

Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*가*생산하는 β -exotoxin의 정제와 특성****심창범 · 이형환 · 이희무***

건국대학교 생물학과 유전공학연구소 *안동대학 생물학과

Purification and Partial Characterization of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Exotoxin**Shim, Chang-Bum, Hyung-Hoan Lee and Hee-Moo Lee***Institute for Genetic Engineering, Department of Biology, Kon Kuk University,
Seoul 133, Korea

*Department of Biology, Andong National University, Kyungbuk, Korea

Bacillus thuringiensis var. *thuringiensis* produces an extracellular insecticidal thermostable β -exotoxin, which was purified through microfiltering, barium precipitation, charcoal absorption chromatography, ion exchange column chromatography and gel filtration. The exotoxin in each purification step was detected by thin layer chromatography, high pressure liquid chromatography and paper electrophoresis with efficient results.

The exotoxin productivity on time course was checked by spectrophotometric absorbance at 258 nm with the result that the exotoxin was initially produced in 6 hour culture and reached maximum value in 36 hour culture. Anti-bacterial effect test on *Micrococcus flava* was applied as toxicity test. The results showed that growth inhibition of *M. flava* could be shown in plate assay of cell free filtered supernatant, alkaline eluant from charcoal and purified exotoxin obtained from gel filtration column. The estimated molecular weight of the exotoxin by gel filtration column chromatography on Sephadex G-10 appeared to be 740. Heat stability of the exotoxin was confirmed through autoclaving twice.

*Bacillus thuringiensis*는 그림염색에 양성 반응을 나타내고, 아포 및 단백질 결정체를 형성하는 간균으로 (Krieg et al. 1984), α -exotoxin, β -exotoxin, γ -exotoxin 및 δ -endotoxin을 생산한다 (Hempel, 1967).

상기 세균이 분비하는 외독소 (β -exotoxin)는 열에 안정한 화합물로 영양세포의 증식기에 생산되고, 그 구조는 핵산과 유사하며, 아데노신 (adenosine)에 포도당이 부착되고 알라린산

(allaric acid)의 4번 탄소 위치에 인산기가 결합되어 glucoside를 형성하고 있다 (Bond et al., 1969). 분자량은 755 내지 825 (Bond et al., 1969; Kim and Huang, 1970)로 보고되었으며, UV-spectrum으로 258 내지 260 nm에서 최대, 230 내지 234 nm에서 최소의 흡광도를 나타내고 있다 (Benz, 1966).

외독소는 특이적으로 쌍시류, 인시류 등의 유충에 독성이 강하여, 치사량 이하에서는 유충,

* Corresponding author.

번데기 및 성충에 기형현상을 일으키며 다량 투여시는 치사현상을 유발하므로, 생물학적 살충제로 개발할 가치가 있는 것으로 보고되고 있다 (Dunn, 1960; Briggs, 1960; Cantwell et al., 1964b; Burgerjon et al., 1969; Lam and Webster, 1972; Wolfenberg et al., 1972; Wright, 1972).

일반적으로 외독소의 생산은 spore 및 crystal 돌연변이체 균주도 야생형과 똑같이 외독소를 생산하는 것으로 미루어보아 아포 및 단백질 결정체 형성과는 무관하다는 보고도 있다 (de Barjac et al., 1966).

본 연구에서는 *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* 균주가 생산하는 외독소를 정제하고, 정제 단계마다 외독소를 확인하기 위하여 TLC, HPLC 및 종이 전기영동법을 이용하였으며 외독소의 열에 대한 안정성 및 분자량도 측정하였다.

재료 및 방법

균주; 본 연구실 냉동실 (-70°C)에 보관 중인 Nutrient broth에 glycerol 30%를 첨가한 액체배지 *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Serotype 1K-2 (BT S1 K-2)를 사용하였다 (Lee, 1982). 미생물의 독성 검정을 위하여 사용된 균주로는 본 연구실에 보관 중인 *Micrococcus flavus* K-200 및 국립 보건원에서 분양받은 *Micrococcus luteus* ATCC 9341을 각각 사용하였다.

배지; 균주 보관 사면배지 및 평판배지로는 한천영양배지 (nutrient agar)를 사용하였으며, 배양배지로는 nutrient broth (NB)를 사용하였다. 외독소 생산배지로는 Conner 및 Hansen (1967)의 최소 액체배지를 약간 수정하여 사용하였으며 그 화학적 조성은 다음과 같다.

즉 potassium phosphate monobasic (KH_2PO_4) 5g, potassium phosphate dibasic (K_2HPO_4) 5g, magnesium sulfate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.05g, manganese sulfate monohydrate ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0.03g, ferric sulfate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.01g, calcium chloride ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.05g, sodi-

um ammonium hydrogen phosphate ($\text{Na}(\text{NH}_4)\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 1.5g, glucose 10g, Difco-casamino acid 10g을 증류수에 녹히어 총량이 1,000 ml 되게 하였으며, pH는 7.0으로 조정하였다. 배양용배지중 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 및 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 는 각각 멸균된 증류수에 용해시켜 0.2 μm 의 막여과지 (Sartorius Co.)로 여과하였고, 나머지는 121°C 15 lb로 가압멸균한 후 혼합하여 사용하였다.

독성효과 검정배지로는 Rosenberg (1971)의 배지를 사용하였다.

B. thuringiensis var. *thuringiensis*의 성장과 외독소 생산성 실험

Lee and Kim (1983)의 방법을 수정하여 이용하였다. 평판배지상의 BT S1 K-2 콜로니를 2-3백금이를 취하여, 30 ml의 NB배지에 접종하여 교반 배양기로 배지의 혼탁도의 O.D.가 2.0이 될 때까지 배양한 후, 소형원심분리기 (Hettich, Universal D-7200)를 사용하여 3,000g로 30분간 원심분리하여 균체를 침전시킨 후 그 침전물에 10 ml의 생리식염수를 가하여 현탁시켰다. 이러한 원심분리 과정을 2회 반복하여 균체를 세척한 다음, 생리식염수로 현탁시킨 균액을 미리 준비된 10 ml의 최소액체 배지에 1 ml씩 접종하여, 28°C 진탕(200 rpm) 배양한 후, 6, 12, 24, 36, 48, 60 시간 별로 배양액 10 ml씩을 취하여 원심분리한 후 상층액만 취한 다음 분광 광도계로 200nm부터 300nm 사이의 spectrum을 측정하여 외독소의 함유량을 측정했다.

외독소 정제방법

Barium에 의한 침전; 외독소 생산성 조사 방법과 동일한 방법으로 실시하였으며, 단지 CH액체 최소배지를 1,200 ml을 만들어 500 ml용량의 6개의 삼각플라스크에 200 ml씩 넣고, 생리식염수에 현탁된 BT S1 K-2 균액을 각각 2 ml씩 접종한 후 28°C 200 rpm으로 진탕배양을 실시하였다. 상층액의 회수는 외독소의 생산이 최대를 나타내는 36시간에 실시하였고, 고속 원심분리기 (Kontron Hermle, centrifon H-401)로 4°C에서 8,000 × g로 25분간 원심분리하여 상층액만 취하였다. 위에서 얻은 상층액을 가압

멸균한 후, 미세 여과지 ($0.2 \mu\text{m}$)로 여과하였다. 여과액중 1,000 ml은 동결 건조하였고 나머지 여과액과 같이 β -외독소를 확인하기 위하여 TLC, HPLC와 미생물 점정을 실시하였다.

상기 BT 배양액 1,000 ml을 실온에서 교반하면서, 질소가스 흐름하에 23 ml의 2.45 M barium acetate를 한방울씩 천천히 가한 후, 4°C 에서 18시간 침전시켰다. 침전 후 상층액을 제거하고 Whatman 여과지 (Ashless-41)로 여과하여 침전물을 얻은 다음, 이 침전물을 500 ml의 증류수와 200 ml의 acetone으로 세척하고 질소 흐름하에서 건조시켜 barium 침전물을 얻었다 (Bond et al., 1969).

목탄 흡수 크로마토그래피; 목탄을 다음과 같이 전처리하였다. 즉 목탄 10 g을 1 M HCl 50 ml에 넣고 건조솥 내에서 100°C 로 1시간 동안 건조시킨 후, 깔대기를 이용하여 적당량의 증류수로 세척하고 다시 1% 암모니아수를 포함한 alkaline aq. ethanol (ethanol + D.W.; 1 : 1, v/v)로 씻은 다음 건조하여 보관하였다.

Barium 침전물을 1 M HCl 35 ml과 같이 비이커에 넣고 4°C 에서 5분간 진탕시키면서 녹인 후, 다시 1 M HCl 18 ml을 넣어 침전물을 완전히 녹였다. 그 후 180 ml의 증류수를 넣고 전처리된 목탄 4g을 넣은 후, 4°C 에서 1시간 동안 진탕시켰다. 외독소가 흡수된 목탄을 분리관 ($0.5 \times 10 \text{ cm}$)속에 넣어 걸러낸 후, 180 ml의 증류수로 세척하였다.

그 후 36 ml의 alkaline aq. ethanol로 서서히 용출시킨 후, 이 용출액을 분광 광도계로 흡광도를 측정하였다. 외독소가 함유된 알칼리성 용출액을 질소 흐름하에서 65°C 로 중탕하면서 258 nm에서 O. D. 가 3.5가 될 때까지 농축하였다.

이온 교환 크로마토그래피; 황산화시킨 DE-AE-cellulose를 분리관에 충전시킨 후 ($2.5 \times 12 \text{ cm}$) 0.5 M ammonium carbonate buffer로 충분히 용출시켜 씻은 다음 여기에 농축된 알칼리성 용출액 0.5 ml을 넣어 분리시켰다. 용출율은 30 ml/hr로 4°C 에서 실시하였으며, ammonium carbonate 농도 구배는 분획을 60개 받은 후 부터 시작하여 120개 까지 linear gradient (0.05 M ~ 0.15 M)를 실시하였다. 각 분획액은

2.5 ml씩 받아 분광 광도계로 258 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Gel filtration; Sephadex G-25 (Sigma Chem. Co., USA)를 $2.5 \times 25 \text{ cm}$ 인 분리관에 넣어 충전시키고 증류수로 세척한 다음 이온교환 크로마토그래피에서 얻은 농축 (O. D. 3.0으로 조절)된 시료 0.5 ml을 위에서 준비된 분리관에 넣어 2차 증류수로 4°C 에서 용출율 25 ml/hr로 용출하여, 3.5 ml씩 분획액을 받아 분광광도계로 258 nm에서 흡광도를 측정하였다.

외독소 확인 방법

종이 전기영동에 의한 동정; Cellulose acetate 전기 영동지 ($14.4 \times 5.7 \text{ cm}$, Gelman Co.)를 formate 완충액 (1 M formic acid 용액 500 ml과 1 M Sodium hydroxide 용액 250 ml를 150 ml의 증류수에 혼합)으로 10분 전처리하여, 흡수지로 완충액 물기를 닦은 후 점종기로 표준물질, AMP 및 gel filtration에서 얻은 정제된 외독소를 $0.16 \mu\text{l}$ 씩 점종한 후, 500 V로 2시간 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후 10% HgCl_2 용액에 5분간 처리후 H_2S 가스로 반응시켜 흑황색의 band를 확인하였다 (Kim and Huang, 1970).

HPLC에 의한 동정; Waters 회사의 HPLC를 사용하였다. Mobile phase로는 0.01 M HCl과 0.2 M NaCl 혼합액을 사용하였으며, Stationary phase로는 μ -bondapak C18 ($3.9 \text{ mm} \times 30 \text{ cm}$) 분리관을 사용하였다. 이 때 용출율은 2.0 ml/min, 온도는 15°C , sensitivity는 0.1로 조절하였고, 파장 254 nm에서 측정하였으며, 각 단계마다 얻은 시료들은 모두 위와 동일한 조건 하에서 HPLC로 분석하였다.

TLC에 의한 동정; Silica gel 박판 (Funakoshi 약품 주식회사)을 사용하여, 여과된 배양 상층액과 알칼리성 용출액을 시료로 하고, 순수한 외독소 및 ATP를 비교물질로 하여 같은 박판에 점적하여 상등법으로 전개하였다. 사용된 전개 용매의 구성은 n-propanol- NH_4OH (Conc.) - H_2O (10 : 2 : 5, v/v/v)를 사용하였다.

미생물에 대한 독성검정 시험; 미생물 검정용 배지를 가압 멸균하여 평판에 부어 굳히고, 실험균주인 *Micrococcus flavus*와 *Micrococcus luteus* ATCC 9341을 따로 전배양한 후 멸균

된 편봉으로 배양액을 충분히 적셔서, 한천 평판 배지 위에 끌고루 도말하였다. 직경 7mm의 멸균된 여과지에 배양액을 적신 후 각 단계에서 얻은 시료를 100 μ l씩 정량하여 well에 떨어뜨리고, 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 18시간 배양하여 발육억제 여부 및 억제대 직경을 mm 단위로 측정하였다(Lee, 1982; Lee and Kim, 1983).

외독소 분자량 측정; Sephadex G-10을 사용한 gel filtration column chromatography법을 사용하여, 기지의 분자량의 핵산계통 물질과 정제한 외독소를 분리관을 통하여 같은 조건으로 용출시켜, 용출 부피를 계산하여 분자량을 측정하였다. 사용된 핵산계통의 물질로는 NAD, DPN 및 CoA를 Na 염으로 만들어 사용했으며, 크로마토그래피법은 앞서 기술한 방법에 준하여 실시하였다.

결 과

***B. thuringiensis* var. *thuringiensis*의 성장과 외독소 생산성조사**

*B. thuringiensis*의 성장은 전형적인 S자 형태의 패턴을 나타내어, 배양 후 2시간 부터 대수기에 들어가 6시간만에 정지기에 도달하였다. 외독소 구조중 adenine성분에 의해 파장 258nm에서 최대 흡광도를 나타내는 특징을 이용하여 외독소의 양을 측정하였다. 시간별 측정 결과 36시간에 흡광도가 2.604로 가장 많이 생산되었으며, 60시간 후에는 오히려 감소하는 결과를 얻었으며(Fig. 1), 시간별 최대 생산치를 측정하여 Table 1에 표시하였다. 상기 결과로 부터 실험에 필요한 최적배양액 회수 시간을 36시간으로 결정하였다.

외독소의 정제

B. thuringiensis 36시간 배양액내의 외독소; *B. thuringiensis*를 36시간 배양한 후 원심분리하여 2,000 ml의 상층액을 얻었으며, 0.2 μ m 미세여과로 원심분리시 미처 제거되지 않은 세포들과 고체불순물들을 제거하였다. 여과액 1,000 ml을 동결 건조한 고체무게는 17.256 g 이었으며, 미생물독성 검정결과 *Micrococcus flavus*에 대한 성장억제 직경은 19 mm 이었고, specific

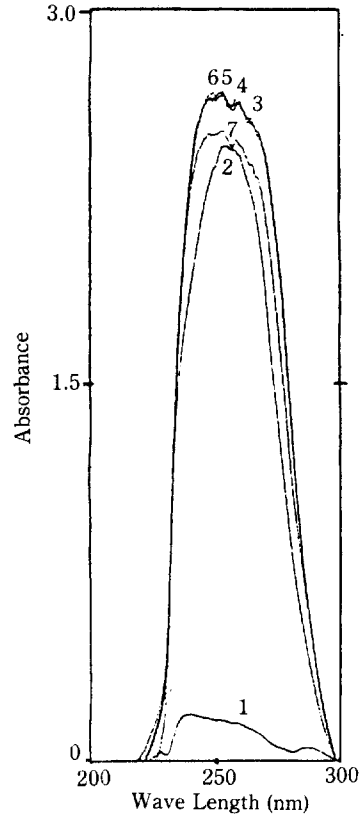


Fig. 1. The productivity of exotoxin from *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* in Conner ϵ Hansen media
1 : 6 hours, 2 : 12 hours, 3 : 24 hours, 4 : 30 hours 5 : 36 hours, 6 : 48 hours, 7 : 60 hours

Table 1. Measurements of the production of β -exotoxin on time course in mineral salts medium

Culture hours	Optical densities at 258 nm
6	0.170
12	2.423
24	2.586
30	2.593
36	2.604
48	2.601
60	2.430

activity는 1.302였으며 여과액의 O. D.는 2.604였다(Table 2). TLC에 의한 외독소의 확인결과는 Fig. 2에 표시하였다. 또한 HPLC에 의한 분석 결과 여러개의 peak가 나타났으며, 같은

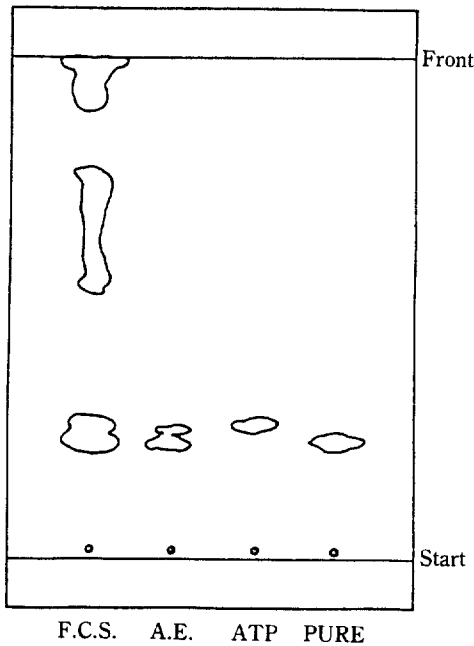


Fig. 2. Thin layer chromatogram of exotoxin preparations.

Developing solvent: n-propanol - NH₄OH (conc.) - H₂O (10:2:5, v/v/v)
 Development: ascending method
 F.C.S.: Filtered culture supernatant, A.E.: alkaline eluant

조건으로 실험하여 얻은 순수 외독소의 retention time 으로 외독소를 확인하였다 (Fig. 3).

Barium 침전; 질소흐름하에서 Barium 침전 물을 건조한 결과 11.935g을 산화현상을 피하기 위하여 회수하였고, 바로 목탄흡수 크로마토 그래피를 실시하였다. 결과로 여과된 배양액 속의 탄수화물, 지방, 단백질 및 무기질의 대부분이 제거되는 효과를 얻을 수 있었다.

Table 2. Summary of the data for the purification of the exotoxin of *Bacillus thuringiensis*

Stage	Volume (ml)	Weight of solid fraction (g)	Diameter of inhibition zone (mm/100 μ l)	UV-absorption at 253 nm (O. D.)	Specific activity	Yield (%)
F. C. S.	1000	17.256	19	2.604	1.302	100
Barium preci.	-	11.935	-	-	-	-
C. A. C.	36	0.094	24	0.765	106.4	0.36
DEAE-cellulose	6	-	28	2.981	249.4	0.16
Sephadex G-25	4	-	30	3.102	387.7	0.10

* F. C. S. : Filtered culture supernatant
 Barium preci. : Barium precipitation

C. A. C. : Charcoal absorption column
 DEAE: Diethylaminoethyl

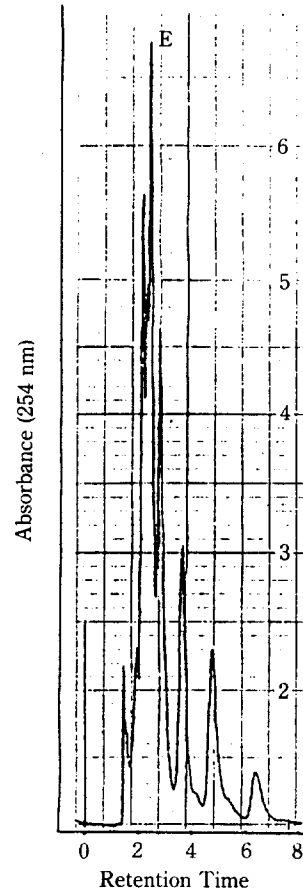


Fig. 3. High pressure liquid chromatogram of the filtered culture supernatant containing exotoxin
 column: micro bondapak C 18 (3.9 mm x 30 cm) waters Co.

Eluent: 0.01 M HCl : 0.20 M NaCl (1:1, v/v)
 Detection: UV at 254 nm
 Flow rate: 2.0 ml/min.
 Operating temp.: 15°C
 E.: Exotoxin

목탄 흡수 크로마토그래피; 외독소가 산성인 상태에선 활성화된 목탄에 흡수되고, 알칼리 상태일 때, 목탄에서 떨어져 나오는 성질을 이용하여 정제를 시도하였다.

분리관을 통해 받아낸 알칼리성 용출액을 분광 광도계로 측정할 결과는 Fig. 4에 표시하였다. 회수된 부피는 36 ml 이었고, O. D. 가 0.765 이었으며 회수율은 0.36%로 낮았으나 specific activity는 106.4로 거의 100배 증가하였고, 건조무게는 0.094 g 이었으며, 미생물 검정 억제직경은 24 mm 이었다. HPLC로 확인한 결과 여과된 배양액에서 나타났던 많은 peak가 3-4 개 정도로 줄어들어 상당히 정제됨을 알 수 있었다 (Fig. 5).

이온 교환 크로마토그래피; 분획번호 85~90 사이, 91~93 사이에 조그만 peak가 나왔고, 95~112번 사이에 큰 peak가 나왔다 (Fig. 6). 큰

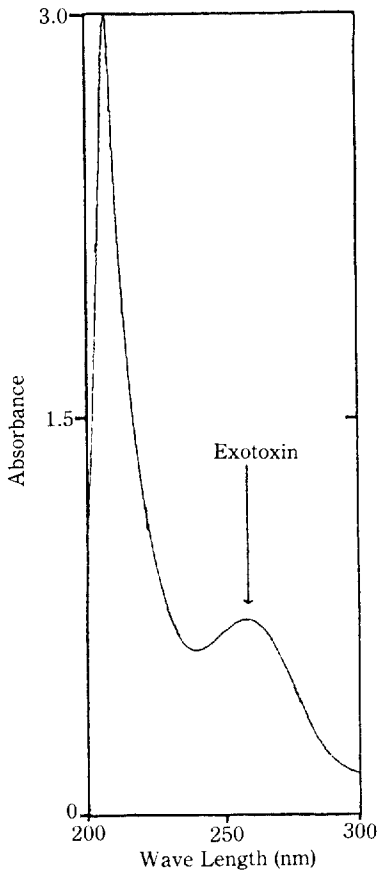


Fig. 4. Spectrophotometric detection on alkaline eluant from charcoal absorption column

peak를 HPLC로 분석하여, 외독소를 확인했으며 알칼리성 용출액에서 본 5-6개의 peak가 큰 peak 1개와 2~3개의 조그만 peak로 줄어들어 더욱 정제되었음을 알 수 있었다 (Fig. 7). 회수된 부피는 6ml로 O. D. 가 2.981이었으며, 미생물검정 억제직경은 28 mm 이었고, 회수율이 0.16%로 줄어들었으나 specific activity는 전 단계보다 2.5배 증가한 249.4였다 (Table 2).

Gel filtration; 분획번호 11번과 13번에서 작은 peak가 나왔고, 16-19번 사이에 큰 peak가 나왔다 (Fig. 8). 큰 peak를 HPLC로 분석하여 외독소를 확인했으며, 이온 교환 단계에서 나온 잔 peak들이 없어서 외독소 peak만을 확인하였다 (Fig. 9). 회수된 부피는 4ml로 O. D. 가

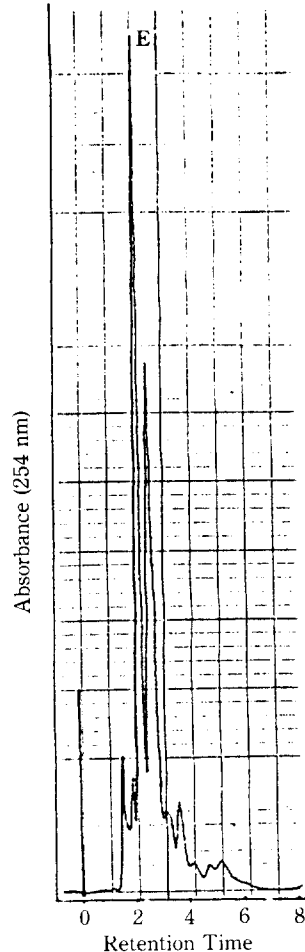


Fig. 5. High pressure liquid chromatogram of alkaline eluant containing exotoxin
E.: Exotoxin

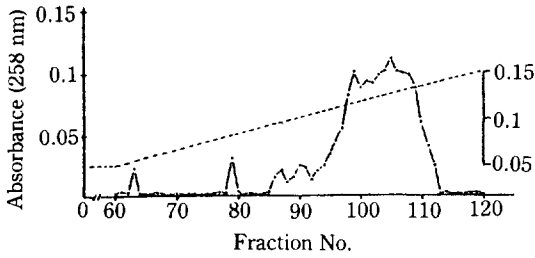


Fig. 6. Ion exchange chromatography on DEAE-cellulose column of alkaline eluant obtained from charcoal absorption column.

The column (2.5 x 12 cm) was eluted at a flow rate of 25 ml per hour with linear gradient from 0.05 M to 0.15 M ammonium carbonate, which was started after 60 fractions were collected. Fractions of 2.5 ml were collected at a temperature of 4°C

3. 102였고, 회수율은 0.10%로 줄어들었으나 specific activity는 이온 교환 단계보다 약 0.8 배 증가한 387.7이었다. 미생물검정 억제직경은 30 mm로 나타났다. 지금까지의 단계별 부

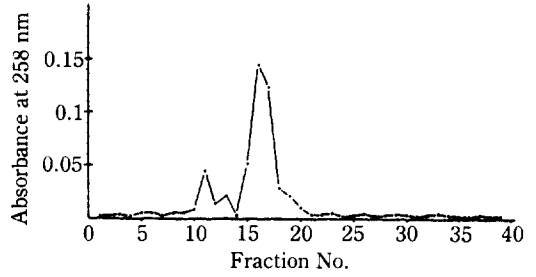


Fig. 8. Gel filtration on a Sephadex G-25 column of β -exotoxin obtained from DEAE-cellulose column. The column (2.5 x 25 cm) was eluted at a flow rate 30 ml per hour with second distilled water at 4°C. The fraction size was 3 ml.

피, 건조무게, O. D., 회수율, specific activity 및 미생물검정 억제직경을 Table 2에 표시하였다.

Micrococcus flavus를 이용한 미생물 검정 대조균주인 **Micrococcus luteus** ATCC 9341

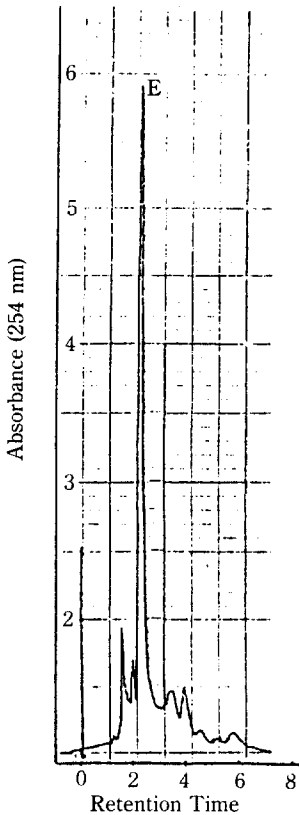


Fig. 7. High pressure liquid chromatogram of exotoxin obtained from ion exchange column
E.: Exotoxin

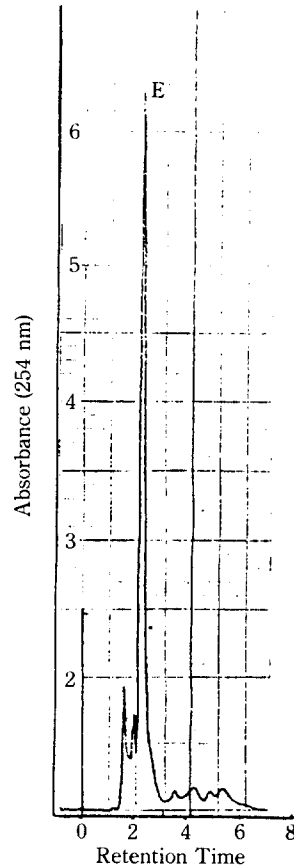


Fig. 9. High pressure liquid chromatogram of exotoxin obtained from gel filtration column
E.: Exotoxin

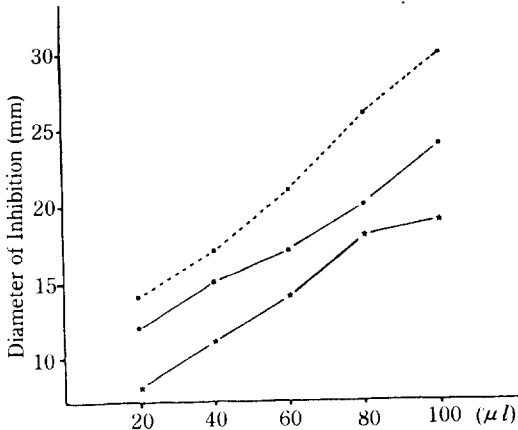


Fig. 10. The inhibition effect of different concentration of exotoxin preparation on the growth of *Micrococcus flava*

■ --- ■: Gel filtration
 ■ — ■: Charcoal absorption
 ★ — ★: Filtered cultured supernatant

은 억제대를 형성하긴 하나 희미하게 형성했을 뿐이고, 반면 *Micrococcus flava*는 뚜렷한 억제대를 형성하였다.

각 단계마다 회수된 외독소 함유 시료를 정량하여 20, 40, 60, 80, 100 μg씩 시험해본 결과 정제 단계가 올라감에 따라, 양이 증가함에 따라 억제직경도 직선상으로 증가하였으며 (Fig. 10). 억제직경을 mm단위로 측정하여 Table 3에 표시하였다.

외독소 분자량 측정

분자량에 따른 투과성을 이용한 gel filtration 방법을 통해, 이미 알고 있는 물질과 정제된 외독소를 같은 조건으로 분리관 크로마토그래피하

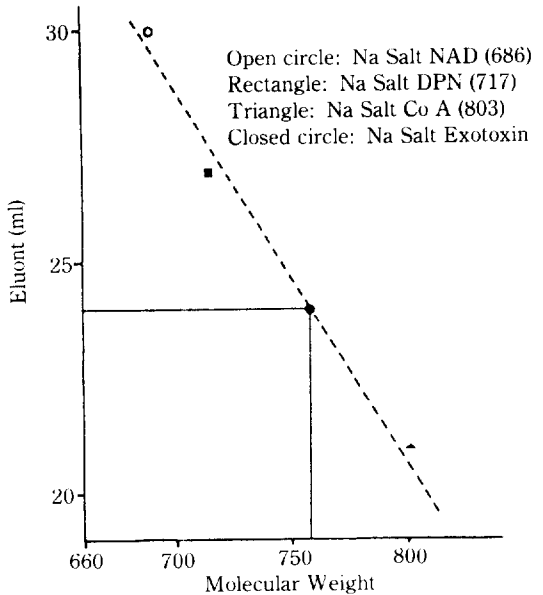


Fig. 11. Estimation of molecular weight of exotoxin by chromatography on Sephadex G-10 column

여, 시료가 용출하는 부피를 측정하여 직선으로 그려 분자량을 측정된 결과 740으로 나타났다 (Fig. 11).

열에 대한 안정성 시험

미생물 검정시험시 시료를 가압멸균기 (Market Forge Sterilmatic model STM-E)로 멸균하여, 멸균하지 않은 시료와 비교하여 본 결과 똑같이 독성을 나타내어, 외독소가 열에 상당한 안정성이 있음을 알 수 있었다.

고 찰

B. thuringiensis var. *thuringiensis* 균이 β-exotoxin을 분비하는 것은 여러가지 실험을 통하여 알 수 있었으며, β-exotoxin을 정제하기 위한 방법이 매우 유효함을 알 수 있었다. Carlberg (1973)는 최소액체 배지에서 10시간 배양 후부터 외독소가 생산되기 시작하여 48시간 내지 72시간에 최대치에 도달하였다고 보고하였으나, 본 실험에서는 6시간 배양 후부터 외독소가 생산되기 시작하여 36시간에 최대였고 (O. D. 가 2.604), 60시간 후에는 (O. D. 가 2.430) 오히려 감소하는 결과를 얻었다.

염을 이용한 외독소의 침전단계에서는 calci-

Table 3. Inhibition zone of different concentration of β-exotoxin preparation on the growth of *Micrococcus flava*

Applied Volumes (μl)	Inhibition zone (mm)		
	FCS	CAAE	GF
20	8	12	14
40	11	15	17
60	14	17	21
80	18	20	26
100	19	24	30

FCS : Filtered culture supernatant
 CAAE : Charcoal absorption alkaline eluant
 GF : Gel filtration

um chloride (Kim and Huang, 1970), barium acetate (Bond et al., 1969) 및 Sodium chloride 등 3가지를 사용하여 각각 4°C, -20°C, -60°C로 온도를 바꿔 실험한 결과 4°C의 NaCl은 O. D. 가 0.312, -20°C의 NaCl은 0.308, -60°C의 NaCl은 0.293으로 나타났고, CaCl₂는 NaCl보다 침전이 잘 되어, 4°C의 CaCl₂는 0.633, -20°C의 CaCl₂는 0.621, -60°C의 CaCl₂는 0.619로 나타난 반면, Ba (COOH)₂는 4°C의 Ba (COOH)₂일 때 0.745, -20°C의 Ba (COOH)₂는 0.729, -60°C의 Ba (COOH)₂는 0.714로 나타나, barium acetate로 4°C에서 침전시킨 것이 제일 좋은 결과를 나타냈다.

목탄흡수 크로마토그래피 단계는 대부분 실험에서 채택된 단계로, 사용한 용출액의 조성에 차이가 있어 50% ethanol 수용액 (de Barjac and Dedonder, 1965), 암모니아성 ethanol (de Barjac and Dedonder, 1968), ethanol 수용액 (Sebesta et al., 1967) 및 1% 암모니아수가 포함된 50% ethanol 수용액 (Bond et al., 1969)을 사용한 바, 본 실험에서 각각 목탄흡수 크로마토그래피하여 받아낸 용출액의 O. D. 를 측정 한 결과, 50% ethanol 수용액은 0.704, 1% 암모니아성 ethanol은 0.719, 1% 암모니아수가 포함된 50% ethanol이 0.745로 나타나 Bond et al., (1969)의 결과가 가장 좋은 효율을 나타내었다.

이온교환 크로마토그래피 단계에서는 Bond et al. (1969)이 Dowex 1AG 1 (Cl⁻ form)을 사용하는데 반하여 본 실험에서는 DEAE-cellulose (CO₃⁻ form)을 사용하여 좋은 결과를 얻었다. Mohd et al. (1980)은 외독소가 열에 안정한 물질로 30분간 고온 가압 멸균하여도 독성 효과가 떨어지지 않았다고 보고하였는데, 본 실험에

서도 121°C 15 lb로 2회 고온 가압 멸균하여 독성효과 검정을 실시한 바, 배양 상층액은 *Micrococcus flava*에 대한 성장억제 직경이 19 mm, 알칼리성 용출액은 24 mm, gel filtration을 통해 정제된 외독소는 30 mm로 나타났고 온도 처리하지 않은 배양 상층액은 18 mm, 알칼리성 용출액은 24 mm, 정제된 외독소는 29 mm로 나타나, 열처리한 것과 열처리하지 않은 것을 비교할 때 아무런 차이를 발견하지 못해, 독성 효과가 그대로 유지됨을 확인하였다.

*Micrococcus flava*를 시험균주로 사용한 독성 검정시험은 Rosenberg et al. (1971) 및 Carlberg (1972)의 방법을 사용한 바, 외독소가 *M. flava*의 성장을 억제한다는 그들의 결과와 일치하였으며, Rosenberg et al. (1971)은 배양 상층액 40 μl에 13 mm, 80 μl에 15 mm로 나타났고, gel filtration한 것은 40 μl에 15 mm, 80 μl에 19 mm로 나타났으나, 본 실험에서는 배양 상층액 40 μl에 11 mm, 80 μl에 18 mm로 나타났고, gel filtration한 것은 40 μl에 17 mm, 80 μl에 26 mm로 나타나 본 실험의 배양 상층액이 Rosenberg의 배양 상층액보다 억제효과가 약간 떨어진 데 반하여, gel filtration한 것은 상당히 억제효과가 높은 것으로 나타났다.

분자량 추정에서 있어, de Barjac and Dedonder (1968), Bond et al. (1967) 및 Kim and Huang (1970)은 각각 730, 825 및 700-755로 추정하였는 바, 본 실험에서는 740으로 추정되어 그들의 결과와 상당한 유의도를 나타내었다.

β-외독소의 동정을 위하여 사용한 종이 전기영동법, HPLC에 의한 동정법, TLC에 의한 동정법등이 매우 정확한 방법임을 실증할 수 있었다.

요 약

Bacillus thuringiensis var. *thuringiensis*가 생산하는 extracellular thermostable β-exotoxin을 정제하였다. 정제단계로는 미세 여과법, Barium 침전, 목탄 흡수 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피 및 gel filtration을 통해 정제하였으며, 정제단계마다 외독소를 확인하기 위해 분광광도계 검정, TLC 및 HPLC를 사용하였고, 마지막 단계에서는 종이 전기영동법으로 외독소를 확인하였다. 배양액내에 있는 β-외독소의 specific activity는 1.302였으나 Barium 침전 및 목탄 흡수 크로마토그래피 단계에서 상당한 정제효과를 얻어 specific activity는 106.4였고 이온교환 크로마토그래피후에는 249.4였으며, gel filtration을 통해 더욱 정제되어 387.7까지 나타났다. H-

PLC 분석을 매단제마다 실시하여 분석한 결과 peak 수의 감소를 통해 외독소가 순수 정제되어감을 확인하였다.

독성효과시험으로써 *Micrococcus flava*의 성장이 얼마나 억제되는가를 조사해 본 결과, 배양액 자체만으로 100 μ l 당 19mm의 억제효과를 얻었으며 gel filtration 후에는 30mm였다. 정제되어 감에 따라 또한 양이 증가됨에 따라 식선적으로 억제효과가 증가하는 결과를 얻었다. 외독소 생산량도 배양액을 100%로 볼 때 gel filtration 후에는 0.10%였다. 또한 화학적 특성에 관한 연구로 열에 대한 안정성 시험에서 121°C 15 lb로 2 회 가압 멸균하여 독성효과시험을 실시해 본 결과 독성이 감소되지 않는 결과를 얻어내어 열안정성을 확인했으며, gel filtration을 통한 분자량 추정 결과 740으로 나타났다.

REFERENCES

1. Benz, G., 1966. On the chemical nature of the heat-stable exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Experientia* 22: 81-82.
2. Bond, R.P.M., C.B.C. Boyce and S.J. French, 1969. A purification and some properties of an insecticidal exotoxin from *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Biochem. J.* 114: 477-488.
3. Briggs, J.D., 1960. Reduction of adult housefly emergence by the effects of *Bacillus* spp. on the development of immature forms. *J. Insect Pathol.* 2: 418-432.
4. Bubenschikova, S.N., V.K. Kagramanova and L.A. Baratova, 1983. Determination of heat-stable exotoxin of *Bacillus thuringiensis* by high performance anion exchange chromatography. *J. Invertebrate Pathol.* 42: 344-347.
5. Burgerjon, A., G. Biache and Ph. Cals, 1969. Teratology of the colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, as provoked by larval administration of the thermostable toxin of *B. thuringiensis*. *J. Invertebrate Pathol.* 14: 274-278.
6. Cantwell, G.E., D.A. Knox and A.S. Michael, 1964 b. Mortality of honey bees *Apis mellifera* L., fed exotoxin of *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner. *J. Insect Pathol.* 6: 532-536.
7. Carlberg, G., 1973. Biological effects of the thermostable β -exotoxin produced by different serotypes of *Bacillus thuringiensis*. *Rep. Dept. Microbiol. Univ. Helsinki*.
8. Carlberg, G., 1972. Assay of the *Bacillus thuringiensis* β -exotoxin. Microbiological control of insects. Seminar in Helsinki 1971, 9: 1-8 IOBB and Department of microbiology, University of Helsinki.
9. Conner, R.M. and P.A. Hansen, 1967. Effects of valine, leucine and isoleucine of the growth of *Bacillus thuringiensis* and related bacteria. *J. Invertebrate Pathol.* 9: 12-18.
10. de Barjac, E. and R. Dedonder, 1968. Purification de la toxine thermostable de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* et analyses complementaires. *Bull. Soc. Chem. Biol.* 50: 941-944.
11. de Barjac, H. and R. Dedonder, 1965. Isolement d'un nucleotide identifiable a la "toxine thermostable" de *Bacillus thuringiensis* var. Berliner. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* 260: 7050-7053.
12. Dunn, P.H., 1960. Control of houseflies in bovine feces by a feed additive containing *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner. *J. Insect Pathol.* 2: 13-16.
13. Heimpel, A.M., 1967. A critical review of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner and other crystalliferous bacteria. *Ann. Rev. Entomol.* 12: 287.
14. Kim, Y.T. and H.T. Huang, 1970. The exotoxins of *Bacillus thuringiensis* I. Isolation and characterization. *J. Invertebrate Pathol.* 15: 100-108.
15. Krieg, N.R. and J.G. Holt, 1984. *Bergey's manual of systematic Bacteriology*, Williams & Wilkins, Baltimore.
16. Lam, A.B.Q. and J.M. Webster, 1972. Effect of the DD-136 Nematodes and of a β -exotoxin preparation of *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* on leather jackets, *Tipula paludosa* larvae. *J. Invertebrate Pathol.* 20: 141-149.
17. Lee, H.H. 1982. Effects of Exotoxin produced by *Bacillus thuringiensis*. on mice.
18. Lee, H.H. and K.S. Kim, 1983. Basic studies on the production of microbial pesticide,

- Bacillus thuringiensis*. Kor. *J. Appl. Microbiol.* **11**: 217-231.
19. Mohd-Salleh, M.B. and C.C. Beegle, 1980. Fermentation media and production of exotoxin by three varieties of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebrate Pathol.* **35**: 75-83.
 20. Rosenberg, G., G. Carlberg and H.G. Gyllenberg, 1971. Microbiological assay of the β -exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl. Bact.* **34**: 417-423.
 21. Sebesta, K., K. Horska and J. Vankova, 1967. Isolation, purification and toxicity of a thermostable exotoxin from the strain of *Bacillus gelechiae*. *Auct. Insect Pathology and Microbial Control.* **238-242**. North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
 22. Wolfenberger, D.A., A.A. Guerra, H.T. Dulmage and R.D. Careia, 1972. Properties of the β -exotoxin of *B. thuringiensis* IMC 10,001 against the tobacco budworm. *J. Econ. Ent.* **65**: 1245-1248.
 23. Wright, R.E., 1972. Fly control in barns and stables. Ontario Ministry of Agriculture and food.

(Received August 10, 1985)