

대장균 배양에서의 유기산 생성과 투석배양에 관한 연구

김 인 호
충남대학교 화학공학과

A Study of Organic Acid Formation and Dialysis Culture in *E. coli* Fermentation

In Ho Kim

Department of Chemical Engineering
Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea

ABSTRACT

In order to elucidate the effect of acetate ion on the growth of *Escherichia coli*, flask and fermentor cultures were performed using M9 and LB media. Acetic acid was secreted at a higher rate under the conditions of high glucose concentration as well as of richer medium, i. e., LB broth. The pH in flask culture could not be controlled as in fermentor and pH decreased with the formation of acetic acid. The inhibition effect of acetic acid was pronounced at a lower pH, and the effective inhibitory concentrations of acetic acid were 2.0g/ℓ for LB flask culture, 4.0g/ℓ for M9 flask culture, and 8.0g/ℓ for M9 fermentor culture.

Dialysis flask culture was designed to slowly provide *E. coli* cells with glucose. Solid LB agar was layered under LB liquid medium with the variation of agar concentration and solid volume. The increase in the solid portion in the total volume(agar+liquid) resulted in the increase of the final cell concentration. This can be ascribed to the fact that the larger solid phase behaves like a larger reservoir for glucose and controls the growth of *E. coli* with a controlled rate.

서 론

대장균이 호기성 조건에서 증식할 때 초산, 젖산 등의 유기산을 대사산물로 배지에 분비하며, 유기산은 대장균 증식과 재조합 단백질과 같은 생성물의 생산성을 감소시킨다고 보고되고 있다(1, 2, 3). 유기산 중 초산의 대사작용에 대해 미생물 생리학적 연구(4)가 이루어졌으며, 탄소원이 세포 안에서 분해되어 여러 대사 중간체를 거쳐 세포 구성물질의 전구체, 생합성용 에너지 운반체(NADPH, ATP, PEP, Acetyl CoA 등)와 네트워크를 구성하게 된다. Central metabolic pathway(5)를 중심으로 탄

소공급과 생합성, 탄산가스, 그리고 대사 분비물로 배출되는 균형이 평소에 이루어지다가 탄소공급이 과잉이 되면 대사중간체는 탄소의 균형을 맞추기 위해 결가지 경로로 빠져게 된다. Central pathway의 잉여 중간 대사산물인 Acetyl CoA는 Phosphoacetyltransferase와 Acetate kinase의 작용에 의해 초산이 되며 배양액으로 분비된다(6). 초산 농도가 5~10g/ℓ 수준이면 세포성장을 저해하며(7), 재조합 단백질의 발현도 방해한다(8).

본 연구에서는 대장균 배양시 초산과 젖산을 중심으로 유기산의 형성에 미치는 배지의 종류와 배양 방법의 영향을 살펴보고, 투석배양법(9)에 의해 대

장균세포 농도가 증가하는 것을 연구하였다.

재료 및 방법

균주

대장균 W3110을 럭키 중앙연구소로부터 분양받았다.

배지

M9 배지와 LB배지(Table 1)에 포도당 농도를 변화시키고 초산을 외부로부터 추가하여 세포 성장의 변화를 보았다.

Table 1. Composition of culture media.

M9 medium	
Composition	Quantity per Liter(gram)
MgSO ₄	0.24
CaCl ₂	0.011
KH ₂ PO ₄	3.0
Na ₂ HPO ₄	6.0
NH ₄ Cl	0.5
Glucose	1.0
	—

LB medium	
Composition	Quantity per Liter(gram)
Tryprone	10
Yeast Extract	5
NaCl	10
Glucose	—

배양방법

플라스크 배양은 진탕 배양기(비전과학, 모델 KMC8480)에서 100ml, 37°C, 200rpm 조건에서, 발효조 배양은 소형 발효기(한국발효기, 모델 KF5)에서 1ℓ 배양액을 채우고 2vvm, 37°C, 200rpm 조건에서 가성소다를 이용하여 pH=7.4로 pH를 조정하면서 배양하였다.

투석 배양

LB 한천 배지를 플라스크 하부에 깔고 LB 액체 배지를 LB 한천 배지 위에 투입한 후 37°C, 200rpm에서 대장균을 진탕배양하였다. 대조군으로 한천과 액체 배지 부피를 합한 부피와 동일한 부피

의 액체 배지만으로 플라스크 배양하였다. 500ml 플라스크에 200ml 액체 배지, 100ml 한천+100ml 액체 배지, 150ml 한천+50ml 액체 배지로 3가지 배지를 넣고 세포 증식, 유기산 농도, 포도당 농도, pH 변화를 시간에 따라 측정하였다.

유기산과 포도당 확산속도를 조절하기 위해 한천의 농도를 1.5%, 3%로 실험하였다.

확산실험

포도당과 초산이 한천 배지와 액체 배지 사이에 교환되는 현상을 보기 위해서 3가지 실험을 아래와 같이 하였다:

실험 1 : 100ml 한천(5g/ℓ 포도당)+100ml 초산 용액(5g/ℓ)

실험 2 : 150ml 한천(5g/ℓ 포도당)+ 50ml 초산 용액(5g/ℓ)

실험 3 : 150ml 한천(10g/ℓ 포도당)+ 50ml 초산용액(10g/ℓ)

진탕 배양기에서 37°C, 200rpm 조건으로 대장균이 없는 상태에서 3시간 동안 진탕하여 포도당과 초산이 확산되도록 하였다.

유기산 농도의 측정

HPLC(Waters, U.S.A.)에 유기산 칼럼(Rezex column, Phenomenex, U.S.A.)을 장착하여 0.05% 황산 용액을 0.5ml/min 유속으로 흘려 보내면서 100μℓ 시료를 주입하여 초산과 젖산을 RI detector (R401, Waters, U.S.A.)로 정량하였다.

포도당 농도의 측정

Dinitrosalicylic acid에 의해 포도당 용액을 발색시켜 550nm 파장에서 분광광도계를(Milton Roy, Spectronic 20D, U.S.A.) 이용하여 포도당 농도를 정량하였다. 한편 유기산 정량시 동시에 포도당 농도 측정이 가능하였다.

균체 농도의 측정

650nm에서 분광광도계를 사용해서 Optical Density(O.D.) 값으로 측정하였다.

pH의 측정

pH meter(Schott Geraete, Model CG728, Germany)로 배양액의 pH를 측정하였다.

결과 및 고찰

플라스크 배양

LB 배지에서 초기 포도당 농도 변화의 영향

포도당 농도가 1g/l과 2g/l인 경우 세포 증식은 5g/l과 10g/l의 경우보다 크게 나타났으며 포도당의 성장수율(균체 무게 증가/포도당 소모량)도 포도당의 농도가 작을수록 크게 나타났다(Fig. 1). 플라스크 배양에서 pH 조절이 되지 않으므로 유기산 생성에 의해 pH가 떨어지게 되고 세포 성장은 pH=4.5에서 중지하였다. 포도당 농도가 5g/l과 10g/l의 경우 포도당이 다 소모되기 전에 pH=

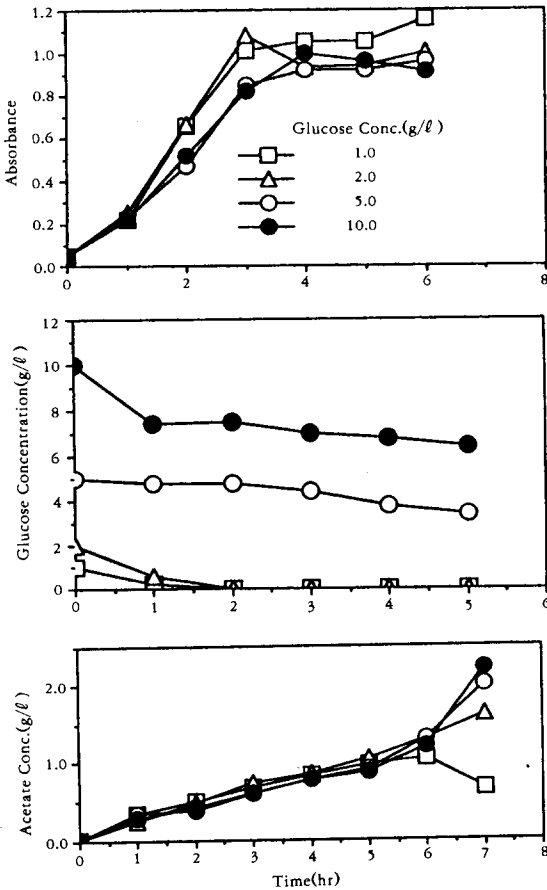


Fig. 1. Time course profiles of cell, glucose and acetic acid concentrations with variation of the initial glucose concentration in LB medium flask culture.

4.5에 도달하여 세포성장이 멈추어지고 포도당이 잔존하였다.

생성된 초산을 초기 포도당 농도별로 보면 배양 개시 후 5시간까지는 별 차이가 없다가 6시간 이후부터 초기 포도당 농도에 비례하여 초산의 농도가 증가함을 알 수 있다. 이는 세포 내에서 축적된 초산이 배양액으로 분비되고 분비되는 시점은 세포가 정지기에 도달하는 시각임을 알 수 있다. 초기 포도당 농도 1g/l의 경우는 초산을 다시 탄소원으로 사용하여 대장균이 Biphasic growth를 함을 보이고 있다.

M9 배지에서 초기 포도당 농도 변화의 영향

초기 포도당 농도가 낮을 경우(0.5g/l, 1g/l, 2g/l 경우) 세포성장은 포도당이 고갈되면 중지하였고, 이는 합성 배지인 M9 배지의 포도당 성장 수율이 낮기 때문에 LB 배지보다 포도당이 빨리 고갈되기 때문이다(Fig. 2). 초기 포도당 농도가 0.5g/l, 1g/l, 2g/l의 경우 포도당 성장 수율은 거의 일정하여 포도당이 고갈될 시점에서 세포농도가 0.25 O.D., 0.5 O.D., 1.0 O.D.를 보였다. 시간에 따른

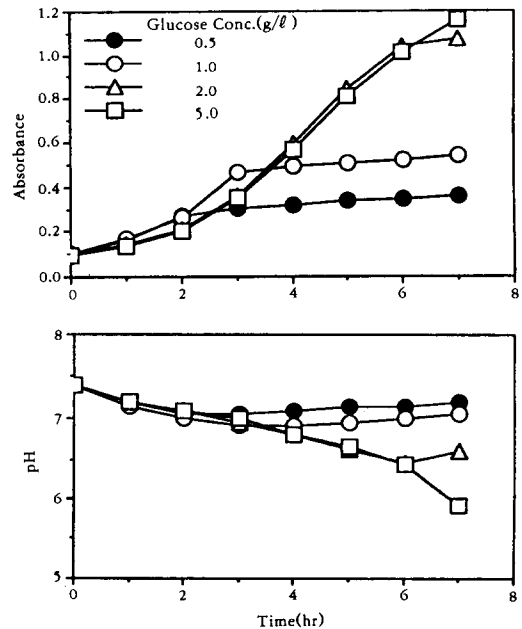


Fig. 2. Time course profiles of optical density and pH with variation of the initial glucose concentration in M9 medium flask culture.

pH 변화를 보면 포도당이 고갈되면 pH 상승이 있고 Biphasic growth 현상이 보인다. 초기 포도당 농도 5g/l의 경우 LB 배지와 M9 배지를 비교하면 M9 배지의 증식 속도가 느려서 배양시간 5시간 경과 후 M9 배지에서 O.D.가 0.8로 LB 배지의 O.D. = 0.9보다 작지만 LB 배지에서는 pH=4.5에 이미 도달 되어 세포 증식이 멈추어진 반면 M9 배지는 7시간 경과 후까지 세포가 계속 증식하여 O.D.가 1.2까지 도달하였음을 보이고 있다. 그리고 pH도 세포가 성장할 수 있는 조건인 pH=5.8이다. 이 결과는 합성 배지는 비증식속도가 0.35 1/H 이상에서 복합 배지가 0.2 1/H 이상에서 초산 생성이 두드러진다는 보고(11)에 의해서도 설명이 가능하다.

LB 배지에서 투입된 초산의 영향

Fig. 3에는 외부에서 초산을 투입하여 대장균 배양을 수행했을 때 세포 성장의 변화를 보여주고 있다. 초기 포도당 농도는 5g/l 이었고 배양을 시작하기 전에 pH를 가성소다를 이용하여 7.4로 맞추어 동일한 초기 조건으로 배양을 시작하였다. 초산 농도가 2g/l 일 때 세포 성장은 크게 저해되었다. 초산의 저해작용이 작을 때는 대장균은 6시간 이내로 급격히 다 자라고 Biphasic growth기로 들어가는데 비해 초산의 저해작용이 클 때에는 시간에 따라 세포의 O.D.가 거의 직선적으로 증가하였다. 비증식속도 μ 를 계산하여 비교하면 초산의 농도가 0.0에서 2.0g/l로 증가할 때 μ 가 0.75에서 0.35 1/H까지 크게 감소하였다.

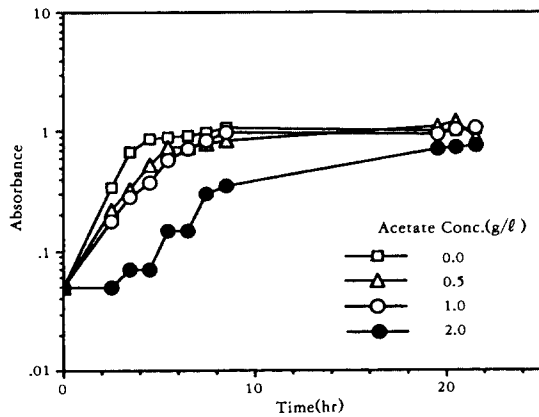


Fig. 3. Growth curve of *E. coli* with variation of the added acetic acid concentration in LB medium flask culture(initial glucose concentration=5g/l).

M9 배지에서 투입된 초산의 영향

합성 배지인 M9 배지의 경우는 LB 배지보다 초산의 저해효과가 높은 초산농도에서 나타났다. Fig. 4에서 보듯이 초산의 저해효과가 4g/l 부터 나타나기 시작했다. 초산 농도 4g/l 과 6g/l 의 경우 9시간 배양기간 동안 pH가 6.8 이하로 떨어지지 않아 유기산 형성이 억제되고 있음을 보이고 있는 반면 초산농도 2g/l 이하인 경우 빠른 대장균의 증식 때문에 유기산 형성이 활발함을 보이고 있다. 초산을 넣어 주지 않을 경우 빠른 유기산 생성 때문에 pH가 급격히 떨어지고 8시간 후 대장균의 증식이 멈추었다. 반면 초산의 농도가 2g/l 의 경우 6시간 후부터 저해효과가 조금 나타나지만 pH 하강 속도도 둔화되어 8시간 후에도 세포성장이 계속되었다. LB와 M9 배지를 초산의 저해효과 측면에서 보면, M9 배지에서 증식속도가 LB 배지에서의 증식속도보다

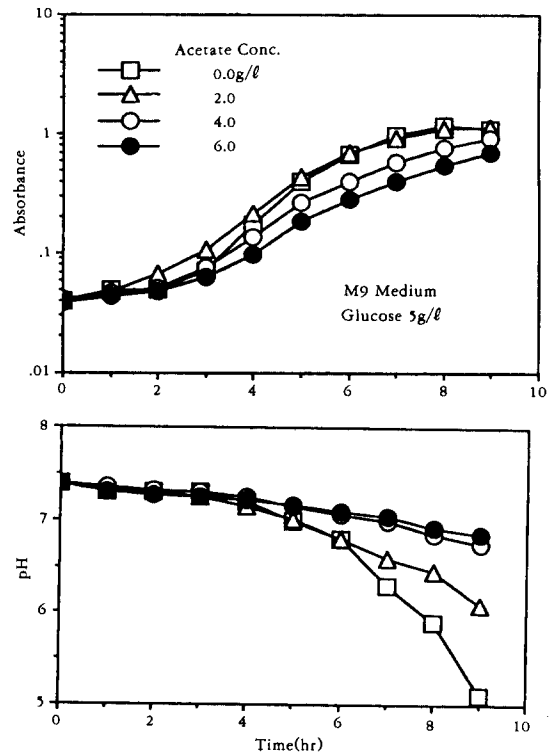


Fig. 4. Time course profiles of cell optical density and pH with variation of the added acetic acid concentration in M9 medium flask culture.

낮고 따라서 M9에서의 pH 강하가 느리고 초산의 저해효과가 작게 나타난다. 초산이온은 양성자와 결합된 상태에서 세포 성장을 더 크게 방해한다고 보고되고 있다(12). 비증식속도를 비교하면 초산의 농도가 0~6g/l로 변할 때 μ 는 0.54에서 0.45 1/H로 변하여 μ 의 감소는 LB 배지에 비해 두드러지지 않았다.

발효조 배양

M9 배지에서 초기 포도당 농도의 영향

발효조 배양의 특징은 pH가 일정값으로 조절되기

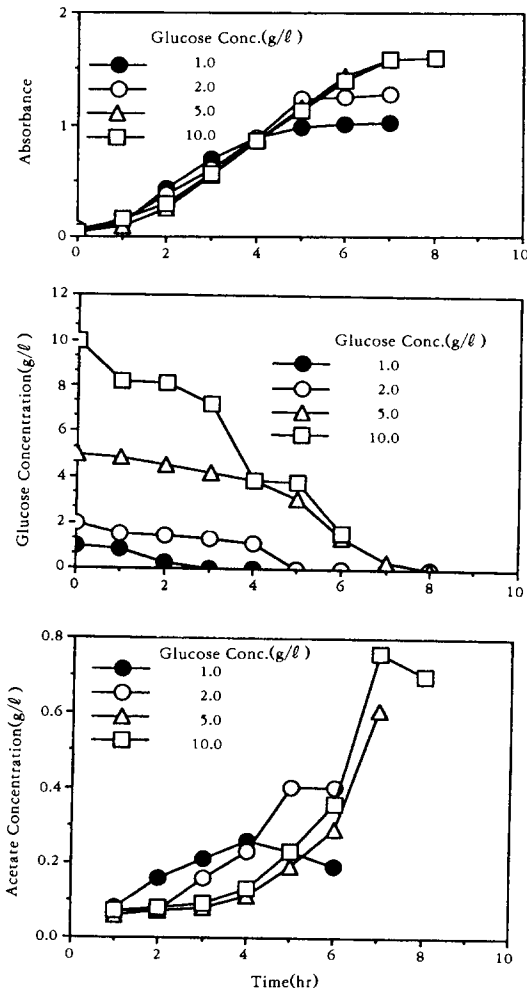


Fig. 5. Time course profiles of cell, glucose and acetic acid concentrations with variation of the initial glucose concentration in M9 medium fermenter culture.

때문에 발효조 배양의 포도당 증식 수율이 플라스크 배양의 수율보다 큰 점이다. Fig. 2와 Fig. 5를 비교하면 포도당 농도 1g/l의 경우 발효조 배양의 최종 세포 O.D.는 1.0인 반면 플라스크 배양의 최종 O.D.는 0.5이었다. 포도당 농도 2g/l와 5g/l의 경우에도 발효조의 O.D.가 플라스크의 O.D.보다 컸으나 1g/l 경우보다 그 차이는 그렇게 크지 않았다. 시간에 따른 포도당과 초산의 농도 변화를 보면, 배양 시작 후 4시간까지는 초기 포도당 농도 변화에 따라 초산 농도 차이가 없다가 초기 포도당 농도가 높은 경우 6시간 이후에 초산 농도가 급격히 증가하였다. 앞서 논의한 바와 같이 포도당의 유기산으로 전환되는 시점과 유기산이 배지로 분비되는 시점 사이에는 시간 차가 존재함을 의미한다고 할 수 있다.

M9 배지에서 투입된 초산의 영향

M9 배지의 경우 초산의 저해효과는 플라스크 배양 (Fig. 4)이 발효조 배양 (Fig. 6) 보다 크게 나타났으며, 발효조에서는 pH가 7.4로 조절이 되고 초산이온이 양성자와 덜 결합된 상태이기 때문이다. 초산 농도가 8g/l 이상에서 저해효과가 관찰되었다. 비증식 속도는 0.84, 0.76, 0.67 1/H로 감소하였다.

투석 배양

Fig. 7는 투석 배양의 결과이며 사용한 배지는 LB 배지이고 포도당 농도는 5g/l, 한천의 농도는 1.5%이었다. 위에서부터 아래로 각각 대조군, 100ml 한천 + 100ml 액체, 그리고 150ml 한천 +

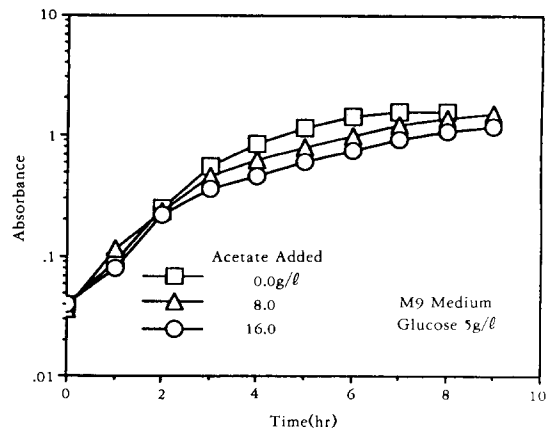


Fig. 6. Growth curve of *E. coli* with variation of added acetic acid in M9 medium fermenter culture.

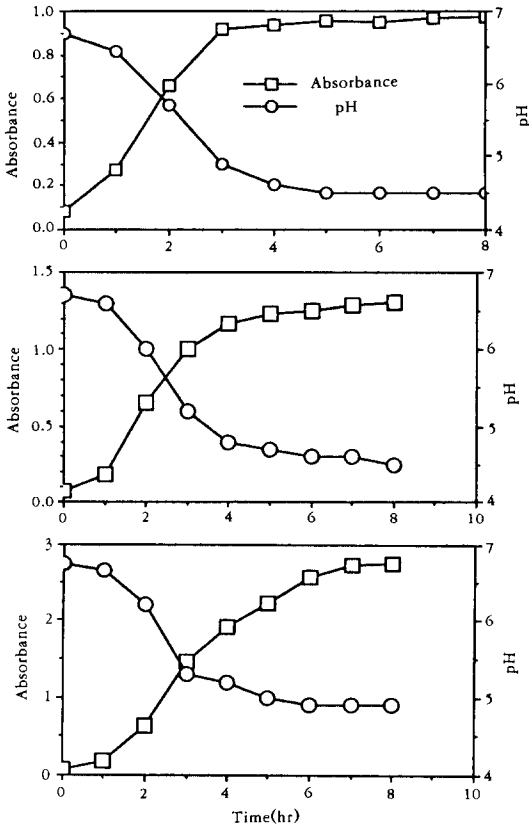


Fig. 7. Growth curves of *E. coli* and pH changes in dialysis flask cultures; upper: 200ml of control LB liquid medium; middle: 100ml of 1.5% LB agar+100ml of LB liquid medium; lower: 150ml of 1.5% LB agar+50ml of LB liquid medium; glucose concentration: 5g/l.

50ml 액체 플라스크에서 얻은 세포 농도와 pH값들이다. 대조군의 경우 pH는 4.5로 4시간 이내에 급격히 떨어져 세포 성장이 O.D.=1.0에서 멈춘 반면, 한천에 의해 투석효과가 있는 경우 pH 변화가 완만하였다. 세포 농도의 증가가 동시에 이루어져 O.D.가 1.3, 2.7로 최종 O.D.가 증가하였다.

투석발효에 의한 대장균의 고농도 세포배양의 보고는 다수 있으며(13, 14, 15) 세포로의 영양분 공급과 세포 대사물 제거에 의해 세포 농도의 증가를 이룩하였다. 반투막을 이용하여 투석 발효를 하는 것이 대개의 연구자들이 택한 방법이었지만 본 연구

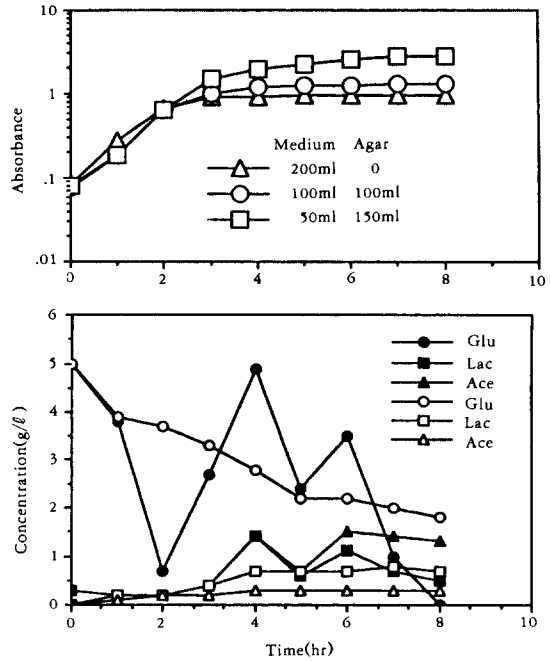


Fig. 8. Comparison of *E. coli* growth under different dialysis culture conditions and time courses of metabolites; lower figure open notation: 200ml of LB liquid medium; closed notation: 150ml of 1.5% LB agar+50ml of LB liquid medium; glucose concentration: 5g/l.

에서는 한천을 플라스크에 고정시켜 반투막과 영양분과 대사물의 저장조 역할을 하도록 하였다.

액상 중의 포도당과 초산, 젖산 농도의 시간 변화를 보면 Fig. 8과 같다. 대조군과 50ml 배양액을 사용한 경우에 대해서 비교해 보면 투석 배양의 메카니즘을 이해할 수 있다. 대조군의 경우 배양 개시후 4시간까지만 세포 성장이 이루어지며 그 후에는 낮은 pH로 인하여 성장이 멈추고 유기산 농도의 변화도 없다. Fig. 1의 5g/l 실험 결과와 비교하여 보면 유사한 결과를 얻었고(최종 O.D.=0.9) 생성된 초산의 농도는 Fig. 8의 경우 0.5g/l 이하인데 비해 Fig. 1의 경우 1g/l 이상이었다. 이는 투석배양에서 대조군의 용액부피가 200ml인데 비해 Fig. 1의 배양은 용액이 100ml로 산소 통기조건의 차이로 인해 생성된 유기산의 분포가 바뀐 것 때문인 것으로 사료된다. 산소 공급이 부족한 상태에서는 젖산

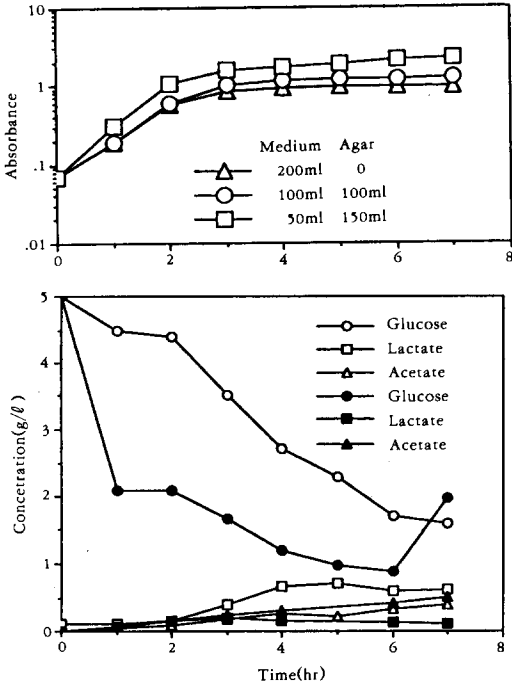


Fig. 9. Comparison of *E. coli* growth under different dialysis culture conditions and time courses of metabolites; lower figure open notation: 200ml of LB liquid medium; closed notation: 150ml of 3% LB agar + 50ml of LB liquid medium; glucose concentration: 5g/l

이 유기산으로 많이 생성되며 배양액의 부피가 50ml인 경우 초산이 젖산보다 많이 생성되었다. 투석배양의 경우 0에서 2시간 사이에 포도당 농도가 급격히 감소하는데 이는 대조군에 비해 용액의 부피가 1/4이므로 포도당 농도 변화가 4배로 증폭되기 때문이다. 대장균의 포도당 소모량은 대조군과 투석배양이 비슷하였다. 2시간과 4시간 사이에서는 포도당 공급 속도가 소모 속도보다 커서 용액 속의 포도당 농도가 증가하였다. 그 사이 유기산의 농도는 증가하였는데 세포생장이 둔화되어 앞서 2시간 동안 생성된 세포 내의 유기산이 분비되었기 때문이다. 6시간 이후에는 포도당의 소모 속도가 커서 포도당의 농도가 감소하였고 생성된 유기산이 고체상으로 확산되어 제거되었기 때문에 액상의 유기산 농도가 감소하였다. 투석배양에서 세포의 증식은 대조군에 비해 서서히 일어나서 초산의 농도는 대조군에 비해서

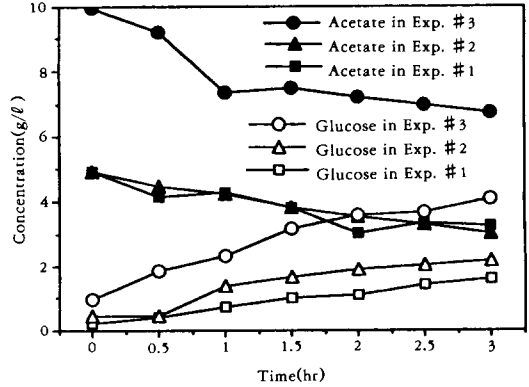


Fig. 10. Time course profiles of glucose and acetic acid concentrations in dialysis experiment; Exp. 1: 100ml of 3% agar with 5g/l glucose + 100ml of 5g/l acetic acid solution; Exp. 2: 150ml of 3% agar with 5g/l glucose + 50ml of 5g/l acetic acid solution; Exp. 3: 150ml of 3% agar with 10g/l glucose + 50ml of 10g/l acetic acid solution.

높지만 pH가 대조군에 비해 서서히 떨어져 대조군의 대장균이 성장을 멈춘 후에도 투석배양의 대장균은 계속 성장하였다.

한천 농도를 3%로 증가시켜 기질의 확산속도를 줄인 경우(Fig. 9) 투석배양의 효과가 감소하였다. 한천 농도 1.5%의 경우와 비교하면 투석 배양에 의해 대조군에 대한 세포 증가가 감소하였으며 포도당 농도의 경우도 Fig. 8과 같은 포도당 농도의 큰 진동을 관찰할 수 없었다. 유기산 농도를 보면 50ml 배양액을 사용한 투석 배양의 경우 초산의 농도는 대조군과 비슷한 수준으로 유지되었고 젖산의 농도는 대조군보다 낮게 유지되었다.

확산실험

세포생장이 없는 조건에서 투석 배양시의 포도당과 초산 농도의 변화를 조사하였다(Fig. 10). 초산은 용액으로부터 한천으로 확산이 되며 포도당은 그 반대 방향으로 확산된다. 단위시간당 포도당이 전달되는 양은 한천내의 포도당 농도에 비례하였고(실험 2와 3을 비교) 포도당 농도가 같을 때는 전달량은 한천의 양과 무관하였다(실험 1과 2를 비교). 실험 1과 2를 비교할 때 포도당이 확산된 용액의 부피가 다른 것을 고려하여 포도당의 전달량을 계산하였다. 단위 시간당 초산의 전달량도 초산의 농도에 비례하

였고 한천의 양에는 무관하였다.

한천의 양에 관계 없이 초산과 포도당이 전달된다면 한천의 양이 증가함에 따라 세포의 최종 농도가 증가한 Fig. 8~9의 실험 결과를 다른 각도에서 살펴 보아야 한다. 한천의 양이 증가할 때 한천에 저장된 포도당의 양은 증가하고 용액중의 포도당을 대장균이 소모할 때 더 낮은 포도당 농도 조건으로 소모하도록 한다. 즉 한천에서 포도당을 서서히 방출하므로 대장균이 높은 포도당 농도 조건에서 빨리 자라는 것을 방지하여 pH 감소 속도를 늦추게 된다.

요 약

초산이온이 대장균 성장을 저해하는 현상을 규명하기 위해서 M9 배지, LB 배지를 사용해서 플라스크, 발효조 배양을 수행하였다. 대장균의 초산 생성은 높은 포도당 초기 농도, LB 배지와 같은 복합 배지에서 활발하였고, 플라스크 배양과 같은 pH 조절이 되지 않는 배양방법에서는 초산의 생성에 따른 pH 감소에 따라 세포성장이 많이 저해되었다. 초산을 외부에서 첨가하여 세포성장에 미치는 영향을 조사하여 보았는데 LB 배지를 사용한 플라스크 배양에서는 첨가된 초산의 농도가 2g/ℓ 이상, M9 배지를 사용한 플라스크 배양에서는 초산의 농도가 4g/ℓ 이상, 그리고 M9 배지를 사용한 발효조 배양에서는 8g/ℓ 이상에서 초산의 성장 저해효과가 나타났다.

LB 한천 배지를 밑에 깔 LB 액체 배지의 플라스크 배양을 수행하였다. LB 한천의 양이 증가함에 따라서 한천에서 포도당의 방출이 일어나 최종 대장균 세포 O.D.가 증가하였다.

감 사

본 연구는 과학재단 지원(92-24-00-07)으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. B. T. Koh, U. Nakashimada, M. Pfeffer and G. S. Y. Miranda(1992), *Biotech. Lett.*, **14**, 1115.
2. L. Yee and H. W. Blanch(1992), *Bio/technol.*, **10**, 1550.
3. K. H. Han(1992), Ph. D. Tesis, Dept. of Chem. Eng., Univ. Cal. Irvine, Irvine.
4. E. M. T. El-Mansi and W. H. Holms(1989), *J. Gen. Microbiol.*, **135**, 2875.
5. W. H. Holms(1986), *Current Topics in Cellular Regulation*, **28**, 59.
6. T. D. K. Brown, M. M. Jones-Mortimer and H. L. Kornberg(1977), *J. Gen. Microbiol.*, **102**, 327.
7. J. G. Pan, J. S. Rhee and J. M. Lebealt(1987), *Biotech. Lett.*, **9**, 89.
8. E. B. Jesen and S. Carlsen(1990), *Biotechnol. Bioeng.*, **36**, 1.
9. E. A. Tyrell, R. E. MacDonald and P. Gerhardt(1958), *J. Bacteriol.*, **75**, 1.
10. J. E. Bailey and D. F. Ollis(1986), *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd ed., p. 396, McGraw Hill, New York.
11. D. Riesenberget al.(1991), *J. Biotechnol.*, **20**, 17.
12. R. C. Baskette and D. J. Hentges(1973), *Infect. Immun.*, **8**, 91.
13. 경규항 (1984), *식품과학*, **17**, 33.
14. P. Landwall and T. Holme(1977), *J. Gen. Microbiol.*, **103**, 345.
15. P. Gerhardt and D. M. Gallup(1963), *J. Bacteriol.*, **86**, 919.