



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0103198
(43) 공개일자 2010년09월27일

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01) *A01N 63/02* (2006.01)

C12R 1/07 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0021683

(22) 출원일자 2009년03월13일

심사청구일자 2009년03월13일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 궁동 220번지 충남대학교

(72) 발명자

유용만

대전광역시 서구 월평2동 무지개아파트 103동 604호

김다아

대전광역시 서구 도마동 대아아파트 105동 503호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최규환

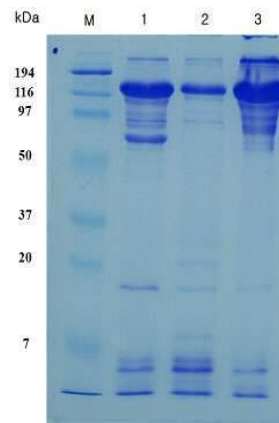
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 살충 활성이 있는 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 KB098 균주 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 해충 살충제로서 이용하기 위하여 국내 토양으로부터 분리한 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 KB098 균주 및 상기 균주의 미생물농약으로서의 이용 가능성에 관한 것이다. 더욱 상세하게는, 상기 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 해충 살충용 조성물, 상기 균주 배양액을 포함하는 살충용 조성물의 제조 방법, 상기 살충제를 식물 또는 토양에 처리하여 해충을 방제하는 방법 및 해충에 대해 살충 활성이 있는 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*) KB098 균주의 배양에 의해 얻어지는 내독소 단백질에 관한 것이다. 상기 살충제는 화학 살충제에 저항성이 강한 해충 방제에 탁월한 효과를 나타냄으로써 친환경 농업의 육성에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

김태환

충청남도 천안시 동남구 용곡동 583번지 세광2차아
파트 213동 1402호

윤영남

대전광역시 유성구 관평동 대덕테크노밸리 1008동
902호

특허청구의 범위

청구항 1

해충에 대해 살충 활성이 있는 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*) KB098 균주 (IMER00510).

청구항 2

제1항의 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 해충의 살충용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 해충은 나비목인 것을 특징으로 하는 해충의 살충용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 해충은 배추좀나방, 담배거세미나방, 과밤나방 또는 암청색줄무늬밤나방인 것을 특징으로 하는 해충의 살충용 조성물.

청구항 5

제1항의 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*) KB098 균주의 유효량을 식물 또는 토양에 살포함으로써 해충을 방제하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 해충은 나비목인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 해충은 배추좀나방, 담배거세미나방, 과밤나방 또는 암청색줄무늬밤나방인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제1항의 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*) KB098 균주를 배양하는 단계를 포함하는 해충의 살충용 조성물의 제조 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 해충은 나비목인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 해충은 배추좀나방, 담배거세미나방, 과밤나방 또는 암청색줄무늬밤나방인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

해충에 대해 살충 활성이 있는 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*) KB098 균주의 배양에 의해 얻어지고, SDS-PAGE에 의해 측정된 분자량이 130kDa인 내독소 단백질.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 토양에서 분리한 살충 활성을 갖는 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 균주 및 이의 용도에 관한 것으로서, 더욱 구체적으로 해충에 대해 살충 활성을 갖는 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 KB098 균

주, 상기 균주를 유효성분으로 함유하는 해충 살충용 조성물, 상기 균주 배양액을 사용한 살충용 조성물의 제조 방법, 상기 살충제를 식물 또는 토양에 처리하여 해충을 방제하는 방법 및 해충에 대해 살충 활성이 있는 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*) KB098 균주의 배양에 의해 얻어지는 내독소 단백질에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 바실러스 투린지엔시스 곤충병원성 세균으로 친환경농업의 주요 농자재로 사용되는 중요한 생물적 방제 인자 중의 하나이다. 비티(*Bacillus thuringiensis*, Bt)는 주모성 편모를 가진 호기성 그람 양성 토양세균으로서 성장조건이 악화되면 내생포자와 함께 내독소 단백질 결정체(parasporal inclusion, crystal)를 형성한다. 비티에서 특이적으로 생성되는 내독소 단백질 결정체는 나비목, 파리목 및 딱정벌레목의 유충에 대한 강한 살충 활성을 나타내며, 선충에 독성이 있는 균주도 보고되었다. 이러한 내독소 단백질은 Cry 1~40 및, Cyt1 및 2로 분류되며 이들의 아미노산 상동성을 기초로 하여 등급이 매겨진다 (Schnepf *et al.*, 1998, Microbiol. & Mol. Biol. Reviews 62:775-806). 내독소 단백질 Cry I 은 나비목, Cry II는 나비목 및 파리목, Cry III는 딱정벌레목, Cry IV는 파리목, Cry V는 나비목 및 딱정벌레목에 각각 독성을 나타낸다. 나비목 유충에 대한 내독소 단백질의 독성은 대부분 130~140 kDa의 분자량으로 곤충 소화액으로 처리하면 50~70 kDa의 단백질을 형성한다 (Aronson *et al.*, 1986, Microbiol. Rev. 50:1-24; Goldberg & Margalit 1977, Mosq. News. 37:355-358; Tamez-Guerra *et al.*, 2004, J. Invertebr. Pathol. 8:7-18). 이러한 비티는 같은 쿠루스타키라 할지라도 독소단백질을 만들어내는 유전자, 즉 Cry의 염기배열의 차이에 따라서 해충에 대한 독성범위의 차이를 나타내는 특이성이 있다. 비티는 현재 국내·외적으로 사용되는 생물농약 중 가장 많이 생산되어 판매·활용되고 있다. 이미 오래전부터 미국을 비롯한 선진국에서는 비티를 사용하여 Gomelin, Bactospeine (*B.t.* subsp. *thuringiensis*), Dendrobacillin (*B.t.* subsp. *dendrolimus*), Thuricide, Dipel, Bathurin82'S' (*B.t.* subsp. *aizawai*), Thuricide90TS (*B.t.* subsp. *galleriae*) 등의 무공해 미생물농약제가 상업적으로 개발되어 유용하게 사용되고 있으며 (Travis *et al.*, *Bacillus thuringiensis*: Biology, Ecology and Safety), 최근에는 비티에 대한 숙주 범위 확대 및 독성 증진을 위한 분자 유전학적인 연구가 이루어지고 있고 (Gill *et al.*, 1995, J. Biol. Chem. 270:27277-27282; Park *et al.*, 1995, Biochem. Biophys. Res. Commun. 214:602-607; Zheng *et al.*, 2005, Transgenic Research, 14: 261-272), 동시에 새로운 비티 균주에 대한 탐색·분리에 관한 연구도 지속적으로 수행되고 있다 (Gough *et al.*, 2005, J. Invertebr. Pathol. 90:39-46; da Silva *et al.*, 2004, J. Appl. Ent. 128:102-107; Apaydin *et al.*, 2005, J. Microbiol. Biotechnol. 21:285-292; Yasutake *et al.*, 2006, Can. J. Microbiol. 52:365-372).

[0003] 가장 많이 사용되는 비티 균주는 비티 아종 쿠루스타키에 속하는 균주로 이를 이용한 해충 살충제는 나비목 특히 배추좀나방에 강한 독성을 보이며, 이외에도 담배나방, 흰불나방 등에 대한 높은 살충 활성을 보여 생물농약으로의 개발이 활발하게 진행되어 왔다. 그러나 이 균주는 나비목에 광범위한 독성을 나타내는 반면 과밤나방에 대해서는 독성이 매우 낮은 것으로 보고되었으며 (Bai *et al.*, 1993, J. Invertebr. Pathol. 62:211-215), 실험실 조건뿐만 아니라 야외 조건에서도 저항성이 유발되어 사용상의 제약이 있다 (Ferre, *et al.*, 1995, FEMS Microbiol. Lett. 132:1-7).

[0004] 상기 저항성 문제를 해결하고 숙주범위를 확대하기 위하여, 최근에는 비티 아이자와이(Aizawai) 균주가 주로 사용되고 있다 (Tanada & Kaya, 1993, Insect pathology. Academic Press, Inc. CA, USA pp. 83-146). 그러나 이 균주는 쿠루스타키에 비하여 배양 효율이 상당히 떨어져 해충 살충제로 개발 시 비용이 많이 들고 제품 가격이 높아지는 단점이 있다. 상기 문제점 외에도 한 균주의 지속적이고 누적된 사용은 저항성 유발의 원인이 되므로, 이를 극복하기 위해서는 다양한 특성을 가진 비티 균주의 분리와 개발이 계속되어야 한다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 토양으로부터 분리된, 살충 효과가 우수한 새로운 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 KB098 균주를 제공하고, 상기 균주의 내독소 단백질을 사용한 해충 살충용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결수단

[0006] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 해충에 대해 살충 활성을 갖는 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이

(*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*) 균주를 제공한다.

- [0007] 또한, 본 발명은 상기 균주를 유효성분으로 함유하는 살충용 조성물을 제공한다.
- [0008] 또한, 본 발명은 상기 균주의 유효량을 식물 또는 토양에 살포함으로써 해충을 방제하는 방법을 제공한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 상기 균주를 유효성분으로 함유하는 살충용 조성물의 제조 방법을 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 상기 균주의 배양에 의해 얻어진 내독소 단백질을 제공한다.

효 과

- [0011] 본 발명에서 분리된 균주는 나비목 곤충, 특히 많은 농작물에 잡식성이며, 난방제 해충으로 널리 알려진 담배거세미나방 및 과밤나방에 대한 살충력이 뛰어날 뿐 아니라 다양한 나비목 곤충에도 높은 활성을 보이므로, 친환경적인 해충 방제용 제제의 개발 등에 유용하게 이용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0012] 상기 목적에 따라, 본 발명에서는 토양으로부터 분리된, 해충에 대해 살충효과를 가지는 새로운 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*) 균주를 제공한다.
- [0013] 더욱 상세하게는 나비목에 살충 효과가 높은 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*) 균주 KB098 (IMER00510)을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명에서는 또한, 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*) 균주 KB098 (IMER00510)의 순수배양물을 유효성분으로 함유하는 해충의 살충용 조성물을 제공한다. 상기 조성물에서, 상기 해충은 나비목일 수 있으며, 상기 해충은 배추좀나방, 담배거세미나방, 과밤나방 또는 암청색줄무늬밤나방일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0015] 본 발명에서는 또한, 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*) 균주 KB098 (IMER00510)의 순수배양물을 함유하는 살충용 조성물의 유효량을 해충의 방제를 위하여 식물 또는 토양에 살포하는 것을 특징으로 하는 해충의 방제 방법을 제공한다. 상기 방제 방법에서, 상기 해충은 나비목일 수 있으며, 상기 해충은 배추좀나방, 담배거세미나방, 과밤나방 또는 암청색줄무늬밤나방일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0016] 본 발명에서는 또한, 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*) 균주 KB098 (IMER00510)를 포함하는 살충용 조성물의 제조 방법을 제공한다. 상기 제조 방법에서, 상기 해충은 나비목일 수 있으며, 상기 해충은 배추좀나방, 담배거세미나방, 과밤나방 또는 암청색줄무늬밤나방일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0017] 본 발명에서는 또한, 해충에 대해 살충 활성이 있는 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*) KB098 균주의 배양에 의해 얻어지고, SDS-PAGE에 의해 측정된 분자량이 130kDa 인 내독소 단백질을 제공한다.
- [0018] 이하, 본 발명의 설명에 사용되어지는 용어의 정의는 다음과 같다.
- [0019] “살충성”은 농작물에 발생하는 해충의 사망률을 증가시키거나 성장률을 저해하는 물질의 능력을 의미한다.
- [0020] “유효량”은 유익한 또는 원하는 결과를 일으키기에 충분한 양이다. 유효량은 1회 이상으로 투여될 수 있다.
- [0021] “조성물”은 비활성(예를 들어, 검출가능 약품 또는 표지 또는 액체 담체) 또는 활성(예를 들어, 보조제)인, 담체 또는 조성물과 같이 활성제 및 또 다른 화합물의 조합을 의미하도록 의도된다.
- [0022] 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 KB098 균주는 대전, 충청남·북도, 전라북도 등지의 산, 들, 밭의 142 곳의 토양 시료로부터 분리하였다. 상기 균주는 Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1C 및 Cry1D 형의 4 가지 유전자를 가지고 있어 생장조건이 악화 될 경우 성기 유전자로부터 내독소 단백질을 생산한다. 내독소 단백질을 위상차현미경으로 관찰한 결과 이중 피라미드형의 결정체를 형성하는 것을 확인하였으며, 배추좀나방, 과밤나방, 담배거세미나방 등 나비목 해충에 대해 뛰어난 살충 효과를 보였다. 또한 비티의 상품화된 제품 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*의 T 제품 및 SB 제품, 및 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*의 SL 제품을 구입하여 독성 비교 실험을

한 결과 본 발명의 KB098 균주의 우수한 효과를 확인하였다. 본 발명의 *Bt* KB098 균주를 적절한 배지, 예를 들어 GYS 배지 (0.1% 글루코스, 0.2% 효모추출물, 0.05% 인산제일칼륨, 0.2% 황산암모늄, 0.002% 황산마그네슘, 0.005% 황산망간, 0.008% 염화칼슘)에서 28 내지 30℃, 바람직하게는 30℃에서 산소분압 30 내지 70%, 바람직하게는 60%하에 160 내지 200 rpm으로 3 내지 5일 동안 배양한 후, 이 배양액을 원심분리하여 균체를 수확하고, 이 균체 10 내지 40 중량 %, 바람직하게는 20 중량 %를 해충 살충제에 통상적으로 사용되는 첨가제 60 내지 90 중량 %, 바람직하게는 80 중량 %와 혼합하여 해충 살충제를 제조할 수 있으며, 이때 첨가제로는 NT-NX250L, NK-EPB100 등의 계면활성제, 화이트카본, 텍소텍스-25 등의 보조제, 카올린 등의 증량제 등을 사용할 수 있다.

[0023] 본 발명의 살충용 조성물을 적용할 수 있는 식물은 특별히 제한되지는 않으며, 배추, 양배추, 오이, 무, 들깨, 고추, 결구상추(양상추), 딸기, 토마토 등의 경제작물 이외에도 화훼 또는 특용작물 등의 식물 표면이나 이들 식물이 성장하고 있는 토양에 처리될 수 있으며 또는 재배하여 수송 또는 저장 중인 채소 표면에도 처리될 수 있다.

[0024] 본 발명의 *Bt* 아종 아이자와이 KB098 균주를 함유하는 해충 방제용 조성물, 더욱 바람직하게는 나비목 해충 방제에 유용한 조성물은 *Bt* 아종 아이자와이 KB098 균주의 배양액 또는 건조분말 5 내지 90 중량 %에 계면활성제, 무기염류, 보조제, 결합제 및 증량제 등을 혼합하여 해충 살충용 조성물로 제조할 수 있다.

[0025] 상기 무기염류는 *Bt* 아종 아이자와이 KB098 내독소 단백질과 함께 해충의 증장에 들어가서 독소 단백질이 빠르게 활성독소의 형태로 전환되는 것을 도와주거나 증장벽에 물리적인 상처를 주어 독소의 활성을 증진시킬 뿐만 아니라 해충의 체내에서 생리적인 변화를 유도하여 독소의 작용효과를 높일 수 있도록 작용하는 물질로서 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 구입하여 사용할 수 있는 것이다.

[0026] 상기 계면활성제는 분자 중에 친수성 분자단 및 친유성 분자단을 동시에 갖는 양친매성 물질로서, 세정력, 분산력, 유화력, 가용화력, 습윤력, 살균력, 기포력 및 침투력이 우수하다는 특징으로 갖는 것으로 이해되는 물질로서, 본 발명에 따른 해충 살충용 조성물 중의 비티가 효과적으로 약효를 발현하도록 수화, 현탁, 분산시키는 작용을 하는 것으로 이해될 수 있다.

[0027] 상기 계면활성제로는 알킬벤젠설포네이트, 알킬나프탈렌설포네이트, 디알킬설포석시네이트, 리그닌설포네이트, 알킬나프탈렌설포네이트포르마린축합물, 폴리옥시알킬렌알킬페닐설포네이트와 같은 설포네이트의 나트륨염 또는 칼슘염, 알킬설페이트, 폴리옥시알킬렌알킬설페이트, 폴리옥시알킬렌알킬페닐설페이트와 같은 설페이트의 나트륨염 또는 칼슘염, 나프탈렌설포석시네이트, 폴리옥시알킬렌석시네이트와 같은 석시네이트의 나트륨염 또는 칼슘염 등의 음이온성 계면활성제, 에톡실화 알킬에테르, 폴리옥시알킬렌알킬페닐폴리머, 다중 알코올과 같은 비이온성 계면활성제가 단독으로 또는 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있으며, 이들은 모두 예시적으로 열거한 것들로서 이들 이외의 계면활성제가 사용될 수 있음은 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 용이하게 이해될 수 있을 것이다.

[0028] 상기 증량제는 상기 계면활성제와 함께 사용되어 상기 계면활성제를 흡착, 분산화하고, 이 계면활성제, 약효 증진제, *Bt* 아종 아이자와이 KB098 균주의 배양액 또는 건조분말과 함께 비티제 조성물의 미립자 표면을 이루는 물질로 작용하며, 진분, 대두박, 밀기울, 입상 섬유질, 유안, 규조토, 제올라이트, 벤토나이트, 탈크, 카올린, 파이로필라이트, 화이트카본 등이 단독 또는 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.

[0029] 상기 결합제는 상기 활성성분인 비티 균주의 건조분말을 포함하여 약효 증진제, 증량제 등을 서로 결합시키는 역할을 하는 것으로서, 수용성 전분, 텍스트린, 카르복시메틸셀룰로오스, 폴리아크릴산나트륨, 폴리비닐알코올, 아라비아검 또는 잔탄검 등이 단독 또는 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.

[0030] 방제 대상인 해충은 레피도프테라(Lepidoptera)이다. 다른 특히 바람직한 양태에서, 해충은 양배추거세미나방 [cabbage looper, 트리코플루시아 니(*Trichoplusia ni*)], 벨벳빈 카테르필라[velvetbean caterpillar, 안티카르시아 겐마탈리스(*Anticarsia gemmatilis*)], 배추좀나방[diamondback moth, 플루텔라 크실로스텔라(*Plutella xylostella*)] 및 담배나방[tobacco budworm, 헬리오티스 비레센스(*Heliothis virescens*)], 과밤나방(*Spodoptera exigua*), 흰불나방(*Hyphantria cunea*), 누에(*Bombyx mori*), 담배거세미나방(*Spodoptera litura*), 작은각시들명나방(*Palpita indica*), 벼애나방(*Naranga aenescens*), 흑명나방(*Cnaphalocrocis medinalis*), 암청색줄무늬밤나방 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0031] 상기 해충 살충제는 입제, 분제, 액상수화제, 수화제 등의 형태로 제형화될 수 있는데 이에 한정되지는 않으며, 수화제가 바람직하다.

[0032] 제형화된 살충제는 사용전에 물에 500 내지 2,000 배, 바람직하게는 약 1,000 배로 희석하여 사용할 수 있다.

[0033] 이하 본 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[0034] 실시예 1. 비티 KB098 균주의 분리

[0035] 토양 시료는 대전광역시 동구 만인산에서 나무 밑 땅 표면으로부터 약 10 cm 하의 토양 10 g을 채취하여 실험에 사용하였다. 비티 균주의 분리는 Ohba and Aizawa (1978, Appl. Environ. Microbiol. 28:124-128) 방법을 사용하였다. 채취된 토양 시료 1g을 시험관에 넣고 멸균 증류수 9 ml를 첨가하여 3~4 회 정도 강하게 교반하였다. 포자를 형성하지 못하는 세균들을 선택적으로 제거하기 위하여 65℃ 항온수조에서 30분간 열처리하였다. 열처리 후 5분간 정지하여 흙을 가라앉히고, 상청액을 10^{-3} 까지 희석하여 영양평판배지(Nutrient agar)에 고르게 도말하였다. 상기 평판배지를 27℃ 배양기에서 3~4일간 배양 후, 형성된 바실러스 콜로니들 중에서 외형이 비티 균주와 유사한 콜로니를 선발하였다. 선발된 콜로니를 위상차현미경 1,000배로 관찰하여 내독소 단백질을 형성하는 균주를 선발하였다.

[0036] 상기 *Bt* 아종 KB098 아이자와이 균주를 농촌진흥청지정 농업유전자원관리기관인 목원대학교 미생물생태자원연구소(IMER)에 2009년 1월 14일자로 기탁하였다 (기탁번호: IMER00510).

[0037] 실시예 2. 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 KB098 균주의 혈청학적 동정

[0038] 상기 선발된 비티 아이자와이 KB098 균주의 편모항원을 기존의 항혈청과 응집반응(agglutination)에 의한 방법으로 동정한 결과, 상기 항원 및 기존의 바실러스 투린지엔시스 아이자와이의 항혈청 간에 응집반응이 일어났다.

[0039] 표 1. 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 KB098 균주의 혈청형 분류

분리 균주	편모항원 분류	아종	응집반응
<i>B.t. aizawai</i> KB098	7	아이자와이 (aizawai)	+

[0041] 실시예 3. 비티 아이자와이 KB098 균주의 내독소 단백질 관찰

[0042] 상기 선발된 비티 아이자와이 KB098 균주가 생산하는 내독소 단백질의 크기와 형태를 위상차현미경 및 주사전자현미경으로 관찰하였다. 위상차현미경 관찰을 위한 내독소 단백질을 얻기 위해 NA 배지에 접종한 후, 포자 및 내독소 단백질이 형성되고 자가분해(autolysis)될 때까지 27℃, 3~5일간 배양기에서 배양하였다. 자가분해가 일어난 콜로니를 슬라이드글라스 위에 떨어뜨리고 커버글라스를 덮은 후 에멀전 오일을 사용하여 위상차현미경(X1,000)으로 관찰하였다 (Kim *et al.*, 1995, Korean J. Seric. Sci. 37:57-61). 주사전자현미경으로 관찰을 위하여 비티 아이자와이 균주 및 비티 아이자와이 KB098 균주를 NA 배지에 접종한 뒤 27℃에서 자가분해가 일어날 때까지 배양한 뒤, conducting silver paint (Ladd Res., USA) 상에서 금으로 코팅을 하여 Philips XL 30 ESEM (Philips, Netherlands)을 이용하여 관찰하였다 (10,000배).

[0043] 비티 아이자와이 KB098 균주는 이중 피라미드 형태의 내독소 단백질 결정체를 가지고 있었으며 (도 1 및 2), 이는 나비목에 대해 독성을 갖는 내독소 단백질의 전형적인 형태와 일치한다.

[0044] 실시예 4. 비티 아이자와이 KB098 균주의 내독소 단백질 전기영동 분석

[0045] 비티 아이자와이 KB098 균주를 NA 배지에 접종하고 27℃에서 5일 정도 배양한 후 위상차현미경으로 내독소 단백질이 형성되었는지 관찰하면서, 내독소 단백질의 형성이 확인되었을 때 배지 위의 균을 모아 원심분리 튜브에 집균하였다. PBS 버퍼를 첨가하여 15,000 rpm, 4℃, 15 분간 원심분리하였다. 상청액을 버리고 세척 버퍼 I (500 mM 염화나트륨, 2% 트리톤 X-100)으로 3 회, 세척 버퍼 II (500 mM 염화나트륨)로 2 회 세척하였다. 세척이 끝난

내독소 단백질은 멸균수를 첨가하여 -20℃에서 보관하였다.

[0046] 상기 방법으로 얻은 내독소 단백질은 Laemmli의 방법 (1970, Nature 277:680-685)에 따라 전기영동(SDS-PAGE)하였다. 12% separating gel (30% Acrylamide/Bis, 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8, 10% SDS, TEMED, 10% Ammonium Persulfate) 및 4% stacking gel (30% Acrylamide/Bis, 1 M Tris-HCl, pH 6.8, 10% SDS, TEMED, 10% Ammonium Persulfate), 전기영동 버퍼 (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% SDS)로 SDS-PAGE를 수행하였다. 전기영동이 끝난 겔은 0.1% 쿠마씨(Coomassie brilliant blue)로 염색한 후 탈염용액 (450 ml Methanol, 100 ml Glacial acetic acid, 450 ml DW)으로 탈염하였다.

[0047] 혈청학적 방법을 통해 이미 분류된 바와 같이 비티 아이자와이 KB098 균주는 비티 쿠르스타키와는 다른 약 130 kDa의 단백질 밴드 모습을 보였다 (도 3).

[0048] 실시예 5. 비티 아이자와이 KB098 균주의 내독소에 다양한 단백질 분해효소의 처리에 따른 단백질 변화

[0049] 담배거세미나방 유충 증장 내의 소화효소를 분리하기 위해 담배거세미나방 5 및 6령 유충을 -4℃에 30 초 정도 보관 후, 멸균된 해부용 칼 및 핀으로 해부하여 증장을 냉각한 튜브에 넣고 13,000g, 4℃, 15 분간 원심분리하였다. 소화효소가 함유된 상청액을 에펜돌프 튜브에 넣어 -20℃에 보관하였다.

[0050] 상기에서와 같이 분리한 내독소 단백질 1 µl에 50 mM NaOH 수용액을 5 분간 처리 후 원심분리하여 상청액을 버리고, 10 배로 희석한 담배거세미나방 증장액 1 µl와 혼합하여 교반한 후, 37℃에서 15 내지 30 분간 반응시킨 후 (Zhong et al., 2000, J. Invertebr. Pathol. 76:131-139; Zouari & Samir, 1997, Biotechnol. Lett. 19:825-829), Laemmli의 방법 (1970, Nature 277:680-685)을 사용하여 단백질 변화를 분석하였다 (도 4).

[0051] 실시예 6. 비티 아이자와이 KB098 균주의 살충 효과

[0052] 비티 아이자와이 KB098 균주를 NA 배지에 접종하고 27℃에서 5일 정도 배양 후, 위상차현미경을 이용하여 관찰하면서 자가분해가 일어날 때까지 배양하였다. 자가분해를 확인한 후 배지 위의 균을 모아 원심분리하여 균주만을 수확한 후, 배양액의 콜로니가 1×10^7 cfu/ml 정도가 되도록 멸균수를 첨가하여 독성실험에 사용하였다.

[0053] 배추좀나방에 대한 생물활성 검정은 직경 2 cm의 양배추 잎에 100 µl의 배양원액을 뿌려 습기가 완전히 마를 때까지 음건한 뒤, 각 구당 2령 유충 20 마리씩을 페트리디쉬에 넣고 48 시간 동안 치사율을 조사하였다. 빨간집모기에 대한 생물활성 검정은 100 µl의 배양원액을 멸균수 50 ml에 희석하여 3~4일 유충 20 마리씩을 플라스틱 컵에 넣고 25℃에서 48 시간 동안 치사율을 조사하였다. 쌀바구미에 대한 검정은 쌀 1 g에 200 µl의 배양원액을 뿌려 습기가 완전히 마를 때까지 음건한 뒤, 각 구당 20 마리씩의 성충을 넣고 48 시간 동안 치사율을 조사하였다. 미국흰불나방 및 암청색줄무늬밤나방에 대한 생물활성 검정은 야외충과 기주를 채집하여 직경 3 cm에 배양원액 200 µl를 뿌려 음건한 뒤 10 마리씩 48 시간 동안 관찰하였다. 담배거세미나방에 대한 생물활성 검정은 포자-결정체 혼합물 희석액 100 µl를 0.5 g의 인공 사료에 첨가하여 23령 유충은 각각 30 마리씩, 4령 유충은 20 마리씩의 유충을 페트리디쉬에 넣고 168 시간 동안 치사율을 조사하였다. 과밤나방에 대한 생물활성 검정은 포자-결정체 혼합물 희석액 100 µl를 0.5 g의 인공 사료에 첨가하여 2령 유충을 20 마리씩 페트리디쉬에 넣고 72 시간 동안 치사율을 조사하였다.

[0054] 모든 실험은 3 회 반복 실시하였으며, 담배거세미나방에 대한 치사율은 그 결과를 Finney (1971, Probit analysis, estimation of the median effective dose. Cambridge University Press, London. pp. 19-47)의 probit 계산법에 기초한 PC 프로그램 (Reymond, 1985, Presentation d'un programme d'analyse log-probit pour micro-ordinateur. Cah. ORSTOM, Ser. Ent. Med. & Parasitol. 22:117-121)을 이용하여 반수치사농도 (LC₅₀)를 산출하였다.

[0055] 비티 아이자와이 KB098 균주의 처리가 효과적인 대상 해충을 찾기 위하여 여러 해충을 대상으로 독성실험을 하였다 (표 2).

[0056] 표 2. 다양한 해충에 대한 비티 아이자와이 KB098 균주의 살충활성

시험 유충	나비목				파리목	딱정벌레목
	배추좀나방	담배거세미나방	과밤나방	암청색줄무늬밤나방	빨간집모기	쌀바구미

KB098	+++	+++	+++	+++	-	-
+++ : 고효율성, 100% 사충율; ++ : 활성, 80~99% 사충율; + : 저활성, 50~79% 사충율; - : 활성 없음, 0~49% 사충율						

[0058] 비티 아이자와이 KB098 균주가 독성을 보이는 해충 중에서 난방제 해충으로 알려져 있는 담배거세미나방에 대해 독성을 보이는 것을 확인하고 (표 2), 독성 정도를 자세하게 확인하기 위해 담배거세미나방 2, 3 및 4 령에 대해 probit을 이용하여 반수치사농도 (LC₅₀)를 알아보았다. 령기가 진행될수록 반수치사농도 값이 높아지는 것을 확인할 수 있었다 (표 3).

[0059] 표 3. 담배거세미나방 유충의 다양한 령기에 따른 비티 아이자와이 KB098 균주의 반수치사농도

[0060]

균주 및 령기		n	slope (평균±표준편차)	LC ₅₀ cfu/ml
KB098	2 령 유충	120	1.38±0.40	9.78×10 ⁵
	3 령 유충	120	2.16±0.35	6.87×10 ⁶
	4 령 유충	60	1.81±0.84	1.83×10 ⁷

[0061] 실제 야외 포장에는 다양한 령기가 혼재되어 있으므로 2, 3 및 4 령 층이 혼재되어 있다고 가정하고, 이들의 사충률의 평균값을 조사하였다 (도 5). 그 결과, 3 령 유충의 사망률과 비슷한 추이를 보여 1x10⁶ cfu/ml 이상의 농도로 비티를 처리하였을 때 효과를 볼 수 있을 것이라는 결과를 얻을 수 있었다.

[0062] **실시예 7. 상품화된 제품과의 비교**

[0063] 비티 아이자와이 KB098 균주, 및 비교 균주인 비티의 상품화된 제품인 비티 아이자와이 T 제품 및 SB 제품, 비티 쿠르스타키 SL 제품간의 독성을 비교하기 위해 실시예 5의 방법을 이용하여 비티 아이자와이 T 제품 및 SB 제품, 및 비티 쿠르스타키 SL 제품의 배양균을 수집하였다. 독성 비교를 위해 난방제 해충으로 알려져 있는 담배거세미나방 3 령 층을 대상으로 실험을 하였다.

[0064] 생물농약으로서의 가능성을 확인하기 위해서 이미 시중에 담배거세미나방의 방제를 위해 등록된 3 가지의 생물농약 및 비티 아이자와이 KB098 균주에 대하여 생물활성을 비교하였다. 균주의 처리 농도를 1X10⁷으로 조정하여 살충성을 확인한 결과 비티 아이자와이 KB098 균주가 상품화된 3 균주에 비하여 더 높은 살충력을 보이는 것을 확인하였다 (표 4).

[0065] 표 4. 비티 아이자와이 KB098 균주와 상품화된 생물농약과의 생물활성비교

[0066]

균주	콜로니 수 (cfu/ml)	사충율 (%)
비티 아이자와이 KB098	1.3×10 ⁷	100
비티 아이자와이 (T사 제품)	1.0×10 ⁷	80
비티 쿠르스타키 (SL사 제품)	3.0×10 ⁷	14
비티 아이자와이 (SB사 제품)	2.5×10 ⁷	0

[0067] 비슷한 농도 (10⁷ cfu/ml)에서 비티 아이자와이 KB098 균주 및 비티 생물농약간의 생물활성을 비교한 결과, KB098 균주가 다른 3 가지 생물농약의 비티 균주에 비해 높은 활성을 나타내었고 (표 4), 또한 실험 1일 후부터 다른 생물농약 균주들에 비해 빠른 사충 효과가 나타났다 (도 6). 상기 결과를 종합해 보면 KB098 균주는 담배거세미나방 3 령 유충에 대해 높은 사충 효과가 있을 뿐만 아니라, 속효성이 있음을 알 수 있다.

[0068] **실시예 8. 비티 아지아와이 KB098 균주의 포장 검정**

[0069] 실험실 내에서의 생물활성 검정 결과에 기반하여, 포장에서도 KB098 균주가 독성을 보이는지 확인하기 위해

2008년 8월 11일부터 9월 3일까지 전남 진도군 군내면 녹진리의 파밭에서 파밤나방을 대상으로 포장 검정을 실시하였다. 검정 당시의 포장 상황은 주당 해충 밀도가 약 0.2 마리였으며 피해주율은 20%였다. 토양 시료로부터 분리된 비티 아이자와이 KB098 균주 및 대조군으로서 시판 중인 T 제품을 약 1×10^6 cfu/ml의 농도로 5x2m의 면적에 살포하였다. 약제 처리는 1주일 간격으로 3 회 처리하고 모든 실험은 3 회 반복 실시하였다. 처리구에서 임의로 파 30 포기를 선택하여 피해주수와 해충수를 확인하였다.

표 5. 비티 아이자와이 KB098 균주와 상품화된 비티 생물농약 T제품과의 파밤나방에 대한 포장에서의 살충효과 비교

처리 방법	살충 효과(%)			
	1 차	2 차	3 차	평균
B. t. KB098	84.5 a	82.5 a	58.9 a	75.3
T 제품	58.4 b	62.8 b	57.5 a	59.6

표 6. 비티 아이자와이 KB098 균주와 상품화된 비티 생물농약 T제품과의 포장에서 기주의 피해감소율 비교

처리 방법	피해 감소율 (%)			
	1 차	2 차	3 차	평균
B. t. KB098	26.1 a	25.2 a	26.8 a	26.0
T 제품	23.0 a	17.3 a	18.8 a	19.7

야외 포장에서의 비티 아이자와이 KB098 균주 및 시판하는 T 제품간의 살충 효과 및 피해감소율을 비교하였다 (표 5 및 6). KB098 균주는 75.3%의 살충 효과를 보여 59.6%의 T 제품보다 살충 효과가 뛰어나함을 알 수 있다. 또한 파밤나방에 의한 피해도 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 살충 효과에서 보면, 3 차 실험에서 살충력이 떨어지는 것으로 보이는 것은 피해를 받은 기주가 많아 약을 살포하여도 약이 묻을 기주가 적기 때문인 것으로 판단된다.

실시예 9. 비티 아이자와이 KB098 균주의 플라스미드 분석

토양 시료로부터 분리된 비티 아이자와이 KB098 균주를 LB 배지(10ml)에 접종하여 28~30℃, 180~250 rpm의 조건 하에서 16 시간 동안 배양하였다. 배양액 1 ml를 SPY 배지 (0.2% (NH₄)₂DO₄, 1.4% K₂HPO₄, 0.6% KH₂PO₄, 0.1% Sodium citrate, 0.02% MgSO₄7H₂O, 0.1% Yeast extract, 0.1% Glucose)에 접종하여 OD₆₀₀ 측정값이 0.7~1.0이 될 때까지 4 시간 정도 배양하였다. 배양된 균은 모두 10,000 rpm, 5 분, 4℃의 조건으로 원심분리하여 균체만 회수하였다. 상청액은 버리고 수확한 균체에 P1 용액 (50 mM TrisCl, pH 8, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNaseA) 4 ml 및 라이소자임 (50 mg/ml)을 50 µl 첨가하고 37℃에서 30 분 정도 반응시켰다. 그 후 P2 용액 (200 mM 수산화나트륨, 1% SDS) 4 ml에 5 분간 상온에서 반응시키고, P3 용액 (3 M 초산칼륨) 4 ml에 냉각 상태에서 15 분간 반응시키고, 12,000 rpm, 15 분, 4℃의 조건으로 원심분리하였다. 상청액을 새 튜브에 옮겨 15,000 rpm, 30 분, 4℃의 조건으로 원심분리하였다. 튜브 위에 설치한 QIAGEN-tip 100에 미리 QBT 용액 (750 mM 염화나트륨, 50 mM MOPS, 15% 이소프로판올, 0.15% 트리톤) 4 ml를 통과시켰다. QBT 용액이 QIAGEN-tip 100을 다 통과하면 원심분리된 상청액을 통과시킨 후 QC 버퍼 (1M 염화나트륨, 50 mM MOPS, 15% 이소프로판올) 10 ml를 2 회 통과시켰다. 아래의 튜브를 새것으로 교체하고, QF 버퍼 (1.25 M 염화나트륨, 50 mM TrisCl, 15% 이소프로판올) 5ml를 통과시켰다. 튜브에 모인 액체를 2 ml 에펜돌프 튜브에 1 ml 씩 담고 이소프로판올알콜 (IPA) 0.7 ml를 넣어 13,000 rpm, 30 분, 4℃로 원심분리하였다. 상청액을 버리고 70℃ 알콜을 넣어 13,000 rpm, 10 분, 4℃의 조건으로 원심분리하여, 상청액을 버리고 에펜돌프 튜브의 물기가 사라질 때까지 clean bench에 넣고 건조시켰다. 건조 후 멸균수 10 µl를 넣고 13,000 rpm, 5 분, 4℃로 원심분리하여 녹인 후 TBE 버퍼(10 mM TrisHCl, pH 8.0, 0.1 mM EDTA)에 아가로스겔을 0.7%로 희석하여 겔을 만든 후 50 V로 40 분간 전기영동하였다.

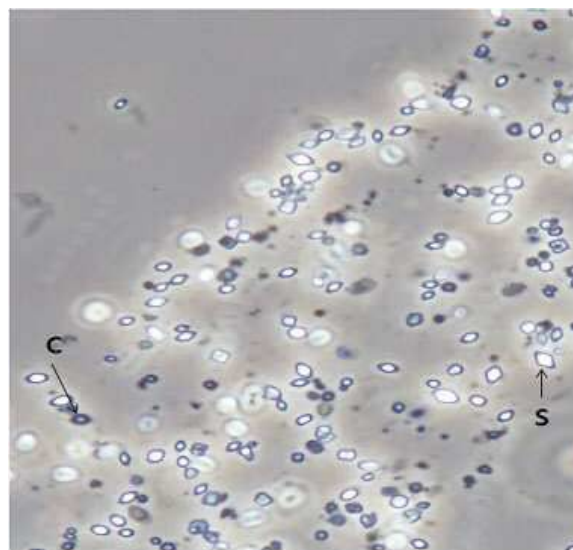
비티 아이자와이 KB098 균주 및 비교 균주로서 비티 아이자와이 HD-133 균주로부터 상기 방법으로 플라스미드 DNA를 추출하여 전기영동하였다 (도 7). 비티 아이자와이 KB098은 비티 아이자와이 HD-133과는 다른 밴드를 보이는 것으로 보아 혈청형을 같으나 다른 균주임을 알 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0079] 도 1은 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 KB098 균주의 내독소 단백질(C) 및 포자(S)의 위상차현미경 (x1,000) 사진이다.
- [0080] 도 2는 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 KB098 균주의 내독소 단백질(C) 및 포자(S)의 주사전자현미경 (x10,000) 사진이다.
- [0081] 도 3은 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 KB098 균주의 내독소 단백질의 SDS-PAGE 전기영동 사진이다. 단백질 표준 분자량 마커 (M), 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 내독소 단백질 (레인 1), 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 내독소 단백질 (레인 2), 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 KB098 내독소 단백질 (레인 3).
- [0082] 도 4는 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 KB098 균주의 내독소 단백질에 담배거세미나방 및 과밤나방의 중장 추출액을 처리한 SDS-PAGE 전기영동 사진이다. 단백질 표준 분자량 마커 (M), 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 KB098 내독소 단백질 (레인 1), 담배거세미나방 중장 추출액을 처리한 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 KB098 균주의 내독소 단백질 (레인 2), 과밤나방 중장 추출액을 처리한 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 KB098 균주의 내독소 단백질 (레인 3).
- [0083] 도 5는 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 KB098 균주 내독소 단백질을 처리한 담배거세미나방 2, 3 및 4령 유충의 사충률 변화 추이를 나타낸 그래프이다.
- [0084] 도 6은 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 KB098 균주의 내독소 단백질, 시판 중인 비티 아이자와이 T 제품 및 SB 제품, 및 비티 쿠르스타키 SL 제품의 내독소 단백질을 담배거세미나방에 처리하여 비교한 그래프이다. *B.t. aizawai* KB098: 1×10^7 cfu/ml, *B.t. aizawai* T 제품: 1×10^7 cfu/ml, *B.t. aizawai* SB 제품: 2.5×10^7 cfu/ml.
- [0085] 도 7은 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 KB098 균주 및 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 HD-133 균주의 플라스미드 DNA의 패턴을 아가로스겔에 전기영동한 사진이다. 람다 DNA를 *HindIII* 효소로 절단한 DNA 마커 (M), 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 HD-133 균주의 플라스미드 DNA (레인 1), 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 KB098 플라스미드 DNA (레인 2).

도면

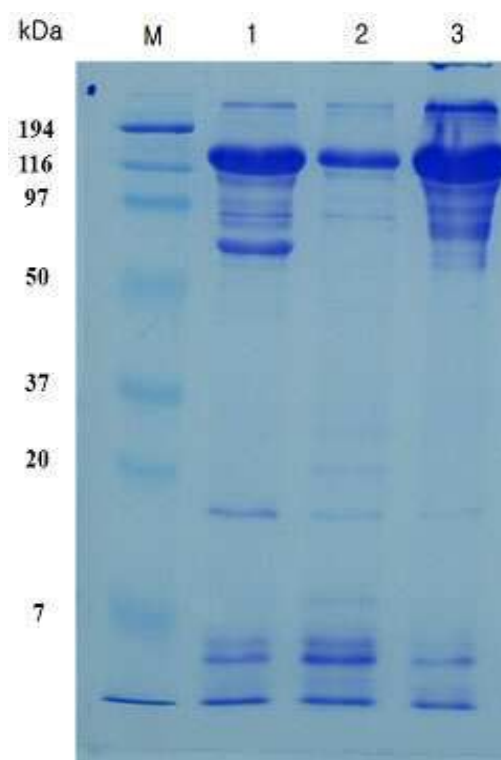
도면1



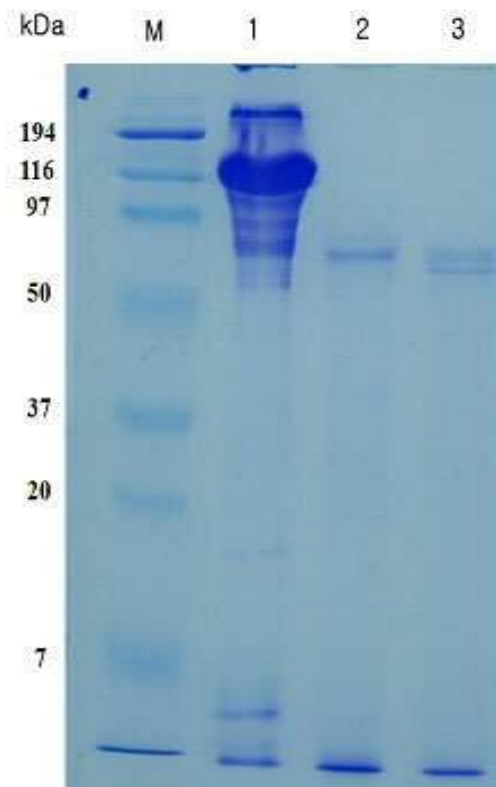
도면2



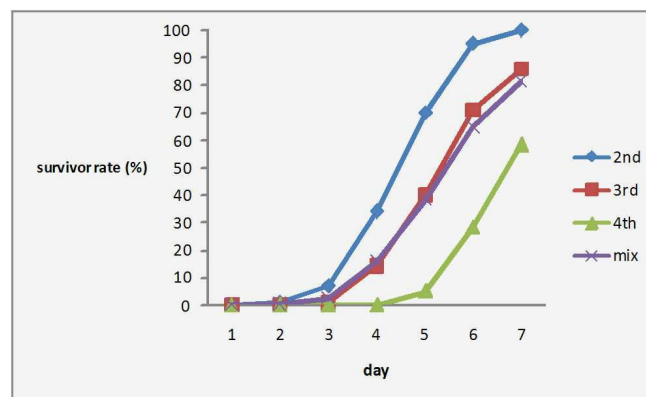
도면3



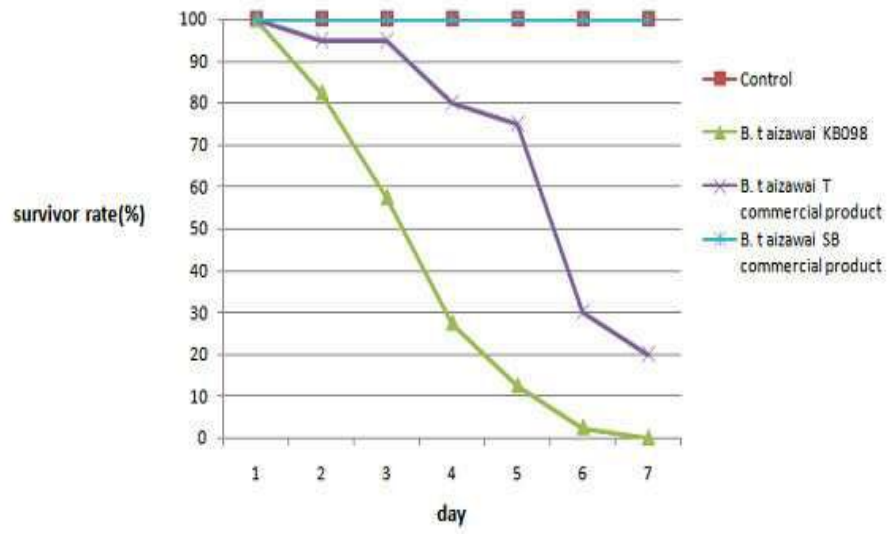
도면4



도면5



도면6



도면7

