

국내에서 선발한 *Bacillus thuringiensis* sp. *aizawai* 균주의 주요 나방류 해충에 대한 살충 활성 및 배양특성

이상계* · 최기현¹ · 이영수² · 오경석 · 오정훈³ · 최성원¹

농촌진흥청 연구개발국, ¹(주)그린바이오텍 생명공학연구소, ²경기도농업기술원 제2농업연구소,
³한국담배인삼공사

요약 : 충북, 충남, 강원도 일대에서 채취한 토양시료로부터 Bt 균주를 분리하고 이들 균주 중 세포내 내독소 단백질 결정체를 형성한 10개의 균주를 분리하여 균체생산수율과 살충력이 뛰어난 균주를 선발하기 위해서 배양 및 생물검정 시험을 수행하였다. 그 결과, 배추좀나방에 대한 살충력은 물론이고, 파밤나방과 담배거세미나방에 대한 살충력도 상대적으로 높고, 배추좀나방 저항성 계통에 대한 살충력이 우수하면서 균체량과 활성포자수가 많은 GB-413 균주를 최종 선발하였다. 선발된 균주의 상업적 생산 적용을 위해 배양 특성 및 배양 공정 최적화 실험을 수행하였다. 탄소원인 초기 포도당 농도를 낮추어 포자형성이 유도되도록 배지조성을 변경하고 배양 중에 탄소원을 첨가하는 방식으로 배양공정을 변경한 결과, 포자형성과 활성포자수가 증가하였고 포자형성시간 및 배양시간이 단축되었으며, 살충활성의 저하는 나타나지 않았다. 이렇게 최적화된 생산배지 및 공정을 5톤 발효조 배양에 최종 적용한 결과 유사한 배양결과를 얻어 상업적 생산을 위한 대량배양의 가능성을 높여주었다. (2006년 3월 20일 접수, 2006년 6월 20일 수리)

색인어 : *Bacillus thuringiensis*, 배양조건, *Plutella xylostella*, *Spodoptera litura*, *Spodoptera exigua*.

서 론

Bacillus thuringiensis(Bt)는 호기성 Gram 양성균의 간균으로, 영양세포에 내생포자를 형성하는 시기에 살충성 단백질 결정체를 동시에 형성한다. 현재까지 나비목, 파리목, 딱정벌레목 등의 곤충에 독성을 가진 단백질 결정체는 내독소(델타-endotoxin)라 불리는 폴리펩티드로 이루어져 있으며, 이 내독소 단백질의 종류에 따라 대상 해충에 대한 독성이 달라지는 기구 특이성을 나타낸다(Schnepf, 1995). Bt는 해충에 대한 활성뿐만 아니라, 산업적으로 균체생산의 용이성, 비대상 생물체에 대한 무독성 등의 장점으로, 현재는 전 세계적으로 가장 널리 쓰이는 생물농약 가운데 하나가 되었다(Khetan, 2001).

Bt의 상업적 생산은 1950년대부터 시작되었으며, 1970년대에 Bt *kurstaki* isolate HD-1이 판매되면서 나비목 해충에 대한 사용량이 급격히 증가하였다. 또한 파리목의 모기유충에 효과가 있는 Bt *israelensis*가 1980년대 초반 상업화가 이루어졌고, 1990년대에는 식식성 딱정벌레에 효과가 있는 Bt *tenebrionis*가 상품

화 되어 판매되고 있다(Lambert와 Peferoen, 1992).

Bt를 이용한 미생물 살충제의 상업적 개발의 성공하기 위하여서는, 높은 살충력과 기주범위가 넓은 살충영역을 가지는 새로운 Bt 균주를 분리하는 것도 중요하지만, 균주에 대한 효율적인 배양방법을 확립함으로써 살충력도 향상시키면서 함께 생산비용을 낮추는 노력도 많은 연구자들에 의해 시도되어왔다(Benoit 등, 1990; Mummigatti와 Raghunathan, 1990; 김 등, 1998).

본 연구에서는 국내 토양에서 분리한 Bt 균주 가운데 상업화 가능한 균주를 주요 해충을 대상으로 선발하고 선발균주의 배양 특성을 확인하여 배양 조건을 최적 생산 공정으로 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

시험균주

충북, 충남, 강원도 일대의 토양으로부터 균주를 장등(1996)과 노 등(1995)의 방법에 의하여 *Bacillus thuringiensis* sp. *aizawai* 10가지 균주(GB-211, GB-245, GB-329, GB-337, GB-352, GB-408, GB-413, GB-550, GB-806, GB-925)를 분리하였다. 분리된 균주는 10%

*연락처

Table 1. Components of culture media

	Components	Medium 1	Medium 2	Scale-up
Batch	Glucose	20.0	20.0	20.0
	Glycerol			
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	3.0	3.0	3.0
	MnSO ₄ ·5H ₂ O	0.5	0.5	0.5
	(NH ₄) ₂ SO ₄	15.0	15.0	15.0
	KH ₂ PO ₄	6.0	6.0	6.0
	K ₂ HPO ₄	3.0	3.0	3.0
	Corn Steep Lquor	30.0	30.0	30.0
	Soybean Meal	30.0	30.0	30.0
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.0	2.0	2.0
	Trisodium citrate	9.0	9.0	5.0
	Feeding	Glucose	20.0	10.0
Glycerol		10.0	10.0	10.0

glycerol과 섞어 -20°C 냉동고에 보관하였으며, 상온에서 해동 후 LB 한천배지에서 2회 계대 배양한 후 본 시험에 사용하였다.

시험곤충

배추좀나방(*Plutella xylostella*)의 감수성계통, 토쿠치온저항성 및 프로싱저항성 계통과 담배거세미나방(*Spodoptera litura*), 파밤나방(*Spodoptera exigua*)을 온도 25±1°C와 광주기 16:8h(L:D)의 조건에서 누대사육하며 3령 초기유충을 살충 실험에 사용하였다. 토쿠치온저항성계통과 프로싱저항성계통은 1996년부터 농업과학기술원 곤충사육실에서 누대사육하면서 각각의 대상 약제를 LC₃₀~LC₅₀ 수준으로 매일 1회씩 80회 이상 도태하여 감수성에 비하여 토쿠치온저항성계통은 500배 이상, 프로싱저항성계통은 800배 이상 저항성이 발달한 계통을 사용하였다. 담배거세미나방과 파밤나방은 2000년도 수원시 인근 배추밭에서 채집한 것을 실내에서 온도 25±1°C, 상대습도 60~70%로 누대사육하면서 본 시험에 이용하였다.

Bacillus thuringiensis 균주의 배양

Flask 배양은 1L baffled elenmyer flask에 GYS 배지(1.0 g L⁻¹ glucose, 0.4 g L⁻¹ MgSO₄·7H₂O, 2.0 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 0.5 g L⁻¹ KH₂PO₄, 0.5 g L⁻¹ K₂HPO₄, 1.0 g L⁻¹ yeast extract, 0.2 g L⁻¹ MnSO₄·5H₂O, 0.12 g L⁻¹ CaCl₂·2H₂O)를 100 mL씩 넣고 121°C에서 15분간 멸균하여, 접종원(3%, v/v) 접종 후 30°C, 150 rpm 조건에서 회전교반하면서 배양하였다. Jar 발효조 배양은 LB 한천배지에서 12시간 자란 균총은 baffled flask(50 mL 500 mL⁻¹)에 TPB 액체배지(10 g L⁻¹ tryptone, 5 g L⁻¹ NaCl, 20 g L⁻¹ peptone)를 넣고 30°C, 150 rpm 조건에서 12시간동안 회전교반 후 접종원으로 사용하였고, 접종원의 오염 여부는 접종전 현미경(×1,000)으로 확인하였다.

2.5 L jar 발효조 조건에서 유가식 배양법에 사용한 배지조성은 표 1과 같다.

실험을 통해 선발된 최적화된 배지조성(Batch 3)을 대량배양(scale-up)에 동일하게 적용하였다. 2.5 L jar 발효조와 50 L 종균발효조 및 5 ton 생산용 발효조

Table 2. Cultivation conditions

	Jar culture	50 L seed culture	5 ton culture
Culture volume	2.5 L	50 L	5.0 ton
Working volume	1.5 L	40 L	2.5 ton
Cultivation time	24~72 hrs	12 hrs	56 hrs
Inoculum volume	45 mL(3%)	1 L	40 L
pH control	6.0 upper	Not	6.0 upper
Temperature control	30±0.2°C	30±0.2°C	30±0.2°C
Aeration rate	0.3~1.2 L min ⁻¹	25 L min ⁻¹	500~1500 L min ⁻¹
Agitation speed	400~900 rpm	150 rpm	80~110 rpm
Foam control	10~20% silicone oil	Not	10~20% silicone oil
DO control	2.0-20 ppm	Not	2.0~20 ppm
Sterilization condition	121°C, 30 min	121~123°C, 20 min	121~123°C, 40 min

각각의 배양조건은 표 2에서 보는 바와 같다.

***Bacillus thuringiensis*의 세포수와 활성포자수 측정**

Bt의 세포수는 흡광도를 측정하여 상대적인 활성세포수로 비교하였다. 흡광광도계(spectrophotometer)를 이용하여 600 nm에서 측정하였으며, 측정시 영점은 증류수로 보정하였고 흡광광도계에서 측정되는 수치가 0-0.7 사이에 있도록 희석 측정 후 희석배수를 곱하여 계산하였다.

활성포자수를 측정하기 위해서 배양액 1 mL을 멸균증류수 9 mL이 든 시험관에 넣어 10배 희석액을 만들어, 영양세포를 죽이고 아포세포만을 남기기 위한 열처리(60°C, 30분) 후, 순차 희석하여 LB 한천 배지에 도달한 다음 30°C에서 24시간 배양 후 포자수를 확인하였다.

***Bacillus thuringiensis*의 살충활성 측정**

소정농도로 희석한 Bt 배양액(10^8 spores mL⁻¹)에 배추 잎을 직경 7 cm로 잘라 30초간 침지하고 1시간 동안 음건한 후 페트리디쉬에 넣고 시험곤충 3령 초기 유충을 각각 10마리씩 접종하였다. 또한 화학 살충제의 방제효과를 비교하기 위한 살충제를 배추좀나방에 대해서는 Thuricide 수화제, 담배거세미나방과 파밤나방에 대해서는 Chlorfenapyr 수화제를 대조약제로 사용하였다. 접종된 시험곤충에 대해서 사육조건과 동일한 조건하에서 접종 3일 후의 생사충수를 조사하였다. 시험은 5반복으로 실시하였으며, 반수치사농도(LC₅₀)의 산출은 Probit 법에 의하여 계산하였다.

결과 및 고찰

균주 선별

토양에서 분리한 10개 후보 균주를 플라스크에 배양하면서 살충활성이 높은 균주를 선별하였다. *Bacillus thuringiensis*는 내생포자 형성할 때 살충성 독소단백질을 같이 생산하여(Benoit *et al.*, 1990) 활성포자수는 곧 독소단백질의 양이라 할 수 있으며, 흡광도는 액체 내 빛의 산란정도를 나타내는 수치이지만 세균배양액에서는 균수와 비례한다(Bull *et al.*, 1980). 이에 흡광도 및 활성포자수를 비교하였다. 600 nm에서 흡광도를 상대 비교 한 결과 GB-806, GB-211, GB-352, GB-337, GB-413의 흡광도가 높게 나타났고, 활성포자수는 GB-337, GB-413, GB-352가 높게 나타났다(표 3). GB-337과 GB-413는 흡광도와 활성포자수가

모두 높아 상품화시 상품가치를 높일 수 있는 장점이 될 수 있을 것으로 생각된다.

Table 3. Relative bacterial biomass and number of active spore after cultivation of GB strains in GYS media

Strain	Optical Density in 600nm	No. Active spore mL ⁻¹ ($\times 10^8$)
GB-211	4.088	3.17
GB-245	3.792	4.10
GB-329	3.776	3.90
GB-337	4.032	7.37
GB-352	4.072	5.27
GB-408	3.952	4.57
GB-413	4.040	7.27
GB-550	2.320	3.10
GB-806	4.248	4.60
GB-925	3.968	4.47

각 균주별 배추좀나방에 대한 살충력을 비교한 결과, GB-211, GB-329, GB-413, GB-352은 감수성계통에 대해서 독성이 높아 교차저항성을 보였다. 한편 토쿠치온 저항성에 대해서는 GB-408, GB-550, GB-352, GB-211, GB-413, 프로싱 저항성에 대해서는 GB-245, GB-413, GB-337, GB-408의 독성이 상대적으로 높아 위 균주들은 살충제 저항성 배추좀나방에 대하여 오히려 역상관교차저항성을 보임으로써 살충제 저항성 배추좀나방 방제에 효과적일 것으로 판단되었다(표 4). 감수성계통과 토쿠치온 및 프로싱 저항성에 대해 모두 강한 독성을 나타내는 것은 GB-413이었다.

담배거세미나방과 파밤나방에 대한 살충력도 함께 검정하였는데, GB-413과 GB-550의 독성이 다른 균주에 비해 높게 나타났다(표 5).

흡광도와 활성포자수는 독소단백질 생산량과 비례한다고 생각할 때 추후 대량생산을 통한 상업화를 고려할 경우 생산성과 직결되는 중요한 인자로 생각되어진다. 흡광도와 활성포자수를 함께 고려하면, GB-337, GB-413, GB-352, GB-806, GB-211(활성포자수 우선순위)이 높은 값을 보였다.

한편, 약효와 직접적으로 관계가 있는 살충력을 배추좀나방의 감수성 계통과 합성피레스로이드계 및 유기인계 약제 저항성 계통에서 검정한 결과, GB-413 균주가 세가지 계통에 고루 높은 살충력을 보였으며, GB-211, GB-352, GB-408 등도 비교적 높은 살충력을 나타내었다. 살충대상 해충을 달리한 실험에서는 담배거세미나방과 파밤나방에 대해 GB-413과 GB-550이

Table 4. Toxicities of 10 Bt strains against diamondback moth, *Plutella xylostella* (3rd instar)

Strain	LC ₅₀ (1.0×10 ⁶ CFU mL ⁻¹)		
	Susceptible	Prothiofos-Resistance	Fenvalerate-Resistance
GB-211	46.42	82.4	397.7
GB-245	262.4	273.0	88.3
GB-329	188.3	185.9	131.0
GB-337	253.8	218.4	113.9
GB-352	194.4	80.1	586.4
GB-408	224.1	12.7	114.7
GB-413	194.3	124.5	109.6
GB-550	502.7	24.9	123.9
GB-806	722.3	289.9	124.2
GB-925	952.7	174.1	164.8
Thuricide	6.5	4.0	-

Table 5. Toxicities of 10 Bt strains against tobacco cutworm, *Spodoptera litura* and beet armyworm, *Spodoptera exigua* (3rd instar)

Strain	LC ₅₀ (1.0×10 ⁶ CFU mL ⁻¹)	
	<i>S. litura</i>	<i>S. exigua</i>
GB-211	>10,000	>10,000
GB-245	>10,000	>10,000
GB-329	>10,000	4891.9
GB-337	>10,000	7315.5
GB-352	7722.8	>10,000
GB-408	>10,000	2809.2
GB-413	3217.0	2212.3
GB-550	3252.8	1635.6
GB-806	>10,000	6879.7
GB-925	>10,000	3889.5
Chlorfenapyr	-	<3.0

상대적으로 높은 살충력을 나타내 적용대상 해충의 확대 가능성을 보여주었지만, 배추좀나방에 비하면 10배 이하의 낮은 살충력이어서 이들 해충에 대한 특이성을 갖는 균주는 아님을 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합하여, 배추좀나방에 대한 살충력은 물론이고, 파밤나방과 담배거세미나방에 대한 살충력도 높을 뿐만 아니라 저항성 계통에 대한 살충력도 높고 균체량과 활성포자수도 많은 GB-413 균주를 최종 선발하였다.

포도당 유가식 배양 (Medium 1)

선발된 GB-413균주의 생산성과 경제적인 가치를 증가시키기 위해서는 간결하고 재현성이 높은 생산공정과 경제적인 배지를 사용하여 비용절감을 할 수 있다. 탄소원으로는 포도당, 질소원으로는 콩에서 기름을 추출한 후의 탈지대두박(soybean meal), 옥수수

전분추출잔유물인 옥수수침지액(corn steep liquor)등의 산업폐자원을 이용한 배지에서 배양을 하였다. Bt균은 50 g L⁻¹이상의 농도에서 성장이 느려지거나 정지되는 등 스트레스를 받는다(Höfte *et al.*, 1989). 이에 배양초기 포도당 농도(20 g L⁻¹)를 낮추어 배양을 시작하고 포도당에 일정량 소비되면 공급하여주는 방식의 유가식(fed-batch) 배양을 수행하였다. 또한 유기질 소원 농도를 높이고 K₂HPO₄와 KH₂PO₄의 농도를 조절하여 인(P)과 칼륨(K)의 균형을 맞추어 주었다(표 1 참고). 앞에서 언급한 흡광도와 활성포자수는 독소단백질의 생산성과 비례하는데 Bt의 활성포자는 균의 성장이 어려운 극한 상황에 생존하기 위한 수단으로 형성되는 것이다(Morris *et al.*, 1997). 이러한 포자형성은 탄소원이나 질소원과 같은 세포증식에 관여하는 영양원이 고갈되면서 일어난다(Mummigatti *et al.*, 1990).

영양원 고갈에 형성된 포자는 일반적으로 외부환경에 대해 안정하다고 알려져 있다(Crecchio *et al.*, 2001). 그 중에 탄소원 고갈에 의한 포자형성유도는 산업적인 Bt 생산에서 일반적으로 사용되는 방법이다. 그러므로 본 배양에서도 탄소원 고갈에 의한 포자형성을 유도하고자 했다.

그 결과 최대흡광도(600 nm)와 활성포자수는 각각 91와 1 × 10⁹ spore mL⁻¹ 이었다. 하지만 포도당이 완전히 소비되기 전인 약 배양 37시간에 포자형성이 현미경에서 관찰되어(그림 1) 탄소원 고갈에 의한 포자형성이 아니라 다른 영양원의 고갈에 의한 포자형성으로 보여지며 배양시간은 72시간이었다. 이에 탄소원인 포도당 고갈로 인한 포자형성을 유도하기 위한 실험을 수행하였다.

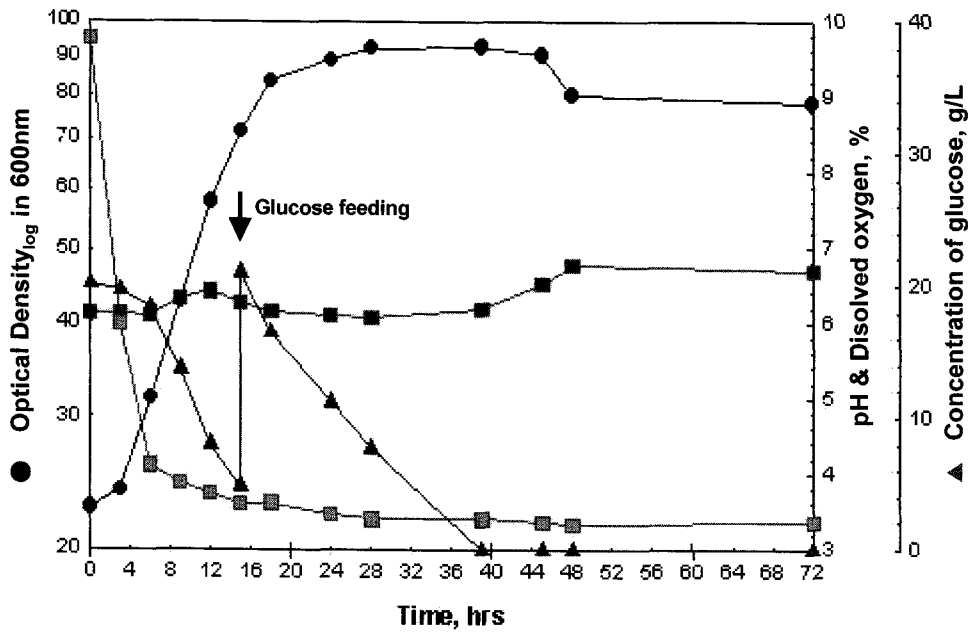


Fig. 1. Fed-batch culture of GB-413 in 2.5 L fermenter with industrial media (glucose feeding) before the glucose was depleted.

포도당 및 글리세롤 유가식 배양조건 (Medium 2)

포도당 농도를 40 g L^{-1} 에서 30 g L^{-1} 로 낮추어 포자 탄소원 고갈로 인한 포자형성이 유도되도록 하고 포자 형성 시 에너지원으로 사용되는 Glycerol(Morris *et al.*, 1996)을 첨가한 배지조성을 변경하여 배양한 결과, 최대흡광도와 활성포자수가 각각 90와 $1 \times 10^9 \text{ spore mL}^{-1}$ 으로 앞 실험과 유사한 결과를 얻었으며, 포자형성시간과 배양시간은 각각 35시간과 50시간으로 짧아지는 결과를 얻었다(그림 2).

대량생산 공정 확립 (Scale-up)

실험실 배양과 생산 공정의 배양은 멸균조건, 멸균 방법 등에 따라 배지 상태가 달라지며 종균의 단계 등에 차이가 있어 배양결과가 달라지기도 한다(Flores *et al.*, 1997). 이러한 물리, 생물적인 조건 차이를 극복하도록 실험실 배양조건이 생산에서도 재현여부를 실험하여야 한다. 그래서 최적화된 실험실 배양조건을 5 ton 생산 발효조 에서 적용하였다. 포자형성시간과 배양시간이 각각 40시간과 56시간으로 다소 길어

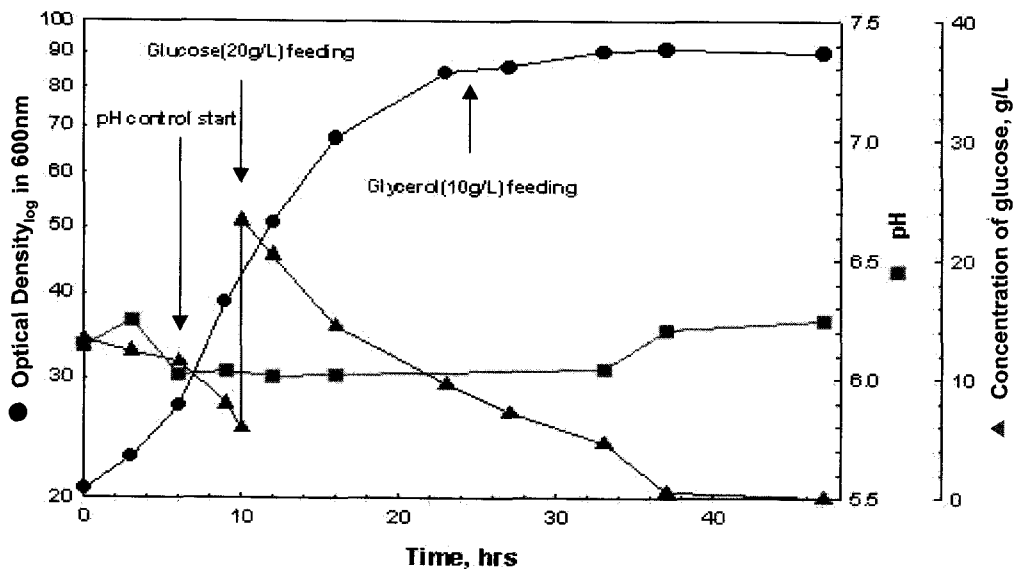


Fig. 2. Fed-batch culture of GB-413 in 2.5 L fermenter with industrial media (glucose and glycerol feeding).

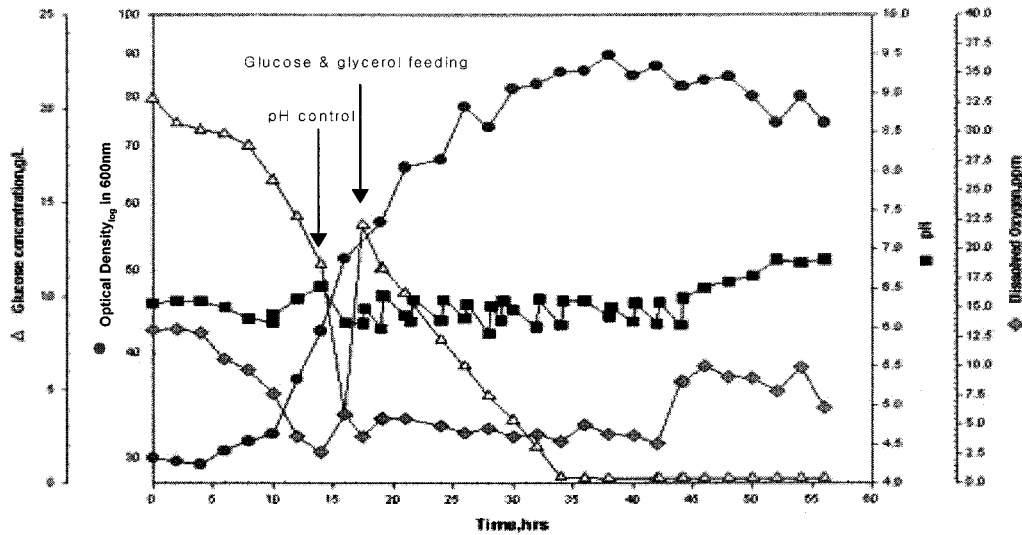


Fig. 3. Fed-batch culture of GB-413 in production fermenter (5 ton) with industrial media (glucose and glycerol feeding).

졌지만, 포자형성율과 활성포자수는 각각 89%와 9×10^8 spore mL^{-1} 로 실험실 배양과 유사한 결과를 얻었다(그림 3).

이상의 결과를 종합해 볼 때, 토양시료로부터 균체 생산 수율과 살충력이 뛰어난 균주를 선발한 결과, GB-413은 배추좀나방, 파밤나방, 담배거세미나방에 대한 살충력도 상대적으로 높고, 흡광도와 활성포자 수도 많았다.

선발된 균주의 살충활성의 저하는 나타나지 않으면서 포자형성율과 활성포자수를 증가시키고 포자형성 시간 및 배양시간을 단축시킬 수 있으며, 산업폐자원을 배지로 사용하여 경제성 높은 대량배양시스템을 실험실배양에서 확립하였고, 생산규모 배양(5 ton)을 통해 실험실규모 배양결과와 유사한 결과를 얻음으로써 상업적 대량공정이 가능한 생산공정 시스템의 가능성을 높여 주었다.

향후에는 추가 영양원 공급으로 보다 많은 활성포자 생산과 포자형성에 영향을 미치는 특정 영양원의 소량 공급 등으로 배양시간의 단축 및 형성되는 포자의 안정성 실험이 필요할 것으로 생각된다.

인용문헌

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.

Crecchio, C. and G. Stotzky (2001) Biodegradation and insecticidal activity of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* bound on complexes of montmorillonite-humic acids-Al hydroxypolymers. Soil Biol. Biochem. 33:573~581.

Flores, E. R., F. Perez and M. D. L. Torre (1997) Scale-up of *Bacillus thuringiensis* fermentation based on oxygen transfer. J. Fermentation and Bioengineering 83:561~564.

Higuchi, K., H. Saitoh, E. Mizuki, T. Ichimatsu and M. Ohba (2000) Larval susceptibility of the diamondback moth, *lutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae), to *Bacillus thuringiensis* H serovars isolated in Japan. Microbiol. Res. 155:23~29.

Höfte, H. and H. R. Whiteley (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 53:242~255.

Khetan, S. K. (2001) Bacterial insecticide: *Bacillus thuringiensis*. pp.3~42, In Microbial pest control, Marcel Dekker Inc., USA.

Lambert, B. and M. Peferoen (1992) Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. Facts and mysteries about a

- successful biopesticide. *Bioscience* 42:112~122.
- Morris, O. N., V. Converse, P. Kanagaratnam and J. S. Davies (199) Effect of cultural conditions on spore-crystal yield and toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* (HD133). *J. Inverte. 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* (HD133). *J. Inverte. 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.
- Ohba, M. and K. Aizawa (1978) Serological identification of *Bacillus thuringiensis* and related bacteria isolated in Japan. *J. Invertebra. Pathol.* 32:303~309.
- Schnepf, H. (1995) *Bacillus thuringiensis* toxins: regulation, activities and structural diversity. *Curr. Opin. Biotech.* 6:305~312.
- Tang, J. D., A. M. Shelton, J. V. Rie, S. D. Roeck, W. J. Moar, R. T. Roush and M. Peferoen (1996) Toxicity of *Bacillus thuringiensis* spore and crystal protein to resistant Diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol.* 62:564~569.
- Zouari, N., S. B. S. Ali and S. Jaoua (2002) Production of delta-endotoxins by *Bacillus thuringiensis* strains exhibiting various insecticidal activities towards lepidoptera and diptera in gruel and fish meal media. *Enz. Microbial Technol.* 31:411~418.
- 김호산, 노종열, 이대원, 우수동, 강석권 (1998) 새로운 *Bacillus thuringiensis* NT0423 균주의 배양체계. *한국응용곤충학회지* 37(2):187~191.
- 노종열, 박현우, 김호산, 진병래, 강석권 (1995) 한국 토양으로부터 새로운 무독성 *Bacillus thuringiensis* 균주의 분리. *한국응용곤충학회지* 34(4):373~377.
- 장진희, 노종열, 제연호, 이대원, 우수동, 설광열, 강석권 (1996) 거세미나방속 해충에 독성을 가지는 *Bacillus thuringiensis* 균주의 분리 및 특성. *한국잡사학회지* 38(2):154~159.

Insecticidal Activities against Major Lepidopteran Pests and Culture Condition of *Bacillus thuringiensis* sp. *aizawai* collected in Korea

Sang-Guei Lee*, Kee-Hyun Choi¹, Young-Su Lee², Kyeong Seok Oh, Jeung-Hun O³ and Sung-Won Choi¹ (Research Development Bureau, RDA, ¹Institute of Biotechnology Green Biotech Ltd. Co., ²Gyeonggi Province Agricultural Research and Extension Services, Northern Agricultural Research Station, ³KT&G Central Research Institute)

Abstract : This experiment was conducted to select prominent microorganisms with a good insecticidal activity among the ten species, which isolated from soil at the near of Chung-buk, Chung-nam, and Gang-won provinces and made protein crystal endotoxin. As a result, GB-413 strain was finally selected, which showed the high insecticidal activity against susceptible diamondback moth (*Plutella xylostella*), beet army worm (*Spodoptera exigua*) and tobacco cutworm (*Spodoptera litura*) as well as resistant diamondback moth strains. By modifying the cultivation process f.g. lowing the glucose concentration at early cultivation stage and adding the carbon after inducing the spores, the percentage of making spore as well as the number of active spore were increased and the time for cultivation and spore forming was reduced without a reduction of insecticidal activity. These results were not only applied successfully for the optimized cultivation process for a fermentation tank containing five tons capacity, but also improved the possibility of mass cultivation for commercial production.

Key words : *Bacillus thuringiensis*, Culture condition, *Plutella xylostella*, *Spodoptera litura*, *Spodoptera exigua*.

*Corresponding author (Fax : +82-31-299-2629, E-mail : sglee@rda.go.kr)