

산업용 배지를 이용한 *Bacillus thuringiensis*의 포자생산

최 성 호 · 강 석 권 · 유 연 우

서울대학교 농업생명과학대학 농업생물신소재 연구센터, ¹아주대학교 공과대학 화학 · 생물공학부
(접수 : 1998. 7. 27., 게재승인 : 1998. 11. 9.)

Production of *Bacillus thuringiensis* Spore Using an Industrial Medium

Sung Ho Choi, Seok Kwon Kang, and Yeon Woo Ryu^{1†}

Research Center for New Bio-Materials in Agriculture, College of Agriculture and Life Science,
Seoul National University, Suwon, 441-744, Korea

¹Department of Biotechnology, College of Engineering, Ajou University, Suwon, 442-749, Korea

(Received : 1998. 7. 27., Accepted : 1998. 11. 9.)

In the production of a low cost bacterial insecticide, it is important to produce a high spore concentration using low price substrates. Experiments were carried out to investigate the effects of the addition of mineral salts and glucose, and of dissolved oxygen concentration on the cell growth and spore formation of *Bacillus thuringiensis* var *aizawai* using a cheap wheat and soybean meal in the batch culture. The maximum viable cell number was 1.2×10^9 CFU/mL at 12 hr culture and spore yield was 54.2% at 74 hr culture using an industrial medium containing 20 g/L wheat meal and 30 g/L soybean meal under 1.0 vvm aeration and 200 rpm agitation. The cell growth and the spore formation were not enhanced by the addition of mineral salts in industrial medium, whereas the addition of 10 g/L glucose decreased the cell growth and spore formation. We could obtain a maximum viable cell number of 2.2×10^9 CFU/mL and spore number of 1.9×10^9 CFU/mL at the dissolved oxygen concentration of 60% of saturation. The spore concentration was enhanced approximately by 2 times as compared to the dissolved oxygen concentration of 50%. In the bench-scale culture, the maximum viable cell and spore number were 2.5×10^9 CFU/mL and 2.2×10^9 CFU/mL, respectively under 1.0 vvm aeration and 400 rpm agitation. The spore yield was 88% based on the maximum viable cell number. As a result, it was confirmed that the production of high spore concentration could be obtained by a bench-scale culture using an industrial medium.

Key Words : *Bacillus thuringiensis*, spore, dissolved oxygen concentration, wheat meal, soybean meal

서 론

지난 수십 년 동안 유기합성 농약의 구분별한 사용으로 인하여 심각한 환경오염을 초래하면서 생태계의 파괴, 농약에 대한 곤충의 내성증가 등 많은 문제점들을 불러일으키게 되었다. 이러한 문제점들을 해결하기 위하여 선진국에서는 오래 전부터 환경친화형 무독성 생물농약의 개발에 많은 노력을 기울여왔다. 지금까지 개발된 생물농약 중에서 *Bacillus thuringiensis*는 미생물 제제의 살충제로서 가장 대표적인 것으로 현재 전 세계적으로 널리 사용되고 있으며, 우리 나라에서도 1989년에 *B. thuringiensis* 제제가 도입된 이래 매년 그 사용량이 증가하고 있는 추세이다(1). 그러나, 아직은 생물농약에 대한 인식의 부족

과 가격 경쟁력에서 열세에 있기 때문에 *B. thuringiensis* 제제의 살충제는 국내의 전체 살충제 시장에서 1.1% (38억 원, 1995년도 기준)의 낮은 시장점유율을 차지하고 있다.

*B. thuringiensis*의 살충 기작은 포자형성 동안에 생성되는 결정형 δ -endotoxin의 독성작용에 기인한다고 알려져 있다(2-4). 이 결정성 단백질의 생성량과 살충력이 *B. thuringiensis* 제제의 성능을 좌우하게 되는데, 이는 균주에 따라서 달라질 수도 있지만 배지의 조성 및 배양조건에 따라 포자형성과 살충성 결정단백질의 생성을 조절할 수 있다고 보고되어 있다(5-9). 따라서 가장 우수한 살충력을 가지기 위한 균주의 영양분 요구 특성을 규명하고 최적의 배양조건을 확립하는 것이 매우 중요하다. 즉 *B. thuringiensis*의 포자형성은 탄소원이 고갈되는 시기에 이루어지며 질소원과 탄소원의 비율에 의해서도 많은 영향을 받는 것으로 알려져 있다(10). 따라서, 영양분 제한상태에서 포자형성의 관계를 연구하기 위한 유기식 배양이 일부에서 시도되어 1.0×10^{10} CFU/mL 이상의 고농도 포자를 생산하게 되었고, C/N ratio의 조절, 무기염의 첨가 등에 의한 포자형성의 영향들을 연구함으로써 배양배지의 최적화에 대한 연구결과들이

† Corresponding Author : Department of Biotechnology,
College of Engineering, Ajou University, Suwon, 442-749,
Korea

Tel . 0331-219-2449, Fax : 0331-216-8777,
e-mail : ywryu@madang.ajou.ac.kr

많이 보고되었다(11-14). 한편, *B. thuringiensis*는 세포성장과 포자형성 그리고 δ -endotoxin의 생성과정에서 충분한 산소의 공급이 필수적인 것으로 알려져 있다(15, 16) Yousten 등(15)은 *B. sphaericus*의 회분식 배양에서 통기량을 1 vvm에서 0.5 vvm으로 50% 감소시켰을 때 포자형성과 살충성이 각각 71%와 54% 감소하였으며, Acras 등(11)도 *B. thuringiensis* 배양에서 K_{La} 값을 38 hr^{-1} 에서 220 hr^{-1} 으로 증가시켰을 때 포자 형성률이 30% 증가하는 것을 확인함으로써 포자형성에 용존산소량이 중요한 역할을 하고 있음을 증명하였다. 따라서 고농도의 포자 생산을 위해서는 발효배지의 개발과 함께 배양과정에서 요구되는 용존산소량의 조건을 검토하여 결정하는 것이 중요하다.

일반적으로 *B. thuringiensis*의 산업적 생산을 위한 배지는 구입이 용이하고, 비용이 저렴한 산업용 배지를 사용하는데 cotton seed meal, soybean meal, corn steep liquor 그리고 molasses 등이 대표적이다 주로 이들은 농산물 가공산업에서 얻어지는 부산물로서 이들과 함께 탄소원으로 가장 널리 이용되는 glucose를 첨가하여 세포성장과 포자형성을 최적화 하는 연구들이 활발히 진행되고 있다. 이에 본 연구에서는 경제성 있는 *B. thuringiensis*의 미생물 살충제 개발을 위하여 산업용 기질인 밀기울과 대두박을 이용한 회분식 배양에서 무기물 및 glucose의 첨가와 용존산소량이 세포의 성장과 포자형성에 미치는 영향에 대한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지조성

본 연구에 사용된 균주는 서울대학교 농업생명과학대학의 강석권 교수 연구실에서 분리한 균주 *Bacillus thuringiensis* var. *anzawai*를 분양받아 사용하였다. 균주 보관용 사면배지는 modified NB broth 배지 (10 g/L glucose, 5 g/L Bacto peptone, 3 g/L beef extract)에 15 g/L agar를 첨가한 slant를 제조하여 사용하였다. Slant에 균을 접종시켜 항온 배양기에서 28°C로 24시간 배양한 후 4°C에 보관하면서 사용하였으며, 4주마다 동일한 배지조성의 slant에 옮겨 주었다. 접종용 균주의 배양은 250 mL 삼각 flask에 modified NB broth 배양배지 100 mL을 첨가하여 멸균한 후 균을 접종하여 28°C에서 24시간 동안 200 rpm으로 진탕 배양하여 사용하였다. 산업용 배지는 이미 다른 연구실에서 연구되어 최적 첨가비율로 결정된(data not published) 2% (w/v)의 밀기울과 3% (w/v)의 대두박을 혼합하여 121°C에서 30분 동안 멸균하여 사용하였다. 배지의 초기 pH는 2N KOH를 이용하여 pH를 7.0으로 조절하여 사용하였다.

배양조건

무기염과 glucose의 첨가에 대한 영향은 박 등(20)이 합성배지에서 사용한 무기염의 조성도와 농도로 각각을 산업용 배지에 첨가하여 영양세포와 포자형성에 대한 영향을 검토하였다. 용존산소량의 영향에 대한 실험은 산업용 배지 2 L를 33 L의 발효조 (NBS, BIOFLOIII)에 넣고 1 vvm에서 용존산소량을 포화용존산소량의 50%와 60%로 각각 조절하면서 28°C에서 회분식 배양을 수행하였다. 용존산소량의 조절은 교반속도를 이용하여 조절하였다. 배양중의 pH는 2N HCl과 2N KOH를 이용하여 pH를 7.0으로 조절하였으며 배양중에 발생하는 과량의 foam은

Antifoam A (Sigma)를 사용하여 조절하였다. Bench-scale 배양은 산업용 매지 30 L를 50 L의 발효조 (한국발효기)에 넣고, 121°C에서 30분 동안 멸균한 후 28°C에서 1.0 vvm의 통기량과 400 rpm의 교반속도에서 배양하였으며, 배양과정에서 과량의 foam이 발생되지 않도록 antifoam A289 (Sigma)를 멸균전에 30 mL을 첨가하였다.

세포 및 포자농도의 결정

영양세포, sporulated cell 그리고 free spore를 포함한 total cell의 농도는 NB agar plate상에서 'drop method' 방법(11)으로 결정하여 colony forming unit (CFU)로 나타내었고, spore는 여러 번 희석시킨 시료를 65°C에서 15분간 열처리한 후 NB agar plate에 도말하여 나타나는 colony 수를 측정하여 결정하였다. 실험은 하나의 시료당 3단계의 희석배수로 달리하고 각각의 시료에 대하여 3배수로 접종하여 총 9개의 plate에 나타난 colony 수를 측정하여 평균값에서 크게 벗어난 값은 제외하였다.

결과 및 고찰

경제성 있는 *B. thuringiensis* 제제의 미생물 살충제를 개발하기 위해서는 살충력이 강한 균주의 개발과 함께 고농도의 균체 및 포자를 저렴하게 생산할 수 있는 산업용 배지의 개발이 매우 중요하다. 따라서 본 실험에서는 산업용 기질인 밀기울과 대두박을 이용한 회분식 배양에서 세포의 성장과 포자형성에 대한 무기물 및 glucose의 첨가와 용존산소량의 영향에 대한 연구를 수행하였으며, 그 결과는 다음과 같다.

산업용 배지에 의한 *B. thuringiensis*의 배양

본 실험에서는 산업용 배지인 밀기울과 대두박을 각각 2% (w/v)와 3% (w/v)를 사용하여 1.0 vvm과 200 rpm에서 *B. thuringiensis*를 배양하였다. 실험결과 (Figure 1)에서 영양세포의 경우는 8시간 이후부터 급격하게 증가하기 시작하여 12시간 배양시에 1.2×10^9 CFU/mL으로 최대값에 도달한 후에 천천히 감소하다가 포자 형성이 증가하는 48시간 이후부터는 급격히 감소하는 경향을 나타내었다. 반면 포자의 형성은 배양 48시간부터 증가하기 시작하여 배양 3일째인 74시간에서 최대의 포자수를 보였다. 그러나 최대 포자수인 6.5×10^8 CFU/mL은 54.2%의 영양세포만이 포자로 전환되었을 뿐 나머지의 영양세포들은 포자로 전환되지 못하고 사멸된 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 박 등(14)이 합성배지를 이용한 최적의 배양조건에서 영양세포와 포자수가 모두 1.5×10^9 CFU/mL인 연구결과보다 낮았는데, 이는 Figure 1에서 나타난 바와 같이 배지내의 용존산소량이 낮았기 때문으로 예상된다. 즉 영양세포의 수가 최대를 보였던 배양 12시간 이후부터 용존산소량이 급격히 감소하기 시작하여 포자수가 증가하는 48시간에서는 용존산소량이 포화용존산소량의 20% 이하로 떨어진 점이 그 가능성을 뒷받침 해주고 있다. 일반적으로 *B. thuringiensis*는 호기성 세균으로서 세포의 성장 및 포자형성에 높은 수준의 용존산소량이 필수적인 것으로 알려져 있다(17-20). 따라서 본 연구에 사용한 균주의 경우에서도 높은 산소농도를 유지하면서 배양하면 높은 포자의 형성 수율이 기대되므로 이에 대한 연구를 수행하였다. 한편, 배양중의 pH는 배양 초기에 5.5까지 감소하다가 배양 24시간 이후부터

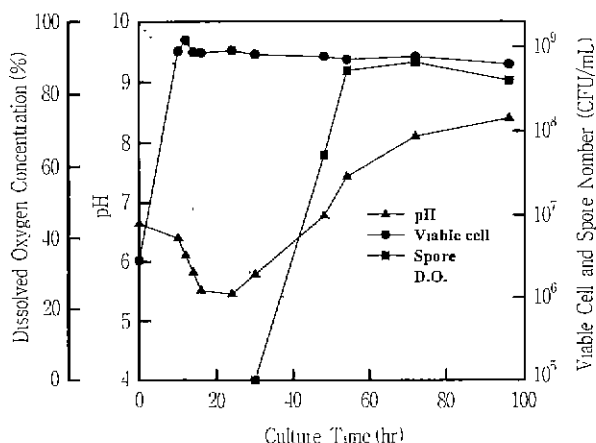


Figure 1. Profiles of viable cell and spore number, pH and dissolved oxygen concentration during the batch culture of *B. thuringiensis* in an industrial medium

다시 증가하기 시작하여 배양 96시간에는 pH가 8.4까지 증가하였다. Salama 등(9)의 연구결과에 따르면 pH가 5.5 미만으로 떨어졌을 때에는 세포의 성장 및 포자형성을 저해한다고 알려져 있기 때문에 본 실험의 경우에도 배양과정에서의 pH를 7.0으로 일정하게 유지시켜 주었다.

무기염과 glucose 첨가에 의한 영향

희분식 배양에서 기본배지에 몇 가지의 무기염들을 첨가한 경우에 포자의 생산이 830%까지 증가되었다는 보고(11)가 있어 산업용 배지에 무기염들의 첨가에 대한 영향을 검토하였다. 실험결과(Figure 2)에서 무기염을 첨가하지 않은 산업용 배지에서의 배양과 비교하였을 때 영양세포와 포자의 수에 있어서 커다란 차이는 없는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 산업용 배지로 사용하고 있는 대두박과 밀기울에는 *B. thuringiensis*의 성장에 필요한 무기염들이 존재하기 때문인 것으로 생각된다. 즉 Figure 2에서 영양세포의 수는 여러 종류의 무기염들을 첨가한 배지에서는 다소 증가하였으나 포자형성에는 오히려 약간 낮아

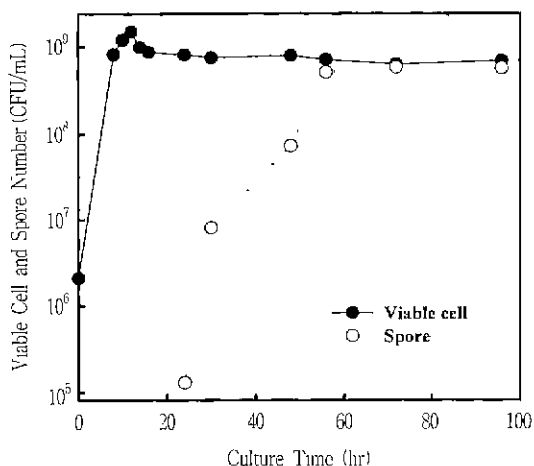


Figure 2. Profiles of viable cell and spore number during the batch culture of *B. thuringiensis* with the addition of mineral salts

지는 경향을 나타내었다.

한편, 산업용 배지에 glucose를 10 g/L 첨가하여 영양세포와 포자형성에 대한 영향을 검토한 결과(Figure 3)에서 포도당이 첨가된 배지에서 최대의 영양세포 및 포자수가 각각 9.9×10^8 CFU/mL과 4.9×10^8 CFU/mL로서 glucose가 첨가되지 않은 산업용 배지에서의 최대 영양세포 및 포자수인 1.2×10^9 CFU/mL와 6.5×10^8 CFU/mL 보다 오히려 낮은 수준을 나타내었다. 이러한 결과는 초기의 높은 glucose 농도가 세포성장을 억제하고, 또한 포자형성에 있어서도 오히려 저해될 수도 있다는 연구결과(1,14)와 일치하는 것으로 glucose를 사용하는 경우에는 이러한 특성을 충분히 검토하여야 한다. 또한, 과량의 영양분이 오히려 포자의 형성과 toxin의 생성에 저해를 줄 수 있다는 Holmberg 등(21)의 연구 결과와도 일치하는 것으로 나타났다.

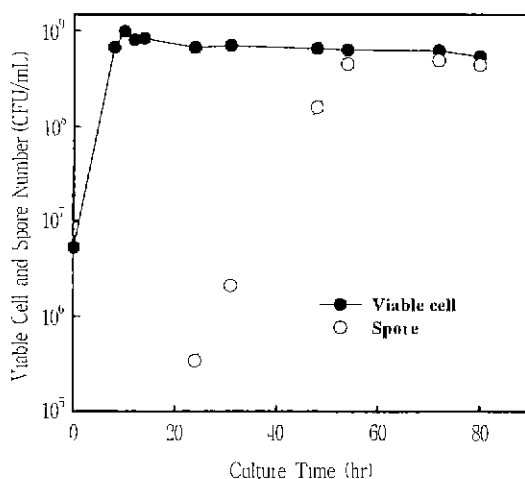


Figure 3. Profiles of viable cell and spore number during the batch culture of *B. thuringiensis* with the addition of 10 g/L glucose.

용존산소량의 영향

세포의 성장과 포자형성에 대한 용존산소량의 영향을 검토하기 위한 실험에서는 배지내의 용존산소량을 포화 용존산소량의 50%와 60%로 각각 조절하면서 실험을 수행하였다. 실험에서 용존산소량의 조절은 1.0 vvm의 통기량 조건하에서 배지내의 용존산소량에 따라 교반속도를 조절하는 방법을 이용하였다. 교반속도의 최소값과 최대값은 200 rpm에서 400 rpm으로 설정하여 이 범위 내에서 용존산소량에 따라 교반속도를 조절하였고, 400 rpm 이상의 교반속도 하에서도 용존산소량의 조절이 어려울 때는 산소를 공기와 함께 혼합하여 공급하였다.

배지내의 용존산소량을 포화 용존산소량의 50%로 조절하면서 배양하였을 경우 Figure 4에서와 같이 최대의 영양세포는 16시간 배양에서 1.8×10^9 CFU/mL를 얻었으며 포자 수는 배양 72시간에 1.1×10^9 CFU/mL로서 최대 값을 보였고, 이때의 포자형성은 61.1% 이었다. 즉 배양시간에 따른 영양세포 수는 배양 8시간부터 급격하게 증가하기 시작하여 16시간에서 최대를 보이다가 16시간 이후부터는 완만하게 감소하는 경향을 보였다. 한편, 포자 수는 배양 24시간 이후부터 증가하기 시작하여 54시간까지 급격하게 증가하다가 배양 72시간에서 최대 포자수를 나타내었으나 영양세포에 대한 포자형성율이 너무 낮은

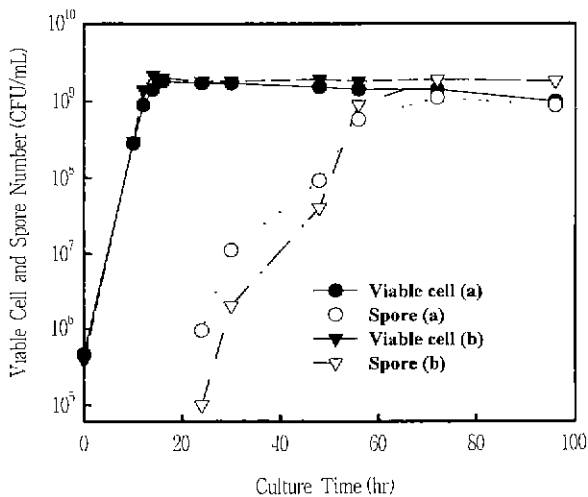


Figure 4. Profiles of viable cell and spore number during the batch culture of *B. thuringiensis* with dissolved oxygen concentrations of 50% (a) and 60% (b) of that at saturation.

수준이었다.

용존산소량을 포화 용존산소량의 60%로 조절한 실험에서는 50%로 조절한 실험결과 (Figure 4)와 비교하였을 때 최대 영양세포 수는 22% 증가한 2.2×10^9 CFU/mL 이었으며, 최대 포자 수는 배양 72시간에서 73% 증가한 1.9×10^9 CFU/mL로 비교적 고농도의 포자를 얻을 수 있었는데, 이때의 포자 형성율은 86.4%로 크게 증가하였다. 이러한 결과들로 볼 때, 본 연구에 사용된 균주가 영양세포의 성장과정에서 보다 포자를 형성하는 단계에서 더 높은 용존산소량을 요구하는 특성을 가지고 있는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 박 등(14)이 *B. thuringiensis*의 포자형성을 위한 최적의 용존산소량이 포화용존산소량의 60% 이었다는 결과와 일치하였다. 또한, Yousten 등(15)도 *B. sphaericus*의 배양에서 통기량의 감소에 의하여 포자형성과 toxicity가 감소했다고 보고한 결과도 일치하였다. 그러나 용존산소량이 60% 이상인 조건에서는 과량으로 발생하는 foam의 조절이 어렵고 세포의 성장이 급격히 증가하는 exponential phase에서 60% 이상의 용존산소량을 일정하게 유지하는 것이 어려웠기 때문에 과량의 산소에 의한 포자형성의 저해효과가 있다는 보고(14)에 대해서는 확인할 수 없었다.

Bench-scale의 생산

*B. thuringiensis*의 대량생산에 대한 가능성을 확인하기 위하여 50 L 발효조(한국발효기)에서 배양하였다. 즉 50 L 발효조에 산업용 배지 30 L를 넣고 초기의 pH를 7.0으로 조절하면서 용존산소량의 조절 없이 통기량과 교반속도가 다른 두 가지의 조건에서 영양세포 수와 포자형성을 비교하였다(Figure 5). 통기와 교반 조건이 0.75 vvm과 250 rpm인 경우에 영양세포는 배양 24시간에서 1.3×10^9 CFU/mL로 최대의 세포농도를 얻었고 포자의 형성은 배양 96시간에서 2.5×10^8 CFU/mL로서 최대의 포자 수를 얻었는데 이때의 포자 형성율은 19.2%에 불과하였다. 또한, 최대의 영양세포 수와 포자 수에 도달한 시간도 각각 24시간과 96시간으로 매우 느리게 성장하였다 통기량과 교반속도를 각각 10 vvm과 400 rpm으로 증가시켜서 배양한 결과에서

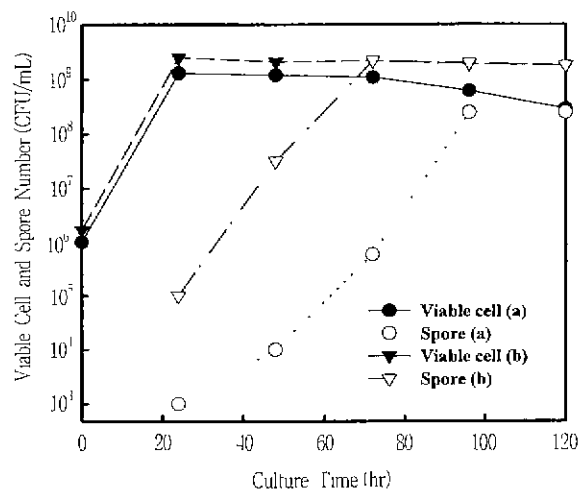


Figure 5. Profiles of viable cell and spore number during the bench-scale batch culture of *B. thuringiensis* in the different aeration rate and agitation speed. (a) : aeration rate of 0.75 vvm and agitation speed of 250 rpm, (b) : aeration rate of 10 vvm and agitation speed of 400 rpm

는 최대의 영양세포 수 및 포자 수가 각각 2.5×10^9 CFU/mL과 2.2×10^9 CFU/mL로서 포자 형성율은 88% 이었다. 이러한 결과는 본 실험에서 얻은 결과 중에서 가장 높은 수준으로서 대량 배양에 의한 고농도의 포자 생산이 가능함을 확인할 수 있었다. 그리고 배양 12시간만에 최대의 영양세포 수에 도달하였고, 72시간 배양에서 최대의 포자 수를 얻었는데, 이는 0.75 vvm의 통기량과 250 rpm의 교반속도에서 배양한 경우 보다 빠르게 성장하였음을 알 수 있었다

현재까지의 연구결과는 포자형성의 단계에서 산업용 배지에서 발효조건에 대한 영향을 검토하였으나, 대량생산을 통한 상업화의 단계를 위한 앞으로의 연구는 발효조건에 따른 toxin의 생성과 bioassay에 의한 toxin의 활성도에 대한 연구가 병행되어 진행되어야 하며, 효과적인 제제화에 대한 연구도 수행되어야 할 것으로 사료된다.

요 약

*B. thuringiensis*를 이용한 미생물 살충제를 생산하기 위해서는 저렴한 가격의 원료를 배지로 하여 높은 살충성을 갖도록 포자 형성율을 향상시키는 것이 중요하다. 따라서 본 연구에서는 저렴한 가격의 밀기울과 대두박을 이용한 회분식 배양에서 무기물 및 glucose의 첨가와 용존산소량이 *B. thuringiensis*의 세포 성장과 포자형성에 미치는 영향을 검토하였다. 산업용 배지를 이용한 회분식 배양에서 최대 세포수는 1.2×10^9 CFU/mL이었고 최대 포자 수는 74시간 배양 시에 6.5×10^8 CFU/mL로서 포자 형성율은 54.2% 이었다. 반면, 산업용 배지에 무기염들을 첨가한 경우에 세포성장과 포자형성이 산업용 배지에서와 거의 동일하였다. 반면 산업용 배지에 10 g/L의 glucose를 첨가한 경우에는 최대 세포 수와 포자 수가 오히려 감소하였다. 용존산소량에 대한 영향에서는 용존산소량을 포화 용존산소량의 60%로 유지시켰을 경우 16시간 배양 시에 최대 세포수가 2.2×10^9 CFU/mL 이

있고 최대 포자수는 72시간 배양시에 1.9×10^9 CFU/mL로서 86.4%의 우수한 포자 형성율을 나타내었다. 50 L 발효조를 이용한 배양은 400 rpm의 교반속도와 1.0 vvm의 통기조건에서 수행한 실험결과 최대의 세포농도 및 포자수는 각각 2.5×10^9 CFU/mL과 2.2×10^9 CFU/mL로서 포자 형성율은 88% 이었다. 이러한 결과로 부터 산업용 배지를 이용한 *B. thuringiensis*의 배양에 의하여 고농도 포자의 생산이 가능함을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 1997년도 교육부 학술연구조성비(생물화학공학)과 일부 농림수산기술개발 사업의 연구비에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다

참 고 문 헌

1. 김무기, 안병구 (1996), *Bacillus thuringiensis* 성장과 살충성 결정 단백질 생성에 대한 탄소원의 영향. *Agri. Chem. and Biotechnol.* 39, 177-182
2. Scherrer, P., P. Luthy, and B. Trumpf (1973), Production of δ -endotoxin by *Bacillus thuringiensis* as a function of glucose concentrations. *Appl. Microbiol.* 25, 644-646.
3. Pearson, D. and O. P. Ward (1988), Effect of culture conditions on growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and development of media for production of the protein crystal endotoxin. *Biotechnol. Lett.* 10, 451-456.
4. Rossa, A. C. and C. Mignone (1993), δ -Endotoxin activity and spore production of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnol. Lett.* 15, 295-300.
5. Dulmage, H. T. (1970), Production of spore-delta-endotoxin complex by variants of *Bacillus thuringiensis* in two fermentation media. *J. Invertebr. Pathol.* 16, 385-389.
6. Dulmage, H. T. (1971), Production of spore-delta-endotoxin by eighteen isolates of *Bacillus thuringiensis* serotype 3 in 3 fermentation media. *J. Invertebr. Pathol.* 18, 353-358.
7. Faloci, M., O. Yantorno, H. Marino, A. Acras, and R. Ertola (1990), Effect of the media composition on the growth parameters and biological properties of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* delta-endotoxin. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 6, 32-38.
8. Dingman, D. and D. Stahly (1983), Medium promoting sporulation of *Bacillus larvae* and metabolism of medium components. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 860-869.
9. Salama, H., M. Foda, H. Dulmage, and A. El-Sharaby (1983), Novel fermentation for production of δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 41, 8-19.
10. Sakharova, Z. V., Y. N. Ignatenko, M. P. Khovrychev, V. P. Lykov, I. L. Rabotnova, and V. V. Shevtsov (1984), Sporulation and crystal formation in *Bacillus thuringiensis* with growth limitation via the nutrient sources. *Microbiology* 53, 221-227.
11. Goldberg, I., B. Sneh, E. Battat, and D. Klem (1980), Optimization of a medium for a high yield production of spore-crystal preparation of *Bacillus thuringiensis* effective against the Egyptian cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* boisd. *Biotechnol. Lett.* 2, 419-426.
12. Acras J. O. Yantorno, and R. Ertola (1987), Effect of high concentration of nutrients on *Bacillus thuringiensis* cultures. *Biotechnol. Lett.* 9, 105-110
13. Kang, B. C., S. Y. Lee, and H. N. Chang (1992) Enhanced production of spore of *Bacillus thuringiensis* by fed-batch culture. *Biotechnol. Lett.* 14, 721-726
14. 박창열, 강석권, 유연우 (1997), *Bacillus thuringiensis*의 세포성장 및 포자형성에 대한 포도당 농도 및 용존산소량의 영향. *한국생물공학회지*, 12(4), 377-382
15. Yousten, A. A. and D. Wallis (1987), Batch and continuous culture production of the mosquito larval toxin of *Bacillus sphaericus* 2362. *J. Industrial Microbiol.* 2, 277-283.
16. Acras, J., O. Yantorno, E. Arraras, and R. Ertola (1984), A new medium for growth and delta-endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Biotechnol. Lett.* 6, 495-500.
17. Moraes, I. O., M. H. Santana, and C. O. Hokka (1980), The influence of oxygen concentration on microbial insecticide production. In *Advances in Biotechnology, Proc. Sixth Internat. Ferm. Symp.* London, Canada, 1, 75-79.
18. Foda, M. S., H. Salama, and M. Selim (1985), Factors affecting growth physiology of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22, 50-52.
19. Pendleton, I. R. (1969), Insecticides of crystal-forming bacteria. *Process Biochem.* 29-32.
20. Zamola, B., P. Valles, G. Meli, P. Miccoli, and F. Kajfez (1981), Use of the centrifugal separation technique in manufacturing a bioinsecticide based on *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnol. Bioeng.* 23, 1079-1086.
21. Holmberg, A., R. Sievanen, and G. Carlberg (1980) Fermentation of *Bacillus thuringiensis* for exotoxin production. Press analysis Study. *Biotechnol. Bioeng.* 22, 1707-1724.