

대장균의 실관투석배양

김인호·윤태호
충남대학교 화학공학과

Hollow Fiber Dialysis Culture of *E. coli*

In Ho Kim and Tae Ho Yoon

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

ABSTRACT

A hollow fiber device was utilized to perform a dialysis culture for *E. coli*. Acetic acid inhibition on the growth of *E. coli* was relieved by dialyzing the acid from broth into a dialysate reservoir. The rate of acetic acid formation was very sensitive to the concentration of glucose and dissolved oxygen. Therefore it was found that the glucose permeation rate should be balanced with the oxygen supply rate. Specific growth rate of *E. coli* was determined by the glucose permeation rate through membrane. Under a low permeation rate, acetic acid formation was depressed in accordance with high dissolved oxygen concentration as well as low glucose concentration.

서 론

미생물이 생성해낸 최종 대사 생성물은 일반적으로 발효미생물의 증식을 저해한다. 그러므로 대사 생성물을 발효액으로부터 제거하고자 하는 연구가 많이 수행되었다. 예를 들면 투석막을 이용한 투석배양(1), 용매를 이용한 추출법(2), 진공에 의한 증발배양(3) 등이 그 예가 된다. 이들 중 투석배양법은 투석막을 사용하여 1960년대부터 연구되어 왔으며 연구초기에는 막 장치의 개발이 미흡하여 투석막을 단순히 봉지 형태로 만들어 진탕용 플라스크에 투입하여 세포농도의 변화를 살펴 본 정도였다(4). 그러나 막 장치의 개발이 활발했던 1970년대에 이르러 발효조에 투석막 장치를 부착하여 배양액을 투석막 장치로 순환시켜 투석연구를 체계적으로 할 수 있게 되었다(5).

투석배양은 미생물 균체를 고농도로 얻기 위해, 미생물이 생산하는 독소 등의 고분자물질 생산을 위

해, 막을 투과하는 유기산 등의 저분자물질 생산조건을 찾기 위해, 그리고 막으로 분리된 두 종류의 미생물 사이의 상호간섭현상을 연구하기 위해서 사용되었다(6). 이중 대장균을 투석배양한 연구는 별로 많지 않은데(4, 7), 그 이유는 대장균 배양이 용이하며 유가배양에 의해서도 손쉽게 고농도의 균체를 얻을 수 있기 때문이라고 사료된다.

본 연구에서 대장균을 배양할 때 발생한 유기산이 투석배양조건에서 어떻게 배양액 내에서 변화하는가와 막을 통한 기질의 투과속도가 대장균 증식속도에 미치는 영향에 관해서 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주

대장균 W3110을 럭키중앙연구소로부터 분양받았다.

시약

배지로 M-9배지를 사용하였고 필요시 초산을 외

Table 1. Culture conditions.

#	Media Composition	Dialysate Composition	Remark
1	M-9 medium + glucose 10g/ℓ		Batch Culture 200rpm
2	M-9 medium + glucose 10g/ℓ		Batch Culture 300rpm
3	M-9 medium + glucose 10g/ℓ Acetic acid 10g/ℓ		Batch Culture 200rpm
4	M-9 medium + glucose 10g/ℓ Acetic acid 15g/ℓ	Glucose 10g/ℓ	Dialysis culture 200rpm
5	M-9 medium + glucose 10g/ℓ Acetic acid 15g/ℓ	M-9 medium + Glucose 10g/ℓ	Dialysis culture 200rpm
6	M-9 medium + glucose 10g/ℓ	M-9 medium + Glucose 10g/ℓ	Dialysis culture 200rpm
7	M-9 medium + glucose 10g/ℓ	M-9 medium + Glucose 10g/ℓ	Dialysis culture 200rpm
8	M-9 medium + glucose 10g/ℓ	M-9 medium + Glucose 10g/ℓ	Dialysis culture 300rpm

부로부터 추가하여 세포성장을 관찰하였다. 투석액으로 M-9배지를 사용하고 포도당 농도를 변화시켰다.

회분배양

플라스크배양은 진탕배양기(비전과학, 모델 KMC 8480)에서 0.5ℓ 용량의 플라스크에서 200ml 배지, 37℃, 200rpm조건으로, 발효조배양은 소형발효기(한국발효기, 모델 KF5)에서 1ℓ 배양액을 채우고, 2vvm, 37℃, 200rpm과 300rpm조건으로 6.2% 압모니아수용액을 이용하여 pH=7.4로 pH를 조정하면서 배양하였다. 구체적인 회분배양조건은 Table 1과 같다.

투석배양

소형 발효기에서 M-9배지로 대장균을 배양하면서 외부의 투석액저장조에 M-9배지를 1ℓ 채운 후 실관막(Amicon, model MF)을 통해 물질전달이 일어나도록 하였다. 발효조로부터 배양액을 펌프(한국발효기, 연동펌프)를 사용하여 실관막의 셀측으로 순환시키고, 투석액은 실관막의 관 안쪽으로 순환되도록 장치를 고안하였다. 순환유속은 30ml/min이었다. 이때 막 안쪽과 셀측의 압력차로 인한 한외여과가 일어나 용액이 이동하지 않도록 투석액 저장조의 높이를 조정하였다. 구체적인 투석배양 조건은 Table 1과 같다.

확산실험

포도당과 초산이 실관막을 통해 확산되는 현상을 보기 위해 Table 2의 실험을 수행하였다. 발효조와 투석액저장조 사이의 물질전달을 측정하기 위해 각

Table 2. Permeability measuring experiments.

#	Fermenter Solution	Dialysate Solution
1	Acetic acid 10g/ℓ	Distilled water
2	Acetic acid 20g/ℓ	Distilled water
3	Distilled water	Glucose 10g/ℓ solution
4	Distilled water	Glucose 20g/ℓ solution
5	Distilled water	Glucose 30g/ℓ solution

각 1ℓ 씩 채워진 발효조와 투석액 저장조의 용액을 30ml/min의 속도로 연동펌프를 이용해 실관막장치의 셀측과 관내로 순환시켰다. 순환방향은 두 흐름이 평행방향이었다.

유기산 농도의 측정

HPLC(Waters, U. S. A.)에 유기산칼럼(Rezex column, Phenomenex, U. S. A.)을 장착하여 0.05% 황산용액을 0.5ml/min 유속으로 흘려 보내면서 100 μ ℓ 시료를 주입하여 초산과 젓산을 RI detector(R401, Waters, U. S. A.)로 정량분석하였다.

포도당 농도의 측정

Glucose Trinder(SIGMA, U. S. A.) 발색시약을 사용하여 포도당용액을 발색시켜 505nm파장에서 분광광도계(Milton Roy, Spectronic 20D, U. S. A.)를 이용하여 포도당을 정량하였다. 한편 유기산 정량시 포도당 농도 측정이 가능하였다.

균체농도의 측정

600nm에서 분광광도계를 사용해서 Optical Density(O. D)값으로 측정하였다.

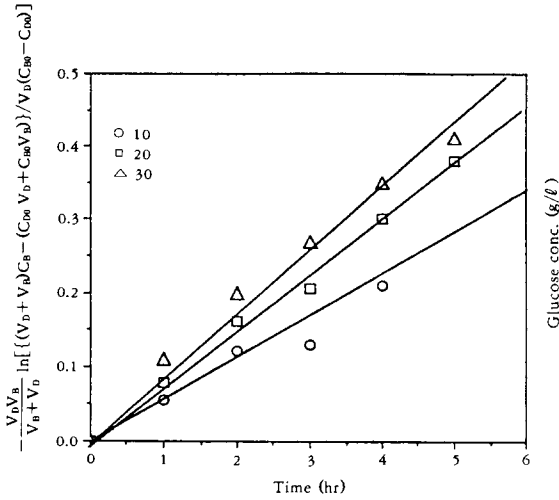


Fig. 1. Permeability of glucose.

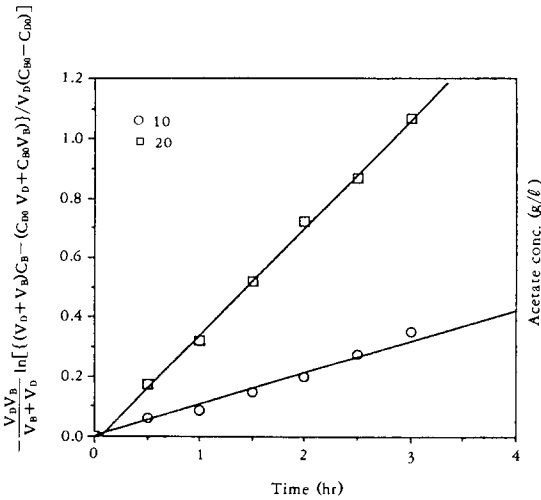


Fig. 2. Permeability of acetic acid.

결과 및 고찰

확산실험

실관막을 통해서 포도당과 초산이 전달되는 속도를 살펴 보기 위한 확산실험에서 투과계수를 Fig. 1과 Fig. 2에서와 같이 구할 수 있었다. 포도당과 초산의 투과계수는(8)

$$-\frac{V_D V_B}{V_B + V_D} \ln \left[\frac{(V_D + V_B) C_B - (C_{D0} V_D + C_{B0} V_B)}{V_D (C_{B0} - C_{D0})} \right] \text{ 대 } P_0 A t \text{에서 기울기로부터 구}$$

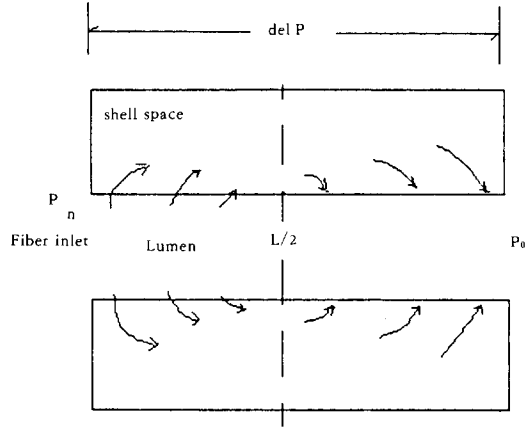


Fig. 3. Starling flow phenomena.

할 수 있고 주어진 식의 기호 의미는 아래와 같다.

- V = 부피
- C = 농도
- P₀ = 투과계수 (Overall Permeability)
- A = 막면적
- t = 시간
- B = Concentrate
- D = Dialysate
- 0 = 초기

포도당의 투과계수는 0.06~0.09cm/h의 값을 갖고 포도당의 초기농도가 증가할수록 투과계수가 증가했다. 막을 통해 포도당이 투과될 때 확산만이 투과의 원인이라면 농도에 무관하게 투과계수가 결정되는데 Fig. 1의 실험자료는 확산 이외에 한외여과가 투과의 원인이 됨을 의미한다. 본 실험에 사용한 실관막의 구멍크기는 0.1 μm이며 작은 압력차에서도 한외여과가 일어난다. 투석액 저장조의 용액부피는 비록 변하지 않았지만 실관막 장치 내에서는 Fig. 3과 같은 Starling Flow가 일어난다. 즉 실관막 상부에서는 막 안에서 셀측으로, 하부에서는 반대방향으로 한외여과가 일어난다. 한외여과액에 동반하여 포도당이 이동하므로 포도당의 농도가 높을수록 포도당의 전달속도가 빠르고 투과계수가 포도당 농도에 따라 변하게 된다. 초산의 투과계수는 0.1~0.4cm/h의 값이었고 포도당에 비교해 분자량이 1/3이며 투과계수가 2배 이상으로 나타났다. 참고문헌 8에 의하면 확산투과계수는 용질의 확산계수(Diffusivity)에 비례하며 초산의 확산계수는 1×10⁻⁵cm²/s,

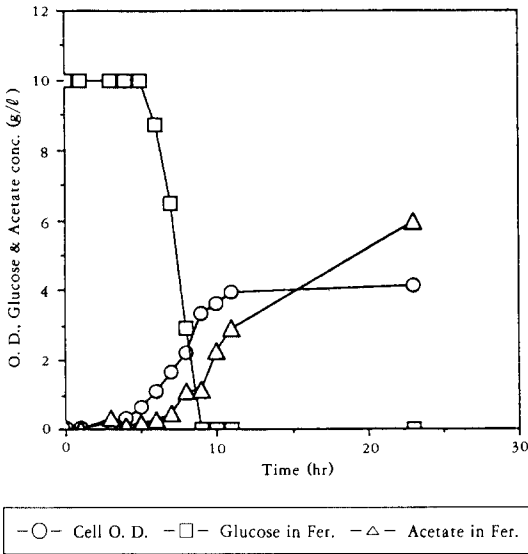


Fig. 4. Batch culture of *E. coli*; glucose 10g/l, 200rpm.

포도당의 확산계수는 $0.6 \times 10^{-5} \text{cm}^2/\text{s}$ 이므로 확산투과계수는 초산이 포도당의 약 2배가 되어야 한다. 그러나 초산, 포도당의 농도가 증가할수록 초산 투과계수/포도당 투과계수 > 2 이므로 용질의 농도가 증가할수록 한외여과에 의한 Starling Flow가 영향을 크게 미치는 것을 생각할 수 있다.

회분발효실험

산소전달이 대장균 증식에 미치는 영향을 보기 위해 교반기의 회전수를 200, 300rpm으로 하여 실험을 하였다(Fig. 4, Fig. 5). 산소전달이 보다 활발한 300rpm의 경우 최종 세포 농도가 높았고, 최종 초산의 농도는 낮았다. 세포성장이 멈춘 휴지기에서 산소 전달이 충분하지 못하면 초산이 계속 배출되는 반면(Fig. 4), 산소전달이 충분한 경우는 초산 농도가 변하지 않고 유지되었다(Fig. 5). 포도당이 고갈된 시점에서 200rpm의 실험을 보면 그 후에 세포성장이 계속되는 반면, 300rpm의 조건에서는 세포성장이 멈추었다. 200rpm의 실험에서는 비성장속도가 초기에 0.6h^{-1} 에서 후기에 0.35h^{-1} 로 변하면서 biphasic 성장을 하는 반면, 300rpm의 실험에서는 비성장속도가 0.55h^{-1} 로 단일 성장속도를 보였다. 용존산소의 농도는 포도당 소모속도가 최대일 때 가장 낮았고 포도당 농도가 0이 되면 급격히 증가하였

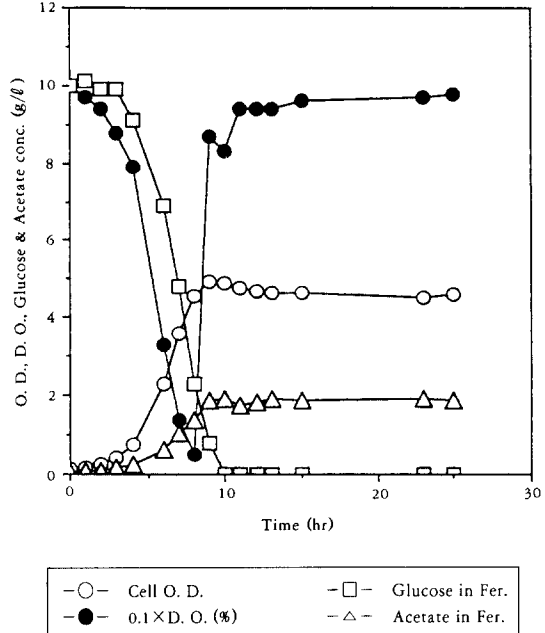


Fig. 5. Batch culture of *E. coli*; glucose 10g/l, 300rpm.

다. 용존산소농도는 대장균의 생리적 상태를 민감하게 반영하였다(Fig. 5). 발효초기에 초산을 10g/l 넣은 경우 세포성장은 저해되어 발효개시 후 8시간까지 비성장속도가 0.15h^{-1} 로 낮았고 8시간에서 14시간까지 비성장속도가 0.3h^{-1} 로 증가하였다(Fig. 6). 비성장속도가 0.3h^{-1} 일 때 포도당과 초산이 같이 대장균에 의해 소모되었으며 초산의 농도가 낮아져 저해효과가 감소되었다. 초산때문에 비성장속도가 낮으므로 용존산소의 농도도 20% 이하로 떨어지지 않아 산소가 제한기질이 되지 않았다. 15시간 이후 대장균이 생리활성은 크게 떨어져 포도당을 천천히 소모하면서 대장균이 증식하여 O.D=3.5까지 자랐다.

투석발효실험

발효초기에 5g/l 초산을 첨가한 발효조와 포도당이 10g/l 들어 있는 투석액 저장조 사이에서 물질교환이 일어날 때, 초산 제거 효과가 대장균의 성장에 미치는 영향을 Fig. 7에 보이고 있다. 발효개시 후 4시간 지난 시점에서 투석이 시작되었고, 발효조의 초산 농도가 감소함에 따라 투석액의 초산 농도가 증가하였으며 확산실험에서의 방법으로 투과계수

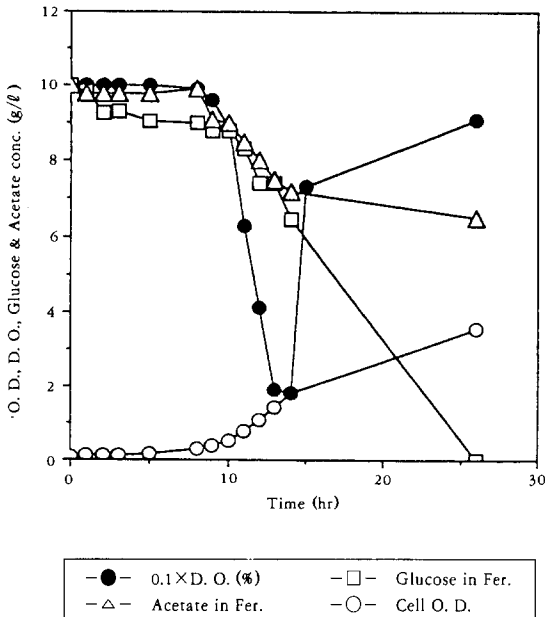


Fig. 6. Batch culture of *E. coli* with acetic acid; glucose 10g/l, 200rpm, acetic acid 10g/l added.

를 계산하면 0.5cm/h이었다. 발효조 초산의 농도가 4g/l 이하로 감소함에 따라 대장균의 비증식속도가 0.12hr⁻¹에서 0.16hr⁻¹로 증가하였다. 포도당 농도는 발효 개시 후 5시간까지 감소하였으나 대장균의 비증식속도가 낮아짐에 따라 포도당의 공급속도가 소모속도보다 빨라져(5시간~6시간) 발효조의 포도당 농도가 증가하였다. 포도당 농도는 공급속도와 소모속도의 차이에 의해 진동하였고, 비증식속도가 회복되고 나서부터는 소모속도가 빨라 포도당 농도가 다시 감소하였다. 투석발효의 특징은 미생물의 생리적 활성을 막을 통해 공급되는 영양분의 공급속도를 조절함으로써 조절할 수 있다는 점을 Fig. 7에서 보이고 있다(9).

15g/l의 초기 발효조 초산 농도를 갖는 투석발효 실험(Fig. 8)에서는 초기 초산의 농도가 높아 실험 개시 후 9시간까지 발효조 초산의 농도가 10g/l 이상이어서 비증식속도가 0.04hr⁻¹(4시간 이후)이었다. Fig. 7의 경우는 초산의 저해효과가 투석에 의해 경감된 반면 Fig. 8에서는 초산이 제거되어도 대장균의 비증식속도가 다시 회복되지 못하였다. Fig. 7과 8에서 공통적으로 나타나는 현상은 초산의 저해

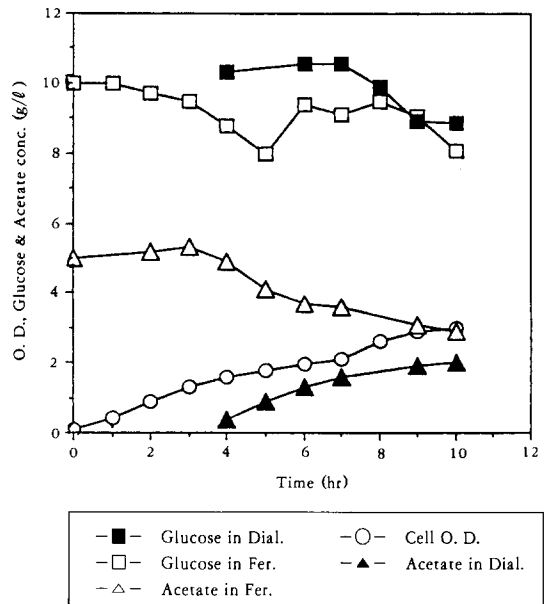


Fig. 7. Dialysis culture of *E. coli*; Initial concentration of acetic acid in fermenter=5g/l, Initial concentration of glucose in dialyze reservoir=10g/l, 200rpm.

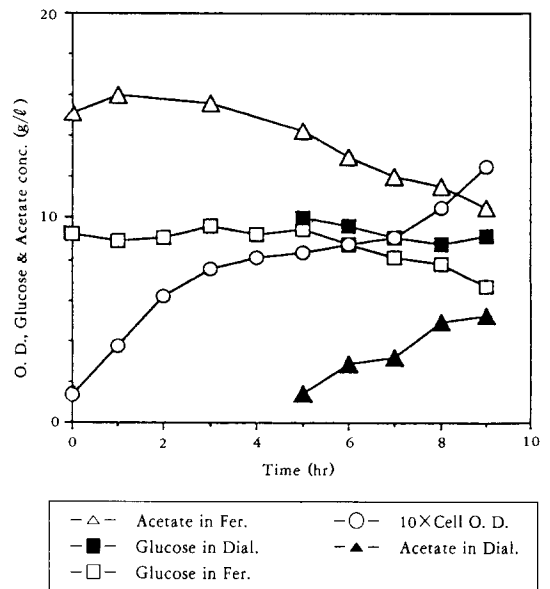


Fig. 8. Dialysis culture of *E. coli*; Initial concentration of acetic acid in fermenter=15g/l, Dialysate reservoir solution=10g/l glucose in M-9 medium, 200rpm.

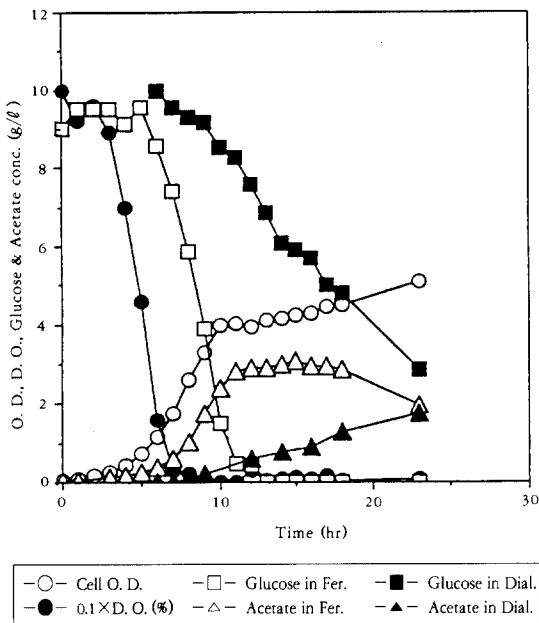


Fig. 9. Dialysis culture of *E. coli*; Dialyzate reservoir: 10g/l glucose in M-9 medium, Fermenter: 10g/l glucose in M-9 medium, 200rpm.

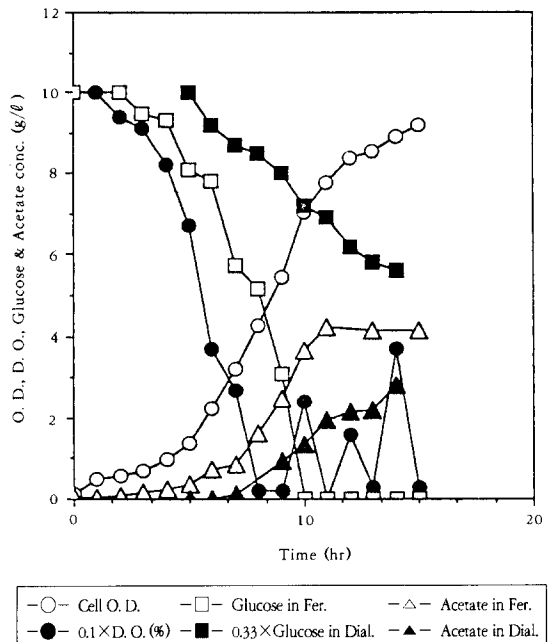


Fig. 11. Dialysis culture of *E. coli*; Dialyzate reservoir: 30g/l glucose in M-9 medium, Fermenter: 10g/l glucose in M-9 medium, 300rpm.

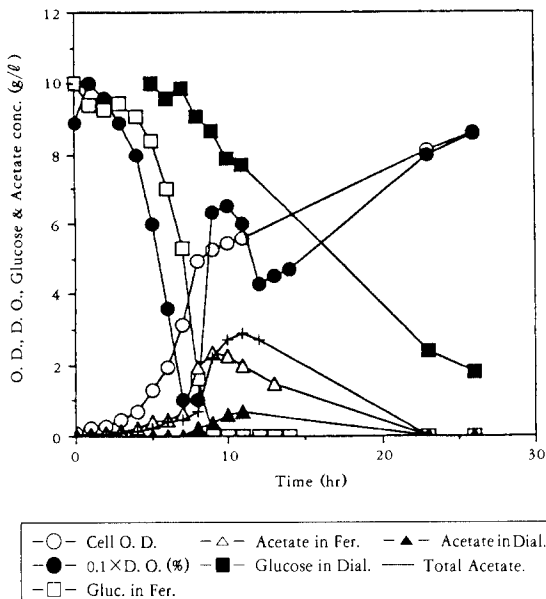


Fig. 10. Dialysis culture of *E. coli*; Same condition as in Fig. 9 except rpm=300.

효과가 나타나는데 발효 개시 후 2시간 이상이 지나야 한다는 점이다. 즉 집중 후 초기에는 대장균의 비중식속도가 0.8hr^{-1} (초산농도 15g/l), 0.9hr^{-1} (초산농도 5g/l)을 보인 반면 2시간이 지나서 배양액의 초산이온이 대장균 내부로 확산되어 들어감에 따라 전자의 경우 0.04hr^{-1} , 후자의 경우 0.12hr^{-1} 로 비중식속도가 감소하였다.

발효가 진행됨에 따라 대장균이 초산을 생성하고 생성된 초산을 투석에 의해 제거하는 실험을 산소전달속도와 포도당 투과속도를 변화시켜 실험하였다. Fig. 9와 Fig. 10은 rpm을 바꾸어 산소전달속도를 바꾼 실험 결과이다. 200rpm 조건에서 발효개시 후 7시간이 지나면 용존산소농도가 0으로 떨어지고 그 후 용존산소가 포화농도의 10% 이하로 유지되어 산소가 제한적으로 공급되었다. 용존산소농도가 0으로 떨어진 후부터 초산의 농도가 급히 증가하여 대장균의 호흡이 제한받게 되면 초산이 발생한다는 보고(10)를 확인할 수 있었다. Fig. 4의 회분배양과 Fig. 9의 투석배양을 비교하면 발효조 내의 포도당의 감소속도가 투석배양의 경우에 둔화되었다. 이는 투

석액 저장조에서 포도당이 지속적으로 공급되기 때문이다. 발효조 내의 포도당 농도가 0이 되는 시점(13시간)부터는 대장균은 포도당의 투과속도에 맞추어 천천히 자랐다(비성장속도 = 0.02hr^{-1}). 생성된 초산의 농도변화를 관찰하면 투석에 의해 발효조는 감소하고 투석조는 증가하였으며 총 초산의 양은 발효개시 13시간 이후 일정하게 유지되었다. 교반기 회전속도를 300rpm으로 증가시키면(Fig. 10) 용존 산소농도가 0으로 떨어지지 않으면서 비성장속도가 0.5hr^{-1} 이었다. 산소공급이 충분한 상태에서 발효개시 후 13시간 이후에 비성장속도는 0.03hr^{-1} 로 Fig. 9의 0.02hr^{-1} 보다 비교적 높게 유지되었고 대장균은 막을 통해 전달되는 포도당을 소비하는 동시에 자신이 생성한 초산을 소비하였다. 여기에서 용존산소가 50% 이상의 높은 조건에서 대장균은 포도당이 제한인자로 작용할 때 초산을 같이 소모함을 알 수 있었다. 회전수를 300rpm으로 유지시키면서 투석액 저장조의 초기 포도당 농도를 $30\text{g}/\ell$ 까지 증가시켜 포도당 공급속도를 증가시켜 보았다(Fig. 11). 이때 초기의 비성장속도는 0.35hr^{-1} , 후기의 비성장속도는 0.04hr^{-1} 이었다. 용존산소의 농도는 발효 후기에 20% 미만으로 산소가 부족하였다. 따라서 초산의 농도는 증가하였고 투석에 의해 제거되었지만 일정수준($4\text{g}/\ell$)을 유지하는 것을 보면 초산이 계속 생성됨을 알 수 있었다. 포도당 농도를 높임에 따라 용존 산소농도가 떨어지므로 초산생성이 증가하였고 대장균 배양에서 산소 전달문제가 가장 심각한 문제임을 지적할 수 있다(11).

요 약

실관막 장치를 이용하여 대장균의 투석배양을 수행했다. 투석액으로 배지 내의 초산을 제거함으로써 초산의 저해효과를 경감할 수 있었다. 초산 생성속

도는 포도당과 용존산소농도에 대단히 민감하였고, 따라서 막을 통한 포도당의 투과속도는 산소공급속도와 균형을 유지해야 했다. 막을 통해 포도당이 천천히 공급될 때, 대장균의 비성장속도는 포도당 투과속도에 좌우되었고 초산의 생성은 억제되었다.

감 사

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

참고문헌

1. J. S. Schultz and P. Gerhardt (1969), *Bacteriol. Rev.*, **33**, 1.
2. T. W. Randolph et al. (1985), *Biotech. Lett.*, **7**, 325.
3. G. R. Cysewski and C. R. Wilke (1977), *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 1125.
4. P. Gerhardt and D. M. Gallup (1963), *J. Bacteriol.*, **86**, 919.
5. R. J. W. Osborne (1977), *J. Soc. Dairy Technol.*, **30**, 40.
6. 경규항(1984), *식품과학*, **17**, 33.
7. P. Landwell and T. Holme (1977), *J. Gen. Microbiol.*, **103**, 345.
8. 서진호, 장호남 (1978), *화학공학*, **16**, 189.
9. J. S. Schultz and P. Gerhardt (1969), *Bacteriol. Review*, **33**, 1.
10. K. B. Anderson and K. Meyenburg (1980), *J. Bacteriol.*, **144**, 114.
11. L. Yee and H. W. Blanch (1992), *Bio/Technol.*, **10**, 1550.