

Bacillus thuringiensis 살충제 개발에 관한 연구

—*B. thuringiensis* serovar *kurstaki* 내독소 생산 배지조건—

이형환 · 현병윤 · 오창근

건국대학교 생물학과 유전공학연구소
(1986년 5월 19일 수리)

Studies on the Development of the *Bacillus thuringiensis* Pesticide

— Conditions of delta-endotoxin production by
B. thuringiensis serovar *kurstaki* —

Hyung Hoan Lee, Byung Yoon Hyun, Chang Keun Oh

Institute for Genetic Engineering and
Department of Biology Kon Kuk University, Seoul 133, Korea
(Received May 19, 1986)

The compositions of the four media and their pHs for delta endotoxin production by *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* 3a3b were examined. In the M-4 media out of the 4 media at pH8, the production of the endotoxin and spore formation were maximal. The mean generation times of the bacterium were 53.4 minutes in the M-1 media, 98 in the M-2, 132 in the M-3, and 127.5 in the M-4. The proper pHs of the media for the endotoxin production appeared to be pH 7 to 8. In the M-4 media, the lag time lasted about 5 hours.

*Bacillus thuringiensis*는 살충력이 있는 외독소 (β -exotoxin)^(1,2,3,4)와 내독소(endotoxin)^(4,5,6)을 생산하며, 혈청형에 따라서 곤충에 대한 독성효과가 약간 다른 것으로 보고되었다^(2,6,8,9). 또한 Dulmage 등은 이 균의 배양배지에 따라서 독소의 생산과 살충효과가 다르지 않을까 생각하여 왔다^(10,11). 그리하여 본 연구에서는 인시류에 살충력이 강한 *B. thuringiensis* var. *kurstaki* 균의 배양조성과 pH 조건을 다르게 한 배지에서 배양했을 때의 이 균주의 성장과 내독소 생산에 미치는 영향을 연구한 것을 보고한다.

실험재료 및 방법

균주

본 연구실에 보관중인 *Bacillus thuringiensis*

serovar *kurstaki* 3a3bK-9 (BTK) 을 본 실험에 사용하였다.

배지의 제조

균주보관용 사면배지와 평판배지는 한천영양배지를 사용하였고, 제 1 차 배양배지는 증류수 1000 ml 에 Bacto-tryptose 2%, Bacto-dextrose 0.2%, NaCl 0.5%와 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.25% (TPB) 을 혼합멸균하여 사용하였으며, 제 2 차 배양배지도 동일한 조성으로 사용하였다. 제 3 차 배양 발효배지는 pH 의 조성을 달리한 M-1, M-2, M-3, M-4 라 칭한 배지를 사용했으며 조성은 Table 1 과 같다. 상기 배지성분중에 dextrose, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 는 각각 멸균된 증류수에 용해하여 여과 (whatman 0.2 μ m) 하였고, 나머지 성분은 950 ml 의 증류수에 용해한 후에 pH를 K_2HPO_4 와 KH_2PO_4

를 pH 6, 7, 8 과 9 로 조정 한 후에 121°C, 15 Lb 로 15분 간 가압 스팀 멸균 한 후에 여과 액을 첨가 하여 1000ml 이 되게 만든 후에 사용 했다.

생장 곡선 측정

평판 배지 상에 있는 BTK 한 개의 콜로니에서 1 백 금이를 TPB 100ml 에 접종 하여 28°C 에서 180rpm 으로 24시간 1 차 전탕 배양 한 후 이 배양액의 3% 를 제 2 차 배양 배지 인 TPB 100ml 에 접종 하여 28°C 에서 180rpm 으로 24시간 배양 한 후 제 3 차 배양 은 M-1, M-2, M-3 과 M-4 배지 150ml 씩에 2 차 배양액의 2% 를 각각 접종 하고 180rpm, 28°C 에서 72시간 배양 하는 동안 일정 시간 마다 정지 기에 도달 할 때 까지 분광 광도계 로 파장 600nm 에서 O. D. 를 측정 하였다. 측정 한 O. D. 값을 그래프로 그리고 성 장율을 Stanier 등의 방 법으로 측정 했다.

균체 습중량과 pH 측정

BTK 균을 각 pH 별로 만든 M-1, M-2, M-3 과 M-4 배지 150ml 에 접종 한 후에 72시간 동안 배양 을 한 다음 72시간 배양 때의 pH 를 측정 하고 4°C 에서 5,000×g 로 15분 간 원심 분리 하고, 다시 2번 세 척 한 다음 각 배지와 pH 별로 균체의 습중량을 측 정 하였다.

아포수의 계속

BTK 균체를 상기의 배지에서 72시간 배양 한 후 65°C 에서 10분 간 열처리 한 배양액 을 TPB 액체 배 지로 연속적인 회석을 한 다음 TPB 한천 평판 배지 에 0.1ml 씩 도말 한 후 28°C 배양기에서 3 일 배양 한 후에 아포수를 ml 당 수치로 계산 하였다.

내독소 결정체의 분리 및 양 측정

BTK 균체를 M-1, M-2, M-3 와 M-4 배지에 접 균 하여 28°C 에서 72시간 배양 을 한 후에 4°C 에서 5,000×g 로 15분 간 2 회 원심 분리 하여 세척 한 다음 1M NaCl 과 0.01% Triton X-100 혼합 용액 을 10 ml 에 현탁 하여 초음파 분쇄 기로 200W 에서 30초 간 격으로 20회 정도 세포 분쇄 를 실시 한 후 위상차 현 미경으로 세포벽 파괴 여부를 검정 하였 고, 균체 분 쇠액 을 20~70% 의 Na-Br 밀도 기울기 튜브 (NaBr 구배 형성 은 20%; 5ml, 30%; 8ml, 40%; 8ml, 50%; 10ml, 60%; 10ml, 70%; 5ml 의 NaBr 양으로 만든 다음 18시간 정도 정제 시킨 후 사용) 에 2.5ml 씩 적하 하여 20,000×g 로 4°C 에서 2시간 동안 원 심 분리 시킨 다음 나타나는 내독소 결정체 층을 각 각 분리 하여 위상차 현미경으로 내독소 결정체를 확 인 하고, 20,000×g 에서 15분 간 증류수를 사용 하여 2 회 원심 분리 하여 세척 한 다음 내독소 결정체 의 습중량을 pH 배지 별로 측정 하여 % 로 환산 하였다.

결 과

***B. thuringiensis* var. *kurstaki* 의 성장**

BTK 균을 1 차 배지와 2 차 배지에서 회분 배양 (batch culture) 을 시킨 후에 M-1 배지 (Table 1) 를 pH 6, 7, 8 과 9 로 조정 하여 9 시간 동안 회분 (회분) 배양 한 결과는 Fig. 1 에 나타냈다. pH 6, 7, 8 과

Table 1. Components of media for *Bacillus thuringiensis* culture

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	-
MgSO ₄ ·7H ₂ O	-	0.3	0.3	0.3
FeSO ₄ ·7H ₂ O	-	0.03	0.03	0.03
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	-	0.02	0.02	0.02

The pH of the media was adjusted with 10mM of K₂HPO₄ and KH₂PO₄·Distilled H₂O to 1,000ml each.

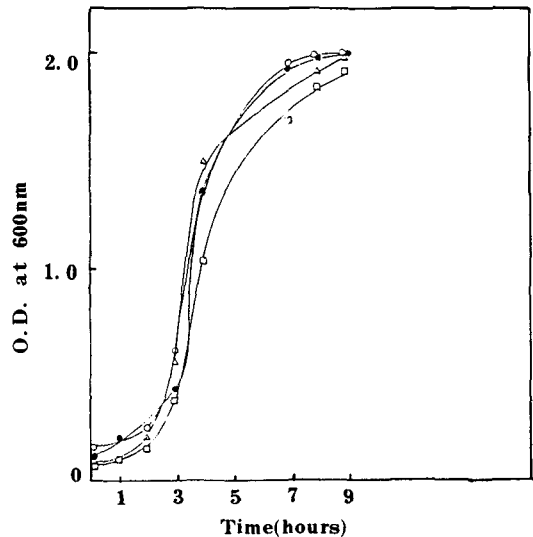


Fig. 1. Growth of *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* in the M-1 medium having various pHs at 28°C.

(□):pH 6 medium, (△):pH 7, (○):pH 8, (●):pH 9. Growth was monitored turbidimetrically.

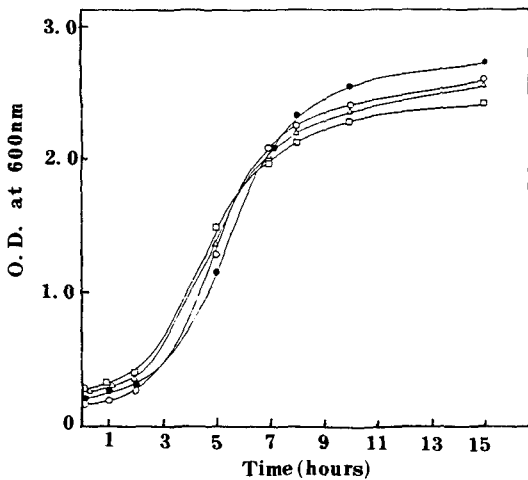


Fig. 2. Growth of *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* in the M-2 medium having various pHs at 28°C.
 (□): pH6 medium, (△): pH 7, (○): pH 8, (●): pH 9. Growth was monitored turbidimetrically.

9로 조정된 M-1 배지에서는 별 차이점없이 성장이 되었으며, 1 시간 정도의 유도기(lag phase)를 지나서 대수증식기(log phase)로 들어가 배양 9 시간 정도부터 정지기로 들어갔으며, 성장에 의한 현탁도는 배양 9 시간 때에 600nm에서 2.0까지 도달했다. 또한 세대시간은 Stanier 등(1976)의 방법으로 구한 결과 M-1 배지에서는 평균하여 53.4 분이 걸리었다(Table 2).

Fig. 2는 3차배지인 M-2배지(Table 1)에서 배지의 pH를 6, 7, 8과 9로 조정하여 28°C에서 BTK 균을 회분배양하면서 측정한 성장곡선이다.

M-2 배지에서도 BTK는 1시간 정도의 유도기를 지나서 가속기를 1시간 지나서 대수증식기에 들어가는 것을 관찰할 수 있었다. 대수증식기는 접종후

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

Media	Average hours lasting			Average ¹ Turbidity	Average ¹ doubling time
	lag phase	log phase	stationary phase		
M-1	0-1	1-9	9-	1.8	53.4
M-2	0-1	1-8	8-	2.4	98
M-3	0-1	1-9	9-	2.2	132
M-4	0-5	5-12	12-	2.0	127.5

¹average turbidity at 9 hour culture.

²doubling time expressed in minutes.

8 시간 때까지 이루어졌으며, 8 시간 이후는 정지기로 들어가기 시작했다. 접종후 9 시간 배양시의 현탁도는 O. D. 600nm에서 평균 1.8정도였으며, 세대시간은 28°C에서 98분이었다(Table 2).

Fig. 3은 M-3배지(Table 1)의 pH를 6, 7, 8과 9로 조정하여 BTK를 2차배양한 후 접종하여 28°C에서 회분배양하면서 조사한 성장곡선이다. pH가 다른 4 배지에서 성장의 거의 차이가 없었으나 pH 6인 배지에서 접종후 7시간째부터는 증식이 pH 7, 8, 9에 비하여 감소를 하기 시작 했음을 알 수 있었다.

성장형은 1시간정도의 유도기를 거쳐서 대수증식기에 들어간 후 9 시간 때까지 대수기를 유지하였고, 그후 정지기에 들어가기 시작했다. 세대시간은 평균 132분 정도였고, 9 시간 배양시의 현탁도는 O. D. 600nm에서 평균 2.2였다(Table 2). M-4 배지(Table 1)의 pH를 6, 7, 8과 9로 조정하여 BTK를 1차, 2차 배양한 후 M-4 배지에 접종한 후에 28°C에서 회분배양하면서 측정한 성장곡선이 Fig. 4이다. 여기에서 보면 전체적으로 유도기를 5시간 정도를 거친 것이 특이하게 나타났고, 특히 pH 6인 배지에서 유도기의 성장속도가 다른 pH 7, 8, 9 배지에 비해서 빠르게 나타났으나 접종후 8 시간 이후 부터는 pH 6과 7의 배지는 성장속도가 pH 8과 9에 비해 저조하게 떨어지는 경향이 나타났었고, 대수증식기가 접종 5 시간 후부터 12시간 때까지 지속되었으며, 그 이후 정지기로 들어감을 알 수 있었다. 9 시간 배양시의 현탁도는

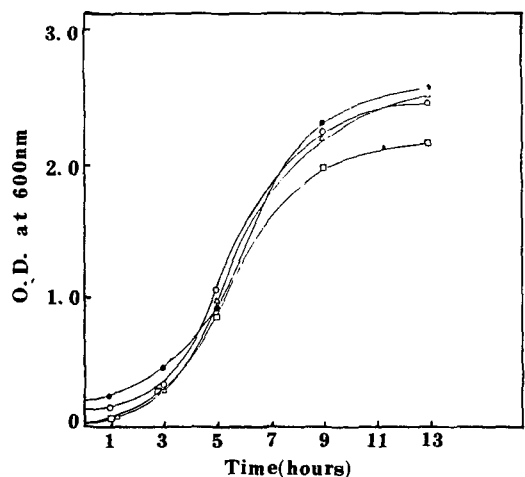


Fig. 3. Growth of *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* in the M-3 medium having various pHs at 28°C.

(□): pH 6 medium, (△): pH 7, (○): pH 8, (●): pH 9. Growth was monitored turbidimetrically.

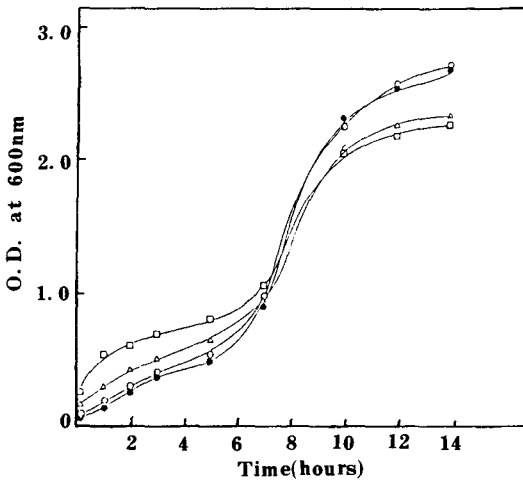


Fig. 4. Growth of *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* in the M-4 medium having various pHs at 28°C.

(□):pH 6 medium, (△):pH 7, (○):pH 8 and (●): pH 9. Growth was monitored turbidimetrically.

O. D. 600nm에서 평균 2.0 이었고, 세대시간은 약 127.5 분이었다 (Table 2).

BTK의 아포와 내독소 결정체 생산

BTK를 M-1, M-2, M-3 그리고 M-4 에서 회분 배양을 한 후에 원심분리를 하여 성장한 BTK의 아포와 내독소 결정체의 습중량을 조사한 것이 Table 3에 제시되었다. 즉 M-1 배지의 pH 6, 7, 8 과 9로 조정된 각 배지의 배양최초의 pH가 72시간 배양 후에 변하는 것을 알 수 있었다. pH 6인 M-1 배지는 pH 6.17로 pH 7 배지는 거의 변동이 없었고, pH 8 배지는 pH 7.42로, pH 9 배지는 pH 7.39로 변했음을 알 수 있었다. BTK의 150ml 회분 배양에서 pH 6의 M-1 배지에서는 2.525 grams의 증식된 세균과 아포 그리고 내독소 결정체를 얻었고, pH 7 배지에서는 가장 많은 3.349g을, pH 8의 M-1 배지에서는 2.792g, 그리고 pH 9의 M-1 배지에서는 최저인 2.013g을 얻었다.

pH 6 M-1 배지에서 생산된 생존아포수는 7.0×10^7 개였으며, 내독소결정체 습중량은 전체 무게의 19.93%였고, M-1 pH 7 배지에서는 생존아포수가 2.9×10^8 개였고, 회수된 내독소의 무게는 전체 무게의 20.34%를 차지했으며, M-1 pH 8 배지에서는 생존아포수는 1.7×10^7 개였고, 내독소결정체 무게는 19.81%였으며, pH 9인 M-1에서는 아포수는 1.0×10^8 개였고, 결정체는 19.17%였다.

M-2 배지에서의 BTK의 아포와 내독소 결정체 생산을 비교한 것이 Table 3에 있다. M-2 배지에서도 BTK점증시의 pH는 72시간후에 변이되었다.

pH 6은 상승하여 6.82로, pH 7은 pH 7.27로, pH 8에서는 pH가 하강하여 pH 7.53으로, 그리고 pH 9는 pH 7.58로 하강했다. BTK의 성장과 아포와 내독소 생산량은 M-2 pH 6 배지에서는 150ml에서 3.66grams이었고, 이중에 아포수는 1.0×10^8 개였고, 회수된 내독소결정체의 무게는 전체의 21.48%였다. M-2 pH 7 배지에서는 제일 많은 BTK증식을 나타내 4.535g을 생산했고, 이중 아포수는 8.5×10^8 개였고, 회수된 결정체수는 21.15%였다. M-2 pH 8과 9 배지에서는 BTK의 증식량이 적었다.

M-3 배지에서 BTK의 증식과 아포와 내독소결정체의 생산을 비교한 결과가 Table 3에 제시되었다. M-3 배지에서도 BTK점균 초기의 배지 pH는 모두 변했다. pH 6 배지는 5.08로, pH 8 배지는 6.09로, pH 9 배지는 6.90으로 변했다. 그리고 BTK의 증식은 150ml에서 M-3 pH 6 배지에서는 4.308grams이었고, 아포수는 2.09×10^{11} 개였으며, 회수된 내독소 결정체 무게비는 21.15%였다. M-3 pH 7 배지에서는 최고로 높은 4.0g을 생산했고, 아포수는 2.31×10^{11} 개였으며, 결정체의 무게비는 21.02%였다. pH 9 배지에서 나온 BTK의 무게는 3.205g이었고, 생존아포수는 1.3×10^{10} 개였으며, 회수된

Table 3. Estimate of viable spores and endotoxin crystal produced by *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* 3a3b in the media-1, 2, 3 and 4.

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	6.17	2.525	7.0×10^7	19.93
	7	7.08	3.349	2.9×10^8	20.34
	8	7.42	2.792	1.7×10^7	19.81
	9	7.39	2.013	1.0×10^8	19.17
M-2	6	6.82	3.660	1.0×10^8	21.48
	7	7.27	4.535	8.5×10^8	21.15
	8	7.53	2.651	6.1×10^7	20.09
	9	7.58	2.656	4.3×10^7	19.18
M-3	6	5.08	4.308	2.09×10^{11}	21.15
	7	6.68	4.000	2.31×10^{11}	21.02
	8	6.09	3.974	1.5×10^{10}	20.02
	9	6.90	3.205	1.3×10^{10}	19.36
M-4	6	6.25	4.320	3.33×10^{11}	20.94
	7	6.59	4.206	1.17×10^{11}	21.26
	8	7.16	4.902	2.87×10^{12}	20.09
	9	7.13	4.375	4.0×10^{11}	19.00

I: initial pH, F: final pH

결정체 무게비는 19.36%로 낮았다.

M-4 배지에서 BTK의 증식과 아포 및 내독소 결정체의 생산을 비교한 결과는 Table 4에 제시되어 있다. M-4 배지에서도 BTK의 초기 접종시의 배지의 pH가 모두 변했다. pH 6인 M-4 배지는 72시간 뒤에는 pH 6.25로 상승했고, pH 8배지는 pH 7.16으로, pH 9배지는 pH 7.13으로 각각 변했다. 또한 BTK의 증식량도 타배지보다 제일 높았다. M-4 pH 6 배지에서는 150ml에서 4.320grams을 얻었고, 이중 생존아포수는 1.17×10^{11} 개였고, 회수된 결정체의 비는 21.26%였으며, M-4 pH 8 배지에서는 BTK 4.902g을 얻었고, 이중 생존아포수는 2.87×10^{12} 개로 제일 많았고, 회수된 결정체비는 20.09%였다. M-4 pH 8 배지가 M-1, M-2, M-3와 다른 pH M-4 배지보다도 BTK 생산량과 아포수가 제일 많았다.

고 찰

Bacillus thuringiensis serovar *kurstaki* (BTK) 3a3b 균은 곤충의 인시류와 쌍시류등의 유충에 대한 치사성이 매우 높은 살충세균이며, 세포내에 이중 피라미드형의 내독소 단백질을 생산하는 것이 특징이다. 본 연구에서는 BTK의 성장과 아포생산 및 내독소결정체의 생산에 미치는 배지의 조성 조건을 비교 연구하였다.

배지는 1차, 2차와 3차배지로 나누어서 연속 증식과 아포형성을 유도하였다. 3차배지는 M-1, M-2, M-3와 M-4 배지중에서 M-4 배지가 BTK의 증식량이 제일 높았다. 특히 M-4 pH 8 배지에서 제일 높은 증식과 아포수를 얻었다.

M-1 배지에서는 초기에 대수증식기간이 길고 성장율이 높았으며 세대시간은 53.4분으로 다른 배지보다 매우 빠르게 성장하였고, 또한 M-2 배지에서도 M-1과 유사한 형이었으나 M-1보다 낮았고, 세대시간은 98분으로 M-1 배지에서 보다 성장율이 늦은 편이었다. M-3 배지에서는 M-2 배지에서보다 세대시간이 132분으로 더욱 성장율이 늦었으나, 아포의 생산수와 세포생산수는 높았다. 그러나 M-4 배지에서는 유도기가 다른 M-1, M-2와 M-3 배지에서보다 5배나 길었고, 대수증식시간도 BTK 접종 후 5~12시간 때로 늦었으나 BTK생산량, 아포수의 생산량과 내독소 결정체의 생산량이 비례적으로 최고로 증가했다. 이상의 결과로 볼 때 배양 중 초기의 BTK의 성장속도가 빠른 배지에서는 영양세포의 수는 증가해도 아포를 형성하고, 내독소 결정체를 생산하는 율은 약간 낮은것 같이 보인다.

배지의 pH 조건도 pH 6, 7, 8과 9의 초기 조건이 72시간 뒤에는 모두 바뀌었다. pH 6인 배지에서는 접종 후 7시간 때부터 pH가 약간 떨어졌다. pH 8과 9인 배지는 72시간 배양후에는 모두 pH 7.13~7.50 정도로 떨어졌다. BTK의 배양배지는 pH 7~7.5 정도가 적합하다고 생각된다. M-3 배지에서는 pH 5.08~6.90으로 떨어졌는데 이는 배지속에 dextrose량이 많이 들어 있었던 것으로 생각된다.

M-4 배지에서 유도기가 다른 배지에서보다 길었던 이유는 배지 조성중에 yeast extract의 결핍으로 대사과정의 속도가 느렸던 것 같다. 그러나 최종 72시간 때에는 제일 높은 생성율과 생산율을 나타내어 연구의 가치가 있었다고 생각된다.

모든 배지에서 회수된 내독소 결정체의 무게비는 평균하여 20% 전후를 나타내고 있다. 개개 세포에서 내독소의 무게비는 20% 정도로 내독소 결정체가 차지하는 비율이 높은 편이다.

상기의 연구로 살충미생물인 BTK의 증식과 내독소 생산조건을 밝히었으므로 이 결과의 응용으로 미생물 살충제의 제조에 보탬이 되리라 생각된다.

결 론

Bacillus thuringiensis serovar *kurstaki* 3a3b 균을 4 종류의 배지에서 배양하여 성장율과, 아포와 내독소 결정체 생산, 배지조성 및 적정 pH 조건을 조사하였다.

1. 4개의 배지중 M-4 pH 8 배지에서 BTK의 증식량과 아포생산수와 내독소결정체 생산이 제일 높았다. 150ml 배양에서 BTK 생산량은 4.90g 이었고, 생존아포수는 2.87×10^{11} 개였고, 내독소결정체 무게 비는 20%였다.

2. M-1 배지에서 BTK의 세대기간은 평균 53.4분이었고, M-2 배지에서 BTK의 세대기간은 평균 98분이었고, M-3 배지에서 BTK의 세대기간은 평균 132분이었고, M-4 배지에서 BTK의 세대기간은 평균 127.5분이었다.

3. 배지의 pH는 pH 7과 8이 BTK의 증식과 내독소 생산에 적합했다.

4. M-4 배지는 성장 유도기간이 5시간이나 되는 배지였다.

사 사

본 논문은 산학재단 연구비에 의해 이루어진 연구 중 일부이며, 연구지원에 대하여 감사를 드립니다.

참고문헌

1. de Barjac, H. and R. Dedonder: *Bull. Soc. Chem. Biol.*, **50**, 941-944 (1968).
2. Llecadet, M. and H. de Barjac: Pathogenesis of Invertebrate Microbial Diseases, (Davidson ed.) Allanheld, Osmum, N.J. Chapter 11.
3. Lee, H.H.: *Kon Kuk University Academic Research Journal, Seoul, Korea*, **26**, 53-59 (1982).
4. Shim, C.B., H.H. Lee and H.M. Lee: *Kor. J. Microbiol.*, **23**, 271-281 (1985).
5. Heimpel, A.M.: *Ann. Rev. Entomol.*, **12**, 287-322 (1967).
6. Oh, S.S. and H.H. Lee: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **13**, 51-57 (1985).
7. Lee, H.H., T.S. Kang and C.K. Oh: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **14**, 91-95 (1986).
8. Mohd-Salleh, M.B. and L.C. Lewis: *J. Invertebr. Pathol.*, **39**, 290-297 (1982).
9. Samasanti, W., S. Pantuwatana and A. Bhumiratana: *J. Invertebr. Pathol.*, **39**, 41-48 (1982).
10. Dulmage, H.T.: *J. Invertebr. Pathol.*, **16**, 385-389 (1970).
11. Dulmage, H.T.: *J. Invertebr. Pathol.*, **18**, 353-358 (1971).
12. Stanier, R.Y., E.A. Adelberg and J. Ingraham: *The microbial world, 4th ed., p276, Prentice-Hall Inc., N.J.* (1976).