

고농도 세포배양에서 *Bacillus thuringiensis*의 세포 성장과 포자 형성 속도

강 병 철 · 장 호 남

¹동의대학교 공과대학 화학공학과, [†]한국과학기술원 화학공학과 및 생물공정연구센터
(접수 : 2000. 11. 20., 게재승인 : 2001. 1. 31.)

Growth Kinetics and Sporulation of *Bacillus thuringiensis* in High Cell Density Culture

Byung-Chul Kang¹ and Ho-Nam Chang[†]

¹Department of Chemical Engineering, Dongeui University, Pusan 614-714, Korea

[†]Department of Chemical Engineering and BioProcess Engineering Research Center, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejon 305-701, Korea

(Received : 2000. 11. 20., Accepted : 2001. 1. 31.)

High cell density culture of *Bacillus thuringiensis* was conducted in fed-batch culture and TCRC using a bioreactor incorporating ceramic membrane filter. Cell growth of *B. thuringiensis* in fed-batch culture increased linearly, which was well matched by the results of cell growth modeling. In spite of the slower growth rate during fed-batch culture, no spore formation was observed, which was contrary to the results of continuous culture. Changing culture mode to batch culture after fed-batch operation induced a 2.7×10^9 CFU/mL spore concentration using a 300 g/L glucose feed concentration. In TCRC operation incorporating ceramic filter within the bioreactor, the effect of glucose feed concentrations on the cell growth and spore formation of *B. thuringiensis* was determined. A maximum cell concentration of 1.8×10^{10} CFU/ml, which corresponds to 82.6 g-cell/L, was obtained in the TCRC using a 50 g/L glucose feed concentration. In the TCRC, cell growth increased linearly and glucose concentration was limited, which agreed well with the results of cell growth modeling. No spore formation was observed except when 1 g/L of glucose was fed. Changing to batch culture induced a 1.2×10^{10} CFU/mL of spore concentration, which was the highest spore concentration obtained among the various culture modes examined. The optimal glucose feed rate was found to be 0.55 g-glucose/h.

Key Words : TCRC, fed-batch, *Bacillus thuringiensis*, ceramic filter

서 론

*Bacillus thuringiensis*는 미생물 살충제로 널리 사용되고 있다(1,2). 그람양성균인 *B. thuringiensis*는 어떤 조건하에서 세포가 포자로 전환되면서 살충력을 갖는 단백질 toxin도 같이 형성됨으로써 살충제의 역할을 한다. 지금까지 *B. thuringiensis*의 배양에 대한 연구는 주로 우수한 균주의 선발이나 배지의 최적화에 집중되어 왔다(3,4). 대부분의 경우 *B. thuringiensis* 배양 방법은 회분식 방법을 사용하고 있다(5). 따라서 회분식 배양방법으로는 고농도 세포배양을 통한 세포 및 제품의 수

율과 생산성을 향상시키는 것은 한계가 있다.

고농도 세포배양을 위한 방법으로는 크게 유가식 배양(fed-batch culture)과 기존 회분식 반응기에 세포를 배양액과 분리할 수 있는 원심분리기나 막 필터 장치를 사용하는 세포 재순환(cell recycle) 생물반응기의 조업방법이 있다. 유가식 배양방법은 회분식 배양을 하면서 세포농도를 최적화할 수 있게 배지를 반연속식으로 투입하여 주는 것이다. 즉 연속식과 회분식 배양의 중간에 해당되는 방법이라고 할 수 있다. 산업체에서 유가식 배양방법이 널리 채택되고 있으며 배지를 공급하는 방법은 주로 경험에 의존하여 생산물의 농도 및 생산성을 최적화하고 있고 유가식 배양방법은 각 제품마다 산업체의 비밀에 해당되기 때문에 잘 알려져 있지 않은 실정이다. 유가식 배양에 의한 생산되는 제품으로는 세포 그 자체가 배양의 목적이 되는 빵효모나 단세포 단백질(single cell protein) 등이 있으며(6,7) 그 외에도 세포가 아닌 제품을 목적으로 하는 항생제, 비타민, 효소 등의 생산에 유가식 배양은

[†]Corresponding Author : Department of Chemical Engineering and BioProcess Engineering Research Center, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejon 305-701, Korea.
Tel : +82-42-869-8801, Fax : +82-42-869-8800
Email : hnchang@sorak.kaist.ac.kr

산업적으로 널리 활용되고 있다(8,9).

세포 재순환 배양방법은 생물반응기에 원심분리거나 막 필터같은 장치를 연결하여 세포와 배양액을 분리하는 것으로 세포는 반응기안으로 재순환시키고 배양액은 배출시키는 것이다(10). 이와 같이 세포를 재순환시킴으로써 회분식배양이나 연속배양 방법에 비해 고농도의 세포를 얻을 수 있고 세포의 생산성도 증가하는 장점을 가지고 있다(11,12). 또한 이 반응기는 유기산이나 알코올같이 세포의 성장을 저해하는 물질을 필터나 원심분리에 의해 효과적으로 제거함으로써 높은 생산성을 얻을 수 있는 장점도 가지고 있다(13,14).

본 연구는 유가식 배양 및 기존의 세포재순환 배양방법과 달리 생물반응기 내부에 세라믹 막 필터를 장착한 TCRC(total cell retention culture) 조업을 통해서 *B. thuringiensis*의 고농도 세포배양을 실시하면서 세포 성장 및 포자 형성의 특성을 파악하고 고농도 배양에서 세포 성장속도를 모델링하여 실험 결과와 비교하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

본 실험의 균주는 *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 (ATCC 33679)을 사용하였다. 균주는 nutrient agar stock plate [0.8% Nutrient Broth(Difco), 0.5% NaCl 그리고 2.0% Bacto-Agar(Difco)]에서 4°C로 보관하였고 2주일마다 계대하였다. 세포 성장 및 포자 형성을 위한 기본 배지로 GYS배지를 사용하였다(15). GYS배지는 증류수 1L에 1.0 g glucose, 2.0 g yeast extract, 2.0 g (NH₄)₂SO₄, 0.5 g K₂HPO₄, 0.41 g MgSO₄·7H₂O, 0.08 g CaCl₂·2H₂O, 0.07 g MnSO₄·H₂O를 포함하고 있다. 침전을 방지하기 위해 glucose, MgSO₄·7H₂O, CaCl₂·2H₂O 그리고 MnSO₄·H₂O를 따로 멸균하였고 (NH₄)₂SO₄, K₂HPO₄ 그리고 yeast extract의 용액은 2N KOH를 사용하여 pH를 7.3으로 조정하였다.

세포 질량과 생균 수의 측정

건조 세포질량은 배양액을 샘플링하여 원심분리 한 후 증류수로 세척하여 다시 원심분리하였다. 이 과정을 두 번 반복하였고 회수된 세포를 105°C 오븐에서 16시간 후에 건조질량의 무게를 측정하였다. 흡광도는 1.0 cm light path를 가진 spectrophotometer (Milton Roy S-21)을 사용하여 610 nm에서 측정하였다. 이것을 이용하여 세포 건조질량과의 상관관계를 나타내었는데 흡광도 1.0 O.D.는 0.4 g/L 세포건조질량에 해당하였다.

생균수의 측정은 nutrient broth agar 배지에서 pour plate 방법을 사용하였고 30°C에서 배양하여 colony가 형성되면 그 개수를 측정하여 colony forming unit (CFU)를 결정하였다. 열저항성을 갖는 포자의 결정은 65°C에서 45분 가열한 후 위와 같은 방법으로 colony forming unit를 결정하였다.

연속 배양, 유가식 배양과 TCRC 조업

연속배양은 1 L의 발효기(Bioflo C-30, New Brunswick Scientific, NJ, USA)를 사용하여 실시하였고 공급되는 배지는 GYS배지를 사용하였으며 공급 유량을 달리하면서 희석율(dilu-

tion rate)을 조절하였다. 정상상태에서 샘플링은 세포농도와 기질의 농도가 일정하게 유지되는 3-5 체류시간이 지난 다음에 실시하였다.

유가식 배양은 2L의 발효기 (Eyela, M-100, Tokyo, Japan)에서 실시하였으며 배양조건은 pH 7.0과 온도 30°C로 유지하였다. 그리고 용존산소농도를 2-3 ppm으로 유지하기 위해 공기와 산소를 혼합하여 40%(v/v)의 산소농도가 되도록 공기를 공급하였다. 공급배지는 일정속도로 peristaltic 펌프 (Cole Parmer, Chicago, IL, USA)로 공급하였고 이 때 초기 배양액의 부피는 0.7 L로 하였고 공급속도는 70 mL/h로 하였고 배양액이 1.7 L에 이르면 배지공급을 중단하였다. 배지를 공급하기 전에 회분식으로 배양으로 세포가 지수성장기에 도달하는 5-8 hr에 유가식배양을 시작하였다. 공급되는 배지의 탄소원인 포도당의 농도를 달리하면서 세포성장속도와 포자형성을 관찰하였다.

TCRC (total cell retention culture) 조업은 세라믹 막 필터 모듈은 내장한 2L의 발효기 (Bioflo C-30, New Brunswick Scientific, NJ, USA)에서 1L의 부피로 운전하였다(12). TCRC 조업은 회분식 배양으로 세포가 지수성장기에 들어가는 시점부터 포도당을 포함한 공급배지를 peristaltic 펌프(Cole Palmer, Chicago, IL, USA)로 공급하였다. 배지의 공급과 막 필터를 통한 배양액의 배출속도는 110 mL/h 혹은 170 mL/h로 일정하게 하였고 이것은 희석율이 각각 0.11 h⁻¹ 과 0.17 h⁻¹에 해당하는 것이다. TCRC조업에서는 정해진 포도당 공급배지의 농도를 달리하면서 세포성장속도와 포자형성의 특성을 관찰하였다.

세포성장 모델링

Monod 식을 따르는 비구조적 모델을 사용하여 세라믹 막 필터를 사용한 TCRC 운전에서 세포성장의 특성을 관찰하기 위해 세포 성장에 대한 모델링을 실시하였다. 물질 수지식을 세우면 다음과 같다.

TCRC 조업에서 세포와 기질에 대한 물질 수지는

$$\frac{dX}{dt} = \mu X$$

$$\frac{dS}{dt} = D(S_o - S) - \frac{\mu X}{Y}$$

로 표시된다. 여기서 μ 와 Y 는 각각 비성장속도와 세포수율이고, D 는 희석율이고, X 는 세포농도이고, S_o 와 S 는 각각 기질의 공급농도와 배양액 중의 농도이다. 기질 제한(substrate limiting) 조건에서는 즉 $\frac{dS}{dt} = S \approx 0$ 에서는 세포 성장은 다음과 같이 선형적으로 증가한다.

$$X = X_o + YD S_o t$$

여기서 X_o 는 초기 세포농도이다.

결과 및 고찰

연속배양에서 희석율에 대한 세포성장속도와 포자형성의 영향 GYS배지를 사용하여 연속배양을 실시하였고 희석율에 대

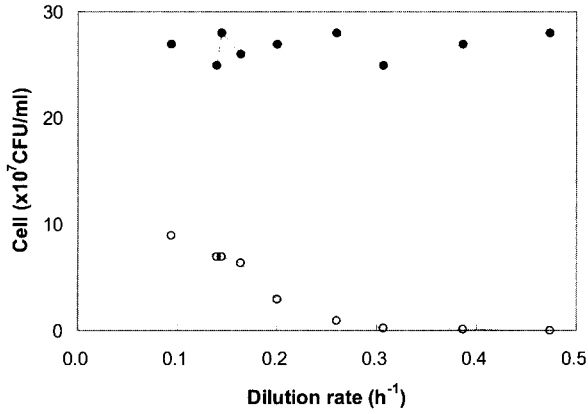


Figure 1. Continuous culture of *B. thuringiensis* in GYS medium. (●, total cell; ○, spore)

한 세포 성장 및 포자 형성의 영향을 조사하였다 (Figure 1). 포자의 생성비율은 희석율이 낮을수록 증가함을 알 수 있다. 이런 경향은 포자형성균에 대한 Pirt 등(16,17)의 실험과 유사한 특성을 나타내었다. 본 실험에서 각 희석율에서 배양액 중에 포도당 농도는 제한되었고 이것으로 탄소원인 포도당 제한 상태하에서의 연속배양이었다. 희석율이 0.4 h⁻¹ 이상에서는 연속배양에서 포자의 생성을 관찰할 수 없었다. 가장 낮은 희석율인 0.09 h⁻¹에서는 전체 세포농도에서 포자가 차지하는 비율은 33%였다. 일반적으로 연속배양이 상업적인 가치를 갖기 위해서는 높은 희석율에서 높은 생산물의 농도를 얻는 것이 효과적이데 생산성(productivity)은 희석율과 생산물 농도의 곱으로 나타나기 때문이다. 이런 측면에서 *B. thuringiensis*를 연속배양에 의해 생산하는 것은 불리한데 그것은 포자의 농도가 연속배양에서 희석율에 반비례하기 때문이다. 하지만 본 실험에서 포자의 생성과 희석율의 관계를 통해서 세포의 성장속도를 감소시킬 수 있는 고농도 배양방법을 채택하면 효과적으로 *B. thuringiensis*를 생산할 수 있을 것으로 기대된다.

유가식 배양에서 *Bacillus thuringiensis*의 성장 및 포자형성 특성

본 실험에서는 배지를 일정한 속도로 공급하고 또한 배지의 포도당의 농도를 달리하면서 유가식 배양에서 세포성장 및 포자형성의 특성을 조사하였다(Figure 2). Figure 2에서 알 수 있듯이 각 공급배지의 농도에서 세포성장은 앞에서 제시된 비구조적 모델과 잘 일치하는 선형적으로 증가하였고 공급배지의 포도당 농도를 높일수록 더 높은 세포농도를 얻을 수 있었다. 공급배지의 포도당 농도를 100 g/L, 200 g/L 그리고 300 g/L로 공급하였을 때 유가식 배양이 끝난 후의 세포농도는 각각 39.2 g/L, 44.0 g/L 그리고 51.6 g/L였다. 세포 농도의 변화는 모델링의 결과와 같이 선형적으로 증가하였고 이에 따라 세포의 비성장속도는 계속 감소하였지만 유가식 배양동안에 포자형성은 관찰할 수 없었다.

일정속도로 배지를 공급하는 유가식 배양에서 세포의 성장은 선형성을 나타내는데 이것은 계속적으로 비성장속도가 감

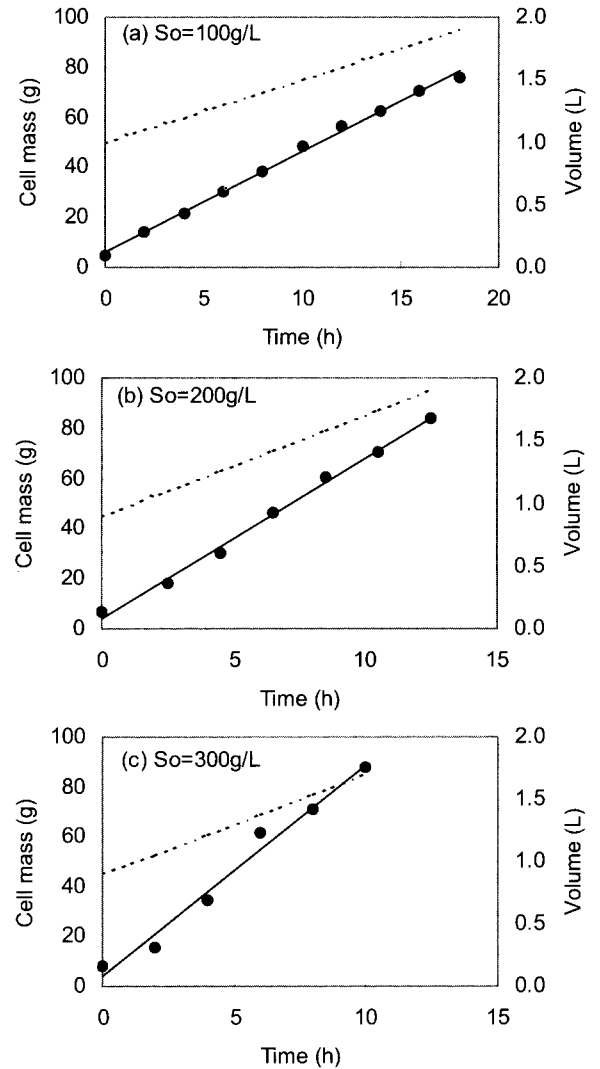


Figure 2. The effect of feeding glucose concentration on the growth of *B. thuringiensis* in fed-batch culture. (●, cell mass; solid line, modeling result; dotted line, culture volume)

소하는 것을 의미한다. 따라서 유가식 배양에서 낮은 비성장속도에서 포자형성을 관찰할 수 없는 것은 연속배양과 유가식 배양의 서로 다른 특성에 기인한 것으로 생각된다. 즉 연속배양은 정상상태하에서의 조업인 반면에 유가식 배양은 세포의 농도가 계속적으로 변하는 비정상상태하의 운전이다. 따라서 세포의 생리특성도 같은 비성장속도에서도 연속배양과 유가식배양에서 전혀 다른 성질을 나타낼 것에 기인한다고 생각된다.

유가식 배양이 끝난 후에 다시 회분식 배양을 통해서 세포를 포자로 전환시키고자 하였다. 이때 300 g/L의 포도당 농도로 공급한 유가식 배양의 경우에만 2.7 × 10⁹ CFU/mL의 포자를 얻을 수 있었다. 나머지 100과 200 g/L의 포도당 농도를 공급한 경우에는 대부분의 세포가 포자를 형성하지 않고 용해(lysis)되는 현상을 보였다. 이것은 세포가 포자로 전환되는데 저해되는 acetate가 유가식 배양에서 축적되는 것이 하나의 원인이라고 생각된다(12). 따라서 일정속도로 배지를 공급하는 유가식 배양은 세포의 고농도배양을 이룰 수 있지만

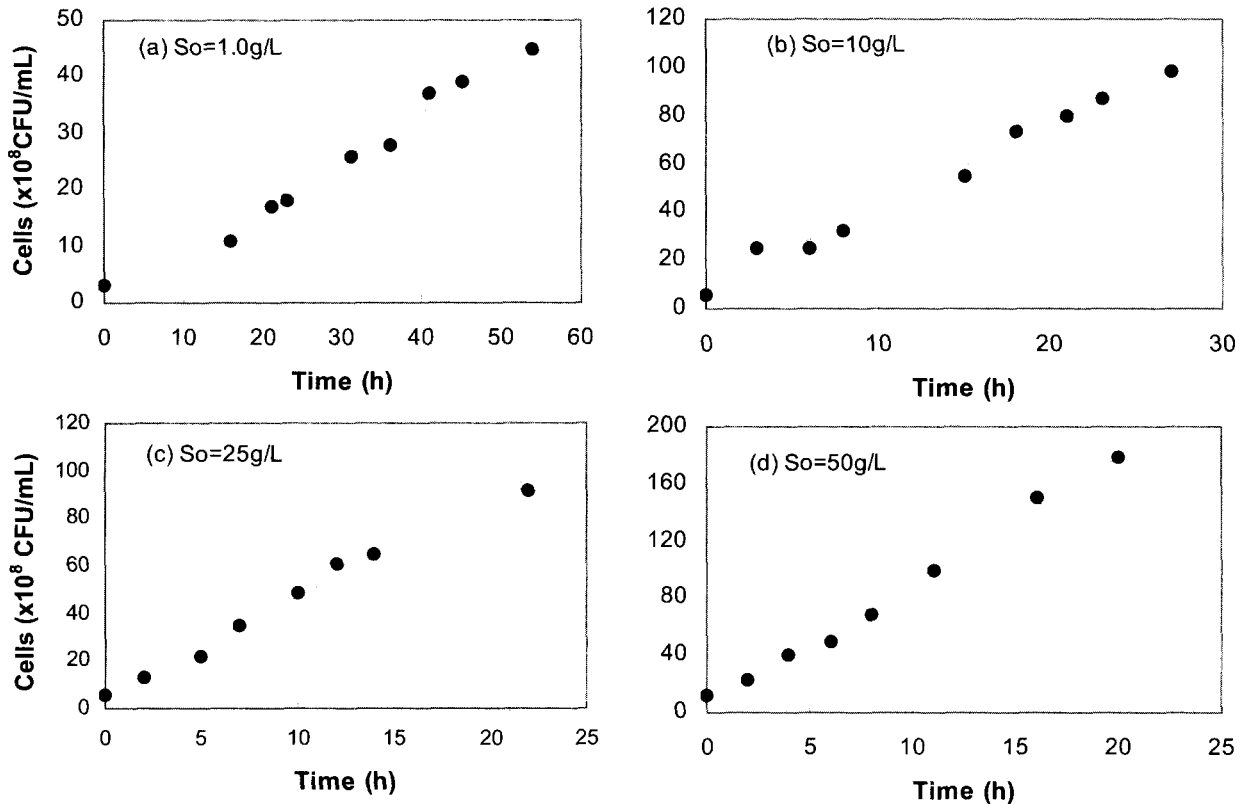


Figure 3. The effect of feeding glucose concentrations on the growth of *B. thuringiensis* in TCRC operation. Feeding glucose concentration (a) 1.0 g/L, (b) 10 g/L, (c) 25 g/L, (d) 50 g/L. (●, cell mass; solid line, modeling result)

포자형성은 불리함을 알 수 있다. 따라서 세포의 고농도 배양과 함께 포자형성을 이루기 위해서는 포자형성의 저해물질인 acetate를 배양액 중에서 제거할 수 있는 시스템 개발이 우선되어야 할 것으로 생각된다.

TCRC조업에서 *Bacillus thuringiensis*의 성장 및 포자형성 특성

유가식 배양에서는 고농도 세포배양을 달성할 수 있지만 배지의 지속적인 공급으로 인해 반응기 조업에 제한을 받게 되고 또한 acetate의 축적으로 포자형성을 저해받게 된다. 하지만 막을 내장한 TCRC 조업에서는 배지를 공급하고 또한 계속해서 여과하여 배출함으로써 배양부피를 일정하게 유지할 수 있고 포자형성의 저해물질의 축적을 방지할 수 있다. 따라서 이론적으로 최대 세포농도까지 배양할 수 있는 장점이 있다.

공급배지의 포도당의 농도에 따른 세포와 포자형성의 특성을 TCRC 조업에서 살펴보았다. Figure 3은 TCRC조업에서 포도당 농도에 따른 세포성장의 특성을 보여주고 있다. 1 g/L의 포도당 농도를 공급한 경우에 세포성장은 전형적인 선형의 성장특성을 보였다(Figure 3(a)). 또한 운전 후 15시간에서 포자가 관찰되었고 포자농도의 경향도 선형적으로 증가함을 알 수 있었다. TCRC조업 후의 전체세포 농도는 2.7×10^9 CFU/mL이었고 이 중에서 포자농도는 1.3×10^9 CFU/mL로서 전체세포 농도의 48%를 차지하였다.

10 g/L의 포도당을 공급한 경우에는 전체 세포성장의 특성은 앞에서와 같이 선형성을 보였다(Figure 3(b)). 하지만

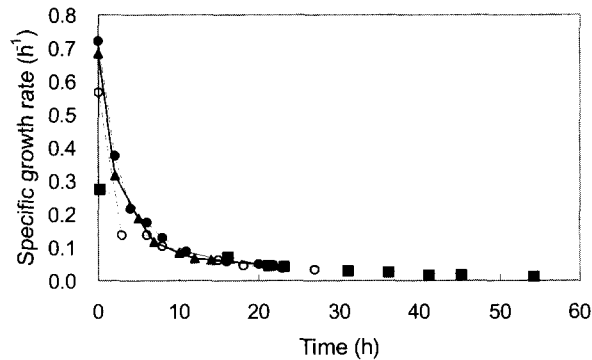
TCRC 조업동안에 포자의 형성은 관찰할 수 없었다. TCRC 조업후의 최대 세포농도는 9.8×10^9 CFU/mL로서 건조중량으로는 47.8 g/L에 해당한다. 이것은 1 g/L의 포도당 농도로 공급한 경우에 비해서 세포농도가 3배 이상 증가했음을 알 수 있다. 포자형성은 TCRC조업 후에 회분식 배양으로 전환했을 때 관찰되었고 포자농도는 7.2×10^9 CFU/mL을 얻을 수 있었다. 이것은 세포의 70% 이상이 포자로 전환되었음을 알 수 있다.

위의 두 실험결과로부터 TCRC조업을 통한 고농도 세포배양에서는 유가식 배양과 달리 포자형성 저해물질인 acetate가 축적되지 않기 때문에 포자형성은 기질의 공급속도와 연관이 있다고 생각되어진다. 공급배지의 포도당 농도가 1 g/L에서 포도당 공급속도는 0.17 g/h인데 이것보다 높은 경우에는 운전 중에 포자형성을 관찰할 수 없었다. 공급배지의 포도당 농도가 10 g/L에서도 포도당 공급속도가 0.17 g/h 이하로 되게 공급속도를 낮추면 포자형성을 관찰할 수 있었다.

공급배지의 포도당 농도를 25와 50 g/L로 하고 희석율을 0.11 h^{-1} 로 조업했을 때 TCRC 조업에서 세포성장과 포자형성을 관찰하였다(Figure 3(c),(d)). 세포성장은 10 g/L의 포도당 농도로 공급했을 때와 같이 TCRC조업 중에는 선형적으로 증가하였고 포자형성은 관찰할 수 없었다. TCRC 조업에서 25 g/L와 50 g/L의 포도당 농도하에서 얻은 최대 세포농도는 46.1 g/L와 82.5 g/L로서 이것은 세포수 농도는 9.7×10^9 CFU/mL과 1.8×10^{10} CFU/mL에 해당된다. TCRC조업 후에 회분식 배양을 통해서 세포로 포자로 전환하였는데 이때 포자농도는 각각 7.6×10^9 과 1.2×10^{10} CFU/mL이었다. 세포

Table 1. Concentration of cell and spore, and glucose consumption in TCRC operation.

Glucose feed concentration (g/L)	Cells (CFU/mL)	Spore (CFU/mL)	Total glucose consumed (g/L)
1.0	2.7×10^9	1.3×10^9	16.8
10	9.8×10^9	7.2×10^9	72.5
25	9.7×10^9	7.6×10^9	73.0
50	18.0×10^9	12.0×10^9	117

**Figure 4.** The change of specific growth rate of *B. thuringiensis* during TCRC operation. (■, 1 g/L; ○, 10 g/L; ▲, 25 g/L; ●, 50 g/L)

성장은 모델링의 결과와 잘 일치하였고 소모된 포도당 농도에 대한 세포 수율은 0.65 g-cell mass/g-glucose 였다.

TCRC 조업 동안에 *B. thuringiensis*의 비성장속도를 Figure 4에 나타내었다. 비성장속도는 세포가 TCRC조업 동안 선형적으로 증가하기 때문에 급속히 감소함을 알 수 있다. 모든 경우에 조업동안 0.1 h^{-1} 이하로 감소하였다. 이것을 연속배양의 결과와 비교하면 연속배양에서는 비성장속도가 0.1 h^{-1} 이하에서는 전체세포 중에서 포자가 차지하는 비율이 30% 이상을 차지하였지만 TCRC조업에서는 운전 중에 포자형성을 관찰할 수 없었다. 유가식 배양과 같이 TCRC조업도 비정상상태의 운전이기 때문에 연속배양에서의 *B. thuringiensis*의 생리적 특성은 전혀 다를 것으로 추정할 수 있다. 따라서 *B. thuringiensis*의 고농도 세포배양과 함께 포자생산을 위해서는 2단계의 배양과정을 거치는 것이 바람직하다고 생각된다. 즉 TCRC조업으로 고농도세포배양을 실시하고 배양 후에는 회분식 조업으로 세포를 포자로 전환시키는 것이다.

TCRC의 조업 결과를 Table 1에 정리하였는데 포자농도는 TCRC 조업 후에 다시 회분식 배양으로 세포를 포자로 전환시킨 후의 결과를 나타낸 것이다. Table 1에 나와 있지 않지만 100 g/L의 포도당 농도로 운전하였을 경우에는 포도당이 제한되지 않았고 운전 후에도 회분식 배양을 통해서 포자형성을 관찰할 수 없었다. 따라서 TCRC 조업은 공급배지의 포도당 농도와 배지의 공급속도를 적절히 조절함으로써 최적의 결과를 얻을 수 있는데 본 실험에서는 배지의 포도당 농도는 50 g/L이고 공급속도는 0.11 h^{-1} 로서 포도당 공급속도를 0.55 g-glucose/hr로 운전했을 때였다.

요 약

유가식배양과 세라믹 막을 장착한 생물반응기에서 운전인

TCRC 조업을 통해서 *Bacillus thuringiensis*의 고농도 세포배양을 실시하였다. 유가식 배양에서 *B. thuringiensis*의 세포 성장은 선형적으로 증가하였고, 이것은 세포성장 모델링의 결과와 잘 맞았다. 낮은 세포 성장속도에도 불구하고 유가식 배양동안에 포자형성은 관찰할 수 없었고, 이것은 연속배양의 결과와는 반대였다. 유가식 조업 후에 회분식 배양으로 바꾸면 300 g/L의 포도당 공급 농도를 사용했을 때 2.7×10^9 CFU/mL의 포자농도를 얻었다. 생물반응기내에 세라믹 막을 장착한 TCRC 조업에서 포도당 공급 농도의 영향을 결정하였다. 50 g/L의 포도당 농도를 사용했을 때 TCRC 조업에서 82.5 g-cell/L에 해당하는 최대 세포농도 1.8×10^{10} CFU/mL를 얻었다. TCRC에서 세포성장은 선형적으로 증가하였고 포도당 농도는 제한되었는데 이것은 세포성장은 모델링의 결과와 잘 일치하였다. 1 g/L의 포도당을 공급한 경우 이외에는 TCRC 조업 동안에 포자형성을 관찰할 수 없었다. 50 g/L의 포도당을 공급한 경우 TCRC조업 후에 회분식 배양으로 전환시키면 1.2×10^{10} CFU/mL의 포자농도를 얻었고, 이것은 연구된 여러 배양형태 중에 가장 높은 포자농도이다. 이 때 최적의 포도당 공급속도는 0.55 g glucose/hr로 공급하였을 때였다.

REFERENCES

- Stockdale, H. (1985), Microbial Insecticides, in *Comprehensive Biotechnology Vol.3*, M. M. Moo-Young Ed., p949, Pergamon, Oxford.
- Feitelson, J. S., J. Payne, and L. Kim (1992), *Bacillus thuringiensis: insects and beyond*, Bio/Technol., **10**, 271-275.
- Pearson, D. and O. P. Ward (1988), Effects of culture conditions on the growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and development of media for production of the protein crystal endotoxin, Biotechnol. Lett., **2**, 451-456.
- Yang, X. M. and S. S. Wang (1998), Development of *Bacillus thuringiensis* fermentation and process control from a practical perspective, Biotechnol. Appl. Biochem., **28**, 95-98.
- Liu, W. M., R. Bajpai, and V. Bihari (1994), High-density cultivation of sporeformers, Ann. N. Y. Acad. Sci., **721**, 310-325.
- Suzuki, T., H. Mori, T. Yamane, and S. Shimizu (1984), Automatic supplementation of minerals in fed-batch culture to high cell mass concentration, Biotechnol. Bioeng., **27**, 192-201.
- Suzuki, T., T. Yamane, and S. Shimizu (1987), Mass production of thioestrepton by fed-batch culture of *Streptomyces laurentii* with pH-stat modal feeding of multi-substrate, Appl. Microbiol. Biotechnol., **25**, 526-531.
- Forberg, C. and L. Haggstrom (1988), Phenylalanine

- production from recombinant *Escherichia coli* strain in fed-batch culture, *J. Bacteriol.*, **8**, 291-300.
9. Konstantinov, K. B. and T. Yoshida (1990), On-line monitoring of representative structural variables in fed-batch cultivation of recombinant *Escherichia coli* for penylalanine production, *J. Ferment. Bioeng.*, **70**, 420-426.
 10. Chang, H. N. and S. Furusaki (1991), Membrane bioreactors: present and prospects, *Adv. Biochem. Eng.*, **44**, 205-210.
 11. Lee, Y. L. and H. N. Chang (1990), High cell density culture of a recombinant *Escherichia coli* producing penicillin acylase in a membrane cell recycle fermentor, *Biotechnol. Bioeng.*, **36**, 330-337.
 12. 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 an internal ceramic filter system, *Biotechnol. Bioeng.*, **42**, 1107-1112.
 13. Vick Roy, T. B., D. K. Mandel, H. W. Blanch, and C. R. Wilke (1983), The application of cell recycle to continuous fermentative lactic acid production, *Biotechnol. Lett.*, **5**, 665-670.
 14. Qureshi, N. and M. Cheryan (1989), Production of 2,3-butanediol in a membrane recycle bioreactor, *Process Biochem.*, **24**, 172-175.
 15. Yousten, A. A. and M. H. Rogoff (1969), Metabolism of *Bacillus thuringiensis* in relation to spore and crystal formation, *J. Bacteriol.*, **100**, 1229-1236.
 16. Pirt, S. J. and W. M. Kurowski (1970), An extension of the theory of the chemostat with feedback of organism, *J. Gen. Microbiol.*, **63**, 357-366.
 17. Pirt, S. J. (1976), *Principles of microbes and cell cultivation*, p186, Blackwell Scientific, London.