

GOVP1200515646

최 종  
연구보고서

산림해충 방제를 위한 미생물농약 개발  
Development of microbiological insecticide  
for forest insect pests control

국립산림과학원

농 립 부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서는 “산림해충 방제를 위한 미생물농약개발”(협동과제 : BT제형개발)의 최종보고서를 제출합니다.

2004년 9월 5일

주관연구기관명 : 국립산림과학원  
총괄연구책임자 : 신 상 철  
연구원 : 최 광 식  
연구원 : 정 영 진  
연구원 : 김 철 수  
연구원 : 박 일 권  
연구원 : 박 지 두  
연구원 : 이 상 길  
연구원 : 김 경 회  
연구원 : 이 승 규  
연구원 : 이 상 현  
연구원 : 제 연 호  
연구원 : 최 재 영  
연구원 : 손 삼 기  
연구원 : 이 명 순  
연구원 : 강 중 남  
연구원 : 정 규 석

협동 연구 기관 : (주)비 아 이 지  
협동연구책임자 : 정 종 상  
연 구 원 : 문 선 주  
연 구 원 : 박 종 철  
연 구 원 : 차 광 호  
연 구 원 : 박 형 근  
연 구 원 : 김 관 경

# 요 약 문

## I. 제 목

산림해충 방제를 위한 미생물 농약 개발

## II. 연구 개발의 목적 및 중요성

현재 우리나라의 산림해충 방제를 위하여 유기 합성 농약의 대량 살포로 인한 환경오염, 잔류독성 및 저항성 해충의 출현 등 심각한 사회문제가 대두되고 있는 실정이다.

이러한 유기합성 살충제를 대체할 수 있는 새로운 무공해 살충제 개발이 시급히 요청되고 있고, 화학적 방제법의 보완, 해결책으로서 이미 미국 등에서는 수십 종의 미생물 살충제가 연구 개발되어 시판되고 있다.

산림해충 중 나비목해충의 방제나 *Bacillus thuringiensis*의 이용으로 유용하게 이루어질 수 있음에도 이에 대한 대량 배양연구 및 제제의 개발연구가 미진하여 소폭·제한적으로 사용되는 문제를 안고 있으므로 이를 극복하기 위한 유용한 *Bacillus thuringiensis* 균주의 산림해충에 대한 이용연구가 시급한 실정이다.

그러므로 선행 농림기술특정과제인 “산림자원으로부터 무공해 생물농약 개발”에서 국내 산림해충에 대해 강한 살충력을 갖는 곤충병원 미생물을 *Bacillus thuringiensis* KFRI-2 균주를 선발 특허 출원한 바 있다.

따라서 본 연구에서는 위에서 선발된 *Bacillus thuringiensis* KFRI-2(이하Bt KFRI-2, 본 균주는 본 과제 신청시에 사용하였던 *Bacillus thuringiensis* KSK-1173과 동일한 균주임을 밝혀 둠)를 이용하여 나비목 등 산림해충에 대한 미생물 살충제를 개발·등록 및 산업화합을 그 목적으로 하고 있다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 국내 산림으로부터 분리한 Bt-KFRI-2 균주를 주요 산림해충 방제에 적용하기 위하여 균주의 대량 생산 공정을 확립, 미생물 농약 원제를 효율적으로 생산하는 것을 목표로 최적화된 배양공정을 통하여 생산된 균체를 효율적으로 수확하는 Down-stream 공정의 최적화 연구와 회수된 균체가 우수한 살충력을 유지하고 안전성을 높여주는 최적의 산림해충 방제용 미생물 농약 생산 공

정을 확립하고 시제품을 제작함

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

○ 본 연구결과 인시목 및 모기에 살충성이 강한 국내산 *Bacillus thuringiensis* KFRI-2 균주의 특허 등록으로 미생물 살충제를 개발할 수 있는 기초를 마련하였음

○ Bt KFRI-2 균주의 대량배양배지 소재선발 및 개선, 저비용 고효율 대량배양으로 배지의 선발, Pilot 배양을 통한 대량배양(300L) 체계 립 및 원제를 생산함

○ Bt KFRI-2 균주의 제제화로 필요한 첨가제 및 부가제를 선발하였고 제제의 조성 및 조제공정의 단순화, 제제처방에 따른 물리성 및 약효를 검정함

○ Bt KFRI-2 균주의 대용량 발효조에서의 배양공정을 최적화하였으며 시제품 제적 및 생산 공정을 확립하고 해충에 대한 야외 실증시험을 실시하였으므로 효과가 인정된 해충방제용으로 산업체 기술 이전을 적극 추진, 국내 미생물 농약 산업의 활성화에 기여할 것으로 생각됨

## SUMMARY

Insecticidal activity of *B. thuringiensis* isolate KFRI-2 was higher than *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *aizawai* which were commonly used to control *P. xylostella* and *S. exigua*. The KFRI-2 was also toxic to mosquito and contained *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIC* and *cryID* crystal protein genes which were known to be toxic to forestry pest such as *L. dispar*. Growth pattern, sporulation and crystal protein yield of the KFRI-2 were superior to subsp. *kurstaki* and *aizawai* in 7ℓ fermentation using GYS medium. Optimized medium containing 1% glucose as C-source, 1% yeast as N-source, 0.4% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> as P-source, 0.1% MgSO<sub>4</sub> crucial for sporulation, 0.0025% MnSO<sub>4</sub> and 0.01% CaCl<sub>2</sub> was established. Both sporulation and crystal protein yield of the KFRI-2 were superior to subsp. *kurstaki* in this optimized medium. Various combinations of white carbon, kaoline, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NK-PX250L, NK-PX100, NK-SLS, DA203W and Tioxolex25 were selected to make a primary formulation.

To make formulations of Bt KFRI-2, high cell density culture of *Bacillus thuringiensis* KFRI-2 was conducted in modified intermittent fed-batch culture using pilot scale fermentor 2500L. The maximum cell growth was reached to OD 120 and converted to endo-spore & endotoxin stably. The spore yield was 80% based on the maximum viable cell number. Optimal culture condition temperature, initial pH, inoculum size and the others for the toxin production were 30°C, 7.0, 1.0%v/v, glucose 2%, MgSO<sub>4</sub> 0.1%, Yeast extract 3%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.4%, MnSO<sub>4</sub> 0.007%, CaCl<sub>2</sub> 0.01%, trace sol. 0.1ml, respectively. and then the glucose & yeast was feeding after consume glucose. After the mass culture of Bt with the industrial media system, several formulations designated as F01~F08, were made with various combinations of adjustment, white carbon, Tween 20, NK-DA203W, NK-SLS, STPP, ammonium sulfate, insecticidal plant extract, etc. These formulations showed good physical properties in wetness, suspensibility and particle size. The stability test of the deterioration of toxin along the long period stock in various temperature, all products were very stable in room temp. and 40°C. The efficacy of the formulations was verified against diamondback moth

larvae(*Plutella xylostella*) in laboratory and field test. Among the tested formulations, the best composition of *Bacillus thuringiensis* KFRI-2 WP was white carbon based WP formulation containing of 25% of B.t concentrated liquid, 5% of Tween 20 as surface active agent, 5% of sodium tripolyphosphate as stabilizer, 10% of suncap as encapsulation agent, 5% of sodium lignosulfonate as UV protector, 30% of white carbon as absorbent, and 20% of ammonium sulfate as carrier. Especially, when compared commercial *B. thuringiensis kurstaki* type formulation with BSF-S(F05) & BSF-D(F06), plant extract added with insecticidal activity, in field condition, BSF-S(F05) and BSF-D(F06) formulations showed equivalent or superior effect to commercial *B. thuringiensis kurstaki* type WP formulation. Above showed that mortality of BSF-S, BSF-D formulation with insecticidal plant extract was highly enforced than B.t only formulation by synergistic effect. The mortality of mixed formulation appeared faster and higher at 2 days after application than single treatment. These results showed that insecticidal plant extract to complement the weakness of Bt only formulation, the effect revealed slowly.

Field test with six formulations (F04052801~F04052806) of Bt KFRI-2 were also conducted against *P. xylostella*, *Cx. pipiens pallens* and forest insect pests. F04052803, F04052804 and F04052805 showed high insecticidal activity against *P. xylostella* larvae among 6 formulations of the KFRI-2. Also, all 6 formulations showed stability under the condition of ultra-violet and 37°C heat shock. In a test with *Dendrolimus spectabilis* larvae, F04052803 and F04052804 showed 82% insecticidal activity at a concentration of 500ppm. Good insecticidal activity were revealed in six formulations against *Acantholyda parki* larvae at a concentration of 333ppm. F04052803 and F04052804 showed 100% insecticidal activity against *Hyphantria cunea* larvae 7 days later after treatment at a concentration of 333ppm, and F04052801, F04052803, F04052804 and F04052805 gave 100% insecticidal activity against *Cx. pipiens pallens* larvae at 100ppm. Larvae of *Agelastica coerulea* were very susceptible to F04052803 at 500ppm concentration. Whole formulations did not show phytotoxicity at 2,000ppm. On the base of these results, commercialization of Bt KFRI-2 formulations will be conducted after completion of this project.

This studies were made to optimize the media composition, operational condition of various culture for the  $\delta$ -endotoxin production and commercial *Bacillus thuringiensis* KFRI-2 formulation were carried out. High cell density culture of *Bacillus thuringiensis* KFRI-2 was conducted in modified intermittent fed-batch culture using pilot scale fermentor 2500L. The maximum cell growth was reach to OD 120 and convert to endo-spore & endotoxin stably. The spore yield was 80% based on the maximum viable cell number. Optimal culture condition temperature, initial pH, inoculum size and the others for the toxin production were 30°C, 7.0, 1.0%v/v, glucose 2%, MgSO<sub>4</sub> 0.1%, Yeast extract 3%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.4%, MnSO<sub>4</sub> 0.007%, CaCl<sub>2</sub> 0.01%, trace sol. 0.1ml, respectively. and then the glucose & yeast was feeding after consume glucose.

After the mass culture of Bt with the industrial media system, several formulations designated as F01~F08, were made with various combinations of adjuvants, white carbon, Tween 20, NK-DA203W, NK-SLS, STPP, ammonium sulfate, insecticidal plant extract, etc. These formulations showed good physical properties in wetness, suspensibility and particle size. The stability test of the deterioration of toxin along the long period stock in various temperature, all products were very stable in room temp. and 40°C. The efficacy of the formulations was verified against diamondback moth larvae(*Plutella xylostella*) in laboratory and field test. Among the tested formulations, the best composition of *Bacillus thuringiensis* KFRI-2 WP was white carbon based WP formulation containing of 25% of B.t concentrated liquid, 5% of Tween 20 as surface active agent, 5% of sodium tripolyphosphate as stabilizer, 10% of suncap as encapsulation agent, 5% of sodium lignosulfonate as UV protector, 30% of white carbon as absorbent, and 20% of ammonium sulfate as carrier. Especially, when compared commercial *B. thuringiensis kurstaki* type formulation with BSF-S(F05) & BSF-D(F06), plant extract added with insecticidal activity, in field condition, BSF-S(F05) and BSF-D(F06) formulations showed equivalent or superior effect to commercial *B. thuringiensis kurstaki* type WP formulation.

Above showed that mortality of BSF-S, BSF-D formulation with insecticidal plant extract was highly enforced than B.t only formulation by synergistic effect. The mortality of mixed formulation appeared faster and higher at 2 days after application than single treatment.



These results showed that insecticidal plant extract to complement the weakness of Bt only formulation, the effect revealed slowly.

# CONTENTS

Chapter I . Introduction -----	13
Section 1. Object and importance of research -----	13
Section 2. Contents and extent of research -----	20
Chapter II . Development of microbiological insecticide for forest insect pests control -----	27
Section 1. Introduction -----	27
Section 2. Materials and Methods -----	29
Section 3. Results and Discussion -----	35
Section 4. References -----	94
Section 5. Conclusion-----	96
Summary-----	99
Chapter III. Optimization of culture conditions for endotoxin production and formulation of <i>Bacillus thuringiensis</i> KFRI-2 strain -----	103
Section 1. Introduction -----	103
Section 2. Materials and Methods -----	105
Section 3. Results and Discussion -----	111
Section 4. References -----	153
Section 5. Conclusion-----	154
Summary-----	159

# 목 차

제 1 장. 서 설 -----	13
제 1 절. 연구개발의 목적과 중요성 -----	13
1. 연구개발의 배경과 목적 -----	13
2. 연구개발의 중요성 -----	14
제 2 절. 연구개발의 내용과 범위 -----	20
1. 연구개발의 목표와 내용 -----	20
2. 연차별 연구개발 목표와 내용 -----	21
3. 연구 추진 내용 및 계획 -----	22
제 2 장. 산림해충 방제를 위한 미생물농약 개발 -----	27
제 1 절. 서 언 -----	27
제 2 절. 재료 및 방법 -----	29
1. 사용균주 및 배양 조건 -----	29
2. 위상차현미경 관찰 -----	29
3. OD <sub>600</sub> 및 pH측정 -----	29
4. 포자수 측정 -----	29
5. 내독소 단백질 생산량 측정 -----	30
6. 기초제제의 첨가제 및 부가제 선발 -----	30
7. 제제의 살충성 검정 -----	31
8. 자외선 조건하에서 지효성 검정 -----	31
9. 열처리 조건하에서 지효성 검정 -----	32

10. 제제의 물리성 조사 -----	32
11. 생물검정 및 야외실증 시험 -----	33
제 3 절. 결과 및 고찰 -----	35
1. 균주 특허출원 및 기초 배양 효율검정 -----	35
2. 대량배지 소재 선발 및 개선 -----	42
3. 저비용·고효율 대량배양용 배지 선발 -----	53
4. 소규모 배지(Fememtor) 시험 -----	65
5. 최적의 대량배지 체제 확립 -----	67
6. 기초제제의 첨가제 및 부가제 선발 -----	70
7. 제제의 살충력 검정 -----	75
8. 자외선 조건하에서 지효성 검정 -----	77
9. 열처리 조건하에서 지효성 검정 -----	78
10. 제제의 물리성 조사 -----	79
11. 생물검정 및 야외실증 시험 -----	81
제 4 절. 결 론 -----	94
제 5 절. 참고문헌 -----	96
SUMMARY -----	99

제 3 장. <i>Bacillus thuringiensis</i> KFRI-2 균주의 최적화 대량 조건 및 제제화 -----	103
제 1 절. 서 언 -----	103
제 2 절. 연구 수행방법 -----	105
1. 재료 및 방법 -----	105
가. 당 농도 분석 -----	105
나. 균체 농도 측정 -----	105

다. 생균수 및 포자측정 -----	105
라. 5L jar fermentor에서의 최적화 공정 -----	105
마. 300L 발효조에서 최적화 -----	106
바. 2500L 발효조에서 발효 · 생산공정의 최적화 연구 -----	106
사. 발효후 공정 연구 및 제제화 연구 -----	108
아. 발효후 제제화된 미생물원제단백질 독소분석 -----	109
자. 미생물원제와 제제화에 따른 살충활성 검정 -----	110
차. 제제화된 시제품의 물리성 -----	110
제 3 절. 결과 및 고찰 -----	111
1. 5L jar 발효조에서 배양공정의 최적화 연구 -----	111
2. 300L 발효조에서 최적화 연구 -----	115
3. 2500L 발효조에서 Bt KFRI-2균주 배양공정 최적화연구 -----	117
4. 세포 수거 및 농축방식에 따른 toxin 함량 및 살충력 비교 -----	125
5. Bt KFRI-2 원제의 최적화 제제 방안 검토 -----	128
6. 제제화된 시료의 기간에 따른 Bt균의 농도변화 -----	131
7. Bt KFRI-2원제의 제제화 후의 살충 활성시험 -----	133
8. 경제성을 고려한 Bt KFRI-2 원제의 제제화된 시제품 제작 ----	149
제 4 절. 결    론 -----	153
제 5 절. 참고문헌 -----	154
SUMMARY -----	159

# 제 1 장 서 설

## 제 1 절 연구개발의 목적 및 중요성

### 1. 연구개발의 배경 및 목적

유기합성 농약의 획일적이고 무분별한 대량살포로 인하여 환경오염, 잔류독성 및 저항성 해충의 출현 등 심각한 사회문제가 대두되고 있는 실정이다. 이와 더불어 전세계 유기합성 농약 시장은 현재 약 30조원에 달할 것으로 추산되고 있으며, 그 중 살충제는 약 8조 7,000억원을 차지하고 매년 평균 5.4%의 매출 신장율을 나타내므로써, 인류의 보건 복지 및 환경 보전을 위하여 유기합성 살충제를 대체할 수 있는 새로운 무공해 살충제 개발이 시급히 요청되고 있는 실정이다. 화학적 방제법의 보완 또는 해결책으로서 이미 미국을 비롯한 선진국에서는 수십종의 미생물 살충제가 연구·개발되어 시판되고 있으며, 우리나라에서는 10여개 농약회사들이 이들 미생물살충제를 수입·시판하고 있으며, 그 수입량 또한 계속 증가추세에 있다. 그러나, 우리나라에서는 무공해 미생물농약 분야에 대한 연구가 극히 부진한 실정이므로, 해충을 무공해 적으로 방제할 수 있는 미생물 살충제의 개발이 절실히 요청되고 있다.

또한, 산림 해충 방제 대상에 있어서 외국에서의 문제 해충과 국내 해충이 다르므로, 국내 자원 특히 산림으로부터 목적해충에 대해 강한 살충력을 갖는 곤충병원 미생물을 분리하여 자체 개발하는 것이 바람직하다고 생각되며, 선진각국의 물질 자원 보호책의 심각한 현실을 고려할 때, 국내의 유용자원과 기술을 이용하여 국내 환경과 목적 해충을 대상으로 특허권을 획득할 수 있는 연구개발이 요구되어진다. 현재까지 국내에서의 미생물 살충제에 대한 연구는 기초 연구와 그의 파생적인 제제화 연구까지 소규모 적으로 이루어지고 있었으나, 이는 그 결과를 크게 기대할 수 없는 실정이므로 산업화에 명확한 목표를 둔 집중적인 연구

투자가 필요할 것이다. 따라서 본 연구에서는 유효 곤충병원 미생물인 *Bacillus thuringiensis* (이하 Bt)를 이용하여 나비목의 산림 해충에 대한 미생물 살충제를 개발·등록 및 산업화 함을 그 목표로 하고 있다.

## 2. 연구개발의 중요성

### 1) 연구개발의 필요성

#### (1) 기술적 측면

- 산림 해충 중 나방류는 나비목 해충에 대해 화학 살충제의 방제를 대체하고 있는 Bt에 의해 대부분 방제가 가능할 것으로 생각되며 대표적인 해충인 미국흰불나방(*Hyphantria cunea*), 매미나방(*Lymantria dispar*), 솔나방(*Dendrolimus spectabilis*) 등에는 이미 독성효과가 검증되어 있는 Bt 균주가 보고되고 있음.
- 미생물 살충제 중에서 가장 널리 활용되고 있으며, 특히 나비목 해충에 독성이 강한 Bt는 그람 양성균의 토양 세균으로 전세계적으로 계속해서 새로운 균주가 분리되고 있으며, 이를 원제로 하는 Bt 살충제는 유전공학적 기술을 활용하여 숙주범위의 확대와 살충력을 강화함으로써 여러 형태의 새로운 살충제를 개발할 수 있어, 국내 나방류 산림해충에 대한 가장 안전하고 효율적인 방제법으로 개발 가능성이 높음.
- 국내에서는 미생물 살충제 개발을 위한 지속적인 투자와 활발한 연구가 미진하여, 산업화할 수 있는 Bt 균주의 분리 및 확보가 되어 있음에도 불구하고 대량배양을 통한 제제화와 실용화로 이어지지 못하고 있어, 이에 대한 체계적이면서 경제적인 기술개발 지원이 절실히 요청됨.

## (2) 경제·산업적 측면

- 산림해충문제의 합리적인 해결은 해충이 산림에 미치는 생태적, 경제적, 사회적 제영향의 평가를 토대로 하여 해충밀도를 일정한 수준이하로 유지 또는 조절하기 위한 각종방제법의 종합적인 이용을 바탕으로 하여야 하며 곤충병원성 미생물을 이용한 생물적 방제법의 개발 및 사용은 이에 필수적으로 이루어져야 함.
- 산림해충방제가 대부분 유기합성 농약의 처리에 의해 이루어지고 있으나 그 부작용으로 사용량이 줄어드는 반면 미생물 농약은 그 생산 및 소비 비율이 지속적으로 증가하여 2,000년대까지 전체 농약시장의 30%까지 차지하여 약 4조 2,000억 - 5조 6,000억원에 달할 것으로 기대되고 있기 때문에, 미생물 살충제의 수요도 이에 따라 크게 증가할 것으로 추측됨.
- 산림 해충 중 나비목 해충의 방제가 Bt제의 이용으로 유용하게 이루어질 수 있음에도 불구하고 이에 대한 대량배양연구 및 제제의 개발 연구가 미진하며 그 사용이 소폭, 제한적으로 사용되는 문제를 안고 있음으로 이를 극복하기 위한 국내 유용 Bt 균주의 산림해충에 대한 미생물적 방제연구가 시급한 실정임.

## (3) 사회·문화적 측면

- 국내 농약사용량은 OECD회원국 중 일본에 이어 4위이며 OECD 평균사용량의 4.6배, 농약최소사용국인 뉴질랜드의 48배로 농약을 과다 사용하고 있음.
- '92 Rio 환경회의에서는 현재의 유기합성 농약의 사용량을 2004년까지 50% 감소시키자는 국가간의 협약을 체결한 바 있으며 '97년 현재 미국에서는 기존



유기합성 살충제의 46%가 대체 농약으로 전환중임.

- 사유림이 전체 산림의 72%를 차지하고 있는 국내의 실정에서 산림해충방제는 주로 정부 주도하에 이루어지는데 한정된 예산과 인력으로 대부분이 화학 살충제 일변도의 방제가 이루어지고 있음.
- 국내에서도 배추좀나방 등의 방제를 위해 무공해 미생물 살충제인 Bt 제제를 수입하여 사용하고 있으며 국민들의 건강과 환경 보전 의식 제고로 인해 그 수요가 점점 확대될 것으로 예상됨.

## 2) 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

### (1) 국내 기술현황

- 산림해충의 미생물적 방제연구는 1990년대에 들어 솔잎혹파리를 방제하기 위한 곤충병원성 곰팡이에 대하여 KIST를 비롯한 연구소 및 몇 개의 대학에서 미생물 농약을 개발하기 위한 기초 연구와 미생물 배양조건 및 기술 체계에 관한 연구가 어느 정도 진행되었으나, 산림해충을 대상으로 한 Bt의 연구는 미진한 실정임.
- 임업연구원과 서울대학교 곤충병리·유전공학연구실에서는 무공해 미생물 살충제의 개발연구로써 토양, 저곡창고 등 국내 자연환경으로부터 새롭고 유효한 Bt 균주를 다수 분리 확보하고 있으며 또한 산림자원으로부터 170여종의 Bt 균주를 분리하였으며, 생물검정을 통하여 유효 병원성 균주를 선발, 확보하고 있음. 그리고 국내산 Bt살충제 산업화연구를 수행한 경험을 축적하고 있어 개발가능성이 높음.
- 그 중 Bt KFRI-2으로 명명된 Bt 균주는 기존의 Bt균주들이 형성하는 내독소

단백질보다는 다소 큰 크기의 내독소단백질을 형성하는 특이한 균주로서 나비목 및 파리목에 이중 독성을 가지는 균주임. 나비목 해충인 배추좀나방 방제를 위해 사용되는 Bt subsp. *kurstaki*와 파밤나방 방제를 위해 주로 사용되는 Bt subsp. *aizawai*에 비하여 배추좀나방 및 파밤나방에 대하여 각각 뛰어난 살충효과를 나타내는 균주임.

- 1차년도에는 Bt KFRI-2로 명명된 Bt 균주의 특허출원과 pilot plant scale에서의 균 배양공정과 제제화 기초연구를 수행하여 원제를 생산하였으며, 이 제제를 이용하여 흰불나방에 대한 생물검정을 실시한 결과 우수한 살충효과를 나타냄.

## (2) 국외 기술현황

- 전 세계적으로 미생물 농약을 제제화하여 등록된 것은 66종에 이르고 있고, 이들 중 살충제로 등록된 제제는 약 40 종정도임. 이들 미생물 살충제 중 세균 살충제는 Bt 제제가 대부분을 차지하고 있으며 14개 국가에서 연간 800만 파운드 정도를 생산 시판하고 있으며 곰팡이 살충제의 경우 11개사에서 18제 품을 판매중임.
- 미국은 이미 1960년도부터 최초로 Bt제제의 상업화를 시작하여, 현재 Mycogen, IRRI 연구소를 중심으로 새로운 Bt균주의 분리 연구와 유전공학적 방법을 통한 신기능 Bt균주 개발에 힘을 기울여 1992년 현재 약 20여종의 Bt 균주를 특허 등록하고 있음. 또한 Bt의 결정성 살충 독소단백질 유전자를 식물에 도입하여 내충성 작물 생산에 성공하여 FDA 승인과 상품화 준비에 치중하고 있음. 일본은 1980년대부터 무공해 농약개발에 집중적으로 투자한 결과, 1992년 미생물 살충제가 12종이 등록되어 곧 실용화될 것으로 예상됨.
- 선진국의 경우 자국의 산림보호와 화학 살충제에 의한 해충 저항성문제 극복

을 위해 곰팡이 살충제와 Bt제를 적극 활용하는 실정임.

### 3) 앞으로의 전망

- Bt 제제는 살충효과가 뛰어나고 동시에 환경 보전적 살충제이기 때문에 다른 농약에 비해 그 사용량이 지속적으로 증가할 것으로 전망됨. Bt 독소유전자의 재조합 및 형질전환 방법으로 숙주범위가 넓고 병원성이 보다 강화된 새로운 균주의 개발이 지속적으로 수행될 것임.
- 현재 국내 여러 농약회사 (한농, 경농, 미성, 동방, 전진, 동양 등)에서 이미 외국에서 상품화되어 있는 미생물 살충제를 수입하여 시판하고 있는 점을 고려할 때 산림병해충에 대한 미생물 농약의 국내 개발이 시급한 실정이라 할 수 있겠으며, 이는 수입 대체효과 및 안정적인 산림환경 조성에도 크게 기여할 것임.
- 국토의 대부분이 산림으로 이루어진 국내 사정을 고려할 때 자연으로부터 분리된 미생물농약의 사용은 장기적인 방제효과를 기대할 수 있으며, 이와 더불어 환경친화적 방제기술의 개발이 다각도로 모색되어야함.

### 4). 기술도입의 타당성

- 산림병해충 방제 대상에 있어서 외국에서의 문제 해충과 국내 해충이 다르므로, 국내 자원 특히 산림으로부터 목적 해충에 대해 높은 방제효과를 갖는 병원 미생물을 분리하여 자체 개발하는 것이 바람직하다고 생각됨.
- 선진 각국의 물질 자원 보호책의 심각한 현실을 고려할 때, 국내의 유용자원과 기술을 이용하여 특허권을 획득할 수 있는 연구개발이 요구되어짐.
- 연구개발 2차년도에는 미생물 농약을 대량생산 판매하고 있는 다국적기업

Syngenta의 연구소(영국 런던 소재)를 방문하여 Bt살충제 개발 전문가(Dr. Fredrick Borer) 면담과 원제 생산시설을 견학하여 본 연구과제의 조기 산업화에 기여코자 함.

## 제 2 절 연구개발의 내용 및 범위

### 1. 연구개발의 목표와 내용

국내 산림으로부터 분리한 Bt KFRI-2 균주를 주요 산림해충 방제에 적용하기 위하여 균주의 대량생산 공정을 확립, 미생물농약 원제를 효율적으로 생산하는 것을 목표로 한다. 그리고 최적화된 배양 공정을 통하여 생산된 균체를 효율적으로 수확하는 Down-stream 공정의 최적화연구와 회수된 균체가 우수한 살충력을 유지하고 안정성을 높여주는 제제화 연구를 통하여 최적의 산림해충 방제용 미생물농약 생산 공정을 확립한다.

## 2. 연차별 연구개발 목표와 내용

구 분	연 구 개 발 목 표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2001)	대량배양 체계확립 및 균주 제제화 기초연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Bt KFRI-2 균주의 특허출원</li> <li>○ 대량배양배지 소재선발 및 개선</li> <li>○ 저비용 고효율 대량배양용 배지 개발</li> <li>○ 소규모 배양(Flask &amp; Fermentor) 시험</li> <li>○ Pilot 배양을 통한 대량배양(300L) 체계확립 및 원제생산</li> <li>○ 산림해충에 대한 생물검정</li> </ul>
2차 년도 (2002)	균주 배양공정의 최적화 및 제제화	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 제제화에 필요한 첨가제 및 부가제 선발</li> <li>○ 제제의 조성 및 조제공정의 단순화</li> <li>○ 제제처방에 따른 물리성 및 약효검정</li> <li>○ 대용량 발효조에서의 배양공정 최적화</li> <li>○ 생물검정 및 타곤충에 대한 영향조사</li> </ul>
3차 년도 (2003)	시제품 제작·평가, 제제화 생산공정 및 야외실증시험	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 시제품제작 및 생산공정 확립</li> <li>○ 안정성평가 및 약해시험</li> <li>○ 야외실증시험</li> <li>○ 제제의 효율성 제고</li> <li>○ 산업체 기술이전 추진</li> </ul>

### 3. 연구추진 내용 및 계획

#### 1) 연구추진 전략

- Bt 살충제 개발을 위한 Bt KFRI-2 균주의 대량배양 공정 연구는 임업연구원과 서울대학교 곤충병리·유전공학 연구실에서 수행되어지며, 수년간 국산 Bt 살충제 산업화연구를 수행한 경험을 바탕으로 균주 특성에 따른 효율적인 대량배양조건과 산림 살포용 제제처방을 위한 원제생산 기술을 확립함.
- 제형개발 및 시제품 제작은 (주)비아이지와 공동으로 수행하며 약효검정은 임업연구원의 주도하에 이루어지며 시제품의 약효 및 안정성 검증이 이루어지면 제반기술을 산업체에 이전하여 상업화를 달성함.

#### 2) 연구개발 내용

##### (1) 균주 특허출원 및 대량배양체계 확립

- Bt KFRI-2 균주의 특허출원  
이미 확보되어 있는 Bt KFRI-2 균주의 특성 및 산림해충에 대한 독성 검정 등의 자료를 기초로 하여 균주에 대한 특허를 출원하였음(2001-13759호).
- 대량배양배지소재 선발 및 개선  
균주마다 고효율의 배지조성이 다른 것으로 알려져 있으므로 대량배양에 적합한 배지소재를 선발하여 배양실험을 수행하며 소재의 적합성 여부를 검정함.
- 저비용 고효율 대량배양용 배지 개발  
생산비 절감을 위하여 선발된 배지소재에 부가적으로 미량원소의 조절을 통한 고효율의 배지조성을 선발함.

- 소규모 배양 (Flask & Fermentor) 시험

선발된 배지를 대상으로 하여 대량배양 이전단계인 소규모 fermentor를 이용한 배양실험을 수행하여 이에 따라 배지조성을 개선하고 적합한 배양조건을 결정하며, 대량 배양 시 야기될 문제점을 분석함.

- Pilot 배양을 통한 대량배양체계 확립 및 원제생산

실제 생산에 적합성을 검정하기 위하여 pilot 규모의 배양을 통하여 배양성능을 검정하며 대량배양 체계를 확립, 제제화 실험에 필요한 원제를 생산함.

(2) 제제화 시험

- 제제화에 필요한 첨가제 및 부가제 선발

미생물농약 원제의 적정 농도 설정 및 자외선 차단제, 전착제, 증량제 등 첨가제와 부가제를 선발하여 경제적인 조성을 개발함.

- 제제의 조성 및 조제 공정의 단순화

다양한 조성연구를 통하여 제제조성을 결정하며 생산 공정의 용이함과 비용 절감 효과를 얻기 위한 최소 조제 단계를 확립하기 위하여 조제 공정의 단순화 연구를 수행함.

- 제제처방에 따른 물리성 및 약효검정

제제처방에 따른 제제의 물리성을 검정하고 실내생물검정을 통하여 약효를 최종적으로 검사하여 원제의 성능과 안정성이 유지되는지를 검사함.

- 조제공정의 확립

연구·개발된 제제 처방과 조제 방법에 따라 제제화하며, 공정상의 문제점과 개선점을 분석하여 최종 조제공정을 확립함.



### (3) 시제품제작·평가 및 야외 실증시험

#### ○ 시제품제작

실제 미생물농약의 시제품을 시판 시 고려되어야 하는 활성, 운송, 보관, 관리 등의 측면에서 야기될 수 있는 요소를 연구 분석하여 시제품을 제작함.

#### ○ 안정성평가 및 약해시험

시제품의 실제 야외적용 시 발생할 수 있는 안정성 및 약해에 대한 평가를 수행함.

#### ○ 야외실증시험

시제품을 야외의 산림에 직접 적용하여 방제 효율 및 잔류효과 등을 검정함.

#### ○ 제제의 효율성 제고

제제의 포장 실증 시험과 약효 및 안정성 검정 결과를 토대로 생물농약에서 야기될 수 있는 불활성화 등의 문제점 분석 및 효과 검정으로 미생물살충제로서의 효율성을 제고함.

#### ○ 산업체 기술이전 추진

공동연구로 추진한 중소기업체나 국내 농약회사에 개발된 제반기술을 이전하여 산업화함으로써 제품화함.

주 관 연 구 과 제

BT 살충제 개발

총괄연구책임자 : 국립산림과학원 신 상 철



## 제 2 장 산림해충 방제를 위한 환경친화적

### 미생물 살충제 개발

#### 제 1 절 서언

지난 수십 년 동안 유기합성 농약의 무분별한 사용으로 인하여 심각한 환경 오염을 초래하면서 생태계의 파괴, 농약에 대한 곤충의 내성증가 등 많은 문제점들을 불러일으키게 되었다. 이러한 문제들을 해결하기 위하여 환경에 안전하고 인축에 무해한 미생물살충제의 개발과 이용이 이미 많은 선진국에서 시도되고 있다. 지금까지 개발된 생물농약 중에서 Bt는 미생물살충제로서 대표적인 것으로 전 세계적으로 널리 사용되고 있다. 포자형성 시기에 곤충에 강한 독성을 보이는 내독소 단백질을 생산하는 Bt는 오래전부터 그 유효성이 인정되었고 많은 조사와 연구가 이루어져 농업해충 및 위생해충의 방제를 위한 무공해 미생물 제제로서 세계의 많은 나라에서 널리 사용되어져 왔으며, 그 사용이 계속적으로 증대되고 있다. 실제로 미생물을 이용한 해충의 방제 전략에 가장 성공적인 평가를 얻고 있는 Bt는 미국에서 1960년 Bt 제제가 잠정적으로 시판되기 시작한 이래 근간에 이르러서는 연간 생산량이 800-1,000만 파운드 정도로 추정되며, 전체 시장 규모는 92년도에 약 2억불 규모로 매년 10% 정도씩 증가되고 있는 추세이다. 이러한 Bt를 이용한 미생물살충제의 개발을 위해 지금까지 수많은 Bt가 분리, 동정되었고 Bt가 생산하는 내독소 단백질의 형태, 독성의 정도와 범위, 독성 기작 등 다양한 연구가 이루어졌다. 특히 주요 농업해충, 산림해충, 저곡해충 및 위생해충에 독성이 있는 새로운 균주의 분리 연구가 추진되고 있으며, Mycogen (미국)의 경우 세계 57개국으로부터 토양시료를 채취하여 새로운 Bt를 분리 동정하고 있고, IRRI (필리핀)에서도 3,000종 이상의 Bt 균주를 확보하여, 이용범위 확대에 대한 연구가 진행되고 있다.

근래에는 Bt 내독소 단백질에 저항성을 갖는 해충의 출현이 보고됨에 따라 독성범위가 넓어지고 독성이 증대된 새로운 Bt를 분리하기 위해서 새로운 Bt의 탐색과 분리와 함께 유전공학적으로 이러한 특성을 갖도록 재조합되어 환경에 안정적인 새로운 Bt의 개발에 관한 연구도 활발히 진행되고 있으며, 우리나라에서도 1989년에 Bt 제제가 도입된 이래 매년 그 사용량이 증가하고 있는 추세이다. 아직은 생물농약에 대한 인식의 부족과 가격 경쟁력에서 열세에 있기 때문에 Bt 제제가 국내의 전체 살충제 시장에서 1.1% (38억 원, 1995년 기준)의 낮은 시

장 점유율을 차지하고 있으나, 국내에서도 이에 대한 수요가 높아짐에 따라 관련 연구가 시급한 실정이다. 이를 위하여 본 실험실에서는 양잠농가와 저곡창고, 시설 원예 단지, 과수원, 논, 밭, 산림 등의 다양한 분리지역에서 통양과 먼지 시료를 채집하였으며 이로부터 다양한 Bt를 분리하였다. 양잠농가는 누에가 사육되는 장소로서, 토양은 미생물의 보고로서 또한 저곡창고는 야외에서 해충에 노출되어 자라 저장 작물들이 오랫동안 보관되는 장소의 특성상 Bt가 분포하기에 적당한 장소로 간주되어, 이 지역을 대상으로 Bt를 분리하여 그 분포와 특성을 조사하고 나아가서 높은 독성을 보이거나 숙주 범위가 넓어진 새로운 Bt 균주들을 확보하였다. 그 중 KFRI-2으로 명명된 Bt 균주는 나비목 해충인 배추좀나방과 과밤나방의 방제를 위해 이용되고 있는 Bt subsp. *kurstaki*와 subsp. *aizawai*에 비하여 뛰어난 살충효과를 나타내었으며, 산림해충인 매미나방과 솔나방에 대해서 독성이 높은 내독소 단백질 유전자로 알려진 *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1C*, *cry1D*등을 가지고 있고, 위생 해충인 모기에 대해서도 독성을 보이는 이중 독성 균주로서 산림 해충의 방제를 위한 제품화 도입이 가능할 것으로 기대되었다. 또한, Bt KFRI-2은 subsp. *kurstaki*에 속하는 균주이나 내독소단백질을 발현하는 유전자형에서는 subsp. *aizawai*와 유사하여 기존의 subsp. *kurstaki* 균주에 나타나던 해충의 저항성을 억제할 수 있을 것으로 기대되며, 내독소단백질 생산효율에 있어서도 subsp. *kurstaki* 균주와 유사하여 subsp. *aizawai* 균주의 문제점인 낮은 생산율을 극복할 수 있을 것으로 예상되었다. 따라서 본 실험에서는 나비목과 파리목에 이중 독성을 갖는 새로운 분리 균주 KFRI-2을 원제로 하여 대량배양을 위한 경제적 배지 소재와 조건을 확립하였다. 더 나아가 이 배지를 이용하여 미생물 농약을 제제화 하였으며, 그 효력을 실내시험, 온실시험 그리고 야외시험을 통하여 조사하고자 하였다.

## 제 2 절 재료 및 방법

### 1. 사용 균주 및 배양조건

*Bacillus thuringiensis* (이하 Bt) KFRI-2 균주의 배양성상을 확인하기 위하여 이 균주와 동일 유전자형을 가지는 다른 아종 균주인 Bt subsp. *aizawai* (이하 *aizawai*)와 분류상 동일 아종에 속하는 Bt subsp. *kurstaki* (이하 *kurstaki*) 균주를 대조균주로 사용하였다.

접종원으로 사용된 Bt 배양액은 LB 액체배지 (yeast 0.5%, trypsin 1%, NaCl 1%)를 이용하여 250 rpm, 28 °C에서 16시간 1차 배양한 다음  $1 \times 10^9$  포자 농도로 맞추어 2차 접종원으로 하였다. Bt의 flask 배양실험에서는 위와 동일 배양조건 하에서 250 ml 배양용 삼각 플라스크에 50 ml을 배양하고 sporulation 및 autolysis를 확인한 후 수거하여 이후 분석을 수행하였다.

### 2. 위상차 현미경 관찰

Bt의 성장상태 및 sporulation과 autolysis를 관찰하기 위하여 배양액을 위상차 현미경 (Nikon Type 104, 일본) 1,000배의 배율에서 관찰하였다.

### 3. OD<sub>600</sub> 및 pH 측정

flask 배양의 경우 Bt 배양액 1 ml을 취하여 OD<sub>600</sub> 0.1-0.9 값의 범위에서 동일비율로 희석하여 흡광도를 측정하였고 배양액 1 ml을 3차 증류수로 5배 희석한 다음 pH 값을 측정하였다. fermentor 배양에 있어서는 배양액 자체의 OD<sub>600</sub> 과 pH를 측정하였다.

### 4. 포자수 측정

Bt 배양액 100  $\mu$ l를 취하여 900  $\mu$ l의 멸균된 3차 증류수를 섞어 vortexing (30초)과 inverting (20번)을 통하여 충분히 혼합한 후  $1 \times 10^{-1}$ 부터  $1 \times 10^{-8}$ 까지 1/10씩 희석하였다. 그중  $1 \times 10^{-6}$ 부터  $1 \times 10^{-8}$  까지의 희석액에서 각각 100  $\mu$ l씩 취하여 nutrient agar 배지에 3반복으로 도말하여 28°C, 12시간 동안 배양한 다음, 형성된 colony 수를 측정하여 Bt 배양액의 포자수를 확인하였다.

## 5. 내독소 단백질 생산량 측정

Bt의 내독소단백질 생산효율을 알아보기 위하여 Bt 배양액을 전기영동한 후 gel analysis system을 이용하여 분석하였다. 준비된 시료 일정량에 5 X sample buffer [0.625 M Tris-HCl (pH 6.8), 25% glycerol, 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanal, 0.1% bromophenol blue]를 넣어 충분히 혼합시키고 100 ℃에서 7분 동안 가열하였다. 그 용액을 15,000 rpm에서 10분 동안 원심분리 하여 상청액을 회수하고 이를 10% separating gel에 100 V, 2시간 동안 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 후 젤은 0.1% Coomassie brilliant blue (Sigma Co., 미국) 용액에 30분간 염색하고 탈색 용액 (10% methanol, 10% acetic acid)으로 1시간 동안 탈색하였다.

단백질 정량 분석을 위해 단백질 양이 알려져 있는 Perfect Protein™ Marker (Novagen Co., 독일)를 사용하였다. 전기영동한 gel은 Kodak 1D gel analysis system (미국)을 이용하여 분석하였다.

## 6. 기초제제의 첨가제 및 부가제 선발

Bt KFRI-2균주의 기초제제를 만들가 위하여 첨가제로는 현수성이 강한 NK-NX250L, NK-SLS, MK-PX 100, DA203W등과 수화성이 강한 부제로서 White Carbon, Kaoline, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CaCO<sub>3</sub>를 Technical powder 50%에 혼합하여 3가지의 유형(표 1.)으로 조제 하였고 각 제제별로 현수성 및 수화성을 조사하였으며 배추좀나방에 대하여 생물검정을 실시하였다.

Table 1. Formulation composition on 3 type wettable powders of *Bacillus thuringiensis* KFRI-2 strain

Component	Formulation Composition					
	Type I		Type II		Type III	
Technical powder	50%		50%		50%	
Carrier (Filler)	White Carbon Kaoline	15% 25%	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	40%	CaCO <sub>3</sub>	40%
Surfactant	NK-NX 250L MK-PX 100	8% 2%	NK-SLS DA203W	5% 5%	NK-SLS NK-PX100	8% 2%

## 7. 제제의 살충력 검정

제제의 살충력 조사는 잎 침지법을 이용하여 수행하였다. 각 제제 1 g를 10 ml의 증류수에 현탁하고 각각 20,000 배와 40,000 배로 희석한 다음 배추잎을 2-3분간 침지시키고 음건한 후, 배추잎을 petri-dish에 넣고 배추좀나방 3령 유충을 처리구 당 10마리씩 접종하여 25 °C에서 2일간 치사율을 조사하였다. 대조구로는 원제와 증류수를 사용하여 그 약효를 비교하였다.

## 8. 자외선 조건하에서 지효성 검정

각 제제 20,000 배 희석액을 배추잎에 2-3분 침지한 다음 자외선 조건하에서 각각 60분, 30분, 10분 처리하여 음건한 후, 배추잎을 petri-dish에 넣고 배추좀나방 3령 유충을 처리구 당 10마리씩 접종하여 25 °C에서 2일간 치사율을 조사하였다. 대조구로는 자외선을 처리하지 않은 제제 희석액과 증류수를 사용하여 그 약효를 비교하였다.



## 9. 열처리 조건하에서 지효성 검정

각 제제 20,000 배 희석액을 배추잎에 2-3분 침지한 다음 37 °C 온도 조건하에서 각각 60분, 30분, 10분 처리하여 음건하였다. 그 후 배추잎을 petri-dish에 넣고 배추좀나방 3령 유충을 처리구 당 10마리씩 접종하여 25 °C에서 2일간 치사율을 조사하였다. 대조구로는 37 °C에서 처리하지 않은 제제 희석액과 증류수를 사용하여 그 약효를 비교하였다.

## 10. 제제의 물리성 조사

제조한 Bt 제제의 수소이온농도 (pH), 평균입경, 수화성, 현수성 및 분말도의 물리성을 조사하였다. pH 측정은 10분 이상 가열하여 15 °C로 냉각한 증류수 100ml에 5g의 제제를 첨가하여 진탕하면서 pH meter를 사용하여 측정하였으며, 평균입경은 적당량의 제제를 증류수에 희석하여 충분히 분산시킨 후 입도측정기를 사용하여 측정하였다.

수화성을 조사하기 위해서는 500ml 비이커에 3도 경도수 300ml을 넣고 수면에 유동이 없을때 수면으로부터 10cm 높이에서 덩어리가 지지 않은 제제 5g을 일시에 떨어뜨리고, 제제를 떨어뜨릴 때로부터 저어서 완전히 가라앉는 시간을 측정하였으며, 수표면에 미세입자의 피막형태로 남아있는 것은 무시하였다.

제제의 현수성은 침전현수율을 조사하였으며, 시료 1,000g을 정평하여 100ml 비이커에 담고 3도 경도수 50ml을 붓고 잘 분산시킨 후 250ml 마개달린 메스실린더에 옮겨 붓고 3도 경도수로 용량을 맞춘 후 1분간 상하 180도로 30회 도립하고 30분간 정치하였다. 30초 내에 바닥층 으로부터 25ml이 남을 때까지 상부로부터 흡입하여 뽑아내고 남은 부분은 filter paper No. 6를 이용하여 중력 하에서 여과하고 105 ± 2 °C에서 1시간 동안 건조시킨 후 데시케이터에서 20분간 냉각하고 평량하여 침전현수율을 구하였다.

습식법을 이용한 제제의 분말도는 제제 20g을 수돗물 200ml이 담긴 400ml 비이커에 유리막대로 잘 저어서 고르게 분산시킨 후 분산액을 표준체 (325 메쉬)에

옹기고 고무관을 통하여 물을 소량씩 가하면서 표준체를 수평으로 흔들어 제제 시료를 통과시켰다. 유출되는 물에 시료가 거의 나오지 않을 때까지 시료를 통과 시킨 후 표준체상의 잔사를 비이커에 씻어 옹기고 잠시 정치하여 상등액을 버린 후 건조시키고 잔사무게를 평량하여 통과량을 백분율로 산출하여 통과율을 구하였다.

## 11. 생물검정 및 야외실증시험

### 1) 솔나방유충에 대한 Bt K-2균주의 Technical Powder에 의한 생물검정

본과제의 협동연구기관인 (주)비아이지에서 Working Volume 300ℓ의 용량에서 배양한 Bt k-2균의 생산물(포자밀도 g당  $1 \times 10^{11}$ cfu)을 갖고 물에 희석하여 솔나방의 유충 식이물인 소나무의 잎에 살포한후 망대(40×70cm)에 10마리씩의 솔나방 유충을 넣은후 소나무가지에 씌워서 매은후 7일후와 15일후의 생사충수를 조사하였다.

### 2) 야외실증시험

#### ① 솔나방에 대한 신개발 Bt제의 살충검정 시험

솔나방 피해지인 북제주군에서 솔나방 4~5령 유충을 해송가지에 접종한 후 먹이가 충분하도록 망사케이지를 씌우고 F01, F02, F03, F04를 500, 1,000, 1,500, 2,000, 3,000배액으로 희석하여 5m<sup>2</sup>당 500ml 희석액을 배부식 분무기를 이용하여 고르게 수관살포하였다. 시험규모는 각 처리구당 10마리×3반복으로 하였으며 약제처리 15일후까지 매일 생·사충수를 조사하여 살충효과를 분석하였다.

#### ② 잣나무넓적잎벌에 대한 신개발 Bt제의 살충검정 시험

잣나무넓적잎벌 피해지인 강원 춘천에서 성충우화최성기를 10일 경과하여 유충이 신초에 집을 짓고 새로 나온 침엽을 가해중인 시기에 가지를 절단하여 실험실내로 옹긴 후 수삽하였다. 수삽한 잣나무 가지에 공시충인 잣나무넓적잎벌 유충을 처리당 10마리×3반복으로 접종하고 F01, F02, F03, F04, F05, F06를 500, 1,000, 1,500, 2,000, 3,000배액으로 희석하여 5m<sup>2</sup>당 500ml의 약량으로 배부식 분무기를 이용하여 고르게 살포하였다. 살충효과조사를 위하여 약제처리 후 매일 생·사충수를 조사하였다.

#### ③ 미국흰불나방에 대한 신개발 Bt제의 살충검정 시험

미국흰불나방은 거의 모든 활엽수종을 가해하는 기주 범위가 매우 넓은 해충이다. 따라서, 산림과학원내 수목원에서 선호할 것으로 판단되는 10여종의 먹이식물을 선택하여 미국흰불나방 유충이 가장 선호하는 뽕잎피나무를 공시목으로 선발하고 F01, F02, F03, F04, F05, F06를 500, 1,000, 1,500, 2,000, 3,000배액으로 희석하여 처리하였다. 약제처리한 기주식물을 마르지 않도록 습식처리한 곤충사육통(플라스틱, Ø75×H84mm)에 넣고 야외에서 아직 분산되지 않은 미국흰불나방의 어린 유충을 채집하여 처리당 10마리×3반복으로 접종하고 살충효과조사를 위하여 약제처리 후 매일 생·사충수를 조사하였다.

#### ④ 모기에 대한 BT제의 살충검정 시험

##### - 대상해충

실험에 사용한 모기는 빨간집모기(*Culex pipiens pallens*)였다. 이들은 국립보건원에서 분양받아 실험에 사용하였다. 성충 모기는 10% 설탕물과 살아있는 쥐의 피를 흡혈시켜 사육하였으며 유충은 플라스틱바트(24 cm × 35 cm × 5 cm)에 40mesh chick chow powder와 yeast를 8/2 비율로 섞은 먹이를 이용하여 사육하였다. 사육조건은  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , 상대습도  $80 \pm 10\%$  그리고 명암은 14L:10D의 조건으로 사육하였다. 이들은 살충제 도태를 하지 않은 실험실내 계통이었다.

##### - 살충활성 검정

모기에 대한 살충활성은 Immersion method 방법을 이용하여 살충활성을 조사하였다. 후추의 메탄올 추출물 및 후추에서 분리된 화합물들은 원하는 농도만큼 아세톤에 녹였다. 빨간집모기 3령 유충 20마리를 각각 250ml의 증류수가 들어있는 종이컵(270ml)에 넣어 화합물을 처리한 후 48시간 후에 살충율을 조사하였다.

#### ⑤ 오리나무잎벌레에 대한 살충검정 시험

##### - 대상해충

오리나무잎벌레 유충은 구 서울대학교 농업생명과학대학 캠퍼스에 식재되어있는 물오리나무에서 채집하였다. 채집한 오리나무잎벌레 유충은  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 상대습도  $65 \pm 5\%$ , 명암 16L:8D의 조건으로 사육하였다.

##### - 살충활성검정

오리나무잎벌레 유충에 대한 살충활성은 물오리나무 잎을 cork borer로 오려낸 절단엽 (직경 5cm) 1매를 5,000ppm 공시약액에 10초간 침지한 후 hood에서 통풍 건조시켜 샤레 (9cm)에 옮겼다. 처리잎이 담겨져 있는 샤레에 오리나무잎벌레 유충 10마리씩 접종하고 덮개를 덮은 다음 48시간 후에 사충수를 조사하였다.

## 제 3 절 결과 및 고찰

### 1. 균주 특허출원 및 기초 배양효율 검증

#### 가. Bt KFRI-2 균주의 특허출원

이미 확보되어 있는 Bt KFRI-2 균주의 특성 및 산림해충에 대한 독성 검증 등의 자료를 기초로 하여 균주에 대한 특허를 출원하였다(특허 제 2001-13759 호).

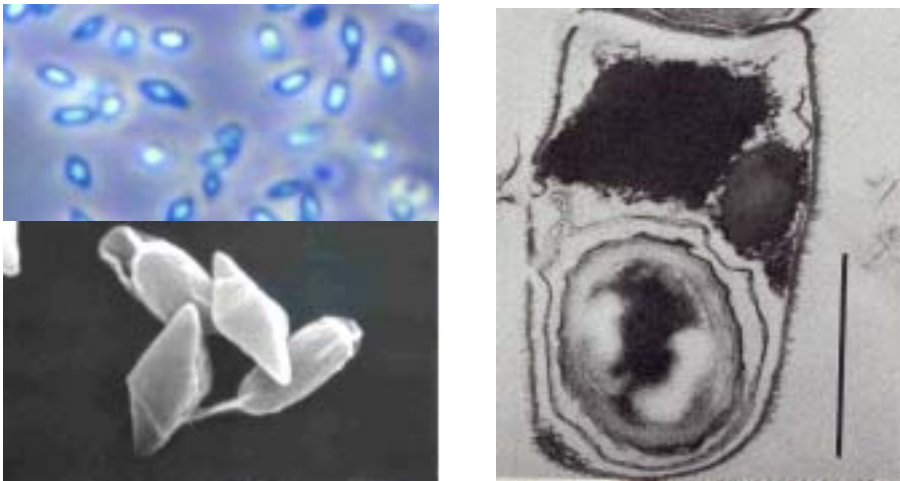


Fig. 1. Sporulation and crystal protein of *Bacillus thuringiensis* KFRI-2 strain

#### 나. Bt KFRI-2 균주와 기존 균주와의 배양효율 비교 재검증

Bt 균주의 포자형성용 배지로 알려진 GYS 배지에서 *aizawai*와 *kurstaki* 균주에 비하여 배양효율이 뒤지지 않는 균주임을 재검증하기 위하여 비교배양실험을 수행하였다(표 1). sporulation 및 autolysis가 완료된 시점인 3일 후에 배양액을 수거하여 포자수를 측정한 결과 Bt KFRI-2 균주의 포자농도는 *aizawai*, *kurstaki* 균주에 비하여 다소 높은 결과를 보였다(표 2). 이로부터 Bt KFRI-2 균주는 *aizawai*와 *kurstaki* 균주에 비하여 배양효율이 대등하거나 우수한 균주임을 확인할 수 있었다. 그러나 분산분석법(ANOVA)에 의해 유의차가 나타나지 않는 수준에서의 차이이므로 대량배양 조건에 가까운 fermentor 수준에서의 배양효율

비교가 필요한 것으로 판단되었다.

Table 2. Comparison of sporulation of *B.thuringiensis* subsp. *aizawai*, *kurstaki* and KFRI-2 in GYS medium

Strain	No. (of $\times 10^7$ CFU/ml)	SD ( $\pm$ )
<i>aizawai</i>	3.9a <sup>§</sup>	2.3
<i>kurstaki</i>	3.6a	2.4
<b>Bt KFRI-2</b>	<b>4.1a</b>	3.0

<sup>§</sup>Duncan test(95% fiducial limit)

#### 다. 7 ℓ fermentor를 이용한 배양효율 비교 실험

균주간의 flask 배양실험상의 배양효율의 차이를 fermentor 수준에서 확인하기 위하여 GYS를 수정한 배지를 이용하여 7 ℓ fermentor (배양; 3 ℓ) 상에서 배양효율을 비교하였다 (표 3).

각 배양상태는 4시간으로 구간을 나누어 OD<sub>600</sub>, pH, DO, sporulation 정도 등을 관찰하였다 (그림 2). 그 결과 *aizawai*, *kurstaki*, KFRI-2 균주 모두 24 시간까지 OD<sub>600</sub> 수치가 증가하여 세포성장기 최고에 이르렀음을 확인하였고 이후 sporulation이 진행되어 그 정도는 32시간에 100%에 이르렀으며, 이 과정 중 pH 값은 최소 6.2에서 최대 8.2까지 변화하였다. 대조 균주들과 비교할 때 KFRI-2 균주가 가장 높은 OD<sub>600</sub> 값을 가져 7 ℓ fermentor 조건에서도 성장이 뛰어난 것을 확인할 수 있었다. 배양 상태 중 3 균주의 시간별 OD<sub>600</sub> 값을 다시 그림 2로 나타내었다.

이상의 배양상태를 통하여 Bt KFRI-2 균주가 다른 균주에 비해 성장이 우수함을 확인할 수 있었으며, 이를 더 확인해 보기 위하여 균주들 간의 포자 농도를 비교하였다 (표 4). Bt KFRI-2 균주는  $1.2 \times 10^9$  CFU/ml 농도의 포자를 생산하여 *kurstaki*와는 Duncan 검정상에서 유의성 있게 차이나는 것으로 알 수 있었으며, *kurstaki*에 비해서는 약 2배, *aizawai*에 약 1.3배 정도 높은 포자 형성율을 나타내어 배양효율이 뛰어난 것을 재확인할 수 있었다.

효율적인 제제화를 위해 Bt 균주 성장에 있어서 포자형성과 더불어 중요한 요소인 내독소단백질의 양을 비교하기 위하여 SDS-PAGE 전기영동 하고 densitometry를 이용하여 130 kDa 주위에 형성되는 밴드를 중심으로 그 내독소단백질의 양을 비교 분석하였다 (그림 4). 동량의 배양액을 채취하여 비교한 결과 *kurstaki* (KUR)을 1로 보았을 때 *aizawai* (AIZ) 균주는 1.6배, KFRI-2 균주는 1.8배로 동량의 배양액내에 포자농도와 마찬가지로 더 많은 양의 내독소단백질이 존재함을 확인할 수 있었다.

이상의 7 ℓ fermentor 비교 배양실험을 통하여 Bt KFRI-2 균주가 *kurstaki* 와 *aizawai* 균주에 비해 포자 형성 및 내독소단백질 생산에 있어서도 효율적인 균주임을 재확인할 수 있었으며, subspecies가 동일한 *kurstaki*에 비해서는 배양 성능이 매우 우수함을 확인하였다.

Table 3. Ingredients of media and culture condition of fermentation of *B. thuringiensis* KFRI-2 strain

Ingredient	GYS (modified, %)	Culture condition	
Glucose	3.0	volume (ℓ)	3
Yeast extract	2.0	pH control	6.2 - 8.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1	- Acid	5N NaOH
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.2	- Alkali	5N HCl
MgSO <sub>4</sub>	0.025	RPM	100 - 500
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.001	V/V/M	0.5
CaCO <sub>3</sub>	0.02	DO control	20% 이상
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.001	Temp.(°C)	30
Antifoamer	0.05	Feeding	-

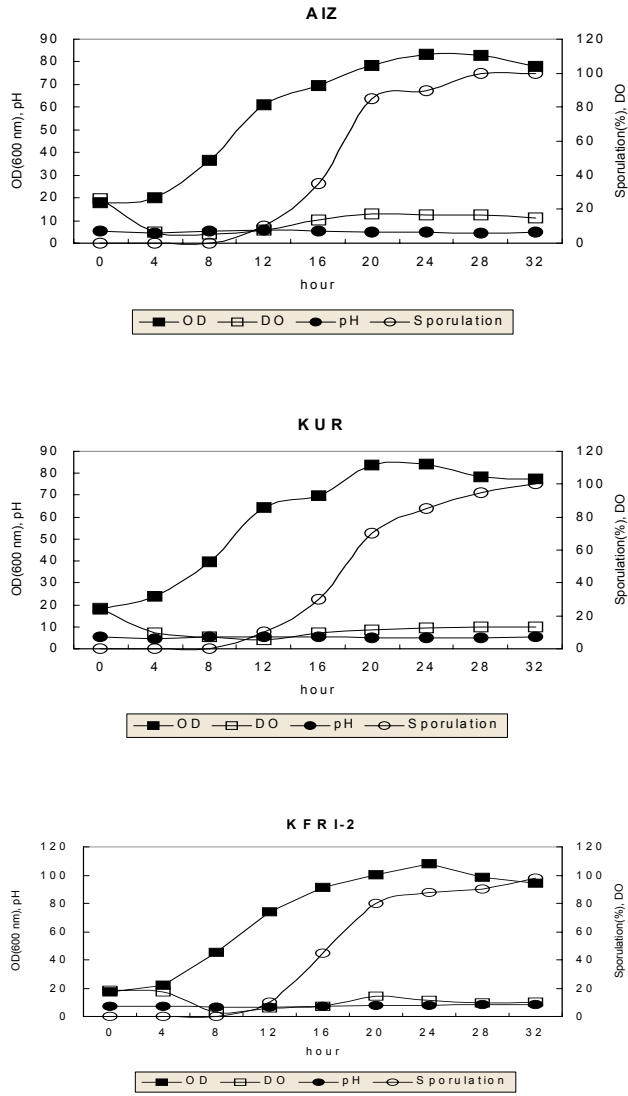


Fig. 2. Growth pattern of *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*(AIZ), *kurstaki*(KUR) and KFRI-2(KFRI-2) in 7 l fermentation.



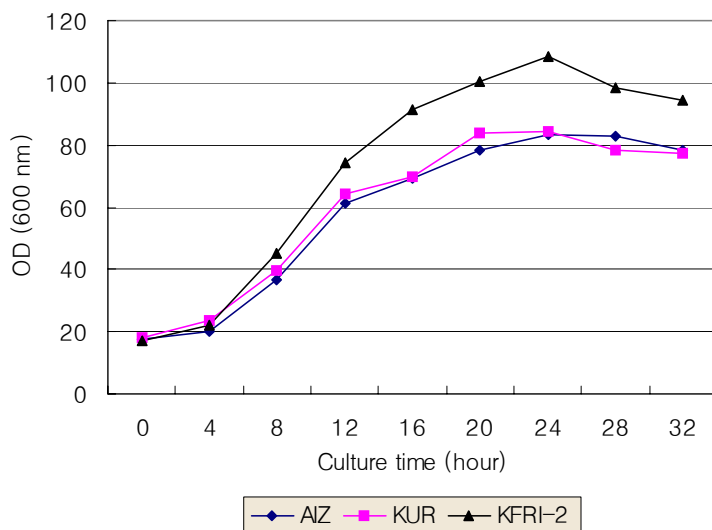


Fig. 3. Comparison of growth of *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*(AIZ), *kurstaki*(KUR) and KFRI-2(KFRI-2) in 7 ℓ fermentation.

Table 4. Comparison of sporulation of *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*, *kurstaki* and KFRI-2 in 7 ℓ fermentation

Strain	No. (of×10 <sup>7</sup> CFU/ml)	SD(±)
<i>aizawai</i>	94.75ab <sup>§</sup>	17.54
<i>kurstaki</i>	68.50b	21.02
Bt KFRI-2	124.00a	19.97

<sup>§</sup>Duncan test(95% fiducial limit)

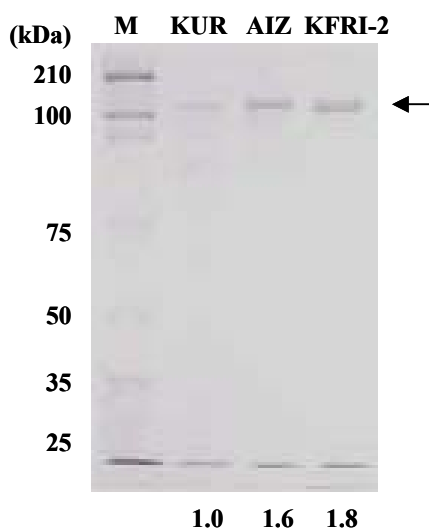


Fig. 4. Comparison of crystal proteins of *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* (AIZ), *kurstaki* (KUR) and KFRI-2 (KFRI-2) in 7 ℓ fermentation.

## 2. 대량배지소재선발 및 개선

### 가. 기본배지 선정

Bt의 경우는 각 균주마다 고효율의 배지조성이 다른 것으로 알려져 있으므로 Bt KFRI-2 균주에 적합한 대량배양배지 조건을 선발하고 개선하기 위하여 Bt 내독소단백질 생산용 배지인 GYS 배지 조성과 일반적인 Bt fermentor용 배지 조성을 절충하여 flask 배양실험에 사용할 기본배지를 정하였다 (표 5).

이 기본배지의 경우 대량배양조건인 flask 조건상에서 좀더 저렴한 배지소재와 다양한 미량원소를 조절을 통한 고효율 배지조성을 선발하는 것을 목표로 하고 있으므로 우선 C source 농도 및 N source 농도를 결정한 후 이 후 실험에 이용하고자 하였다.

Table 5. Ingredient of media used for culture of *B. thuringiensis* KFRI-2 strain

Ingredient	GYS (%)	Fermentation (%)	Basal medium (%)
Glucose	0.1	2	2
Yeast extract	0.2	2	0.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.05	0.1	0.1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.2	0.4	0.4
MgSO <sub>4</sub>	0.002	0.1	0.1
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.005	0.004	0.005
CaCl <sub>2</sub>	0.008	0.01	0.01

### 나. Glucose 농도에 따른 Bt KFRI-2 균주와 *kurstaki* 균주의 비교배양

Bt KFRI-2 균주의 고효율 배지조성 확립을 위한 flask 배양을 수행하는데 있어서 가장 적합한 배지조성을 정하고자 기본배지 (표 5)를 대상으로 하여 C-source 인 glucose 농도를 달리하여 배양 실험을 수행하였다. flask 배양실험에서 배지의 멸균시 Glucose, MgSO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>를 각각 별도로 멸균하여 첨

가하였다. 배양성상을 비교하고자 OD<sub>600</sub>의 흡광도와 pH 값 및 포자 농도를 측정하였고 *kurstaki* 균주를 대조균주로 사용하였다.

C source의 농도는 세균 배양상에서 수율에 큰 영향을 주는 배지성분이나 Bt의 경우 glucose 농도가 너무 높으면 고농도의 당으로 인하여 sporulation이 일어나지 않는 현상이 일어남으로 flask 상에서의 적절한 glucose 농도를 먼저 정할 필요가 있다. 이에 glucose의 농도를 2%, 3%, 4%로 하여 배양을 수행한 결과 Bt KFRI-2 균주와 *kurstaki* 균주 모두 5일 동안 배양 후에도 sporulation이 일어나지 않았는데 이는 고농도의 당으로 인한 것으로 생각되며, 이후 실험에서는 그 농도를 0.1%, 0.5%, 1.0%로 낮추어 배양하고 그 배양특성과 포자 생산효율을 비교하였다 (표 6, 표 7).

배양결과 Bt KFRI-2 균주의 경우 glucose 0.1%와 0.5%에서 모두 sporulation이 정상적이었으나 1% 농도에서는 OD<sub>600</sub>값은 다른 농도에 비하여 높았지만 정상적인 sporulation이 일어나지 못하였다. 그중 0.5%의 농도에서 OD<sub>600</sub> 값은 0.1%에 비하여 다소 낮은 값을 가지나 최종 포자 농도는 더 높게 나타나 sporulation 효율이 높은 것으로 나타났다 (표 7). *kurstaki* 균주 역시 glucose 0.1%, 0.5%, 1.0% 농도구에서 모두 정상적으로 sporulation이 일어났으며 그중 0.5%의 농도구에서 가장 높은 sporulation 효율을 나타내어 두 균주 모두 glucose 0.5% 농도가 적합함을 확인하였다. 이에 따라 flask 배양실험에 있어 glucose의 농도는 0.5%로 고정하였다.

Table 6. Effect of glucose concentration on growth of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* and KFRI-2 in flask culture

Strain	Glucose (%)	Initial OD <sub>600</sub>	Final OD <sub>600</sub>	Initial pH	Final pH
<i>kurstaki</i>	0.1	0.016	4.32	6.82	7.94
	0.5	0.016	4.64	6.84	7.54
	1.0	0.016	6.97	6.84	7.47
Bt KFRI-2	0.1	0.016	3.37	6.84	8.1
	0.5	0.016	2.87	6.83	7.72
	1.0	0.016	7.5	6.84	7.3

Table 7. Effect of glucose concentration on sporulation of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* and KFRI-2

Strain	Glucose (%)	No. (of $\times 10^7$ CFU/ml)	SD ( $\pm$ )
<i>kurstaki</i>	0.1	11.33a <sup>§</sup>	2.31
	0.5	25.67a	12.42
	1.0	19.00a	5.20
Bt KFRI-2	0.1	13.00a	6.56
	<b>0.5</b>	<b>32.00a</b>	32.92
	1.0	ND <sup>*</sup>	ND

<sup>§</sup>Duncan test(95% fiducial limit), <sup>\*</sup>ND; not determined.

#### 다. yeast 농도에 따른 Bt KFRI-2 균주와 *kurstaki* 균주의 비교배양

flask 배양에 있어 기본배지 중 C source인 glucose의 농도를 0.5%로 정한 후 주 N-source인 yeast의 농도를 결정하기 위한 배양실험을 수행하였다. 기초실험으로 Yeast 농도를 0.1%, 0.5%, 1.0%, 2.0% 까지 배양한 결과 OD600 값 및 포자 농도가 계속적인 증가추세를 보여 구간을 3%, 5%까지 늘려 실험을 수행하였다 (표 8, 표 9). Bt KFRI-2 균주의 경우, OD<sub>600</sub>값, 포자 농도는 yeast의 농도 0.1%-2%에서 yeast의 농도가 증가함에 따라서 현저하게 증가하였고 2% 농도에서 가장 높은 수치를 보였다. 그러나 3%와 5%에서는 OD<sub>600</sub>값, 포자 농도는 오히려 감소하였다. 마찬가지로 *kurstaki* 균주에서도 OD<sub>600</sub>, 포자 수 모두 yeast의 농도 0.1%-2%에서 yeast 농도가 증가함에 따라서 증가하였으며 2% 농도에서 가장 높은 수치를 보였고 3%와 5%에서는 OD<sub>600</sub>값, 포자 농도는 오히려 감소하였다.

포자농도와 더불어 Bt의 제제화시에 매우 중요한 Bt 배양액내의 내독소단백질의 양을 SDS-PAGE를 이용하여 측정하였다 (그림 5). 전기영동에 사용된 시료를 배양액의 양으로 환산하면 40  $\mu$ l이며, 이를 다시 배양액 ml당 내독소단백질 양 ( $\mu$ g)으로 나타내었다 (표 10). Bt KFRI-2 균주와 *kurstaki* 균주에 있어서는 약 130 kDa의 Cry1에 해당되는 내독소 단백질과 더불어 약 65 kDa에 해당되는 Cry2 type의 단백질이 있으나 전기영동상에 뚜렷하게 나타나지 않아 분석에서는 제외하였고 Cry1 type만을 분석하였다 (그림 5; 화살표). Bt KFRI-2 균주는 yeast 1%에서 가장 많은 내독소단백질을 생산하였는데, 최대의 포자를 생산하는 yeast 2% 농도의 내독소단백질양보다 2.2배 더 많은 양을 생산하였다. 그 다음으로 yeast 0.5%, 2%, 0.1%, 3% 순으로 단백질을 많이 생산하였고 yeast 5%에서는 거의 내독소단백질이 만들어지지 못하였다.

이로부터 KFRI-2 균주에 있어서 yeast의 1% 농도보다 높은 농도는 오히려 내독소단백질의 생산이 억제됨을 알 수 있었다. *kurstaki* 균주는 yeast 농도에 따른 성장이 뚜렷하게 증가하였으나 yeast 1% 농도 이상에서는 내독소단백질의 형성이 비정상적으로 일어나는 것이 위상차현미경을 통해서도 확인되었으며, 단지 yeast 0.5% 농도에서 내독소단백질의 생산을 확인할 수 있었고 다른 농도에서는 모두 내독소단백질의 형성이 제대로 이루어지지 않았다.

위의 실험을 통하여 기본배지의 성분 중 yeast의 농도를 1%로 정하였으나 이는 glucose의 농도별 배양실험을 하였을 때의 yeast 농도 0.5%와는 다소 차이가 있었다. 그러므로 고효율 배지조성 확립에 있어서 중요한 영향을 주는 C-source인 glucose의 농도별 사용효과를 yeast의 농도를 1%로 고정한 후 배양효율을 재검증하였다. flask 배양실험에서 배지의 멸균시 glucose, MgSO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>를

각각 별도로 멸균하여 첨가하였다. Bt KFRI-2 균주의 배양효율에 있어서는 OD<sub>600</sub>, pH값, 포자농도 등을 비교하였으며 배양액의 단백질 전기영동을 통하여 내독소단백질 생성효율을 비교하였다. Bt의 경우 일정한 범위에서 glucose 농도가 증가함에 따라 배양효율도 증가하지만 농도가 너무 높으면 고농도의 당으로 인하여 sporulation이 일어나지 않는 현상이 일어기 때문에 glucose 농도의 범위를 2%이하로 하고 0.1%, 0.5%, 1.0%, 2.0% 네 개의 농도구를 정하여 배양하고 그 배양특성, 포자와 내독소단백질의 생산효율을 비교하였다.

배양결과 Bt KFRI-2 균주의 경우 glucose 0.1%, 0.5%와 1.0% 모두 sporulation이 정상적이었으나 2.0% 농도에서의 OD<sub>600</sub>값은 다른 농도에 비하여 높았지만 현미경 관찰결과 sporulation의 효율이 80%정도밖에 되지 못하였다 (표 11). 그중 1.0%의 농도에서 OD<sub>600</sub>값은 2%에 비하여 다소 낮은 값을 가지나 최종 포자 농도는 2%보다 높게 나타났고 0.1%와 0.5%에 비해서는 유의차를 벗어나는 범위에서 높은 값을 나타내는 것을 확인할 수 있었다 (표 12). 내독소단백질의 생성효율은 SDS-PAGE 분석을 통하여 측정하였다. autolysis된 배양액 40  $\mu$ l를 SDS-PAGE 젤에 전기영동하고 분석 시스템을 이용하여 각 농도구의 단백질 생성량을 측정하여 비교하였다. 이전 실험과 마찬가지로 Bt KFRI-2 균주는 약 130 kDa의 Cry1에 해당되는 내독소단백질과 더불어 약 65 kDa에 해당되는 Cry2 type의 단백질이 있으나 전기영동상에 뚜렷하게 나타나지 않아 분석에서는 제외하였고 Cry1 type만을 분석하였다(그림 6). 포자의 농도가 가장 높은 glucose 1%에서 가장 많은 양의 내독소단백질을 생성하는 것을 확인할 수 있었다. 그 다음으로 glucose 2%, 0.5%, 0.1% 순으로 단백질을 많이 생성하였다 (그림 6; 표 13).

이로부터 Bt KFRI-2 균주는 yeast 농도가 1%일 때 glucose 1%에서 가장 많은 포자를 생성할 뿐 만 아니라 내독소단백질도 가장 많이 생산함을 알 수 있었다. 이는 yeast 농도를 0.5%로 고정한 후 glucose 농도를 조절한 실험결과 (표 7)에서 glucose 0.5% 농도가 효율적이었던 것과는 다소 다른 결과이나 yeast의 농도가 0.5%에서 1%로 증가할 때 포자농도가 가파르게 상승했던 yeast 농도 조절 실험결과 (표 9)과는 유사성을 보여주고 있다. 그러므로 포자형성과 내독소단백질에 있어 적합하다고 판단되는 yeast 1% 농도를 기준으로 할 때 glucose 농도를 1%로 증가시킴으로써 하여 보다 높은 배양성능을 얻을 수 있다고 판단되었으며, 이에 따라 glucose와 yeast 농도를 각각 1%로 정하고 이후 실험을 수행하였다.

Table 8. Effect of yeast concentration on growth of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* and KFRI-2 in flask culture

Strain	Yeast (%)	Initial OD <sub>600</sub>	Final OD <sub>600</sub>	Initial pH	Final pH
<i>kurstaki</i>	0.1	0.016	3.87	6.75	5.32
	0.5	0.016	5.97	6.83	6.96
	1.0	0.016	10.12	6.72	7.95
	2.0	0.04	10.18	6.68	8.42
	3.0	0.11	8.95	6.57	8.48
	5.0	0.26	8.53	6.53	8.55
Bt KFRI-2	0.1	0.016	2.36	6.75	5.52
	0.5	0.016	5.11	6.83	7.10
	1.0	0.016	10.05	6.72	7.80
	2.0	0.04	10.25	6.68	8.16
	3.0	0.110	7.95	6.57	8.29
	5.0	0.260	6.98	6.53	8.43



Table 9. Effect of glucose concentration on growth of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* and KFRI-2

Strain	Yeast (%)	No. (of $\times 10^7$ CFU/ml)	SD ( $\pm$ )
<i>kurstaki</i>	0.1	36.00c <sup>§</sup>	5.57
	0.5	63.67c	10.26
	1.0	200.33b	3.51
	2.0	350.67a	59.50
	3.0	255.00b	73.82
	5.0	186.33b	15.18
<b>Bt KFRI-2</b>	0.1	13.67d	5.69
	0.5	68.67cd	3.51
	<b>1.0</b>	<b>217.67ab</b>	15.70
	2.0	259.67a	122.65
	3.0	165.33abc	73.35
	5.0	110.00cd	60.75

<sup>§</sup>Duncan test (95% fiducial limit)

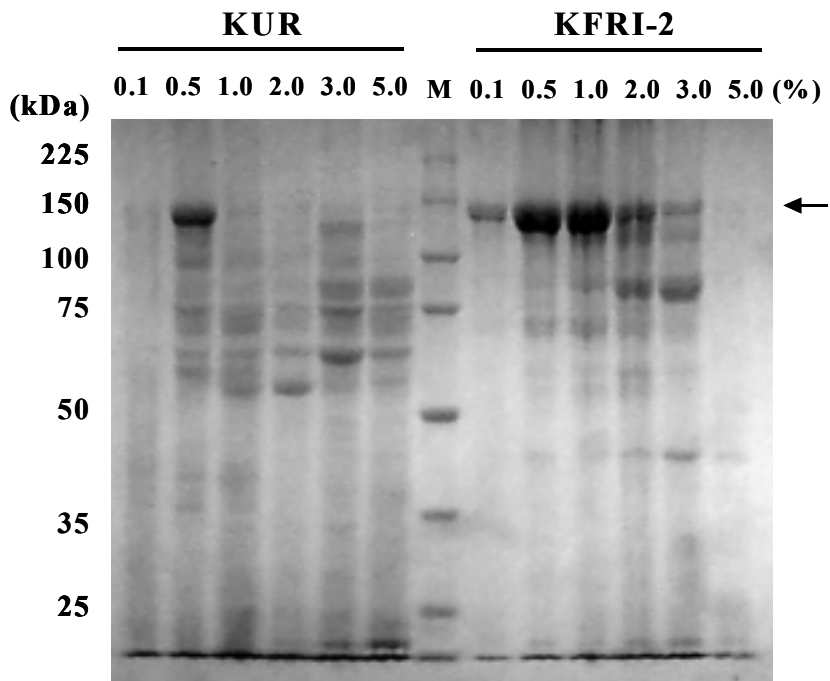


Fig. 5. Effect of yeast concentration on crystal protein expression of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* and KFRI-2.

Table 10. Comparison of crystal protein yield of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* and KFRI-2 on yeast concentration

Strain	Yeast (%)	No. ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
<i>kurstaki</i>	0.1	0
	0.5	34
	1.0	0
	2.0	0
	3.0	0
	5.0	0
Bt KFRI-2	0.1	19.7
	0.5	57.9
	<b>1.0</b>	<b>62.9</b>
	2.0	27.9
	3.0	15.1
	5.0	0

Table 11. Growth pattern of *B. thuringiensis* KFRI-2 in flask culture on glucose concentration

Strain	glucose (%)	Initial OD <sub>600</sub>	Final OD <sub>600</sub>	Initial pH	Final pH
Bt KFRI-2	0.1	0.03	5.44	6.9	8.4
	0.5	0.03	10.85	6.9	8.2
	1.0	0.04	16.20	6.9	7.52
	2.0	0.03	17.22	7.0	7.19

Table 12. Sporulation of *B. thuringiensis* KFRI-2 in flask culture on glucose concentration

Strain	glucose (%)	No. (of $\times 10^4$ CFU/ml)	SD ( $\pm$ )
Bt KFRI-2	0.1	60c <sup>§</sup>	10.00
	0.5	153.33bc	83.86
	<b>1.0</b>	<b>286.67a</b>	85.05
	2.0	230.00a	26.46

<sup>§</sup>Duncan test (95% fiducial limit)

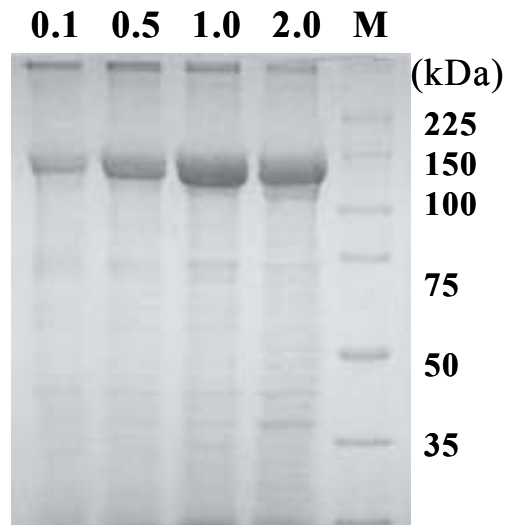


Fig. 6. Effect of glucose concentration on crystal protein expression of *B. thuringiensis* KFRI-2.

Table 13. Comparison of crystal protein yields of *B. thuringiensis* KFRI-2 on glucose concentration

Strain	glucose (%)	No. ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
Bt KFRI-2	0.1	23.0
	0.5	36.2
	1.0	60.0
	2.0	51.3

### 3. 저비용 고효율 대량배양용 배지 개발

가. Salt 농도에 따른 Bt KFRI-2 균주의 배양효과

#### 1) Ammonium sulfate의 농도에 따른 배양효과

Ammonium sulfate  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  는 Bt 배양에 있어 N-source 공급원으로 가격이 저렴하여 자주 사용되는 배지 성분으로 기본배지에서도 이를 조절하여 성장 증진, 포자 및 내독소단백질의 생성효과를 확인하기 위하여 그 농도를 0.1%, 0.2%, 0.4%, 0.7%, 1.0%, 1.5%, 2.0%로 조절하여 배양실험을 수행하였다.

배양결과  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  7개 농도에서 모두 sporulation이 정상적으로 일어났고 그중  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.4% 농도에서 제일 높은 OD<sub>600</sub>값을 나타내었다 (표 14). 포자 생성을 비교에서  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.4% 농도는 0.1%와 0.2%에 비하여 유의차 범위내에서 다소 높은 값을 보였고 0.7%, 1.0%와 1.5%와 2.0%에 비하여 유의차 범위를 초과하여 높은 값을 가졌다(표 15).

내독소단백질의 생성효율에 있어서는  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.1%, 0.2%, 0.4%와 0.7%에서 비슷한 수치를 나타내었고 1%, 1.5%, 2.0% 농도구에서는 이에 비하여 다소 낮은 값을 나타내었다 (표 7). 이로부터 Bt KFRI-2 균주는 포자 및 내독소단백질 생산은  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.1%에서 2.0% 농도의 범위내에서 농도의 변화에 따라 큰 변화가 없는 것을 확인하였고 이에 따라서 이 농도구내에서는  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 농도가 Bt KFRI-2 균주의 배양에 있어서 큰 영향은 주지 않는 것을 알 수 있었다.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.4% 농도에서 가장 많은 포자를 생성할 뿐더러 미생물 살충제의 중요한 작용을 하는 내독소단백질도 많이 생산함으로  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  농도를 0.4%로 정하였다.

Table 14. Growth pattern of *B. thuringiensis* KFRI-2 in flask culture on ammonium sulfate concentration

Strain	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)	Initial OD <sub>600</sub>	Final OD <sub>600</sub>	Initial pH	Final pH
Bt KFRI-2	0.1	0.03	15.11	6.84	8.1
	0.2	0.03	14.83	6.83	7.8
	0.4	0.04	14.85	6.75	7.7
	0.7	0.02	14.15	6.70	7.5
	1.0	0.03	13.85	6.68	7.5
	1.5	0.05	13.91	6.62	7.4
	2.0	0.05	13.96	6.53	7.2

Table 15. Spoulation of *B. thuringiensis* KFRI-2 in flask culture on ammonium sulfate concentration

Strain	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)	No. (of ×10 <sup>7</sup> CFU/ml)	SD (±)
Bt KFRI-2	0.1	240.67a <sup>§</sup>	35.13
	0.2	250.33a	16.20
	<b>0.4</b>	<b>257.00a</b>	23.52
	0.7	216.6ab	30.44
	1.0	217.00ab	34.60
	1.5	213.67ab	21.94
	2.0	190.33b	12.06

Table 16. Comparison of crystal protein yields of *B. thuringiensis* KFRI-2 on ammonium sulfate concentration

Strain	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)	No. (µg/ml)
Bt KFRI-2	0.1	62.3
	0.2	62.4
	<b>0.4</b>	<b>62.5</b>
	0.7	62.1
	1.0	56.7
	1.5	57.9
	2.0	58.4



## 2) potassium phosphate 농도에 따른 배양효과

potassium phosphate ( $K_2HPO_4$ )는 Bt 배양에 있어서 필수적으로 사용되는 P-source이다. 이 성분이 Bt KFRI-2 균주의 배양에 주는 영향을 알아보기 위하여 그 농도를 0.1%, 0.3%, 0.7%, 1.0%로 조절하여 배양실험을 수행하여 배양성상 및 포자와 내독소단백질의 생성효과를 알아보았다. 위상차현미경 관찰 결과  $K_2HPO_4$  4개 농도구에서 모두 sporulation이 정상적으로 일어났고  $OD_{600}$ 과 pH 에서 모두 비슷한 값을 나타내었다 (표 17). 포자 생성을 비교에서  $K_2HPO_4$  0.1% 농도에서 다른 농도에 비하여 다소 높은 수치를 나타내었지만 유의차 범위를 초과하지는 않았으며  $K_2HPO_4$ 의 여러 농도에서 모두 비슷한 수치를 가졌다 (표 18).

내독소단백질의 생성효율 분석결과 Bt KFRI-2 균주는  $K_2HPO_4$  0.1%, 0.3%와 0.7%에서 비슷한 수치를 나타내었고 0.05%에서는 다른 농도구에 비하여 비교적 낮은 값을 가졌다 (표 18). 이로부터 Bt KFRI-2 균주는  $K_2HPO_4$  0.05%에서 다른 농도에 비하여 떨어지지만 0.1%에서 0.7% 농도 범위에서 포자 및 내독소단백질 생산이 농도의 변화에 따라 큰 변화가 없는 것을 확인하였다.  $(NH_4)_2SO_4$ 와 마찬가지로  $K_2HPO_4$ 의 농도 역시 0.1%~1.0%의 범위내에서는 Bt KFRI-2 균주의 배양에 있어서 큰 영향은 주지 않는 것을 알 수 있었다. Bt KFRI-2 균주의 배양에 있어서  $K_2HPO_4$  0.1% 농도에서 가장 많은 포자와 내독소단백질을 생산함으로  $K_2HPO_4$  농도를 0.1%로 고정하였다.

Table 17. Growth pattern of *B. thuringiensis* KFRI-2 in flask culture on potassium phosphate concentration

Strain	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (%)	Initial OD <sub>600</sub>	Final OD <sub>600</sub>	Initial pH	Final pH
Bt KFRI-2	0.05	0.03	15.28	6.9	7.4
	0.1	0.03	15.74	6.9	7.2
	0.3	0.04	13.18	6.9	7.2
	0.7	0.03	15.77	7.0	7.4

Table 18. Sporulation of *B. thuringiensis* KFRI-2 in flask culture on potassium phosphate concentration

Strain	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (%)	No. (of $\times 10^7$ CFU/ml)	SD ( $\pm$ )
Bt KFRI-2	0.05	218.67a <sup>§</sup>	19.55
	<b>0.1</b>	<b>232.67a</b>	36.07
	0.3	221.00a	25.94
	0.7	224.00a	17.69

<sup>§</sup>Duncan test (95% fiducial limit)

Table 19. Comparison of crystal protein yields of *B. thuringiensis* KFRI-2 on potassium phosphate concentration

Strain	glucose (%)	No. ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
Bt KFRI-2	0.05	52.3
	<b>0.1</b>	<b>61.4</b>
	0.3	60.5
	0.7	60.9

나. 미량원소의 농도조절에 따른 Bt KFRI-2 균주의 배양효과

1)  $\text{MgSO}_4$  농도에 따른 배양효과

$\text{MgSO}_4$  미량원소는 Bt 배양에 있어서 포자 형성과 sporulation에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져있다. 이 미량원소가 포자형성효율과 단백질의 생성에 대한 영향을 알아보기 위하여 그 농도를 0.025%, 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.4%로 조절하여 배양실험을 수행하였다. 실험결과 Bt KFRI-2 균주는 5개의 농도구에서 모두 sporulation이 정상적으로 일어났고  $\text{OD}_{600}$ 의 값은 농도의 변화에 따라 큰 변화가 없지만 pH값은 농도가 커짐에 따라 그 값이 낮아지는 것을 확인할 수 있었다 (표 20).  $\text{MgSO}_4$  0.1%에서 가장 높은 포자 농도를 보였지만 다른 농도구들과 유의차 범위를 벗어나지 않았고 단백질 생성율도 비슷한 효과를 보였다 (표 21, 22). 이로부터 Bt KFRI-2 균주는  $\text{MgSO}_4$  0.025% - 0.4%의 농도 범위내에서 sporulation 효율과 단백질 생성효과 모두 안정되었으며  $\text{MgSO}_4$  농도의 영향을 크게 받지 않는 것으로 생각되어졌다.  $\text{MgSO}_4$  0.1%에서 포자 농도가 가장 높게 나타났고 단백질 생성량도 다른 농도들에 비하여 떨어지지 않기 때문에  $\text{MgSO}_4$  농도를 0.1%로 정하였다.

Table 20. Growth pattern of *B. thuringiensis* KFRI-2 in flask culture on magnesium sulfate concentration

Strain	MgSO <sub>4</sub> (%)	Initial OD <sub>600</sub>	Final OD <sub>600</sub>	Initial pH	Final pH
Bt KFRI-2	0.025	0.03	15.28	6.8	7.85
	0.05	0.03	15.44	6.8	7.63
	0.1	0.04	15.18	6.8	7.21
	0.2	0.03	15.37	6.9	6.87
	0.4	0.04	15.20	6.9	6.77

Table 21. Sporulation of *B. thuringiensis* KFRI-2 in flask culture on magnesium sulfate concentration

Strain	MgSO <sub>4</sub> (%)	No. (of ×10 <sup>7</sup> CFU/ml)	SD (±)
	0.025	201.51a <sup>§</sup>	23.85
	0.05	220.29a	11.09
Bt KFRI-2	<b>0.1</b>	<b>231.01a</b>	45.23
	0.2	229.89a	29.65
	0.4	219.47a	33.19

<sup>§</sup>Duncan test (95% fiducial limit)

Table 16. Comparison of crystal protein yields of *B. thuringiensis* KFRI-2 on magnesium sulfate concentration

Strain	MgSO <sub>4</sub> (%)	No. (µg/ml)
	0.025	62.5
	0.05	62.4
Bt KFRI-2	<b>0.1</b>	<b>62.9</b>
	0.2	62.7
	0.4	62.7

## 2) $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 및 $\text{CaCl}_2$ 의 농도조절을 통한 배양효과

Mn과 Ca 등 미량원소는 Bt의 배양에 있어서 포자의 형성에 중요한 역할을 하지만, 그 양이 적정하지 못할 경우 Bt의 생장을 방해할 가능성이 있는 중금속 물질이다. Bt KFRI-2 균주의 배양에 있어서 적합한 농도를 찾고자 하여  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{MnSO}_4$ )의 농도를 0.0025%, 0.005%, 0.01%로 하고  $\text{CaCl}_2$ 의 농도를 0.005%, 0.01%, 0.02%, 0.04%로 한 다음 서로 조합하여 배양성상 및 sporulation 과 단백질 생성효율을 검정하였다. Bt KFRI-2 균주는  $\text{MnSO}_4$ 와  $\text{CaCl}_2$ 의 여러 농도 조합에서  $\text{OD}_{600}$ , pH는 비슷한 값을 나타내었고 포자 농도는  $\text{MnSO}_4$  0.01%와  $\text{CaCl}_2$  0.02% 농도조합에서 다소 낮은 수치를 나타내었지만 그 외의 농도 조합에서는 모두 유의차 범위내에서 비슷한 값을 가졌다 (표 23, 24). 미생물 살충제로서 가장 중요한 작용을 하는 내독소단백질의 생성효율의 비교에서  $\text{MnSO}_4$  0.0025%와  $\text{CaCl}_2$  0.01% 농도조합에서 가장 높은 값을 나타내었고 다른 농도 조합에서는 비슷하게 나타났다 (표 25).

이로부터  $\text{MnSO}_4$ 과  $\text{CaCl}_2$ 의 두 미량원소가 처리한 농도구내에서 Bt KFRI-2 균주의 배양과 sporulation에 주는 영향은 크지 않았다. 본 결과에 따라 내독소단백질을 가장 많이 생성하며 포자 생성도 다른 농도 조합에 비하여 떨어지지 않는  $\text{MnSO}_4$  0.0025%와  $\text{CaCl}_2$  0.01% 농도조합을 선발하여 이후 실험에 이용하였다.

Table 23. Growth pattern of *B. thuringiensis* KFRI-2 in flask culture on MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O and CaCl<sub>2</sub> concentration

MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O (%)	CaCl <sub>2</sub> (%)	Initial OD <sub>600</sub>	Final OD <sub>600</sub>	Initial pH	Final pH
0.0025	0.005	0.02	14.8	6.7	7.8
	0.01	0.02	14.3	6.8	7.8
	0.02	0.03	14.6	6.7	7.7
	0.04	0.04	14.3	6.7	7.7
0.005	0.005	0.01	13.8	6.6	7.6
	0.01	0.02	14.2	6.7	7.9
	0.02	0.03	14.7	6.7	7.8
	0.04	0.02	14.0	6.8	7.9
0.01	0.005	0.02	14.5	6.7	7.80
	0.01	0.04	13.9	6.7	7.7
	0.02	0.01	14.7	6.7	7.8
	0.04	0.03	14.7	6.8	7.9

Table 24. Sporulation of *B. thuringiensis* KFRI-2 in flask culture on MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O and CaCl<sub>2</sub> concentration

MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O (%)	CaCl <sub>2</sub> (%)	No. (of ×10 <sup>7</sup> CFU/ml)	SD (±)
0.0025	0.005	208.21a <sup>§</sup>	21.09
	<b>0.01</b>	<b>221.00a</b>	10.62
	0.02	211.37a	8.96
	0.04	203.78a	32.25
0.005	0.005	205.00a	24.78
	0.01	210.41a	13.98
	0.02	220.91a	15.69
	0.04	221.79a	24.63
0.01	0.005	215.35a	41.05
	0.01	211.98a	23.59
	0.02	195.85b	51.33
	0.04	219.55a	25.48

<sup>§</sup>Duncan test (95% fiducial limit)



Table 25. Concentration of crystal protein yields of *B. thuringiensis* KFRI-2 on  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{CaCl}_2$  concentration

$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (%)	$\text{CaCl}_2$ (%)	No. ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
0.0025	0.005	61.9
	<b>0.01</b>	<b>62.8</b>
	0.02	61.8
	0.04	61.5
0.005	0.005	60.9
	0.01	60.9
	0.02	61.8
	0.04	61.7
0.01	0.005	61.7
	0.01	61.9
	0.02	62.0
	0.04	62.0

#### 4. 소규모 배양(Fermentor) 시험

가. Pilot 배양을 통한 대량배양체계 확립 및 원제생산

BIG로부터 받은 원제 0.2 g을 증류수 10 ml에 희석하였다 (20 mg/ml). 이 희석액을 각각 1, 0.5, 0.1, 0.05 ml씩 수거하여 10,000 rpm, 5분 원심분리하였다. 이렇게 얻은 침전물을 증류수 50  $\mu$ l와 5 x 단백질 sample buffer 50  $\mu$ l을 섞어 재현탁하였다. 이중 10  $\mu$ l를 10% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하여 분석하였다 (그림 7).

위의 분석과 동일하게 130 kDa의 Cry1 type에 해당되는 내독소단백질만을 분석하였다. 전기영동에 사용된 시료를 원제의 양으로 환산하면 각각 2, 1, 0.2, 0.1 mg 이었다. 2 mg과 1 mg 시료의 경우는 원제의 양이 많아 시료가 적절히 만들어지지 못한 것으로 판단되었고 0.2 mg과 0.1 mg에서는 분석이 가능하였다. 0.2 mg에서는 1.52  $\mu$ g, 0.1 mg에서는 0.90  $\mu$ g의 내독소단백질 양이 존재하는 것으로 판단되었다. 두 시료간의 내독소단백질 양 차이가 유의성 있게 나지는 않았지만, 평균적으로 원제 1 g 당 8.3 mg에 해당하는 내독소단백질이 존재하는 것으로 생각되었다.

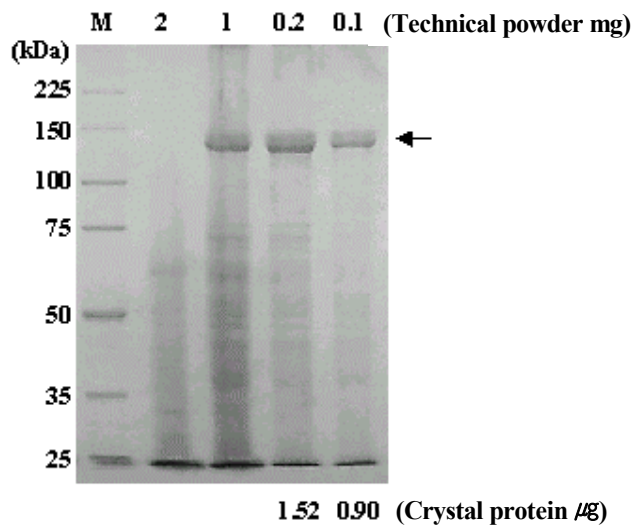


Fig. 7. Quantification of crystal protein in technical powder

## 5. 최적의 대량배양체계 확립

### 가. Bt KFRI-2 배양용 배지 선발

위의 대량배지소재선발 및 개선에 대한 여러 실험을 통하여 최종적으로 Bt KFRI-2 균주의 배양에 가장 적합한 배지를 선발하였다 (표 26). 선발된 배지는 실험을 수행하기 전에 선발한 기본배지에 비하여 glucose,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 의 농도가 2분의 1로 감소되었고 yeast extract은 오히려 2배로 증가하였다. 실험을 수행하기 전에 선발한 기본배지는 실험실에서 많이 이용되어지고 있는 GYS 배지와 Bt fermentor용으로 알려진 배지를 기초로 하여 Bt KFRI-2 균주의 대량배지소재선발을 하기 위하여 만들어진 것이고, 이 후의 실험을 통하여 이 기본배지의 성분조성을 개선하여 Bt KFRI-2 균주의 포자와 내독소단백질을 안정하게 대량 생성할 수 있는 배지가 최종적으로 선발되었다.

Table 26. Ingredients of selected medium used for optimized culture of *B. thuringiensis* KFRI-2 strain

Ingredient	Basal medium(%)	Selected medium(%)
Glucose	2	1
Yeast extract	0.5	1
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.1	0.1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.4	0.4
$\text{MgSO}_4$	0.1	0.1
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.005	0.0025
$\text{CaCl}_2$	0.01	0.01

2) 선발배지에서 Bt KFRI-2 균주와 *kurstaki* 균주의 배양효과

최종적으로 선발된 배지에서 Bt KFRI-2 균주와 분류상 동일 serotype의 균주인 *kurstaki* HD-1 균주를 대조 균주로 하고 포자농도와 내독소단백질의 생성량을 비교하여 배양효과를 재검증하였다.

두 균주의 경우 sporulation이 모두 정상적으로 일어났고 Bt KFRI-2 균주는 *kurstaki* HD-1 균주에 비하여 유의성 있게 더 많은 포자를 생성하였다 (표 26). 내독소단백질의 생성량에 있어서도 Bt KFRI-2 균주는 *kurstaki* HD-1 균주보다 4배 이상의 많은 양을 생성하였다 (그림 8, 표 27).

이로부터 최종적으로 선발된 배지에서 Bt KFRI-2 균주는 *kurstaki* HD-1 균주에 비하여 포자 및 내독소단백질 생성에서 모두 우수하였으며 이 선발배지가 Bt KFRI-2 균주의 배양에 있어서 최적화된 배지임을 재확인하였다.

Table 27. Comparison of sporulation of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* and KFRI-2 in selected medium

strain	No. (of $\times 10^7$ CFU/ml)	SD ( $\pm$ )
<i>kurstaki</i>	172.23a <sup>§</sup>	29.38
<b>Bt KFRI-2</b>	<b>216.58b</b>	51.52

<sup>§</sup>Duncan test (95% fiducial limit)

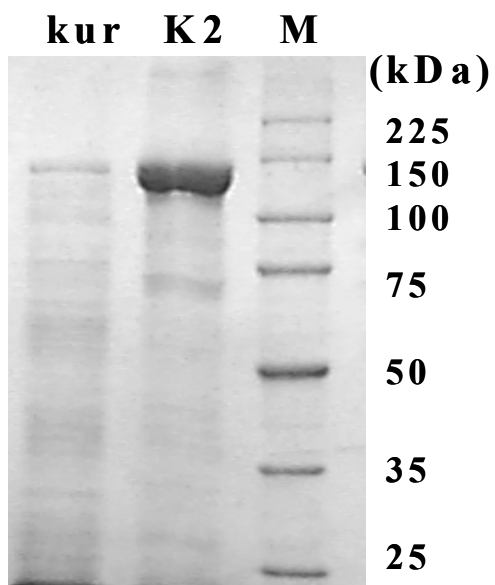


Fig. 8. Expression of crystal protein of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*(**Kur**) and KFRI-2(**K2**) in selected medium.

Table 28. Comparison of crystal protein yields of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* and KFRI-2 in selected medium

strain	No. ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
<i>kurstaki</i>	14.5
<b>Bt KFRI-2</b>	<b>63.9</b>

## 6. 기초제제의 첨가제 및 부가제 선발

Bt KFRI-2균주의 기초제제를 만들가 위하여 첨가제로는 현수성이 강한 NK-NX250L, NK-SLS, MK-PX 100, DA203W 등과 수화성이 강한 부제로서 White Carbon, Kaoline, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CaCO<sub>3</sub>를 Technical powder 50%에 혼합하여 3가지의 유형으로 조제 하였고 각 제제별로 현수성 및 수화성을 조사한 결과는 (표 29)에서와 같이 Type I에서 수화성 및 현수성이 가장 양호하였으며 배추좀나방에 대한 생물검정에서도 Technical powder와 3가지의 제제 유형중에서 Type I에서 살충효과가 (그림 9)에서와 같이 가장 우수한 결과를 보여 Type I 제제를(표 30)에서와 같이 각각의 함량에 변형을 주어 도둑나방, 멸강나방, 배추좀나방, 목화명나방, 버즘나무방패벌레등에 대하여 생물검정을 한 결과는 (표 31)과 같다.

Table 29. Wetting ability and suspensibility of 3 type wettable powders by using *B. thuringiensis* KFRI-2 strain

Formulation	Wetting ability	Suspensibility
Type I	+++ <sup>a</sup>	+++
Type II	+++	+++
Type III	+	+
Technical Powder	+	+

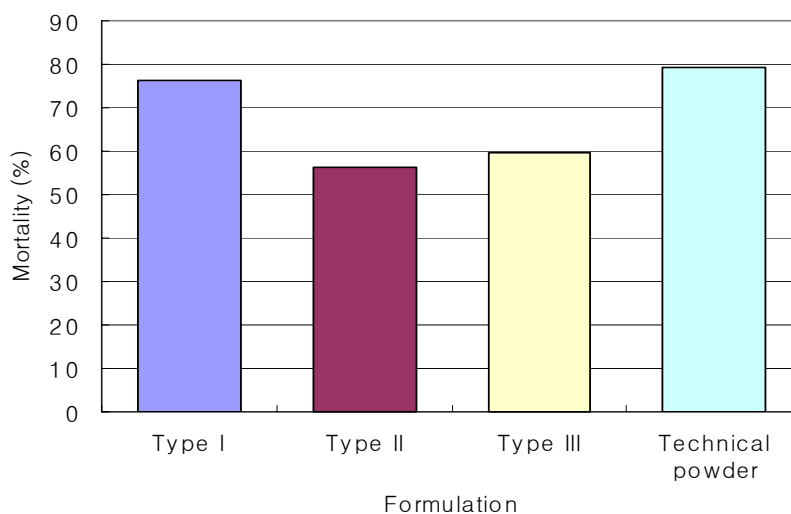


Fig. 9. Mortality(%) of 3 type wettable powders by using *B. thuringiensis* KFRI-2 strain against *Plutella xylostella* larvae



Table 30. Compositional rate(%) of transmitted formulation on type I wettable powder by using *B. thuringiensis* KFRI-2 strain

Component	Treat No.	Formulation Composition(%)											
		Type I	I-1	I-2	I-3	I-4	I-5	I-6	I-7	I-8	I-9	I-10	I-11
Technical powder	Bt KFRI-2	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Carrier	White Carbon	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
	Kaoline	25	25	25	15	15	15	-	-	-	-	-	-
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	-	25	25	25	15	15	15
Surfactant	NK-N250L	8	-	-	8	-	-	8	-	-	8	-	-
	NK-PX100	2	-	-	2	-	-	2	-	-	2	-	-
	NK-SLS	-	5	10	-	5	10	-	5	10	-	5	10
	Da203W	-	5	-	-	5	-	-	5	-	-	5	-
UV Protectant	Tixolox25	-	-	-	10	10	10	-	-	-	10	10	10

Table 31. Mortality(%) of transmitted formulation type I wettable powder of *B. thuringiensis* KFRI-2 strain against several important insect pests

Chemical Ref.	Conc. (ppm)	Mortality (%)				
		<i>M. brassicae</i>	<i>P.separata</i>	<i>P. xylostella</i>	<i>N. derogata</i>	<i>C. ciliata</i>
BT tape I -6	5000	30	20	100	100	20
	2500	20	0	100	95	10
	1250	22.5	5	100	90	20
BT tape I -7	5000	20	5	100	100	15
	2500	0	0	100	100	5
	1250	0	0	100	100	5
BT tape I -8	5000	20	100	100	100	5
	2500	10	100	100	100	5
	1250	0	67.5	100	91.7	10
BT tape I -9	5000	10	88.9	100	100	10
	2500	0	100	100	100	5
	1250	0	78.8	100	100	20
BT tape I -10	5000	10	80.6	100	100	5
	2500	0	75	100	100	0
	1250	10	40.6	100	100	0
BT tape I -11	5000	10	55	100	100	0
	2500	0	55	100	100	0
	1250	0	18.3	100	100	0

※*M. brassicae* : 도둑나방, *P. separata* : 멸강나방, *P. xylostella* : 배추좀나방  
*N. derogata* : 목화명나방, *C. ciliata* : 버즘나무방패벌레

Table. 31. Continued

Chemical Ref.	Conc. (ppm)	Mortality (%)				
		<i>M. brassicae</i>	<i>P.separata</i>	<i>P. xylostella</i>	<i>N. derogata</i>	<i>C. ciliata</i>
BT tape I -6	5000	20	100	100	100	25
	2500	30	94.4	100	75	25
	1250	20	77.8	100	75	0
BT tape I -7	5000	90	70	100	80	15
	2500	100	45	100	100	0
	1250	100	35	100	85	10
BT tape I -8	5000	30	85	100	95.5	20
	2500	22.5	100	100	91.3	0
	1250	0	44.3	100	98.7	0
BT tape I -9	5000	80	70.8	100	95	5
	2500	60	74.4	100	85	10
	1250	10	55	100	70	10
BT tape I -10	5000	40	63	100	100	10
	2500	30	11.1	100	100	5
	1250	30	10	100	75	20
BT tape I -11	5000	30	5	100	95	10
	2500	20	5	100	95	20
	1250	10	0	100	95	20

※*M. brassicae* : 도둑나방, *P. separata* : 멸강나방, *P. xylostella* : 배추좀나방  
*N. derogata* : 목화명나방, *C. ciliata* : 버즘나무방패벌레

## 7. 제제의 살충력 검정

KFRI-2 균주로 제조한 6가지 제제의 살충성을 알아보기 위하여 배추좀나방을 이용하여 생물 검정 실험을 수행하였다. 실험 결과 Bt KFRI-2 균주의 각 제제의 살충력은 20,000 배 희석액 에서는 F04052805 > F04052803, F04052804 > F04052802 > F04052806 > F04052801의 순위로 배추좀나방 유충에 살충력을 보였으며 (표 32), 40,000 배 희석액 에서는 F04052804 > F04052803 > F04052805 > F04052802 > F04052801 > F04052806의 순위로 살충력을 보였다 (표 33). 제제 F04052803, F04052804 및 F04052805는 두 농도구 모두에서 원제에 비하여 살충력은 다소 감소하지만 50% 이상의 살충력을 보유하고 있으므로 미생물 살충제 제제로 사용이 가능할 것으로 판단되었다.

Table 32. Mortality(%) of 1/20,000 diluted formulations *B. thuringiensis* KFRI-2 strain against *P. xylostella* larvae

Dilution	Formulation	Mortality (%)
	D.W.	0
	Technical powder	100
20,000	F04052801	18.2
	F04052802	82.8
	F04052803	90.9
	F04052804	90.9
	F04052805	100
	F04052806	54.5

Table 33. Mortality(%) of 1/40,000 diluted formulations *B. thuringiensis* KFRI-2 strain against *P. xylostella* larvae

Dilution	Formulation	Mortality (%)
	D. W.	0
	Technical powder	100
40,000	F04052801	36.3
	F04052802	45.5
	F04052803	63.7
	F04052804	72.8
	F04052805	54.5
	F04052806	18.2

## 8. 자외선 조건하에서 지효성 검정

야외 자외선 조건하에서 KFRI-2 균주의 6가지 제제의 지효성을 알아보기 위하여 실험실 자외선 조건하에서 배추좀나방에 대한 살충력을 검정하였다. 실험 결과, 6 가지 제제 모두 자외선 10분, 30분, 60분 조건하에서 자외선 처리전과 비슷한 약효를 보였다 (표 34). 이로부터 제작된 6가지 제제는 자외선 조건하에서 약효가 지속됨을 확인할 수 있었다.

Table 34. Efficacy(%) of *B. thuringiensis* KFRI-2 strain formulations by ultra-violet irradiation

Formulation	0 min.	10 min.	30 min.	60 min.
D. W.	0	0	0	0
Technical powder	100	100	100	100
F04052801	18.2	18.2	18.2	15.7
F04052802	82.8	80.9	82.8	82.8
F04052803	90.9	90.9	90.0	90.8
F04052804	90.9	89.5	90.9	88.5
F04052805	90.9	98.2	90.9	90.9
F04052806	54.5	50.7	55.2	52.2

## 9. 열처리 조건하에서 지효성 검정

야외 온도 조건하에서 KFRI-2 균주의 6가지 제제의 지효성을 알아보기 위하여 실험실 열처리 조건하에서 배추좀나방에 대한 살충력을 검정하였다. 실험 결과, 6 가지 제제 모두 37 °C 열처리 10분, 30분, 60분 조건하에서 처리전과 비슷한 약효를 보였다 (표 35). 이로부터 제작된 6가지 제제는 37 °C 열처리 조건하에서 약효가 지속됨을 확인할 수 있었다.

Table 35. Efficacy(%) of *B. thuringiensis* KFRI-2 formulations by high temperature(37°C)

Formulation	0 min.	10 min.	30 min.	60 min.
D. W.	0	0	0	0
technical powder	100	100	100	100
F04052801	20.9	21.5	20.9	20.0
F04052802	80.5	80.9	82.8	81.5
F04052803	89.5	90.9	90.0	89.5
F04052804	90.9	89.5	90.9	88.5
F04052805	90.9	92.0	90.9	92.0
F04052806	54.5	50.7	55.2	52.2

## 10. 제제의 물리성 조사

본 과제에서 제조한 6가지 제제에 대하여 수소이온농도 (pH), 평균입경, 수화성, 현수율, 및 분말도의 5가지 항목에 대하여 그 물리성을 조사하였다 (표 36). 제제 희석 용액의 산도 (acidity) 또는 알칼리도 (alkalinity)를 나타내는 지표인 수소이온농도는 6가지 제제 모두가 pH 7~8의 범위에 존재하는 것으로 나타났다. 일반적으로 유기합성제제가 pH 6~8의 범위에 존재하고 Bt 제제의 경우 대략 pH 6 정도인 것에 비추어 볼 때 본 과제에서 제작한 6가지 제형의 수소이온농도는 정상적인 범주에 있는 것으로 나타났다.

분상제형 또는 수중분산성 제형에 대해 개개 입자의 평균적인 크기를 측정하여 얻어지는 평균입경은 제제의 분산성, 현수성 등의 물리성 및 약효 발현에 중요한 영향을 미치는 요소로써, 일반적으로 분사노즐의 구멍이 막히지 않도록 10  $\mu\text{m}$  이하여야 한다. 6가지의 제제 중 coating형 제제인 F04052801과 수면부유성 제제인 F04052804는 평균입경이 20  $\mu\text{m}$ 가 넘는 것으로 나타났으나, 나머지 4가지의 제형은 대략 11  $\mu\text{m}$  정도의 평균입경을 가짐으로써 실제 사용 시 문제가 없을 것으로 판단되었다.

수중분산성 제제의 일정량을 특정 높이에서 물이 담겨있는 용기에 떨어뜨렸을 때 완전히 습윤 (wetting)하는 시간을 측정하는 수화성은 일반적으로 유기합성 농약의 경우 30초 이내이고, 생물 농약의 경우는 1분 이내여야 한다. 본 실험에서 제조한 6가지 제제 중 F04052804는 완전히 습윤 되는데 10분 정도가 걸리는 것으로 조사되어 문제점을 나타내었으며, 나머지 5가지 제형은 최소 13 ~ 51초 정도로 매우 우수한 수화성을 보였다.

고형인 유효성분이 약제사용농도에서 물에 고르게 현탁 되어 있는 정도를 측정하는 현수성의 경우 일반적으로 수화제를 기준으로 80 ~ 90 % 이상 되어야 하는데, 수면부유성 제형인 F04052803 제제가 89.2 %로 가장 우수한 현수율을 보였으며, 나머지 5가지 제형은 대략 70 % 정도의 비교적 양호한 현수율을 나타내었다.

제형별 관리규격체의 해당 메쉬 (mesh) 통과율을 측정하여 분상고형제형 또는 액상 현탁제형의 분말화 정도를 평가하는 분말도 항목에서는 F04052802 제제가 92.8 %로 가장 우수한 분말도를 보였으며, F04052803과 F04052805 및 F04052806 제제도 각각 89.0, 87.4 및 87.9 %의 비교적 우수한 분말도를 보였다.

이상의 경과 제제의 물리성 측면에서는 전체적으로 F04052804 제제가 가장 적합한 제형인 것으로 판단되었으나, 분말도를 높이기 위하여 증량제의 변경을 검토해 볼 필요가 있을 것으로 판단되었다. 나머지 제형의 경우 현수성의 향상을 위한 제제의 검토가 필요할 것으로 생각되며, 특히 F04052805와 F04052806 제제



는 현수성과 더불어 수화성을 높이기 위하여 계면활성제에 대한 검토 필요성이 제기되었다.

Table 36. Physical character of *B. thuringiensis* KFRI-2 formulations

Formulation	pH	Size ( $\mu\text{m}$ )	Wettability (sec)	Suspensibility (%)	Wet sieve test (%)
F04052801	7.48	20.8	20	71.7	80.5
F04052802	7.69	11.9	13	68.5	92.8
F04052803	8.35	11.2	18	89.2	89.0
F04052804	7.07	27.3	600	77.5	78.0
F04052805	8.11	10.9	47	76.4	87.4
F04052806	8.31	11.8	51	74.6	87.9

## 11. 생물검정 및 야외실증시험

가. 솔나방유충에 대한 Bt KFRI-2균주의 T. P.에 의한 생물검정

협동연구기관인 (주)비아이지에서 배양한 Bt KFRI-2균의 생산물(포자밀도 g당  $1 \times 10^{11}$ cfu)을 갖고 물에 희석하여 솔나방의 유충 식이물인 소나무의 잎에 살포한후 망대(40×70cm)에 10마리씩의 솔나방 유충을 넣은후 소나무가지에 씌워서 매은후 7일후와 15일후의 생사충수를 조사한 결과 1,000배액으로 살포하였을때 6일후에 살충율이 85.0%이었고 12일 경과한 후의 살충율은 93.3%이었으며 2,000배액 살포구에서는 살포 후 15일후 63.3%이었다.

Table 37. Mortality(%) of *B. thuringiensis* KFRI-2 strain by several sporulation concentration against *D. spectabilis* larvae

Conc.	1		2		3		Mean	
	6 DAT	12 DAT	6 DAT	12 DAT	6 DAT	12 DAT	6 DAT	12 DAT
100	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
1000	75.0	80.0	80.0	100.0	100.0	100.0	85.0	93.3
2000	60.0	70.0	65.0	70.0	40.0	50.0	55.0	63.3
4000	20.0	20.0	10.0	10.0	0.0	0.0	10.0	10.0
10000	10.0	10.0	0.0	0.0	0.0	15.0	3.3	8.3
Control	15.0	20.0	25.0	25.0	10.0	10.0	16.8	18.3

나. 야외 실증시험

1) 솔나방에 대한 신개발 Bt KFRI-2제의 살충검정 시험

솔나방 피해지인 북제주군에서 솔나방 4~5령 유충을 대상으로 F01, F02, F03, F04를 500, 1,000, 1,500, 2,000, 3,000배액으로 희석하여 5m<sup>2</sup>당 500ml 희석액을 배부식 분무기를 이용하여 수관살포하고 살충효과를 조사한 결과 표 38~41과 같다. 각 제제별 살충효과는 F03 > F04 > F02 > F01의 순으로 우수하게 나타났으며 F03 처리구는 1,500배액처리에서 7일후 90%의 살충효과가 있었으며 14일 후에는 3,000배액처리에서도 90%의 살충율을 나타내었다. F04 처리구는 14일 후 1,500배액에서 96.7%의 높은 살충율을 보였으나 F03에 비하여 살충효과가 더디게 발현하였으며 F02와 F01 처리구는 솔나방에 대하여 저조한 살충효과를 보였다. 본 시험에 이용된 솔나방 유충은 4~5령으로서 비교적 크기 때문에 보다 작은 어린 유충을 대상으로 하였을 경우에는 보다 높은 살충효과가 있을 것으로 판단된다.

Table 38. Mortality(%) of *B. thuringiensis* KFRI-2 F04052801 formulation against *D. spectabilis* larvae

Dilutions	after 7 days		after 14 days	
	Mean Mortality(%)	Control value	Mean Mortality(%)	Control Value
500	63.3	62.0	80.0	78.6
1,000	50.0	48.3	80.0	78.6
1,500	40.0	38.0	70.0	67.8
2,000	36.7	34.5	73.3	71.4
3,000	33.3	31.0	43.3	39.2
Control	3.3	-	6.7	-

Table 39. Mortality(%) of *B. thuringiensis* KFRI-2 F04052802 formulation against *D. spectabilis* larvae

Dilutions	after 7 days		after 14 days	
	Mean Mortality(%)	Control value	Mean Mortality(%)	Control value
500	56.7	55.2	93.3	92.8
1,000	56.7	55.2	86.7	85.7
1,500	36.7	34.5	86.7	85.7
2,000	40.0	38.0	73.3	71.4
3,000	40.0	38.0	76.7	75.0
Control	3.3	-	6.7	-

Table 40. Mortality(%) of *B. thuringiensis* KFRI-2 F04052803 formulation against *D. spectabilis* larvae

Dilutions	after 7 days		after 14 days	
	Mean Mortality(%)	Control value	Mean Mortality(%)	Control value
500	100.0	100.0	100.0	100.0
1,000	93.3	93.1	100.0	100.0
1,500	90.0	89.7	96.7	96.5
2,000	83.3	82.7	90.0	89.3
3,000	86.7	86.2	90.0	89.3
Control	3.3	-	6.7	-

Table 41. Mortality(%) of *B. thuringiensis* KFRI-2 F04052804 formulation against *D. spectabilis* larvae

Dilutions	after 7 days		after 14 days	
	Mean Mortality(%)	Control value	Mean Mortality(%)	Control value
500	83.3	82.7	96.7	96.5
1,000	80.0	79.3	93.3	92.8
1,500	63.3	62.0	96.7	96.5
2,000	63.3	62.0	83.3	82.1
3,000	36.7	34.5	76.7	75.0
Control	3.3	-	6.7	-

2) 잣나무넓적잎벌에 대한 신개발 Bt제의 살충검정 시험

실험실내에서 수삽한 잣나무 가지에 공시충인 잣나무넓적잎벌 유충을 처리당 10마리×3반복으로 접종하고 F01, F02, F03, F04, F05, F06를 500, 1,000, 1,500, 2,000, 3,000배액으로 희석하여 5㎡당 500ml의 약량으로 처리한 결과 표 42~45과 같다. 각 제제별 살충효과는 솔나방에서와 같이 F03, F04처리구가 가장 우수하였으나 타 처리구도 6일후에는 희석배수와 관계없이 실험개체 모두 사망하였다. F03, F04처리구는 3일후에 모든 처리에서 유충이 사망하여 가지 밑으로 떨어 졌으며 F01과 F02는 비교적 서서히 약효가 나타났으며 F05와 F06은 3일 경과후 급격히 사망하는 개체를 확인 할 수 있었다. 6일후 각 처리구 공히 모두 사망하여 산림해충인 잣나무넓적잎벌에 신개발 Bt제가 매우 우수한 살충력을 보였으며 사망한 개체는 새까맣게 말라죽는 형태를 나타내었다.

Table 42. Mortality(%) of *B. thuringiensis* KFRI-2 F04052801 formulation against *Acantholyda parki*. larvae

Dilutions	after 3 days		after 6 days	
	Mean Mortality(%)	Control value	Mean Mortality(%)	Control value
500	86.7	85.7	100.0	100.0
1,000	76.7	75.0	100.0	100.0
1,500	70.0	67.8	96.7	96.2
2,000	76.7	75.0	100.0	100.0
3,000	63.3	60.7	100.0	100.0
Control	6.7	-	13.3	-

Table 43. Mortality(%) of *B. thuringiensis* KFRI-2 F04052802 formulation against *A. parki*. larvae

Dilutions	after 3 days		after 6 days	
	Mean Mortality(%)	Control value	Mean Mortality(%)	Control value
500	100.0	100.0	100.0	100.0
1,000	86.7	85.7	100.0	100.0
1,500	86.7	85.7	100.0	100.0
2,000	83.3	82.1	100.0	100.0
3,000	73.3	71.4	100.0	100.0
Control	6.7	-	13.3	-

Table 44. Mortality(%) of *B. thuringiensis* KFRI-2 F04052803 formulation against *A. parki* larvae

Dilutions	after 3 days		after 6 days	
	Mean Mortality(%)	Control value	Mean Mortality(%)	Control value
500	100.0	100.0	100.0	100.0
1,000	100.0	100.0	100.0	100.0
1,500	100.0	100.0	100.0	100.0
2,000	100.0	100.0	100.0	100.0
3,000	100.0	100.0	100.0	100.0
Control	6.7	-	13.3	-

Table 45. Mortality(%) of *B. thuringiensis* KFRI-2 F04052804 formulation against *A. parki* larvae

Dilutions	after 3 days		after 6 days	
	Mean Mortality(%)	Control value	Mean Mortality(%)	Control value
500	100.0	100.0	100.0	100.0
1,000	100.0	100.0	100.0	100.0
1,500	100.0	100.0	100.0	100.0
2,000	100.0	100.0	100.0	100.0
3,000	100.0	100.0	100.0	100.0
Control	6.7	-	13.3	-

Table 46. Mortality(%) of *B. thuringiensis* KFRI-2 F04052805 formulation against *A. parki* larvae

Dilutions	after 3 days		after 6 days	
	Mean Mortality(%)	Control value	Mean Mortality(%)	Control value
500	93.3	92.8	100.0	100.0
1,000	90.0	89.3	100.0	100.0
1,500	83.3	82.1	100.0	100.0
2,000	76.7	75.0	100.0	100.0
3,000	73.3	71.4	100.0	100.0
Control	6.7	-	13.3	-

Table 47. Mortality(%) of *B. thuringiensis* KFRI-2 F04052806 formulation against *A. parki* larvae

Dilutions	after 3 days		after 6 days	
	Mean Mortality(%)	Control value	Mean Mortality(%)	Control value
500	83.3	82.1	100.0	100.0
1,000	76.7	75.0	100.0	100.0
1,500	76.7	75.0	100.0	100.0
2,000	70.0	67.8	100.0	100.0
3,000	63.3	60.7	100.0	100.0
Control	6.7	-	13.3	-



3) 미국흰불나방에 대한 신개발 Bt KFRI-2제의 살충검정 시험

실험실내에서 F01, F02, F03, F04, F05, F06를 500, 1,000, 1,500, 2,000, 3,000배액으로 희석하여 처리한 기주식물을 마르지 않도록 습식 처리한 곤충사육통(플라스틱, Ø75×H84mm)에 넣고 미국흰불나방의 어린 유충을 채집하여 처리당 10마리×3반복으로 접종하여 처리별 살충효과를 조사한 결과 표 48~53과 같다. 각 제제별 살충효과는 솔나방, 잣나무넓적잎벌의 경우에서와 같이 F03, F04처리구가 가장 우수하게 나타났다. F03, F04처리구는 1일후부터 섭식량이 현저히 떨어지고 움직임 둔화되는 현상을 보였으며 타 처리구는 3일후부터 비슷한 증상이 나타나기 시작하였다. 3일후 F03와 F04는 모든 처리에서 90%이상의 사충율을 보였으며 F05와 F06은 1,000배액이상, F01과 F02는 500배액처리에서만 90%이상의 살충효과를 보였다. 7일후에는 F03과 F04는 모든 처리에서 100%의 살충율을 나타냈고 F05와 F06는 2,000배액이상, F01과 F02는 1,500배액이상에서 90%이상의 살충율을 나타냈다. 미국흰불나방은 산림 내에서는 피해가 거의 없으며 주거지역의 가로수나 정원수에 피해를 많이 끼치는 습성이 있기 때문에 약제 살포시는 인축이나 천적 등에 영향이 적은 농약사용이 절실히 요구되고 있다. 본 시험에 사용된 Bt제는 자연계 내에 존재하는 것으로서 저독성, 저공해성 살충제로 방제효과도 우수하여 산림해충 방제에 매우 적절한 약제로 판단된다.

Table 48. Mortality(%) of *B. thuringiensis* KFRI-2 F04052801 formulation against *Hyphantria cunea* larvae

Dilutions	after 3 days		after 7 days	
	Mean Mortality(%)	Control value	Mean Mortality(%)	Control value
500	90.0	90.0	96.7	96.6
1,000	73.3	73.3	93.3	93.1
1,500	70.0	70.0	93.3	93.1
2,000	53.3	53.3	86.7	86.2
3,000	46.7	46.7	56.7	55.2
Control	0.0	-	3.3	-

Table 49. Mortality(%) of *B. thuringiensis* KFRI-2 F04052802 formulation against *H. cunea* larvae

Dilutions	after 3 days		after 7 days	
	Mean Mortality(%)	Control value	Mean Mortality(%)	Control value
500	93.3	93.3	100.0	100.0
1,000	63.3	63.3	96.7	96.6
1,500	56.7	56.7	90.0	89.7
2,000	43.3	43.3	73.3	72.4
3,000	40.0	40.0	76.7	75.9
Control	0.0	-	3.3	-

Table 50. Mortality(%) of *B. thuringiensis* KFRI-2 F04052803 formulation against *H. cunea* larvae

Dilutions	after 3 days		after 7 days	
	Mean Mortality(%)	Control value	Mean Mortality(%)	Control value
500	100.0	100.0	100.0	100.0
1,000	93.3	93.3	100.0	100.0
1,500	96.7	96.7	100.0	100.0
2,000	93.3	93.3	100.0	100.0
3,000	90.0	90.0	100.0	100.0
Control	0.0	-	3.3	-

Table 51. Mortality(%) of *B. thuringiensis* KFRI-2 F04052804 formulation against *H. cunea* larvae

Dilutions	after 3 days		after 7 days	
	Mean Mortality(%)	Control value	Mean Mortality(%)	Control value
500	100.0	100.0	100.0	100.0
1,000	100.0	100.0	100.0	100.0
1,500	100.0	100.0	100.0	100.0
2,000	96.7	96.7	100.0	100.0
3,000	93.3	93.3	100.0	100.0
Control	0.0	-	3.3	-

Table 52. Mortality(%) of *B. thuringiensis* KFRI-2 F04052805 formulation against *H. cunea* larvae

Dilutions	after 3 days		after 7 days	
	Mean Mortality(%)	Control value	Mean Mortality(%)	Control value
500	100.0	100.0	100.0	100.0
1,000	96.7	96.7	100.0	100.0
1,500	83.3	83.3	96.7	96.6
2,000	73.3	73.3	90.0	89.7
3,000	63.3	63.3	83.3	82.7
Control	0.0	-	3.3	-

Table 53. Mortality(%) of *B. thuringiensis* KFRI-2 F04052806 formulation against *H. cunea*. larvae

Dolutions	after 3 days		after 7 days	
	Mean Mortality(%)	Control value	Mean Mortality(%)	Control value
500	100.0	100.0	100.0	100.0
1,000	93.3	93.3	100.0	100.0
1,500	86.7	86.7	100.0	100.0
2,000	76.7	76.7	93.3	93.1
3,000	76.7	76.7	86.7	86.2
Control	0.0	-	3.3	-

4) 모기에 대한 Bt KFRI-2제제의 살충활성

6종 BT 시제품의 빨간집모기 유충에 대한 살충활성 결과는 표 54에 나타내었다. 살충활성검정결과 2번 제제를 제외한 나머지 다섯 종의 BT 시제품은 처리 48시간 후90%이상의 높은 살충활성을 나타내었다.

Table 54. Mortality(%) of *B. thuringiensis* KFRI-2 formulation against *Culex pipiens pallens* larvae

Formulation No.	concentration(ppm)	Mortality(%)
F04052801	100	100
F04052802	"	70
F04052803	"	100
F04052804	"	100
F04052805	"	100
F04052806	"	96.6

5) 오리나무잎벌레 유충에 대한 Bt KFRI-2제제의 살충활성

6종 BT 시제품의 오리나무잎벌레 유충에 대한 살충활성 결과는 표 2에 나타내었다. 살충활성검정결과 BT3번과 6번 제제가 1000배액 및 2000배액 농도에서 강한 살충활성을 보였으며, 나머지는 약한 살충활성을 보였다.

Table 55. Mortality(%) of *B. thuringiensis* KFRI-2 formulation against *Agelastica coerulea* larvae

Sample(Dilution)	Mortality(%)			
	48hrs	72hrs	96hrs	120hrs
F04052801(1000 x)	6.6%	30%	50%	66.6%
(2000 x)	0	16.6%	26.6%	36.6%
F04052802(1000 x)	0	3.3%	16.6%	23.3%
(2000 x)	0	10%	16.6%	20%
F04052803(1000 x)	100%	-	-	-
(2000 x)	76.6%	83.3%	100%	
F04052804(1000 x)	6.6%	6.6%	6.6%	6.6%
(2000 x)	0	0	3.3%	6.6%
F04052805(1000 x)	3.3%	3.3%	13.3%	20%
(2000 x)	0	0	3.3%	6.6%
F04052806(1000 x)	90%	96.6%	100	
(2000 x)	86.6%	86.6%	93.3%	100

## 제 4 절 결 론

KFRI-2으로 명명된 Bt 균주는 나비목 해충인 배추좀나방과 과밤나방의 방제를 위해 이용되고 있는 Bt subsp. *kurstaki*와 subsp. *aizawai*에 비하여 뛰어난 살충효과를 나타내었으며, 산림해충인 매미나방과 솔나방에 대해서 독성이 높은 내독소 단백질 유전자로 알려진 *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1C*, *cry1D*등을 가지고 있고, 위생 해충인 모기에 대해서도 독성을 보이는 이중 독성 균주로서 산림 해충의 방제를 위한 제품화 도입이 가능할 것으로 기대되었다. 새로운 분리 균주 KFRI-2를 원제로 하여 대량배양을 위한 경제적 배지 소재와 조건을 확립하기 위하여 Bt 균주의 포자형성용 배지로 알려진 GYS 배지와 대량배양 조건에 가까운 7 ℓ fermentor 수준에서의 배양효율을 비교한 결과 Bt KFRI-2 균주가 *kurstaki*와 *aizawai* 균주에 비해 포자 형성 및 내독소단백질 생산에 있어서도 효율적인 균주임을 재확인할 수 있었으며, subspecies가 동일한 *kurstaki*에 비해서는 배양성능이 매우 우수함을 확인하였다. Bt KFRI-2 균주에 적합한 대량배양배지 조건을 선별하고 개선하기 위하여 Bt 내독소단백질 생산용 배지인 GYS 배지 조성파 일반적인 Bt fermentor용 배지 조성을 절충하여 flask 배양실험에 사용할 기본배지를 정하고 이 기본배지의 여러 가지 영양 source를 달리 하여 최종적으로 Bt KFRI-2 균주의 배양에 가장 적합한 배지를 선별하였다. C-source인 glucose의 농도는 기본배지의 2분의 1인 1%, N-source인 Yeast는 기본배지의 2배인 1%로, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 농도는 0.4%, P-source인 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>는 0.1%, sporulation에 중요한 역할을 하는 미량원소 MgSO<sub>4</sub>는 0.1%, MnSO<sub>4</sub> 0.0025%와 CaCl<sub>2</sub> 0.01% 농도조합으로 선별배지를 제작하였다. 최종적으로 선별된 이 배지에서 Bt KFRI-2 균주는 *kurstaki* HD-1 균주에 비하여 포자 및 내독소단백질 생성에서 모두 우수하였으며 따라서 Bt KFRI-2 균주의 배양에 있어서 최적화된 배지임을 재확인하였다.

KFRI-2 균주로 제조한 6가지 제제의 배추좀나방에 대한 살충성 실험결과 F04052803, F04052804 및 F04052805는 높은 살충성을 보유하고 있기에 미생물 살충제 제제로 사용이 가능할 것으로 판단되었다. 또한 제작된 6가지 제제 모두 자외선 조건과 37 °C 열처리 조건하에서 약효가 지속되었다. 제제의 수소이온농도 (pH), 평균입경, 수화성, 현수율, 및 분말도의 5가지 항목에 대한 물리성 조사 실험에서 전체적으로 F04052804 제제가 가장 적합한 제형인 것으로 판단되었으나, 분말도를 높이기 위하여 증량제의 변경을 검토해 볼 필요가 있을 것으로 판단되었다. 나머지 제형의 경우 현수성의 향상을 위한 제제의 검토가 필요할 것으

로 생각되며, 특히 F04052805와 F04052806 제제는 현수성과 더불어 수화성을 높이기 위하여 계면활성제에 대한 검토 필요성이 제기되었다.

야외 생물검정 결과 F04052803과 F04052804 제제 500ppm을 솔나방 유충에 처리했을때 82%의 살충효과를 보였고, 잣나무넓적잎벌 유충에 모든 처리 농도에서 처리 후 6일 이후에 높은 살충율을 보였다. 또한 F04052803과 F04052804를 미국 흰불나방 유충에 333ppm을 처리했을때 처리후 7일 후에 100%의 살충률을 보였다. 그리고 F04052801, F04052803, F04052804와 F04052805를 빨간집모기 유충에 100ppm 농도로 처리했을때 100%의 살충효과를 나타내었다. 오리나무잎벌 유충에 F04052803제제 500ppm을 처리한 후 48시간 후에 100%의 살충효과를 보였다.



## 제 5 절 참 고 문 헌

1. Bai, C., Degheele, D., Jansens, S. and Lambert, B. 1993. Activity of insecticidal crystal proteins and strains of *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera exempta* (Walker). *Journal of Invertebrate Pathology* **63**, 211-215.
2. Baum, J. A. and M. P. Gilbert. 1991, Characterization and comparative sequence analysis of replication origins from three large *Bacillus thuringiensis* plasmids. *J. Bacteriol.* 173: 5280-5289
3. Carozzi, N. B., Kramer, V. C., Warren, G. W., Ecola, S. and Koziel, M. G.. 1991. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 3057-3061.
4. Ceron, J., Covarrubias, L., Quintero, R., Ortiz, A., Ortiz, M., Aranda, E., Linda, L. and Bravo, A. 1994. PCR analysis of the *cryI* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 353-356.
5. Ceron, J., Ortiz, A., Quintero, R., Guereca, L. and Bravo, A. 1995. Specific PCR primers detected to identify *cryI* and *cryIII* gene within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 3826-3831.
6. Chambers, A. J., Jelen, A., Gilbert, M. P., Jany, C. S., Johnson, T. B. and Gawron-Burke, C. 1991. Isolation and characterization of a novel insecticidal crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. *Journal of Bacteriology* **173**, 3966-3976
7. Chang, J. H., J. Y. Roh, Y. H. Je, H. W. Park, B. R. Jin, S. D. Woo, and S. K. Kang. 1998. Isolation of a strain of *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD-1 encoding  $\delta$ -endotoxin Cry1E. *Lett. Appl. Microbiol.* 26: 387-390.

8. Gleave, A. P., Williams, R. and Hedqes, R. J. 1993. Screening by polymerase chain reaction of *Bacillus thuringiensis* serotypes for the presence of *cryV*-like insecticidal protein genes and characterization of *cryV* gene cloned from *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 1683-1687.
9. Hofte, H. and Whiteley, H. R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Review* **53**,242-255.
10. Kalman, S., Kiehne, K. L., Libs, J. L. and Yamamoto, T. 1993. Cloning of a novel *cryIC*-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 1131-1137.
11. Kronstad, J. W., Schnepf, H. E. and Whiteley, H. R. 1983. Diversity of locations for *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. *Journal of Bacteriology* **154**, 419-428.
12. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
13. Laurent, P., Ripouteau, H., Dumanoir, V. C., Frachon, E. and Lecadet, M. M. 1996. A micromethod for serotyping *Bacillus thuringiensis*. *Letters in Applied Microbiology* **22**, 259-261.
14. Moar, W., Pusztai-Carey, M., Faassen, H. V., Bosch, D., Frutos, R., Rang, C., Luo, K. and Adang, M. J. 1995. Development of *Bacillus thuringiensis cryIC* resistance by *Spodoptera exigua* (H?ner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 2086-2092.
15. Nickerson, K. W., St Julian, G. and Bulla Jr, L. A. 1974. Physiology of spore forming bacteria associated with insects : Radiorespirometric survey of carbohydrate metabolism in the 12 serotypes of *Bacillus thuringiensis*. *Applied Microbiology* **28**, 129-132.
16. Ohba, M. and Aizawa, K. 1978. Serological identification of *Bacillus*

*thuringiensis* and related bacteria isolated in Japan. *Journal of Invertebrate Pathology* **32**, 303-309.

17. Schnepf, E., N. Crickmore, J. van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler and D. H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 775-806.

18. Tabashnik, B., Liu, Y., Finson, N., Masson, L. and Heckel, D. G. 1997. One gene in diamondback moth confers resistance to four *Bacillus thuringiensis* toxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 1640-1644.

19. Thomas, W. E. and Ellar, D. J. 1983. *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* crystal  $\delta$ -endotoxin: Effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Cell Science* **60**, 181-197.

20. Visser, B., Munsterman, E., Stocker, A. and Dirkse, W. G. 1990. A novel *Bacillus thuringiensis* gene encoding a *Spodoptera exigua*-specific crystal protein. *Journal of Bacteriology* **172**, 6781-6788.

21. Visser, B., T. van der Salm, W. van den Brink and G. Folkers. 1988. Genes from *Bacillus thuringiensis entomocidus* 60.5 coding for insect-specific toxins. *Mol. Gen. Genet.* 212: 219-224.

22. Whitlock, H. V., Lo, M. C., Kuo, M. H. and Soong, T. S. 1991. Two new isolates of *Bacillus thuringiensis* pathogenic to *Spodoptera litura*. *Journal of Invertebrate Pathology* **58**, 33-39.

23. Wilcks, A., L. Smidt, O. A. Økstad, A. KolstØ, J. Mahillon and L. Andrup. 1999 Replication Mechanism and Sequence Analysis of the Replicon of pAW63, a Conjugative Plasmid from *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* 181: 3193-3200.

## SUMMARY

Insecticidal activity of *B. thuringiensis* isolate KFRI-2 was higher than *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *aizawai* which were commonly used to control *P. xylostella* and *S. exigua*. The KFRI-2 was also toxic to mosquito and contained *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIC* and *cryID* crystal protein genes which were known to be toxic to forestry pest such as *L. dispar*. Growth pattern, sporulation and crystal protein yield of the KFRI-2 were superior to subsp. *kurstaki* and *aizawai* in 7ℓ fermentation using GYS medium. Optimized medium containing 1% glucose as C-source, 1% yeast as N-source, 0.4% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> as P-source, 0.1% MgSO<sub>4</sub> crucial for sporulation, 0.0025% MnSO<sub>4</sub> and 0.01% CaCl<sub>2</sub> was established. Both sporulation and crystal protein yield of the KFRI-2 were superior to subsp. *kurstaki* in this optimized medium. Various combinations of white carbon, kaoline, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NK-PX250L, NK-PX100, NK-SLS, DA203W and Tioxlex25 were selected to make a primary formulation.

To make formulations of Bt KFRI-2, high cell density culture of *Bacillus thuringiensis* KFRI-2 was conducted in modified intermittent fed-batch culture using pilot scale fermentor 2500L. The maximum cell growth was reached to OD 120 and converted to endo-spore & endotoxin stably. The spore yield was 80% based on the maximum viable cell number. Optimal culture condition temperature, initial pH, inoculum size and the others for the toxin production were 30°C, 7.0, 1.0%v/v, glucose 2%, MgSO<sub>4</sub> 0.1%, Yeast extract 3%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.4%, MnSO<sub>4</sub> 0.007%, CaCl<sub>2</sub> 0.01%, trace sol. 0.1ml, respectively. and then the glucose & yeast was feeding after consume glucose. After the mass culture of Bt with the industrial media system, several formulations designated as F01~F08, were made with various combinations of adjustment, white carbon, Tween 20, NK-DA203W, NK-SLS, STPP, ammonium sulfate, insecticidal plant extract, etc. These formulations showed good physical properties in wetness, suspensibility and particle size. The stability test of the deterioration of toxin along the long period stock in various temperature, all products were very stable in room temp. and 40°C. The efficacy of the formulations was verified against diamondback moth

larvae(*Plutella xylostella*) in laboratory and field test. Among the tested formulations, the best composition of *Bacillus thuringiensis* KFRI-2 WP was white carbon based WP formulation containing of 25% of B.t concentrated liquid, 5% of Tween 20 as surface active agent, 5% of sodium tripolyphosphate as stabilizer, 10% of suncap as encapsulation agent, 5% of sodium lignosulfonate as UV protector, 30% of white carbon as absorbent, and 20% of ammonium sulfate as carrier. Especially, when compared commercial *B. thuringiensis kurstaki* type formulation with BSF-S(F05) & BSF-D(F06), plant extract added with insecticidal activity, in field condition, BSF-S(F05) and BSF-D(F06) formulations showed equivalent or superior effect to commercial *B. thuringiensis kurstaki* type WP formulation. Above showed that mortality of BSF-S, BSF-D formulation with insecticidal plant extract was highly enforced than B.t only formulation by synergistic effect. The mortality of mixed formulation appeared faster and higher at 2 days after application than single treatment. These results showed that insecticidal plant extract to complement the weakness of Bt only formulation, the effect revealed slowly.

Field test with six formulations (F04052801~F04052806) of Bt KFRI-2 were also conducted against *P. xylostella*, *Cx. pipiens pallens* and forest insect pests. F04052803, F04052804 and F04052805 showed high insecticidal activity against *P. xylostella* larvae among 6 formulations of the KFRI-2. Also, all 6 formulations showed stability under the condition of ultra-violet and 37°C heat shock. In a test with *Dendrolimus spectabilis* larvae, F04052803 and F04052804 showed 82% insecticidal activity at a concentration of 500ppm. Good insecticidal activity were revealed in six formulations against *Acantholyda parki* larvae at a concentration of 333ppm. F04052803 and F04052804 showed 100% insecticidal activity against *Hyphantria cunea* larvae 7 days later after treatment at a concentration of 333ppm, and F04052801, F04052803, F04052804 and F04052805 gave 100% insecticidal activity against *Cx. pipiens pallens* larvae at 100ppm. Larvae of *Agelastica coerulea* were very susceptible to F04052803 at 500ppm concentration. Whole formulations did not show phytotoxicity at 2,000ppm. On the base of these results, commercialization of Bt KFRI-2 formulations will be conducted after completion of this project.

## 협동연구과제

### BT 제형개발 분야

협동연구책임자 : (주) 비아이지 정종상



## 제 3 장 BT 제형개발

### 제 1 절 서 언

#### 1. Bt KFRI-2균주의 대량배양공정 및 제형 개발

##### 가. 대량 발효조에서의 배양공정의 최적화

영양원인 탄소원과 질소원이 소진된 후에 열에 내성을 가진 내세포자와 살충성 단백질인 crystal을 형성하므로 높은 비율의 포자형성을 유도하기 위해서는 포자형성의 징후가 보일때 배양액 내의 탄소원과 질소원이 동시에 소진되어야 한다.

본 연구에서는 Bt KFRI-2균주의 대량생산을 위한 최적발효조건을 산업화에 적합한 유가식 배양, 연속식배양 등 다양한 배양방식을 적용하여 구멍하고 살충성이 우수한 제제를 만드는 것을 목적으로 하였다. 회분식 배양(batch culture)을 통한 *Bacillus thuringiensis*의 생산은 안전하게 생산할 수는 있는 장점을 지니나 고농도 세포배양을 통한 세포 및 제품의 수율과 생산성을 향상시키는 것은 한계가 있다. 고농도 세포배양을 위한 방법으로 유가식 배양(fed-batch culture), 연속 배양(continuous culture)등의 방법을 사용하고 있다. 선행 연구에서 연속식보다는 유가식 배양방법이 BT균 생산에 적합한 것으로 알려져 있어 산업체에선 유가식 배양방법이 널리 채택되고 있으며 배지를 공급하는 방법 등은 각 제품마다 산업체의 비밀에 해당되기 때문에 잘 알려져 있지 않은 실정이다. 따라서, 본 연구에서도 연속식보다는 변형된 유가식 배양(intermittent fed batch culture) 방식을 적용하여 고농도 배양을 수행하고자 하였다.

본 연구에 사용된 Bt KFRI-2균주도 일반 gram 양성세균인 *Bacillus thuringiensis*와 마찬가지로 포자를 형성하는 시기에 결정성 단백질을 생성하는데, 이 결정 단백질의 생성량과 살충력이 제제의 성능을 좌우하게 된다. Bt KFRI-2균주가 생성하는 살충성 결정단백질의 양과 질은 배양조건, 배지의 조성 등에 따라 달라질 수 있다. 즉, 세포밀도를 최대로 증대시키고 포자 전환율을 높이는 배양조건을 탐색하여 살충성단백질의 최대 생성 효율을 얻고자 하였다.

플라스크 배양(flask culture)을 근거로 하여 5L jar fermentation을 수행하고 5L 조건에 준하여 300L와 2500L 로 scale up하여 최적 조건의 대량배양 조건을 탐색하였다.



## 나. 제제화 연구

고농도 배양을 통해 얻은 세포와 살충성 단백질을 어떻게 효율적으로 농축하고 효과적인 살충력을 발휘하게 제제를 하는 것이 연구의 관건이다. 제제는 유제, 수화제, 액제, 분제, 입제로 구분되며 다양한 오일, 유화제, 분산제, 완충제, 증량제등을 포함한다. 수화성, 균음방지, 취급과 혼합의 편리성을 증진시키기 위한 구성성분이 또한 첨가되고, 제제의 살포시 다른 첨가제가 살충 효율을 증가시키는데, 첨가제로는 전착제, 고착제, 자외선 차단제, 섭식촉진제가 있다.

발효 후 안정된 원제 생산을 위한 down-stram 과정은 두 가지 방법을 사용하였다. 농축과정은 작업 시간등 경제성이 좋은 VMF 방식을 사용하여 농축하였다. 원제를 얻는 첫 번째 방법은 발효 후 cell 농축과정을 거치고 여기에 부형제를 투입하여 hot spray dry하여 Btk 원제를 얻는 방법이고, 두 번째 방법은 발효 후 cell 농축과정을 거치고 여기에 흡착제를 투입하여 흡착시켜 Btk 원제를 얻는 방법을 사용하였다. .

두 가지 방식으로 만들어진 원제를 몇 가지 제형으로 제제화 하여 시험해충인 배추좀나방(*Plutella xylostella* L.)에 대한 실내 실험을 진행하여 우수한 제제를 선발하고 야외 포장시험을 통해 약효를 검증하였다.

## 제 2 절 연구수행 방법

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 당 농도의 분석

발효가 진행되는 상태에서 발효조내 배양액에 미생물에 의해 섭취되는 포도당 농도를 조사하기 위하여 Glucose-lactate analyzer(YSI, USA)를 사용하여 분석하였다. 발효조로부터 일정량을 일정시간 간격으로 채취하여 원심분리한 후에 배양상층액을 Glucose-lactate analyzer(YSI, USA) 측정하여 glucose 소모양상을 조사하였다.

#### 나. 균체농도 측정

균체농도를 측정하기 위하여 spectrophotometer(UVICON 430, Kontron Instruments, Italy)를 사용하였다. 즉 배양액을 멸균증류수로 희석하여 600nm에서 흡광도를 측정하였다. 그리고 건조 균체무게(Dry cell weight, DCW)는 발효조에서 10ml를 취하여 원심분리후에 상등액은 버리고 생리 식염수로 반복 세척한 다음 일정량의 증류수에 현탁하여 95℃에서 40~50 시간 건조 시킨후 desiccator에 보관하면서 측정하였다. 이 결과로 calibration curve를 작성한 다음 OD 수치를 DCW(dry cell weight)로 환산 하였다.

#### 다. 생균수 및 포자 측정

생균수 측정은 시료를  $10^{-1}$ 의 농도로 연속적으로 희석하여 도달한 후 Nutrient agar plate상에서 발생하는 colony를 계수하여 측정하였다. 포자는 배양된 세포를 75℃에서 15min 동안 열처리하여 세포를 사멸시킨 다음, 포자를 생세포와 포자를 구별하고, 생세포수 조사방법과 동일하게 NA plate 상에서 colony를 조사하여 포자수와 포자 형성률을 조사하였다.

#### 라. 5L jar fermentor 에서의 최적화 공정

5L jar fermentor는 비아이지 자체 보유하고 있는 한국발효기 5L fermentor를 사용하여 최적화하였다. 배지는 변형된 GYS배지 조건을 사용하였다. 배지 성분(%)은 glucose 2, yeast extract 2.5,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.4,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1,  $\text{MgSO}_4$  0.1,

MnSO<sub>4</sub> 0.007, CaCl<sub>2</sub> 0.01, trace sol. 0.1ml등을 사용하였으며 Feeding을 위하여 Glucose와 yeast extract를 사용하였다. Seed culture는 본 발효의 10% vol.으로 nutrient broth로 준비하고 배양온도는 30℃, pH는 NH<sub>4</sub>OH와 함께 7.0로 조절 유지하였다. Aeration은 1vvm으로 유지하고 Agitation은 100~1400으로 조절하여 배양 중의 용존산소(DO)를 20% 이상 유지하여 배양하였다.

#### 마. 300L 발효조에서의 최적화

5L jar fermentor에서 이루어진 modified intermittent fed-batch의 최적조건을 단계적으로 working volume 300L 에서 재현하였다.

#### 바. 2500L 발효조에서의 발효 · 생산공정의 최적화 연구

5L와 300L에서 이루어진 결과를 2500L에서 재현하고자 다음과 같이 발효를 수행하였다. 1차 종배양은 본 발효의 5L flask에 2L vol.으로 nutrient broth 로 준비하고 배양온도는 30℃, 140rpm에서 12시간 배양하여 준비하였다. 2차종배양은 300L에서 배양온도는 30℃로 조절하고 pH는 NH<sub>4</sub>OH와 함께 7.0로 조절 유지하였다. 2차 종배양은 배양 12시간 경과하여 working vol. 1000L의 배지가 준비된 2500L 발효조로 멸균 라인을 통하여 집중하였다. 산업용 배지 성분(%)은 다음과 같다. 배지 성분(g/L)은 glucose 2, yeast extract 3, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.4, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1, MgSO<sub>4</sub> 0.1, MnSO<sub>4</sub> 0.007, CaCl<sub>2</sub> 0.01, trace sol. 0.1ml등을 사용하였으며 Feeding을 위하여 Glucose와 yeast extract를 사용하였다. 배양조건은 pH는 7.0, 온도는 30℃로 유지하였으며 aeration은 0.2~1vvm 그리고 agitaiton은 50~250rpm까지 사용하여 배양 중 배지 내 용존산소(DO)를 10% 이상으로 유지하도록 하였다. 발효 수행시 배지내 pH는 NH<sub>4</sub>OH(Industrial grade; Duck san chemical)를 사용하여 조절하였으며 발효기 내부 압력은 0.2bar를 유지 하였다. 2500L발효조에서의 배양공정의 최적화를 위하여 생명공학연구원 산업화 지원실 2500L (KFC2500; Korea Fermentor Co., Korea)를 사용하였다. 이 실험을 위해 사용한 발효기는 2차 종배양을 위한 pilot plant scale 발효조인 300L와 본 배양을 위한 2500L 발효조의 geometric 구조는 Fig. 1 에 자세히 나타내었다. 발효조의 impeller type은 Fed-batch시 발효조 내에서 mixing에 가장 효과적인 제일 하부 1단 impeller는 six-blade type(43%) 그리고 중간부와 상부 impeller는 six-blade pitched type(43%)를 사용하였다. Six-blade pitched type(43%)의 pitched angle 은 30°로 된 impeller를 사용하였다.

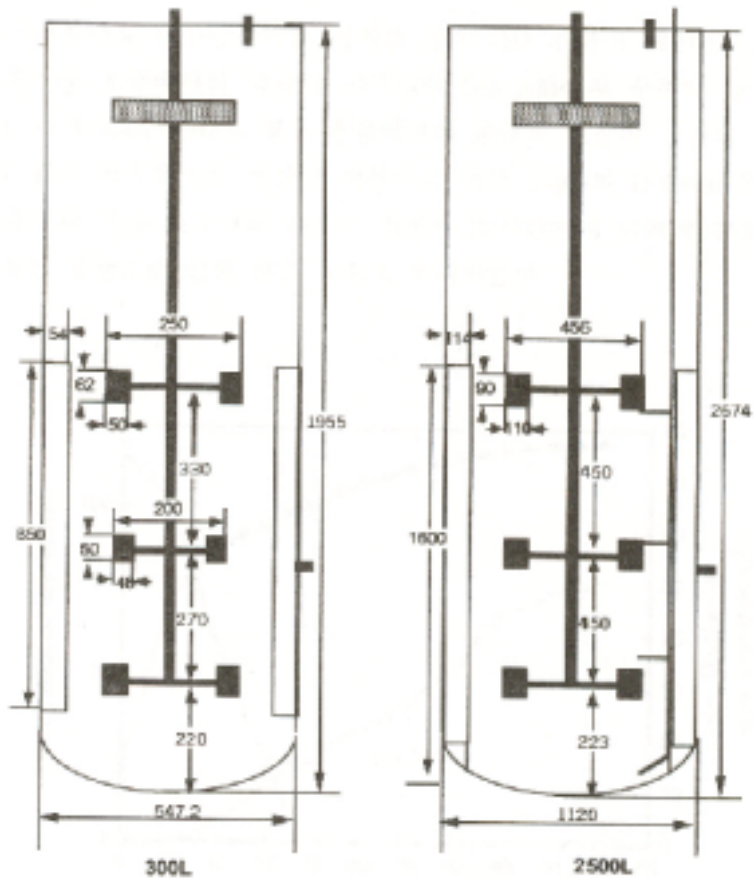


Fig. 1. Geometric structure of 300L and 2500L fermentor for BT KFRI-2 (the numbers indicate the scale in millimeter)

## 사. 발효 후 공정연구 및 제제화 연구

### 1) 정제과정

산업용 원심분리 공정은 basket centrifuge, multi-chamber centrifuge, decanter centrifuge, disc bowl centrifuge, tubular-bowl centrifuge 방식 등 주로 5가지 방식을 사용하고 있다. Bt KFRI-2 균주를 2500L 발효 후 배양액 중의 포자 및 endotoxin의 harvest를 위하여 membrane filtration 방식인 VMF(vibration membrane filtration)과 separator centrifuge 방식인 Kansai centrifuge 방식을 사용하였다(Fig. 2). Separator centrifuge 방식은 긴 원통형 회전 rotor에 시료를 연속적으로 주입시켜 고형질은 rotor내벽에 모이도록 하고 액상은 rotor 밖으로 나오도록 고안된 장비이다. 단위시간당 처리용량은 시료에 따라 시간당 약 24L/hr이다. 단점은 rotor내에 고형질이 쌓이면 이를 제거하기 위해 운전을 중단 해야한다. VMF는 membrane의 vibration을 이용하여 세포 등의 고형물과 상층액을 분리하는 방식으로 720L/hr의 처리 능력을 가지고 있어 매우 효율적인 장비이다.

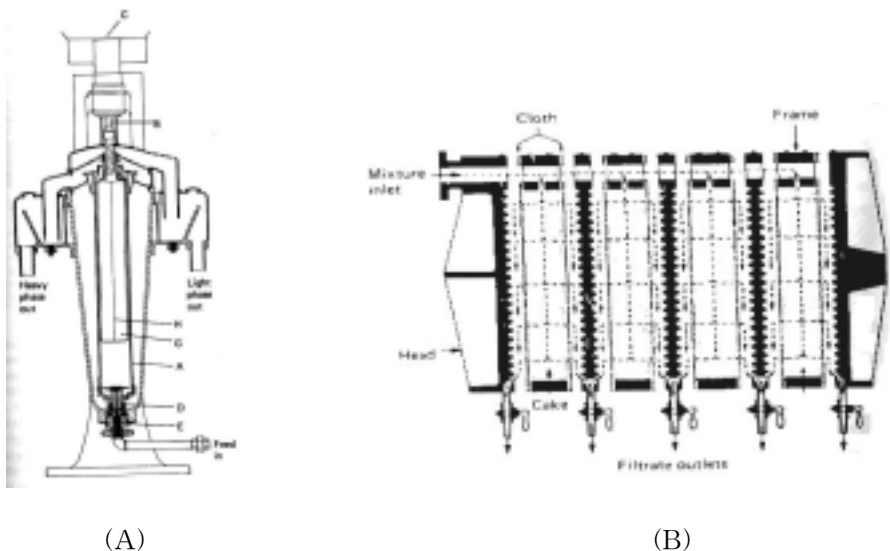


Fig. 2. Construction details for (A) separator centrifuge & (B) membrane filter method.

## 2) 원제제조

농축된 세포원액을 두 가지 방법을 이용하여 원제로 만들었다. 첫 번째 방법은 포집(encapsulation) 기능이 있는 "suncap"이라는 변형전분을 첨가하여 spray dry 시켜 얻는 방법, 두 번째 방법은 "white carbon"이라는 흡착제에 세포원액을 흡착시켜 원제를 얻는 방법을 사용하였다. 두 가지 모두 제제 후에 온도 가속화 실험을 통한 경시변화 cfu/g 를 측정하여 안정화 정도를 검증하고 사용하였다. 캡슐방법은 배양된 Bt KFRI-2 균주를 미생물 안정제로 쓰이는 다양한 polymer와 당류를 이용하여 균안정성에 가장 우수한 것을 선발하기 위하여 sucrose, trehalose, lactose 등 10% solution 50ml을 만들어 세포 현탁액 10ml과 혼합한 후 약 5분 동안 homogenizing 한 후에 분무 건조를 하였다. Spray dry 조건은 inlet 온도는 130℃, outlet 온도는 95℃로 하여 건조 하였다. 건조 후 각 시료를 채취하여 각 시료의 생균수(c.f.u/g)를 측정하여 spore의 생존을 조사하여 안정성을 조사하였다. 이 실험을 통하여 선발된 당류나 polymer를 2500L 배양 후 harvest 후 안정제로 첨가하여 분무 건조하여 technical powder를 만들었다. 또한, white carbon 에 흡착하는 방식을 사용한 제제와 같이 상온과 40℃에서 경시변화를 관찰하고 배추즙나방을 대상으로 살충력을 검증하였다.

### 아. 발효후 제제화한 미생물원제 단백질독소 분석

원제간의 내독소단백질량을 비교하기 위하여 각각의 원제를 전기영동한 후 gel analysis system을 이용하여 분석하였다. SDS-PAGE는 Laemmli (1970)의 방법을 개선하여 수행하였다. 준비된 시료에 일정량의 5 × sample buffer [0.625 M Tris-HCl (pH 6.8), 25% glycerol, 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue]를 넣고 충분히 혼합시키고 100℃에서 7분 동안 가열하였다. 그 용액을 15,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상청액을 회수하고 이를 10% separating gel에 100 V, 2시간 동안 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 후 젤은 0.1% Coomassie brilliant blue (Sigma Co., 미국) 용액에 30분간 염색하고 탈색 용액 (10% methanol, 10% acetic acid)으로 1시간 동안 탈색하였다. 단백질 정량 분석을 위해 단백질 양이 알려져 있는 Perfect Protein<sup>TM</sup> Marker (Novagen Co., 독일)를 사용하였다. 전기 영동한 gel은 Kodak 1D gel analysis system (미국)을 이용하여 분석하였다.

## 자. 미생물원제와 제제화에 따른 살충활성 검정

### 1) 실내실험

Pilot plant scale에서 발효 생산한 미생물원제의 살충활성을 검정하기 위하여 실내시험을 진행하였으며 시험해충은 감수성 계통의 배추좀나방(*Plutella xylostella* L.)을 한국화학연구원에서 분양 받아 누대사육한 3령충을 사용하였다. 실험방법은 침지법(leaf dipping method)에 따라 수화제를 Tween20 200ppm에 희석한 후 배추잎을 30초간 침지시키고 음지에서 건조한 다음 생물검증 용기에 넣어 배추좀나방(*Plutella xylostella* L.) 3령충을 각 처리구 3반복 당 10마리씩 접종 24hrs, 48hrs 후 사충수를 조사하였다. 대조구로는 시판중인 A(Bt subsp. *kurstaki* type formulation)제품을 사용하였으며 무처리구는 Tween 20 200ppm 희석액에 침지하여 시험충을 접종하였다.

### 2) 야외 실험

선발된 formulation을 야외에서 살충활성을 검정하기 위하여 3개 지역을 선정하여 포장시험을 진행하였다. 포장은 충북 청원군 현도면, 경기도 여주군 백사면, 경북 상주에서 가가 진행되었으며 배추좀나방, 배추흰나비, 목화도둑명나방 3가지 해충에 대하여 살충활성을 검증하였다. 시험방법은 난괴법 3반복으로 진행하였으며 약체 처리전 사전밀도를 조사하고 2일 후 7일 후 약효 조사를 하였다. 처리약제는 모두 1000배로 희석하여 살포하였다. 2일차 조사는 약제의 속효성을 보기 위하여 진행되었다.

## 차. 제제화된 시제품의 물리성

제제화한 시제품의 물리성은 국립농업자재검사소 고시 공정검사방법(국립농업자재검사소 1933)에 준하여 수화성, 현수성 및 분말도를 조사하였다.

### 제 3 절 연구 결과 및 고찰

#### 1. 5L jar 발효조에서의 배양공정 최적화 연구

working volume 2L로 변형된 GYS 배지 성분(%)은 glucose 2, yeast extract 2.5,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.4,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1,  $\text{MgSO}_4$  0.1,  $\text{MnSO}_4$  0.007,  $\text{CaCl}_2$  0.01, trace sol. 0.1ml 으로 회분식 배양(batch culture)을 수행한 결과 다음의 그래프와 같이 세포의 최대 OD 50 까지 성장하였다(fig. 3). 대부분의 산업화 공정에서 연속적 배양보다는 유가식 배양방법을 채택하여 생산하고 있어 본 연구에서도 변형된 유가식 배양 방법을 적용하였다. glucose 를 feeding 하기 위해 yeast extract 를 2.5%에서 4.0%로 늘려서 발효 배지를 제조하였다.

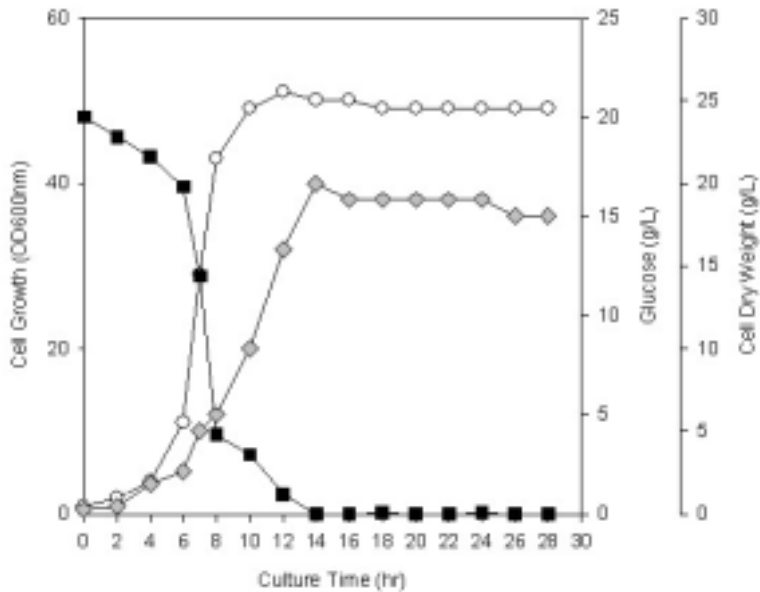
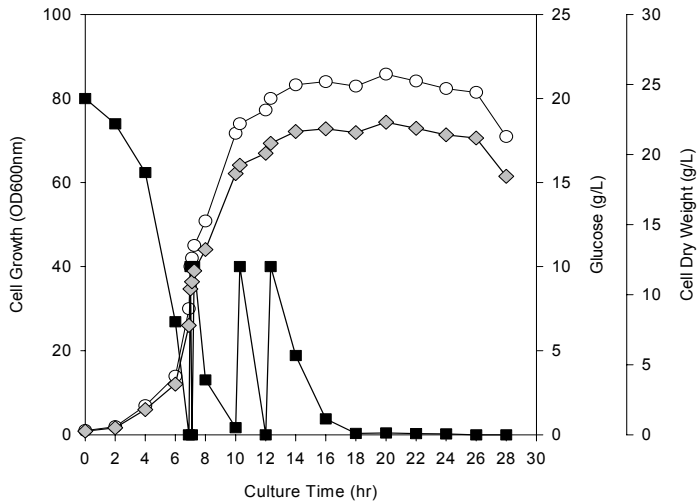


Fig. 3. Growth pattern and glucose utilization of the Bt KFRI-2 strain on batch culture in small scale fermentor(5L)

(Open circle ; cell optical density 600nm, closed square ; glucose, gray diamond ; cell dry weight)

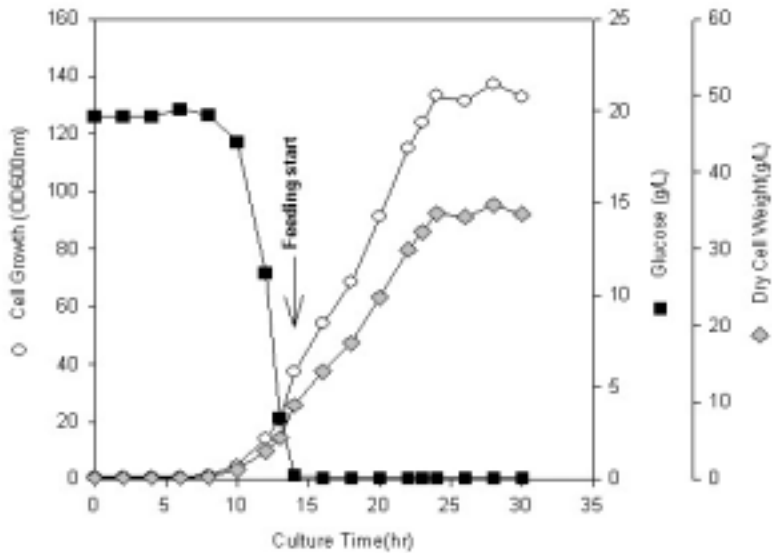


이것은 glucose를 feeding 함으로 C source와 N source의 비율을 맞추어 주기 위함이다. 발효 중 탄소원이 고갈되는 시점에 glucose를 10g/L 비율로 즉, 20g을 30ml에 녹여 3회 첨가하여 세포의 고농도 배양을 유도하였다. 그 결과 세포의 최대 성장은 OD 80에 까지 이르렀다. 포자의 형성은 탄소원 고갈 이후 약 4-5시간 경과 후 부터 시작하여 발효 종료시 80%이상의 포자로 전환되었다(fig. 4 ).



**Fig. 4. Growth pattern and glucose utilization of the Bt KFRI-2 strain on intermittent fed-batch culture in small scale fermentor (5L)**  
(Open circle; Cell optical density 600nm, closed square; glucose, gray diamond; cell dry weight)

유가식 배양방법(fed-batch culture)을 통한 고농도세포 배양을 유도하기 위해 위의 변형된 유가식 배양조건의 배지와 배양조건을 같이하여 배양을 시도하였다. 그러나 탄소원이 고갈될 시점에서 feeding medium을 glucose와 yeast extract를 준비하여 탄소원이 고갈되는 시점부터 glucose를 10g/L/hr의 속도로 공급하면서 배양하였다(fig. 5). 단위 batch당 Bt KFRI-2가 생산하는 endotoxin 및 endospore의 양을 고농도로 생산하고자 하였다. 그 결과 세포의 성장은 OD 140에 이르도록 성장하였다. 세포건조중량은 약 35g/L로 생산되었다. 따라서 기존의 BT 균주 생산공정이 발효시간이 길고 단위 batch당 세포 생산량이 적은 배양공정을 개선하였다. 그러나 glucose를 첨가하는 량과 소모되는 시간을 정확히 맞추지 못하면 과량의 glucose가 배지에 남아 있게 되므로 포자 형성에 소요되는 시간이 길어지고 포자 형성율이 낮은 단점이 있었다.



**Fig. 5. Fed batch cultivation by glucose & yeast extract addition.**  
 (Open circle ; cell optical density 600nm, closed square ; glucose, gary diamond ; cell dry weight)

따라서, 실제적인 산업화 생산에 적합한 최대의 생산 효율과 포자 형성률을 나타내는 배양조건을 찾고자 변형된 유가식 배양 방법을 통한 다양한 배지 조건으로 실험을 계속하였다. 배지 성분(%)은 glucose 2, yeast extract 4,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.4,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1,  $\text{MgSO}_4$  0.1,  $\text{MnSO}_4$  0.007,  $\text{CaCl}_2$  0.01, trace sol. 0.1ml 조건으로 Fig. 4의 실험에서 glucose를 10g/L로 3회 feeding 한 것을 용량을 높여 20g/L로 3회 feeding 을 하였다. 세포의 최대 성장은 OD 100 이상을 나타냈지만 배지의 glucose 감소량을 분석한 결과 최초 2회의 feeding 까지는 glucose 소모가 빨리 일어나지만 3회 feeding 한 후는 매우 천천히 일어나는 것으로 조사되었다. 즉, 과량의 glucose가 배지 속에 남아 있어 포자형성 지연의 결과를 초래하였다(data not show).

위의 결과를 바탕으로 배지 성분의 조정을 통하여 배지 성분(%)은 glucose 2, yeast extract 3,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.4,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1,  $\text{MgSO}_4$  0.1,  $\text{MnSO}_4$  0.007,  $\text{CaCl}_2$  0.01, trace sol. 0.1ml 조건으로 탄소원이 고갈되는 시점에 glucose를 20g/L 로 3회 feeding 하고 마지막 3회 feeding 시에 yeast extract 를 10g/L 로 같이 feeding 하는 방법을 사용하였다. 결과는 fig 5의 유가식 배양과 비슷한 수준의

세포 성장을 볼 수 있었으며, 유가식 배양 방식의 단점인 포자 형성 시간 지연과 낮은 포자 형성률의 단점을 극복할 수 있었다. 또한, 유가식 배양시 연속적인 배지 투입에 소요되는 장비와 비용을 덜 수 있게 되었다(fig. 6).

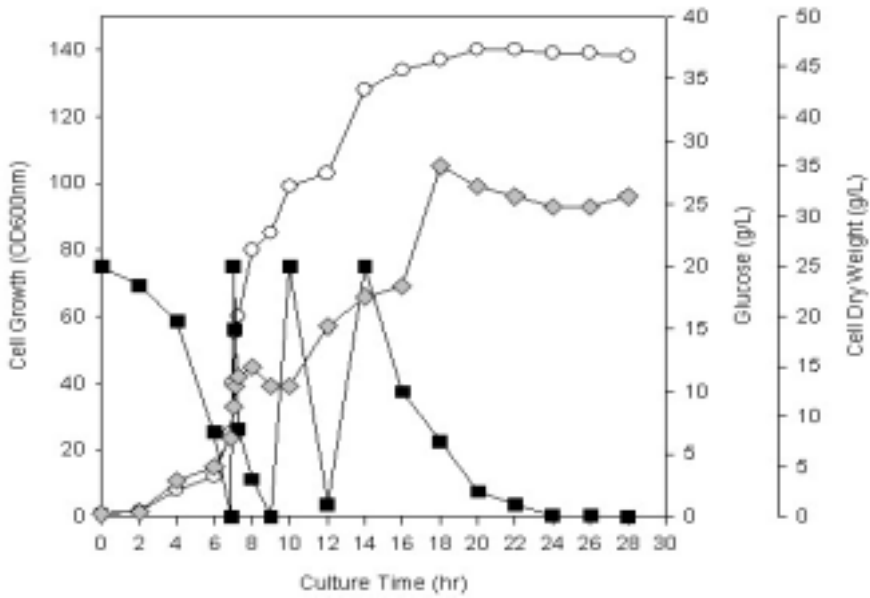


Fig. 6. Growth pattern and glucose utilization of the Bt KFRI-2 strain on intermittent batchculture in small scale fermentor(5L)

(Open circle ; cell optical density 600nm, closed square ; glucose, gray diamond ; cell dry weight)

## 2. 300L 발효조에서의 Bt-KFRI-2 균주 배양공정의 최적화 연구

온도 및 pH, agitation, aeration 등의 배양요소를 고려하여 비교적 최적화된 위의 결과를 가지고 300L 발효조에서 5L jar 발효조의 결과를 재현하고자 하였다. 배지 성분 (%) glucose 2, yeast extract 2.5,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.4,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1,  $\text{MgSO}_4$  0.1,  $\text{MnSO}_4$  0.007,  $\text{CaCl}_2$  0.01, trace sol. 0.1ml 조건으로 회분식 배양(batch culture) working vol. 100L에 멸균하여 준비된 발효조에 2L용량의 OD 5.234로 성장한 세포를 접종하였다. 저용량(5L) 발효조와 다른 발효 조건은 배양기내 압력을 0.25bar로 유지 하였다. Aeration은 DO probe의 감도 문제로 초기 0.16 vvm을 유지하였다. 다음의 그림은 300L pilot plant fermentor에서 다른 영양원의 공급 없이 Batch culture 방식으로 배양한 결과이다. 그 결과 세포의 성장은 약 40 OD에 이르게 성장하였다. 세포건조중량은 약 12g/L가 생산 되었다. 이 생산성은 5L 발효조의 결과와 비슷한 수준의 것으로 나타났다(data not show).

5L jar 발효조에서 최대의 세포성장을 유도하는 변형된 유가식 배양 조건인 배지 성분(%) glucose 2, yeast extract 3,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.4,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1,  $\text{MgSO}_4$  0.1,  $\text{MnSO}_4$  0.007,  $\text{CaCl}_2$  0.01, trace sol. 0.1ml 조건으로 탄소원이 고갈되는 시점에 glucose를 20g/L 로 3회 feeding 하고 마지막 3회 feeding 시에 yeast extract 를 10g/L 로 같이 feeding 하는 방법을 사용하여 결과를 재현하였다(fig. 7). 최대 세포 성장 OD 120이며, 포자 형성 시간과 형성률은 적절하게 이루어졌다. 배양액은 VMF (vibration membrane filtration)을 이용하여 포자를 harvest하여 in let temp. 113°C, out let temp. 98°C로 유지하여 spray dry하였다. 그 결과 technical powder가 약 4.65kg이 나왔고 포자수는  $6.92 \times 10^{10}$  c.f.u/g이며 총균수는  $3.2 \times 10^{14}$  cell로 나타났다.

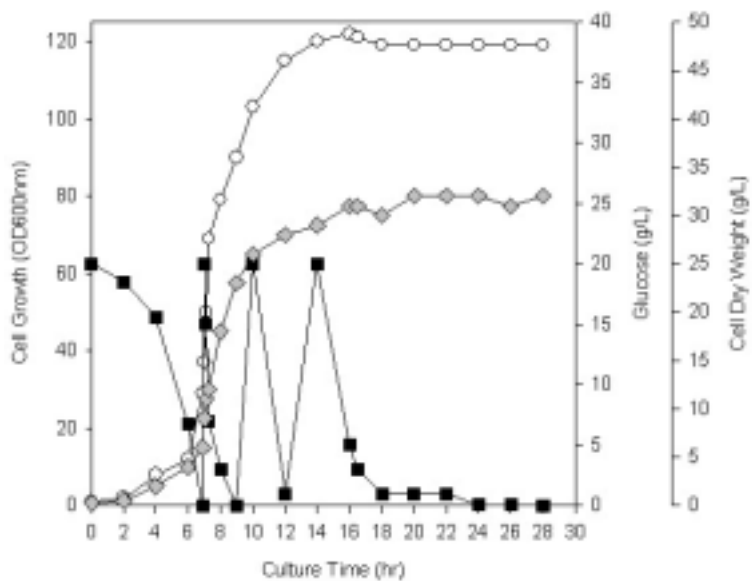
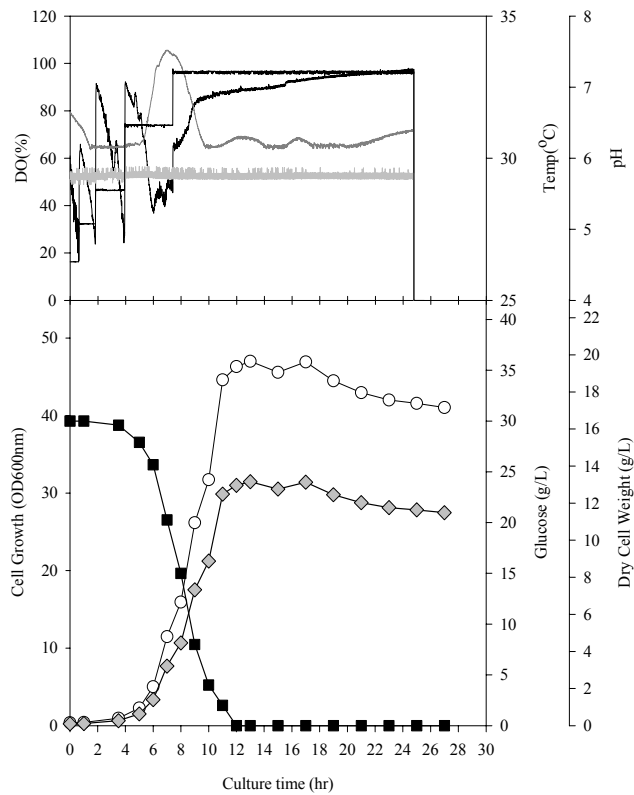


Fig. 7. Growth pattern and glucose utilization of the Bt KFRI-2 strain on intermittent batch culture in pilot scale fermentor (300L) (Open circle ; cell optical density 600nm, closed square ; glucose, gray diamond ; cell dry weight)

### 3. 2.5톤 발효조에서의 Bt KFRI-2균주 배양공정의 최적화연구

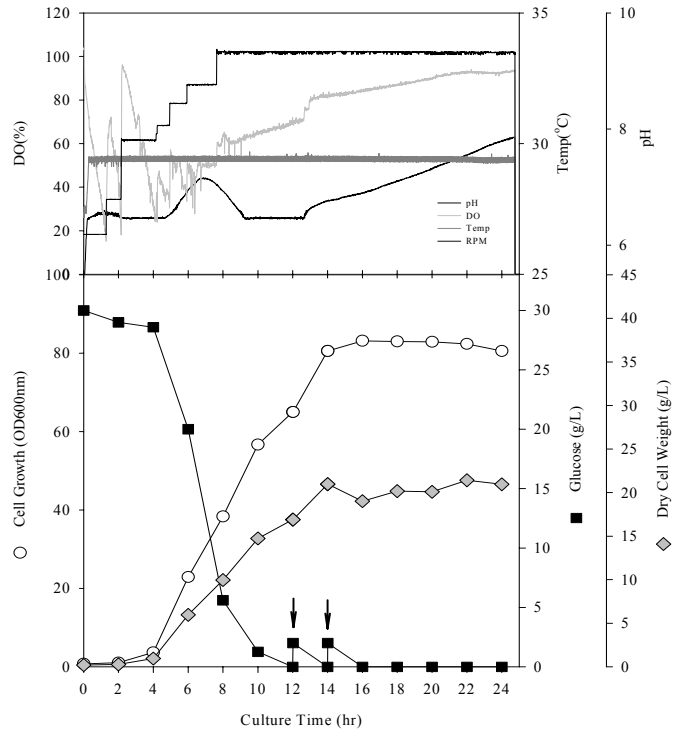
2500L scale에서 working volume 1000L의 배양공정을 최적화하기 위하여 pilot plant scale의 조건을 참고하여 발효를 시도하였다. 배양조건은 1차 종배양은 5L flask에 2L의 배지를 준비하여 30℃, 150rpm에서 12시간 배양하여 세포의 성장이 OD 4.03정도 자란 균주를 2차 배양의 종균으로 사용하였다. 2차 종배양은 300L(Korea Fermentor Co., KFC300)에 working vol. 100L로 준비하고 aeration은 0.5~1vvm, agitation은 50~300rpm 조절하여 배양액 내의 용존 산소를 20% 이상 유지 하였다. 온도는 1차 종배양과 같이 30℃, pH는 NH<sub>4</sub>OH용액과 함께 7.0로 조절하였다. 발효조내 내부 압력은 0.2bar로 유지하여 12시간 배양한 결과 2차 종배양 후 세포의 성장은 OD 8.2까지 성장하였다. 이와 같이 배양된 2차 종배양된 균주를 300L 발효조에서 2500L 발효조로 멸균라인을 통하여 접종을 하였다. 다음의 2500L 발효조 배양은 5L와 300L에서와 같은 배지 조건으로 batch fermentation을 시도하였다. 그 결과 세포의 성장은 pilot plant scale에서 배양한 결과 비슷한 성장을 나타낸 최고 OD 46까지 성장 하였다. 이때 Dry cell weight는 13.3g/L로 나타났으며 Glucose가 소진된 이후 4시간 정도 경과한 배양 16시간 경과하여 sporulation이 시작되었다. 배양 24시간 경과하여서는 세포벽이 붕괴되기 시작하여 endotoxin과 spore가 분리된 것들도 관찰 되었으며 80% 이상 포자를 형성하였다.



**Fig. 8. Production of Bt toxin in batch culture by using 2,500L fermentor with six-blade type impeller.**

Closed square; glucose, opened circle; Cell OD(600nm), opened diamond; dry cell wight

두 번째 2500L 배양은 modified intermittent feeding 방식으로 feeding을 하여 단위 batch당 세포 수확량을 높이고자 하였다. 다음의 그림에서와 같이 탄소원인 glucose을 initial glucose와 첨가된 glucose가 고갈되는 시점에서 feeding을 하였다. 2회에 걸쳐 각각 20g/L의 glucose를 멸균하여 첨가하여 세포의 고농도 성장을 유도하였다. 그 결과 다음의 그림과 같이 발효 16시간 경과하여 세포의 성장이 5L와 pilot plant scale 수준에 이르는 최고 OD 83에 까지 이르렀다. 이때 dry cell weight는 21.58g/L에 이르렀다. 탄소원이 소진된 배양 16시간 경과 이후 약 6.5~7시간 경과 후에 sporulation이 시작되었다. 고농도 배양을 위해서는 feeding medium을 계속적으로 feeding하여 단위 batch당 포자 수확량을 극대화해야 한다.



**Fig. 9. Growth pattern and glucose utilization of the Bt KFRI-2 strain on intermittent fed-batch culture in 2,500L fermentor.**  
 Open circle; cell optical density(600nm), Closed square; glucose, Gray diamond; cell dry weight

마지막으로 5L와 300L에서 최대의 세포 성장을 나타내는 조건을 2500L에서 재현하였다. 배지와 배양조건은 두 번째 방법과 동일하며 glucose를 20g/L 로 3번 feeding 하고 세 번째 glucose feeding 시에는 yeast extract 10g/L 도 같이 첨가 하여 배지의 탄소원과 질소원의 비율을 맞추어 세포의 최대 성장을 유도하였다. 그 결과 세포의 성장은 pilot plant scale 에서와 비슷한 배양 결과를 나타내 최고 OD 120 까지 성장하였다(Fig. 10). glucose가 완전히 소진된 이후 5시간 경과 후부터 포자 형성을 시작하여 harvest 시점인 총 배양시간 48시간 후에는 90%이상의 포자를 형성하였고 내생포자와 살충성단백질의 lysis가 일어나기 시작하였다. 여기 그림을 제시하진 않았지만 모든 발효는 2500L 발효조에서 working



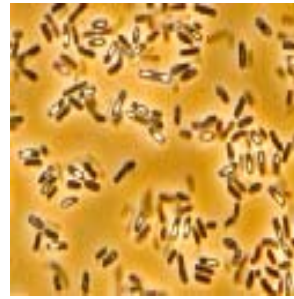
volume 1000L 로 발효를 수행하였으나 volume을 1500L 로 상향조정하여 같은 결과를 재현하였다. 배양액은 VMF (vibration membrane filtration)을 이용하여 1/10 vol.으로 농축하여 제제에 필요한 발효원액으로 사용하였다. 농축된 원액의 포자수는  $4.00 \times 10^{10}$  c.f.u/ml이며 1회의 발효로 총150L의 농축액을 얻었으며 총균 수는  $6.0 \times 10^{15}$  cell로 나타났다. 따라서, 단위 면적당 생산 수확량을 늘릴 수 있었다.



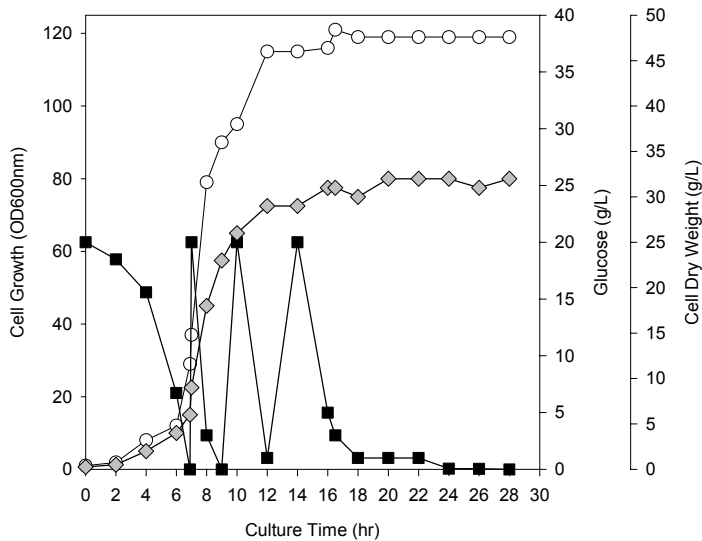
6hr culture



24hr culture

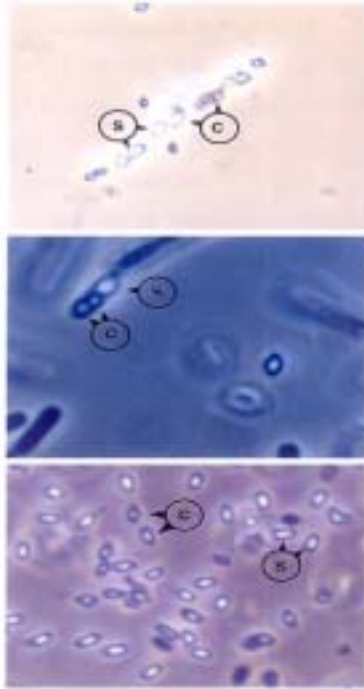


48hr culture

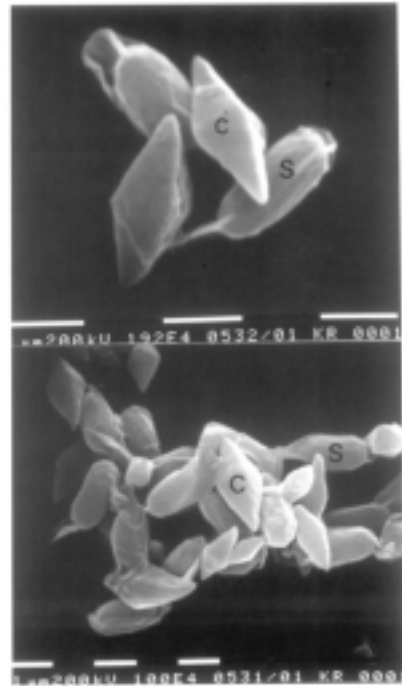


**Fig. 10. Growth pattern and glucose utilization of the Bt KFRI-2 strain on intermittent fed-batch culture in small scale fermentor**  
 (Open circle; Cell optical density 600nm, closed square; glucose, gray diamond; cell dry weight)

이상의 결과를 종합해 보면 변형된 유가식 배양방법(modified intermittent fed-batch)을 사용하여 세포 수확의 최대 효율적 방법을 모색하였다. 2500L에서 working volume 1500L, 온도 30°C, pH 7.0(control with NH<sub>4</sub>OH), 배지 성분(%) glucose 2, yeast extract 3, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.4, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1, MgSO<sub>4</sub> 0.1, MnSO<sub>4</sub> 0.007, CaCl<sub>2</sub> 0.01, trace sol. 0.1ml 조건으로 배양을 시작하고 탄소원이 고갈되는 시점에 glucose를 20g/L 로 3회 feeding 하고 마지막 3회 feeding 시에 yeast extract 를 10g/L 로 같이 feeding 하여 단위 면적당 최대의 세포성장과 포자 형성을 유도하였다. 발효를 진행하는 중간에 배지 원료 중 가장 큰 비중을 차지하는 yeast extract 를 대체하고자 탐색하였으나 단위 면적당 세포 성장률이 너무 저조하여 yeast extract 이상의 산업적 가치를 지닌 원료를 찾지 못하였다(data not show). 따라서, 이상의 조건에서 더 큰 발효조의 scale up과 가장 좋은 효율을 찾는 것이 바람직 할 것으로 판단된다.



(A)



(B)

Fig. 11. (A) Parasporal(C) and (S) of *B. thuringiensis* KFRI-2 observed by phase contrast microscopy. (B) Parasporal inclusions (C) of spores(S) *B. thuringiensis* KFRI-2 observed by scanning electron microscopy. White bar indicates 1.0um

(정리) *B. thuringiensis* KFRI-2 균주의 대량 배양 최적화 조건

1. 균주: *B. thuringiensis* KFRI-2

2. Seed & Inoculation

- ① Temp. : 30℃
- ② Agitation : 140rpm
- ③ Seed age : for 12hr
- ④ Seed Medium : Nutrient broth
- ⑤ Seed vol. : 10 %

3. Main Fermentation(300L, 2500L)

1) 배지: modified GYS (%)

Glucose.....	2
Yeast Extract.....	3
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0.1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	0.4
MgSO <sub>4</sub> .....	0.1
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O.....	0.007
CaCl.....	0.01

2) Fermentation condition

- ① Temp.: 30℃
- ② pH : 7.0 control with NH<sub>4</sub>OH
- ③ Agitation : 100 ~ 800 (DO 20% 이상유지)
- ④ Aeration : 1 ~ 0.5 vvm
- ⑤ Fermentation mod : modified intermittent fed-batch fermentation

3) operating condition

- ① Nutrient broth 로 12hr culture 후 변형된 GYS 배지로 만들어진 300L 발효조에 seed.
- ② 300L 발효조에서 working volume 100L로 12시간 발효 후 working vol. 1,500L 의 2500L 발효조로 멸균 라인을 통해 transfer.
- ③ 발효 시작 후 modified intermittent fed-batch 방식을 적용하여 initial glucose 고갈되는 시점에 glucose 20g/L conc.로 3회 feeding. 3회 feeding 시에

yeast extract 10g/L 로 같이 feeding.

⑤ 발효시간은 약 48hr 유지하여 90%이상의 포자 전환 유도 후 cell lysis 가 일어나기 직전에 harvest을 포함한 down stream 과정을 거친다.

#### 4. 세포 수거 및 농축방식에 따른 toxin 함량 및 살충력 비교

##### 가. 세포농축 방식에 따른 toxin 함량 비교

Kansai 방식과 VMF 방식의 차이를 비교하기 위해 kansai 방식으로 300L 배양 원제 (0.3T), 2.5 ton 배양 원제 (2.5T)를 농축하고, VMF 방식으로 2.5 ton 배양 원제 (2.5T-VMF)를 농축하였다. 3가지 방식에 대한 내세포자의 수를  $3.0 \times 10^8$  cfu/ml 으로 조절한 다음 각각 1 g씩 증류수 10 ml 희석하였다 (100 mg/ml). 각 원제의 희석액을 1/5과 1/25로 희석하고 이렇게 얻은 3개 농도구의 희석액 50  $\mu$ l 와 5 × 단백질 sample buffer 50  $\mu$ l을 섞어 재현탁하였다. 이중 20  $\mu$ l를 12% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하여 분석하였다 (Fig. 10). Bt KFRI-2 균주에 있어서 약 130 kDa의 Cry1에 해당되는 내독소단백질과 더불어 약 65 kDa에 해당되는 Cry2 type의 단백질이 있으나 전기영동상에 뚜렷하게 나타나지 않아 분석에서는 제외하였고 Cry1 type만을 분석하였다. 전기영동에 사용된 시료를 원제의 양으로 환산하면 각각 1, 0.2, 0.04 mg 이었다. 1 mg 시료의 경우 분석은 가능하였으나 세 가지 원제 모두 0.2 mg의 경우에 비하여 단백질량이 적게 보임으로 시료의 양이 너무 진하여 시료가 적절하게 만들어지지 못한 것으로 판단되었고 0.2 mg과 0.04 mg에서는 분석이 가능하였다. 원제 0.2 mg내의 내독소단백질의 양은 2.5T가 가장 많았고 다음으로 0.3T와 2.5T-VMF였고 원제 0.04 mg에서도 마찬가지로 2.5T가 가장 많았고 다음으로 0.3T와 2.5T-VMF였다 (Table. 1). 두 농도구에서 평균적으로 0.3T는 1 g 당 5.4 mg, 2.5T-VMF는 5.1 mg이고 2.5T는 6.5 mg에 해당하는 내독소단백질이 존재하였다. 이상의 결과 원제내의 내독소단백질량은 2.5T, 0.3T, 2.5T-VMF 순으로 높게 나타났다. 이것은 membrane 방식의 VMF로 harvest하는 것은 endotoxin이 손실이 생긴다는 것을 추정할 수 있다. 이론적으로 VMF 방식의 filter pore size는 0.4 $\mu$ m로 endotoxin의 size 보다 작아 toxin 이 빠져나가지 못하지만 기계적인 문제로 인한 loss 인 것 같다. 하지만 Kansai centrifuge 방식은 상대적으로 작업시간이 길고 많은 노동력이 소요된다. 따라서 이런 경제성을 제고 한다면 VMF방식이 더 효과적일 것이다.

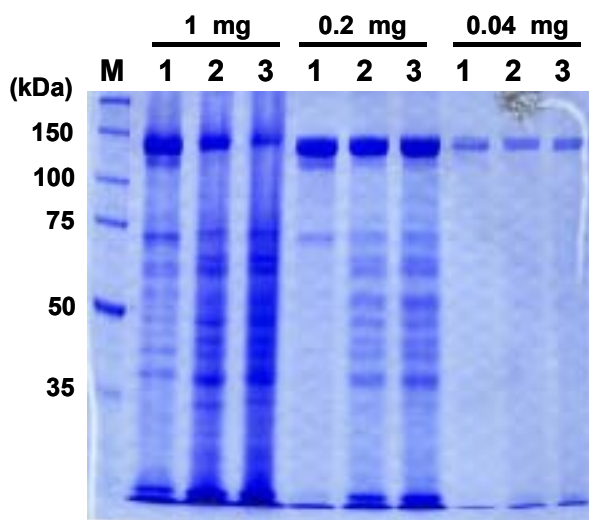


Fig. 12. SDS-PAGE analysis of Bt KFRI-2 endotoxin proteins.  
Lanes: M, Perfect Protein Marker; 1, 0.3T; 2, 2.5T-VMF; 3, 2.5T.

Table 1. Comparison of insecticidal crystal proteins concentration among products.

Mass fo Products	Con. crystal proteins	measured value ( $\mu\text{g}$ )
1 mg	0.3T	0.91
	2.5T-VMF	0.47
	2.5T	0.28
0.2 mg	0.3T	1.00
	2.5T-VMF	0.92
	2.5T	1.20
0.04 mg	0.3T	0.23
	2.5T-VMF	0.22
	2.5T	0.28

#### 나. 발효조 및 농축방식에 따른 Bt KFRI-2 원제의 살충활성 실험

Bt KFRI-2 균주를 pilot plant scale인 300L와 2500L 발효조에서 배양하여 VMF 방식으로 harvest 한 농축원제 내생포자  $4.0 \times 10^{10}$  cfu/g로 조절하여 미생물 원제를 20,000배, 40,000배, 80,000배로 희석하여 배추좀나방(*Plutella xylostella* L.)에 대한 살충 활성을 조사하여 보았다. 300L와 2500L발효의 차이는 포자형성과 endotoxin 형성은 별 차이가 없었다. 다만 균체 harvest시 300L는 Kansai centrifuge 방식을 사용하고 2500L는 VMF방식을 사용하여 harvest하였다. 그러나 위의 SDS-polyacrylamide gel를 이용한 전기영동 분석에 의한 결과도 300L와 2500L에서의 toxin량의 차이는 유의할 수준은 아니다. 그러나 전체적으로 300L에서 생산한 원제와 2500L에서 생산한 원제에 대한 살충활성을 조사한 결과 300L에서 조금 좋은 결과를 나타냈다. glucose 가 완전히 고갈된 후 내생포자로 전환시 endotoxin이 같이 만들어지는 Bt KFRI-2의 특성상 발효 batch 별 효율의 차이에서 기인하는 문제인 것으로 판단된다.

Table 2. Insecticidal activity of Bt KFRI-2 endotoxin about 3rd *Plutella xylostella* L. on fermentation scale(pilot plant; 300L & 2500L).

Fermentor	Dilution rate	No. of dead insect/No. of total insect			Mortality(%)
		1 repeat	2 repeat	3 repeat	
300L	20,000	8/10	7/10	5/10	66.7
300L	40,000	7/10	6/10	7/10	66.7
300L	80,000	4/10	7/10	6/10	56.7
2500L	20,000	4/10	3/10	8/10	50.0
2500L	40,000	2/10	6/10	5/10	43.3
2500L	80,000	2/10	1/10	4/10	23.3
Control	-	0/10	0/10	0/10	-

위의 두 실험결과는 300L와 2500L 발효가 정상적으로 최대의 세포 성장을 하고 효율적으로 포자로 전환되면서 toxin 을 생성했음을 보여준다.



## 5. Bt KFRI-2 원제의 최적화 제제방안 검토

### 가. 스프레이 드라이를 통한 원제의 안정화 방법.

Hot spray dry 조건에서 Bt KFRI-2의 spore와 toxin 은 열에 어느 정도 안정하나 최적의 spray dry 조건과 활성을 유지시킬 수 있는 열 안정화 물질을 탐색하고자 다양한 당류와 polymer를 대상으로 테스트 한 결과 다음의 표와 같은 결과가 나왔다. 포자수 측정은 80℃에서 10분간 열처리하여 세포를 사멸시킨 다음 통상의 평판희석법을 사용하여 측정하였다. hot spray dry 전 각각의 시료에 들어 있는 내세포자의 수는  $1.80 \times 10^9$  c.f.u/ml이었다. 각각의 시료는 levan을 제외하고 10% 수용액 100ml을 제조하고 여기에 cell 배양액 10ml를 혼합하여 균질화(homogenization)시킨 후 hot spray dry과정을 수행하였다. control은 cell 배양액 자체 100ml을 분무 건조하였다.

Table 3. Stability and efficiency of Bt KFRI-2 on various sugar at spray dry

	Concentration /brix	c.f.u/g	weight after SD(g)	Recovery rate(%)
Control	-/5	$2.0 \times 10^{10}$	1.25	-
Sucrose	10/11	$4.8 \times 10^9$	4.76	47.6
Trehalose	10/11	$4.4 \times 10^9$	4.83	48.3
Lactose	10/11	$3.0 \times 10^9$	3.57	35.7
Levan sol.	3/11	$4.5 \times 10^9$	0.62	10.3
Suncap	10/11	$3.6 \times 10^9$	5.37	53.7
CaCl <sub>2</sub>	10/11	$3.3 \times 10^9$	1.62	16.2

일반적으로 일정량의 부형제를 혼합하여 스프레이 드라이 과정을 거치는 것이 손실을 줄임과 동시에 활성 유지를 기대 할 수 있다. 이상의 실험 결과 가장 효율적인 것은 "sun-cap"으로 판단되며 이것은 또한, 물에 녹였을 때 pH 4의 산성을 나타내므로 Bt KFRI-2가 생성하는 toxin 이 protease 의 영향으로부터 어느 정도 보호받을 수 있을 것으로 판단된다. "sun-cap"은 변성 전분으로 기능성물질 등을 포접(encapsulation)하여 안정화시키는 능력이 우수하며, 냉수에 쉽게 용해되고 점도가 낮아 고농도의 용액 제조가 가능하여 분무공정에 적합한 물성을 갖추고 있다. 따라서, hot spray dry 과정에 보호제 및 부형제로 널리 사용되는 sucrose 와 여기에 suncap을 혼합하여 사용하면 최적의 분무 조건과 안정화를 기대 할 수 있을 것으로 판단된다.

#### 나. 흡착을 통한 원제의 안정화 방법

보통 technical powder의 희석 및 흡착에 사용되는 물질로서, 주로 광물질 증량제가 이용되며, 주로 벤토나이트, 규조토, Clay, talc, CaCO<sub>3</sub>, 납석 등이 주로 사용된다. 이상의 광물들은 각각이 가진 특성 때문에 증량제로 많이 사용되나 발효 원액의 직접적인 흡착 능력은 떨어져 사용할 수가 없다. 알려진 powder 중에 가장 좋은 흡착력을 나타내며 자외선 차단 효과도 있는 "white carbon"을 사용하여 발효 원액을 1:1로 흡착하여 원제를 안정화시키는 방법을 사용하였다.

위 두 가지 방법에 의해 제조된 원제를 이용하여 몇 가지 제제를 만들어 산업화에 적합한 제제방법을 탐색하였다. 2500L 발효조에서 working volume 1000L로 배양한 원액을 VMF 방식으로 1/10 volume으로 농축한 후 변성전분인 "SUNCAP" 10%를 녹여 spray dry 후 원제에 들어 있는 내생포자의 수는  $5.4 \times 10^{11}$  c.f.u/g이었다. 동일한 방법에 의한 만들어진 농축 원액에 변성전분인 suncap 10%를 녹인 후 균질화(homogenization) 시킨 후 "White carbon"에 1:1로 흡착시킨 원제에 들어 있는 내생포자의 수는  $7.4 \times 10^{10}$  c.f.u/g이었다.

Table 4. Formulation recipes of Bt KFRI-2 using various carrier and additives

Compartments	F01	F02	F03	F04	F05	F06	F07	F08
Ⓐ spray dry 원제	10	10						
Ⓑ white carbon 흡착 원제			50	50	50	50		
Ⓒ suncap				10	10	10		
Ⓓ white carbon에 1:1로 흡착된 TWEEN20				10	10	10		
Ⓔ NK-DA203W		7						
Ⓕ NK-SLS		5		5	5	5		
Ⓖ STPP (sodium tripolyphosphate)		5		5	5	5		
Ⓗ 황산암모늄	90	69	50	20			80	80
Ⓙ white carbon에 1:1로 흡착된 멸구슬나무추출물					20		20	
Ⓚ white carbon에 1:1로 흡착된 고삼추출물						20		20
Total	100	100	100	100	100	100	100	100

F01과 F02는 spray dry 원제를 포함한 것이고 F03 ~ F06까지는 흡착원제를 포함 것인데 내생포자의 수는 거의 같은 수준으로 조절하였다.

예비 실험은 통해 얻은 자료를 바탕으로 가장 효율이 좋은 첨가제 및 부형제를 선택하여 제제를 만들었다. 모든 제제에서 기존의 판매되는 약제에 비해 수화성과 현수성은 크게 떨어지지 않았다.

## 라. 제제화별 물리성 비교

증량제 및 여러 가지 부자재를 첨가하여 제제화된 시료의 회석 살포시 물리성을 조사하기 위하여 수화성, 현수성, 분말도를 시험하였다.

Table 5. Physical properties of formulations tested

Formulation code	wettability	suspensibility	particle size
F01	++++	++++	passed
F02	++++	++++	passed
F03	++++	++++	passed
F04	+++	+++	passed
F05	+++	+++	passed
F06	+++	+++	passed

++++ ; excellent    +++ ; moderate    ++ ; acceptable    + ; unacceptable  
The particle size was determined by sieve test(325mesh).

제제화된 시료의 수화성은 거의 모든 제제에서 비슷하였으나, 황산암모늄이 많이 포함된 제제에서 우수하였다. 이것은 황산암모늄이 물에 상당히 잘 녹는 성질을 나타내기 때문이다.

현수성은 F01, F02에 비해 F03 - F06이 떨어진다. 이것은 white carbon이 흡착재료로서 많이 사용된 제제의 경우 white carbon이 아래로 가라앉아 나타나는 현상이다. 한편, 분말도는 모두 양호한 결과를 나타냈다.

## 6. 제제화된 시료의 기간에 따른 Bt균의 농도 변화.

제제화된 시료의 저장 안정성은 다음 그림에서 보는 바와 같이 상온과 40℃ 저장조건에서 8주간 안정하였으며, 12주 경과 후 약간 농도가 줄어드는 경과를 나타냈지만 균농도가  $10^{10}$  cfu/g 이상을 유지하고 있으므로 제제화된 시료 모두가 온도에 크게 영향을 받지 않는 것으로 판단된다. 따라서, 기본 제제를 통한 유통에는 전혀 문제가 없을 것으로 판단된다.

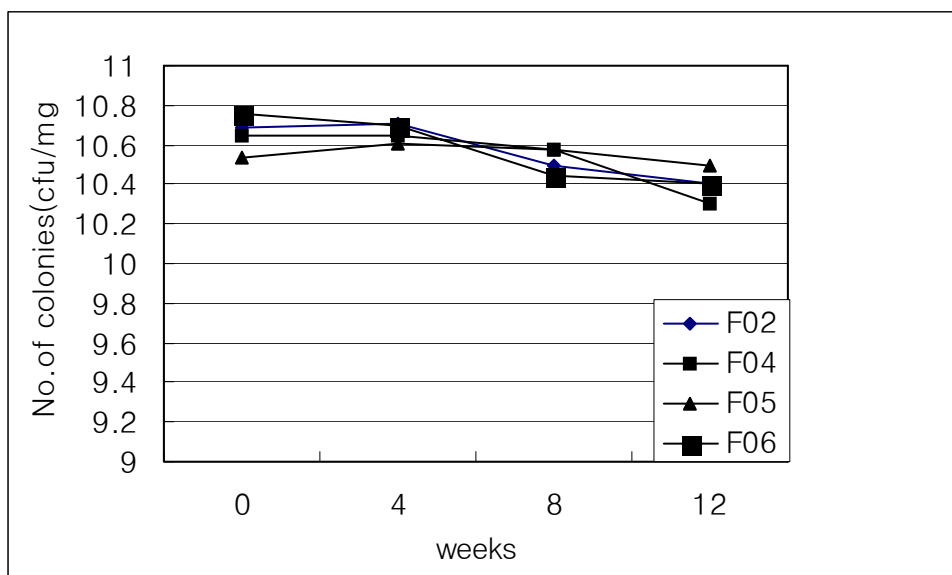


Fig. 13. Change in number of viable cells during storage under room temp.

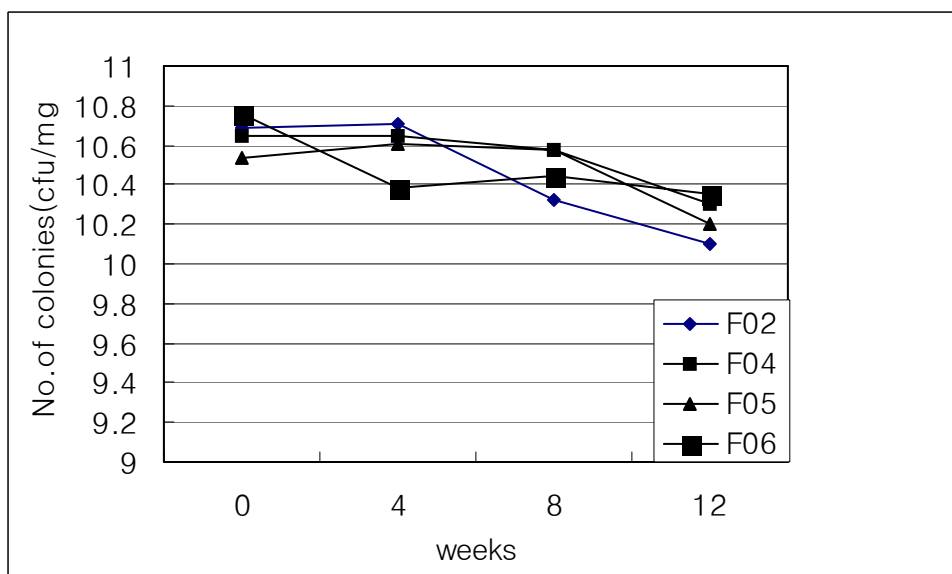


Fig. 14. Change in number of viable cells during storage under 40°C.

## 7. Bt KFRI-2 원제와 제제화 후의 살충활성 실험

### 가. 제제별 살충효과 비교

잎 침지방법(leaf dipping method)에 따라 제제화된 시료를 40,000배, 80,000배, 160,000배로 희석한 후 배추잎을 충분히 침지시키고 음지에서 건조한 다음, 생물검증 용기에 넣어 배추좀나방(*Plutella xylostella* L.) 3령 유충을 처리구당 10마리씩 접종하여 24시간과 48시간 동안 사충수를 조사하였다. 각 농도당 5반복으로 실험을 수행하였다.

Table 6. Insecticidal activity of several Bt KFRI-2 formulations against 3rd *Plutella xylostella* L. on cabbage in a laboratory condition

	Dilution	24hrs		48hrs	
		Mean Density	Mortality(%) )	Mean Density	Mortality(%) )
F01	40,000	5.8±1.48	58	7.6±0.55	76
	80,000	4.4±1.52	44	6.8±1.30	68
	160,000	3.8±1.92	3	5.8±1.30	58
F02	40,000	6.0±2.74	60	7.2±2.17	72
	80,000	5.4±1.14	54	6.6±1.67	66
	160,000	3.2±1.10	32	5.2±2.28	52
F03	40,000	6.0±1.00	60	7.4±0.89	74
	80,000	4.2±2.59	42	6.4±1.14	64
	160,000	3.4±2.61	34	5.2±3.03	52
F04	40,000	6.6±1.52	66	8.0±0.00	80
	80,000	4.0±2.00	40	6.8±1.79	68
	160,000	3.2±1.30	32	5.2±1.79	52
F05	40,000	7.2±0.84	72	9.4±0.89	94
	80,000	5.4±1.52	54	8.4±0.55	84
	160,000	5.0±2.24	50	6.4±1.82	64
F06	40,000	6.0±1.14	66	9.0±1.41	90
	80,000	5.0±2.00	50	8.0±1.22	80
	160,000	3.8±2.39	38	5.6±2.51	56
F07	40,000	1.4±1.14	14	2.0±0.71	20
	80,000	1.0±0.71	10	1.0±0.71	10
	160,000	0.6±0.89	6	0.6±0.89	6
F08	40,000	1.0±0.71	10	1.8±1.30	18
	80,000	0.6±0.55	6	0.8±0.45	8
	160,000	0.0±0.00	0	0.0±0.00	0
Control	-	0.0±0.00	0	0.0±0.00	0

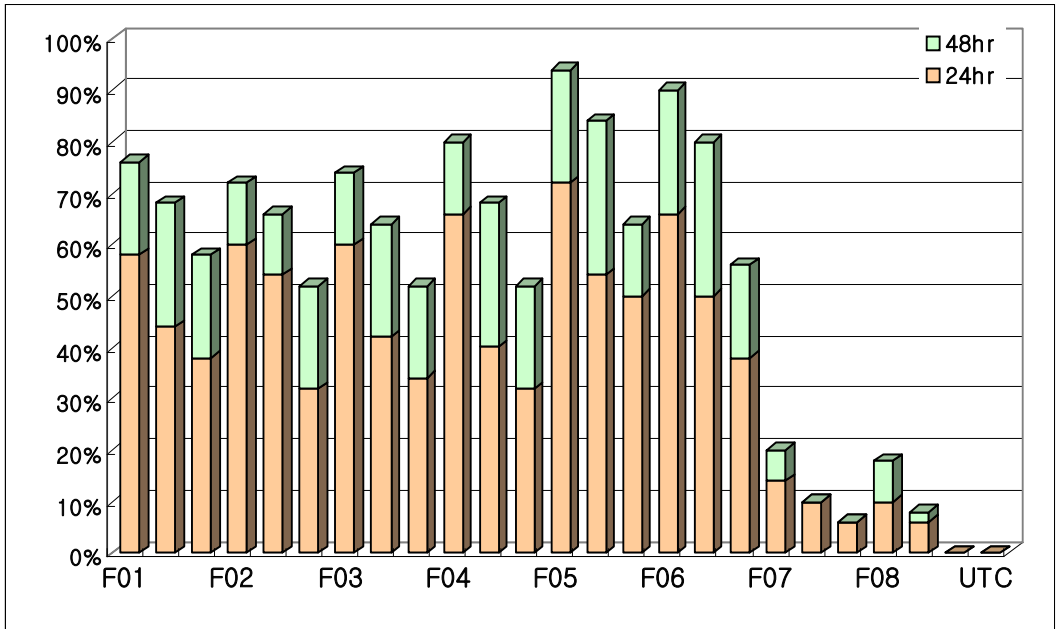


Fig. 15. Insecticidal activity of several Bt KFRI-2 formulations against 3rd *Plutella xylostella* on cabbage in a laboratory condition.

위의 결과를 보면 spray dry 방법을 이용한 원제 생산과 white carbon 흡착에 의한 원제 생산은 살충력에 큰 차이를 보이질 않았다. 거의 비슷한 수준의 살충력을 나타냈다. 그리고 F01과 F02를 비교하고 F03과 F04를 비교하여 보면 원제 자체와 적당한 계면활성제와 안정제등을 첨가한 제제에서 살충력에 큰 차이를 보이지 않았지만 실내 포장에서와는 달리 야외 포장시험에서는 제제화의 효과가 기대된다. 예비실험을 통해 얻은 결과를 바탕으로 배추즙나방에 살충력이 있다고 알려진 식물추출물을 첨가한 F05와 F06을 보면 강한 살충 상승효과를 나타냄을 알 수 있다. 즉, 식물추출물 단독으로 낮은 살충 활성을 나타내지만 Bt 와 합제로 사용이 되면 강한 상승 효과를 나타내고 있다. 이 첨가물을 이용하면 속효성이 떨어지는 Bt의 단점을 어느 정도 보완할 수 있을 것으로 기대된다.



UTC



F04



F05



F06

Fig. 16. Insecticidal activity of several Bt KFRI-2 formulations against 3rd *Plutella xylostella* on cabbage in a laboratory condition after 48hr treatment.

#### 나. 저장 기간에 따른 살충효과 지속력 비교

상온과 40℃에서 12주 동안 저장 한 후 시간별로 살충력을 실내실험으로 비교 검증하였다.



Table 7. Change of insecticidal activity during storage under room temp. & 40°C

Formulation	Dilutions	after 4 weeks		after 8 weeks		after 12 weeks	
		Mean Density	Mortality (%)	Mean Density	Mortality (%)	Mean Density	Mortality (%)
F02R	40,000	7.4±2.07	74	7.2±2.39	72	7.2±2.95	72
	80,000	6.8±1.30	68	6.0±1.58	60	6.4±2.61	64
	160,000	5.6±1.67	56	5.8±1.48	58	5.2±1.92	52
F02F	40,000	8.0±0.71	80	7.8±1.48	78	7.0±2.45	70
	80,000	7.2±0.84	72	5.6±2.51	56	6.2±3.03	62
	160,000	5.2±2.77	52	5.4±2.79	54	4.6±3.05	46
F04R	40,000	9.0±0.71	90	8.6±1.95	86	10.0±0.00	100
	80,000	8.6±0.55	86	7.4±2.07	74	9.8±0.45	98
	160,000	6.6±1.14	66	6.0±2.35	60	8.4±1.14	84
F04F	40,000	8.8±1.30	88	8.8±2.68	88	9.4±1.34	94
	80,000	7.8±0.84	78	7.8±2.28	78	8.8±1.10	88
	160,000	6.0±1.58	60	5.6±4.34	56	6.8±1.64	68
F05R	40,000	7.2±1.79	72	7.0±2.24	70	7.2±2.17	72
	80,000	6.4±1.82	64	6.0±3.16	60	6.4±1.14	64
	160,000	5.4±1.82	54	5.8±2.28	58	5.0±2.24	50
F05F	40,000	8.4±1.14	84	9.6±0.89	96	8.0±1.22	80
	80,000	6.2±1.92	62	6.6±3.13	66	6.6±3.13	66
	160,000	6.0±1.00	60	5.8±3.19	58	5.0±2.55	50
F06R	40,000	8.8±0.45	88	10.0±0.00	100	9.6±0.55	96
	80,000	7.6±0.55	76	10.0±0.00	100	8.8±0.84	88
	160,000	6.0±1.58	60	7.8±1.10	78	7.2±2.39	72
F06F	40,000	9.0±1.00	90	8.8±2.68	88	9.4±1.34	94
	80,000	7.4±1.52	74	8.6±1.34	86	8.6±1.34	86
	160,000	6.0±1.22	60	6.6±3.13	66	7.0±1.87	70
Control	-	0.0±0.00	0	0.0±0.00	0	0.2±0.45	2

\* R ; room temperature      F ; 40°C.

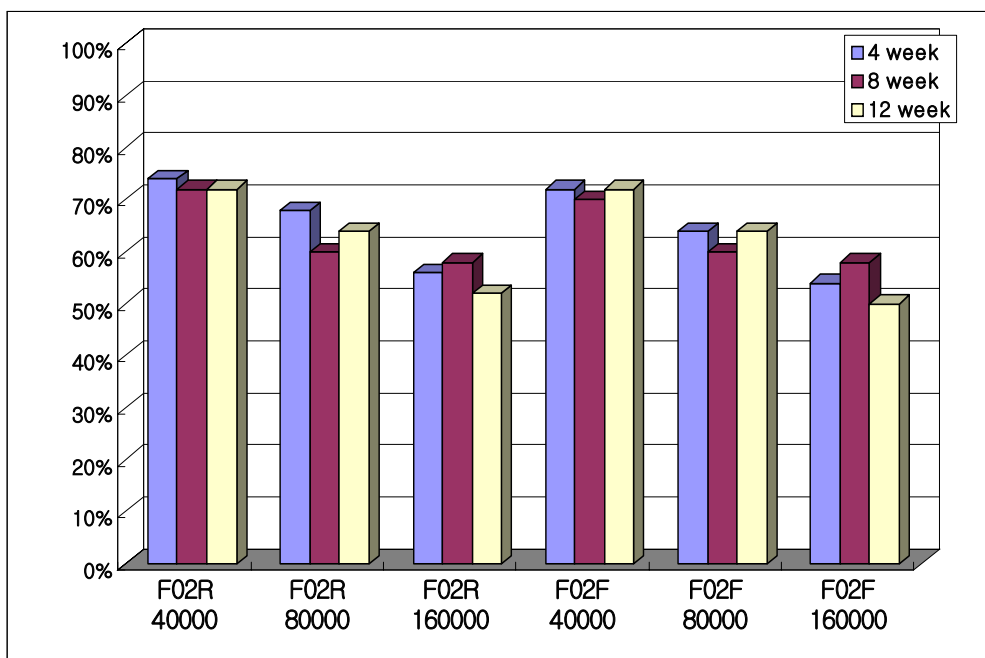


Fig. 17. Change of insecticidal activity about formulation No. F02 during storage under room temp. & 40°C

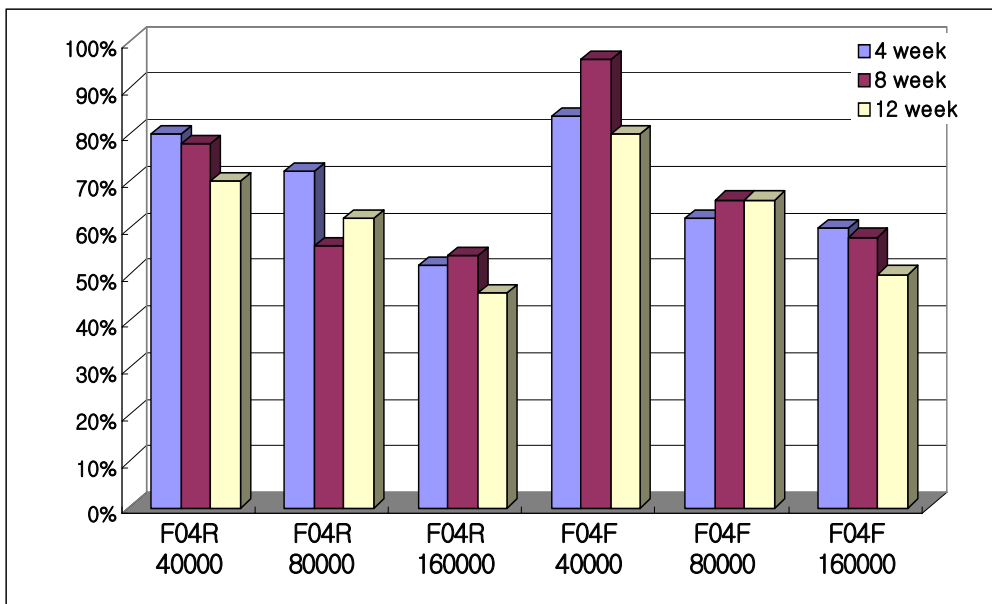


Fig. 18. Change of insecticidal activity about formulation No. F04 during storage under room temp. & 40°C

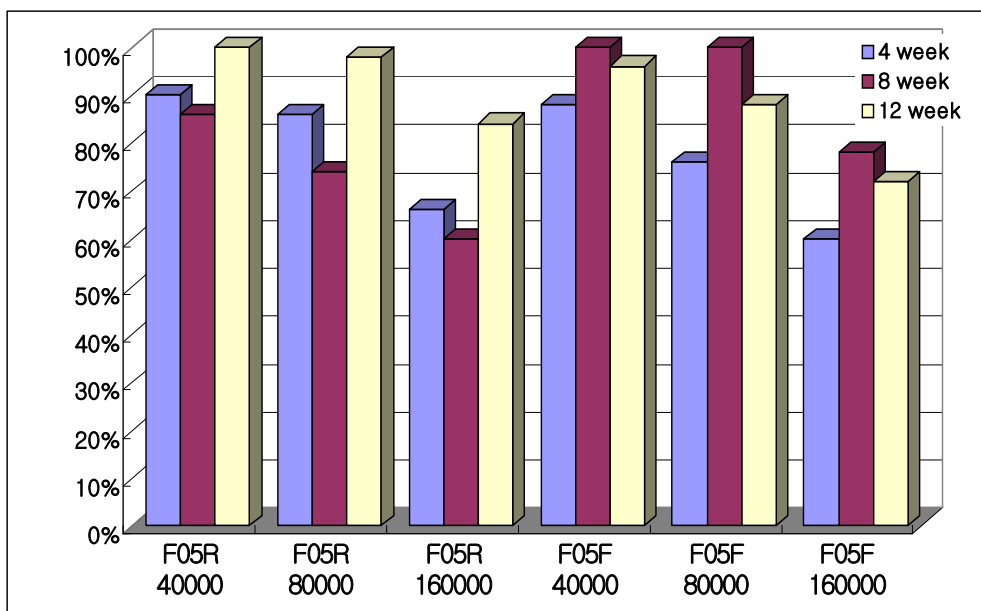


Fig. 19. Change of insecticidal activity about formulation No. F05 during storage under room temp. & 40°C

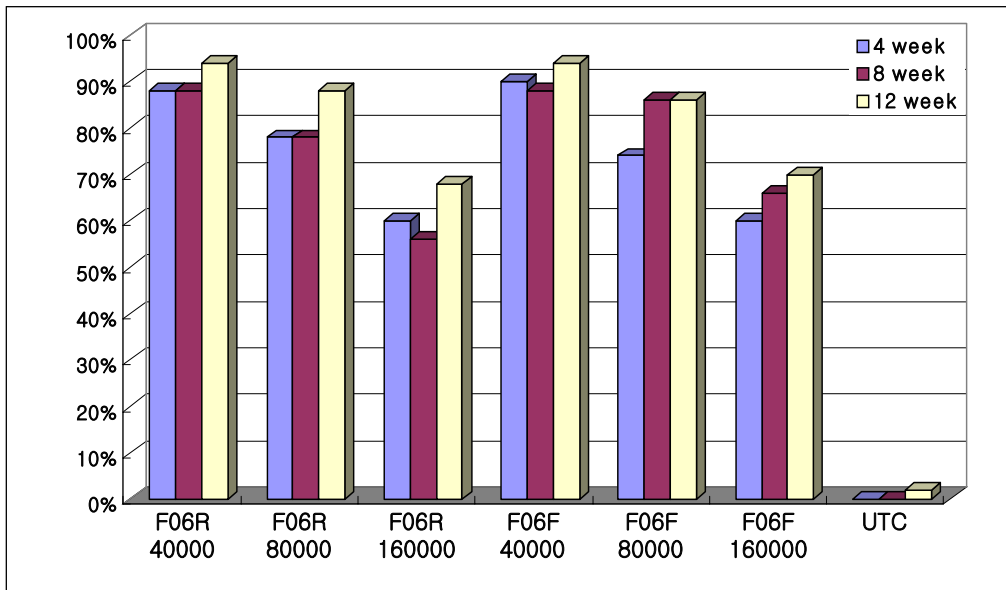


Fig. 20. Change of insecticidal activity about formulation No. F06 during storage under room temp. & 40°C

이상의 결과는 상온과 40°C 온도 학대 조건 모두에서 기간과 희석 배수별로 약간의 활성 차이를 보이지만 유의할 정도의 활성 감소 현상은 나타나지 않는 것으로 나타났다. 이것은 white carbon에 흡착된 toxin이 기본제제에 의해 안정적으로 보관 및 유지 될 수 있을 보여준다. 40°C 온도 학대 조건에서 12주 동안 살충활성에 안정성을 나타내었으며 이 시험결과로 볼 때 제품으로 유통 시 전혀 문제가 없을 것으로 판단됨.

#### 다. 제제별 야의 살충 효과 검증

기본 제제 formulation No. F04 와 효과 상승제가 첨가된 F05와 F06에 대해 시중에 판매 중인 Bt subsp. *kurstaki* type formulation과 비교 활성 실험을 수행하였다. 각 시료는 다음과 같이 시제품명으로 명명하였다.

Formulation No. F04 ; BSF-Z, No. F05 ; BSF-S, No. F06 ; BSF-D, 시중에 판매 중인 Bt subsp. *kurstaki* type formulation ; A

시험장소 : 경기도 여주

시험해충 : 배추좀나방(*Plutella xylostella*)

시험작물 : 배추

시험구 배치 및 면적 : 난괴법 3반복, 구당면적 10m<sup>2</sup> 소요면적 150m<sup>2</sup>

조사방법 ; 처리전 및 처리 2일, 7일 후 구당 15주에 대한 생충수 조사

Table. 8 Insecticidal activity of formulation against *P. xylostella* L. in a field condition.

Formulation	Dilution	3 DAT					Mean	Control value
		Density of pretreatment	I	II	III			
BSF-Z	1,000	44.3	34.5	50.0	69.2	51.2	50.4 b	
BSF-S	1,000	44.3	31.4	28.3	38.9	32.8	68.2 a	
BSF-D	1,000	49.7	27.3	22.4	41.7	30.5	70.5 a	
A	1,000	57.0	50.9	44.4	56.6	50.7	50.9 b	
UTC	-	45.3	102.2	98.0	109.5	103.2	- c	

\*C.V----- 12.0

Formulation	Dilution	7 DAT					Mean	Control value
		Density of pretreatment	I	II	III			
BSF-Z	1,000	44.3	8.6	22.2	25.6	18.8	83.2 b	
BSF-S	1,000	44.3	3.9	10.9	11.1	8.6	92.3 a	
BSF-D	1,000	49.7	3.6	3.4	11.1	6.1	94.6 a	
A	1,000	57.0	20.0	12.7	20.8	17.8	84.1 b	
UTC	-	45.3	115.6	102.0	119.0	112.2	- c	

\*C.V----- 17.4

처리전 밀도 : 약제처리전 각 처리구의 평균밀도(15주/구당)

C.V : 변이계수

a\* : Duncan test <0.05%

A ; Bt subsp. *kurstaki* type formulation.

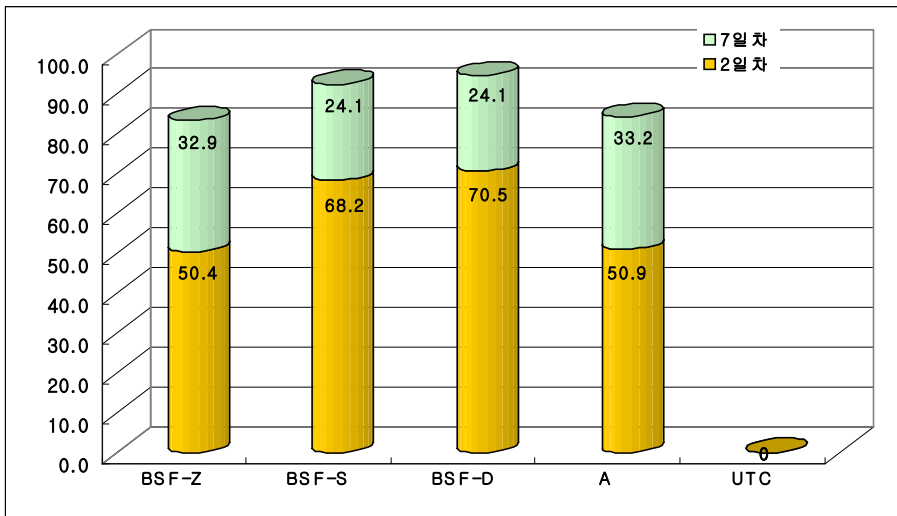


Fig. 21. Insecticidal activity of formulation against *P. xylostella* in a field condition.



a. BSF-D 처리구



b. BSF-Z 처리구

Fig. 22. Compare of insecticidal activity between BSF-D & BSF-Z formulation.

위 그림에서와 같이 BSF-D처리구와 BSF-Z처리구는 방제가는 약 80%이상이지만 속효성 차이가 확연히 들어났으며 BSF-Z처리구에 피해 증상이 더 큰 것으로 확인 되었다. 이는 속효성의 증가가 해충으로부터 작물의 피해를 크게 감소시키는 것으로 판단된다.

시험장소 : 경북 상주

시험해충 : 목화명나방(*Palpita indica* S)

시험작물 : 오이

시험구 배치 및 면적 : 난괴법 3반복, 구당면적 10m<sup>2</sup> 총소요면적 150m<sup>2</sup>

조사방법 : 처리전 및 처리 2.7일후 구당 15주에 대한 생충수 조사



Table 9. Insecticidal activity of formulation against *Palpita indica* S in a field condition

Formulation	Dilution	3 DAT					
		Density of pretreatment	I	II	III	Mean	Control value
BSF-Z	1,000	51.0	41.5	60.5	62.2	54.7	38.9 b
BSF-S	1,000	52.7	23.2	23.7	37.2	28.1	68.7 a
BSF-D	1,000	57.0	18.0	23.9	34.9	25.6	71.4 a
A	1,000	58.3	60.0	49.2	56.1	55.1	38.5 b
UTC	-	51.7	82.7	81.8	104.2	89.6	- c

처리약제	희석배수	7 DAT					
		처리전밀도	1반복	2반복	3반복	평균	방제가(%)
BSF-Z	1,000	51.0	10.8	20.9	26.7	19.5	81.0 b
BSF-S	1,000	52.7	3.6	10.2	9.3	7.7	92.5 a
BSF-D	1,000	57.0	3.3	3.0	11.6	6.0	94.2 a
A	1,000	58.3	20.0	12.7	19.3	17.3	83.0 b
UTC	-	51.7	103.8	94.5	108.3	102.2	- c

\* C.V-----15.7

처리전 밀도 : 약제처리전 각 처리구의 평균밀도(15주/구당)

C.V : 변이계수

a\* : Duncan의 다중검정 0.05%

A : Bt subsp. *kurstaki* type formulation.

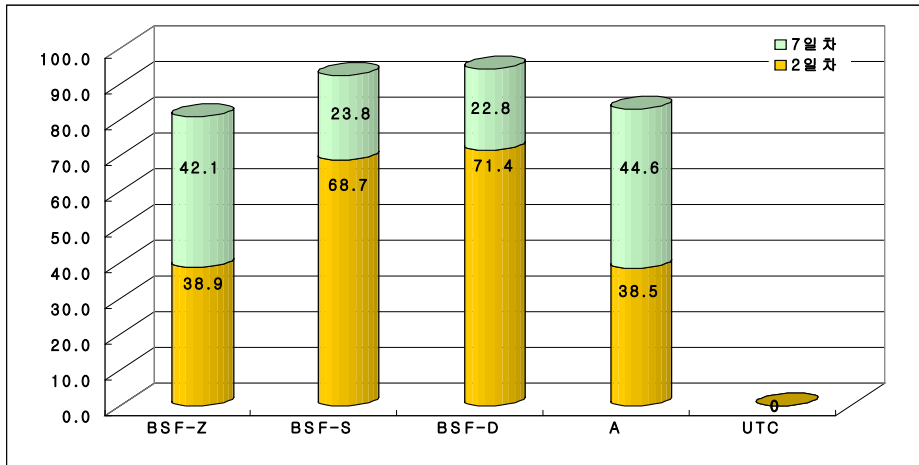


Fig. 23. Insecticidal activity of formulation against *Palpita indica* S in a field condition.

시험장소 : 경기도 여주

시험해충 : 배추흰나비(*Artogeia rapae* L)

시험작물 : 케일

시험구 배치 및 면적 : 난괴법 3반복, 구당면적 10m<sup>2</sup> 총소요면적 150m<sup>2</sup>

조사방법 : 처리전 및 처리 3.7일후 구당 15주에 대한 생충수 조사

Table 10. Insecticidal activity of formulation against *Artogeia rapae* L in a field condition.

Formulation	Dilution	3 DAT					
		Density of pretreatment	I	II	III	Mean	Control value
BSF-Z	1,000	39.3	34.8	42.4	53.8	43.7	58.8 b
BSF-S	1,000	42.0	31.8	28.3	47.2	35.8	66.3 a
BSF-D	1,000	44.0	34.9	28.3	38.9	34.0	67.9 a
A	1,000	53.7	46.0	46.7	49.0	47.2	55.5 c
UTC	-	49.3	102.0	107.7	108.5	106.1	- d

Formulation	Dilution	7 DAT					
		Density of pretreatment	I	II	III	Mean	Control value
BSF-Z	1,000	39.3	10.9	21.2	25.6	19.2	82.3 b
BSF-S	1,000	42.0	4.5	13.0	8.3	8.6	92.1 a
BSF-D	1,000	44.0	4.7	3.8	13.9	7.4	93.2 a
A	1,000	53.7	18.0	20.0	19.6	19.2	82.4 b
UTC	-	49.3	106.1	105.8	114.9	108.9	- c

\* C.V----- 12.0  
 처리전 밀도 : 약제처리전 각 처리구의 평균밀도(15주/구당)  
 C.V : 변이계수  
 a\* : Duncan test <0.05%  
 A ; Bt subsp. *kurstaki* type formulation.

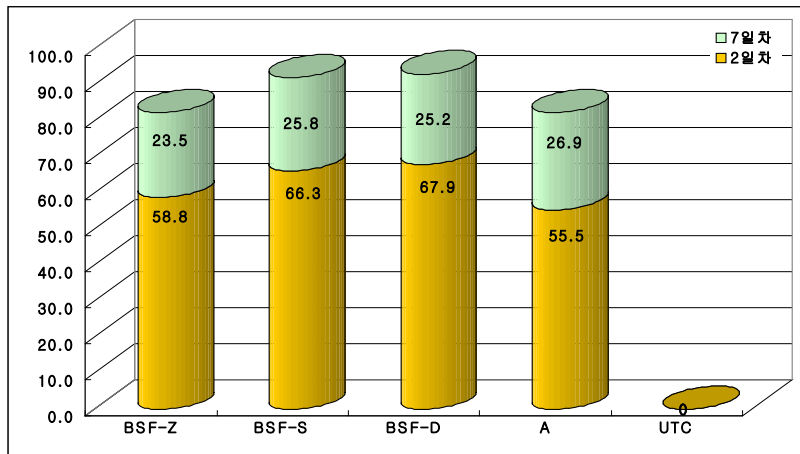


Fig. 24. Insecticidal activity of formulation against *Artogeia rapae* L in a field condition.



a. BSF-D



b. BSF-S



c. BSF-Z

Fig. 25. Comparison of insecticidal activity among formulations.

약효조사 결과 기본제제인 BSF-Z 및 A 제품의 살충효과는 비슷한 살충효과를 보였으며, 두 비교 처리구 보다 BSF-S와 BSF-D 처리구에서 살충력에 속효성이 우수한 것으로 조사되었다. 일반적으로 배추좀나방에 살충력이 있다고 알려진 식물추출물을 사용한 BSF-S와 BSF-D의 경우 식물추출물 단독으로 약효의 발현이 미비(Table 6, Fig. 15 참조)하지만 Bt 와 혼용 처리시 강한 상승효과를 나타낼 수 있었으며, 이는 Bt 의 약효 발현 시간이 길다는 단점을 보완 해 줄 수 있는 첨가제로 응용이 가능할 것으로 기대된다.

## 8. 경제성을 고려한 Bt KFRI-2 원제의 제제화 및 시제품 제작

이상의 결과를 살펴보면 "white carbon"에 농축된 발효 원액을 흡착하여 제제화하는 방법을 사용하여도 기존의 hot spray dry 방법을 통한 제제화에 비해 약효나 경시변화 측정에서 떨어지지 않기 때문에 산업적으로 유용하게 제제화 할 수 있을 것이다. 즉, spray dry에 의한 비용과 loss를 줄일 수 있다. 단점이라면 white carbon이 너무 많이 첨가될 경우 현수성이 떨어지는 것과 약제를 살포한 후에 약흔이 남는다는 것이 단점으로 작용 할 수 있다.

배추좀나방을 대상으로 실험하여 가장 좋은 효과를 나타내는 제형을 탐색하였고 이를 기본으로 산림해충방제를 위한 시제품을 만들었다. 시제품을 만들기 위한 산업화 제제는 다음과 같다. BtK 발효액(  $10^9$  cfu/ml 이상)을 1/10 volume으로 농축한 원액 25%에 변형전분인 "sun-cap" 10%를 녹여 균질화 시킨 다음 white carbon 25%에 흡착시키고 white carbon에 1:1로 흡착된 계면활성제 TWEEN20 10%를 첨가하고, 여기에 안정제인 sodium tripolyphosphate 5%, 자외선 차단제인 NK-SLS 5%, 황산암모늄 20%를 혼합한 후 Hammer mill로 분쇄하여 사용한다. 효과상승제인 식품 추출물을 투입할 경우 황산암모늄 대신에 white carbon에 1:1로 흡착된 식물 추출물 20%를 첨가하면 강한 살충 상승효과를 기대 할 수 있다. 위와 같은 방법을 사용하여 다음의 몇 가지 제제를 만들어 한국산림과학원에서 산림해충을 대상으로 살충활성을 실험하였다.

Table 11. Formulation of wettable powders with Bt KFRI-2 strain

Formulations		Component	
coating tape	<b>A</b>	Btk 발효 1/10 vol. 농축원액	25 %
		suncap	10 %
		white carbon	25 %
		White carbon에 1:1로 흡착된 TWEEN 20	10 %
		sodium tripolyphosphate	5 %
		NK-SLS	5 %
		황산암모늄	20 %
	<b>B</b>	성분동일하며 suncap 대신 감자전분 첨가	
confused tape	<b>A</b>	Btk 발효 1/10 vol. 농축원액	25 %
		suncap	10 %
		white carbon	35 %
		White carbon에 1:1로 흡착된 TWEEN 20	10 %
		밀구슬나무 추출물 <sup>Ⓐ</sup>	10 %
		sodium tripolyphosphate	5 %
		NK-SLS	5 %
	<b>B</b>	동일하며 고삼 추출물 <sup>Ⓑ</sup> 첨가	
floating tape	<b>A</b>	Btk 발효 1/10 vol. 농축원액	30 %
		white carbon	36 %
		제충국 추출물 <sup>Ⓒ</sup>	10 %
		sodium tripolyphosphate	7 %
		NK-SLS	7 %
		Ca-stearate	10 %
	<b>B</b>	Btk 발효 1/10 vol. 농축원액	30 %
		white carbon	35 %
		제충국 추출물 <sup>Ⓒ</sup>	10 %
		감자전분	10 %
		대두 oil	5 %
		Ca-stearate	10 %



Fig. 26. Photograph of test products.



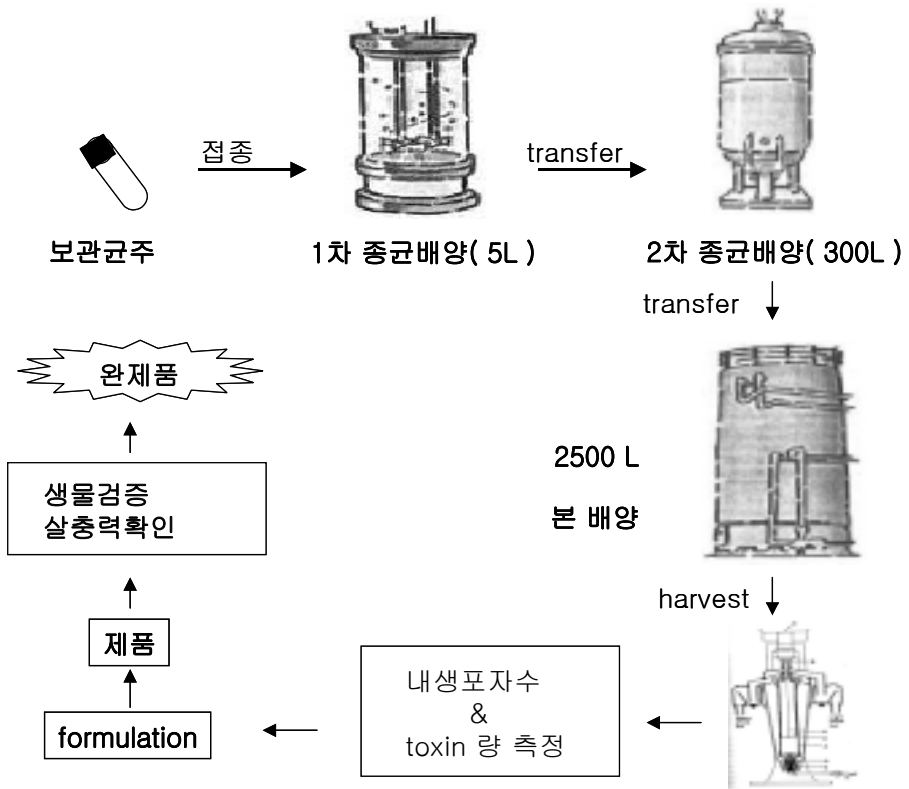


Fig. 27. Manufacturing process of products.

## 제 4 절 결 론

선발된 Btk KSK-1173균의 대량배양 최적 배지 조성과 배양체계를 확립하고 경제적이고 안전하게 endospore 및 endotoxin을 제제화 시키는 방법을 탐색하였다. 최적의 배양 조건을 탐색하기 위해 5L jar 발효조에서 유가식 배양방법 (fed-batch culture)을 변형하여 최대의 세포 성장을 유도할 수 있었다. 이 결과를 300L 와 2500L에서 단계적으로 재현하여 2500L에서 최대 OD 120 까지 성장했으며 80%이상 안정하게 포자로 전환되었다. 최적의 배양조건은 다음과 같다. 배양 온도 30℃, pH는 암모니아수를 이용하여 7.0으로 유지했으며, 배지 조성은 glucose 2%, MgSO<sub>4</sub> 0.1%, Yeast extract 3%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.4%, MnSO<sub>4</sub> 0.007%, CaCl<sub>2</sub> 0.01%, trace sol. 0.1ml를 기본 배지로 하여 glucose가 고갈되는 시점에 20g/L 단위로 3회 첨가하여 주었다. 마지막 세 번째 feeding 에서는 yeast extract 를 10g/L 로 같이 첨가하여 최대의 세포 성장과 포자 형성 전환을 유도할 수 있었다.

이상의 발효원액을 여러 가지 수화제 타입으로 제조하였다. 수화제의 물리성을 향상하기 위해 여러 가지 첨가제가 이용되었으며, 배추좀나방에 대해서 제제별 활성을 시험하였다. 이러한 제제들은 수화성, 현수성 그리고 분말도(입자 크기)에서 좋은 물리성을 나타냈으며, 배추좀나방을 대상으로 하는 살충력 실험에서 기존 약제(commercial *B. thuringiensis kurstaki* type formulation)에 비해 같거나 그 이상의 살충력을 보여줬다. 살충력 비교 실험에서 살충력이 있다고 알려진 식물추출물을 첨가한 제제에서는 강한 상승 효과를 나타냈다. 이상의 실험결과로 가장 경제적이고 산업화에 적합한 제제는 발효 원액을 농축한 후에 white carbon을 흡착시킴으로 하는 수화제(white carbon based WP)는 다음과 같다. 25% B.t 농축 원액에 encapsulation 역할의 10% suncap 을 녹인 후 균질화 시킨 다음 25% white carbon 에 흡착시키고 white carbon에 1:1로 흡착된 Tween20 (계면활성제) 10%를 첨가하고 여기에 5% sodium tripolyphosphate(안정화제), 5% sodium lignosulfonate(UV 차단제), 20% ammonium sulfate(증량제)을 결정하였다. 포장에서 배추좀나방에 대한 살충력 실험에서 판매 중인 기본 약제에 비해 효과면에서 우수하였으며 특히, 여기에 살충력이 있다고 알려진 식물추출물을 첨가한 제제(BSF-S, BSF-D)의 경우 강한 상승효과를 나타내었다. 즉, 식물추출물 단독으로 낮은 활성을 나타내지만 Bt 와 혼용시 높은 시너지 효과를 나타내는 것으로 조사되었다. 이는 약효 발현이 느리다는 B.t 균주의 단점을 보완해 줄 수 있을 것으로 기대된다.

## 제 5 절 참고문헌

1. Adams, L. F., S. Mathewes, P. O'Hara, A. Petersen, and H. 1994. Elucidation of the mechanism of CryIII<sub>A</sub> overproduction in a mutagenized strain of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *Mol. Microbiol.* 14:381-389.
2. Adams, L. F., J. E. Visick, and H. R. Whiteley. 1989. A 20-kilodalton protein is required for efficient production of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* 27-kilodalton crystal protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 171:521-530.
3. Adang, M. J., M. J. Staver, T. A. Rocheleau, J. Leighton, R. F. Barker, and D. V. Thompson. 1985. Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 and their toxicity to *Manduca sexta*. *Gene* 36:289-300.
4. Asano, S. I., Y. Nukumizu, H. Bando, T. Iizuka, and T. Yamamoto. 1997. Cloning of novel enterotoxin genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1054-1057.
5. Barloy, F., A., L. Nicolas, and M.-M. Lecadet. 1996. Cloning and expression of the first anaerobic toxin gene from *Clostridium bifermentans* subsp. *malaysia*, encoding a new mosquitocidal protein with homologies to *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *J. Bacteriol.* 178:3099-3105.
6. Bishop, A. H. 1994. Unpublished observation.
7. Bosse M., L. Masson, and R. Brousseau. 1990. Nucleotide sequence of a novel crystal protein gene isolated from *Bacillus thuringiensis* subspecies *kenyae*. *Nucleic Acids Res.* 18:7443.
8. Bradley, D., M. A. Harkey, M.-K. Kim, D. Biever, and L. S. Bauer. 1995. The insecticidal CryIB protein of *Bacillus thuringiensis* ssp. *thuringiensis* has dual specificity to coleopteran and lepidopteran larvae. *J. Invertebr. Pathol.*

65:162-173.

9. Bravo, A. 1997. Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxin family proteins and their functional domains. *J. Bacteriol.* 179:2793-2801.

10. Brizzard, B. L., and H. R. Whiteley. 1988. Nucleotide sequence of an additional crystal protein gene cloned from *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis*. *Nucleic Acids Res.* 16:2723-2724.

11. Brown, K. L., and H. R. Whiteley. 1992. Molecular characterization of two novel crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *thompsoni*. *J. Bacteriol.* 174:549-557.

12. Chak, K. F. 1996. Unpublished observation.

13. Chak, K. F., and J. C. Chen. 1993. Complete nucleotide sequence and identification of a putative promoter region for the expression in *Escherichia coli* of the *cryIA(b)* gene from *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* HD133. *Proc. Natl. Sci. Counc. Repub. China* 17:7-14.

14. Chambers, J. A., A. Jelen, M. P. Gilbert, C. S. Jany, T. B. Johnson, and C. Gawron-Burke. 1991. Isolation and characterization of a novel insecticidal crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. *J. Bacteriol.* 173:3966-3976.

15. Cheong, H., and S. S. Gill. 1997. Cloning and characterization of a cytolytic and mosquitocidal δ-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3254-3260.

16. Chungjatupornchai, W., H. , J. Seurinck, C. Angsuthanasombat, and M. Vaeck. 1988. Common features of *Bacillus thuringiensis* toxins specific for *Diptera* and *Lepidoptera*. *Eur. J. Biochem.* 173:9-16.

17. Dankocsik, C., W. P. Donovan, and C. S. Jany. 1990. Activation of a

cryptic crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* by gene fusion and determination of the crystal protein insecticidal specificity. Mol. Microbiol. 4:2087-2094.

18. Dardenne, F., J. Seurinck, B. Lambert, and M. Peferoen. 1990. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of a *cryIA(c)* gene variant from *Bacillus thuringiensis*. Nucleic Acids Res. 18:5546.

19. Deleluse, A., M.-L. Rosso, and A. Ragni. 1995. Cloning and expression of a novel toxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan* encoding a highly mosquitocidal protein. Appl. Environ. Microbiol. 61:4230-4235.

20. Donovan, W. P., C. C. Dankocsik, M. P. Gilbert, W. C. Gawron-Burke, R. R. Groat, and B. C. Carlton. 1988. Amino acid sequence and entomocidal activity of the P2 crystal protein. An insect toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. J. Biol. Chem. 263:561-567. (Author's correction, 263:4740.

21. Donovan, W. P., C. Dankocsik, and M. P. Gilbert. 1988. Molecular characterization of a gene encoding a 72-kilodalton mosquito-toxic crystal protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. J. Bacteriol. 170:4732-4738.

22. Donovan, W. P., J. M. Gonzales, Jr., M. P. Gilbert, and C. Dankocsik. 1988. Isolation and characterization of EG2158, a new strain of *Bacillus thuringiensis* toxic to coleopteran larvae, and nucleotide sequence of the toxin gene. Mol. Gen. Genet. 214:365-372.

23. Donovan, W. P., M. J. Rugar, and A. C. Slaney. January 1995. U.S. patent 5,378,625.

24. Donovan, W. P., M. J. Rugar, A. C. Slaney, T. Malvar, M. C. Gawron-Burke, and T. B. Johnson. 1992. Characterization of two genes encoding *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins toxic to *Coleoptera* species. Appl. Environ. Microbiol. 58:3921-3927.

25. Donovan, W. P., Y. Tan, C. S. Jany, and J. M. Gonzales, Jr. June 1994.

U.S. patent 5,322,687.

26. Earp, D. J., and D. J. Ellar. 1987. *Bacillus thuringiensis* var. *morrisoni* strain PG14: nucleotide sequence of a gene encoding a 27 kDa crystal protein. *Nucleic Acids Res.* 15:3619.

27. Felsenstein, J. 1989. PHYLIP—phylogeny inference package (version 2). *Cladistics* 5:164–166.

28. Fischhoff, D. A., K. S. Bowdish, F. J. Perlak, P. G. Marrone, S. H. Mc-Cormick, J. G. Niedermeyer, D. A. Dean, K. Kusano-Kretzmer, E. J. Mayer, D. E. Rochester, S. G. Rogers, and R. T. Fraley. 1987. Insect tolerant transgenic tomato plants. *Bio/Technology* 5:807–813.

29. Foncerrada, L., A. J. Sick, and J. M. Payne. August 1992. European Patent Office no. EP 0498537.

30. Galjart, N. J., N. Sivasubramanian, and B. A. Federici. 1987. Plasmid location, cloning and sequence analysis of the gene encoding a 23-kilodalton cytolytic protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* (PG-14). *Curr. Microbiol.* 16:171–177.

31. Geiser, M., S. Schweitzer, and C. Grimm. 1986. The hypervariable region in the genes coding for entomopathogenic crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*—VOL. 62, 1998 REVISION OF *B. THURINGIENSIS* Cry AND Cyt NOMENCLATURE 811 *giensis*: nucleotide sequence of the kurhd1 gene of subsp. *kurstaki* HD1. *Gene* 48:109–118.

32. Gleave, A. P., R. J. Hedges, and A. H. Broadwell. 1992. Identification of an insecticidal crystal protein from *Bacillus thuringiensis* DSIR517 with significant sequence differences from previously described toxins. *J. Gen. Microbiol.* 138:55–62.

33. Gleave, A. P., R. J. Hedges, A. H. Broadwell, and P. J. Wigley. 1992. Cloning and nucleotide sequence of an insecticidal crystal protein gene from

*Bacillus thuringiensis* DSIR732 active against three species of leafroller Lepidoptera *Tortricidae*. N. Z. J. Crop Hortic. Sci. 20:27-36.

34. Gleave, A. P., R. Williams, and R. J. Hedges. 1993. Screening by polymerase chain reaction of *Bacillus thuringiensis* serotypes for the presence of *cryV* like insecticidal protein genes and characterization of a *cryV* gene cloned from *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Appl. Environ. Microbiol. 59:1683-1687.

35. Guerchicoff, A., R. U. Ugalde, and C. P. Rubinstein. 1997. Identification and characterization of a previously undescribed *cyt* gene in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Appl. Environ. Microbiol. 63:2716-2721.

36. Haider, M. Z., and D. J. Ellar. 1988. Nucleotide sequence of a *Bacillus thuringiensis aizawai* ICI entomocidal crystal protein gene. Nucleic Acids Res. 16:10927.

37. Hefford, M. A., R. Brousseau, G. Preontaine, Z. Hanna, J. A. Condie, and P. C. K. Lau. 1987. Sequence of a lepidopteran toxin gene of *Bacillusthuringiensis* subsp. *kurstaki* NRD-12. J. Biotechnol. 6:307-322.

38. Herrera, G., S. J. Snyman, and J. A. Thomson. 1994. Construction of a bioinsecticidal strain of *Pseudomonas flourescens* active against the sugarcane borer, *Eldana saccharina*. Appl. Environ. Microbiol. 60:682-690.

39. Herrnstadt, C., T. E. Gilroy, D. A. Sobieski, B. D. Bennett, and F. H. Gaertner. 1987. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of a coleopteran-active delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *san diego*. Gene 57:37-46.

## SUMMARY

This studies were made to optimize the media composition, operational condition of various culture for the  $\delta$ -endotoxin production and commercial *Bacillus thuringiensis* KFRI-2 formulation were carried out.

High cell density culture of *Bacillus thuringiensis* KFRI-2 was conducted in modified intermittent fed-batch culture using pilot scale fermentor 2500L. The maximum cell growth was reach to OD 120 and convert to endo-spore & endotoxin stably. The spore yield was 80% based on the maximum viable cell number. Optimal culture condition temperature, initial pH, inoculum size and the others for the toxin production were 30°C, 7.0, 1.0%v/v, glucose 2%, MgSO<sub>4</sub> 0.1%, Yeast extract 3%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.4%, MnSO<sub>4</sub> 0.007%, CaCl<sub>2</sub> 0.01%, trace sol. 0.1ml, respectively. and then the glucose & yeast was feeding after consume glucose.

After the mass culture of Bt with the industrial media system, several formulations designated as F01~F08, were made with various combinations of adjuvants, white carbon, Tween 20, NK-DA203W, NK-SLS, STPP, ammonium sulfate, insecticidal plant extract, etc. These formulations showed good physical properties in wetness, suspensibility and particle size. The stability test of the deterioration of toxin along the long period stock in various temperature, all products were very stable in room temp. and 40°C. The efficacy of the formulations was verified against diamondback moth larvae(*Plutella xylostella*) in laboratory and field test. Among the tested formulations, the best composition of *Bacillus thuringiensis* KFRI-2 WP was white carbon based WP formulation containing of 25% of B.t concentrated liquid, 5% of Tween 20 as surface active agent, 5% of sodium tripolyphosphate as stabilizer, 10% of suncap as encapsulation agent, 5% of sodium lignosulfonate as UV protector, 30% of white carbon as absorbent, and 20% of ammonium sulfate as carrier. Especially, when compared commercial *B. thuringiensis kurstaki* type formulation with BSF-S(F05) & BSF-D(F06), plant extract added with insecticidal activity, in field condition, BSF-S(F05) and BSF-D(F06) formulations showed equivalent or superior effect to commercial *B. thuringiensis kurstaki* type WP formulation.



Above showed that mortality of BSF-S, BSF-D formulation with insecticidal plant extract was highly enforced than B.t only formulation by synergistic effect. The mortality of mixed formulation appeared faster and higher at 2 days after application than single treatment.

These results showed that insecticidal plant extract to complement the weakness of Bt only formulation, the effect revealed slowly.