

대장균의 전기투석배양

윤 태호, 김 인호
충남대학교 화학공학과

Electrodialysis culture of *E.coli*

Tae Ho Yoon, In Ho Kim
Department of Chemical Engineering
Chungnam National University, Taejeon, 305-764

서론

일반적으로 발효 공정이 진행될 때 포도당과 무기염류를 기질로 섭취하는 미생물들은 대사산물로서 산과 여러가지 유기물을 생성하게 된다. 이때 생성되어진 산은 미생물의 성장을 저해한다⁽¹⁾. 이러한 저해효과를 경감시키는 공정으로 여러가지 연구가 수행되어 왔는데, 예를 들면 투석배양⁽²⁾, 용매추출법⁽³⁾, 진공증발배양⁽⁴⁾ 등이 있다. 이들 중 투석배양법은 1960년대부터 연구되었으나 연구가 미흡한 상태였고⁽⁵⁾, 막 장치의 개발이 활발했던 1970년대에 들어 체계적으로 연구되었다⁽⁶⁾.

한편 1980년대에는 전기투석배양으로 해리된 이온-초산이온, 젖산이온 등-들을 정전기적 인력과 이온교환막의 선택적 투과능력을 이용하여 강제적으로 제거·농축하여 미생물증식의 저해요인을 제거할 수 있게 되었다. 전기투석장치에 사용된 이온교환막은 1950년대 상업적으로 생산되었고, 1960년대 대량으로 탈염공정에 이용되었으며, 이 탈염공정을 발효공정에 응용하여 초산, 젖산과 프로피온산의 정제에 적용한 연구가 수행되었다^{(7),(8),(9)}.

전기투석이 진행되고 있는 동안 물의 전기분해와 염의 이동에 기인하는 pH변화가 발생되고, 배지 내의 중요한 성분인 인산 이온이 이동하게 된다. 이때 전류효율이 최대인 최적전압을 찾고, 배지 내의 인산은 외부에서 공급해줄 필요가 있다⁽¹⁰⁾. 본 실험에서는 모델 용액으로 증류수 또는 M-9배지에 초산을 가해 전압변화에 따른 초산제거 속도를 관찰하였고, pH변화에 따른 초산제거 속도를 측정하였다. 그리고 전기투석발효실험을 수행하여 미생물이 증식하는 동안 초산제거 효과를 관찰하여 필요시 외부에서 초산을 첨가하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지조성

사용균주로 *E.coli* W3110, 종배양용 배지로 포도당 5g/l의 M-9배지를 사용하여 12시간동안 종배양하였다. 주배양용 배지는 초기 포도당 20, 50, 100g/l의 M-9배지를 사용하였다. 초산의 저해효과를 보기 위하여 필요시 외부에서 초산을 가해 변화를 관찰하였다.

분석방법

초산농도는 HPLC로, 포도당 농도는 Glucose Trinder로 문헌⁽¹¹⁾의 방법에 의해 측정하였다.

균체농도의 측정은 600nm에서 분광광도계를 사용하여 Optical density (O.D.)값으로 측정하였다.

전기투석장치

음이온교환막은 Neosepta AMX (Tokuyama Soda Co., Japan), 양이온교환막은 Neosepta CMX를 사용했다.

Stack은 3구획으로 구성되었고(Fig.1.), 아크릴판과 실리콘 고무판으로 막 사이의 공간을 만들었다. Anode로 백금선을 cathode로 스테인레스 망을 이용하였다. 이온교환막 사이의 공간을 유지하기 위해 플라스틱망을 삽입하였다. 전극용액으로 0.1N NaOH, 0.1N H₂SO₄ 용액을 사용했다.

실험방법

전기투석발효의 예비실험으로 초산을 넣은 증류수와 M-9배지로 실험을 하였다. pH의 영향을 보기위하여 암모니아수로 pH조절을 하였다(Table 1).

Table 1. Experimental condition for electrodialysis.

Exp No.	Model solution	pH control	Voltage
#1	D.W.1l+Acetic acid 10g	NH ₄ OH 25%	2-10v
#2	"	None	"
#3	M-9.1l+Acetic acid 10g	NH ₄ OH 25%	5-10v
#4	"	None	"

결과 및 고찰

전기투석실험

Fig. 2.는 Table 1.의 조건에서 pH를 7.4로 유지하고 실험하여 구한 전류효율 대 전압의 결과이다. 전류효율 (η)은 $\frac{\text{이동한초산의당량}}{\text{시간} \times \text{전류}}$ 으로 계산하였다. 증

류수에 초산을 가해 실험한 경우 물질전달에 기여하는 이온은 H⁺, OH⁻, CH₃COO⁻, NH₄⁺이온이다. M-9배지에 초산을 가해 실험한 경우에 비해 초산제거 효율이 높게 나오고 최적전압도 낮다. 증류수에 비해 M-9배지의 효율이 낮은 이유는 초산이온보다 이동도가 높은 M-9배지 내 이온들이 먼저 이온교환막을 통해 이동하기 때문이다. pH조절을 하지 않고 전기투석을 실시한 경우 pH는 초기보다 계속해서 떨어진다. 이것은 모델용액중의 OH⁻이온이 음이온교환막을 통과하는 속도보다 빨리 이동하는 것으로 설명된다.

증류수에 초산을 가해서 초기 pH를 7.4로 맞추어 8.3V조건으로 pH조절을 하지 않고 전기투석을 하면 5시간 후의 pH는 3.5 정도로 떨어졌다. 이처럼 pH가 떨어지게 되면 초산의 해리상수 K_a는 pH의 변화로 작아지고 해리된 초산이온이 감소하므로 초산의 제거속도도 작아지게 된다. M-9배지에서 pH조절을 하지 않았을 경우 5시간후의 pH는 6.0으로 증류수에 비해 pH가 덜 떨어졌다. 이것은 배지 성분의 인산이온이 완충역할을 하기 때문이다. 이와 같은 pH 하강은 전압이 높아질수록 심화되는 경향을 보였다. 이것은 이온교환막과 용액상간에 초산이온의 농도경계층 두께가 증가하여 농도분극현상이 높은 전압에서 빨리 나타나는 것을 반영한다. 이때 초산이온이 이동하는 대신 이온교환막 부근에서 물의 전기분해가 일어나서 H⁺와 OH⁻로 되어 pH 변화가 수반된다.

회분발효실험

발효시 대장균이 생성하는 초산에 의한 저해효과를 보기 위해 초기 포도당 농도를 높였다. 초기 포도당 농도를 50g/l로 실험한 경우 24시간 발효 후, 최종세 포농도는 O.D.로 8.4이었고, 초산의 최종농도는 12.3g/l였다. 이경우 10시간까지의 비성장속도는 0.42h⁻¹이었다가 점차로 감소하였다(Fig.3.). 초산이 다량으로 생산되는 시점은 대수성장기에 접어들면서 발효조내의 용존산소량이 50%미만일 때이고 더불어 초산농도가 급속히 증가한다. 이런 사실은 세포내 호흡이 어려울

경우 세포활성이 감소하여 포도당의 대부분을 유기산생성에 소모한다는 보고와 일치한다⁽¹¹⁾. 초기 포도당 농도 50g/l의 배지를 사용할 경우 발효개시 후 15시간이 지나면 포도당이 거의 고갈되었다. 초산생성이 더 많이 되도록 초기 포도당 농도를 100g/l로 올려 실험하였다. 이 경우에는 포도당의 기질저해효과가 약간 나타났다($\mu=0.41h^{-1}$). 초기포도당 100g/l의 경우 최종세포농도는 O.D.로 10.0이었고, 초산의 최종농도는 9.2g/l, 잔존포도당은 30g/l로 세포활성이 전반적으로 낮았다. 따라서 초산이 발효에 의해 대장균으로부터 생성되어 세포성장을 저해하는 현상은 초기포도당 농도가 높은 상태에서 파악하기 어려웠다.

전기투석발효실험

발효초기의 포도당농도를 낮추고, 초산의 저해효과를 확실하게 볼 수 있도록 세포가 대수성장기에 도달한 후 외부에서 초산을 가하여 저해효과를 관찰하였다. 초산의 저해효과에 의해 비성장속도가 느려진 상태에서 전기투석을 실시해 비성장속도의 변화를 관찰하였다(Fig.4.). 초기의 포도당 농도를 20g/l로 하고, 7시간 후 초산을 10g/l로 투입하여 비성장속도의 변화를 보고 12시간후에 전기투석을 실시하였다. 이때 배지 내의 염이 이동하므로 매시간마다 50배 농축된 M-9배지 4ml과 포도당 4g을 매시간마다 5시간 공급하였다. 한편 Fig.4.의 조건과 동일하고, 다만 전기투석만을 하지 않은 실험을 수행했다(Fig.5.). 전기투석을 실시하지 않은 경우 비성장속도는 $0.54h^{-1}$ 에서 초산을 10g 가한 경우 $0.08h^{-1}$ 로 비성장속도가 감소했다. 전기투석을 실시한 경우 초기의 비성장속도는 $0.56h^{-1}$ 이고 후기에 $0.126h^{-1}$ 로 감소하였으나 전기투석을 하지 않았을 때보다 높았다. 이때 전기투석기에 가해진 전압은 7.5V였고, 초기전류는 1.5A, 전류효율은 24%였다. 최종세포농도를 살펴보면 Fig.5.의 경우 O.D.로 13.4였고, Fig.4.의 경우 20.4로 50%이상의 세포농도 증가를 보였다.

참고문헌

1. K. H. Han, Ph.D. Thesis, Dept. of Chem. Eng., Univ. Cal. Irvine, Irvine(1992).
2. J. S. Schultz and P. Gerhardt (1969), *Bacteriol. Rev.*, **33**, 1.
3. T. W. Randolph et al. (1985), *Biotech Lett.*, **7**, 325.
4. G. R. Cysewski and C. R. Wilke (1977), *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 1125.
5. P. Gerhardt and D. M. Gallup (1963), *J. Bacteriol.*, **86**, 919.
6. R. J. W. Osborne (1977), *J. Soc., Dairy Technol.*, **30**, 40.
7. Y. Nomura et al. (1988), *J. Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 137-142.
8. A. J. Weier et al. (1992), *Biotechnol. Prog.*, **8**, 479-485.
9. S. T. Zhang et al. (1993), *J. Ferm. Bioeng.*, **75**, 4, 276-282.
10. S. T. Zhang et al. (1994), *J. Ferm. Bioeng.*, **77**, 3, 288-292.
11. 김인호, 윤태호 (1994), *한국생물공학회지*, **9**, 5, 492-498.

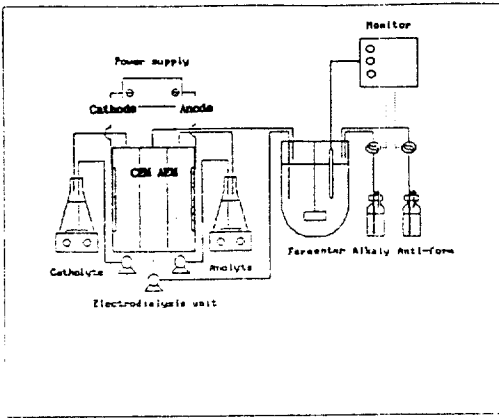


Fig.1. Schematic diagram.

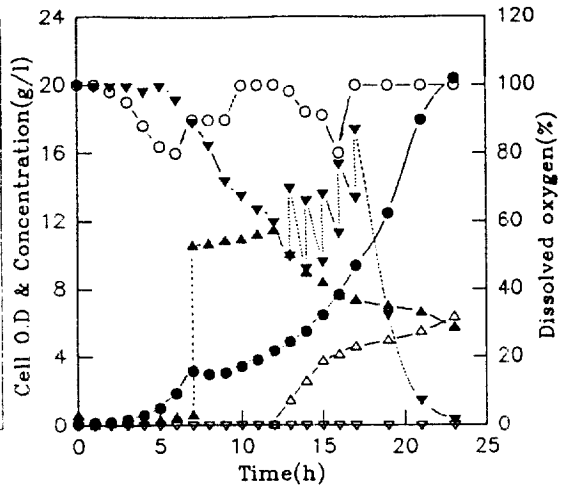


Fig.4. Electrodiagnosis culture combined fed-batch.

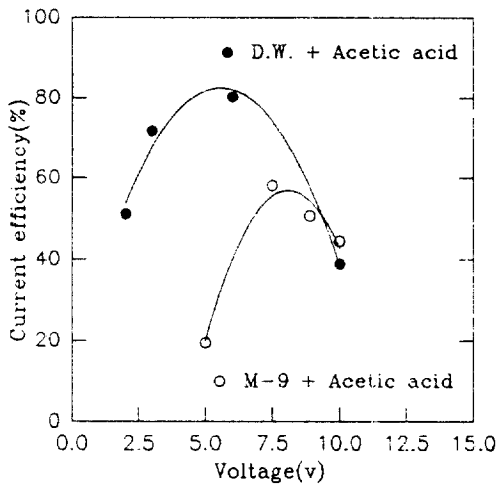


Fig.2. Current efficiency versus voltage

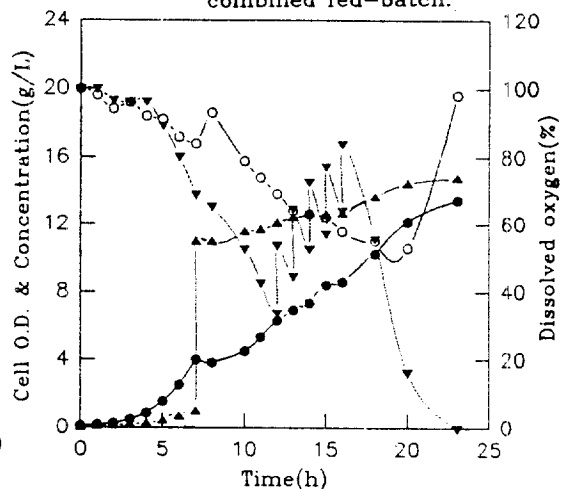


Fig.5. Fed-batch culture without Electrodiagnosis.

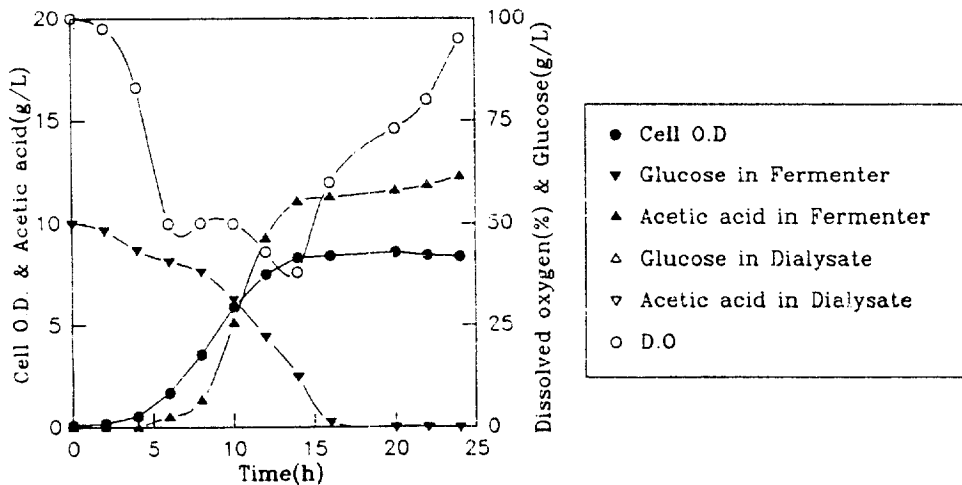


Fig.3. Batch culture; Glucose 50g/L, M-9.