

Bacillus thuringiensis subsp. *kurstaki* HD-1의 아밀라제 생산과 특성 연구

Production of Extracellular Amylase by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and its Characteristics

김수영¹ · 유관희² · 이영주¹ · 이형환¹

Kim Soo Young¹, Kwan Hee Yoo², Young Chu Lee, and Hyung Hoan Lee¹

ABSTRACT The extracellular amylase production by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 in amylase production media and its characteristics were investigated. The amylase production was highest in the medium composed of 0.2% soluble starch, 1.0% Bacto-peptone, 0.3% beef extract, 0.3% yeast extract, 0.5% NaCl, 0.3% K₂HPO₄, 0.1% KH₂PO₄, 0.012% CaCl₂·2H₂O, 0.005% MnSO₄·H₂O, and 0.03% MgSO₄·7H₂O. The amylase activity was inhibited by 50mM EDTA. The enzyme was optimally active from pH 6.5 to 7.0 at 55°C. The specific activity of the enzyme in the ethanol precipitate was 2.01 units/mg, and the Km value was approximately 0.8 mg/ml.

KEY WORDS *Bacillus thuringiensis*, amylase

抄 錄 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1을 아밀라제 생산배지에 32°C로 24시간 배양하였을 때 아밀라제 활성은 0.40 units/ml였고, 50 mM EDTA에 의하여 활성이 억제되었으며, 기본배지에 soluble starch와 Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺을 첨가했을 때 활성이 비교적 높았고, pH6.5와 7.0 사이에서, 온도 55°C에서 비교적 활성이 높았다. 아밀라제 생산을 위한 최적 배지로는 0.2% soluble starch, 1.0% bacto-peptone, 0.3% beef extract, 0.3% yeast extract, 0.5% NaCl, 0.3% K₂-KH₂PO₄, 0.012% CaCl₂·2H₂O, 0.005% MnSO₄·H₂O, 0.03% MgSO₄·7H₂O이었다. 효소 용액에 HPO₄, 0.1% 탄을 침전시켜 5 ml의 0.1M 인산염 완충액에 용해한 용액의 비활성은 2.01 units/mg였고, starch에 대한 효소의 Km 값은 0.80 mg/ml였다.

檢 索 語 *Bacillus thuringiensis*, 아밀라제

*Bacillus thuringiensis*는 Gram 양성 간균으로서 아포 형성시 생성되는 단백질 결정체가 나비목 유충에 독성을 나타낸다(Angus 등 1959, de Barjac 등 1966).

B. thuringiensis subsp. *kurstaki*는 Kurstak (1982)에 의하여 가루줄명나방(*Anagasta kuehniella*)의 병든 유충으로부터 분리되었으며, 이 균주가 자연상태에서 나비목유충에 감염될때 38~52%의 치사율을 나타내는 매우 높고 특이한 활성을 가지고 있는 것이 관찰되었다.

de Barjac와 Lemille(1970)은 이 균주를 편모형청형 3a 3b로 분류하였고, Dulmage(1970)는 병든 목화다래나방(*Pectinophora gossypiella*)으

로부터 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*를 분리 하였다.

이 균에 대한 대부분의 연구는 독소단백질의 형성과 특성, 독소 단백질의 작용기작, 독소 유전자의 유전적 특성 및 유전공학적인 연구에 집중되었다(Adang 등 1985, Bulla 등 1980, Debabov 등 1977, Held 등 1982, Huber 등 1981, Lee 등 1984, Schnepf 등 1981, Ward 등 1984).

Li와 Yousten(1975)은 *B. thuringiensis*가 생산하는 프로티아제에 관하여, Tobey와 Yousten (1976)은 아밀라제에 관하여 연구 하였다.

*B. thuringiensis*가 생산하는 세포외 효소의 생산과 특성에 관하여 조사함으로써 발효에 의한 살충제 생산의 조건을 연구하는데 중요한 기초자료를 얻을 수 있다고 생각된다.

본 연구는 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*

1 건국대학교 생물학과(Department of Biology, Kon Kuk University, Seoul 133-701, Korea)

2 상지대학교 생물학과(Department of Biology, Sanggi University, Wonju 220-130, Korea)

HD-1이 생산하는 아밀라제의 특성과 여러가지 배지조성에 따른 균의 생장, pH 변화, 아밀라제 생산, 아밀라제의 부분 정제, km 값 등을 측정하였다.

材料 및 方法

균 주

본 실험에 사용한 균주는 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1으로서 Bacillus Genetic Stock Center (The Ohio State University, Department of Biochemistry)로 부터 분양받아 건국대학교 생물학과 미생물학 연구실에서 BHI 사면 배지에 배양중인 균주를 사용하였다.

배 지

LB 배지의 조성은 1.0% bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 1.0% NaCl, pH 7.5이다.

아밀라제 생산 배지 아밀라제 생산 기본배지는 1.0% bacto-peptone, 0.3% beef extract, 0.3% yeast extract, 0.5% NaCl, 0.3% K_2HPO_4 , 0.1% KH_2PO_4 가 되도록 조성하였다.

Glucose 배지는 아밀라제 생산 기본배지에 0.2% glucose를 첨가하였다.

Soluble starch 배지는 기본배지에 0.2% soluble starch가 되도록 첨가하였다.

Glucose 아밀라제 생산배지는 glucose 배지에 0.012% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.005% $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0.03% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 첨가하였다.

Soluble starch 아밀라제 생산 배지는 soluble starch 배지에 0.012% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.005% $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0.03% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 가 되도록 첨가하였다.

효소의 활성 측정

아밀라제의 활성 측정은 3,5-dinitrosalicylic acid 환원당 측정법(Bernfield 1955, Plummer 1978)을 이용하였다. 효소 용액의 활성 측정을 위한 표준곡선(Fig. 1)의 작성은 다음과 같이 하였다.

각 시험관에 0.05~1.0 mg/ml가 되도록 maltose 용액을 3 ml씩 조성하고, 1% 3,5-dinitro-

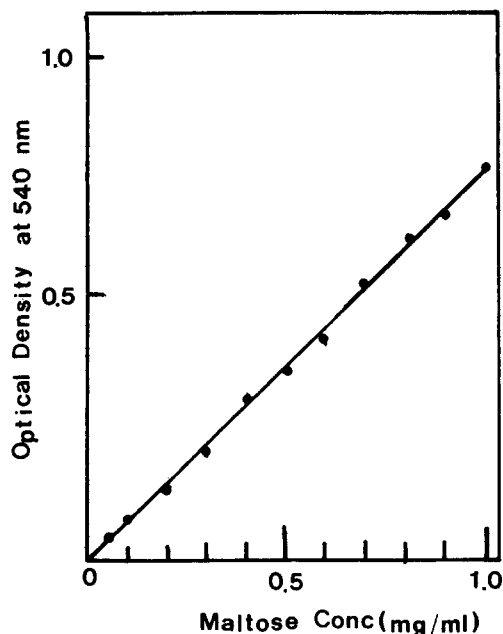


Fig. 1. Standard curve for reducing sugar determination by the method of Bernfeld (1955).

salicylic acid를 1.0 ml씩 첨가한 후, 5분간 중탕하였다. 차가운 물로 식혀 실온이 되게하여 파장 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 증류수 3 ml에 1% 3,5-dinitrosalicylic acid 1.0 ml를 첨가하고 5분간 중탕하여 처리하였다.

아밀라제 활성을 측정하기 위하여 0.1% soluble starch와 0.1M 인산염 완충액을 1 ml씩 섞은 후, 55°C로 처리한 효소용액 1 ml를 혼합하여 55°C에서 10분간 반응시키고 1.0% 3,5-dinitrosalicylic acid 용액을 1 ml 첨가한 후 5분간 중탕 한 다음 차가운 물로 식혀 실온이 되게하여 파장 540 nm에서 흡광도를 측정하고 대조군 값을 제한 후에 표준곡선에 의하여 아밀라제 활성을 계산하였으며 pH와 온도 변화에 따른 아밀라제 활성도 측정하였다.

아밀라제 1 unit는 실험조건하에서 soluble starch 용액으로 부터 55°C에서 1분동안에 환원당(maltose) 0.1 mg을 형성하는 효소의 양이다.

아밀라제 효소용액의 준비

LB 배지 20 ml에 *B. thuringiensis* subsp. *kur-*

starki HD-1을 접종하고 32°C에서 150 rpm으로 18시간 배양한 균액을 0.2% soluble starch가 포함된 아밀라제 생산배지 300 ml에 1:50으로 접종하였다. 32°C에서 150 rpm으로 24시간 진탕배양한 후, 6,000 rpm으로 15분간 원심분리(Centrifikon H401)한 후 상등액을 4°C에 보관하면서 아밀라제 효소용액으로 이용하였다.

배지 조성에 따른 균의 성장, pH 변화, 아밀라제 생산

아밀라제 생산 기본배지 1리터당 0.12 g CaCl₂·2H₂O, 0.30 g MgSO₄·7H₂O, 0.05 g MnSO₄·H₂O, 0.005 g CuSO₄·5H₂O, 0.005 g ZnSO₄·7H₂O, 0.005 g FeSO₄·7H₂O, 2.0 g (NH₄)₂SO₄를 각각 또는 2~3 종류씩 조합하여 포함시켜 아밀라제의 생산에 미치는 영향을 조사하였다.

아밀라제 활성에 대한 금속이온의 영향

아밀라제의 활성을 나타내는데 있어서 Ca²⁺과 같은 금속이온의 필요성을 확인하기 위하여 EDTA가 들어 있는 효소반응용액과 들어 있지 않은 용액에서 각각의 활성을 측정하였다.

효소 반응용액내의 EDTA 농도는 50 mM로 하였으며 0.007% CaCl₂·2H₂O가 들어 있는 반응 혼합액을 조성하여 적정 온도에서 30분간 반응시켜 활성을 측정하였다.

아밀라제의 부분정제

B. thuringiensis 균주가 생산하는 아밀라제를 균 배양액으로 부터 부분정제하기 위하여 Alexander 등(1985)의 방법을 변형하여 이용하였다. Starch를 포함한 아밀라제 생산배지에서 24시간 배양하여 얻은 균 배양액 300 ml로 부터 준비된 효소용액을 얼음위에 방치하고 동량의 95% 에탄올(-20°C)을 1시간 이상 천천히 떨어뜨리면서 섞어 준 다음, 15,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 침전물을 모은 후, 에탄올로 1회 세척하여 5 ml의 0.1M 인산염 완충액(pH 6.9)으로 용해하고 투석막에 넣어 흐르는 물에서 18시간 동안 투석한 후, -20°C에 보관하였다. 일부 용액은 냉동건조시켜(Labconco) 분말상태로 -20°C에 보관하였다.

단백질 농도 측정

부분적으로 정제된 효소용액의 단백질농도 측정은 folin-phenol 방법을 이용하였다(Lowry 등 1951). 단백질의 농도 측정을 위한 표준곡선을 작성하기 위하여 bovine serum albumin을 이용하여 시험관에 농도에 따른 반응 혼합액을 조성하고, 2% CuSO₄·5H₂O 1 ml과 4% sodium potassium tartrate 1 ml 그리고 3% CaCO₃ 48 ml를 실험적전에 바로 혼합하여 1 ml씩을 각 시험관에 첨가하였다. 실온에서 10분간 배양하고, phenol-ciocalteau 시약(Merck)을 50 μl씩 첨가하여 혼합한 후, 실온에서 다시 25분간 반응시켜준 후, 한번 더 진탕하고, 5분후 540 mm에서 흡광도를 측정하였다.

대조군을 0으로 하고 각 반응 시험관액의 흡광도를 측정하여 표준곡선을 작성하였다. 미정 표본의 흡광도에서 완충액의 흡광도를 제하여 단백질 농도를 계산하였다. 이상의 실험을 2회 이상 반복하였다.

Km 값 측정

Soluble starch 용액을 인산염 완충액 ml 당 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 8.0, 16 mg씩 넣고 아밀라제 효소용액 1 ml를 첨가하여 섞은 후 1% 3,5-dinitrosalicylic acid를 1 ml 첨가한 후(Plummer 1978) 아밀라제 활성측정법에 의하여 활성을 측정하고 반응속도 V(mg/min)를 구한 후 Km 값을 계산하였으며 1/[S], 1/V 대신 [S], V/[S]를 사용하였다.

結果 및 考察

아밀라제 활성

B. thuringiensis subsp. *kurstaki* HD-1을 soluble starch가 포함된 아밀라제 생산 배지에서 24시간 배양하여 활성을 측정한 결과는 0.40 unit/ml였다(Fig. 4).

일부 아밀라제는 calcium을 조인자로 가지고 있는 metalloenzyme으로 알려져 있는데(Fisher & Stein 1960), 50 mM ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)의 존재 하에서 반응시켜 아밀라제 활성을 측정한 결과, 효소의 활성이 거

Table 1. Effect of EDTA on the activity of amylase produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 on the amylase production medium*

Conditions	O.D. at 540 nm
Water blank	0
Reaction blank ^a	0.082
No EDTA ^b	0.190
50mM EDTA ^c	0.097

^a Reaction mixture without amylase and EDTA.

^b Reaction mixture with amylase.

^c Reaction mixture with amylase and EDTA.

* Amylase production medium contains 0.2% soluble starch, 1.0% Bacto-peptone, 0.3% beef extract, 0.3% yeast extract, 0.5% NaCl, 0.3% K_2HPO_4 , 0.1% KH_2PO_4 , 0.012% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.005% $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0.03% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$.

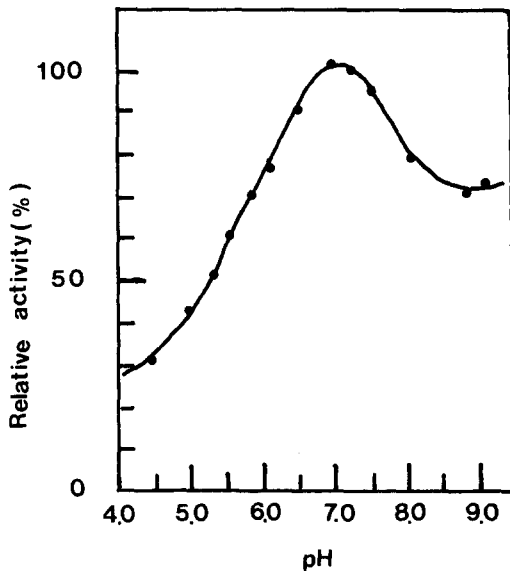


Fig. 2. Effect of pH on the activity of amylase produced by *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 cultured on amylase production medium for 24 hrs.

의 억제되었다(Table 1).

아밀라제의 활성은 pH 6.5와 7.0 사이(Fig. 2), 온도 55°C에서(Fig. 3) 비교적 높게 나타났다.

배지 조성에 따른 아밀라제 생산

B. thuringiensis subsp. *kurstaki* HD-1을 아밀라제 생산 기본배지와 여러가지 금속이온이

Table 2. Effect of metal ions on the amylase production by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1

Ions ^a	Amylase (units/ml) at 24 hours
Ca ²⁺	0.15
Mg ²⁺	0.02
Mn ²⁺	0.09
Mg ²⁺ - Mn ²⁺	0.17
Ca ²⁺ - Mn ²⁺	0.44
Ca ²⁺ - Mg ²⁺	0.22
Ca ²⁺ - Mn ²⁺ - Mg ²⁺	0.60
Cu ²⁺ - Zn ²⁺	0.34
Fe ³⁺ - NH ₄ ⁺	0.01
None	0.03

^a Composition of the amylase production basal medium is as follows; 0.2% soluble starch, 1.0% Bacto-peptone, 0.3% beef extract, 0.3% yeast extract, 0.5% NaCl, 0.3% K_2HPO_4 , 0.1% KH_2PO_4 . Final concentrations of each salts per liter added to the basal medium are 0.12 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.3 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.005 g $CuSO_4$, 0.005 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.005 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2 g $(NH_4)_2SO_4$.

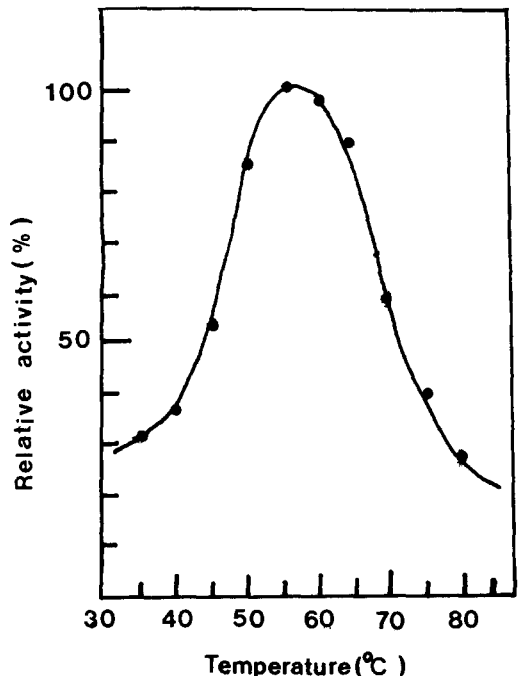


Fig. 3. Effect of temperature on the activity of amylase produced by *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 on the amylase production medium for 24hrs.

첨가된 배지에서 배양하여 아밀라제의 생산을 비교한 결과는 Table 2 와 같다.

Table 3. Amylase production by *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 in different media

Media composition	Amylase (units/ml) at 12hr culture
Basal medium ^a	0.20
Basal medium + 0.2% starch	0.20
Basal medium + 0.2% starch + Ca ²⁺ , Mg ²⁺ and Mn ²⁺	0.42
Basal medium + 0.2% glucose	0.22
Basal medium + 0.2% glucose + Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , and Mn ²⁺	0.34

^a Basal medium: 1.0% Bacto-peptone, 0.3% Beef-extract, 0.3% yeast-extract, 0.5% NaCl, 0.3% K₂HPO₄ and 0.1% KH₂PO₄.

Table 4. Purification table for amylase produced by *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 on the amylase production medium^a at 24 hrs

Fraction	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Total (mg)	Units (Units/ml)	Total units	Specific activity (units/mg)	Enzyme yield
Crude enzyme	200	4.69	938	0.57	114	0.12	100
Ethanol precipitation	5.0	0.64	2.57	1.22	5.16	2.01	5.7

^a Amylase production medium: 0.2% soluble starch, 1.0% Bacto-peptone, 0.3% beef extract, 0.3% yeast extract, 0.5% NaCl, 0.3% K₂HPO₄, 0.1% KH₂PO₄, 0.012% CaCl₂·2H₂O, 0.005% MnSO₄·H₂O, 0.03% MgSO₄·7H₂O.

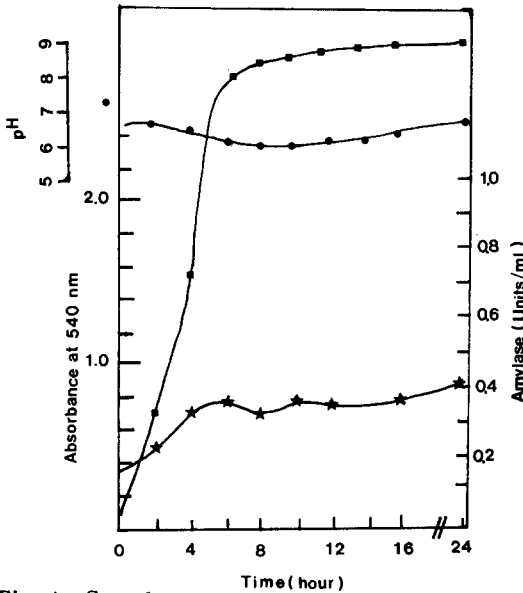


Fig. 4. Growth pattern, pH change and amylase production by *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 on the amylase production medium.

● : pH, ■ : growth, ★ : amylase production.

*B. thuringiensis*에 있어서 Ca²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺ 등이 아밀라제 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 Ca²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺ 등을 각각 또는 조합하여 기본배지에 첨가하고 배양하여 아밀라제 활성을 측정한 결과 금속이온을 첨가하지 않은 경우보다 높은 활성을 나타냈다.

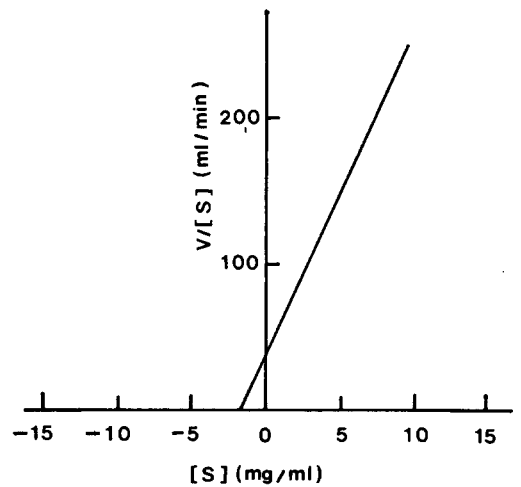


Fig. 5. Lineweaver-Burk plot for activity of amylase produced by *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1.

Mg²⁺이나 Mn²⁺ 보다는 Ca²⁺을 포함한 경우에 높은 활성을 나타냈으며, Mg²⁺과 Mn²⁺ 또는 Ca²⁺과 Mg²⁺을 포함한 경우 보다 Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺을 모두 포함한 경우가 가장 활성이 높았다.

Li와 Yousten(1975)은 프로티아제의 경우 Mn²⁺이 효소의 생산에 필요하며 Ca²⁺은 안정화에 필요하다고 하였고, Tobey와 Yousten(1976)은 Ca²⁺-Mn²⁺을 포함한 경우에서만 높은 활성을

나타낸다는 결론을 얻었다. Cu^{2+} - Zn^{2+} 를 포함한 경우와 Fe^{2+} - NH_4^+ 를 포함한 경우는 기본 배지와 비슷한 활성을 나타내는 것으로 보아 아밀라제 생산 또는 활성에 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다.

배지와 이차 증류수에 포함된 금속이온이 아밀라제 생산에 미치는 영향을 조사하지는 못했으나, 본 실험의 결과 Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} 은 아밀라제의 생산에 어느 정도 영향을 미치는 것으로 생각되며 Coleman과 Elliott(1962), Weinberg 등(1964)도 Mn^{2+} , Ca^{2+} 들이 아밀라제 생산에 영향을 미친다고 하였다.

Glucose, soluble starch가 아밀라제 생산에 미치는 영향을 알기 위하여 기본 배지에 각각 0.2%가 되도록 첨가하고 배양한 결과 정지기 이후에는 Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} 이 포함된 soluble starch 배지의 경우 비교적 활성이 높게 측정되었다(Table 3).

starch를 포함한 아밀라제 생산배지에서 배양 시간에 따른 균의 성장, pH의 변화와 효소 용액의 아밀라제 활성을 측정된 결과(Fig. 4), 배양후 8시간에 정저기에 들어갔으며 이때의 pH는 5.9로 가장 낮았다. 효소 활성은 6시간에서 높았다가 약간 떨어진 후 10시간에 다시 증가하였다.

아밀라제의 부분 정제

B. thuringiensis subsp. *kurstaki* HD-1을 0.2% soluble starch가 포함된 아밀라제 생산배지에서 배양하여 얻은 효소 용액과, 에탄올 침전을 시켜 얻은 용액의 단백질 농도는 ml 당 각각 4.69 mg과 0.64 mg이었다.

조(粗)효소 용액의 아밀라제 활성은 0.57 units/ml이었고, 에탄올 침전물은 1.22 units/ml였으며 specific activity는 조효소가 0.12 units/mg, 에탄올 침전물은 2.01 units/mg였다(Table 4).

아밀라제 활성 Km 값 측정

B. thuringiensis subsp. *kurstaki*가 생산하는 아밀라제의 starch 분해에 대한 Km 값은 0.80 mg/ml였다(Fig. 5).

引用 文 獻

- Adang, M.J., M.J. Staver, T.A. Rochelean, J. Leighton, R.F. Barker & D.V. Tompson. 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.
- Alexander, P.R. 1985. Isolation and purification of enzymes, in Basic biochemical methods. Wiley-Interscience. pp.29~44.
- Angus, T.A. & A.M. Heipel. 1959. Inhibition of feeding and blood pH changes in *Lepidoptera* larvae infected with crystalforming bacteria. Canad. Entomol. 91 : 352~358.
- Bernfield, P. 1955. Amylase α and β , in Methods in Enzymology. S.G. Colowick and N. Kaplan, ed., Academic Press, N.Y. 1 : 149~155.
- Bulla, L.A., Jr., D.B. Bechtel, K.J. Kramer, Y.I. Shethna, A.I. Aronson & P.C. Fitz-James. 1980. Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. Crit. Rev. Microbio. 8 : 147~204.
- Coleman G. & W. Elliot. 1962. Studies on α -amylase formation by *Bacillus subtilis*. Biochem. J. 83 : 256~263.
- Debabov, V.G., R.R. Azizbekyan, O.I. Klebalina, V.V. Dyachenki, F.P. Galushka & R.A. Belykh. 1977. Isolation and preliminary characteristics of extrachromosomal elements of *Bacillus thuringiensis*. DNA Genetika 13 : 496~501.
- de Barjac, H., A. Burgerjon & A. Bonnefoi. 1966. The production of heat stable toxin by nine serotypes of *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol. 8 : 536~538.
- de Barjac, H. & F. Lemille. 1970. Presence of flagella antigenic subfactors in serotype 3 of *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol. 15 : 139~140.
- Dulmage, H. 1970. Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. J. Invertebr. Pathol. 15 : 232~239.
- Fisher, E.H. & E.A. Stein. 1960. The Enzymes. in P. Boyer, H. Lardy and K. Myrback, eds., Vol. 4. p.313~343. Academic Press, New York.
- Held, G.A., L.A. Bulla, Jr., E. Ferrari, J.A. Hoch, A.I. Aroson & S.A. Minnich. 1982. Cloning and localization of the lepidopteran protoxin gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Proc. Acad. Sci. USA 79 : 6065~6069.
- Huber, H.E., P. Luthy, H.R. Ebersold & I.L. Corrier. 1981. The subunits of the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis*: size, linkage, and toxicity. Arch. Microbiol. 129 : 14~18.
- Kurstak, E. 1982. Microbial and viral pesticides.

- Marcel Dekker New York. pp.9.
- Lee, H. H., K.H. Yoo & S.Y. Kim. 1984. Cloning of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* insecticidal protein gene. Hanguk J. Genetic Engineering, Kon Kuk University. Seoul 1 : 29~35.
- Li, E. & A. Yousten. 1975. Metalloprotease from *Bacillus thuringiensis*. Appl. Microbiol. 30 : 354~361.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr & R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265~275.
- Plummer, D. 1978. Practical biochemistry, McGraw-Hill, N.Y. pp243.
- Schnepf, H.E. & H.R. Whitely. 1981. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78 : 2893~2897.
- Segel, H.I. 1976. Biochemical calculations. John-Wiley and Sons Ins. N.Y. pp208.
- Tobey, J. & A.A. Yousten. 1976. Factor affecting the production by *Bacillus thuringiensis*. Development in industrial Microbiol. 18 : 449~510.
- Ward, E.S., D.J. Ellar & J.A. Todd. 1984. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the insecticidal delta endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. FEBS Lett. 175 : 377~382.
- Weinberg, E. 1964. Manganese requirement for sporulation and other secondary biosynthetic process of *Bacillus*. Appl. Microbiol. 12 : 436~441.

(1988년 12월 2일 접수)