

Bacillus thuringiensis kurstaki HD-1 유래 미생물살충제 생산을 위한 두부공업폐수의 이용

옥 민 · 김대진¹ · 이영춘 · 최용락 · 조영수*

동아대학교 생명자원과학부 · ¹식품과학부

Production of Microbial Pesticides by Soybean Curd Waste-water in *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1

Ok Min, Dae-Jin Kim¹, Young-Chun Lee, Yong-Lak Choi and Young-Su Cho*

Faculty of Natural Resource and Life Science · ¹Faculty of Food and Nutrition,
Dong-A University, Busan 604-714, Korea

Abstract

The waste-water from the industry for production of a soybean curd (the soybean curd waste-water) was investigated to use for the substrate to produce the endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 used as one of well known microbial pesticides. The pH of the soybean curd waste-water was 9.8 and its chemical oxygen demand (COD), total nitrogen (TN) and phosphate (TP) were 276.0, 71.1 and 5.5mg/ℓ, respectively. The higher was the concentration of the soybean curd waste-water in the medium, the more endotoxin was produced. Maximal sporulation occurred at which concentration of K₂HPO₄ in the medium supplied with the soybean curd waste-water was 1% (w/v). Production of the endotoxin with the optimized medium supplied with the soybean curd waste-water was 1.5 times higher than that without the soybean curd waste-water. The soybean curd waste-water was found to be suitable substrate for production of the endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1.

Key words – endotoxin, microbial pesticide, soybean curd waste-water, *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD-1

서 론

식품제조 공업과 물의 사용은 언제나 밀접한 관계가 있다. 이중 두부제조시 발생하는 두부공업폐수는 고농도 유기 폐수이기 때문에 무단 방류시 수질오염으로 인한 부영양화가 초래되어 환경적으로 여러 가지 문제점이 야기될 가능성이

이 있다. 하지만, 두부제조공업폐수의 특징으로는 고분자물질의 함량이 높아 저분자물질로 용이하게 분해될 수 있으며 유기태 질소원 및 칼륨, 인등의 무기염류원을 많이 함유하고 있고, 화학적 유해 독성물질을 함유하고 있지 않아서 미생물공업용 대체기질로 이용할 수 있는 특성을 지니고 있다 [5]. 현재, 두부공업폐수는 우수한 유기물원으로서의 인지도는 주환경오염원으로 취급되어지고 있으며, 두부공업폐수를 대량정화처리하기 위해 고가의 처리비용이 지출되고 있는 실정이다.

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 82-51-200-7586, Fax : 82-51-200-7505
E-mail : choys@mail.donga.ac.kr

생물농약은 미생물제제가 주류를 이루고 있으며, 그 중에서도 *Bacillus thuringiensis*를 이용한 살충제가 그 핵심을 이루고 있다[1,12,8,6,10]. Gram양성세균인 *Bacillus thuringiensis*는 포자를 형성하는 시기에 결정성단백질을 생성하는데[4, 11,3], 이 결정성 단백질의 생성량과 살충력이 *Bacillus thuringiensis*제제의 성능을 좌우하게 된다[4,11]. *Bacillus thuringiensis*가 생성하는 살충성결정단백질의 양과 질은 균주에 따라 달라질 수 있겠지만, 배양조건과 배지조성을 달리하여 *Bacillus thuringiensis*의 세포밀도와 포자형성률을 증가시킬 수 있기 때문에 *Bacillus thuringiensis*의 양분요구특성을 조사하여 포자형성과 살충성 결정단백질의 생성을 조절할 수 있다[3,6,7,12,2]. 북미를 중심으로 *Bacillus thuringiensis*제제가 상업화되면서 전세계적으로 그 사용량이 크게 증가되었고, 우리나라에서도 1989년 처음 *Bacillus thuringiensis*제제가 도입된 이래 매년 그 사용량이 증가되고 있으나, 아직 미생물살충제의 가격이 높게 형성되어 실제 농가에서는 사용이 국한되어 있는 실정이며, 저가의 우수한 미생물의 살충제 개발로 수질오염 방지 및 자원이용측면에서 그 필요성이 더해지고 있는 실정이다.

따라서, 본 연구는 두부제조공업에서 다량 발생하는 유기폐수를 자원화하기 위한 연구의 일부분으로 *Bacillus thuringiensis*를 두부공업폐수에 접종하여 고폠포자형성능을 확인하여 대량생산에 관한 연구를 수행하기 위한 기초적인 기반을 확립하여 식품산업폐자원을 이용하여 환경오염중 수질오염원을 차단하고 고부가가치 미생물살충제 개발의 타당성을 검토하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

Bacillus thuringiensis kurstaki HD-1를 동아대학교 천연물유전공학연구실로부터 분양 받아 계대배양 후 사용하였고, GYS배지를 적당히 변형시킨 후 고포자생성배지 및 종배양용배지로 사용하였다. 균주보존용배지는 agar를 1.5% 함유한 NA배지를 사용하였다.

폐수 및 분석

본 실험에 사용한 폐수는 부산 서구 소재 K사의 두부공장폐수로 4℃ 이하에서 보관하면서 사용하였다. 분석중 일반성분의 분석은 상법으로 측정하였다. 폐수내에 존재하는 총

질소와 인은 시료를 persulfate방법에 따라 질소 또는 인을 질산염과 인산염으로 산화시킨 후 수행하였다. 즉, 시료 4ml에 0.67% potassium persulfate용액(0.30% NaOH 첨가) 6ml을 가하고 autoclave를 이용하여 120℃에서 30분간 가열하여 완전히 산화시켰다. 산화된 시료에 0.3N HCl 0.6ml을 가하여 혼합한 후 완충용액(3.0% boric acid, 2.0N NaOH) 0.8ml과 증류수 8.6ml을 가하여 과황산염으로 산화 처리하여, 시료내 인산염과 질소를 정인산염(PO_4^{3-})과 질산염의 형태로 변화시켰다. 정인산염은 시료를 phosphomolybdate로 발색시킨 후 5cm light path의 cuvette로 885 nm에서 분광광도계로 흡광도를 측정하여 정량하였고, 질산염은 Szechrome NB시약(Polyscience Inc., U.S.A)을 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 미네랄 분석, Ca, Mg, K, Na, Fe는 dry ash 법으로 시료를 회분처리 후 6N HCl 10ml를 가하여 수욕 상에서 완전히 증발 건조시켜, 이 건조물에 3N HCl 10ml를 가하고 수분간 가열 후 여과하여 100ml 메스플라스크에 정용한 후 원소분석기(AAnalyst 300, Perkin Elmer, U.S.A)로 측정하였다.

배양방법

500ml flask에 NB 배지 50ml를 넣은 후 24시간 동안 전배양한 배양액을 두부공업폐수를 증류수와 적당히 희석한 배양배지에 각각 5ml씩 접종하여, 30℃에서 180 rpm으로 4일 동안 배양한 후 세균밀도 조사와 포자형성능을 각각 비교하였다.

포자형성능

배양액을 90℃에서 10분동안 열처리하고 적당히 희석한 후 NA배지에 도말후 30℃에서 24시간 배양시킨 후 나타나는 집락수를 colony counter method로 계산하였다.

무기염의 첨가에 따른 포자형성능 확인

인산염 농도를 달리하여 두부공업폐수에 농도별 첨가에 따라 포자형성능을 확인하기 위해 K_2HPO_4 를 농도별로 첨가하여 30℃에서 180 rpm으로 교반하여 4일동안 배양한 후 630 nm에서 흡광도와 포자형성능을 확인하였고, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 GYS배지를 기초로 하여 농도별로 두부폐수원액에 첨가하여 30℃에서 180 rpm으로 교반하여 4일동안 배양한 후 630 nm에서 흡광도와 포자형성능을 각각 확인하였다.

결과 및 고찰

폐수의 성상

고농도 유기폐수의 하나인 두부공업폐수를 이용하여 *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD-1이 생산하는 미생물살충제의 생산 배지로 사용하기 위하여 산업용 배지로서의 적합성을 확인하기 위해 부산시 서구에 있는 K사에서 정화처리시설 유입 직전의 폐수를 수급하여 성상을 검토하였다.

본 실험에 사용한 K사의 두부공업폐수를 분석한 결과는 Table 1과 같았다. pH는 9.86으로 강한 알칼리성이며, 화학적 산소요구량(COD) 276mg/ℓ, 전질소량 71.1mg/ℓ, 전인량은 5.52mg/ℓ 이었고, 주요 미네랄은 나트륨이 비교적 많이 함유되어 있었고, 칼륨, 마그네슘 순이었다. 이러한 성분들은 두부의 주원료인 콩과 두부응고 시에 사용하는 단백질 응고제에서 유래된 것으로 생각되어진다. 여기서 두부공업폐수 내 함유되어 있는 유기 물질과 미네랄 성분을 이용하여 유용미생물의 생육에 적합한 배지로 이용 가능하다면 수질오염원 차단과 아울러 유용미생물 생산에 이용할 수 있는 산업용 배지로서 이용 가능케 함으로서 수질정화 및 산업적 이용 양측에서 유익할 것으로 생각되어진다.

포자형성능

두부공업폐수를 배지원으로 사용하기 위하여 폐수원액, 70%, 50%, 30%로 희석하여 *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD-1을 접종하고 대조구로 nutrient broth배지를 이용하여 포자형성능을 관찰하였다. 동일 접종량으로 균을 접종하고 30℃에서 180 rpm의 교반속도로하여 4일 동안 배양한 후 포자형성능을 관찰한 결과, 농도별로 희석 시킨구보다 두부폐수

원액을 그대로 이용한 구에서 4.7×10^6 cfu/ml로 가장 높은 포자형성능을 나타내었고, 폐수의 농도별 함량비에 따라 비례적으로 포자형성능을 나타내어, 두부폐수 중에 함유된 유기 및 미네랄성분을 충분히 *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD-1균이 생육에 이용하고 있음을 알 수 있었다(Fig. 1). 또한, 두부공업폐수 원액 그대로 이용했을 때와 pH 6.8로 조정 후 배양하였을 경우 pH를 조정하지 않았을 때 더 높은 포자형성능을 나타냄으로서 두부제조시 발생하는 폐수를 일정한 처리의 과정을 거치지 않고 그대로 미생물 배양배지로 재이용할 수 있는 가능성을 확인하였다.

두부폐수에서 인산의 첨가효과

Bacillus thuringiensis kurstaki HD-1균 생산배지로 사용할 대상폐수에 인산을 첨가함으로써 이 균이 생산하는 살충성 단백질의 생산성에 미치는 영향을 실험하기 위하여 인산원인 K_2HPO_4 를 0~1% 범위내에서 단계적으로 첨가하여 생성되는 포자수를 확인하여 살충성단백질의 생산성을 확인한 결과, K_2HPO_4 0.5%를 첨가 하였을 때 균체의 성장이 가장 높았으며, 포자형성능은 1% 첨가구에서 2.9×10^6 cfu/ml로 가장 높게 나타 났다(Table 2). 이는 무첨가 대조구에서의 1.3×10^6 cfu/ml보다 약 2배 가량 높은 포자형성능을 나타내었으며, K_2HPO_4 첨가량이 많을수록 포자형성능이 높아짐을 확인하였으며, 대상폐수를 이용한 미생물살충제의 생산

Table 1. Content analyses of soybean curd wastewater from K coporation

pH	9.86
COD	276 mg/l
Total nitrogen	71.1 mg/l
Total phosphate	5.52 mg/l
Ca	0.19 ppm
Fe	0.35 ppm
K	3.61 ppm
Mg	3.60 ppm
Na	18.50 ppm

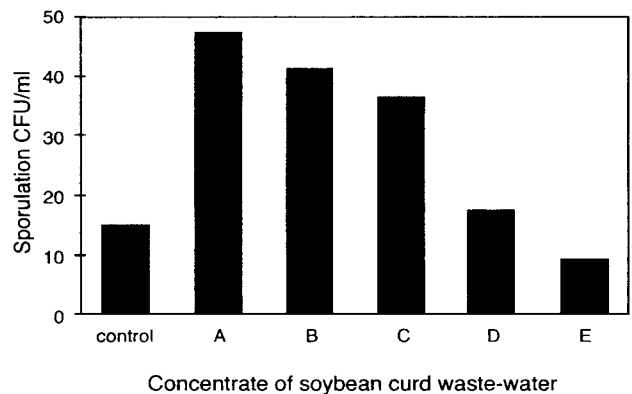


Fig. 1. Effect of soybean curd waste-water on the sporulation of *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 at harvest in liquid culture.

A: no treatment soybean curd waste-water. B: soybean curd waste-water adjusted at pH6.8. C: 75% dilution D: 50% dilution E: 25% dilution, Control: used NB medium *CFU/ml: colony forming unit, 1×10^6

Table 2. Cell mass and endospore of *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 after 3 days culture at various K_2HPO_4 concentrations

	OD (630 nm)	Endospore count (1×10^6)
0%	2.2847	45
0.1%	2.3615	39
0.3%	2.4735	58
0.5%	2.5172	67
0.7%	2.4835	74
1.0%	2.4999	83

에 있어서 인산의 첨가가 *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD-1 균의 포자형성능을 높힐 수 있음이 확인 되었다.

두부폐수에서 황산마그네슘의 첨가효과

Bacillus thuringiensis kurstaki HD-1균 생산배지로 사용할 대상폐수에 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 0.1~0.5% 농도별로 첨가 하였을 때 생성되는 포자수를 확인하여 이 균이생산하는 살충성단백질의 생산성을 확인하였다. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 농도별로 첨가하였을 때 균체의 성장과 포자형성은 농도 간에는 유의적 차이를 나타나지 않았다. 이는 두부폐수내 마그네슘 함량을 분석한 결과 그 함량이 이미 3.6 ppm이상 함유되어 있어 황산마그네슘 첨가에 의한 포자 생성에는 그 효과를 나타내지 못한 것으로 생각되어진다(Table 3).

배양시간별 포자형성능 비교

Bacillus thuringiensis kurstaki HD-1균의 배양시간별 포자형성능을 확인하기 위하여 *Bacillus thuringiensis*균의 일반최적배지조건(pH 7.0, 7g K_2HPO_4 , 2g KH_2PO_4 , 0.5g $C_6H_5Na_3O_7$

Table 3. Cell mass and endospore of *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 after 3 days culture at various $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ concentrations

	OD (630 nm)	Endospore count (1×10^5)
0.1%	2.2907	41
0.2%	2.2340	38
0.3%	2.2762	38
0.4%	2.4369	43
0.5%	2.4290	51

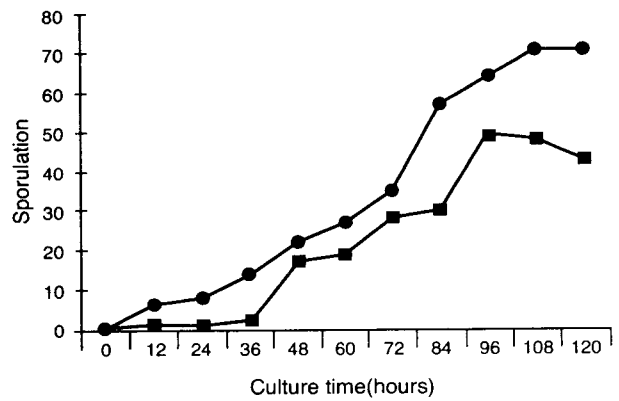


Fig. 2. Additive effect of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ and K_2HPO_4 on the sporulation of *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 at harvest in liquid culture.

(—●—; Optimal medium, —■—; No treatment)

$\cdot 2H_2O$, 0.1g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, yeast extract per 1 liter)과 두부폐수에 1% K_2HPO_4 첨가구를 이용하여 0~120시간 동안 배양한 결과, 일반최적배지조건에서는 96시간대에 최대 포자수인 5.0×10^7 cfu/ml이었고, K_2HPO_4 를 첨가한 두부폐수는 108시간대에 7.0×10^7 cfu/ml을 나타내었다. 일반최적배지에 1% K_2HPO_4 첨가된 두부폐수에서 배양시간에 따른 포자형성능은 일정한 시간까지는 비례적으로 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 2).

요 약

*Bacillus thuringiensis*를 이용한 미생물 살충제를 생산할 목적으로 두부폐수를 이용하여 내생포자 생산능을 검토하였다. 실험에 사용한 두부폐수원액의 성상은 pH 9.8, COD 276 mg/ℓ, 전질소량 71.1mg/ℓ, 전인량 5.52mg/ℓ이며 *Bacillus thuringiensis*균을 대량배양하기 위한 기질로서의 이용 가능성을 확인한 결과, 두부폐수원액에서 가장 높은 포자형성능이 관찰 되었으며, 두부폐수원액의 첨가량이 작을수록 포자형성은 감소 하는 경향을 나타내었다. 최대 포자형성능은 1% K_2HPO_4 첨가때 가장 높은 포자형성능을 나타내었다. 두부공업폐수를 이용한 *Bacillus thuringiensis*의 최적배지 조건에서 시간별 포자형성능을 확인한 결과, 동일 시간당 1.5배 높은 포자형성능이 확인되었다. 두부폐수는 *Bacillus thuringiensis*를 생산하기 위한 적당한 배양기질로서 이용될 수 있을 것으로 생각되어 진다.

감사의 글

1999년도 동아대학교 교비 (특정목적) 연구비지원에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

1. Aronson, A. I., W. Bexkman and P. Dunu. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* **50**, 1-24.
2. Bigoff, M. H. and A. A. Yousten. 1969. *Bacillus thuringiensis*: Microcobiological 1532 considerations. *Ann. Rev. Microbiol.* **23**, 357-386.
3. Bulla, L. A. Jr., A. W. Nickerson, T. L. Mounts, and J. J. Iandole (1985) In spores IV. p. 520, *Am. Soc. Microbiol.* Washington, D.C.
4. Bulla, L. A. Jr., D. B. Bechtel, K. J. Kramer and Y. I. Shethra. 1980. Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* **7**, 147-204.
5. Cheong, D. Y., Y. M. Chio., H. Y. Cho and H. C. Yang. 1997. Production of δ -aminolevulinic acid in soybean curd wastewater by *Rhodobacter capsulatus* KK-10. *Agriculture Chemistry and Biotechnology* **40**, 556-560.
6. Dulmage, H.T. 1970. Production of spore-delta-endotoxin complex by variants of *Bacillus thuringiensis* in two fermentation media. *J. Invertebr. Pathol.* **16**, 385-389.
7. Dulmage, H. T. 1971. Production of delta-endotoxin by eighteen isolates of *Bacillus thuringiensis* serotype 3 in 3 fermentation media. *J. Invertebr. Pathol.* **18**, 353-389.
8. Feitelson, J. S., J. Payne and L. Kim. 1992 *Bacillus thuringiensis*: Insect and beyond. *Biotechnology* **10**, 271-275.
9. Hofte, H. and H. R. Whiteley. 1989 Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* **53**, 242-255.
10. Kang, B. C., S. Y. Lee and H. N. Chang. 1992 Enhanced spore production of *Bacillus thuringiensis* by fed-batch culture. *Biotechnol. Lett.* **14**, 721-726.
11. Meadows, J., S. S. Gill and L. W. Bone. 1990. *Bacillus thuringiensis* strains affect population growth of the free-living nematode *Turbatrix aceti*. *Invert. Repod. Develop.* **17**, 75-76.
12. Rajalakshmi, S. and Y. I. Shethna. 1980. Spore and crystal formation in *Bacillus thuringiensis* during growth in cystine and cysteine. *J. Biosci.* **2**, 321-328.

(Received June 5, 2002; Accepted June 20, 2002)