

Bacillus thuringiensis BT-1, BT-2가 생산하는 δ -endotoxin의 특성 규명

김영민¹ · 최흥서² · 정건섭*

¹한남대학교 생명나노과학대학 생명과학전공, ²세종대학교 줄기세포 및 암연구소, 연세대학교 생물자원공학과

Received March 19, 2007 / Accepted May 2, 2007

Characterization of a δ -endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* BT-1, BT-2. Youngmin Kim¹, Hongseo Choi² and Kunsob Chung*. ¹Department of Biological Sciences, Hannam University, 305-811, Daejeon, Korea, ²Department of Bioscience and Biotechnology, Sejong University, 608B Chungmoogwan, 98 Gunja-dong, Gwangjin-gu, 143-747, Seoul, Korea. Department of Biological Resources and Technology, Yonsei University, 220-710, Wonju, Korea – *Bacillus thuringiensis* is a well-known species of entomopathogenic bacteria that is widely used as a biopesticide against many insect pests. It produces parasporal crystals (δ -endotoxin) and endospores during sporulation. In this report, the δ -endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* BT-1 and BT-2 were characterized by Scanning Electron Microscope (SEM), Transmission Electron Microscope (TEM), SDS-PAGE, and solubilization activity by alkaline solution. BT-1, BT-2 were cultured in the GBY medium, and the δ -endotoxin of them was purified with discontinuous sucrose density gradient centrifugation. Their δ -endotoxin was observed by SEM and TEM. Morphologically, the δ -endotoxin of BT-1 was a square and flat type; whose size was $1.73 \mu\text{m} \times 0.7 \mu\text{m}$; and the δ -endotoxin of the BT-2 was spherical form whose size was $1.1 \mu\text{m} \times 0.9 \mu\text{m}$ determined by SEM and TEM. The δ -endotoxin of the BT-1 was composed of 28 kDa and 21 kDa, however, it of the BT-2 was composed of 50 kDa, 35 kDa, and 22 kDa bands determined by SDS-PAGE. The purified crystals of BT-1 and BT-2 were dissolved gradually in alkaline solution as time goes by, and it was perfectly dissolved after 3 hours. It is supposed that the δ -endotoxin of crystal was converted to a state of activation in the course of time in the intestines of insect.

Key words – *Bacillus thuringiensis*, biopesticide, endospores, δ -endotoxin, crystals

서 론

지난 50년 동안 해충의 확산을 막기 위하여 DDT (dichlorodiphenyltrichloro ethane)와 같은 많은 화학 살충제 (chemical pesticide)들이 개발되었다. 그러나 이것들은 자연 환경에서 잘 분해되지 않고 축적되어 여러 해충들에게 내성 (resistance)을 증가시켰고, 해충의 천적 및 익충(益蟲)을 포함한 많은 생물체들에게도 비선택적인 손상을 주어 오히려 해충이 증가하는 등 생태계를 파괴하였다[16]. 이에 따라 미생물 등을 이용한 환경 친화적인 생물학적 살충제(biological pesticide)에 관심을 갖게 되었고, 그 중에서 대표적인 것이 *Bacillus thuringiensis*에서 발견되었다[4,14].

*B. thuringiensis*는 주모성 편모를 갖는 호기성 세균이고, 포자와 내독소(δ -endotoxin) 단백질을 생산하는 그람양성의 간균이다. 1901년 병에 걸린 누에(silkworm) 유충에서 분리한 *B. thuringiensis* subsp. *sotto*가 최초로 보고되었고, 그 후에 선충 등 다른 해충에 살충효과를 나타내는 새로운 *B. thuringiensis*가 발견되었다[5]. *B. thuringiensis*는 포자형성시기동안 포자낭 내에 내독소 단백질을 형성하여 곤충 체내에서 독

소로 작용한다. 이러한 내독소 단백질은 인시류(Lepidoptera), 쌍시류(Diptera) 초시류(Coleoptera)의 유충에 특이성이 높은 살충성[3,12]을 나타내고, 기생편형동물(platyheminths), 원생동물류(protozoans)에도 특이성이 있음이 밝혀졌다[2].

내독소는 포자 바깥쪽에 이웃하여 내독소 단백질의 결정체(crystal)를 형성하기 때문에 autolysis가 일어나면 포자와 완전히 분리되고, 그 형성과정은 포자형성과정과 시간적으로 일치한다[15]. 내독소 단백질은 열에 의해 쉽게 변성되고, 물, 유기용매 및 높은 알칼리 용액에서 쉽게 용해된다. 이것들은 비활성 상태(protoxin)로 합성되어 곤충 중장(midgut)의 높은 pH 10 ~ pH 11하에서 단백질 분해효소의 작용에 의해 활성화되어 독소로 작용한다. 따라서 해충이 *B. thuringiensis*를 섭식하게 되면 중장의 높은 알칼리 조건과 단백질 분해효소에 의해 독소가 활성화되어, 중장의 상피세포에 위치하고 있는 특정 부위와 결합하여 원형질막에 작은 구멍을 형성한다. 그리하여 장막의 투과성을 변화시켜 체액의 pH와 이온의 변화를 초래함으로써 24~48시간 내에 해충은 결국 치사하게 된다[10].

본 연구에서는 내독소(δ -endotoxin)를 분비하는 두 개의 *B. thuringiensis* 균주(여기서는 BT-1, BT-2라고 명명함)로부터 내독소 단백질을 분리하고, 전자현미경(SEM, TEM)과 SDS-PAGE 방법을 통하여 내독소결정체의 구조와 활성을 분석하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-33-760-2252, Fax : +82-42-763-4323

E-mail : kschung@yonsei.ac.kr

재료 및 방법

사용균주 및 배지

Bacillus thuringiensis BT-1, BT-2 균주는 경기도의 한 축산 농가의 돼지분변으로부터 분리하여 사용하였다. 배지의 선택은 내독소 생산이 *B. thuringiensis*에 따라 차이가 있고, 영양분이 고갈되어야만 포자 및 내독소가 생성되는 점을 고려하여, GBY 배지(0.2% glucose, 0.2% yeast extract, 0.2% bacto peptone, pH 7.0)를 제조하여 사용하였다.

균주 배양 및 성장곡선 측정

멸균한 GBY 배지(0.2% glucose, 0.2% yeast extract, 0.2% bacto peptone, pH 7.0) 50 ml에 BT-1 균주를 접종하여 30°C, 170 rpm(비전과학, Korea) 조건으로 16시간 동안 1차 회전진탕 배양한 후, 동일 배지 250 ml에 1차 배양액 5 ml을 접종하고, 1차 배양과 같은 조건으로 완전히 포자가 형성되어 autolysis가 일어날 때(일반적으로 72시간 이상)까지 광학현미경으로 일정 시간마다 관찰하면서 배양하였다. 그런 다음, 배양액을 13,000 rpm, 4°C, 15분간 원심 분리(BECKMAN, USA)하여 펠렛(pellet)을 얻었다. 펠렛을 washing buffer (1M NaCl, 0.01% Triton X-100, 멸균증류수)로 13,000 rpm, 4°C, 15분간 원심 분리하여 3회 반복 세척하였으며, 최종 펠렛은 멸균증류수 5 ml에 혼합한 후, 2시간마다 5 ml씩 채취하여 분광광도계(Spectronic Genesys, USA)를 이용하여 OD₅₈₀에서 흡광도를 측정하여 BT-1과 BT-2의 성장을 측정하였다.

내독소 결정체 단백질의 분리 및 정제

내독소 결정체 단백질의 분리는 불연속적 농도구배 원심 분리(discontinuous gradient centrifugation)를 이용하여 수행하였다[13]. 65%, 70%, 75%, 80%, 85%(w/v) sucrose solution을 제작하여 filtering(pore size: 0.45 µm, Millipore, France)하고, 4°C에서 10시간 방치한 후, 투명한 밀도구배 튜브(Nalgene Co. USA)에 아래로부터 고농도 순으로 넣어준 다음, 그 위에 BT-1, BT-2 균주의 최종 펠렛 5 ml을 조심스럽게 피펫팅하였다. 25,000 x g, 4°C 조건으로 2시간 동안 원심 분리(himac CP70MX, Japan)를 한 후, 원심분리 튜브에 형성된 균주의 내독소 밴드 위치를 확인하고, ice상에서 20 ml syringe를 이용하여 밴드를 회수하였다. Sucrose 성분을 제거하기 위해 회수한 내독소 결정체량의 3배 정도의 ethanol (4°C)을 넣고, -20°C에서 10시간 정도 방치한 후, 13,000 rpm, 4°C 조건으로 15분간 원심 분리하여 최종 내독소 밴드를 회수하였다. 회수한 내독소 결정체를 멸균 증류수로 3회 세척한 후, 증류수 1~2 ml과 섞어서 -20°C에서 보관하면서 실험에 이용하였다.

주사전자현미경(Scanning Electron Microscope)에 의한 관찰

불연속적 농도구배 원심분리를 통해 분리된 BT-1, BT-2 균주의 내독소 결정체 현탁액을 aluminium mounts에 떨어뜨리고 실온에 방치하여 건조한 후, Ion sputter (HITACHI E-1010, Japan)를 이용하여 15 mA, 15분 동안 gold coating 하였고, 주사전자현미경 (HITACHI S-3000N, Japan)을 이용하여 20 kv, working distance 6.7 mm에서 20,000배로 관찰, 촬영하였다[9].

투과전자현미경(Transmission Electron Microscope)에 의한 관찰

배양과 동일한 조건으로 포자가 완전히 형성될 때까지 배양한 후, 배양액을 13,000 rpm, 4°C 조건으로 15분간 원심 분리하여 상등액은 버리고, 펠렛을 취하여 멸균 증류수로 3회 반복하여 세척하였다. 펠렛을 paraformaldehyde glutaraldehyde buffer (pH 7.2)에 넣고, 1시간 고정된 후, phosphate buffer (pH 7.2)로 고정된 sample을 15분씩 3회 세척하는 전고정(pre-fixation)을 수행하였다. Sample에 1% Osmium tetroxide (OsO₄)를 넣고 2시간 동안 고정된 후, phosphate buffer (pH 7.2)로 15분씩 3회 세척하는 후고정(post-fixation)을 수행하였다. Ethanolpropylene series를 이용하여 탈수 과정을 수행하였고, Epon 812 resin mixture를 이용하여 60°C에서 28시간 이상 incubation(제이오텍, Korea)하였다[17]. Ultrathin section은 LKB (BROMMA 2088 ultramicrotome)를 이용하여 수행하였고, uranyl acetate와 lead citrate로 염색한 후 투과전자현미경(JEOL CXII, Japan)으로 관찰, 촬영하였다.

SDS-PAGE에 의한 내독소 결정체 단백질의 분리

분리된 내독소 결정체 단백질 분리는 SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) 방법을 이용하여 분석하였다. SDS-PAGE는 Laemmli[8] 방법에 의한 불연속 완충용액 시스템을 응용하였고, 12% separating gel과 5% stacking gel을 이용하여 100 V에서 3시간 동안 수행하였으며, SDS-PAGE용 sample은 분리된 내독소 결정체 현탁액과 Laemmli sample buffer [0.125M Tris/HCl buffer (pH 6.8), 4%(w/v) SDS, 10% sucrose, 10% 2-mercaptoethanol, 0.004% bromophenol blue]를 동일량으로 혼합한 후, 약 3분간 95°C에서 가열하고, 다시 약 30초 동안 10,000 rpm에서 원심 분리하여 여기서 얻어진 상등액을 취하여 사용하였다. 전기영동이 끝난 후 Coomassie brilliant blue로 1시간 동안 염색, 탈색을 거친 후, 45°C에서 60분간 건조시켜 보관하였다.

In vitro상에서 alkaline solubilization에 의한 내독소 결정체 단백질의 활성화 측정

BT-1, BT-2 내독소 결정체 단백질을 알칼리 완충용액 [50 mM Na₂CO₃ (pH10), 10 mM dithiotheritol (DTT) 1 mM EDTA] 으로 37°C에서 각각 10분, 20분, 30분, 1시간, 2시간, 3시간 동안 용해한 후, solubilization activity를 멈추기 위해서 동일량의 Laemmli sample buffer를 첨가하였고, 3분간 95°C에서 가열한 후, 다시 약 30초 동안 10,000 rpm에서 원심 분리하여 얻어진 상등액으로 SDS-PAGE 분석을 실시하였다[6,7].

결과 및 고찰

균주의 증식곡선 측정

BT-1과 BT-2 균주는 2시간 정도의 유도기를 지나서 2시간 이후부터 8시간 동안 대수증식기에 들어갔으며, 배양 후 12시간이 지나서 부터 정지기에 들어갔다(Fig. 1). 증식에 의한 현탁도는 배양 12시간 때에 OD₅₈₀값이 1.7~1.8이었다. Lopez 등[11]의 실험결과와 같이, 12시간 이후부터 GBY 배지 조성 특성상 생장에 필요한 영양분이 점차 감소하면서 생장이 줄어들게 되면 포자 및 내독소가 형성되기 시작 하였다.

내독소 결정체의 분리 및 정제

BT-1, BT-2 균주에 대해서 85%는 5 ml, 80%는 5 ml, 75%는 6 ml, 70%는 5 ml, 65%는 5 ml을 각각 첨가하였다. 밀도 구배 튜브 각각에 동일 농도로 서로 다른 양의 sucrose solution을 고농도 순으로 넣어준 후, 25,000 × g, 4°C 조건으로 2시간 동안 원심 분리한 결과, 65%와 70%사이의 sucrose 농도 위치에서 내독소 밴드가 형성되었다. 포자는 튜브 바닥에 펠렛으로 형성되었고, 각 균주의 내독소 결정체 밴드는 폭이 약 2 mm정도로 나타났다(Fig. 2). 각 균주의 내독소 결정체

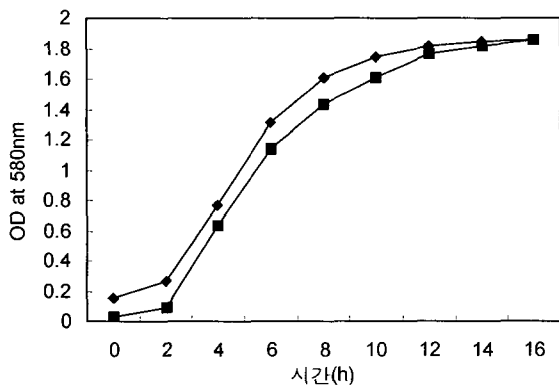


Fig. 1. Growth curves of *B. thuringiensis* BT-1 and BT-2. They were cultured in GBY medium at 30°C, whose growths were measured at OD₅₈₀. ◆◆: *B. thuringiensis* BT-1, ■■: *B. thuringiensis* BT-2

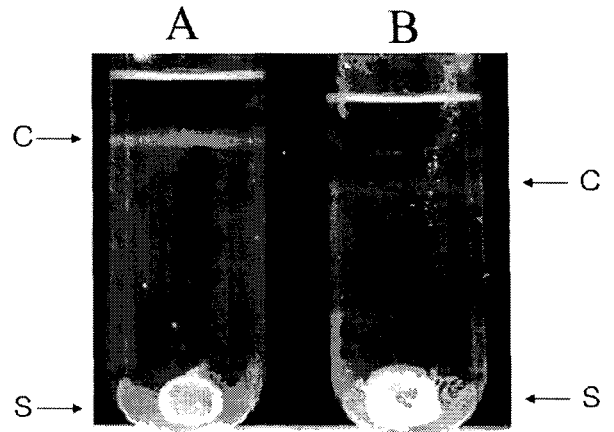


Fig. 2. Crystal bands of δ -endotoxin isolated by 65%~85% discontinuous sucrose gradient centrifugation (C) and pellets of endospore (S). A: *Bacillus thuringiensis* BT-1, B: *Bacillus thuringiensis* BT-2, C: Crystal bands of δ -endotoxin, S: pellets of endospore (S)

밴드를 cold ethanol을 이용하여 침전시켜 분리한 후, 멸균한 증류수 1~2 ml를 넣어 -20°C에서 보관하면서 다음 실험에 이용하였다.

주사전자현미경(Scanning Electron Microscope)에 의한 관찰

일반적으로 *B. thuringiensis* 균주의 내독소 단백질 결정체의 모양과 살충 활성범위와는 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 이중피라미드형(bipyramidal or cuboidal type)은 나비 및 나방류의 인시류(Lepidopteran), 막대형 및 불규칙한 구형(bar and irregular spherical type)은 파리, 모기 등의 쌍시류(Dipteran), 사각형 및 납작형(square and flat type)은 딱정벌레와 같은 초시류(Coleopteran)에 대해 높은 살충 활성이 있으며, 일부 부정형(amorphous or atypical type)은 비살충성을 나타낸다[6].

분리 및 정제된 BT-1, BT-2 균주의 내독소 결정체의 외부 구조를 주사전자현미경(SEM)을 이용하여 20,000배로 관찰한 결과 BT-1의 내독소 결정체 모양은 사각형 및 납작형(square and flat type)과 구형(spherical form)이 혼재하고 있었다(Fig. 3). 구형은 내독소 결정체가 미성숙된 것과 일부 포자가 혼재하고 있는 것으로 판단되었고, 미성숙된 것이 점차 성숙되어 가면서 사각형 및 납작형(square and flat type)으로 변화되는 것으로 추측된다. Fig. 3에서 나타난 것처럼 미성숙된 결정체의 크기는 길이가 1.0 μ m, 폭이 0.4 μ m였으나, 성숙된 결정체의 크기는 길이가 1.73 μ m, 폭이 0.7 μ m였다. 이런 형태는 Inmaculada 등[4]이 보고한 형태와 유사하였다. 반면에 BT-2의 내독소 결정체 모양은 크고 작은 주름이 잡힌 구형(spherical form)과 일정한 크기를 나타내는 장타원형의 포자가 혼재하고 있었고, 구형의 내독소 결정체의 크기는 길이가

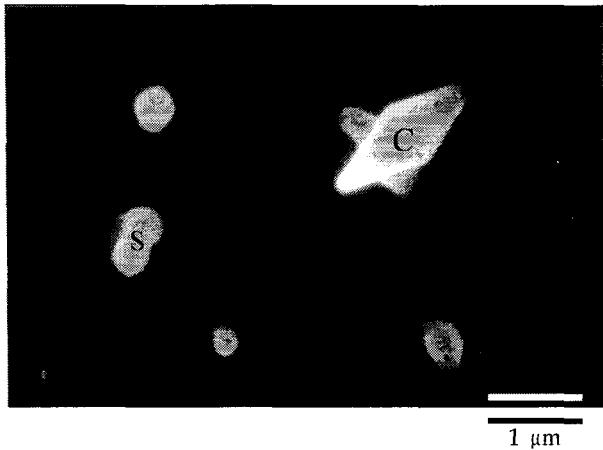


Fig. 3. Scanning electron micrographs of δ -endotoxin produced by *B. thuringiensis* BT-1 (x 20,000). C: Crystal of a δ -endotoxin, S: Endospore, bar: 1 μ m

1.1 μ m, 폭이 0.9 μ m였다(Fig. 4). 이와 같은 형태는 JOEL 등 [7]이 보고한 형태와 유사하였다.

두 균주 모두 내독소 결정체의 크기가 각각 다른 것들이 혼재하는 것을 관찰할 수 있었는데, 이것은 성숙한 것과 미성숙된 것이 함께 모여 있는 것으로 판단되었다. 즉, 미성숙된 균주의 내독소는 거의 구형에 가까웠으며, 이것이 점점 성숙되어 가면서 각 균주의 고유한 형태로 변하는 것으로 여겨진다. 내독소 외형과 크기면에서 뚜렷한 차이가 있는 결과를 통해 두 균주가 생산하는 내독소가 서로 다르다는 것을 알 수 있었다((Fig. 3, Fig. 4).

투과전자현미경(Transmission Electron Microscope)에 의한 관찰.

BT-1 균주를 투과전자현미경으로 내독소 결정체 단백질의 내부 미세구조를 관찰한 결과, 사각형 및 납작형(square

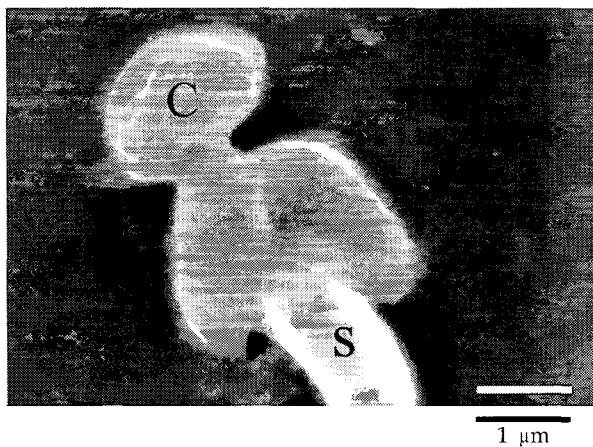


Fig. 4. Scanning electron micrographs (SEM) of δ -endotoxin produced by *B. thuringiensis* BT-2 (x 20,000). C: Crystal of a δ -endotoxin, S: Endospore, bar: 1 μ m

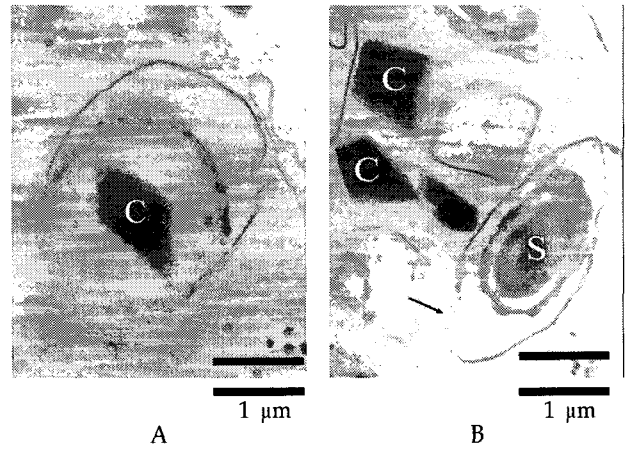


Fig. 5. Transmission electron micrographs (TEM) of δ -endotoxin produced by *B. thuringiensis* BT-1 (C: Crystal of a δ -endotoxin, S: Endospore, allow: autolysis, bar: 1 μ m). A: x 44,800, B: x 32,000

and flat type)으로 밝혀졌다(Fig. 5). 포자와 이웃하고 있던 내독소가 autolysis가 일어나 포자와 떨어져 있는 상태를 관찰할 수 있었으며(화살표 부위), 성숙한 내독소와 미성숙된 내독소간의 크기 또한 다르게 관찰되었다. 또한 일부는 그 형태가 깨진 것을 볼 수가 있는데 이것은 sample 제작 과정상의 외부적 요인(온도, pH 등)에 의한 결과라고 여겨진다. BT-2 균주는 크고 작은 주름이 잡힌 구형(spherical form)이 나타남을 관찰하였는데 BT-1의 내독소와는 달리 깨진 형태의 내독소는 볼 수 없었다(Fig. 6). 이러한 결과를 통해 *B. thuringiensis* BT-1, BT-2가 생산하는 내독소 단백질 결정체의 구조는 서로 다른 형태 및 크기의 내독소를 생산함을 확인할 수 있었다.

BT-1은 Lepidoptera-specific 특성을 가지고 있는 *B. thuringiensis kurstaki*, *B. thuringiensis fitinimus*, *B. thuringiensis*

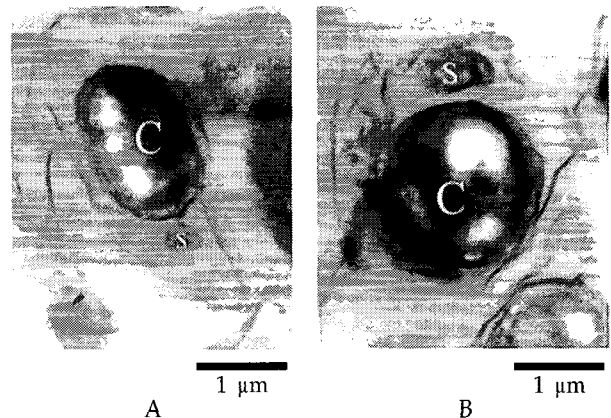


Fig. 6. Transmission electron micrographs (TEM) of δ -endotoxin produced by *B. thuringiensis* BT-2 (C: Crystal of a δ -endotoxin, S: Endospore, bar: 1 μ m). A: x 44,800, B: x 32,000

sotto, *B. thuringiensis sumiyoshiensis*, *B. thuringiensis fukuokaensis*, *B. thuringiensis darmstadiensis*, *B. thuringiensis japonensis* 등이 생산하는 내독소 결정체와 동일한 형태이고, BT-2는 Coleoptera- and Diptera-specific 특성을 가지고 있는 *B. thuringiensis* subsp *israelensis*, *B. thuringiensis kenyae*, *B. thuringiensis entomocidus* 등이 생산하는 내독소 결정체와 동일한 형태였다. BT-1과 BT-2의 내독소 결정체와 포자는 외피(envelope)에 의해 둘러싸여 있다는 공통점이 있었다. BT-1의 이러한 특성은 일부 Lepidoptera-specific strain만이 가지고 있는 특성이지만, 반면에 BT-2의 경우는 일반적이다[17].

· SDS-PAGE에 의한 내독소 결정체 단백질의 분류

BT-1, BT-2의 내독소 결정체 단백질의 구성을 SDS-PAGE 방법에 의해 분석한 결과 Fig. 7에서 보는 바와 같이 BT-1의 내독소 결정체 단백질은 분자량이 약 28 kDa, 21 kDa의 밴드를 형성하였고, BT-2는 분자량이 약 50 kDa, 35 kDa, 22 kDa의 밴드를 형성하였다. 두 균주 모두 일부 밴드가 희미하게 나타났는데 이것은 sucrose gradient에 의한 내독소 결정체 분리 및 처리 과정에서의 외부적인 요인(온도, pH 등)으로 생긴 분해 산물로 여겨지며, 또한 SDS-PAGE 과정에서 SDS의 분해 작용으로 인해 생성된 것으로도 판단된다. Yasunori 등[18], Calabress 등[1]은 16개의 균주를 사용하여 내독소 단백질의 크기에 따라서 3개 군(group)으로 분류하였다. 즉, I 형은 고분자량(140~160 kDa), II 형은 고분자량과 중간분자량(60~150 kDa), III 형은 저분자량(40~50 kDa)으로 되어 있고, I 형과 II 형은 대부분 이중피라미드형, III 형은

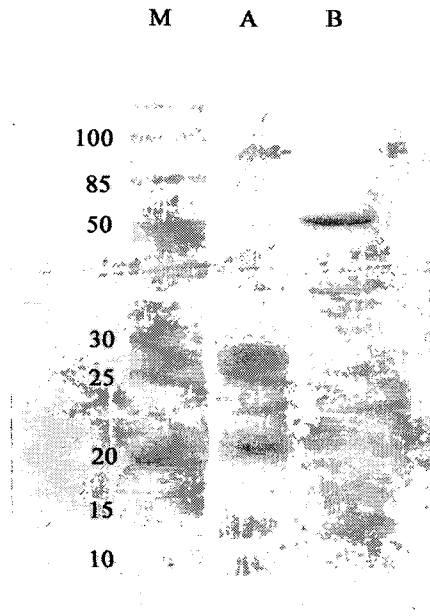


Fig. 7. δ -endotoxin of crystal proteins using SDS-PAGE analysis. A : *B. thuringiensis* BT-1, B : *B. thuringiensis* BT-2, M : Standard protein marker (kDa)

사면체와 구형으로 되어 있어 내독소 결정체 단백질의 분자량과 외부구조가 연관이 있음을 밝힌바 있다. 따라서 전자현미경에 의한 형태적 특성과 크기, SDS-PAGE 방법에 의한 내독소 결정체 단백질의 구성을 통해 BT-1과 BT-2의 내독소 결정체 단백질은 III형에 속하는 것으로 나타났다.

In vitro 상에서 알칼리 완충용액에 의한 내독소 결정체 단백질의 활성화

분리된 BT-1과 BT-2의 내독소 결정체 단백질을 알칼리 완충용액(alkaline buffer)으로 37°C에서 각각 10분, 20분, 30분, 1시간, 2시간, 3시간 동안 반응시킨 후 SDS-PAGE 방법으로 분석하였다. BT-1의 내독소 결정체 단백질은 알칼리 완충용액에 반응시킨 후, 시간이 경과함에 따라 점차로 용해되며, 3시간 후에는 거의 완전하게 용해되어 밴드를 관찰할 수 없었다(Fig. 8).

마찬가지로 BT-2의 내독소 결정체 단백질은 알칼리 완충용액에 반응시킨 후, 시간이 경과함에 따라 점차로 용해되었지만, 50 kDa은 2시간 후에, 35 kDa, 22 kDa 밴드는 10분 후부터 급격하게 용해되었으며, 3시간 후에는 거의 완전하게 용해되었다(Fig. 9).

이러한 결과는 BT-1과 BT-2가 생성하는 내독소 결정체가 곤충의 중장 내에서 비활성 상태에서부터 활성 상태로 전환되는데 시간적인 차이가 있음을 보여준다. 즉 BT-1, BT-2의 내독소 결정체 단백질이 알칼리 완충용액에 의해 비활성 상태에서 활성 상태로 전환됨을 의미하는 것으로, BT-2는 곤충의 중장내 알칼리 환경에 활성화 속도가 빠른 반면, BT-1은 BT-2에 비하여 다소 느리다는 것을 의미한다. 이러한 특성을 바탕으로 in vivo 상에서 BT-1과 BT-2가 생산하는 내독소 결정체 단백질의 특이적인 살충활성 및 다른 *B. thuringiensis* 내독소와의 특성 비교에 대한 추가적인 연구가 더 진행되어야 할 것으로 보인다.

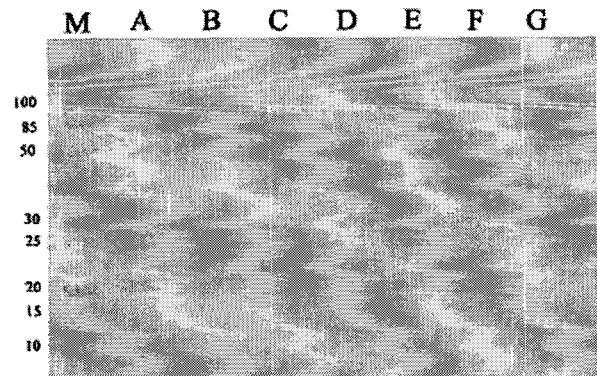


Fig. 8. Solubilization activity of intact crystal proteins of *B. thuringiensis* BT-1 by alkaline buffer (pH 10). M: standard molecular marker (kDa), A, intact crystal band, B, the crystals solubilized for 10 min.; C, 20 min.; D, 30 min.; E, 1 hours.; F, 2 hours.; G, 3 hours

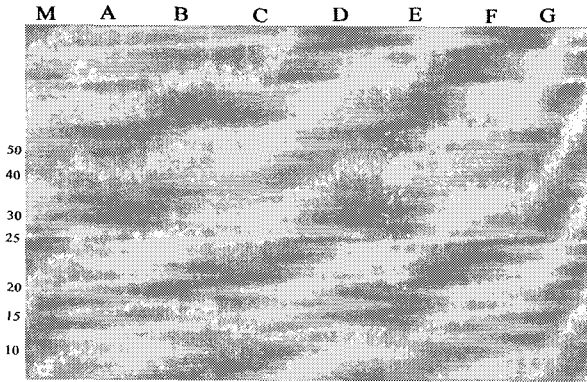


Fig. 9. Solubilization activity of intact crystal proteins of *B. thuringiensis* BT-2 by alkaline buffer (pH 10). M: standard molecular marker(kDa), A, intact crystal band, B, the crystals solubilized for 10 min.; C, 20 min.; D, 30 min.; E, 1 hours.; F, 2 hours.; G, 3 hours

요 약

*B. thuringiensis*는 많은 해로운 곤충들을 박멸시키는데 널리 사용되는 생물학적 살충제로 잘 알려져 있다. 그것은 측포자 형태의 결정체(δ -내독소)를 생산하고 내생포자들을 형성한다. 본 논문에서는 *B. thuringiensis* BT-1과 BT-2에 의해 생산되는 내독소의 특성을 주사전자현미경(SEM), 투과전자현미경(TEM), SDS-PAGE, 알칼리 용액에서의 용해 활성을 통하여 규명하였다. BT-1, BT-2 균주는 GBY 배지에서 배양되었고, 두 균주의 내독소는 당밀도구배법을 이용하여 정제되어, 주사전자현미경(SEM), 투과전자현미경(TEM)으로 관찰하였다. 형태학적으로, BT-1의 내독소는 사각형 및 납작형이고 크기는 $1.73 \mu\text{m} \times 0.7 \mu\text{m}$, 그리고 BT-2 내독소는 구형이며 $1.1 \mu\text{m}$, 폭이 $0.9 \mu\text{m}$ 인 것으로 밝혀졌다. SDS-PAGE 방법으로 분석한 결과, BT-1의 분자량은 28 kDa, 21 kDa, 반면에 BT-2의 분자량은 50 kDa, 35 kDa, 22 kDa로 밴드가 형성되었다. 이들의 결정체는 알칼리 완충용액 내에서 시간이 지나감에 따라서 점차로 용해되었으며 3시간 후에는 거의 완전히 용해되었다. 이 결과들을 통하여 BT1과 BT-2 결정체의 내독소가 곤충의 중장 내에서 시간이 흐름에 따라 비활성 상태에서 활성상태로 전환되는 것으로 보여진다.

감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발사업의 지원(1999-2002)에 의해 이루어진 것임.

참 고 문 헌

1. Calabrese, D. M. and K. W. Nickerson. 1980. *Can. J. Microbiol.* **26**, 1006-1010.

2. Feitelson, J. S., J. Payne and L. Kim. 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Bio/Technology* **10**, 271-275.

3. Inmaculada, G. R., J. Sanchezb, A. Gruppec, A. C. Martinez-Ramirez, C. Rausella, M. D. Real and A. Bravo. 2001. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* PS86Q3 strain in hymenopteran forest pests. *Insect Biochem. and Mol. Bio.* **31**, 839-935.

4. Ishwata, S. 1901. On a kind of severe flacheric(sotto disease). *Dninihon. Sanshi Kaiho* **114**, 1-5

5. Kim, H. S., D. W. Lee, S. D. Woo, Y. M. Yu and S. K. Kang. 1998. Distribution, Serological Identification, and PCR Analysis of *Bacillus thuringiensis*. *Curr. Microbiol.* **37**, 195-200.

6. Laemml, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

7. Lee, H. H., S. H. Hwang and Y. S. Park. 1990. Transfer Insecticidal Toxin Gene in Plants : Cloning of Insecticidal Protein Gene in *Bacillus thuringiensis*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **6**, 647-652 .

8. Lee, I. H., Y. H. Je, J. H. Chang, J. Y. Roh, H. W. Oh, S. G. Lee, S. C. Shin and K. S. Boo. 2001. Isolation and Characterization of a *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* Strain Toxic to *Spodoptera exigua* and *Culex pipiens*. 2001. *Curr. Microbiol.* **43**, 284-287.

9. Lee, J. Y., G. J. Park and H. H. Lee. 1993. Growth and Production of Endotoxin of *Bacillus thuringiensis* Isolates. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **3**, 193-199.

10. Li, M. S., Y. H. Je, I. H. Lee, J. H. Chang, J. Y. Roh, H. S. Kim, H. W. Oh and K. S. Boo. 2002. Isolation and Characterization of a Strain of *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* Containing a New delta-Endotoxin Gene. *Curr. Microbiol.* **45**, 299-302.

11. Lopez, J. and Ibarra, J. E. 1996. Characterization of a Novel Strain of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Envir. Microbiol.* **62**, 1306-1310.

12. Nagamatsu, Y., Y. Itai, C. Hatanaka, G. Funatsu and K. Hayashi. 1984. A toxic fragment from the Entomocidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Agric. Biol. Chem.* **48(3)**, 611-619.

13. Oh, S. S. and H. H. Lee. 1985. Studies on the Isolation of δ -Endotoxin and Plasmids in *Bacillus thuringiensis*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **1**, 51-57.

14. Somerville, H. J. 1978. Insect Toxin in Spore and Protein crystal of *Bacillus thuringiensis*. *Trends Biochem. Sci.* **3**, 108-110.

15. Stahly, D. P., D. W. Dingman, L. A. Bulla, Jr. and A. I. Aronson. 1978. Possible Origin and Function of the Parasporal Crystals in *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **84**, 581-588.

16. Tabashink, B. E. 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* **39**, 47-79.

17. Wasano, N., Y. A. Chisa, S. Ryoichi, M. Ohba, T. Kawarabata and H. Iwahana. 2000. Spherical Parasporal Inclusions of the Lepidoptera-Specific and Coleoptera-specific *Bacillus thuringiensis* Strains: A Comparative Electron Microscopic Study. *Curr. Microbiol.* **40**, 128.