

# 마이크로플레이트 기반 생물반응기 시스템(MABOOMS™)을 이용한 발효배지 성분의 미생물 성장 특성 연구

손옥재, 이종일\*

## Study on Cell Growth Characteristics with Culture Medium Components by Using MABOOMS™

Ok-Jae Sohn and Jong Il Rhee\*

접수: 2012년 12월 10일 / 게재승인: 2013년 2월 15일  
© 2013 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** In this work a MABOOMS™ has been employed to cultivate microorganisms and investigated the effects of culture medium components on cell growth. A 24-well microplate coated with 4-divided fluorescent sensing membranes was used to monitor the dissolved oxygen, pH and cell concentration during cultivations. Fluorescence intensity for dissolved oxygen or solution pH and reflectance for cell concentration was online monitored by using the MABOOMS™. The online monitoring results showed the effects of culture medium components on cell growth in cultivation processes very well.

**Keywords:** culture medium, fluorescent sensing membrane, MABOOMS™, Online monitoring

### 1. 서론

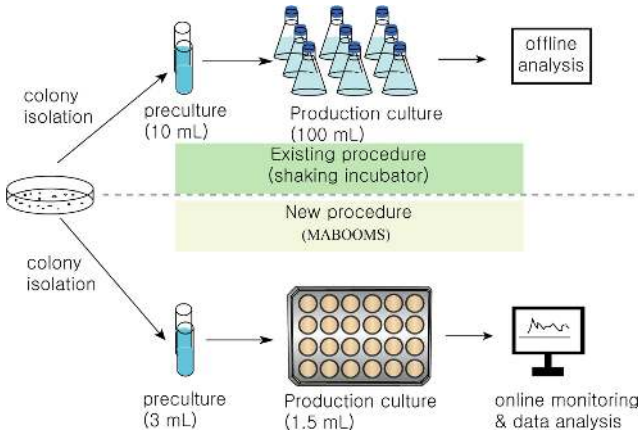
최근, 생물반응기의 소형화를 통해 빠른 시간 내에 많은 미생물을 동정 (screening)하고 성장조건을 최적화하는 연구에 대한 관심이 높아지고 있다 [1]. 즉, 많은 종류의 미생물로부터 적절한 성장조건이나 생산물질에 대한 정보를 알아내기 위해 고성능 (high-throughput) 미생물 배양 기술을 개발하고

있다 [2,3]. 향후, 다양한 생물제품의 개발과 생산 최적화를 위해 더 많은 미생물이 동정될 것이고, 미생물의 성장특성 및 최적화를 위해 많은 실험이 수행되어야 할 것이다. 고효율 균주는 많은 수의 후보균주를 다양한 배양실험을 통해 선별되는데, 주로 진탕배양기 또는 생물반응기를 이용하여 배양실험이 수행되며 많은 시간, 넓은 배양 공간 및 다양한 배지가 소모되므로 새로운 고성능 미생물 배양기술의 개발이 요구된다 [4].

미생물 배양공정의 소형화 기술 연구는 주로 시험관 (test tube), 마이크로플레이트 (microtiter plate)와 모세관 (capillary tube) 등을 이용하여 이루어 졌다. 1~10 mL의 시험관을 이용한 미생물 배양은 시험관을 다채널로 구성할 수 있으므로 한번의 실험에 많은 경우의 실험조건을 수행할 수 있다. 그러나 세포농도, 용존산소 및 pH 등 공정변수에 대한 온라인 모니터링이 쉽지 않아 분석하는데 많은 시간과 노동력이 필요하다. 수  $\mu\text{L}$  크기의 모세관을 이용한 미생물 배양기술은 다채널화가 가능하지만, 시스템이 복잡하고 구성에 많은 비용이 들어가는 단점이 있다. 한편, 마이크로플레이트를 이용한 미생물의 발효는 수  $\mu\text{L}$ 에서 수 mL까지 미생물을 배양할 수 있고 분광기 등 분석장비와 함께 사용 가능할 수 있으므로 공정변수를 쉽게 온라인 모니터링 할 수 있는 장점이 있다. 특히, 마이크로플레이트를 이용한 미생물 배양은 기존의 실험 방법을 소규모화 시킴으로써 사용되는 배지와 실험 기구 등의 구입비용을 줄일 수 있으며, 고효율 균주의 빠른 선별이 가능하다.

한편, 발효배지의 최적화를 위한 플라켓-버만 설계법 (Plackett-Burman design method), 반응표면분석법 (Response

전남대학교 공과대학 응용화학공학부, 촉매연구소  
School of Applied Chemical Engineering, Research Institute for Catalysis, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Republic of Korea  
Tel: +82-62-530-1847, Fax: +82-62-530-0846  
e-mail: jirhee@jnu.ac.kr



**Fig. 1.** Comparison between a shaking incubator and MABOOMS™ for medium optimization.

surface method, RSM)등과 같은 통계학적 분석방법들이 이용되고 있다. 그러나 통계적인 방법을 사용하더라도 미생물 동정으로부터 배지 최적화 단계까지 실험을 하기 위해서는 많은 횟수의 실험이 필요하다. 특히, 발효배지의 최적화를 위해 많은 양의 배양실험과 발효 공정변수에 대한 정보를 모니터링하는 것이 필수적이다. 한편, Boccazzi 등은 용존산소, pH 그리고 세포농도를 모니터링 할 수 있는 50 µL와 150 µL 부피의 소형 생물반응기를 개발하여, 대장균과 효모를 이용한 유전자 발현 연구를 수행하였다 [5]. 또한, Kensy 등은 진탕 배양기에 형광염료를 고정화하여 용존산소와 pH를 검출할 수 있도록 하여 대장균 발효공정에서 용존산소와 pH를 온라인 모니터링 하였다 [6].

Fig. 1에는 배지 최적화 실험을 위해 전통적으로 실험에 사용되는 진탕배양기와 본 연구팀에 의해 개발된 광학온라인 모니터링시스템을 갖춘 마이크로플레이트 기반 생물 반응기 시스템 (MABOOMS™)을 비교하였다 [7]. 본 연구에서는 MABOOMS™을 이용하여 대장균 (*Escherichia coli*)과 고초균 (*Bacillus cereus*)를 배양하면서 용존산소, pH 및 세포농도의 변화를 모니터링함으로써 발효 배지의 최적화 연구를 위해 각 배지 성분에 의한 미생물의 성장 특성을 조사하고자 한다.

**2. 재료 및 방법**

**2.1. 균주 및 배지**

미생물 발효배지의 특성 연구를 위해 호기성 미생물인 *E. coli* DH5α와 *B. cereus* 318을 사용하였고 Table 1과 2에서와 같이 배지의 조성과 pH를 5.0~8.0으로 임의로 변화하였다. *E. coli* DH5α의 발효를 위해 LB복합배지를 기준으로 24가지의 배지 조성을 구성하였는데, 탄소원으로 포도당이 배지에 존재할 경우와 없는 경우로 나누었다. 그리고 질소원인 트립톤, 효모 추출물과 염화나트륨이 첨가된 경우와 첨가되지 않은 경우 대장균의 성장특성을 관찰하였다. Table 1에서

**Table 1.** Medium composition in *E. coli* DH5α cultivation

	pH	glucose [g/L]	tryptone [g/L]	yeast extract [g/L]	NaCl [g/L]
A1	5	0	0	5	10
A2	5	0	10	5	10
A3	5	5	10	5	10
A4	5	5	0	5	10
A5	5	5	10	0	10
A6	5	5	10	5	0
B1	6	0	0	5	10
B2	6	0	10	5	10
B3	6	5	10	5	10
B4	6	5	0	5	10
B5	6	5	10	0	10
B6	6	5	10	5	0
C1	7	0	0	5	10
C2	7	0	10	5	10
C3	7	5	10	5	10
C4	7	5	0	5	10
C5	7	5	10	0	10
C6	7	5	10	5	0
D1	8	0	0	5	10
D2	8	0	10	5	10
D3	8	5	10	5	10
D4	8	5	0	5	10
D5	8	5	10	0	10
D6	8	5	10	5	0

C2열에 해당하는 배지 조성은 복합배지인 LB 배지 (기준배지)를 나타낸 것이다. Table 2는 *B. cereus* 318용 배지 조성을 나타낸 것인데, C2열이 전형적인 배지 조성 (기준배지)을 나타낸 것이다. 배양실험을 위해 *B. cereus* 318의 배지조성은 포도당, 펩톤, 효모추출물 그리고 탄산수소나트륨의 유·무에 따라 pH 5.0에서 8.0으로 변화하여 24가지의 서로 다른 배지를 준비하였다.

**2.2. 발효 실험**

미생물의 산소 소비속도는 미생물의 증식속도에 밀접한 관계가 있고 기질의 분해 및 미생물이 생산하는 물질에 따라 배지의 pH는 산성 또는 알칼리성으로 변화하게 된다. 실험에 사용된 24-웰 마이크로플레이트는 하나의 웰이 두개의 용존산소농도 검출용 형광 센서막과 하나의 pH 검출막 그리고 나머지 하나는 센서막이 부착되지 않은 투명한 상태인 4분할형 센서막으로 구성된 것이다[8]. 즉, 하나의 웰에 용존산소 검출용 형광 염료 (루테늄 복합체, tris(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline) ruthenium(II), Ru(dpp)<sub>3</sub><sup>2+</sup>), pH 검출용 형광염료 (8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt, HPTS) 그리고 센서막이 부착되지 않은 24-웰 마이크로 플레이트를 사용하여 배양을 하면서 용존산소와 pH 검출용 광학센서막으로부터 얻어지는 형광세기와 세포농도의 변화를 모니터링 하기위한 반사도 (reflectance, RF)를 측정하였다 [9]. 발효실험을 하기전 형광센서막이 코팅되어진 24-웰 마이크로플레

**Table 2.** Medium composition in *Bacillus cereus* 318 cultivation

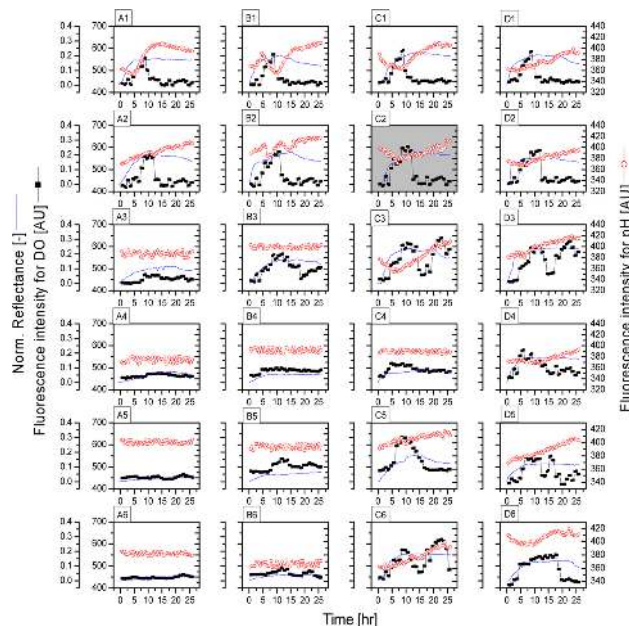
	pH	glucose [g/L]	peptone [g/L]	yeast extract [g/L]	NaHCO <sub>3</sub> [g/L]
A1	5	0	0	5	3
A2	5	0	5	5	3
A3	5	5	5	5	3
A4	5	5	0	5	3
A5	5	5	5	0	3
A6	5	5	5	5	0
B1	6	0	0	5	3
B2	6	0	5	5	3
B3	6	5	5	5	3
B4	6	5	0	5	3
B5	6	5	5	0	3
B6	6	5	5	5	0
C1	7	0	0	5	3
C2	7	0	5	5	3
C3	7	5	5	5	3
C4	7	5	0	5	3
C5	7	5	5	0	3
C6	7	5	5	5	0
D1	8	0	0	5	3
D2	8	0	5	5	3
D3	8	5	5	5	3
D4	8	5	0	5	3
D5	8	5	5	0	3
D6	8	5	5	5	0

이트를 무균대에서 24시간 동안 UV로 살균하였다. Table 1과 2에서와 같은 조성, 즉 탄소원과 질소원 그리고 염 등의 조성을 각각 달리하여 제조되어진 배지를 24-웰 마이크로플레이트 A1웰 부터 D6웰에 각각 1.5 mL씩 넣었다. 각 웰에 LB배지에서 전배양 (pre-culture)한 *E. coli* DH5 $\alpha$ 와 *B. cereus* 318을 발효 부피의 1%인 15  $\mu$ L씩 접종한 후, MABOOMS™을 이용하여 24시간 동안 배양하면서 형광세기와 반사도를 온라인 모니터링 하였다. MABOOMS™의 운전조건은 37°C, 교반속도 400 rpm에서 실시하였으며, 모니터링 시간 간격은 30분으로 하였다 [9].

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. *E. coli* DH5 $\alpha$ 발효공정에서 배지성분의 영향

*E. coli* DH5 $\alpha$  발효공정에서 포도당의 유·무, 트립톤, 효모추출물 및 염화나트륨의 유·무에 따른 미생물 성장특성에 대한 영향을 조사하였다. Fig. 2는 MABOOMS™을 이용하여 24 시간 동안 *E. coli* DH5 $\alpha$ 를 각각 다른 조성의 배지에서 발효하면서 용존산소 및 pH 변화를 모니터링하기 위한 형광세기와 세포농도 변화를 모니터링하기 위한 정규화 반사도 (Norm. RF)를 측정할 것이다. 그림에서 A열은 초기 배지의 pH를 5.0으로 조절한 것으로 LB배지 조성인 C2웰과 비교하여 미생물의 성장이 느리게 나타나는 것을 알 수 있다. 그리고 초기 배지의 pH를 6.0으로 고정한 B열의 경우 초기 pH를



**Fig. 2.** Online monitoring of fluorescence intensity for DO and pH, and normalized reflectance for cell concentration in *E. coli* DH5 $\alpha$  cultivation with various medium components using MABOOMS™ (-■-: DO, -: Norm. RF, ○: pH).

5.0으로 조절한 A열보다는 미생물의 성장이 조금 빠른 것을 볼 수 있으나, C2웰의 것 보다는 미생물의 성장이 느렸다. *E. coli* DH5 $\alpha$ 의 배지를 pH 7.0으로 조절한 C열의 경우 6개의 웰에서 미생물의 성장이 지수 성장곡선을 보이고 있으나, C4웰과 같이 질소원인 트립톤이 결여된 경우 미생물의 성장 속도가 다른 웰의 것과 비교하여 매우 느리며, 배지의 pH의 변화가 거의 일어나지 않음을 볼 수 있다. 이는 미생물의 성장이 제대로 이루어지지 못하여 일차 및 이차대사 산물이 생산되지 않았기 때문에 배지의 pH가 크게 변화되지 않는 것으로 보인다. D열의 경우에는 6개의 웰에서 미생물의 성장 특성이 비슷하게 나타났으며, 포도당과 트립톤, 효모추출물 그리고 염화나트륨 모두가 포함된 배지 조성 (D3)에서는 가장 좋은 미생물 성장특성을 보였다. 한편, 24개의 웰에서 미생물 성장특성을 비교했을 때 배지의 pH와 무관하게 5 g/L의 포도당이 존재할 경우 *E. coli* DH5 $\alpha$ 의 성장이 지연되는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 포도당이 존재하고 트립톤이 첨가되지 않은 배지 조성 (A4, B4, C4, D4)에서 *E. coli* DH5 $\alpha$ 의 성장이 매우 느린 것을 알 수 있었다. 한편, 기준배지인 LB배지로 *E. coli* DH5 $\alpha$ 를 배양한 C2웰의 경우, 미생물 성장과 배지 내 pH의 변화가 진탕 배양기에서 실시한 배양과 거의 동일하게 나타나는 것을 알 수 있었다 [9]. 따라서 MABOOMS™을 이용하여 각 웰이 4분할된 형광센서막으로 코팅된 24-웰 마이크로플레이트에서 형광세기와 반사도를 온라인 모니터링 했을 때 발효공정내 용존산소, pH 및 세포 농도를 모니터링 할 수 있으므로 각 배지조성에 따른 미생물의 성장특성을 알 수 있고, 배지조성의 최적화 연구에 적용할 수 있다.

### 3.2 *B. cereus* 318 발효공정에서 배지성분의 영향

MABOOMS™을 이용하여 *B. cereus* 318의 발효 실험을 하였고, 포도당, 펩톤, 효모추출물 그리고 탄산수소나트륨의 유·무 따른 미생물 성장 특성을 조사하였다. 본 실험에 사용한 24-웰 중 C2웰은 *Bacillus* 발효를 위한 전형적인 배지 조성 pH이며, 나머지 웰의 배지는 다른 pH값, 즉, pH 5.0 (A열), pH 6.0 (B열), pH 7.0 (C열), 그리고 pH 8.0 (D열)으로 조절하였다. 포도당 및 질소원 등의 유·무 따라 다른 배지 조성은 표 2와 같다. 초기 배지 pH를 5.0으로 조절하여 배양을 실시한 A열의 경우 pH 센서막으로 부터 얻어지는 형광세기는 산성 영역 ( $\approx$  pH 5)에서 나타나는 330 부근의 일정한 형광을 방출하였다. 그리고 A5와 같이 효모 추출물이 배지에 첨가되지 않은 경우에는 용존산소의 변화가 거의 일어나지 않아 미생물이 성장하지 못하는 것을 알 수 있었으며, A6과 같이 탄산수소나트륨이 없는 경우, 용존산소 검출용 광학센서막의 형광세기와 정규화 반사도 (Norm. RF)의 변화를 보면 *B. cereus* 318이 배양 10시간까지 성장함을 볼 수 있었다. 따라서 나트륨이온이 *B. cereus* 318의 성장에 상당한 영향을 미치는 것을 알 수 있다. 배양 초기 pH를 6.0으로 조절한 B열의 경우 6개의 웰에서 미생물이 어느 정도 성장하는 것으로 보이나, A열과 동일하게 효모 추출물이 첨가되지 않은 배지 (B5)에서는 배양 10-12시간 이후에는 *B. cereus* 318의 성장이 더 이상 관찰되지 않았다. 24시간 이후에는 초기 배양에서 얻어진 미생물이 사멸기에 접어들어 미생물이 분해되면서 그 영양분을 이용하여 미생물이 성장하면서 용존산소 검출용 광학센서막의 형광세기가 증가 (용존산소농도 감소)하는 것이 관찰되었다. C열의 경우 *B. cereus* 318의 최적 성장 pH인

7.0으로 조절되었으며, 6개의 웰에서 시간이 경과됨에 따라 pH 7.0에서 산성영역으로 pH가 감소하였는데, 효모추출물의 유무에 대한 영향이 크지 않음을 알 수 있었다. 알칼리 영역인 pH 8.0으로 조절된 D열의 경우에는 C열과 거의 유사한 미생물 성장 특성을 보였다. 본 실험에서 24개의 웰에 각각 다른 배지 조성 pH를 도입하여 *B. cereus* 318을 24시간 배양하면서 용존산소 및 pH의 변화를 모니터링하기 위해 형광세기를 측정하였으며, 세포농도의 변화를 모니터링하기 위해 반사도를 측정하였는데 모니터링된 형광세기 및 반사도의 변화를 통해 미생물의 성장 특성을 관찰할 수 있었다. 따라서 MABOOMS™을 이용하여 그람 양성균인 *B. cereus* 318의 배지 조성의 최적화 연구에도 잘 적용할 수 있음을 알 수 있다.

미생물 배양에서 배지 조성 및 발효조건에 대한 최적화 연구를 위해 각종 통계적인 방법이 사용되고 있다. 예를 들면, 전통적으로 하나의 요인을 여러 수준으로 놓고 나머지 요인들을 고정하여 실험하는 일일일원 실시법 (one factor at a time method, OFAT), 또는 2개의 변수를 모두 독립변수로 설정하여 각 변수의 영향을 분석할 뿐만 아니라 두 변수가 결합되어 일어나는 상호작용을 분석할 수 있는 요인배치법 (Factorial design method) 등이 있다 [10]. 또한, 적은 회수의 실험을 통해 다양한 인자들에 대한 영향을 알아낼 수 있는 플라킷-버만 설계법 (Plackett-Burman design method) [11]과 여러 가지 실험 인자들, 즉 독립 변수의 상호작용에 따른 종속변수의 변화에 대하여 최대 반응값을 나타내는 최적 조건을 찾아내기 위해 이용되는 반응표면법 (Response surface method) 등이 생물공학 및 산업공정 등에 폭넓게 이용되고 있다 [12]. 통계적인 방법에 의해 발효공정 및 배지의 최적화 연구를 위해서 일정한 양의 발효실험이 수반되어야 하며 가능한 한 많은 데이터를 빠른 시간내에 수집할 수 있는 고성능 (high-throughput) 발효 시스템이 연구, 개발되고 있다.

그람 음성균인 *E. coli* DH5 $\alpha$ 와 그람 양성균인 *B. cereus* 318의 발효를 위해 최근 개발된 MABOOMS™를 이용하여 배지 성분에 따른 미생물의 성장 특성을 연구하였다. 용존산소 및 pH 검출용 형광 센서막과 센서막이 부착되지 않은 투명한 부분을 가진 4 분할형 24-웰 마이크로플레이트를 사용하여 용존산소, pH 및 세포농도의 변화를 측정할 수 있는 형광세기와 반사도를 온라인 모니터링하면서 기존의 배지 조성에서 배지의 pH, 탄소원 및 질소원을 변화하여 미생물 성장에의 영향을 조사하였다. 미생물의 발효중 용존산소, pH 및 세포농도를 형광 및 반사광의 세기에 상관하는 상관식 (correlation)을 직접 적용하지 못하였지만 온라인 모니터링된 형광 및 반사광의 세기는 미생물의 성장 특성을 잘 반영함을 알 수 있었다. 향후, 형광세기와 용존산소 또는 pH, 그리고 반사광과 세포농도와의 상관성을 잘 보여주는 식들을 개발하여 사용하였을 때 발효공정중 용존산소, pH 및 세포농도의 변화를 실시간으로 관찰 할 수 있을 것이다. 또한, 균일한 형광 센서막의 제조 방법 및 광학적 측정기술의 개선을 통해 MABOOMS™은 미생물의 동정, 발효배지 및 생산 최

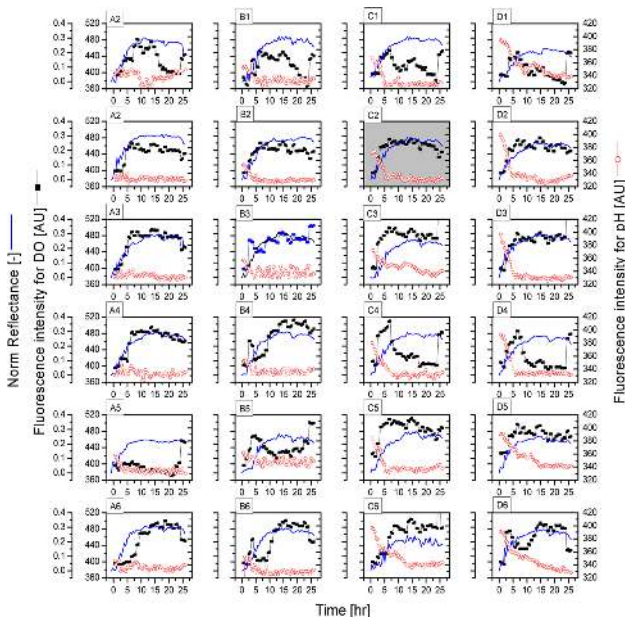


Fig. 3. Online monitoring of fluorescence intensity for DO and pH, and normalized reflectance for cell concentration in *B. cereus* 318 cultivation with various medium components using MABOOMS™ (-■-: DO, -: Norm. RF, ○: pH).

적화 실험에 광범위하게 적용될 수 있을 것이다.

#### 4. 결론

본 연구에서는 광학온라인 모니터링시스템을 갖춘 마이크로플레이트 기반 생물 반응기 시스템(MABOOMS™)을 이용하여 *E. coli* DH5α와 *B. cereus* 318의 발효공정에서 배지 성분에 따른 미생물의 성장 특성을 연구하였다. 즉, 4 분할형 24-웰 마이크로플레이트를 사용하여 용존산소, pH 및 세포농도의 변화를 측정할 수 있는 형광세기와 반사도를 온라인 모니터링하면서 배지의 pH, 탄소원 및 질소원에 따른 미생물 성장 특성을 조사하였다. 온라인 모니터링된 형광 및 반사광의 세기는 미생물의 발효공정에서 용존산소, pH 및 세포농도에 따른 미생물의 성장 특성을 잘 반영함을 알 수 있었다. 향후, 형광세기와 용존산소 또는 pH, 그리고 반사광과 세포농도와의 상관성을 잘 보여주는 식들을 개발하고 균일한 형광 센서막의 제조 방법 및 광학적 측정기술의 개선을 통해 MABOOMS™은 미생물의 동정, 발효배지 및 생산 최적화 실험에 사용하고자 한다.

#### 감사

이 논문은 2011년도 정부 (교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업 지원을 받아 수행된 것임 (2011-0008514).

#### REFERENCES

1. Wen, Y., R. Zang, X. Zhang, and S.-T. Yang (2012) A 24-well-microwell plate with improved mixing and scalable performance for high throughput cell cultures, *Process Biochemistry* 47: 612-618.

2. Cowan, D. A. (2000) Microbial genomes-the untapped resource, *Trends in Biotechnology* 18: 14-16.
3. Gao, S. J. and P. S. Moore (1996) Molecular approaches to the identification of unculturable infectious agents, *Emerging Infectious Diseases* 2: 159-167.
4. Lee, M. J., Y. S. Jeong, P. H. Kim, and G. T. Chun (2007) Establishment of miniaturized cultivation method for large and rapid screening of high-yielding *monascus* mutants, and enhanced production of monacilin-K through statistical optimization of production medium, *Korean Journal Biotechnology and Bioengineering* 22: 305-312.
5. Boccazzi, P., A. Zanzotta, N. Szita, S. Bhattacharya, K. F. Jensen, and A. J. Sinskey (2005) Gene expression analysis of *Escherichia coli* grown in miniaturized bioreactor platforms for high-throughput analysis of growth and genomic data, *Applied Microbial Biotechnology* 68: 518-532.
6. Kensy, F., G. T. John, B. Hofmann, and J. Büchs (2005) Characterization of operation condition and online monitoring of physiological culture parameters in shaken 24-well microtiter plates, *Bioprocess and Biosystems Engineering* 28: 75-81.
7. Rhee, J. I. (2008), Multichannel mini-bioreactor with optical sensing membranes, Korea Patent, No. 10-0860958-0000.
8. Sohn, O.-J. and J. I. Rhee (2012) Study on online monitoring of dissolved oxygen, pH and cell concentration in *E. coli* cultivation process using MABOOMS™, *KSBB Journ.* accepted.
9. Sohn, O.-J. (2009). *Microplate-based bioreactor equipped with an optical online monitoring system*, Ph.D Thesis, Chonnam National University.
10. Liu, J., J. Xing, T. Ghang, Z. Ma, and H. Liu (2005), Optimizations for nattokinase production by *Bacillus natto* NLSSE using statistical experimental methods, *Process Biochemistry* 40: 2757-2762.
11. Montgomery, D. C. (1997) Design and analysis of experiments, 4th ed., Wiley, New York, USA.
12. Kalil, S. J., F. Maugeri, and M. I. Rodrigues (2000) Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization, *Process Biochemistry* 35: 539-550.