

Bacillus thuringiensis subsp. *indiana*(TH109)가
생산한 δ -endotoxin에 관한 연구

李光培 · 蔡龍坤

大邱保健專門大學

**Study on the δ -endotoxin by *Bacillus*
thuringiensis subsp. *indiana*(TH109)**

Kwang-Bae Lee, Yong-Gon Chae

Taegu Health Junier College

Abstract

This report was investigate the biological characteristic of δ -endotoxin of product by TH109 strain, one strain TH109 which has toxicity on Cockroach is isolate and identification.

Generally the δ -endotoxin of product by *B. thuringiensis* strain was easily soluble in acid, alkaline and organic solvents but δ -endotoxin of product by TH109 strain are insoluble in HCl, NaOH, Thiol-reagent(25mM Dithiotheritol, 25mM Dithioeryritol, 25mM Na-thioglycolate, 0.2M ESCN, 2% v/v β -mecaptethanol), organic solvents(acetone, CCl₄, ether, dioxin MeOH, chloroform, xylene), Protease.

Through this study of δ -endotoxin produced by TH109 strain is insoluble in acid, alkaline, organic solvents and protease etc. In the point of view, it is greater possibility that δ -endotoxin will be transform into toxin by the reducible materials instead of the reaction of protease in the intestine.

I. 緒 論

최근 해충 방제를 위한 유기합성 약제의 무절제한 살포로 생태계의 커다란 영향을 끼치고 있을 뿐만 아니라, 인축에게까지 만성적인 영향을 끼치므로 이에 대한 대책으로 천적을 이용한 생물학적 방제방법의 개발이 오래전부터 연구되어왔다(Faulkner, P.1981, Krieg, A.1971, Roberts, D.W. 1971). 이들중 세균인 *Bacillus thuringiensis* 균주는 포자형성 기간중에 결정성 단백질을 생산하며 모기나 나방의 유충 소화기관내에서 용해되어 그 유충을 죽이는 독으로 작용한다.

이들 세균은 곤충의 유충내에 존재하는 hemolymph가 아주 좋은 영양환경이며 때로는 이곳에서 포자를 형성하기도 한다(Burges, H. D. 1982). 특히 본 저자들이 토양으로부터 분리한 *Bacillus thuringiensis* subsp. *indiana* (TH109) 균주는 생물학적으로 구제가 불가능했던 바퀴(*Blattella germanica* L.)에게 특이적으로 작용하는 δ -endotoxin이란 결정성 독소단백질을 생산하여 포자형성후에 균체외로 분비함을 보고한 바 있다(李, 蔡. 1993). 지금까지 알려진 보고에 의하면 *Bacillus thuringiensis* 균주들이 분비한 δ -endotoxin을 감수성 유충에 섭취되면 protoxin인 δ -endotoxin은 유충 장내에서 alkali와 환원물질 및 protease에 의해 toxin으로 변화되어 이들 유충은 사멸된다(Fast, P., etal. 1978). 세균들은 많은 종류의 균체외 독소단백질을 생산하는 것으로 알려져 있다(Bernheimer A, W. 1974. Briest, F.G. 1977). 이들중 cytolytic toxin인 cytolysin이 특히 gram positive세균에서 병원성 인자로서 주의를 끌고 있다

(Briest, F.G. 1977). 이들 단백질이 어떤 대사과정에 의해 세포막에 영향을 미치는가 하는 연구는 많이 행해져 왔다(Stephen, J., etal. 1981). 따라서 본 연구에서는 본 저자들이 분리한 *Bacillus thuringiensis* subsp. *indiana*(TH109)가 생산한 δ -endotoxin의 성질을 조사하고자 한다.

II. 材料 및 方法

1. 대상곤충 및 공시균주

대상곤충은 국립보전연구원에서 분양받은 독일바퀴벌레(*Blattella germanica* L.)를 사용하였으며, 실험에 사용된 공시균주는 본 대학 실험실에 보관된 *Bacillus thuringiensis* subsp. *indiana*(TH109)균주를 사용하였다. 균주의 배양은 T.Y.G 배지(Hwang과 Kim, 1987)를 사용하였다. 즉, 0.5% Trypton, 0.5% Yeast extract, 1.0% Glucose 및 0.1% K_2HPO_4 로 조성하고 pH는 7.2로 조절하였다.

2. 단백질의 정량

단백질의 정량은 Lowry(1951)의 방법에 의하여 측정하였다.

3. δ -endotoxin의 분리방법

T.Y.G 액체배지에서 진탕배양(28°C, 8일간)시킨 균주를 원심분리(13,000g, 30분)하여 균체만을 모아 Cheung과 Hammock(1985)의 방법에 의해 0.03% Triton X-100에 균체를 현탁시켜 50, 63, 73% 설탕구배밀도상에서 원심분리(8,500g, 30분)하였으며 δ -endotoxin의 순도 측정은 위상차 현미경으로 조사하였다.

4. δ -endotoxin의 용해

(1) NaOH 및 HCl에 용해

정제된 내독소를 0.1N NaOH과 0.1N HCl에 각각 현탁시킨후 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 다음 원심분리(13,000g, 15분)하여 용해된 물질과 용해되지 않은 물질에 대하여 초미량주사법으로 바퀴의 3령 자충에 1.5 μ l 씩 주사하여 새로운 사육조에 넣고 먹이와 적정 온도, 습도를 유지시키면서 시간별로 치사되는 수를 계측하였다. 대조구는 PBS buffer를 1.5 μ l 씩 주사하여 실험구와 비교하였으며 각 group당 10마리의 바퀴가 사용되었다.

(2) Thiol- reagents 및 유기용매에 용해

25mM Dithiothreitol, 25mM Dithioerythritol, 25mM Na-thioglycolate, 0.2M KSCN, 2% v/v β -mercaptethanol 등에 내독소를 현탁하여 37°C에서 2시간 동안 반응시킨후 원심분리(13,000g, 15분)하였다. 상층액과 침전물을 분리하여 4°C에서 50mM PBS buffer (pH 7.2)로 하룻밤 투석시킨 후 용매물질을 제거하고 침전물과 상층액에 대하여 초미량주사법으로 3령자충에 1.5 μ l 씩 주사하여 새로운 사육조에 넣고 먹이와 적정 온도, 습도를 유지시키면서 시간별로 치사되는 수를 계측하였다. 또한 acetone, CCl₄, ether, dioxin, MeOH, chloroform, xylene 등의 유기용매에 내독소를 각각 현탁하여 30°C에서 2시간 반응시킨 후 원심분리(13,000g, 15분)하여 침전물과 상층액을 분리하였다. 침전물은 PBS buffer (pH 7.2)로 3번 수세한 후 다시 0.1ml PBS buffer에 현탁시켜 농도별로 희석한 후 초미량주사법으로 3령 자충에 1.5 μ l 씩 주사하여 시간별로 치사된 수를 측정하였고, 상층액은

0.1ml PBS buffer에 직접 희석하여 농도별로 희석후 초미량주사법으로 3령자충에 1.5 μ l 씩 주사하여 시간별로 치사되는 수를 계측하였다. 대조구로서는 PBS buffer만을 1.5 μ l 씩 주사하여 실험구와 비교하였다.

(3) Protease에 용해

정제된 내독소를 0.1M phosphate buffer (pH 7.2)에 용해시킨 protease K(1mg/ml)와 Trypsin(1mg/ml) 용액에 현탁시킨후 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 다음 1mM의 PMSF용액을 첨가하여 4°C에서 방치하였다. 그후 원심분리(13,000g, 15분)하여 용해된 물질과 용해되지 않은 물질을 분리하였다. 용해되지 않은 물질은 PBS buffer(pH 7.2)로 세번 수세하여 이물질을 제거하였고, 용해된 물질은 4°C에서 하룻밤 PBS buffer로 투석한 후 각각의 용액을 시료로 하여 초미량 주사법으로 바퀴의 3령 자충에 각각 1.5 μ l 씩 주사하여 사육조에 넣은 다음 시간별로 치사수를 계측하였다. 또한 바퀴벌레의 장내에 존재하는 단백질 분해효소로 내독소를 분해시켜 보고자 바퀴벌레 약 25마리의腸內 물질을 모아 5ml PBS buffer용액에 넣고 glass tissue grinder로 마쇄한 후 15,000g에서 15분 동안 원심분리하여 상층액과 침전물을 분리하여 상층액은 다시 ammonium sulfate로 포화시킨 다음 50mM Tris-HCl buffer로 투석시킨 것을 crude enzyme으로 하였다. Crude enzyme은 0.1M carbonate buffer(pH 10.0) 1ml에 현탁시킨 다음 내독소를 현탁하여 37°C에서 2시간 반응시킨 후 상기와 같은 방법에 의하여 바퀴에 독성여부를 조사하였다. 이때 바퀴수는 각 group당 10마리가 사용되었다.

5. 열에 대한 안정성

10mM EDTA용액에 보관된 내독소를 멸균 증류수로 3회 수세한 후 100°C에서 1시간, 3시간, 5시간별로 열처리한 후 초미량주사법으로 3령자충에 각각 1.5 μ l 씩 주사하여 시간별로 치사되는 수를 계측하였다. 대조구로서는 PBS bufrer 1.5 μ l 씩을 주사하였으며 실험 group당 사용된 바퀴는 10마리씩이 사용되었다.

III. 結果 및 考察

1. δ -endotoxin의 용해

정제된 내독소를 NaOH 및 HCl, Thiol reagents, organic solvent 등에서 내독소의 용해성 및 독력의 변화가 검토되었다. 그 결과 Table 1, 2, 3, 4에서 보는 바와 같이 내독소중 바퀴에 독성을 나타내는 독성물질은 알카리, 산, 여러 종류의 유기용매에 대하여 용해되지 않은 특이한 독소임을 알 수 있었다.

Table 1. Solubility of delta- endotoxin in 0.1N NaOH

Solubility	Protein conc.	Mortality(%, 1.5 μ l /ml)
Intact	1.88	100
	0.94	90
	0.47	50
	0.23	40
Soulble	2.10	10
	1.05	0
	0.53	0
	0.25	0
Insoluble	3.09	100
	1.54	100
	0.77	100
	0.38	80
Control		10

Protein conc. : Intact; 1,254 μ g/ml, Soluble; 2,100 μ g/ml, Insoluble; 3,092 μ g/ml. Control; PBS buffer.

일반적으로 *Bacillus thuringiensis*속의 균주는 단백질성의 내독소(δ -endotoxin 혹은 parasporal crystal)를 생산하는 특징이 있으며, 이들 내독소가 나방이등의 곤충의 유충에게 특이적인 독성을 나타낸다고 알려져있다(Aronson 등, 1986). 지금까지 연구보고된 자료에 의하면 해충에 특이적 독성을 나타내는 *Bacillus thuringiensis*균주들이 생성하는 δ -endotoxin들은 NaOH 및 유기용매에 용해되어 그 용해된 물질이 해충에 insectidal로 작용하는 것으로 알려져있다(Cheung과 Kim, 1990). *Bacillus thuringiensis* 균주들이 분비한 단백질성의 내독소를 감수성 유충이 섭취하면 유충의 장내에서 protoxin인 δ -endotoxin은 alkali와 환원물질 및 protease에 의해 toxin으로 전환되어 이들 유충은 사멸한다고 보고된 바 있어, 본 실험에서는 바퀴벌레의 장내에 존재하는 protease를 분리하여 분리된 protease에 의해 *Bacillus thuringiensis* subsp. *indiana*(TH109) 균주가 분비한 내독소를 용해시켜 장내 protease에 의해 toxin으로 전환되어 유충이 사멸되는지를 확인하고자 실험

Table 2. Solubility of delta- endotoxin in 0.1N HCl

Solubility	Protein conc.	Mortality(%, 1.5 μ l /ml)
Soluble	0.22	10
	0.11	10
	0.05	0
	0.02	0
Insoluble	3.04	100
	1.52	100
	0.76	90
	0.38	60
Control		10

Protein conc. Soluble; 227.5 μ g/ml, Insoluble; 3,040 μ g/ml. Control; PBS buffer(pH 7.2).

Table 3. Solubility of delta- endotoxin in thiol reagents

Reagents	Solubility	Protein conc.	Mortality(%, 1.5 μ l /ml)
25mM DTT	soluble	0.45	0
	insoluble	1.28	80
25mM DET	soluble	0.96	0
	insoluble	1.81	90
25mM Na- TG	soluble	0.32	10
	insoluble	1.72	90
0.2N KSCN	soluble	0.23	10
	insoluble	1.72	90
2% (v/v) ME	soluble	0.22	0
	insoluble	1.80	100

Notes : DTT; dithiothreitol(soluble; 455 μ g/ml , insoluble; 1280 μ g/ml)

DET; dithioerythrytol(soluble; 966 μ g/ml , insoluble; 1810 μ g/ml)

Na- TG; Na- thioglycolate(soluble; 320 μ g/ml , insoluble; 1720 μ g/ml)

KSCN; (soluble; 230 μ g/ml , insoluble; 1720 μ g/ml)

ME; β - mercaptoethanol(soluble; 227.5 μ g/ml , insoluble; 1800 μ g/ml)

Table 4. Solubility of delta- endotoxin in organic solvents

Organic solvents	Solubility	Protein conc.	Mortality(%, 1.5 μ l /ml)
Acetone	soluble	0.25	0
	insoluble	1.76	80
Ether	soluble	0.31	0
	insoluble	1.69	70
Methanol	soluble	0.32	10
	insoluble	1.82	90
CCl ₄	soluble	0.18	0
	insoluble	1.96	90
Dioxin	soluble	0.23	0
	insoluble	1.87	70
Chloroform	soluble	0.35	0
	insoluble	1.87	90
Xylene	soluble	0.26	10
	insoluble	1.83	80

Notes : Acetone(soluble; 250 μ g/ml , insoluble; 1760 μ g/ml)

Ether(soluble; 310 μ g/ml , insoluble; 1690 μ g/ml)

Methanol(soluble; 320 μ g/ml , insoluble; 1820 μ g/ml)

CCl₄(soluble; 180 μ g/ml , insoluble; 1960 μ g/ml)

Dioxin(soluble; 230 μ g/ml , insoluble; 1870 μ g/ml)

Chloroform(soluble; 350 μ g/ml , insoluble; 1870 μ g/ml)

Xylene(soluble; 260 μ g/ml , insoluble; 1830 μ g/ml)

Table 5. Solubility of delta-endotoxin in protease

Protease	Solubility	Protein conc.	Mortality after 48hr(%, 1.5 μ l / ml)
Protease K	soluble	0.37	0
	insoluble	1.54	70
Trypsin	soluble	0.24	0
	insoluble	1.86	80
Cockroach	soluble	0.21	0
Protease	insoluble	1.12	70

Protease only; 650 μ g/ml , protease+ toxin; 1060 μ g/ml
 Trypsin only; 1880 μ g/ml , trypsin+ toxin; 1720 μ g/ml
 Cockroach protease+ toxin; 350 μ g/ml

험을 병행하여 본 결과 Table 5에서 보는 바와 같이 장내 효소인 protease에 의해서도 용해되지 않은 특이한 독소임을 알게 되었다. 이는 지금까지 알려진 *Bacillus thuringiensis* 균주가 생성한 내독소는 유충의 장내에서 protease에 분해되어 toxin으로 작용한다는 보고와는 달리 *Bacillus thuringiensis* subsp. *indiana* (TH109)균이 생성한 단백질성의 내독소는 장내 효소인 protease에 의해서 toxin으로 전환되는 것이 아니라 장내의 다른 alkali 및 여러 종류의 환원성 물질에 의해 toxin으로 전환될 가능성이 있는 것으로 추정된다. 또한 본 실험을 통해서 분리동정된 *Bacillus thuringiensis* subsp. *indiana*(TH109)균주는 표준균주인 *B. thuringiensis* subsp. *indiana*균주가 생성한 내독소의 특이성 독성실험에서 아직까지 특정한 해충에 독성을 나타낸다는 보고는 없는 실정이다. 그러나 저자의 최근 연구에서 *Bacillus thuringiensis* subsp. *indiana*(TH109)균주가 생성하는 exotoxin은 원예작물과 약용작물에 심한 피해를 주고있는 뿌리혹선충(*Meloidogyne incognita*)의 egg와 2령유충에 강한 독작용을 나타냄을 보고한 바 있다(李와 金, 1993).

5. 내독소의 열에 대한 안정성

정제된 내독소의 열에 대한 안정성을 조사하기 위하여 내독소물질이 함유된 용액의 농도를 A₂₃₀이 되게 한 후 시간별로 열처리하여 바퀴에 대한 독작용을 검토하였다. 그 결과 Table 6에서 보는 바와 같이 100°C에서 5시간 가열하여도 독력의 소실이 없음을 알 수 있어 본 균주가 생성한 내독소는 열에 대단히 안정함을 알 수 있었다. 이는 일반 식물성, 동물성 단백질 및 *Bacillus thuringiensis*균주들이 생성한 내독소성의 단백질은 열에 대단히 불안정한데 반해 *Bacillus thuringiensis* subsp. *indiana*(TH109)생성한 내독소는 열에 대단히 안정함을 볼 때 지금까지 알려진 내독소들과는 전혀 다른 형태의 독소일 가능성이 크다고 사료된다.

Table 6. Stability of delta-endotoxin by treatment of heating

Heat Temp.	Mortality after 24hr
100°C 1hr treatment	100
100°C 3hr treatment	100
100°C 5hr treatment	100
Nontreatment	100

III. 結 論

지구상에는 수많은 곤충들이 존재하며 그중 일부는 인간과 가축에게 병원균의 매개체로 직간접의 피해를 주고 있어 이에 구제의 일환으로 부작용이 심한 화학적 살충제 대신 인축에 부작용이 없는 생물학적 2세대 살충제(second generation pesticides)의 개발이 위생해충의 구제를 위해 그 어느때 보다도 시급한 실정이다. 따라서 본 보는 위생곤충중 인간과 더불어 긴 역사를 가지고 있으면서 약품에 대하여 내성이 강하고 적응력이 뛰어난 거주성인 독일바퀴(*Blattella germanica L.*)의 미생물학적 구제를 위해 토양으로부터 독성을 나타낸 *Bacillus thuringiensis* subsp. *indiana* (TH109) 균주를 분리동정한데 이어 균이 분비한 내독소(δ -endotoxin)의 성질을 조사하였다. 일반적으로 *Bacillus thuringiensis* 균주들이 분비한 내독소는 산이나 알카리 및 유기용매 등에 쉽게 용해되는 성질이 있는 반면에 *Bacillus thuringiensis* subsp. *indiana* (TH109) 균체가 분비한 δ -endotoxin은 HCl, NaOH 등에 대해서도 거의 용해되지 않았으며, Thiol-reagents 즉, 25mM Dithiotheritol, 25mM Dithioeryritol, 25mM Na-thioglycolate, 0.2M KSCN, 2% v/v β -mercaptethanol 등과 여러 종류의 유기매(acetone, CCl₄, ether, dioxin, MeOH, chloroform, xylene)에 대해서도 거의 용해되지 않음을 알 수 있었다. 또한 기존의 *Bacillus thuringiensis* 균주들이 분비한 내독소가 해충의 유충에 섭취되면 장내에서 장내 효소인 protease에 의해 분해되어 toxin작용한다는 보고에 의거 본균이 생성한 내독소를 장내효소로 분해시켜 독성 여부를

조사해 본 결과 장내 효소에 의해서도 용해되지 않은 특이함을 발견하였다. 이는 본 균이 생성한 내독소가 장내 효소에 의해 분해되어 toxin으로 작용할 가능성 보다는 장내의 다른 alkali 및 환원성 물질에 의해 toxin으로 전환될 가능성이 크다고 사료된다. 반면에 본 내독소로 인한 생물학적 활성에 의한 독성 보다는 내독소에 의한 장 폐쇄 등의 기계적인 장애 작용일 가능성도 전혀 간과할 수는 없다고 사료된다. 계속된 연구를 통해서 본 내독소가 독소로서의 작용가능성을 alkali 및 환원성 물질에 기초하여 실험을 시행하여 내독소에 대한 성질을 다시 한번 검토하고자 한다.

참 고 문 헌

1. Faulkner, P. 1981. Baculovirus. In E.W. Davis(ed.), Pathogenesis of invertebrate microbial diseases. Allenheld, Osmun publishers, Totowa, N.J. 3-37
2. Krieg, A. 1971. Possible use of richettisiae for microbial control of insects. In H.D.Burges and N.W.Hussey (ed.), Microbial control of insects and mites. Academic Press, Inc., New York. 459-468
3. Roberts, D.W., and W.G.Yondel. 1971. Use of fungi for microbial control of insects and mites. Academic Press, Inc., New York. 125-146
4. 李光培, 蔡龍坤. 1993. 바퀴(*Blattella germanica L.*)의 생물학적 제어를 위한 토양세균의 분리 및 동정. 대한위생학회지. Vol.8.129-138

5. Fast, P.G., D.W. Murphy, and S.S. Sohi. 1978. *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin : evidence that toxin acts at the surface of susceptible cells. *Experientia*.34. 762-763
6. Bernheimer, A.W. 1974. Interactions between membranes and cytolytic bacterial toxins. *Biochim. Biophys. Acta*. 334. 27-50.
7. Briest, F.G. 1977. Exteracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriol. Rev.* 41. 711-753
8. Stephen, J., and R.A. Pietrowski. 1981. Bacterial toxin. *In* J.A.Cole, and C.J. Knowles(ed.). *Aspects of microbiology*. Thomas Nelson and Sons LTD. 12-58
9. Cheung, T.Y., and B.D. Hammock. 1985. Micro- lipid- droplet encapsulation of *Bacillus thuringiensis* susp. *isrealensis* delta- endotoxin for control of mosquito larvae. *Appl. Environ. Microbial.* 50 : 984-988
10. Aronson, A.I., W.Beckman, and P.Dunn. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbial Rev.* 50. 1-24
11. Cheung, T.Y., and K.H.Kim. 1990. Immunological characteristics of mosquito- cidal delta- endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* 73E 10-2. *Kor.J.Microbial.Bioeng.* 18 : 3-1-304
12. 李光培. 金光顯. 1993. *Bacillus thuringiensis*(TH109)菌株에 의한 뿌리혹선충 *Meloidogyne incognita*의 防除效果. 東義大學校 生物科 博士學位論文