

새로운 *Bacillus thuringiensis* NT0423 균주의 배양체계

Establishment of Culture System of a New Strain NT0423 of *Bacillus thuringiensis*

김호산 · 노종열 · 이대원 · 우수동 · 강석권¹

Ho San Kim, Jong Yul Roh, Dae Weon Lee, Soo Dong Woo and Seok Kwon Kang¹

Abstract – For efficient and economical production of *Bacillus thuringiensis* strain NT0423 as a microbial-control agents, a new culture medium and culture condition were developed. Five media designated as SW11, SW14, SW23, SW32 and SW41 were prepared with various mixture ratio of soybean cake and wheat bran. It was found that in terms of the cell growth rate and development of sporulation of *B. thuringiensis* strain NT0423 in all SW culture media were more efficient than those in GYS and in LB media. Total cell number in all SW media showed similar values, but SW32 medium was the most efficient in the development of spore, which amounted to 3.7×10^8 CFU/ml. Also, at the pH ranging from 6.2 to 7.3 in the medium no adverse effect was not made in the culture of *B. thuringiensis* strain NT0423. The optimal volume (%) of SW32 medium in a 5 l fermentor was determined as 4% volume of total medium, resulting in growth (4.2×10^8 CFU/ml) of *B. thuringiensis* strain NT0423. As *B. thuringiensis* was cultured in the shake-flask and 5 l fermentor, bacterial cells were yielded to 1×10^9 CFU/ml and 5×10^{10} CFU/ml.

Key Words – *B. thuringiensis* strain NT0423, Microbial-control agent, Culture medium, Culture condition, Soybean cake, Wheat bran

초 록 – 새로운 *Bacillus thuringiensis* NT0423 균주를 이용한 배양체계 확립과 대량생산을 위한 새로운 배양 배지를 개발하였다. 대두박과 밀기울의 다양한 성분비로 구성된 5종의 SW 배지는 기존의 인공합성배지인 GYS나 LB 배지보다 *B. thuringiensis*의 성장과 포자형성면에서 훨씬 우수한 결과를 보였고, 그 중 대두박과 밀기울이 3:2의 비율로 구성된 SW32 배지에서 전체 세포 수가 3.9×10^8 CFU/ml에 달했고, 대부분의 세포가 빠르게 포자를 형성하여 (3.7×10^8 CFU/ml) 가장 효율적이었다. 배양에 따른 배지의 pH는 최저 6.2에서 최고 7.3까지 변화하여 성장에 크게 영향을 미치지 않았고, 전체 배양액에서 대두박과 밀기울이 차지하는 비율이 4%일 경우, ml당 4.2×10^8 CFU의 포자가 형성되어 *B. thuringiensis*의 성장에 가장 유리하였다. 교반플라스크와 5l의 소규모 발효기를 이용한 *B. thuringiensis*의 배양조건 확립에 의해 각각 최대 1×10^9 CFU/ml과 5×10^{10} CFU/ml에 해당하는 많은 양의 균체를 회수할 수 있었다.

검색어 – *B. thuringiensis* NT0423 균주, 내독소 단백질, 배양체계, 대량생산, 대두박, 밀기울

서 론

Bacillus thuringiensis (이하 B.t로 약칭)는 곤충에 독

성을 보이는 내독소 단백질을 생산하며 이 내독소 단백질은 목적 해충외에 영향이 없기 때문에, 오래전 부터 해충방제를 위해 많은 연구 개발이 이루어져 오고 있다. 현재 미국, 일본 등 선진국을 비롯하여 많은 국가

Division of Applied Biology and Chemistry, College of Agriculture & Life Sciences, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

¹ Present address : Division of Applied Biology and Chemistry, College of Agriculture & Life Sciences, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

들이 이를 농업해충 및 위생해충 방제에 사용하고 있다(Aronson 등 1986; Höfte와 Whiteley 1989). 이와 같은 B.t를 이용한 미생물 살충제의 개발에 있어서는 높은 독성과 넓은 살충 영역을 가지는 새로운 B.t 균주의 분리뿐만 아니라 새로운 균주에 대한 효율적인 배양체계 확립이 매우 중요한 인자이기 때문에 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Benoit 등, 1990; Mummigatti 등, 1990; Morris 등, 1997).

B.t의 생산에 사용되는 가장 기본적인 배지는 ammonium phosphate 같은 질소원과 쉽게 대사에 이용될 수 있는 dextrose 같은 탄소원을 포함하는 화학적 배지인 그리고 단백질, 핵산, 보조효소 성분들과 같은 생리적으로 기능하는 무기원들을 적절히 배합하는 것이 필요하다(Yousten과 Rogoff, 1969; Bulla 등, 1980). 그러나, 이들 배지 구성분들은 B.t의 대규모 배양에 사용하기에는 비경제적이기 때문에 농업산물 또는 부산물 같은 값싼 재료로 대체하는 것이 산업적인 측면에서 요구된다. 이와 같은 농업산물은 대개 B.t의 성장에 필요한 단백질이 풍부하고 질소원, 탄소원을 비롯한 무기염류도 충분히 포함되어 있으므로 대체재료로 그 유용성을 인정받고 있다. 따라서 B.t 제제를 생산, 상업적으로 시판하는 대부분의 나라에서는 농업산물과 같은 쉽게 얻을 수 있는 저가의 배지를 개발하여 B.t의 대량생산에 이용하고 있다(Lüthy 등, 1982; Morris 등, 1996).

따라서 본 연구에서는 국내 양잠농가의 잠실에서 분리되어 독성과 그 숙주범위에서 새로운 특성을 보이는 B.t인 NT0423 균주에 적합한 경제적 대량배양용 배지의 개발을 위해 농업부산물인 대두박과 밀기울을 이용하여 새로운 SW 배지를 개발하고 그 배양효율에 대해 조사, 분석하였다.

재료 및 방법

공시균주 및 농업부산물

공시균주로는 경기도 일원에서 채취된 양잠농가의 토양 및 먼지에서 새롭게 분리된 B.t NT0423 균주(Kim 등 1993)를 사용하였다. 본 실험에 사용된 농업부산물인 대두박과 밀기울(동방사료(주))의 입자를 미세화시키기 위해 정미소에서 일차로 분쇄하고 325 mesh의 체를 통과하여 얻어진 미세분말을 B.t 배양에 사용하였다.

*Bacillus thuringiensis*의 배양

B.t의 배양을 위해 영양평판배지(Difco Co., beef extract 0.3%, Bacto-peptone 0.5%, 증류수 1,000 ml, pH 7.2), LB(Maniatis 등, 1982), GYS(Nickerson 등, 1974)와 대두박과 밀기울을 이용한 SW로 명명된 5종의 천연배지가 사용되었다. 공시균주인 B.t NT0423 균주를

영양사면배지에서 영양평판배지에 이식하여 30°C에서 12시간 이상 배양한 후, 생성된 단일 콜로니를 25 ml 배지가 들어 있는 500ml 플라스크에 접종하고, 30°C에서 240 rpm의 속도로 배양하며 배양체계 분석에 이용하였다. 또한 이 배양액을 3/1의 배지가 들어 있는 5/1 발효기(Braun Co.)에 접종하고, 0.2% Antifoam(Sigma Co.)을 첨가하여, 30% pO₂, 30°C, 200 rpm의 조건으로 진탕배양하여 시험용 시료로 사용하였다.

*Bacillus thuringiensis*의 세포수와 포자수 측정

NT0423 균주의 성장효율과 그 성장시기 분석을 위한 내세포자 형성정도는 성장 초기에 포자형성 시기를 조사하기 위해 배양액 일정량을 6시간 간격으로 24시간 동안 수거하다가 이후 12시간 간격으로 배양액을 수거하여 영양평판배지에서 포자수를 측정하였다. 수거된 배양액을 25°C, 10,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후, 침전물을 0.1% Triton-X 100의 멸균증류수에 현탁하고 다시 20분간 원심분리하여 침전물을 증류수에 재현탁한 후, 80°C, 10분간 열처리에 의해 세포를 사멸시킨 다음, 포자를 연속적으로 희석하고 영양평판배지에 도말한 후 30°C 항온기에서 24시간 동안 배양하여 포자수를 측정하였다. 또한 전체 세포수는 수거된 배양액에 열처리 과정을 제외하고 영양평판배지에서 생성된 콜로니수로 결정하였다(Benoit 등, 1990; Seeley 등, 1991).

배지에 따른 *Bacillus thuringiensis* 성장 분석

배지에 따른 NT0423 균주의 성장을 조사하기 위해 초기 pH 7.0으로 조정된 인공합성배지인 GYS, LB 그리고 대두박과 5종의 SW 배지에 균주를 접종하고 포자형성이 끝날 때까지 배양하면서 24시간 간격으로 배양액 일정량을 수거한 후 전체 세포수, 포자수와 최종 pH를 조사하였다.

Bacillus thuringiensis 성장에 따른 배지내 pH 변화분석

3/1의 배지가 들어 있는 5/1 발효기(Braun Co.)에 NT0423 균주를 접종하고, 초기 B.t의 빠른 성장에 의한 pH의 현저한 변화를 알아보기 위해 6시간 간격으로 12시간까지 조사한 후, 이후 12시간 간격으로 pH 변화를 조사하였다.

배지량에 따른 *Bacillus thuringiensis* 성장분석

전체 배양액중 적정 배지량을 결정하기 위하여 배지량을 3%, 4%, 5%, 6%의 비율로 다양하게 준비한 후, 교반플라스크를 이용하여 5일 동안 배양하면서 24시간 간격으로 소량의 배양액을 수거하여 전체 세포수를 조사, 비교하였다.

결 과

새로운 SW 배지의 개발

서로 다른 구성성분으로 이루어진 대두박과 밀기울의 적절한 배합으로 가장 효율적인 B.t 생산을 위하여 대두박과 밀기울을 1:1, 1:4, 2:3, 3:2 그리고 4:1의 비율로 배합한 5종의 SW 배지를 개발하여 B.t의 배양에 사용하였다 (Table 1). 이렇게 만들어진 SW 배지의 효용성을 내독소 단백질 생산에 많이 사용되는 GYS 배지 및 일반적인 세균의 배양에 널리 쓰이는 LB 배지와 함께 B.t의 배양조건과 그 효율성을 비교 조사하였다. 그 결과, LB 배지에서는 B.t가 거의 성장되지 않았고 포자형성도 10^6 CFU/ml로 매우 저조하였다. 반면에 GYS 배지는 4×10^8 CFU/ml의 수치로 빠르게 성장하지만 포자형성이 저조한 특징을 보였고, 5종의 SW 배지는 전체 세포수에서 $2.8 - 5 \times 10^8$ CFU/ml에 해당하는 수치를 보여 대체로 성장이 빠르고 포자형성 또한 활발하여 매우 우수하였다 (Table 2). 대두박과 밀기울의 혼합비율에 따른 배양효율은 5개의 배지가 7.3에서 7.6에 이르는 비슷한 pH를 보이면서 전체 세포수도 거의 비슷한 특징을 보였지만, 포자형성은 배지에 따라 차이

Table 1. Five fermentation media (g/l) for the production of δ -endotoxin by isolates of *B. thuringiensis*

Ingredient	Medium ^a				
	SW11	SW14	SW23	SW32	SW41
Soybean cake	20	10	13.4	26.6	30
Wheat bran	20	30	26.6	13.4	10

^a pH was adjusted to 7.0 with 2 N NaOH before autoclaving.

Table 2. Comparison of growth and sporulation of *B. thuringiensis* strain NT0423 in SW and known media

Medium	Initial pH	Final pH	Number (10^7 CFU/ml)	
			Total cell	Spore ^a
LB	7.0	6.7	8	-- ^b
GYS	7.0	7.8	42	-- ^c
SW11	7.0	7.5	50	22
SW14	7.0	7.5	40	14
SW23	7.0	7.3	44	1
SW32	7.0	7.3	39	37
SW41	7.0	7.6	28	19

^a After incubation for 4 days, spore number is calculated after heat treatment (80°C, 10 min).

^b and ^c Colony were not observed until the concentration was increased upto $\times 10^6$ CFU/ml.

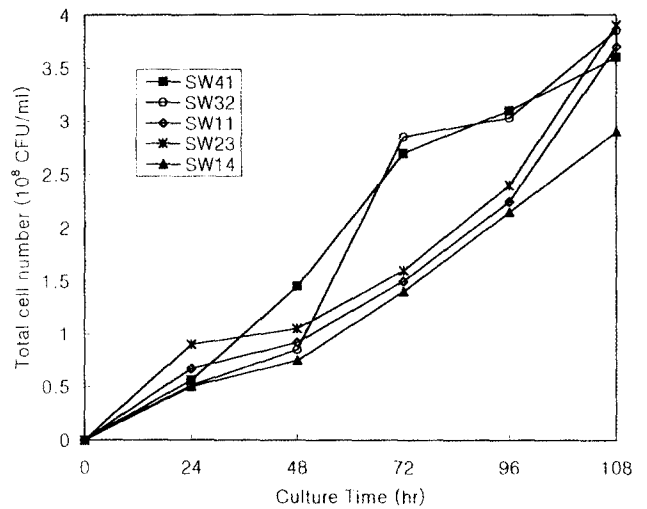


Fig. 1. Growth curve of *B. thuringiensis* strain NT0423 in the 5 SW media consisted of various mixture ratio of soybean cake and wheat bran. Total cell number indicates the number of viable cell and spore.

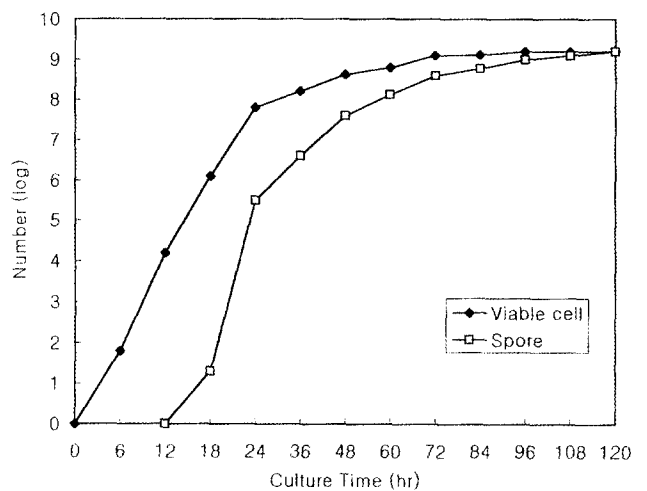


Fig. 2. Growth curve of viable cell and spore of *B. thuringiensis* strain NT0423 in the SW32 medium.

를 보였다. 동일조건하에서 3:2의 비율로 혼합된 SW32 배지에서 특히 3.7×10^8 CFU/ml에 이르는 포자가 형성되었고 또한 대부분의 영양세포가 포자형성이 완료되어 다른 SW 배지보다 더 효율적임을 알 수 있었다. Fig. 1은 5종의 SW 배지에서 배양된 B.t의 1일에서 5일에 이르는 시기에서 성장상을 나타낸 것으로 SW32 배지에서 보다 안정적이고 빠른 성장을 보였다. 이 결과로부터 B.t의 성장에 가장 적합한 배지로 SW32 배지를 선발하고 이 배지에서 전체 세포수와 포자형성을 조사한 결과, 2일만에 5×10^8 CFU/ml에 도달

하여 성장이 거의 끝났고 포자형성은 12시간째부터 계속 증가하다가 4일째에는 8×10^8 CFU/ml에 해당하는 수치를 보여 포자형성이 거의 완료되고 세포로부터 방출되었다 (Fig. 2).

SW32 배지에서의 B.t의 성장상

SW32 배지에서 pH에 따른 B.t의 성장상은 일반적으로 사용되는 다른 배지와 같은 양상을 보여 주었다 (Fig. 3). 초기 pH 7로부터 최저 6.2까지의 pH 하강이 12시간까지 관찰되다가, 이후 pH가 점차로 증가하여 96시간에 이르러서는 거의 중성에 해당하는 최고 7.3의 pH로 변화하였다.

대두박과 밀기울은 물에 녹지 않는 성분이 많이 포함되어 있고, 발효기내 배지성분의 함량이 B.t의 성장에 많은 변화를 일으키기 때문에 전체 배양액에 대한 적정배지량을 3%에서 6%까지 달리하여 교반플라스크를 이용하여 B.t의 성장상을 조사한 결과, 4%와 5%에서 유사한 성장상을 보였지만, 4%에서 포자형성이 빠르고 최대 4.2×10^8 CFU/ml의 전체 세포수에 달해 가장 효율적으로 B.t가 성장함을 알 수 있었다 (Fig. 4). 5일 이후에는 세포수에 큰 변화없이 지속적으로 유지되었다.

이상의 모든 결과로부터 많은 수의 B.t를 분석하기에 용이한 플라스크와 대규모 배양을 위한 예비단계로 소규모의 발효기를 이용하여 배양조건을 확립하였다. 플라스크를 이용한 배양에서는 충분한 공기공급을 위해서 500 ml 플라스크내에 25 ml의 배지를 첨가하고 30°C, 240 rpm으로 배양하여 4일만에 $5-10 \times 10^8$ CFU/ml에 해당하는 균체를 회수할 수 있었고, 5l의 발효기에 3l의 배지를 첨가하여 30°C, 200 rpm, 30% pO₂ 조건으로 배양한 결과에서는 2일내에 log phase를 마치고 포자형성단계로 접어들어 4일만에 포자형성이 완료되고

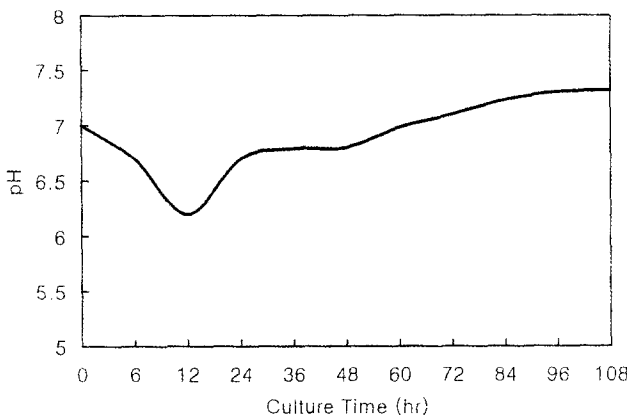


Fig. 3. Change in pH during growth and sporulation of *B. thuringiensis* strain NT0423.

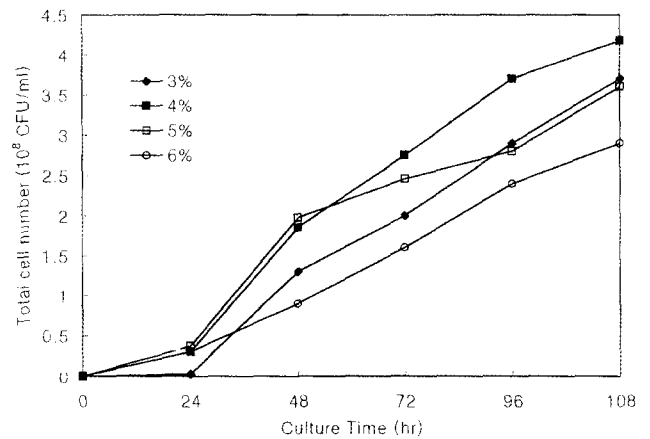


Fig. 4. Determination of the optimum volume (%) of the medium in a fermentor.

세포에서 방출되어 $1-5 \times 10^{10}$ CFU/ml에 해당하는 많은 양의 균체를 회수할 수 있었다.

고 찰

본 연구에 사용된 NT0423 균주는 내독소 단백질의 발현이 상당히 안정되어 큰 단백질을 생산하며 새로운 유전자를 포함하고 나비목에 대한 넓은 숙주역과 강한 독성을 보이므로 살충제로서 이용에 매우 유리한 조건을 갖고 있다 (Kim 등, 1993). 그러나, B.t를 이용한 배양조건 확립은 균주마다 차이를 보이므로 균주에 따른 배지선정 및 배양조절이 요구된다 (Morris 등, 1996). 특히 배지선정에서 최근의 경향은 상대적으로 쉽게 얻을 수 있고 미생물 성장에 필요한 영양분이 풍부하면서 가격이 저렴한 농업부산물을 이용, 유용한 배지개발을 위한 연구가 진행되고 있다 (Morris 등, 1997).

본 실험에 이용된 대두박과 밀기울로 구성된 배지는 농업부산물로서 이러한 조건을 충족하는 것으로 판단되었다. SW 배지에서 대두박은 단백질을 84.1%로 가장 많이 함유하고 있어 질소원으로 유용하고, 밀기울은 탄수화물을 80% 이상 포함하고 있어 탄소원으로 B.t의 배양에 효과적으로 작용하였다 (NAS-NRC, 1994). 그러나 SW 배지에서 자란 B.t 배양액은 불용성인 대두박 및 밀기울 성분과 혼재되어 있어 이 두 성분이 잎에 대한 고착효과 증대, 자외선 차단효과 그리고 영양원으로 작용할 수 있는 이점이 있는 반면에 제제화 공정시 B.t 원체를 미세분말화시키는 분쇄 공정을 어렵게 하는 문제점이 있다. 또한 대두박과 밀기울 성분내에 포함된 섬유질은 크기가 크고, 쉽게 분말화되지 않아 분무기를 이용한 살포시, 분사노즐이 막히게 되는 문제를 발생시킬 수 있으므로 본 연구에서는 대두박과 밀기울을 일차로 분쇄한 후, 325 mesh의 체로 미리 쳐서 가는 입자

만 골라내어 배지에 이용하였다.

인공합성배지인 GYS 및 LB 배지와와의 성장비교에서 (Table 2) 모든 SW 배지가 빠른 성장과 포자형성을 보여 B.t NT0423 균주의 배양에 이 배지가 효율적임을 보였고, 최종적으로 선발된 SW32 배지는 탄소원과 질소원이 가장 적절한 비율로 혼재되어 B.t 배양에 효과적으로 작용함을 보여 주었다. 또한 형성된 포자수에서 SW32 배지는 3.7×10^8 CFU/ml로 대부분의 세포가 포자를 형성했지만, 비슷한 비율로 구성된 SW23 배지에서는 B.t의 성장은 빠르지만, 전체 세포수 4.4×10^8 CFU/ml에서 단지 1×10^7 CFU/ml만 포자가 형성되는 저조함을 보여 배지를 이루는 주된 구성성분의 적절한 혼합비율이 B.t의 배양에 상당한 영향을 미침을 보여 주었다.

SW32 배지를 이용한 B.t의 배양에서 pH는 6.2에서 7.3의 범위내에서 변화함으로써 성장에 불리하게 작용하지 않음을 지적해 주고 있다 (Fig. 3). B.t 배양시 pH의 영향에 대해서는 배양 초기 빠른 성장에 의한 glucose의 분해에 의한 배양액의 산성화 (pH 5.6~5.8)가 B.t 성장을 억제하므로 pH 조건이 중요한 조절인자임이 보고된 바 있다 (Yousten과 Rogoff, 1969; Nickerson 등, 1974). 그러나, SW 배지는 이상과 같은 유용성이 있지만, 높은 교반속도와 공기공급 조건하에서는 배지성분중 대두박내 단백질 분해에 의한 많은 거품을 유발하여 B.t의 성장에 영향을 주기 때문에 거품억제 및 성장에 영향이 적은 적절한 거품억제제의 선발이 필요하다.

B.t 제제는 오랫동안 사용되어졌고, 현재 가장 주목받고 있는 살충제이다. 상업적 농업에서의 B.t 사용은 제한되어 있지만, 최근 생물적 방제 특히 종합적 해충관리 (IPM) 전략에 부합되므로 그 필요성이 점차 증가되고 있다. 따라서 본 연구에서와 같은 새로운 B.t 균주와 농업부산물로 구성된 새로운 배지를 이용한 배양체계 확립은 B.t의 대량생산을 위한 전단계로서 중요하며 나아가서 B.t를 이용한 미생물 제제 개발에 크게 기여할 것으로 기대된다.

사 사

본 연구는 서울대학교 농업생물신소재 연구센터와 농림·수산기술개발사업 과제 (첨단기술)의 연구비 지원으로 수행되어졌다.

인 용 문 헌

- Aronson, A.I., W. Beckman and P. Dunn. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. Microbiol. Rev. 50: 1~24.
- Benoit, T.G., G.R. Wilson and C.L. Baugh. 1990. Fermentation during growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* HD-1. Lett. Appl. Microbiol. 10: 15~18.
- Bulla, L.A., Jr., D.B. Bechtel, K.J. Kramer, Y.I. Shethna, A.I. Aronson and P.C. Fitz-James. 1980. Ultrastructure, physiology and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. CRC Crit. Rev. Microbiol. 8: 147~204.
- Höfte, H. and H.R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 53: 242~255.
- Kim, H.S., H.W. Park, S.H. Kim, Y.M. Yu, S.J. Seo and S.K. Kang. 1993. Dual-specificity of δ -endotoxin produced by newly isolated *Bacillus thuringiensis* NT0423. Kor. J. Appl. Entomol. 32: 426~432.
- Lüthy, P., J.L. Cordier and H.M. Fischer. 1982. *Bacillus thuringiensis* as a bacterial insecticide: basic consideration and application. In "Microbial and viral pesticide." ed. kurstak, E. pp. 35~74. New York Marcel Dekker, INC.
- Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook. 1982. Molecular Clonings. In "A Laboratory manuals." Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Morris, O.N., V. Converse, P. Kanagaratnam and J.S. Dacies. 1996. Effect on cultural conditions on spore-crystal yield and toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* (HD 133). J. Invertebr. Pathol. 67: 129~136.
- Morris, O.N., P. Kanagaratnam and V. Converse. 1997. Suitability of 30 agricultural products and by-products as nutrient sources for laboratory production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* (HD 133). J. Invertebr. Pathol. 70: 113~120.
- Mummigatti, S.G. and A.N. Raghunathan. 1990. Influence of media composition on the production of δ -endotoxin by *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol. 55: 147~151.
- NAS-NRC 1994. Nutrient Requirements of Poultry. National Academy of Sciences Washington, D.C.
- Nickerson, K.W. and L.A. Jr. Bulla. 1974. Physiology of sporeforming bacteria associated with insects minimal nutritional requirements for growth sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol. 28: 124~128.
- Seeley, H.S., Jr., P.J. Vandemark and J.J. Lee. 1991. Microbes in action. In "A Laboratory of manual of microbiology." 4th ed. pp. 95-97. W.H. Freeman and Company, New York.
- Yousten, A.A. and M.H. Rogoff. 1969. Metabolism of *B. thuringiensis* in relation to spore and crystal formation. J. Bacteriol. 100: 1229~1236.