

영지의 액체배양 중 균사형태에 미치는 통기·교반의 영향 및 Scale-up

이학수, 이기영², 최상윤¹, 이신영^{2*}

Effect of Agitation, Aeration and Scale-up on Mycelial Morphology During Liquid Culture of *Ganoderma lucidum*

Hak-Su Lee, Ki-Young Lee², Sang-Yun Choi¹, and Shin-Young Lee^{2*}

접수: 2011년 6월 15일 / 게재승인: 2011년 8월 29일
© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: This study was carried out to investigate the effects of agitation, aeration and scale-up on the mycelial growth, exo-polysaccharide (EPS) production, and mycelial morphology in the liquid culture of *Ganoderma lucidum*. A correlation between roughness and operating variables was also studied to scale-up the liquid culture of *G. lucidum* in a jar fermenter. When the agitation speed or aeration rate increased, the morphological form was changed from rough pellet to smooth pellet form. Increase of the agitation and aeration reduced the mycelial roughness. On the other hand, in the case of pellet size, it was not affected by aeration. The higher EPS production was obtained at approximately 17% of roughness and mycelial pellet size of 3~5 mm. The morphology at each fermenter was closely correlated with $k_L a$ value, and it was found that similarity of morphology would be used as a criteria of scale-up for liquid culture of *G. lucidum*.

Keywords: *Ganoderma lucidum*, scale-up, morphology, liquid culture, regression analysis, bi-staged pH process

동방미래화학(주) 기술연구소
Technique Research Institute, Dongbang Future Chemical Co., Ltd.,
Gyunggi 445-920, Korea

¹ 고려대학교 생명공학원
¹School Life Sci. Biotechnol., Korea University, Seoul, Korea

² 강원대학교 생물공학과
²Department of Bioengineering and Technology, Kangwon National
University, Chuncheon 200-701, Korea
Tel: +82-33-250-6273, Fax: +82-33-243-6350
e-mail: sylee@kangwon.ac.kr

1. 서론

일반적으로 균류는 액체배지에서 생육하는 경우, 분산된 filament 형태로부터 밀한 균사 집합체로서의 pellet 형태에 이르는 서로 다른 균사형태를 나타낸다 [1,2].

이러한 균사의 형태는 배양액 점도 등의 물성을 변화시켜 물질 및 열전달 등에 영향을 미치는데, filament 형태로 생육할 경우는 배양액 점도의 증가로 적절한 교반 및 통기에 많은 동력이 소비된다 [3,4]. 반면, pellet 형태로 생육할 경우는 점도의 증가가 적어 교반 및 통기를 위한 동력의 소모는 적지만, pellet 내부로의 물질전달이 어려워 균사의 생육과 생성물의 생산이 저해된다 [4,5].

그러므로 균류를 산업적으로 이용할 때 균에 따라 서로 다른 형태가 요구되는데, *Rhizopus arrhizus*를 이용한 fumaric acid의 생산, *Aspergillus niger*를 이용한 펙틴 효소의 생산 및 *Penicillium chrysogenum*을 이용한 항생제의 생산 시는 펠렛 형태보다 필라멘트 형태에서의 생산성이 더 높았다 [4,5]. 반면, *Aspergillus niger*에 의한 구연산, itaconic acid 및 polygalacturonase의 생산에서는 펠렛 크기에 의존하며, *Penicillium chrysogenum*을 이용한 페니실린 생산은 펠렛 및 필라멘트 생육이 모두 중요하였다 [2,7].

따라서 균사의 형태는 발효공정의 중요 조절인자의 하나로써 많은 경우 발효산물의 생산성과 밀접한 관련을 가지는 것으로 볼 수 있으며, 결국 균사형태를 조절함으로써 발효 생산성을 향상시킬 수 있음을 예측할 수 있다.

버섯에 의한 생육 균사형태와 대사산물 생산과의 관계는 비록 잘 알려져 있지 않지만 영지버섯 액체배양의 경우 균사의 적정 크기 및 형태가 균사생육 및 다당 생산에 매우 중요한 것으로 보고되었다 [8-13].

Fang 등 [13]은 영지의 대사가 그의 형태에 관계되며 진탕 배양에서 펠렛 형태로 생육하는데, 펠렛 크기에 따라 균체내 다당과 ganoderic acid의 상대적 생산성이 달라진다고 하였다.

특히, Lee와 Lee [14]는 영지의 경우 air-lift fermenter system에서 배지조성 및 배양조건에 따라 균사형태는 non-branched long filamentous mycelium, non-branched short filamentous mycelium, branched long filamentous mycelium, branched short filamentous mycelium, 각종 clump의 필라멘트 형태와, smooth pellet, rough pellet 및 hollow rough pellet 등의 다양한 형태를 갖는다고 하였다. 또, 세포외 다당 생산에서 적정 크기와 빈도수의 펠렛을 유지하는 것이 중요하다고 하였으며, pH 조절 및 ammonium phosphate의 농도에 의해 이의 조절이 가능하다고 하였다 [8,9,15].

이에 따라 Lee 등 [9]은 그 동안 영지의 액체배양에 관한 일련의 연구로서 air-lift fermenter system을 이용한 2단계 pH shift 배양법을 확립하여 세포외 다당의 생산성의 수준을 현저하게 향상시킬 수 있음을 보고하였다.

하지만 균사형태와 생성물과의 상관관계 분석은 이루어지지 않았고, 또 산업적 규모로 널리 이용되지 않는 air-lift fermenter system에 제한되었다.

통상, 영지 액체배양의 jar fermenter system은 air-lift fermenter system과는 달리 교반날개나 방해판 등에 의한 균사의 손상 또는 단편화 및 각종 sensor에 부착하여 생육하는 wall growth 등이 동반된다 [8]. 아울러, 세균 및 곰팡이에 의한 대부분의 다당 생산에 있어 산소는 주로 신생세포의 glucan 합성 효소계에 영향을 주어 다당의 생산성을 향상시키므로 [16] 이러한 높은 산소요구도의 충족을 위해 높은 교반 및 통기속도가 필요하다 [17]. 하지만 높은 전단효과에 의해 균사체의 파괴나 생성물의 생산이 저해될 수 있으므로 적정 수준의 산소가 기상으로 액상으로 전달되도록 하는 것이 중요하며 [18,19], 궁극적으로 산소이동에 대한 통기 및 교반의 효과를 확립하지 않으면 안 된다.

일반적으로 균사의 형태에 영향을 미치는 요인으로는 전단응력, 접종원의 농도, 배지의 구성성분, pH 및 용존산소의 농도 등이 있지만 [1-5], jar fermenter system하에서는 균사의 형태를 일정한 크기와 형태로 유지하기 위한 통기 및 교반 조건의 확립이 중요하며, 균사형태와 생성물과의 상관관계 확립 및 이의 정량화가 필요하다.

이상의 관점으로부터 본 연구는 jar fermenter system을 이용하여 서로 다른 pH process하의 영지 액체배양 중의 균사형태변화를 조사하였다. 특히, 세포외 다당의 대량생산을 위한 적정 교반 및 통기속도를 확립할 목적으로 이들 변화에 따른 균사체 형태 분석을 조사하여, 그 효과를 해석하였다. 아울러, bistage pH control하의 서로 다른 발효조 용량 (2.6, 20 및 75 L jar fermenter system)에서의 배양을 통하여 scale-up에 따른 균사형태의 변화를 조사하였고, scale-up, 통기 및 교반속도에 따른 형태지표와 조작변수와의 상관관계를 해석하였다. 또, 그 동안 균사 형태를 지표로 한 scale-up의 연구는 보고된 바 없었으므로 산소이동용량계수 ($k_L a$)와의 상관성을 분석하여 균사형태의 scale-up 지표로서의 가능성을 검토하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 균주 및 보존

본 연구에서 사용한 균주는 *Ganoderma lucidum* ASI 7004이다. P.D.A. (potato dextrose agar) 평판배지에서 30°C로 7일간 배양한 후 4°C에서 보존하였고, 3개월마다 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

2.2. 배지조성

본 실험에서 종균배양에 사용한 배지는 Sone 등 [20]이 보고한 진탕배양용 배지이며, 본 배양에는 이 등 [8]이 보고한 *G. lucidum* 액체배양에 의한 세포외 다당 생산의 최적 배지를 사용하였다. 배지는 121°C에서 15분간 가압 살균 후 사용하였고, 살균 시 염의 침전을 방지하기 위해 탄소원, 질소원, 무기염류는 각각 분리 살균한 후 혼합하여 사용하였다. pH는 필요시 1 N NaOH 또는 1 N HCl로 조절하였다.

2.3. 전 배양

P.D.A. 평판배지에서 생육한 균사체를 직경 5 mm의 stainless steel pipe로 mycelium disk를 만든 다음, 이 disk 4-5개를 50 mL의 배지를 넣은 250 mL 삼각 플라스크에 접종하였다. 30°C에서 7일간 배양한 다음 이를 1차 전 배양액으로 하였다. 다시 종균용 배지 50 mL를 함유한 250 mL의 삼각 플라스크에 5% (v/v)의 1차 전 배양액을 접종하였고, 30°C에서 100 rpm으로 5일간 진탕배양하여 2차 전 배양액으로 하였다. 이 때, 각 전 배양액은 균질기 (동양(주), model 0820)로 30초 동안 균질화시켜 본 배양의 접종용으로 사용하였고, 매 실험마다 새로이 배양하여 사용하였다.

2.4. 발효조 배양

2.6 L jar fermenter 배양: 2.6 L의 jar fermenter (Marubishi, MD-250)은 전 배양액을 5% (v/v)로 접종하여 온도 30°C, uncontrolled, controlled 및 bi-staged pH (배양 6시간 후 pH를 3에서 6으로 조정), 배지액량 1.5 L, 통기속도 0.5~2.0 vvm 및 교반속도 100~600 rpm의 배양 조건으로 실시하였다. pH는 필요시 1N HCl 또는 1 N NaOH를 사용하여 조절하였고, 통기로 인하여 발생한 거품은 Antifoam 289 (Sigma Co.)를 사용하여 제거하였다. 또 균사체 생육으로 인한 wall growth를 방지하기 위하여 polyacrylic acid (Wako Chemical Co.)를 0.1% (w/v)를 첨가하였다 [21].

20 L jar fermenter 및 75 L pilot fermenter 배양: 20 L의 jar fermenter (Bioengineering, L1523) 및 75 L의 pilot fermenter (Bioengineering, LP351)를 사용하여 접종비를 5% (v/v)로 하고, 전지는 온도 30°C, pH (초기 pH 6.0 또는 pH shift)의 조건, 배지액량 12 L, 통기속도 1.0 vvm 및 교반속도 200~600 rpm의 배양 조건으로, 그리고 후자는 온도 30°C, pH shift (pH 3- > pH 6), 배지액량 50 L, 통기속도 0.3~1.0 vvm 및 교반속도 100~300 rpm의 배양 조건에서 실시하였다.

2.5. 균사체, 세포외 다당 및 잔존당의 측정

균사체량은 배양액을 10,000 × g에서 15분간 원심분리하고

침전된 균사체를 filter paper (No. 2, Whatman)로 여과한 다음, 증류수로 2~3회에 걸쳐 수세하였고, 70°C에서 24시간 건조한 후, desiccator에서 항량이 될 때까지 방치하면서 건조 중량 (mycelial dry weight, MDW)을 측정하여 정량하였다. 또한, 세포의 다당은 원심분리 (10,000 × g, 15분)하여 균사체를 제거한 후 얻어진 배양 여액에 2배량의 acetone을 가하여 침전물을 얻었으며, 이를 70°C에서 24시간 건조한 다음 중량을 측정하여 조다당 (crude exopolysaccharide)으로 정량하였다.

한편, 배양액 중의 잔존 glucose 농도는 DNS (dinitrosalicylic acid) 법 [22]을 이용하여 575 nm에서 흡광도를 구한 후, 표준곡선으로부터 환산하여 구하였다.

2.6. 균사체의 형태분석

균사체 형태는 image capturing board를 사용하여 PC에 연결한 image analysis system (Optimas Co., U.S.A)으로 분석하였다. 즉, CCD camera (Panasonic, wv-CP410) 또는 microscope (Olympus, CHS-213E), PCI video frame grabber (Flashpoint Ver. 3.11, Integral Tech, Inc) 및 PC로 구성되었고, 구성된 장치를 사용하여 image software (Optimas 6.1, Optimas Co.)로 분석하였다.

시료의 조제: 균사의 형태 관찰을 위하여 시료 1 mL를 무작위로 취한 다음, 동량의 고정화 용액 (13 mL 40% formaldehyde + 5 mL glacial acetic acid + 200 mL 50% ethanol)으로 고정시켜 10배로 희석한 후, glass cube (가로 4 cm × 세로 3 cm × 높이 1.5 cm)의 시료로 사용하였다 [23].

Table 1. Condition of parameters for an analytical image of *G. lucidum*

Parameter	Condition
Camera control	Brightness : 0
	Contrast : 160
Intensity	Window : 256
	Level : 160
Arithmetic operation	Multiply
Conditional dilate	127~200 thresholds

화상분석: 화상분석의 절차는 Cox와 Thomas의 방법 [24]에 준하였고, 화상의 분석을 위한 CCD camera의 노출, 명암, arithmetic operation 및 threshold 범위 등의 화상분석 조건은 Table 1과 같았다. 분석시 CCD camera의 화상은 640 × 640 pixels 및 256 grey level의 해상도로 촬영하였으며, 오차를 최소화하기 위하여 400 × 400 pixels로 수정하였다. Image software (Optimas 6.1)를 이용하여 면적, 길이, 직경 등 각종 형태변수를 구하였으며, roughness는 펠렛의 면적을 이용하여 다음 식으로부터 계산하였다 [24].

$$\text{Roughness (\%)} = \frac{(\text{whole pellet area} - \text{core pellet area})}{\text{whole pellet area}} \times 100$$

2.7. 중회귀분석

설명변수인 통기속도 (Vs, X1), 교반속도 및 impeller 지름

(NDi, X2)과 목적변수인 산소이용용량계수 (k_{La}, Y)의 중회귀분석은 MS Excell (Microsoft Co.)을 사용하여 실시하였다 [25].

3. 결과 및 고찰

3.1. 세포의 다당 생산 및 균사형태에 미치는 서로 다른 pH process의 영향

Lee 등 [8]은 air-lift fermenter system하에서 서로 다른 pH process, 즉 uncontrolled, controlled 및 bi stage pH control 이 균사 및 세포의 다당의 생성에 영향을 줌을 보고하였다.

따라서 이와의 비교 관점에서 jar fermenter system (2.6 L) 하에서의 이들 pH process가 세포의 다당 생산 및 균사형태에 미치는 영향을 조사하였으며, 그 결과는 Fig. 1과 같다.

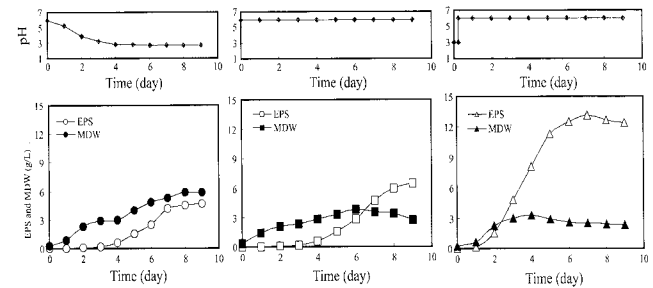


Fig. 1. Time courses of MDW and EPS of *G. lucidum* mycelium under different pH processes.

Air-lift fermenter system에서와 마찬가지로 [8] uncontrolled system에서 균사체량은 가장 높았으나 세포의 다당 생성량은 가장 낮았다. 반면, bistage pH control에서는 균사체량은 가장 낮았으나 세포의 다당 생성이 가장 높았다.

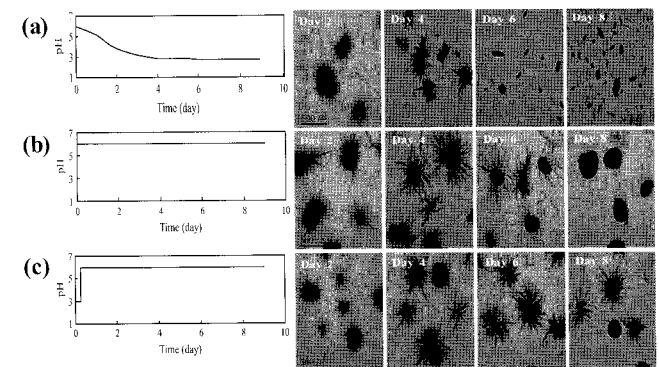


Fig. 2. Morphological changes of *G. lucidum* mycelium culture under different pH processes in a 2.6 L jar fermenter (30°C, 400 rpm and 1 vvm). (a) uncontrolled pH 6, (b) controlled pH 6, (c) bi-staged pH (shift from 3 to 6)

Fig. 2는 이 때의 균사의 형태변화를 조사한 결과로, pH process에 상관없이 배양초기 (day 2 및 day 4)에는 주로 비슷한 크기의 rough pellet으로 생육하였다. 하지만 배양 중기 및 후기 (day 6 및 day 8)에서 uncontrolled process에서는

균사의 파편화 및 짧은 필라멘트 생육이 현저하였다. 반면, controlled system에서는 배양 후기 smooth pellet의 형태를 나타내었고, bistage pH process하에서는 rough pellet의 형태를 그대로 유지하였다. 따라서 rough pellet의 형태가 세포의 다당 생성에 유리한 것으로 판단되었으며, 이하에서는 bistage pH process하에서 실험하였다.

3.2. 균사 형태에 미치는 교반 및 통기속도의 영향

영지의 액체배양 중 통기속도를 1 vvm으로 고정하고 여러 교반속도 (100~600 rpm)에 따른 균사형태의 변화를 조사하였으며, 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다.

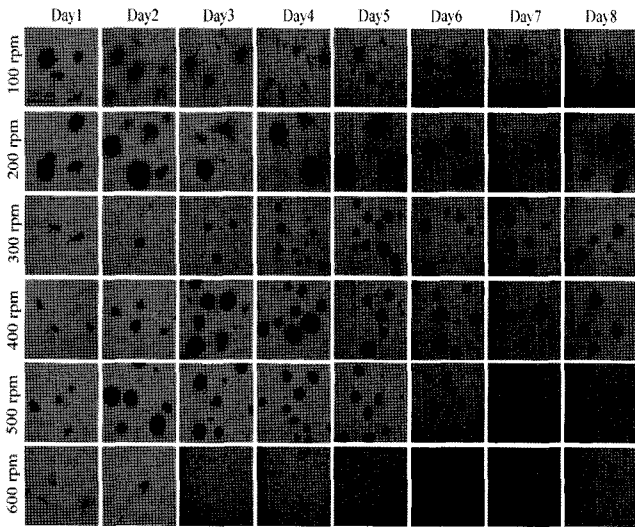


Fig. 3. Agitation effect on morphological changes of *G. lucidum* mycelium. (2.6-L jar fermenter, bi-staged pH process, 1.0 vvm, 30°C)

영지 균사는 500 rpm까지는 비교적 전형적인 pellet 형태로 생육하였으나 600 rpm에서는 pulp의 형태로 변하였다. 또, 500 rpm까지의 교반속도에 따른 균사의 형태는 대체로 교반속도의 증가에 따라 rough pellet으로부터 smooth pellet 형태로 변하였는데, 이러한 교반속도에 따른 균사체의 형태 변화 경향은 Fukushima와 Okada 등 [26]이 *Lentinus edodes*에 대해 보고한 사실과 비슷하였다.

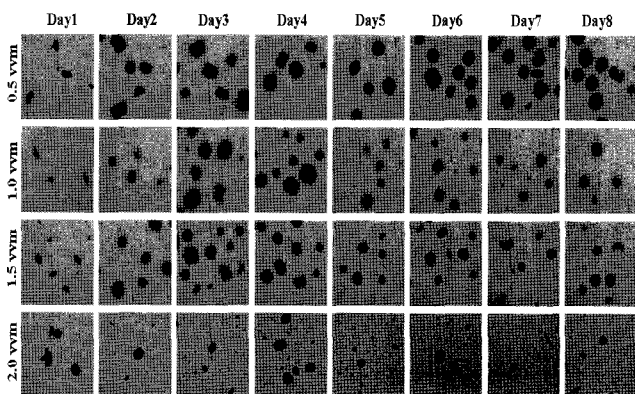


Fig. 4. Aeration effect on morphological changes of *G. lucidum* mycelium. (2.6-L jar fermenter, bi-staged pH process, 400 rpm, 30°C)

한편, 영지의 액체배양 중 교반 속도를 400 rpm으로 고정하고 여러 통기속도 (0.5~2.0 vvm)에 따른 균사형태의 변화를 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. 교반속도의 효과와 비슷하게 낮은 통기속도 (0.5 vvm)에서는 pellet 형태로 생육하였다. 하지만 통기속도가 증가함에 따라 smooth pellet 형태로 변하였으며, 2.0 vvm에서는 균사의 파편화 및 pulp 형태가 관찰되었다.

일반적으로 균사형태를 정량화하기 위해서는 fractal 차원과 원형도가 널리 사용되지만 [27-29], 이들 값은 균사의 면적과 둘레길이의 값을 이용하여 산출하므로 rough pellet 또는 smooth pellet 형태의 차이를 분석하는 데는 부적당하다.

따라서 본 연구에서는 균사 형태의 정량화 지표로서 균사의 roughness 정도와 core 크기를 조사하였으며, 교반속도에 따른 이들의 변화를 Fig. 5에 나타내었다.

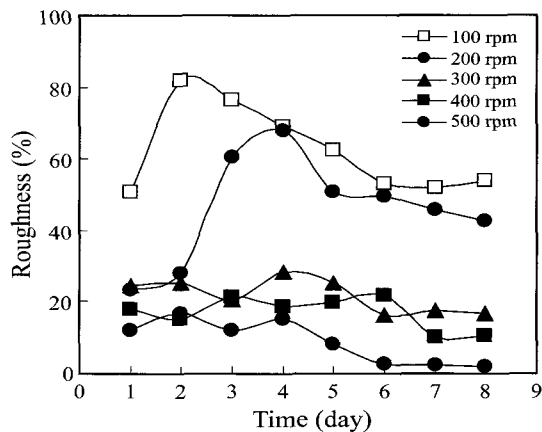
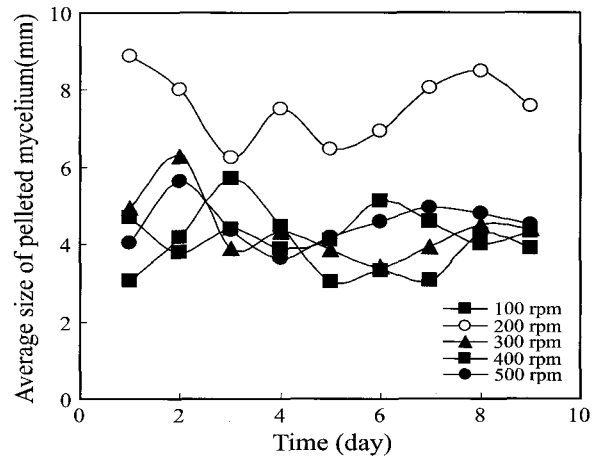


Fig. 5. Effect of agitation speed on the roughness and pellet size of *G. lucidum* mycelium under bi-staged pH process (pH shift from 3 to 6 after 6hr of batch culture) in 2.6-L jar fermenter.

비교적 낮은 교반속도인 100~200 rpm에서는 roughness가 컸으며, 배양경과 시 roughness가 증가하다 6일 후 다소 감소하였다. 반면, 교반속도가 300 rpm일 때는 배양 5일 후 감소하였고 400 및 500 rpm에서는 각각 배양 4일과 3일후 roughness가 감소하였다. Roughness 값은 낮은 교반속도인 100 rpm에서 최대 60%이상이었으며, 높은 교반속도인 500 rpm에서는 20%이하로 낮았다. 이와 같이 100~500 rpm

으로 교반속도가 증가함에 따라 pellet의 roughness가 감소하였는데, 이는 Cui 등 [30]이 보고한 “shaving of hair” 현상, 즉 교반속도 증가에 따라 rough pellet 주위의 균사들이 잘려진다는 보고와 잘 일치한다. 하지만 교반속도가 600 rpm 이상에서는 mechanical force에 의한 전단효과 (shear effect)로 균사의 파편화 등이 관찰되었고, 균사형태도 filament 형태를 나타내었다. 균사의 크기는 100 rpm에서 3.8~5.1 mm, 200 rpm에서 6.2~8.8 mm로 교반속도의 증가에 따라 증가하였고, 300~500 rpm에서는 3~5 mm 정도로 일정하였다.

한편, Fig. 6에서 볼 수 있는 바와 같이, 통기속도도 0.5~2.0 vvm으로 증가할수록 roughness 값이 감소하였다. 하지만 대체로 20%이하로 교반속도 변화에 대한 값보다는 낮았으며, 따라서 pellet 형태의 변화는 통기속도에 비해 교반속도가 더 큰 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. 또, 통기 속도에 따른 균사 크기의 변화를 보면, 낮은 통기속도인 0.5 vvm에서 균사의 크기는 5~6.6 mm 정도였으나, 1.0~2.0 vvm에서는 3~5.5 mm 정도로 일정하였다.

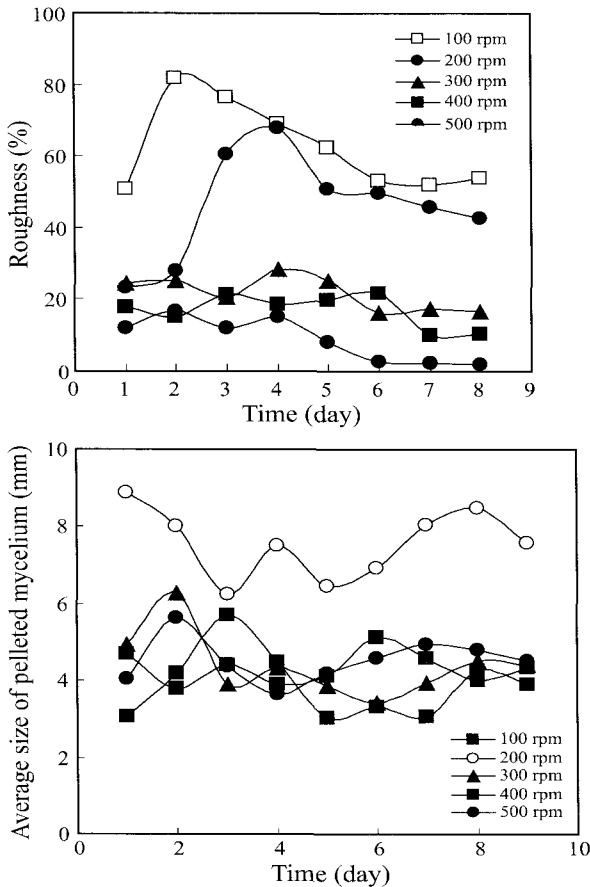


Fig. 6. Effect of aeration rate on the roughness and pellet size of *G. lucidum* mycelium under bi-staged pH process (pH shift from 3 to 6 after 6hr of batch culture) in 2.6-L jar fermenter.

이상의 교반 및 통기속도에 따른 roughness 및 균사의 평균 크기변화를 다당 생성 (Fig. 2)과 비교해 보면, 최대 다당 생산을 나타내는 최적 교반 및 통기 조건은 400 rpm 및 1 vvm이었으며, 이 때의 pellet의 형태는 rough 형태로,

roughness (%)는 약 17%, 그리고 펠렛 크기는 3~5 mm 정도를 유지할 때 높은 다당 생성을 보임을 알 수 있었다.

3.3. Scale-up에 따른 균사형태의 변화

2.6 L 발효조에서 서로 다른 통기 및 교반조건하의 균사형태는 다당의 생성과 상관성을 가지며, roughness와 펠렛 크기가 중요한 인자임이 확인되었다. 특히, 다당 생성의 적정 펠렛 크기 (약 4 mm)에 따른 roughness의 변화폭이 매우 컸으므로 (Fig. 7) roughness의 적정 값이 다당 생성에 더 중요한 것으로 나타났다.

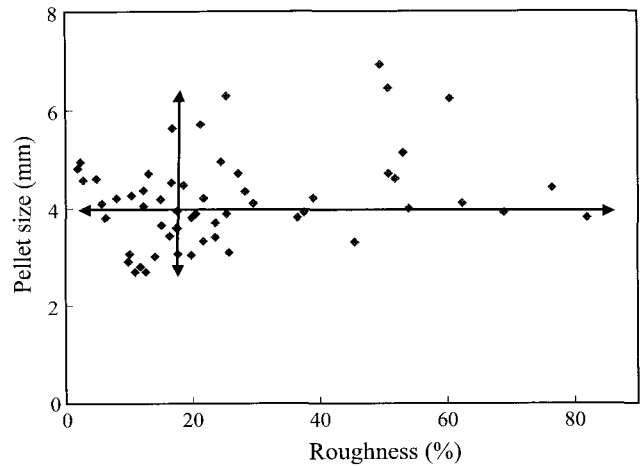


Fig. 7. Corellation of pellet size and roughness for exopolysaccharide production of *G. lucidum* in batch culture under bi-staged pH process.

따라서 서로 다른 발효조 크기에서도 이러한 상관성이 성립되는 지를 확인하기 위해 20 L 발효조 (200~600 rpm/1 vvm) 및 75 L 발효조 (100 rpm/1 vvm, 200 rpm/0.5 vvm, 300 rpm/0.3 vvm)에서 균사형태를 조사한 결과는 Fig. 8과 같다.

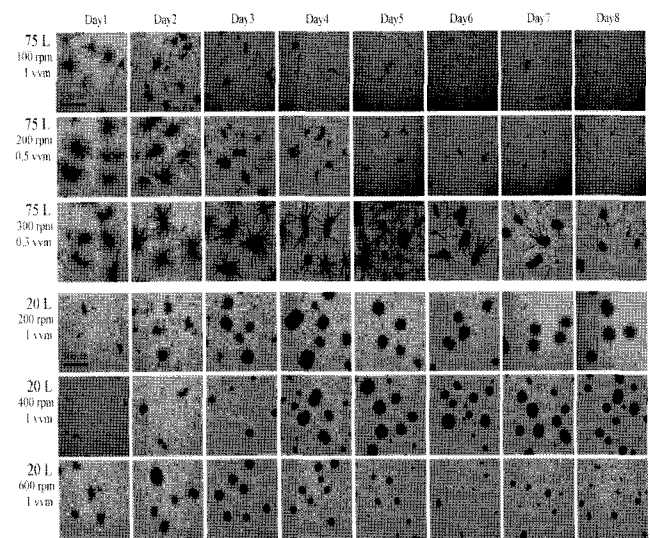


Fig. 8. Aeration and aeration effect on morphological changes of *G. lucidum* mycelium. in 20 and 75 L fermenter systems under bi-staged pH process at 30 °C.

20 L 발효조에서 200 rpm, 1 vvm 조건하의 배양경과에 따른 균사형태의 변화는 400 rpm, 1 vvm 조건하의 2.6 L 발효조에서와 매우 유사하게 rough 펠렛으로 진행되었다. 그러나 20 L 발효조의 400 및 600 rpm, 1 vvm의 통기교반 조건하에서는 배양말기에 rough 펠렛으로부터 smooth 펠렛의 형태로 변하고, 전단의 영향을 받음을 보였다. 또 75 L pilot fermenter에서도 2.6 및 20 L 발효조의 산소이동 용량계수와 비슷한 값을 나타내는 통기교반 조건인 100 rpm, 1 vvm 또는 200 rpm, 0.5 vvm에서 균사형태의 배양경시변화는 배양 3일 및 5일후 rough 펠렛의 fragmentation으로 매우 작은 펠렛이나 필라멘트를 생성하여 진행되었는데, 100 rpm, 1 vvm의 경우가 200 rpm, 0.5 vvm의 경우보다 더 심하였다. 하지만 교반속도는 높지만 통기속도는 낮은 300 rpm, 0.3 vvm의 조건에서 균사형태는 rough 펠렛의 형태를 유지하여 큰 발효조에서는 교반보다는 통기에 의한 shear effect가 rough pellet의 fragmentation에 더 큰 영향을 미치는 것으로 판단하였다.

3.4. Roughness와 조작변수와의 상관관계

각 발효조에서 통기속도 및 교반속도의 증가에 따라 서로 비슷한 균사 형태의 변화를 보였으므로 통기 및 교반속도에 따른 roughness (%)의 관계를 조사하였으며, 그 결과를 Fig. 9에 나타내었다.

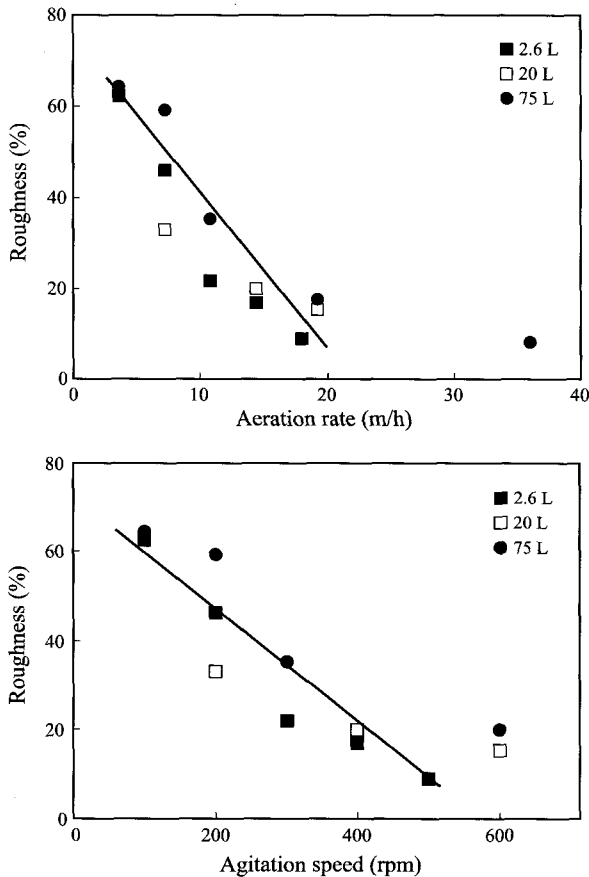


Fig. 9. Effects of agitation speed and aeration rate on roughness (%).

발효조 용량의 차이에 상관없이 매우 높은 교반속도나 통

기속도를 제외하면 대체로 roughness (%) 값은 직선적으로 감소하였다. 또, 각 발효조에서 대응하는 통기 및 교반에 대한 roughness (%) 값의 직선관계로부터 구한 기울기 값은 통기 속도의 쪽이 더욱 커서 roughness (%)는 교반속도의 변화보다는 통기속도의 변화에 더욱 민감함을 알 수 있었다.

또, 이들 관계를 보다 정량적으로 조사하기 위하여 통기 속도 (Vs), 교반속도 및 impeller 지름 (N·Di)을 독립변수로 하고, roughness (%) 값을 종속변수로 하여 2차 회귀 분석하였으며, 그 결과를 Table 2 및 Fig. 10에 나타내었다.

Table 2. Results of multiple regression analysis

	Regression coefficient	Standard error
Y-intercept	16.588	0.385
Vs(X1)	0.24	0.166
N ³ ×Di ² (X2)	-0.32	0.062

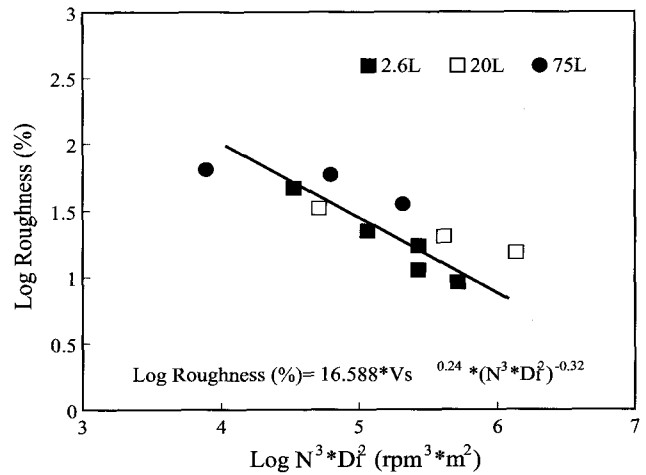


Fig. 10. Relationship of roughness (%) and N³*Di² at different aeration rates. 2.6 L: aeration rate : 7.2, 10.8, 14.4 m/h, 20.0 L: aeration rate : 9.6, 19.2, 28.8, 38.4 m/h, 75.0 L: aeration rate : 10.8, 18, 28.8 m/h.

이들 자료에 의해 roughness (%), 통기 (Vs), 교반속도 및 impeller 지름 (NDi)과의 상관관계는 다음과 같은 관계의 식으로 나타낼 수 있었다.

$$\text{Log Roughness (\%)} = 16.588 \times Vs^{0.24} \times (N^3 \cdot Di^2)^{-0.32}$$

Table 3은 이들 독립변수와 종속변수의 다중상관계수와 잔차를 요인으로 하여 이 식의 종속변수에 대한 독립변수의 영향을 검토한 분산분석 (ANOVA: Analysis of Variance)의 결과이다.

Table 3. ANOVA table

Factor	Square Sum	Degree of Freedom	Square Mean	F ratio
Regression	0.771	2	0.386	16.072**
Error	0.24	10	0.024	
Total	1.011	12		

R² = 0.763, R = 0.873.

회귀식의 제공함은 0.771, 잔차의 제공함은 0.24이었고, 0.873의 다중회귀계수를 얻었다. 또 유의수준 $p < 0.01$ 에서 유의성이 있음을 보여 종속변수와 독립변수의 상관관계가 양호함을 알 수 있었다.

한편, 서로 비슷한 균사 형태의 경시변화를 나타낸 각 발효조에서의 통기교반 조건에서는 산소이동 용량계수의 값도 비슷하였으므로 산소이동용량 계수와 균사형태가 밀접한 관련을 갖는 것으로 생각되었다. 즉, 저자들의 또 다른 연구에 의하면, 배양 중의 통기 및 교반에 의한 산소이동 용량계수의 변화를 측정함으로써 정확하게 세포외 다당 발효를 제어할 수 있는 것으로 나타났다 [31].

이에 따르면, 산소이동용량계수 (k_{La}), 통기 (V_s), 교반속도 및 impeller 지름 (ND_i)과의 상관관계는 다음과 같은 관계의 식으로 나타낼 수 있었다.

$$k_{La} = 0.555 \times V_s^{0.42} \times (N^3 \times Di^2)^{0.33}$$

또, 최대의 다당 생성이 예측되는 산소이동 용량계수 값은 $85.4 \pm 26.70 \text{ h}^{-1}$ 이었다.

자료화하지는 않았으나 roughness (%)와 조작변수의 관계 식 및 k_{La} 와 조작변수 관계식의 상관관계는 매우 양호한 부의 상관관계 ($R^2 = 0.9558$)를 나타내었다.

이와 같이, 최대의 다당 생산을 나타내는 산소이동용량계수가 균사형태와 밀접한 상관관계를 보였음은 균사형태를 각 발효조에서 비슷하게 하는 조작조건을 구함으로써 scale-up이 가능한 것을 암시하는 것으로 추후 충분한 검토의 필요성이 높다고 판단되었다.

4. 결론

Bi-staged pH control하의 jar fermenter system에서 영지의 액체배양 시 효율적인 균사체 및 세포외 다당 생산을 위한 통기, 교반 및 scale-up의 효과를 균사형태의 변화를 변수로 하여 조사하였다. 아울러, 형태변수와 발효조 조작변수와의 상관관계를 해석하여 scale-up의 조건을 검토, 확립하였다.

균사 형태에 미치는 통기 및 교반의 효과를 조사한 결과, 교반 및 통기속도의 증가에 의해 균사의 형태는 rough pellet의 형태로부터 smooth pellet의 형태로 변화하였고, roughness (%)에 의하여 정량화가 가능하였다. 100rpm에서의 roughness는 60%이상이었으나 500 rpm에서는 20%이하로 교반속도의 증가로 roughness가 감소하였고, 실험한 통기속도 범위에서 roughness 값은 20%이하로 통기속도의 증가에 따라서도 roughness는 감소하는 경향을 보였다. 한편, 균사의 크기는 100 rpm에서는 3.8~5.1 mm이었으나 200 rpm에서는 6.2~8.8 mm로 증가하였고, 300~500 rpm에서는 다시 감소하여 3~5 mm의 일정크기를 유지하였다. 그러나 통기속도는 균사 크기에 큰 영향을 주지 않고 3~5.5 mm 범위이었다. 대체로 다당 생성은 roughness 및 균사크기와 유의적인 상관관계를 보였고, roughness가 약 17% 및 균사크기가 3~5 mm의 균사 크기를 유지할 때 다당 생산성이 높았다. 교반 및 통기

에 따른 roughness (%)와 통기속도 (V_s), 교반속도 (N) 및 impeller 지름 (Di)의 자료로부터 중회귀분석한 결과, 이들 사이의 관계는 다음 식으로 표현할 수 있었다.

$$\text{Log Roughness (\%)} = 16.588 \times V_s^{0.24} \times (N^3 \times Di^2)^{-0.32} \\ (R = 0.873, p < 0.05)$$

또, roughness (%)와 교반 및 통기에 따른 산소전달계수 (k_{La})는 매우 양호한 부의 상관관계를 보여, 새로운 scale-up 지표로서의 가능성이 예측되었다.

References

- Papagianni, M. (2004) Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol. Adv.* 22: 189-259.
- Metz, B. and N. W. F. Kossen (1977) Biotechnology review: The growth of molds in the form of pellets. *Biotechnol. Bioeng.* 19: 781-799.
- Mitard, A. and J. P. Riba (1988) Morphology and growth of *Aspergillus niger* ATCC 26036 cultivated at several shear rates. *Biotechnol. Bioeng.* 32: 835-840.
- Byrne, G. S. and O. P. Ward (1989) Effect of nutrition on pellet formation by *Rhizopus arrhizus*. *Biotechnol. Bioeng.* 33: 912-914.
- Vecht-Lifshitz, S. E., S. Magdassi, and S. Braun (1990) Pellet formation and cellular aggregation in *Streptomyces tendae*. *Biotechnol. Bioeng.* 35: 890-896.
- König, B., K. Schügerl, and C. Seewald (1982) Strategies for penicillin fermentation in tower-loop reactors. *Biotechnol. Bioeng.* 24: 259-280.
- Lee, S. Y. and T. S. Kang (1996) Production condition and characterization of exo-polysaccharide production produced by submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* mycelium. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24: 111-118.
- Lee, K. M., S. Y. Lee, and H. Y. Lee (1999) Bistage control of pH for improving exopolysaccharide production from mycelia of *Ganoderma lucidum* in an air-lift fermentor. *J. Biosci. Bioeng.* 88: 646-650.
- Wagner, R., D. A. Mitchell, G. L. Sasaki, M. A. Lopes de Almeida Amazonas, and M. Berovic (2003) Current techniques for the cultivation of *Ganoderma lucidum* for the production of biomass, ganoderic acid and polysaccharides. *Food Technol. Biotechnol.* 41: 371-382.
- Wagner, R., D. A. Mitchell, G. L. Sasaki, and M. A. Lopes de Almeida Amazonas (2004) Links between morphology and physiology of *Ganoderma lucidum* in submerged culture for the production of exopolysaccharide. *J. Biotechnol.* 114: 153-164.
- Tang, Y. J., L. W. Zhu, H. M. Li, and D. S. Li (2007) Submerged culture of mushrooms in bioreactors - Challenges, current state-of-the-art, and future prospects. *Food Technol. Biotechnol.* 45: 221-229.
- Fang, Q. H., Y. J. Tang, and J. J. Zhong (2002) Significance of inoculation density control in production of polysaccharide ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochem.* 37: 1375-1379.
- Lee, K. M. and S. Y. Lee (2001) Influence of ammonium phosphate on mycelial morphology during submerged cultivation of *Ganoderma lucidum*. *Kor. J. Mycol.* 29: 91-98.
- Lee, K. M., S. Y. Lee, and H. Y. Lee (1999) Effect of ammonium

- phosphate on mycelial growth and exopolysaccharides production of *Ganoderma lucidum*. in an air-lift fermenter. *J. Microbiol. Biotechnol.* 9: 726-731.
15. Rau, U., E. Gura, E. Olszewski, and F. Wagner (1992) Enhanced glucan formation of filamentous fungi by effective mixing, oxygen limitation and fed-batch processing. *J. Industrial Microbiol.* 9: 19-26.
 16. Rane, K. D. and K. A. Sims (1994) Oxygen uptake and citric acid production by *Candida lipolytica* Y1095. *Biotechnol. Bioeng.* 43: 131-137.
 17. Smith, J. J. and M. D. Lilly (1990) The Effect of agitation on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. Bioeng.* 35: 1011-1023.
 18. Dronawat, S. N., C. K. Svihla, and T. Hanley (1995) The Effects of agitation and aeration on the production of gluconic acid by *Aspergillus niger*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 51: 347-354.
 19. Sone, Y., R. Okuda, A. Wada, A. Kishida, and A. Misaki (1985) Structures and antitumor activities of the polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*. *Agric. Biol. Chem.* 49:2642-2650.
 20. Lee, S. Y. and H. S. Lee (2001) Effect of polyacrylic acid addition on wall growth in submerged cultivation of *Ganoderma lucidum*. *Journal of Industrial Technology* (Kangwon Natl. Univ.) 21A: 341-345.
 21. Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chem.* 31: 426-428.
 22. Packer, H. L. and C. R. Thomas (1990) Morphological measurements on filamentous microorganism by fully automatic image analysis. *Biotechnol. Bioeng.* 35: 870-881.
 23. Cox, P. W. and C. R. Thomas (1992) Classification and measurement of fungal pellets by automated image analysis. *Biotechnol. Bioeng.* 39: 945-952.
 24. Nho, H. J. (1998) *Investigation Method and Statistical Analysis by Excell* (in Korean), Pumunsa, Seoul, Korea, pp. 320-333.
 25. Fukushima, Y., K. Okada, G. Kawai, and H. Motai (1991), Efficient production of mycelium of *Lentinus edodes* by a continuous culture. In *Science and Cultivation of Edible Fungi*, Vol. 2. M. J. Maher (ed), A. A. Balkema, Rotterdam, Netherlands, 721-725.
 26. Treskatis, S. K., V. Orgeldinger, H. Wolf, and E. D. Gilles (1997) Morphological characterization of filamentous microorganisms in submerged cultures by on-line digital image analysis and pattern recognition. *Biotechnol. Bioeng.* 53: 191-201.
 27. Ryoo, D. H. (1994) Analysis of filamentous fungal growth and pellets formation by fractal geometry. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 9: 512-517.
 28. Patankar, D. B., T. Liu, and T. Oolman (1993) A fractal model for the characterization of mycelial morphology. *Biotechnol. Bioeng.* 42: 571-578.
 29. Cui, Y. Q., R. G. M. Van der Lans, and K. C. A. M. Luyben (1997) Effect of agitation intensities on fungal morphology of submerged fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 55: 715-726.
 30. Lee, H. S. U. and S. Y. Lee (2009) Scaling up study of exopolysaccharide production through mycelial submerged cultivation of *Ganoderma lucidum*. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 24: 303-311.