

녹강균(*Metarhizium anisopliae*)의 최적 배양조건 및 효소활성

박영일 · 한영환*

동국대학교 자연과학대학 생물학과

녹강균(*Metarhizium anisopliae*)을 생물살충제로서 활용할 목적으로 녹강균의 균사생육 및 포자형성에 미치는 환경요인과 균사의 분비 효소 활성에 대하여 조사하였다. *M. anisopliae* DGUM35001의 균사 생육에 적절한 온도와 pH는 각각 26°C 및 5~9이었다. 사용한 복합배지 중 MCM와 SDPY에서 우수한 균사 생장을 보여주었으며, 공중균사는 SDPY 사용시 가장 우수하였다. 최소배지로 Czapek-Dox 한천배지를 사용하여 탄소원 이용성 실험의 결과, 당류에서 glucose가 이당류에서 sucrose가 가장 우수한 탄소원이었다. 고분자 물질로 chitin 사용시 우수한 균사 생육을 보여주었다. 유기질소원으로 bacto-peptone과 soytone이 무기질소원으로 urea와 ammonium phosphate가 우수한 균사생육을 나타내었으며, 아미노산으로 serine 첨가시 가장 우수한 균사 생육을 나타내었다. Starch배지를 사용하였을 때 가장 우수한 포자형성의 결과를 얻었다. 액체배양후 균사를 제거한 상등액을 조효소액으로 사용시 amylase와 protease 효소 활성이 우수하였다. 그러나, lipase와 chitinase 효소활성은 상대적으로 낮았다.

Key words □ enzyme activity, *Metarhizium anisopliae*, mycelial growth, spore

현재까지 해충 방제를 목적으로 사용되고 있는 살충제는 화학 합성을 통하여 제조된 독성 농약이 대부분이다. 이는 사람과 동물 등 비대상 생물에 대해 약해가 심할 뿐만 아니라, 방제후에도 잘 분해되지 않아 토양에 오래 동안 잔류하여 환경오염의 주요 요인으로 지적되어 왔다. 최근 약제 내성 해충의 빈번한 출현으로 보다 독성이 강한 살충제의 사용이 요구되기도 한다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여 개발된 가장 효과적인 방제법은 길항 미생물 혹은 이들이 생성하는 항생물질을 이용하는 생물학적 방제법이다.

지금까지 알려진 곤충병원성 곰팡이는 *Beauveria bassiana*, *Hirsutella thompsonii*, *Paecilomyces fumosoroseus* 등을 포함하여 약 400여종이 보고되고 있다. 일반적으로 곤충 병원성 진균의 살충작용은 기생균의 분생포자가 곤충 외골격의 큐티클 층을 뚫거나, 먹이 중의 분생포자를 통하여 감염된 후 숙주를 치사시킨다. *M. anisopliae*는 벼멸구, 진딧물, 좀 등 다양한 종류의 해충을 감염시켜 이들을 치사시킬 수 있는 능력이 있어 *B. bassiana*와 함께 살충제로의 사용 가능성이 제기되고 있다. *M. anisopliae*는 곤충병원성 사상균으로 yeast phase 시기에 destruxin으로 알려진 depspeptides 독소를 분비한다. Depspeptides 독소는 살아있는 곤충에 감염시 즉시 마비 증세가 나타나며 몇 일 이내로 감염된 곤충을 죽일 수 있는 강력한 독성을 가지고 있다. Roberts(11)는 몇몇 유기질소원과 무기질소원을 첨가하였을 때, *M. anisopliae*의 균사체의 성장과 독성 물질의 생산에 관해서 연구했고, Campbell(4)은 *M. anisopliae*의 유용

성과 비교적 다양한 amino acid와 amide를 첨가하였을 때의 포자와 균사생장 능력을 연구하였다.

본 연구는 분리 균주 *M. anisopliae* DGUM35001의 생물학적 방제 미생물로의 사용 가능성을 규명할 목적으로, 균사생육 및 포자형성에 영향을 미치는 환경요인 및 배지조성 등을 조사하였으며, 균사 세포외로 분비하는 효소의 활성을 측정하였다.

재료 및 방법

사용 균주

경상북도 경주시 현곡면 야산의 감염된 곤충으로부터 포자를 분리한 다음, 발아된 균사를 PDA배지에서 계대배양하여 사용하였다.

균사 배양

최적 균사생육 온도 및 pH의 규명을 위하여, 온도는 16, 20, 24, 28, 32, 37°C로 조절된 항온기에 배양하였으며, pH는 5.0~12.0의 범위에서 수행하였다. 복합배지의 균사생육에 관한 영향의 규명을 위하여 여러 종류의 복합한천배지를 사용하였고, 각 배지의 pH는 5.0으로 조절하였다(Table 1). 탄소원, 질소원(유기질소원, 무기질소원, 아미노산원), 인산 및 비타민의 이용성에 대한 실험은 Czapek-Dox 최소 한천배지를 사용하였다. 액체배양은 100 ml의 액체배지를 250-ml 삼각플라스크에 넣어 제조한 후 멸균하여 사용하였다. 각 액체배지에 10%(v/v)의 전 배양된 액체종균을 접종하여 24°C에서 10일간 진탕배양하였다(120 rpm). 탄소원으로 당은 1.0%, 유기산은 0.1%를 첨가하였으며, 질소원으로 0.3%의 유기 질소원, 20 mM의 무기질소원, 0.3%의 아미노산을 각각 별도로 첨가하여 실험하였다. 인산원은 최종 농도가

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 054-770-2213, Fax: 054-770-2515
E-mail : yhhan@mail.dongguk.ac.kr

Table 1. The composition of the media used in this experiment

	Media and composition (g/l)							
	SM	YMGGM	PDM	SDPY	YGM	MCM	MMM	CDM
Dextrose		4	20		40	20	20	30
Starch	25							
Yeast extract		4		10	10	2.0		
Malt extract		10						
Peptone				10	10	2.0		
Potato			4	24				
Asparagine							2.0	
NaNO ₃								
K ₂ HPO ₄						1.0	0.5	10
KCl								0.5
FeSO ₄ · 7H ₂ O								0.01
KH ₂ PO ₄						0.5	0.5	
MnSO ₄							0.5	
NaCl								0.5
MgSO ₄ · 7H ₂ O						0.5		0.5
Agar	20	20	20	20	20	20	20	20

PDM, potato dextrose media; MCM, mushroom complex media; MMM, mushroom minimal media; YMGGM, yeast extract-malt extract-glucose media; SM, starch media; SDPY, Sabouraud-dextrose-peptone-yeast extract media; CDM, Czapek-Dox medium; YGM, yeast extract-glucose-malt extract medium

20 mM이 되도록 배지에 첨가하였다.

균사 생육의 측정

PDA 한천배지에 배양된 균사를 cork borer(직경 5 mm)를 이용하여 떼어내어 실험하는 한천배지 위에 위치한 다음 14일간 24°C 항온기에서 배양하였다. Colony의 직경을 mm 단위까지 측정하고 밀도를 관찰하여 균사 생육 정도를 결정하였고, 한천배지 상의 포자 형성을 관찰하였다.

조효소액 및 단백질 농도의 측정

효소 활성의 측정을 위해서 *M. anisopliae* DGUM35001을 MCM 배지에 10%(V/V)의 전 배양된 액체 종균을 접종하여 24°C에서 10일간 배양한 다음, 배양액을 여과(Toyo, 90 mm)하여 균사를 제거하였다. 상등액을 ammonium sulfate로 20%에서 80%까지 단계적으로 포화시켜 4°C에서 하루 동안 방치한 후 4°C에서 원심분리(5,000×g, 20분)하여 침전물을 회수하여 조효소로 사용하였다. 단백질 농도는 Bradford의 방법(2)을 사용하였으며, bovine serum albumin(Fr. V)을 표준품으로 사용하였다.

효소활성의 측정

Amylase 효소활성은 Takagi 등(13)의 방법을, β -glucosidase 효소활성은 Tokao 등(14)의 방법을, xylanase 효소활성은 Kim 등(9)의 방법을, CMCase 효소활성은 Kanda 등(8)의 방법을 사용하였다. Chitinase 효소활성은 Jeong과 Lee(7)의 방법을 사용하였으

며, colloidal chitin의 제조는 Hsu and Lockwood(6)의 방법을 이용하였다. Amylase, β -glucosidase, xylanase, CMCase와 chitinase의 효소활성 측정시의 환원당은 Miller(10)의 DNS법을 사용하여 측정하였으며, 각 효소의 unit는 1분 동안 1 μ mol의 환원당을 생성하는 효소량으로 정의하였다. Protease 효소활성은 Brown and Schmitz(3)의 방법을 사용하였으며, 1 unit는 420 nm에서의 흡광도 값이 0.01 증가하는 것으로 정의하였다 (Increase of Abs₄₂₀ × 3.33). Lipase 효소활성은 Yang 등(15)의 방법으로 수행하였으며, 1 unit는 1분 동안 1 μ mol의 p-nitrophenol이 생성되는 효소량으로 정의하였다.

결과 및 고찰

녹강균의 동정

감염된 줄소똥뽕뽕이(*Aphodius rugisostatus*)로부터 분리한 사상균을 균사 및 분생포자의 형태, 색깔에 따라 *Metarhizium anisopliae*로 동정하고 *M. anisopliae* DGUM35001 명명하였다 (1). 분생포자는 장타원형(5~10 μ m)으로 녹색의 색깔을 띠며, 플라스크모양의 분생자 자루위에 연쇄상으로 존재하였다.

균사배양 최적 온도 및 pH

pH 5~12 범위의 PDA배지를 사용하여 14일 동안 배양한 결과, pH 11~12에서 균사생육이 억제되었으나, 적정 pH는 5~9의 범위에서 우수한 균사생육을 보여주었다(Fig. 1). 16°C에서

37°C의 온도 범위에서 균사생육을 관찰한 결과, 37°C에서의 균사생육은 관찰되지 않았으나 16-30°C의 온도범위에서의 균사생육은 우수하였다. 균사배양을 위한 최적 온도는 26°C이었다(Fig. 2).

복합배지의 영향

사용된 모든 복합배지에서의 균사생육은 우수하였으며, 그 중 SDPY, MCM 배지에서 가장 좋은 균사생육과 균사밀도를 나타내었다(Table 2). 특히 SDPY 한천배지를 사용하였을 경우, 매우

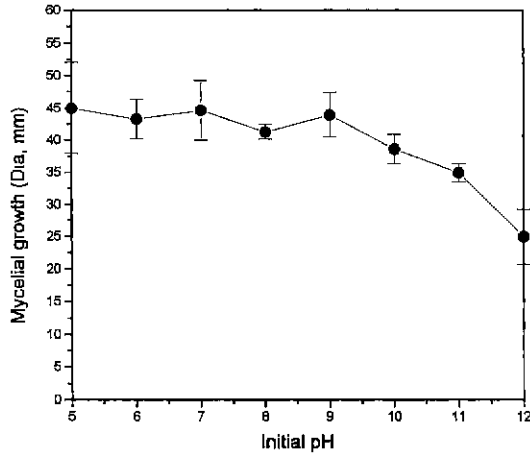


Fig. 1. Effect of initial pH on the mycelial growth of *M. anisopliae* DGUM 35001. The cultivation was carried out at 24°C for 14 days on the potato dextrose agar medium.

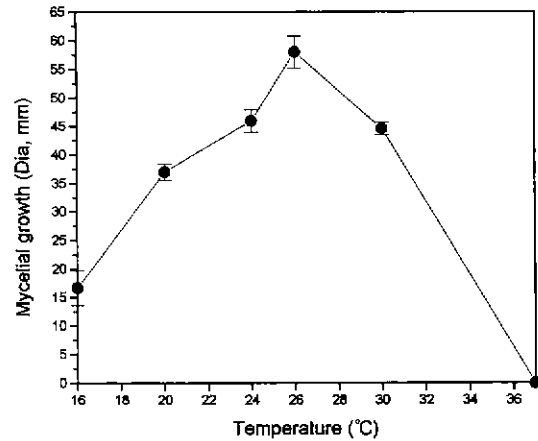


Fig. 2. Effect of temperature on the mycelial growth of *M. anisopliae* DGUM 35001. The cultivation was carried out at 24°C for 14 days on the potato dextrose agar medium.

Table 2. Utilization of complex media on mycelial growth of *M. anisopliae* DGUM35001

Complex medium	Mycelial growth ^a (Dia, mm)	Mycelial compactness ^b	Complex medium	Mycelial growth (Dia, mm)	Mycelial compactness
SM	41.2 ± 2.6	Moderate	YGM	29.2 ± 8.5	Moderate
YMGM	34.1 ± 1.7	Moderate	MCM	40.6 ± 0.5	Compact
PDM	31.3 ± 3.2	Compact	MMM	38.3 ± 5.2	Moderate
SDPY	40.3 ± 5.0	Compact	CDM	36.2 ± 1.7	Thin

^aThe mycelia were grown at 24°C for 14 days in a complex medium (pH 5.0).

^bThin; aerial mycelia grown very slightly thin over agar medium (< 2 mm), Moderate: moderate aerial mycelia (2-5 mm), Compact; aerial mycelia grown upto cover glass of petridish (> 8 mm).

Table 3. Utilization of carbon source in *M. anisopliae* DGUM35001

Source of Carbon	Mycelial growth(Dia, mm)	Mycelial compactness	Source of Carbon	Mycelial growth (Dia, mm)	Mycelial compactness
Carbohydrate ^a					
Cellulose	37.3 ± 1.2	Thin	Galactose	36.1 ± 2.2	Thin
Starch	39.3 ± 4.2	Thin	Sucrose	45.3 ± 1.2	Moderate
Chitin	49.3 ± 3.1	Compact	Fructose	42.6 ± 2.3	Thin
Lactose	37.0 ± 2.6	Thin	Xylose	28.1 ± 1.7	Thin
Maltose	39.3 ± 1.2	Thin	Glucose	48.2 ± 3.5	Moderate
Addition of organic acid ^b					
Formate	46.6 ± 3.1	Thin	Oxalate	36.6 ± 3.1	Thin
Lactate	42.6 ± 2.3	Thin	Fumarate	58.6 ± 1.2	Thin
Acetate	0	Thin	Gluconate	49.3 ± 5.1	Thin
Succinate	50.6 ± 7.5	Thin	Citrate	56.0 ± 2.0	Thin

^aThe mycelial were growth at 24°C for 14 days in Czapek-Dox agar plate (pH 5.0) supplemented with 1.0% each carbon source.

^bOrganic acid (0.1%) were added to Czapek-Dox medium.

우수한 균사밀도를 갖는 공중균사를 관찰할 수 있었다. SM한천 배지를 사용하였을 때, 우수한 균사생육과 더불어 다량의 포자형성을 관찰할 수 있었다. 그러나, SM과 MMM 배지를 사용할 경우 한천배지상의 균사생육 직경은 우수하였으나, 균사의 밀도가 상대적 양호하지 못하였다. GYM과 CDM 한천배지상의 균사생육은 상대적으로 저조하였다.

탄소원의 영향

각각의 탄소원이 1% 첨가된 Czapek-Dox 한천배지를 최소배지로 사용하였을 때, 고분자인 chitin을 탄소원으로 주었을 때 가장 우수한 균사생육을 보여주었다(Table 3). 균사의 밀도는 chitin 첨가시 가장 우수하였으나, 다른 종류의 탄소원 첨가시에는 비교적 저조하였다. 이 결과는 분리한 녹강균이 chitin을 외골격 요소로 갖고 있는 곤충에 감염시 밀접한 연관관계가 있을 것으로 판단되어 이에 관련된 연구를 지속적으로 수행할 예정이다. Sucrose, glucose에서는 우수한 균사생육을 보여주었으나, xylose, galactose, maltose에서는 비교적 저조한 균사생육을 보여주었다. 각각의 유기산이 0.1% 첨가된 Czapek-Dox 한천배지에서의 균사생육은 fumarate, citrate가 첨가되었을 때, 가장 우수한 균사생육을 보여주었으나, acetate 첨가시 균사가 전혀 성장하지 못하였다. 균사밀도는 측정된 모든 유기산에서 저조한 결과를 나타내었다(Table 3).

질소원의 영향

무기질소원(20 mM)을 사용했을 때, urea와 ammonium phosphate에서 균사생육이 양호하였으나, ammonium molybdate는 균사생육을 완전히 억제하였다(Table 4). 이 결과는 ammonium

molybdate가 균사생육을 억제하는 Han과 Ham(5)의 결과와 일치하였으며, ammonium molybdate를 추후 항진균제로 이용할 가능성을 제시하였다. 유기 질소원(0.3%)으로 복합질소원인 bacto peptone과 soytone에서 우수한 균사생육 및 밀도를 보여 주었으나, yeast extract, malt extract 이용시 균사생육은 우수하였으나 균사 밀도는 비교적 작았다(Table 4). 유일질소원으로 아미노산(20 mM)이 첨가된 Czapek-Dox 한천 배지에서의 균사 생육을 측정된 결과, serine, alanine을 첨가하였을 때 가장 우수한 균사생육을 나타내었으나, proline, phenylalanine, tryptophane을 첨가시는 비교적 저조한 균사생육 및 밀도를 보여주었다(Table 4).

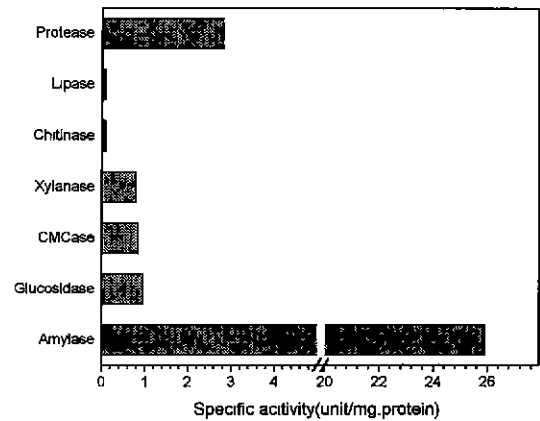


Fig. 3. The specific activity of extracellular enzymes in *M. anisopliae* DGUM 35001. The mycelia were grown at 24°C for 14 days in the mushroom complex broth, the filtrate was concentrated by stepwise addition of ammonium sulfate and then dialyzed for further use as a crude enzyme solution.

Table 4. Utilization of nitrogen source in *M. anisopliae* DGUM35001a

Soruce of nitrogen	Mycelial growth (Dia, mm)	Mycelial compactness	Soruce of nitrogen	Mycelial growth (Dia, mm)	Mycelial compactness
Inorganic nitrogen source ^b					
Urea	54.0 ± 0.0	Compact	NH ₄ -molybdate	0	
Ca(NO ₃) ₂	49.3 ± 2.3	Moderate	NH ₄ -phosphate	52.0 ± 0.0	Compact
NaNO ₂	36.0 ± 2.0	Thin	NH ₄ Cl	25.3 ± 2.3	Thin
NaNO ₃	48.6 ± 5.7	Thin	(NH ₄) ₂ SO ₄	36.6 ± 6.1	Thin
Organic nitrogen source ^c					
Yeast extract	54.0 ± 2.0	Moderate	Bacto peptone	55.3 ± 4.1	Compact
Malt extract	58.6 ± 7.0	Thin	Soytone	55.3 ± 1.2	Compact
Amino acid ^d					
Lysine	38 ± 6.0	Moderate	Arginine	31.3 ± 5.7	Compact
Threonine	30.6 ± 5.0	Moderate	Proline	18.0 ± 3.5	Thin
Leucine	32.6 ± 1.2	Moderate	Asparagine	31.3 ± 9.0	Compact
Tryptophane	26.6 ± 3.1	Moderate	Glycine	37.3 ± 3.0	Compact
Phenylalanin	23.3 ± 6.1	Moderate	Valine	36.6 ± 7.5	Compact
Serine	44.6 ± 1.2	Compact	Alanine	42.0 ± 2.0	Compact

^aThe mycelial growth was performed at 24°C for 14 days in Czapek-Dox agar plate (pH 5.0). Nitrogen source was replaced by 20 mM inorganic nitrogen source^b, 0.3 % organic nitrogen source^c, and 0.3% amino acid^d

Table 5. Utilization of phosphorus source on mycelial growth in *M. anisopliae* DGUM 35001

Source of phosphate	Mycelial growth ^a (Dia, mm)	Mycelial compactness	Source of phosphate	Mycelial growth (Dia, mm)	Mycelial compactness
(NH ₄) ₂ HPO ₄	50.0 ± 2.0	Compact	NaH ₂ PO ₄	53.3 ± 3.1	Thin
NH ₄ H ₂ PO ₄	36.0 ± 2.0	Compact	KH ₂ PO ₄	50.6 ± 4.2	Thin
Na ₂ HPO ₄	44.6 ± 5.0	Thin	K ₂ HPO ₄	46.0 ± 2.0	Thin

^aThe mycelia were growth at 24°C for 14 days in Czapek-Dox agar plate (pH 5.0). Glucose was used as a carbon source and phosphorus source was replaced by 20 mM of each phosphorus source.

인산원의 영향

인산원(20 mM)을 첨가한 Czapek-Dox 한천배지에서의 균사생육은 ammonium phosphate를 인산원으로 첨가시 가장 우수하였으나, disodium phosphate, mono sodium phosphate, mono potassium phosphate에서 균사생육의 직경은 컸으나 균사밀도는 매우 적어 우수한 인산원이 아님을 알 수 있었다(Table 5)

균사 세포외 분비효소의 활성

M. anisopliae DGUM35001이 생산하는 세포외 분비 효소의 활성은 실험한 모든 종류의 효소에 대하여 활성이 있었다(Fig. 3). 특히 α-amylase 효소 비활성이 상대적으로 우수하였으며 protease 효소 비활성도 우수하였다. 곤충 외골격의 분해에 chitinase, protease 그리고 lipase 등의 효소들이 작용한다. 이들 효소의 활성정도는 실험실내에서 곤충 기생균의 살충능력 정도를 간접적으로 알 수 있는 좋은 지표가 된다(12) 실험결과 protease의 활성은 우수하였으나, lipase와 chitinase의 효소활성은 상대적으로 미흡하였다. Chitin이 유일탄소원으로 주어졌을 때, 균사생육 및 밀도는 우수하였으나 chitinase 효소활성은 저조하였다. 균사체외로 분비되는 chitinase 효소활성과 초기 감염 포자 발아시의 chitinase 효소활성과 어떤 관련이 있는지는 아직 불분명하여 지속적인 연구가 요구된다. 곤충기생 진균 *M. anisopliae* DGUM35001의 우수한 amylase 효소활성은 이 진균의 인공배양시 값싼 곡물배지(또는 미강)를 사용하여 양산할 수 있는 가능성을 제시하였으며, 곤충 기생성 진균이 왜 높은 amylase 효소활성을 보이는지를 규명하기 위해서 지속적인 연구가 필요하다.

참고문헌

1. 성재모. 1996. 한국의 동충하초. 교학사.
2. Bradford, M.M. 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.
3. Brown V. and G. Schmitz. 1980. Excretion of protease of *Serratia marcescens*. *Arch. Microbiol.* 124, 55-61.
4. Campbell, R.K., T.M. Perring, G.L. Barnes, R.D. Eikenbary, and

C.R. Gentry. 1978. Growth and sporulation of *Beauveria bassiana* and *Metarrizium anisopliae* on media containing various amino acids. *J. Invertebr. Pathol.* 31, 289-295.

5. Han, Y.-H. and J.-H. Ham. 1999. Optimization of culture condition for enhanced mycelial growth of *Amanita hemibapha* subsp. *hemibapha* DGUM 28001. *Dongguk J.* 38, 273-286.
6. Hsu, S. C. and L. Lockwood. 1975. Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of *Actinomycetes* in water soil. *Appl. Microbiol.* 29, 422-426.
7. Jeong E.-U and Y.-H. Lee. 1995. Isolation of microorganism producing chitinase for chitoooligosaccharides production, purification of chitinase, and its enzymatic characteristics. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23, 187-196.
8. Kanda, T., K. Wakabayashi, and K. Nisizawa. 1976. Purification and properties of an endocellulase of avicelase type from *Irpex lacteus* (*Polyporus tuliferus*). *J. Ferment Technol.* 60, 381-383.
9. Kim D.-J., H.-J. Shin, B.-H. Min, and K.-H. Yoon. 1995. Isolation of a thermophilic *Bacillus* sp. producing the thermostable cellulase-free xylanase, and properties of the enzyme. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23, 304-310.
10. Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426-428.
11. Roberts, D.W. 1966. Toxins from the entomogenous fungus in *Metarrhisium anisopliae*. I. Production in submerged and surface cultures, and in inorganic and organic nitrogen media. *J. Invertebr. Pathol.* 8, 212-221.
12. Rapp, P. and S. Backhaus. 1992. Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeasts, and bacteria. *Enzyme Microb. Technol.* 14, 938-943.
13. Takaki, T., H. Toda, and T. Isemura. 1971. Bacterial and mold amylases. p. 235. In Boyer P.D. (ed.), the Enzymes. Vol. V, 3rd ed. Academic Press, New York.
14. Tokao, S., Y. Kamagata, and S. Sasaki. 1985. Cellulase production by *Penicillium purpurogenum*. *J. Agri. Sci. Camb.* 93, 217-222.
15. Yang Y.-K., M.-N. Moon, Y.-H. Lee, and C.-Y. Lim. 1997. Development of lipase hyper-producing strain from hybrids between *Aspergillus niger* and *Penicillium chrysogenum* by nuclear transfer. *Kor J. Microbiol.* 33, 31-37.

(Received May 29, 2000/Accepted June 14, 2000)

ABSTRACT : Optimal Culture Condition and Extracellular Enzyme Activity of *Metarhizium anisopliae*

Young-II Park and Yeong-Hwan Han*(Department of Biology, College of Natural Science, Dongguk University, Kyongju 780-714, Korea)

In order to use *Metarhizium anisopliae* as a biological pesticide, effect of environmental factors on mycelial growth, spore formation, and extracellular enzyme activity in culture broth of *M. anisopliae* DGUM 35001 was determined. Optimal temperature was 26°C and optimal pH ranged from 5 to 9. Among the complex media tested, MCM and SDPY media were the most favorable for mycelial growth. When Czapek-Dox agar was used as a minimal medium, glucose and sucrose among the saccharides were very excellent source of carbohydrate. Among the biopolymers tested, chitin was the most favorable source for mycelial growth and produced high aerial mycelia. Urea and ammonium phosphate as an inorganic nitrogen source and bacto-peptone and soytone as an organic nitrogen source enhanced the mycelial growth. When serine as a source of amino acid was supplemented, excellent mycelial growth was shown. Large amount of spores could be obtained from the aerial mycelia of starch medium. When the culture broth was filtrated and then the concentrate with ammonium sulfate was used as a crude enzyme solution, high enzyme activities of amylase and protease were shown. However, lipase and chitinase activities were comparatively low.