

세라믹 필터를 장착한 생물반응기에서 *Bacillus thuringiensis*의 성장 특성 모델링

강병철, 장호남*

동의대학교 화학공학과, 한국과학기술원 화학공학과*

전화 (051) 890-1702, FAX (051) 890-1619

Abstract

Bacillus thuringiensis (Bt) is the most widely used microbial insecticide in the biological control market. Cultivation of the microorganism to high cell densities offers potential for enhancing the rate of formation as well as the concentration of the desired products in the fermentation broths in bioreactor. With this objective, we developed the new bioreactor incorporating ceramic membrane module for the retention of cell mass. Cell yield and spore formation of *Bacillus thuringiensis* was improved markedly by adopting this new bioreactor based on glucose -limited feeding operation. It was possible to grow the cell and the heat-resistant spore to above 1.2×10^{10} CFU/ml density. With glucose-limited operation, we studied the growth behavior of *Bacillus thuringiensis* during the cell retention culture. Linear growth of *Bacillus thuringiensis* was observed under glucose-limited culture, which matched well with simple mathematical model of cell retention culture.

서론

Bacillus thuringiensis (Bt) 는 생물학적 방법에 의한 살충제 시장에서 가장 널리 사용되고 있는 미생물 살충제이다. 실제적으로 경제적으로 생산되기 위해서는 생물 반응기에서 고농도의 세포배양이 필수적이다.³⁾ 지금까지의 대부분의 연구는 회분식 배양이나 유가식배양으로 고농도 bt생산에 집중되어 왔다. 또 다른 고농도 세포배양 방법으로 막(membrane)을 이용한 재순환 생물반응기를 사용하는 것이다.¹⁾ 이것은 주로 막모듈이 반응기의 외부에 장착됨으로써 배양액은 막을 통해 여과되어 나가고 세포는 재순환되는 과정을 거치면서 고농도 세포배양이 가능하게 된다. 이것은 주로 유기산이나 에탄올 같은 생산물저해를 받은 세포배양이나 빵효모나 SCP같은 세포자체가 생산물이 되는 분야에 널리 연구되었다.

본 연구진은 세라믹 막을 반응기 내부에 장착한 새로운 형태의 생물반응기에서

bt의 고농도 배양을 달성할 수 있었다. 본 연구는 이러한 결과를 바탕으로 간단한 수학적 모델링을 통해서 이와 같이 새로운 형태의 반응기에서 bt의 세포성장과 포자형성의 특성을 비교해 보고자 한다.

재료 및 방법

본 연구에 사용된 미생물은 *Bacillus thuringiensis* HD-1 (ATCC 33679) 였다. 세포는 nutrient agar plate (0.8% nutrient broth, + 2.0% bacto agar)에서 4 °C에서 보관하였다. 플라스크배양은 GYS배지를 사용하였으며 배지의 pH는 2N KOH로 7.0으로 하였다. 세포수의 측정은 배양액을 희석하여 pour plate방법으로 nutrient agar plate에서 실시하였고 48시간 후 colony를 측정하였다. 세포 수는 3반복의 평균을 낸 것이다.

세라믹 막 모듈의 구조 및 본 연구에 사용된 생물반응기의 구조는 Kang등에 의해 보고되었다.²⁾ 세포를 전혀 반응기 밖으로 빼내 주지 않는 total cell retention culture (TCRC)는 다음과 같이 실시하였다. 우선 회분식 배양으로 세포가 지수성장기에 접어드는 5시간동안 배양한 후 신선한 배지를 공급하고 배양액의 여액을 계속적으로 빼내 주는 TCRC를 실시하였다. 배지의 공급속도와 여액의 배출속도는 배양액의 부피의 변화가 없게 일정하게 유지하였고 희석속도를 0.11 h^{-1} 또는 0.17 h^{-1} 로 하였다.

포도당 제한 상태 하에서 TCRC조업에서 bt의 세포성장 특성은 간단한 비구조적 모델링으로 하였다.⁵⁾ TCRC 조업에서 반응기 주변에 대한 수지(balance) 식은 다음과 같다.

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (1)$$

$$\frac{ds}{dt} = D(s_i - s) - \frac{\mu x}{Y} \quad (2)$$

여기서 x 는 세포농도, s 는 포도당 농도, μ 는 비성장속도 그리고 Y 는 포도당에 대한 세포수율을 나타낸다.

포도당 제한 상태에서는 $ds/dt = 0$ 와 $s=0$ 가 되는 가(pseudo) 정상상태가 된다. 따라서 (2)식은 다음과 같이 되고

$$\mu x = YD s_i$$

이것을 (1)식에 대입하면 다음과 같이 된다.

$$\frac{dx}{dt} = YD s_i$$

$$x = x_0 + YD s_i \quad (3)$$

즉 세포수의 증가는 포도당 제한 상태에서는 선형적으로 증가하는 특성으로 나타난다.

결과 및 고찰

TCRC 조업에서 공급되는 포도당 농도를 달리하면서 세포성장의 특성에 대한 영향을 조사하였다. 본 연구에서 공급되는 배지의 포도당 농도는 1 g/l, 10 g/l, 25 g/l, 50 g/l로 하였다. Fig. 1에서와 같이 모든 포도당의 농도에 대해 bt의 성장 특성은 선형임을 알 수 있다. 이것은 제시된 간단한 비구조적 모델과 잘 일치됨을 알 수 있다. 이것은 포도당이 제한됨으로써 기인하는 것이다.

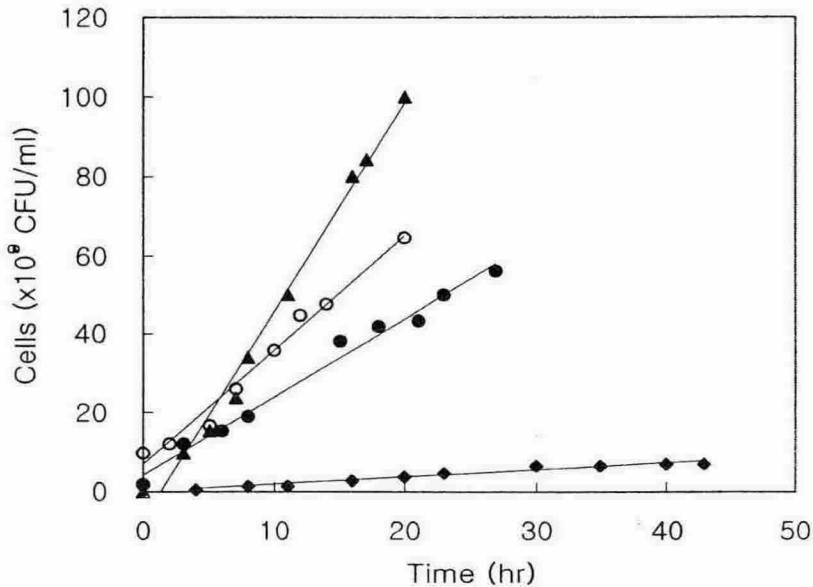


Figure 1. Time course of cells during TCRC operation. Lines indicate the modeling results. Symbols: feeding glucose concentration, (◆) 1g/l; (●) 10g/l; (○) 25 g/l; (▲) 50g/l.

TCRC에서 bt가 선형성장의 특성을 보이는 사실은 발효과정 동안 세포의 비성장 속도(specific growth rate)가 계속적으로 감소한다는 사실을 의미한다. Pearson과 Ward는 연속배양에서 비성장속도가 낮을수록 포자형성과 toxin의 양은 비례적으로

증가한다고 보고하였다.⁴⁾ 본 연구에서는 포도당 농도를 1 g/l로 했을 때만 세포성장 과정에서 포자형성이 관찰되었지만 다른 포도당 공급 농도에서는 포자형성을 TCRC 조업 중에는 관찰할 수 없었다. 이것은 연속배양과 TCRC조업의 전혀 다른 특성에서 기인된 것이다. 즉 연속배양에서는 정상상태(steady-state)에서 조업되는 것이고 TCRC에서는 세포가 배출되지 않고 계속적으로 반응기 내부에 retention되는 비정상상태 하에서의 운전이다. 세포 생리적인 면에서 전혀 다른 특성을 나타낼 것으로 기대할 수 있다. 포도당 농도를 50 g/l로 공급하였을 때 TCRC조업후의 최대 세포농도는 1.7×10^{10} CFU/ml이었고 이것을 다시 회분식으로 조업했을 때 1.6×10^{10} CFU/ml의 포자를 얻을 수 있었다.

요약

Bacillus thuringiensis (bt)는 생물학적 살충제 시장에서 가장 널리 사용되는 미생물 살충제이다. Bt의 고농도로 세포배양을 하면 생물반응기에서 원하는 생산물의 농도를 이룰 수 있을 뿐만 아니라 생산물의 생성속도도 이룰 수 있다. 이런 목적 하에서 우리는 세라믹 막 모듈을 반응기 내부에 장착한 새로운 형태의 생물반응기를 개발하였다. 이 새로운 형태의 생물반응기에서 포도당 제한 상태하의 운전을 통해서 bt의 세포와 포자 수율을 현저하게 증가시킬 수 있었다. 최대로 1.2×10^{10} CFU/ml의 포자 수율을 달성할 수 있었다. 세라믹 막 모듈 생물반응기에서 포도당 제한 상태 하에서 bt의 성장특성을 연구하였다. 포도당 제한 상태에서는 세포의 성장은 선형 (linear) 성장특성을 보였는데 이것은 간단한 비구조적 수학적 모델의 결과와 잘 일치하였다.

참고문헌

1. Chang, H. N. and S. Furusaki, *Adv. Biochem. Eng.*, **44**, 27-64 (1991)
2. Kang, B. C., S. Y. Lee and H. N. Chang, *Biotechnol. Bioeng.*, **42**, 1107-1112 (1993)
3. Liu, W. M., R. Bajpai, and V. Bihari, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **721**, 310-325 (1994)
4. Pearson, D. and P.O. Ward, *Biotechnol. Lett.*, **2**, 451-456 (1988)
5. Pirt, S. J. and W. M. Kurowski, *J. Gen. Microbiol.*, **63**, 357-366 (1970)