

Chitinase을 생산하는 곤충병원미생물 *Metarhizium anisopliae* HY-2
(KCTC 0156BP)의 토양해충 생물검정

석은영, 손광희*, 신동하**, 김기덕, 박두상, 박호용

한국생명공학연구원 곤충자원실, 항생물질연구실*, (주)인섹트바이오텍 부설연구소**

전화 (042) 860-4650, FAX (042) 860-4659

Abstract

Solid state fermentation was performed for the production of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* HY-2 using wheat bran media containing rice bran. Fungal growth in a solid state fermentation system was estimated by viable cell count, spore count, and mycelial biomass. It was used chemical method measuring *N*-acetylglucosamine (chitin) content for estimating of mycelial biomass. In static flask culture, viable cell reached 2.40×10^8 cfu/g at 23 days of culture at 27 °C and then mycelial biomass was 41.59 mg/g. Specific growth rate(μ max) was 0.0418 h^{-1} between 3 and 9 days when estimated by viable cell count and was 0.00976 h^{-1} between 9 and 17 days when *N*-acetylglucosamine content was measured. Viable cells reached 1.12×10^8 cfu/g in polypropylene-bag at 28 days of culture at 27°C. Formulated microbial pesticide containing *M. anisopliae* HY-2 were tested their bio-activity against Chestnut Brown Chafer (*Adoretus tenuimaculatus*). The protection rate of the liquid culture showed 13~26 % with 1st to 3rd instar, and spore suspension of *M. anisopliae* HY-2 showed 56~64%. Conidia produced by large scale solid-state fermentation showed 20~27 % activity 60~64 % with *M. anisopliae* HY-2.

서론

곤충은 환경에 대한 적응력이 뛰어나며 현재 지구상의 생물 중에서 가장 많은 종을 차지하고 있다. 이들 중 일부는 상업적으로 중요한 농경 작물에 많은 손실을 일으키고있는 실정이다. 이를 방지하기 위해 예전부터 화학살충제가 많이 사용되어 왔으나, 이것의 광범위한 방제 스펙트럼으로 인해서 익충 및 천적곤충, 토양미생물도 박멸하였다. 살포량 및 횟수의 증가는 반복적으로 노출된 목적 해충이 화학살충제에 대한 내성이 발달할 수 있으며, 아울러 화학살충제의 성분은 환경오염의 주범이 되어 문제시되고 있다. 그러나, 환경친화적 해충 방제는 이러한 단점을 해결할 수 있는 대안으로 제시되고 있으며 대표적인 예로는 곤충병원성 미생물 (insect pathogenic microorganism)을 이용한 해충방제를 들 수 있다. 이러한 곤충병원미생물은 곤충에만 특이적인 살충력을 가지고 있으며 사람이나 가축, 식물에는 전혀 해가 없으면서 대상해충을 효과적으로 방제할 수 있는 선택적 특성이 있다. 곤충의 곰팡이에 의한 병은 주로 곤충표피에서 포자가 발아하여 침입함¹⁾으로서 시작되고 이것은 곤충의 표피성분을 효소의 분리와 침입기구의 형성등 물리적인 작용과 관계가 있다²⁾. 침입균사는 숙주의 조직으로 들어가서 혈관에서 증식한 후 사충의 외부로 균사를 자라게하여 포자를 형성한다. 곤충은 곰팡이의 성장 영양분의 고갈 독물중독에 의한 복합적인 작용에 의해 죽게

되며 이러한 곰팡이에 의한 병현상을 mycosis³⁾라고 한다. 이상과 같이 살충력을 가진 곤충 병원미생물이 30-50% 정도의 chitin을 함유하고 있는 곤충의 외원표피층을 분해 한다면 효과적인 살충효과를 나타낼수 있다.

본 연구에서는 토양해충방제용 미생물인 *Metarhizium anisopliae* HY-2를 이용하여 균체 및 chitinase를 최적으로 생산할 수 있는 배지조건과 이의 생산에 의한 해충의 살충력을 조사하였다.

재료 및 방법

균주의 배양은 고압멸균한 CDY-broth 배지에 균주를 접종하여 26°C/ 4-5day/ 180rpm으로 진탕배양하였다. Viable count(cfu/g)와 Hemacytometer counting(No. of spore/g)을 이용하여 생균수와 conidia의 수를 측정하였다.

Chitinase의 활성은 Yanai⁴⁾의 방법에 의하여 측정하였다. 0.5% colloidal chitin과 조효소액을 포함하는 반응혼합물을 27°C/ 2hr 동안 방치한 후 이 혼합물을 원심분리하여 상등액을 취하고 0.8M boric acid와 1M KOH를 첨가하여 pH를 10으로 적정하여 3분동안 중탕하였다. DMAB용액을 첨가하여 20분동안 방치한 후 A₅₃₅에 측정하였다. Chitinase(Sigma Co.)의 효소 활성의 측정을 위한 기질, 효소의 양 및 반응시간의 결정은 Chitinase를 사용하였으며 1 unit는 분당 N-acetylglucosamine 1 μ mol에 해당하는 당을 생성하는 효소량으로 정의하였다. *M. anisopliae* HY-2의 Chitinase를 생산하는 최적의 배양조건을 확인하기 위하여 다양한 배지조성을 이용하여 균체의 증식과 chitin 분해효소의 생산성을 분석하였다. 생물검정은 주둥무늬차색풍뎅이 (*Adoretus tenuimaculatus*) 유충의 생태적 특성과 인공사료의 섭취습성과 관련하여 합리적이고 재현성이 높은 방법인 충체침지법과 접촉독성법을 수행하여 검정하였다.

결과 및 고찰

M. anisopliae HY-2의 각각의 배지에 대한 균체 증식의 결과 자백 기본배지 및 밀기울이 첨가된 배지를 제외한 모든 실험구에서 배양 4일째의 균체 생산성이 8일째 보다 높아서 액상배양에 의한 배양시간의 단축으로 생산성향상이 이루어졌다. 배지 성분별 균체 생산성은 흰점박이 꽃무지(*P. brevitarsis*) 분말이 포함된 배지에서 가장 높았고, 그 다음으로 효모 추출물, 면실박, 대두분, 포도당의 순이었다. Chitin, 전분, 밀기울은 액상에서의 균체생산성이 낮았다. 2%의 흰점박이 꽃무지 분말을 사용한 경우에 자연상태의 곤충과 비슷한 조성으로 인해 특히 균체 생산성이 높았는데 이때 10ml 배지당 0.5g 이상이 균체량이 관찰되었다.

Chitin 분해효소 생산성의 조사 결과 기질로 사용한 chitin을 배지로 사용하였을 경우 높은 효소 생산성을 보였다(Fig.1.). 위의 결과는 기질로 사용한 Chitin에 의해 효소 생산이 유도된 것을 보여 준다. 그리고 효모 추출물과 쌀겨, 흰점박이 꽃무지 분말을 사용할 경우 좋은 생산성을 보였으며, 탄소원 및 질소원의 종류가 chitin 분해효소의 생성에 중요한 인자로 작용함을 알 수 있었다. 생산성 및 상업성을 고려하여 *M. anisopliae* HY-2 균주의 대량 배양을 위한 기본 배지로 쌀겨와 밀기울이 첨가된 배지로 결정하여 in vitro 활성을 측정하였

으며 경제적으로 생산할 수 있음을 확인할 수 있었다(Fig.2).

액체 배양된 포자를 이용한 총채 침지법의 결과 대조구에서는 13~26%의 살충효과가 있는 반면 포자 현탁액에서는 56-64%의 살충효과를(Fig.3-1), 고체 배양된 포자를 이용한 접촉독성은 대조구에서는 20~27%이었고 고체대량배양물에서는 60~64%의 살충 효과를 확인할 수 있었으며(Fig.3-2), 시간이 흐름 에 따라 *M. anisopliae* HY-2 균주에 감염된 주둥무늬 차색풍뎡이 유충을 확인할 수 있었다.

요약

균체 생산성 실험과 chitinase 생산성 실험을 비교해 볼 때, chitinase만을 생산하는 조건에서는 배지성분에 chitin을 첨가해 주는 것이 좋으나, 해충 방제용으로 살균력을 증진시키기 위하여 균체량과 chitinase의 생성량 및 산업적, 경제적 사용이 용이한 배지를 고려할 때에는 쌀겨와 밀기울이 첨가된 배지가 좋은 배지임을 알 수 있었다. 또한 이 배지를 이용하였을 경우 균체는 1×10^8 cfu/g, chitinase는 370mU/g로 생산되었으며 생물검정결과 53-64%의 탁월한 살충효과를 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. Midwest Biological Control News. 1997. 7월호
- 2) Bery, P. T., *et al.* "Integumental penetration of the pea aphid, *Acyrtosiphon pium*, by *Conidiobolus obscurus*" (1986), *J. Invertebr. Pathol.* 48:34-41
- 3) Hassan, A. E. M., *et al.* "Ultrastructural study of the penetration by *Metarhizium anisopliae* through Dimilin-affect cuticle of *Manduca sexta*." (1989), *Invertebr. Pathol.* 54:117-124.
- 4) Yanai, K., *et al.* "Purification of two chitinase from *Rhizopus oligosporus* and isolation and squencing of the encoding gens" (1992), *J. Bacteriol.* 174:7398-7406

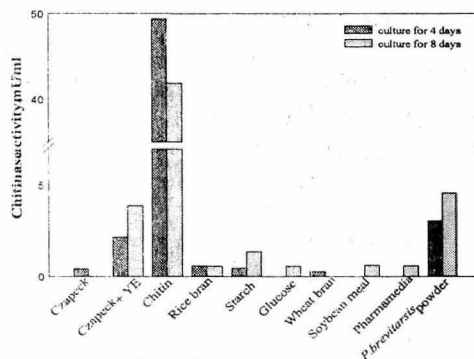


Fig.1. Effect of different carbon and nitrogen sources on chitinase activity of *M. anisopliae* HY-2. Fungal cultures centrifuged and the supernatant was filtered through a 0.22m-pore-size filter. The substrate for enzyme activities were used colloidal chitin. The enzyme reaction was performed in 0.2M phosphate buffer(pH 6.2) at 37°C for 50 min.

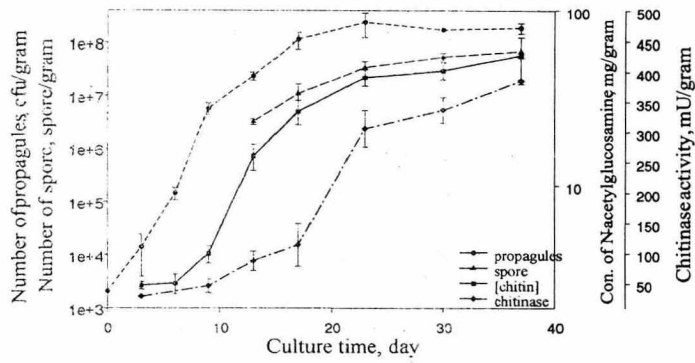


Fig.2. Growth and extracellular chitinase activity of *M. anisopliae* HY-2 in flask with wheat bran media.

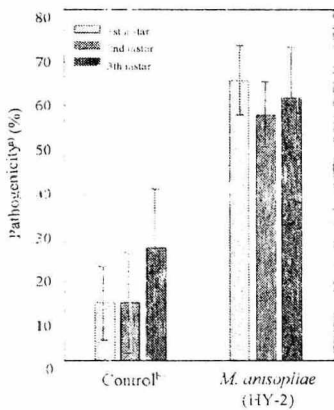


Fig.3-1. Percentage pathogenicity of liquid broth culture on the 1st, 2nd, 3rd instar larva of *Adoretus tenuimaculatus*

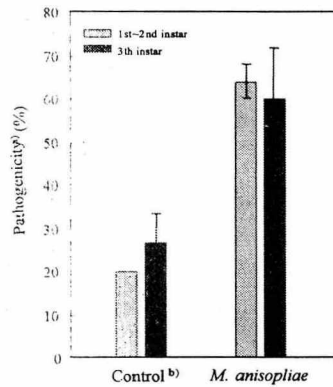


Fig.3-2. Percentage pathogenicity of solid culture on the 1st~2nd, 3rd instar larva of *Adoretus tenuimaculatus*

^{a)} *Adoretus tenuimaculatus* were inoculated by dipping in a conidia suspension (1×10^8 spore/ml) and the pathogenicity was determined 15~20days after treatment.
^{b)} Tween 80 solution(0.05%)/DDW was used as a control treatment.