

GOVP1200508997

M1-9808-00-0031

***Bt* 살충제 생산성 제고를 위한 균주육종
및 생산공정 개발**

Strain improvement and process optimization for improving
productivity of *Bt* insecticide

(주)인바이오넷
생명공학연구원

과학기술부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “ Bt 살충제 생산성제고를 위한 균주육종 및 생산공정개발에 관한 연구”과제의 보고서로 제출합니다.

2002. 10. 30.

주관연구기관명 : (주)인바이오넷 부설연구소

주관연구책임자 : 구 본 탁

연 구 원 : 이 정 기

 " : 박 기 돈

 " : 이 상 준

 " : 성 기 철

 " : 정 현 미

공동연구기관명 : 한국생명공학연구원

공동연구책임자 : 박 승 환

연 구 원 : 최 수 근

 " : 김 지 현

 " : 김 성 빈

 " : 박 수 영

 " : 박 연 경

보고서 초록

과제관리번호	M1-9808-00-0031	해당단계 연구기간	1998.9.1-2001.8.31	단계 구분	3/3
연구사업명	중 사업명	선도기술개발사업			
	세부사업명	신기능 생물소재 기술개발사업			
연구과제명	중 과 제 명				
	세부(단위)과제명	Bt 살충제 생산성제고를 위한 균주육종 및 생산공정 개발			
연구책임자	구 분 탁	해당단계 참여연구원수	총 : 70 명 내부 : 38 명 외부 : 32 명	해당단계 연구비	정부: 1,188,278 천원 기업: 272,000 천원 계: 1,460,278 천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)인바이오넷/생명공학연구원		참여기업명	(주)인바이오넷	
국제공동연구	상대국명 :	상대국연구기관명 :			
위탁연구	연구기관명 :	연구책임자 :			
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)					보고서 면수
					119
<p>○ 국민건강과 환경 및 생태계보호를 위해서 기존 화학농약을 대체할 수 있는 무공해 Bt 생물농약균주의 산업화를 위한 연구개발을 위해 힘쓴 본 과제는 Bt 살충제의 생산성을 높이고, 이를 위한 균주육종 및 생산공정 개발하였다.</p> <p>○ 생물농약 전문기업인 미국의 마이코젠사에 Bt 균주 및 유전자 관련 기술을 수출하였다.</p> <p>○ 모기유충에 살충활성이 있는 Bti 균주의 용혈활성을 가진 유전자를 제거하면서 외래 DNA 조각을 삽입하지 않은 환경 친화적 균주를 제작하였다.</p> <p>○ 모니터링용 Bti 균주를 이용한 현장적용 실험에서 돼지의 사료에 섞여 먹었을 때 90% 이상이 돼지의 장을 통과하는 동안 생존하여 분변을 통해 배출되었고 배출된 Bt는 모기 유충에 대해 살충력을 나타냄을 확인함으로써 Bti 균주의 사료첨가 가능성을 확인하였다.</p> <p>○ 포자형성 과정에 의존적으로 생산되는 Bt 독소단백질의 생산성을 조절하기 위한 포자형성 조절인자를 처음으로 발견하여 그 특성을 분석하였다.</p> <p>○ Bt 전체 게놈의 95% 정도를 해독 완료하였으며 Bt 균이 생산하는 다양한 독소단백질, 효소, 2차 대사산물 등을 생산하는 유전자를 확인하였다.</p> <p>○ 새로운 신호물질 분해 유전자를 발견하였는데 재조합 대장균을 이용한 실험에서 무름병을 억제할 수 있어 살충제로서의 기능뿐만 아니라 살균제로서의 개발가능성을 확인하였다.</p> <p>○ 위생해충 제어용 Bti 미생물제를 여러 종류의 유화제 형태로 만들어 현장적용 시험을 실시하였고 국내 현실에 적합한 위생해충 제어용 Bti 제형의 선정 및 시제품 제작하였다.</p>					
색 인 어 (각 5개 이상)	한 글	바실러스 쉐린젠시스, 모기 유충 제어, 포자형성조절, Bt 게놈, 살균제			
	영 어	<i>Bacillus thuringiensis</i> , Biocontrol, sporulation regulation, Bt genome, antimicrobial			

요 약 문

I. 제 목

Bt 살충제 생산성 제고를 위한 균주육종 및 생산공정 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

환경 및 생태계보호뿐만 아니라 생산자와 소비자를 포함한 국민건강을 위하여 기존 화학농약을 대체할 수 있는 무공해 생물농약의 개발이 절실히 요청된다.

최근에 들어 국내뿐만 아니라 전 세계적으로 모기에 의한 피해가 점점 늘어나고 있어 모기 또는 모기유충에 대한 효과적인 방제수단의 개발이 시급하다.

모기방제를 위해 현재 화학농약이 쓰이고 있는데 일반적인 화학농약은 모기뿐만 아니라 다른 어류 및 사람에게도 해롭기 때문에 무분별한 사용은 생태계에 미치는 영향이 적지 않다.

모기유충의 경우, *Bt*를 이용한 미생물농약이 우수한 살충력을 지니고 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 모기에 의한 피해를 줄이기 위해서 *Bt*와 같이 무공해 미생물 살충제의 응용 및 산업화 연구가 요구된다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

- 다양한 발효기질을 효율적으로 이용할 수 있는 모기유충 방제용 *Bt* 균주의 환경친화적 육종
- *Bt* 균주의 대량배양 조건 탐색
- 산업적 생산을 위한 생산공정 개발
- 개발된 균주의 field 적용 방법 개발 및 다양한 산업적 용도를 개발.
- *Bt* 균의 살충성독소 생산성을 위한 포자형성 제어기술 수립
- *Bti* 제의 현장적용을 위한 다양한 *Bti* 제형 구성 및 이를 이용한 현장 적용시험
- 위생해충 제어용 *Bt* 미생물제 제품 1건 개발

IV. 연구개발결과

- 여러 가지 배지를 사용하여 *Bt* 균의 대량배양 실험을 한 결과 Arcas 배지에서 가장

높은 수준의 성장 및 포자 형성률을 보였다.

- 모기유충에 탁월한 살충효과가 있는 *Bti* 균주의 용혈활성을 제거함으로써 환경에 대한 안전성이 확보되었으며 축산분뇨 및 습지 등에서의 모기서식을 감소시킬 수 있기 때문에 위생해충 제어 시장에서 강력한 경쟁력을 가질 수 있을 것으로 사료된다.
- 고온성 catabolite repression 내성 균주를 제조하여 1차 발효를 실시함으로써 고농도의 탄소원을 포함하는 표준화기질을 얻는데 성공하였다. 또한 상기 표준화 기질을 이용하여 고농도의 *Bt*를 회수하는데 성공하였다.
- 급여된 *Bt*는 90% 이상이 돼지의 장을 통과하는 동안 생존하여 분변을 통해 배출되었고 배출된 *Bt*는 모기 유충에 대해 살충력을 나타냄을 확인하였다.
- 모기 유충의 섭식 메카니즘에 부합하기 위하여 약제처리 후 수표면에 부상하여 확산할 수 있는 여러 조합의 유제형태로 제제화 시도하였다.
- 제제화 후 모기 유충을 이용한 활성 검정과 수표면 부상 물리적 특성을 고려하여 최종 제제화 제품 구성 및 개발된 제형을 이용하여 현장 실험하였다.
- *Bt* subsp. *finitimus* 균, *Bt* subsp. *kurstaki* 균 및 *Bt* subsp. *israelensis* 균에서 포자 형성을 조절하는 유전자를 새로이 발견하여 특성을 밝혔으며, 이 유전자의 발현조절을 통하여 포자형성율과 *Bt* 생산성을 효율적으로 높일 수 있음을 확인하였다.
- 국내 현실에 적합한 위생해충 제어용 *Bti* 제형의 선정 및 시제품 제작하였다 (Spec.: 수면부상성제제, 700 IU/mg).
- *Bacillus subtilis* 유래의 cellulase를 *Bti*의 *cytA* 유전자 중간에 도입함으로써 *Bti* 균주에 cellulase의 활성을 강화시킴과 동시에 CytA 독소단백질 생성을 억제하는 균주를 제작하였다.
- 전체 게놈의 95% 정도를 해독 완료하였는데 *Bt* 균이 생산하는 다양한 독소단백질, 효소, 2차 대사산물 등을 생산하는 유전자를 확인하였고 genome 분석 중 cryptic 하게 존재하고 있는 새로운 신호물질 분해 유전자를 발견하여 대장균에 발현시키고, 재조합 대장균을 이용한 실험에서 무름병을 억제할 수 있어 살충제로서의 기능뿐만 아니라 살균제로서의 개발가능성을 확인하였다.

V. 연구개발결과의 활용계획

최근 모기에 의한 질병이 계속 증가 추세에 있는데 이로 인한 사회적 비용도 큰 폭으

로 증가하고 있다. 모기방제를 위해 현재 화학농약이 쓰이고 있는데 일반적인 화학농약은 모기뿐만 아니라 다른 어류 및 사람에게도 해롭기 때문에 무분별한 사용은 생태계에 미치는 영향이 적지 않다. 따라서 생태계에 안전한 *Bt* 살충제의 확대보급으로 인해 국민경제 및 생태계 복원에 들어가는 국가적 비용을 감소시킬 수 있다. 본 연구의 결과로 나온 모기유충 방제용 *Bt* 균, 대량 배양 기술 및 제제화 기술을 활용하여 국내 위생해충 제어 시장에 진출하며 이것은 지속적인 증가추세에 있는 *Bt* 수입제품의 대체효과를 기대할 수 있다.

따라서 본 연구성과를 바탕으로 국내 생물농약 시장의 활성화와 수입대체 효과를 획득하며 나아가 브라질, 중국, 동남아 등의 시장에 진출할 수 있는 계기를 만들고자 한다.

S U M M A R Y

Bacillus thuringiensis is a Gram-positive spore-forming bacterium characterized by producing a parasporal crystal, which consists of proteins, during the stationary phase of its growth cycle. The insecticidal activity of *B. thuringiensis* was attributed largely or completely (depending on the insect) to the parasporal crystals. This observation led to the development of bioinsecticides based on *B. thuringiensis* for the control of certain insect species among the orders Lepidoptera, Diptera, and Coleoptera. The mode of action of the *B. thuringiensis* Cry proteins involves several steps such as solubilization of the crystal in the insect midgut, proteolytic processing of the protoxin, binding of the Cry toxin to midgut receptors, and insertion of the toxin into the apical membrane to create ion channels or pores. There are more recent reports of *B. thuringiensis* isolates active against other insect orders (Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera, and Mallophaga) and against nematodes, mites, and protozoa. *B. thuringiensis* is already a useful alternative or supplement to synthetic chemical pesticide application in commercial agriculture, forest management, and mosquito control. It is also a key source of genes for transgenic expression to provide pest resistance in plants. To date, many insecticidal crystal protein (*cry*) genes have been isolated from *B. thuringiensis*. In 1998, Crickmore et al. proposed a nomenclature system according to their degree of evolutionary divergence as estimated by phylogenetic tree algorithms. They have been classified *cry1* to *cry32* and *cyt* by degree of amino acid sequence homology. *B. thuringiensis* is now the most widely used biologically produced pest control agent. In 1995, worldwide sales of *B. thuringiensis* were projected at \$90 million, representing about 2% of the total global insecticide market. It was reported that the annual worldwide distribution of *B. thuringiensis* amounts to 2.3×10^6 kg. As of early 1998, there were nearly 200 registered *B. thuringiensis* products in the United States. While the use of biological pesticides in agriculture remains significantly behind that of synthetic chemical pesticides, several environmental and safety considerations favor the future

development of *B. thuringiensis*. Cry proteins that have been studied thus far are not pathogenic to mammals, birds, amphibians, or reptiles, but are very specific to the groups of insects and invertebrate pests against which they have activity. Cry-based pesticides generally have low costs for development and registration. *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, for example, had a development cost estimated at 1/40 that of a comparable novel synthetic chemical pesticide. Finally, the mode of action for the Cry proteins differs completely from the modes of action of known synthetic chemical pesticides, making Cry proteins key components of integrated pest management strategies aimed at preserving natural enemies of pests and managing insect resistance. Mosquito-borne diseases affect millions of people worldwide each year. Some species of mosquitoes can transmit diseases such as encephalitis, dengue fever, and malaria to humans, and a variety of diseases to wildlife and domestic animals. Many countries have used chemical pesticides to combat mosquitoes and the public health hazards they present. However, the chemical pesticide is not effective to mosquito control and not favorable to ecosystem. Since *Bt israelensis* is highly effective against mosquito larvae and favorable to ecosystem, biological control using *Bt* pesticide is recommended. *Bt israelensis* produces a parasporal crystal composing Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa and Cyt1Aa. Whereas Cry4Aa, Cry4Ba and Cry11Aa have high host specificity, the Cyt1Aa has not. Cyt1Aa is a potential hazardous toxin because of its hemolytic activity. We constructed a *Bt israelensis* strain having *cyt1Aa* deletion. This strain may use a biological pesticide with environmental safety. Most of the crystal protein genes in *B. thuringiensis* are transcribed at the sporulation stage because their promoters have consensus sequences recognized by RNA polymerases containing sporulation-specific sigma factors, σ^{35} and σ^{28} , that share homology with σ^E and σ^K from *B. subtilis*, respectively. Since the expression of crystal protein genes is dependent on sporulation process, the sporulation frequency of *B. thuringiensis* cells is an important factor for the production of *B. thuringiensis* crystal protein. That is, the enhancement of sporulation efficiency causes the increased production of crystal protein in *B. thuringiensis*. Among the Gram-positive

bacteria, *B. subtilis* of which genome is completely sequenced is well known its sporulation process. *B. subtilis* sense and respond to their environment by two-component signal transduction system composing sensor histidine kinase and response regulator. Sensor kinase autophosphorylates at a conserved histidine residue in response to the signal. The phosphorylated histidine kinase catalyzes the transfer of the phosphate to an aspartyl of the response regulator. The phosphorylated response regulator is a transcription factor governing the initiation of sporulation or competence. Response regulator aspartyl-phosphate (Rap) phosphatase modulates the sporulation and/or competence by detaching the phosphate from the phosphorylated response regulator. The activity of Rap phosphatase is inhibited by a peptide comprising the last five amino acids at the C-terminal end of the Phr protein encoded by a small gene translationally coupled with rap gene. However the regulation of sporulation such as Rap/Phr system has never found in any other spore-forming Gram-positive bacteria. In this study, a pair of genes, *orf50fin* and *orf4fin*, involving sporulation regulation in *B. thuringiensis* was identified and characterized. A comparison of the deduced amino acid sequence of the Orf50fin with those of proteins in the GenBank database using the BLAST network service also shows significant similarity to the Rap phosphatases of *B. subtilis*. The phr-like sequence (*orf4fin*) coding for a 43-amino-acid protein was also found in the C-terminus of *orf50fin* with translationally coupled. The roles of Orf50fin and Orf4fin on sporulation of *B. thuringiensis* cells containing plasmid pBP58 or pBP59 or pBP60 were investigated. Plasmids pBP58, pBP59 and pBP60, which exist multicopy in *Bacillus* cells, contain both *orf50fin* and *orf4fin*, and *orf50fin* only, and *orf4fin* only, respectively. The sporulation efficiency of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* cells containing pBP58 was similar with wild type cells. The cells harboring plasmid pBP59 showed sporulation deficiency, whereas the cells containing plasmid pBP60 showed significantly increased sporulation efficiency. The similar results were obtained in *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. These results revealed that the Orf50fin and Orf4fin exerted negative and positive effects on sporulation of *B. thuringiensis*, respectively.

The Orf4fin closely resembles Phr protein, a secretory protein, by presence of a positively charged amino terminus, a hydrophobic amino-terminal domain and a hydrophilic carboxy-terminal domain with a potential signal peptidase cleavage site separating the two domains. To study whether the secretory proteins or peptides from *B. thuringiensis* cells regulates intracellular Orf50fin activity, we tested the complementation of sporulation deficiency in *B. thuringiensis* cells containing pBP59 by growth in sterilized culture supernatants of wild type cells or cells containing plasmid pBP60. The culture supernatants of wild type cells or cells containing plasmid pBP60 restored the capability of sporulation of *B. thuringiensis* cells containing plasmid pBP59. This result revealed that the secretory components suppressed intracellular Orf50fin activity, and the components might derive from Orf4fin. To confirm that the secretory derivatives of Orf4fin regulate the Orf50fin activity, the chemically synthesized peptide composing C-terminus 19 amino acids of Orf4fin was added in culture supernatants of *B. thuringiensis* cells containing plasmid pBP59. The result showed that the chemically synthesized Orf4fin derivative suppressed the sporulation deficiency caused by intracellular Orf50fin activity. Thus, it was speculated that the secretory derivative of Orf4fin might re-enter into the cells and inhibit the Orf50fin activity like mode of action of Phr. *orf50fin*-like genes are widely distributed in *B. thuringiensis* strains suggested from the data of Southern hybridization. Among them, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1 and subsp. *israelensis* strains are most widely used as biological control agents. The importance of these two strains in industrial field led us to clone genes for regulation of sporulation. The sequence analysis of *orf50isr* was revealed that it encodes a 424-amino-acids protein having a predicted molecular weight of 50.34 kDa. A comparison of the deduced amino acid sequence of the Orf50isr with those of Orf50fin revealed that the Orf50isr protein was 79.5% identical to that of Orf50fin. A small open reading frame (*orf4isr*) encoding a 43-amino-acids protein was found downstream of *orf50isr*. The deduced amino acid sequence of Orf4isr was 39.5% identical to that of Orf4fin. Like Orf4fin, Orf4isr is also considered as a secretory protein. The *orf50kur* encodes a 424-amino-acids

protein having a predicted molecular weight of 51.06 kDa. A comparison of the deduced amino acid sequence of the Orf50kur with those of Orf50fin and Orf50isr revealed that the Orf50kur protein was 67.1% and 68.6% identical to those of Orf50fin and Orf50isr, respectively. Interestingly, the amino acid sequence of Orf50kur was 96.2% identical to that of PreL of *Lactobacillus* sp. A small open reading frame (*orf4kur*) located downstream of *orf50kur* is also considered as a secretory protein, by presence of a positively charged amino terminus, a hydrophobic amino-terminal domain and a hydrophilic carboxy-terminal domain with a potential signal peptidase cleavage site separating the two domains. However, Orf4kur has different character from Orf4fin or Orf4isr. Orf4kur encodes an 84-amino-acids protein that is larger than Orf4fin or Orf4isr. Comparison of Orf4kur with other proteins showed that the deduced amino acid sequence of Orf4kur is 91.8% identical to that of a protein (Orf9) encoded by a gene located downstream of *preL* of *Lactobacillus* sp. The *orf50kur-orf4kur* structure is closed resembled to *preL-orf9*. These results indicate that, at least, two types of regulators for sporulation exist in *B. thuringiensis* strains.

Similar structure of *orf50fin-orf4fin* was surveyed in the *orf50fin* homologous genes, *preL*, *nprA* and *B. anthracis orfX*. Interestingly, all three genes contain the *phr*-like sequences at C-terminus of each gene although *B. stearothermophilus orf5* and *B. anthracis orfY* are not translationally coupled with their partners. Like Orf4fin, the Orf9, Orf5 and OrfY also possesses the typical characteristics of Phr protein. This fact suggests that other Orf50fin-homologous protein also might function similarly with Orf50fin. Homologs of the *B. subtilis* Rap phosphatases have been also identified in *Clostridium acetobutlicum*. Therefore the regulatory system via Rap phosphatase and Phr may be a general concept in Gram-positive bacteria. Since the expression of crystal protein genes is closely related with the sporulation process, the enhancement of sporulation efficiency may be favorable for the industrial production of *B. thuringiensis* crystal proteins. Thus, the application of *orf50* and *orf4* genes in industry will be of benefit that they may increase the productivity of *B. thuringiensis* product by controlling sporulation efficiency.

Despite many efforts to reuse of food wastes, most case has been restricted to use as compost or animal feed. We have developed a novel cost-effective method using two-stage fermentation system to produce valuable products from food waste. As amylase and cellulase were key enzymes for degrading food wastes, we isolated *Bacillus thermoglucosidasius* (EFB 3) producing the enzymes from food wastes. And this strain was mutated by NTG and UV for resistance against glucose catabolite repression. The phenomenon, catabolite repression, is widespread system in microorganisms, whereby the presence of a rapidly metabolizable carbon source in the growth medium inhibits the synthesis of catabolic enzymes for other carbon source.

The primary fermentation step using the catabolite repression insensitive mutant of thermophilic *Bacillus thermoglucosidasius*, producing amylase, protease and cellulase, was designed for preparation of glucose-rich standardized substrate for bacterial cultivation. In the secondary fermentation, the useful microorganisms were cultivated in the supernatant from the primary step. The growth rate of *B. thuringiensis* was higher than in case of cultivation in the rich media such as Potato dextrose broth, MRS broth and Nutrient broth. The primary fermentation of food waste at 55°C for 24h resulted in the reduction of initial solid content of 7% to 2.5%, and increasing of glucose concentration from 5g/l to 8g/l. For scale-up of the bioconversion system, we also pretreated food wastes by heat shock (80°C for 5min) instead of autoclave (121°C for 15min) and condition for primary fermentation was optimized. The optimal temperature, fermentation time and maximum solid content of food wastes were 55°C, 24 hours and 8% (w/v), respectively. In secondary fermentation for cultivation of Bt, optimal C/N ratio was 40. In fed batch bioconversion system having biofilter for removal of unpleasure odor, products of 90% from primary fermentation was used standardized substrate for secondary fermentation for Bt, and the rest of products was used as seed culture for consecutive fermentation. And this system was compared with anaerobic digestion system. Digestion ratio of solid content and cell number of BtgMu series in this system were 40% (w/w) and 1.5×10^7 CFU/ml till sixth batch, respectively. Our results revealed that the products from the primary fermentation of

food waste could be used as a medium for the cultivation of useful microorganisms such as Bt, and this novel method could be a powerful tool for bioconversion of organic wastes including food wastes to valuable microbial products.

Gram-negative bacteria can communicate with each other by *N*-acyl homoserine lactones (AHLs), quorum-sensing autoinducers. Recently, the *aiiA* gene encoding an enzyme catalyzing the degradation of AHL has been cloned from *Bacillus* sp. 240B1. From the ongoing *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* genome project, an *aiiA* homologue gene in the genome sequence was found. These results led to consideration of the possibility of the widespread existence of the gene in *B. thuringiensis*. *aiiA* homologue genes were found in 16 subspecies of *B. thuringiensis*, and their sequences were determined. Comparison of the *Bacillus* sp. 240B1 *aiiA* gene with the *B. thuringiensis* *aiiA* homologue genes showed high homologies of 89.95% and 90.96% in the nucleotide sequence and deduced amino acid sequence, respectively. Among the subspecies of *B. thuringiensis* having an *aiiA* gene, *aizawai*, *galleriae*, *kurstaki*, *kyushuensis*, *ostrinae*, and *subtoxicus* were shown to degrade AHL. It was observed that recombinant *E. coli* producing AiiA proteins also had AHL-degrading activity, and could also attenuate the plant-pathogenicity of *Erwinia carotovora*. These results indicate that insecticidal *B. thuringiensis* strains might have potential to compete with gram-negative bacteria in natural ecosystems by autoinducer-degrading activity. The distribution of *aiiA*-homologous genes in the insecticidal *B. thuringiensis* is reported, and the possibility of biological control of plant-pathogenic bacteria by *B. thuringiensis* is discussed.

C O N T E N T S

Chapter 1. Introduction	17
Chapter 2. Current R&D status	19
Chapter 3. Result and discussion	21
Section 1. Construction of non-hemolytic <i>Bti</i> strain	21
1. Background	21
2. Methods	21
3. Result and discussion	23
(1) Construction of recombinant plasmid for the destruction of <i>cytA</i> gene	24
(2) Construction of recombinant <i>Bti</i> strain	24
(3) Confirmation of recombinant <i>Bti</i> strain	25
(4) Survival rate of <i>Bti</i> strain in the feces after feeding swine	26
Section 2. Cloning of genes involved in spore forming and control of spore forming in <i>Bt</i> strain	28
1. Background	28
2. Methods	28
3. Result and discussion	29
(1) Cloning of genes involved in spore forming and analysis of genes structure	29
(2) Effect of Orf50fin and Orf4fin on the spore formation of <i>Bt</i> strain	32
(3) Effect of secreted Orf50fin on the spore formation	35
(4) Distribution of Orf50fin gene and cloning and analysis of <i>orf50</i> and <i>orf4</i> genes <i>Bt israelensis</i> and <i>Bt kurstaki</i>	36
Section 3. Development of bioconversion system by reutilizing of food waste for the production of <i>Bti</i> strain	43
1. Background	43
2. Methods	44
3. Result and discussion	49
(1) Optimization of pre-treatment process	49
(2) Optimization of primary fermentation	52
(3) Optimization of secondary fermentation	59

(4) Optimization for design of plant	61
(5) Design of plant	72
Section 4. Development for the <i>Bti</i> fomulation for the field application	76
1. Background	76
2. Methods	76
3. Result and discussion	78
(1) <i>Bti</i> fomulation for the field application	78
(2) Bio-test of <i>Bti</i> spore	80
Section 5. Analysis of <i>Bt</i> genome and gene encoding acyl-homoserine lactone degrading enzyme	82
1. Background	82
2. Methods	84
3. Result and discussion	86
(1) Analysis of <i>Bt</i> genome	86
(2) <i>aiiA</i> gene in <i>Bt</i> strain	87
(3) AHL degrading activity of <i>Bt</i> strain	90
(4) Construction of <i>AiiA</i> over-producing recombinant <i>E. coli</i>	91
(5) Attenuation of plant pathogenicity by <i>E. coli</i> harboring <i>aiiA</i> gene	92
Chapter 4. Achievement	94
Chapter 5. Application plan	97
Chapter 6. R&D trend	99
Chapter 7. Reference	104

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	17
제 2 장 국내외 기술개발 현황	19
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	21
제 1 절 용혈활성이 제거된 Bti 균주의 개발	21
1. 연구배경	21
2. 실험방법	21
3. 연구수행결과 및 고찰	23
(1) <i>cytA</i> 유전자 결실을 위한 재조합 플라스미드의 제작	24
(2) 재조합 Bti 균주의 제작	24
(3) 재조합 Bti 균주의 확인	25
(4) 돼지 급여 시 Bti균(포자)의 생존율과 분변의 살충력	26
제 2 절 포자 형성 유전자의 클로닝 및 포자형성 제어	28
1. 연구배경	28
2. 실험방법	28
3. 연구수행결과 및 고찰	29
(1) 포자형성 조절유전자의 클로닝 및 염기서열 분석	29
(2) 바실러스 튜린겐시스 포자형성에 대한 Orf50fin 및 Orf4fin의 영향	32
(3) 분비된 Orf4fin이 포자형성에 미치는 영향	35
(4) Bt 균주 내에서 Orf50fin의 분포 및 <i>Bt israelensis</i> 와 <i>Bt kurstaki</i> 에서의 <i>orf50</i> 및 <i>orf4</i> 유전자의 cloning 및 염기서열 분석	36
제 3 절 음식물 쓰레기를 이용한 Bti 균주 생산공정 개발	43
1. 연구배경	43
2. 실험방법	44
3. 연구수행결과 및 고찰	49
(1) 음식물찌꺼기의 발효 기질화 연구	49
(2) 음식물찌꺼기의 발효 기질화를 위한 내열성효소 고 생산균주 탐색 및 응용	52
(3) 2단계 발효인 Bt의 발효생산연구	59
(4) 플랜트 설계 개발을 위한 공정 최적화	61

(5) 플랜트 설계	72
제 4 절 Bti 제제화	76
1. 연구배경	76
2. 실험방법	76
3. 연구수행결과 및 고찰	78
(1) 제제 연구 결과	78
(2) 생물 검정 결과	80
제 5 절 Bt 게놈 분석 및 신호전달 물질 분해 효소 유전자	82
1. 연구배경	82
2. 실험방법	84
3. 연구수행결과 및 고찰	86
(1) Bt genome 분석	86
(2) Bt균에서 aii A 유전자의 존재확인 및 단백질 아미노산서열 결정	87
(3) Bt 균주의 AHL분해능	90
(4) AiiA 과잉발현하는 재조합 대장균의 제조와 AHL분해능	91
(5) 해충방제용 <i>Bacillus</i> 속 미생물의 그람음성 미생물의 병원성 감쇠	92
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	94
제 5 장 연구개발 결과의 활용계획	97
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	99
제 7 장 참고 문헌	104

제 1 장 연구개발과제의 개요

가. 기술적 측면

환경 및 생태계보호뿐만 아니라 생산자와 소비자를 포함한 국민건강을 위하여 기존 화학농약을 대체할 수 있는 무공해 생물농약의 개발이 절실히 요청된다. 국내 생물농약 산업의 독립성과 지속적 성장을 위하여 외국기업 제품과 경쟁할 수 있는 차별화된 제품을 개발해야 하는데, 이를 위해 살충성이 우수하거나 살충범위가 넓어진 새로운 BT 산업 균주의 개발이 선행되어야 한다. Bt는 아포를 형성하는 그람 양성균으로 아포 형성과 함께 특정 곤충에 치사효과가 있는 단백질로 이루어진 내독소를 생성한다. 이 독소단백질은 곤충의 중장내에 있는 단백질 분해효소에 의해 활성화된 후 특정한 수용체에 결합하여 살충작용을 일으키므로 수용체를 가지고 있지 않은 사람이나 동식물 및 어류 등에는 무해한 무공해 농약으로 알려져 있다. 현재까지 많은 수의 Bt 균주가 분리되었는데 그 중 Bti가 모기유충에 탁월한 살충효과가 있는 것으로 알려져 있으며 이 Bti를 이용한 제품이 전 세계적으로 생산되어 널리 쓰이고 있다. Bti는 Cry4A, Cry4B, Cry11A 및 CytA 등으로 구성된 내독소를 형성하는데 이들 독소단백질 각각이 모기유충에 대해 살충활성을 가지고 있다. 그러나 Bti가 생산하는 독소단백질 중 CytA는 다른 독소단백질에 비해 특이성이 적으며 적혈구를 파괴하는 용혈활성을 가지고 있다. 따라서 Bti를 사용함으로써 생기는 부작용에 대한 보고는 아직 없지만 잠재적 위험요소를 가지고 있다. 프랑스의 한 연구팀이 이cytA 유전자의 제거와 관련된 특허를 획득한 바 있는데 (미국특허 제 5736513호 및 5304484호), cytA 유전자 중간에 에리스로마이신 (erythromycin) 항생제 내성 유전자를 삽입하여 CytA의 생성을 차단하였다. 그러나 항생제 내성 유전자를 포함한 미생물을 자연계에 살포하는 것은 예기치 못한 결과를 초래할 수 있기 때문에 이에 대한 규제가 점점 강화되어 가고 있다. 따라서 환경친화적인 Bti 균주의 개량이 요구된다.

나. 경제·산업적 측면

현재 모기 성충의 방역 수단으로 쓰고 있는 것은 살충제를 연무기를 사용하여 공중에 살포하는 것이지만 큰 효과를 기대하기는 힘든 방법이다. 또한 모기 유충의 방제를 위해 미꾸라지 등의 천적을 이용한 방법도 시도되었으나 농약 등 오염이 심한 물에서는 미

꾸라지가 살 수 없어서 실용화되지 못하였다. 따라서 모기로 인한 피해를 최소화 하기 위하여 모기 또는 모기유충에 대한 효과적인 방제수단의 개발이 시급하다. 국내 뿐만 아니라 외국의 경우도 마찬가지로 모기 성충에 대한 특별한 방제수단은 없으며 전염병에 대한 백신접종 등과 같은 소극적인 수단으로 대처하고 있다. 모기유충의 경우, Bt를 이용한 미생물농약이 우수한 살충력을 지니고 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 모기에 의한 피해를 줄이기 위해서 Bt와 같이 무공해 미생물 살충제의 응용 및 산업화 연구가 요구된다.

다. 사회문화적 측면

최근에 들어 국내뿐 만아니라 전세계적으로 모기에 의한 피해가 점점 늘어나고 있다. 모기는 흡혈을 통하여 전염병을 매개하며 모든 곤충 중에서 인류에게 가장 큰 피해를 주는 것으로 알려져 있다. 모기가 매개하는 질병으로는 말라리아, 뎅기열, 일본뇌염, 사상충 및 황열 등이 있다. 특히 말라리아의 경우 전 세계적으로 매년 3.5억명의 새로운 환자가 발생하며 그 중 200만명 정도가 사망하는데 동남아시아, 아프리카 및 중남미 등에서 피해가 크다. 국내에서도 1993년 휴전선 부근에서부터 말라리아 환자가 보고되기 시작하여 1994년에는 21명, 1998년에는 전국적으로 3,300명 이상의 환자가 발생하는 등 점점 피해가 확산되고 있다. 따라서 이와 같은 사회적인 문제를 해결하기 위해 살충성 미생물인 Bt 응용에 관한 연구가 요구된다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

국내에는 *Bt* 연구를 하는 인원이 매우 적는데 생명공학연구소를 제외하고는 서울대, 건국대 등 몇몇 대학에서 *Bt* 연구를 수행하고 있다. 국내의 연구는 주로 *Bt* 균주탐색과 특성분석이 주종을 이루어 왔으며 서울대에서 *Bt* 독소유전자를 이용한 살충성 바이러스 개발, 생명공학연구소의 *Bt*제의 현장적용에 있어서 efficacy를 향상시키기 위한 bioencapsulation 기술의 개발, KAIST의 사과해충 방제를 위한 *Bt*제의 개발 등의 사례가 있다. 국내의 경우 현재 모기 성충의 방역 수단으로 쓰고 있는 것은 살충제를 연무기를 사용하여 공중에 살포하는 것이지만 큰 효과를 기대하기는 힘든 방법이다. 또한 모기 유충의 방제를 위해 미꾸라지 등의 천적을 이용한 방법도 시도되었으나 농약 등 오염이 심한 물에서는 미꾸라지가 살 수 없어서 실용화되지 못하였다. 한편 미생물제제를 이용한 모기방제는 아직 시도된 적이 없다.

국외의 경우 *Bti*는 상업화가 되어서 모기방제에 쓰이고 있으며 *Bt kurstaki* 다음으로 많은 제품이 생산되어 판매되고 있다. 그러나 *Bti*의 제품은 적절한 제제화가 중요한데 그것은 *Bti*는 모기의 유충이 섭식을 해야만 독성을 나타내는데 *Bti*를 살포했을 경우 대부분 짧은 시간 안에 물의 바닥으로 침전이 일어나서 모기유충이 섭식할 시간적 여유가 없게된다. 따라서 적절한 제제화를 통하여 *Bti*제가 물위에 오랫동안 머무를 수 있게 해야 한다. 한편 모기유충의 주요한 먹이가 되는 생물체나 물위에 부상하는 미생물 등에서 모기에 살충효과가 있는 독소단백질 유전자를 발현시켜서 좀 더 효과적인 모기방제를 시도한 적이 있다 (Soltes-Rak E. et al. 1993)(Yap W.H. et al. 1994).

*Bti*는 Cry4A, Cry4B, Cry11A 및 CytA 등으로 구성된 내독소를 형성하는데 이들 독소단백질 각각이 모기유충에 대해 살충활성을 가지고 있다. 그러나 *Bti*가 생산하는 독소단백질 중 CytA는 다른 독소단백질에 비해 특이성이 적으며 적혈구를 파괴하는 용혈활성을 가지고 있다. 따라서 *Bti*를 사용함으로써 생기는 부작용에 대한 보고는 아직 없지만 잠재적 위험요소를 가지고 있다. 프랑스의 한 연구팀이 이 *cytA* 유전자의 제거와 관련된 특허를 획득한 바 있는데 (미국특허 제 5736513호 및 5304484호), *cytA* 유전자 중간에 에리스로마이신 (erythromycin) 항생제 내성 유전자를 삽입하여 CytA의 생성을 차단하였다. 그러나 항생제 내성 유전자를 포함한 미생물을 자연계에 살포하는 것은 예기치 못한 결과를 초래할 수 있기 때문에 이에 대한 규제가 점점 강화되어 가고 있다. 따라서 환경친화적인 *Bti* 균주의 개량이 요구된다.

대부분의 독소단백질 유전자는 세포 주기상 성장 정지기에서 발현이 되는데 그 이유는 독소단백질 유전자의 프로모터가 σ^{35} 및 σ^{28} 를 포함하는 RNA polymerase에 의해 인식되는 부위를 가지고 있기 때문이다. σ^{35} 및 σ^{28} 는 *Bacillus subtilis*의 σ^E 및 σ^K 와 상동성을 가지고 있는데 이 시그마 팩터는 세포 성장 정지기에서 포자형성 과정이 진행되어야만 활성을 갖게 된다 (Baum & Malvar, 1995) (Brown & Whiteley, 1988). 이는 독소단백질의 생산이 포자형성 과정에 의존적이라는 것을 알 수 있는데 포자형성이 잘 될 수록 독소단백질의 생산성은 높아진다. 따라서 *Bt*의 포자형성률을 조절하면 독소단백질의 생산성을 조절할 수 있게 된다.

포자를 형성하는 그람양성 세균 중 전체 게놈 유전자 분석이 완료된 (Kunst et al., 1997) *Bacillus subtilis*에서 포자형성 메커니즘이 잘 알려져 있다. *B. subtilis*는 센서인 histidine kinase와 response regulator로 구성된 two-component signal transduction system에 의해 주위 환경을 인지하고 반응한다. Sensor kinase는 주위 환경을 인지하여 conserved histidine residue에 autophosphorylation 된 후 phosphate를 response regulator에게 전해주게 되는데 phosphorylation된 response regulator는 transcription factor로 작용하여 sporulation이나 competency 등에 영향을 주게 된다 (Grossman, 1995). sporulation의 초기과정을 조절하는 주요 인자로 Rap (response regulator aspartyl-phosphate) phosphatase가 있는데 이것은 response regulator에서 phosphate를 떼어내는 역할을 수행함으로써 sporulation에 억제작용을 하고 있다. 이 Rap phosphatase 활성은 Phr C-말단의 5개 아미노산으로 구성된 작은 펩타이드에 의해 조절받고 있다. *phr* 유전자는 *rap*과 translationally coupled되어 있는데 Phr이 발현되면 세포 외로 분비가 일어난 후 5개의 아미노산으로 구성된 작은 펩타이드로 분해가 일어나고 이것이 다시 세포 내로 들어와 Rap과 반응함으로써 Rap의 활성을 조절하고 있다 (Perego et al., 1996). 그러나 이러한 Rap/Phr에 의한 조절기작이 *B. subtilis*를 제외한 다른 포자형성 그람양성균에서 아직 발견된 적이 없다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절. 용혈활성이 제거된 Bti 균주의 개발

1. 연구배경

*Bti*는 Cry4A, Cry4B, Cry11A 및 CytA 등으로 구성된 내독소를 형성하는데 이들 독소단백질 각각이 모기유충에 대해 살충활성을 가지고 있다. 그러나 *Bti*가 생산하는 독소단백질 중 CytA는 다른 독소단백질에 비해 특이성이 적으며 적혈구를 파괴하는 용혈활성을 가지고 있다. 따라서 *Bti*를 사용함으로써 생기는 부작용에 대한 보고는 아직 없지만 잠재적 위험요소를 가지고 있다. 프랑스의 한 연구팀이 이 *cytA* 유전자의 제거와 관련된 특허를 획득한 바 있는데 (미국특허 제 5736513호 및 5304484호), *cytA* 유전자 중간에 에리스로마이신 (erythromycin) 항생제 내성 유전자를 삽입하여 CytA의 생성을 차단하였다. 그러나 항생제 내성 유전자를 포함한 미생물을 자연계에 살포하는 것은 예기치 못한 결과를 초래할 수 있기 때문에 이에 대한 규제가 점점 강화되어 가고 있다. 따라서 환경친화적인 *Bti* 균주의 개량이 요구된다.

2. 실험 방법

(1) 사용균주 및 배양조건

제한효소, T4 DNA ligase, DIG-High Prime 및 Southern blot을 위한 시약들은 베링거만하임(Boehringer Mannheim)사에서 구입하였으며, 항생제 및 기타 시약들은 Sigma사에서 구입하였다. 본 실험에 사용된 *Bt israelensis*, *kurstaki* 및 *finitimus*는 BGSC(*Bacillus* Genetics Stock Center, Ohio, USA)에서 분양 받아 사용하였으며 DNA 분리를 위해서는 LB 배지를 포자형성을 위해서는 DS 배지 (Shaeffer et al., 1965)를 사용하여 30도에서 배양하였다.

(2) Southern hybridization

Bt 균주의 전체 DNA를 Kalman 등[Kalman et al., 1993]의 방법으로 분리하여 여러가지 제한효소로 절단한 다음, 0.8% agarose gel에 전기영동하였다. 분리된 DNA를 Trans-Vac TE80 vacuum blotter(Hoefler Scientific)을 이용하여 nylon membrane으로 옮

졌다. DNA를 gel에서 membrane으로 옮기는 동안, denaturation 용액(0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl)으로 15분, neutralization 용액(1.0 M Tris-HCl, pH 7.5, 1.5 M NaCl)으로 15분, 그리고 2×SSC (1×SSC, 0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate)로 15분간 처리하였다. Membrane으로 DNA를 옮긴 다음, UV를 3분간 처리하여 DNA를 고정시켰다. 그리고 DNA가 결합된 membrane을 0.02 % SDS와 1.0 % blocking agent(Boehringer Mannheim Biochemicals) 및 0.1% N-lauroylsarcosine이 포함된 5×SSC로 68°C에서 한 시간동안 prehybridization을 실시한 후 하룻밤동안 hybridization을 실시하였다. 이때 사용한 probe DNA는 *Bt* 균주의 전체 DNA를 주형으로 각 독소단백질 유전자 및 중성 단백질분해효소 유전자에 특이적인 프라이머를 사용하여 증폭시킨 PCR 산물을 베링거만하임사의 Dig-High Prime으로 표지한 것이다. Hybridized DNA에 대한 판별은 The DIG System User's Guide for filter Hybridization (Boehringer Mannheim Biochemicals)에 기술된 방법에 따랐다.

(3) Colony hybridization

제조합 플라스미드로 형질전환된 *E. coli*를 nylon membrane으로 옮긴 후 0.1% SDS가 포함된 denaturation 용액, neutralization용액 및 2X SSC 용액을 각각 15분씩 처리하고 UV를 사용하여 DNA를 고정시킨 다음 0.1% SDS가 포함된 3×SSC에서 1시간동안 반응시켜 세포의 잔해를 제거하였다. 다음에 68°C에서 1시간 동안 prehybridization을 실시하고 probe DNA가 포함된 prehybridization 용액에 담구어 68°C에서 하룻밤동안 hybridization시켰다. 이 후의 과정은 Southern blotting과 동일하게 실시하였다.

(4) 형질전환

형질전환을 위한 *Bt* subsp. *israelensis* 균주는 Kalman 등의 방법[Kalman, 1995]에 근거하여 다음과 같이 준비하였다. *Bt* subsp. *israelensis* 균주를 BHIS(brain heart infusion plus 0.5 M sucrose)에 접종하여 600 nm의 파장에서 흡광도 0.2가 될 때까지 30°C에서 진탕배양하였다. 원심분리로 세포를 모아서 동일한 부피의 5 mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine -N'-2-ethane -sulfonic acid [pH 7])-0.5 M sucrose로 한번, 1/10 부피로 두 번 더 씻어 주었다. 마지막으로 1/10부피의 5 mM HEPES-0.5 M sucrose에 녹여 350 μ l를 electroporation에 사용하였다. Electroporation은 1.25 kV와 3 μ

F로 0.2-cm electrode gap cuvette에서 실시하였다. 전기충격을 가한 직후 5ml의 BHIS를 넣고 30℃에서 3시간 동안 배양한 후 항생제가 첨가된 TBAB(tryptose blood agar base) 평판배지에 도말하였다. 이후 항생제 내성 유전자 및 *Bacillus* 이외의 DNA 절편을 제거하기 위하여 항생제가 포함되어 있지 않은 LB 배지에서 24시간 진탕배양한 후 셀룰로오스가 포함된 LB 아가 배지에서 투명환을 형성하는 균주를 선택하였다.

(5) 용혈활성 검정

제조함 *Bti* 균주에서 용혈활성이 제거되었는지 알아보기 위하여 집토끼의 혈액을 이용하여 Majumdar 등의 방법 (Majumdar et al., 1990)으로 용혈활성을 검정하였다.

(6) Sequencing

염기서열 분석을 위한 nested deletion mutant는 exonuclease III를 이용하여 한쪽 방향으로 순차적 절단에 의해 제작하였다 (Henikoff, 1984). Sanger dideoxy-mediate chain termination 방법에 의한 염기서열 분석은 베링거만하임사에서 추천한 방법으로 Dig taq DNA sequencing kit을 사용하여 수행하였다.

(7) 염기서열 분석

염기서열 및 아미노산 서열 분석은 DNASTAR 사의 Lasergene 프로그램을 사용하였으며 분비서열 분석 및 signal peptidase I의 절단부위 예측은 SignalP 프로그램을 사용하였다 (Nielsen et al., 1997).

(8) 돈분내의 Bti monitoring

돈분 1g을 정량하여 9ml의 0.85% saline 용액에 현탁시켰다. 시료를 거즈 두겹을 이용하여 고형물을 걸러낸 후 걸러진 시료 0.5ml을 4.5ml의 tube에 옮겼다. 적당한 단계까지 희석 과정을 반복하고 열처리 하지 않은 시료는 즉시 LB 배지에 도말하고 열처리 시료는 80도에서 15분간 가열한 후 일련의 과정을 반복하였다.

3. 연구수행 결과 및 고찰

(1) *cytA* 유전자 결실을 위한 재조합 플라스미드의 제작

먼저 *cytA* 유전자를 클로닝하기 위하여 *Bti* 균주로부터 DNA를 칼만등의 방법(Appl. Environ. Microbiol. 59, 1131-1137, 1993)으로 분리하고 이를 EcoRV와 EcoRI 제한효소로 절단한 후 *cytA* 유전자에 특이적으로 결합하는 프로브를 사용하여 사우던 하이브리다이제이션(Southern hybridization)을 수행하여 약 2.5kb 정도의 시그널을 확인하였다. 이때 사용한 프로브는 *cytA* 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머를 사용하여 *Bti*의 DNA로부터 연쇄효소 중합반응(polymerase chain reaction)으로 유전자의 일부를 증폭하고 이를 다시 디그 DNA 라벨링 키트(DIG-DNA labeling Kit, 베링거 만하임 사)를 이용하여 라벨링한 후 사용하였다. 따라서 EcoRV와 EcoRI으로 절단된 *Bti*의 DNA를 플라스미드 pUC19의 SmaI 및 EcoRI 위치에 각각 연결시킨 후 대장균에 형질전환하였다. 형질전환된 대장균으로부터 원하는 유전자는 콜로니 하이브리다이제이션(Colony hybridization) (The DIG System User's Guide for Filter Hybridization, Boehringer Mannheim Biochemica, 40-43, 1993)을 통하여 탐색하였으며 이때 사용한 프로브는 상기의 사우던 하이브리다이제이션에서 사용한 프로브와 동일한 것이다. 이렇게 클로닝된 플라스미드를 다시 XbaI과 EcoRI으로 절단한 후 플라스미드 pDIA5304의 동일한 위치에 삽입하였다. 이를 다시 PstI으로 절단한 후 플라스미드 pBS1 (Park et al., 1991)으로부터 온 셀룰로오즈 분해효소를 포함한 DNA 절편을 삽입하였다. 이렇게 최종적으로 만들어진 플라스미드 pSK80은 *cytA* 유전자 내에 셀룰라아제 유전자가 삽입되어 있어 정상적인 CytA 단백질 형성이 불가능하다.

(2) 재조합 *Bti* 균주의 제작

플라스미드 pSK80을 Kalman 등의 방법(Appl. Environ. Microbiol. 1995. 61:3063-3065)으로 *Bti* 균주에 형질전환 시켰다. 플라스미드 pSK80은 바실러스 유래의 복제기원이 없기 때문에 클로로암페니콜이 포함된 배지에서 *Bti*의 염색체 내로 삽입된 것만 자랄 수 있게 된다. 다음으로 항생제 내성 유전자와 바실러스 이외에서 유래한 DNA 절편을 제거하기 위하여 pSK80이 도입된 *Bti* 균주를 클로로암페니콜이 포함되지 않은 LB 배지에서 90 세대 동안 배양하였다. 이때 pSK80이 도입된 *Bti* 균주 내에서 자연적으로 DNA의 재배열이 일어나게 되는데 클로로암페니콜이 포함된 배지에서는 자라지 못하면서 셀룰로오즈 분해활성은 가지고 있는 균주를 탐색한 결과 본 발명의 재조합 *Bti* 균주

(*cytA*::cellulase)인 BSK69를 제작 완료하였다 (Fig.1).

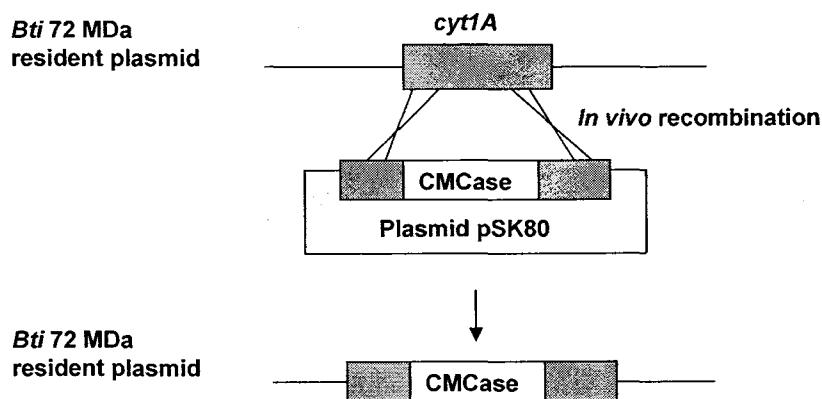


Fig. 1. Construction of non-hemolytic Bti

(3) 재조합 *Bti* 균주의 확인

완성된 BSK69를 확인하기 위하여 먼저 서든 하이브리다이제이션을 수행하였다. BSK69의 DNA를 *EcoRV*+*Bgl*III, *EcoRV*+*EcoRI* 및 *EcoRV*+*Hind*III로 절단 했을때 각각 4.6, 3.0 및 4.1 kb의 DNA 절편이 시그널로 나타나는 것으로 보아 *cytA* 유전자 중간에 셀룰라아제 유전자가 삽입되어 있음을 알 수 있다. *Bti*와 BSK69를 MGYS 배지 ((NH₄)₂SO₄ 2g, yeast extract 2g, K₂HPO₄ 3.3g, Sodium citrate 1g, glucose 1g, MnSO₄.H₂O 0.05g, CaCL₂ 0.08g, MgSO₄.7H₂O 0.41g, pH7.5)에서 배양하여 단백질 전기영동을 실시한 결과 BSK69에서 27Kd의 CytA 독소단백질 밴드가 보이지 않는 것으로 보아 BSK69에서는 CytA가 생성되지 않음을 알 수 있었다 (Fig. 2.).

*Bti*와 BSK69를 CMC를 포함한 LB 고체배지에서 배양했을 때 BSK69에서만 CMC 분해활성환을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3). 이는 *Bti*에 비해 BSK69에서 셀룰로오즈 분해 활성이 부가되었음을 의미한다. BSK69에서 용혈활성이 제거되었는지 알아보기 위하여 집토끼의 혈액을 이용하여 Majumdar 등의 방법 (J. Appl. Bacteriol. 1990, 69: 241-246)

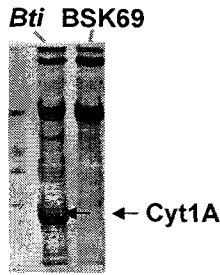


Fig. 2. SDS-PAGE analysis of Bti and BSK69



Fig. 3. CMCCase activity of Bti and BSK69

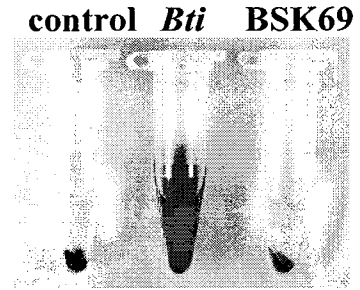


Fig. 4. Hemolysis assay Of Bti and BSK69

으로 용혈활성을 검정한 결과 *Bti*에서는 적혈구가 파괴되어 용액이 붉은색을 띠는데 반하여 BSK69에서는 용혈활성이 없어졌음을 확인하였다 (Fig. 4). 이렇게 완성된 BSK69 균주는 여전히 모기유충에 대해 우수한 살충활성을 지니고 있음이 확인되었다 (table 2).

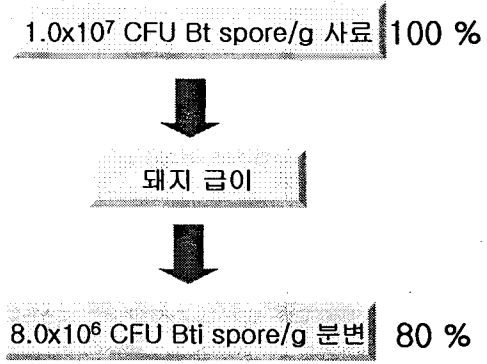
Table 2. Characterization of Bti and BSK69

Strain	Mosquitocidal activity	CMCase activity	Hemolysis activity
<i>Bti</i>	+	-	+
BSK69	+	+	-

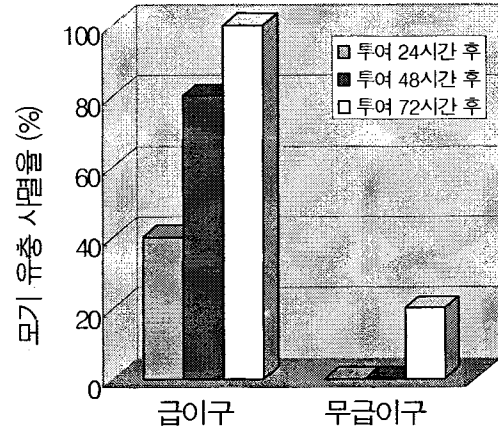
(4) 돼지 급여 시 *Bti*균(포자)의 생존율과 분변의 살충력

사료 g당 *Bti* 포자를 10^7 CFU가 되도록 돼지에 급여한 후 분변내의 *Bti* 포자 수를 측정한 결과 투여된 포자의 80% 정도가 분변으로 배출 된 것으로 확인되었다. 이러한 분변내의 *Bti* 포자가 모기 유충을 제어할 수 있을 것으로 예상되어 *Bti* 포자가 포함된 돈분과 포함되지 않은 분변을 이용하여 모기 유충에 대한 살충력을 조사하였다. 다음 그림에 나타난 바와 같이 높은 살충력을 보였다. 따라서 본 실험 결과로부터 축산환경내의 모기 방제를 위해 사료 첨가용 미생물로 *Bti* 균주의 사용이 현실성 있는 것으로 판명되었다.

A. 분변에서의 생존율



B. 분변의 모기 유충에 대한 살충력



제 2 절. 포자 형성 유전자의 클로닝 및 포자형성 제어

1. 연구배경

*Bacillus*속 미생물의 포자형성은 인산화를 동반한 신호전달계, 즉 phosphorelay에 의해 조절되어진다. Phosphorelay는 기존에 알려진 two component 신호전달의 좀 더 복잡한 과정으로 이해되고 있다. 5개 kinase들중 하나의 신호감지가 자가 인산화 반응을 일으키고, 이 인산화 잔기가 바로 Spo0F 중간 response regulator에 전달되어, Spo0F~P가 만들어지고, 이 인산화 잔기가 Spo0B phosphotransferase에 의해 Spo0A response regulator 이자 transcription factor에 전달된다. 세포내의 인산화된 Spo0A의 농도가 포자형성을 시작할 지, 아니면 vegetative 성장을 지속할 지를 결정짓는다. Gram 양성균의 대표적인 균주인, *B. subtilis*에서는 두가지의 oligopeptide가 신호물질로 작용하는 것이 알려져 있다. ComX (tryptophan에 isoprenoid가 modified된 decapeptide), Pentapeptide 인 PhrA 와 PhrE가 존재하는 것으로 알려져 있다. ComX는 ComQ의 도움으로 세포밖으로 분비되어, sensor kinase인 ComP에 binding하여 autophosphorylation을 시킨다. Activated ComP~P는 cell 내의 response regulator인 ComA를 phosphorylation시킨다. 결과산물인 ComA~P는 *comS* 유전자를 포함하고 있는 *sf* operon을 activation시켜서 cell competence를 증가시킨다. PhrA의 경우는 분비되어, processing된 후, peptapeptide형태로 cell 내부로 들어와서 RapA (phosphatase)를 inhibition시켜서, ComA~P의 dephosphorylation을 억제하는 역할을 한다. PhrA의 경우를 다른 말로 Competence and sporulation factor (CSF) 라고 한다. 이러한 Rap/Phr에 의한 조절기작이 *B. subtilis*를 제외한 다른 포자형성 그람양성균에서 아직 발견된 적이 없다. 본 연구에서는 Bti 균주의 포자 형성관련 펩타이드의 기능을 규명하여 sporulation 조절을 시도하였다.

2. 실험 방법

(1) Sporulation assay

*Bt*를 클로르암페니콜 (5 ug/ml)이 포함된 LB agar 배지에 도말한 후 30도에서 16시간 배양했다. 세포를 DS 배지를 사용하여 plate로부터 회수한 후 클로르암페니콜 (5 ug/ml)이 포함된 20 ml의 DS 배지에 OD600에서 0.01이 되게 접종하여 30도에서 48시간 동안 진탕배양했다. 배양된 세포는 희석 완충용액 (10mM potassium phosphate buffer(pH7.4), 50 mM KCl, 1mM MgSO4)에 순차

적으로 희석한 후 80도에서 10분간 열처리를 한 것과 하지않은 것을 각각 LB agar 배지에 도말하여 생긴 콜로니 수를 비교하였다.

3. 연구수행 결과 및 고찰

(1) 포자형성 조절유전자의 클로닝 및 염기서열 분석

바실러스 추린젠시스 아종 피니티무스 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *finitimus*) HD3 (이하 Bt HD3)으로부터 포자형성 조절유전자를 클로닝하였다. Bt HD3 균주는 BGSC (*Bacillus* Genetic Stock Center, Ohio, USA)로부터 얻었다. 먼저 Bt HD3의 DNA를 칼만 등의 방법 (Kalman et al., 1993)으로 분리한 후 HindIII로 절단하고 이를 0.8% 아가로즈에 전기영동을 하였다. 전기영동이 끝난 후 아가로즈 젤 속에 있는 DNA를 호퍼사 (Hofer Scientific Instruments, USA)의 트랜스백 (TransVac™)을 사용하여 베링거만하임사 (Boehringer Mannheim Biochemicals, Germany)의 양이온성 나일론 멤브레인 (positive charged nylon membrane)으로 옮겼다. 상기 멤브레인은 포자형성 유전자의 인접부위에 특이적으로 결합하는 프로브를 이용하여 사우던하이브리다이제이션 (Southern hybridization)을 실시하였다. 이때 사용된 프로브는 BGSC로부터 얻은 바실러스 추린젠시스 아종 쿠스타키 HD1의 DNA를 상기 칼만 등의 방법으로 분리하여 주형으로 하고 nprA1 (5'-GGA GGG ACA GGC TCT GCG TTT-3')과 nprA2 (5'-AGT ACG CCT TTA CCA GTT CCT-3')를 프라이머로 하여 베링거만하임사 (Boehringer Mannheim Biochemicals, Germany)의 PCR DIG 라벨링 키트를 사용하여 라벨링하였다. 사우던하이브리다이제이션 결과 3.4 kb의 HindIII 절편에서 시그널이 보였으므로 상기 HindIII 절편을 베링거만하임사의 DIG 뉴클라익산 (nucleic acid) 디텍션 키트를 사용하여 키트에 첨부된 방법에 따라 콜로니하이브리다이제이션 (colony hybridization)을 수행하였다.

이를 위해 먼저 Bt HD3의 DNA를 HindIII로 절단하고 2-5 kb의 DNA 절편을 아가로즈젤로부터 분리하여 플라스미드 pUC19의 동일부위에 클로닝하였다. 계속해서 클로닝된 플라스미드를 대장균에 도입한 후 콜로니하이브리다이제이션으로 포자형성 조절유전자 *orf50fin* 및 *orf4fin*를 포함한 콜로니를 분리하였고 이로부터 *orf50fin* 및 *orf4fin*를 포함한 플라스미드 pBP1을 분리하였다.

분리된 플라스미드의 *orf50fin* 및 *orf4fin*를 포함한 3.4 kb DNA 절편은 프로메가사 (Promega Co. USA)의 Erase-a-Base System을 사용하여 여러가지 길이의 DNA 절편을

얻은 후 베링거만하임사의 디그텍 DNA 시퀀싱 키트 (DIG taq DNA sequencing kit)를 사용하여 첨부된 방법에 따라 염기서열을 분석하였다 (Fig. 5).

```

aagctttcgaagtataaatcaaacaccgagcggcgattgtgaataccatctttccaatatgtataagccatattaattt 80
gatataaatctgtatgtaaggcatagctatcgtctttataataagtcacgcgaaaacacctccataatttggttatagt 160
ataccaatttttcaccgcttgtagcaagaatggatgatgaaggtgtagtcagaggggaaaaaaatgaataatgcatatt 240
ttttagaaaattaacatttatcaattttatattctcaagattttatgtattattagagt-35aatgggggtaaatgagaatgg 320
      M Q Q T L E K I G K Q V F Y K R L Q Q K M T Q E
aggaggacaATGCAACAAACATTAGAAAAATAGGCAAACAAGTCTTTTATAAACGGCTACAGCAAAAAATGACACAAGA 400
      E L C Q G I C S V S Y L S K I E N G K I E A S E E I
AGAATTATGTGAGGGCATTGTTCGTCTCATACTTAAGTAAATCGAAAAATGGAAAGATCGAAGCATCAGAAGAGATTC 480
L Q L L C A R L E I A V T D L R D V E E D V K G K L D
TACAATGTCTCGCAGAGATTAGAAATGCCGTGACGGATTTGAGGGATGTAGAAGAAGATGTGAAGGGGAAGCTGGAT 560
E W L N A L I R L E K V Q V E R I Y N E L Q E D M Q H
GAATGGTFAAATGCACTAATCCGTTTGGAGAAGGTGCAAGTTGAACGTATCTATAATGAATGCAAGAGGATATGCAACA 640
      V L D F E I I N Y Y K L L N I R Y L L M K R D L P V
CGTTTTAGATTTTGAATATATAAATTATATAAACTACTTAATATACGTTATTACTGATGAAAAGGGATTGCGCGTAA 720
I A E E L E Q L K K A Y K K F S P F Q K L L Y T Y S R
TTGCAGAAGAATTAGAGCAGCTTAAGAAGGCATATAAGAAATCTCGCCTTTTCAGAAGTTGTTGTATACGTATAGTAGA 800
      G L L C C L Q Y K W K Q G L S Y L L E T E V M A K E L
GGATTATATGCTGTTTACAATATAAGTGGAAACAGGGATTAAGTTATTTATAGAGACAGAGGTTATGGCAAAAGAGTT 880
      G Y H E T G I Y Y N I A L T Y S H L E I Q H L T L H
AGGGTATCATGAGACAGGAATTTATATAATATTGCTCTACTTATAGTCATTTGGAAATCCAACATCTTACGTTACACT 960
F A N I A L E A F R N E Y K F R N V I N C Q I L I A L
TTGCAAAATATGCACTAGAGGCATTAGAAATGAGTATAAAATTCGGAACGTGATAAACTGTCAAATCTTATTGCATTA 1040
S Y A E Q G Q Y E E A L E M Y E S I L R E S E A F A D
AGTTATGCGGAACAAGGGCAATATGAAGAAGCTCTAGAAATGTATGAGACATACTGCGGGAATCAGAGGCTTTTGGCGGA 1120
      K D V L K A I T L S N I G N I Y Y K K K K Y N Q A K
TAAAGACGTTCTAAAAGCTATTACTTTAAGTAATATTGGGAATATACTATAAAAAGAAAAATATAATCAAGCAAAG 1200
D Y Y L E S L Q L Q K Q I D L N Y I D T L Y E M A L A
ATTATTATTAGAGAGTTTACAACCTCAAAAACAAATAGATTTAAATATATAGACACATATATGAAATGGCATTAGCT 1280
      C I K L D Q F E E A R E W I D K G I V A A K R E E R F
TGTATTAATTAGATCAGTTTGAAGAAGCAAGAGAATGGATTGATAAAGTATTGTTGCTGCCAAACGTGAAGAGAGATT 1360
      N T K L Y L L L M L R N K Y F E E A R E Y K Q F L E
TAATACAAAATATATTTACTACTCATGCTTCGAAATAAGTATTTTGAAGAGGCGGAGAGTATAAGCAATTTTGGAAAT 1440
L E A I P F Y K S A G N K I E L K K V Y M E L A E Y F
TAGAAGCTATTCCGTTTATAAATCAGCAGGTAATAAGATAGAACTAAAGAAAGTATATATGGAGCTTGCAGCAACTTT 1520
S K S L N F E Q S N H Y Y K L V I E M L E S Y K E D E
TCTAAATCACTGAACCTTTGAGCAAAGTAATCACTACTATAAGCTAGTTATTGAAATGTTAGAAAGCTATAAGCAGGATGA 1600
      K *
AAAATGAaaaaagcattagctggaatttttagcagttgtagtagtacttacaattgtcgggtggagtacagtatacgagtaa 1680
      M K K A L A G I L A V A V V L T I V G G V Q Y T S K
accagatactttaggattagattctagtgtgcacaaactgtaaatgtgtaattattgaaaaaccctttccaaccggaaa 1760
      P D T Y G L D S S V S Q T V N V *
ggggtttttcaatatttgttccccaaaattctacaaaacttgagaataaattaattgaatttttagtatattaatagtg 1840

```

Fig. 5. Nucleotide sequence of orf50fin and orf4fin, and their deduced amino acid sequences

그 결과 425개의 아미노산으로 구성된 단백질을 코딩하는 *orf50fin* 유전자 뒤에 43개의 아미노산으로 구성된 단백질을 코딩하는 *orf4fin* 유전자가 겹쳐져 있었다. Orf50fin의 아미노산 염기서열을 GenBank database와 비교하면 *Bacillus subtilis*의 Rap phosphatase와 유사성을 보인다 (Table 3).

Table 3. Orf50fin-homologous proteins in *B. subtilis*

Protein	% of	
	Identity	Similarity
RapA	13	35
RapB	15	34
RapC	13	34
RapD	15	38
RapE	15	35
RapF	14	36
RapG	11	30
RapH	15	34
RapI	15	36
RapJ	13	35
RapK	12	31

*B. subtilis*의 Rap phosphatase는 phosphorylated response regulator로부터 인산기를 떼어냄으로써 포자형성을 조절하는 기능을 수행하고 있는데 그 활성화는 *rap* 유전자와 translationally coupled 되어있는 작은 유전자인 *phr*의 C-terminal의 5개 아미노산으로 구성된 펩타이드에 의해 조절받고 있으며 이 Phr은 분비단백질의 특성 즉, N 말단에 양이온성 아미노산과 소수성 도메인을 가지고 있다 (Fig. 6) (Perego, 1998). 본 연구에서 발견된 *orf50fin-orf4fin*의 구조는 이 *rap-phr*의 구조와 유사성을 보인다 (Fig. 7).

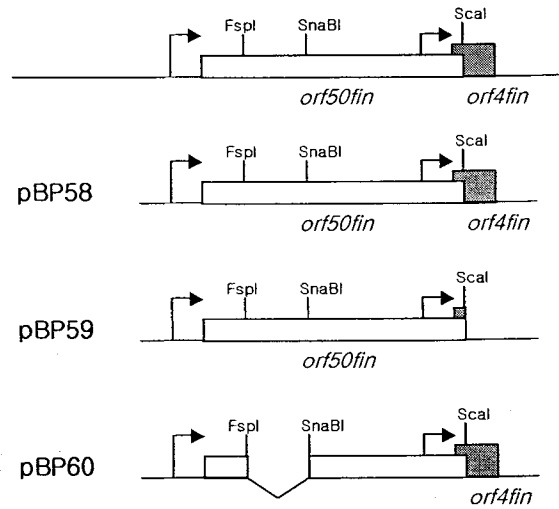


Fig. 8. Construction of plasmid pBP58, pBP59 and pBP60

먼저 pBP58을 제작하기 위하여 플라스미드 pBP1을 주형으로 하고 프라이머 Btact9 (5'-GAA GCT TAT GAG AAT GGA GGA GGA CAA TG-3')과 Btpro1 (5'-AGA GAG CAC ATT TTT AGA ATC C-3')을 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR은 95° C 5분, 95° C 30초, 55° C 30초, 72° C 1분의 조건으로 30 사이클을 수행하였다. 상기 PCR 산물은 프로메가사의 pGemT-easy 벡터에 클로닝한 후 EcoRI과 HindIII로 절단하여 플라스미드 pHPS9 (Haima et al., 1990)의 동일 부위에 클로닝하여 플라스미드 pBP58을 완성하였다. 플라스미드 pBP58은 Scal과 SpeI으로 절단하고 클레나우 (Klenow) 효소로 블러트엔드를 만든 후 다시 리가아제 (ligase)로 결합하여 플라스미드 pBP59를 완성하였다. 한편, 플라스미드 pBP58을 SnaBI과 AviIII로 절단한 후 리가아제 (ligase)로 결합하여 플라스미드 pBP60를 완성하였다. 이 세가지 플라스미드는 *Bt israelensis* 4Q7 및 *Bt kurstaki* 4D11에 형질전환한 후 포자형성률을 조사하였다 (Table 4, 5).

Table 4. Sporulation efficiency of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* strains carrying multicopy plasmids

Plasmid	Insert	Viable cell count	Heat-resistant spore count	% efficiency of sporulation ^a
pHPS9	-	2.8×10^8	1.7×10^8	60.7 (65.8)
pBP58	<i>orf50fin-orf4fin</i>	3.1×10^8	2.0×10^8	64.5 (54.5)
pBP59	<i>orf50fin</i>	1.9×10^8	1.0×10^7	5.3 (3.9)
pBP60	<i>orf4fin</i>	1.8×10^8	1.7×10^8	94.4 (89.3)

^aValues in parentheses refer to percentages of sporulation obtained in an independent experiment.

Table 5. Sporulation efficiency of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* strains carrying multicopy plasmids

Plasmid	Insert	Viable cell count	Heat-resistant spore count	% efficiency of sporulation ^a
pHPS9	-	2.8×10^8	1.7×10^8	60.7 (65.8)
pBP58	<i>orf50fin-orf4fin</i>	4.0×10^8	2.3×10^8	57.5 (77.1)
pBP59	<i>orf50fin</i>	4.5×10^8	4.0×10^7	8.9 (8.7)
pBP60	<i>orf4fin</i>	1.6×10^8	1.3×10^8	79.1 (93.8)

^aValues in parentheses refer to percentages of sporulation obtained in an independent experiment.

그 결과 바실러스 추린젠시스 아종 이스라엘렌시스의 경우, 플라스미드 pBP58 즉, Orf50fin과 Orf4fin 모두를 가지고 있는 세포의 포자형성률은 대조구로 사용한 플라스미드 pHPS9을 가지고 있는 세포의 포자형성률과 비슷한 64.5 %였다. 그러나 플라스미드 pBP59 즉, Orf50fin만 가지고 있는 세포의 포자형성률은 5.3 %로써 포자형성률이 현저히 감소함을 관찰할 수 있는데 이는 Orf50fin이 바실러스 추린젠시스 아종 이스라엘렌시스의 포자형성을 억제하는 기능이 있음을 확인할 수 있었다. 반면 플라스미드 pBP60 즉, Orf4fin만 가지고 있는 세포의 포자형성률은 94.4 %로써 포자형성률이 현저히 증가함을 관찰할 수 있는데 이는 Orf4fin이 바실러스 추린젠시스 아종 이스라엘렌시스의 포자형성을 촉진하는 기능이 있음을 확인할 수 있었다. 바실러스 추린젠시스 아종 쿠스타키의 경우에도 유사한 결과를 얻을 수 있었다.

따라서 Orf50fin 및 Orf4fin은 바실러스 쉼린젠시스 아종 이스라엘렌시스 및 바실러스 쉼린젠시스 아종 쿠스타키 이외의 다른 바실러스 쉼린젠시스 균주도 포자형성을 조절할 수 있다는 것이 예상된다.

(3) 분비된 Orf4fin이 포자형성에 미치는 영향

Orf4fin은 PhrA와 같이 분비단백질의 특성을 보이므로 분비된 Orf4fin이 세포 내의 Orf50fin 활성을 조절하는지 조사해 보았다. 즉 *orf50fin* 만을 포함한 플라스미드 pBP60을 함유하고 있는 Bt 세포를 배양한 후 배양상등액을 제거하고 대신 *orf4fin*을 포함하고 있는 Bt 세포의 배양상등액으로 치환한 다음 포자형성률을 조사하였다 (Table 6).

Table 6. Complementation of sporulation deficiency of BSK180 containing *orf50fin* in multicopy plasmid by culture supernatants of various strains.

Plasmid ^a	Insert	Viable cell count	Heat-resistant spore count	% efficiency of sporulation ^b
pHPS9	-	1.2×10^7	6.0×10^6	50.0 (48.7)
pBP58	<i>orf50fin-orf4fin</i>	1.6×10^7	7.0×10^6	43.8 (38.9)
pBP59	<i>orf50fin</i>	1.6×10^7	0	0.0 (1.8)
pBP60	<i>orf4fin</i>	1.6×10^7	9.0×10^6	56.2 (58.0)

^a Bt cells harboring the multicopy plasmids were grown for 15 hr in DS medium with the addition of chloramphenicol at a concentration of 5 µg/ml at 30°C and centrifuged. The supernatants were filter sterilized and inoculated with BSK180 cells entering the stationary phase. Cultures were further incubated for 30 h at 30°C and tested for spore formation by assaying survival to heat treatment.

^bValues in parentheses refer to percentages of sporulation obtained in an independent experiment.

그 결과 *orf4fin*을 함유한 세포의 배양상등액이 Orf50fin의 활성을 억제한다는 사실을 발견하였고 이는 분비된 Orf4fin이 다시 세포 내로 들어와 Orf50fin의 활성을 조절한다는 것을 의미한다. 이를 다시 검증하기 위하여 Orf4fin의 C 말단 19개 아미노산으로 구성된 펩타이드를 화학적으로 합성한 후 바실러스 쉼린젠시스 4Q7의 배양액에 첨가하여 포자형성이 조절되는지를 조사하였다.

먼저 주식회사 펩트론(한국)에 의뢰하여 "TSKPDTYGLDSSVSQTVNV"의 서열을 갖는 Orf4fin의 C 말단의 19개의 아미노산 펩타이드를 화학적으로 합성하였다. 다음 *orf50fin* 유전자를 포함한 바실러스 쉼린젠시스 4Q7 균주를 DS 배지에서 배양할 때 성장

정지기에 들어선지 30분 후에 상기 펩타이드를 배지에 첨가하여 다시 48시간을 배양한 뒤 포자형성률을 조사하였다 (Fig. 9).

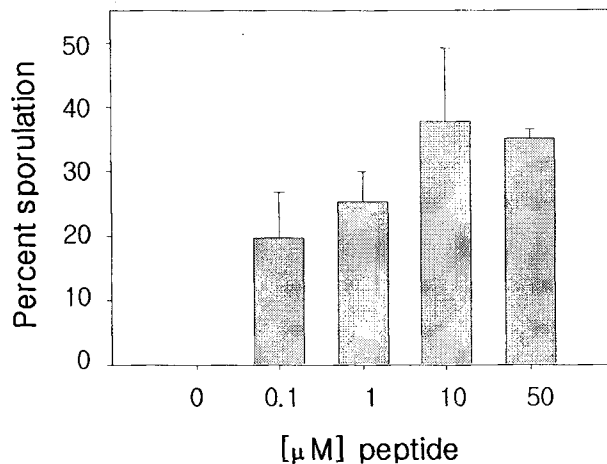


Fig. 9. In vivo complementation of sporulation deficiency of *B. Thuringiensis* cells containing *orf50fin* by chemically synthetic peptide composing C-terminus 19-amino-acids of Orf4fin.

그 결과 Orf4fin를 배양액 중에 첨가하면 *orf50* 유전자를 포함한 바실러스 추린젠시스 균주의 포자형성률이 증가함을 알 수 있다. 이는 Orf4fin 또는 그 일부분을 배양액에 첨가함으로써 바실러스 추린젠시스의 포자형성률을 조절할 수 있고 독소단백질의 생산성 또한 조절할 수 있음을 추측할 수 있다.

(4) *Bt* 균주 내에서 Orf50fin의 분포 및 *Bt israelensis*와 *Bt kurstaki*에서의 *orf50* 및 *orf4* 유전자의 cloning 및 염기서열 분석

*orf50fin*과 유사한 유전자를 *Bt* 균주 내에서 *orf50fin*에 특이적으로 결합하는 probe를 사용하여 Southern hybridization으로 조사하였다. 그 결과 대부분의 *Bt* 균주에서 positive signal을 보였으며 *Bt indiana* 및 *tohokuensis*에서는 signal이 나타나지 않았다. 이것은 상대적으로 낮은 상동성을 가진 유전자가 존재하기 때문이라고 사료된다 (Table 7). 이중 상업적으로 많이 생산되고 있는 *Bt kurstaki* HD1 및 *israelensis*에서 *orf50* 및

orf4 유사 유전자를 클로닝하고 염기서열을 분석하였다. 클로닝에 사용된 프로브 및 방법은 *Bt finitimus*에서 사용된 것과 동일하다. *Bt israelensis*의 경우 424 아미노산을 코딩하는 *orf50isr* 유전자를 확인하였는데 (Fig. 10) *orf50fin*과는 아미노산 서열이 79.5%의 상동성을 가지고 있었다. *orf50fin*과 마찬가지로 *orf50isr* 역시 downstream에 43개의 아미노산으로 구성된 작은 ORF (*orf4isr*)가 발견되었는데 Orf4fin과 Orf4isr은 서로 39.5%의 상동성을 가지고 있었으며 (Fig. 11, A) Orf4isr은 분비단백질의 특성을 가지고 있었다 (Fig. 11, B).

Table 7. Distribution of *orf50fin*-homologous genes in *B. thuringiensis* strains

Subspecies	Southern hybridization	Subspecies	Southern hybridization
<i>kurstaki</i> HD1	+++	<i>morrisoni</i> NRRL4049	+
<i>kurstaki</i> HD73	+	<i>sandiego</i>	++
<i>thuringiensis</i> HD2	+	<i>ostrinae</i> HD501	++
<i>finitimus</i> HD3	++++	<i>tolworthi</i> HD537	++
<i>alesti</i> HD4	+	<i>tolworthi</i> NRRL4050	+
<i>alesti</i> NRRL4041	++	<i>darmstadiensis</i> HD146	+
<i>dendrolimus</i> HD7	+	<i>toumanoffi</i> HD201	+
<i>kenya</i> HDB23	+	<i>kyushuensis</i> HD541	++
<i>galleriae</i> HD29	+	<i>pakistani</i> HD395	+
<i>galleriae</i> NRRL4045	++	<i>israelensis</i> IPS82	+++
<i>canadensis</i> HD224	+	<i>israelensis</i> HD567	+
<i>canadensis</i> NRRL4056	+	<i>indiana</i> HD521	-
<i>entomocidus</i> HD635	+	<i>dakota</i> HD511	+
<i>entomocidus</i> HD9	+	<i>tohokuensis</i> 4V1	-
<i>subtoxicus</i> HD109	+	<i>kumamotoensis</i> HD867	+
<i>aizawai</i> HD11	+	<i>tochigiensis</i> HD868	+
<i>aizawai</i> HD137	++	<i>colmeri</i> IS720	+
<i>morrisoni</i> HD12	+	<i>thompsoni</i> HD542	++
<i>morrisoni</i> HD116	+	<i>morrisoni</i> HD518	++
<i>aizawai</i> HD133	++	<i>B. subtilis</i> 168	-

Levels of signal intensities are relative to that of *B. thuringiensis* subsp. *finitimus* HD3 as a positive control; +++, strong; ++, medium; +, weak.

GACTCGAGGAATTCTTCTCAAATGTAATTCGCTAAATAGCGATATCGCTTTCAGTAAAGCTGAAATTTCTATGTA 30

CTCTACAATTTTCACGAAGCCAGCAAAAACGCGTAGCCGTTCTCAAATGGAAGCTTTCGAAAGTATAAATCAAACACGG 160

AACGGCGATTATGAATACCATCTTCCAATA TGTATAAGCCATGTTGATTTGATATAGGTC TGTATGTAAAGGCATACTA 240

TCGTCTTTAATAGTCAATCGCGAAGCACCTCCAT AATTTGGTTATAGTATACCAATTTTCACCATT CGTAGCAAAG 320

AAGAGATATTGAAGTCAAGAGAGAAAAAATGAAA TTAATGATATTTTGAATAATTTATATTTATCANTTTAT 400

ATTTCTCCAAATTTTATGTAATTTAGAGTAATGCGGTAATGA GAAATGGAGCAATGCACCAACATTAAGAAAAA 480

I G K Q V F Y K R L Q Q K M T Q E E L C Q G I C S V S M Q Q T L E K

TAGGCAAAACAGTCTTTTACAAACGGCTTCAGCAAAAATGACACAAGAAGAAATATGTCAGGGCATTGTTCTGTCTCA 560

Y L S K I E N G K I E A S E E I L Q L L C T R L E I A

TACTTAAGTAAGATGAAAATGGAAGATCGAAGCATCAGAAGAAATTC TACAATGCTCTGCACAAGAC TGGAAATGTC 640

V T D L R D V E E D V K G K L D E W L N A L V H L D

CGTGACGGATTGAGAGATGTAGAAAGATGTGAAGGGGAGCTGGATGAA TGGTTGAATGCACTAGTTCATTTGGACA 720

K Q Q V E R I Y E E L Q G E M K H V L D F E I I N Y Y

AGCAACAAGTAGACGTATATA TGAAGATTGCAAGGTGAAATGAA GCAATGTTGGATTTGAAATATAAATTTATTA 800

K L L Y T R Y L I M K R D F P A L E E E L D K L K K V

AAACGCTGTATACACTTATTAAATTA GAAAAGGATTTCTGCGACTCGAAGAGAAT TAGATAAGT TGAAGAAGT 880

Y K K Y S P F Q K L L Y M Y S R G L L C C L Q Y R W

ATATAAAAATATCTCCATTT CAGAAGTTATATATGATAGTAGAGGGTAT TGTGCTGTTACAGTATAGATGGA 960

K D G L D Y L L K T E V M A K E Q G Y H E T G L Y Y N

AGGATGGGCTAGATTACTTATTA AAAACAGAAGTAAATGGCCAA GGAACAAGGTTATCA TGAACAGGCTTGTATTATAAT 1040

I A L A Y T H L D I H H L A I H F V N M A L E G F R S

ATAGCGCTTGCAATACCAITTAGATA TFCATCTTGGGATTCATTTGTAAATA TGGCATTAGAAAGGATTTCTGTAG 1120

E Y K F R N I I N C Q I L I A V S Y T E K G Q Y E E

TGAAATAGTTTAGAACAATAATTAAT TGCCAAATCTTATTGCGGTAAGT TATACAGAAAAGGTCAGTATGAAAGAG 1200

A L K M Y E S I L R E A T S F A D K D V L L A I T L S

CTTTAAAAATGATGAAAGTATATTGAGAGAGCCACATCTTTT GCTGATAAGGATGACTATTAGCTAT TACTTTAAGT 1280

N M G S I Y Y K K G K Y Q Q A K K Y Y L D S L Q L Q K

AAATGCGAAAGTATCTATTATAAAAAGGAAAAATATCAGCAAGCGA AAAAATATTATTAGATAGTCACAACTTCAAAA 1360

Q I D L N Y L D T I Y E M A L V C I K L E E L D E A

ACAAATAGATTTAATCTTTATGATACAATA TATGAAATGGCA TTAGATGCAITAAATTA GAAAGATTTGATGAGGCAA 1440

R A L I D K G I D A A K Q E E R F N A K L Y L L L M L

GGCATTATGATAAGGGAAT TGAATCCAGCAACAAGAAGAGATT TAAATGCAAAAATATACTTGCTTTTAAATGCTT 1520

R Y K Y F E E A K D Y K L F L E N E A I P L Y K S A G

AGATATAAATATTTGAAAGCAAGCAAAAGATTATAAAT TATTTTGGAAAATGAGGCTATCCCGT TGTATAAATCTGCAGG 1600

N K I E L K K V Y V E L A E H E S N L S R F E E S N

AAATAAAATGAAATTAAGAAAATA TACGTTGACTAGCAAGACATTTTCA AATTTATCCAGATTTGAAAGAAATATC 1680

R Y Y R L V I D L M N D N K E E *

GATATTAAGGTTAGTATGATTTGATGAA TGAATAAAGGAATAAAAATGAAA AAGATGTTTGGAGTATTAG 1760

CATTATAGT GACTCTTACAGTTCGCTGGAGSAAATACATCAGTATAGCAGTAAACCTGATAT TGTGGTCAACAAGCTAAA 1840

A F I V T L T V A G G I H Q Y S S K P D I V G Q Q A K

ACTGTTGAACAAGTTAATCATAAAT AATCCCCCTTCCAAACCGGAAAGGGT TTTTCAATATTTGTTCTCAAAT TCTA 1920

T V E Q V N S *

CAAACTTGAGAAAATATATTTGAATTTT TAGTATATTAAATAGTGGAAACATAATGCTAATATGAAAC TACTCTTTTT 2000

CAAAAAATTTTATTAGGGGGAAGGTT CATGAAAAAAGAAATTTAGCCGT TAGTGTAGCGACAGGAATGGCAGTTAC 2080

AACGTTTGGAGGACAGCTCTGCATTTGCGGATTCTAAAATGTA CTC TCTACGAAGAAGTACAAATGAGACAGTACAGT 2160

Fig. 10. Nucleotide sequence of orf50isr and orf4isr and their deduced amino acid sequence.

(A)

```
                *           20           *           40
Orf4fin : MKKATAGILAVAVVLTIVGGV-QYTSKPDITYGLDSSVSOITVNV : 42
Orf4isr : MKKMVFGVLAETIVITLTVAGGIHQYSSKPDIVGQQAKTVEQVNS : 43
```

(B)

```
MKKMVFGLAFIVTLTVAGGIHQYSSKPDIVGQQAKTVEQVNS
++|-----Hydrophobic-----|*|-----Hydrophilic-----|
```

Fig. 11. Sequence alignment of Orf4fin and Orf4isr (A) and structural organization of the Orf4isr (B).

Bt kurstaki HD1의 경우 424개의 아미노산으로 구성된 ORF (*orf50kur*)가 발견되었으며 (Fig. 12) Orf50fin 및 Orf50isr과는 각각 67.1% 및 68.6%의 상동성을 가지고 있었다. *orf50kur* 역시 작은 ORF (*orf4kur*)와 translationally coupled 되어 있었는데 이 Orf4kur는 분비단백질의 특성을 보이고 있다 (Fig. 13, A). 그러나 Orf4kur는 Orf4fin 및 Orf4isr과는 다른 특성을 보이고 있는데 그것은 84개의 아미노산으로 구성되어 다소 크기가 크고 상동성 조사에서도 *Lactobacillus* sp.에서 발견된 PreL (Maeda et al., 1994)의 downstream에 위치한 Orf9과 91.8%의 높은 상동성을 보인다는 것이다 (Fig. 13, B). 이러한 결과로 *Bt* 균주 내에는 적어도 두가지 타입의 sporulation regulator가 존재한다는 것을 알 수 있다.

CCGC GTTGGGAGCTCTCCGGATCCAAGCTTTGAAAAATATAAATCAAAAACA GAACGGCGATTATGAATACCATCTTTCC 80

AATATGTATAAGCCATGTTGATTTGATATAGGCTGTATGTAAGGCATAACTATCGTCTTTATAATGAGTCATCGCGAGA 160

ACACCTCCATATTTGGTTATAGTATACCAATTTTTCACCATTGGTAGCAAGAAAGAGATATTGATGTGAAGTCAAGAGA 240

AAAAAAATGAAATTAATGCATATTTTATGAAAAATTTATAATTTATCAATTTATATTTCCCAAATTTTATGTAATTTAG 320

AGTAATGGGGTAATGAGAAATGGAGGAGGACAATGCACCAAACATTA GAAAAATA GGCAAAACAAATC TTTTACAAACGGC 400

M H Q T L E K I G K Q V F Y K R

L Q Q K M T Q E E L C Q G I C S V S Y L S K I E N G K

LTCAGAAAAAATGACACAGAAGAATTATGTCAGGGCATTTGTTCTGCTCATACTTAAAGTAAAGATCGAAAAATGGAAAG 480

I E A S E E I L Q L L C A R L E I A V T D L R D V E E

ATCGAAGCATCAGAAGAAAATTCACAAATGCTCTCGCAAGATTAGAAAATGCTGTACGGGATTGAGAGATGTAGAAGA 560

D V K G K L D E W L N A L V H L D K Q Q V E R I Y E

AGATGTGAAGGGGAGCTGGATGAATGGTTGAATGCACTAGTTCATTGGACAAACAAAGTAAACCTATAATGAAG 640

E L Q G E M K H V L D F E I I N Y Y K L L Y T R Y L M

ACTTCAAGGTGAATGAACATGTTGGATTTTGAATATAAATTAATAAACTGCTGTATACAGTTAATTAATG 720

M K R D L P A L E E E L D R L K K V Y K K Y S P F Q K

ATGAAGCGAGATCTACCTGCTCTGGAAGAAGATTGGACAGATTGAAGAAGTGTACAAGAATACTCACCTTTCAAAA 800

L L Y T Y S K A L L L S L Q Y K H K E S L K Y L I E

GTTATGTATACGTACAGTAAGCAATTA TACTTAGTTGCAATATAAGCATAAAGAAAGT TTAATAATTTAATTGAAA 960

T E E M A K E Q G Y Y E T G I Y Y N L S L A Y S H L N

CAGAAGAATGGCTAAAGCAAGGATAATTAAGAACGGGATATAATTAACCTAAGTCTGCGTATAGTCACTAAAT 1040

I P H L A M H F A H I A M E G F R N E Y K F R Y V I N

ATCACCAATTAGCCATGCAATTTGCTCATATTGCCATGGAGGGTCCGTAACGAATAATAATTCGGTATGTAATAA 1120

C Q T I I A L S Y V E K A Q Y E E A L K I Y E S I L

TTGTCAAAGGATTAATGCTTTAAGTATGTTGAAAAACACAAATTAAGAAAGCTCTAAAGATTATGAGAGTATAATA 1200

R E V D S F A E K D M I K A M T L N N M G E L Y H Y K

GAGAAGTAGATCTTTTGGCGAAAAAGATGATTAAGCTATGACTTTAAATAATATGGGGAAATATACCAATATAAA 1280

N E H D K S K D Y F L Q S F E L Q K T V N M N Y I E T

AATGAGCATGATAAATCTAAAGACTATTTCCTCAAAGTTTCGAATTCAGAGACTGCAATAATGAATATAATGAAC 1360

I Y G L A K Q Y I H L K R Y E E A Q E W I E K G I D

AATTTATGGACTGGCTAAGCAATACATTTAAACSTTATGAAAGCGCAGGAAATGGATAGAAAGGAATGATT 1440

C S R S D E K Y N K M I Y S F C I F K Y K Y F G E S Q

GCTCAGGGATGATGAGAAATCAATAAATGATTTATTCATTCTGTATATTAAAGTATAAATAATTTGGAGAAATCTCAA 1520

E F K R F L E N E A I P F F K S V G S M K E L K N A Y

GAATTTAAGAGATTTTAGAATGAGGCTATTCCTTTTAAAGAGTGTAGTACTATGAAGGAATTAATAATGCTTA 1600

L E L A M Y L E N E F K Y E E S N K Y Y K E V I K V

TTTAGAATAGCTATGATTTAGAGAAATGAATTAAGTATGAGGAAATTAATAATTAATAAAGGATTTAAGTTT 1680

L E E K E E L N *

TAGAAGAAAAGGAGGAAATTAATGAAAAGCGCATTATGGTGCAGTAGGGCTTGGAAATAGTACCGATTCTTCTTTAG 1760

L K K R I Y G A V G L G I V A I L S L

CGGTAAATTTATCAATCCAGACATATA TGGGGTAAAGTCTTTAAAAGAAGGCTCAGTAAATTAATCTTAATCCAGATTT 1840

G V N Y S N P D I Y G V K S L K E G S V N Y S N P D I

TATGGATTAACGCTTTAAAAGAAAAGTATATAAATATTCTAACCCAGATATTTACGGTTTAAATTTTTCAGAAAGAAA 1920

Y G L N A L K E S S I K Y S N P D I Y G F K F S E E K

GGTATAAATTAATCTAATCCAGATATTATGGTTAAAGAAATATTGAAAAACCCTTTCCAAATCGGAAAGGGGTTTTT 2000

V I N Y S N P D I Y G *

TCAATATTTGTTCCCAAATCTCAAAACTTGAGAAATAAATTAATTAATTTTATGATATTAATAGTGAACATA 2080

ATGCTAATATGAAACTACTCTTTTCAAATAATTTTATTTAGGGGAAAGGTATATGAAAAAGAGAGTTAGCATTAG 2160

Fig. 12. Nucleotide sequence of orf50kur and orf4kur and their deduced amino acid sequence.

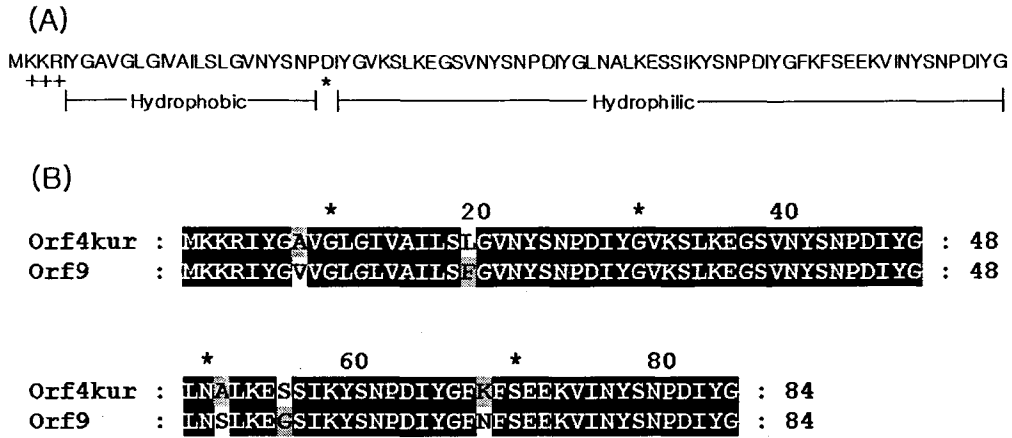
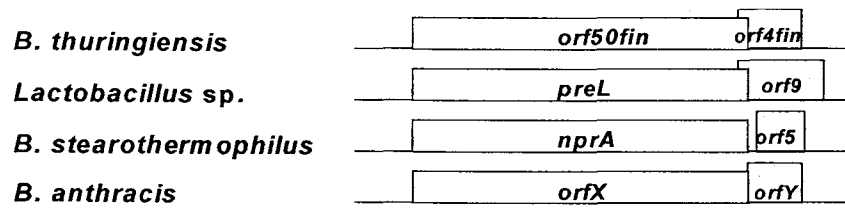


Fig. 13. Structural organization of the Orf4kur (A) and sequence alignment of Orf4kur and Orf9 (B).

*orf50-orf4*와 유사한 구조를 가지고 있는 유전자는 *Bt* 균주 외의 다른 그람양성균에서도 발견되는데 그것은 *B. anthracis*, *B. stearothermophilus* 및 *Lactobacillus* sp. 등이다. 이들 역시 작은 ORF를 가지고 있으며 이들은 분비단백질의 특성을 보이고 있다 (Fig. 14). 또한 *B. subtilis*의 Rap phosphatase와 유사한 유전자가 역시 포자를 형성하는 그람양성균인 *Clostridium acetobutanicum*에서도 발견된다는 보고가 있다 (Perego 1998). 따라서 Rap phosphatase 및 Phr을 통한 포자형성 조절 기작은 포자를 형성하는 그람양성균에서 일반적인 현상으로 여겨진다.

*B. thuringiensis*의 독소단백질 유전자는 sporulation 기작에 의존적인 sigma factor에 의해 발현이 되기 때문에 독소단백질의 생산성은 sporulation 빈도에 의존적이라 할 수 있다. 따라서 sporulation 빈도를 조절할 수 있는 Orf50 및 Orf4는 산업적으로 *B. thuringiensis* 제품의 생산성을 높이는데 매우 유용하게 사용될 수 있을 것이다.



Orf4fin MKK--ALAGILAVAVVLTIVGGV--QYTSKPDTYGLDSSVSQTVNV
 ++ *

Orf9 MKKR-IYGVVGLGLVAILSFGV---NYSNPD IYGVKSLKEG---EEKVINYSNPD IYG
 +++ *

Orf5 MKK--LLLGIMTEGIMSLLVLLIG--SDQEPKYVAKDEHPPPTII IAAKDEHPPATII
 ++ *

OrfY MKK--MVEGALAFIVTLTVAGGI--HQYSSKPDIVGQEAKTVQQINS
 ++ *

Fig. 14. The orf50fin-homologous genes (A) and structural organization of Orf4fin-like proteins (B).

제 3 절. 음식물 쓰레기를 이용한 Bti 균주 생산공정 개발

1. 연구배경

국내에서 대량 발생하고 있는 음식물찌꺼기의 자원화 방법으로서 주로 지방자치단체들을 중심으로 퇴비화나 사료화가 시도되고 있다. 그러나 음식물찌꺼기의 퇴비화는, 1) 처리과정에서 발생하는 다량의 악취에 의해 도시형 플랜트로 건설되기 어렵고, 2) 퇴비로서의 품질을 확보하기 위해 상당한 면적의 후숙시설이 요구되며, 3) 음식물찌꺼기 중의 염분이 퇴비로서의 품질을 떨어뜨리는 등 극복해야 할 여러 가지 문제점들을 가지고 있다. 또한 음식물찌꺼기의 사료화는, 1) 사료화에 필수적인 신신도를 유지하면서 수거, 유통시키기 어렵고, 2) 유리조각 등 사료로서의 안전성을 떨어뜨리는 이물질의 혼입을 막기 어려우며, 3) 살모넬라 등 가축에 치명적인 병원성 미생물의 발생가능성이 높고, 4) 건조사료 제조시의 과도한 건조비용과, 5) 염분농축 등이 문제점으로 지적되고 있다. 따라서 퇴비화나 사료화와 같은 기존의 자원화 방법들은 음식물찌꺼기의 재활용방법으로서는 경제성이 떨어지거나 안정한 최종제품을 내기에는 기술적으로 어려운 한계를 가지고 있다.

음식물찌꺼기의 재활용은 환경오염을 줄일 수 있고 처리에 드는 비용을 줄일 수 있는 경제적이점이 있지만 현재의 음식물찌꺼기의 재활용 수준은 2% 미만에 불과한 실정이다. 따라서 국내에서 대량 발생하고 있는 음식물찌꺼기를 효과적으로 재활용할 수 있는 기술의 개발이 절대적으로 요구되는 상황이다. 본 연구를 통하여 1) Bti 미생물농약 등 고부가가치 생물공학제품의 판매를 통해 막대한 이익을 발생시킬 수 있고, 2) 버려지는 음식물찌꺼기를 이용해 값싸게 이러한 환경농업소재를 대량생산하여 공급함으로써 국내의 환경농업 발전에 이바지하고 있다고 볼 수 있다. 또한 음식물찌꺼기 외에 처리에 막대한 비용이 들고 있으며 심각한 환경오염을 일으키고 있는 여러 가지 유기성폐기물에 대한 자원화를 통해 처리에 따르는 비용을 절감하고 자원화를 통한 부가가치를 창출할 수 있는 효과적인 방안이 제공될 수 있을 것이다. 특히 축산분뇨 등에 효과적으로 적용할 수 있게 될 경우 환경오염의 주원인 중의 하나로 제약을 받고 있는 국내의 축산 산업 분야를 보다 발전시킬 수 있게 될 것이다.

매립에 의한 음식물찌꺼기의 처리는 침출수에 의한 2차적인 환경오염 문제를 일으키고 있고 매립지 선정에 있어서의 님비현상에 의한 인근 주민들과의 갈등 등 사회적인 문제를 가지고 있다. 소각 또한 최근들어 다이옥신 등 대기오염물질에 대한 사회적 관심이 증폭되면서 소각시설

입지 선정 등에 있어서 주민들과의 마찰이 끊이지 않고 있는 실정이다. 오는 2005년부터 음식물 찌꺼기의 직접매립이 금지됨에 따라 지방자치단체를 중심으로 환경친화적인 음식물찌꺼기의 재활용 방법으로 퇴비화나 사료화에 의한 자원화가 적극적으로 시도되고 있는데 이는 매립이나 소각에 따른 환경오염을 방지하고 지역주민과의 갈등을 피할 수 있으며 처리비용을 절감하여 경제적 이득을 보려고 하는데 초점이 맞춰져 있다. 본 연구는 도시에서 대량발생하는 음식물찌꺼기를 효과적으로 재활용할 수 있는 대규모의 플랜트에 적합한 생물공정을 개발하는 것에 관한 내용으로서 농민들이 안정적으로 사용할 수 있는 Bti 등 미생물농약 얻을 수 있는 기술에 대한 것이다.

식품가공폐기물이나 축산폐기물과 같은 고농도의 유기성폐기물을 효소처리와 고온성 호기발효공정 등을 이용하여 Single Cell Protein (사료, 식품 등으로 활용하기에 충분한 영양가치를 지닌 미생물균체)이나 젖산(Lactic acid) 등의 최종제품을 만드는 “생물학적 전환기술” 등이 전세계적으로 연구되고 있다. 이 기술들은 유기성폐기물을 미생물의 배양기질로 활용하여 부가가치가 높은 안정된 최종산물을 만든다는 개념을 가지고 있으며 효소공학적 응용과 발효공학기술을 기반으로 한다. 본 연구에서의 음식물찌꺼기는 고온에서 효소에 의해 생분해 하고 이것을 생물농약 균주인 Bti 균주의 배양기질로 하여 미생물농약을 생산 및 최적화 연구를 진행하였다. 부산물로서의 효소의 활성 및 농축 가능성을 진단해보았고 또한 본 기술의 산업화를 위해 공정의 최적화를 실시하였다.

2. 실험방법

(1) 음식물찌꺼기의 발효기질화 연구

가. 음식물찌꺼기의 성분분석 및 표준기질로서의 사용가능성 조사

국내 식당, 가정에서 발생하는 음식물찌꺼기의 성분을 화학적 방법을 이용하여 정량, 정성적인 방법으로 분석하였다.

다. 효소에 의한 생분해 반응 최적조건 연구

미생물유래 효소를 이용하여 음식물찌꺼기를 생분해하는 최적조건을 찾기 위하여 다음과 같이 단계별로 실험하였다.

1) 음식물찌꺼기의 물리적 파쇄 : 음식물찌꺼기를 실험실에서 파쇄기, 믹서, 실험실용

homogenizer를 사용하여 직경 0.1mm 이하로 미세하게 분쇄하였다.

- 2) 음식물찌꺼기의 분해농도 결정 : 분쇄된 음식물찌꺼기를 dilution하여 농도별로 시료를 준비한 후 공업용 효소인 alpha-amylase, cellulase, proteinase, lipase를 이용하여 음식물찌꺼기를 분해하였다.
- 3) Key enzyme의 결정 : 위 각 효소 중 가장 중요한 역할을 하는 key enzyme을 찾기 위하여 6% 음식물찌꺼기의 효소별 55도, 24시간 분해조건에서 분해능을 조사함. 각 효소에 의한 분해능은 기질에 따라 분해능을 측정하는 방법이 다름. 24시간이 경과한 후 ice machine에 투입하여 더 이상의 효소활성에 의한 분해를 정지한 후 amylase의 경우 총 glucose 농도, protease의 경우 총 free 아미노산 농도 등을 spectrophotometer, chromatography 법을 이용하여 측정하였다.
- 4) 효소카테일의 사용 : Alpha-amylase, cellulase, proteinase를 동시에 사용하여 음식물찌꺼기의 동시분해능을 측정하였다.
- 5) 효소의 동시투입과 단계별투입에 따른 분해율 변화 : 위 세가지 효소를 동시에 투입하여 음식물찌꺼기를 분해한 경우와 각각의 효소를 단계적으로 (amylase, cellulase, proteinase) 투입한 경우의 분해율을 비교하여 표준기질화 공정설계에 필요한 기본적인 데이터를 확보하였다.

(2) 음식물찌꺼기의 발효기질화를 위한 내열성효소생산균주 탐색/응용

가. 음식물찌꺼기로부터 균주의 탐색

음식물찌꺼기 및 유사한 환경으로부터 시료를 채취한 후 nutrient agar plate 상에 도말하여 30℃ ~ 50℃ 조건에서 24 ~ 72시간 배양함. Plate 상에서 colony를 형성한 후보 균주를 분리한 후 소량을 액체배양하여 single colony로 보관함. 각 colony를 plate에 도말한 후 각효소에 대한 기질을 이용하여 효소 활성을 측정하여 최종 고활성효소생산균주를 선정하였다.

나. 분리 균주의 효소활성도 측정

soluble starch, CMC를 amylase, cellulase에 대한 기질로 하여 시간별, 온도별로 효소 활성을 측정함. 각 효소의 활성 측정 방법은 다음과 같다. Amylase 및 cellulase 활성의 측정은 0.1% soluble starch 혹은 1% cellulose 용액 900 μ l에 균주 배양 상층액 (효소액)을 100 μ l 첨가하여 55 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킨 후 동량의 DNS (Dinitro salicylic acid) 용액을 혼합하여 물에 15분간 끓인 후 570nm 에서 흡광도를 측정하여 계산하였다. 대조구에서는 효소액 대신 멸균수를 100 μ l 첨가시켜 동일 방법으로 흡광도를 측정하였다. 단위 활성 (Unit)은 기질 용액과 55 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응하여 효소가 첨가되지 않은 대조구와 비교할 때 0.001의 흡광도 값의 차이를 나타내게 하는 효소의 량으로 정의하였다.

다. 고온성 미생물의 탐색

55 $^{\circ}$ C, 최소배지조건에서 48시간 이상 배양하였을 경우 고온에서 미생물의 성장과 효소 활성이 유지되는 미생물을 plate 상에서 확인하였다.

라. 음식물찌꺼기 적용실험

미세분쇄한 6% 음식물찌꺼기를 기질로 solid content(%), 생균수(CFU/ml), 환원당 (gram/liter)을 측정하였다.

마. 효소생산균주의 개량

음식물찌꺼기를 표준기질화하여 유용한 미생물을 대량발효생산하기 위해서는 표준기질 내에 유용미생물이 성장하기 위한 영양분이 모두 존재하여야 함. 그러나 1단계 효소분해 과정중 효소생산미생물에 의하여 영양분이 모두 고갈될 경우 표준기질로 사용하기가 어려움. 따라서 효소생산미생물과 최종생산되는 유용미생물은 서로 다른 영양분을 이용하여야 함. 따라서 효소생산용 미생물을 개량하여 glucose utilization을 하지 않는 돌연변이 균주로 개량함. 인위적 돌연변이는 UV 혹은 TG를 사용하였고 방법은 다음과 같다. 분리된 균을 nutrient broth (beef extract 0.3%, peptone 0.5%) 5ml에 55 $^{\circ}$ C 온도 조건으로 24시간 배양한 후 NTG를 최종 1mM 처리하여 다시 2시간 동안 진탕 배양하였다. 배양액은 회수하여 전분 혹은 섬유소가 1% 첨가된 영양한천배지에 순차 희석 도말법으로 도말하였다. 이어 평판 배지에 UV를 20 erg의 양으로 40초 동안 조사하고 고체 배양기 중심에 30mM의 2-데옥시글루코스를 100 μ l 투입하였다. 그 후 55 $^{\circ}$ C에서 24시간 정지 배양하였다. 배양 후 2-데옥시글루코스의 확산으로 인해 고체 배양기 중심부위로부터 균의 생육이

저지되는 투명환이 형성되는데 이 투명한 영역대에서 생육하는 미생물 집락을 분리하고 이를, 포도당 주 수송수단인 Group translocation이 파괴되고 카타블라이트리프레션 시스템이 손상을 입은, 변이주로 선별하였다. 분리된 변이주는 다시 glucose가 0.3%, soluble starch 혹은 CMC (carboxymethyl cellulose)가 1% 첨가된 영양한천배지에 접종하였다. 24시간 동안 배양 후 1/10N iodine 용액 혹은 0.1% Congo-red 용액으로 처리하여 투명환의 크기가 가장 크고 amylase, cellulase에 각각 특이적인 catabolite repression resistant 변이주를 선별하였다.

(3) Bt 발효 생산 연구

가. Bt 발효 생산 연구

음식물찌꺼기를 미생물유래 효소로 분해하여 표준기질을 만든 다음(1단계), 표준기질을 이용하여 산업적으로 유용한 Bt 발효생산조건을 최적화하고, 실험실 스케일에서 Bt를 발효생산함(2단계). Bt는 *Bacillus*의 일종으로서 생균수의 측정과 sporulation rate의 측정을 병행함. 생균수는 agar plate 상에서, sporulation rate는 heat shock을 준 후 agar plate상과 현미경 상에서 측정함. 또한 생산된 미생물 농약을 모기 유충을 이용해 bio assay를 실시하여 생산된 미생물 농약이 실제로 생물학적 방제 효과가 있는지를 확인함.

나. 다른 유용 미생물의 적용

1차 발효를 통해 얻어진 표준 기질에 본사가 보유하고 있는 효모 (*Saccharomyces* sp.), 유산균 (*Lactobacillus* sp.) 및 Gram 음성 균인 *Acinetobacter* sp.를 적용하여 각 균들의 생육 정도를 조사하였다.

(4) 플랜트 설계 개발을 위한 공정 최적화

가. 1차 전처리 공정 최적화

1) 고형분 함량 최적화: 음식물 찌꺼기의 고형분 함량은 8%에서 12% (w/w)까지 조절한 후 실제로 발효조 내에서 교반이나 공기 주입에 대한 문제점을 살펴 보았다.

2) 멸균 방법 최적화: 플랜트의 용이성과 경제적 상황을 고려하여 121℃에서 고온 멸균을 진행하는 대신에 80℃에서 heat shock을 시간별로 주면서 멸균 방법을 최적화 하였

다.

- 3) 원료의 전처리 방법 최적화: 1차 발효에 사용되기 전의 강염 (NaOH) 처리가 1차 발효 시 고형분 감량에 어떠한 영향을 미치는 가를 조사 하였다.

나. 1차발효 최적화

- 1) 발효 온도의 최적화: 발효온도는 각각 30, 37, 45, 50, 55℃로 설정하여 24시간 발효 한 후 고형분 감량, 환원당 등을 조사하였다.
- 2) 발효 시간의 최적화: 발효 시간을 96시간까지 진행하여 고형분 감량, 환원당 등을 조사
- 3) pH 조절 방법 최적화: NaOH를 이용한 자동 조절과 potassium phosphate를 이용한 완충 조절 방법을 비교함. 또한 buffering 농도를 달리하여 최적 완충 농도를 판단하였다.
- 4) 기존 기술과의 고형분 감량능 비교: 혐기성 하수병합처리 방법에 쓰이는 혐기성 산발효와 고형분 함량을 비교하였다.
- 5) 강염 (NaOH) 가수분해 후 개발균주 적용 효과 검증: 음식물 찌꺼기를 강염 가수분해 후 본 발효를 실시한 것과 열처리를 한 것의 고형분 감량능을 비교하였다.
- 6) 연속발효: 초기 발효균의 접종을 제외하고 별다른 종균의 접종없이 1일 단위로 초기 음식물찌꺼기의 90% (v/v) 분량의 새로운 음식물을 투입하여 발효를 실시해 10일 동안의 고형분 함량 및 생균수를 조사하였다.

다. 2차 전처리 및 공정 최적화

- 1) 고형분 분리 여부 판단: 원심분리나 Ultra filtration을 사용하여 거른 액을 2차 발효에 적용한 것과 1차 발효액 자체를 2차 발효에 적용한 것의 2차 종균의 생균수를 비교하였다.
- 2) 영양분의 추가 여부 판단: 미생물 농약을 최적으로 생산해 내기 위해 1차 발효액에 영양분을 첨가하여 BT의 생균수 및 내성포자수를 측정하였다.

라. 실험실 규모의 pilot plant의 운영

실험실 규모 (5 liter)의 pilot plant를 자체 제작 운영하여 고형분의 감량능 및 생균수 등을 측정하였다.

마. 후처리 공정 최적화

본 공정에서 발생하는 악취를 하수병합처리 방법일때와 비교하였다. 또한 바이오필터를 설치하여 본 공정의 악취 발생 농도를 측정하였다.

3. 연구수행 결과 및 고찰

(1) 음식물찌꺼기의 발효기질화 연구

가. 계획수립

음식물찌꺼기를 효율적으로 분해하여 표준화된 발효기질을 생성하는 1차발효와 표준화된 기질을 이용하여 Bt (생물농약)와 같은 고부가가치 제품을 발효 생산하는 2차발효로 분리하였다 (그림 1)

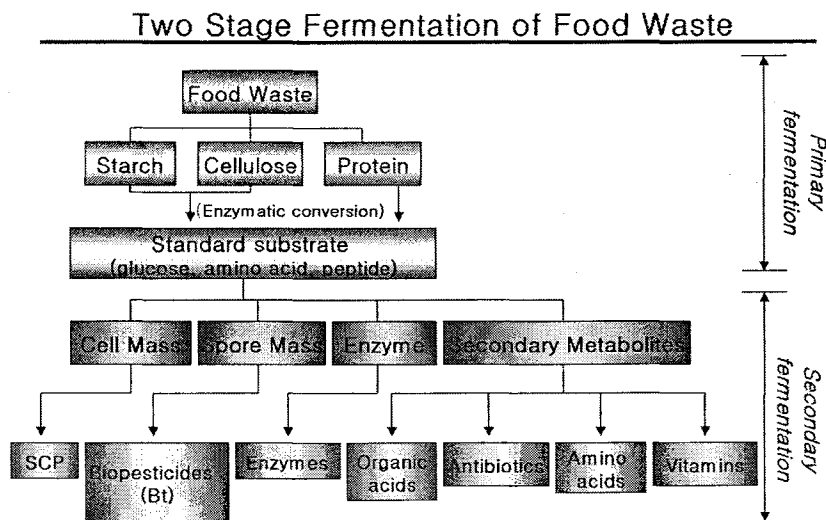


그림 1. 2단계연속발효공정에 의한 음식물찌꺼기의 고부가가치 발효생산 제품으로의 생물학적 전환

나. 음식물찌꺼기의 성분분석 및 표준기질로서의 사용가능성 조사

한국의 식당, 가정에서 발생하는 음식물찌꺼기를 분석한 결과 평균 수분함량은 84.16%, pH는 약 6.8, 주요성분함량은 단백질, 지방, 섬유소, 전분을 포함하는 성분이 각각 27.3%, 11.5%, 2.83%, 56.8%로 측정되었음. 이외에도 칼슘성분이 1.42%, potassium이 0.23% 함유되어 있다. 음식물찌꺼기의 성분조사 결과 위 성분들을 미생물유래 효소를 이용하여 효율적으로 분해할 경우 매우 우수한 미생물 발효 배지의 조건을 갖출 수 있을 것으로 예상되었다.

다. 효소에 의한 생분해 반응 최적조건 연구 :

1) 음식물찌꺼기의 분해농도 결정 : 분쇄된 음식물찌꺼기를 4%, 6%, 7%, 8.5%, 10%, 12%의 농도별로 시료를 준비한 후 공업용 효소인 alpha-amylase, cellulase, proteinase, lipase를 이용하여 음식물찌꺼기를 분해하였음. 그 결과 6~7% 음식물찌꺼기 농도에서 가장 효율적으로 효소에 의해 분해되었음. 이후 모든 효소분해실험은 6% 음식물찌꺼기 농도 조건에서 수행하였다.

2) Key enzyme의 결정 : 위 각 효소 중 가장 중요한 역할을 하는 key enzyme을 찾기 위하여 6% 음식물찌꺼기의 효소별 분해능을 조사함. 그 결과 alpha-amylase가 가장 중요한 key enzyme으로 밝혀짐. 55°C, 24시간 분해조건에서 alpha-amylase의 경우 6% 음식물찌꺼기를 2.1%까지 분해되어 65%의 분해율을 나타내어 glucoamylase (58%), proteinase (30%), cellulase (55%), lipase (9%)에 비해 높은 분해율을 나타냄. Amylase가 6% 음식물찌꺼기를 2.1%까지 분해하여 key enzyme으로 선정되었다 (그림 2).

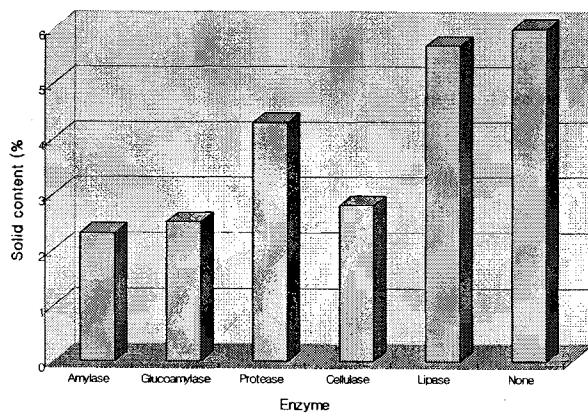


그림 2. 각종 공업용 효소를 이용한 음식물 찌꺼기 분해능 실험.

- 3) 효소카테일의 사용 : Alpha-amylase, cellulase, proteinase를 동시에 사용하여 음식물찌꺼기를 분석한 결과 6% 음식물찌꺼기는 1.2%까지 분해되어 80% 이상의 분해율을 나타내었음. 따라서 효율적인 음식물찌꺼기의 분해를 위해서는 key enzyme인 alpha-amylase 이외에 cellulase와 proteinase가 필수적임. 효소분해 후 잔류하는 1.2% 성분은 효소로서 분해할 수 없는 성분으로 사료된다.
- 4) 효소의 동시투입과 단계별투입에 따른 분해율 변화 : 위 세가지 효소를 동시에 투입하여 음식물찌꺼기를 분해한 경우와 각각의 효소를 단계적으로 (amylase, cellulase, proteinase) 투입한 경우의 분해율을 비교한 결과 모두 80% 정도의 분해율을 나타내었음 (그림 3). 따라서 공정의 단순화를 위하여 효소의 동시투입이 효율적이라는 결론을 얻었다.

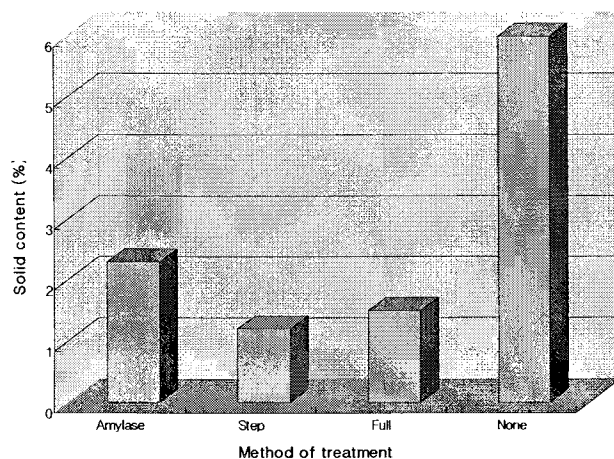


그림 3. 효소카테일의 동시투입 및 단계별 투입에 따른 음식물 찌꺼기 분해능 차이

- 5) 결론 : 한국의 음식물찌꺼기는 미생물유래 효소를 이용하여 분해하였을 경우 고부가가치성 미생물 또는 미생물제품을 대량생산하는 2차발효의 표준기질로 사용하기에 적합하며, 약 80% 이상의 높은 분해율을 얻음. 음식물찌꺼기를 효율적으로 분해하기 위해서는 고온에서 활성을 유지하는 amylase, cellulase를 생산하는 고온성미생물이 매우 중요한 것으로 판명되었다.

(2) 음식물찌꺼기의 발효 기질화를 위한 내열성효소 고 생산균주 탐색 및 응용

가. 음식물찌꺼기로부터 균주의 탐색

분쇄한 음식물찌꺼기를 agar plate상에 도말하여 37° C에서 24~48시간 배양한 후 plate상에서 자란 미생물 colony를 분리함. 각 colony를 3ml nutrient broth를 사용하여 배양한 후 특성을 파악한 결과 Ba (*Bacillus amyloliquefaciens*), L32 (*Bacillus licheniformis*), EFB (1-38, *Bacillus thermoglucosidasius*), Hot (1-8, 미동정), New (1-5, 미동정) 수종을 포함하는 43개 균주를 분리, 확보하였다.

나. 분리 균주의 효소활성도 측정

분리한 43개 균주를 각각 soluble starch, casein, 또는 CMC를 기질로 사용하여 만든 plate에 도말하여 24시간 배양한 후 plate상의 clear zone의 지름을 측정하여 각 균주의 효소활성도를 조사하였다. 그 결과, Ba, EFB3에서 매우 높은 amylase activity가 관찰되었으며, L32와 Hot8에서 약간의 amylase activity가 나타남. Protease activity의 경우 EFB3에서 가장 높았으며 43개 균주에서 모두 일정한 단백질 분해능이 관찰되었음. CMC를 분해하는 cellulase의 경우 L32, EFB3, Hot8에서 활성이 관찰되었으며 이중 EFB3의 cellulase activity가 약 3배 이상 높은 것으로 나타났다.

다. 고온성 미생물의 탐색

위의 43개 균주를 55° C, 최소배지조건에서 48시간 이상 배양하였을 경우 Hot1-8, New1-5, 그리고 EFB1-38이 고온에서도 성장과 효소활성을 유지함을 확인하였다.

라. 음식물찌꺼기 적용실험

미세분쇄한 6% 음식물찌꺼기를 기질로 Ba, L32, EFB3, Hot8, New2-3를 선별하여 30° C 조건에서 144시간까지 적용한 후 solid content(%), 생균수(CFU/ml), 환원당(gram/liter)을 측정한 결과 EFB3에서 2.0%, 5.5×10^8 , 1.7g/l로, 음식물찌꺼기에 대해 가장 우수한 효과를 보였다.

마. 고전적 돌연변이 유발(classical mutation)에 의한 균주의 개량

50° C 이상의 온도조건에서 음식물찌꺼기를 분해할 수 있는 효소를 생산하는 *Bacillus*

thermoglucoisidasius (이하 Btg로 표기함) 균주를 이용하여 음식물찌꺼기를 분해한 결과 분해능은 뛰어나지만 표준기질의 필수조건인 glucose 영양분을 고갈시키는 현상을 발견하였다. 표준화된 기질 내에 glucose의 농도가 낮을 경우 유용한 미생물의 효율적인 발효생산이 어려움. 따라서 Btg 균주를 classical mutation 방법을 이용하여 돌연변이 균주로 전환하여 glucose utilization pathway를 block하고 대신 다른 탄소원을 이용하는 균주를 개발하였다.

- 1) BtgMu의 개발 : UV/NTG를 이용하여 돌연변이를 유발한 결과 돌연변이 균주중 glucose를 탄소원으로 이용하지 않으면서 amylase 효소의 활성이 증가된 균주를 확보하였다 (그림 4).
- 2) BtgCelMu의 개발 : UV/NTG를 이용하여 돌연변이를 유발한 결과 돌연변이 균주중 glucose를 탄소원으로 이용하지 않으면서 cellulase 효소의 활성이 증가된 균주를 확보하였다 (그림 4).
- 3) BtgMu와 BtgCelMu의 glucose utilization : BtgMu와 BtgCelMu가 표준기질의 필수조건인 glucose를 고갈시키는지 여부를 확인한 결과 두 균주 모두 glucose 농도에 변화를 주지 않음을 확인하였다 (그림 5).
- 4) BtgMu와 BtgCelMu의 고형 음식물찌꺼기 분해능 : Solid state에서의 BtgMu와 BtgCelMu 각각의 음식물찌꺼기 분해능을 조사한 결과 음식물찌꺼기 총질량의 감소정도 (Reduced Total Weight)와 BtgMu와 BtgCelMu의 총 생균수에서 모두 만족할만 한 결과를 얻었다. 음식물찌꺼기의 감소는 미생물처리후 13까지 꾸준히 올라 약 65% 정도의 분해율을 나타내고 있다 (그림 6).
- 5) BtgMu와 BtgCelMu의 액상 음식물찌꺼기 분해능 : Liquid state에서의 BtgMu와 BtgCelMu 각각의 음식물찌꺼기 분해능을 조사한 결과 음식물찌꺼기 총질량의 감소정도 (Reduced Total Weight)가 고형에서보다 우수한 결과를 얻었다. 음식물찌꺼기의 감소는 공업용효소를 사용했을 경우와 유사하게 6%에서 2%까지 감소함. 또한 BtgMu와 BtgCelMu의 생균수도 정상적으로 증가하는 것으로 나타났다 (그림 7).

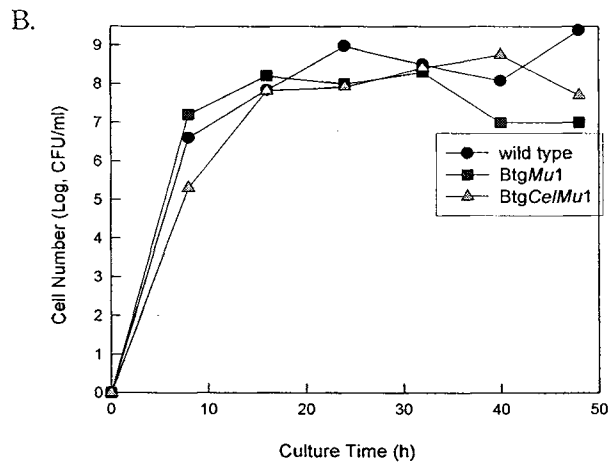
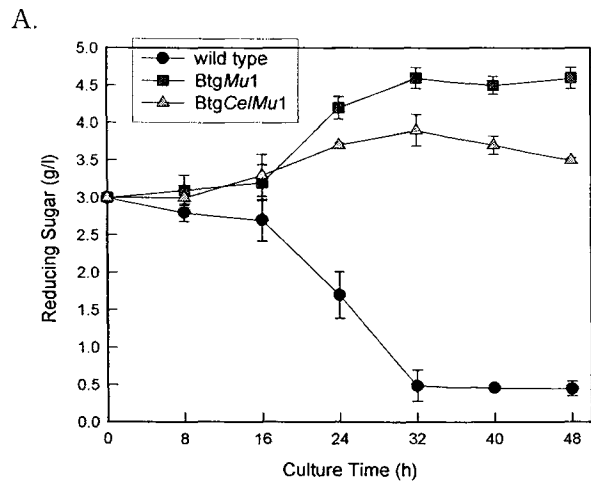


그림 5. Wild type 균주, BtgMu, BtgCelMu의 glucose utilization 및 생육 비교

(A, reducing sugar ; B, cell number)

A.

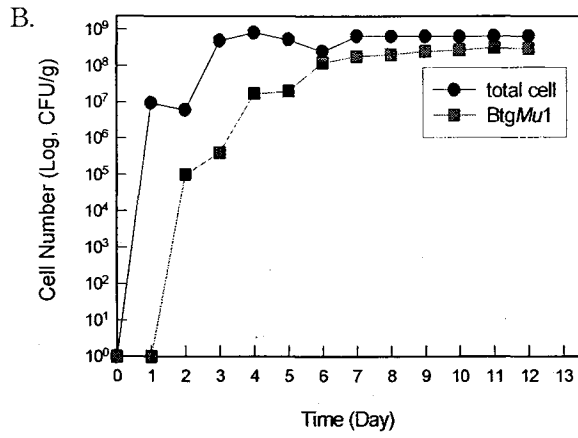
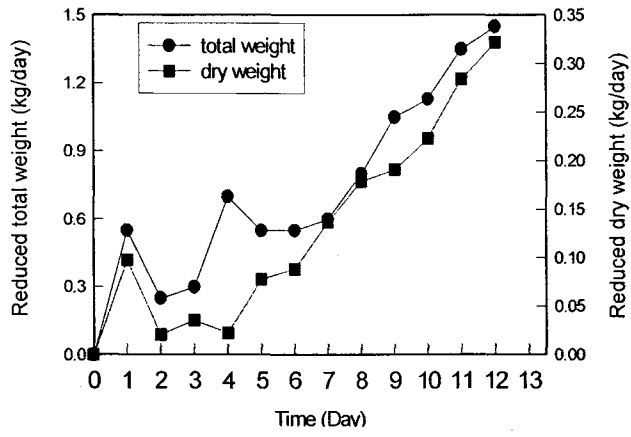
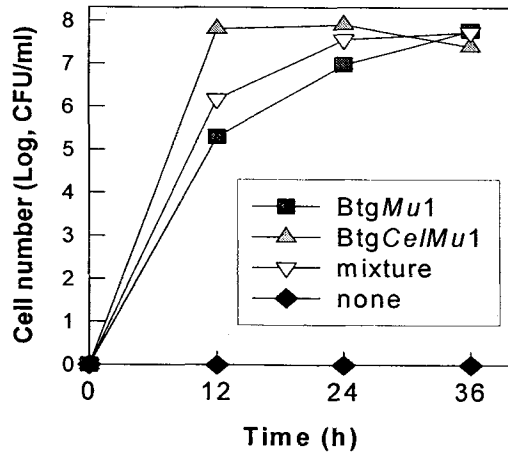


그림 6. BtgMu와 BtgCelMu를 각각 이용한 고형 음식물찌꺼기의 분해능(A) 및 생균수 분석(B)

A.



B.

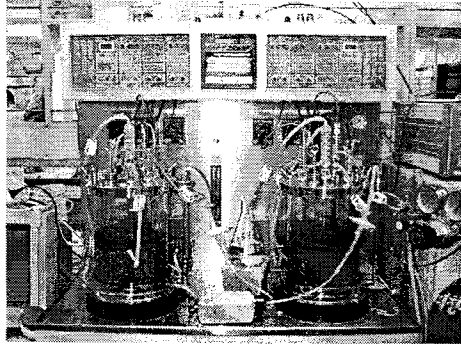
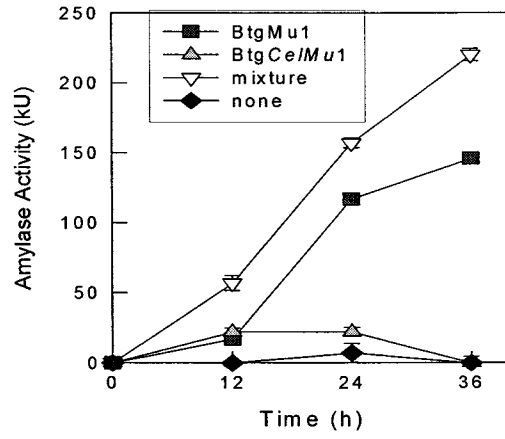


그림 7. BtgMu과 BtgcelMu1의 액상 음식물 찌꺼기 적용시 성장 경향 (A) 및 1차 발효 시설 (B)
 (BtgMu1, BtgMu1 단독접종 ; BtgcelMu1, BtgcelMu1 단독접종 ; BtgMu1과 BtgcelMu1의 동시접종 ; none, 무접종)

6) BtgMu와 BtgCelMu의 혼합투입시 액상 음식물찌꺼기 분해능 : Liquid state에서의 BtgMu와 BtgCelMu를 혼합배양하여 투입했을 경우의 음식물찌꺼기 분해능을 조사한 결과 amylase, cellulase 모두 각각 투입한 것에 비교하여 효소의 활성이 증가하는 경향을 보임. 이는 두 미생물을 동시에 음식물찌꺼기에 투입하여 분해하므로 각각을 발효하는 것에 비해 매우 경제적인 시스템을 구성하는데 필수적인 것으로 볼 수 있었다 (그림 8, 9).

A.



B.

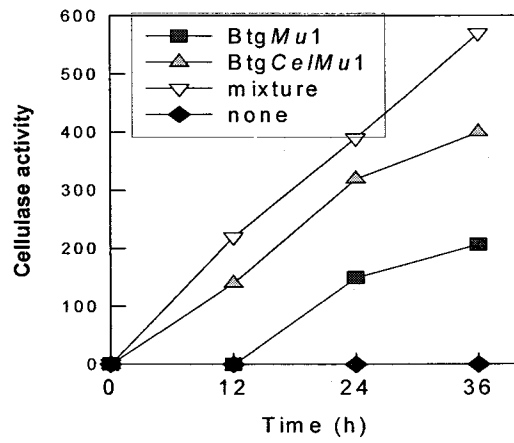


그림 8. BtgMu와 BtgCeIMu를 혼합투입하였을 경우 amylase(A)와 cellulase(B)의 활성증가

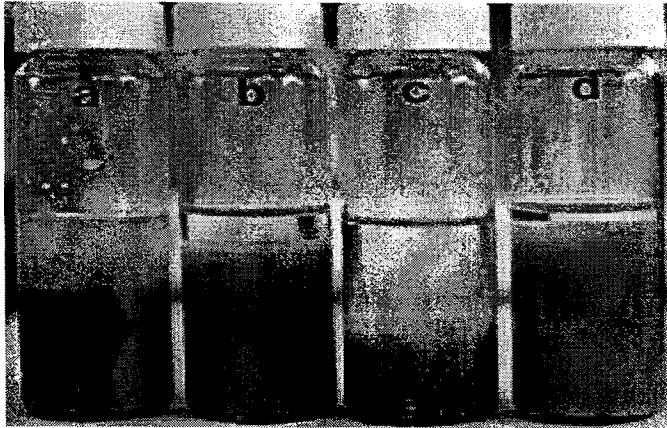


그림 9. BtgMu와 BtgCelMu를 투입하고 8시간 경과후 음식물찌꺼기의 분해정도 비교.

(a, BtgMu 단독투입; b, BtgCelMu 단독투입 ; c, 혼합투입; d, 무처리)

7) 결론 : Amylase, cellulase 등 음식물찌꺼기를 분해하는데 필요한 효소를 생산하는 *Bacillus thermoglucosidasius* 균주의 glucose 소모 문제점을 보완하기 위해 classical mutation을 이용하여 돌연변이균주를 제작하여 실험한 결과 BtgMu와 BtgCelMu는 glucose에 대한 catabolite repression에 대해 저항성을 가지는 동시에 우수한 활성효소를 생산하는, 음식물찌꺼기의 bioconversion의 조건에 정확하게 일치하는 우수한 균주임을 확인함. Protease의 활성도 매우 높은 편이나 개선의 여지가 있고, 음식물찌꺼기의 분해능을 증가시켜 전체적인 시스템을 가속화시키는 연구가 필요한 것으로 판단되었다.

바. 1차 발효액의 재순환을 통한 효소의 농축

1차 발효액을 다시 1차 발효조로 재순환시켜 발효액 내의 효소의 농축 가능성을 타진해 본 결과 세번의 재순환시 amylase의 경우는 약 3배의, cellulase의 경우는 약 1.5배의 효소 활성이 농축되었다. 하지만 이후 효소액이 포화되면서 그 이상의 급격한 증가는 보이지 않았다 (표 1). 또한 이런 효소의 활성 증가는 환원당의 농도에 영향을 미쳐 환원당 양을 초기 5.3 g/liter에서 8.4 g/liter로 증가시켰다.

표 1. 1차 발효액의 재순환에 따른 효소 활성

재순환 횟수	0	1	2	3
Amylase activity (U)	0	119	219	368
Cellulase activity (U)	0	240	310	358
Reducing sugar (g/L)	5.3	6.6	7.3	8.4

사. 결론

*Bacillus thermoglucosidasius*로 동정된 EFB3 균주가 고온성 미생물로서 비교적 높은 amylase, cellulase activity를 가지는 후보균주로 확보됨. 따라서 음식물찌꺼기의 생물학적 전환에 EFB3 균주를 사용하기로 하였다. 또한 고전전 돌연변이 유발을 통해 본 균주를 변이시켜 amylase와 cellulase에 각각 특이적인 catabolite repression resistant 변이주를 개발하고 이를 동시 적용한 결과 보다 우수한 분해력을 나타내는 것을 확인함. 1차 발효의 재순환을 통해서도 효소의 농축으로 효소 생산가능성을 확인할 수 있었다.

(3) 2단계 발효인 Bt의 발효생산연구

가. Bt의 발효생산 : 1차 발효에서 음식물찌꺼기를 효소로 분해하여 glucose가 함유된 표준화된 기질을 만든다음 이 기질을 미생물 배양용 배지로 하여 고부가가치성 미생물농약제품인 *Bacillus thuringiensis* (Bt)를 생육시켜 고농도 생산하였음 (그림 10).

나. 생산된 Bt의 모기 유충을 이용한 생물학적 방제 실험 : 2차 발효를 통해 생산된 미생물 농약의 최종 농도 (spore 농도)를 각각 10^3 부터 10^7 CFU/ml로 조절하여 시험관에 넣고 여기에 모기 유충을 5마리씩을 첨가한 후 모기 유충의 사멸율을 시간대별로 살펴 보았다. 이때 10^4 CFU/ml이상의 Bt spore가 첨가된 시험관에서는 14시간안에 모든 모기 유충이 사멸됨을 관찰할 수 있었다. 또한 10^6 CFU/ml이상의 Bt spore가 첨가된 경우는 불과 2시간 안에 모든 모기 유충이 사멸됨을 관찰할 수 있었다. 자세한 결과를 표 2에 정리하였다. 여기서 대조구는 미생물 농약이 첨가되지 않는 모기유충의 서식하고 있던 물에 같은 수의 모기 유충을 첨가한 경우이다.

표 2. 생산된 미생물 농약의 모기 유충에 대한 방제력 검사

시간 (hrs)	최종 미생물 농약 농도 (CFU/ml)					대조구	
	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	-	-
0.0	5	5	5	5	5	5	5
0.5	4	4	5	5	5	5	5
1.0	1	2	5	5	5	5	5
2.0	0	0	5	5	5	5	5
4.0	0	0	2	4	5	5	5
7.0	0	0	1	3	5	5	5
14.0	0	0	0	0	5	5	5
19.0	0	0	0	0	5	5	5
36.0	0	0	0	0	3	5	5
80.0	0	0	0	0	3	5	5
104.0	0	0	0	0	0	5	4
128.0	0	0	0	0	0	0	1
152.0	0	0	0	0	0	0	1

다. 다른 유용 미생물의 배양 : 본사가 보유하고 있는 미생물인 *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus* sp., *Acinetobacter* sp.를 1차 발효 결과 얻어진 표준화 기질에 배양하여 그 생육을 관찰한 결과 배양 24시간 후 각각 4.2×10^9 , 1.4×10^9 , 1.4×10^{10} CFU/ml의 생균수를 나타내었다. 이는 균들이 영양 배지 상에서 조사한 생균수인 3.7×10^8 , 4.5×10^8 , 3.5×10^9 CFU/ml 보다 높은 생균수로 1차 발효에서 얻어진 표준화 기질은 Bt 뿐만 아니라 많은 다른 미생물에 적용할 수 있음을 나타내고 있다.

라. 결론 : 일반배지를 사용하였을 경우에 비교해 음식물찌꺼기를 미생물유래 효소로 분해하여 표준기질을 만든 후 이를 원료로 Bt를 생산했을 경우 Bt의 생균수 및 sporulation rate에서 크게 차이가 없었고 (그림 10) 오히려 *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus* sp., *Acinetobacter* sp.의 경우에 있어서는 일반 영양배지 보다 높은 생균수를 나타내었다. 따라서 음식물찌꺼기를 미생물을 이용하여 표준화된 기질로 만드는 1단계 발효공정과 표준화된 기질을 이용하여 고부가가치 미생물을 고농도배양하는 2단계 발효공정을 최적화하고 scale-up할 수 있다면 음식물찌꺼기의 다단계 발효공정을 이용한 성공적인 생물학적

전환(bioconversion) 시스템을 구축할 수 있다는 확신을 가짐.

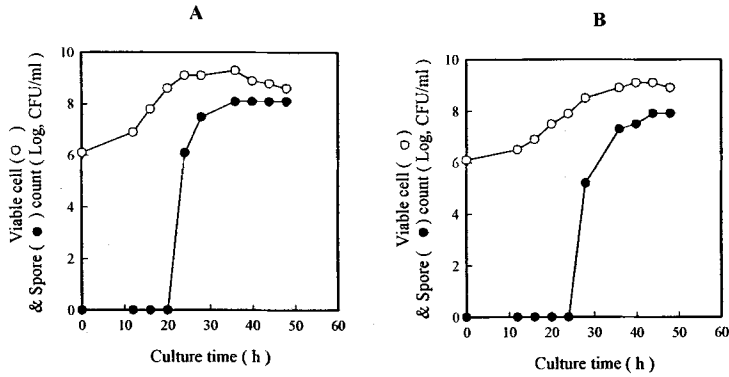


그림 10. 일반배지(A)와 음식물찌꺼기를 분해하여 만든 표준기질(B)을 이용한 Bt의 고농도발효생산

(4) 플랜트 설계 개발을 위한 공정 최적화

가. 1차 발효 전처리 최적화

1) 초기 고형분 함량의 최적화: 고형분의 함량이 8.5% 이상이 되면 agitation 및 aeration이 불가능하다고 판단되었음. 따라서 최적의 고형분 함량은 8.0%로 확인되었음.

2) 전처리 효과

가) Autoclave 대체 효과

음식물 찌꺼기를 autoclave하는 것은 실험실에서는 간단한 일이지만 대형화 플랜트에 적용한다면 상당한 경제적 부담 및 조작의 복잡성을 야기할 수 있으므로 보다 간단하면서도 효과를 낼 수 있는 멸균 방법을 모색하였다. 우선 수거해 온 음식물 찌꺼기의 오염 정도를 확인 하기 위해 37°C에서 2일간 배양하여 생균수를 측정하였다. 결과 음식물 찌꺼기 1ml당 1×10^8 CFU 이상의 자체 오염 미생물이 확인되었다. 그 후 오염된 음식물 찌꺼기에 80°C에 열을 0분에서 5분간격으로 40까지 적용함으로써 멸균 효율을 살펴 보았다. 약 5분 이상 열처리가 된 경우 잡균이 밀도가 약 1×10^4 CFU/ml 이하로 저하되

어 멸균 효율이 높은 것으로 나타났다 (표3).

표 3. 음식물찌꺼기의 잡균 오염 정도와 멸균 효과

배양일	멸균전			멸균후
	0day	1day	2day	
pH	6.67	5.28	5.09	5.19
중온성 균 수 (CFU/ml)	5.2×10^7	1.0×10^8	2.6×10^8	10^4 이하
고온성 균 수 (CFU/ml)	10^9 이하	10^9 이하	10^9 이하	10^4 이하

나) 강염기 전처리 비교

전처리로 최종 1N의 농도로 NaOH를 처리하여 음식물 찌꺼기의 pH가 12가 되도록 조정하여 12시간 처리한 것과 그렇지 않은 실험구의 고형분 함량을 비교하였다. 이때 강염기를 처리한 구는 점도가 현저하게 줄어드는 것을 확인할 수 있었지만 측정 결과 고형분 함량에서는 열처리를 한 음식물찌꺼기와 거의 차이를 보이지 않았다.

나. 1차 발효 최적화

- 1) 발효 온도별 1차 발효 실시 : 6%의 음식물 찌꺼기를 *Bacillus thermoglucosidasius* catabolite repression resistant mutant를 이용하여 30, 37, 45, 50, 55°C에서 각각 1차 발효를 실시하여 pH, 생균수, 고형분 감량 및 환원당의 결과를 비교하였다. 결과 분해율은 37, 55°C일때가 가장 좋았지만 환원당의 함량으로 볼때 30°C에서는 급격한 저하를 보이는 반면 55°C일때는 증가하는 경향을 보였다 (그림 11). 따라서 본 공정은 55°C에서 진행되어야 함을 결정할 수 있었다.
- 2) 열처리 방법에 따른 1차 발효 효율 측정 결과 : 37°C에서 2일 동안 배양하여 자연 오염 시킨 음식물 쓰레기를 각각 열처리 (80°C, 5분)와 autoclave (121°C, 15min)한 후 1차 발효를 실시하였다. 고형분 감량은 autoclave한 것이 약 65%로 가장 높게 나왔으나 경제적

인 면을 고려한다면 열처리한 것이 약 58%로 유사한 분해율로 판단되어졌다 (그림 12).

- 3) 발효 시간에 따른 1차 발효 효율 : 발효 시간을 48시간으로 늘려서 55℃에서 1차 발효를 실시하였다. 앞선 결과에 따라 음식물 찌꺼기를 80℃에서 5분간 열처리한 후 발효를 진행하였고 대조구로는 열처리를 하지 않은 음식물 찌꺼기를 사용하였다. 고형분 생균수 및 고형분 함량은 이미 12 시간 이후에 급격한 증가를 나타냈으나 표준화 기질에서 중요한 요소가 되는 환원당의 농도가 발효 24시간 이후에 증가되므로 최적의 발효 시간은 24시간 이후어야 할 것으로 판단되어졌다 (그림 13).

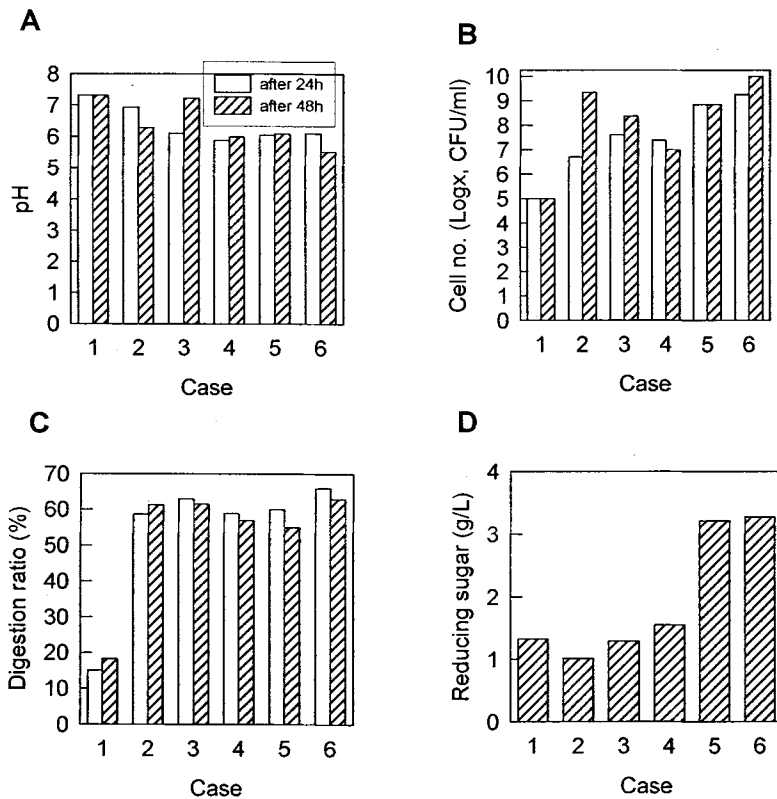


그림 11. 발효 온도에 따른 1차 발효 효율

(1, culture at 4℃ ; 2, at 30℃ ; 3, at 37℃ ; 4, 45℃ ; 5, 50℃ ; 6, 55℃) (A, pH ; B, cell number ; C, digestion ratio ; D, reducing sugar)

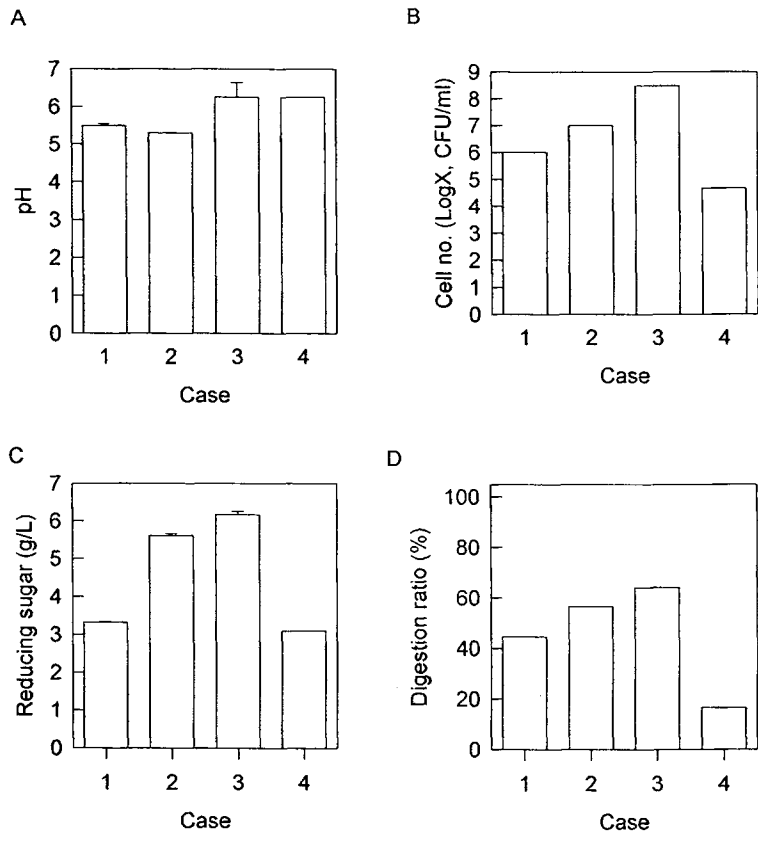


그림 12. 열처리 방법에 따른 1차 발효 효율 측정 결과

(1, 무처리 Btg 발효 ; 2, 열처리 후 Btg 발효 ; 3, autoclave 후 Btg 발효 ; 4, Btg 접종 없이 발효) (A, pH ; B, cell number ; C, reducing sugar ; D, digestion ratio)

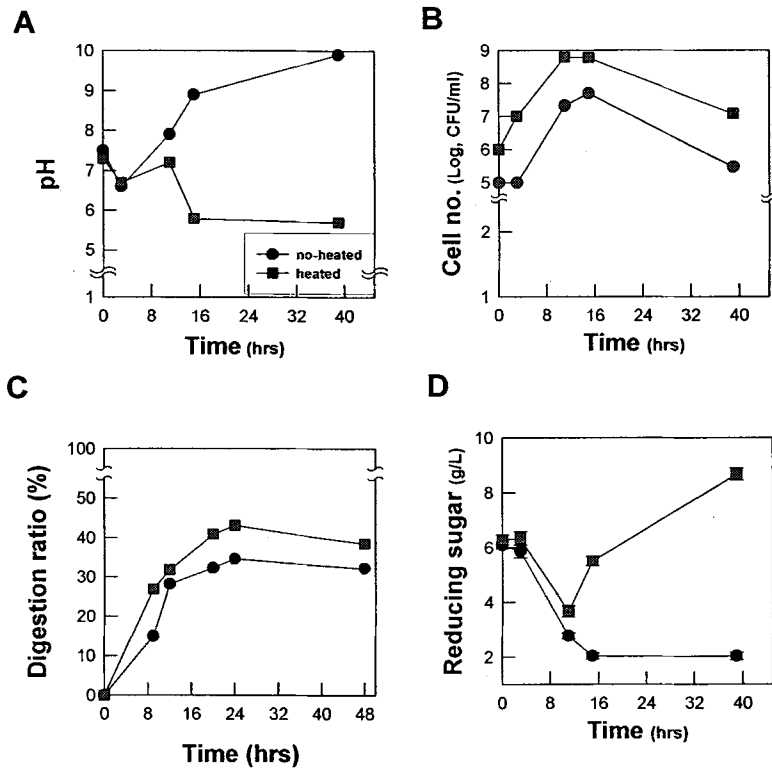


그림 13. 발효 시간에 따른 1차 발효 효율

(A, pH ; B, cell number ; C, digestion ratio ; D, reducing sugar)

- 4) 음식물 쓰레기의 고형분 함량을 높여서 재실시: 대형화 플랜트 운영시 경제성을 고려해 적용하고자하는 음식물의 고형분 함량을 기존의 6% (w/w)에서 8% (w/w)로 높여 pH, 생균수 및 고형분 감량율을 조사하였다. 발효는 55°C에서 4일 동안 이루어 졌다. 초기 65% (w/w)보다 고형분 분해율을 저하되었지만 분해율은 이미 24시간째 최대 수준으로 올라감을 알 수 있었다 (그림 14). 이때 분해율은 39%였으며 경제성을 고려할 때 만족할 수준으로 판단되어 졌다.
- 5) 혐기적 산발효와 NaOH 처리 발효의 효율 비교: 본 생물학적 전환 기술에서의 1차 발효와 다른 유사 발효와의 효율을 비교 검증하였다. 실험구는 3가지 형태로 진행되었으며 첫번째

는 음식물 찌꺼기의 전처리 방법으로 강염기 (NaOH)를 처리하여 음식물 찌꺼기의 pH를 12까지 올려 하루를 방치한 후 본 미생물을 투여하여 발효한 것이고 두번째는 전처리가 끝난 뒤 음식물 찌꺼기 자체를 종균으로 하여 혐기적으로 37°C에서 발효를 진행한 것이다. 마지막 세번째는 본 연구에서 제안하는 방법으로 음식물찌꺼기를 80°C에서 5분간 전처리 한 후 55°C에서 본 종균을 투입하여 발효한 경우이다. 발효가 진행됨에 따라 pH의 변화는 열처리 방법으로 종균을 투여한 구에서 가장 큰 변화를 나타내 초기 7에서 약 5.6까지 저하하는 경향을 보였다. 생균수는 강염기를 처리하여 종균을 투여한 구에서는 약 2.4×10^6 CFU/ml이하로 나타났으며 혐기적 산발효 구에서는 약 10^9 CFU/ml 이상으로 나타났다. 본 연구에서 제안한 공정에서는 약 2.4×10^7 CFU/ml로 나타났다. 본 기술 공정에서의 분해율은 기존의 방법들보다 높게 나타났으며 또한 발효액에 존재하는 환원당의 농도도 약 5.0g/L로 가장 높은 수치를 보였다. 나머지 두 방법에서의 환원당은 거의 변화가 없거나 저하하는 경향을 보였다 (그림 15).

- 6) Buffering effect 조사 : 초기 음식물 찌꺼기의 pH를 조절하기 위해 potassium phosphate를 이용하여 buffering을 실시하였다. buffer 농도에 따른 1차 발효의 효율을 조사하기 위해 최종 potassium phosphate의 농도를 각각 0, 5, 10, 50, 100, 200mM로 조절하여 고형분 분해율, 생균수 및 pH 변화를 측정하였다. 대조구로는 종균 접종을 하지 않은 것을 사용하였다. buffer 농도가 10mM을 초과할 경우 생균수 및 고형분 분해율이 급격하게 저하되는 것을 확인할 수 있었다 (그림 16).
- 7) 연속 음식물 투여시 효율 검증 : 5 liter 발효기에서 catabolite 변이주를 최종 약 10^6 CFU/ml (약 1% v/v)로 접종하여 8%의 음식물 쓰레기로 1차 발효를 실시하였다. 발효 24 시간 후 발효액의 10%를 초기 접종용으로 남겨두고 새로운 8% (w/w) 음식물을 전체 volume의 90%를 투여하였다. 이후 이와 같은 작업을 반복하여 고형분 감량능과 pH 및 생균수의 변화를 관찰하였다. 또한 pH 조절 방법을 초기 buffering을 한것과 5N NaOH를 이용한 자동 조절 한것, 두가지 경우로 나누어 발효를 실시하였다. 발효 4일까지 약 34% 이상의 분해율을 보이던 것이 생균수가 10^6 CFU/ml 이하로 저하되면서 급격하게 저하하기 시작하였다. 전체적으로 buffering을 이용한 고형분 분해율이 NaOH를 이용한 자동 조절을 이용한 발효에서 보다 낮은 경향을 보였다 (그림 17).

다. 2차 발효 전처리 및 2차 발효 최적화

1) 전처리 최적화

1차 발효액을 8,000rpm에서 15분간 원심분리한 후 얻은 상등액과 1차 발효액 자체에 각각 Bt를 접종하여 내성 포자수를 조사한 결과 각각 3.0×10^8 , 2.9×10^8 CFU/ml로 나타났다. 이는 1차 발효액이 원심분리 유무에 상관없이 모두 Bt를 배양하는데 적합한 기질임을 보여주는 결과라 할 수 있다.

2) 2차 발효 최적화

1차 발효액을 8,000rpm에서 원심분리한 후 상등액을 이용하여 2차발효를 실시하였다. 사용된 균주는 *Bacillus thuringiensis*로 미생물 농약 균주로 약 1% 농도로 접종되었다. 균주를 접종하기전 발효액의 pH를 NaOH 및 HCl로 7.0으로 조절한 후 발효액의 탄소원 및 질소원 함량을 측정하여 탄소원과 질소원의 비를 각각 glucose와 ammonium sulfate로 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70%로 조절하였다. 결과 C/N 비가 40을 넘어설 경우 생균수 및 미생물 농약 생성에 중요한 역할을 하는 내성 포자수가 급격하게 줄어들음을 확인할 수 있었다 (그림 18).

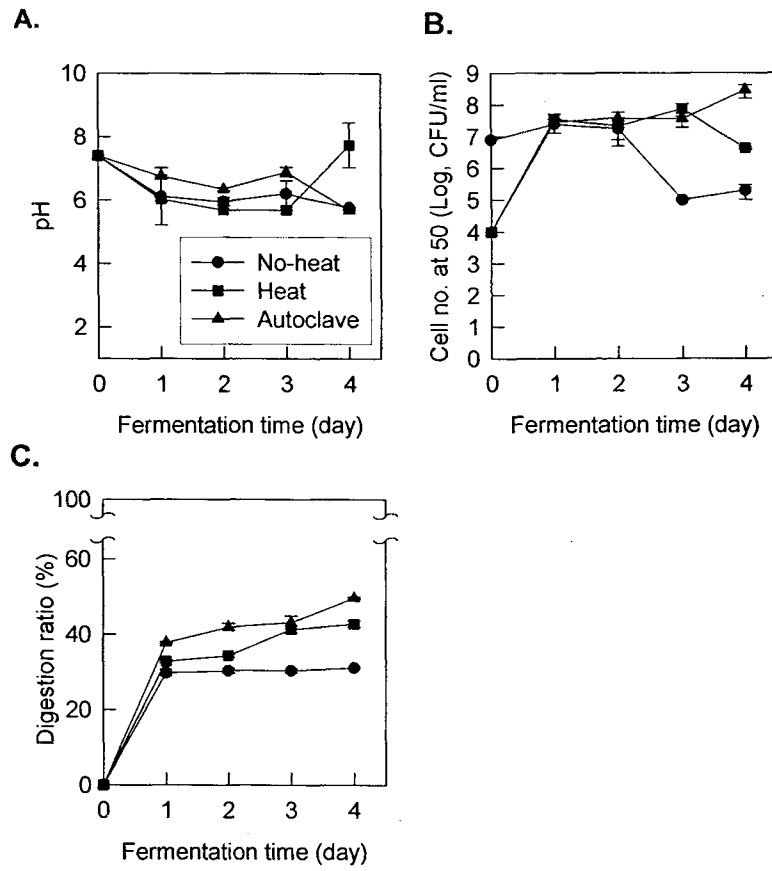


그림 14. 고휘분 8% (w/w) 음식물찌꺼기를 이용한 1차 발효

(A, pH ; B, cell number ; C, digestion ratio)

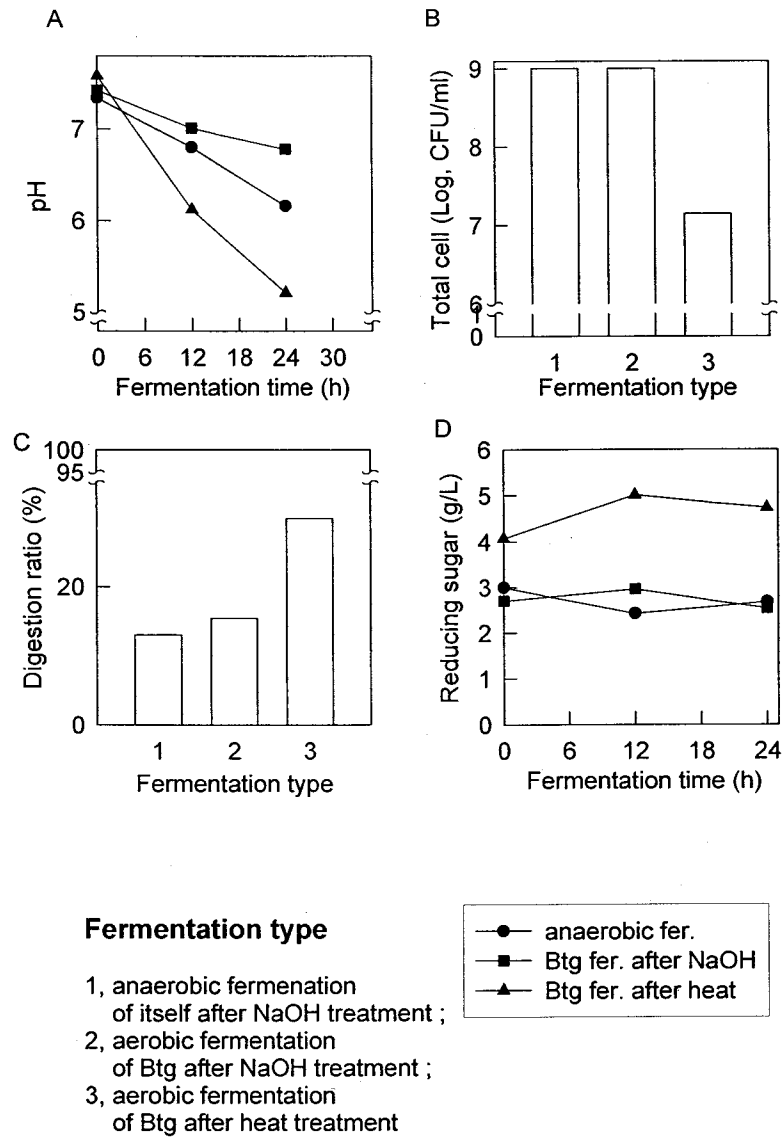


그림 15. 혐기적 산발효와 NaOH 처리 발효와의 효율 비교

(A, pH ; B, total cell number ; C, digestion ratio ; D, reducing sugar)

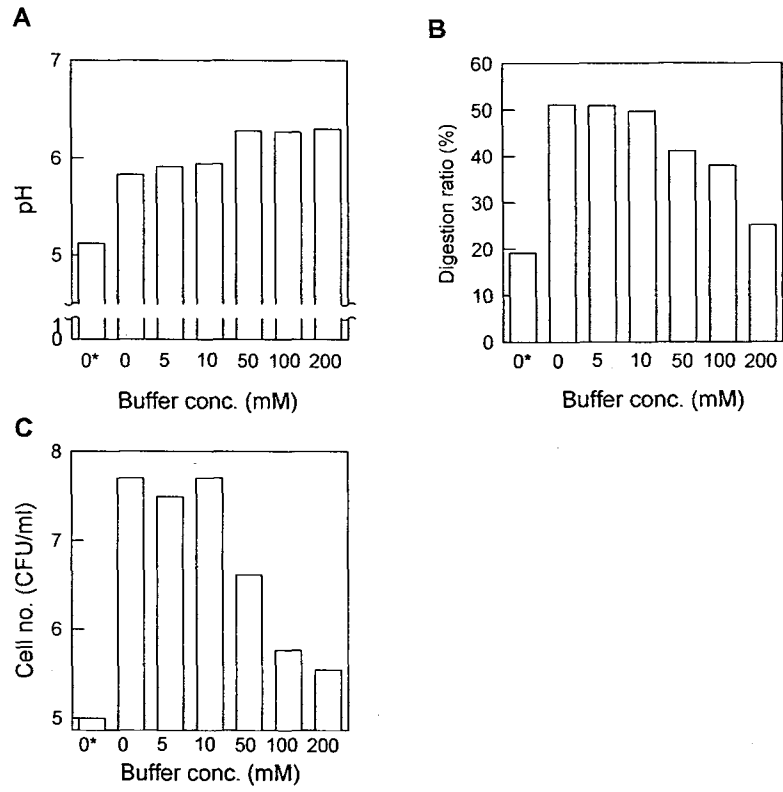


그림 16. buffer 농도 (potassium phosphate)에 따른 1차 발효 효율

(A, pH ; B, digestion ratio ; C, cell number)

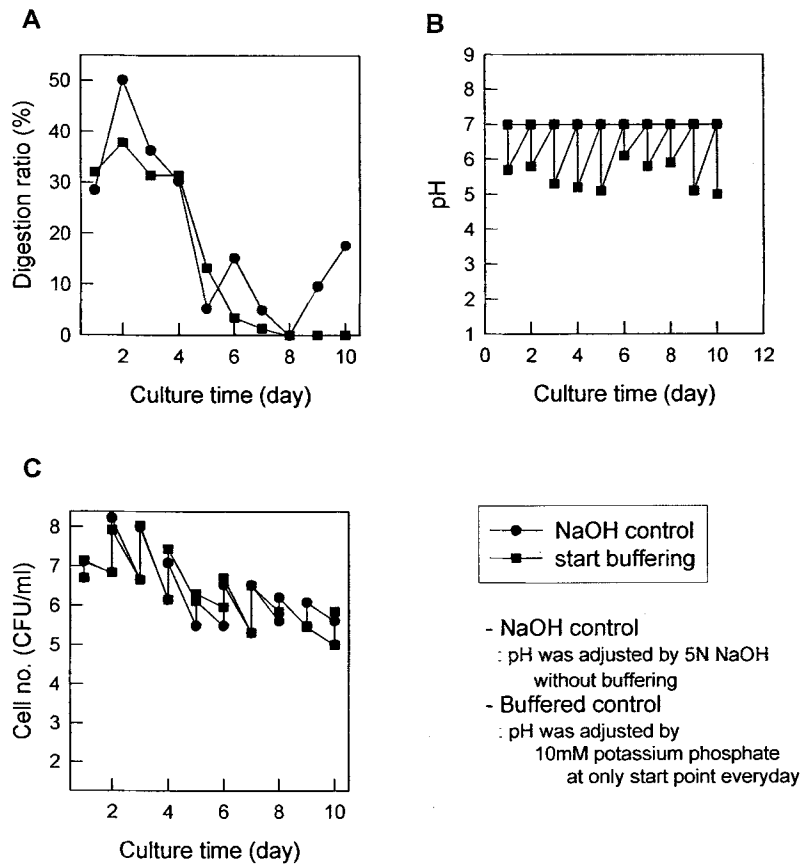


그림 17. Fed batch 방법에 따른 1차 발효 효율

(A, digestion ratio ; B, pH ; C, cell number)

라. 후처리 공정 최적화

각 발효조에서 생성되는 악취 성분 (암모니아, 황화수소, 아민류, 에탄올, 메탄올)을 측정된 결과 소량이 측정되었다. 따라서 본 시스템에 본사사가 개발한 biofilter를 장착하여 악취를 제거하는 실험을 진행하여 90% 이상의 악취를 제거하였다. 자세한 결과를 표 4에 나타내었다.

표 4. Biofilter 장착에 따른 1차 발효조내의 악취의 감소 경향

	암모니아 (ppm)	황화수소 (ppm)	아민류 (ppm)	에탄올 (ppm)	메탄올 (ppm)
Biofilter 장착 전	0	2	2	100	80
Biofilter 장착 후	0	0	0	10	6

(5) 플랜트의 설계

상기의 결과를 토대로 한 전체 공정은 아래와 같으며 그림 19에 전체 공정도를 나타내었다.

수거된 유기성 폐기물로부터 선별기 (1)를 거쳐 미생물에 의해 분해될 수 없는 금속류, 비닐류, 유리류 등을 제거한다. 선별된 고농도 유기성 폐기물은 수송관 (2)을 거쳐 파쇄기 (3)로 들어가 잘게 파쇄된 후 수송관 (4)을 거쳐 전처리조 (5)로 투입된다. 전처리조에서의 고농도 유기성 폐기물은 고형분 함량이 6-8%가 되도록 가수하고 습식 멸균되어 이 후 상온으로 보관되며 고농도 유기성 폐기물의 혐기적 발효를 방지하기 위하여 산소공급 (5)과 교반기 (impeller, 6)를 이용한 예지테이션 (agitation)이 이루어 진다. 전처리조는 언제든지 1차 발효에 쓰일 수 있도록 1차 발효조 (8)에 비해 2-3배의 용량 (40,000-60,000 l)을 지니고 있다. 전처리조에서의 액상 유기물은 수송관 (7)을 통해 1차 발효조 (8)로 옮겨져 상기에서 언급한 균주를 이용하여 55℃에서 발효된다. 발효 시간은 초기 24-48 시간이며 안정화 된 뒤는 약 12~24 시간이다. 발효액은 수송관 (9)을 거쳐 원심분리기 (10)로 옮겨져 고형분과 상층액으로 분리된다. 상층액의 약 10~20%는 1차 발효조 내의 효소 농축을 위해 재순환 (11) 된다. 초기 발효에서 상층액의 나머지 80~90%는 2차 발효조 (12)로 옮겨져 2차 발효의 기질로 활용되지만 재순환이 4~6회 이상 진행 될 경우는 약 60~70%만이 2차 발효조로 이동되며 나머지 10~20%는 산업용 대량 효소로 제품화된다. 고형 성분은 수송관 (13)를 통해 선택적으로 건조기를 통과한 후 퇴비화나 사료화 공정에 활용되어 진다. 2차 발효조 (12)에서의 발효는 적용 미생물에 따라서 다양한 조건에서 시행되어진다.

상층액을 이용할 경우는 수송관 (14)을 통해 유용 물질 분리, 정제 과정을 거치게 되며 고형분을 이용할 경우는 상층액은 수송 (15)되어 전처리조의 가수용으로 쓰이고 고형분은 건조기

(16)을 거친 후 제품화된다. 건조기에서 발생한 열은 공기관 (17)을 통해 열에너지원으로 활용된다.

산소 공급은 공기 공급기 (18)를 통해 전저리조, 1차 발효조, 2차 발효조, 건조기로 투입된다. 각 반응조 및 기계에서 발생하는 악취는 배출 공기관 (19)을 통해 바이오 필터 (biofilter, 20)를 통해 외부 환경으로 방출되어진다.

현재 본사는 생물학적 전환기술의 사업화를 추진하기 위해 본 연구의 결과로 얻어진 상기의 공정을 바탕으로 약 10 톤 규모의 발효조를 이용하여 보다 구체적인 공정 적용 실험을 계획 중에 있다.

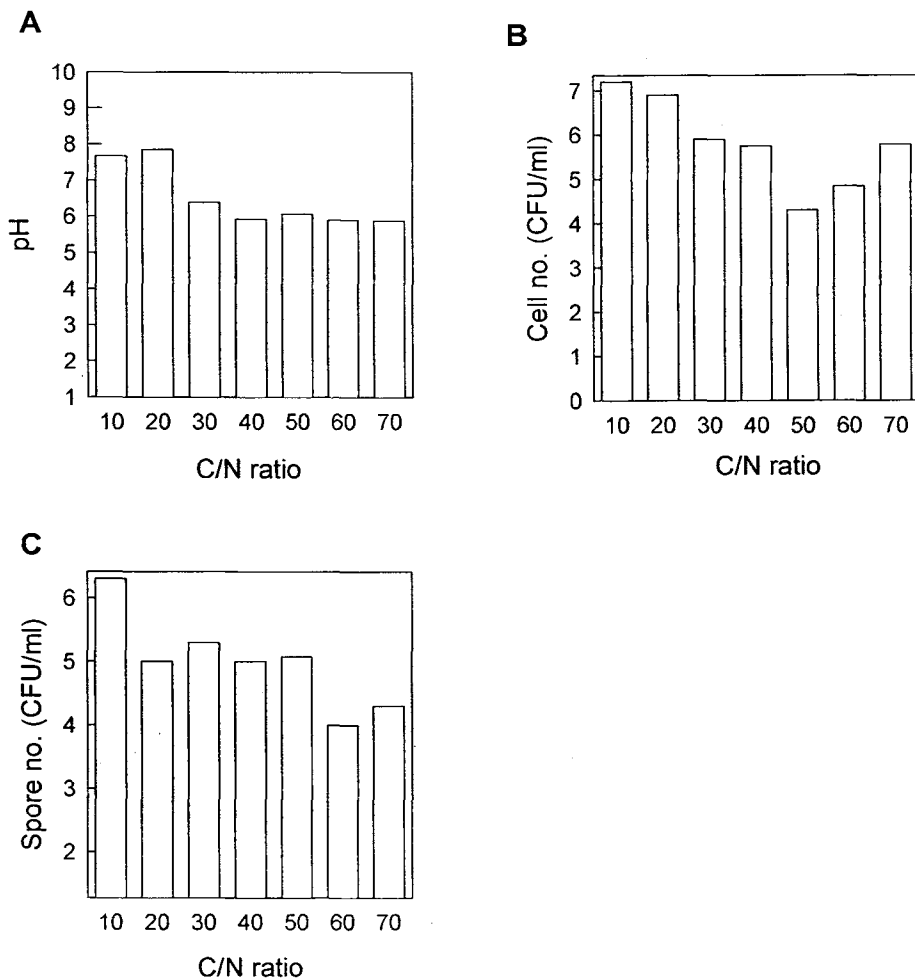


그림 18. 표준화 기질을 이용한 Bt의 발효

(A, pH ; B, spore number ; C, cell number)

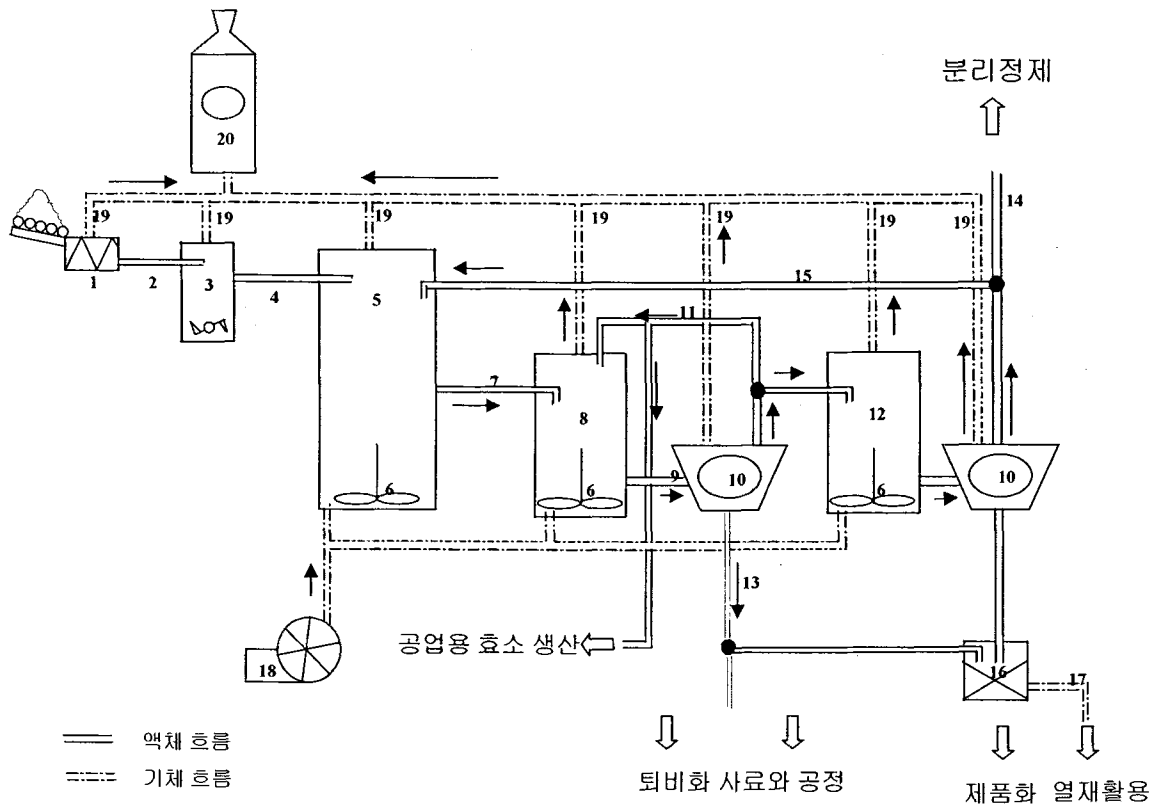


그림 19. 생물학적 전환기술의 전체 공정도

고형물 6%의 음식물 찌꺼기는, 그 자체에 고농도로 존재하는 영양분 (glucose)에 영향을 받지 않고 amylase와 cellulase를 대량으로 생산하며 glucose의 주 수송 경로인 group PTS 기작이 파괴되어 소량의 glucose만을 흡수하는 고온성 *Bacillus thermoglucosidasius*의 catabolite repression 변이주에 의해 1차 발효되어 표준화 기질을 제조할 수 있었다. 결과적으로 국내의 음식물찌꺼기는 미생물 유래 효소를 이용하여 분해하였을 경우 고부가가치성 미생물 또는 발효 산물을 생산하는 표준화 기질로 사용하기에 적합하며, 본 개발 시스템은 약 80% 이상의 높은 분해율을 보임으로써 음식물 찌꺼기 처리에도 우수함을 나타내었다. 표준화 기질을 통한 2차 발효에 있어서는 Bt의 경우 일반 배지를 사용하였을 경우에 비교해 생균수와 내성 포자수에서 크게 차이를 보이지 않았고 *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus* sp., *Acinetobacter* sp. 등과 같은 다른 유용 미생물등의 경우에 있어서는 오히려 영양배지에서보다 높은 생균수를 나타내

었다. 따라서 음식물 찌꺼기를 미생물을 이용하여 표준화된 기질로 만드는 1단계 발효 공정과 표준화된 기질을 이용하여 고부가가치 미생물을 고농도배양하는 2단계 발효 공정을 scale-up 할 수 있다면 음식물 찌꺼기 다단계 발효 공정을 이용한 성공적인 생물학적 전환 시스템을 구축할 수 있다는 가능성을 가지게 되었다. 생산된 Bt를 이용한 생물학적 방제 실험에서는 생산된 Bt가 모기 유충에 대해 우수한 독성을 보임으로써 제품의 품질에 있어서도 확신을 가질 수 있었다. 1차 발효액의 일부 혹은 전체를 재순환 시킴으로써 발효조 내의 효소의 농도를 높여 1차 발효의 분해율을 증대시킬 수 있는 가능성을 확인하였을 뿐 아니라 산업 각 분야에 유용한 효소 생산을 위한 활용 가능성을 제시하였다.

본 생물학적 전환시스템의 대형화를 위한 공정 최적화 실험에서는 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

- 많은 열량을 필요로 하는 autoclave 시스템을 80℃의 열처리 시스템으로 전환함으로써 경제적인 시스템 설계가 가능해 졌다.
- 전처리 방법으로 NaOH를 처리해 보았으나 이는 전체 공정 효율에 별 영향을 미치지 못하는 것으로 확인되었다.
- 1차 발효 최적화 실험을 통해 최적 1차 발효 조건 (55℃, 24시간, 8% 고형분 함량의 음식물 찌꺼기 배지)를 설정함으로써 1차 발효 공정에 있어서의 경제성을 보다 구체적으로 산출할 수 있는 계기를 마련하였다.
- 1차 발효시 음식물 찌꺼기의 pH 조절 방법을 확립함으로써 보다 효율적인 1차 발효 공정을 설계할 수 있게 되었다.
- 음식물 찌꺼기의 처리 방법으로 현재 널리 사용되고 있는 혐기적 산발효의 효율과 비교함으로써 본 생물학적 전환기술의 우수함을 확인하였다.
- 연속적으로 음식물을 투입하여 1차 발효를 실시함으로써 본 시스템에서 미생물의 2차 접종 시기를 예측할 수 있게 되었다.
- 2차 발효에 적용된 Bt의 생육에 대한 optimization을 실시하여 구체적인 영양비를 예측할 수 있게 되었다.
- Biofilter를 장착시킴으로써 본 시스템에서 발생될 수 있는 악취 문제를 해결하였다.

제 4 절 Bti 제제화

1. 연구배경

- 모기 유충에 대하여 살충력을 가지고 있는 Bti의 배양분을 이용하여 모기 유충을 방제 할 수 있는 제제 개발
- Bti 원분을 공급받아 모기 유충의 섭식 메커니즘에 부합되도록 수면 및 수중에서 확산, 분산이 이루어질 수 있는 형태의 제제 개발

2. 실험방법

(1) 원분(Bti)의 성질

1) 원분 형태 : 건조 형태의 분말, 6~7BIU

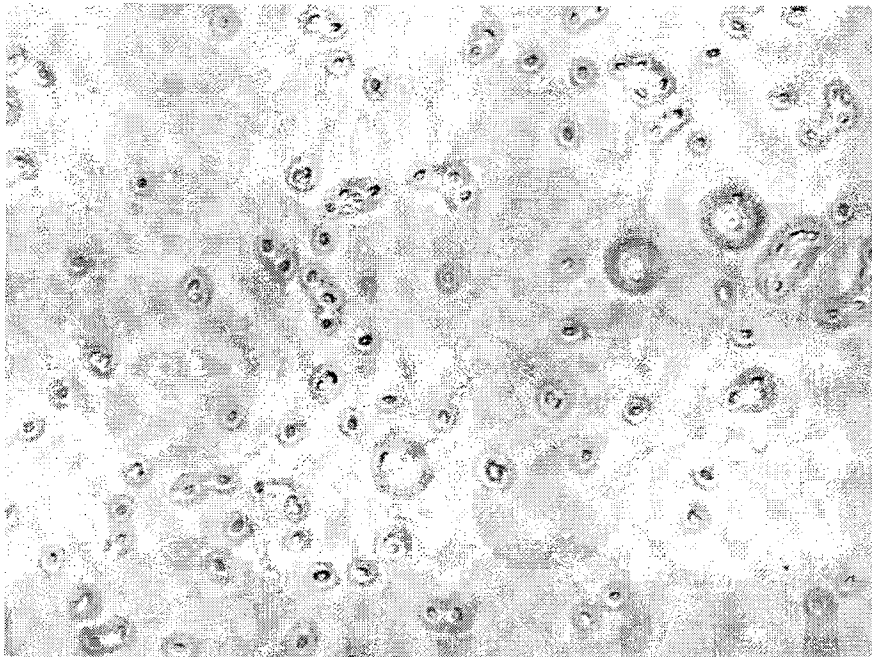
2) 원분의 성질

가비중 : ≈ 0.58

pH : 5.1 (5% solution, H₂O)

입도 : 10% - 8.7, 50% - 27.2, 90% - 76.7 μ m

3) 원분의 전자 현미경 사진 (X100)



(2) 제제 검토

- 1) 제제형태는 수면에 부상하여 확산될 수 있는 일발처리형 액상 수화제 (FL;Flowable) 와 수중에서 분산되는 분산형의 수화제 (WP;Wettable Power)를 주제제로 하였다.(표1)
- 2) FL의 경우 수면 부상성을 가지기위하여 오일을 증량제로 하였으며 유화, 분산 및 확산성을 얻기 위하여 수중의 계면활성제(SAA ; Surface Active Agent)를 사용하였다.
- 3) WP의 경우 Kaolin을 증량제로 하였으며 수화성과 수중 분산성을 가지기 위해 계면활성제를 첨가하였다.
- 4) 제품의 기본적인 물성을 얻기 위하여 FL의 경우 dino-mill을 이용하여 습식 분쇄하였으며 WP는 coffee-mill을 이용하여 건식 분쇄하였다.
- 5) 모든 제제품은 물리성을 검사하여 목적에 부합되는가를 조사하였다. (표2)

(3) 제조 방법

- 1) FL : Methyl oleate에 원분(10%)을 넣은 후 분산제, 환전제, 유화제 및 증점제를 가하고 충분히 혼합한 후 dino-mill을 이용하여 습식 분쇄하였다. 이 분쇄물에 보조 오일을 가하고 dino-mill로 1~2회 더 분쇄한 후 제품으로 하였다.
- 2) WP : Kaolin에 원분(10%)과 계면활성제를 가한 후 coffee-mill로 건식 분쇄하여 제품으로 하였다.

2-2. 생물 검정 시험의 재료 및 방법

(본 시험 결과는 서울대학교 농업생명과학대학교 곤충병리실에서 수행되었음)

(1) 시험 약제

원제는 1g을 멸균된 3차 증류수 10ml에 희석하여 10% 용액으로 만들어 사용하였다. 시제품 8종은 각각 멸균된 3차 증류수 10ml에 1g의 약제를 희석하여 사용하였다.

(2) 대상 해충

서울대학교 위생곤충연구실 및 국립보건원 위생곤충 사육실에서 누대 사육중인

빨간집 모기(*Culex pipiens*)유충을 분양 받아 본 연구실에서 대량 사육하여 3령 유충을 실험에 사용하였다.

(3) 생물검정 방법

원제와 8종의 제제를 강하게 흔들어진 후 각각 1ml씩 취하여 9ml의 멸균된 3차 증류수를 담은 15ml 코니칼 튜브 (Falcon Co.,USA)에 넣었다. 각 약제를 vortexing (30초)과 inverting (20번)을 통하여 충분히 혼합시킨 후 1000 ppm까지 희석한 다음 다시 200 ppm에서 0.064 ppm까지 6개의 농도구를 만들었다. 24 well plate (Nunc, Co., Denmark)에 3령 모기유충을 10마리씩 넣은 후 각각의 희석액을 1ml씩 넣고 3반복하여 25 °C 사육 상에 두고 24시간에서의 살충효과를 조사하였다. (표3)

3. 연구수행 결과 및 고찰

(1) 제제 연구 결과

표 1. 제제 처방 검토 결과

원부제명	용도 제형	처방 1	처방 2	처방 3	처방 4	처방 5	처방 6	처방 7	처방 8
		FL	FL	FL	FL	FL	FL	WP	WP
Bti	원분	10	10	20	10	10	10	10	10
SAA 1	분산제	5	5	-	5	5	5	-	-
SAA 2	확전제	2.5	7	5	7	5	5	-	-
SAA 3	유화제	5	10	10	10	7	7	-	-
PAG	증점제	1	1	2	0.5	-	-	-	-
Oil 1	보조용제	45	37	-	37	33	10	-	-
Oil 2	증량제	R*	R	R	R	R	R	-	-
SAA 4	분산제							10	-
SAA 5	분산제							-	10
Kaolin	증량제							R	R
Total		100	100	100	100	100	100	100	100

* R : rest

SAA 1 : Naphthalene sulfonic acid, polymer with formaldehyde, sodium salt

SAA 2 : Polyoxyethylene nonylphenol

Castor oil, ethoxylated

Polyoxyalkylene styryl phenyl ether

Dodecylbenzene sulfonic acid calcium salt

Xylene

SAA 3 : Polyethylene glycol mono(tristyrylphenyl)ether
Dodecylbenzene sulfonic acid calcium salt
Sorbitan monooleate
Methyl oleate

PAG : Sepiolite

Oil 1 : Corn Oil

Oil 2 : Methyl oleate

SAA 4 : Nonylphenol ethoxylated, monoether with sulfuric acid ammonium salt
Lignosulfonic acid, sodium salt
Silicon dioxide

SAA 5 : Alcohols, (C12~14) ethoxylated, monoether with sulfuric acid sodium salt
Silicon dioxide

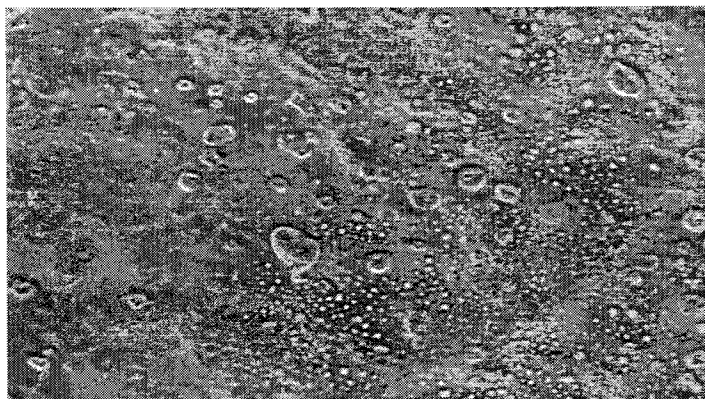


사진: 희석 전 처방 A

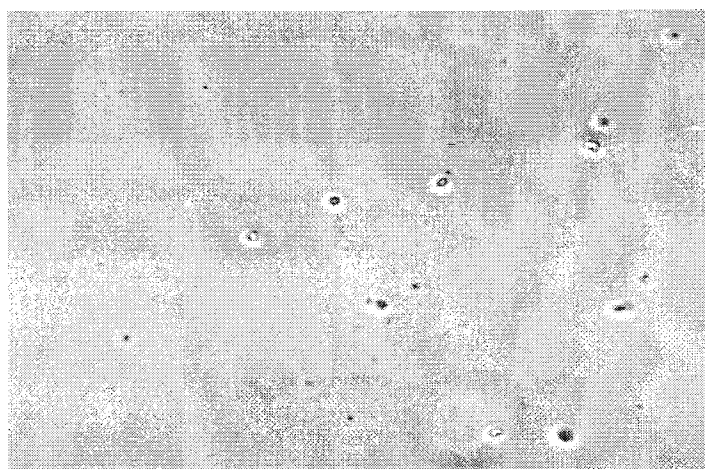


사진: 희석 후 처방 A

표 2. 처방별 물리성 검토 결과

	처방 No. 제형	처방 1 FL	처방 2 FL	처방 3 FL	처방 4 FL	처방 5 FL	처방 6 FL	처방 7 WP	처방 8 WP
물리성	수면부상성	양호	양호	침강	양호	양호	양호	침강	침강
	수면분산성	양호	양호	보통	양호	보통	양호	-	-
	수중분산성	양호	미흡	보통	보통	양호	양호	양호	양호
	수화성	양호	양호	양호	양호	양호	양호	양호	양호
	충분리현상	충분리	충분리	충분리	충분리	충분리	충분리	소량	-

(2) 생물 검정 결과

표 3. 모기 유충에 대한 처방별 살충 효과 결과

제제 종류	n	LC ₅₀ **	FL ₉₅ ***	Slope	비고
원분(10%)	180	5.22	3.26 ~ 8.34	2.07 ± 0.38	
처방 1	240	23.69	14.76 ~ 35.47	2.09 ± 0.25	
처방 2	240	1382.91	1074.62 ~ 1846.18	2.54 ± 0.31	
처방 3	240	10.05	6.79 ~ 14.28	2.62 ± 0.33	
처방 4	240	249.4	162.75 ~ 407.03	2.47 ± 0.29	
처방 5	180	> 200	-		
처방 6	180	71.36	46.04 ~ 112.44	2.46 ± 0.53	
처방 7	180	12.12	7.91 ~ 18.36	2.65 ± 0.56	
처방 8	180	10.17	6.47 ~ 15.61	2.48 ± 0.50	

* n 실험에 사용된 모기 유충수

** LC₅₀ (median lethal concentration) ppm

*** FL₉₅ (95% fiducial limits) ppm

고찰

- 1) 모기 유충의 섭식 형태에 부합하기 위하여 수면 부상성에 주안점을 두고 처방에 임하였다.
- 2) 비중이 높은 처방 3과 분말 형태의 처방 7, 8을 제외한 처방에서 수면 부상성을 얻을 수 있었다.
- 3) 증점제가 첨가된 처방에서는 제품의 유동성이 감소하여 약제처리시 엉김현상이 발생하였다.
- 4) FL 처방의 경우 수면 부상성과 확산성은 모든 처방에서 양호하였으나 보관 시 corn oil의 충분리 현상이 나타났다.

- 5) 처방 6의 경우 수면 부상성을 가질 수 있는 최저 양의 corn oil을 사용 하여 충분리 현상을 감소시켰다.
- 6) FL 처방 공히 우수한 수화성과 분산성을 보여 주었다.
- 7) 분말 상태인 WP 처방(처방 7,8)은 수면 부상성은 가지지 못하였지만 수면에서의 수화성과 수중에서의 분산성은 우수하였다
- 8) 종합적으로 약제가 수면에 부상하고 있을 때 유층의 섭식에 유리할 것이라 추측하였으나 수면 또는 수중에 고루 분산되어 있는 것이 섭식이 용이하였을 것이라 사료된다.
- 9) 상기의 제제 처방 결과와 생물 활성 결과를 종합하여 볼 때 일발처리제로 이용할 경우 액상 형태의 FL 처방 1과 6이 우수하였고 희석제 형태로 처리 할 경우 처방 8(WF)이 적당하리라 사료되었다.

제 5 절 Bt 계놈 분석 및 신호전달 물질 분해 효소 유전자

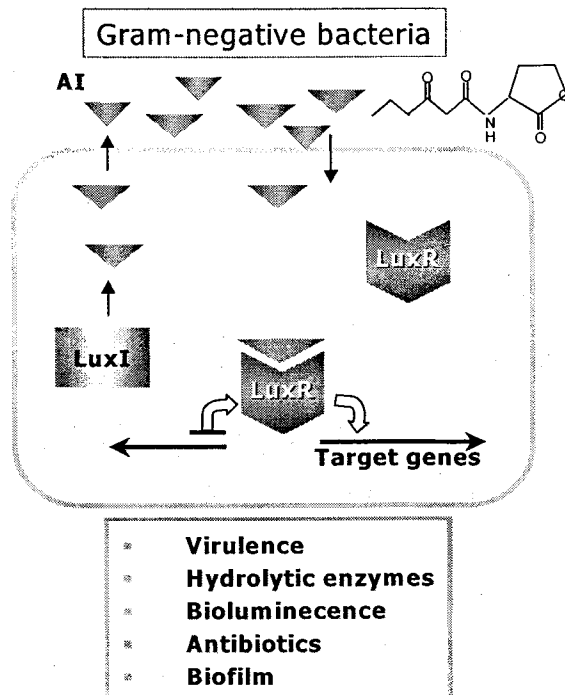
1. 연구배경

Bt 미생물 살충제의 생산성을 제고하고 다양한 *Bt* 산업균주 개발을 위해 *Bt* 균의 전체 계놈을 해석하는 일이 필요하다는 판단 하에 본 연구과제의 연구비 외에 주관연구기관에서 추가로 약 5억원의 연구비를 투입하여 *Bt* 균의 계놈 프로젝트를 진행하였다. 그 결과 많은 수의 toxin 관련 유전자와 유용 효소 유전자가 발견되었고 세계최초로 *Bt* 균주에 미생물 신호전달 물질 분해 효소 유전자가 존재함이 확인 되었다. 현재까지 *Bt* 균은 생물농약 균주로의 산업적 이용성만이 부각되어 왔는데 본 연구 결과로 식물 병원성 미생물의 신호물질 분해기능으로 식물 병원성 미생물 제어에도 사용될 수 있음을 보여준 결과라 할 수 있다.

미생물의 신호 전달 시스템

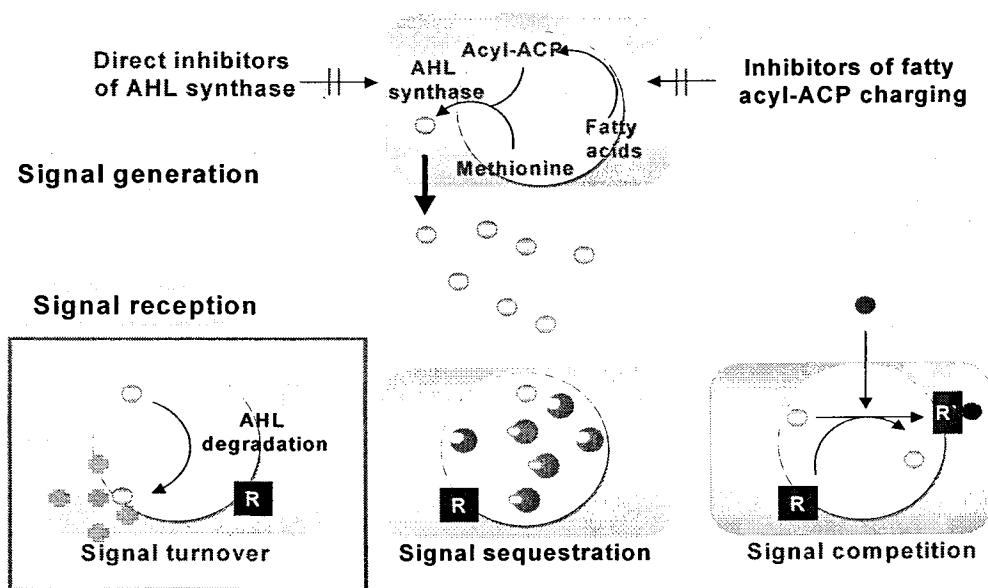
지금까지 농작물, 동물 등의 세균병을 제어하기 위해서 화학농약 및 항생제가 일반적으로 이용되어 왔다. 그러나 화학농약 및 항생제의 사용은 토양 및 체내의 약물잔류, 유용미생물 사멸, 항생제 내성 균주의 출현 등의 문제점을 안고 있다. 이러한 문제점들을 극복할 수 있는 한 방법으로서 병원성 미생물의 밀도인식 신호 전달 체계를 타겟으로 하는 새로운 방법이 대두되고 있다.

Quorum sensing (쿼럼 감지)이란 세균의 밀도에 의해서 신호물질의 농도가 결정되고, 이러한 농도에 의해 세포내 다양한 유전자의 발현이 조절되는 기작이다 (그림). 세균은 특정 환경에 적응하기 위하여 서로간에 신호물질로서 세포내 많은 유전자의 발현을 조절하고 있다. 그람음성세균에서 대표적인 신호물질은 N-acylhomoserine lactone (AHL) 계열의 화합물이며, AHL의 종류로는 OHHL(N- β -oxo-hexanoyl-L-homoserine lactone), OOHL(N- β -oxo-octanoyl-L-homoserine lactone), ODHL(N- β -oxo-decanoyl-L-homoserine lactone), HHL(N- hexanoyl-L-homoserine lactone), BHL (N-butanoyl-homoserine lactone) 등이 알려져 있다. 이러한 신호전달물질에 의해 조절되는 형질로는 protease와 같은 exo-enzyme의 합성, 항생제 합성, biofilm 분화와 다당류 및 이차대사산물 생산 조절 등 광범위하게 관련되어 있다. 특히 이러한 신호물질이 많은 동·식물의 세균병을 유발하는 병발 요소들의 발현을 유도하는 것으로 알려져 있다. 많은 그람음성

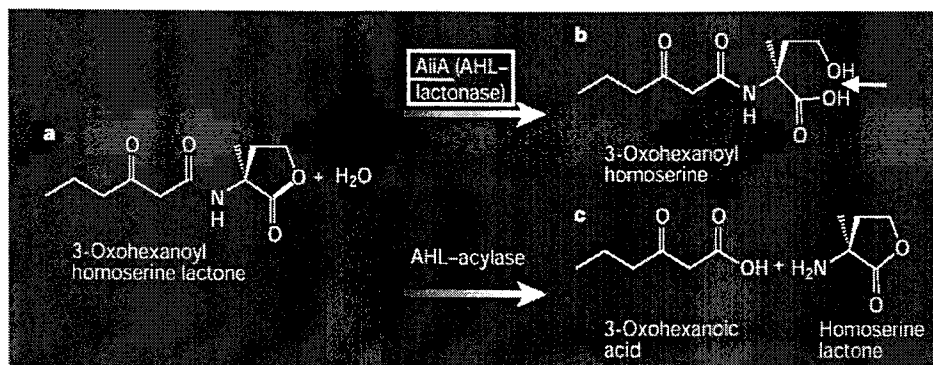


병원성 세균들이 병원성을 조절하기 위해 quorum sensing을 사용하기 때문에 병발 억제를 위해 quorum sensing을 차단하기 위한 방법들이 최근 연구되고 있다.

Quorum sensing을 차단하는 방법 중의 하나로 신호교란제로서 신호물질 (acylated homoserine lactone) 의 유사체 즉 길항제 (antagonists)를 이용할 수 있다. 대표적인 물질로 alga의 일종인 *Delisea pulchra*가 생산하는 대사산물인 halogenated furanone이 AHL-mediated gene expression을 저해할 수 있는 것으로 보고되어 있다. 두 번째 방법



으로 Quorum sensing 관련 target 단백질들의 새로운 inhibitor 개발이 target이 될 수 있다. 가장 유력한 신호전달 억제 방법으로 신호 물질 분해가 알려져 있고, 신호물질 분해 균주 및 효소의 개발을 통한 새로운 세균병 제어 기술 개발이 시도되고 있다.



최근 신호 물질을 탄소원으로 이용하여 성장하는 그람음성 세균인 *Varoiovorax paradoxus*가 토양에서 분리되었고, 이 균주는 aminoacylase를 이용하여 신호물질을 분해하는 것으로 알려졌다. 또한 *Bacillus cereus*군에 속하는 많은 종류의 *Bacillus* sp.에서 신호 물질을 분해하는 AHL-lactonase를 코딩하는 *aiiA* 유전자가 최근에 보고 되었다

*B. thuringiensis*는 여러 곤충 목(目)과 선충 및 원생동물에 대하여 고도의 특이성과 독성 수준을 지닌 살충성 결정단백질인 델타내 독소를 생성하는 것으로 알려져 있다. *B. thuringiensis*의 이러한 특성을 활용하여 농작물 및 산림해충, 동물 및 인간질병 매개충의 생물학적 방제를 위한 환경친화적 생물살충제가 활용되고 있다. *Bacillus cereus*군에 속하는 *B. thuringiensis* 아종 *morrisonia*에 대한 genome project를 진행 하는 중에 *aiiA* 유사 유전자의 존재를 genome data base를 통해 확인하였다. 그래서 보유하고 있는 16 *B. thuringiensis* 아종균들에 대한 신호 물질 분해 유전자와 분해능을 확인하였고, 이들 균주들을 이용한 식물 병원성 세균의 제어 가능성을 조사하였다.

2. 실험방법

(1) Bt genome sequencing 및 분석

B. thuringiensis HD12 균주의 genomic DNA를 sonicator로 단편화한 뒤 mung bean nuclease로 처리하여 단편의 끝을 평할 말단으로 전환시킨 다음 agarose gel 전기영동하여 2.5-3kb 사이의 DNA 단편을 분리 정제 하였다. 벡터는 pGEM3Zf(+) 플라스미드를 *Sma*I로 절단한 뒤 dephosphorylation 하여 insert DNA와 연결하여 *E. coli* DH5 α 에 electroporation으로 형질전환 하

였다. 플라스미드 DNA는 alkaline lysis method와 glass fiber filter plate (Whatmann)을 이용하여 분리 정제하였다.

모든 DNA sequencing은 ABI Prism 3700 DNA analyzer와 Big Dye terminator kit를 이용하였다. 염기서열을 결정하고 나온 결과를 Phred/Phrap sequence assembly program을 이용하여 contig assembly를 수행하였다. Gap 부분은 primer를 새로 합성하여 염기서열을 결정하였다. Contig assembly 결과 나온 시퀀스는 (주)스몰소프트의 Gene prediction 소프트웨어와 in-house DNA/Protein DB를 이용하여 분석하였다.

(2) Bioassay

30°C, LB배지에서 24시간 동안 배양한 *Chromobacterium violaceum* CVO26 또는 *Agrobacterium tumefaciens* NT1(pDCI41E33)을 LB-고체배지 위에 overlay 하였다. LB 플레이트에 hole을 만든 다음, hole에 배양시간대 별로 채취한 배양액 시료 20 μ l를 올려 놓았다. 상기 bioassay용 고체배지를 30°C에서 24시간 배양한 다음, hole 주변에 생긴 푸른색의 바이올라세인 존(violacein zone)의 직경을 구하여 AHL의 잔존량을 측정하였다.

(4) 신호전달물질 분해 활성 측정

AHL에 속하는 기질 중에서, BHL(N-butanoyl-L-homoserine lactone), OHL(N-octanoyl-L-homoserine lactone), DHL(N-decanoyl-L-homoserine lactone) 및 OdDHL(N-3-oxododecanoyl-lactone)은 Quorum Sciences사에서 구입하여 사용하였으며, HHL(N-hexanoyl-L-homoserine lactone)과 OHHL(N-3-oxohexanoyl-L-homoserine lactone)은 종래 알려진 방법(Zhang, L., P. J. Murphy, A. Kerr, and M. E. Tate. 1993. *Agrobacterium* conjugation and gene regulation by N-acyl-L-homoserine lactones. Nature (London) 362:446-448)에 따라 직접 합성하여 사용하였다.

전체 세포 분석(whole cell bioassay)을 위해, 하룻밤 배양된 IBN110 균주를 회수(harvest)하여 100mM Tris-HCl(pH 7.0)에 OD₆₀₀=1.0이 되도록 재현탁하였다. 세포현탁액 50 μ l와 40mM AHLs 용액 50 μ l를 혼합하고, 천천히 교반하면서 30°C에서 3시간 배양한 후, 배양액을 95°C에서 5분간 가열하여 반응을 중지시켰다.

반응이 중지된 배양액을 적당한 농도로 희석시킨 다음, *A.tumefaciens* NT1(pDCI41E33)-overlaid plate나 *C.violaceum* CVO26-overlaid plate의 홀에 로딩하여

추가배양한 다음 color zone의 크기를 측정하였다.

3. 실험 결과 및 고찰

(1) Bt genome 분석

염기서열을 결정하고 나온 결과를 Phred/Phrap sequence assembly program을 이용하여 contig assembly를 수행한 결과 1,000 여개의 contig를 확보할 수 있었다. 이 contig sequence를 (주)스몰소프트의 Gene prediction 소프트웨어와 in-house DNA/Protein DB를 이용하여 분석하였다.

```
GenoTech/SmallSoft:Homology analysis

Total files = 1103
[CG] category](416)
[mismatched files](687)

(Sorted by BLAST score)

[BT.Contig1002]
[CG] [23] : (0.000000e+00) cell-division protein [Staphylococcus

[BT.Contig1008]
[CG] [1] : (0.000000e+00) ABC transporter (ATP-binding protein)

[BT.Contig1017]
[CG] [34] : (0.000000e+00) class III stress response-related ATPase

[BT.Contig1020]
[CG] [15] : (0.000000e+00) similar to hypothetical proteins [Bacillus

[BT.Contig1030]
[CG] [21] : (0.000000e+00) adenylosuccinate lyase [Bacillus subtilis]

[BT.Contig1032]
[CG] [20] : (0.000000e+00) menaquinol:cytochrome c oxidoreductase

[BT.Contig1039]
[CG] [14] : (0.000000e+00) valyl-tRNA synthetase [Bacillus subtilis]

[BT.Contig1059]
[CG] [4] : (0.000000e+00) ATP-dependent Clp protease proteolytic

[BT.Contig1074]
[CG] [7] : (0.000000e+00) formate acetyltransferase [Staphylococcus

[BT.Contig1075]
[CG] [15] : (0.000000e+00) glutamyl-tRNAGln amidotransferase subunit B

[BT.Contig1077]
[CG] [13] : (0.000000e+00) similar to malate dehydrogenase [Bacillus
```

이중 BT toxin을 중심으로 Bt 균주의 특이적 유전자를 분석하여 선별하였다. 분석 결과

다수의 toxin 유전자가 발견되었고 특이할만한 유전자는 현재까지 Bt 균주에서 발견된 적이 없는 미생물 신호전달물질 분해 효소인 acyl homoserine lactonase 유전자가 존재함이 확인되었다. 이는 Bt 균주의 상업적 이용가능성을 높여주는 결과이므로 이 유전자의 실재 활성을 검증하는 실험을 실시하였다.

Gene	Gene
Bacillus thuringiensis subsp. aizawai Cry1D (cry1Da1) gene	Bacillus thuringiensis insecticidal crystal protein (NRcryV) gene
Bacillus thuringiensis cryID gene	Bacillus thuringiensis insecticidal crystal protein (NRcryV) gene
Bacillus thuringiensis plasmid encoded Cry1Ba (cry1Ba) gene	Bacillus thuringiensis insecticidal crystal protein (NRcryV) gene
B.thuringiensis DNA for pseudooperon cryX-cryIG	Bacillus thuringiensis insecticidal crystal protein (NRcryV) gene
Bacillus thuringiensis subsp. entomocidus delta-endotoxin Cry1Ba2	Bacillus thuringiensis wuhanensis insecticidal crystal protein CryH2
Bacillus thuringiensis protoxin (cry1Ac) gene	Bacillus thuringiensis wuhanensis insecticidal crystal protein CryH2
Bacillus thuringiensis subsp. morrisoni crystal protein Cry1Fb	Bacillus thuringiensis subsp. entomocidus delta-endotoxin Cry1Ba2
Bacillus thuringiensis serovar leesis vegetative insecticidal protein	Bacillus thuringiensis wuhanensis insecticidal crystal protein CryH2
Bacillus thuringiensis protoxin (cry1Ac) gene	Bacillus thuringiensis wuhanensis insecticidal crystal protein CryH2
Bacillus thuringiensis insecticidal crystal toxin Cry1K (cry1K) gene	Bacillus thuringiensis insecticidal crystal protein (NRcryV) gene
Bacillus thuringiensis subsp. finitimus Cry26Aa1 protein (cry26Aa1)	Bacillus thuringiensis insecticidal crystal protein (NRcryV)
Bacillus thuringiensis plasmid pBTC19 CryII (cryII) gene	B.thuringiensis cry19Aa gene & ORF2
Bacillus thuringiensis insecticidal crystal protein (NRcryV) gene	Bacillus thuringiensis subsp. entomocidus delta-endotoxin Cry1Ba2
Bacillus thuringiensis protoxin (cry1Ac) gene	Bacillus thuringiensis wuhanensis insecticidal crystal protein CryH2
Bacillus thuringiensis crystal protein (cryI ETS) gene	Bacillus thuringiensis crystal toxin gene
Bacillus thuringiensis wuhanensis insecticidal crystal protein CryE1	Bacillus thuringiensis insecticidal crystal protein (NRcryV) gene
PESTICIDIAL CRYSTAL PROTEIN CRY1HB	Bacillus thuringiensis insecticidal crystal protein (NRcryV) gene
Bacillus thuringiensis protoxin (cry1Ac) gene	Bacillus thuringiensis insecticidal crystal protein (NRcryV) gene
Bacillus thuringiensis alesti delta endotoxin gene	Bacillus thuringiensis cryID gene for insecticidal crystal protein
B.thuringiensis DNA for pseudooperon cryX-cryIG	Bacillus thuringiensis insecticidal crystal protein (NRcryV) gene
Bacillus thuringiensis plasmid pBTC19 CryII (cryII) gene	Bacillus thuringiensis wuhanensis insecticidal crystal protein CryH2
Bacillus thuringiensis plasmid pBTC19 CryII (cryII) gene	Bacillus thuringiensis subsp. entomocidus delta-endotoxin Cry1Ba2
Bacillus thuringiensis subsp. aizawai Cry1D (cry1Da1) gene	B.thuringiensis cryIBC gene for delta-endotoxin
Bacillus thuringiensis crystal protein (cry2) gene	Bacillus thuringiensis insecticidal crystal protein (NRcryV) gene

(2) Bt균에서 aii A 유전자의 존재확인 및 단백질 아미노산서열 결정

HD12 Bt 균주에서 신호전달물질 분해효소 유전자가 발견되었으므로 다른 Bt균주에서도 존재하는지 확인하기 위하여 해충방제용으로 활용되는 *Bacillus thuringiensis*에 속하는 아종 16 균주를 입수하고 유전자 유무를 확인하였다. 각각의 콜로니로부터 염색체 DNA를 추출하고 다음과 같은 서열을 갖는 프라이머를 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. 밑줄친 코돈이 각각 개시코돈과 종결코돈이다. 상기 프라이머는 *Bacillus* sp. 240B1 으로부터 AHL분해를 촉매하는 효소의 유전자인 *aiiA*(서열 3)를 참조하여 구성하였다.

AIF 프라이머 : 5'-TAAATG TAAAGGTGGATACATAATGGACAGT

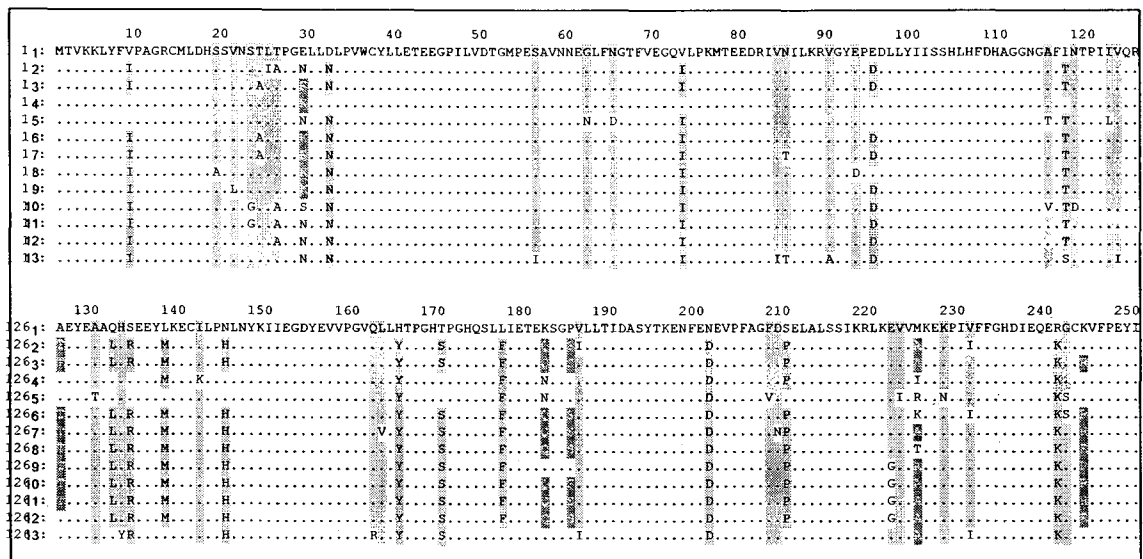
AIR 프라이머 : 5'-AGCTCATGACTTTTTGCACTATATATA

증폭된 DNA를 pT7BlueT-vector (TaKaRa Corp.)에 옮겨서 DNA sequencing을 의뢰하여, 염기서열을 결정하였다. 각각의 염기서열을 GenBank/EMBL database에 등재하였다. 실험된 아종의 명칭, 아종의 HD code, 각각의 DB 번호(access number) 및 각각의 아미노산 서열을 표 1에 나타내었다.

【표 1】

참고번호	아종명	HD code	DB. 번호	서열 번호
1	<i>aizawai</i>	HD11	AF478045	서열 4
2	<i>alesti</i>	HD4	AF478046	서열 5
3	<i>canadensis</i>	HD224	AF478047	서열 6
4	<i>damstadiensis</i>	HD146	AF478048	서열 5
5	<i>galleriae</i>	HD29	AF478049	서열 7
6	<i>indiana</i>	HD521	AF478050	서열 4
7	<i>israelensis</i>	HD567	AF478051	서열 5
8	<i>kurstaki</i>	HD263	AF478059	서열 4
9	<i>kyushuensis</i>	HD541	AF478052	서열 8
10	<i>morrisoni</i>	HD12	AF478053	서열 5
11	<i>ostrinae</i>	HD501	AF478054	서열 9
12	<i>pakistani</i>	HD395	AF478055	서열 10
13	<i>subtoxicus</i>	HD109	AF478056	서열 11
14	<i>thompsoni</i>	HD542	AF478057	서열 5
15	<i>tolworthi</i>	HD537	AF478060	서열 12
16	<i>toumanoffi</i>	HD201	AF478058	서열 13

상기 아종들을 유전자 분석하여 *aiiA*와 상동성이 있는 유전자의 존재를 확인한 결과 입수된 모든 아종에서 *aiiA* 상동유전자가 발견되었다. 그 상동성은 아종에 따라 다소 차이가 있어서 핵산의 염기서열로 89~95%이고, 단백질의 아미노산서열로 90~96%였다. 본 발명에 의한 방법으로 해충방제용 *Bacillus thuringiensis* 균주는 AHL을 분해하는 효소의 유전자를 염색체상에 가지고 있음을 알 수 있었다.



1, *Bacillus* sp. strain 240B1; 2, *B. anthracis* Ames strain; 3, *Bacillus* sp. strain IBN35 isolated from soil; 4, *B. thuringiensis* subsp. *toumanoffi* HD201; 5, *B. thuringiensis* subsp. *kyushuensis* HD541; 6, *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* HD11, *B. thuringiensis* subsp. *indiana* HD521, and *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD263; 7, *B. thuringiensis* subsp. *galleriae* HD29; 8, *B. thuringiensis* subsp. *ostrinae* HD501; 9, *B. thuringiensis* subsp. *subtoxicus* HD109; 10, *B. thuringiensis* subsp. *pakistanii* HD395; 11, *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* HD537; 12, *B. thuringiensis* subsp. *canadensis* HD224; 13, *B. thuringiensis* subsp. *alesti* HD4, *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* HD146, *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* HD567, *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* HD12, and *B. thuringiensis* subsp. *thompsoni* HD542. Numbers 6 and 13 contain multiple conserved sequences.

Fig. Sequence alignment of putative AHL-degrading enzymes from various subspecies of *B. thuringiensis*

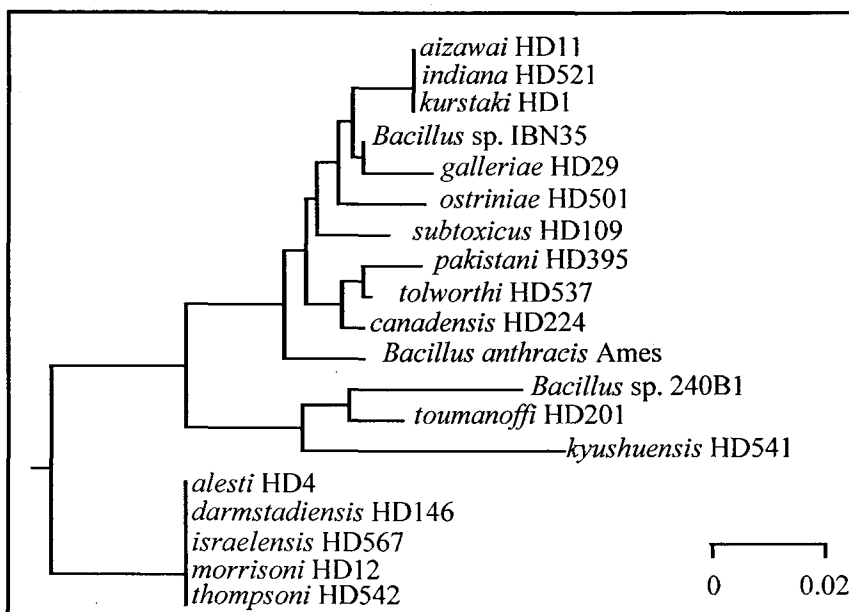


Fig. Phylogenetic dendrogram of AHL-degrading enzymes

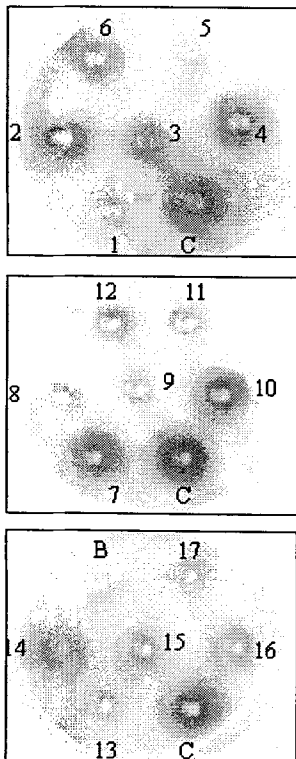
(3) Bt 균주의 AHL분해능

B. thuringiensis 여러 아속들이 실제 AHL을 분해할 수 있는지를 확인하였다. 균주들을 배양하고 균체를 수득하여, 2mM 의 ZnSO₄ 를 포함한 200mM MES buffer (pH 6.5) 에 OD₆₀₀=1.0가 되도록 현탁시켰다. 세포현탁액 40 μl와 OHHL(N-β-oxo-hexanoyl-L-homoserine lactone)을 1600 pmoles 함유한 용액 가지는 40 μl를 혼합하였다. 혼합액을 37°C 에서 1시간동안 반응시킨 다음 95°C에서 5분동안 가열하여 반응을 중지시켰다.

OHHL을 분해하여 발색반응을 유발하는 미생물 *C. violaceum* CV026이 배양된 고체 배양 플레이트(CV026-overlaid plate)에 홀을 형성한 후 상기 반응액 20 μl를 홀에 접종 (loading)하였다. 플레이트를 30°C에서 12시간 배양하였다.

각 홀에서의 발색도를 확인하여 도 1 사진을 도시하였고, 표 2에 상대적인 비발색도 즉, 상대적인 AHL 분해능을 나타내었다.

【표 2】



No.	Strain	HD code	Relative AiiA activity
1	<i>aizawai</i>	HD11	+++
2	<i>alesti</i>	HD4	+
3	<i>canadensis</i>	HD224	++
4	<i>dermstadiensis</i>	HD146	+
5	<i>galleriae</i>	HD29	+++
6	<i>indiana</i>	HD521	++
7	<i>israelensis</i>	HD567	+
8	<i>kurstaki</i>	HD1	+++
9	<i>kyushuensis</i>	HD541	+++
10	<i>morrisoni</i>	HD12	+
11	<i>ostrimiae</i>	HD501	+++
12	<i>pakistani</i>	HD395	++
13	<i>subtonicus</i>	HD109	+++
14	<i>thompsoni</i>	HD542	+
15	<i>tebworthi</i>	HD537	++
16	<i>toumanoffi</i>	HD201	++
17	<i>Bacillus</i> sp. IBN35*	-	+++

도 및 표에서 볼 수 있듯이, 모든 아종이 상당한 정도의 AHL 분해능을 보였으며, 특히 *aizawai*, *galleriae*, *kurstaki*, *kyushuensis*, *ostrinae*, 및 *subtoxicus*는 매우 강한 AHL 분해능을 보였다.

이 결과로 보아, Bt 균주들이 아실화 호모세린 락톤을 분해 효소를 보유하고 있음을 확인할 수 있었다.

(4) AiiA 과잉발현하는 재조합 대장균의 제조와 AHL분해능

B. thuringiensis 아종에서 AHL 분해능을 가지는 효소의 유전자를 클로닝하여 대장균에 도입하고 AHL 분해능을 조사하였다. 아종 *morrisoni*와 *kyushuensis*로부터 다음과 같은 서열을 갖는 프라이머를 이용하여 *aiiA* 유전자를 증폭하였다.

5'-CCCCATATGACAGTAAAAAAGCTTTA 서열 14

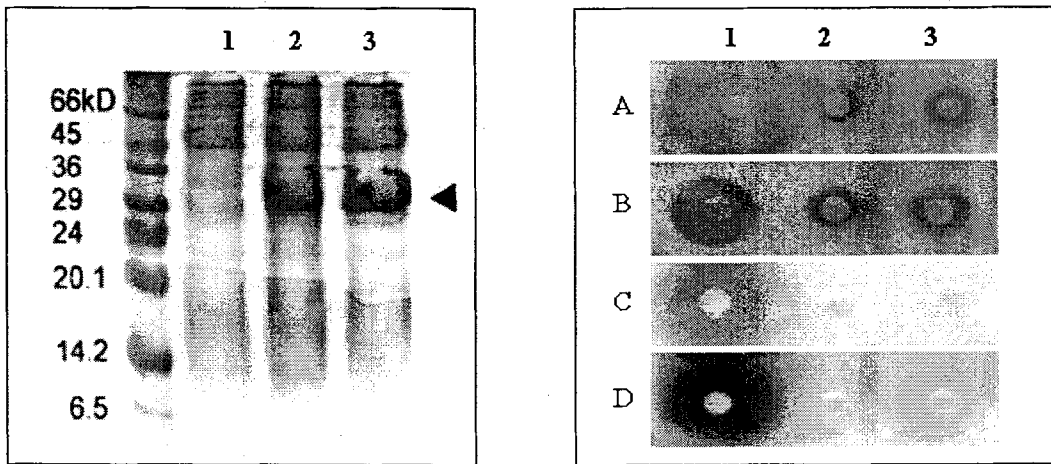
5'-GGGCTCGAGTATATACTCCGGAACA 서열 15

서열 중 밑줄친 부분이 각각 *NdeI* 및 *XhoI* 가 인식하는 restriction site이다.

증폭된 유전자를 *NdeI* 과 *XhoI*로 digestion 하고, 사전에 *NdeI*와 *XhoI*로 자른 pET22b(+) vector (Novagen)에 삽입하였다. 결과산물인 *aiiA* 발현벡터를 각각 pETAIM 와 pETAIK로 명명하였다. 상기 발현벡터로 *E. coli* BL21(DE3)를 형질전환하여 AHL 분해효소인 AiiA를 대량발현하는 재조합 대장균을 제조하였다. *E. coli* carrying pET22b(+); 1, *E. coli* carrying pETAIK; 2, *E. coli* carrying pETAIM. 재조합 대장균을 LB 배지에서 배양하여, OD600=0.7이 될 때 IPTG induction하여 3시간후에 세포를 회수하여, 300 μ l의 MES buffer에 재현탁시켰다. 상기 현탁액에 20 M의 AHL을 종류별 (OHHL, HHL 및 OHL로 40 μ l씩 가한 후 혼합액을 37°C 에서 1시간동안 반응시킨 다음 95°C에서 5분동안 가열하여 반응을 중지시켰다. 이어서 반응액내의 AHL의 농도가 OHHL의 경우 0.5pmoles, OHL의 경우 25pmoles, HHL의 경우 30pmoles이 되도록 희석한 다음 각각을 *A. tumefaciens* NT1-overlaid plate와 CV026-overlaid plate의 홀에 접종 (loading)하였다. AHL이 잔존함에 따라 CV026의경우는 보라색, NT1의 경우는 파란색이 발색되는 원리를 이용하여 AHL의 분해능을 조사하였다. 그림에서 A, B, C 및 D는 각각 OHL, OHHL, HHL 및 OHHL을 가한 균을 나타낸다. 그림에서 N은 AHL 분해효

소 유전자가 없는 pET22b(+) 벡터를 가지는 대장균, pETAIK로 형질전환된 대장균, 2는 pETAIM으로 형질전환된 대장균을 이용한 것을 나타낸다.

그 결과, 그림에서 볼 수 있듯이, *aiiA* 유전자를 발현벡터에 삽입시켜 만든 AiiA 대량 발현 재조합 대장균은 여러 가지 AHL을 효과적으로 분해하는 것으로 확인되었다. 이로써, *B. thuringiensis*의 여러 가지 아속이 가지고 있는 *aiiA* 유전자는 AHL을 분해하는 효소의 유전자라는 것을 알 수 있다.

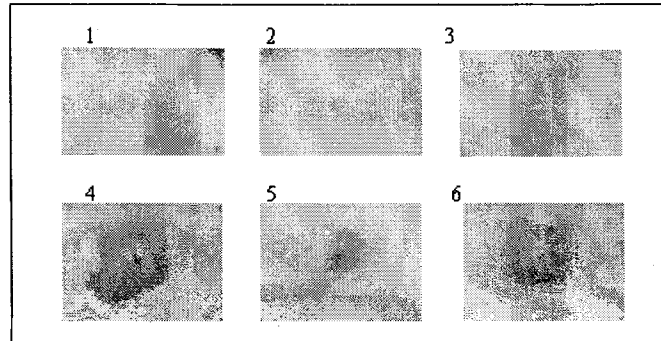


1, *E. coli* carrying pET22b(+); 2, *E. coli* carrying pET22b(+)-*aiiA* (*kyushuensis*); 3, *E. coli* carrying pET22b(+)-*aiiA* (*morrisoni*). The arrow indicates the bands of recombinant AiiA proteins. OHL, OHHL, HHL, and OHHL were used as substrates for A, B, C, and D, respectively. The reporter strain for A and B was *A. tumefaciens* NT1 (pDCI41E33); that for C and D was *C. violaceum* CV026.

(5) 해충방제용 *Bacillus*속 미생물의 그람음성 미생물의 병원성 감쇠

상기 해충방제용 Bt 균주의 병원성 미생물 제어 능력을 알아보기 위해 감자무름병 병원성 균주인 어위니아 카로도보아(*Erwinia carotovora*)에 적용하였다.

E. carotovora IBN98균주를 OD₆₀₀=1.0까지 배양하고 saline solution (0.15M NaCl)으로 희석하였다. 이와는 별도로 해충방제용 *Bacillus thuringiensis*에 속하는 아종 미생물을 배양하여 역시 saline solution으로 재현탁하였다. *Erwinia carotovora* IBN98 (OD₆₀₀=0.05)과 해충방제용 *Bacillus*속 미생물 (OD₆₀₀=5)를 동일 부피로 혼합한 후 혼합액 20 μl를 감자 조각에 접종하였다. 접종된 감자 조각을 30℃에서 18시간동안 방치한 결과, 감자무름병이 현저하게 감소함을 확인하였고, 이에 해충방제용 *Bacillus*속 미생물이 병원성 미생물을 제어하는 것을 확인하였다.



1, saline solution; 2, *E. coli* carrying pET22b(+)-*ahhA* (*kyushuensis*); 3, *E. coli* carrying pET22b(+); 4, *E. carotovora* ; 5, mixture of *E. carotovora* and *E. coli* carrying pET22b(+)-*ahhA* (*kyushuensis*); 6, mixture of *E. carotovora* and *E. coli* carrying pET22b(+).

본 연구결과 병원균의 밀도인식 신호물질인 AHL을 분해하는 유전자가 해충방제용 *Bacillus*속 미생물에 폭 넓게 존재하고, 이로 인해 Bt균을 이용하여 그람음성 병원성 미생물을 생물학적으로 제어할 수 있을 것으로 사료된다.

이러한 병원성 미생물 제어에 해충방제용 Bt 균주를 이용한 생태학적 접근 방법은 기존의 생화학적 병원성 미생물 제어의 문제점인 농약의 잔류 및 항생제 내성 등을 해결하면서 효과적이고 환경 친화적인 병원성 미생물 제어방법으로 매우 효과적일 것이다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

가) 외국 기업에 기술이전

세계적 생물농약 전문기업인 미국의 마이코젠사에 *Bt* 균주 및 유전자 관련 기술을 1998년 10만불에 수출하였다.

나) 모기유충에 살충활성이 있는 *Bti* 균주의 환경 친화적 개량

*Bti*가 생산하는 독소단백질 중 CytA는 다른 독소단백질에 비해 살충활성 특이성이 적으며 적혈구를 파괴하는 용혈활성을 가지고 있다. 따라서 *Bti*를 사용함으로써 생기는 부작용에 대한 보고는 아직 없지만 잠재적 위험요소를 가지고 있다. 이러한 위험요소를 제거하기 위하여 *Bacillus subtilis* 유래의 cellulase를 *Bti*의 *cytA* 유전자 중간에 도입함으로써 *Bti* 균주에 cellulase의 활성을 강화시킴과 동시에 CytA 독소단백질 생성을 억제하는 균주를 제작하였는데 cellulase가 *Bti*의 DNA 내로 도입됨으로써 유전자의 안전성을 향상시켰고 in vivo recombination 기법을 도입하여 항생제 내성 유전자 등 외래의 DNA 조각을 제거함으로써 환경친화적인 균주를 제작하였다.

다) *Bti* 균주의 사료첨가 가능성 확인

모기는 사람 뿐만 아니라 가축에게도 심각한 피해를 입히는데 축사 등에서 모기를 제어하는 특별한 수단이 없다. 가축의 분변이 오염된 축사 근처의 물에서 주로 모기유충이 서식하고 있는데 각각의 물웅덩이에 일일이 살충제를 뿌리기에는 너무 많은 노력이 따라야 한다. 만약 가축의 분변 속에 *Bt* 독소단백질이 포함되어 있다면 효과적인 모기 방제가 될 것이다. 본 연구에서 제작된 모니터링용 *Bti* 균주를 이용한 현장적용 실험에서 돼지의 사료에 섞여 먹었을 때 90% 이상이 돼지의 장을 통과하는 동안 생존하여 분변을 통해 배출되었고 배출된 *Bt*는 모기 유충에 대해 살충력을 나타냄을 확인하였다. 따라서 *Bt*를 사료첨가제로 개발하여 적용하면 축사에서의 모기를 효과적으로 제어할 수 있을 것이다.

라) 포자형성 조절인자 발견

Bt 독소단백질은 포자형성 과정에 의존적으로 생산되기 때문에 포자형성을 조절

하면 *Bt* 독소단백질의 생산성을 조절할 수 있게 된다. 포자형성 조절기작은 고초균의 경우 잘 알려져 있는데 두가지 단백질-RapA와 PhrA-이 포자형성의 초기과정을 조절하는데 중요한 역할을 담당하고 있다. 그러나 고초균을 제외한 포자형성 그람양성균에서 이러한 *rapA* 및 *phrA*와 유사한 유전자는 아직 보고되지 않았으며 알려진 게놈정보에서도 상동성을 가진 유전자는 발견되지 않았다. 본 연구에서 이러한 RapA 및 PhrA와 비슷한 역할을 *Bt* 내에서 담당하고 있다고 생각되는 유전자를 찾았으며 이 유전자들의 특성을 분석한 결과 포자형성을 조절하는 기능이 있음을 확인하였다. 포자형성과 관련된 것으로 독소단백질의 생산 이외에 분비효소 및 항생제 등이 있는데 이러한 것들의 생산성을 높이는 일에 본 연구의 결과가 응용될 수 있을 것이다.

마) *Bt* 게놈 초안 완성

Bt 미생물 살충제의 생산성을 제고하고 다양한 *Bt* 산업균주 개발을 위해 *Bt* 균의 전체 게놈을 해석하는 일이 필요하다는 판단 하에 본 연구과제의 연구비 외에 주관연구기관에서 추가로 약 5억원의 연구비를 투입하여 *Bt* 균의 게놈 시퀀싱을 수행하였다. 그 결과 전체 게놈의 95% 정도를 해독 완료하였는데 *Bt* 균이 생산하는 다양한 독소단백질, 효소, 2차 대사산물 등을 생산하는 유전자를 확인하였고 현재 각 유전자들에 대한 특성을 분석 중이다.

바) *Bt* 균의 항균활성 확인

현재 주관연구기관에서 진행중인 생물농약 균주 *Bacillus thuringiensis* 의 genome 분석 중 cryptic 하게 존재하고 있는 새로운 신호물질 분해 유전자를 발견하여 대장균에 발현시키고, 재조합 대장균을 이용한 실험에서 무름병을 억제할 수 있어 살충제로서의 기능뿐만 아니라 살균제로서의 개발가능성에 대한 결과를 특허출원 [바실러스 튜링기엔시스 균주를 이용한 질병 제어방법, 대한민국 특허출원 제 1020020017167호, 출원일 2002. 4. 10]하고, 그 내용은 미국미생물학회에서 발간하는 *Applied and Environmental Microbiology* 저널의 2002년도 8월호에 게재되었다 [Lee, S.J., Park, S.Y., Lee, J.J., Yum, D.Y., Koo, B.T. and Lee J.K. (2002) "Genes Encoding the *N*-Acyl Homoserine Lactone Degrading Enzyme

Are Widespread in Many Subspecies of *Bacillus thuringiensis*" *Appl. Environ. Microbiol.* 68(8) 3919-3924].

사) 위생해충 제어용 *Bti* 미생물제의 현장적용 시험 및 최종 제품 개발

모기 유충의 섭식 메카니즘에 부합하기 위하여 약제처리 후 수표면에 부상하여 확산 할 수 있는 여러 조합의 유제형태로 제제화하고 국내 현실에 적합한 위생해충 제어용 *Bti* 제형의 선정 및 시제품 제작하였다 (Spec.: 수면부상성제제, 700 IU/mg).

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

가. 기술적 효과

- *Bt* 전체 개념의 초안이 완성되었으므로 *Bt* 균주 유래의 다양한 효소나 물질을 탐색할 수 있게 되었고 다양한 산업균주의 개량과 여러 형태의 *Bt*제 개발을 위한 토대를 마련했다고 할 수 있다.
- *Bt*의 포자가 동물의 장을 통과해서 생존할 수 있는 능력을 확인하였는데 이는 사료첨가제로서 개발될 가능성이 있다는 것을 시사한다. 따라서 좀더 큰 시장인 사료첨가제 시장으로의 진출을 위한 *Bt*제의 추가연구를 위한 가능성을 확인하였다.
- 포자를 형성하는 그람양성 세균에서 포자형성을 조절하는 유전자를 발견하였는데 이를 이용하여 *Bt* 균주의 독소단백질 생산성을 조절할 수 있을 뿐만 아니라 바실러스 균에서 생산되는 여러 가지 분해 효소 및 항생제 등도 역시 포자형성 기작에 밀접하게 관련되어 있기 때문에 이들의 생산성을 조절하는 데도 매우 유용하게 적용할 수 있을 것이다.
- 다양한 고농도 유기성 폐기물의 반 연속 액상 발효를 통한 생물학적 전환 장치 및 공정 특허를 등록하였는데 이 기술은 *Bt* 균주의 대량배양 뿐만 아니라 다른 유용한 바실러스 균주의 대량배양에도 유용하게 적용될 수 있을 것이다.
- *Bt* 균주는 독소단백질에 의한 살충활성 뿐만 아니라 세포간 신호전달 물질을 억제하는 효소를 생산함으로써 살균활성이 있음을 확인하였다. 이는 *Bt* 균주가 농업용 뿐만아니라 의약용으로도 사용될 수 있음을 의미한다.

나. 경제적 효과

- 최근 모기에 의한 질병이 계속 증가 추세에 있는데 이로 인한 사회적 비용도 큰 폭으로 증가하고 있다. 따라서 모기 유충 방제를 위한 *Bt*제의 개발은 이러한 비용을 감소시켜 궁극적으로 국가경제에 이바지하게 될 것이다.
- 일반적인 화학농약은 모기뿐만 아니라 다른 어류 및 사람에게도 해롭기 때문에 무분별한 사용은 생태계에 미치는 영향이 적지 않다. 따라서 생태계에 안전한 *Bt* 살충제의 확대보급으로 생태계 복원에 들어가는 국가적 비용을 감소시킬 수 있다.
- *Bt*제의 국내생산으로 계속적인 증가추세에 있는 *Bt* 수입제품의 대체효과를 기대할 수 있다.

- 본 연구의 결과에서 *Bt*제는 단순한 생물농약으로서의 역할 뿐만 아니라 사료첨가제 및 의약품 치료제로서의 가능성을 보여 주었으므로 차후에 *Bt*제의 시장이 대폭 확대될 수 있는 가능성을 열어놓았다.
- 본 연구성과를 바탕으로 산업적, 경제적 대량생산 기술을 개발하여 국내 생물농약 시장의 활성화와 수입대체 효과를 획득하며 나아가 브라질, 중국, 동남아 등의 시장에 진출할 수 있는 계기를 만들고자 한다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

Bacillus thuringiensis (*Bt*)는 포자를 형성하는 그람양성 세균으로써 세포성장 정지기에 단백질로 구성된 내독소 결정체를 만든다. *Bt*의 살충성은 이 내독소에 의해 결정되는데 이들 독소단백질은 나비목, 파리목, 딱정벌레목 등 다양한 곤충에 선택적 독성을 가지는 것으로 잘 알려져 있다 (Schnepf et al., 1998). 이 독소단백질들은 해충의 유충에 의해 섭취되어 유충의 중장에 용해된 다음 중장의 단백질분해효소 작용에 의해 활성을 가지는 작은 분자로 분해된다. 활성분자들은 상피세포에 존재하는 수용체와 결합하여 세포막을 변화시킴으로써 삼투압 균형을 파괴하고, 결국 유충은 섭식을 멈추고 죽음에 이르게 된다. 최근에는 Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera 및 Mellophaga 등 다른 종류의 곤충과 선충, 진드기 및 원생동물 등에 살충활성을 가진 *Bt* 균주들이 보고되고 있다 (Feitelson et al., 1992). *Bt*는 이미 농업용, 임업용 및 모기 제어 등에 상업적으로 쓰이고 있으며 독소단백질 유전자는 곤충 저항성 식물을 만드는 주요 소스로 활용되고 있다.

현재까지 많은 종류의 독소단백질 유전자가 클로닝 되었는데 그들의 아미노산 서열의 상동성에 따라 Cry1에서 Cry32의 Cry 단백질과 Cyt으로 분류되며 계속해서 새로운 독소단백질 유전자가 분리되고 있다.

최근의 *Bt* 연구의 동향은 크게 몇가지로 나눌 수가 있는데 그것들은 새로운 *Bt* 균주 및 *Bt* 독소단백질 유전자의 탐색, 독소단백질 유전자의 유전공학적 방법을 이용한 *Bt* 균주개발, *Bt* 독소단백질 유전자의 발현 메카니즘에 대한 이해, 곤충의 receptor 연구를 통한 살충기전에 대한 이해, 독소단백질 유전자의 식물체로의 도입을 통한 종자개발 등이다.

1901년 처음 나방류 해충에 살충활성을 지닌 *Bt* 균주가 발견된 이래 1976년 파리목해충, 1982년 딱정벌레목 해충 등 다양한 곤충에 대한 살충성을 지닌 많은 수의 *Bt* 균주가 발견되었으며 최근에는 개미, 바퀴벌레 뿐만아니라 선충 등과 같이 곤충 이외의 생물에 대하여 치사효과를 가지는 *Bt* 균주들이 발견됨에 따라 *Bt* 생물농약의 다양한 적용의 가능성을 보여주고 있다[Feitelson, 1992]. 외국 선진국의 경우 오래전부터 세계 각국에서 *Bt* 균주를 수집해 왔으며 *Bt*와 관련된 회사의 경우 수만주의 *Bt* 균주를 확보하고 있을 것으로 추정되고 있다. 최근의 *Bt* 균주 탐색연구는 선진국의 탐색기술을 이전받아서 주로 개발도상국에서 이루어지고 있다.

Bt 독소단백질 유전자는 1981년 *cryIAa*가 클로닝된 이래 현재까지 약 140종의 유전자가 알려져 있으며 계속해서 새로운 유전자가 발견되고 있다. 독소단백질 유전자의 수가 많아짐에 따라 1993년 *Bt* 독소단백질 유전자 명명위원회가 결성되었으며 이 위원회에서 *Bt* 독소단백질 유전자의 이름을 부여하고 있다. *Bt* 독소단백질 유전자는 그 아미노산의 상동성에 따라 *cry1*부터 *cry22*와 *cyt*로 나뉘어 지며 *cry1*은 다시 *cry1A*부터 *cry1K*까지로 나뉘어진다. *cry1A*는 다시 *cry1Aa*에서 *cry1Af*를 포함하며 *cry1Aa*는 *cry1Aa1*에서 *cry1Aa6*로 나뉘어진다. *Bt* 독소단백질 유전자가 이처럼 복잡한 분류체계를 가지는 이유는 예를들어 아미노산 상동성이 95% 정도로 매우 높아도 살충 스펙트럼이 서로 다르기 때문이다. 이들 다양한 유전자는 chimeric 유전자, 재조합 미생물 및 transgenic plant 등을 만드는데 재료로 쓰이고 있다.

유전공학적 방법을 이용한 *Bt* 균주의 개량은 *Bt* 독소유전자 자체의 개량과 *Bt* 균주의 개량으로 나눌 수 있으며 주로 *Bt* 저항성해충의 방제 또는 살충스펙트럼을 넓히기 위해 수행되었다. *Bt* 저항성해충의 방제를 위한 chimeric 유전자의 제작은 네델란드의 Plant Breeding and Reproduction Research 등에서 시도되었는데 *cry1C* 유전자와 *cry1E* 유전자의 in vivo recombination을 통해 *cry1C* 유전자의 domain III가 *Spodoptera exigua*와 *Mamestra brassicae*에 대한 살충성에 관여함을 알았고 이 부분을 *cry1E* 유전자에 도입함으로써 만들어진 새로운 단백질은 기존의 *cry1C* 유전자가 인지하는 membrane receptor와는 다른 receptor를 인지한다는 것을 알 수 있었다[Bosch, 1994]. 따라서 이 새로운 재조합 단백질은 *Bt* 저항성곤충의 방제에 사용될 수 있을 것으로 사료되었다. 유사한 실험으로 *cry1C* 유전자의 domain III 부위를 *cry1A(b)* 유전자의 domain III와 대체시켜 만든 재조합 단백질은 기존의 *cry1C* 유전자에 비해 *S. exigua*에 대한 살충성이 약 10배 정도 더 우수함이 판명되었다[de Maagd, 1996]. 이런 실험들은 *Bt* 독소단백질 유전자의 recombination을 통하여 살충력이 우수하거나 새로운 살충기전을 갖는 독소단백질을 만들어 낼 수 있다는 가능성을 보여준다. 또한 독소단백질 유전자를 다른 *Bt* 균주 내로의 도입이 시도되었다. 1995년 Kalman등은 두단계를 거쳐 *cry1C* 유전자를 *Bt* 아종 *kurstaki* BT93과 BT94 균주내로 도입하므로서 Cry1C 독소단백질을 생산하는 재조합 *Bt* 아종 *kurstaki* 균주를 만들었는데, 먼저 electroporation을 통해 *cry1C* 유전자를 *Bt* 아종 *kurstaki* HD73의 염색체내로 integration하였고, bacteriophage CP-51을 사용한 transduction을 통하여 *Bt* 아종 *kurstaki* BT93과 BT94내로의 도입에 성공하였다

[Kalman, 1995]. 또한, 1997년 Sanchis 등은 transposon Tn4430을 갖는 벡터를 사용하여 *cry1C* 유전자를 *Bt* Kto 균주내로 도입한 바 있다[Sanchis, 1997].

Bt 독소유전자의 발현메카니즘에 대한 연구는 프랑스의 파스퇴르 연구소에서 주도적으로 하고있으며 세포성장 주기 중 어느시기에서 독소단백질이 발현되느냐에 따라 생산 배지의 조성이 달라진다는 점에서 *Bt* 생산공정 연구에서 매우 중요하다. *Bacillus*의 경우 *E. coli*와 달리 여러 종류의 sigma factor를 가지고 있는데 이들이 세포성장 주기 중에 작용하는 시기가 다르다[Haldenwang, 1995]. 따라서 *Bt* 독소단백질 유전자의 sigma factor 의존성을 밝히는 것이 중요하다. 대부분의 *Bt* 독소단백질 유전자는 sporulation stage에서 발현되는데 이들은 promoter 부위에 *B. subtilis*의 sigma factor E 또는 K와 상동성을 가지고 있는 sigma 35와 28의 인지부위를 가지고 있기 때문이며 sigma E 혹은 35는 late sporulation stage에서 작용하며 sigma K 혹은 28은 middle sporulation stage에서 작용한다[Baum, 1995]. *Bt* 독소단백질 유전자 중 *cry2Aa*, *cry4Ba* 및 *cry15Aa*는 sigma E에 의해 인지되는 promoter sequence를 가지고 있으며 *cry1Aa*, *cry1Ac*, *cry1Ba*, *cry4Aa*, *cry11Aa* 및 *cyt1Aa* 유전자는 sigma E와 K 둘다 동시에 인지된다. 최근에는 *cry4Aa* 유전자는 sigma H에 의해 인지되기도 한다는 것이 밝혀졌다[Yoshisue, 1995]. *cry3* 유전자의 경우 다른 유전자와 달리 sigma A 의존성 promoter를 가지고 있는데 이 sigma A factor는 세포가 활발히 성장하고 있는 vegetative stage에서 작용한다[Agaisse, 1994].

Bt 독소단백질 유전자의 살충기전에 대한 연구는 주로 대학에서 이루어지고 있으며 *Bt* 독소단백질의 3차 구조가 밝혀짐에 따라 가속화되었다[Grochulski, 1995][Li, 1991]. *Bt* 독소단백질은 크게 활성에 관여하는 N 말단과 구조에 관여하는 C 말단의 두 부위로 나눌 수 있으며 N 말단은 3개의 domain으로 구성되어 있다. 이 중 domain I은 곤충의 장내 membrane에 구멍을 내는 ionophore의 역할을 담당하며 domain II는 membrane receptor에 binding하는 기능을 가지고 있다. domain III의 기능은 아직 알려지지 않았다. 이런 지식들을 바탕으로 최근 각 domain의 특정 부위에 돌연변이를 일으켜 곤충에 대한 독성을 높이는 연구가 시도되고 있다.

*Bt*제는 현재 전세계에서 가장 많이 팔리고 있는 생물농약인데 1995년 기준 세계 판매량이 9천만불 정도로 전체 살충제 시장의 약 2% 정도를 차지하고 있다 (Lambert and Peferoen, 1992). 1998년 기준으로 미국에서 약 200종류의 *Bt*제가 허가를 받았다 (Table

1). *Bt*제는 특정곤충에 선택적으로 살충활성을 보이면서 고등동물, 조류, 식물 및 어류 등에는 독성이 없고 제품개발이나 허가 비용이 화학농약에 비해 저렴하기 때문에 미래형 농약으로 주목받고 있으며 시장 또한 점차 커지고 있다.

Table 3. Microbial pesticides registered by the U.S. Environmental Protection Agency as of 1997

Agent	Active ingredient(s)	Crop	Yr registered	No. of products	Target pest
Bacterium	<i>B. popilliae</i> , <i>B. lentimorbus</i>		1948	2	Japanese beetle larva
	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>		1961	127	Lepidopteran larva
	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>		1981	26	Dipteran larva
	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>Berliner</i>		1984	1	Lepidopteran larva
	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>tenebrionis</i>		1988	6	Coleopteran larva
	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> EG2348		1989	4	Lepidopteran larva
	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> EG2424		1989	1	Lepidopteran larva
	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> EG2371		1990	3	Lepidopteran larva
	<i>B. sphaericus</i>		1991	1	Dipteran larva
	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i> GC-91		1992	2	Lepidopteran larva
	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i>		1992	2	Lepidopteran larva
	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> BMP123		1993	5	Lepidopteran larva
	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> EG7673		1995	2	Lepidopteran larva
	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> EG7673		1995	2	Colorado potato beetle
	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> EG7841		1996	1	Lepidopteran larva
	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> EG7826		1996	3	Lepidopteran larva
	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> M200		1996	1	Lepidopteran larva
Nonviable microbial pesticide	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> delta-endotoxin in killed <i>P. fluorescens</i>		1991	2	Lepidopteran larva
	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>san diego</i> delta-endotoxin in killed <i>P. fluorescens</i>		1991	1	Coleopteran larva
	<i>B. thuringiensis</i> <i>Cry1Ac</i> and <i>Cry1C</i> delta-endotoxin in killed <i>P. fluorescens</i>		1995	1	Lepidopteran larva
	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> <i>Cry1C</i> delta-endotoxin in killed <i>P. fluorescens</i>		1996	1	Lepidopteran larva
Plant pesticide	<i>B. thuringiensis</i> <i>Cry3A</i> delta-endotoxin	Potato	1995	1	Colorado potato beetle
	<i>B. thuringiensis</i> <i>Cry1Ab</i> delta-endotoxin	Corn	1995	2	Lepidopteran larva
	<i>B. thuringiensis</i> <i>Cry1Ac</i> delta-endotoxin	Cotton	1995	1	Lepidopteran larva
	<i>B. thuringiensis</i> <i>Cry1Ab</i> delta-endotoxin	Corn	1996	2	Lepidopteran larva
	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> delta-endotoxin from IID-1-derived plasmid vector pZO1502	Corn	1996	2	Lepidopteran larva
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> <i>Cry1Ac</i> delta-endotoxin	Corn	1997	1	Lepidopteran larva	

최근에 들어 국내뿐만 아니라 전 세계적으로 모기에 의한 피해가 점점 늘어나고 있다. 모기는 흡혈을 통하여 전염병을 매개하며 모든 곤충 중에서 인류에게 가장 큰 피해를 주는 것으로 알려져 있다. 모기가 매개하는 질병으로는 말라리아, 뎅기열, 일본뇌염, 사상충 및 황열 등이 있다. 특히 말라리아의 경우 전 세계적으로 매년 3.5억명의 새로운 환자가 발생하며 그 중 200만명 정도가 사망하는데 동남아시아, 아프리카 및 중남미 등에서 피해가 크다. 국내에서도 1993년 휴전선 부근에서부터 말라리아 환자가 보고되기 시작하여 1994년에는 21명, 1998년에는 전국적으로 3,300명 이상의 환자가 발생하는 등 점점 피해가 확산되고 있다. 따라서 모기로 인한 피해를 최소화하기 위하여 모기 또는 모기유충에 대한 효과적인 방제수단의 개발이 시급하다. 국내뿐만 아니라 외국의 경우도 마찬가지로 모기 성충에 대한 특별한 방제수단은 없으며 전염병에 대한 백신접종 등과 같은 소극적인 수단으로 대처하고 있다. 모기유충의 경우, *Bt*를 이용한 미생물농약이 우수한 살충력을 지니고 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 모기에 의한 피해를 줄이기 위해서 *Bt*와 같이 무공해 미생물 살충제의 응용 및 산업화 연구가 절실히 요구는 상황이다.

제 7 장 참고문헌

Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R., and Dean, D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 775-806.

Feitelson, B. S., Payne, J., and Kim, L. (1992). *Bacillus thuringiensis*: Insects and beyond. *Bio/technology* 10, 271-275.

Lambert, B., and Peferoen, M. (1992). Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. Facts and mysteries about a successful biopesticide. *BioScience* 42, 112-122.

Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M. G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S. C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C. V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N. M., Choi, S. K., Codani, J. J., Connerton, I. F., Danchin, A., and et al. (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390, 249-56.

Grossman, A. D. (1995). Genetic networks controlling the initiation of sporulation and the development of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Annu Rev Genet* 29, 477-508.

Perego, M., Glaser, P., and Hoch, J. A. (1996). Aspartyl-phosphate phosphatases deactivate the response regulator components of the sporulation signal transduction system in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 19, 1151-7.

Baum, J. A., and Malvar, T. (1995). Regulation of insecticidal crystal protein production in *Bacillus thuringiensis*. *Mol Microbiol* 18, 1-12.

Brown, K. L., and Whiteley, H. R. (1988). Isolation of a *Bacillus thuringiensis* RNA polymerase capable of transcribing crystal protein genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 4166-70.

Yap WH, Thanabalu T, Porter AG. Expression of mosquitocidal toxin genes in a gas-vacuolated strain of *Ancylobacter aquaticus*. *Appl Environ Microbiol.* 1994 Nov;60(11):4199-202.

Soltes-Rak E, Kushner DJ, Williams DD, Coleman JR. Effect of promoter modification on mosquitocidal cryIVB gene expression in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *Appl Environ Microbiol.* 1993 Aug;59(8):2404-10.

Shaeffer, P., Millet, J., and Aubert, J.-P. (1965). Catabolite repression of bacterial sporulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 54, 704-711.

Kalman, S., Kiehne, K. L., Libs, J. L., and Yamamoto, T. (1993). Cloning of a novel cryIC-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*. *Appl Environ Microbiol* 59, 1131-7.

Majumdar MK, Sikdar DP, Sarma AB, Majumdar SK. A simple haemolytic method for quantitation of the delta endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* from crude samples. *J Appl Bacteriol.* 1990 Aug;69(2):241-6.

Henikoff, S. (1984). Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene* 28, 351-9.

Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., and von Heijne, G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* 10, 1-6.

Park SH, Kim HK, Pack MY. Characterization and structure of the cellulase gene of *Bacillus subtilis* BSE616. *Agric Biol Chem.* 1991 Feb;55(2):441-8.

Perego, M. (1998). Kinase-phosphatase competition regulates *Bacillus subtilis* development.

Trends Microbiol 6, 366-70.

Haima, P., van Sinderen, D., Schotting, H., Bron, S., and Venema, G. (1990). Development of a beta-galactosidase alpha-complementation system for molecular cloning in *Bacillus subtilis*. *Gene* 86, 63-9.

Maeda, T., Kawano, S., Takagi, M., and Imanaka, T. (1994). Nucleotide sequence and possible functional mechanism of the translational activator gene (preL) for neutral protease from *Lactobacillus* sp. *J. Ferment. Bioeng.* 77, 347-351.

특정연구개발사업 연구결과 활용계획서

사업명	중사업명	선도기술개발사업		
	세부사업명	신기능 생물소재 기술개발사업		
과제명	Bt 살충제 생산성제고를 위한 균주육종 및 생산공정 개발			
연구기관	(주)인바이오넷	연구책임자	구본탁	
총연구기간	1998년 9월 1일 ~ 2002년 8월 31일 (48개월)			
총 연구비 (단위 : 천원)	정부출연금	민간부담금	합계	
	1,188,278	272,000	1,460,278	
기술분야	생물과학/생물공정기술			
참여기업	(주)인바이오넷			
공동연구기관	한국생명공학연구원			
위탁연구기관				
연구결과활용 (해당항목에(√) 표시)	1. 기업화(√)	2. 기술이전()	3. 후속연구추진()	4. 타사업에 활용()
	5. 선행 및 기초연구()	6. 기타목적활용(교육,연구)()	7. 활용중단(미활용)()	8. 기타()

특정연구개발사업 처리규정 제 31조(연구개발결과의 보고) 제 2항에 의거 연구결과 활용계획서를 제출합니다.

첨부 : 1. 연구결과 활용계획서 1부.
2. 기술요약서 1부

2002년 10월 31일

연구책임자 : 구 본 탁 (인)

연구기관장 : 구 본 탁 (직인)

과학기술부장관 귀하

[첨부1]

연구결과 활용계획서

1. 연구목표 및 내용

Bt 균주의 육종과 개량된 균주의 산업적 생산공정 개발

구분	연구개발 목표	연구개발 내용
1차년도 (’98)	<ul style="list-style-type: none"> ○ Bt 균주의 대량배양 조건 탐색 ○ 다양한 발효기질을 효율적으로 이용할 수 있는 모기유충 방제용 Bt균주의 육종 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Arcas 배지로 50L scale의 발효조건을 선택하였다. ○ <i>cytA</i> 유전자 중간에 <i>cellulase</i> 유전자가 삽입하여 용혈활성이 없어졌으나, 여전히 모기유충에 대해 우수한 살충활성을 가지는 BSK69 균주를 개량함. 이것으로 <i>cellulase</i> 유전자도입으로 다양한 발효기질을 효율적으로 이용할 수 있는 Bt균주를 분자생물학적 기법으로 육종함 (대한민국 특허등록제1003285620000호).
2차년도 (’99)	<ul style="list-style-type: none"> ◇ 위생해충 제어용 Bt 미생물의 산업적 생산 및 적용을 위한 균주 개량 및 생산공정 개발 ○ Field에 적용했을 때 실험자가 생존물이나 증식정도 등을 모니터링할 수 있는 시험균주의 제작. ○ 생산원가를 낮추기 위해 값싼 산업배지를 이용한 Bt 균주의 대량배양 연구. ○ 개발된 균주의 field 적용 방법 개발 및 다양한 산업적 용도를 개발. 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 모니터링용 표지유전자를 포함한 플라스미드 제작 ○ 모니터링용 표지유전자를 숙주 Bt균의 염색체내로 도입 ○ 파리유충에 대해 살충활성이 있다고 보고된 <i>cry1B</i> 유전자의 cloning ○ <i>cry1B</i> 유전자가 부가된 재조합 Bt 균주 제작 ○ 값싼 산업배지를 이용한 Bt 균주의 대량배양 연구 ○ 모니터링용 Bt균을 동물사료에 혼합 급여하여 분변 및 환경에서의 추이를 분석함
3차년도 (’00)	<ul style="list-style-type: none"> ○ Bti 제제의 현장적용을 위한 Bti 제형 1건 개발 및 이를 이용한 현장실험 ○ 위생해충 제어용 Bt 미생물제 시제품 1건 개발 ○ 분화과정 제어를 통해 독소 생산성이 30% 이상 향상된 Bt균주 1주 및 생산공정 개발 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 모기 유충의 섭식 메카니즘에 부합하기 위하여 약제처리 후 수표면에 부상하여 확산 할 수 있는 여러조합의 유체형태로 제제화. ○ 제제화 후 모기 유충을 이용한 활성 검정과 수표면 부상 물리적 특성을 고려하여 최종 제제화 제품 구성. ○ 개발된 제형을 이용하여 현장 실험중- <i>B.t. subsp. finitimus</i> 균, <i>B.t. subsp. kurstaki</i> 균 및 <i>B.t. subsp. israelensis</i> 균에서 포자형성을 조절하는 유전자를 새로이 발견하여 특성을 밝혔으며, 이 유전자의 발현조절을 통하여 포자형성과 B.t. 생산성을 효율적으로 높일 수 있음을 확인하였다 ○ 신규 유전자를 이용한 포자형성 조절방법에 대하여 특허를 출원하였다. (대한민국 특허출원번호2001-19174).
4차년도 (’01)	<ul style="list-style-type: none"> ◇ 위생해충 제어용 B.t.i. 미생물제의 현장적용 시험 및 최종 제품 개발 ○ B.t.i. 제의 현장적용을 위한 다양한 B.t.i.제형 구성 및 이를 이용한 현장 적용시험 ○ 위생해충 제어용 B.t. 미생물제 제품 1건 개발 ○ 포자형성 제어기술을 이용하여 B.t. 균의 살충성독소 생산성을 위한 균주 보완 ○ B.t.i 원제의 산업적 생산공정 개발완료 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 전년도 제제화 개발제품의 적용 최적화 연구 ○ 호소 등 다양한 모기 서식지에서 B.t.i. 제제의 다양한 현장적용을 위한 B.t.i. 제형 구성 개발 및 이를 이용한 현장 적용시험 ○ 상기 개발된 제형들을 이용하여 주렁가 연못, 하수관로, 정화조 및 호소 등에 대한 현장 적용 실험을 실시함. ○ 국내 현실에 적합한 위생해충 제어용 B.t. 미생물제 제품 1건 개발 (Spec.: 수면부상성제제, 700 IU/mg) ○ B.t. 균주의 대량배양 시 포자형성을 극대화를 위한 조절유전자 제어방법의 개선 및 균주의 보완 개량 ○ B.t. 균주의 고농도 배양 시 포자형성 제어기술을 통한 독소단백질 생산성 극대화를 위한 최적 발효공정개발

2. 연구수행결과 현황(연구종료시점까지)

가. 특허(실용신안) 등 자료목록

발명명칭	특허공고번호 출원(등록) 번호	공고일자 출원(등록) 일자	발명자 (출원인)	출원국	비고
셀룰로오스 분해활성이 부가된 바실러스 튜링기엔시스 변이주	1003285620000	2002. 3. 4	박승환, 최수근, 신병식, 공은미	대한민국	
다양한 고농도 유기성 폐기물의 반 연속 액상 발효를 통한 생물학적 전환 장치 및 공정	1003117580000	2001. 9. 28	구본탁, 박기돈, 김진만, 이정기, 김국진, 김현국	대한민국	
식물병원성 곰팡이에 대한 길항작용을 가진 바실러스속 균주	1002521980000	2000. 1. 17	박승환, 최수근, 신병식, 김정일, 구본탁, 정희순, 반재구	대한민국	
바실러스 튜링겐시스 NR5 유전자 및 그로부터 발현된 재조합단백질	1002521990000	2000. 1. 17	박승환, 김정일, 최수근, 신병식, 공은미	대한민국	
그람양성세균의 포자형성조절 방법	2001-19174	2001. 4. 11	박승환, 최수근, 김지현, 이현희	대한민국	
바실러스 튜링기엔시스 균주를 이용한 질병 제어방법	1020020017167	2002. 4. 10	구본탁, 이상준, 박순양, 염도영, 이정기	대한민국	
살충성과 항진균성을 동시에 갖는 신규한 바실러스 튜링겐시스 BP865	154108	1998. 7. 7	박승환, 김정일, 최수근, 구본탁, 신병식, 반재구	대한민국	
신규한 바실러스 튜링겐시스 crtIK 유전자 및 이로부터 발현된 단백질	154278	1998.7.8	김정일, 박승환, 신병식, 구본탁, 최수근, 반재구	대한민국	

나. 프로그램 등록목록

프로그램 명칭	등록번호	등록일자	개발자	비고

다. 노하우 내역

라. 발생품 및 시작품 내역

마. 논문게재 및 발표 실적

○ 논문게재 실적(필요시 별지사용)

학술지 명칭	제목	게재연월일	호	발행기관	국명	SCI게재여부
<i>Current Microbiology</i>	Cloning of a new <i>Bacillus thuringiensis cryII</i> -type crystal protein gene	2000년 41권	1호	Springer-Verlag New York, Inc.	미국	SCI
<i>Applied and Environmental Microbiology</i>	Genes Encoding the <i>N</i> -Acyl Homoserine Lactone-Degrading Enzyme Are Widespread in Many Subspecies of <i>Bacillus thuringiensis</i>	2002년 68권	8호	American Society for Microbiology	미국	SCI
계: 건수	2					

○ 학술회의 발표 실적(필요시 별지사용)

학술회의 명칭	제목	게재연월일	호	발행기관	국명
		년 월 일			
계: 건수					

3. 연구성과

가) 외국 기업에 기술이전

세계적 생물농약 전문기업인 미국의 마이코젠사에 Bt 균주 및 유전자 관련 기술을 1998년 10만불에 수출하였다.

나) 모기유충에 살충활성이 있는 Bti 균주의 환경 친화적 개량

*Bti*가 생산하는 독소단백질 중 CytA는 다른 독소단백질에 비해 살충활성 특이성이 적으며 적혈구를 파괴하는 용혈활성을 가지고 있다. 따라서 *Bti*를 사용함으로써 생기는 부작용에 대한 보고는 아직 없지만 잠재적 위험요소를 가지고 있다. 이러한 위험요소를 제거하기 위하여 *Bacillus subtilis* 유래의 cellulase를 *Bti*의 *cytA* 유전자 중간에 도입함으로써 *Bti* 균주에 cellulase의 활성을 강화시킴과 동시에

CytA 독소단백질 생성을 억제하는 균주를 제작하였는데 cellulase가 Bti의 DNA 내로 도입됨으로써 유전자의 안전성을 향상시켰고 in vivo recombination 기법을 도입하여 항생제 내성 유전자 등 외래의 DNA 조각을 제거함으로써 환경친화적인 균주를 제작하였다.

다) Bti 균주의 사료첨가 가능성 확인

모기는 사람 뿐만 아니라 가축에게도 심각한 피해를 입히는데 축사 등에서 모기를 제어하는 특별한 수단이 없다. 가축의 분변이 오염된 축사 근처의 물에서 주로 모기유충이 서식하고 있는데 각각의 물웅덩이에 일일이 살충제를 뿌리기에는 너무 많은 노력이 따라야 한다. 만약 가축의 분변 속에 Bt 독소단백질이 포함되어 있다면 효과적인 모기 방제가 될 것이다. 본 연구에서 제작된 모니터링용 Bti 균주를 이용한 현장적용 실험에서 돼지의 사료에 섞여 먹었을 때 90% 이상이 돼지의 장을 통과하는 동안 생존하여 분변을 통해 배출되었고 배출된 Bt는 모기 유충에 대해 살충력을 나타냄을 확인하였다. 따라서 Bt를 사료첨가제로 개발하여 적용하면 축사에서의 모기를 효과적으로 제어할 수 있을 것이다.

라) 포자형성 조절인자 발견

Bt 독소단백질은 포자형성 과정에 의존적으로 생산되기 때문에 포자형성을 조절하면 Bt 독소단백질의 생산성을 조절할 수 있게 된다. 포자형성 조절기작은 고초균의 경우 잘 알려져 있는데 두가지 단백질-RapA와 PhrA-이 포자형성의 초기과정을 조절하는데 중요한 역할을 담당하고 있다. 그러나 고초균을 제외한 포자형성 그람양성균에서 이러한 RapA 및 PhrA와 유사한 유전자는 아직 보고되지 않았으며 알려진 계통정보에서도 상동성을 가진 유전자는 발견되지 않았다. 본 연구에서 이러한 RapA 및 PhrA와 비슷한 역할을 Bt 내에서 담당하고 있다고 생각되는 유전자를 찾았으며 이 유전자들의 특성을 분석한 결과 포자형성을 조절하는 기능이 있음을 확인하였다.

마) Bt 균의 항균활성 확인

현재 주관연구기관에서 진행중인 생물농약 균주 *Bacillus thuringiensis* 의

genome 분석 중 cryptic 하게 존재하고 있는 새로운 신호물질 분해 유전자를 발견하여 대장균에 발현시키고, 재조합 대장균을 이용한 실험에서 무름병을 억제할 수 있어 살충제로서의 기능뿐만 아니라 살균제로서의 개발가능성에 대한 결과를 특허출원 [바실러스 튜링기엔시스 균주를 이용한 질병 제어방법, 대한민국 특허출원 제 1020020017167호, 출원일 2002. 4. 10]하고, 그 내용은 미국미생물학회에서 발간하는 *Applied and Environmental Microbiology* 저널의 2002년도 8월호에 게재되었다 [Lee, S.J., Park, S.Y., Lee, J.J., Yum, D.Y., Koo, B.T. and Lee J.K. (2002) "Genes Encoding the N-Acyl Homoserine Lactone Degrading Enzyme Are Widespread in Many Subspecies of *Bacillus thuringiensis*" *Appl. Environ. Microbiol.* 68(8) 3919-3924].

바) 위생해충 제어용 B.t.i. 미생물제의 현장적용 시험 및 최종 제품 개발

모기 유충의 섭식 메카니즘에 부합하기 위하여 약제처리 후 수표면에 부상하여 확산 할 수 있는 여러 조합의 유제형태로 제제화하고 국내 현실에 적합한 위생해충 제어용 B.t.i. 제형의 선정 및 시제품 제작하였다 (Spec.: 수면부상성제제, 700 IU/mg).

사) Bt 게놈 초안 완성

Bt 미생물 살충제의 생산성을 제고하고 다양한 Bt 산업균주 개발을 위해 Bt 균의 전체 게놈을 해석하는 일이 필요하다는 판단 하에 본 연구과제의 연구비 외에 주관연구기관에서 추가로 약 5억원의 연구비를 투입하여 Bt 균의 게놈 시퀀싱을 수행하였다. 그 결과 전체 게놈의 95% 정도를 해독 완료하였는데 Bt 균이 생산하는 다양한 독소단백질, 효소, 2차 대사산물 등을 생산하는 유전자를 확인하였고 현재 각 유전자들에 대한 특성을 분석 중이다.

4. 기술이전 및 연구결과 활용계획

가. 당해연도 활용계획(6하원칙에 따라 구체적으로 작성)

나. 활용방법

다. 차년도이후 활용계획(6하원칙에 따라 구체적으로 작성)

최근 모기에 의한 질병이 계속 증가 추세에 있는데 이로 인한 사회적 비용도 큰 폭으로 증가하고 있다. 모기방제를 위해 현재 화학농약이 쓰이고 있는데 일반적인 화학농약은 모기뿐만 아니라 다른 어류 및 사람에게도 해롭기 때문에 무분별한 사용은 생태계에 미치는 영향이 적지 않다. 따라서 생태계에 안전한 BT살충제의 확대보급으로 인해 국민경제 및 생태계 복원에 들어가는 국가적 비용을 감소시킬 수 있다. 본 연구의 결과로 나온 모기유충 방제용 Bt 균, 대량 배양 기술 및 제제화 기술을 활용하여 국내 위생해충 제어시장에 진출하며 이것은 계속적인 증가추세에 있는 BT 수입제품의 대체효과를 기대할 수 있다.

따라서 본 연구성과를 바탕으로 국내 생물농약 시장의 활성화와 수입대체 효과를 획득하며 나아가 브라질, 중국, 동남아 등의 시장에 진출할 수 있는 계기를 만들고자 한다.

5. 기대효과

가. 기술적 효과

- Bt 전체 계놈의 초안이 완성되었으므로 Bt 균주 유래의 다양한 효소나 물질을 탐색할 수 있게 되었고 다양한 산업균주의 개량과 여러 형태의 BT제 개발을 위한 토대를 마련했다고 할 수 있다.
- Bt의 포자가 동물의 장을 통과해서 생존할 수 있는 능력을 확인하였는데 이는 사료첨가제로서 개발될 가능성이 있다는 것을 시사한다. 따라서 좀더 큰 시장인 사료첨가제 시장으로의 진출을 위한 Bt제의 추가연구를 위한 가능성을 확인하였다.
- 포자를 형성하는 그람양성 세균에서 포자형성을 조절하는 유전자를 발견하였는데 이를 이용하여 Bt 균주의 독소단백질 생산성을 조절할 수 있을 뿐만 아니라 바실러스 균에서 생산되는 여러 가지 분해 효소 및 항생제 등도 역시 포자형성 기작에 밀접하게 관련되어 있기 때문에 이들의 생산성을 조절하는 데도 매우 유용하게 적용할 수 있을 것이다.
- 다양한 고농도 유기성 폐기물의 반 연속 액상 발효를 통한 생물학적 전환 장치 및 공정 특허를 등록하였는데 이 기술은 Bt 균주의 대량배양 뿐만 아니라 다른 유용한 바실러스 균주의 대량배양에도 유용하게 적용될 수 있을 것이다.

- Bt 균주는 독소단백질에 의한 살충활성 뿐만 아니라 세포간 신호전달 물질을 억제하는 효소를 생산함으로써 살균활성이 있음을 확인하였다. 이는 BT 균주가 농업 뿐만아니라 의약용으로도 사용될 수 있음을 의미한다.

나. 경제적 효과

- 최근 모기에 의한 질병이 계속 증가 추세에 있는데 이로 인한 사회적 비용도 큰 폭으로 증가하고 있다. 따라서 모기 유충 방제를 위한 Bt제의 개발은 이러한 비용을 감소시켜 궁극적으로 국가경제에 이바지하게 될 것이다.
- 일반적인 화학농약은 모기뿐만 아니라 다른 어류 및 사람에게도 해롭기 때문에 무분별한 사용은 생태계에 미치는 영향이 적지 않다. 따라서 생태계에 안전한 BT 살충제의 확대보급으로 생태계 복원에 들어가는 국가적 비용을 감소시킬 수 있다.
- BT제의 국내생산으로 지속적인 증가추세에 있는 BT 수입제품의 대체효과를 기대할 수 있다.
- 본 연구의 결과에서 BT제는 단순한 생물농약으로서의 역할 뿐만 아니라 사료첨가제 및 의약용 치료제로서의 가능성을 보여 주었으므로 차후에 Bt제의 시장이 대폭 확대될 수 있는 가능성을 열어놓았다.

6. 문제점 및 건의사항(연구성과의 제고를 위한 제도·규정 및 연구관리 등의 개선점을 기재)

[첨부2]

기술 요약서

■ 기술의 명칭

모기 위생해충 방제를 위한 친환경적 Bt 살충제의 생산성 향상 기술 및 음식물 폐자원을 이용한 생산 공정 기술

■ 기술을 도출한 과제현황

과제관리번호	M1-9808-00-0031			
과제명	Bt 살충제 생산성 제고를 위한 균주육종 및 생산공정 개발			
사업명	선도 신기능생물소재기술개발사업			
세부사업명				
연구기관	(주)인바이오넷	기관유형	중소기업	
참여기관(기업)	생명공학연구원			
총연구기간	1998. 9. 1. - 2002. 8. 31.			
총연구비	정부(1,188,278)천원	민간(272,000)천원	합계(1,460,278)천원	
연구책임자 1	성명	구 분 탁	주민번호	
	근무기관 부서	(주)인바이오넷	E-mail	btkoo@inbionet.com
	직위/직급	대표이사	전화번호	042-866-9114
연구책임자 2	성명	박 승 환	주민번호	
	근무기관 부서	생명공학연구원	E-mail	shpark@mail.kribb.re.kr
	직위/직급	책임연구원	전화번호	042-860-4410
실무연락책임자	성명	김 정 원	소속/부서	경영지원실
	직위/직급	실장	E-mail	jwkim@inbionet.com
	전화번호	042-966-9102	FAX	042-866-9114
	주소	(305-390) 대전광역시 유성구 전민동 461-6		

■ 기술의 주요내용

[기술의 개요]

국민건강과 환경 및 생태계보호를 위해서 기존 화학농약을 대체할 수 있는 무공해 Bt 생물농약균주의 산업화를 위한 연구개발을 위해 Bt 살충제의 생산성을 높이고, 이를 위한 균주육종 및 생산공정 개발하였다. 모기유충에 살충활성이 있는 Bti 균주의 cytA 유전자를 제거함으로써 환경 친화적으로 개량하였고, 고온성 catabolite repression 내성 균주를 제조하여 음식물 쓰레기 폐 자원을 이용 1차 발효를 실시함으로써 고농도의 탄소원을 포함하는 표준화기질을 얻는데 성공하였다. 모기 유충의 섭식 메카니즘에 부합하기 위하여 약제처리 후 수표면에 부상하여 확산 할 수 있는 여러조합의 유제형태로 제제화하여, 개량 균주를 현장에 적용하였고, 제제화 후 모기 유충을 이용한 활성 검정과 수표면 부상 물리적 특성을 고려하여 최종 제제화 제품 구성 및 개발된 제형을 이용하여 현장 실험하였다. 이로서, 위생해충 제어용 Bt 미생물제의 최종 제품 개발을 이루었고, Bt 미생물살충제의 산업적 생산성 제고를 위한 독자적인 생산 공정을 개발하였다. 또한 현장적용 시험 결과 사료첨가제로써의 가능성을 확인하였다. Bt의 포자형성 조절인자를 최초로 확인하였으며 Bt 게놈 초안을 완성하여 다양한 Bt 제를 만드는데 필요한 여러 정보들을 확보하였다.

<기술적 특징>

- (1) 용혈활성이 제거되어 친환경적이며 모기유충에 살충활성을 갖는 Bt 균주
- (2) 음식물 쓰레기의 고농도 탄소원을 포함한 표준발효 기질 제조 기술
- (3) 음식물 쓰레기를 이용한 Bti 균주 생산 기술
- (4) Bt 균의 포자형성 조절 기술
- (5) Bti 포자의 수표면 부상 물리적 특성을 갖는 제제화 기술

[용도·이용분야]

- (1) 위생해충인 모기의 환경 친화적 방제
- (2) 폐자원인 음식물 쓰레기의 고부가가치 미생물 발효 기질화
- (3)

■ 본 기술과 관련하여 추가로 확보되었거나 개발중인 기술

[기술개요]

기술명	
개발단계	<input type="checkbox"/> 연구개발 계획 <input type="checkbox"/> 연구개발 중 <input type="checkbox"/> 연구개발 완료
기술개요	

[기술을 도출한 과제현황]

과제관리번호			
과제명			
사업명			
세부사업명			
연구기관		기관유형	
참여기관(기업)			
총연구기간			
총연구비	합계 : ()백만원 - 정부 : ()백만원 민간 : ()백만원		
연구책임자	소속		성명
	전화번호		E-mail
연구개발 주요내용			