

당밀을 이용한 곤충병원성 곰팡이 *Beauveria bassiana* 726의 포자생산

김 병 혁 · ¹강 성 우 · 윤 철 식 · ²성 재 모 · 홍 석 인 · †김 승 욱
고려대학교 화학공학과, ¹생명공학원, ²강원대학교 농생물학과
(접수 : 1999. 5. 18., 게재승인 : 1999. 6. 5.)

Spore Production of Entomopathogenic Fungus, *Beauveria bassiana* 726, Using Molasses

Pyong Hyok Kim, Seong Woo Kang¹, Cheol Sik Yoon, Jae Mo Sung², Suk In Hong, and Seung Wook Kim†

Department of Chemical Engineering and

¹Graduate School of Biotechnology, Korea University 1, Anam-dong, Sungbuk-ku, Seoul 136-701, Korea

²Department of Agricultural Biology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

(Received : 1999. 5. 18., Accepted : 1999. 6. 5.)

To optimize the culture conditions for *Beauveria bassiana* 726, the effects of culture medium, pH, and temperature on mycelium and spore production were investigated. The optimum temperature and pH for the cultivation of *B. bassiana* 726 were 28 °C and 5.0, respectively. The optimized medium was composed of 1.0~2.0% total sugar from molasses, 0.5% corn steep liquor and 0.05% KH₂PO₄. In the cultivation of *B. bassiana* 726 with the optimum medium, the specific growth rate and substrate utilization were well-fitted with the proposed kinetic model in the shake flask and stirred tank reactor. When the fed-batch cultivation using carbon source, nitrogen source, and mineral salt as a feeding medium was compared with batch cultivation in stirred tank reactor, mycelium (12.7 g/L) and spore production (5.4×10⁸/mL) were enhanced up to 110% and 85%, respectively.

Key Words : molasses, *Beauveria bassiana*, spore production, fed-batch cultivation

서 론

근대농업에서는 병충해 예방 및 잡초제거를 위해 여러 가지 기술들을 사용하여 생산성을 증대시키고 있으며, 이러한 기술 중 가장 일반적인 방법은 화학적 방제기술로서 해충이나 잡초 등을 방제하는데 있어 다른 기술에 비해 매우 경제적이어서 현재 전 세계적으로 널리 사용되고 있다. 그러나 화학적 방제기술에서 주로 사용되는 살충제의 대부분이 살포 후 다양한 물리 화학적 경로를 통하여 생태계에 유해한 물질로 전환될 뿐만 아니라 익충까지도 죽이는 광범위한 살충범위로 인하여 수질오염, 수중생태계 파괴 등 여러 가지 환경문제를 유발시키고 있다. 또한 살충제를 사용하면 할수록 해충의 살충제 내성이 더욱 증가하여 더욱 강력한 살충제를 사용하거나 잦은 방제를 통해 병충해를 조절해야만 한다. 이러한 여러 가지 단점을 지닌 화학적 살충제는 다른 방제방법으로 대체되어야 하는데, 이중 생물학적 방제방법인 곤충병원성 곰팡이에 의한 살충방법을 이용하면 이러한 환경문제는 해결될 수 있다고 여겨진다

곤충병원성 곰팡이의 살충작용은 분생포자가 곤충 외벽의 표

면에 달라붙어 발아한 후 침입도구인 부착기로 큐티클층을 통과하거나 분생포자에서 발아한 발아관이 직접 큐티클층을 통과하여 곤충내부로 침입하게 되는데, 이때 물리적인 작용과 lipase, protease, chitinase 등 효소작용이 함께 일어난다(1). 곤충내부에 침입한 곰팡이는 군사체로 성장하거나 확장된 발아관으로 부터 군사체가 격막화되어 출아포자를 형성한 후 독성 대사물질(cyclodepsipeptide, beauvericin)을 분비하거나 혈체강의 영양원을 고갈시켜 숙주를 죽인다. 곤충이 죽고난 후에 곤충내부는 군사체가 계속해서 성장하여 군사체로 팽창한 미이라와 같은 곤충사체는 건조하거나 추운 환경에서는 군사체의 저장과 보존 장고로서 작용하다가 성장하기 좋은 환경이 되면 곤충의 큐티클을 뚫고 나와서 성장하여 사체 위에 포자층을 형성한다. 이렇게 성장한 곰팡이가 생산하는 분생포자는 물이나 바람 등에 의해서 다시 부근 지역의 다른 곤충을 감염시킨다. 감염된 곤충은 죽기도 하지만 생식능력이 감소되거나 또는 감염된 유충이 태어나기도 하는 이차적인 살충효과도 있다(2,3).

곤충병원성 곰팡이를 이용한 생물학적 방제기술의 장점은 인간과 고등동물, 어류, 곡물 등에 직접적인 피해와 위험물질의 축적 등과 같은 간접적인 유해 요소가 없어 안전성이 높고, 목적하는 해충만을 선택적으로 방제할 수 있다는 점이다. 또한 화학적 살충제와는 달리 살충효과가 지속적이어서 반복적인 방제를 최소화 할 수 있으므로 곤충의 내성이 잘 유발되지 않는다는 점이다.

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering, Korea University, 1, Anam-dong, Sungbuk-ku, Seoul 136-701, Korea

Tel : 02-3290-3300 Fax : 02-926-6102

e-mail : swkim@prosys.korea.ac.kr

곤충병원성 곰팡이의 대량배양은 주로 액체배양과, 반고체 배양 그리고 이단계배양 (diphasic fermentation)이 쓰이고 있다. 반고체 배양은 살충성이 강한 분생포자를 많이 생성한다는 장점을 가지고 있으나 액체배양이 상대적으로 쉽게 대규모화할 수 있는 장점 때문에 현재 많이 연구되고 있다. 균사체의 대량 액체배양을 위해서는 최적 성장온도와 최적 pH, 그리고 적합한 탄소원, 질소원, 무기염류와 각 영양원의 최적농도가 결정되어야 한다 이들의 중요성은 균체량과 포자생성에 많은 영향을 준다 (4,5,6).

본 연구에서는 곤충병원성 곰팡이를 미생물 살충제로 산업화에 이용하기 위한 대량배양 기술을 확립함이 그 목적이다 이를 위해서 *Beauveria bassiana* 726의 성장조건을 확립하고 값싼 배지인 당밀을 이용한 생산매지의 최적화와 최적화된 배지에서 포자의 대량생산을 위해 교반식 생물반응기에서 회분식 및 유가식 배양을 수행하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

본 실험에 사용된 균주는 곤충 병원성 곰팡이의 일종인 *Beauveria bassiana* 726로서, 강원대학교 농생물학과로부터 분양을 받았다. 균주 보관용 배지는 PDA (Potato Dextrose Agar)배지를 사용하였고, 종균배지로는 DP (20% Dextrose, 10% Bacto peptone)배지를 사용하였다

배양방법

PDA 사면배지에서 배양된 균체를 멸균수 10 mL를 이용하여 포자와 균사체를 분리한 후 종균배지에 접종하여 조업부피가 100 mL 되게 하여 28 °C, 180 rpm으로 5일간 배양하여 종균으로 사용하였다.

본배양 기질로는 제일제당 인천공장에서 제공받은 당밀을 사용하였고 그 조성은 30~35% sucrose, 10~15% 전화당 (포도당과 과당). 그리고 시럽내의 고형분의 농도는 70% (w/w)이었고, 회분의 농도는 10.4%였다. 증류수를 이용하여 당밀을 4배로 희석하고 황산으로 pH 4.0으로 맞춘 후, 121 °C, 15기압에서 30분간 열처리하였다. 열처리된 당밀을 15,000 rpm에서 30분간 원심분리 후 얻어낸 농축액을 적절하게 다시 희석하여 사용하였다

본배양은 250 mL 삼각플라스크에서 조업부피가 50 mL가 되도록 액체배지를 만들어 종균을 10% (v/v)로 접종한 후 28 °C, 180 rpm으로 진탕배양하였다 교반식 생물반응기 (한국발효기)에서 배양시 온도는 28 °C, 초기 pH는 5.0으로 맞추어서 300 rpm, 1.0 vvm의 조건으로 배양하였다. 회분식 배양에서의 조업부피는 1.5 L이었다.

유가식 배양에서는 당밀을 공급배지로 이용한 경우와 당밀, 질소원 그리고 무기염류를 혼합한 공급배지를 이용한 두 가지 방법을 수행하였다.

분석방법

균체량 측정은 50 mL 배양액을 Whatman GF/C (47mΦ Circles)를 이용하여 감압여과 후 증류수로 잔여 배지성분을 세척한 다음 70 °C에서 overnight하여 dry cell weight (DCW)로 측정하였다. 환원당과 sucrose의 농도는 Modified DNS 방법

(7)과 Dubios 방법(8)으로 측정하였다. 포자농도는 혈구계수기 (Haemocytometer)를 이용하여 배양물내의 포자농도를 측정하였다.

결과 및 고찰

배양온도와 초기 pH의 영향

Beauveria bassiana 726 배양시 배양온도가 균체농도에 미치는 영향을 조사하였다. 23 °C, 28 °C 그리고 33 °C에서 균주를 배양하여 균체농도를 조사하였을 때 균체농도가 각각 9.81, 17.61, 4.46 g/L로 28 °C에서 가장 좋은 성장을 보였다 (Table 1)

초기 pH가 균체농도에 미치는 영향을 조사하기 위하여 초기 pH를 4.0~8.0으로 변화시켜 균주를 배양했을 때 균체농도가 각각 3.24, 9.33, 4.96, 7.47, 5.72 g/L로 초기 pH 5.0에서 가장 좋은 성장을 보였다 (Table 2). 따라서 최적 배양온도와 초기 pH는 28 °C, 5.0으로 이후의 모든 배양에 적용하였다

Table 1. Effect of cultivation temperature on cell concentration of *B. bassiana* 726

배양온도	Cell concentration (g/L)
23°C	9.81
28°C	17.61
33°C	4.46

Culture was carried out in the medium containing 5.0% total sugar and 10% bacto peptone

Table 2. Effect of initial pH on cell concentration of *B. bassiana* 726.

Initial pH	Cell concentration (g/L)
4.0	3.24
5.0	9.33
6.0	4.96
7.0	7.47
8.0	5.72

Culture was carried out in the medium containing 5.0% total sugar and 10% bacto peptone

당밀 농도의 영향

1.0% bacto peptone을 함유한 배지에 전처리한 당밀의 당농도를 각각 1.0%, 2.0%, 3.0%, 4.0%로 첨가하여 그 영향을 조사하였다 최대 균체와 포자농도는 당농도가 2.0%인 경우에 각각 12.57 g/L와 1.88×10^8 /mL로 가장 좋은 결과를 보인 반면에 수울면에서는 당농도가 1.0%인 경우가 0.94 (g dry cell weight/g carbon source)로 가장 높은 값을 보여주었다 (Table 3). 한편 당농도가 4.0%인 경우에는 당을 50% 밖에 이용하지 못했다. 균체의 성장 모습은 육안으로도 잘 자랐음을 확인할수 있을 정도로 균체의 성장이 왕성하였다. 성장 초기에는 균체가 균사체 형

Table 3. Effect of total sugar concentration on cell concentration, spore and cell yield of *B. bassiana* 726.

Initial total sugar (g/L)	Final pH	Cell conc (g/L)	Spore ($\times 10^8$ /mL)	Residual total sugar (g/L)	*Y _{vs}
10	6.92	7.35	1.04	2.22	0.94
20	6.50	12.57	1.88	3.96	0.78
30	5.23	9.43	0.69	8.84	0.48
40	5.35	8.60	0.80	20.38	0.44

Culture was carried out in the medium containing 1.0% bacto peptone as a nitrogen source

*Y_{vs} : cell yield (g dry cell weight/g carbon source used)

태로 자랐지만 성장이 진행됨에 따라서 pellet 형태로 성장함을 알 수 있었다. 균체의 수율은 1.0% 농도에서 가장 높게 나왔고, 2.0%인 경우에서 최대의 균체와 포자농도를 보이고, 수율도 크게 차이가 없어 최적 초기 당농도는 1.0~2.0%를 이용할 수 있음을 알 수 있었다.

질소원의 영향

여러 종류의 유기질소원 (bacto peptone, proteose peptone, corn steep liquor, yeast extract)을 1.0%로 첨가하여 영향을 살펴보았다. Yeast extract를 이용한 경우가 다른 유기질소원을 사용한 경우 (10.3~11.7 g/L) 보다 균체농도가 14.30 g/L로 약 22~34% 정도 높았으나, 포자농도 면에서는 corn steep liquor 가 약 0.4×10^8 /mL로 가장 높아 값이 싼 corn steep liquor를 대량배양에서의 경제성을 생각하여 질소원으로 채택하였다 (Table 4)

그리고 여러 가지 무기질소원의 영향을 살펴본 결과 첨가하지 않은 대조구보다 균체농도와 포자농도에서 비슷하거나 낮아져 본 실험에서는 배제되었다. Corn steep liquor를 0.5~3.0% 농도로 첨가하여 배양한 결과 모든 농도에서 거의 비슷한 균체농도 (11.2~14.8 g/L)를 보였지만 포자농도와 수율면에서는 0.5%

Table 4. Effect of various organic nitrogen sources on cell concentration, spore and cell yield of *B. bassiana* 726.

Organic nitrogen source (1.0%)	pH	Cell conc. (g/L)	Spore ($\times 10^8$ /mL)	*Y _{vs}
Control	4.52	4.72	0.66	4.72
Bacto peptone	4.23	10.81	0.05	10.81
Proteose peptone	4.18	10.32	0.16	10.32
Corn steep liquor	5.06	11.68	0.39	11.68
Tryptone	4.75	6.75	0.07	6.75
Yeast extract	4.47	14.26	0.08	14.26

Culture was carried out in the medium containing 2.0% total sugar and 1.0% organic nitrogen source

*Y_{vs} : cell yield (g dry cell weight/g nitrogen source)

Control : nitrogen source was not added

Table 5. Effect of concentration of corn steep liquor on cell concentration, spore and cell yield of *B. bassiana* 726.

Concentration (% v/v)	pH	Cell conc. (g/L)	Spore ($\times 10^8$ /mL)	*Y _{vs}
0.5	5.08	11.16	0.76	44.64
1.0	4.65	11.85	0.01	23.70
1.5	5.16	13.65	0.03	18.20
2.0	4.57	14.03	0.05	14.03
2.5	4.51	13.11	0.02	0.16
3.0	4.55	14.83	0.04	0.25

Culture was carried out in the medium containing 2.0% total sugar and various concentrations of corn steep liquor

*Y_{vs} : cell yield (g dry cell weight/g nitrogen source used)

에서 각각 0.76×10^8 /mL, 44.6 (g dry cell weight/g nitrogen source)으로 나타났다 (Table 5). 따라서 최적의 corn steep liquor 농도는 0.5%로 결정하였다.

무기염류의 영향

다양한 무기염류를 0.1% 농도로 첨가하여 균체 성장과 포자의 생성을 관찰한 결과 대조구 보다 균체농도는 비슷하거나 저조하였으며 포자농도에서는 모두 낮았다 (Table 6). 무기염류 중에서도 K₂HPO₄와 KH₂PO₄를 첨가한 경우에서 균체농도가 각각 11.2, 9.2 (g/L)로 높게 나타나 농도별로 조사하였다 K₂HPO₄와 KH₂PO₄를 각각 0.05~0.2% 농도별로 첨가하여 배양한 결과 균체농도와 포자농도는 무기염류의 농도에 따라 크게 변하지 않았지만 이중 가장 나은 균체의 생성과 포자의 생성을 보인 0.05% KH₂PO₄로 결정하였다 (Table 7, 8). 따라서 최적화된 기본배지의 조성은 1.0~2.0% total sugar, 0.5% corn steep liquor, 0.05% KH₂PO₄로 결정되었다

Table 6. Effect of inorganic salt on cell concentration and spore of *B. bassiana* 726.

Concentration (0.1%, w/v)	pH	Cell conc. (g/L)	Spore ($\times 10^8$ /mL)
Control	4.18	7.75	1.01
K ₂ HPO ₄	4.15	11.19	0.98
KH ₂ PO ₄	4.31	9.15	0.64
CoSO ₄ · 7H ₂ O	3.97	6.61	0.11
ZnCl ₂	4.13	8.50	0.66
CuCl ₂ · 7H ₂ O	4.27	0.95	0.02
MgSO ₄ · 7H ₂ O	4.69	7.41	0.59
NaCl	4.45	8.95	0.59

Culture was carried out in the medium containing 2.0% total sugar, 0.5% corn steep liquor and 0.1% inorganic salt

Control : inorganic salt was not added

최적화된 생산배지에서의 포자생산

최적화된 배지조성을 이용한 삼각플라스크 배양에서 시간에 따른 profile은 Figure 1과 같다. 약 80시간 정도에서 균체의 성장은 stationary phase에 도달하였고, 포자의 농도는 120시간 정도에서 최고의 농도 (1.5×10^8 /mL)를 나타냈다. pH는 약 35시간 후에 포자의 농도가 급격하게 증가하면서 pH 4.0 정도를 유지하다가 포자가 최대농도에 이른 후 pH가 증가하여 최종 pH 6.0을 나타내었다. 기질은 거의 시간에 따라 1차의 감소 경

Table 7. Effect of concentration of KH_2PO_4 on cell concentration and spore of *B. bassiana* 726.

Concentration (% w/v)	pH	Cell conc (g/L)	Spore ($\times 10^8$ /mL)
0.05	4.44	8.46	1.75
0.10	4.53	8.45	1.40
0.15	4.70	8.53	1.75
0.20	5.02	8.82	1.36

Culture was carried out in the medium containing 2.0% total sugar, 0.5% corn steep liquor and various concentrations of KH_2PO_4

Table 8. Effect of concentration of K_2HPO_4 on cell concentration and spore of *B. bassiana* 726

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

Culture was carried out in the medium 2.0% total sugar, 0.5% corn steep liquor and various concentrations of K_2HPO_4

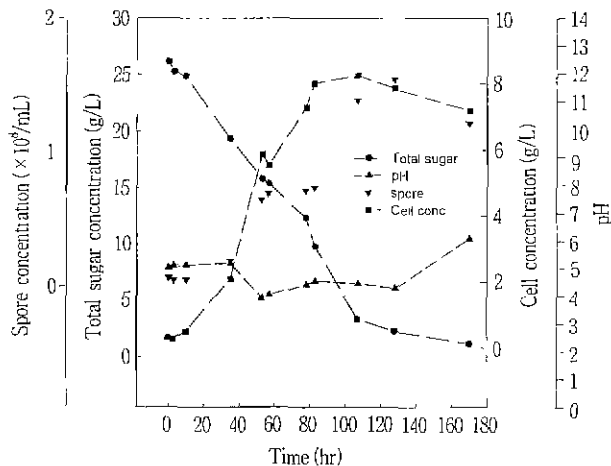


Figure 1. Batch culture in the shake flask with the optimized medium.

향을 보였고, 균체의 농도를 로그값을 취하면 시간에 따라서 3차의 경향으로 증가함을 알 수 있었다 (Figure 2). 이를 토대로 기질의 감소와 비성장속도를 fitting한 결과 아래의 모델과 일치함을 알 수 있었다 (Figure 3).

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

s : Substrate concentration (g/L)

μ : Specific growth rate

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

K_s : Utilization constant (g/L)

교반식 생물반응기 (1.5 L)에서 회분식 배양한 결과 (Figure 4), 기질 (초기농도 13 g/L)은 약 72시간 정도에서 고갈됨을 알 수

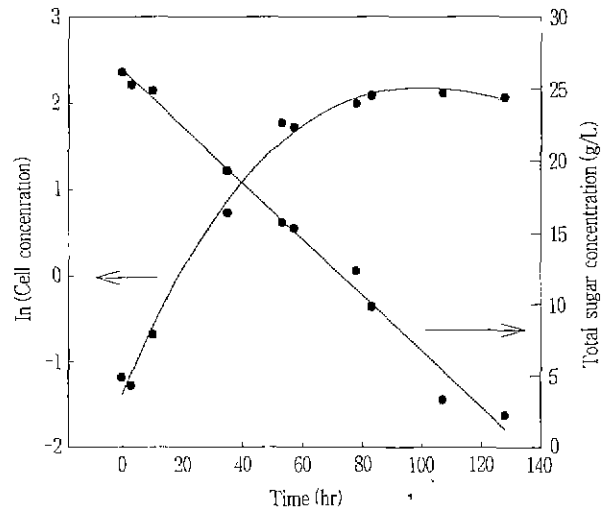


Figure 2 Cell growth and substrate utilization in the shake flask culture with the optimized medium.

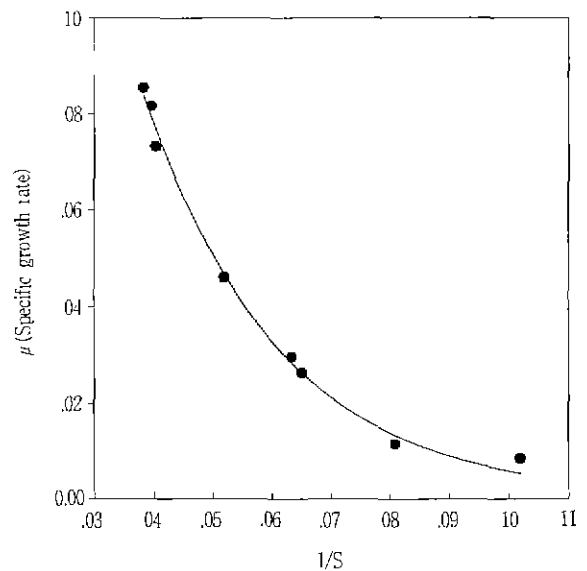


Figure 3. μ vs $1/s$ of batch culture in the shake flask with the optimized medium.

있었다. 균체의 최고농도는 약 70시간에 6.0 g/L로 나타났고, 이후 약 20시간 후에 나타나는 포자의 최고 농도는 2.80×10^8 /mL 이었다. 그러나 삼각플라스크 배양과는 달리 균체와 포자의 농도가 최대값에 이른 다음 급격하게 감소함을 보였다. 이는 기질의 소모속도가 교반식 생물반응기에서 빠르기 때문으로 생각된다. 기질의 감소 profile을 보면 대략 60시간 정도까지는 거의 시간에 따라서 1차로 감소함을 알 수 있었다. 회분식 배양에서의 반응속도 매개변수를 결정하기 위해, 균체의 농도와 기질의 감소를 3차와 1차로 fitting하여 보았다 (Figure 5). 이를 통해 삼각플라스크 배양에서의 모델과 잘 맞음을 알 수 있었다 (Figure 6).

Figure 7은 교반식 생물반응기에서 환원당만을 공급배지로 이용한 유가식 배양을 보여준다 10% (w/v) 환원당만을 공급배지로 첨가한 경우 46.5시간째 기질의 농도를 원하는 농도로 유지하기 위하여 공급배지를 34 mL 투입해 주었다 Figure 7에서 보여주는 바와 같이 균체와 포자의 최대농도는 각각 5.5 g/L, 1.7×10^8 /mL로 회분식 배양에 비해 증가하지 않았다. 균체의 최대농도는 회분식 배양과 거의 같은 시기에 얻었으나, 포자의 최

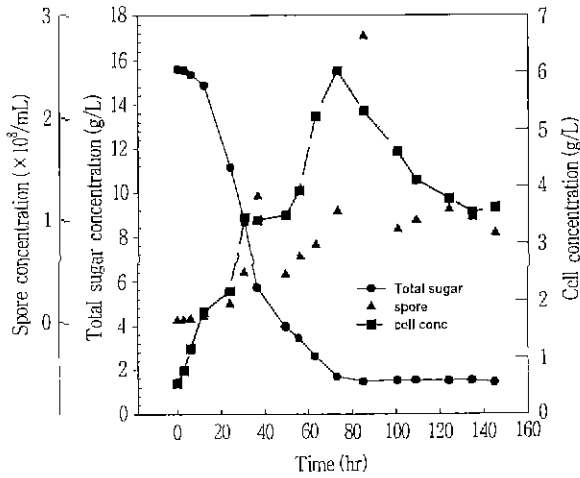


Figure 4. Batch culture in the stirred tank reactor with the optimized medium

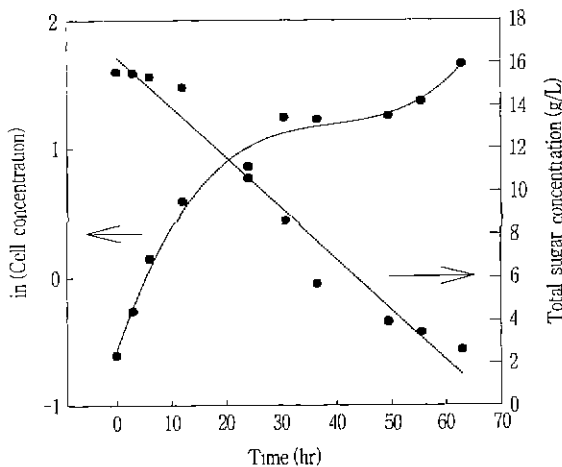


Figure 5. Cell growth and substrate utilization of batch culture in the stirred tank reactor with the optimized medium.

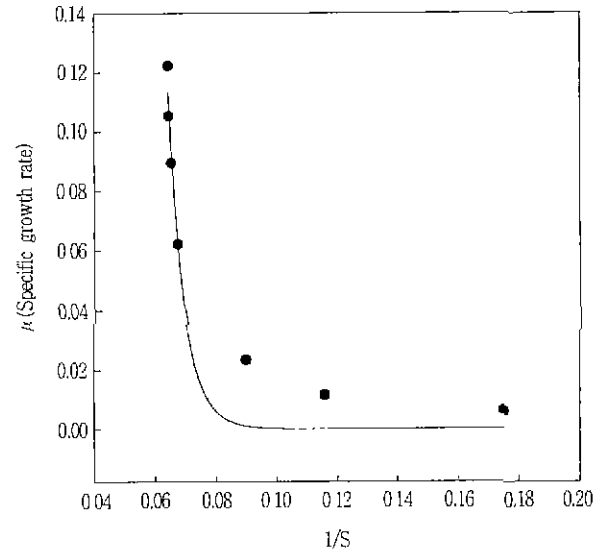


Figure 6. μ vs $1/S$ of batch culture in the stirred tank reactor with the optimized medium.

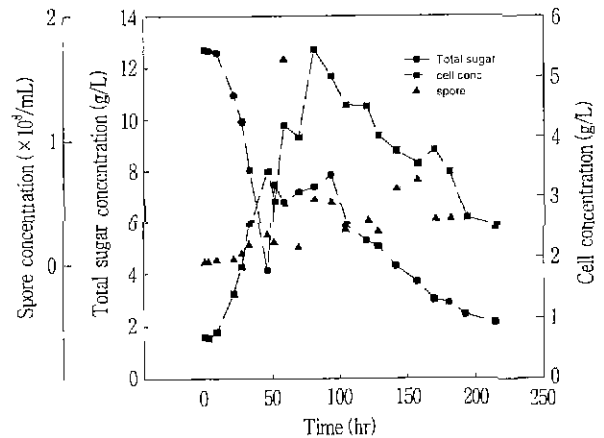


Figure 7. Fed-batch culture in the stirred tank reactor with the optimized medium. Feeding medium containing only carbon source was added at 61 hrs.

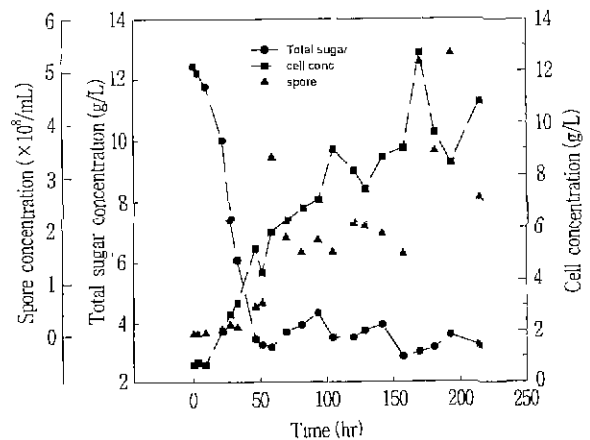


Figure 8. Fed-batch culture in the stirred tank reactor with the optimized medium. Feeding medium containing carbon, nitrogen and inorganic salts was added every 12 hrs after 46.5 hrs.

대농도는 낮지만 약 50시간 후에 얻어 회분식 배양에 비해 훨씬 빨리 생성됨을 알 수 있었다. 탄소원을 이용한 유가식 배양 역시 균체와 포자농도가 최대값에 이른 후 급격하게 감소하여 회분식 배양보다 더 낮은 값을 보여주고 있다 이는 공급기질을 투입한 후 기질의 소모가 매우 느리게 이루어짐에 기인한 것으로 보인다. 이를 통해 *B. bassiana* 726의 균체의 성장과 포자의 생성을 위해서는 질소원의 영향이 중요함을 확인할 수 있었다.

따라서 기본 생산배지를 공급배지로 이용한 유가식 배양을 검토하였다. 10% 환원당, 2.5% corn steep liquor, 0.5% KH_2PO_4 를 포함한 공급배지를 사용한 유가식 배양의 결과를 Figure 8에 보여준다 기질이 어느 정도 소모되는 46.5시간 후에 매 12시간마다 공급배지를 공급하였을 때 시간에 따라 계속적으로 기질이 소모됨을 알 수 있었고 균체의 농도 및 포자의 농도도 계속 증가함을 알 수 있었다. 최대 균체와 포자의 농도는 각각 12.7 g/L, 5.4×10^8 /mL이었으며 회분식 배양결과와 비교했을 때 각각 110%와 85%가 증가되었다.

결론적으로 생산배지 최적화에서는 당밀과 corn steep liquor로 조성된 매우 값싸고 간단한 생산배지가 확립되었으며, 포자의 대량생산에는 회분식 배양이나 탄소원만을 이용한 유가식 배양보다 탄소원, 질소원, 무기염류가 포함된 공급배지를 이용한 유가식 배양이 가장 우수하다는 결론을 내릴 수 있었다

요 약

Beauveria bassiana 726의 배양조건을 최적화하기 위하여 균체와 포자 생산에 대한 pH, 온도 그리고 배양배지의 영향을 조사하였다. *B. bassiana* 726의 최적 배양온도와 pH는 각각 28 °C, 5.0이었다 최적화된 배지조성은 1.0~2.0% total sugar, 0.5% corn steep liquor 그리고 0.05% KH_2PO_4 이었다

최적화된 배지를 사용하여 삼각플라스크와 교반식 생물반응기에서 배양한 결과 균체의 성장속도와 기질의 감소는 아래의 모델과 잘 맞았다

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

교반식 생물반응기에서는 탄소원, 질소원 그리고 무기염류를 함유한 공급배지를 이용한 유가식 배양에서 균체와 포자의 농도가 각각 12.7 g/L, 5.4×10^8 /mL로 회분식 배양과 비교했을 때 각각 110%와 85%가 증가되었다.

감 사

본 연구는 농림부의 농림수산특정연구비에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Hajek, A. E. and R. J. St. Leger (1994), Interaction between Fungal Pathogens and Insect Hosts *Annu. Rev. Entomol.* 39, 293-322
- Khachatourians, G. G. (1991), Physiology & Genetics of Entomopathogenic Fungi, Handbook of Applied Mycology (K. K. Arora, L. Ajello, & K. G. Mukerji, eds), Vol. 2, p.613-663, Marcel Dekker, Inc., New York
- Robert, D. W. and R. A. Humber (1981), Entomogenous Fungi, Biology of Conidial Fungi (G. T. Cole and B. Kendrick, eds), Vol 2, p201-236, Academic Press, New York
- Feng, M. G., T. J. Poprawski, and G. G. Khachatourians (1994), Production, Formulation and Application of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* for Insect Control. Current Status, *Biocontrol Sci. Technol.* 4, 3-34
- Im, D. J., D. H. Lee, R. M. Aguda, and M. C. Rombach (1988), Effect of Nutrients and pH on the Growth and Sporulation of Four Entomogenous Hypomyces Fungi (Deuteromycotina), *Korean J. Appl. Entomol.* 27(1), 41-46
- Vézina, C., K. Singh, and S. N. Sehgal (1965), Sporulation of Filamentous Fungi in Submerged Culture, *Mycologia.* 57, 723-736
- Miller, G. L. (1959), Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, *Anal. Chem.* 31(3), 426-428
- Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith, (1956) Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, *Anal. Chem.* 28(3), 350-356