

Bacillus thuringiensis var. *alesti*로부터 분리된

독소의 성상과 누에에 대한 독성

李永根* · 趙鏞涉** · 林鍾聲**

*農村振興廳 蠶業試驗場 **서울대학교 農科大學

Characterization of a Toxin isolated from *Bacillus thuringiensis* var. *alesti* and Its Toxicity to the Silkworm, *Bombyx mori*

Yung Keun Lee* · Yong Sup Cho** · Jong Sung Lim*

*Sericultural Experiment Station, O.R.D **College of Agriculture, Seoul National University

SUMMARY

In the studies of characterization of crystal prototoxin isolated from *Bacillus thuringiensis* var. *alesti* and its bioassay to the silkworm larvae, *Bombyx mori* L., the following results were obtained.

1. The complete lysis of bacteria grown on the nutrient agar at 30°C in an incubator took 30 days, but the period could be reduced by a half in a devised broth media in a fermentation jar.
2. The protein toxin extracted directly from a mixture of crystals and spores without separation of crystals and spores was pure as same as the protein toxin extracted from only crystals separated.
3. By SLS polyacrylamide gel electrophoresis of prototoxin released from crystals in alkali (pH 9.5), three different proteins in molecular weights of 120,000, 87,000, 74,000 were separated.
4. In the bioassay of the toxin to the silkworm larvae, LD₅₀ per gram of the larvae in the 4th instar was 0.080 µg.

I. 머리말

Bacillus thuringiensis 는 Ishiwatta⁽¹³⁾에 의하여 죽은 누에로부터 처음 분리되었으며 그후 다시 Berliner⁽¹¹⁾에 의하여 이와 비슷한 세균이 분리된 이래 같은 성질을 가진 많은 변종들이 그 후에도 계속 분리되어왔다. Delaporte 와 Beguin⁽⁵⁾ 그리고 Heimpel 과 Angus 등은 이와 비슷한 세균들을 모두 Berliner 에 의하여 분리된 *Bacillus thuringiensis* 라는 종(Species)에 넣었고 이러한 분류학상의 문제들은 de Barjac 과 Bonnefoi⁽³⁾⁽⁴⁾에 의한 혈청학적 및 생화학적인 실험으로 해결되었다. 특히 이들 저자들은 이 세균들을 섬모에 의한 항체에 기초를 두고 9개의 그룹으로 나누었다. 이것은 Norris⁽¹⁸⁾에 의한 Esterase 의 활성에 의한 구분과도 일치 하였다. 이 세균들은 긴 막대형으로 Gram 염색에 양성이며

특히 이 세균의 중요한 특성은 포자와 단백질 결정체를 형성하는 것이다. Heimpel⁽¹⁰⁾은 이 세균의 계통들로부터 분리되는 독소의 종류를 그 형태 및 성질 그리고 그 독소들에 대해 감수성이 있는 기주에 따라 α-exotoxin, β-exotoxin, γ-exotoxin 그리고 δ-endotoxin 으로 구분하였다. 이 가운데 δ-endotoxin 은 인시목(Lepidoptera)에 대하여 독성을 갖고 있는 단백질 결정체인 것이다. Norris 와 Watson⁽¹⁷⁾은 규칙적으로 배열되어 있는 일정한 모양의 특별한 결정체의 구조를 보였고 Vankova 와 Kralik⁽²⁴⁾도 이 세균의 많은 변종들의 피라미트형의 단백질 결정체를 관찰하였다. Holmes 와 Monro⁽¹²⁾는 X-ray 에 의한 관찰을 통하여 더 자세하게 이 결정체의 구조를 발표하였다. Grigorova⁽⁶⁾는 전자현미경을 통하여 두개의 다른 형태의 결정체들을 관찰하였다. 하나는 Diamond 모양의 Bipyramid 형이고 다른 하나

는 입체형태의 Biprisma 형이었다. 이들 결정체들은 배양 후 일정한 시간이 지나면 Bacterial lysis가 일어나고 이때 포자와 결정체가 따로 떨어져 나온다. Hannay와 Fitz-James⁽⁸⁾는 결정체들을 0.01N-NaOH에 용해, 자외선 분광광도계를 통하여 280nm에서 최고의 흡광을 관찰함으로써 이 결정체는 단백질로 구성되어 있음을 확인하였다. 또한 Lecadet⁽¹⁵⁾는 이 단백질들의 amino acid들을 분석, 다른 보통 단백질과 같은 amino acid들을 얻었고 Holmes와 Monro⁽¹²⁾는 Strain들간의 독소 단백질의 amino acid 조성에 별 다른 차이가 없음을 확인하였다. Schaeffer⁽²¹⁾ 및 Ryter는 *Bacillus subtilis*의 포자형성 과정에 있어서 중요한 형태학적 변화과정 및 세포학적 연구를 통하여 Vegetative 세포로부터 포자가 형성될 때까지의 과정을 여섯 단계로 나누었으며 Young과 Fitz-James⁽²⁵⁾는 *Bacillus thuringiensis*에 대한 포자와 결정체의 형성 과정을 세포학적으로 연구, 단백질 결정체는 Vegetative 세포의 Chromatin으로부터 분화되었고, Spore의 Chromatin도 Vegetative 세포의 Chromatin들로부터 유래됨을 밝혔다. Steinhaus⁽²²⁾ Steinhaus 그리고 Jarrel⁽²³⁾, Hannay⁽⁷⁾ 등은 단백질 결정체의 인시목(Lepidoptera)에 대한 독성을 관찰하였으며, Heimpel⁽¹⁰⁾에 의하면 약 140종(Species)이 이 세균에 대하여 감수성을 나타내고 그중 약 100종 정도가 인시목(Lepidoptera)에 속한다고 하였다. 그리고 이 독소의 강도는 Strain들에 따라 다르고 또한 분비되는 독소의 종류에 따라 다른 것을 밝혔다. 이 결정체의 Endotoxin은 오직 인시목(Lepidoptera)에만 독성을 나타내는데 Heimpel과 Angus⁽⁹⁾는 누에에 있어서 δ -endotoxin의 침식으로 인하여 중장내의 알카리성 위액이 체강으로 흘러나와 장내의 pH는 떨어지고 체액의 pH는 증기됨으로 인하여 전체적인 마비상태를 일으키는 것을 관찰하였다. 그들은 이에 속하는 곤충(예; *Bombyx mori*)들은 δ -endotoxin에 감수성이 있는 Type I으로 구분하였고 Type II는 중장소화액의 유출이나 마비상태는 없으나 식욕이 부진하게 되어 끝내는 세균들이 체내를 침입하여 죽게되는 곤충들이며 Type III는 Spore와 δ -endotoxin이 공동으로 치사에 작용되는 곤충들이라고 하였다.

이러한 *Bacillus thuringiensis*는 허충에 대한 방제 수단으로 오랜동안 사용되어 왔고 구미 각국에서는 농업에 있어서 이의 사용이 계속 증가하고 있는 실정이기도 하다. 그러나 한국에서는 양잠이 하나의 주요산업이기 때문에 세균의 사용이 불가능한 것으로 생각되어 지고 있지만 어떠한 이에 대한 조사 및 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

본 연구는 장차 이러한 연구를 위한 이 균에 대한 하나의 기초연구로서 *Bacillus thuringiensis*의 변종의 하나인 *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*를 배양시켜 독소 결정체로부터 단백질 독소를 분리하여 이에 대한 물리화학적 성질을 조사하고 또 이 독소의 누에에 대한 독성을 조사코저 한 것이다.

끝으로 본 연구를 위하여 지도와 편달을 해주신 박태식 교수님과 Otago University, Dr. J. Kalmakoff에게 심심한 사의를 드리며 본 연구의 수행을 위하여 협조해주신 잠업시험장 정태암 장장님 그리고 이상동 연구관님에게 깊은 감사를 드립니다.

잠상보호연구 담당관실 여러분께도 협조해 주신데 대하여 감사를 드립니다. 그리고 본 연구에 공시한 *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*를 분양해 주신 Otago University, Dr. J.S. Pillai에게도 깊은 감사를 드립니다.

II. 재료 및 방법

1. 용해성 독소의 준비

세균배양 : 공시균 *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*는 Dr. J.S. Pillai (University of Otago, Dunedin, New-Zealand)로부터 분양을 받았으며, 이 균의 배양은 Nutrient agar의 일종인 Trypticase soy-agar(B.B.L)의 배지를 써서 30°C의 항온에 배양하였다. 다른 한 방법은 Cooksey⁽²⁾에 의해서 방안된 액체 배지를 사용하여 1l의 발효기(Fermentation Jar)속에서 온도 30°C로 배양하였다. Bacterial lysis의 여부를 확인하기 위하여 공시균 배양 이외에 여분으로 배양시켜 일주일 후에 매일 검정량을 채취하여 Malachite green 염색법에 의해서 검정확인하였다.

독소 결정체의 순수분리 : 본 방법은 Murray와 Spencer⁽¹⁶⁾의 방법에 의하여 하였다. 즉 Nutrient agar에 배양된 균체들이 포자와 결정체로 각각 완전 분리 자연 파괴되었을때 이것들을 수집하여 증류수(Deionized water)에 세척한 후 Sorvall 원심분리기에 500g의 힘으로 20분간 원심분리한 후 침전물(포자, 결정체, 파괴된 세포 부분 물질들의 혼합물)을 냉동건조시켰다. 냉동건조된 혼합물을 증류수(Deionized water)로 0.5% (W/V)로 부유액을 만들고, 이것을 35°C에서 2시간동안 부드럽게 진탕시킨 후 1.5배의 Chloroform을 가하여 Vortex mixer를 사용 강하게 뒤흔들었다. 다음에는 350g에 10분간 원심분리하여 세개의 층을 형성시켰다. 이 때, 아래의 층은 Chloroform이고 중간층은 세포의 부분 파괴물과 포자 그리고 결정체들이 포함되어 있고 맨 윗층은 주로 결정체 그리고 약간의 포자가 포함되

어 있었다. 맨 윗층을 Pasteur Pipette 을 이용하여 주의깊게 옮긴 후 다시 이것을 Whatman No 1과 No 4의 걸름 종이를 합쳐서 걸른 후 다시 Millipore filter of Prefilter 를 사용하여 걸렸다. 그리고 상층액의 옮긴용량만큼의 증류수(Deionized water)를 남아 있는 혼합물에 가하여 원심분리과정을 수회 반복 실시하였다. 이렇게 해서 걸른 상층액을 5,000g에 20분 원심분리후 독소결정체들을 냉동 건조시켰다.

용해성 독소의 준비 : 용해성 독소의 준비는 냉동건조된 결정체로부터의 독소분리와 결정체의 분리와 냉동작업을 덜고자 포자 및 결정체가 혼합된 배양물로부터의 독소분리, 2가지 방법을 사용하였다. 첫째 냉동건조된 결정체들로부터는 건조된 결정체들을 0.04N NaOH 를 써서 30°C에 60분간 방치하여 용해시킨 후 1N-CH₃COOH 를 가하여 pH 4.4로 맞추어 10,000g에 15분간 원심분리하여 침전시키고 다시 0.05M-NaHCO₃, pH 9.5인 Buffer 에 용해시켰다. 다음에 결정체와 포자의 혼합물로부터는 포자-결정체의 혼합물을 0.1M-Na₂HPO₄-NaH₂PO₄, pH 6.0 buffer, 1M-NaCl 및 증류수(Deionized water)에 순서대로 5,000g에 20분간 원심분리하여 세척하였다. 침전물을 다시 0.04N-NaOH 에 용해시켜 2시간동안 진탕시킨 후 5,000g에 20분간 원심분리하여 상층액에 CH₃COOH를 서서히 가하여 pH를 4.4로 맞추어 후 4°C에 30분간 방치하였다. 다음에 10,000g의 힘으로 15분간 원심분리하여 이 침전물을 다시 소량의 0.04N-NaOH 에 용해시킨 후 1M-NaHCO₃를 써서 pH를 9.5로 맞추었다.

2. 단백질 독소의 정량

단백질의 정량은 Bovine Serum albumin (sigma)를 표준으로 썼고 Loury⁽¹⁴⁾방법으로 했다.

3. 단백질 독소의 Polyacrylamide gel 전기영동

독소단백질의 준비 : 분리된 독소의 용액을 전기영동을 위하여 독소단백질을 보다 순수하게 만들고자 Sephadex-G-200의 3.5cm×27.0cm 유리관에 걸렸다. 이때 Buffer는 0.5mM의 Dithiothreitol이 들어 있는 0.05M-Na₂CO₃-NaHCO₃, pH 9.5를 사용하였으며 한 시험관에 5ml씩 수집하여 독소단백질이 들어 있는 부분만을 합쳐서 이 수집된 양의 반 단클의 암모니아 용액으로 중화시킨 Ammonium sulphate 용액을 가하여 4°C에 하룻밤을 지난 후 10,000g에 15분간 원심분리하였다. 침전된 단백질을 다시 7M-Urea가 포함되어 있는 0.05M Na₂CO₃-NaHCO₃, pH 9.5에 용해시켜 단백질정량을 한 후 전기영동을 적용하였다.

전기영동방법 : 각 공시 단백질의 20μg을 사용하여 전원 200V에 1,000V의 변압기를 사용하여 처음 30분

간은 매 Tube 당 2mA를 적용하였고 그 후 5시간동안은 5mA를 써서 5시간 영동한 후 21G 크기의 주사기에 증류수를 넣어 gel을 유리관으로부터 옮긴 후 20% (W/V)의 Sulphosalicylic acid에 하룻밤 고정시켰다. 다음에 0.25% Coomassie blue에 3~4시간 염색한 후 7%의 CH₃COOH을 써서 3시간동안 탈색하여 단백질의 이동거리를 측정하였다. 그리고 여기서 사용한 재료의 조성은 다음 Table 1과 같다.

Table 1. Materials used for forming gels and electrode buffer

A) Gel buffer

Na ₂ HPO ₄ (Anhydrous)	1.229g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0.1326g
C ₁₂ H ₂₅ OSO ₃ Na	0.1g
(NH ₂) ₂ CO	48.05g

위의 화학물질들에 증류수를 가하여 전체를 100ml로 만든다.

B) Ammonium Persulphate 용액

(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	0.075g
Gel buffer	10ml

C) TEMED 용액

TEMED	0.06ml
Gel buffer	10ml

D) Acrylamide Solution

Acrylamide	5.0g
Bis acrylamide	0.13g
Gel buffer	80ml

B), C), D)의 비율을 1:1:8로 혼합한 것을 준비된 0.75cm × 12.00cm 유리관에 8cm 정도의 길이로 gel-column을 준비한다.

Electrode buffer

Na ₂ HPO ₄	12.99g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	1.326g
C ₁₂ H ₂₅ OSO ₃ Na	1.000g

위의 화학물질들에 증류수를 가하여 1l로 만든다.

4. 독소단백질의 분자량 측정

표준단백질로 Bovine Serum albumin fraction V, Egg albumin, Lysozyme 등을 써서 독소단백질의 분자량을 측정하였다.

5. 독소의 누에에 대한 생물학적 검증

분리된 독소의 누에에 대한 독성을 검증하기 위하여 일정량의 독소가 함유되어 있는 용액을 원액으로 해서 0.002%의 Tween-20을 가한 증류수로 단계희석을 한 다음 일정량의 독소용액에 일정한 양의 뵤이를 적신후

음전해서 누에품종 잠 100×잠 104 4령기잠에 경구접종하였으며 각 처리구는 2반복으로, 1반복당 10마리의 누에를 사용하였다. 누에는 처리 12시간 전에 결식시키고 누에의 몸무게를 정량하였으며 처리후 48시간 이내에 죽은 누에마리수와 그리고 남아 있는 뽕잎을 조사하여 먹은 뽕잎의 양을 계산, 누에체중 1g당 LD₅₀을 조사하였다.

III. 결 과

세균의 배양에 있어서는 고체배지 Nutrient agar에 배양했을 경우 세균들의 완전파괴, 즉 포자와 결정체로 분리되기까지 30일 걸렸고 발효기(發酵器)를 사용하여 액체배지에 배양했을 경우에는 14일 걸렸다.

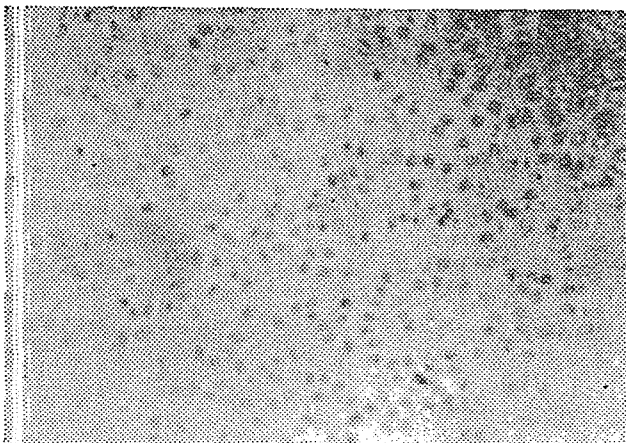


Fig 1. Appearance of bacterial spores (dark) and crystal bodies (hyaline) after bacterial lysis and stained with Malachite green.

※ Crystals were stained with red colour and spores were stained with green. Vegetative cells were not seen.

독소결정체의 분리는 15cm×25cm 크기의 용기에 고체배지를 사용하여 배양한 세균으로부터 140mg의 냉동건조된 결정체와 포자 그리고 파괴된 세포의 부분으로 된 혼합물을 얻었으며 이것으로부터 다시 결정체만을 분리하여 냉동건조했을때 4mg의 무게를 얻어 0.04N NaOH 2ml에 용해시킨 후 UV-Spectrophotometer에 의하여 Fig. 2와 같은 곡선을 얻었다.

발효기를 이용하여 액체배지에 배양한 세균으로부터 원심분리에 의하여 3g의 결정체와 포자 및 다른 세포 성분들이 포함된 혼합물을 얻었으며 이것으로부터 결정체를 분리하지 않고 결정체와 포자의 혼합물로부터 용해성 독소를 직접 분리한 후에도 UV-Spectrophotometer를 통하여 Fig. 2와 같은 곡선을 얻었다.

단백질의 정량은 Lowry 방법에 의하여 독소단백질을

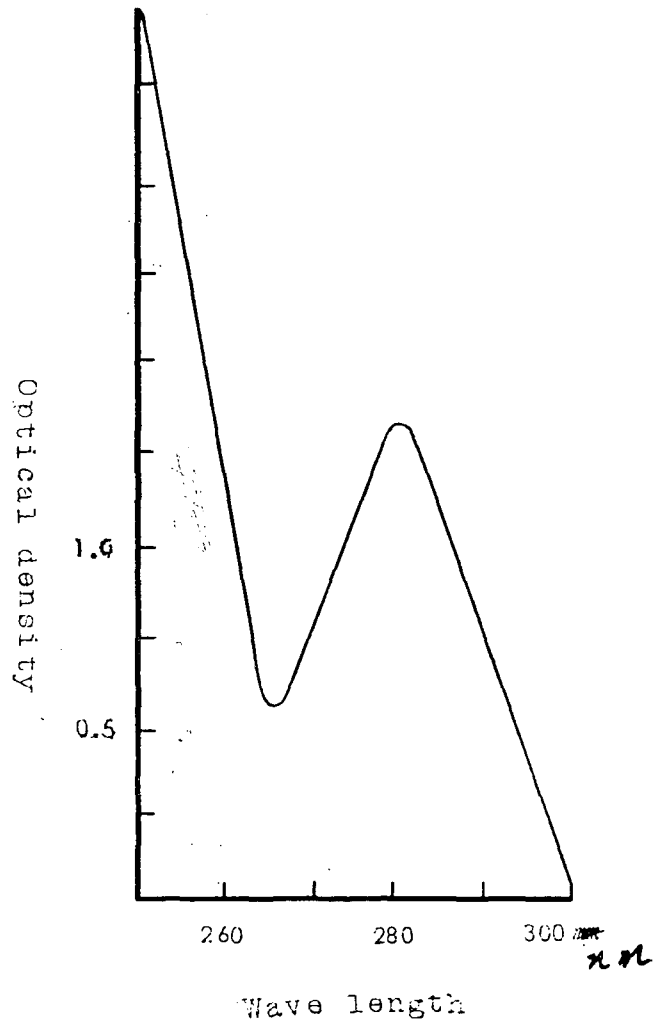


Fig 2. Absorption curve of the toxin

정량했을 때 포자와 결정체의 혼합물로부터 직접 분리한 독소용액에는 2mg/ml의 독소단백질이 포함되어 있었고(Fig 3에서 A) 먼저 결정체만을 분리한 후에 그 결정체로부터 독소를 분리한 독소용액에는 1.86mg/ml의 독소단백질이 포함되어 있었다.(Fig 3에서 B)

Polyacrylamide gel 전기영동에 있어서는 표준단백질로 사용한 Bovine albumin이 28mm, Egg albumin이 43mm, Lysozyme이 77mm의 이동거리를 보였으며 이 단백질들의 분자량의 대수와 이동거리에 의하여 표준도표를 그린 후 독소단백질의 이동거리의 12, 21, 26mm의 각각에 대하여 분자량 120,000, 87,000, 74,000의 세가지 다른 단백질을 관찰하였다.

독소의 생물학적 검정에 있어서는 처리한 독소의 양을 독소용액 1ml 당 2.00, 1.00, 0.50 및 0.25 μ g으로 구분 경구접식하였으며 이것들을 순서대로 처리구 1, 2, 3, 및 4로 하였다. 그리고 각 처리구에서 한 반복의 누

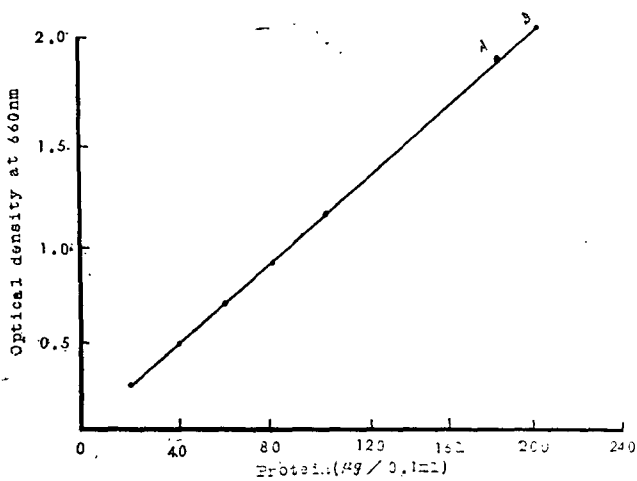


Fig. 3. Protein estimation of toxin by Lowry method.

- A: the toxin isolated from a mixture of crystals-spores directly,
- B: the toxin isolated from crystals alone.

Table 2. The molecular weights, log of molecular weights and the distance of migration of toxin and standards in polyacrylamide gels.

Samples	M.W	Log of M.W	Distance of migration(mm)
Toxin	120,000	5.065	12 band 1
(mean of two samples)	87,000	4.940	21 band 2
	74,000	4.870	26 band 3
Bovine, albumin	69,000	4.838	28
Egg, albumin	45,000	4.650	43
Lysozyme	14,000	4.146	77

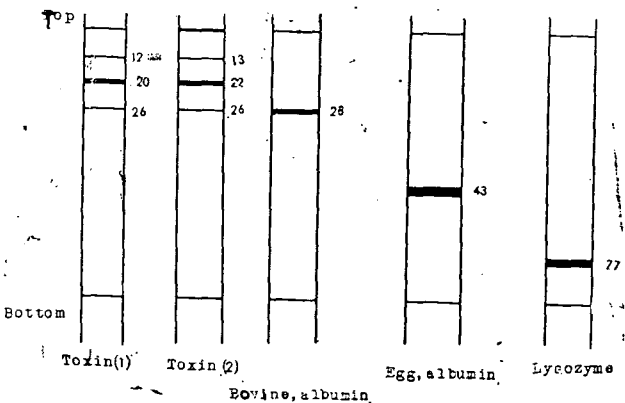


Fig. 4. Diagrams of polyacrylamide gels showing the distance of migration of toxin and standards.

에 10마리가 먹은 독소의 양은 각각 0.5724, 0.3574, 0.1723, 0.0748 μ g 및이었으며, 병정의 관찰은 처리후 6시간부터 6시간 간격으로 48시간까지 육안으로 판정해서 정상, 비정상, 마비상태 그리고 치사로 구분 조사

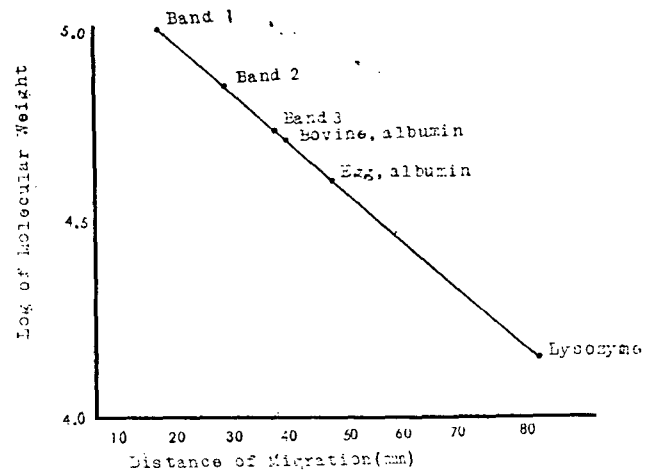


Fig. 5. Log of the molecular weight plotted against the distance migrated by the toxin and the standards in polyacrylamide gels.

하였다.

어느 처리구나 6시간까지는 Table 3에서 보는바와 같이 독소의 효과를 나타내지 않고 정상상태를 보였고 12시간 후에서 부터는 처리구 4번을 제외하고 그 밖의 다른 구에서는 비정상적인 상태를 보이기 시작했다. 그리고 그 비정상적인 누에의 수는 독소의 양의 증가에 따라 증가하였으며 또한 독소의 양이 가장 많이 들어 있는 처리구에서는 처음으로 마비상태를 보이기도 했다. 18시간 후에는 처리구 1에서 누에가 치사하기 시작했고, 처리구 4에서도 한마리가 마비상태를 보이기 시작했다. 48시간까지 이병잠의 수는 증가를 보였고 그때까지 치사한 누에의 비율은 처리구 순서대로 80, 60, 25 및 15%였다. 따라서 이에 의한 누에체중 g당 본 독소의 LD₅₀치는 0.080 μ g이었다.

IV. 고 찰

Bacillus thuringiensis var. *alesti* (H. Serotype III)의 완전한 Bacterial lysis는 고체배지를 사용하여 항온기에서 30°C로 배양했을 경우는 30일 걸렸고 액체배지를 써서 발효기에서 배양했을 경우는 14일 걸렸다. Bacterial lysis, 즉 이 세균이 분열증식을 중단하고 포자 및 결정체가 형성되어 마침내 세균의 파괴와 더불어 포자와 결정체가 분리되어 나오기까지의 기간은 변종들간의 서로 다른 성질과 배지의 종류 및 배양환경에 따라 다르리라고 생각한다. 그런데 본 연구에서 사용된 고체배지는 종합배지로서 비교적 세균을 위한 영양분이 풍부한 것이었으며 한편 액체배지는 무기염류가 포함된 비교적 영양분이 적은 배지였다. 뿐만 아니라, 발효기(發酵器)에서는 공기의 공급을 계속적으로 해주어 세균의 발육의 Bacterial lysis를 촉진시켜 주었고 항

Table 3. Results of treatment with toxin of *Bacillus thuringiensis* var. *aiești* to larvae of *Bombyx mori* L.

No. of treatments	Treated amount of toxin in solution per milliliter	Replication	Weight of 10 larvae (g)	Amount of toxin solution eaten by 10 larvae* (ml)	Number of larvae observed after treatment									
					6 (hrs)	12	18	24	30	36	42	48		
1	2.00 (μg)	1	3.60	0.2970 (0.5940)	4 4 2 —	2 3 3 2	2 4 2 2	2 4 2 2	2 4 2 2	2 1 2 5	2 — — 8	2 — — 8	N, AN, P, D N, AN, P, D N, AN, P, D N, AN, P, D N, AN, P, D N, AN, P, D N, AN, P, D	
		2	3.63	0.2754 (0.5508)	5 3 2 —	5 2 1 2	1 5 2 2	1 4 1 4	1 1 2 6	2 — — 8	2 — — 8			
2	1.00	1	3.70	0.3267 (0.3267)	7 3 — —	7 3 — —	7 3 — —	7 3 — —	4 3 3 —	3 2 1 4	2 1 2 5	N, AN, P, D N, AN, P, D N, AN, P, D N, AN, P, D N, AN, P, D N, AN, P, D N, AN, P, D		
		2	3.71	0.3881 (0.3881)	7 3 — —	7 3 — —	5 5 — —	7 3 — —	3 2 2 3	2 1 1 6	2 — 1 7			
3	0.50	1	3.72	0.3348 (0.1674)	8 2 — —	8 2 — —	8 2 — —	8 2 — —	4 3 2 1	5 2 2 1	5 2 — 3	N, AN, P, D N, AN, P, D N, AN, P, D N, AN, P, D N, AN, P, D N, AN, P, D N, AN, P, D		
		2	3.74	0.3544 (0.1772)	8 2 — —	7 2 1 —	7 2 1 —	7 2 1 —	5 2 2 1	5 2 2 1	5 1 2 2			
4	0.25	1	3.80	0.3159 (0.0790)	10 — — —	9 1 — —	9 1 — —	8 2 — —	6 2 1 1	6 — 2 2	6 — 1 3	N, AN, P, D N, AN, P, D N, AN, P, D N, AN, P, D N, AN, P, D N, AN, P, D N, AN, P, D		
		2	3.84	0.2822 (0.0706)	10 — — —	10 — — —	10 — — —	10 — — —	9 1 — —	9 1 — —	9 — 1 —			

* The numbers in the brackets are the amount of toxin converted and the larvae treated with toxin were observed at intervals of 6 hours after treatment

N, AN, P and D stand for normal state, abnormal state, paralyzed state and death, respectively.

온기에서는 공기의 유통이 비교적 원활하지 못한 편이었던 것이다.

단백질 독소의 분리방법에 있어서는 포자와 결정체의 혼합물로부터 결정체만을 분리한 후에 이 결정체들을 알카리용액에 용해시켜 단백질독소를 추출하는 것과 포자—결정체의 혼합물을 알카리에 용해시킨 후 원심분리에 의해서 용해된 단백질독소를 상층액으로부터 추출하는 것과는 독소의 순수도에 있어서 별다른 차이는 없었으나 분리작업에 있어서는 후자의 방법이 간편한 것을 알 수 있었다. 그리고 이렇게 하여 분리한 독소를 Sephadex G-200을 통해서 걸른 후에 Ammonium Sulphate에 침전시켜 다시 용해시키기에는 Urea를 쓰지 않고는 어려웠으며 이 단백질 독소의 냉동건조 혹은 냉동후에 다시 용해하여도 독소의 성상에는 변화가 없었다.

단백질 독소의 분자량 측정은 Sodium Lauryl Sulphate Polyacrylamide gel을 이용한 전기영동에 의했다. 이때 gel column에 형성된 세개의 대(Band)의 이동거리에 의하여 계산된 분자량들은 각각 120,000, 87,000, 74,000이었다. 그런데 지금까지 알려진 것을 보면 Herbert⁽¹¹⁾는 결정체를 구성하고 있는 부분단백질의 분자량을 100,000이라고 하였고 Cooksey⁽²⁾는 *Pieris brassicae*의 효소에 의해서 분해된 분자량이 40,000이라고 하였다. 또 Pendelton⁽¹⁰⁾은 *Bacillus thuringiensis* var. *entomocidus*의 결정체를 *Philosamia ricini*(Lepidoptera)의 Protease에 의해서 분해했을 때 *Protoxin의 분자량은 200,000보다 크고 활성독소의 분자량은 50,000정도 된다고 하였다. 이와같이 저자들간에 서로 다른 분자량을 보인 것은 세균 변종들 사이에 독소단백질의 틀린점과 곤충들간의 Protease의 활성도가 서로 다른 것에 의한 것으로 생각되며 본 연구에서 얻어진 단백질들은 곤충의 Protease에 의해서 분해된 것이 아니고 단지 알카리에 용해시켜 얻어진 것으로 그 분자량들이 큰 것으로 보아 활성소가 아니고 Protoxin임을 알 수 있다.

곤충에 대한 독소의 생물학적 검정에 있어서도 결정체가 하나의 기질(Substrate)로서의 요인이 되고 Protease가 하나의 효소로서의 요인이 되어 복합적인 관계에 의하여 다르게 나타난다고 하였다. Lecadet와 Martouret⁽¹⁵⁾는 *anduze*(H. Serotype III) 변종은 *Pieris brassicae* 유충에는 독성이 *berliner*(H. Serotype I) 변종보다는 덜 강하지만 누에에는 전자의 변종이 후자의 것보다 그 독성이 강하게 나타난다고 하였다. 본 연구에서 나타난 4령기 누에의 체중 g당 LD₅₀는 0.080μg이었다. 그것은 Cooksey⁽²⁾의 알카리에 의하여 추출된 독소의 *Pieris brassicae*에 대한 체중 g당 ED₅₀가 0.063μg

으로써 비교적 근사한 경향이라고 할 수 있겠다. 그러나 누에 품종간에 Protease의 활성도가 다르다면 이 세균의 독성에 대하여도 다르게 나타날 수 있고 또 균변종들 간에도 다르게 나타날 것이라고 생각한다. 이와 같이 누에 품종간과와 그리고 세균변종들간의 일어날 수 있는 독소의 상호작용에 대하여는 앞으로 더 연구되어져야 할 과제로 남아 있다. 또한 산림이나 다른 농작물의 해충에 대하여도 마찬가지로 이와 같은 점에서 앞으로 연구되어져야 할 문제들이 많이 남아 있다고 생각된다.

주: *Prototoxin—침식에 의하여서는 Protease에 의하여 적은 분자량으로 분해된 후 치사를 일으켜도 체강에 주사를 통해서만 치사하지 않는 toxin, 즉 활성독소의 전단계독소를 말함.

V. 적 요

Bacillus thuringiensis var. *alesti* (H. Serotype III)로부터 분리된 단백질 독소의 물리화학적 성질 및 누에에 대한 생물학적 검정에 있어서 다음과 같은 결과들을 얻었다.

1. Nutrient agar 배지를 사용하여 항온기에서 30°C에 세균을 배양했을 때 완전한 Bacterial lysis는 30일 걸렸고 액체 배지를 사용하여 발효기(Fermentation Jar)에 배양했을 때는 그 기간이 반으로 단축되었다.
2. 분리된 결정체들만으로 부터 추출된 단백질 독소와 포자—결정체의 혼합물로부터 분리된 독소와는 단백질 독소의 순수도에 있어서 차이가 없었다.
3. 단백질 결정체를 알카리(pH 9.5)에 용해시켜 Sodium Lauryl Sulphate Polyacrylamide gel을 사용한 전기영동을 행했을 때 분자량이 120,000, 87,000, 74,000의 3개의 단백질의 분리되었다.
4. 분리된 독소의 누에에 대한 생물학적 검정에 있어서 4령기 누에 체중 g당 LD₅₀는 0.080μg이었다.

인 용 문 헌

1. Berliner, E. (1915); Über die Schlafsucht der Mehlmottenraupe (*Ephestia Kühniella*, Zell) Und ihren Erreger *Bacillus Churingiensis*, n. sp. Z. angew. Entomol., 2, 29-56.
2. Cooksey, K.E. (1968); Purification of a Protein from *Bacillus thuringiensis* Toxic to Larvae of Lepidoptera, Biochem. J., 106, 445.
3. de Barjac, H. and A. Bonnefoi (1962); Essai de Classification biochimique et sérologique de 24 souches de *Bacillus* du type *B. thuringiensis*.

- Entomophaga, 7, 5.
4. de Barjac, H. and A. Bonnefoi (1967); Compt., Rend, 264, 1811.
 5. Delaporte, B. and S. Beguin (1955); Ann Inst. Pasteur, 96, 680.
 6. Grigorova, R., E. Kantardgiva and N. Pashov (1967); On the shape and Structure of the Crystal in Two Strains of *Bacillus thuringiensis*. J. Inv. Pathol., 9, 503.
 7. Hannay, C.L. (1953); Crystalline inclusions in aerobic spore-forming bacteria. Nature, 172, 1004.
 8. Hannay, C.L. and P.C. Fitz-James(1955); The Protein Crystals of *Bacillus thuringiensis* Berliner. Can. J. Microbiol., 1, 694.
 9. Heimpel, A.M. and T.A. Angus(1959); The Site of Action of Crystalliferous bacteria in Lepidoptera larvae. J. Insect. Pathol., 1, 152.
 10. Heimpel, A.M. (1967); A Critical Review of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berlier, and other Crystaliferous Bacteria. Ann. Rev. Entomol., 12, 287.
 11. Herbert, B.N. (1969); The application of Disc Electrophoresis to the Study of Parasporal Inclusion of *Bacillus thuringiensis*. Spore Research, Academic Press, 481.
 12. Holmes, K. C. and R.A. Monro (1965); Studies on the Structure of Parasporal Inclusions from *Bacillus thuringiensis*. J. Mol. Biol., 14, 572.
 13. Ishiwata, S. (1902); Kyoto Sangyo Ko, Hijo Ko, hijo Sanji Hokoku 2, 346.
 14. Lowry, O.H. (1951); Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem., 193, 265.
 15. Lecadet, M.M.(1965); La toxine figurée de *Bacillus thuringiensis*. Technique de séparation et Composition en acides aminés. Compt. Rend., 261, 5693.
 16. Murray, E.D. and E.Y. Spencer(1966); A simplified Purification Technique for Parasporal Inclusions from Certain Varieties of *Bacillus thuringiensis*. J. Invert. Path., 8, 418.
 17. Norris, J.R., and D.H. Watson(1960); An electron microscope study of sproulation and protein crystal formation in *Bacillus Cereus* var. *alesti*. J. Gen. Microbiol., 22, 744
 18. Norris, J.R.(1964); The Classification of *Bacillus thuringiensis*. J. Appl. Bacteriol., 27, 439.
 19. Pendelton, I.R.(1973); Characterization of Crystal Protoxin and an Activated Toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *entomocidus*. J. Invert. Path., 21, 46.
 20. Ryter, A.(1965); Ann. Inst. Paster, 108, 40.
 21. Schaeffer, P., H. Ionesco and A. Ryter (1965); Régulations Chez les microorganismes, Marseille, 553.
 22. Steinhaus, E.A. (1951); Possible use of *Bacillus thuringiensis* Berliner as an aid in the biological Control of the Alfalfa Caterpillar. Hilgardia, 20, 359.
 23. Steinhaus, E.A. (1954); Further Observations on *Bacillus thuringiensis* Berliner and other Spore-forming bacteria. Hilgardia, 23, 1.
 24. Van Kova, J. and O. Kralik(1966); Zentr. Bakteriolog., Parasitenk, Abt. I. Orig. 199, 5380.
 25. Young, I.E. and P.C. Fitz-James (1959); Chemical and Morphological Studies of Bacterial Spore Formation. J. Biophys. Biochen: Cytol., 6, 483.