

*Bacillus thuringiensis*의 內毒素 蛋白質의 分離¹

金英勳 · 金尚賢 · 姜錫權

서울대학교 농과대학

Purification of Parasporal Protein Crystals of *Bacillus thuringiensis*

Young Hoon Kim, Sang Hyun Kim, Seok Kwon Kang

College of Agriculture, Seoul National University, Suwon, Korea

Summary

The study has been carried out to acquire some basic informations about *Bacillus thuringiensis* for developing the microbial pesticide. Three strains of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, *dendrolimus* and *aizawai*, were used in the experiments as follows. Growth characteristics of each strain were examined and parasporal protein crystals were isolated from the mixtures of spores and protein crystals by the new method of centrifugation in two-layer cushion of Renograffin using a fixed angle rotor. The results are as follows. 1. No difference was shown in growth characteristics among three strains of *B. thuringiensis*. In growth curves, all strains reached to exponential phase by 3 hr and stationary phase by 7-8 hr after inoculation. 2. The pH of the culture media during exponential growth stage decreased about 1.4 of a pH unit at the beginning of sporulation, but recovered during the early stage of sporulation and then remained nearly constant during the later stage. 3. As 10 ml sample was applied to two-layer cushion of Renograffin and then centrifuged for 1hr at 27,000g a fixed angle rotor, the purity and recovery ratio was 99.9% and 5.8%, respectively. It has been shown that the new method for the isolation of parasporal protein crystals was more efficient than any from the established methods.

緒 言

*Bacillaceae*과에 속하는 *Bacillus thuringiensis*는 Gram 양성이고 호기성이며 포자를 형성하는細菌으로서 1902년 일본의 Ishiwata가 病蠶에서 최초로分離하여 *Bacillus sotto*라命名하였고, 1915년 독일 Berliner가 Thuringia 地方에서 地中海 가루줄 명나방 (*Anagasta kuehniella*) 幼蟲으로부터分離하여 그 명칭을 *Bacillus thuringiensis* Berliner로命名하여 이것이 현재 학명으로 사용되고 있으며, 이때부터 微生物殺蟲劑로서의開發可能性이示唆되었다. 1920年

에서 1950年 사이에는 *B. thuringiensis*를 이용하여 많은 殺蟲野外實驗이 행해져 상당한 效果를 거두었으나 當時에는 病原性機作에 관해서는 不明한 상태였다. 以後 Hannay(1955)에 의해서 菌體가 孢子를 形成할 때에 封入體를 生成하는 것을 確認하였으며, 이어서 Fitz-James(1969)가 이 封入體는 蛋白質 結晶體라고 報告하였다. Angus(1956)의 획기적인 研究에 의하여 *B. thuringiensis*의 殺蟲力은 이 封入體蛋白質에 의해 決定된다는 것이 究明된 이후 1970年代에 이르기까지 *B. thuringiensis*에 관한 研究는 化學殺蟲劑의 效力때문에 크게 進展되지 못했으나, Kurstak(1962)에 의해 보다 毒性이 강한 새로운 變異菌 *kurstaki*가 發見된 이래, Goldberg & Margalit(1977)는 당시까지 鱗翅目계통의 昆蟲에 한하여 毒性을 가지고 있다는 종래의 研究結果와는 달리 雙翅目에도

1. 이 論文은 1990年度 教育部 學術研究 助成費(遺傳工學)에 의하여 研究되었음.

毒성을 가지는 새로운 菌株 *israelensis*를 發見·報告하였다. *B. thuringiensis*의 殺蟲 内毒素蛋白質에 관한 報告는 Labaw(1964)가 電子顯微鏡觀察에서 規則的인 結晶性을 가지며, 또한 多數의 subunit로 構成된 複合體라는 것을 暗示하였다. 이를 立證하는 Holmes & Monro(1965), Lecadet & Martouret(1967), Cooksey(1971) 등의 많은 報告들이 發表되었는데, 이 結晶性 蛋白質은 分析試料로 사용한 菌株, 處理方法 및 分析方法에 따라 subunit의 分子量에 상당한 差異를 나타낸다고 밝혀졌다.

이러한 觀點에서 本 研究는 國內에 적합한 細菌農藥開發의 基礎資料를 얻기 위해, 몇 種의 有用菌株를 이용하여 발효조내에서의 生長시기에 따른 pH變化를 알아보고 Renograffin을 이용 보다 간편하고 효율적인 内毒素蛋白質을 純粹分離하는 方法을 얻었다.

材料 및 方法

1) 供試材料

本 實驗에 供試된 *Bacillus thuringiensis*는 미국 농무성의 Faust博士로부터 分讓받은 *aizawai*, *dendrolimus*, *kurstaki*의 3變種을 供試하였다.

2) *B. thuringiensis*의 培養

Bacto nutrient agar slant培地에 subculture한 菌들을 10 ml의 G. Y. S. 培地(Nickerson & Bulla, 1974)가 들어있는 500 ml Erlenmeyer flask에 接種하고 30°C, 18시간 恒溫水槽內에서 培養한 후, phase의 感染이나 acrytaliferous 變異菌의 發生을 감지하기 위해 위상차현미경으로 sporulation을 確認하고 이를 接種源으로 사용하였다. 이 接種源을 5l의 N. B. S. 醱酵槽(New Burnswick scientific G-52 gyrotary shaker)에 50 ml를 가하여 250 rpm, 30°C, 10d airtion 條件으로 24시간 培養하여 實驗에 이용하였다.

3) 生長曲線 및 生長時期에 따른 培地內的 pH 變化

pH 變化測定은 N. B. C 醱酵槽에 부착된 pH測定器를 이용하여 記錄하였고, 生長曲線은 接種後 매시간마다 試料를 採取, 10倍 稀釋하여 Pu8800 spectrophotometer(Phillip Harris Co.)로 420 nm에서 吸光度를 測定하여 구하였다.

4) 内毒素蛋白質의 分離 및 測定

醱酵槽 內에서 24시간 培養한 供試菌은 胞子와 内毒素蛋白質의 autolysis를 유도하기 위해서 약 5시간

동안 停置, 위상차 현미경으로 胞子와 内毒素의 autolysis를 確認한 後, 遠心分離(10,000g, 20分)하여 沈澱物을 모아 0.02% Triton X-100 1N NaOH 溶液을 加하여 洗滌한 각각의 試料를 100倍 稀釋하여 660 nm에서 吸光度를 測定하고, Kavenagh 公式 [$W = 9929(1 - \sqrt{1 - 0.07347 \times A660})$]을 인용하여 乾物重으로 환산하였다.

각 供試菌株의 内毒素蛋白質의 分離는 67% Renograffin液 20 ml위에 30% Renograffin 10 ml를 重層하고 그 위에 試料 10 ml를 조심스럽게 重層한 後, 15,000 rpm, 1시간 遠心分離(Beckman JC-21 rotor)하여 형성된 중간 band를 주사기로 吸入하여 分離하였다(그림 3). 分離된 内毒素蛋白質은 Schaeffe-Fulton 方法에 따라 0.5%(w/v) Malachite green으로 5분간 加熱染色한 後 Safranin O液으로 Counter staining하여 현미경 觀察에 의해서 純度를 調査하였다. 内毒素 蛋白質의 回收率은 遠心分離하여 얻은 分割을 稀釋(100-200배)한 다음 Spectrophotometer로 660 nm에서 吸光度를 測定하여 얻은 乾物重과 重層試料의 比率에 의하여 算定하였다. 分離한 内毒素蛋白質은 증류수로 5회이상 遠心洗滌(13,000g, 20分)하여 減壓 冷凍乾燥機로 건조한 後 -20°C에 凍結保存하면서 실험을 行하였다.

結果 및 考察

1) *Bacillus thuringiensis*의 生長性狀

N. B. S. 발효조를 이용하여 G. Y. S. 培地에서 時間經過에 따른 菌의 生長曲線을 調査한 結果는 그림 1에서와 같이 供試變種 3菌株가 거의 같은 生長樣式을 나타내고 있는데, 일반적으로 배양후 3시간에 exponential phase, 7-8시간에 stationary phase에 이르게 되어 sporulation이 開始됨을 示唆하고 있다.

이 結果는 Aronson & Fitz-James(1976)의 報告와도 일치하는 것으로 δ -内毒性的의 生成은 위상차 현미경에 의해서 sporulation開始 後 7-8시간 경에 일어난다는 것을 觀察할 수 있었다.

生長經過에 따른 培地內的 pH變化는 일반적으로 培養直後부터 lag phase를 經過하여 약간씩 내려갔다가 배양후 7시간인 sporulation이 시작되는 stationary phase에서는 급격히 떨어지는 현상을 보였다. 또한 培養후 약 9시간경 sporulation이 시작되는 stationary phase에서는 배양초기에 있어서는 배지 pH보다 약간 높아지는 현상을 나타내고 있다(그림 2).

Bacillus 菌은 E. M. P. pathway에 따라서 glucose를 分解하는 것으로 알려져 있으며, 本 *B. thuringiensis*

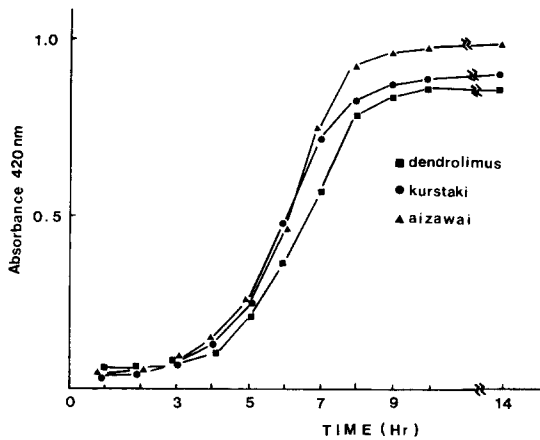


Fig. 1. Growth curves of *B. thuringiensis* var. *aizawai*, *dendrolimus* and *kurstaki*. Measured the light absorbance of culture media which were 10 times diluted with distilled water at 420 nm.

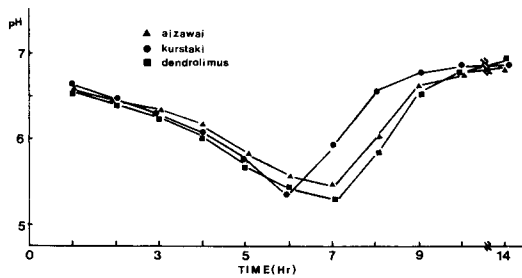


Fig. 2. pH of media during growth and sporulation of *B. thuringiensis* var. *aizawai*, *dendrolimus* and *kurstaki*. Initial pH of medium was 6.76.

菌에 대해서도 Nickerson(1974)에 의하면 영양細胞에서 93-100%의 glucose가 E. M. P pathway에 따라 분해되어 acetate와 pyruvate, poly- β -hydroxybutyrate 등의 酸性物質이 생산되므로 pH가 내려간다고 報告하고 있다.

이러한 *Bacillus*菌의 일반적인 특성과上記 *B. thuringiensis*의 研究報告를 本實驗에서의 배양초기에서부터 exponential phase까지의 pH 低下現象과 比較·檢討하여 보면 동일한 結果로 생각되어진다. 또한 배양후기에 있어서 pH의 회복 내지 上昇現象은 영양細胞와 sporulated cell의 pathway가 서로 다른 結果로서 生長期間에 蓄積된 酸性代謝物質이 移轉되어 胞子와 內毒素蛋白質 生成에 必要한 amino acid 合成에 주로 이용되기 때문인 것으로 추측된다.

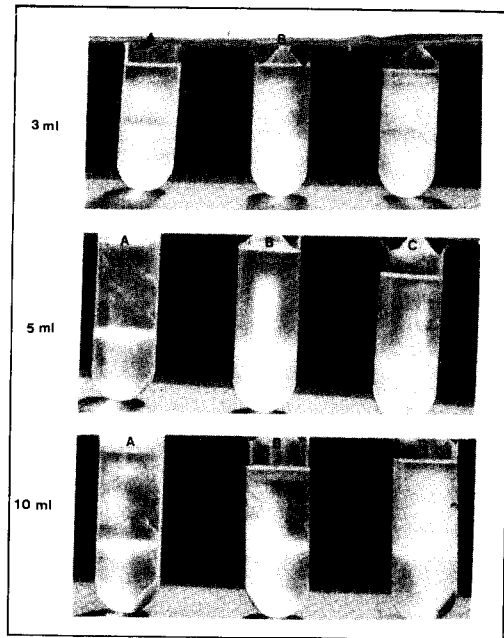


Fig. 3. The photograph of separated parasporal protein crystals which a visible band was formed were at the interface between the 67% and 30% Renograffin layers by the method of centrifugation in two layers cushion of Renograffin, using a fixed angle rotor. Centrifuged for 10 min. (A), 30 min. (B) and 60 min. (C) at 27,000g with respect to loading vol. 3 ml, 5 ml and 10 ml.

2) 內毒素蛋白質의 分離 및 收率

종래의 sucrose 또는 Renograffin density gradient에 의한 遠心分離法으로 內毒素蛋白質을 分離하는 方法보다 效率의인 分割法을 確立하기 위하여 fixed angle rotor를 이용하여 胞子와 內毒素蛋白質을 分離하는 方法을 試圖하였다.

즉, 67%, 30% Renograffin 不連續重層法에 의한 遠心分離法에서 分割한 結果는 30% Renograffin 層 위에 微量의 營養細胞와 分離破片物이 걸쳐져 있고, 30%와 67% Renograffin의 境界線에 內毒素 band가 形成되었으며, 胞子は 沈澱되어 있었다(그림 3).

試料 10 ml(乾物重 370 mg/ml) 重層時에는 遠心 30분후부터 95%이상의 純度를 나타내고, 1시간 후에는 거의 100%에 가까운 純度를 보여 주었으며, 純度가 增加함에 따라 回收率은 減少하여 1시간 이후 5.7% 정도에서 安定性을 보였다. 試料를 5 ml, 3 ml 重層했을 때에는 試料量이 減少함에 따라 짧은 遠心時間

Table 1. The comparison of recovery efficiency of isolated from *B. thuringiensis var kurstaki* δ -endotoxin protein with respect to centrifugal time and loading volume.

Loading vol. (36996 $\mu\text{g/ml}$)	Centrifugal time (min)	^{a)} A660	^{b)} Approx. dry weight ($\mu\text{g/ml}$)	^{c)} Dry weight weight (μg)	^{d)} Total dry weight	^{e)} Recovery efficiency (%)	^{f)} Purity (%)
3 ml	10	0.051	18.65	1865	9323	8.4	93
	20	0.046	16.87	1687	8435	7.6	98
	30	0.044	15.98	1598	7991	7.2	99.9
	60	0.042	15.32	1532	7660	6.9	99.99
	120	0.041	14.87	1487	7435	6.7	99.99
5 ml	10	0.117	41.92	4192	21458	11.6	88
	20	0.101	36.37	3637	18184	9.83	93
	30	0.070	25.60	2560	12800	6.92	98
	60	0.063	22.97	2297	11487	6.21	99.9
	120	0.060	21.83	2183	10914	5.9	99.9
10 ml	10	0.141	51.05	10211	51054	13.8	85
	20	0.104	38.48	7695	38476	10.4	90
	30	0.067	24.42	4983	24417	6.6	97
	60	0.060	21.94	4388	21939	5.93	99
	120	0.059	21.50	4299	21495	5.81	99.9

a) Measured 100 times or 200 times diluted samples of 3 ml, 5 ml and 10 ml, respectively.

b) Calculated from light absorbance at 660 nm by using the formula

$$W = 9929(1 - \sqrt{1 - 0.07347 \times A660})$$

c) b) dilution time

d) c) \times isolated protein solution volume (5 ml)

e) $\frac{\text{dry weight of isolated protein}}{\text{dry weight of loading sample}} \times 100(\%)$

f) 3% and 5% error are comprised in these values, smaller than 95% and 90%, respectively.

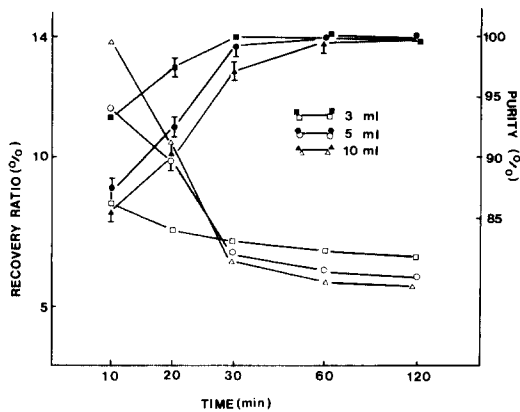


Fig. 4. The comparison of recovery efficiency and purity of separated parasporal protein crystals of *B. thuringiensis var. kurstaki* in different centrifugal time and loading volume in two layers cushion of Renograffin, using a fixed angle rotar.

에서도 높은 純度를 나타내었고, 内毒素蛋白質의 回收率은 같은 純度에서는 10 ml의 試料를 重層한 경우보다 높은 값을 보였으나 전체적인 回收性에는 큰 差異가 없었다(표 1 및 그림 4).

이상의 實驗에서 얻어진 結果를 分析檢討하면 이 方法에서는 10 ml의 試料를 重層하고 약 1시간 遠心했을 경우가 가장 적절한 條件으로 생각된다.

*B. thuringiensis*의 殺蟲性 内毒素蛋白質을 孢子로부터 純粹分離하기 위한 研究는 그 重要性에 따라 비교적 많은 研究報告가 있다.

Pendleton & Morrison(1966)과 Gingrich(1968)의 foam flotation 方法, Fast(1972)의 CsCl-density gradient 遠心法, Renograffin linear density gradient 遠心法(Sharpe *et al.*, 1975), Milne *et al.*(1977)의 Renograffin discontinuous density gradient 遠心法 및 NaBr density gradient 遠心法(Yamamoto & McLaughlin, 1981)에 의한 内毒素蛋白質 分離法이 報告되어 있다.

지금까지 이들 分離法은 水平遠心 rotor를 이용하여 density gradient를 조제해야 하고, 또한 linear gradient 遠心法의 경우에는 胞子和 內毒素의 buoyant density가 각각 1.30-1.32와 1.25-1.27로서 거의 같기 때문에 重層量에 制限을 받게 되며, 過重層時에는 胞子和 內毒素의 band가 중복되는 경우가 발생하므로 多量の 純粹한 內毒素蛋白質 分離에 問題點이 있는 것으로 指摘되어 왔다.

本 實驗에서 수행된 方法은 fixed angle rotor를 이용하여 density gradient를 調製할 必要가 없으므로 重層量에 큰 制限을 받지 않게 되고, gradient 조제 시간을 절약할 수 있는 새로운 方法인 동시에 지금까지 수행되어 온 上記의 方法들과 비교하여 순도와 회수량에서 큰 차이가 없기 때문에 효율적인 것으로 인정되었다.

摘 要

害蟲의 微生物的 防除를 위하여 *Bacillus thuringiensis* 殺蟲劑 開發에 관한 基礎資料를 얻고자 3種의 *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, *dendrolimus*, *aizawai*를 利用하여 培地内에서 生長特性을 調査하고 이들의 內毒素蛋白質의 分離를 위해 Renograffin 不連續重層法을 利用한 새로운 分離法을 試圖하였다.

1. 各供試菌株의 生長曲線을 調査한 結果는 3菌株 모두 接種後 3時間 以內에 exponential phase에 이르렀고, 7-8시간 정도에서 stationary phase에 이르렀다.

2. 培地内 pH變化는 exponential phase때 원래 培地에서 1.4정도 低下하였다가 sporulation의 開始에 따라 회복되기 始作하여 후기에 거의 平衡狀態를 나타내서 菌株間에 差異가 없는 것으로 確認되었다.

3. Renograffin 不連續重層法을 利用한 새로운 *B. thuringiensis* 內毒素蛋白質 分離法은 50 ml 遠心分離管에 10 ml의 試料를 重層, fixed angle rotor를 利用하여 27,000g에서 1時間 遠心했을 경우 99.0% 純도와 5.8%의 回收率을 나타내어 지금까지 報告된 方法들보다 더욱 效率的인 것으로 認定되었다.

引用文獻

Angus, T. A. (1956) Extraction purification and properties of *Bacillus sotto* toxin. *Can. J. Microbiol.* **2** : 416-426.
 Aronson, A. I. and P. Fitz-James (1976) Structure and morphogenesis of the bacterial spore coat. *Bacteriol. Rev.* **40** : 360-402.

Cooksey, K. E. (1971) The protein crystal toxin of *Bacillus thuringiensis* : Biochemistry and mode of action. p. 247-274 In H.

Burges D. and N. W. Hussey (ed). Microbial control of insects and mites. Academic Press. Inc., New York.

Fast, P. G. (1972) δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. II. A rapid method for separating parasporal bodies from spores. *J. Invertebr. Pathol.* **20** : 139-140.

Fitz-James, P. and E. Young (1969) Morphology of sporulation. In The bacterial spore (G. W. Gould and A. Hurst eds.). Academic Press, Inc., New York. pp. 39-72.

Goldberg, L. J. and J. Margalit (1977) A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex anivitattus*, *Aedes aegypti*, and *Culex pipiens*. *Mosq. News* **37** : 355-358.

Hannay, C. L. and P. Fitz-James (1955) The protein crystals of *Bacillus thuringiensis* berliner. *Can. J. Microbiol.* **1** : 694-710.

Homes, K. C. and R. E. Monro (1965) Studies on the structure of parasporal inclusions from *Bacillus thuringiensis*. *J. Mol. Biol.* **14** : 572-581.

Labaw, L. W. (1964) The structure of *Bacillus thuringiensis* Berliner crystals. *J. Ultrastruct. Res.* **10** : 66-75.

Lecadet, M. M. and D. Martouret (1967) Enzymatic hydrolysis of the crystals of *Bacillus thuringiensis* by the proteases of *Pieris brassicae*. *J. Invertebr. Pathol.* **9** : 322-330.

Milne, R., D. Murphy and P. G. Fast (1977) *Bacillus thuringiensis* δ -/Endotoxin, An improved technique for the separation of crystals from spores. *J. Invertebr. Pathol.* **29** : 230-231.

Nickerson, K. W. and L. A. Bulla (1974) Physiology of sporeforming bacteria associated with insects : Minimal nutritional requirements for growth, sporulation and parasporal crystal formation of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Microbiol.* **28** : 124-128.

Pendleton, I. R. and R. B. Morrison (1966) Separation of the spores and crystals of *Bacillus thuringiensis*. *Nature (Lond.)* **212** : 728-729.

Sharpe, E. S., K. W. Nickerson, J. N. Aronson and L. A. Jr. Bulla (1975) Separation of spores and parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis* in gradients of certain x-ray contrasting agents. *Appl. Microbiol.* **30** : 1052-1053.

Yamamoto, T. and R. E. McLaughlin (1981) Isolation of a protein from the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* toxic to the mosquito larva, *Aedes taeniorhynchus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **103** : 414-421.