

Bacillus thuringiensis 생장과 살충성 결정단백질 생성에 대한 탄소원의 영향

김무기·안병구*

전북대학교 농과대학 농화학과

초록 : 액체배양 실험으로 14가지 탄수화물을 사용하여 *B. thuringiensis*의 생장, 포자형성 및 살충성 결정단백질 생성에 대한 탄소원의 영향을 조사하였다. 최대 세포밀도는 *B. thuringiensis* 균주에 따라 접종 16.7~22시간 후에 모든 탄소원배지에서 $10^7 \sim 10^8$ cells/ml 수준으로 나타났고, 접종 16.7~24.7시간 후에 포자가 나타나기 시작하여 포자형성율이 80%에 이르는 시간은 균주에 따라 28~51.3 시간이 소요되었다. 배양에 따른 배지의 pH변화는 없었고, 단백질 총량은 sucrose를 사용한 배지에서 가장 높았고, 전분을 첨가했을 때 가장 낮았다. Glucose, lactose, maltose 또는 sucrose를 탄소원으로 사용한 배지에서 살충성 결정단백질 생성량이 많았고, 단백질 총량과 살충성 결정단백질량은 비례관계에 있었다. *B.t. kurstaki*와 *B.t. israelensis*에서 생성되는 서로 다른 종류의 살충성 결정 단백질의 양은 사용한 모든 탄소원의 경우 그 개별적 증감의 경향이 같았다.(1996년 3월 27일 접수, 1996년 5월 29일 수리)

서 론

지난 수십년동안 모든 생물에 독성을 나타내며, 잘 분해되지 않는 유기합성농약을 부분별하게 사용하여 결과적으로 병균해충의 농약에 대한 저항성을 증대시키고 심각한 환경오염을 초래하게 되면서 전세계적으로 많은 문제를 야기시키게 되었다. 이 문제에 대한 현명한 대처방안으로 생물방제방법이 도입되어 큰 관심을 불러일으키고 있다.¹⁾

생물농약은 미생물체제가 주류를 이루고 있으며, 그 중에서도 *B. thuringiensis*를 이용한 살충제가 그 핵심을 이루고 있다.²⁻⁵⁾ 북미를 중심으로 *B. thuringiensis*제제가 상업화되면서 전세계적으로 그 사용량이 크게 증가되었고, 우리나라에서도 1989년 처음 *B. thuringiensis*제제가 도입된 이래 매년 그 사용량이 증가되고 있다.

Gram 양성세균인 *B. thuringiensis*는 포자를 형성하는 시기에 결정성 단백질을 생성하는데,⁶⁻⁸⁾ 이 결정단백질의 생성량과 살충력이 *B. thuringiensis*제제의 성능을 좌우하게 된다. *B. thuringiensis*가 생성하는 살충성 결정단백질의 양과 질은 균주에 따라서 달라질 수 있지만, 배양조건 즉, 배지의 조성을 조정하여 *B. thuringiensis*의 세포밀도와 포자형성률을 증가시킬 수 있기 때문에,^{9,10)} *B. thuringiensis*의 양분요구 특성을 조사하여 포자형성과 살충성 결정단백질의 생성을 조절할 수 있다고 본다.^{11,12)} 대부분의 *B. thuringiensis* 균주들은 단백질, peptide 혹은 아미노산형태의 질소와 무기질을 함유하는 glucose 배지에서 잘 자라는데 amylases를 생성하기 때문에 glucose 대신 전분을 사용할 수도 있다.¹³⁾ 탄수화물은 ene-

rgy원으로서의 중요할 뿐만 아니라, 세포의 발효기간중에 배지를 산성화하여 생장을 저해할 수도 있다. Glucose는 *B. thuringiensis*의 세포생장을 촉진하고, 따라서 세포밀도를 증가시킬 수 있으나 포자형성을 저해할 수도 있다.¹⁴⁾ 따라서 살충성 결정단백질의 생성을 위해서는 탄수화물 대사의 이 두가지 특성을 조화시킬 필요가 있다고 본다.

지금까지 국내외적으로 이루어진 연구들은 실험에 사용한 *B. thuringiensis* 균주의 선정에 있어서 살충성 결정단백질의 특성을 기준으로 하기 보다는 오히려 임의적이었으며, *B. thuringiensis*의 포자밀도 및 포자형성 시간 등을 중심으로 이루어졌고,^{5,15,16)} Scherrer 등¹⁷⁾과 Kuppasamy와 Balaraman¹⁸⁾는 glucose농도에 대한 영향만을 조사하는 등 실험재료가 제한적이었고, *B. thuringiensis*세포가 생성하는 살충성 결정단백질을 전체의 양으로만 계산하여 서로 다른 크기의 살충성 결정단백질에 대한 개별적인 증감에 대한 분석은 없었다.

이에 본 연구에서는 이러한 점들을 보완하여 에너지원으로 이용되는 몇가지 탄소원에 대하여 *B. thuringiensis*의 생장과 포자형성 및 살충성 결정단백질 생성에 미치는 영향을 비교 검토한바 그 얻어진 결과를 보고 하고자 한다.

재료 및 방법

균주

본 실험에 사용된 균주는 살충성 결정단백질을 기준으로 해서 나비목(Lepidoptera) 유충에 대해 살충성이 있

찾는말 : *Bacillus thuringiensis*, 탄소원, 살충성 결정단백질, 포자형성
*연락처

Table 1. Effect of carbon sources on growth of *B. thuringiensis* strains in liquid culture.

Carbon sources	Maximum cell density				Time to maximum cell density				
	A ^a	B	C	D	A	B	C	D	D
		log10	CFU ^b /ml				hours		
Fructose	7.91	7.94	7.88	8.43	20.0	17.3	19.3	17.3	17.3
Galactose	7.77	7.62	7.97	8.17	18.7	18.0	18.7	18.0	18.0
Glucose	7.95	8.06	7.77	8.44	20.7	16.7	20.0	18.0	18.0
Mannose	8.02	8.05	7.81	8.32	18.0	17.3	20.0	16.7	16.7
Mannitol	7.84	7.66	7.83	8.18	18.7	16.7	20.0	17.3	17.3
Lactose	7.93	8.08	8.04	8.11	20.0	16.7	18.7	18.0	18.0
Maltose	8.17	7.99	8.04	8.41	19.3	18.0	18.0	18.0	18.0
Sucrose	7.95	8.18	8.15	8.05	18.7	17.3	18.0	18.0	18.0
Corn starch	8.13	7.71	7.95	8.09	21.3	19.3	20.0	18.7	18.7
Potato starch	8.09	7.43	7.85	8.16	22.0	19.3	20.0	18.7	18.7
Rice starch	8.27	7.24	7.85	8.01	21.3	18.7	19.3	18.7	18.7
Wheat starch	8.10	7.48	7.86	7.88	21.3	18.7	19.3	18.7	18.7
Glycerol	8.24	7.65	8.01	8.47	21.3	18.0	18.7	18.0	18.0
Molasses	8.34	7.62	8.23	8.20	18.7	16.7	18.0	18.0	18.0
LSD _{0.05}	0.32	0.29	0.27	0.24	1.6	1.7	1.2	1.6	1.6

^aA; *B. thuringiensis*, B; *B. tenebrionis*, C; *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, D; *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*. ^bCFU; Colony forming unit.

는 단백질을 생성하는 *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis*(*CryI*)과 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*(*CryI*과 *CryII*), 딱정벌레목(Coleoptera) 유충에 살충성이 있는 단백질을 생성하는 *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*(*CryIII*), 그리고 파리목(Diptera) 유충에 살충성이 있는 단백질을 생성하는 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*(*CryIV*와 *CytA*) 등을 사용하였다.

배지 및 배양

기본배지(pH 7.0, 7 g K₂HPO₄, 2 g KH₂PO₄, 0.5 g C₆H₅Na₃O₇·2H₂O, 0.1 g MgSO₄·7H₂O, 3.2 g yeast extract per liter)을 121°C에서 15분간 가압멸균하고, 탄소원으로 fructose, galactose, glucose, mannose, mannitol, lactose, maltose, sucrose, starch(corn, potato, rice, wheat), glycerol 또는 molasses를 여과살균하여 접종 직전 0.1% 수준이 되도록 300 ml 배지가 들어 있는 1 liter 삼각 flask에 첨가하여 사용하였다. Luria-Burtani(LB) broth에서 10⁷~10⁸ cells/ml 수준으로 배양된 균주를 10³ cells/ml 수준이 되도록 각 탄소원배지에 접종하고 30°C, 180 rpm에서 배양하였고 실험구는 3반복으로 하였다.

세포의 증식과 포자형성

각 배지별로 접종 10시간 후 부터 2시간 간격으로 Drop plate count방법¹⁹⁾을 이용하여 생세포수를 조사하여 최대 세포밀도와 이에 이르는 시간을 조사하였고, 배지의 pH변화도 조사하였다. 현미경관찰과 병행하여 viable spore count로 포자밀도와 포자형성률을 조사하였다. Viable spore count는 배양된 세포의 일정량을 75°C에서 15분동안 열처리하여 생세포와 포자를 구별하고, 생세포수 조사방법과 동일하게 LB plate상에서의 colony for-

ming unit를 조사하여 포자수와 포자형성률을 조사하였다.

살충성 결정단백질 정량

포자형성 후 세포용해가 완료된 다음 포자와 결정단백질 혼합물을 4°C에서 10분간 10,000 rpm으로 원심분리하고, 0.5M NaCl로 2번, 살균수로 4번을 원심분리하면서 수확하고, Bradford방법²⁰⁾에 의해 단백질 총량을 측정하였다. 살충성 결정단백질은 8% SDS-PAGE에 의해 성분별로 분리하고, gel을 얼음에 보관한 0.1M KCl 용액에 10~15분 정도 담가 두어 단백질 band가 하얗게 침전되도록 한 다음 살충성 결정단백질 band를 잘라내어 phosphate buffered saline(pH 7.4, 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na₂HPO₄, 0.24 g KH₂PO₄ per liter)를 넣고 균질화한 후 단백질 총량의 정량방법과 동일하게 생성량을 조사하였다.

결과 및 고찰

세포의 증식

LB-broth에 배양된 균주들을 10³ cells/ml 수준으로 각각 다른 탄소원을 함유한 배지에 접종하고 10시간이 경과했을 때부터 2시간 간격으로 세포수를 조사하여 균주별로 각각의 탄소원에 따라 최대 세포밀도와 이 최대밀도에 이르는 시간을 Table 1에 나타냈다.

Table 1에 나타난 바와 같이 모든 균주들이 사용된 탄소원을 energy원으로서 잘 이용하고 있었으며, 균주 간에 세포증식이 가장 컸던 탄소원 배지와 가장 작았던 배지 간의 세포밀도 차이는 log 1 이내로서 사용한 탄소원 종류에 따라 세포증식에 대한 영향이 없음을 보

Table 2. Incubation time for the initiation of cell lysis of *B. thuringiensis* strains in liquid culture containing different carbon sources.

Carbon sources	A ^a	B	C	D
	hours			
Fructose	22.0	19.3	20.0	17.3
Galactose	20.0	18.7	20.7	18.0
Glucose	24.7	18.7	22.0	18.0
Mannose	20.7	20.0	22.7	16.7
Mannitol	21.3	16.7	20.7	17.3
Lactose	18.7	17.3	19.3	18.0
Maltose	18.0	18.0	20.7	18.0
Sucrose	19.3	18.7	18.7	18.0
Corn starch	18.7	20.7	20.7	18.7
Potato starch	19.3	20.0	18.7	18.7
Rice starch	19.3	18.7	18.0	18.7
Wheat starch	20.0	18.7	18.7	18.7
Glycerol	19.3	19.3	19.3	18.0
Molasses	19.3	18.7	18.7	18.0
LSD _{0.05}	2.1	2.5	2.1	1.6

^aA; *B. thuringiensis*, B; *B. tenebrionis*, C; *B. kurstaki*, D; *B. israelensis*.

여주고 있다. 그러나 균주중에 *B. t. israelensis*는 밀전분 첨가 배지를 제외한 모든 탄소원 배지에서 10⁸ cells/ml 이상의 세포밀도를 나타내어 다른 균주보다 세포증식이 왕성했음을 보여 주었다.

한편 집종한 균주가 증식되어 최대 세포밀도에 도달하는 시간은 접종후 16.7~22시간이 소요되었으며, 균주별로 다른 탄소원 배지간에 성장속도의 차이를 나타냈다. *B. t. tenebrionis*와 *B. t. israelensis*가 *B. thuringiensis*와 *B. t. kurstaki*보다는 생장이 더 빨랐고, 특히 모든 균주가 전분을 탄소원으로 사용한 배지에서 세포증식이 느린 것으로 나타났는데, 이는 이 등²¹⁾과 Mummigatti와 Raghumathan²²⁾의 연구에서도 전분을 단독으로 사용했을 때는 세포증식이 작았다고 했으며, Doi 등²³⁾도 전분을 탄소원으로 사용했을 때 *B. subtilus*의 성장율이 다른 탄소원에 비하여 낮았다고 했다.

생세포수를 조사하면서 배지의 pH를 조사한 결과 유의적인 변화는 나타나지 않았는데, 이는 다른 배지^{24,25)}의 경우보다 인산염의 완충능이 컸기 때문인 것으로 생각된다.

포자형성

현미경 관찰로 각 배지에 접종 배양된 균주의 세포 용해가 일어나기 시작한 시간을 조사하여 Table 2에 나타냈다. 이 결과에서 세포증식이 빨랐던 *B. t. tenebrionis*와 *B. t. israelensis*가 세포용해도 먼저 이루어졌으며, 탄소원 별로는 *B. t. tenebrionis*의 경우에는 mannitol, *B. t. israelensis*의 경우에는 mannose, *B. t. kurstaki*의 경우에는 쌀전분, *B. t. israelensis*의 경우에는 mannose를 탄소원으로 사용한 배지에서 가장 빠른 세포용해를 나타내어

Table 3. Incubation time for 80% sporulation of *B. thuringiensis* strains in liquid culture containing different carbon sources.

Carbon sources	A ^a	B	C	D
	hours			
Fructose	50.7	35.3	31.3	37.3
Galactose	47.3	36.0	28.0	36.7
Glucose	46.7	40.7	51.3	37.3
Mannose	41.3	38.0	28.7	30.7
Mannitol	45.3	42.0	31.3	39.3
Lactose	44.0	39.3	32.7	32.7
Maltose	48.7	39.3	32.7	33.3
Sucrose	39.3	34.0	31.3	32.0
Corn starch	49.3	40.7	34.0	31.3
Potato starch	40.7	42.0	36.0	32.7
Rice starch	44.0	41.3	37.3	32.0
Wheat starch	47.3	40.0	34.7	32.7
Glycerol	42.7	42.0	30.7	30.7
Molasses	38.0	38.7	32.0	32.0
LSD _{0.05}	5.2	3.8	5.1	5.3

^aA; *B. thuringiensis*, B; *B. tenebrionis*, C; *B. kurstaki*, D; *B. t. israelensis*.

균주간에 탄소원에 대한 반응이 달랐다. 더구나 세포증식이 느렸던 전분 첨가배지도 다른 탄소원을 사용한 배지와 같은 시기에 세포용해가 일어났다. 하지만 *B. thuringiensis*을 glucose 첨가배지에 접종을 하면 다른 탄소원 배지보다 세포용해가 늦게 일어나는 것으로 조사되었다. Doi 등²³⁾과 Goldberg 등¹⁶⁾의 연구결과에서 사용한 모든 배지에서 세포용해는 접종후 16시간에 일어났다고 한 것보다 탄소원 배지별로 1~9시간정도 늦었다.

현미경관찰과 viable spore count로 포자형성률을 계산하여 포자형성률이 80%가 되기 까지의 시간을 조사하였다. 균주에 따라 접종후 28~51.3시간이 경과했을 때 80% 이상의 포자형성률을 나타냈는데, 균주별로 보면 *B. thuringiensis*는 18.7~30.7시간, *B. t. tenebrionis*는 15.3~25.3시간, *B. t. kurstaki*는 6.0~29.3시간, *B. t. israelensis*는 12.6~20시간이 경과했을 때 80% 이상의 포자형성률에 도달하는 것을 알 수 있다. *B. thuringiensis*는 maltose, *B. t. tenebrionis*는 mannitol을 첨가한 배지에 배양하면 다른 탄소원보다 세포용해는 빨리 일어나지만 80% 포자형성률에 도달하는 데는 가장 많은 시간이 소요되는 것으로 나타났다.

포자수를 조사하면서 포자형성률의 변화가 거의 정체기에 이르렀을 때 각 배지의 포자와 결정단백질 혼합물을 수확하였으며, 그 시기는 80% 이상의 포자형성률을 나타내는 시점에서 8~10시간이 경과했을 때였다. Table 4에서 보는 바와 같이 *B. thuringiensis*와 *B. t. kurstaki*를 접종한 molasses, *B. t. tenebrionis*를 접종한 sucrose, 그리고 *B. t. israelensis*를 접종한 maltose 첨가배지에서 포자밀도와 세포밀도가 가장 많았다. 한편 sucrose를 첨가한 배지에 *B. t. tenebrionis*, *B. t. kurstaki*, 그리고

Table 4. Effect of carbon sources on the rate of sporulation of *B. thuringiensis* strains at harvest in liquid culture.

Carbon sources	Spore number				Sporulation rate				
	A ^a	B	C	D	A	B	C	D	
	log ₁₀ CFU ^b /ml				%				
Fructose	7.78	7.69	7.53	7.94	90.9	84.9	85.2	85.1	
Galactose	7.63	7.53	7.56	7.74	82.5	85.2	84.1	86.4	
Glucose	7.50	7.49	7.74	7.18	86.3	83.4	86.2	88.5	
Mannose	7.62	7.48	7.67	8.08	89.3	89.0	85.3	89.5	
Mannitol	7.67	7.04	7.45	8.08	86.2	85.1	86.2	90.0	
Lactose	7.93	6.84	7.67	7.99	83.3	85.4	89.0	83.9	
Maltose	7.73	7.71	7.40	8.14	87.6	86.8	89.6	83.8	
Sucrose	7.46	7.86	7.84	7.87	89.5	88.4	90.6	92.2	
Corn starch	7.57	7.32	7.66	7.73	85.4	85.4	86.9	91.3	
Potato starch	7.57	7.06	7.49	7.86	82.5	83.0	89.2	89.5	
Rice starch	7.59	7.42	7.48	7.56	84.8	82.9	90.1	88.8	
Wheat starch	7.64	7.38	7.52	7.72	84.4	89.3	88.0	89.9	
Glycerol	7.82	7.35	8.03	7.37	87.0	86.9	86.6	90.2	
Molasses	8.15	7.66	8.10	8.07	83.4	88.8	85.2	89.0	
LSD _{0.05}	0.30	0.31	0.29	0.24	3.5	4.6	4.3	4.0	

^aA; *B. thuringiensis*, B; *B. tenebrionis*, C; *B. kurstaki*, D; *B. israelensis*. ^bCFU; Colony forming unit.

Table 5. Effect of carbon sources on the production of total protein of *B. thuringiensis* strains in liquid culture.

Carbon sources	A ^a	B	C	D
	pg/1,000 spores			
Fructose	39.3	89.4	52.9	47.2
Galactose	31.4	42.7	29.8	48.3
Glucose	59.6	79.4	49.6	68.7
Mannose	29.5	36.3	34.6	48.0
Mannitol	34.4	42.0	27.7	40.7
Lactose	59.4	56.3	51.3	53.8
Maltose	66.5	78.4	54.7	61.9
Sucrose	88.8	112.2	85.2	113.2
Corn starch	28.8	49.2	24.9	30.5
Potato starch	23.5	34.0	24.6	17.8
Rice starch	22.9	21.3	23.3	9.9
Wheat starch	25.0	20.3	15.8	21.5
Glycerol	79.3	47.9	62.9	73.8
Molasses	26.4	57.5	39.1	22.6
LSD _{0.05}	7.8	9.4	8.8	5.7

^aA; *B. thuringiensis*, B; *B. tenebrionis*, C; *B. kurstaki*, D; *B. israelensis*.

*B. israelensis*를 배양했을 때 포자밀도가 가장 컸는데, 그와 상반되게 *B. thuringiensis*의 경우에는 sucrose 첨가배지에 접종 배양했을 때 포자밀도가 사용된 탄소원 가운데 가장 작았다. 수확시 포자형성률은 82.5~92.2% 수준으로 나타났는데, 세포밀도와 포자밀도가 크다고 해서 포자형성률이 높지는 않았다. *B. thuringiensis*는 fructose, *B. tenebrionis*는 밀전분, *B. kurstaki*와 *B. israelensis*는 sucrose을 탄소원으로 사용했을 때 다른 탄소원배지보다 포자형성률이 높았다.

살충성 결정단백질 생성

각각 다른 탄소원 배지에서 형성된 단백질 총량은 각 균주가 포자 1,000개를 형성하면서 생성하는 단백질량으로 계산하여 Table 5에 나타냈다. 균주별로 sucrose을 탄소원으로 사용한 배지에서 단백질 총량이 가장 많았고, 전분을 사용한 배지에서 가장 적었다. 그러나 molasses을 사용한 배지에 *B. thuringiensis*, *B. kurstaki*, 또는 *B. israelensis*를 접종 배양했을 때 단백질 총량은 포자 밀도와 비례하지 않았으며, 전분을 사용한 배지와 같은 수준을 나타내었다. 모든 균주들이 포자를 형성하면서 생성하는 살충성 결정단백질 생성량을 조사하여 Table 6에 나타냈다. 단백질 총량이 많았던 sucrose 첨가배지에서 살충성 결정단백질량도 많이 생성되었고, 단백질 총량이 적었던 전분을 사용한 배지에서 살충성 결정단백질량도 적었는데 이는 Mummigatti와 Raghumathan²¹⁾의 연구결과와도 일치하고 있다. *B. thuringiensis*와 *B. tenebrionis*에서 생성된 살충성 결정단백질량은 단백질 총량의 41~78%을 차지했으며, 특히 이당류 탄수화물을 탄소원으로 사용했을 때는 단백질 총량의 71~78%에 해당하는 높은 생성량을 보였다. *B. kurstaki*에서 생성되는 결정단백질중 *CryIA* 단백질은 단백질 총량의 17~55%, *CryIIA* 단백질은 단백질 총량의 25~57%을 생성하여 *CryIIA* 단백질이 더 많이 만들어짐을 알 수 있다. *B. israelensis*에서 생성하는 살충성 결정단백질중 *CryIVA*, *CryIVB*, *CryIVC* 단백질은 단백질 총량의 1~10%가 생성되고, *CryIVD* 단백질은 7~34%, *CytA* 단백질은 10~54%가 생성되어 다섯 종류의 형태중 *CytA* 단백질을 가장 많이 생성함을 알 수 있다. 그리고 *B. kurstaki*의 전체 살충성 결정단백질량은 단백질 총량의 59~90%, *B. israelensis*의 경우에는 31~86%을 생성하

Table 6. Effect of carbon sources on the production of insecticidal crystal proteins of *B. thuringiensis* strains in liquid culture.

Carbon sources	A ^a		B		C		D		
	<i>CryIB</i>	<i>CryIIIA</i>	<i>CryIA</i>	<i>CryIIA</i>	<i>CryIVA</i>	<i>CryIVB</i>	<i>CryIVC</i>	<i>CryIVD</i>	<i>CytA</i>
	pg/1,000 spores								
Fructose	22.1	61.7	16.7	14.8	3.4	2.2	4.6	11.4	18.8
Galactose	23.3	21.8	6.1	16.1	3.2	1.8	3.7	15.4	16.0
Glucose	45.1	55.6	17.4	22.5	3.3	2.1	4.5	17.2	27.6
Mannose	17.1	23.5	12.0	19.8	2.9	1.1	3.8	13.9	13.8
Mannitol	21.2	21.3	15.1	9.6	1.5	1.1	4.2	15.3	12.2
Lactose	43.2	40.1	19.6	22.9	3.1	1.3	4.3	9.2	19.0
Maltose	49.3	56.1	21.7	27.2	3.6	1.2	5.0	17.6	26.6
Sucrose	69.4	87.5	33.8	26.4	3.5	1.0	5.9	35.9	28.9
Corn starch	14.4	27.3	5.3	12.3	0.8	0.4	0.7	9.3	7.5
Potato starch	17.0	20.2	4.1	10.4	0.9	0.5	1.7	5.3	4.6
Rice starch	9.3	12.8	4.6	10.5	0.4	0.4	0.6	0.7	1.0
Wheat starch	16.1	12.6	2.8	4.0	1.1	0.9	1.0	5.4	7.5
Glycerol	53.8	33.0	26.9	21.4	1.0	0.5	2.3	28.6	21.6
Molasses	11.1	41.5	14.5	12.2	1.4	0.6	0.6	4.5	12.1
LSD _{0.05}	5.3	4.6	1.5	2.4	0.4	0.2	0.2	3.3	2.6

^aA; *B. thuringiensis*, B; *B. tenebrionis*, C; *B. kurstaki*, D; *B. israelensis*.

였다. *B. kurstaki*와 *B. israelensis*의 결정단백질 생성량을 서로 비교해 보면 한 균주내에서 만들어지는 살충성 결정단백질 형태중 어느 한쪽 살충성 결정단백질만 증가하거나 감소하지 않고 같은 경향으로 증가하거나 감소함을 알 수 있다.

이상의 결과로 부터 탄소원에 따라 각 균주들이 생성하는 단백질 총량과 살충성 결정 단백질량과는 비례 관계에 있음을 알 수 있고, 어느 균주든지 탄소원으로 glucose 또는 이당류 탄수화물을 탄소원으로 사용하면 많은 양의 살충성 결정단백질을 얻을 수 있음을 알 수 있다.

참 고 문 헌

- Baker, R. P. and P. E. Dunn (1990) New directions in biological control: Alternatives for suppressing agricultural pests and diseases, p. 419-434, Liss, New York.
- Aronson, A. I. and W. Bexkman, and P. Dunu (1986) *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* **50**, 1-24.
- Feitelson, J. S., J. Payne, and L. Kim (1992) *Bacillus thuringiensis*: Insect and beyond. *Biotechnology.* **10**, 271-275.
- Höfte, H., and H. R. Whiteley (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* **53**, 242-255.
- Kang, B. C., S. Y. Lee, and H. N. Chang (1992) Enhanced spore production of *Bacillus thuringiensis* by fed-batch culture. *Biotechnol. Lett.* **14**, 721-726.
- Bulla, L. A. Jr., D. B. Bechtel, K. J. Kramer, and Y. I. Shethra (1980) Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* **7**, 147-204.
- Meadows, J., S. S. Gill, and L. W. Bone (1990) *Bacillus*

thuringiensis strains affect population growth of the free-living nematode *Turbatrix aceti*. *Invert. Repod. Develop.* **17**, 75-76.

- Bulla, L. A. Jr., A. W. Nickerson, T. L. Mounts, and J. J. Iandole (1985) In spores IV, p. 520, Am. Soc. Microbiol. Washington, D.C.
- Dulmage, H. T. (1970) Production of spore-delta-endotoxin complex by variants of *Bacillus thuringiensis* in two fermentation media. *J. Invertebr. Pathol.* **16**, 385-389.
- Dulmage, H. T. (1971) Production of delta-endotoxin by eighteen isolates of *Bacillus thuringiensis* serotype 3 in 3 fermentation media. *J. Invertebr. Pathol.* **18**, 353-358.
- Rajalakshmi, S., and Y. I. Shethna (1980) Spore and crystal formation in *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* during growth in cystine and cysteine. *J. Biosci.* **2**, 321-328.
- Rogoff, M. H. and A. A. Yousten (1969) *Bacillus thuringiensis*: Microbiological 1532 considerations. *Ann. Rev. Microbiol.* **23**, 357-386.
- Bernhard, K. and R. Utz (1993) In '*Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: Theory and practice', Entwistle, P. F., et al(eds), Chap. 12, John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Dulmage, H. T., J. A. Correa, and G. Gallegos-Morales (1990) In 'Bacterial control of mosquitoes & black flies', de Barjac, H., et al(eds), Chap. 8, Rutgers University Press, New Brunswick.
- Goldberg, I., B. Sneh, E. Battat, and D. Klein (1980) Optimization of a medium for a high yield production of spore-crystal preparation of *Bacillus thuringiensis* effective against the Egyptian cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* boisd. *Biotechnol. Lett.* **2**, 419-426.
- Smith, R. A. (1982) Effect of strain and medium variation mosquito toxin production by *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*. *Can. J. Microbiol.* **28**, 1089-1092.

17. Scherrer, F., P. L. thy, and B. Trumpi (1973) Production of δ -endotoxin by *Bacillus thuringiensis* as a function of glucose concentrations. *Appl. Environ. Microbiol.* **25**, 644-646.
18. Kuppusamy, M. and K. Balaraman (1991) Fed-batch fermentation studies with *Bacillus thuringiensis* H-14 synthesising delta endotoxin. *Indian J. Exp. Biol.* **29**, 1031-1034.
19. Schwingamer, E. A. and W. F. Dudman (1980) In 'Methods for evaluating biological nitrogen fixation', Bergerson, F.J., p. 337-366, Wilery, Chichester.
20. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
21. Lee, H. H., J. J. Lee, and J. H. Suh (1986) Studies on the development of the *Bacillus thuringiensis* pesticides; Media compositions for the endotoxin production by *B. thuringiensis* var *israelensis*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **14**, 329-334.
22. Mummigatti, S. G., and A. N. Raghunathan (1990) Influence of media composition on the production of δ -endotoxin by *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* **55**, 147-151.
23. Doi, M., Y. Tsunemi, and S. Asahi (1994) Optimization of conditions for production of uridine by a mutant of *Bacillus subtilis*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**, 1608-1612.
24. Salama, H. S., M. S. Foda, H. T. Dulmage, and A. El-Sharaby (1983) Novel fermentation media for production of δ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* **41**, 8-19.
25. Aronson, A. I., N. Angelo, and S. C. Holt (1971) Regulation of extracellular protease production in *Bacillus cereus* T: characterization of mutants producing altered amounts of protease. *J. Bacteriol.* **106**, 1016-1025.

Growth and Production of Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis* as Affected by Carbon Sources

Moo-Key Kim and Byung-Koo Ahn* (Department of Agricultural Chemistry, Chonbuk National University, Chonju, 561-756, Korea)

Abstract : Effects of 14 carbohydrates supplied as carbon sources on cell growth and sporulation of, and the production of insecticidal crystal proteins by *Bacillus thuringiensis* strains were investigated in liquid cultures. Strains grew well in media containing any one of the 14 carbohydrates supplied, reaching maximum cell densities of $10^7 \sim 10^8$ cells/ml in 16.7 to 22 hours after inoculation depending on the strain. Spores first appeared in 16.7 to 24.7 hours after inoculation, and 80% sporulation was reached in 28 to 51.3 hours after inoculation depending on the strain. No change in pH of media was observed after cell multiplication. The production of total protein was highest when supplied with sucrose and was lowest with starch. More insecticidal crystal proteins were produced when supplied with glucose, lactose, maltose, or sucrose. The amount of insecticidal crystal proteins produced by the strains was proportional to that of the total protein. The relative amount of individual insecticidal crystal protein species produced by *B.t. kurstaki* and *B.t. israelensis* was not influenced by the carbohydrates supplied.

*Corresponding author