

Bacillus thuringiensis serovar. thuringiensis의 내독소 생산조건

이 형 환¹ · 이 희 무²

LEE, HYUNG-HOAN¹ AND HEE-MOO LEE² : Cultural Conditions for Endotoxin Production by *Bacillus thuringiensis* serovar. *thuringiensis*

Korean J. Plant Prot. 25(2) : 71-76(1986)

ABSTRACT *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* H1 (BTT) strain was cultured in the 4 different fermentation media and then measured their growths and the productions of endotoxin crystals from the culture media. Out of the 4 media, the productions of the endotoxin crystals and spores were maximal in the pH9-M-3 medium. The wet weight of BTT cells grown in the 150ml culture was approximately 3.218g and the number of the viable spores was 3.3×10^{10} /ml, and the ratio of the endotoxin weight over total cell weight was 20.05%. The generation time of the BTT bacteria in the M-1 was about 47.6 minutes in the M-2, 132.9 minutes in the M-3 and 110.2 minutes in the M-4. The proper pH for the production of the endotoxin by BTT appeared to be pH 6.5.

서 론

*Bacillus thuringiensis*는 그람염색에 양성반응을 나타내는 간균이며, 현재는 23 serovars까지 분류되어 있으며(Lee등, 1986d), 또한 쌍시류와 인시류등의 유충에 살충력이 있는 외독소(de Barjac and Dedoner, 1968 ; Lecadet and de Barjac, 1981 ; Lee, 1982 ; Shim and Lee, 1985)와 내독소(Heimpel, 1967 ; Oh and Lee, 1985 ; Lee등, 1985 ; Lee등, 1986a, b, c)를 생산하는 것이 보고되었고, 혈청형 변이주에 따라서 곤충에 대한 독성효과가 특이성을 갖는 것이 보고되었다(Lecadet and de Barjac, 1981 ; Mohd-Salleh and Lewis, 1982 ; Samasanti, 1982). *B. thuringiensis* 균은 배양배지조성이나 조건에 따라서 내독소 결정체 생산에 영향을 미치는 것이 보고 되었다(Dulonage, 1970, 1971 ; Lee등 1986c).

이에 본 연구에서는 인시류등에 살충력이 강한 *B. thuringiensis* serovar. *thuringiensis*균의 내독소 결정체 생산에 미치는 배지조성과 조건을 연구한 것을 보고한다.

재료 및 방법

1. 균 주

Bacillus thuringiensis serovar. *thuringiensis*

1 건국대학교 생물학과 유전공학연구소(Institute for Genetic Engineering and Department of Biology, Kon Kuk University, Seoul 133, Korea)

2 안동대학 생물학과

HI K-6(BTT)를 본 실험에 사용하였다(건국대학교 생물학과 분자생물학교실 보관).

2. 배지 조성 및 제초

BTT 균주 보관용 평판배지와 사면배지는 한천 영양배지를 사용하였고, 제 1 차 배양배지는 증류수 97%에 Bacto-tryptose 2%, Bacto-dextrose 0.2%, NaCl 0.5%, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.25%(TPB)를 혼합 사용하였으며, 제 2 차 배양배지도 동일한 조성으로 하였다. 제 3 차 배양발효 배지는 pH와 배지 성분의 조성을 달리한 M-1, M-2, M-3, M-4 배지를 사용하였으며, 조성은 Table 1과 같다.

발효배지는 1,000ml의 증류수에 각 성분을 혼합하여 사용하였으며 배지 성분중에서 dextrose,

Table 1. Components of the M-media for *Bacillus thuringiensis* culture

Ingredients(gram)	M-media			
	M-1	M-2	M-3	M-4
Tryptose	10	—	—	—
Soluble starch	5	—	—	10
Casein hydrolysate	—	10	10	15
Dextrose	5	10	15	5
Yeast extract	2	2	2	—
Bactopeptone	—	3	3	—
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	—	0.3	0.3	0.3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	—	0.03	0.03	0.03
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	—	0.02	0.02	0.02
distilled H_2O	1,000	1,000	1,000	1,000

The pHs of the media were adjusted with 10mM of K_2HPO_4 and KH_2PO_4 .

MgSO₄·7H₂O, FeSO₄·7H₂O, ZnSO₄·7H₂O는 각기 멸균되어진 증류수에 용해하여 여과지(Whatman, 0.2μm)로 여과하고, 나머지 성분은 121°C, 15Lb로 15분간 가압 습윤 멸균하여 사용하였으며, pH는 K₂HPO₄와 KH₂PO₄로서 pH 6, 7, 8, 9로 적정하여 사용하였다.

3. 생장곡선 측정

평판배지상에 있는 BTT 균체의 한군락에서 1백균이를 취하여 TPB 100ml에 접종하여 28°C에서 180rpm으로 24시간 1차 진탕 배양한 후 이 배양액의 3%를 제 2차 배양배지인 TPB 100ml에 접종하여 28°C에서 180rpm으로 24시간 회분배양한 후 제 3차 배양배지인 M-1, M-2, M-3, M-4배지 150ml씩에 2차 배양액의 2%를 각각 접종하고 28°C에서 180rpm으로 72시간 배양하는 동안 일정시간마다 정지기에 도달할 때까지 분광광도계로 파장 600nm에서 O.D.를 측정하였다. 측정한 O.D.값은 그래프로 도식화하고 성장율은 stanier등(1976)의 방법으로 측정하였다.

4. 균체 습증량과 pH측정

BTT균을 각 pH별로 조성한 M-1, M-2, M-3, M-4배지 150ml에 접종한 후에 72시간 진탕 배양을 하여 배양액의 pH를 측정하고 4°C에서 5,000×g로 15분간 원심분리하고, 다시 2회 세척한 다음 각 배지와 pH별로 균체의 습증량을 측정하였다.

5. 아포수의 계측

BTT균체를 제 3차 M 발효배지에서 72시간 배양한 후 65°C에서 10분간 열처리한 배양액을 TPB액체배지로 연속적인 희석분주를 한 다음 TPB한천 평판배지에 0.1ml씩 도달한 후 28°C 배양기에서 2~3일 배양하여 ml당 아포수를 계측하였다.

6. 내독소 결정체의 분리 및 양측정

BTT균체를 M-1, M-2, M-3와 M-4배지에 접종하여 28°C에서 72시간 배양한 후에 4°C에서 5,000×g로 15분간 2회 원심분리하여 세척한 다음 1M NaCl과 0.01% Triton X-100 혼합용액 10ml에 현탁하여 초음파 분쇄기로 200W에서 20회이상 세포분쇄를 실시한 후 위상차 현미경으로 세포벽 파괴 여부를 검정하고, NaBr 밀도기

을기는 NaBr용액 20%를 5ml으로, 30%용액을 8ml, 40%용액을 8ml, 50% 용액을 10ml, 60% 용액을 10ml, 70% 용액을 5ml으로 조성하여 18시간 정제시킨 후에 균체 분쇄액을 2.5ml씩 적하하여 20,000×g로 4°C에서 2시간 동안 원심분리하여 형성되어지는 내독소 결정체층을 각각 분리하여 위상차 현미경과 아포-결정체 염색에 의하여 내독소 결정체를 확인하고 20,000×g에서 15분간 증류수를 사용하여 2회이상 원심분리하여 세척한 다음 내독소 결정체의 습증량을 pH 배지별로 측정하여 회수율을 %로 환산하였다.

결 과

1. *B. thuringiensis* serovar. *thuringiensis*의 성장 곡선

BTT균을 TPB배지에서 회분배양(Batch cult-

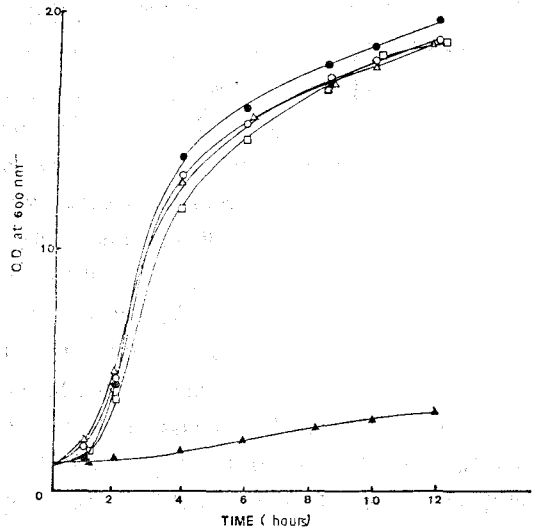


Fig. 1. Growth pattern of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* in the M-1 medium having various pHs at 28°C. (▲): pH 4, (□): pH 6, (△): pH 7, (○): pH 8, (●): pH 9. Growth was monitored turbidimetrically.

Table 2. Average growth rates for *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* on the four different media

Media	Average hours lasting			Average turbidity	Average doubling time
	lag phase	log phase	stationary phase		
M-1	0~1	1~8	8~	1.7	47.6
M-2	0~3	3~9	9~	1.1	49.6
M-3	0~2	2~11	11~	1.4	132.9
M-4	0~3	3~11	11~	1.2	110.2

ure)을 한 후, 발효 배지인 M-1배지에서 배양을 하면서 일정시간 마다 600nm에서 성장 양상을 측정할 결과가 Fig. 1에 제시되었다. pH 4인 M-1배지에서는 성장이 거의 되지 않았다. pH 6, 7, 8, 9인 M-1배지에서는 성장 양상이 유사하였다. 1시간 정도의 유도기(lag phase)를 지나서

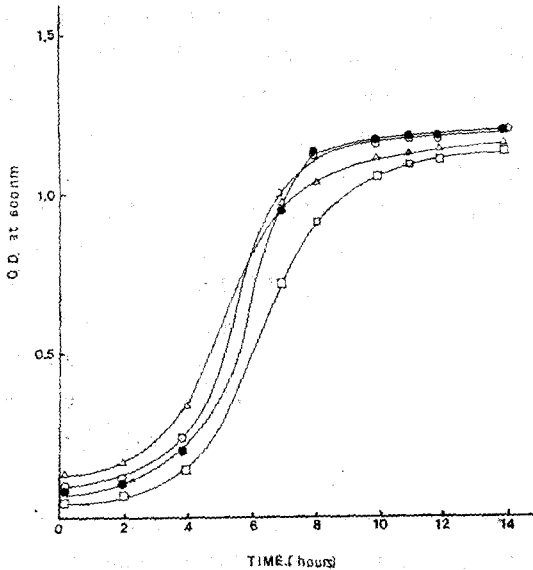


Fig. 2. Growth pattern of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* in the M-2 medium having various pHs at 28°C. (□) : pH 6, (△) : pH 7, (○) : pH 8, (●) : pH 9. Growth was monitored turbidimetrically.

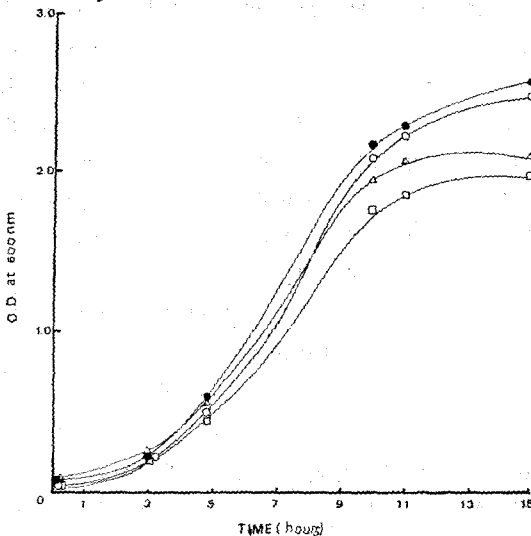


Fig. 3. Growth pattern *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* in the M-3 medium having various Hs at 28°C. (□) : pH 6, (△) : pH 8, (●) : pH 9. Growth was monitored turbidimetrically.

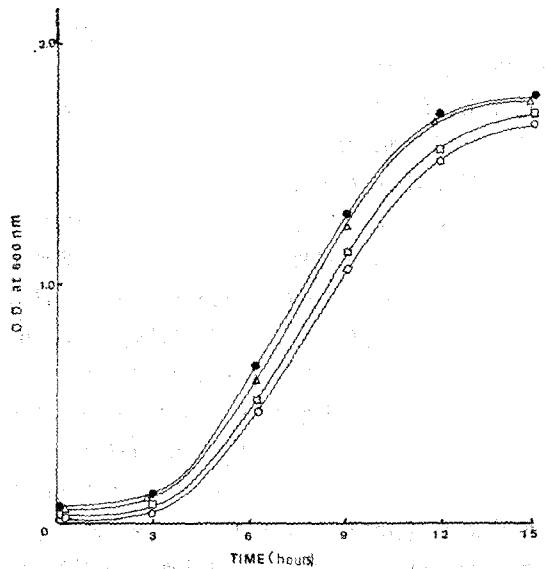


Fig. 4. Growth pattern of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* in the M-4 medium having various pHs at 28°C. (□) : pH 6 medium, (△) : pH 7, (○) : pH 8, (●) : pH 9. Growth was monitored turbidimetrically.

대수증식기(lag phase)로 들어가고, 배양 8시간 정도 부터는 정지기로 들어 갔으며, 성장에 의한 평균 현탁도는 9시간 때에 1.7에 도달하였으며, 세대시간은 stanier등(1976)의 방법으로 측정할 결과 평균하여 47.6분이었다(Table 2).

M-2배지에서 배지의 pH를 6, 7, 8, 9로 적정하여 BTT균을 희분배양하면서 측정할 성장곡선(Fig. 2)은 3시간 정도까지 유도기를 거쳐서 대수증식기가 9시간까지 계속되었으며 9시간 이후에 정지기에 도달하는 것을 관찰할 수 있었다. 접종 후 9시간 때의 평균 현탁도는 O.D. 600nm에서 평균 1.1이었으며, 세대시간은 49.6분으로 나타났다(Table 2).

pH 6, 7, 8과 9인 M-3배지(Table 1)에서 BTT균을 희분배양하면서 성장 양상을 측정할 결과(Fig. 3), 2시간 때까지의 유도기를 지나서 11시간 때까지 대수증식기가 이루어졌으며, 정지기는 11시간 이후에 도달하였다. 9시간때 평균 혼탁도는 1.4이었으며 세대시간이 132.9분으로 나타났다(Table 2).

pH 6, 7, 8과 9인 M-4배지에서의 성장 양상을 그래프화한 것이 Fig. 4이다. 유도기는 3시간 정도까지 지속되었으며, 11시간까지 대수증식기

가 계속되었고, 정지기는 11시간 이후부터 시작되었으며, 평균 혼탁도는 9시간 때 O.D. 600nm에서 1.2였으며, 세대시간은 평균 110.2분으로 나타났다(Table 2).

2. BTT의 아포와 내독소 결정체의 생산

BTT를 M-1, M-2, M-3, M-4배지에서 회분 배양한 후에 pH변화와 아포와 내독소 결정체의 습중량을 조사한 결과가 Table 3에 있다. pH 6인 M-1배지는 pH가 5.96으로 변화였고, 150ml 배양에서 3.113g의 증식된 세포를 얻었으며, 이 중에 내독소 결정체의 무게 비율은 20.43%였으며, 생존 아포수는 ml당 2.1×10^{10} 개였다.

pH 7인 M-1배지의 경우 6.47로 최종 pH가 변화였고, 15ml의 배양에서 2.037g의 세포 생산을 보였으며, 이 중에 내독소결정체 회수율은 22.51%였고, ml당 생존아포수는 8.3×10^8 개였다.

pH 8인 M-1배지는 최종 pH가 감소하여 pH 6.73이 되었으며, pH 9인 M-1배지는 pH 6.92로 변했다. pH 9인 M-1배지 150ml배양에서 3.143g으로 제일 많은 BTT의 증식을 얻었으며, 생존 아포수 역시 ml당 3.0×10^{10} 개로 가장 많았고 결정체 회수율은 20.01%이었다. pH 8배지에

서는 균체습중량은 2.771g이었고 생존 아포수는 ml당 1.2×10^{10} 개였으며, 결정체 회수율은 19.66%이었다.

M-2배지의 경우(Table 3) pH 6 M-2배지에서 최종 pH의 변화는 거의 없었으며, 150ml배양에서 가장 적은 BTT균체 습중량인 1.043g이었고, ml당 1.3×10^8 개의 생존 아포와 23.10%의 결정체 회수율을 보였다. pH 7 M-2배지는 pH 6.15로 변화였고, 생존아포는 ml당 1.5×10^8 개였으며, 150ml에서 1.293g의 세포가 생산되었고 회수된 결정체의 무게비는 21.32%이었다. pH 8인 배지는 6.76으로 pH가 변했고, ml당 2.5×10^9 개의 아포수가 나타났으며, 150ml배양에서 2.51g의 세포가 생산되었고, 20.13%의 내독소 무게비를 나타냈다. pH 9 배지에서는 7.01로 pH가 변화였고 ml당 5.2×10^9 개의 생존 아포수를 보였으며, 150ml 배양에서 2.522g의 세포가 생산되었고, 결정체 회수율의 무게비는 19.92%를 보였다.

M-3배지에서 BTT의 증식과 아포 및 내독소 결정체의 생산을 비교한 결과는 Table 3과 같다. M-3배지에서도 배양 초기의 배지 pH가 72시간 배양 후에 모두 변화했다. pH 6인 경우 pH 5.89로, pH 7은 pH 6.90으로, pH 8은 pH 7.51로, pH 9인 경우 pH 7.52로 변화하였다. 또한 BTT의 증식량도 다른 배지보다 높았다. pH 8인 경우는 150ml 배양에서 1.859g의 세포 생산량과 ml당 5.0×10^8 개의 생존 아포를 얻었고, pH 9인 M-3배양에서는 3.218g의 세포생산과 3.3×10^{10} 개의 아포수를 나타내어 다른 M-1, M-2, M-4 배지보다 가장 많았으며 회수된 결정체 무게비는 20.05%이었다.

M-4배지인 경우도 72시간 배양 후 처음 배양시의 pH가 모두 변화였는데, pH 6은 pH 6.34로 상승하였으며, pH 7인 경우 pH 6.63으로 감소하였고, pH 8은 pH 7.20으로 pH 9에서는 pH 6.67로 변화하였다. pH 6배양에서는 2,539g의 세포 생산과 3.0×10^9 의 생존 아포수를 보였으며 23.00% 결정체 회수율을 보였다. pH 8배양에서는 2.998g의 가장 많은 생산량과 ml당 6.0×10^9 개의 아포수를 보였으며, 회수된 결정체 무게비는 21.04%이었다.

Table 3. Estimate of viable spores and endotoxin crystal produced by *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* in the M-1, 2, 3 and 4 media.

Media	pH		Wet weight of the cell(g/150ml)	No. of viable spore (spore/ml)	Wet weight of Endotoxin Crystal/Total Cell Weight (%)
	I	F			
M-1	6	5.96	3.113	2.1×10^{10}	20.43
	7	6.47	2.037	8.3×10^8	22.51
	8	6.73	2.771	1.2×10^{10}	19.66
	9	6.92	3.143	3.0×10^{10}	20.01
M-2	6	6.02	1.043	1.3×10^8	23.10
	7	6.15	1.293	1.5×10^8	21.32
	8	6.76	2.510	2.5×10^9	20.13
	9	7.01	2.522	5.2×10^9	19.92
M-3	6	5.89	3.038	4.7×10^9	22.16
	7	6.90	3.026	1.1×10^9	21.03
	8	7.51	1.859	5.0×10^8	19.93
	9	7.52	3.218	3.3×10^{10}	20.05
M-4	6	6.34	2.539	3.0×10^9	23.00
	7	6.63	2.789	1.0×10^9	21.35
	8	7.20	2.998	6.0×10^9	21.04
	9	6.67	2.809	1.0×10^9	20.89

I: initial pH, F: final pH.

고찰

Bacillus thuringiensis var. *thuringiensis*(BTT) H1균은 곤충의 인시류등의 유충에 대한 치사성이 강한 살충세균이며, 세포내에서 이중 피라미드 형태의 내독소 결정체 단백질을 생성하는 것이 특징이어서(Heimpel, 1976), 본 연구에서는 BTT의 성장 양상과 아포 생산 및 내독소 결정체의 생산에 미치는 배지의 조성과 조건을 비교 연구하였다.

배지는 1차, 2차와 3차 배지로 연속적인 희분 배양을 하여 균의 증식과 아포 형성을 유도하였다. 3차 배지인 M-1, M-2, M-3, M-4 배지중에서 M-3배지가 BTT의 증식량이 제일 높았다. 특히 pH 9인 M-3배지에서 제일 높은 세포 증식과 아포를 얻었다.

M-1배지에서는 유도기가 다른 배지보다 빠르며 세대기간은 47.6분으로 높은 성장을 보였고, M-2배지의 성장은 M-1과 유사하고, 세대기간은 49.6분으로 나타났다. M-3배지는 M-1, M-2보다 대수증식기의 시간이 9시간이나 되었고, 세대기간은 132.9분으로 성장율이 타 배지보다 늦었으나 아포의 생산과 세포의 증식이 가장 많았다. M-4배지에서는 8시간의 대수증식기를 거쳐서 정지기로 도달하였으며, M-3배지와 유사한 양상을 보였고, 세대기간은 110.2분이었다.

이상의 결과로 볼 때, 배양시 대수증식기까지의 BTT의 성장속도가 빠른 배지에서는 영양세포수는 증가되어도 아포형성 및 내독소 결정체를 생산하는 율은 다소 낮은 것으로 보인다. Lee등(1986c)은 *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki*의 경우는 M-1배지에서 세대기간이 53.4분, M-2에서는 98분, M-3에서는 132분, 그리고 M-4에서는 127.5분으로 보고 했는데, 이것에 비하면 BTT는 세대기간이 대단히 빠른 것으로 나타났다.

배지의 pH조건도 pH 6, 7, 8과 9인 초기조건이 72시간 배양 후에는 모두 변화하였다. pH 6 배양액은 pH 5.89~6.34로 변하였고, pH 7배양액에서는 pH 6.15~6.90으로 다소 감소하였으며, pH 8에서는 pH 6.73~7.51로 많은 변화를 보였고, pH 9인 경우 pH 6.67~7.52로 거의 pH의

최종 변화는 6.5~7.5로 나타났다. pH 6.5에서 7.5사이의 배지에서 BTT의 배양이 적합하다고 생각된다. 또한 *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki*균의 경우도 본 결과와 유사하게 변이된 것을 Lee등(1986c)은 보고했다.

M-3배지가 내독소와 아포 생산 및 세포 생산량이 가장 많았던 배지인데 이 배지는 다른 M-1, M-2와 M-4배지와는 달리 Tryptose와 Soluble Starch가 결핍되어 있으며, dextrose의 양이 많았던 배지로서 성장율은 상대적으로 느린 경우이었으나 72시간 배양 후 세포생산과 아포수의 증가율이 가장 높았다. 내독소 결정체의 회수율 무게비는 20%전후로 하여 나타났는데 개개의 세포에서 내독소가 차지하는 비율은 높은 것으로 생각된다. 그러나, *B. thuringiensis* serovar *kurstaki*균은 pH 8인 M-4배지에서 성장 및 내독소와 아포의 생산이 제일 높았었다(Lee등, 1986c).

적요

Bacillus thuringiensis var. *thuringiensis* H1균을 4종류의 배지에서 배지 조성 및 pH 조건에 따라서 성장 양상과 아포와 내독소 결정체 생산을 조사했다.

1. 4개의 M-배지중 pH 9인 M-3배지에서 BTT의 증식량과 내독소 결정체 및 아포 생산수가 가장 높았다. 150ml배양에서 BTT의 생산량은 3.218g이었고, 생존 아포수는 ml당 3.3×10^{10} 개였고, 내독소 결정체의 회수된 무게비는 20.05%였다.

2. M-1배지에서 BTT의 세대기간은 평균 47.6분이었고, M-2에서는 평균 49.6분, M-3에서는 평균 132.9분, M-4에서는 평균 110.2분이었다.

3. M-배지의 초기 pH는 72시간 배양 후에 pH 6.5~7.5로 변화하였으며, 최적 배양 pH는 6.5~7.0이었다.

LITERATURES CITED

1. de Barjac, H. and R. Dedoner. 1968. Purification de la toxine thermostable de *Bacillus thuringiensis* et analyses complementaires. Bull. Soc. Chem. Biol., 50 : 941~

- 944.
2. Dulmage, H. 1970. Production of the spore- δ -endotoxin complex by variants of *Bacillus thuringiensis* in two fermentation media. J. Invertebr. Pathol., 16 : 385~389.
 3. Dulmage, H. 1971. Production of δ -endotoxin by eighteen isolates of *Bacillus thuringiensis*, serotype 3, in 3 fermentation media. J. Invertebr. Pathol., 18 : 353~358.
 4. Heimpel, A.M. 1976. A critical review of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner and other crystaliferous bacteria. Ann. Rev. Entomol., 12 : 287~322.
 5. Lecadet, M. and de Barjac. 1981. Pathogenesis of Invertebrate Microbial Disease, Davidsn Ed., Allanheld, Osmum, N.J. Chapter 11.
 6. Lee, H.H. 1982. Effects of exotoxin on mice produced by *Bacillus thuringiensis*. Kon Kuk University Academic Research Journal 26 : 53~60.
 7. Lee, H.H., K.H. Yoo and S.Y. Kim. 1984. Cloning of *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* insecticidal protein gene. HG. J. Gen. Eng. 1 : 29~35.
 8. Lee, H.H., T.S. Kang and K.H. Yoo. 1985. E.M. visualization and electrophoesis analysis of *B. thuringiensis* var *kurstaki* and var. *israelensis* delta endotoxin. Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng. 13 : 315~319.
 9. Lee H.H., T.S. Kang and C.K. Oh. 1986
 - a. Studies on the development of the *Bacillus thuringiensis* pesticide. 1. Purification of *B. thuringiensis* subsp. endotoxin crystals. Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng., 14 : 91~95.
 - b. 1986b. Studies on the development of the *Bacillus thuringiensis* pesticide. 2. electrophoresis analysis of *B. thuringiensis* subsp. endotoxin. Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng., 14 : 97~101.
 10. Lee, H.H., T.S. Kang and J.H. Suh. 1986d. Biochemical characterization of *Bacillus thuringiensis*, 23 serovar. Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng., 14 : 205~208.
 11. Lee, H.H., B.Y. Hyun and C.K. Oh. 1986c. Studies on the development of the *B. thuringiensis* pesticide. 3. Conditions of delta-endotoxin production by *B. thuringiensis* serovar *kurstaki*. Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng., 14 : 259~264.
 12. Mohd-Salleh, M.B. and L.C. Lewis. Toxic effects of Spore/Crystal rations of *Bacillus thuringiensis* on European corn borer larvae. J. Invertebr. Pathol, 39 : 290~297.
 13. Oh, S.S. and H.H. Lee. 1985. Studies on isolation and characterization of the entomocidal toxin and plasmid in *Bacillus thuringiensis*. Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng., 13 : 51~48.
 14. Samasanti, W., S. Pantuwatana, and A. Bhumiratana. 1982. Role of the parasporal body in causing toxicity of *Bacillus thuringiensis* toward *Aedes aegypti* larvae. J. Invertebr. Pathol., 39 : 41~48.
 15. Stanier, R.Y., E.A. Adelber and J. Ingraham. 1976. The microbial world, 4th Ed., p. 276, Prentice-Hall Inc., N.J.
 16. Shim, C.B., H.H. Lee and H.M. Lee. 1985. Purification and partial characterization of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* exotoxin. Kor. J. Microbiol., 23 : 271~281.