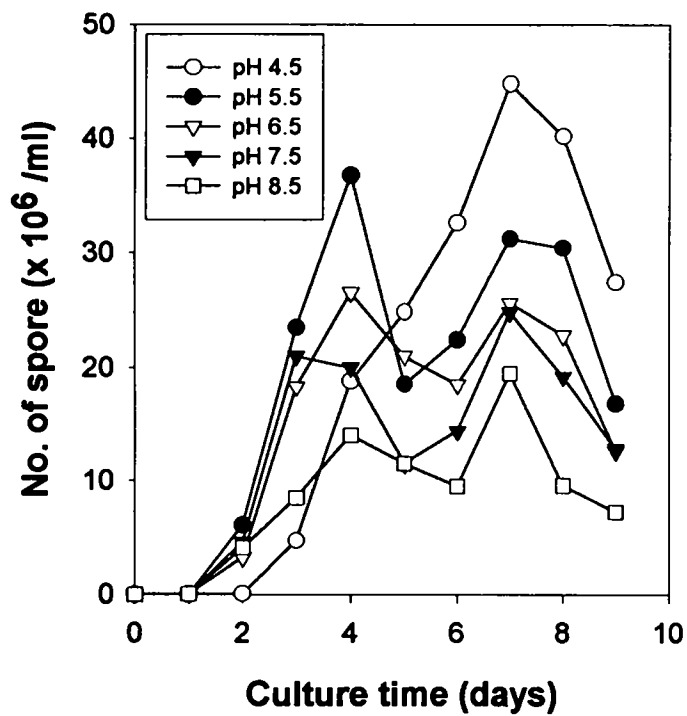


Fig. 83. Spore formation of *B. bassiana* during the culture at various initial pHs of 100% Cabbage juice media.

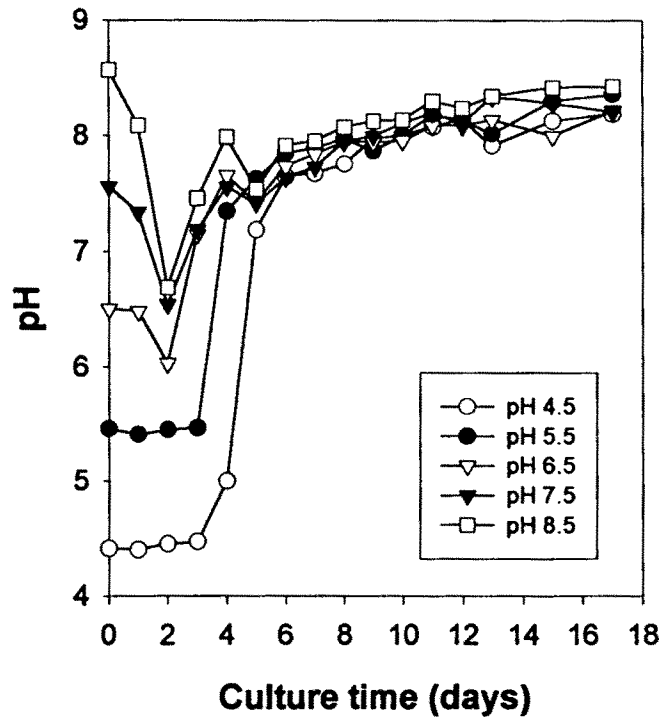


Fig. 84. pH changes during the *B. bassiana* cultures at various initial pHs

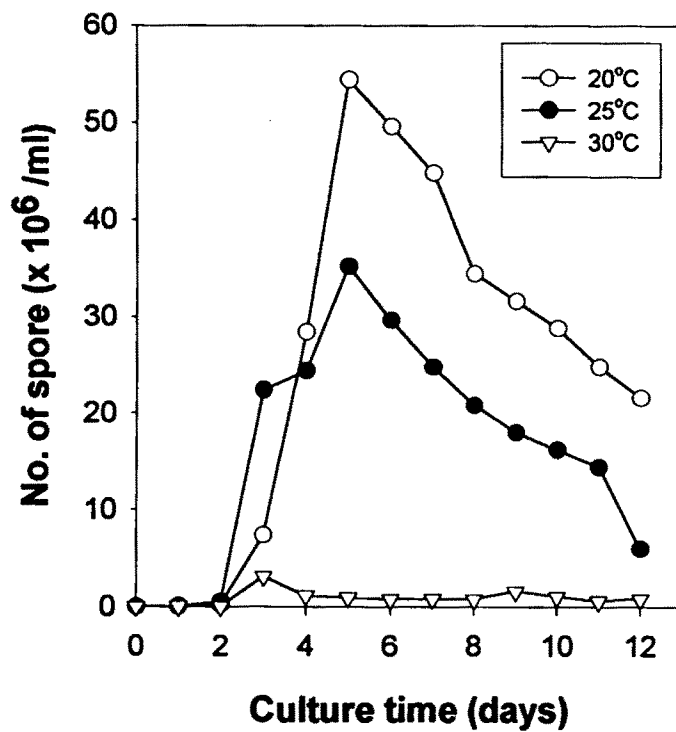


Fig. 85. Temperature effect on the spore formation during the *B. bassiana* culture

Table 9. Mycellial pellet size during the submerged cultures of *M. anisopliae* for 7-30days.

Culture media	Pellet size (ϕ =mm)
Potato dextrose broth(PDB)	5.0-7.0
Cabbage juice media	10.0-13.0
Cabbage juice media + 1%(w/v) loess	1.5-3.0
Cabbage juice media + 5%(w/v) loess	0.6-1.0
Cabbage juice media + 10%(w/v) loess	<0.5

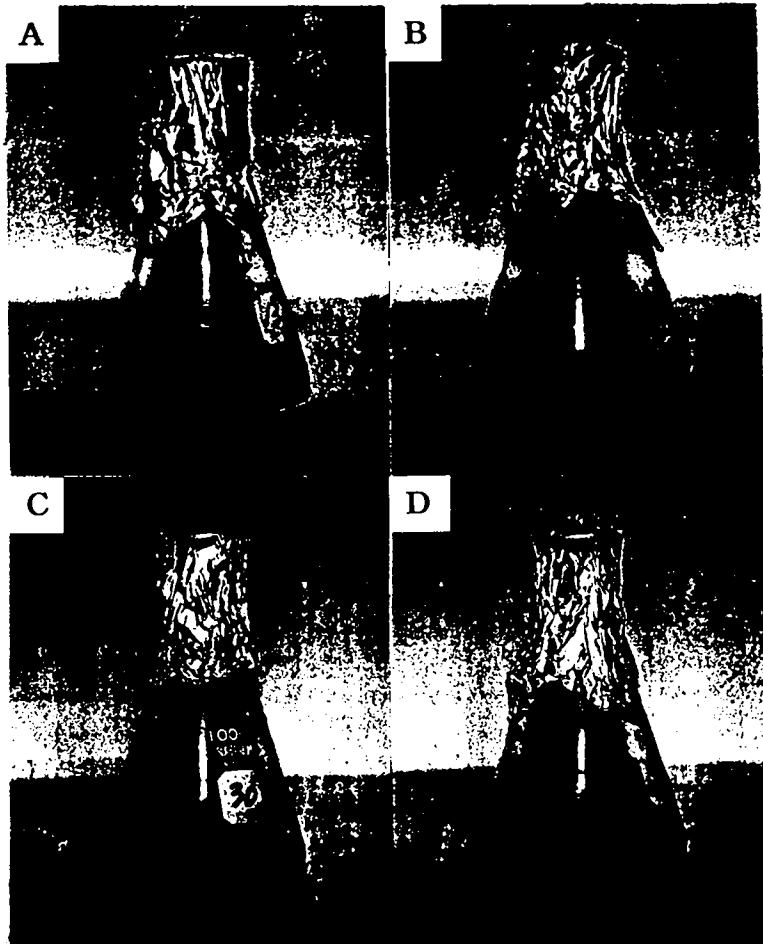


Fig. 86. Addition effect of loess on the reduction of mycelial pellet size during the submerged cultures of *M. arisopliae* in the Cabbage juice media.

- A. Cabbage juice media(Control), B. Cabbage juice media with 1% loess,
C. Cabbage juice media with 5% loess, D. Cabbage juice media with 10% loess

Table 10. Content analyses of loess collected from Taegu and Kyungbook area.

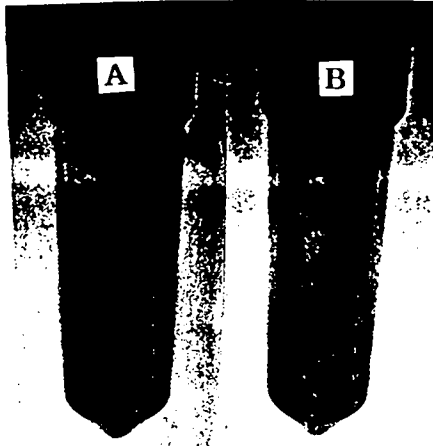
Soil sample	CEC	Ex. Catioons, meq/100g				pH	OM	sp. area
	meq/100g	Ca	Mg	K	Na		%	m ² /g
Jinryang	12.8	22.6	0	0	0	5.8	0.3	30.6
Kyungsan	14.2	2.8	5.1	0.3	0.5	5.8	0.3	32.2
Taegu	15.0	2.5	0	0	0	5.9	0.4	25.9

에 비해 고체배양시 생성되는 conidia(분생자)가 온도 감수성이 낮고, 6개월 이상의 장기 보관 시에도 높은 viability를 유지할 수 있는 것으로 보고되고 있다. 따라서 이들 균주의 생물농약으로의 상업적 이용을 위해서는 *M. anisopliae*, *B. bassiana* 등의 균주들을 고체배양하여 conidia를 대량생산하는 체계가 필요하다. 이를 위해서 고두밥(rice cooked), 보리, 옥수수, 쌀겨, 밀, 퇴비 등의 값싼 고체배지를 이용하여 각 배지에 대한 *M. anisopliae*의 배양시간별 포자(conidia)생성능(Fig. 87-93) 및 *B. bassiana*의 배양시간별 포자생성능(Fig. 94-99)을 각각 조사하였다. 그 결과 두 균주에서 퇴비를 제외한 모든 곡물배지에서 포자형성능이 높았다.

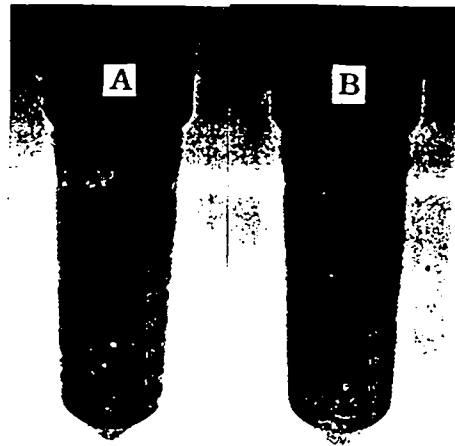
제 15절. Conidia형성에 미치는 황토의 영향

고두밥(rice cooked), 보리, 옥수수, 쌀겨, 밀, 퇴비 등의 고체배지에서 살충성 사상균 *M. anisopliae*와 *B. bassiana*를 배양할 때 포자형성에 미치는 황토의 효과를 검토하기 위하여 각각의 곡물배지에 최종농도가 4%(w/w)가 되도록 황토를 첨가하여 고체배양한 후 conidia수를 결정하였다. 그 결과 황토첨가에 의하여 포자형성 시간이 단축됨과 동시에 포자형성능이 촉진되어 배양 15일 경에 황토 첨가하지 않은 대조구에 비해 포자수가 높은 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 100-111).

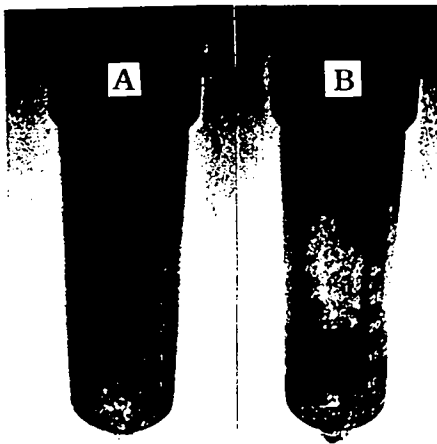
1. Rice cooked media



2. Barley-based media



3. Corn -based media



4. Wheat-based media

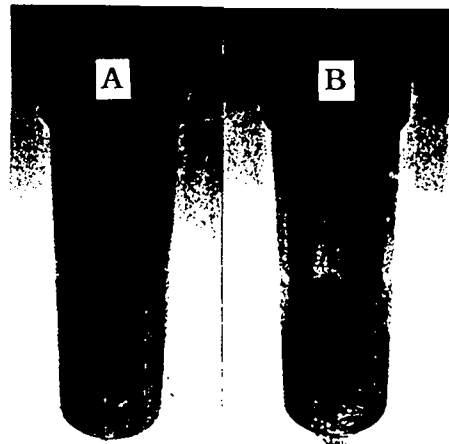


Fig. 87. Solid cultures of *M. anisopliae* in the 50ml conical tubes. A and B denote 40 and 60% humidities, respectively.

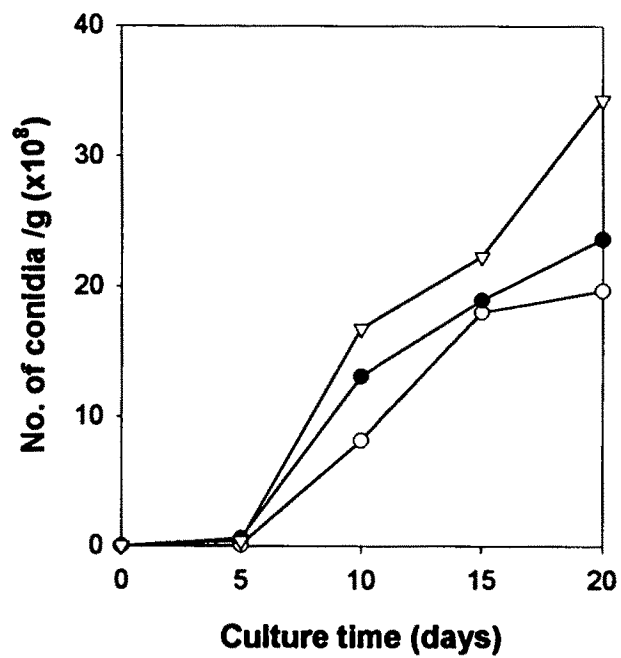


Fig. 88. Numbers of *Metarhizium anisopliae* conidia culturing on rice-cooked solid media at various humidities. ○-○; 40%, ●-●; 50%, ▽-▽; 60%

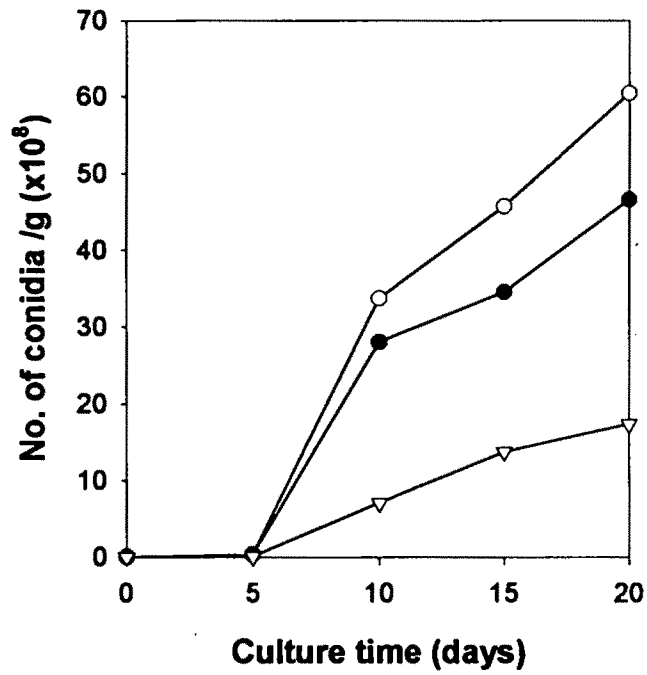


Fig. 89. Numbers of *Metarhizium anisopliae* conidia culturing on barley solid media at various humidities. ○-○; 40%, ●-●; 50%, ▽-▽; 60%

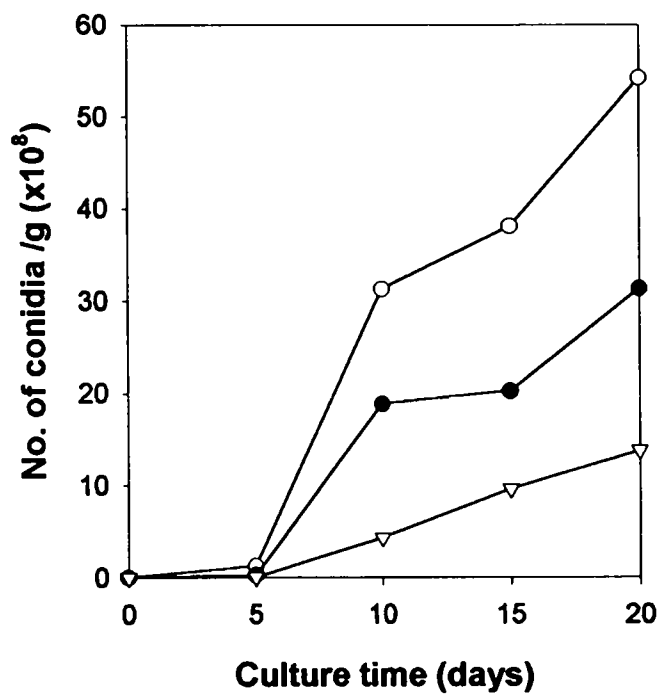


Fig. 90. Numbers of *Metarhizium anisopliae* conidia culturing on wheat solid media at various humidities. ○-○; 40%, ●-●; 50%, ▽-▽; 60%

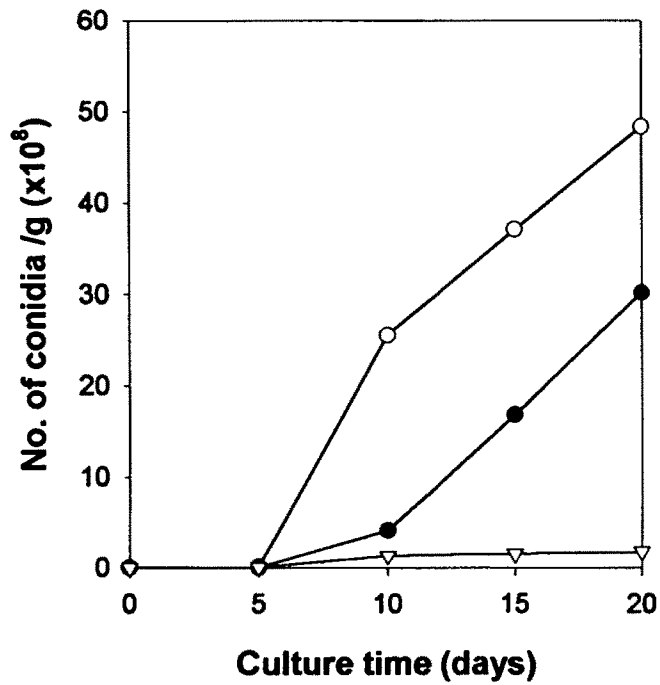


Fig. 91. Numbers of *Metarhizium anisopliae* conidia culturing on corn solid media at various humidities. ○-○; 40%, ●-●; 50%, ▽-▽; 60%

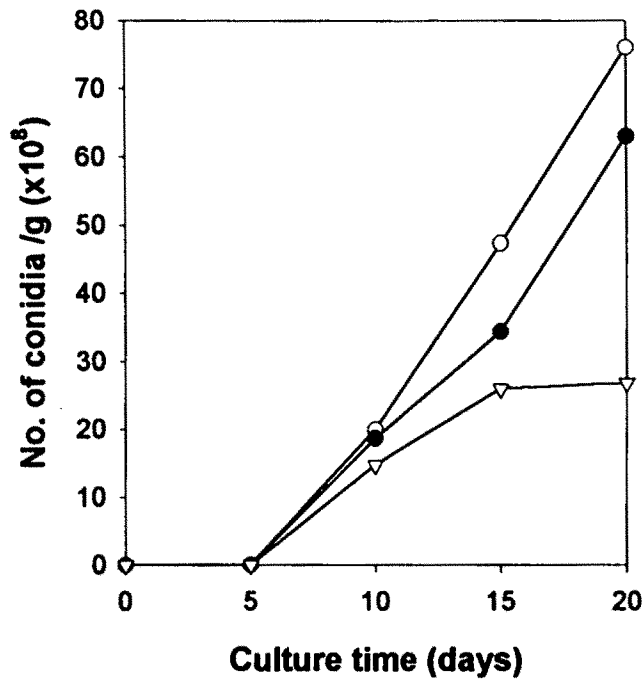


Fig. 92. Numbers of *Metarhizium anisopliae* conidia culturing on rice bran solid media at various humidities. ○-○; 40%, ●-●; 50%, ▽-▽; 60%

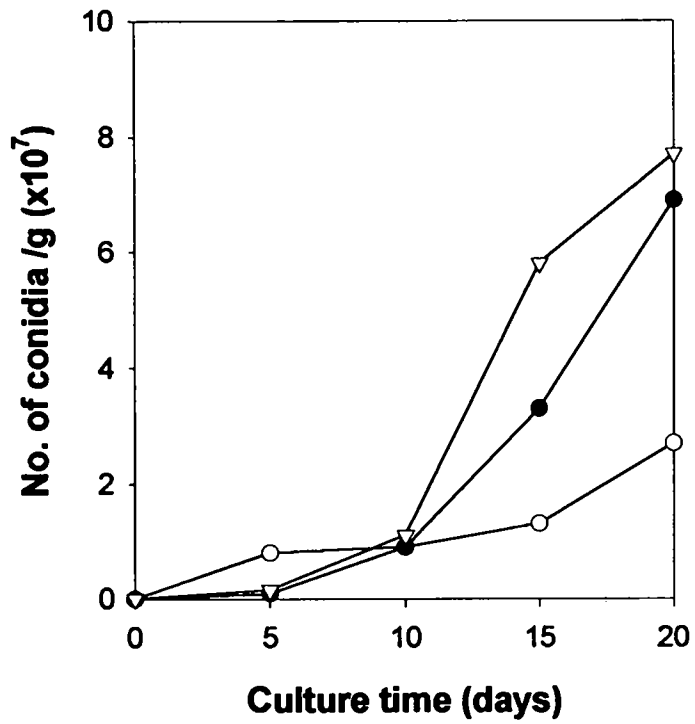


Fig. 93. Numbers of *Metarhizium anisopliae* conidia culturing on compost solid media at various humidities. ○-○; 40%, ●-●; 50%, ▽-▽; 60%

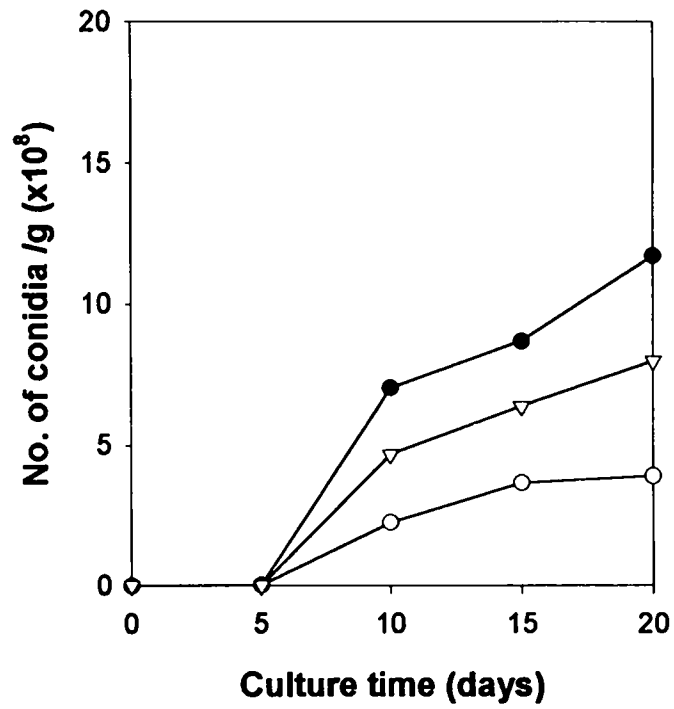


Fig. 94. Numbers of *Beauveria bassiana* conidia culturing on rice-cooked solid media at various humidities. ○-○; 40%, ●-●; 50%, ▽-▽; 60%

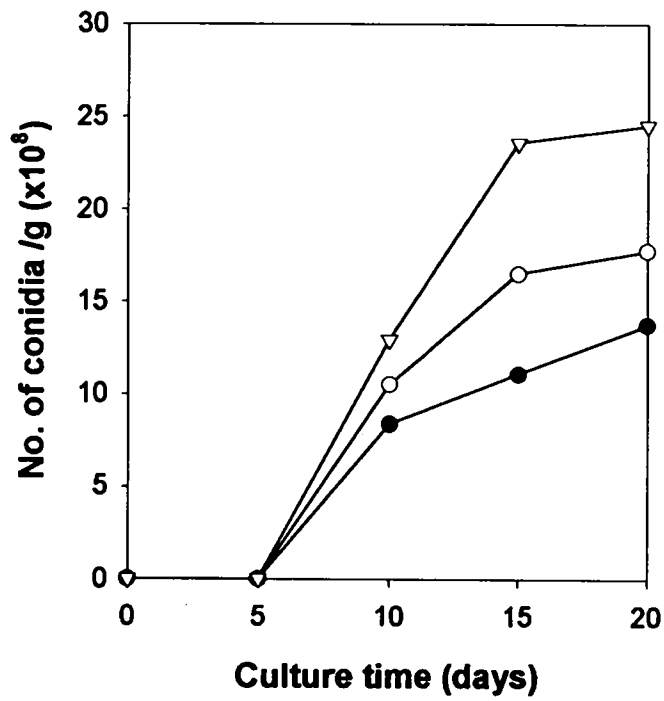


Fig. 95. Numbers of *Beauveria bassiana* conidia culturing on barley solid media at various humidities. ○-○; 40%, ●-●; 50%, ▽-▽; 60%

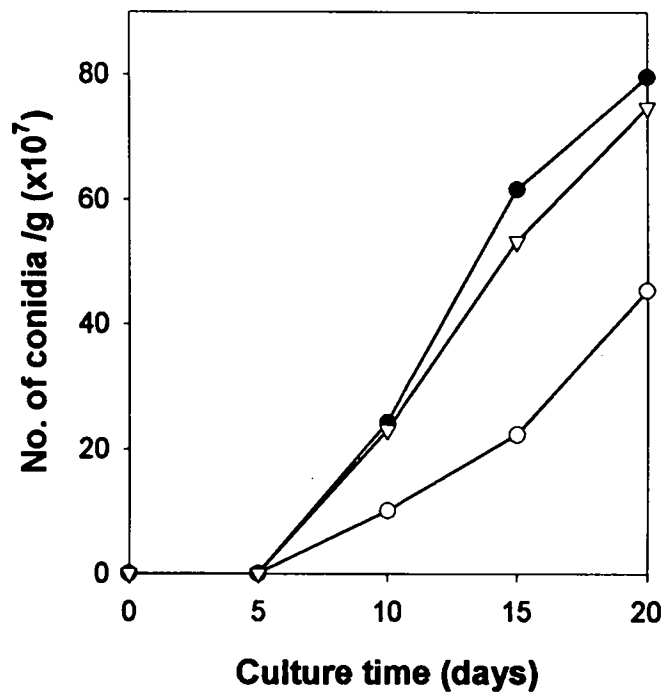


Fig. 96. Numbers of *Beauveria bassiana* conidia culturing on wheat solid media at various humidities. ○-○; 40%, ●-●; 50%, ▽-▽; 60%

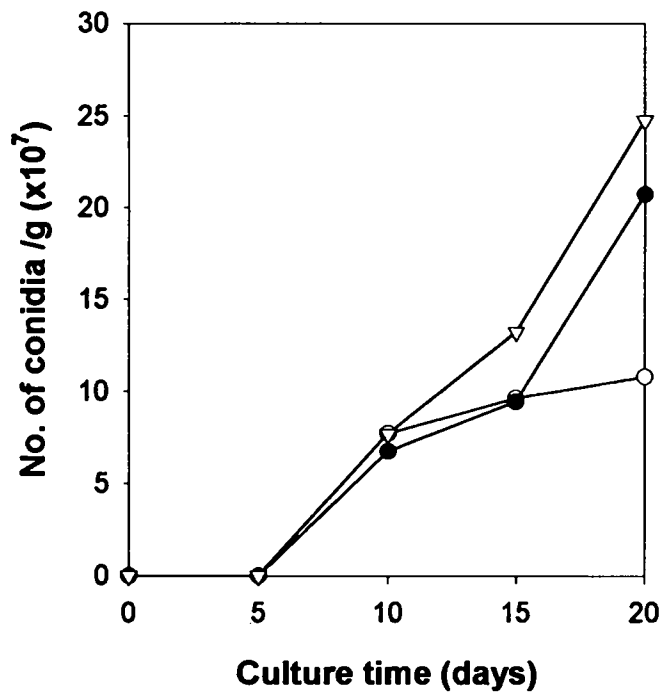


Fig. 97. Numbers of *Beauveria bassiana* conidia culturing on corn solid media at various humidities. ○-○; 40%, ●-●; 50%, ▽-▽; 60%

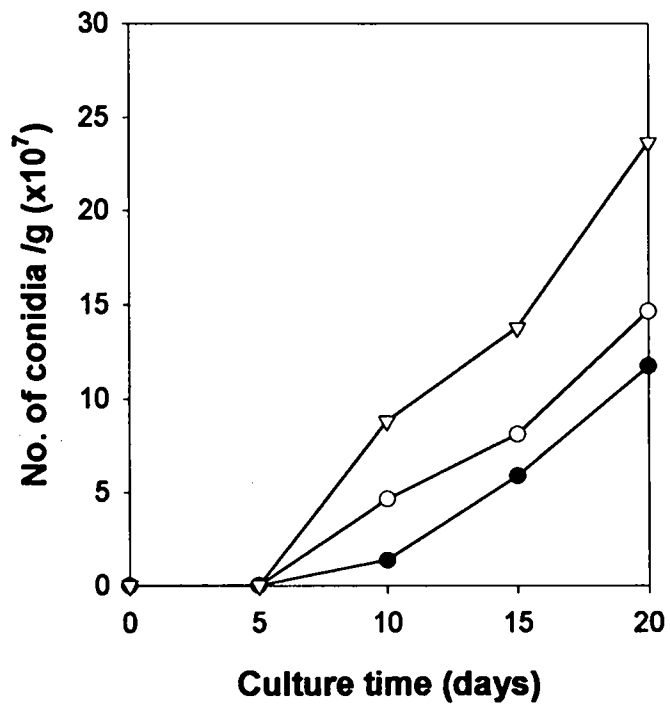


Fig. 98. Numbers of *Beauveria bassiana* conidia culturing on rice bran solid media at various humidities. ○-○; 40%, ●-●; 50%, ▽-▽; 60%

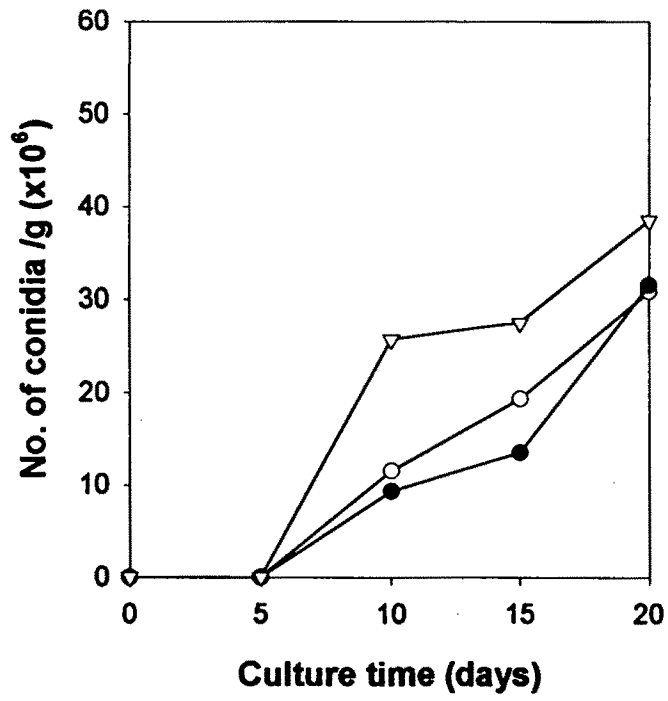


Fig. 99. Numbers of *Beauveria bassiana* conidia culturing on compost solid media at various humidities. ○-○; 40%, ●-●; 50%, ▽-▽; 60%

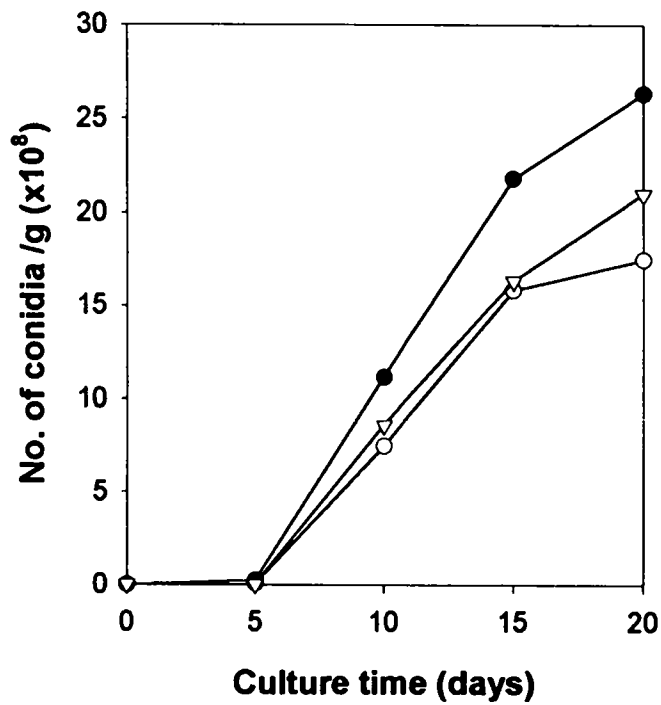


Fig. 100. Numbers of *Metarhizium anisopliae* conidia culturing on rice-cooked solid media supplemented with 4%(w/w) loess at various humidities. ○-○; 40%, ●-●; 50%, ▽-▽; 60%

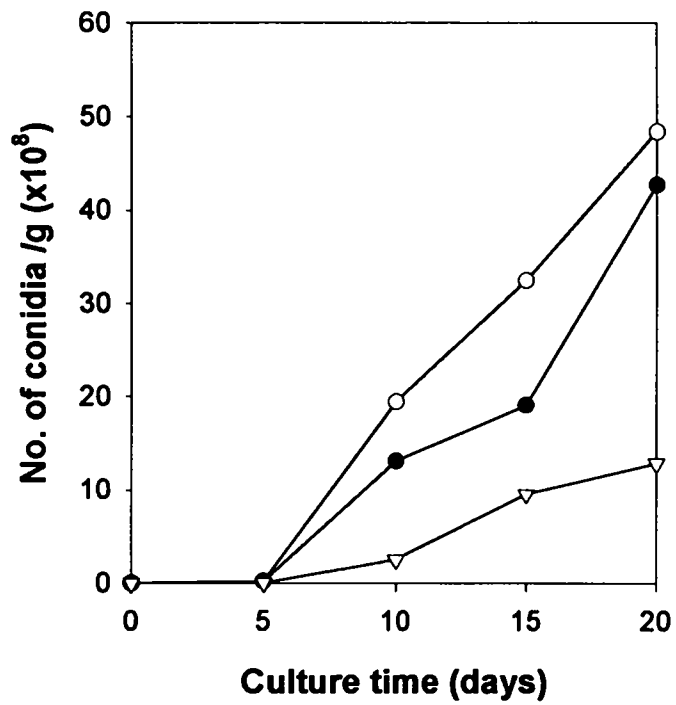


Fig. 101. Numbers of *Metarhizium anisopliae* conidia culturing on barley solid media supplemented with 4% (w/w) loess at various humidities. ○-○; 40%, ●-●; 50%, ▽-▽; 60%

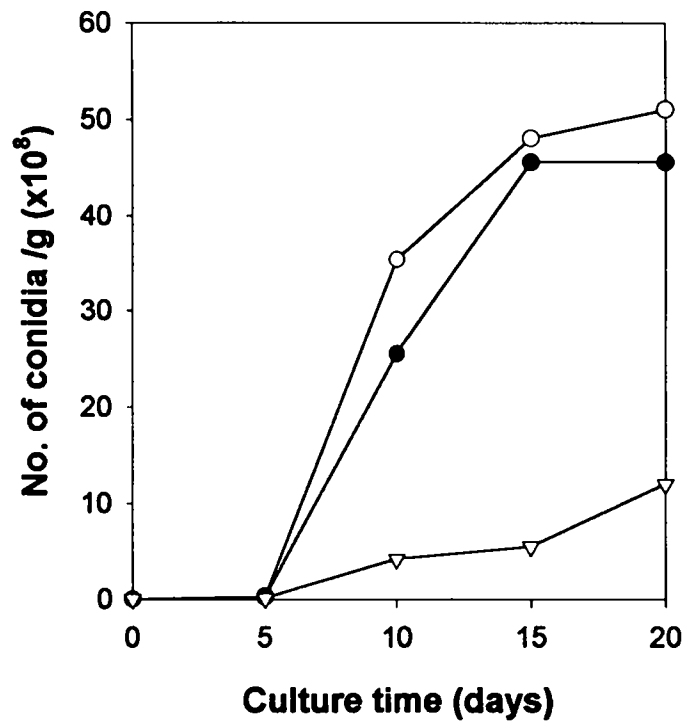


Fig. 102. Numbers of *Metarhizium anisopliae* conidia culturing on wheat solid media supplemented with 4% (w/w) loess at various humidities. ○-○; 40%, ●-●; 50%, ▽-▽; 60%

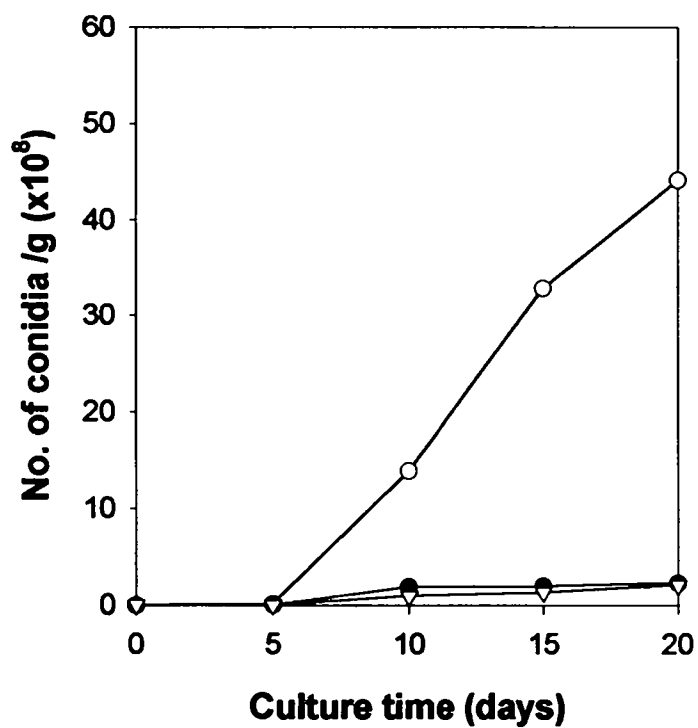


Fig. 103. Numbers of *Metarhizium anisopliae* conidia culturing on corn solid media supplemented with 4% (w/w) loess at various humidities. ○-○; 40%, ●-●; 50%, ▽-▽; 60%

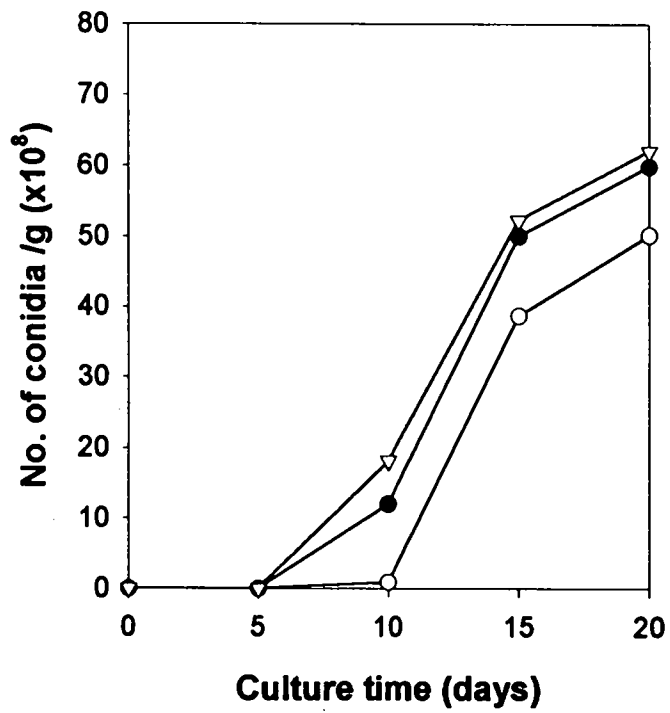


Fig. 104. Numbers of *Metarhizium anisopliae* conidia culturing on rice bran solid media supplemented with 4% (w/w) loess at various humidities. ○-○; 40%, ●-●; 50%, ▽-▽; 60%

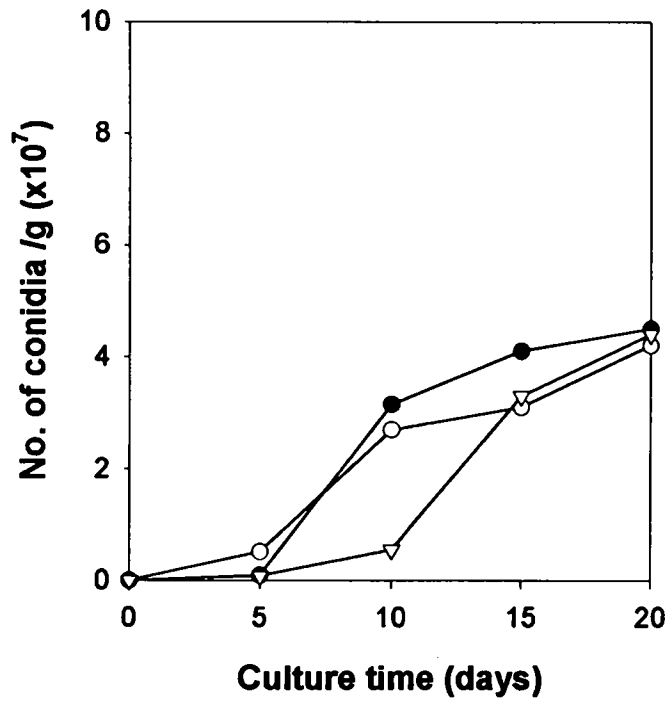


Fig. 105. Numbers of *Metarhizium anisopliae* conidia culturing on compost solid media supplemented with 4% (w/w) loess at various humidities. ○-○; 40%, ●-●; 50%, ▽-▽; 60%

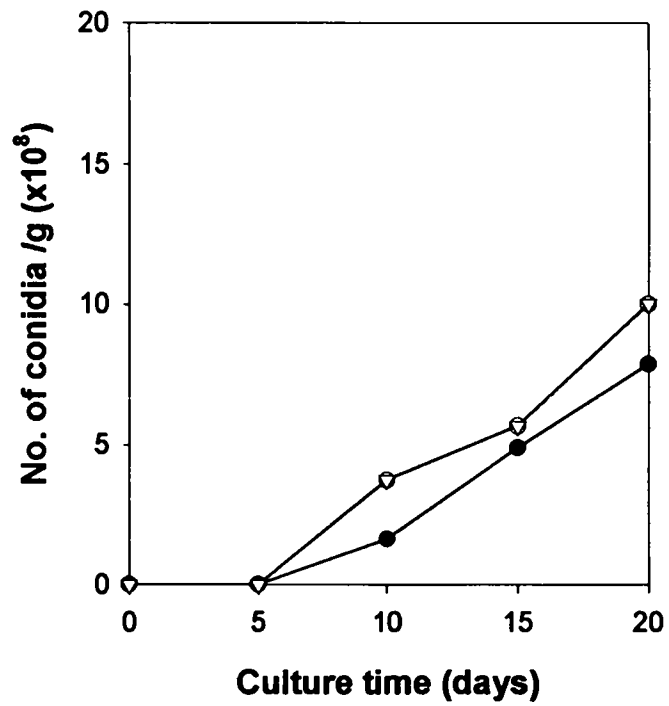


Fig. 106. Numbers of *Beauveria bassiana* conidia culturing on rice-cooked solid media supplemented with 4% (w/w) loess at various humidities. ○-○; 40%, ●-●; 50%, ▽-▽; 60%

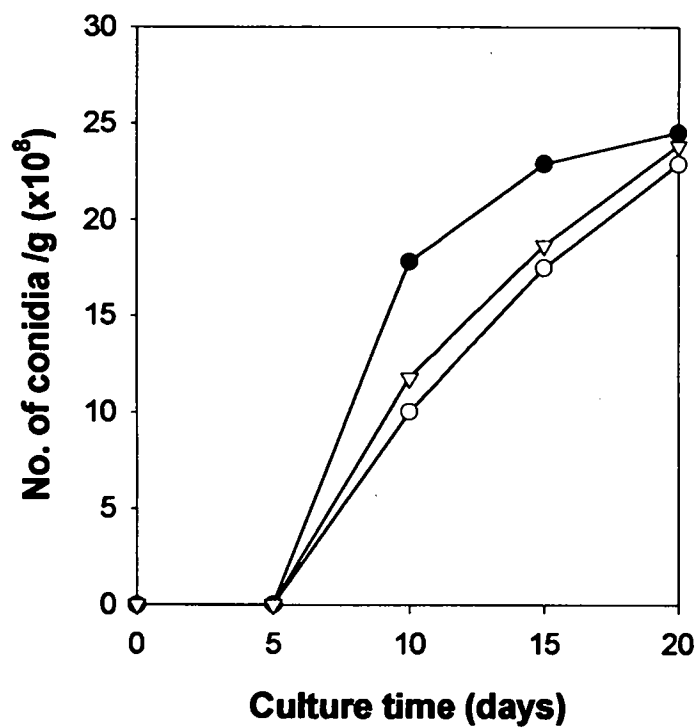


Fig. 107. Numbers of *Beauveria bassiana* conidia culturing on barley solid media supplemented with 4% (w/w) loess at various humidities. ○-○; 40%, ●-●; 50%, ▽-▽; 60%

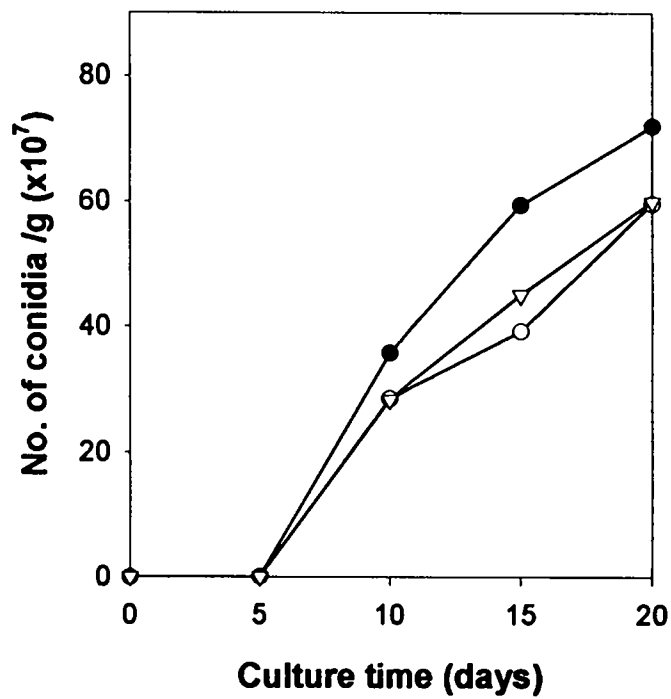


Fig. 108. Numbers of *Beauveria bassiana* conidia culturing on wheat solid media supplemented with 4% (w/w) loess at various humidities. ○-○; 40%, ●-●; 50%, ▽-▽; 60%

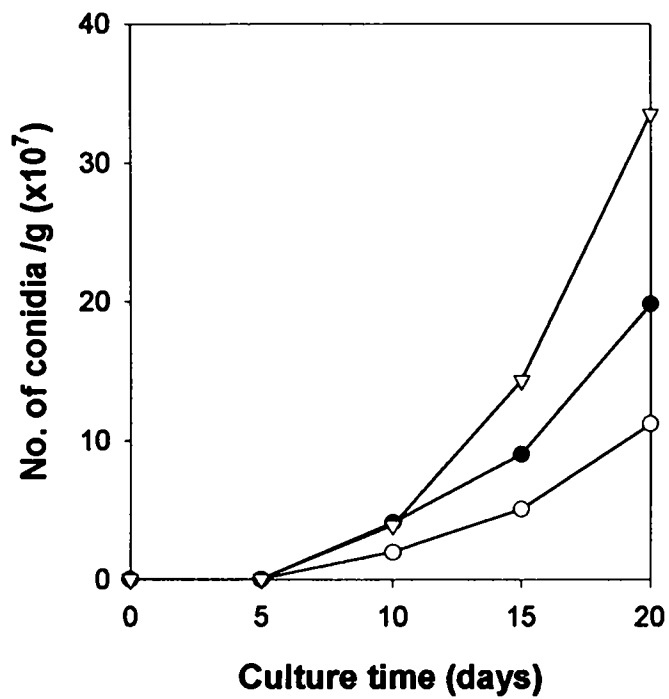


Fig. 109. Numbers of *Beauveria bassiana* conidia culturing on corn solid media supplemented with 4% (w/w) loess at various humidities. ○-○; 40%, ●-●; 50%, ▽-▽; 60%

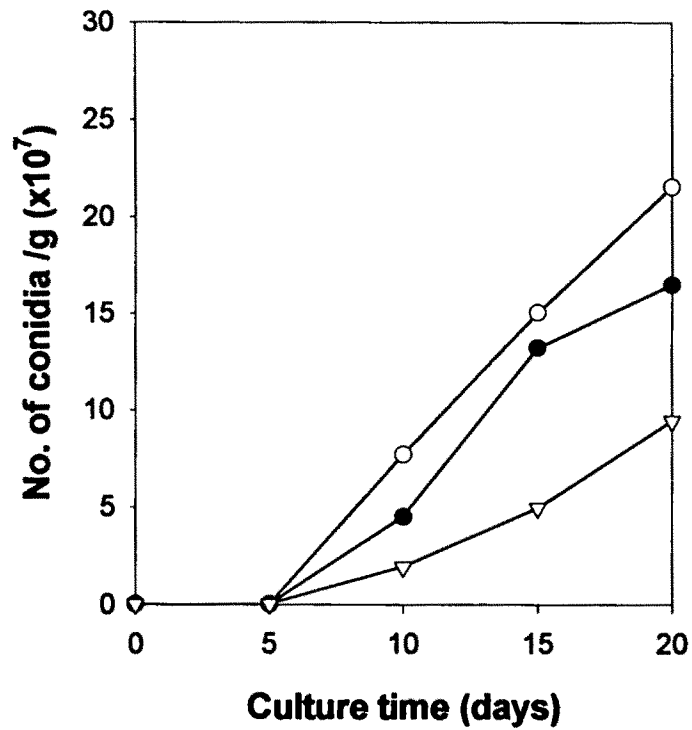


Fig. 110. Numbers of *Beauveria bassiana* conidia culturing on rice bran solid media supplemented with 4% (w/w) loess at various humidities. ○-○; 40%, ●-●; 50%, ▽-▽; 60%

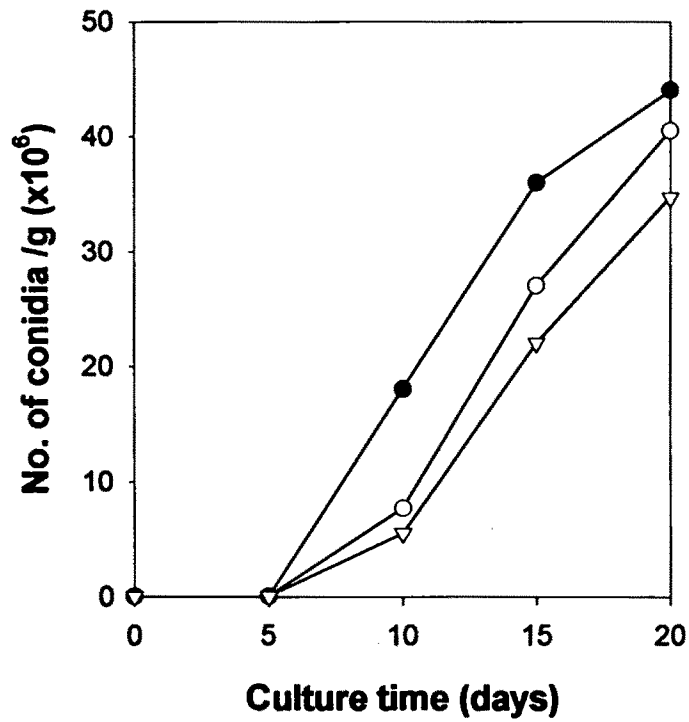


Fig. 111. Numbers of *Beauveria bassiana* conidia culturing on compost solid media supplemented with 4% (w/w) loess at various humidities. ○-○; 40%, ●-●; 50%, ▽-▽; 60%

제 16절. 사상균의 장기보관 및 제재화를 위한 증량제 개발

본 연구에서는 발효공정을 통하여 생산된 살충성 사상균의 균체 혹은 conidia를 장기 보관하기 위하여 또한 균주의 제재화를 위한 적절한 희석공정을 위하여 증량제를 개발하고자 한다. 증량제의 재료로서는 zeolite, loess, kaoline, talc, diatomite, bentonite, 쌀겨 등을 이용하였다. 각각의 증량제에 대한 살충성 사상균의 포자생존율을 조사한 결과 보관온도, 균주종류, 배지종류, 증량제의 종류 등에 따라 큰 차이를 보였다. 즉 25℃에서 6개월간 장기보관했을 때 *B. bassiana* 균주는 증량제로서는 diatomite에서, 성장배지로서는 쌀겨 혹은 밀에서 배양했을 때 가장 보존 안정성이 높은 것으로 나타났다(Fig. 112-118). 또한 *M. anisopliae* 균주는 증량제로서는 bentonite와 diatomite에서, 성장배지로서는 쌀과 보리에서 배양했을 때 가장 보존 안정성이 높은 것으로 나타났다(Fig. 119-125). 한편 4℃에서 6개월간 장기보관했을 때 *B. bassiana* 균주는 증량제와 성장배지에 관계없이 대부분 90% 이상의 보존 안정성을 나타내었다(Table 11-17). 마찬가지로 *M. anisopliae*에서도 증량제와 성장배지에 관계없이 90% 이상의 보존 안정성을 나타내었다(Table 18-24).

제 17절. 사상균의 화학농약에 대한 안정성

살충성 사상균을 생물농약으로서 단독으로 이용할 경우도 있지만 화학적으로 합성된 살충제, 살균제, 제초제와 혼용 사용 혹은 비슷한 시기에 화학농약이 사용될 경우가 있다. 따라서 본 과제에서 개발한 살충성 사상균 생물농약이 효과적으로 이용되기 위해서는 화학농약에 대한 안정성 여부를 검토할 필요가 있다. 본 연구를 수행하기 위한 연구방법은 현재 시중에 유통중인 산마루(수화제), 엘산(유제) 등 살충제 9종과 포름디(수화제), 산요루(유제) 등 살균제 8종 및 그라복손(액제), 스톱프(유제), 탠드마스타(액제)와 같은 제초제 3종을 구입하여 이들을 토양에서 사용되는 농도의 0.1, 1, 10배 약량으로 PDA배지와 혼합하여 평판배지를 제조하였다. 여기에 적절히 희석한 *B. bassiana* 및 *M. anisopliae*의 conidia를 도말하여 25℃에서 3~5일간 항온배양하면서 성장한 개체수를 측정하여 생존율을 계산하였다.

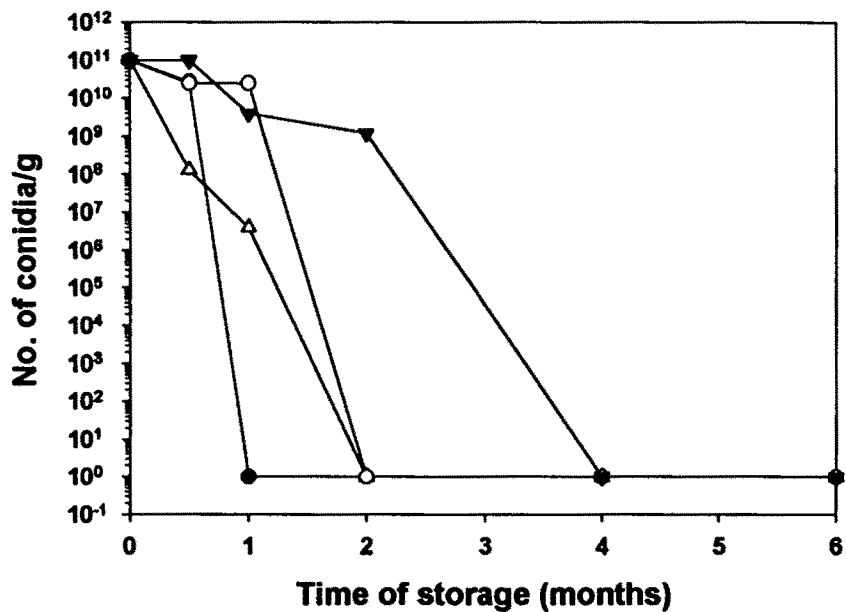


Fig. 112. Survival numbers of *Beauveria bassiana* conidia during the 6 months storage at 25°C with zeolite, a carrier molecule, after culturing in each solid medium. All data were means of three replicate. Symbols denote culture media based on as followings: ●-●, rice; △-△, barley; ○-○, wheat; ▼-▼, rice bran.

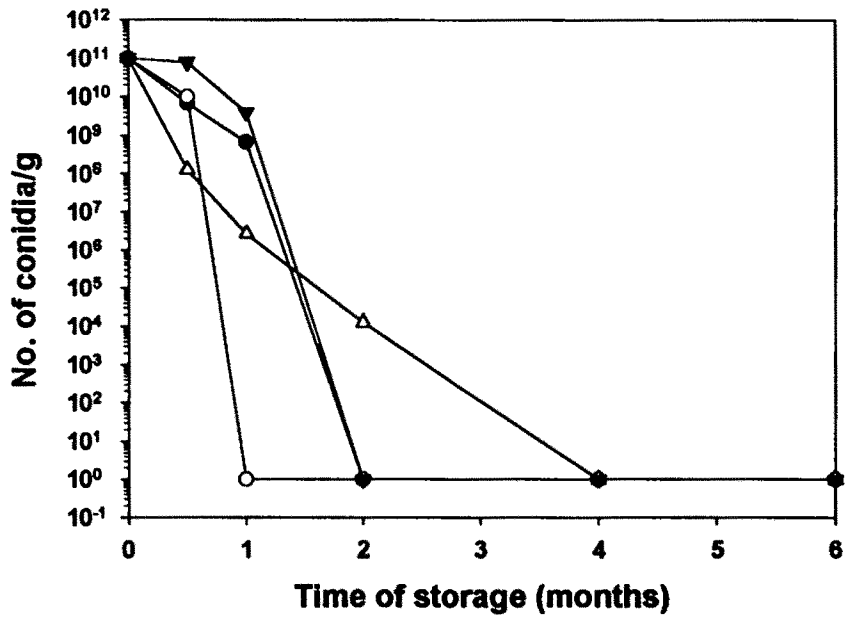


Fig. 113. Survival numbers of *Beauveria bassiana* conidia during the 6 months storage at 25°C with loess, a carrier molecule, after culturing in each solid medium. All data were means of three replicate. Symbols denote culture media based on as followings: ● -●, rice; △-△, barley; ○-○, wheat; ▼-▼, rice bran.

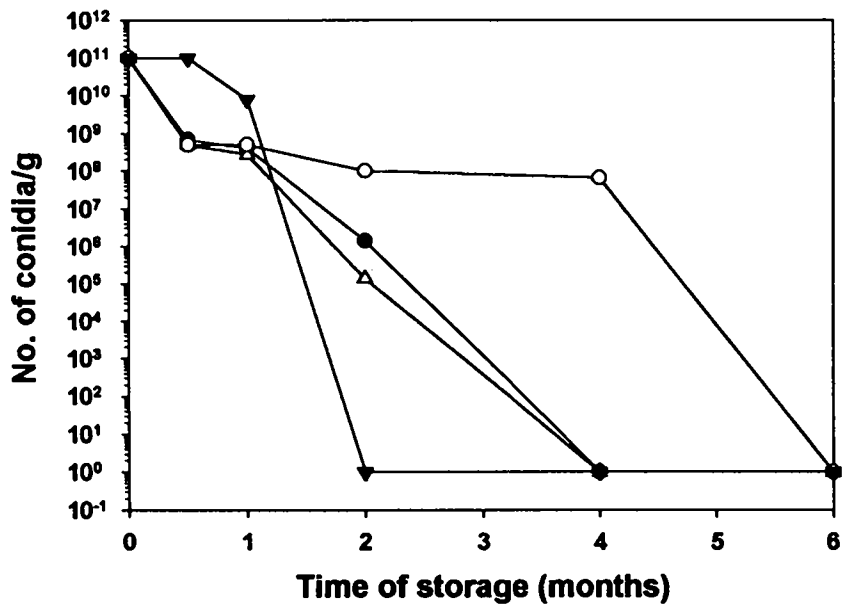


Fig. 114. Survival numbers of *Beauveria bassiana* conidia during the 6 months storage at 25°C with talc, a carrier molecule, after culturing in each solid medium. All data were means of three replicate. Symbols denote culture media based on as followings: ● -●, rice; △-△, barley; ○-○, wheat; ▼-▼, rice bran.

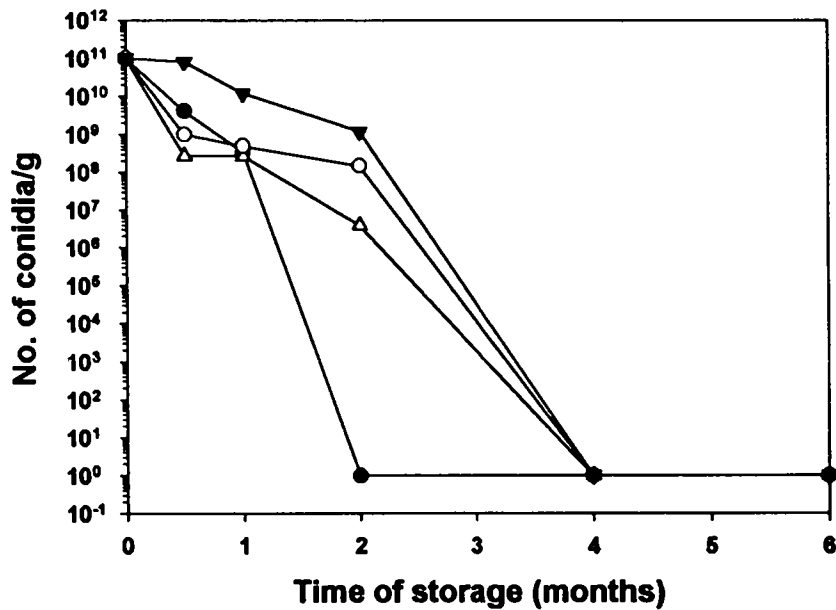


Fig. 115. Survival numbers of *Beauveria bassiana* conidia during the 6 months storage at 25°C with kaoline, a carrier molecule, after culturing in each solid medium. All data were means of three replicate. Symbols denote culture media based on as followings: ● -●, rice; △-△, barley; ○-○, wheat; ▼-▼, rice bran.

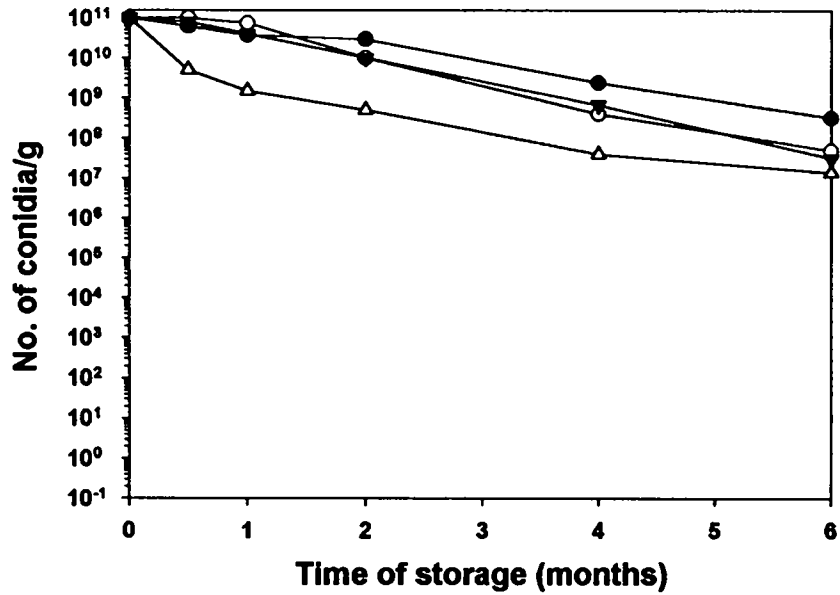


Fig. 116. Survival numbers of *Beauveria bassiana* conidia during the 6 months storage at 25°C with diatomite, a carrier molecule, after culturing in each solid medium. All data were means of three replicate. Symbols denote culture media based on as followings: ●-●, rice; △-△, barley; ○-○, wheat; ▼-▼, rice bran.

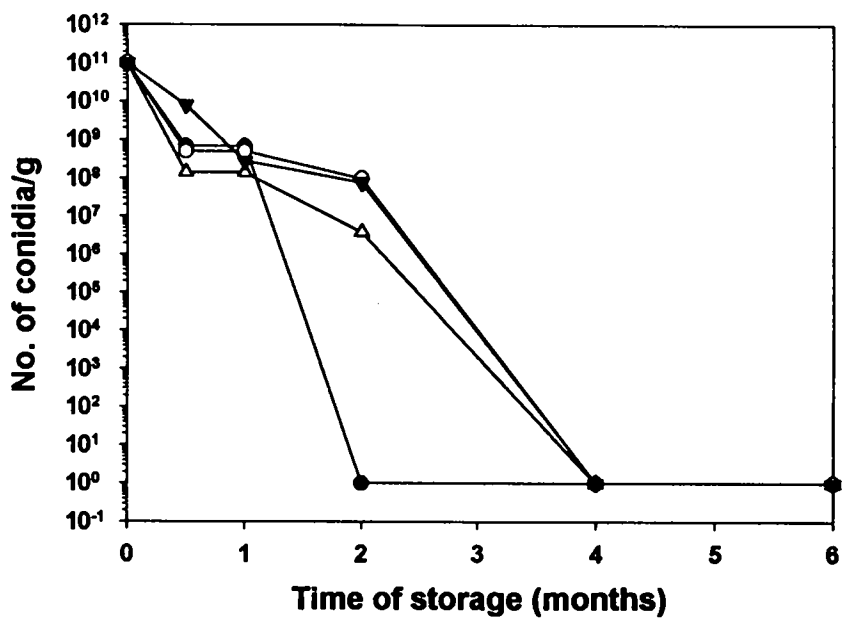


Fig. 117. Survival numbers of *Beauveria bassiana* conidia during the 6 months storage at 25°C with bentonite, a carrier molecule, after culturing in each solid medium. All data were means of three replicate. Symbols denote culture media based on as followings: ●-●, rice; △-△, barley; ○-○, wheat; ▼-▼, rice bran.

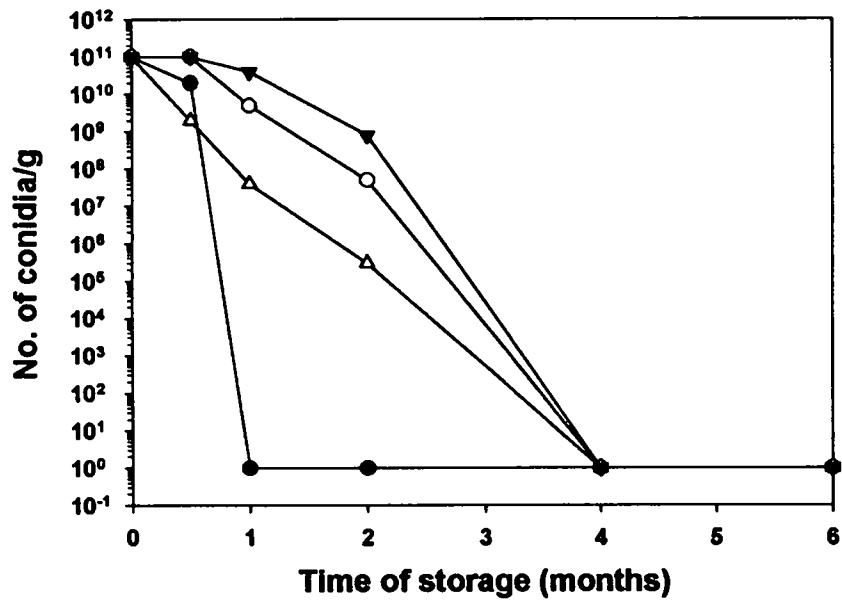


Fig. 118. Survival numbers of *Beauveria bassiana* conidia during the 6 months storage at 25°C with rice bran, a carrier molecule, after culturing in each solid medium. All data were means of three replicate. Symbols denote culture media based on as followings: ●-●, rice; △-△, barley; ○-○, wheat; ▼-▼, rice bran.

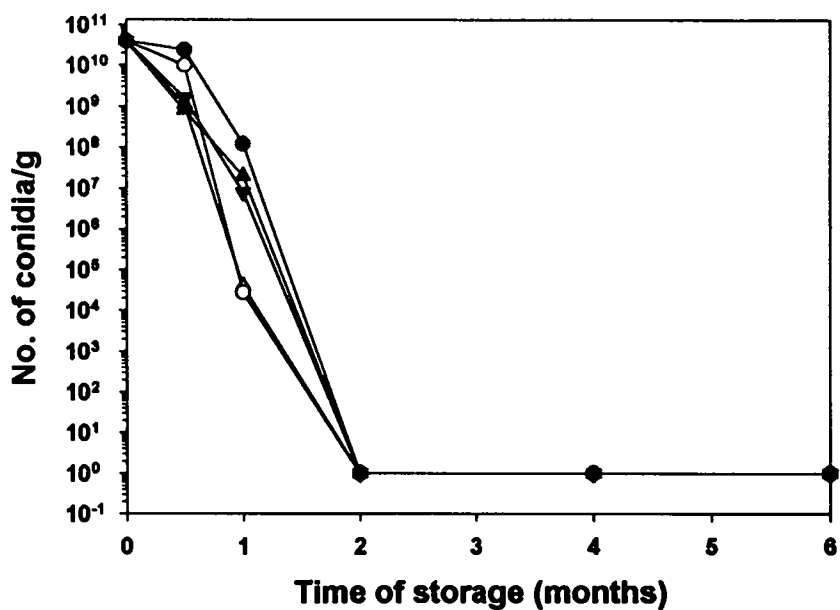


Fig. 119. Survival numbers of *Metarhizium anisopliae* conidia during the 6 months storage at 25°C with zeolite, a carrier molecule, after culturing in each solid medium. All data were means of three replicate. Symbols denote culture media based on as followings: ●-●, rice; △-△, barley; ○-○, wheat; ▲-▲, corn; ▼-▼, rice bran.

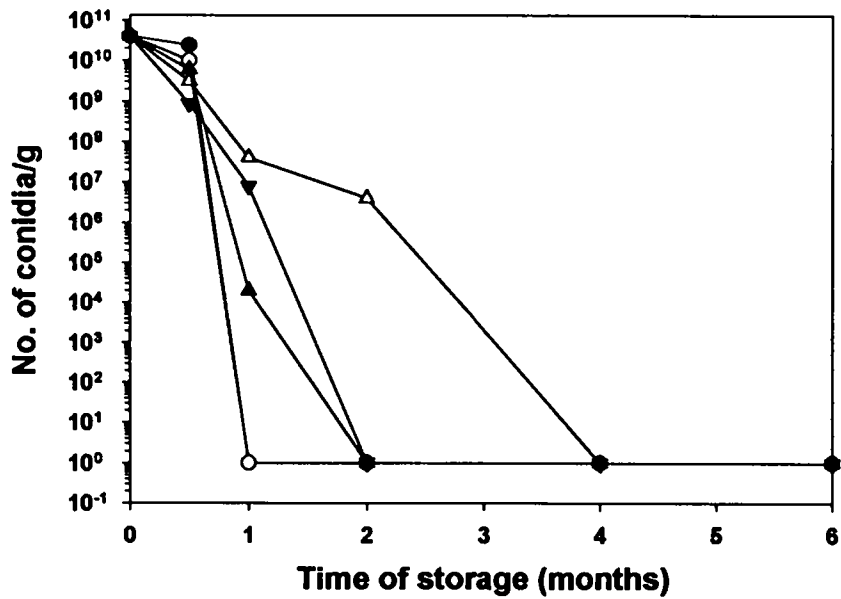


Fig. 120. Survival numbers of *Metarhizium anisopliae* conidia during the 6 months storage at 25°C with loess, a carrier molecule, after culturing in each solid medium. All data were means of three replicate. Symbols denote culture media based on as followings: ●-●, rice; △-△, barley; ○-○, wheat; ▲-▲, corn; ▼-▼, rice bran.

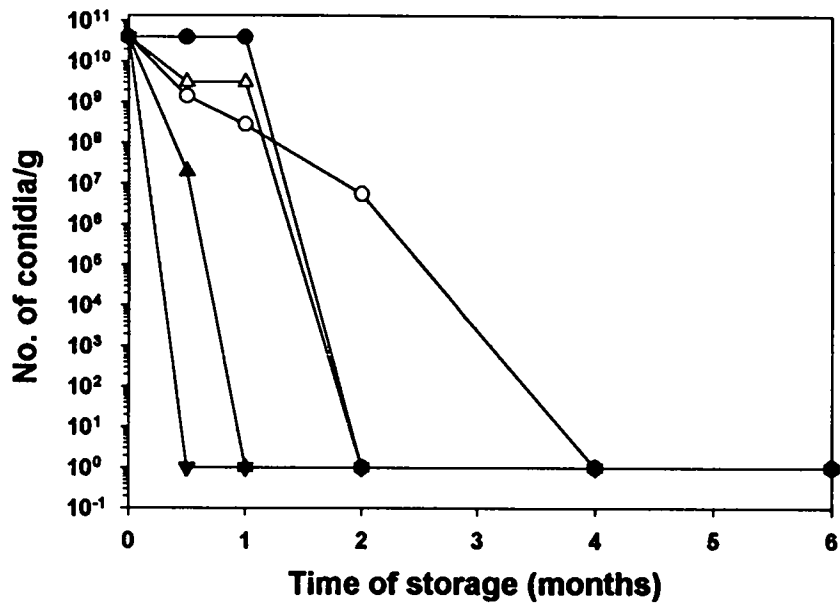


Fig. 121. Survival numbers of *Metarhizium anisopliae* conidia during the 6 months storage at 25°C with talc, a carrier molecule, after culturing in each solid medium. All data were means of three replicate. Symbols denote culture media based on as followings: ●-●, rice; △-△, barley; ○-○, wheat; ▲-▲, corn; ▼-▼, rice bran.

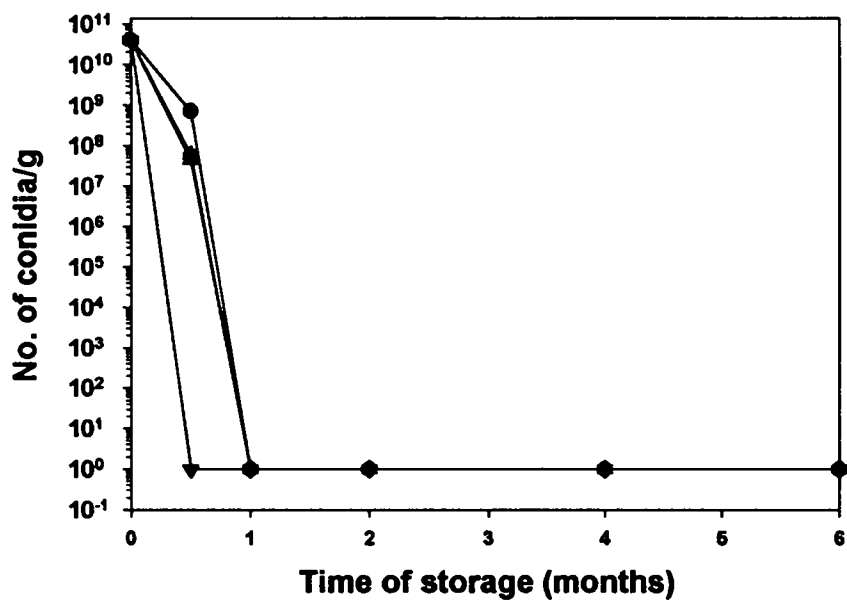


Fig. 122. Survival numbers of *Metarhizium anisopliae* conidia during the 6 months storage at 25°C with kaoline, a carrier molecule, after culturing in each solid medium. All data were means of three replicate. Symbols denote culture media based on as followings: ●-●, rice; △-△, barley; ○-○, wheat; ▲-▲, corn; ▼-▼, rice bran.

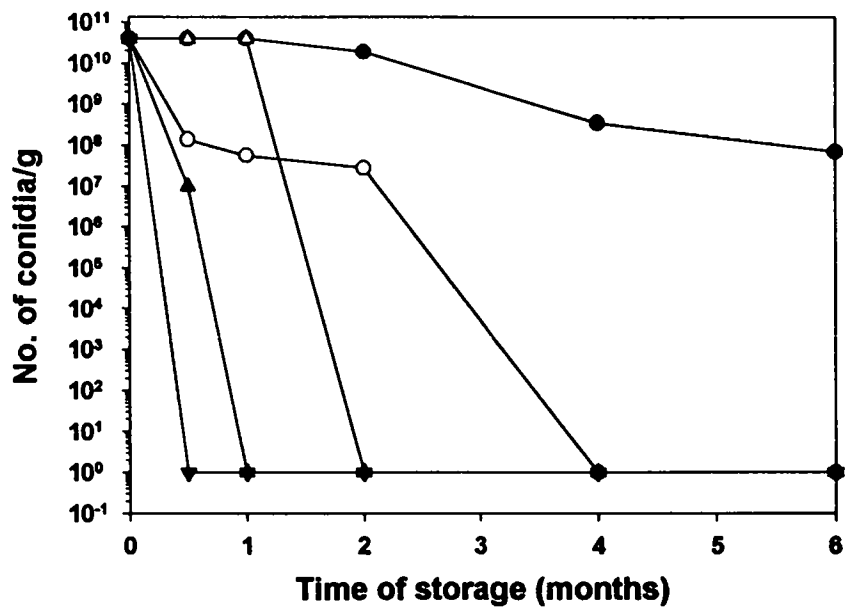


Fig. 123. Survival numbers of *Metarhizium anisopliae* conidia during the 6 months storage at 25°C with diatomite, a carrier molecule, after culturing in each solid medium. All data were means of three replicate. Symbols denote culture media based on as followings: ●-●, rice; △-△, barley; ○-○, wheat; ▲-▲, corn; ▼-▼, rice bran.

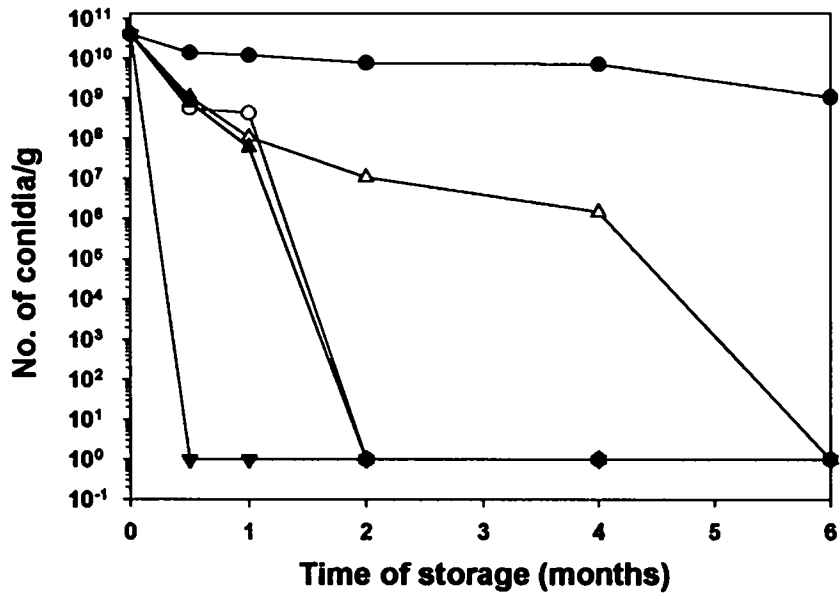


Fig. 124. Survival numbers of *Metarhizium anisopliae* conidia during the 6 months storage at 25°C with bentonite, a carrier molecule, after culturing in each solid medium. All data were means of three replicate. Symbols denote culture media based on as followings: ●-●, rice; △-△, barley; ○-○, wheat; ▲-▲, corn; ▼-▼, rice bran.

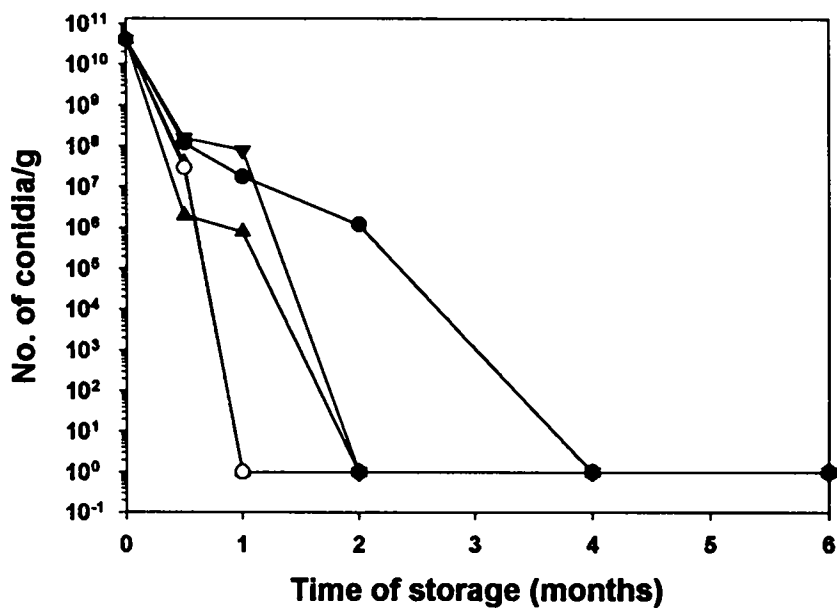


Fig. 125. Survival numbers of *Metarhizium anisopliae* conidia during the 6 months storage at 25°C with rice bran, a carrier molecule, after culturing in each solid medium. All data were means of three replicate. Symbols denote culture media based on as followings: ●-●, rice; △-△, barley; ○-○, wheat; ▲-▲, corn; ▼-▼, rice bran.

Table 11. Survival numbers of *Beauveria bassiana* conidia during the storage at 4°C with zeolite, a carrier molecule, after culturing in each solid medium below.

Storage time Culture Media	0 month (No. of conidia/g)	1 month (No. of conidia/g)	2 months (No. of conidia/g)	6 months (No. of conidia/g)
Rice	1.0×10^{10}	1.0×10^{10}	1.0×10^{10}	1.0×10^{10}
Barly	1.0×10^9	1.0×10^9	1.0×10^9	1.0×10^9
Wheat	1.1×10^{11}	1.1×10^{11}	1.1×10^{11}	1.0×10^{11}
Corn	4.0×10^{10}	2.0×10^{10}	7.0×10^9	7.0×10^9
Rice bran	3.0×10^{10}	2.0×10^{10}	1.0×10^{10}	1.0×10^{10}

Table 12. Survival numbers of *Beauveria bassiana* conidia during the storage at 4°C with loess, a carrier molecule, after culturing in each solid medium below.

Storage time Culture Media	0 month (No. of conidia/g)	1 month (No. of conidia/g)	2 months (No. of conidia/g)	6 months (No. of conidia/g)
Rice	3.0×10^{10}	1.0×10^{10}	1.0×10^{10}	1.0×10^{10}
Barly	1.2×10^{10}	1.1×10^{10}	1.1×10^{10}	1.1×10^{10}
Wheat	2.1×10^{11}	4.0×10^{10}	2.0×10^{10}	2.0×10^{10}
Corn	6.0×10^{10}	4.5×10^{10}	4.0×10^{10}	4.0×10^{10}
Rice bran	1.2×10^{11}	9.0×10^{10}	7.0×10^{10}	1.0×10^{10}

Table 13. Survival numbers of *Beauveria bassiana* conidia during the storage at 4°C with talc, a carrier molecule, after culturing in each solid medium below.

Storage time Culture Media	0 month (No. of conidia/g)	1 month (No. of conidia/g)	2 months (No. of conidia/g)	6 months (No. of conidia/g)
Rice	2.0×10^9	2.0×10^9	2.0×10^9	2.0×10^9
Barly	1.0×10^{10}	1.0×10^{10}	1.0×10^{10}	1.0×10^{10}
Wheat	8.0×10^{10}	7.6×10^{10}	7.0×10^{10}	7.0×10^{10}
Corn	1.3×10^{11}	1.3×10^{11}	1.1×10^{11}	1.0×10^{11}
Rice bran	7.0×10^{10}	6.3×10^{10}	6.0×10^{10}	6.0×10^{10}

Table 14. Survival numbers of *Beauveria bassiana* conidia during the storage at 4°C with kaoline, a carrier molecule, after culturing in each solid medium below.

Storage time Culture Media	0 month (No. of conidia/g)	1 month (No. of conidia/g)	2 months (No. of conidia/g)	6 months (No. of conidia/g)
Rice	2.0×10^{10}	2.0×10^{10}	2.0×10^{10}	2.0×10^{10}
Barly	1.0×10^{10}	1.0×10^{10}	1.0×10^{10}	1.0×10^{10}
Wheat	4.0×10^{10}	2.6×10^{10}	1.0×10^{10}	1.0×10^{10}
Corn	2.0×10^{10}	2.0×10^{10}	2.0×10^{10}	2.0×10^{10}
Rice bran	7.0×10^{10}	3.2×10^{10}	1.0×10^{10}	1.0×10^{10}

Table 15. Survival numbers of *Beauveria bassiana* conidia during the storage at 4°C with diatomite, a carrier molecule, after culturing in each solid medium below.

Storage time Culture Media	0 month (No. of conidia/g)	1 month (No. of conidia/g)	2 months (No. of conidia/g)	6 months (No. of conidia/g)
Rice	1.1×10^{10}	1.1×10^{10}	1.1×10^{10}	1.1×10^{10}
Barly	1.5×10^{10}	1.3×10^{10}	1.0×10^{10}	1.0×10^{10}
Wheat	1.0×10^{10}	5.0×10^9	3.0×10^9	3.0×10^9
Corn	2.0×10^9	2.0×10^9	2.0×10^9	2.0×10^9
Rice bran	6.5×10^{10}	6.0×10^{10}	5.0×10^{10}	5.0×10^{10}

Table 16. Survival numbers of *Beauveria bassiana* conidia during the storage at 4°C with bentonite, a carrier molecule, after culturing in each solid medium below.

Storage time Culture Media	0 month (No. of conidia/g)	1 month (No. of conidia/g)	2 months (No. of conidia/g)	6 months (No. of conidia/g)
Rice	4.0×10^{10}	4.0×10^{10}	4.0×10^{10}	4.0×10^{10}
Barly	4.0×10^{10}	3.4×10^{10}	3.0×10^{10}	3.0×10^{10}
Wheat	1.7×10^{11}	1.7×10^{11}	1.7×10^{11}	1.7×10^{11}
Corn	5.0×10^{10}	4.6×10^{10}	4.0×10^{10}	4.0×10^{10}
Rice bran	1.0×10^{10}	1.0×10^{10}	1.0×10^{10}	1.0×10^{10}

Table 17. Survival numbers of *Beauveria bassiana* conidia during the storage at 4°C with rice bran, a carrier molecule, after culturing in each solid medium below.

Storage time Culture Media	0 month (No. of conidia/g)	1 month (No. of conidia/g)	2 months (No. of conidia/g)	6 months (No. of conidia/g)
Rice	1.0×10^{10}	1.0×10^{10}	1.0×10^{10}	1.0×10^{10}
Barly	1.1×10^{11}	2.0×10^{10}	1.0×10^{10}	1.0×10^{10}
Wheat	4.0×10^{10}	2.7×10^{10}	2.0×10^{10}	2.0×10^{10}
Corn	1.3×10^{11}	2.1×10^{10}	2.0×10^{10}	2.0×10^{10}
Rice bran	1.6×10^{11}	3.2×10^{10}	1.0×10^{10}	1.0×10^{10}

Table 18. Survival numbers of *Metarhizium anisopliae* conidia during the storage at 4°C with zeolite, a carrier molecule, after culturing in each solid medium below.

Storage time Culture Media	0 month (No. of conidia/g)	1 month (No. of conidia/g)	2 months (No. of conidia/g)	6 months (No. of conidia/g)
Rice	1.9×10^{13}	1.9×10^{13}	1.9×10^{13}	1.9×10^{13}
Barly	3.8×10^{13}	3.8×10^{13}	3.8×10^{13}	3.8×10^{13}
Wheat	3.2×10^{13}	2.7×10^{13}	2.5×10^{13}	2.5×10^{13}
Corn	1.7×10^{13}	1.7×10^{13}	1.7×10^{13}	1.7×10^{13}
Rice bran	2.0×10^{13}	2.0×10^{13}	2.0×10^{13}	2.0×10^{13}

Table 19. Survival numbers of *Metarhizium anisopliae* conidia during the storage at 4°C with loess, a carrier molecule, after culturing in each solid medium below.

Storage time Culture Media	0 month (No. of conidia/g)	1 month (No. of conidia/g)	2 months (No. of conidia/g)	6 months (No. of conidia/g)
Rice	3.7×10^{12}	3.7×10^{12}	3.7×10^{12}	3.7×10^{12}
Barly	4.1×10^{13}	3.7×10^{13}	3.2×10^{13}	3.2×10^{13}
Wheat	5.1×10^{13}	4.5×10^{13}	4.1×10^{13}	4.1×10^{13}
Corn	2.6×10^{13}	2.3×10^{13}	2.2×10^{13}	2.2×10^{13}
Rice bran	1.3×10^{13}	1.2×10^{13}	7.8×10^{12}	7.8×10^{12}

Table 20. Survival numbers of *Metarhizium anisopliae* conidia during the storage at 4°C with talc, a carrier molecule, after culturing in each solid medium below.

Storage time Culture Media	0 month (No. of conidia/g)	1 month (No. of conidia/g)	2 months (No. of conidia/g)	6 months (No. of conidia/g)
Rice	3.4×10^{13}	3.1×10^{13}	3.0×10^{13}	3.0×10^{13}
Barly	1.2×10^{13}	1.2×10^{13}	1.2×10^{13}	1.2×10^{13}
Wheat	3.9×10^{13}	3.9×10^{13}	3.9×10^{13}	3.9×10^{13}
Corn	2.8×10^{13}	2.1×10^{13}	1.9×10^{13}	1.9×10^{13}
Rice bran	1.9×10^{13}	1.9×10^{13}	1.9×10^{13}	1.9×10^{13}

Table 21. Survival numbers of *Metarhizium anisopliae* conidia during the storage at 4°C with kaoline, a carrier molecule, after culturing in each solid medium below.

Storage time Culture Media	0 month (No. of conidia/g)	1 month (No. of conidia/g)	2 months (No. of conidia/g)	6 months (No. of conidia/g)
Rice	8.7×10^{12}	6.3×10^{12}	3.9×10^{12}	3.9×10^{12}
Barly	3.7×10^{13}	3.1×10^{13}	2.9×10^{13}	2.9×10^{13}
Wheat	5.5×10^{13}	4.8×10^{13}	4.6×10^{13}	4.6×10^{13}
Corn	1.9×10^{13}	1.9×10^{13}	1.9×10^{13}	1.9×10^{13}
Rice bran	3.8×10^{13}	3.7×10^{13}	3.7×10^{13}	3.7×10^{13}

Table 22. Survival numbers of *Metarhizium anisopliae* conidia during the storage at 4°C with diatomite, a carrier molecule, after culturing in each solid medium below.

Storage time Culture Media	0 month (No. of conidia/g)	1 month (No. of conidia/g)	2 months (No. of conidia/g)	6 months (No. of conidia/g)
Rice	4.2×10^{12}	4.1×10^{12}	3.9×10^{12}	3.9×10^{12}
Barly	2.2×10^{12}	2.0×10^{12}	1.7×10^{12}	1.7×10^{12}
Wheat	4.5×10^{12}	4.3×10^{12}	4.3×10^{12}	4.3×10^{12}
Corn	9.4×10^{12}	9.4×10^{12}	9.4×10^{12}	9.4×10^{12}
Rice bran	8.9×10^{12}	8.9×10^{12}	8.9×10^{12}	8.9×10^{12}

Table 23. Survival numbers of *Metarhizium anisopliae* conidia during the storage at 4°C with bentonite, a carrier molecule, after culturing in each solid medium below.

Storage time Culture Media	0 month (No. of conidia/g)	1 month (No. of conidia/g)	2 months (No. of conidia/g)	6 months (No. of conidia/g)
Rice	6.1×10^{12}	6.1×10^{12}	6.1×10^{12}	6.1×10^{12}
Barly	2.0×10^{12}	2.0×10^{12}	2.0×10^{12}	2.0×10^{12}
Wheat	4.2×10^{12}	4.1×10^{12}	4.1×10^{12}	4.1×10^{12}
Corn	4.1×10^{12}	4.1×10^{12}	4.1×10^{12}	4.1×10^{12}
Rice bran	8.9×10^{12}	8.9×10^{12}	8.9×10^{12}	8.9×10^{12}

Table 24. Survival numbers of *Metarhizium anisopliae* conidia during the storage at 4°C with rice bran, a carrier molecule, after culturing in each solid medium below.

Storage time Culture Media	0 month (No. of conidia/g)	1 month (No. of conidia/g)	2 months (No. of conidia/g)	6 months (No. of conidia/g)
Rice	1.5×10^{13}	1.5×10^{13}	1.5×10^{13}	1.5×10^{13}
Barly	1.3×10^{13}	1.3×10^{13}	1.3×10^{13}	1.3×10^{13}
Wheat	1.3×10^{13}	1.1×10^{13}	1.1×10^{13}	1.1×10^{13}
Corn	3.5×10^{12}	3.1×10^{12}	2.9×10^{12}	2.9×10^{12}
Rice bran	7.3×10^{12}	7.3×10^{12}	7.3×10^{12}	7.3×10^{12}

연구결과를 보면 *B. bassiana*의 경우 살충제에서는 키펀다를 제외하고는 대체로 80% 이상의 높은 생존율을 보였다(Table 25). 살균제와 제초제에서는 시험된 11종 전부 80% 내외의 높은 생존율을 보였으며, 특히 제초제의 경우는 10배의 약량에서도 전부 100%의 생존율을 보였다(Table 26, 27). 또한 *M. anisopliae*의 경우에도 살충제에서는 키펀다를 제외하고는 거의 100%의 생존율을 보였다(Table 28). 살균제에서는 헥사코나졸(액상수화제)에서 0%, 스포르곤(수화제)에서 50% 내외의 생존율을 보였으나 나머지는 80% 이상의 높은 생존율을 보여주었다(Table 29). 제초제에서도 대체로 90% 내외의 높은 생존율을 보여주었다(Table 30). 이상의 결과를 종합적으로 분석해보면 살충성 사상균은 대부분의 경우 화학농약에 대해 안정한 것으로 생각된다.

제 18절. 곤충사육

1. 문제해충 사육

배추좀나방 (*Plutella xylostella*), 담배거세미나방(*Spodoptera litura*), 벼멸구 (*Nilaparvata lugens*), 쌀바구미(*Sitophilus oryzae*), 점박이응애(*Tetranychus urticae*) 등에 대해서 필요시 공급이 가능하도록 세대유지가 이루어지고 있다. 배추좀나방, 점박이응애, 벼멸구, 쌀바구미, 담배거세미나방 등은 25±2℃, 50±5%의 상대습도 조건에서 실내 사육실에서 누대 사육하고 있다.

곤충명	입수처	사육상태
배추좀나방	농업과학기술원	세대유지
담배거세미나방	작물시험장	세대유지
점박이응애	전진산업(주)	세대유지
차면지응애	원예연구소	세대유지
온실가루이	채 집	세대유지

한편 살충효과 검정을 위해서 사용되는 살충성 사상균의 대량배양은 SDAY배지에 Cork bore로 절취한 균주를 이식하여 28℃에서 지속적으로 배양하였다. 이때 사용한 공시균주는 대구

Table 25. Effect of commercially available pesticides on the conidial number and survival ratio (S. R.) of *Beauveria bassiana* when treated at the effective concentrations for the pest control.

Trade name of pesticides	Target pest	Commercially recommended concentration (1×) for the field use (dose/water)	Conidial No. and survival ratio (S. R.) of <i>Beauveria bassiana</i> determined on the PDA plate containing various concentrations of pesticides							
			0 × (control)		0.1 ×		1 ×		10 ×	
			No. of conidia	S.R. (%)	No. of conidia	S.R. (%)	No. of conidia	S.R. (%)	No. of conidia	S.R. (%)
산마루 (수화제)	응애	1 µg/ml	2.7×10 ¹²	100	2.7×10 ¹²	100	2.7×10 ¹²	100	2.1×10 ¹²	77.8
로드 (수화제)	진딧물, 배추좀나방 등	1 µg/ml	2.7×10 ¹²	100	2.7×10 ¹²	100	2.3×10 ¹²	85.2	2.3×10 ¹²	85.2
엘산 (유제)	멸구, 온실가루이 등	1 µg/ml	2.7×10 ¹²	100	2.7×10 ¹²	100	2.3×10 ¹²	85.2	2.3×10 ¹²	85.2
모노포 (액제)	응애, 진딧물 등	1 µl/ml	5.2×10 ¹²	100	5.2×10 ¹²	100	5.2×10 ¹²	100	3.4×10 ¹²	65.4
키렌다	진딧물 등	1 µg/ml	5.2×10 ¹²	100	5.2×10 ¹²	100	0	0	0	0
메소밀 (수화제)	진딧물, 담배나방	0.65 µg/ml	5.2×10 ¹²	100	5.2×10 ¹²	100	5.2×10 ¹²	100	5.2×10 ¹²	100
화스타	진딧물, 잎말이나방	1 µl/ml	5.2×10 ¹²	100	5.2×10 ¹²	100	5.2×10 ¹²	100	5.2×10 ¹²	100
메타	진딧물, 굴굴나방	1 µl/ml	5.2×10 ¹²	100	5.0×10 ¹²	96.2	4.5×10 ¹²	86.5	4.2×10 ¹²	80.8
메소밀 (유제)	진딧물, 담배나방	1 µl/ml	5.2×10 ¹²	100	4.7×10 ¹²	90.4	4.7×10 ¹²	90.4	3.8×10 ¹²	73.1

Table 26. Effect of commercially available fungicides on the conidial number and survival ratio (S. R.) of *Beauveria bassiana* when treated at the effective concentrations for the control of fungal pathogens.

Trade name of fungicides	Plant disease	Commercially recommended concentration (1×) for the field use (dose/water)	Conidial No. and survival ratio (S. R.) of <i>Beauveria bassiana</i> determined on the PDA plate containing various concentrations of fungicides							
			0 × (control)		0.1 ×		1 ×		10 ×	
			No. of conidia	S.R. (%)	No. of conidia	S.R. (%)	No. of conidia	S.R. (%)	No. of conidia	S.R. (%)
포름디 (수화제)	역병	2 µg/ml	2.7×10 ¹²	100	2.7×10 ¹²	100	2.6×10 ¹²	96.3	2.6×10 ¹²	96.3
델란티 (수화제)	접무늬 석음병	1 µg/ml	2.7×10 ¹²	100	2.7×10 ¹²	100	2.7×10 ¹²	100	2.4×10 ¹²	88.9
포름씨 (수화제)	역병	2 µg/ml	2.7×10 ¹²	100	2.7×10 ¹²	100	2.7×10 ¹²	100	2.7×10 ¹²	100
델란 (수화제)	탄저병, 흑점병 등	1 µg/ml	2.7×10 ¹²	100	2.7×10 ¹²	100	2.7×10 ¹²	100	2.3×10 ¹²	85.2
산요루 (유제)	흰가루 병	2 µg/ml	5.2×10 ¹²	100	5.2×10 ¹²	100	5.2×10 ¹²	100	3.3×10 ¹²	63.5
사프롤 (유제)	녹병, 흰가루 병 등	1 µl/ml	5.2×10 ¹²	100	4.1×10 ¹²	78.8	4.0×10 ¹²	76.9	2.3×10 ¹²	44.2
스포르곤 (수화제)	마이코 근병	1 µg/ml	5.2×10 ¹²	100	4.7×10 ¹²	90.4	4.1×10 ¹²	78.8	4.1×10 ¹²	78.8
헥사코나졸 (액상수화제)	별무늬병, 녹병 등	0.5 µl/ml	5.2×10 ¹²	100	5.2×10 ¹²	100	5.2×10 ¹²	100	0	0

Table 27. Effect of commercially available herbicides on the conidial number and survival ratio (S. R.) of *Beauveria bassiana* when treated at the effective concentrations for the weed control.

Trade name of herbicides	Target weed	Commercially recommended concentration (1×) for the field use (dose/water)	Conidial No. and survival ratio (S. R.) of <i>Beauveria bassiana</i> determined on the PDA plate containing various concentrations of herbicides							
			0 × (control)		0.1 ×		1 ×		10 ×	
			No. of conidia	S. R. (%)	No. of conidia	S. R. (%)	No. of conidia	S. R. (%)	No. of conidia	S. R. (%)
그라목슨 (액제)	잡초	2.5 µg/ml	2.7×10 ¹²	100	2.7×10 ¹²	100	2.7×10 ¹²	100	2.7×10 ¹²	100
스톱프 (유제)	광엽 잡초	3.0 µg/ml	2.7×10 ¹²	100	2.7×10 ¹²	100	2.7×10 ¹²	100	2.7×10 ¹²	100
랜드마스타 (액제)	잡초	3.7 µg/ml	2.7×10 ¹²	100	2.7×10 ¹²	100	2.7×10 ¹²	100	2.7×10 ¹²	100

Table 28. Effect of commercially available pesticides on the conidial number and survival ratio (S. R.) of *Metarhizium anisopliae* when treated at the effective concentrations for the pest control.

Trade name of pesticides	Target pest	Commercially recommended concentration (1×) for the field use (dose/water)	Conidial No. and survival ratio (S. R.) of <i>Metarhizium anisopliae</i> determined on the PDA plate containing various concentrations of pesticides							
			0 × (control)		0.1 ×		1 ×		10 ×	
			No. of conidia	S.R. (%)	No. of conidia	S.R. (%)	No. of conidia	S.R. (%)	No. of conidia	S.R. (%)
산마루 (수화제)	응애	1 µg/ml	7.7×10^{12}	100	7.7×10^{12}	100	7.7×10^{12}	100	7.4×10^{12}	96.1
로드 (수화제)	진딧물, 배추좀나방 등	1 µg/ml	7.7×10^{12}	100	7.7×10^{12}	100	7.6×10^{12}	98.7	6.4×10^{12}	83.1
열산 (유제)	벌구, 은실가루이 등	1 µg/ml	7.7×10^{12}	100	7.7×10^{12}	100	7.7×10^{12}	100	7.6×10^{12}	98.7
모노포 (액제)	응애, 진딧물 등	1 µl/ml	8.2×10^{12}	100	8.2×10^{12}	100	8.2×10^{12}	100	8.2×10^{12}	100
키렌다	진딧물 등	1 µg/ml	8.2×10^{12}	100	8.2×10^{12}	100	8.2×10^{12}	100	0	0
메소밀 (수화제)	진딧물, 담배나방	0.65 µg/ml	8.2×10^{12}	100	8.2×10^{12}	100	8.2×10^{12}	100	8.2×10^{12}	100
화스탁	진딧물, 잎말이나방	1 µl/ml	8.2×10^{12}	100	8.2×10^{12}	100	8.2×10^{12}	100	8.2×10^{12}	100
메타	진딧물, 굽글나방	1 µl/ml	8.2×10^{12}	100	8.2×10^{12}	100	8.2×10^{12}	100	8.2×10^{12}	100
메소밀 (유제)	진딧물, 담배나방	1 µl/ml	8.2×10^{12}	100	8.2×10^{12}	100	8.2×10^{12}	100	8.2×10^{12}	100

Table 29. Effect of commercially available fungicides on the conidial number and survival ratio (S. R.) of *Metarhizium anisopliae* when treated at the effective concentrations for the control of fungal pathogens.

Trade name of fungicides	Plant disease	Commercially recommended concentration (1×) for the field use (dose/water)	Conidial No. and survival ratio (S. R.) of <i>Metarhizium anisopliae</i> determined on the PDA plate containing various concentrations of fungicides							
			0 × (control)		0.1 ×		1 ×		10 ×	
			No. of conidia	S.R. (%)	No. of conidia	S.R. (%)	No. of conidia	S.R. (%)	No. of conidia	S.R. (%)
포름디 (수화제)	역병	2 µg/ml	7.7×10 ¹²	100	7.7×10 ¹²	100	7.7×10 ¹²	100	7.7×10 ¹²	100
델란티 (수화제)	접두니 색움병	1 µg/ml	7.7×10 ¹²	100	6.6×10 ¹²	85.7	6.2×10 ¹²	80.5	6.1×10 ¹²	79.2
포름씨 (수화제)	역병	2 µg/ml	7.7×10 ¹²	100	7.7×10 ¹²	100	7.0×10 ¹²	90.9	6.6×10 ¹²	85.7
델란 (수화제)	탄저병, 후검병 등	1 µg/ml	7.7×10 ¹²	100	7.7×10 ¹²	100	7.2×10 ¹²	93.5	7.1×10 ¹²	92.2
산요루 (유제)	흰가루 병	2 µg/ml	8.2×10 ¹²	100	7.4×10 ¹²	90.2	7.3×10 ¹²	89.0	6.7×10 ¹²	81.7
사프롤 (유제)	녹병, 흰가루 병 등	1 µl/ml	8.2×10 ¹²	100	8.2×10 ¹²	100	8.2×10 ¹²	100	4.2×10 ¹²	51.2
스포르곤 (수화제)	마이코 근병	1 µg/ml	8.2×10 ¹²	100	6.4×10 ¹²	78.4	4.6×10 ¹²	56.1	4.6×10 ¹²	56.1
핵사코나졸 (액상수화제)	별무니 병, 녹병 등	0.5 µl/ml	8.2×10 ¹²	100	8.2×10 ¹²	100	0	0	0	0

Table 30. Effect of commercially available herbicides on the conidial number and survival ratio (S. R.) of *Metarhizium anisopliae* when treated at the effective concentrations for the weed control.

Trade name of herbicides	Target weed	Commercially recommended concentration (1×) for the field use (dose/water)	Conidial No. and survival ratio (S. R.) of <i>Metarhizium anisopliae</i> determined on the PDA plate containing various concentrations of herbicides							
			0 × (control)		0.1 ×		1 ×		10 ×	
			No. of conidia	S.R. (%)	No. of conidia	S.R. (%)	No. of conidia	S.R. (%)	No. of conidia	S.R. (%)
그라목손 (액제)	잡초	2.5 µg/ml	7.7×10 ¹²	100	7.4×10 ¹²	96.1	7.3×10 ¹²	94.8	7.1×10 ¹²	92.2
스름프 (유제)	광엽 잡초	3.0 µg/ml	7.7×10 ¹²	100	7.7×10 ¹²	100	7.1×10 ¹²	92.2	6.1×10 ¹²	79.2
텐드마스타 (액제)	잡초	3.7 µg/ml	7.7×10 ¹²	100	7.0×10 ¹²	90.9	6.8×10 ¹²	88.3	6.5×10 ¹²	84.4

대학교에서 자체적으로 분리한 균주를 분양받은 것으로 일련번호를 부여하여 시험에 공시하였다. 균주보관은 Slant Agar를 만들어 접종하여 배양 후 5℃ 냉장상태로 보관하고, 1개월 경과할 때마다 새로 배양시킨 후 위와 동일한 방법으로 보관하였다. 살충성 사상균의 포자 현탁액 조제방법은 <1> PDA배지에서 배양된 균주를 0.1% Tween 80 용액 혹은 0.1% Tween 80과 Polyoxyethylene alkyl ether를 주성분으로하는 계면활성제 0.0025%의 혼합액을 사용하여 붓으로 균체 분리하는 과정, <2> 산업용종이(킴와이퍼스)를 이용한 일부 균사체의 여과과정, <3> 원심분리 (Hitachi CR21, 4,000rpm,10min)시켜 침전되는 포자의 수확과정, <4> Haemocytometer (Depth 0.10mm)를 사용한 포자농도 결정과정 등의 단계로 되어 있다.

2. 인공사료 개발

공시충의 원활하고 안정적인 공급을 위하여 파밤나방을 대상으로 인공사료를 개발하였다. 이것은 기본적으로 Shorey & Hale의 인공사료와 변형사료인 VI을 참조하여 본 연구진에 의해 독자적으로 개발되었으며 자세한 조성은 Table 31에 나타내었다. 개발된 사료조성에 따라 파밤나방을 배양한 결과 5대까지 누대사육이 성공적으로 수행되었다.

제 19절. 실내 살충성 검정

문제해충에 대한 살충성 사상균의 실내 검정은 복숭아혹진딧물, 벼물바구미, 쌀바구미, 점박이용애, 배추좀나방 등에 대하여 수행하였다.

1. 배추좀나방에 대한 살충력 검정

가. Spray에 의한 살충력검정 (방법-1)

실험방법은 Tween 80과 Polyoxyethylene alkyl ether를 주원료로 하는 계면활성제

Table 31. Composition of artificial fodder culturing for *Spodoptera exigua*.

Ingredients	Content developed by Shorey & Hale	Content modified to VI	Content developed by our laboratory
Agar(g)	40	28	28
Keydney bean(g)	150	150	150(Soybean)
Brewer's yeast(g)	100	80(dried yeast)	80(Torrula)
Corn powder(g)	100	-	-
Wheat germ(g)	150	150	150
Water(ml)	1,300	1,400	1,400
Methyl p-hydroxybenzonate(g)	7.6	6	6
Ascorbic acid(g)	30	18	18
Sorbic acid(g)	4.2	3	-
Wesson's salt mix.(g)	10	10	10
Formalin(ml)	8.5	4.5	-
Vitamin complex(g)	35	-	-
Potassium sorbate(g)	-	-	3

0.0025%의 혼합용액으로 포자현탁액을 제조하여 사육실에서 사육한 배추좀나방 2-3령충에 spray건을 이용하여 포자를 충체에 뿌려주었다. 다음 단계는 균이 접종된 충체를 지름 9cm 정도로 자른 배추 잎에 옮겨 사육하였으며, 3일 경과 후에 사충수를 조사하였다. 사충수 조사방법은 붓으로 충체를 접촉하여 움직이지 않으면 죽은 것으로 간주하였다. 이상의 실험은 3반복으로 실시하였으며, Table 32의 결과를 얻었다. 즉 1.0×10^8 conidia/ml 농도에서 3일만에 520번, 310번 균주가 배추좀나방에 대해 각각 89.3% 및 50.0%의 높은 방제효과를 보였으나 다른 균주는 3.6~14.3% 정도의 효과만을 보였다.

나. Spray에 의한 살충력검정 (방법-2)

본 연구는 0.1% Tween 80용액을 이용하여 포자현탁액을 제조하여 배추좀나방에 spray 하여 살충성을 검정하였으며(Table 33), 그 결과를 분석해 보면 1.0×10^8 conidia/ml 농도에서 310번, 520번 균주가 34.8% 및 40.3%의 중간 정도의 방제효과를 보였으며 다른 균주는 4.4-17.5% 정도의 낮은 방제효과를 보였다.

다. 엽침지법에 의한 살충력 검정

연구방법은 <1> 지름 9cm로 자른 배추잎을 약 3초간 침지(leaf dipping test)시킨 후 1시간 정도 음건시킨다. <2> 음건 시킨 배추를 petri dish(ϕ 9cm)에 넣고 배추좀나방을 접종하였다. 사충수 조사방법은 붓으로 충체를 접촉하여 움직이지 않으면 죽은 것으로 간주하여 조사하였다. 이상의 실험은 3반복으로 실시 하였다. 이 방법에 따른 배추좀나방에 대한 살충효과 검정 결과(Table 34)를 보면 균주에 관계없이 효과가 없는 것으로 나타났다.

2. 쌀바구미에 대한 살충력 검정

쌀바구미에 대한 살충성 검정은 <1> 현미 20g을 넣고 쌀바구미 10마리를 접종하는 과

Table 32. Frequency of percent mortality responses to *Pulutella xylostella*

Code No	Concentration /ml	No. of insects	Survial Ratio after 72hrs				Effect(%)
			RI	RII	RIII	Aver	
110	1.0×10 ⁰	30	100.0	90.0	80.0	90.0	3.6
120	1.0×10 ⁰	30	90.0	70.0	100.0	86.7	7.1
210	1.0×10 ⁰	30	80.0	100.0	80.0	86.7	7.1
310	1.0×10 ⁰	30	30.0	60.0	50.0	46.7	50.0
410	1.0×10 ⁰	30	80.0	90.0	90.0	86.7	7.1
420	1.0×10 ⁰	30	70.0	80.0	100.0	83.3	10.7
510	1.0×10 ⁰	30	100.0	80.0	90.0	90.0	3.6
520	1.0×10 ⁰	30	10.0	20.0	0.0	10.0	89.3
610	1.0×10 ⁰	30	90.0	100.0	100.0	96.7	-
710	1.0×10 ⁰	30	100.0	80.0	80.0	86.7	7.1
810	1.0×10 ⁰	30	100.0	100.0	90.0	96.7	-
910	1.0×10 ⁰	30	90.0	90.0	90.0	90.0	3.6
101	1.0×10 ⁰	30	80.0	90.0	70.0	80.0	14.3
112	1.0×10 ⁰	30	90.0	90.0	100.0	93.3	-
Control 1*	-	30	90.0	90.0	100.0	93.3	-
Control 2*	-	30	90.0	70.0	100.0	86.7	7.1
Control 3*	-	30	80.0	100.0	100.0	93.3	-

Control 1*: 0.1% Tween 80+Polyoxyethylene alkyl ether주제의 계면활성제 0.0025%혼합액

Control 2*: Water

Control 3*: 무처리

$$\# \text{ Control effect(\%)} = \frac{\text{Survival ratio of control plot} - \text{Survival ratio of treated plot}}{\text{Survival ratio of Control plot}} \times 100$$

Table 33. Frequency of percent mortality responses to *Plutella xylostella*

Code No	Concentration /ml	No. of insects	Survial Ratio after 72hrs				Effect(%)
			R I	R II	R III	Aver	
110	1.0×10^5	30	60.0	70.0	60.0	66.7	13.0
120	1.0×10^5	30	50.0	80.0	60.0	63.3	17.5
220	1.0×10^5	30	60.0	90.0	70.0	73.3	4.4
310	1.0×10^5	30	50.0	60.0	40.0	50.0	34.8
410	1.0×10^5	30	40.0	70.0	80.0	63.3	17.5
420	1.0×10^5	30	60.0	70.0	70.0	66.7	13.0
510	1.0×10^5	30	80.0	70.0	50.0	66.7	13.0
520	1.0×10^5	30	40.0	50.0	40.0	43.3	43.5
610	1.0×10^5	30	60.0	60.0	70.0	66.7	13.0
810	1.0×10^5	30	80.0	60.0	70.0	70.0	8.7
112	1.0×10^5	30	80.0	50.0	60.0	63.3	17.5
<i>Control*</i>	-	30	70.0	80.0	70.0	76.7	-

Control*: 1% Tween 80용액

$$\# \text{ Control effect(\%)} = \frac{\text{Survival ratio of control plot} - \text{Survival ratio of treated plot}}{\text{Survival ratio of Control plot}} \times 100$$

Table 34. Frequency of mortality responses to *Plutella xylostella* fungi by using leaf dipping method.

Code No	Concentration /ml	No. of insects	Survial Ratio after 72hrs				Effect(%)
			R I	R II	R III	Aver	
110	1.0×10^8	30	80.0	90.0	90.0	86.7	7.1
120	1.0×10^8	30	90.0	100.0	90.0	93.3	0.0
220	1.0×10^8	30	90.0	80.0	100.0	90.0	3.5
310	1.0×10^8	30	80.0	100.0	100.0	93.3	0.0
410	1.0×10^8	30	90.0	90.0	90.0	90.0	3.5
420	1.0×10^8	30	90.0	80.0	80.0	83.7	10.3
510	1.0×10^8	30	70.0	100.0	90.0	86.7	7.1
520	1.0×10^8	30	80.0	90.0	80.0	86.7	7.1
610	1.0×10^8	30	80.0	90.0	80.0	83.3	10.3
810	1.0×10^8	30	90.0	90.0	100.0	93.3	0.0
112	1.0×10^8	30	90.0	80.0	80.0	83.3	10.3
Control*	-	30	100.0	90.0	90.0	93.3	-

Control*: 0.1% Tween 80용액

$$\# \text{ Control effect(\%)} = \frac{\text{Survival ratio of control plot} - \text{Survival ratio of treated plot}}{\text{Survival ratio of Control plot}} \times 100$$

정, <2> 포자 현탁액 1cc을 넣고 잘 섞은 후 실온에 방치하는 과정, <3> 120시간 후에 생충수를 조사하는 과정 등으로 되어 있다. 이상의 방법에 의한 살충효과 검정 결과는 Table 35와 같다. 그 결과를 보면 1.0×10^8 /ml 농도의 포자 처리구에서 211, 220번 균주가 각각 47.9%, 55.2%의 대체로 높은 살충효과를 보였으며 이외의 균주에 대해서는 20%전후의 방제효과를 보였다.

3. 점박이용애에 대한 살충력 검정

점박이용애에 대한 살충효과 검정은 엽침지법에 의해서 수행했으며, 복숭아혹진딧물과 쌀바구미에 대한 살충력이 상대적으로 높은 균주에 대해서만 실험을 실시하였다. 점박이용애에 대한 살충력 결과는 Table 36과 같다. 결과를 보면 선발균주 211, 220, 710, 101번 균주가 1.0×10^8 /ml 처리구에서 점박이용애에 대한 살충력이 각각 40.39%, 42.57%, 31.19%, 5.95%, 46.04%를 보였다.

4. 복숭아혹진딧물에 대한 살충력 검정

복숭아혹진딧물에 대한 살충성을 검정한 결과(Table 37) 211번, 220번, 101번 균주가 1.0×10^8 /ml의 처리구에서 각각 39.51%, 35.80%, 30.86%의 방제효과를 보였고, 820번, 910번, 111번 균주는 각각 24.69%, 24.07%, 27.78%의 방제효과를 보였다. 이외의 균주는 10%내외의 방제효과를 보였다.

5. 벼물바구미에 대한 살충력 검정

벼물바구미에 대한 살충효과 검정방법은 살충성 사상균의 포자 현탁액에 3초간 침지시킨 벼물바구미 10마리를 기주식물인 벼를 넣은 test tube(ϕ 2mm)에 접종하여 2일 후부터 24시간 마다 새로운 벼를 넣어 주었다. 조사는 120시간 후에 생충수를 조사하였다. 이때

Table 35. Percent mortalities of *Sitophilus oryzae* after the infection of entomopathogenic fungi.

Code No	Concentration / ml	No. of insects	No. Survival after 120hr				CM [#] (%)
			RI	RII	RIII	Aver	
110	1.0×10 ⁸	30	5	8	5	7.0	26.8
211	1.0×10 ⁸	30	3	6	6	5.0	47.9
212	1.0×10 ⁸	30	6	6	6	6.0	37.5
220	1.0×10 ⁸	30	5	2	6	4.3	55.2
410	1.0×10 ⁸	30	7	8	7	7.3	23.9
420	1.0×10 ⁸	30	5	6	7	6.0	37.5
510	1.0×10 ⁸	30	8	9	9	8.6	10.4
610	1.0×10 ⁸	30	8	6	6	6.6	31.2
710	1.0×10 ⁸	30	9	9	9	9.0	6.2
810	1.0×10 ⁸	30	9	10	7	8.6	10.4
910	1.0×10 ⁸	30	8	9	10	9.0	6.2
920	1.0×10 ⁸	30	9	7	6	7.3	23.9
101	1.0×10 ⁸	30	10	10	9	9.6	0
111	1.0×10 ⁸	30	8	7	7	7.3	23.9
112	1.0×10 ⁸	30	8	7	8	7.6	20.8
<i>Control</i>	1.0×10 ⁸	30	9	9	10	9.6	-

$$\# \text{ Corrected mortality} = \frac{\text{Control alive number} - \text{Test alive number}}{\text{Control alive number}} \times 100$$

Table 36. Percent mortalities of two-spotted mite after the infection of entomopathogenic fungi.

Code No	Concentration / ml	No. of insects	* Survival after 72hr						Aver
			RI	RII	RIII	RIV	RV		
211	1.0×10^8	107	31.0	34.6	60.8	83.3	64.7	54.88	40.39
220	1.0×10^8	73	71.4	38.5	50.0	35.3	69.2	52.88	42.57
710	1.0×10^8	117	40.0	99.7	71.4	40.7	65.0	63.36	31.19
910	1.0×10^8	81	78.9	80.9	100. 0	85.7	87.5	86.6	5.95
101	1.0×10^8	98	50.0	55.0	68.4	60.0	75.0	49.68	46.04
Control	1.0×10^8	116	77.8	89.3	93.3	100.0	100.0	92.08	-

Table 37. Percent mortalities of *Myzusa persicae* Shlzer after the infection of entomopathogenic fungi.

Code No	Concentration / ml	No. of insects	Alive after 120hr				Effect(%)
			RI	RII	RIII	Aver	
110	1.0×10^8	90	170.00	173.33	180.00	174.44	3.09
211	1.0×10^8	90	90.00	123.33	113.33	39.51	39.51
212	1.0×10^8	90	183.33	156.67	110.00	150.00	16.67
220	1.0×10^8	90	100.00	90.00	156.67	115.56	35.80
410	1.0×10^8	90	173.33	150.00	157.78	157.78	12.35
420	1.0×10^8	90	170.00	150.00	160.00	160.00	11.11
510	1.0×10^8	90	136.67	143.33	156.56	145.56	19.14
610	1.0×10^8	90	210.00	196.67	170.00	192.22	-
710	1.0×10^8	90	156.67	193.33	173.33	174.44	3.09
810	1.0×10^8	90	226.67	163.33	163.33	184.44	-
820	1.0×10^8	90	140.00	136.67	130.00	135.56	24.69
910	1.0×10^8	90	130.00	150.00	130.67	136.67	24.07
920	1.0×10^8	90	163.33	140.00	143.33	148.89	17.28
101	1.0×10^8	90	90.00	113.33	170.00	124.44	30.86
111	1.0×10^8	90	123.33	140.00	126.67	130.00	27.78
112	1.0×10^8	90	163.33	160.00	156.67	160.00	11.11
Control	1.0×10^8	90	156.67	210.00	173.33	180.00	-

공시충으로 사용한 벼물바구미는 경기 남양에서 채집하여 실험에 사용하였다. Table 38은 이상의 실험방법에 의해 수행된 벼물바구미에 대한 살충효과 검정 결과이다. 결과를 살펴보면 선발균주 모두가 1.0×10^8 /ml의 포자농도 처리구에서 벼물바구미에 대한 살충력은 0~4%로 저조하였다. 쌀바구미에서는 211, 220번 균주가 동일한 처리 농도에서 각각 47.9%, 55.2%의 살충력을 보였지만 벼물바구미에서는 단지 211번 균주가 2.04%, 220번 균주는 0%의 살충력만을 보였다.

제 20절. 시설원예하우스에서의 살충력 검정

본 연구에서는 생물농약의 시제품 제작을 위하여 원예하우스에서 살충성을 검토하였다. 시설원예하우스에서 문제해충에 대한 방제효과 검정은 1차로 배추좀나방 및 복숭아혹진딧물에 대해 pot에서 수행하였으며 2차로 선발균주의 실내 인공배양을 통하여 시제품을 제작, 포장내에서 배추좀나방에 대하여 방제효과 검정을 수행하였다.

1. 복숭아혹진딧물에 대한 pot 시험

복숭아혹진딧물에 대한 살충성 시험을 수행한 결과 (Table 39) 220, 710번 균주가 1.0×10^8 /ml 처리구에서 각각 17.67%, 20.62%의 방제효과를 보였고 나머지 선발균주는 살충력이 관찰되지 않았다. 복숭아혹진딧물의 실내살충력에서 211, 220번 균주가 각각 39.51%, 35.80%의 방제효과를 보였지만 Pot시험에서는 실내검정보다 다소 낮은 결과를 보였다. 이와같이 포장시험이 실내검정보다 저조한 방제가를 보이는 것은 온도, 습도 등과 같은 환경적 요인의 차이에 의한 것으로 생각된다. 그러나 710번 균주의 경우에는 실내검정에서는 3.09%의 방제효과를 보였지만 Pot시험에서는 오히려 20.62%로 방제가가 월등히 높았다. 따라서 궁극적으로 시설원예하우스 내의 Pot 혹은 포장에서 살충력을 높이기 위해서는 공시균주의 살충력에 영향을 미치는 환경요인들에 대한 보다 자세한 연구가 필요할 것이다.

Table 38. Percent mortalities of *Lissorhoptus oryzophilus* Kuschel after the infection of entomopathogenic fungi.

Code No	Concentration / ml	No. of insects	No. Survival after 120hr					Aver	CM ^r (%)
			R I	R II	R III	R IV	R V		
211	1.0×10 ⁸	50	10	9	10	10	9	9.6	2.04
220	1.0×10 ⁸	50	10	10	10	10	10	10.0	0
710	1.0×10 ⁸	50	8	9	10	10	10	9.4	4.08
910	1.0×10 ⁸	50	9	10	10	9	10	9.6	2.04
101	1.0×10 ⁸	50	10	9	10	9	10	9.6	2.04
Control	1.0×10 ⁸	50	10	10	10	9	10	9.8	-

$$\# \text{ Corrected mortality} = \frac{\text{Control alive Number} - \text{test alive Number}}{\text{Control alive Number}} \times 100$$

Table 39. Percent mortalities of *Myzus persicae* after the infection of entomopathogenic fungi.

Code No	Concentration / ml	No. of insects	3 days after treatment					Effect (%)
			Alive rate(%)					
			RI	RII	RIII	RIV	Aver	
211	1.0×10^8	1891	164.25	143.29	132.65	183.41	-	
220	1.0×10^8	1125	117.63	206.59	132.65	62.27	130.53	17.67
710	1.0×10^8	1557	100.96	125.36	126.88	150.15	125.84	20.62
910	1.0×10^8	1534	185.23	150.92	132.01	185.42	-	-
101	1.0×10^8	1432	231.25	143.29	203.32	196.30	193.54	-
Furthio Carb WP	1000	1332	10.18	4.11	21.90	8.89	11.27	92.89
Control	1.0×10^8	1498	112.01	205.54	158.23	158.38	158.54	-

2. 배추좀나방에 대한 pot 시험

배추좀나방에 대한 실내시험에서 선발된 균주를 한국삼공(주)의 유리온실에서 pot 검정시험을 수행하였다. 지름 15cm의 pot에 배추좀나방 10마리씩 접종하여 균주를 배추에 살포하여 배추좀나방에 대한 살충력을 검정한 결과는 Table 40와 같다. 즉 410번 균주는 처리후 3일 후에 37.8%, 6일 후에는 46.97%의 방제가를 보였다. 이것은 실내검정에서 1.0×10^8 농도의 포자를 처리했을 때 7.1%의 방제가를 보인데 비해 비록 포자농도를 1.0×10^{11} 농도로 높인 것을 감안하더라도 상당히 증가한 효과를 보였다.

3. 배추좀나방에 대한 시설하우스내 포장시험

시설하우스 내에서 배추좀나방에 대한 살충성 검정을 위하여 배추를 pot에서 2주간 육묘후 포장에 정식하고 배추좀나방을 접종하여 해충의 사전밀도를 조사하였다. 여기에 배양기에서 배양시킨 520번 균주의 포자를 0.1% Tween 80과 Polyoxyethylene alkyl ether를 주원료로 하는 계면활성제 0.0025% 용액의 혼합액을 이용하여 포자 현탁액을 만든 뒤 원심분리 및 동결건조를 통하여 분말화한 포자체 (1×10^5 /분말포자1mg)를 50%로 첨가한 뒤 Polyoxyethylene alkyl ether를 주원료로 하는 계면활성제를 15%, Sodium tripolyphosphate를 주원료로 하는 계면활성제를 15%첨가한 뒤 안정제로서 Ammonium sulfate를 Rest로 첨가하는 제 1 처방과 분말화한 포자체 50%와 Polyoxyethylene alkyl ether를 주원료로 하는 계면활성제를 25%, Sodium tripolyphosphate를 주원료로 하는 계면활성제를 Rest로 첨가하는 제 2 처방을 검토한 결과 제 2 처방 보다 제 1 처방에서 물과 혼합시 물리성 및 수화성이 양호하므로 제 1처방으로 하여 제제한 제품을 물에 현탁시켜 포자액 1ml당 포자수를 1×10^8 개가 되게 하여 포장 내에 살포하였으며 대조약제로는 비티 수화제를 1000배로 희석하여 살포하였고 그 결과는 Table 41과 같다. 이 표에서 보면 1.0×10^8 /ml 농도에서 520번 균주의 효과는 pot시험과 같은 경향치로서 처리 5일 후 약 30% 정도로 나타났다.

제 21절. 살충성 사상균의 항진균 활성

살충성 사상균인 *M. anisopliae*와 *B. bassiana*에 대해서 식물병원균에 대한 저해효과

Table 40. Percent mortalities of diamondback moth *Plutella xyostella* after the infection of entomopathogenic fungi.

Code No	Concentration / ml	No. of insects	3 days after treatment	6 days after treatment
			Effect (%)	Effect (%)
210	1.0×10^{11}	48	12.4	18.43
410	1.0×10^{11}	50	37.8	46.97
1110	1.0×10^{11}	49	9.85	11.63
1111	1.0×10^{11}	49	10.98	13.42
Control		47	-	-

Table 41. Frequency of Percent Mortality Responses to *Pulutella xylostella*

Code No	Concentration / ml	No. of insects/Plot	Survial Ratio after 3days				Effect(%)
			RI	RII	RIII	Aver	
520	1.0×10^9	27.7	93.9	86.6	75.8	85.4	27.1
BT WP	1000 x	30.0	6.7	13.3	10.0	10.0	91.5
<i>Control</i>	-	32.7	128.4	107.0	116.2	117.2	-

Code No	Concentration / ml	No. of insects/Plot	Survial Ratio after 5days				Effect(%)
			RI	RII	RIII	Aver	
520	1.0×10^9	27.7	90.3	86.7	83.0	86.7	29.7
BT WP	1000 x	30.0	10.0	3.3	6.7	6.7	94.5
<i>Control</i>	-	32.7	131.5	116.2	122.3	123.3	-

$$\# \text{ Control effect(\%)} = \frac{\text{Survival ratio of Control plot} - \text{Survival ratio of treated plot}}{\text{Survival ratio of Control plot}} \times 100$$

를 살펴보았다. 그 결과 *M. anisopliae*는 *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* 등의 식물병원균에 대해서 높은 항진균활성을 보였다(Fig. 126-128, Table 42-44). 마찬가지로 *B. bassiana*도 식물병원균에 대해서 높은 항진균활성을 보였다(Fig. 129-131, Table 45-47). 이상의 결과로부터 위의 두종류의 살충성 사상균은 해충 방제뿐만아니라 식물병원균의 방제에도 활용될 수 있기 때문에 본 연구의 최종목표인 유전 공학적 기법을 이용한 살충성 사상균의 균주 육종이 이루어지면 이 균주는 해충방제와 식물병 방제의 효능을 동시에 나타내는 매우 효율적인 생물농약으로 이용될 수 있을 것이다.

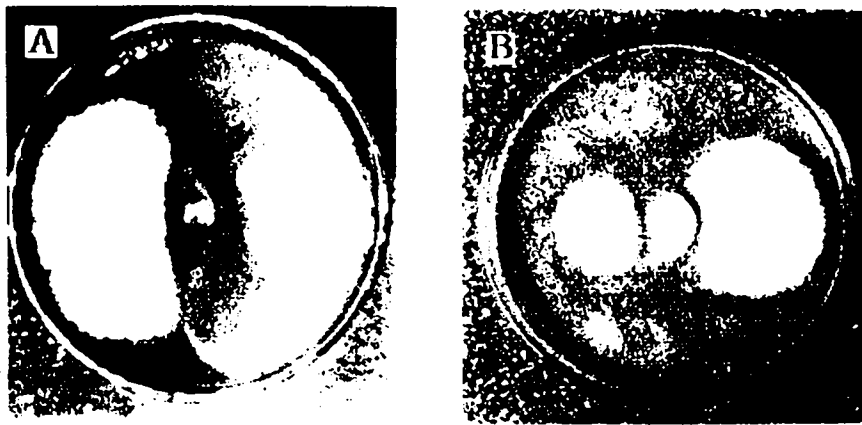


Fig. 126. *In vitro* antagonism assay. A mycelial plug of *Metarhizium anisopliae* was placed on the center of potato dextrose agar (PDA) plate surrounded by mycelial plug of *A. solani*, *B. cinerea*, *M. gypseum*, and *F. oxysporum* at given distance (2cm) from the center.

- A. *Alternaria solani* (left), *Metarhizium anisopliae* (center), and *Botrytis cinerea* (right)
- B. *Microsporium gypseum* (left), *Metarhizium anisopliae* (center), and *Fusarium oxysporum* (right)

Table 42. Inhibition rate of mycelial growth of phytopathogenic fungi with the culture filtrate of *M. anisopliae*.

Phytopathogenic fungi \ Media	Inhibition rate			
	PDA	SDA	TSA	LB
<i>Botrytis cinerea</i>	10.0	5.4	3.7	18.0
<i>Fusarium oxysporum</i>	16.5	5.4	5.6	5.3

* Culture media : PDA (potato 200 g, Bacto dextrose 20 g, agar 15 g, and 1 liter of distilled water); SDA(neopepton 10 g, dextrose 40 g, agar 15 g, and 1 liter of distilled water); TSA(tryptic soy broth 20 g, agar 15 g, and 1 liter of distilled water); LB (trypton 10 g, yeast extract 5 g, sodium chloride 10 g, agar 15 g, and 1 liter of distilled water)

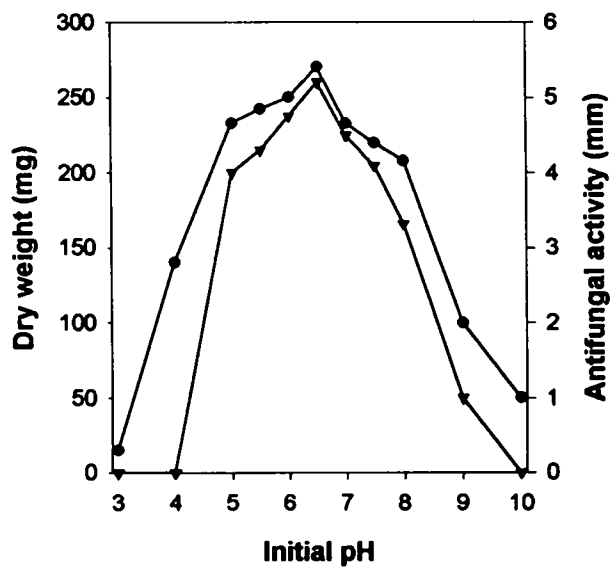


Fig. 127. Effect of initial pHs on antibiotic production of *M. anisopliae* culturing in YPD media for 6 days.

Symbols: (●-●) Dry weight of cell mass(*M. anisopliae*, mg); (▼-▼) antifungal activity (diameter of inhibition zone, mm)

Table 43. Effect of the culture filtrate of *M. anisopliae* on the spore germination of *B. cinerea*

Treatment\Time (hrs)	% of spore germination							
	12	16	20	24	28	32	36	40
Control	-	-	7	10.0	22.0	40.3	75.5	88.2
15%	-	-	2	7.5	17.0	20.7	35.5	40.1
30%	-	-	-	-	5.4	9.7	15.5	21.5

Control: PDB medium

15%: PDB media supplemented with the culture filtrate of *M. anisopliae* at final concentration of 12 $\mu\text{g/ml}$.

30%: PDB media supplemented with the culture filtrate of *M. anisopliae* at final concentration of 24 $\mu\text{g/ml}$.

Table 44. Effect of the culture filtrate of *M. anisopliae* on the spore germination of *F. oxysporum*.

Treatment\Time(hrs)	% of spore germination									
	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48
Control	-	-	8.6	13.0	18.7	25.0	30.4	40.0	56.7	78.6
15%	-	-	-	6.5	22.0	27.0	30.4	41.3	47.8	53.3
30%	-	-	-	-	17.5	20.2	29.5	35.4	40.7	53.0

Control: PDB medium

15%: PDB media supplemented with the culture filtrate of *M. anisopliae* at final concentration of 12 $\mu\text{g/ml}$.

30%: PDB media supplemented with the culture filtrate of *M. anisopliae* at final concentration of 24 $\mu\text{g/ml}$.

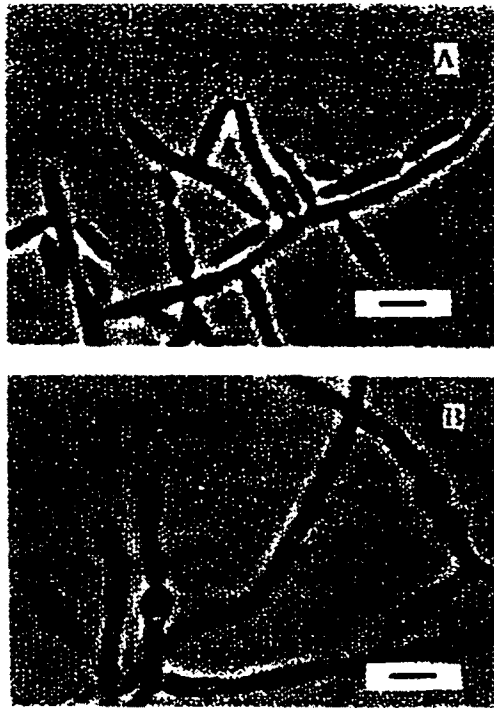


Fig. 128. Chlamydospore formation of *F. oxysporum* induced by culture filtrate of *Metarhizium anisopliae*. (bar=30 μ m)

A: PDB medium

B: PDB medium with 10% of culture filtrate of *M. anisopliae*.

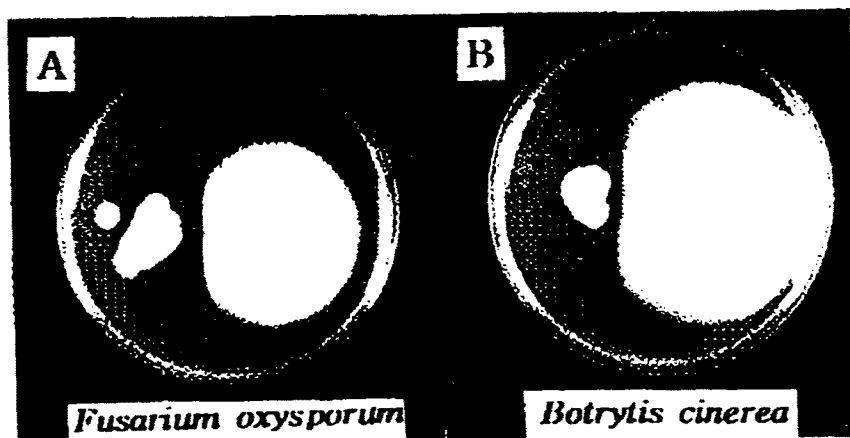


Fig. 129. *In vitro* antagonism assay. A mycelial plug of *Beauveria bassiana* was placed on the left of each potato-dextrose agar (PDA) plate, and mycelial plugs of two phytopathogenic fungi were on the right. (A) *Fusarium oxysporum*; (B) *Botrytis cinerea*.

Table 45. Mycelial growth inhibition of *Botrytis cinerea* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* on different media amended with culture filtrate of *Beauveria bassiana*.

Phytopathogenic fungus	% Inhibition of mycelial growth ^a			
	Culture medium ^b			
	PDA	SDA	TSA	LB
<i>Botrytis cinerea</i>	34.3	13.3	8.8	2.0
<i>Fusarium oxysporum</i>	13.3	9.3	15.9	5.0

^aEach medium was incorporated with 10% final concentrations of culture filtrate of *B. bassiana*. Inhibition percentage = $[1 - \{\text{mycelial growth of treatment (mm)} / \text{mycelial growth of control (mm)}\}] \times 100$.

^bPDA : potato-dextrose agar, SDA : sabouraud dextrose agar, TSA : tryptic soy agar, LB : Luria-Bertani agar.

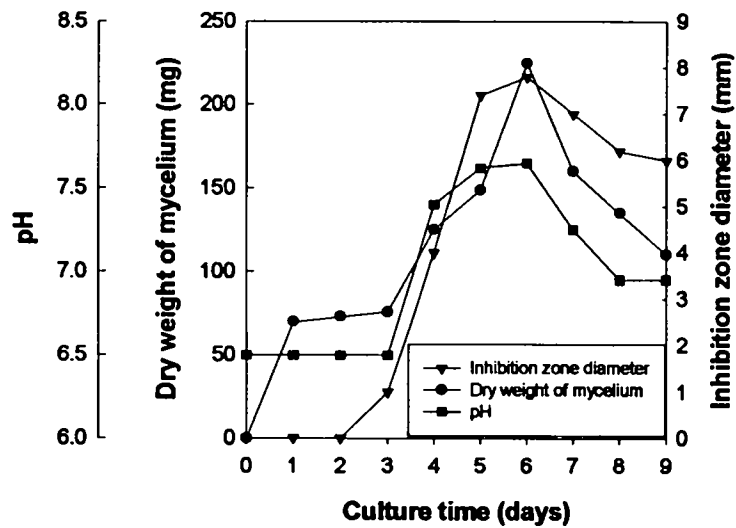


Fig. 130. Dry Weight of mycelium, production of antifungal substances, and pH changes of *Beauveria bassiana* cultures according to the culture time.

Table 46. Effect of culture filtrate of *Beauveria bassiana* on the spore germination of *Botrytis cinerea*.

Treatment	% of spore germination ^a						
	16	20	24	28	32	36	40
Control	0.0	7.0	10.0	22.0	40.3	75.5	88.2
15% of culture filtrate	0.0	0.0	8.0	11.0	18.8	23.6	40.7
30% of culture filtrate	0.0	0.0	6.8	8.5	14.6	18.9	30.0

^aSpore germination was examined in potato-dextrose broth incorporated with 15 and 30% final concentrations of culture filtrate of *B. bassiana*.

Table 47. Effect of culture filtrate of *Beauveria bassiana* on the spore germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Treatment	% of spore germination ^a								
	16	20	24	28	32	36	40	44	48
Control	0.0	8.6	13.0	18.7	25.0	40.0	30.4	56.7	78.6
15% of culture filtrate	0.0	0.0	7.4	7.8	8.0	8.7	10.0	10.8	11.0
30% of culture filtrate	0.0	0.0	0.0	7.0	7.0	8.0	8.5	9.0	9.0

^aSpore germination was examined in potato-dextrose broth incorporated with 15 and 30% final concentrations of culture filtrate of *B. bassiana*.



Fig. 131. Morphological abnormalities of *Fusarium oxysporum* induced by culture filtrate of *Beauveria bassiana* (bar=30 μ m). A ; Potato-dextrose broth medium, B ; Potato-dextrose broth medium with 10% of culture filtrate of *B. bassiana*.

제 4 장. 참고문헌

1. Agaisse, H. and Lereclus, D. (1995) "How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein?" *J. Bacteriol.* 177, 6027-60321.
2. Ahn, Y. J. and Cho, K. Y. (1992) "Establishment of bioassay system for developing new insecticides I. Effects of organic solvents on the toxicity against insects, Phytotoxicity and solubility of compounds." *Kor. J. Appl. Entomol.* 31, 182-189.
3. Ahn, Y. J. and Cho, K. Y. (1992) "Establishment of bioassay system for developing new insecticides II. Differences in susceptibilities of the insect species to insecticides according to different application methods." *Kor. J. Appl. Entomol.* 31, 452-460.
4. Al-Zubaidi, F. S. and Capinera, J. L. (1983) "Application of different nitrogen levels to the host plant and cannibalistic behavior of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae)." *Environ. Entomol.* 12, 1687-1689.
5. Andersen, S. O., Højrup, P., and Roepstorff, P. (1995) "Insect cuticular protein." *Insect. Biochem. Molec. Biol.* 25, 153-176.
6. Auffray, C. and Rougeon, F. (1980) "Purification of mouse immunoglobulin heavy chain RNAs from total myeloma tumor RNA." *Eur. J. Biochem.* 107, 303-324.
7. Barson, G., N. Renn and A. F. Bywater (1994) "Laboratory evaluation of six species of entomopathogenic fungi for control of the house fly (*Musca domestica* L), a pest of intensive animal." *J. Inverteb. Path.* 64, 107-113.
8. Bernier, L., Cooper, R. M., Charnley, A. K. and Clarkson, J. M. (1989) "Transformation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* to benomyl

- resistance." *FEMS Microbiol. Lett.* 60, 261-266.
9. Bidochka, M. J. and Khachatourians, G. G. (1987) "Purification and properties of an extracellular protease produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*." *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1679-1684.
 10. Bidochka, M. J. and Khachatourians, G. G. (1990) "Identification of *Beauveria bassiana* extracellular protease as a virulence factor in pathogenicity toward the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*." *J. Invertebr. Pathol.* 56, 362-370.
 11. Bradford, J. (1976) "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
 12. Brey, P. T. and Latge, J. P. (1986) "Integumental penetration of the Aphid, *Acyrtosiphon pisum*, by *Conidiobolus obscurus* (Entomophthoraceae)." *J. Invertebr. Pathol.* 48, 34-414.
 13. Chakraborty, B. W., Patterson, N. A. and Kapoor (1991) "An electroporation-based system for high-efficiency transformation of a germinated conidia of filamentous fungi." *Can. J. Microbiol.* 37, 858-863.
 14. Crimmins, D. L., McCourt, D. W., Thoma, R. S. Scott, M. G. Macke, K., and Schwartz, B. D. (1990) "In situ chemical cleavage of proteins immobilized to glass-fiber and polyvinylidenedifluoride membranes cleavage at tryptophan residues with 2-(2'-nitrophenylsulfenyl)-3-methyl-3'-bromo-indolenine to obtain internal amino acid sequence." *Anal. Biochem.* 187, 27-38.
 15. Dangar, T. K., Geetha, L., Jayapal, S. P. and Pillai, G. B. (1991) "Mass

- production of the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* in coconut water wasted from copra making industry." *J. Plantation Crops* 19, 54-69.
16. Dorta, B., Bosch, A., Ardas, J. A. and Ertola, R. J. (1990) "High level of sporulation of *Metarhizium anisopliae* in an medium containing by-products." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33, 712-715.
 17. El-sayed, G. N., Coudron, T. A., and Igonoffo, C. M. (1989) "Chitinolytic activity and virulence associated with native and mutant isolates of an entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*." *J. Invertebr. Pathol.* 54, 394-403.
 18. Goettel, M. S., St. Leger, R. J., Rhairi, S., Jung, M. D., Oakley, B. R., Roberts, D. W. and Staples, R. C. (1990) "Pathogenicity and growth of *Metarhizium anisopliae* stably transformed to benomyl resistance." *Curr. Genet.* 17, 129-132.
 19. Gunkle, F. A. and Gassen, H. G. (1989) "Proteinase K from *Tritirachium album* Limber: Characterization of the chromosomal gene and expression of the cDNA in *Escherichia coli*." *Eur. J. Biochem.* 179, 185-194.
 20. Hattori, M. and Sakaki, Y. (1986) "Dideoxy sequencing method using denatured plasmid templates." *Anal. Biochem.* 152, 232-238.
 21. Havukkala, I., Mitamura, C., Hara, S., Hirayae, K., Nishizavua, Y., and Hibi, T. (1993) "Induction and purification of *Beauveria bassiana* chitinolytic enzymes." *J. Invertebr. Pathol.* 61, 97-102.
 22. Hwang, C. W., Lee, D. G. and Kang, S. C. (1998) "Molecular cloning and sequence of *ura5* gene encoding orotate phosphoribosyl transferase(OPRTase) from entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*." *J. Microbiol. Biotechnol.* 8,

284-286.

23. Joshi, L., St. Leger, R. J. and Bidochka, M. J. (1995) "Cloning of a cuticle-degrading protease from the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*." *FEMS Microbiol. Lett.* 125, 211-218.
24. Joshi, L., St. Leger, R. J. and Roberts, D. W. (1997) "Isolation of a cDNA encoding a novel subtilisin-like protease (Pr1B) from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* using differential display-RT-PCR." *Gene* 197, 1-8.
25. Kang, S. C., Park, S. and Lee, D. G. (1998) "Isolation and characterization of a chitinase cDNA from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*." *FEMS Microbiol. Lett.* 165, 267-271.
26. Kleespies, R. G. and Zimmermann, G. (1992) "Production of blastospores by three strains of *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin in submerged culture." *Biocontrol Sci. Technol.* 2, 127-135.
27. Kucera, M. and Samsinakova, A. (1968) "Toxins of the entomophagous fungus *Beauveria bassiana*." *J. Invertebr. Pathol.* 12, 316-320.
28. Laemmli, V. K. (1970) "Clearage of structural protein curing the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature.* 227, 680-685.
29. Lokesh Joshi, Raymond J. St. Leger, Michael J. Bidochka. (1995) "Cloning of a cuticle-degrading protease from the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*." *FEMS Microbiol. Letters* 125, 211-218
30. Maniatis, T., Fritsh, E. F. and Sambrook, J. (1989) "Molecular Cloning (A

Laboratory Manual. 2nd.).” *Cold Spring Harbor Laboratory*, Cold Spring Harbor, New York.

31. Matsuzawa, O. H., Tokugawa, K., Hamaoki, M., Mizoguchi, M., Taguchi, H., Terada, I., Kwon, S. T. and Ohta, T. (1988) “Purification and characterization of aqualysin I (a thermostable alkaline serine protease) produced by *Thermus aquaticus* YT-1.” *Eur. J. Biochem.* 171, 441-447.
32. McGaughey, W. H. (1990) “Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. In - New directions in Biological Control.” *Alan R. Liss*, New York, pp. 583-598.
33. Pandit, N. C. and Som, D. (1988) “Culture of *Beauveria bassiana* and its pathogenicity to insect pests of jute (*Corchorus capsularis* and *C. olitorius*) and mesta (*Hibiscus cannabinus* and *H. sabdariffa*).” *Ind. J. Agr. Sci.* 58, 75-76.
34. Paterson, I. C., Charnley, A. K., Cooper, R. M. and Clarkson, J. M. (1993) “Regulation of production of a trypsin-like protease by the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*.” *FEMS Microbiol. Lett.* 109, 323-328.
35. Pfeifer, T. A. and Khachatourians, G. G. (1992) “*Beauveria bassiana* protoplast regeneration and transformation using electroporation.” *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38, 376-381.
36. Prescott, A. and Martin, C. (1987) “A rapid method for the quantitative assessment of level of specific mRNAs in plants.” *Plant. Mol. Biol. Rep.* 4, 219-224.
37. Punt, P. J., Dingemans M., Kuyvenhoven, A., Soede, R. D. M., Pouwels, P. H.

- and Van Den Hondel C.A.M.J.J. (1990) "Functional elements in the promoter region of the *Aspergillus nidulans* GPDA gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase." *Gene* 93, 101-109.
38. Samuels, K. D. Z., Heale, J. B., and Leewellyn, M. (1989) "Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* toward *Niaparvat lugens*." *J. Invertebr. Pathol.* 53, 25-31.
39. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) "DNA sequencing with chain terminating inhibitors." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
40. Seip, E. R., Woloshuk, C. P., Payne, G. A. and Curtis, S. E. (1990) "Isolation and sequence analysis of a β -tubulin gene from *Aspergillus flavus* and its use as a selectable marker." *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 3686-3692.
41. Smithson, S. L., Paterson, I. C., Bailey, A. M., Screen, S. E., Hunt, B. A., Cobb, B. D., Cooper, R. M., Charnley, A. K. and Clarkson, J. M. (1995) "Cloning and characterization of a gene encoding a cuticle-degrading protease from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*." *Gene* 166, 161-165.
42. Steinhaus, E. A. (1949) "Fungus infections. In - Principles of Insect Pathology." *McGraw-Hill Book Co.*, London, pp. 318-416.
43. St. Leger, R. J., Charnley, A. K. and Cooper, R. M. (1986) "Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Synthesis in culture on cuticle." *J. Invertbr. Pathol.* 48, 85-95.
44. St. Leger, R. J., Cooper, R. M. and Charnley, A. K. (1986) "Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi : Regulation of production of chitinolytic enzymes." *J. Gen. Microbiol.* 132, 1509-1517.

45. St. Leger, R. J., Cooper, R. M. and Charnley, A. K. (1987) "Production of cuticle-degrading enzymes by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* during infection of cuticles from *Calliphora vomitoria* and *Manduca sexta*." *J. Gen. Microbiol.* 133, 1371-1372.
46. St. Leger, R. J., Cooper, R. M., and Charnley, A. K. (1991) "Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*." *J. Invertebr. Pathol.* 58, 415-426.
47. St. Leger, R. J., Frank, D. C., Roberts, D. W. and Staples, R. C. (1992) "Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle-degrading-protease structural gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*." *Eur. J. Biochem.* 204, 991-1001.
48. St. Leger, R. J., Joshi, L., Bidochka, M. J. and Roberts, D. W. (1996) "Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 6349-6354.
49. St. Leger, Shimizu, S., Joshi, L., Bidochka, M. J., and Roberts, D. W. (1995) "Co-transformation of *Metarhizium anisopliae* by electroporation or using the gene gun to produce stable GUS transformations." *FEMS Microbiology Letters.* 131, 289-294.
50. St. Leger, R. J., Staples, R. C., and Roberts, D. W. (1993) "Entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae*." *J. Invertebr. Pathol.* 58, 415-426.
51. St. Leger, R. J., Staples, R. C., and Roberts, D. W. (1993) "Entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Aspergillus flavus* produce multiple extracellular chitinase isozymes." *J. Invertebr. Pathol.* 52,

285-293.

52. Takafi, M., Yanai, K., Takaya, N., Kojima, N., Horiuchi, H., and Ohta, A. (1992) "Purification of two chitinase from *Rhizopus oligosporus* and isolation and sequencing of the encoding genes." *J. Bacteriol.* 174, 7398-7406.
53. Timberlake, W .E. and Marshall, M. A. (1989) "Genetic engineering of filamentous fungi." *Science* 244, 1313-1317.
54. Trudal, J. and Asselin, A. (1989) "Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis." *Anal. Biochem.* 178, 362-366.
55. Watanabe, T. Kobori, K. Miyashita, K., Fujii T., Sakai, H., Vchida, M. and Tanaka, H. (1993) "Identification of glutamic acid 204 and aspartic acid 200 chitinase A1 of *Bacillus cirulans* WL-12 as essential residues for chitinase activity." *J. Biol. Chem.* 268, 18567-18572.
56. 강석권 (1995) "솔잎혹파리의 생물학적방제 국가대책수립을 위한 연구조사 - 곤충병원성 미생물 이용 솔잎혹파리 방제기술." *과학기술처 연구보고서* pp. 125-154.
57. 김창호 (1993) "곤충의 사육법" *경상대학교 출판부* pp 1-313.
58. 권여옥, 이형래, 유재기, 류갑희 (1983) "혼합제 농약의 병해충 방제효과시험." *농촌진흥청 농약연구소 시험연구보고서* pp. 193-206.
59. 고현관, 이상계, 이비파, 최기문, 김정화 (1990) "인공사료에 의한 파밤나방의 대량 사육법" *한국응용곤충학회지* 29(3), 180-183.
60. 고위진, 김현규, 김범기, 강선철, 권석태 (1997) "곤충 병원성 곰팡이 *Beauveria bassiana*로부터 Protease의 정제와 특성." *한국농화학회지* 40, 388-394.

61. 고휘진, 김현규, 강선철, 권석태 (1996) "곤충 병원성 곰팡이 *Beauveria bassiana*로부터 Protease의 최적 생산." *한국농화학회지* 39, 449-454.
62. 이동규, 예완해, 황철원, 권석태, 강선철 (1998) "pBRG-4를 이용한 *Metarhizium anisopliae*의 형질전환." *한국농화학회지* 41, 219-223.
63. 이범영 (1995) "솔잎혹파리의 생물학적방제 국가대책수립을 위한 연구조사 - 솔잎혹파리 방제효과 방제효과의 평가 및 관리전략." *과학기술처 연구보고서* pp. 39-83.
64. 이창근 (1995) "솔잎혹파리의 생물학적방제 국가대책수립을 위한 조사연구 - 솔잎혹파리에 의한 산림 피해 및 해석." *과학기술처 연구보고서* pp. 1-38.
65. 이형래, 박중수, 최승윤 (1978) "농약혼합제 선발에 관한 시험" *농촌진흥청 농업기술연구소 시험연구보고서(병해충·유전)* pp. 387-390.
66. 최승, 김길하 (1987) "Acephate, Demeton-S-methyl 저항성계통 복숭아 흑진딧물에 대한 살충제간의 연합 독작용" *한국식보지* pp. 151-157.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림특정연구사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림특정연구사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.