

High cell density cultivation of *Bacillus* sp.

이백석, 채원복, 조재희, 최기현*, 김영범*, 최성원*, 김은기
 인하대학교 생물공학과 생물환경소재실, (주) 그린바이오텍*
 전화 (032) 860-7514, FAX (032) 875-0827

Abstract

In this study, media optimization by statistically designed experiments stimulated an increase in cell growth of *Bacillus* sp. during batch cultivation. Plackett-Burman design method selected 3 components among 7 components of production medium. Box-Behnken design method calculated the optimum concentration of selected components by Plackett-Burman design. In the optimized medium, viable cell number increased 2 times. Addition of antifoam effected the cell growth depending on the type of antifoam. Vegetable oil, are a carbon source and an antifoam, increased cell growth and controlled foaming

1. 서 론

가축의 생산성을 향상시키기 위한 방법으로는 항생물질, 성장 호르몬제, 항균제 및 활성제 등을 이용하는 방법이 있다. 화학적으로 합성된 항생물질 등의 사용은 축산물내 잔류문제와 병원균의 내성증가 등의 문제가 있어 최근에는 미생물을 이용한 생균제, 효소제, 효모제 등의 활성제를 사료배합에 이용하고 있다.

미생물 사료는 사료 첨가제로 사용되는 형태이며 항생제와 생균제의 역할을 하고 있다.

생균제는 보통 장내 세균총의 변화를 유도하고 대장균을 감소시키며, 병원성 미생물이 소화관 장벽에 부착 정주하여 집락을 형성하는 것을 방지하여¹⁾ 가축에게 공급시 성장촉진과 사료효율의 개선효과가 있다.

또한 미생물로부터 생산된 항생제의 첨가는 병원성 미생물의 감염을 예방하기 위해 사용하기도 하지만 사료의 소화율을 향상 시킴으로써 사료 효율과 증체량을 증가시키는 효과도 있다. 이런 생균제와 항생제를 비교해 보면 생균제의 첨가는 항생제와 같은 목적으로 첨가되지만 작용방식이 조금 다르다. 항생제는 장내 균을 모두 사멸시키지만 생균제는 장내 균총을 유익한 균으로 바꿔 병원성 균의 증식을 억제한다.

효소제는 양계사료나 돼지사료에 이용되는 밀, 보리, 귀리 등의 곡류사료가 섬유소 함량이 높아 소화기관내에서의 이용성이 떨어지기 때문에 glucanase, pectinase, amylase, 등의 효소를 첨가함으로써 비전분성 탄수화물의 이용성을 향상시킬 수 있어 소화율 향상과 가축의 생산성이 개선된다²⁾.

여러 종의 *Bacillus* 는 미생물 농약이나 이런 사료의 원료로 많이 사용되고 있다. 산업화에 이용되는 *Bacillus* sp.는 장기간의 보존을 위해 포자로의 전환이 필수적이고, 경제성을 고려할 때 고농도 배양이 요구된다. 따라서 *Bacillus* sp.가 산업화에 이용되기 위해서는 대량 생산을 위한 최적 배지 조성의 확립과 손쉬운 배양 조건이 필요하다. *Bacillus* sp.의 고농도

배양을 위해 종진에는 'one factor at a time'의 방법으로 많이 이용하였지만 이 방법은 많은 시간의 소비에 비해 큰 효율을 기대하지 못한다. 따라서 실험인자 상호간의 관계와 높은 효율을 기대할 수 있는 여러 통계학적 실험 방법이 응용되고 있다.

따라서 본 연구는 *Bacillus* sp.의 고농도 배양을 위해 통계학적 실험 방법 중 PBD(Plackett-Burman experimental design)³⁾와 BBD(Box-Behnken experimental design)⁴⁾를 병행하여 최적 배지 조성을 구하였고 scale up시 문제가 되는 foam control에 대해서도 연구를 병행하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 사용 균주 및 배양 조건

본 실험에 사용한 균주는 *Bacillus* sp.중 *B. coagulans*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis* 의 5가지 균주를 사용하였고 배양에 LB배지를 사용하였다. 이를 30 mL test tube에 working volume 10 mL로 전배양후 생산 배지에 본 배양을 하였다. 배양 조건은 진탕 배양기에서 250rpm, 30℃(*Bacillus coagulans*, 37℃)로 10~12시간 배양하였다. 균체량은 배양후 생균수 측정법을 사용하였다.

2.2 최적 배지 선정

최적 배지 조성을 구하기 위해 PBD와 BBD를 병행하여 사용하였다. 먼저 PBD에서 *Bacillus* sp.의 성장에 큰 영향을 주는 factor 3개를 선정하였다. 선정된 각각의 factor를 "one factor at a time" method⁵⁾를 이용하여 최적 농도 범위를 구하였고, 다시 BBD를 실행하여 Minitab (Window version 10.5, Minitab. Co., PA, USA)으로 최적 농도를 계산하였다.

2.3 Antifoam test

Antifoam test는 대표적으로 사용되는 antifoam 204와 LS-300으로 농도를 달리하여 *Bacillus* sp.의 성장에 어떠한 영향을 주는지 알아보았다⁶⁾. 또한 vegetable oil이 가격이 비싼 soluble starch를 대신할 수 있는 탄소원으로 사용 및 foam control이 가능하므로 7가지 vegetable oil (soybean oil, safflower seed oil, sunflower seed oil, olive oil, corn oil, rape seed oil)을 탄소원 대신 사용하여 성장시 영향과 foam control을 함께 확인하였다.

2.4 Fermentation

*Bacillus coagulans*의 최적 배지를 이용하여 2.5 L jar fermenter에서 배양을 하기 위해 먼저 산소의 영향 test를 해 보았다. 산소 요구도를 측정하기 위해 250 mL flask에서 working volume을 달리하여 배양하였고 초기 pH는 3, 5, 7, 9, 11로 보정한 후 세포 성장에 대한 영향을 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1 최적 배지 선정

PBD와 BBD를 병행하여 *Bacillus* sp. 5가지의 최적 배지를 선정하였다. Fig. 1에서 보듯이 양성 효과를 나타내는 3개의 성분을 선택하였고 3개의 main factor에 대한 최적 성분 range를 알아보았다. 그 최적 성분 범위를 +, 0, - 로 나누어 BBD를 실행하여 최적 배지 조성을 구하였다.

3-2 Antifoam test

Fig. 2으로 antifoam 204와 LS-300이 고농도 첨가시 균의 생장에 영향이 있음을 알 수 있었다. Fig. 3는 탄소원으로 vegetable oil를 사용했을 때 vegetable oil은 세포 성장에도 좋은 영향을 주며 foam control도 가능하다는 사실을 알 수 있었다

3-3 Fermentation

*Bacillus coagulans*의 scale-up시 산소의 영향을 알아보기 위한 실험결과 초기 volum이 20 mL일때 높은 성장을 보였다. 따라서 이 균주는 산소의 영향을 많이 받음을 알 수 있었다. 또한 초기 pH를 달리 하여 균의 성장을 확인한 결과 pH 7에서 가장 좋은 결과를 보였다. Fig. 4에서는 2.5 L jar fermenter에서 pH와 DO control 없이 배양한 결과이며, Fig. 5에서는 pH와 DO를 control한 결과를 나타냈다. pH와 DO를 control 한 결과 2배정도의 균체량 증가를 볼 수 있었다.

4. 요약

본 연구는 *Bacillus* sp.의 고농도 생산을 위한 최적배지 조건의 확립과 배양중 발생하는 foam control에 대해 알아 보았다. PBD와 "one factor at a time", BBD로 이어지는 배지 최적화 과정을 통해 최초 생산 배지에서의 균체량보다 100% 이상의 향상된 균체량을 볼 수 있었다. 또한 scale-up 과정에서 발생하는 foam control을 위해 각기 다른 type의 antifoam 을 사용하였는데, 적당한 농도에서 좋은 성장을 보이고 있었고, vegetable oil은 foam control과 값비싼 탄소원인 soluble starch을 대신할 수 있는 좋은 기질임을 알 수 있었다. 또한 배양액 내의 산소를 잡고 있으면서 좋은 전달자의 역할을 하여 급격한 DO의 감소를 막아주었다.

5. 참고문헌

- [1] Fuller, R. and B. E. Brooker. . Lactobacilli which attach to the crop epithelium of the fowl (1974). Amer. J. Clin. Nutr. 27:1305.
- [2] Bedford, M. R., Patience, J. F., Classen, H. L. and Inborr, J. The effect of dietary enzyme supplementation of rye-and barley-based diet on digestion and subsequent performance in weanling pigs (1992). Can. J. Anim. Sci. 72:97.
- [3] Philippe Jacques, Choukri Hbid, Jacqueline Destin, Hary Razafindralambo, Michel Paquot, Edwin de Pauw and Philippe Thonart. Optimization of biosurfactant lipopeptide production from *Bacillus subtilis* S499 by Plackett-Burman design (1999). Appl. Biochem. Biotech. 77. 223-233.
- [4] Park K. M., Reardon K. F. Mwdium optimization for recombinant protein production by *Bacillus subtilis* (1996). Biotech. Lett. 18, 6, 737-740.
- [5] Pham. P. L., P. Taillandier, M. Delmas and P. Strehaiano. Optimization of a culture medium for xylanase production by *Bacillus* sp. using statistical experimental design (1998). World J. Microbio. Biotech. 14, 185-191.
- [6] Koch V., Ruffer H. M., Schugerl K., Innertsberger E., Menzel H. & Weis J.

Effect of antifoam agents on the medium and microbial cell properties and process performance in small and large reactors (1995). Process Biochem. 30, 5, 435-446.

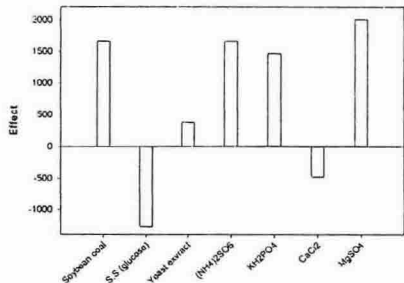


Fig.1 PBD of *Bacillus coagulans* viable cell counting after 12 hr culture

Table 1. Three factor Box-Behnken design for the medium optimization study.

Run	Component	Soybean meal	(NH ₄) ₂ SO ₄	MgSO ₄
1		+	0	+
2		-	0	+
3		+	0	-
4		-	0	-
5		0	+	+
6		0	-	+
7		0	+	-
8		0	-	-
9		+	+	0
10		+	-	0
11		-	+	0
12		-	-	0
13		0	0	0
14		0	0	0
15		0	0	0

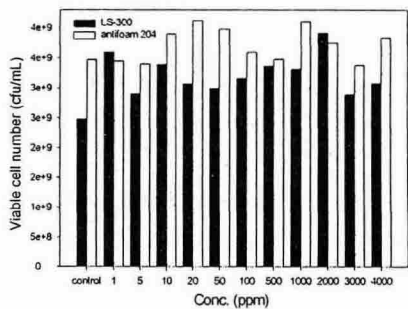


Fig. 2 Effect of antifoam on cell growth after 12 hr
 □: antifoam 204, ■: LS-300

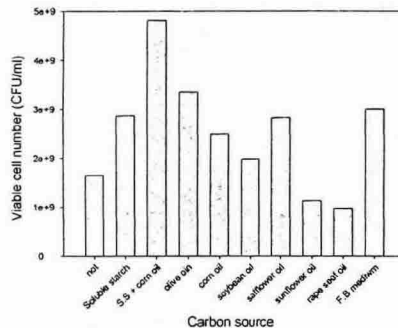


Fig. 3 Carbon source test of *B. coagulans*

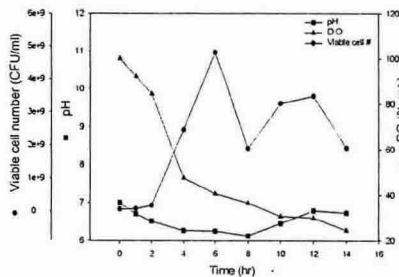


Fig. 6 Batch culture results in 2.5 L fermenter. (without pH and DO control)

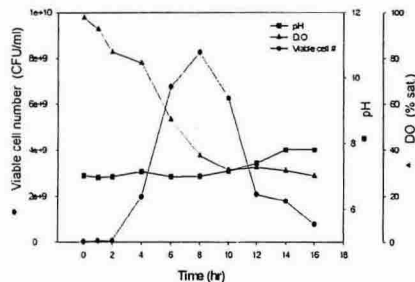


Fig. 7 Batch culture results in 2.5 L fermenter. (pH and DO control)