



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0103199
(43) 공개일자 2010년09월27일

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01) A01N 63/00 (2006.01)

C12R 1/07 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0021688

(22) 출원일자 2009년03월13일

심사청구일자 2009년03월13일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 궁동 220번지 충남대학교

(72) 발명자

유용만

대전광역시 서구 월평2동 무지개아파트 103동 604호

백승경

대전광역시 서구 가수원동 계룡아파트 3동 906호

진나영

대전광역시 동구 판암동 549-10번지 동우빌라 102호

(74) 대리인

최규환

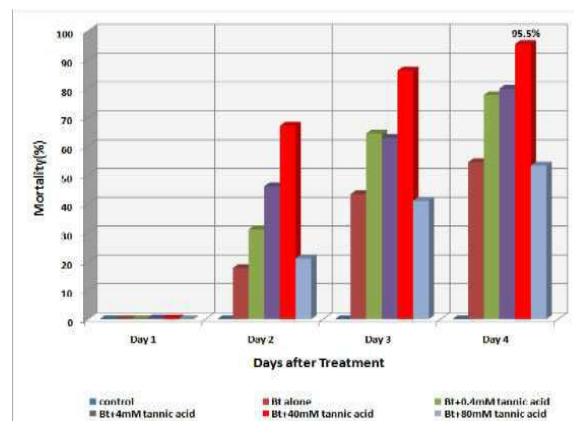
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 살충 활성이 있는 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB100 균주 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 토양시료에서 분리한 미생물 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키(*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) KB100 균주의 해충 살충능력을 검정하고 해충 살충용 조성물로서의 이용방법에 관한 것으로, 기존 화학 농법이 초래하는 환경오염, 농산물 및 인·축에의 농약 축적이라는 부작용을 해소하는 친환경적인 대안이다. 더욱 상세하게는, 상기 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 살충용 조성물, 상기 균주 배양액에 탄닌산을 첨가하여 해충 살충 활성이 증대된 살충용 조성물의 제조 방법, 상기 살충제를 식물 또는 토양에 처리하여 해충을 방제하는 방법 및 상기 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) KB100 균주의 배양에 의해 얻어지고, SDS-PAGE에 의해 측정된 분자량이 130kDa인 내독소 단백질에 관한 것이다. 상기 살충제는 화학 살충제에 저항성이 강한 해충 방제에 탁월한 효과를 나타냄으로써 친환경 농업의 육성에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도6



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009010FT113273333

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관

연구사업명 공동연구사업

연구과제명 자원순환형 친환경 유기농업기술개발 , 유통미생물 살충제 농약절감 모델 개발 및 신규
세균 살충제의 제작기술 개발

기여율

주관기관 서울대학교

연구기간 2009년 01월 01일 ~ 2011년 12월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

해충에 대해 살충 활성이 있는 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) KB100 균주 (IMER00512).

청구항 2

제1항의 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 해충 살충용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 탄닌산이 40 mM의 농도로 첨가된 것을 특징으로 하는 해충 살충용 조성물.

청구항 4

제2항 또는 제3항에 있어서, 상기 해충은 나비목인 것을 특징으로 하는 해충 살충용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 해충은 과밤나방, 배추좀나방, 작은가시들명나방, 벼애나방 또는 흑명나방인 것을 특징으로 하는 해충 살충용 조성물.

청구항 6

제1항의 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) KB100 균주의 유효량을 식물 또는 토양에 살포함으로써 해충을 살충하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 해충은 나비목인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 해충은 과밤나방, 배추좀나방, 작은가시들명나방, 벼애나방 또는 흑명나방인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제6항에 있어서, 40 mM의 탄닌산을 추가로 살포하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제1항의 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) KB100 균주 배양액에 탄닌산을 첨가하는 단계를 포함하는 해충 살충용 조성물의 제조 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 탄닌산의 농도는 40 mM인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서, 상기 해충은 나비목인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 해충은 과밤나방, 배추좀나방, 작은가시들명나방, 벼애나방 또는 흑명나방인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

해충에 대해 살충 활성이 있는 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 (*Bacillus thuringiensis* subsp.

kurstaki) KB100 균주의 배양에 의해 얻어지고, SDS-PAGE에 의해 측정된 분자량이 130kDa인 내독소 단백질.

청구항 15

제14항에 있어서, 이의 활성 형태가 분자량 65kDa인 것을 특징으로 하는 내독소 단백질.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 토양에서 분리한 살충 활성을 갖는 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 균주 및 이의 용도에 관한 것으로서, 더욱 구체적으로 해충에 대해 살충 활성을 갖는 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB100 균주, 상기 균주를 유효성분으로 함유하는 해충 살충용 조성물, 상기 균주 배양액에 탄닌산을 첨가하여 살충 활성이 증대된 살충용 조성물의 제조 방법, 상기 살충제를 식물 또는 토양에 처리하여 해충을 방제하는 방법 및 상기 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) KB100 균주의 배양에 의해 얻어지고, SDS-PAGE에 의해 측정된 분자량이 130kDa인 내독소 단백질에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 생물농약의 일종인 바실러스 투린지엔시스(*Bacillus thuringiensis*, *Bt*, 비티)는 포자를 형성하는 동안 델타-내독소(δ -endotoxin)라 불리는, 내독소 결정형 단백질(insecticidal crystal proteins, ICPs)을 생산하는 그람 양성 세균이다. 100 가지 이상의 *Bt* 크리스탈(ICPs)은 살충 특성 및 분자구조에 근거하여 크게 Cry I, II, III, IV, V의 5 종류로 분류된다. 이들은 나비목(Cry I), 나비목 및 파리목(Cry II) 딱정벌레목(Cry III), 파리목(Cry IV), 나비목 및 딱정벌레목(Cry V)에 대한 살충 활성이 있다 (Cannon, 1996. Biol. reviews of the Cambridge Philosophical Society 71:561-636 ; Crickmore *et al.*, 1998, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:807-813). 이 중 나비목에 대한 *Bt* 내독소 결정형 단백질의 경우는 유충 발육단계 동안에 다양한 독성을 지닌다. 대부분의 나비목 중에 높은 독성을 나타내는 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키(*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*) CryIAc의 델타-내독소(δ -endotoxin)는 과밤나방에 대해서 초기 어린 유충을 제외하고는 높은 살충효과를 나타내지 않는다.

[0003] *Bt*가 생산하는 내독소 결정형 단백질(ICPs)은 분자량이 약 130 kDa이며 자체적으로는 살충 활성이 없으나, 상기 전독소 단백질을 곤충이 섭식하였을 때, 알칼리 상태인 곤충의 중장 내에서 단백질 소화효소에 의해서 약 55-70 kDa의 살충성을 나타내는 독소 단백질로 분해된다. 이러한 독소는 중장세포의 수용체에 결합하여 구멍을 뚫으로써, 중장세포막의 이온교환의 불균형 및 영양분의 흡수가 이루어지지 않게 되며, 이에 따라 패혈증이 유발되어, 곤충은 섭식이 중단되고 결국은 사멸하게 된다 (Gill *et al.*, 1992, Annual review of entomology 37:615-634).

[0004] 하지만 *Bt*에 내성이 강한 과밤나방의 경우의 내독소 결정형 단백질이 중장효소에 의해 과분해되어 살충성을 나타내는 독소단백질 보다 더 작은 분자로 분해되어 결국 살충 활성이 약화 된다 (Christeller *et al.*, 1992, Insect biochemistry and molecular biology 22:735-746). 이렇듯 단백질 분해효소가 *Bt* 독소의 살충력을 결정하는 중요한 요소이다. 따라서 이러한 소화효소의 강한 분해력을 억제시키는 단백질 분해효소 억제자 및 *Bt*를 함께 섭식시켜 독소 단백질이 과분해되지 않도록 하여 살충성을 높이는 데 초점을 두고 있다. 나비목 유충의 중장 내 소화효소는 세린계 단백질 분해효소(Serine proteases)가 높은 비율을 차지하며, 이는 단백질 가수분해 과정에 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Oppert, 1999, Archives of insect biochemistry and physiology 42:1-12).

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 안출된 것으로서, 본 발명자들은 여러 나비목 해충에 독성을 가지는 균주를 선별하고 이 균주 및 이 균주의 살충 활성을 증대시킬 수 있는 첨가제의 발굴 및 살충 활성 증대효과를 확인하고자 하였다.

[0006] 현재까지 많은 바실러스 투린지엔시스 균주가 분리되고 있고 이를 통한 살충제의 개발 및 많은 연구가 진행 중인 하나, Bt의 경우, 화학 농약에 비해 그 효과가 미비하고 또한 효과가 늦게 나타나는 지효성을 나타낸다. 따라서 본 발명에서는 Bt의 단점을 보완하여 화학 살충제와 유사한 효과를 나타낼 수 있도록 하기 위해 단백질 분해효소 저해제인 탄닌산을 첨가하여 살충 활성이 증대된 살충용 조성물로서 이용하도록 함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제 해결수단

[0007] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 해충에 대해 살충 활성을 갖는 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) 균주를 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 균주를 유효성분으로 함유하는 해충 살충용 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 균주의 유효량을 식물 또는 토양에 살포함으로써 해충을 방제하는 방법을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 균주 배양액에 탄닌산을 첨가한 조성물의 제조 방법을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 균주의 배양에 의해 얻어지고, SDS-PAGE에 의해 측정된 분자량이 130kDa인 내독소 단백질을 제공한다.

효 과

[0012] 본 발명의 Bt KB100 균주 및 상기 균주에 탄닌산을 혼합처리할 경우, 각 나비목 해충에 대해 강력한 살충효과를 보이므로 이를 포함하는 본 발명의 조성물은 친환경적인 제제로서 작물에 미치는 영향을 최소화하고 작물에 발생하는 해충을 방제하는데 효과적이며, 속효성을 보임으로서 나비목 해충에 탁월한 살충효과를 얻을 수 있으므로, 무공해성 해충 방제용 제제의 개발 등에 유용하게 이용될 수 있다.

[0013] 상기와 같이, 탄닌산을 첨가함으로써 Bt에 의한 살충 활성의 상승효과 및 낮은 농도의 Bt에 탄닌산을 첨가함으로써 증대된 살충 활성을 얻을 수 있으므로 생물농약인 Bt제의 생산 비용의 절감을 기대할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0014] 상기 목적에 따라, 본 발명에서는 토양으로부터 분리된, 해충에 대해 살충효과를 가지는 신규한 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) 균주를 제공한다.

[0015] 더욱 상세하게는 나비목 해충에 살충 효과가 높은 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) 균주 KB100 (IMER00512)을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명에서는 또한 신규한 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) 균주 KB100 (IMER00512)의 순수배양물을 유효성분으로 함유하는 해충의 살충용 조성물을 제공한다. 상기 조성물에서, 상기 해충은 나비목일 수 있으며, 상기 나비목 해충은 과밤나방, 배추좀나방, 작은가시들명나방, 벼애나방 또는 흑명나방일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0017] 상기 조성물에는 40 mM의 탄닌산이 첨가될 수 있다.

[0018] 본 발명에서는 또한, 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) KB100 균주 (IMER00512) 또는 이의 순수배양물을 함유하는 조성물의 유효량을 해충의 방제를 위하여 식물 또는 토양에 살포하는 것을 특징으로 하는 해충의 방제 방법을 제공한다.

[0019] 상기 방제 방법에서, 40 mM의 탄닌산을 추가로 살포할 수 있으며, 상기 해충은 나비목일 수 있으며, 상기 나비목 해충은 과밤나방, 배추좀나방, 작은가시들명나방, 벼애나방 또는 흑명나방일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0020] 본 발명에서는 또한, 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) KB100 균주 (IMER00512)에 탄닌산을 첨가하는 단계를 포함하는 해충의 살충용 조성물의 제조 방법을 제공한다.

[0021] 상기 탄닌산의 농도는 40 mM일 수 있으며, 상기 해충은 나비목일 수 있으며, 상기 나비목 해충은 과밤나방, 배추좀나방, 작은가시들명나방, 벼애나방 또는 흑명나방일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0022] 본 발명에서는 또한, 해충에 대해 살충 활성이 있는 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) KB100 균주의 배양에 의해 얻어지고, SDS-PAGE에 의해 측정된 분자량이

130kDa인 내독소 단백질을 제공한다. 상기 내독소 단백질의 활성 형태는 분자량 65kDa이다.

- [0023] 이하, 본 발명의 설명에 사용되어지는 용어의 정의는 다음과 같다.
- [0024] “살충성”은 식물해충의 사망률을 증가시키거나 성장률을 저해하는 물질의 능력을 의미한다.
- [0025] “유효량”은 유익한 또는 원하는 결과를 일으키기에 충분한 양이다. 유효량은 1회 이상으로 투여될 수 있다.
- [0026] “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.
- [0027] 본 발명의 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*) 균주 KB100은 대한민국 보은군 무밭에서 채집한 토양에서 분리하여 얻은 것으로, 내독소 단백질 유전자를 함유하고 있어, 생장조건이 악화될 경우 이 유전자로부터 내독소 단백질을 생산한다. 이렇게 생산된 내독소 단백질은 이중 피라미드 형태의 결정체를 형성하며, 배추좀나방, 과밤나방, 작은각시들명나방 등의 나비목 해충에 대해 우수한 살충 효과를 나타낸다. KB100 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%에 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, 텍소렉스-25 등의 보조제, 카울린 등의 증량제 등을 사용할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 살충용 조성물을 적용할 수 있는 식물은 특별히 제한되지는 않으며, 배추, 양배추, 오이, 무, 들깨, 고추, 결구상추(양상추), 딸기, 토마토, 파, 담배, 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.
- [0029] 본 발명의 Bt 아종 쿠르스타키 KB100 균주를 함유하는 해충 방제용 조성물, 더욱 바람직하게는 나비목 해충 방제에 유용한 조성물은 Bt 아종 쿠르스타키 KB100 균주의 배양액 또는 건조분말 5 내지 90 중량%에 계면활성제, 무기염류, 보조제, 결합제 및 증량제 등을 혼합하여 해충 살충용 조성물로 제조할 수 있다.
- [0030] 상기 무기염류는 Bt 아종 쿠르스타키 KB100 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.
- [0031] 상기 계면활성제는 분자 중에 친수성 분자단과 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.
- [0032] 상기 계면활성제로는 알킬벤젠설포네이트, 알킬나프탈렌설포네이트, 디알킬설포석시네이트, 리그닐설포네이트, 알킬나프탈렌설포네이트포르마린축합물, 폴리옥시알킬렌알킬페닐설포네이트와 같은 설포네이트의 나트륨염 또는 칼슘염, 알킬설페이트, 폴리옥시알킬렌알킬설페이트, 폴리옥시알킬렌알킬페닐설페이트와 같은 설페이트의 나트륨염 또는 칼슘염, 나프탈렌설포석시네이트, 폴리옥시알킬렌설포석시네이트와 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.
- [0033] 상기 증량제는 상기 계면활성제와 함께 사용되어 상기 계면활성제를 흡착, 분상화하고, 이 계면활성제, 약효 증진제, Bt 아종 쿠르스타키 KB100 균주의 배양액 또는 건조분말과 함께 비티제 조성물의 미립자 표면을 이루는 물질로 작용하며, 진분, 대두박, 밀기울, 입상 섬유질, 유안, 규조토, 제올라이트, 벤토나이트, 탈크, 카울린, 파이로필라이트, 화이트카본 등이 단독 또는 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.

[0034] 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.

[0035] 방제 대상인 해충은 레피도프테라(Lepidoptera)이다. 특히 바람직한 양태에서, 해충은 양배추거세미나방 [cabbage looper, 트리코플루시아 니(*Trichoplusia ni*)], 벨벳빈 카테르필라[velvetbean caterpillar, 안티카르시아 겐마탈리스(*Anticarsia gemmatalis*)], 배추좀나방[diamondback moth, 플루텔라 크실로스텔라(*Plutella xylostella*)], 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*) 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0036] 상기 해충 살충제는 입제, 분제, 액상수화제, 수화제 등의 형태로 제형화 될 수 있는데 이에 한정되지는 않으며, 수화제가 바람직하다.

[0037] 제형화된 살충제는 사용전에 물에 500 내지 2,000 배, 바람직하게는 약 1,000 배로 희석하여 사용할 수 있다.

[0038] 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.

[0039]

[0040] **실시예 1. KB 100 균주의 분리 및 혈청학적 동정**

[0041] 토양 시료는 주로 충청도, 전라도, 경기도 일대의 논, 밭, 과수원을 중심으로 이전에 생물농약을 처리하지 않은 토양 총 115 곳에서 시료를 채취하였다. 나무 밑 표면으로부터 약 10 cm 하의 토양 10 g을 채취하여 실험에 사용하였다. *Bt* 균주의 분리는 Ohba 와 Aizawa의 방법 (1978, Appl. Environ. Microbiol. 28:124-128)을 사용하였다. 채취된 토양 시료 1 g을 시험관에 넣은 뒤 멸균 증류수 9 ml을 넣고 3-4 회 정도 강하게 교반하였다. 포자를 형성하지 못하는 세균들을 선택적으로 제거하기 위하여 65℃ 항온수조에 30 분간 열처리하였다. 열처리 후 5 분간 정치하여 흙을 가라앉히고 상청액을 10^{-3} 까지 희석하여 영양평판배지(Nutrient agar)에 고르게 도말하였다. 상기 평판배지를 27℃에서 3-4일간 배양 후 위상차현미경 1,000배로 내독소 단백질 및 포자를 형성하는 균주를 선별하였다 (표 1).

[0042] 분리된 총 46 개의 *Bt* 균주 중 과밤나방에 고활성을 보이는 *Bt* KB100 균주는 보은군 무밭에서 채집한 토양에서 분리되었고, *Bt* KB100 균주의 편모항원을 기존의 항혈청 및 응집반응(agglutination)에 의한 방법으로 동정한 결과 항원의 기존의 바실러스 투린지엔시스 쿠르스타키의 항혈청 및 응집반응이 일어났다 (표 2).

[0043] 표 1. 작물 토양 샘플로부터 채집된 바실러스 투린지엔시스의 분리

[0044]

작물토양 종류		토양 시료 수 (개)	분리된 <i>Bt</i> 균주의 수 (개)	<i>Bt</i> 분리율(%)
식용작물		29	17	58.6
공예작물		20	4	20.0
과채류	채소류	54	25	46.2
	과수류	8	0	0.0
기타		4	0	0.0
총계		115	46	40.0

[0045] 표 2. 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB100 균주의 혈청형 분류

[0046]

분리 균주	편모항원 분류	아종	응집반응
<i>Bt</i> KB100	3abc	쿠르스타키(<i>kurstaki</i>)	+

[0047] **실시예 2. *Bt* 아종 쿠르스타키 KB100 균주의 선별 및 살충 효과**

[0048] 총 115 개의 토양 시료 중에서 담배거세미나방에 높은 활성을 보이는 균주를 선별하기 위해서 같은 농도의 포자-결정체 균액을 만들어 활성을 시험하고, 선별된 균주가 다른 해충에도 활성이 있는지 알아보기 위해서 다양한 해충에 대해서 활성을 시험하였다.

[0049] 분리된 *Bt* 아종 쿠르스타키 KB100 균주, 비교균주 (*Bt* 아종 쿠르스타키 HD-1) 및 상품화된 생물농약의 *Bt* 균주를 영양평판배지(Nutrient agar)에 접종하고 27℃에서 4~6일간 배양 후 위상차현미경으로 내독소 결정체 단백질 형성을 관찰하면서 내독소 단백질이 형성되었을 때, 배지 위의 균을 모아 원심분리하여 균주만을 수확한 후, 멸균수 2 ml를 첨가하여 약 1.5×10^7 cfu/ml에 해당하는 균액을 정성적 생물검정에 사용하였다.

[0050] 담배거세미나방 및 과밤나방에 대한 생물검정은 약 1.5×10^6 cfu/ml에 해당되는 희석액 100 μ l를 0.5 g의 인공사료에 첨가하여 2령 말기 유충을 5 마리씩 넣고 4회 반복 실시하여 24시간 단위로 120시간 동안 치사율을 조사하였다.

[0051] 배추좀나방 및 작은각시들명나방에 대한 생물검정은 Tabashnik *et al.* (1990, Journal of economic entomology 83:1170-1176)의 방법을 수정하여 잎 디스크 침지법으로 실시하였다. 3x3 cm의 배춧잎을 약 1.5×10^5 cfu/ml에 해당되는 희석액 20 ml에 침지한 후 건조시킨 다음, 2령 유충 10 마리씩을 3회 반복 실시하여 24시간 단위로 72시간 동안 치사율을 조사하였다.

[0052] 벼애나방 및 흑명나방에 대한 생물검정은 약 15 cm의 옥수수 유묘 35주에 각각의 *B. thuringiensis* 균주의 1.5×10^5 cfu/ml 희석액 10 ml를 분무하고 음건한 뒤 3령된 벼애나방 및 흑명나방 유충 20 마리씩을 접종하여 72시간까지 검정하였다.

[0053] 과밤나방을 대상으로 총 115 개의 토양샘플에서 분리된 46 개의 *Bt* 균주들을 1.5×10^6 cfu/ml 농도의 균액으로 처리 시, 사충율 90%를 초과하는 균주는 KB128, KB100 및 KB162로 이중 100%의 높은 사충율을 보인 균주는 KB100 균주였다 (표 3). KB100 균주가 과밤나방에 대하여 이렇게 높은 활성이 있으므로 본 발명에서 차기 분석을 위하여 선별하였다. 그리고 생물농약으로 등록하기 위해서는 넓은 기주 범위에 적용 가능성이 있어야 하므로, 다양한 해충을 대상으로 확대 검정하였다. 과밤나방에 고효율인 *Bt* 아종 KB100 균주는 과밤나방 외에도 배추좀나방 및 작은각시들명나방에 100%의 높은 활성을 보였고 벼애나방 및 흑명나방에도 중간 정도의 활성을 보였다 (표 4).

[0054] 상기 *Bt* 아종 KB100 균주를 농촌진흥청지정 농업유전자원관리기관인 목원대학교 미생물생태자연연구소에 2009년 1월 14일자로 기탁하였다 (기탁번호: IMER00512).

[0055] 표 3. 과밤나방 유충에 대해 높은 활성을 보이는 *Bt* 분리균

시험 해충	<i>Bt</i> 분리균 (>90% 사충율)
과밤나방	CAB128, KB100, CAB162 (3)

[0057] 표 4. 다양한 나비목 해충에 대한 *Bt* 아종 쿠르스타키 KB100 균주의 활성

시험 해충	활성 정도 (사충율, %)
배추좀나방	+++ (100)
작은각시들명나방	+++ (100)
벼애나방	++ (87)
흑명나방	++ (80)
담배거세미나방	-(28)
+++ 고효율성, 사충율 90% 초과; ++ 활성, 사충율 70% 초과 90%이하; + 저활성, 사충율 50% 초과 70%이하; - 효과없음, 사충율 50% 이하	

[0059] 실시예 3. KB 100 균주의 형태 및 내독소 단백질 분석

[0060] 상기 분리된 *Bt* KB 100 균주를 영양평판배지에서 증식시켜 포자 형성기가 지난 콜로니를 위상차현미경(Olympus BX51) 및 주사전자현미경(Philips XL30E SEM)으로 관찰하였다. 위상차현미경으로 관찰하기 위해 소량의 *Bt* 배양

액을 슬라이드 글라스에 떨어뜨린 후, 1000 배로 관찰하였다. 주자전자현미경으로 관찰할 시료는 conducting silver paint(Ladd Res., USA)에서 금으로 코팅을 관찰하였다. 분리된 KB100 균주는 균체 내에 내생포자(endospore) 및 이중 피라미드 형태의 내독소 단백질이 형성되어 있음을 위상차현미경 및 주자전자현미경을 통해서 확인하였고, 이는 나비목 해충에 대해 독성을 갖는 내독소 단백질의 전형적인 형태와 일치한다 (도 1 및 2).

[0061] *Bt* KB100 균주의 내독소 단백질 전기영동 분석을 위해서 Laemmli의 방법 (1970, Nature, 227:680-685)에 따라 다음과 같이 SDS-PAGE하였다. 영양평판배지에 *Bt* KB100 균주를 접종하여 27℃에서 5일 동안 배양한 후, 위상차 현미경으로 자가분해(autolysis)가 일어나는 것을 확인한 후 13000 rpm으로 원심 분리하여 집균하였다. 모아진 균은 500 mM 염화나트륨(NaCl), 2% Triton X-100이 포함된 용액에서 3 회, 500 mM 염화나트륨이 포함된 용액에서 3 회 세척하였다. 12% separating gel 및 4% stacking gel로 SDS-PAGE를 수행하였다. 이때 비교를 위해 *Bt* 아종 쿠르스타키 (*kurstaki*) HD-1 및 아이자와이(*aizawai*)의 내독소 단백질 시료를 KB100 균주의 내독소 단백질 시료와 함께 전기영동 하였다. 도 3에서 보듯이, 아이자와이는 130 kDa의 단일 밴드를 나타내었고 쿠르스타키 HD-1균주는 130 kDa 및 65 kDa의 밴드를 나타내었으며, *Bt* KB100 균주는 같은 혈청형인 쿠르스타키 HD-1 균주와 유사한 단백질 패턴을 보였다.

[0062] 실시예 4. 중장액의 농도에 따른 내독소 단백질의 분해

[0063] *Bt* KB100 균주의 내독소 단백질을 용해시키기 위해 50 mM 수산화나트륨 (NaOH, pH 12.05)에 상온에서 5 분간 용해시킨 후, 3차 증류수에 희석한 농도별 중장액 및 KB100 균주의 내독소 단백질을 3:7 비율로 37℃에서 20 분간 반응시켰다. 이 후 Laemmli 로딩 버퍼를 첨가하고 100℃에서 10 분간 반응시켰다. 실시 예 2에서 명시된 겔(gel) 조성대로 단백질 전기영동을 수행하였다.

[0064] 10 배로 희석된 중장액에서 내독소 단백질이 약 30 kDa의 과분해된 단백질 밴드로 확인되지만, 중장액을 희석할 수록 살충 활성을 가지는 약 65 kDa의 독소 밴드가 생성되는 것을 확인할 수 있었다 (도 4). 이를 통해 독소가 파밤나방 중장액은 내독소 단백질에 대해 강한 단백질 가수분해 활성을 나타내고 또한 과분해되어 사충률이 떨어진다는 가설을 증명할 수 있다.

[0065] 실시예 5. 단백질 소화효소 저해제인 탄닌산의 선별

[0066] 상기 결과를 토대로 단백질 소화효소에 의한 *Bt* 전독소의 과분해를 억제시키기 위한 단백질 분해효소 저해제를 선별하기 위하여 다양한 종류의 단백질 분해효소 저해제에 따른 단백질 분해효소 억제효과 검정을 실시하였다.

[0067] 일반적인 단백질 분해력 검정은 기질로서 아조카제인(azocasein)을 10 mg/ml 농도로 용해하여 검정을 실시하였고, 파밤나방 중장액은 1/3로 희석하여 사용하였다. 아조카제인 용액을 희석된 중장액과 1:1(v/v)로 각각 300 μ l씩 혼합하여 37℃에서 15 분간 반응시켰고 반응 후, 10% trichloroacetic acid(TCA) 200 μ l를 첨가하였다. 상기 혼합액을 14,000 rpm, 4℃조건으로 30 분간 원심분리 후, 상청액만을 셀(cell)에 넣고 1M NaOH 600 μ l을 첨가시킨 후, 흡광도는 405 nm로 측정하였다. 다양한 단백질 분해효소 저해제는 세린계 단백질 분해효소 저해능력이 있는 탄닌산(tannic acid), SBTI, PMSF 및 메탈로 단백질 분해효소 저해능력이 있는 EDTA, 및 트립신에 저해능력이 있는 TLCK가 사용되었다.

[0068] 단백질 중장 소화효소에 다양한 단백질 분해효소 저해제 처리에 따른 영향을 본 결과, 탄닌산이 20 mM 농도에서 약 35%의 저해능력을 보였으며 다른 단백질 분해효소 저해제들에 비해 가장 높은 억제력을 보였다 (표 5). 이는 파밤나방 중장액에 주요한 단백질 분해효소는 세린계 단백질 분해효소이므로 탄닌산이 파밤나방 중장액에 높은 저해능력을 가진 이유라고 사료된다. 따라서 파밤나방의 과도한 단백질 분해능력을 가진 소화효소를 억제할 수 있는 저해제로서 탄닌산을 선별하였다.

[0069] 표 5. 파밤나방 중장액 내 소화효소에 다양한 단백질 분해효소 저해제의 처리에 따른 영향

[0070]

단백질 분해효소 저해제	단백질 분해효소 저해제의 농도	단백질 분해 활성 (% , 무처리구)
탄닌산	20 mM	65.8±0.7
EDTA	20 mM	94.2±2.5
PMSF	20 mM	97.2±0.4
SBTI	0.5 mg/ml	95.3±0.8

TLCK	20 mM	89.5±0.9
------	-------	----------

실시예 6. 탄닌산 및 내독소 단백질의 혼합처리를 통한 령기별 파밤나방의 사충률

생물 활성 검정에 사용하기 위하여 KB100 균주는 0.5 g의 인공사료에 2 또는 3 령은 1.02×10^5 cfu/ml 농도로, 5 령의 경우에는 1.02×10^6 농도의 포자-크리스탈 혼합액(spore-crystal mixture)을 적용하였다. 이 후 각 농도의 탄닌산을 인공사료에 재차 처리하고, 각 령기의 파밤나방 유충 및 위에서 처리된 인공사료를 페트리디시에 넣고 시간별 사충률을 조사하였다.

Bt 단독 처리구에 비해 Bt 및 탄닌산 혼합처리구에서 보다 높은 사충률을 나타내었다 (표 6). 특히, Bt 및 40 mM 탄닌산을 혼합처리하였을 경우 가장 높은 사충률을 나타내었다. 파밤나방 2 령은 95.5% 사충률로 Bt 단독처리 사충률인 54.4%에 비해 1.8 배, 3 령은 93.3%로 60.0%에 비해 1.6 배, 5 령은 40%로 13.3%에 비해 3 배 증가된 사충률을 나타내었다. 일차별 사충률을 보면, 모든 령기에 대하여 Bt 및 탄닌산 혼합처리구는 Bt 단독 처리 구에 비해 빠른 사충률을 나타내었고, 마찬가지로 40 mM 탄닌산 혼합처리 구에서 가장 빠르고 높은 사충률을 보였다 (도 6-8). 따라서 살충효과가 느리게 나타나는 Bt의 단점을 보완하여 그 효과가 증대되는 것을 알 수 있다.

표 6. 각 령기별 파밤나방에 대한 KB 100 및 탄닌산의 혼합처리 결과

처리구	농도 탄닌산(mM)	사충률(%) (평균±표준편차)		
		파밤나방 유충		
		2 령	3 령	5 령
무처리구	-	0.0±0.0	6.7±0.8	0.0±0.0
KB 100	-	54.4±1.9	60.0±1.7	13.3±0.3
KB 100 및 탄닌산	0.4	77.8±1.9	73.3±1.6	-
	4	80.0±15.7	76.7±1.8	-
	20	77.8±7.1	86.6±0.5	-
	40	95.5±4.6	93.3±0.8	40.0±0.4
	80	53.3±8.8	76.6±1.3	-

실시예 7. 실내 생물검정에서 선발된 탄닌산 농도 및 Bt의 혼합처리를 통한 포장 실험

진도 파 포장에서 폭 1.0 m, 길이 5.0 m의 넓이에 대해서 포장 실험을 수행하였다. Bt는 2.0×10^6 농도로 적용하였고, 탄닌산은 실내에서 가장 효과가 좋은 40 mM 농도를 선발하여 혼합처리하였다. 각 처리구는 1,500 ml/ha의 양으로 살포하고, 이때 전착효과를 나타내는 1% Tween[®] 80을 첨가하였다. 각 처리구는 10 주의 피해엽 및 잎에 존재하는 파밤나방 수를 파악하였고, 1 주일 간격으로 3 회 살포하였다.

Bt 단독 처리 구는 1, 2 및 3 차 처리에서 61.8%, 80.4%, 47.3%의 사충률을 나타낸 것에 비해 Bt 및 40 mM 탄닌산의 혼합처리 구는 83.9%, 89.4%, 66.8%의 증가된 사충률을 나타내었다 (표 7). 또한 기주 피해 감소율은 Bt 단독 처리 구에서 18.3%, 3.2%, 2.8%에 비해, Bt 및 40 mM 탄닌산 혼합처리 구는 34.8%, 16.7%, 22.6%를 나타내어 기주의 피해 정도 또한 감소된 결과를 나타내었다.

표 7. 파 포장에 대한 KB 100 및 탄닌산의 혼합처리 결과

처리구	처리 후 시간경과 (%)					
	1 주차		2 주차		3 주차	
	피해감소율	사충률	피해감소율	사충률	피해감소율	사충률
KB 100	18.3±6.2b	61.8±9.9b	3.2±2.8b	80.4±4.9b	2.8±2.8b	47.3±6.8b
KB 100 및 40 mM 탄닌산	34.8±5.3a	83.9±3.5a	16.7±6.8a	89.4±2.5a	22.6±12.0a	66.8±7.0a

실시예 8. *Bt* 및 탄닌산과의 혼합처리를 통한 나비목 해충에 대한 상승된 살충 효과

기주의 확대 적용을 위해서 작은각시들명나방은 오이 잎을, 흑명나방은 옥수수 잎을, 배추좀나방은 배춧잎을 실험에 사용하였다. 작은각시들명나방 및 배추좀나방은 1.02×10^2 cfu/ml, 흑명나방은 1.02×10^5 cfu/ml 농도의 *Bt*를 사용하였고, 침지 시에는 *Bt* 및 탄닌산이 혼합된 액체에 15 초간 침지한 후 약 10 분간 음건하였다.

배추좀나방, 작은각시들명나방, 흑명나방에 *Bt* 단독 처리한 결과 각각 75.0%, 20.0%, 64.5%의 사충률을 나타내었다 (표 8). 일반적으로 탄닌산을 *Bt*와 혼합처리하였을 때 증가된 사충률을 나타내었다. *Bt* 및 40 mM 탄닌산을 혼합처리한 결과, 배추좀나방 및 목화바둑명나방은 각각 100.0%, 90.0%로 큰 폭으로 증가된 사충률을 보였다. 반면에 흑명나방은 *Bt* 및 0.4 mM 탄닌산을 혼합처리하였을 때 가장 높은 사충률인 86.7%의 사충률을 나타내었다. 이것은 각각의 나비목 해충의 경우 단백질을 분해하는 중장 프로파일의 차이로 인한 것으로 사료된다.

표 8. 기타 나비목 해충에 대한 *Bt* KB100 및 탄닌산의 혼합처리 결과

처리구	농도 탄닌산(mM)	사충률(% , 평균±표준편차)		
		나비목		
		작은각시들명나방	흑명나방	배추좀나방
무처리구	-	0.0±0.0	6.6±9.4	15.0±11.2
KB 100	-	20.0±0.0	64.5±10.9	75.0±11.2
KB 100 및 탄닌산	0.4	50.0±0.4	86.7±9.4	77.5±4.3
	4	70.0±0.4	64.5±4.1	92.5±8.3
	40	90.0±0.1	73.3±1.2	100.0±0.0

도면의 간단한 설명

도 1은 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB100(*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*) KB100 균주의 위상 차현미경 사진이다.

도 2는 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키(*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*) KB100 균주의 내독소 단백질 (C) 및 포자 (S)의 주사전자현미경 사진이다.

도 3은 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키(*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*) KB100 균주의 내독소 단백질의 SDS-PAGE 사진이다. 단백질 표준 분자량 마커 (1), 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이(*B.t.* subsp. *aizawai*) (2), 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 (*B.t.* subsp. *kurstaki*) HD-1 (3), 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키(*B.t.* subsp. *kurstaki*) KB100 (4), 국내 시판 중인 BT제 (5).

도 4는 파밤나방 중장액의 농도에 따른 내독소 단백질의 분해 정도를 나타낸 SDS-PAGE 사진이다. 단백질 표준 분자량 마커 (1), KB100 균주 (2), x10 배로 희석한 중장액 (3), x20 배로 희석한 중장액 (4), x40 배로 희석한 중장액 (5), x80 배로 희석한 중장액 (6), x160 배로 희석한 중장액 (7), x320 배로 희석한 중장액 (8), x640 배로 희석한 중장액 (9) (각각의 희석된 중장액 및 내독소 단백질을 반응).

도 5는 탄닌산의 농도에 따른 파밤나방 중장액의 내독소 단백질의 분해 억제 정도를 나타낸 SDS-PAGE 사진이다. 단백질 표준 분자량 마커 (1), KB100 균주 (2), 내독소 단백질+중장액 (3), 내독소 단백질+중장액+0.4mM 탄닌산 (4), 내독소 단백질+중장액+4mM 탄닌산 (5), 내독소 단백질+중장액+40mM 탄닌산 (6), 내독소 단백질+중장액+80mM 탄닌산 (7).

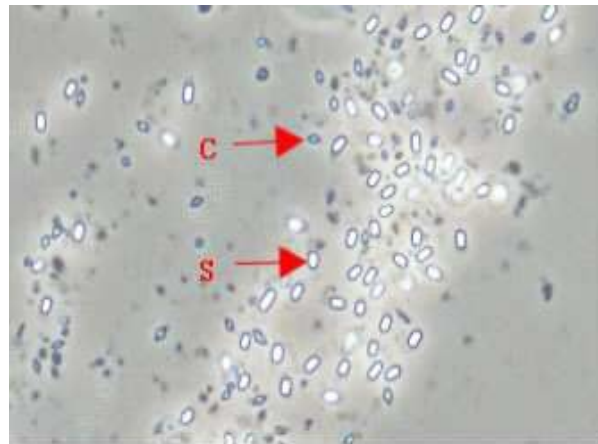
도 6은 파밤나방 2령 유충의 일차별 사충률을 나타내는 그래프이다.

도 7은 파밤나방 3령의 일차별 사충률을 나타내는 그래프이다.

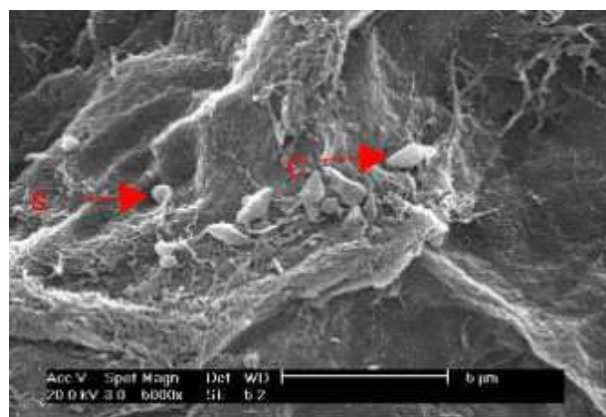
도 8은 파밤나방 5령의 일차별 사충률을 나타내는 그래프이다.

도면

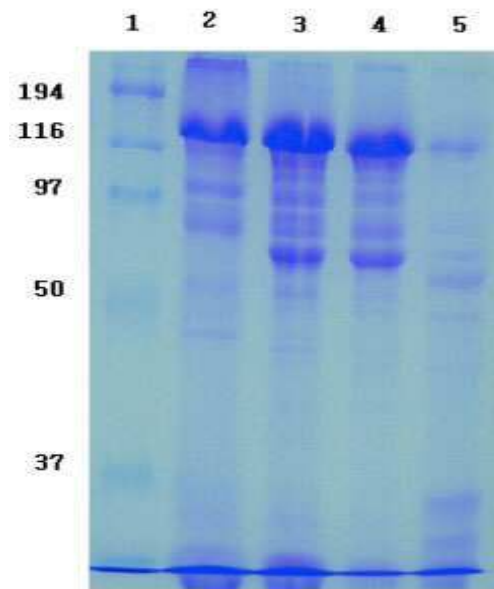
도면1



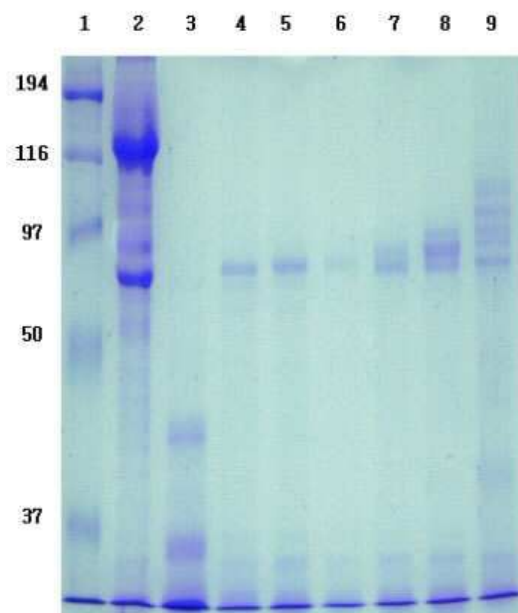
도면2



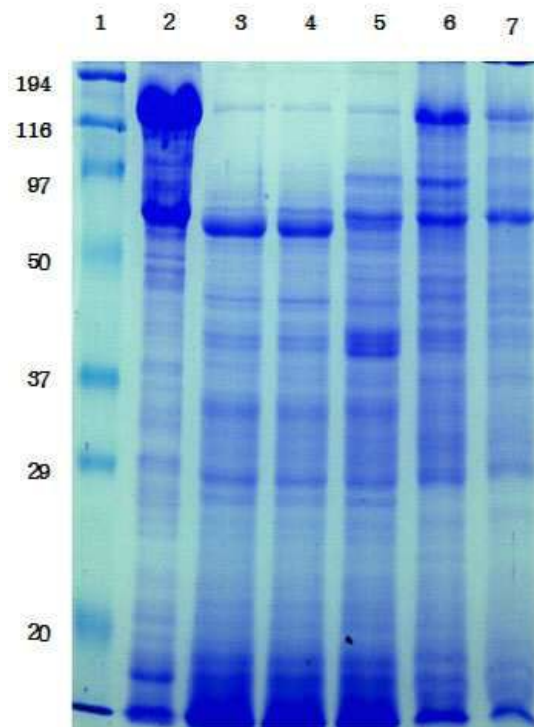
도면3



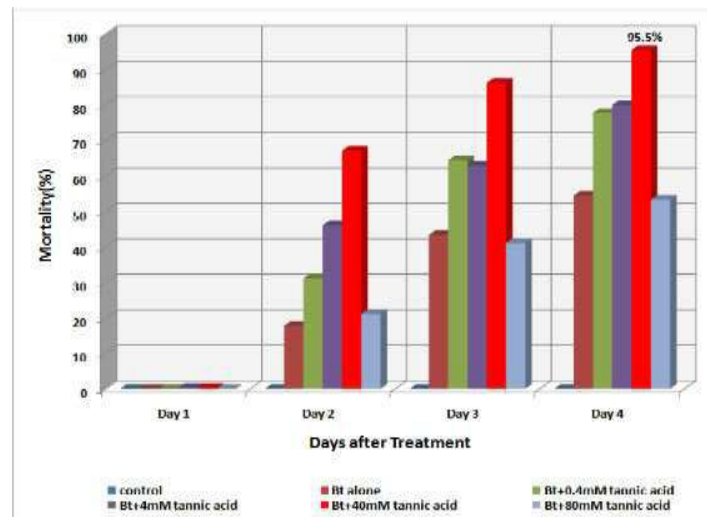
도면4



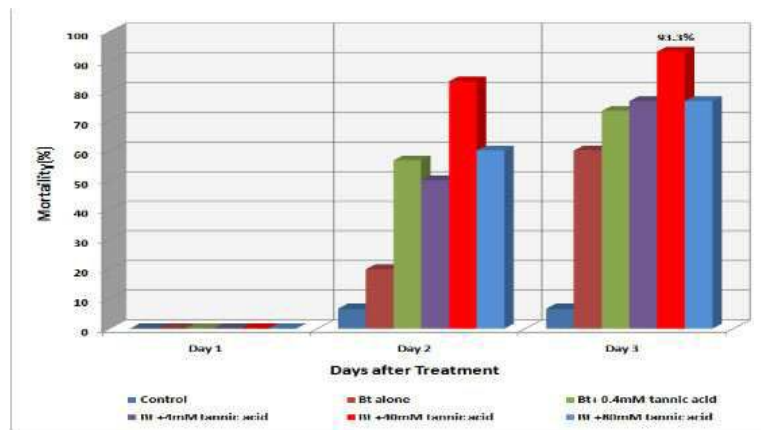
도면5



도면6



도면7



도면8

