

흡광도를 이용한 곰팡이 배양액의 세포농도 측정 - Pellet의 특성에 관한 연구 -

이 종 식 · 김 의 용
서울시립대학교 공과대학 화학공학과

Measurement of Cell Concentration of Fungal Broth Using Optical Density - Characteristics of Pellets -

Jong-Sik Lee and Eui Yong Kim

Department of Chemical Engineering, Seoul City University,
Seoul 130-743, Korea

ABSTRACT

A new method that considers the pellet sedimentation characteristics for fungal cell concentration measurement was developed using optical density. Appropriate mixing of the pellet suspension almost homogeneously was tried to prevent the sedimentation of the pellet by a small magnetic bar in cuvette, giving a stable optical density. The linear relationship between optical density and the dry cell weight was obtained. However, different curved lines were observed according to the pellet size. Optical density couldn't be detectable in the size range of 355 μ m above. It was concluded from the result that the use of optical density for measuring cell concentration in fungal broth became possible by considering the pellet characteristics.

서 론

대부분 세포농도는 산물의 생성속도와 밀접한 관련이 있기 때문에 미생물 배양시 가장 중요한 제어 변수중 하나이다(1). 그러나 곰팡이 배양의 경우 세포농도의 과도한 증가는 배양액의 점도를 높여 유변학적인 문제를 발생시킨다(2). 따라서 세포농도의 정확하면서도 신속한 측정이 발효공정의 제어에 있어서 하나의 목표가 되는 것은 당연하다.

단순 morphology를 가지며 배양액중에 균일상을 형성하는 박테리아와는 달리 곰팡이의 경우에는 복잡한 morphology를 가지고 있어서 증식은 균체의

크기나 밀도의 변화에 따라 큰 영향을 받는다(3). 곰팡이 배양의 경우 대부분 초기 성장단계에서 균사 길이와 분지의 수가 증가하게 되고 이에 따라 서로 엉키게 되어 pellet 입자를 형성하게 되는데 pellet은 균사보다 밀도가 크기 때문에 자연상태에서 침강하게 된다(4). Pellet의 침강특성은 밀도에 따라 크게 영향을 받게 되는데 pellet의 밀도는 기질의 농도와 같은 주변환경의 변화나 균의 종류에 따라 차이가 나게 된다. 이상의 이유때문에 pellet을 형성하는 곰팡이 배양시 박테리아와 같이 흡광도를 측정해 세포농도를 계산하는 것이 불가능하므로 곰팡이 세포의 농도는 전형적인 방법인 건조세포 중량을 측정해

계산되었다. 그러나 건조세포 중량에 의해 세포농도를 측정하는데는 시간지연의 문제가 있으므로 발효 공정상의 직접적인 제어변수가 될 수 없다(5). 따라서 미생물 배지의 誘電인 특성(4, 6), 배지 내에서의 빛 산란(7)이나 산소소모속도(8), 배지의 현탁도(5, 9)와 전도도(10), 점도(11) 등의 특성을 측정하여 농도를 추정하는 새로운 방법들이 다수 시도되고 있다. 특히 Tanaka 등(5)은 식물세포 배양시 흡광도를 이용해 세포의 농도를 측정하고자 시도하였는데 이러한 흡광도에 의한 세포중량의 추정은 매우 간편하고 신속하면서도 높은 선형성을 가지는 특징을 가지고 있다.

본 연구에서는 흡광도를 이용하여 곰팡이 세포의 농도를 측정하기 위하여 먼저 pellet의 동 특성을 파악하여 pellet의 침강과 흡광도와와의 상관관계를 구하고 그 결과를 곰팡이세포의 농도 결정에 적용시키고자 한다.

재료 및 방법

재료 및 방법

균주는 *Cephalosporium acremonium* ATCC 36225와 ATCC 48272를 사용하였다. 배지의 조성은 Table 1과 같다. 여기서 A는 계대배지이며, B는 발효배지이다.

온도 26°C, 교반속도 150rpm으로 500ml 플라스크에서 200ml의 작업용량으로 배양하였으며 초기 pH는 7.0으로 조절하였다.

분석절차 및 방법

균사의 Morphology 분석

Particle size analyzer(Karkeiss, Mop-Video-plan, Germany)를 사용하여 균사의 길이를 측정하여 세포의 형태를 정량적으로 분석하였다(12, 13).

Spectrophotometer

Pellet의 침강 특성을 관찰하기 위하여 Spectrophotometer(HP 8452A, U. S. A.)를 이용하여 세포 현탁액의 흡광도가 감소하는 것을 측정하였다. 이를위해 우선 sieve를 사용하여 크기별로 pellet을 분리하였다. 분리된 각 pellet을 2ml 취하여 cuvette 내에서 초기 균일상을 만들어 준 후 660nm에서 매 5초 간격으로 현탁액의 흡광도를 측정하여 pellet의 침전에 따른 흡광도의 변화를 측정하였다. 또한 세포농도의 간접적인 추정을 위하여 시료를 cuvette 내에서 5mm magnetic bar를 이용하여 균

Table 1. Compositions of the media used throughout the study.

A-Medium		B-Medium	
Peptone	1.0 %	Sucrose ^{a)}	36.0g
		Glucose ^{a)}	27.0g
Beef extract	0.5 %	(NH ₄) ₂ SO ₄	7.5g
		DL-Methionine	5.0g
NaCl	0.25%	Methyl oleate	1.5ml
		Salt Mix I	7.5ml
Agar	1.5 %	Salt Mix. II	135ml
		D. W.	1 ℓ
pH	7.0		
		*Salt Mix. I	
		Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₆ H ₂ O	20g/ℓ
		*Salt Mix. II	
		KH ₂ PO ₄	204g
		K ₂ HPO ₄	208g
		Na ₂ SO ₄	22.7g
		MgSO ₄	4.9g
		CaCl ₂	0.4g
		ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.4g
		MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.4g
		CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.1g
		D. W.	1.8 ℓ

a) autoclaved separately

일하게 혼합시켜 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

곰팡이의 경우 복잡한 morphology 때문에 증식은 균체의 크기나 밀도의 증가에 따라 큰 영향을 받으며 pellet의 침전으로 흡광도 측정에 의한 세포 중량의 간접적인 추정이 불가능하다. Fig. 1은 박테리아 농도 측정을 위해 기존에 사용해 왔던 것과 동일한 방법으로, *Cephalosporium*을 배양 중 채취하여 일정 비율로 희석한 후 spectrophotometer로 200초 동안 5초 간격으로 흡광도를 측정한 결과이다. 발효초반 시간이 경과함에 따라 137시간까지는 균체(주로 pellet form)의 침전에 의해 흡광도가 감소되나 183시간 이후부터는 흡광도의 감소가 상당히 둔화되며, 206시간 이후로는 흡광도의 감소가 나타나지 않았다. 이와 같은 결과는 균체의 morphology가 시간에 따라 변하기 때문으로 판단되었다. 즉 초기 흡광도가 시간에 따라서 감소하는 원인은 *Cephalosporium acremonium*이 초반 가늘고 긴 균사상태로 증식되고 이들이 단단하게 뭉쳐 침전 가능한 고밀도 입자인

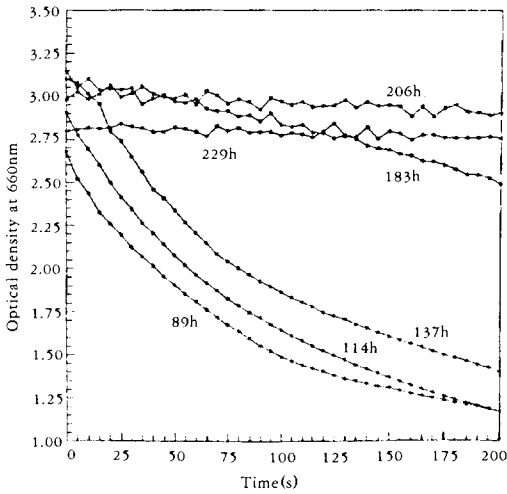


Fig. 1. Effect of fermentation time on sedimentation rate of *Cephalosporium acremonium*.

pellet을 형성하였기 때문이다. 그러나 주변 환경의 변화와 미생물 자체의 유전적 특성에 의해 가늘고 긴 균사와 pellet은 팽윤되고 분절되어 분절포자 (arthrospore)인 최종상태까지 분화하게 되는데, 분화가 진행될수록 박테리아의 morphology와 유사한 타원체의 단세포 모양을 갖게 된다. 그러므로 발효 후반인 206시간 이후에서는 박테리아에서와 같이 흡광도값이 변하지 않고 일정한 값을 갖는다.

한편, Fig. 1의 결과로부터 137시간부터 183시간 사이에 분절이 가속됨을 추정해 볼 수 있는데 분석 결과 137시간대에서 glucose가 완전 고갈되고 균체의 농도가 최대값에 도달되었으므로 glucose의 고갈이 pellet의 파괴와 더불어 팽윤균사를 분화, 분절을 촉진시키는 요인이 되는 것으로 판단되었다. Pellet과 같은 입자 또는 미생물의 침전 특성은 Stoke's law에 의해 다음의 식으로 표현될 수 있다.

$$\text{Settling velocity, } V = \frac{(L_p - L)gd_p^2}{18\mu F(\phi)}$$

여기서 L_p 와 L 은 입자와 배양액의 밀도이며, d_p 는 입자의 직경, μ 는 배양액의 점도, $F(\phi)$ 는 void function이다(14, 15). Fig. 1의 발효 후반기와 같이 입자의 침전속도가 0이 되며 현탁액의 상이 균일하게 되기 위해서는 위의 식에 의하면 다음과 같은 3가지 조건 중 한 조건을 만족해야 가능하다.

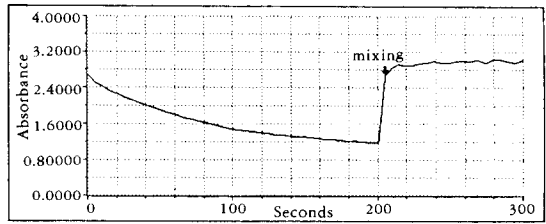


Fig. 2. Effect of mixing on sedimentation of *Cephalosporium acremonium* broth.

Strain : *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272
 Wavelength : 660nm
 Data integration time : 0.5s
 Run time : 300s

첫째 조건은 입자와 배양액의 밀도가 같을 경우인데 ($L_p - L = 0$) *Cephalosporium*의 배양 특성상 배양 중 존재하는 pellet의 밀도분포가 광범위하기 때문에 용액의 밀도와 동일한 조건은 불가능하다. 둘째 조건은 배양액의 점도가 상당히 높을 경우인데 ($\mu \rightarrow \infty$) 본 실험의 조건에서는 고점도로 인하여 pellet이 균일상으로 분산되는 것 역시 불가능하였다. 마지막 조건은 입자의 크기가 상당히 작아질 경우인데 ($d_p \rightarrow \text{small}$) *Cephalosporium*의 경우 균체가 분화, 분절되는 특성이 있기 때문에 이와 같은 추론은 가능하다. 그러므로 206시간 이후의 일정한 흡광도를 나타내는 원인은 초기 pellet형으로부터 팽윤 또는 분절포자로 분화, 분절에 의해 입자의 크기가 감소되기 때문이었으며 이상의 결과는 광학현미경 관찰로부터 정성적으로, Particle size analyzer 분석을 통하여 정량적으로 확인되었다. 결과적으로 발효 초반 나타나는 pellet형 세포의 침전 특성 때문에 흡광도를 이용한 세포농도의 계산이 불가능하였다.

Pellet의 침전을 막기 위해 spectrophotometer cuvette 하단에 stirrer를 설치하고 길이 5mm의 magnetic bar를 사용하여 일정 rpm으로 시료를 혼합하면서 흡광도를 측정하였다. 이때 곰팡이 균체의 이질성이 높아 시료를 고배율로 희석을 할 경우 데이타의 재현성에 문제가 있기 때문에 본 실험에서는 시료를 2배 희석해 준 뒤 흡광도를 측정하였는데 그 histogram을 Fig. 2에 나타내었다. 전반부 200초 동안은 혼합과정이 없으므로 침전에 의해 흡광도가 감

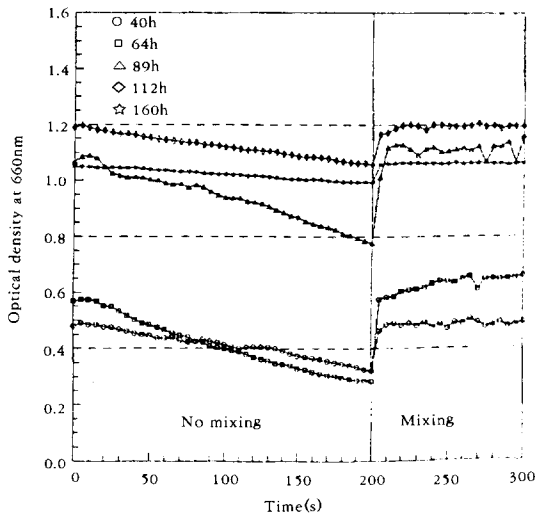


Fig. 3. Effect of mixing on sedimentation of *Cephalosporium acremonium* broth with different fermentation times.

소되지만 200초 시점에 혼합해 줌에 의해 즉시 흡광도가 증가하여 정상상태에 도달되었다. Fig. 3은 배양 중 시간 경과에 따라 채취된 시료를 동일한 방법으로 혼합하여 측정된 흡광도인데 모든 경우 혼합 즉시 정상상태에 도달됨을 알 수 있다. 다음은 이상의 과정에서 시도된 방법과 동일한 방법으로 배양 중 시료를 채취하여 정상상태의 흡광도(혼합 후 100초간 측정된 값의 평균값)를 측정하였으며 그때의 세포의 건조중량을 계산해 상호간의 관계를 관찰하였는데 그 결과는 Fig. 4와 같다. 데이터의 재현성을 위해 5차례 실험하였으며 그 결과를 최소 자승법을 이용해 계산하였을 때 세포의 건조중량과 정상상태 흡광도의 관계는 다음과 같다.

$$\text{Dry cell weight(g/ℓ)} = 7.602 * [\text{O. D.}] - 17.332,$$

$$\text{직선상관계수} = 0.954$$

직선상관계수가 0.954로 높게 나타났지만 다소 데이터 분산이 관찰되었는데 이는 시료중에 다양한 형태의 세포(팽윤, 분절포자, pellet의 농도 및 크기 등)가 존재하기 때문인 것으로 판단되었다.

다음은 배양 중 존재하는 다양한 형태의 균체를 크기별로 stainless-steel sieve로 분리하여 각각의 특성을 파악하고자 시도하였다. 실험에 사용한 sieve의 크기는 각각 500, 355, 212, 63, 45, 38 μm 이었으

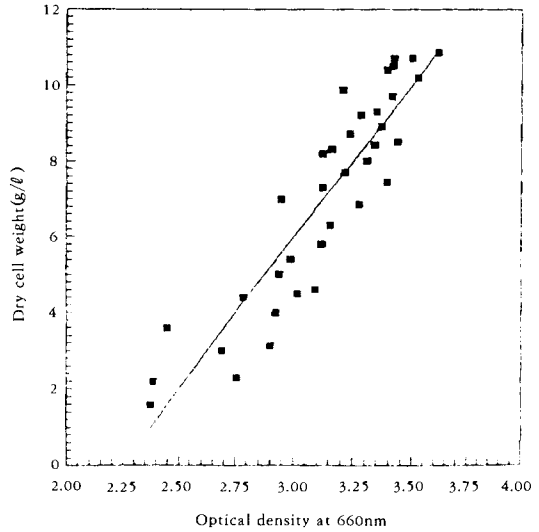


Fig. 4. Relationship between optical density and dry cell weight.

며 이들을 순차적으로 배열한 후 채취된 200ml의 시료를 상부에서 하부로 흘렸다. 그 후 saline을 섞어 차례 통과시켜 크기별로 분리를 하였으며 각각의 sieve를 개별적으로 취하여 하부에서 상부로 다시 saline을 흘리며 압축공기를 이용해 세포를 회수하였다. 즉 212 μm 의 sieve로부터 수거된 미생물 군집은 직경이 212~355 μm 범위의 pellet이었다. 광학현미경을 통해 관찰한 결과 63 μm 이상의 sieve를 통해 분리된 세포의 형상은 대부분 pellet이었으며 균일한 크기별로 용이하게 분리되었다. 한편 38, 45 μm 의 sieve에서 분리된 세포는 대부분 균사의 형태였으나 particle size analyzer를 이용하여 유효길이를 측정한 결과 양쪽 모두 약 70 μm 의 크기로 나타났으므로 크기별 분리는 실패하였다. 그러나 38 μm 에서 분리된 세포에 비하여 45 μm 에서 분리된 세포들의 분지가 많음이 정성적으로 관찰되었다. 분리된 세포를 일정 흡광도를 갖도록 희석 또는 농축을 해 준 뒤 혼합이 없는 상태에서 각각의 흡광도를 추적하였는데 그 histogram을 Fig. 5에 나타내었다. 추적과정의 흡광도변화는 재현성이 있음을 알 수 있었으며 그 결과를 정리하여 Fig. 6에 나타내었다. 38 μm 와 45 μm 의 sieve에서 분리된 세포들은 박테리아에서와 같이 배지상에 고루게 분산된 균일상을 형성하였으나 63 μm 이상의 sieve를 통해 분리된 세포(대부분 pellet형)들은 침전되는 특성을 보였다. 이상의 결과로부터

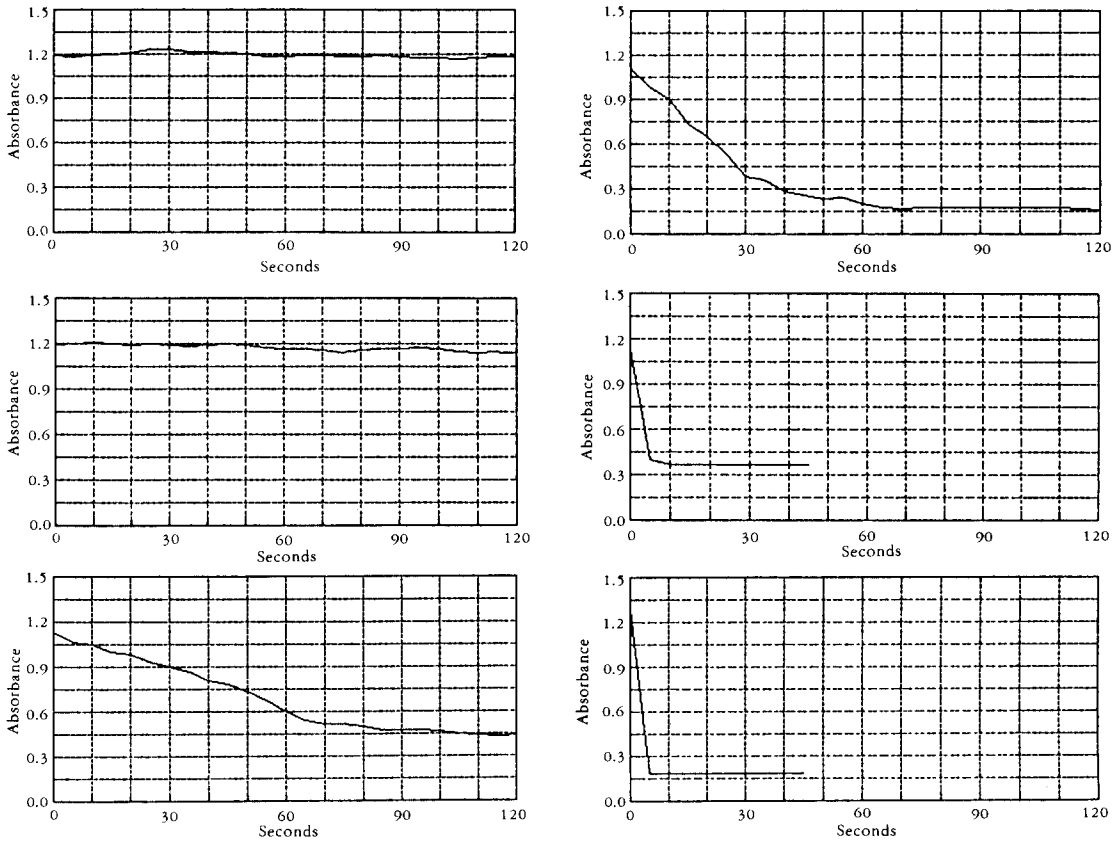


Fig. 5. Spectrophotometer histograms of different size cells of *Cephalosporium acremonium*.

터 곰팡이 세포의 흡광도 측정을 방해하는 요인이 pellet 형태의 세포임을 확실히 알 수 있었다. 각 분리된 세포를 적절한 배율로 희석한 후 spectrophotometer의 cuvette에서 고르게 혼합하여 흡광도를 측정하였고 그때의 건조세포 중량을 실험적으로 구하였는데 그 결과를 Fig. 7에 나타내었다. 38 μ m에서 얻어진 분지가 적은 세포는 건조세포의 농도가 흡광도에 비해 매우 낮게 나타난 반면 45 μ m 이상의 sieve에서 얻어진 세포는 비슷한 결과를 보이고 있다. 특히 125 μ m 이하에서 얻어진 실험값 모두 높은 선형성을 보였으나 212 μ m의 경우는 데이터의 선형도가 낮았는데 이는 입자가 커질수록 교반에 의한 흡광도 측정이 어려워지기 때문이었다. 결국 균일한 morphology를 갖는 세포들로 구성된 배양액의 경우 입자의 직경이 212 μ m 이하이면 흡광도에 의해 균체의 농도를 즉시 역산할 수 있으나 355 μ m 이상의 세

포는 흡광도를 이용한 균체농도의 계산이 불가능함을 알 수 있었다.

한편 *Cephalosporium*과 같이 배양 중 다양한 morphology를 갖는 경우는 세포중량의 보다 정확한 계산을 위해서는 38 μ m에서 분리된 것과 같은 세포의 분율을 별도로 고려해 주어야 하나 이들이 흡광도에 미치는 영향이 미미하므로 세포농도의 계산에 큰 오차를 주지 못할 것으로 판단되었다. 이상의 결과들로부터 교반에 의해 곰팡이의 건조세포 중량을 계산할 수 있었으며, 약간의 데이터 오차는 입자의 직경이 큰 pellet들에 의해서 야기됨을 알 수 있었다.

요 약

곰팡이 세포농도를 측정하기 위하여 pellet에 대한

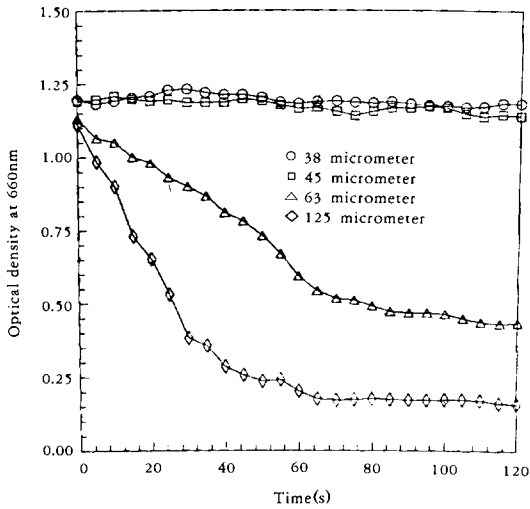


Fig. 6. Effect of different size cells on sedimentation rate of *Cephalosporium acremonium*.

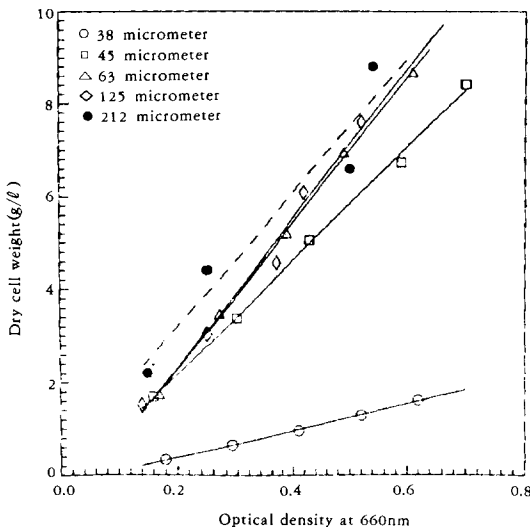


Fig. 7. Relationship between optical density and dry cell weight in different size cells of *Cephalosporium acremonium*.

침강 특성을 고려하여 흡광도를 측정하는 새로운 방법을 개발하였다. Pellet의 침강을 막기 위해 spectrophotometer의 cuvette 내에서 소형 마그네틱바로 시료를 적절히 교반시켰는데 그 결과 안정된 값의 흡광도를 얻을 수 있었으며 세포의 건조중량과 흡광도간에 선형적인 관계가 있는 것으로 나타났다.

그러나 크기별로 pellet 입자를 분리한 결과 입자 크기별로 동일한 흡광도에서 서로 다른 건조중량을 갖는 것으로 나타났으며 입자의 직경이 355 μm 이상인 경우 교반에 의한 흡광도를 측정할 수 없었다. 이상의 결과로부터 pellet을 형성하는 곰팡이 배양액의 경우 pellet의 침강 특성을 고려해 줌으로써 흡광도를 이용한 곰팡이 세포농도의 측정이 가능하다는 결론을 얻었다.

감 사

본 연구는 1993년도 한국과학재단의 핵심전문연구과제 연구비의 지원으로 수행하였으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. M. Taya, M. Hegglin, J. E. Prenosil and J. R. Bourne(1989), *Enzyme Microb. Technol.*, **11**, 170-176.
2. M. Charles(1978), *Advances in Biochemical Engineering*, **18**, 1-59, Berlin West Germany : Springer-Verlag.
3. A. Mitard and J. P. Riba(1986), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 245-249.
4. K. Mishima, A. Mimura and Y. Takahara (1991), *J. Ferment. Bioeng.*, **72**, 4, 296-299.
5. H. Tanaka, H. Aoyagi and T. Jitsufuchi (1992), *J. Ferment. Bioeng.*, **73**, 2, 130-134.
6. M. H. Christine, W. T. Robert, J. B. Stephen, W. L. Robert, J. M. Gareth and B. K. Douglas(1987), *Enzyme Microb. Technol.*, **9**, 181-186.
7. M. J. Kennedy, M. S. Thakur, D. I. C. Wang and G. N. Stephanopoulos(1992), *Biotechnol. Bioeng.*, **40**, 8, 875-887.
8. D. Siegmund and H. Diekmann(1989), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **32**, 32-36.
9. Z. R. Sung(1978), *Plant. Physiol.*, **57**, 460-462.
10. W. L. Robert, P. W. Robert, M. Gareth and B. K. Douglas(1988), *Appl. Microb. Biotechnol.*, **23**, 168-173.
11. R. P. Christopher, R. S. James and L. C. Charles(1979), *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 519-

- 523.
12. B. Metz, E. W. DE Bruijn and J. C. van Suijdam(1981), *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 149-162.
 13. H. L. Adams and C. R. Thomas(1981), *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 111-148.
 14. W. L. McCabe, J. C. Smith and P. Harriott (1985), *Unit Operation of Chemical Engineering*, (K. Verma and M. Eichbert, eds), 4th ed., p. 143, McGraw-Hill.
 15. R. H. Perry, D. Green and J. O. Maloney (1984), *Perry's Chemical Engineering Handbook*(H. B. Crawford and B. E. Eckes, eds), 6th ed., 5-63-5-64, McGraw-Hill.