

액상 및 반고체배지 발효에 의한 *Bacillus thuringiensis* 살충제의 제조

이 형 환

건국대학교 이과대학 생물학과

Formulations of *Bacillus thuringiensis* Insecticides by Liquid and Semi-Solid Fermentations. Lee, Hyung-Hoan. Department of Biological Science, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea - Microbial insecticide formulations were prepared by liquid and semi-solid fermentations using *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HL-106 (BTK-HL106), *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* HL-63 (BTI-HL63) and *B. sphaericus* 1593 (BS-1593) strains. The liquid fermentation medium contained molasses 2%, dextrose 1.5%, peptone 2%, D-xylose 0.025%, CaCl₂ 0.1%, K₂HPO₄ 0.1%, KH₂PO₄ 0.1%, MgSO₄ · 7H₂O 0.03%, FeSO₄ · 7H₂O 0.002%, ZnSO₄ · 7H₂O 0.02%. The composition of the semi-solid fermentation medium was rice bran 45.2%, zeolite 31%, yeast powder 0.02%, corn powder 5%, dextrose 3%, lime 0.3%, NaCl 0.06%, CaCl₂ 0.02%, and H₂O 15.42%. Insecticide formulations produced in the liquid fermentation named BTK-HL106, BTI-HL63 and BS-1593 pesticides and those in the semi-solid fermentation were designated as BTK-HL106-1, BTI-HL63-1 and BS-1593-1 pesticides, respectively. The number of spore (endotoxin crystals) was 2.65×10^9 spores per ml in the BTK-HL106 and 3.5×10^{10} in the BTK-HL106-1 3.8×10^9 spores in the BTI-HL63 and 7.0×10^{10} in the BTI-HL63-1, and 7.5×10^9 in the BS-1593 and 1.4×10^{10} in the BS-1593-1. The spores in the BS-1593 formulation was produced two times more than the other formulations. The spores in the BTI-HL63-1 were contained twice than those in the BTK-HL106-1, and five times than those in the BS-1593-1. The results indicated that spore (endotoxin crystals) productions in the semi-solid fermentation increased about ten times than those in the liquid fermentations. LC₅₀s of the BTI-HL63 and BS-1593 were 4.5 µg, and those of the BTI-HL63-1 and BS-1593-1 were 1.5 µg. LC₅₀ of the BTK-HL106 was 1.5 mg and that of the BTK-HL106-1 was 0.9 mg. The LC₅₀s of the formulations in the semi-solid fermentations showed about two to three times higher than those in the liquid fermentations.

Key words: microbial pesticide, *B. thuringiensis*, *B. sphaericus*, liquid fermentation, semi-solid fermentation

*Bacillus thuringiensis*는 그람양성의 간균이며, 운동성이 있고, 영양세포는 환경조건이 나쁠 때에는 아포를 형성하여 생존을 하며, 특히 아포를 형성하면서 세포내에서 곤충에 독성을 나타내는 δ-내독소결정체를 생산하며, 세포마다 한 개씩이 주로 존재하고 간혹 두개가 존재한다[1, 3]. 특히 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*균은 이중 피라미드 형태의 내독소결정체를 만들며[1, 3, 5, 9, 11, 15], 곤충의 인시류, 쌍시류와 진드기류 등의 곤충에 살충효과를 나타내기 때문에 생물 방제제로 이용이 되고있다[1, 3]. 또한 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*균은 세포내에 구형의 내독소를 아포형성 시기에 형성을 하며[1, 2, 3, 9, 10, 11, 15], 이 내독소는 모기 유충에 대한 살충력[12]이 높기 때문에 모기살충제로서의 이용율이 매우 높다[1, 3, 9]. *B. thuringiensis*는 δ-내독소결정체 이외에 β-exotoxin을 세포 외로 분비를 한다[1, 3, 5, 7], 이 외독소는 주성분이 뉴클레오티드로 되어 있어서 내열성

이 강하며, 파리류를 포함한 각종의 곤충류에 주로 독성을 나타내기 때문에 미생물 살충제로서 이용이 되고있다[1, 3]. *B. sphaericus* 균도 아포를 형성하며, 모기의 유충을 살상하는 내독소단백질을 생산하는데[16], 세포벽에 존재하는 것이 보고되어있고, 모기 살충제로서 이용이 되고 있다[1, 3]. *B. sphaericus* 내독소결정체는 *B. thuringiensis*가 생산하는 내독소결정체와 형태나 구성분이 다르다[1, 3].

*B. thuringiensis*를 이용한 미생물 살충제 제조에 대한 기초연구를 이미 보고한 바 있으며[4, 6, 11], 또한 살충제의 제조에 필요한 균주를 국내에서 새로 분리 동정하여 이미 보고하였으며[5, 8, 10, 15]. 새로 분리 동정한 균주들과 국내에서 활용이 가능한 값이 저렴한 배지재료를 이용하여 새로운 *Bacillus* 살충제를 제조하는 것이 필요하여 본 연구를 하였다.

본 연구에서는 국내의 저렴한 가격의 배지재료를 이용하여 액상 및 반고체배지 발효법으로 새로 분리 동정한 강력한 살충력을 가진 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HL-106과 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* HL-63 및

*Corresponding author
Tel. 82-2-450-3426, Fax. 82-2-452-9715
E-mail: hhlee@kkucc.konkuk.ac.kr

B. sphaericus 1593의 살충제를 제조하는 것이 목적이었으며, 그 공정과정과 살충제의 살충력을 보고한다.

사용한 균주

인시류와 모기유충에 강력한 살충력을 갖는 *B. thuringiensis* subsp *kurstaki* HL-106 (BTK-HL106) 및 모기유충에 살충력을 갖는 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* HL-63 (BTI-HL63) (본 연구실에서 분리한 균주) [5, 8, 10, 15]과 *B. sphaericus* 1593 (BS-1593) (H. De Barjac, Pasteur 연구소에서 분양)을 이용하였다.

액상배지 발효에 의한 살충제 제조

BTI-HL63, BTK-HL106과 BS-1593 균주를 20 ml 영양배지(nutrition broth)에 각각 접종을 하여 6시간 동안 30℃에서 진탕 배양을 한 후에 제2차 배양배지(tryptose 2%, dextrose 0.02%, NaCl 0.05%, Na₂HPO₄ 0.025%, yeast powder 0.02%) 100 ml에 배양액을 모두 첨가하여 8시간을 진탕 배양을 하였다. 제2차 배양액 100 ml을 900 ml의 제3차 배양배지(molasses 2.0%, dextrose 1.5%, peptone 2.0%, D-xylose 0.025%, CaCl₂ 0.1%, K₂HPO₄ 0.1%, KH₂PO₄ 0.1%, MgSO₄ · 7H₂O 0.03%, FeSO₄ · 7H₂O 0.002%, ZnSO₄ · 7H₂O 0.02%)에 접종을 하여 28℃에서 72시간 동안 발효배양을 하였다. 제3차 배지의 증가에 따라서 제1차 및 2차 배지의 양도 같은 비율로 증가하여 사용하였다.

72시간 배양이 끝난 후에 12,000×g에서 원심분리를 30분간하여 상층액을 버리고, 침전된 균을 증류수 50 ml에 희석을 하고, lactose를 4.0% 가한 후에 진탕 배양을 5분간 한 다음에 아세톤을 150 ml 넣고, 실온에서 내독소와 아포를 침전을 시켰다. 침전을 12시간 동안 한 후에 상층의 아세톤 층을 제거하고, 내독소 또는 내독소단백질 결정체와 아포를 모두 모아서 4℃에 보관하면서 아포 수를 계산하였다[5]. 최종산물인 내독소와 아포 용액을 zeolite 50 g과 혼합을 한 후에 50℃에서 12시간 동안 건조를 했다. 건조된 분말을 분쇄기에 넣어서 분말로 살충제를 제조했다. 상기의 세 종류의 균주를 이용하여 제조하여 만든 제품을 각각 BTK-HL106, BTI-HL63, 및 BS-1593 살충제라 명명을 했다.

BT와 BS분말 50 g를 21% sorbitol용액 900 ml에 현탁을 한 다음에 60%의 Triton 전착제 2 ml을 첨가하여 농축시켜서 액상 살충제로 이용하였다.

액체배지 발효에서 생산된 아포의 수는 Table 1에 제시됐다. BTK-HL106 살충제는 ml당 아포의 수가 2.65 × 10⁹이었고, BTI-HL63살충제는 3.8 × 10⁹로서 전자의 약 1.6배의 아포 수를 생산했고, BS-1593살충제는 7.5 × 10⁹이며, BTK-HL106보다는 2.9배가 많았고, BTI-HL63 보다는 2배가 높았으나, ml당 아포 수는 반고체배지 발효

Table 1. Number of spores in the liquid preparations

Preparations	No. of spores/ml
BTK-HL106	2.6 × 10 ⁹
BTI-HL63	3.8 × 10 ⁹
BS-1593	7.5 × 10 ⁹

에서 보다 전체적으로 10배 이상 적게 생산이 되었다.

Semi-solid배지 발효에 의한 살충제 제조

BTI-HL63, BTK-HL106과 BS-1593 균주를 한 루프씩 20 ml 영양배지에 각각 접종을 하여 6시간동안 30℃에서 진탕 배양을 한 후에 제2차 배양배지(액상용 배지와 동일) 100 ml에 제1차 배양액 20 ml를 모두 첨가하여 8시간을 진탕 배양을 하였다. 제2차 배양액 100 ml을 400 ml의 제3차 배양배지(water-soluble starch 1%, casein 1.5%, dextrose 0.5%, yeast powder 0.02%, CaCl₂ 0.1%, K₂HPO₄ 0.1%, KH₂PO₄ 0.1%, MgSO₄ · 7H₂O 0.03%, FeSO₄ · 7H₂O 0.002%, ZnSO₄ · 7H₂O 0.02%)에 접종을 하여 28℃에서 24시간 동안 배양을 하였다. 발효조(낙원상사 제품)에 1,000 g의 제4차 발효배지(rice bran 45.2%, zeolite 31%, yeast powder 0.02%, corn powder 5%, dextrose 3%, lime 0.3%, NaCl 0.06%, CaCl₂ 0.02%, H₂O 15.42%)를 넣고, 여기에 제3차 배양액 500 ml을 접종을 하여 균일하게 혼합하고 28℃에서 약 48시간을 발효를 진행시켰다.

발효조에 30-34℃의 멸균된 95% 습기를 4시간 동안 불어넣어 주고, 그 후에는 발효가 되도록 온도를 조절하고, 6시간마다 습한 공기를 60분씩 넣어주었다. 48시간 후에는 건조한 공기로 온도를 약 50℃로 올려서 12시간 동안 건조하여 살충제를 제조한 후에 분쇄기에 넣고 분말을 만들었다. 분말 속에 함유된 Bacillus 균주의 아포 수를 계산하였다[6]. 살충제를 살포하기 위하여 제조한 반고체 살충제를 100 g의 분말을 600 ml의 증류수에 현탁을 한 다음에 70% sorbitol 용액 300 ml을 첨가하여 액화한 다음에 60% Triton 전착제 2 ml을 첨가한 후에 농축된 살충제로 살포에 이용하였다. 상기의 세 종류의 균주를 이용하여 제조하여 만든 제제를 각각 BTK-HL106-1, BTI-HL63-1, 및 BS-1593-1 살충제라 명명을 했다.

반고체배지 발효에서 생산된 아포의 수는 Table 2에 제시됐다. BTK-HL106-1 살충제는 ml당 아포의 수가 3.5 × 10¹⁰이었고, BTI-HL63-1살충제는 7.0 × 10¹⁰이며,

Table 2. Number of spores in the semi-solid preparations

Preparations	No. of spores/ml
BTK-HL106-1	3.5 × 10 ¹⁰
BTI-HL63-1	7.0 × 10 ¹⁰
BS-1593-1	1.4 × 10 ¹⁰

전자의 약 2배의 아포 수를 생산했고, BS-1593-1살충제는 1.4×10^{10} 이며, BTK-HL106-1보다는 2배가 적었고, BTI-HL63-1보다는 4배가 적었으나, ml당 아포 수는 액상 발효 살충제보다 보다 전체적으로 10배 이상 많이 생산이 되었다.

모기 살충제의 LC₅₀ 측정 및 측정값

살충제 BTI-HL63, BS-1593, BTI-HL63-1과 BS-1593-1의 모기 유충에 대한 살충효능을 보기 위하여 Lee의 방법 [4]과 Pasteur연구소의 방법(personal communication)을 이용하여 다음과 같은 생물검정을 실시하였다. 50 mg의 살충제 분말을 10 ml의 탈이온수에 넣고, 여기에 유리구슬(직경 6 mm)을 첨가하여 10분간 균일하게 현탁을 시켰다. 다음에 시험관(17×175 mm)에 9.9 ml의 탈이온수를 넣고, 여기에 현탁액 0.1 ml을 첨가하여 진탕을 약 5초간 하였으며, 이 현탁액을 시험용 원액으로 사용하였다.

다음에 플라스틱 컵에 탈이온수 145 ml 씩을 넣은 후에 3령의 모기(*Culex pipiens*) 유충을 25 마리씩을 넣고, 살충제 시험용 원액을 희석하여 8단계로 나누어서 다음과 같이 처리하였다. 살충제의 처리량은 10 µl당 0.5 µg 씩이 함유된 것을 사용하였으며, 8개의 처리군은 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150, 200 µl이었다. 각 처리군마다 총 용액이 150 ml이 되게 이온수로 채웠고, 비처리군(대조군)은 탈이온수만을 넣었다. 각 시험군 마다 컵을 3개씩 준비하여 처리 한 후에 28℃에서 48 시간 경과되었을 때에 죽은 유충의 수를 조사하여 LC₅₀을 결정하였다.

조사한 결과는 Table 3에 제시됐다. BTI-HL63과 BS-1593 살충제는 90 µl(4.5 µg)에서 LC₅₀을 나타냈으며, BTI-HL63-1과 BS-1593-1 살충제는 30 µl(1.5 µg)에서 LC₅₀을 나타내어서 3배의 살충력을 가진 것으로 나타났다.

BTK-HL106과 BTK-HL106-1 살충제의 LC₅₀측정 및 측정값

Table 3. LC₅₀ of the liquid preparations against *C. pipiens* 3rd instar larvae

Preparations	LC ₅₀ against <i>C. pipiens</i> larvae
BTI-HL63	90 µl (4.5 µg)
BTI-HL63-1	30 µl (1.5 µg)
BS-1593	90 µl (4.5 µg)
BS-1593-1	30 µl (1.5 µg)

Table 4. LC₅₀ of the semisolid preparations against *Hyphantria cunea* 3rd instar larvae

Preparations	LC ₅₀ against <i>H. cunea</i> larvae
BTK-HL106	150 µl (1.5 mg)
BTK-HL106-1	90 µl (0.9 mg)

곤충의 유충에 대한 BTK-HL106과 BTK-HL106-1 살충제의 살상효능을 보기 위하여 Pasteur연구소(personal communication)와 Lee의 방법[4]을 이용하여 다음과 같이 흰불나방(*Hyphantria cunea*) 유충을 이용하여 실시하였다. 살충제의 처리량은 10 µl당 0.1 mg이 함유되었으며, 9개의 처리군은 10, 40, 60, 90, 150, 200, 400, 800, 1,200 µl이었고, 비처리군(대조군)은 탈이온수 만 0.1 ml을 첨가하여 측정을 했다.

조사한 결과는 Table 4에 제시됐다. BTK-HL106 살충제는 30 µl(1.5 mg)에서 LC₅₀을 나타냈으며, BTK-HL106-1 살충제는 90 µl(0.9 mg)에서 LC₅₀을 나타내어서 1.7배의 살충력을 가진 것으로 나타났다.

액상배지발효 살충제가 반고체배지 발효 살충제보다 살충력이 낮은 것으로 나타났으며, 그 이유는 Table 1과 2에서 제시된 결과에서와 같이 반고체배지 발효에서 약 10배 이상의 아포를 생산하였기 때문이다. 본 연구의 배지에서 액상배지에서는 당밀(molasses)을 사용했고, 반고체배지에서는 우리 나라에서 많이 값이 싸게 생산되는 쌀겨(rice bran)를 이용하여 만들었다. 그 이유는 생산의 단가를 낮추기 위한 것이었다. 본 연구에서는 *B. thuringiensis*와 *B. sphaericus*를 액상배지 발효와 반고체배지 발효를 하여 국내 최초로 살충제를 제조하는데 성공을 하였으며, 곤충의 유충에 강력한 살충력을 나타내는 것을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단(87-0511) 및 산학재단의 지원에 의해 수행되었습니다.

REFERENCES

- Burges, H. D. 1981. *Microbial Control of Pests and Plant Diseases*, pp. 193-280. Academic Press, London.
- de Barjac, H. 1978. Un nouveau candidate a la lutte biologique contre les moustiques: *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Entomophaga* **23**: 309-319.
- Kurstaki, E. 1982. *Microbial and Viral Pesticides*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Lee, H. H. 1986. Studies on the development of *Bacillus thuringiensis* pesticide. 4. The lethality and safety of *Bacillus thuringiensis* serovar. *kurstaki* pesticide. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **14**: 325-328.
- Lee, H. H., B. R. Yoo, Y. J. Kim, N. H. Won, and H. C. Kim. 1993. Characterization of microbial pathogen *Bacillus thuringiensis* isolates from soil against mosquito and silkworm larvae (II). *Kor. J. Microbiol.* **31**: 17-21.
- Lee, H. H., B.Y. Hyun, and C.K. Oh. 1986. Studies on the development of *Bacillus thuringiensis* pesticide. 3. Media conditions of *Bacillus thuringiensis* serovar. *kur-*

- staki* endotoxin production. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **14**: 259–264.
7. Lee, H. H., C. B. Shim, and H. M. Lee. 1985. Purification of *Bacillus thuringiensis* exotoxin. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **23**: 271–281.
 8. Lee, H. H., D. G. Joo, S. C. Kang, and H. G. Lim. 1992. Characterization of seven *Bacillus thuringiensis* isolates from soil (I). *Kor. J. Applied Microbiol. Biotech.* **20**: 377–383.
 9. Lee, J. Y., G. J. Park, and H. H. Lee. 1993. Growth and production of endotoxin of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 193–199.
 10. Lee, H. H., J. D. Jung, M. S. Yoon, K. Y. Lee, M. M. Lecadet, J. F. Charles, V. Cosmao Dumanoir, E. Frachon, and J. C. Shim. 1995. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in Korea. *Bacillus thuringiensis Biotechnology and Environmental Benefits* **1**: 201–216.
 11. Lee, H. H., J. J. Lee, and J. H. Suh. 1986. Studies on the development of a microbial pesticide, *Bacillus thuringiensis*: Media compositions for the endotoxin production by *Bacillus thuringiensis*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **14**: 329–334.
 12. Lee, H. H. and K. H. You. 1987. Cloning and expression of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* mosquito-cidal crystalline protein gene in *Escherichia coli*. *Han-Guk J. Gen. Eng.* (Konkuk University) **2**: 7–12.
 13. Lee, H. H., K. H. Yoo, and S. Y. Kim. 1984. Cloning of *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* insecticidal protein gene. *Han Guk J. Genetic Eng.* (Konkuk University) **1**: 29–35.
 14. Lee, H. H., K. K. Lee, and M. W. Lee. 1991. Ultrastructure of midgut cells of *Culex pipiens* larvae ingested by *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* insecticidal endotoxin. *Kor. J. Entomology* **21**: 1–10.
 15. Lee, H. H., K. Y. Lee, T. J. Kim, S. B. Sim, J. G. Cho, and S. I. Kwon. 1992. Insecticidal characterization of thirteen *Bacillus thuringiensis* isolates from soil (III). *Kor. J. Microbiol.* **30**: 438–443.
 16. Lee, H. H., S. Y. Kim, P. O. Lim, and H. S. Lee. 1987. Cloning and expression of *Bacillus sphaericus* mosquito-cidal crystalline protein gene in *Escherichia coli*. *Han-Guk J. Genetic Eng.* (Konkuk University) **2**: 19–25.

(Received May 11, 1998)