

유가식 배양공정에 의한 *Bacillus thuringiensis*의 고농도 포자생산

박 창 열 · *유 연 우
아주대학교 대학원 분자과학기술학과
(접수 : 1999. 10. 18., 게재승인 : 2000. 6. 20.)

High Concentrated Spore Production of *Bacillus thuringiensis* by Fed-Batch Processes

Chang Yeol Park and Yeon Woo Ryu†
Department of Molecular Science and Technology, Ajou University, Suwon 442-749, Korea
(Received : 1999. 10. 18., Accepted : 2000. 6. 20.)

Both the production of high spore concentration and high insecticidal activity are required in the production of *Bacillus thuringiensis* to be used for the bacterial insecticide. In the production of high cell and spore concentrations of *B. thuringiensis*, the continuous fed-batch culture (CFBC) and intermittent fed-batch culture (IFBC) were investigated at 28 °C by maintaining 40% dissolved oxygen concentration. When the final glucose concentration was 50 g/L, the maximum viable cell number obtained using the CFBC with linear gradient feeding was 9.37×10^9 cells/mL and maximum spore concentration was 8.33×10^9 spores/mL which was approximately 84.4% yield of spore formation. When the final glucose concentration was 100 g/L, the maximum viable cell and spore concentrations obtained using the IFBC with pH-stat^b were 1.38×10^{10} cells/mL and 1.35×10^{10} spores/mL respectively and the yield of spore formation was approximately 97.8%.

Key Words : *Bacillus thuringiensis*, fed-batch, spore formation, pH-stat

서 론

최근에 화학 살충제의 과다한 사용에 의한 대상 곤충의 내성 증가, 생태계 파괴에 의한 부작용 및 인체에 대한 해로운 영향 등의 문제점이 제기되고 있어, 자연계에 존재하는 곤충 병원성 미생물을 이용한 미생물 살충제의 개발에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다(1). 이 중에서 *Bacillus thuringiensis*는 가장 널리 사용되고 많이 연구된 미생물 살충제이며(1), 여러 종류의 *B. thuringiensis* 제제가 이미 미생물 살충제로서의 경제적 중요성이 대두되고 있다(2). *B. thuringiensis*의 곤충에 대한 살충성은 *B. thuringiensis*가 포자의 형성시기에 생성하는 δ -endotoxin에 기인한다. 이때 *B. thuringiensis*에 의한 toxin의 생성은 포자의 형성수에 비례하지만, 생성된 toxin의 살충성 정도는 균주와 사용배지 및 배양조건에 따라 다르다(3). *B. thuringiensis*의 포자형성은 탄소원의 고갈에 의하여 이루어진다고 알려져 있는데, 많은 연구결과에 의하면 포자형성은 탄소원의 고갈뿐만 아니라 질소원과 탄소원의 농도비가 포자형성과 밀접한 관계가 있다고 알려져

있다(4). 즉 *B. thuringiensis*의 회분식 배양에서 endotoxin의 최대 수율은 8 g/L 이하의 초기 glucose 농도에서 얻었으며(5), 최대의 toxin 생산량은 23 g/L의 초기 glucose 농도에서 얻었다(6). 또한 30 g/L의 glucose 농도에서 4×10^9 spore/mL의 포자를 얻었으며, 포자 수의 증가는 생물분석에 의하여 toxin 농도의 증가와 비례함을 보여주었다(2). 반면 Arcas 등(3)은 glucose 농도를 8 g/L 에서 56 g/L로 증가시켰을 때 spore 수도 1.08×10^9 spore/mL 에서 7.36×10^9 spore/mL 까지 증가시킬 수 있다고 보고하였다. 그러나 실질적인 응용을 위해서는 높은 살충성을 지닌 고농도의 포자가 요구된다(7). 그러므로 세포농도와 포자생산을 최대화하기 위해서는 배지와 배양조건을 최적화하는 것이 바람직하다. *B. thuringiensis*의 배양을 위해 사용된 배지는 일반적으로 glucose, starch, molasses 등의 carbon 및 energy source와 peptone, yeast extract, soybean meal 등의 nitrogen source, 그리고 mineral salts로 이루어진다. 높은 수율의 포자를 얻기 위해서는 높은 농도의 nutrients가 포함된 배지가 요구된다. 그러나 Holmberg 등(6)과 Scherrer 등(5)은 높은 농도의 nutrients에서 포자형성과 toxin 생산이 억제될 수 있다고 보고하였다. 즉 Holmberg 등(6)에 의하면 toxin 생산에 사용되는 최대의 당 농도는 23 g/L molasses를 초과할 수 없다고 보고하였다. 또한 Arcas 등(1)에 의하면 초기 glucose 농도가 56 g/L 이상에서는 세포의 비 성장속도와 colony forming unit 값이 급격히 감소하였다. 연속배양에 의한 *B. thuringiensis*의 생산에 대한 연구에서는 배양

†Corresponding Author : Department of Molecular Science and Technology, Ajou University, Suwon 442-749, Korea
Tel : 0331-219-2449, Fax : 0331-216-8777
E-mail : ywryu@madang.ajou.ac.kr

시간이 경과할 수록 포자의 형성이 감소하였으며(8), 또한 회분식 배양 후에 세포를 재 순환시키면서 연속배양을 수행한 경우에도 세포 재 순환의 횟수 증가에 따라 포자의 형성이 감소하였다(9). 따라서 고농도의 포자를 얻기 위해서는 유가식 배양공정이 요구된다. 유가식 배양공정은 높은 농도의 세포를 얻음으로써 생산성을 증가시키며, 높은 기질 또는 영양분의 농도에 의한 세포성장의 억제, 부산물의 생성에 의한 생육억제 및 호기성 배양에서의 용존산소량의 제한과 같은 고농도 세포배양에서 일어나는 문제점들을 최소화시킨다(10). 회분식과 연속식 배양방법을 이용하여 고농도의 포자를 얻기 위한 여러 보고가 있었으나 포자농도는 7×10^9 spores/mL에 도달하지는 못하였다. 따라서 여러 가지 유가식 배양에 의한 고농도의 세포배양과 배양된 세포로부터 높은 수율로 포자를 얻기 위한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지조성

본 연구에 사용한 균주는 서울대학교 농업생명과학대의 강석권 교수님 연구실에 보관중인 *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1을 분양 받아 이용하였다. 균주 보관용 사면배지는 modified NB broth 배지 (10 g/L glucose, 5 g/L Bacto peptone, 3 g/L beef extract)에 15 g/L agar를 첨가한 slant를 제조하여 사용하였다. Slant에 균을 접종시켜 항온 배양기에서 30°C로 24시간 배양한 후 4°C에 보관하면서 사용하였으며, 3주마다 동일한 배지의 slant에 옮겨주었다.

접종용 균주의 배양은 300 mL 삼각 flask에 modified NB broth 배양배지 50 mL을 첨가하여 멸균한 후 균을 접종하여 30°C에서 18시간 동안 150 rpm으로 진탕 배양하여 사용하였다.

배양배지는 다음과 같은 modified GYS medium을 사용하였다. 즉, 8 g/L glucose, 4 g/L yeast extract, 4 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L K_2HPO_4 , 0.07 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.08 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 이다. 이때 glucose, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 는 농축된 stock solution을 제조하여 무균적으로 첨가하였으며, 나머지는 함께 멸균하였다.

유가식 배양에서 최종 배양액의 glucose의 농도가 50 g/L가 되도록 하는 경우에는 glucose와 yeast extract의 비율을 2 : 1 하였으며, 최종 배양액의 glucose 농도가 100 g/L가 되도록 하는 경우에는 1 : 1의 비율로 하였다. 농축배지의 제조에서 glucose 용액은 autoclave로 멸균하였으며, yeast extract 용액은 0.2 μL 의 membrane filter를 이용하여 멸균한 후에 혼합하여 이용하였다. 배지의 초기 pH는 멸균 이전에 2N KOH를 이용하여 7.2로 조절하였다.

배양조건

Glucose 농도가 8 g/L인 배양배지 1.8 L를 3.3 L 발효조 (Bioflo III, NBS co, USA)에 넣고 28°C에서 통기와 교반속도를 변화시켜 포화 용존산소량의 40%를 유지하면서 회분식 배양을 수행하다가 glucose 농도가 약 2~5 g/L 이하가 되는 시점 (6시간 내지 9시간 배양)부터 유가식 배양을 시작하였다. 이때 배양액의 pH는 4N KOH를 이용하여 7.0으로 유지하였으며, foam 발생을 제거하기 위하여 antifoam solution (Sigma, USA)을 3배 희석하여 사용하였다. 유가식 배양동안에 용존산소량은 교반속

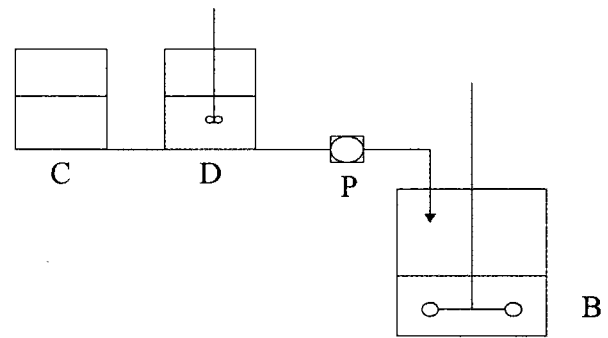


Figure 1. Experimental device employed in fed-batch cultures with linear gradient feed of nutrients. B: bioreactor; C: concentrate reservoir; D: dilute reservoir; P: peristaltic pump

도에 의하여 40%로 유지하다가 교반속도가 800 rpm 이상이 되는 경우에는 air에 pure oxygen을 혼합하여 포화 용존산소량이 30~40%가 되도록 조절하였다. 유가식 배양이 끝난 후에 포자 형성을 유도하는 시기에는 용존산소량을 60%로 유지시켰으며, 배양액의 최종 부피는 2.3 L가 되도록 하였다.

Continuous fed-batch culture (CFBC)에서는 배양액의 glucose 농도가 약 2~5 g/L 이하가 되었을 때 농축된 배지를 일정한 속도로 공급하였다. Linear gradient feeding에 의한 유가식 배양에서는 Srinivasan 등(11)에 의해 보고된 장치를 제조하여 이용하였다. 즉 농도 구배장치(Fig. 1)에서 vessel C와 D는 동일한 모양으로 각각 농축된 배양배지와 희석된 배양배지를 포함하고 있다. 또한 두 vessels은 bottom에서 tube로 연결되어 있으며, peristaltic pump(P)로 vessel D의 배양배지를 일정한 속도로 배양기(B)에 공급하면, 시간에 따라 vessel D의 nutrients (glucose 및 yeast extract) 농도는 증가하면서 linear gradient의 농도구배가 생긴다. 이때 배양배지의 공급속도는 90 mL/h 이었으며, 각 vessel의 배지는 400 mL 이었다. 따라서 농도구배장치를 이용한 유가식 배양에서는 농축배지 제조의 어려움 때문에 초기의 회분식 배양을 1.5 L로 시작하여 최종 배양액의 부피가 2.3 L가 되도록 하였다.

Intermittent fed-batch culture (IFBC)의 경우에는 배양액의 glucose 농도가 약 2~5 g/L 이하가 되었을 때 농축된 배지를 첨가하였다. 이때 pH 조절에 의한 유가식 배양(pH-stat)에서는 pH가 6.8 이하가 되면 농축된 배지가 자동적으로 주입되도록 하였으며, pH가 7.0 이상이면 농축된 배지의 주입이 자동적으로 멈추도록 하였다. 또한 배양기 내에 glucose의 농도가 거의 고갈 되었을 때 pH가 상승하는 점을 이용하여 pH가 7.0에서 상승할 때마다 배양기 내로 농축된 배지가 자동적으로 공급되도록 하는 pH-stat 유가식 배양도 수행하였다.

분석방법

균체량의 측정은 spectrophotometer로 620 nm에서 흡광도를 측정하여 흡광도와 건조균체량의 표준곡선에 의하여 건조균체량으로 환산하였다. Glucose 농도는 Glucose analyzer (YSI SIDEKICK, USA)를 이용하여 측정하였다. Viable cell은 희석한 시료를 열처리 과정 없이 NB plate에 접종하여 colony 수를 측정하여 colony forming unit (CFU)로 나타내었고, spore 수는 희석한 시료를 80°C에서 20분간 열처리 한 후 NB plate에 접종하여 colony 수를 측정하였다. 포자의 관찰은 Coomassie brilliant blue solu-

tion (0.25% Coomassie brilliant blue, 50% ethanol, and 7% acetic acid)을 3분간 처리하고 증류수로 세척 후 건조시킨 다음 광학 현미경을 이용하여 관찰하였다.

결과 및 고찰

Continuous fed-batch culture(CFBC)

초기에 용존산소량을 포화용존산소량의 30~40%로 조절하면서 회분식 배양을 수행하다가 glucose 농도가 약 2~5 g/L 이하에서 500 mL의 농축된 배지 (230 g/L glucose와 115 g/L yeast extract)를 약 8.4 g-glucose/h의 일정한 속도(36.5 mL/h)로 peristaltic pump를 이용하여 공급해주는 CFBC를 수행하였다. 실험결과(Fig. 2)에서 배양액의 glucose 농도는 유가식 배양 초기에 주입되는 glucose 양은 일정한 반면, 세포농도가 낮아 glucose가 축적되어 농축된 배지의 공급이 2시간 경과 후에 최대 10 g/L가 되었으며, 그 이후부터는 주입되는 glucose 양보다 소모되는 양이 더 크기 때문에 배양액의 glucose 농도는 급격히 감소하여 유가식 배양 8시간이 경과한 이후부터는 glucose가 미생물의 성장제한조건이 되었다. 총 50 g/L의 glucose를 소모하여 최대 세포농도는 21시간 배양 시에 40.3 g/L이었으며, 최대 생존세포 수는 8.95×10^9 cells/mL 이었다. 그러나 이때 얻어진 포자농도는 60시간 배양에서 최대 1.55×10^9 spores/mL로서 최대 생존 세포 수에 대한 포자 형성율이 17.3%에 불과하였다. 이는 glucose 제한조건이 유가식 배양에 있어서 포자형성의 유일한 조건이 아니라고 보고한 Kang 등(12)의 보고와 일치하였다.

따라서 일반적으로 세포는 지속적으로 성장하기 때문에 세포가 성장함에 따라 glucose의 농도도 계속적으로 증가시킬 수 있는 농도 구배장치(Fig. 1)를 이용하여 실험을 수행하였다. 이때 최종 배양액의 glucose 농도가 50 g/L가 되도록 하는 linear gradient fed-batch culture는 vessel C에 400 mL의 농축배지 (262.5 g/L glucose 및 131.25 yeast extract)와 vessel D에 400 mL의 희석배지 (25 g/L glucose 및 12.5 g/L yeast extract)를 이용하여 실험을 수행하였다. 실험결과(Fig. 3)에서 41.5 g/L의 세포농도를 얻을 수 있었으며, 이때 세포의 생산성은 2.24 g/L·h로서

CFBC 방법을 이용하여 총 53.6 g/L의 glucose를 소모하여 36 g/L의 세포농도를 얻은 Kang 등(12)의 결과보다 우수하였다. 또한 최대 생존 세포 수는 9.37×10^9 cells/mL이었으며 89%가 포자로 전환되어 8.33×10^9 spores/mL의 포자를 얻을 수 있었다. 이때 소모된 glucose에 대한 포자의 수율은 1.67×10^{11} spores/g-glucose로서 Kang 등(12)이 얻은 결과보다 2.23배 증가하였으며 포자의 생산성도 1.74×10^{11} spores/L·h로서 1.6배 증가하였다.

Linear gradient feeding 방법에 의한 유가식 배양이 고농도의 세포와 포자를 얻는데 적절한 방법으로 판단되어 최종 배양액의 glucose 농도가 100 g/L인 경우에 대한 실험을 수행하여 Fig. 4에 나타내었다. 이때 400 mL의 농축배지는 550 g/L의 glucose와 550 g/L의 yeast extract로 구성되어 있으며, 400 mL의 희석배지는 25 g/L의 glucose와 25 g/L의 yeast extract로 되어 있다. 실험

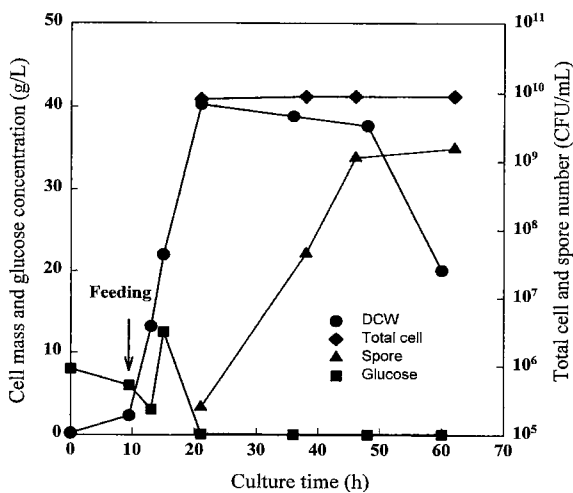


Figure 2. Profiles of cell and glucose concentration, viable cell and spore numbers during a continuous fed-batch culture for the final glucose concentration of 50 g/L. The flow rate was 8.4 g-glucose/h and the arrow indicates the start of medium feeding.

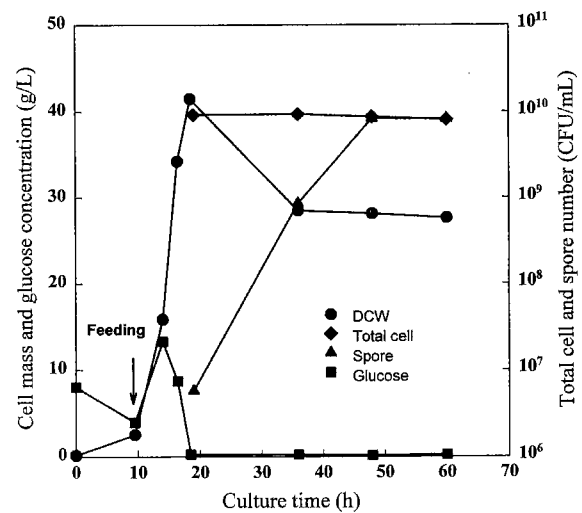


Figure 3. Profiles of cell and glucose concentration, viable cell and spore numbers during a linear gradient fed-batch culture for the final glucose concentration of 50 g/L. The flow rate was 90 mL/h and the arrow indicates the start of medium feeding.

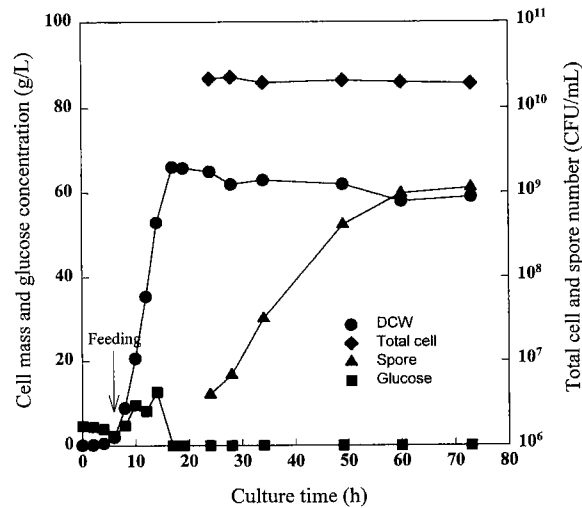


Figure 4. Profiles of cell and glucose concentration, viable cell and spore numbers during a linear gradient fed-batch culture for the final glucose concentration of 100 g/L. The flow rate was 90 mL/h and the arrow indicates the start of medium feeding.

결과에서 최대 세포농도는 66 g/L를 얻을 수 있었으며 생산성은 3.88 g/L·h로서 50 g/L glucose를 이용한 경우보다 1.7배가 증가하였다. 이는 Kang 등(12)이 최종 배양액의 glucose 농도가 100 g/L가 되도록 CFBC를 수행하여 얻은 49.6 g/L의 세포농도와 비교하여 우수하였다. 이러한 결과는 농도 구배장치에 의하여 공급되는 영양분의 농도가 시간이 지남에 따라 계속적으로 증가하여 세포성장에 요구되는 영양분의 양과 거의 유사한 농도로 영양분이 배양기로 공급됨으로써 영양분의 농도가 세포성장을 위한 적절한 농도로 유지되었기 때문으로 사료된다. 그러나 최대 생존 세포 수는 1.30×10^{10} cells/mL로서 매우 높았으나 포자형성이 거의 이루어지지 않아 결국 얻어진 포자는 1.14×10^9 spores/mL로 8.8%에 불과하였다. 이러한 결과는 CFBC 방법에 의해서는 공급되는 glucose 농도를 10 g/L에서 50 g/L까지 증가시킬 경우에 포자의 농도는 증가하지만 100 g/L 이상의 농도에서는 오히려 감소한다는 Kang 등(12)의 결과와 일치하였다. 따라서 높은 농도의 세포로 성장하는 동안에 세포의 생리적 상태가 포자를 형성하는 능력에 영향을 미치는 것으로 사료되었다.

결과적으로 CFBC 방법에 의해서는 고농도의 세포를 얻으면서 동시에 고농도의 포자를 얻는 것이 어렵다고 판단된다. 최종적으로 CFBC 방법에 의한 유가식 배양에 대한 실험결과들을 Table 1에 나타내었다. 유가식 배양을 최종 배양액의 glucose 농도가 50 g/L가 되도록 하는 경우에 최대 세포농도, 세포와 포자에 대한 생산성 및 소모된 glucose에 대한 포자수율 등 모든 면에서 농도 구배장치를 이용한 CFBC 방법이 가장 우수하였으며, 기존에 보고된 어느 결과들보다도 높았다. 그러나 농도 구배장치를 이용하여 최종 배양액의 glucose 농도가 100 g/L가 되도록 하는 유가식 배양에서는 포자형성이 거의 이루어지지 않았기 때문에 고농도 포자생산을 위한 유가식 배양공정으로는 적절하지 않았다.

Intermittent fed-batch culture(IFBC)

CFBC에 의해서는 고농도의 포자를 얻을 수 없었기 때문에 유가식 배양공정의 다른 방법인 IFBC를 수행하였다. IFBC는 회

분식 배양을 수행하다가 배양액의 glucose 농도가 약 2~5 g/L 이하가 될 때마다 농축된 배지를 간헐적으로 첨가하여 주었다. 최종 배양액의 glucose 농도가 50 g/L가 되도록 하기 위하여 500 mL의 농축된 배지(230 g/L glucose와 115 g/L yeast extract)를 3회에 나누어 첨가해주는 IFBC에 대한 실험을 수행하여 Fig. 5에 나타내었다. 실험결과에서 42.1 g/L의 최대 세포농도를 얻을 수 있었으며, 세포의 생산성은 1.83 g/L·h 이었다. 최대 생존 세포 수는 CFBC를 이용하여 얻은 세포농도와 거의 유사하였으나 생산성은 낮았다. 이는 유가식 배양초기에 배양액의 glucose 농도가 10 g/L가 되도록 주입한 것은 적절하였으나 그 후에 두 번 20 g/L의 glucose가 되도록 주입한 것은 너무 높은 농도의 당이 공급되어 세포가 대수적으로 성장하다가 고농도의 당에 대한 적응기간이 존재하게 되어 결과적으로 최대 세포농도에 이르는 시간이 지연되었다고 사료된다. 최대 생존 세포 수는 5.18×10^9 cells/mL 이었으며, 97%가 포자로 전환되어 5.03×10^9 spores/mL의 포자를 얻을 수 있었다. 포자의 생산성은 9.5×10^{10} spores/L·h로서 농도 구배장치를 이용한 유가식 배양법 보다 낮았다. 이러한 결과는 위에서 언급한 바와 같이 고농도의 당에 의한 세포성장의 지연에 따라 초래된 결과로 사료된다.

그러나 IFBC 방법을 사용한 경우 고농도의 세포와 90% 이상의 포자 형성율을 얻을 수 있었기 때문에 최종 배양액의 glucose 농도가 100 g/L가 되도록 하는 IFBC에 대한 실험을 수행하였다. 앞의 결과에서 농축배지를 초기에 고농도로 첨가하는 경우에 세포성장이 지연되었기 때문에 500 mL의 농축배지(460 g/L의 glucose와 460 g/L의 yeast extract)의 공급을 배양액의 glucose 농도가 10→10→20→20→40 g/L가 되도록 첨가하여 주었다. 실험결과(Fig. 6)에서 세포는 매우 빠르게 성장하여 총 29 시간 배양 시에 76.2 g/L의 세포농도를 얻을 수 있었으며, 세포의 생산성은 2.63 g/L·h로서 최종 배양액의 glucose 농도가 50 g/L인 경우보다 1.4배 증가하였다. 이와 같이 세포의 생산성이 향상된 이유는 농축배지의 공급 양이 세포성장에 필요한 양만큼 적절하게 첨가되었기 때문으로 사료된다. 최대 생존 세포 수는 1.50×10^{10} cells/mL로서 85%가 포자로 전환되어 1.28×10^{10}

Table 1. Cell and spore production of *B. thuringiensis* by continuous fed-batch culture.

Fermentation kinetic parameters	8.4 g-glucose/h	Gradient feeding	
	50 g/L glucose	50 g/L glucose	100 g/L glucose
X _m (g-cell/L)	40.3	41.5	66.0
Y _{x/s} (g-ccc/g-glucose consumed)	0.81	0.83	0.66
P _{cell} (g-cell/L·h)	1.92	2.24	3.88
Maximum viable cell number ($\times 10^9$ cells/mL)	8.95	9.37	13.0
Maximum spore number ($\times 10^9$ spores/mL)	1.55	8.33	1.14
Sporulation ratio (%)	17.3	88.9	8.8
P _{spore} ($\times 10^{11}$ spores/L·h)	0.25	1.74	0.17
Spore yield ($\times 10^{11}$ spores/g-glucose consumed)	0.31	1.67	0.11

X_m: Maximum cell concentration(g-cell/L)

Y_{x/s}: Cell mass yield(g-cell/g-glucose consumed)

P_{cell}: Volumetric cell productivity(g-cell/L·h)

Sporulation ratio: Maximum spore number/maximum viable cell number $\times 100$ (%)

P_{spore}: Volumetric spore productivity(spore/L·h)

Spore yield: spores/g-glucose consumed)

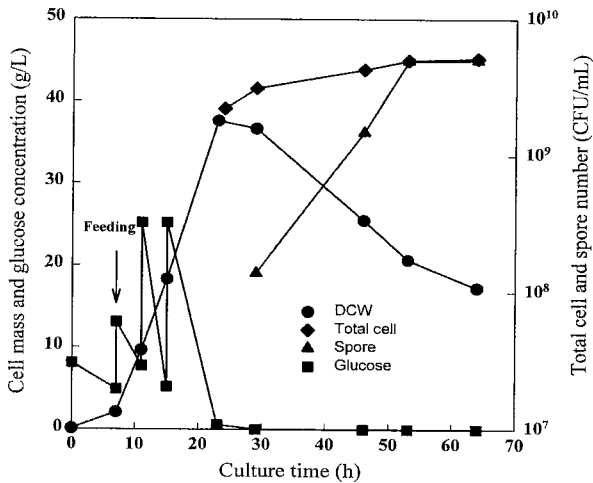


Figure 5. Profiles of cell and glucose concentration, viable cell and spore numbers during a intermittent fed-batch culture for the final glucose concentration of 50 g/L. The arrow indicates the start of medium feeding.

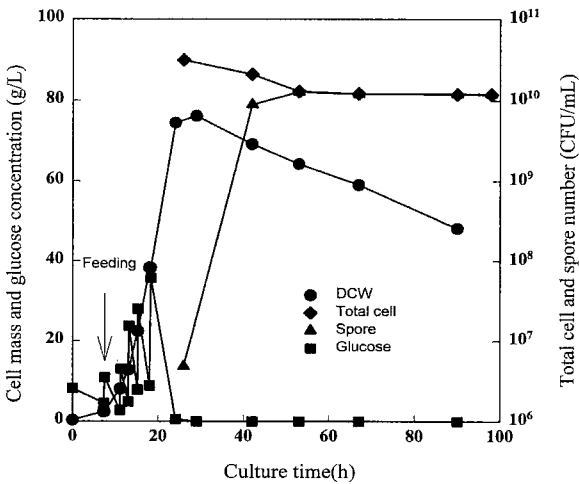


Figure 6. Profiles of cell and glucose concentration, viable cell and spore number during a intermittent fed-batch culture for the final glucose concentration of 100 g/L. The arrow indicates the start of medium feeding.

spores/mL의 포자를 얻을 수 있었으며, 이때 포자 생산성은 2.41×10^{11} spores/L · h로서 Kang 등(12)이 최종 배양액의 glucose 농도가 100 g/L인 경우에 얻은 세포농도인 72.6 g/L 보다는 약간 높은 값을 얻을 수 있었으나 포자의 생산성은 Kang 등(12)이 얻은 2.77×10^{11} spores/L · h에 비해 약간 낮았다. 그러나 IFBC 방법은 glucose 농도가 2~5 g/L 이하가 될 때마다 glucose 농도를 측정하여 여러 차례 농축된 배지를 배양기에 공급해야 함으로 자동화에 대한 어려움과 조절이 용이하지 않다는 문제점이 있다.

*B. thuringiensis*의 회분식 배양동안에 glucose가 소모되는 시기에는 유기산들이 생성되면서 pH가 낮아지고, 배양액에 glucose가 거의 고갈되면 생성된 유기산이 다시 탄소원으로 이용되기 때문에 pH가 상승한다(13). 따라서 pH 값의 상승을 농축배지의 feeding 신호로 하여 배지를 공급하여주는 유기식 배양에 대한 연구를 최종 배양액의 glucose 농도가 100 g/L가 되도록 하는 실험을 수행하였다. 실험결과(Fig. 7) 24시간 배양에서 73 g/L의 세포농도를 얻을 수 있었으며, 세포의 생산성이 3.32 g/L · h로서 IFBC 방법에 비해 1.2배 증가하였다. 최대 생존 세포 수는

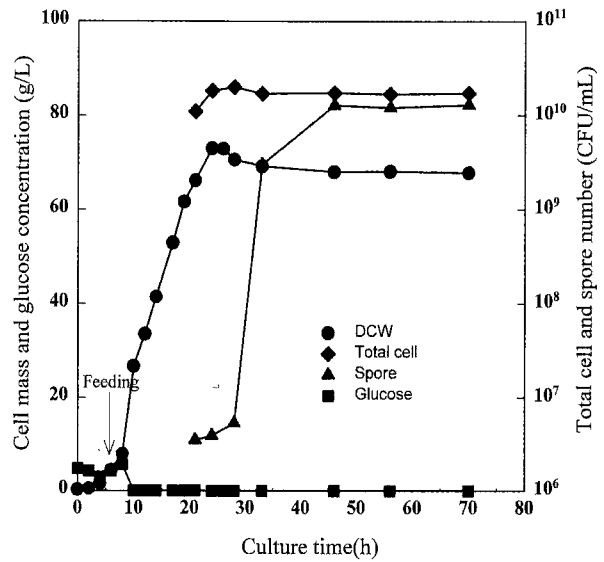


Figure 7. Profiles of cell and glucose concentration, viable cell and spore numbers during a pH-stat^a fed-batch culture for the final glucose concentration of 100 g/L. The arrow indicates the start of medium feeding.

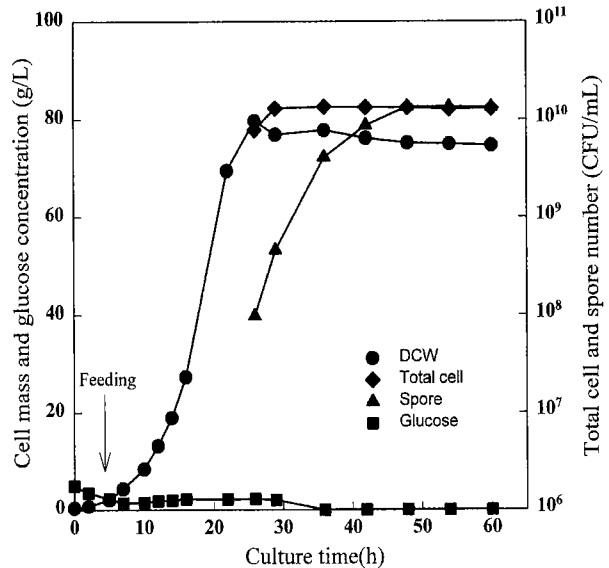


Figure 8. Profiles of cell and glucose concentration, viable cell and spore number during a pH-stat^b fed-batch culture for the final glucose concentration of 100 g/L. The arrow indicates the start of medium feeding.

1.52×10^{10} cells/mL 이었으며, 1.33×10^{10} spores/mL의 포자를 얻어 88%의 포자 형성율을 보였다. 이때 포자의 생산성은 2.89×10^{11} spore/L · h로서 매우 높았다.

또 다른 종류의 pH 조절을 신호로 하여 농축된 배지를 첨가하는 pH-stat에 의한 유기식 배양을 최종 배양액의 glucose 농도가 100 g/L가 되도록 하여 수행하였다. 즉 세포 성장시기에 유기산이 생성되어 배지의 pH가 낮아진다는 점에 착안하여 pH가 떨어질 때마다 당이 주입되도록 하였다. 실험결과(Fig. 8)에서 세포는 빠르게 성장하여 26시간 배양에서 최대 79.7 g/L의 세포농도를 얻을 수 있었으며, 세포의 생산성은 3.07 g/L · h로서 total

Table 2. Cell and spore production of *B. thuringiensis* by IFBC.

Fermentation kinetic parameters	IFBC		pH-stat (100g/L glucose)	
	50g/L glucose	100g/L glucose	a	b
X _m (g-cell/L)	42.1	76.2	73.0	79.7
Y _{xs} (g-cell/g-glucose consumed)	0.84	0.76	0.73	0.80
P _{cell} (g-cell/L · h)	1.83	2.63	3.32	3.07
Maximum viable cell number (×10 ⁹ cells/mL)	5.18	15.0	15.2	13.8
Maximum spore (×10 ⁹ spores/mL)	5.03	12.8	13.3	13.5
Sporulation ratio (%)	97.0	85.3	88.0	97.8
P _{spore} (×10 ¹¹ spores/L · h)	0.95	2.41	2.89	2.81
Spore yield (×10 ¹¹ spores/g-glucose consumed)	1.00	1.28	1.33	1.35

a: The increase of pH was used the indicator of medium feeding.

b: The decrease of pH was used the indicator of medium feeding

cell retention culture 방법을 이용하여 82.2 g/L의 세포농도를 얻은 Kang 등(14)의 결과와도 비교할만하다. 최대 생존 세포 수는 1.38×10^{10} cells/mL로서 거의 대부분이 포자로 전환되어 1.35×10^{10} spores/mL의 포자를 얻었으며, 소모된 glucose에 대한 포자 수율은 1.35×10^{11} spores/g-glucose로서 다른 유가식 배양공정에 비하여 매우 우수하였다. 포자의 생산성 역시 2.81×10^{11} spores/L · h로서 pH-stat에 의한 유가식 배양 공정이 고농도 포자생산에 있어서 매우 우수하였다. 더구나 pH-stat 방법에 의한 유가식 배양에서는 농축 배지의 주입이 pH control mode에 의해 자동으로 주입되므로 배양이 비교적 간단하며, 농도 구배장치나 ceramic filter system같은 부수적인 장치가 필요 없다. 또한 당의 주입이 세포가 성장할 때마다 이루어지므로 매우 빠르게 세포포장이 가능하고 배양액의 glucose 농도도 약 2 g/L 정도로 일정하게 유지되었다.

IFBC방법에 의한 실험결과들을 Table 2에 나타내었는데, pH-stat의 경우 70 g/L이상의 고농도 세포와 높은 생산성, 그리고 90% 이상의 높은 포자 형성율로 빠른 시간 내에 고농도의 포자를 생산할 수 있었기 때문에 *B. thuringiensis*의 고농도 포자를 생산하기 위해서는 공정제어 등을 고려해 볼 때 pH-stat 방법에 의한 유가식 배양이 매우 우수함을 알 수 있었다.

요 약

*Bacillus thuringiensis*를 생물농약으로 이용하기 위해서는 고농도의 포자형성에 의한 높은 살충성의 δ -endotoxin를 생산하는 것이 중요하다. 따라서 본 연구에서는 *B. thuringiensis*의 고농도 배양에 의한 높은 포자형성 수율을 얻기 위하여 40%의 용존산소량과 28°C에서 여러 가지 방법의 유가식 배양법을 검토하였다. 최종 배양액의 glucose 농도가 50 g/L가 되도록 하는 경우의 유가식 배양에서는 continuous fed-batch culture의 linear gradient feeding 법에 의하여 9.37×10^9 cell/mL의 최대 생존 세포 수와 8.33×10^9 spore/mL의 최대 포자 수를 얻었으며, 이때의 포자 형성율은 88.9% 이었다. 최종 배양액의 glucose 농도가 100 g/L가 되도록 하는 경우의 유가식 배양에서는 intermittent fed-batch culture의 pH-stat 법에 의하여 1.38×10^{10} cell/mL의 최대 생존 세포 수와 1.35×10^{10} spore/mL의 최대 포자 수를 얻었으며, 이

때의 포자 형성율은 97.8% 이었다.

감 사

본 연구는 1997년 교육부 학술연구조성비(생물화공)에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Arcas, J., O. Yantorno, and R. Ertola (1987), Effect of High Concentration of Nutrients on *Bacillus thuringiensis* Cultures. *Biotechnol. Lett.*, **9**(2), 105-110.
2. Goldberg, I., B. Sneh, E. Battat, and D. Klein (1980), Optimization of a Medium for a High Yield Production of Spore-crystal Preparation of *Bacillus thuringiensis* Effective against the Egyptian Cotton Leaf Worm *Spodoptera littoralis* Biosd. *Biotechnol. Lett.*, **2**, 419-426.
3. Arcas, J., O. Yantorno, E. Arrgràs, and E. Ertol. (1984), A New Medium for Growth and Delta-endotoxin Production by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Biotechnol. Lett.*, **6**, 495-500.
4. Sakharova, Z. V., Y. N. Ignatenko, M. P. Khovrychev, V. P. Lykov, I. L. Rabotnova, and V. V. Shevtsov (1984), Sporulation and Crystal Formation in *Bacillus thuringiensis* with Growth Limitation via the Nutrient Sources. *Microbiology*, **53**, 221-227.
5. Scherrer, P., P. Lüthy, and B. Trump (1973), Production of δ -endotoxin by *Bacillus thuringiensis* as a Function of Glucose Concentrations. *Appl. Microbiol.*, **25**, 644-646.
6. Holmberg, A., R. Sievämen, and G. Carlberg (1980), Fermentation of *Bacillus thuringiensis* for Exotoxin Production : Process Analysis Study. *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 1707-1724.
7. Stockdale, H. (1985), Microbial insecticides, In *Comprehensive Biotechnology* Vol. **3**, p.949, Pergamon Press, Oxford.
8. Blokhina, T. P., Z. V. Sakharova, Yu. N. Ignatenko, I. L. Rabotnava, and Yal Rautenshtein (1984), Variability in *Bacillus thuringiensis* under Various Growth Conditions. *Microbiology*, **53**, 340-344.
9. Sleinger, L. B., P. S. Dawson, and G. G. Khachatourians (1988), Behavior of *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* under Continuous Phased Cultivation in a Cyclone Fermentor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 247-253.

10. L. Yee, and H. W. Blanch (1992), Recombinant Protein Expression in High Cell Density Fed-batch Cultures of *E. coli*. *Biotechnology*, **10**, 1550-1556.
11. Srinivasan, V. R., M. B. Fleenor, and R. J. Summers (1977), Graient-feed Method of Growing High Cell Density Cultures of *Cellulomonas* in a Bench-scale Fermenter. *Biotech. Bioeng.*, **19**, 15-155.
12. 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.
13. Park, C. Y., S. K. Kang, and Y. W. Ryu (1997), Effect of Glucose and Dissolved Oxygen Concentrations on the Cell Growth and Sporulation of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **12**(4), 377-382.
14. Kang, B. C., S. Y. Lee, and H. N. Chang (1993), Production of *Bacillus thuringiensis* Spores in Total Cell Retention Culture and Two-stage Continuous Culture using a Internal Ceramic Filter System. *Biotech. Bioeng.*, **42**, 1107-1112.