

Phellinus linteus WI-001 발효에 따른 배양공정 parameter의 온라인 분석

김종래^{*1,2} · 권호균¹ · 전계택² · 이계관¹

¹환인제약(주) 중앙연구소, ²강원대학교 자연과학대학 생명과학부

On-line Analysis of *Phellinus linteus* WI-001 Fermentation Parameters. Kim, Jong-Lae^{*1,2}, Ho-Kyun Kwon¹, Gie-Taek Chun², and Kye-Kwan Lee¹. ¹Department of Biotechnology, Central Research Center, Whanin Pharm. Co., Ltd., 150, Sinsohyun-Dong, Ansong, Kyunggi, Korea, ²Division of Life Science, Kangwon National University, Chunchon, Kangwon 200-701, Korea – Fermentation parameters were estimated by use of a vent gas analyzer coupled to a computer data acquisition system in cultivation of *Phellinus linteus* WI-001, a producer of polysaccharides known to have potent anticancer activities. Oxygen uptake rate (OUR), a critical indicator of the cells' activities, was calculated by applying oxygen mass balance. In addition, by dividing the oxygen uptake rate by the total oxygen consumed, on-line estimation of the cells specific growth rate was successfully done. It was also possible to estimate cell concentration directly by use of oxygen-cell yield ($Y_{x/o}$) which was obtained based on a correlation between cell growth and total oxygen consumed.

Key words: *Phellinus linteus*, polysaccharides, oxygen uptake rate, specific growth rate, cell yield

대부분 상업적으로 생산되는 발효산물의 경우, 배양의 상태를 최적화하는 것은 매우 어렵고 까다로운 작업이다. 미생물의 배양조건, 즉 온도, pH, 통기, 교반, 미생물의 성장 속도 등에 따라 발효산물은 크게 영향을 받는다. 이러한 데이터들은 컴퓨터 상에서 분석하고 조건에 만족하도록 직접 조절 가능한 신호전달체제로 바꿔 줌으로서 최적의 배양조건을 유지할 수 있다. 이러한 작업은 실험실 수준의 발효기 뿐만 아니라 pilot plant에서 미생물을 배양할 때 더 유용하다. 예를 들면, 시간에 따른 미생물의 농도를 구하고자 할 때, 정해진 시간에 시료를 채취하여 일정시간 이후에 측정이 되어 확인 할 수 있지만, gas analyzer를 통해 산소분압을 측정하고 공급되고 배출되는 공기의 압력, 온도, 유량 등의 여러 가지 변수를 측정하여 산소섭취속도와 총산소섭취량을 구하고 이로부터 특정시간의 미생물 농도를 컴퓨터에서 직접 확인할 수 있다[5].

특히 산업적 규모의 발효에서는 시료채취시 오염가능성이 있어 균체량을 측정하는데 많은 문제점을 가지고 있으며 분석결과를 실시간으로 분석, 진단하고 배양공정을 조절하기에는 매우 비효율적이다. 또한 배지조성 중 불용성 물질이 함유되어 있는 경우 균사체량을 측정하는 것은 매우 어렵다. 단백질, DNA 및 RNA등의 세포 구성물질을 화학적 분석방법을 이용하여 균사체량을 해석할 수 있으나 매우 복잡하고 노동력이 많이 소모되어 비경제적이다. 따라서 최근에는 배양중 간접적인 방법으로 세포량을 유추 해석할

수 있는 방법이 흥미를 유발시키고 있다[1,4,7].

또한 발효산물의 생산은 생산균주의 세포 비성장속도 (specific growth rate)와 제한 기질의 특성이 영향을 미치는 주된 요소로 알려져 있다[6]. 실제적인 실험에서의 세포 비성장속도의 측정은 시간에 따른 시료채취를 통한 세포성장곡선을 조사하여 얻을 수 있다. 그러나 세포 비성장속도 역시 gas analyzer를 이용하여 실시간으로 측정될 수 있다. 따라서 세포 비성장 속도를 실시간으로 측정하고 분석함으로써 적절한 배양조건으로의 신속한 전환이 이루어질 수 있다.

본 연구팀에서는 상황버섯 배양중 온라인 가스분석을 통해 균사체 배양 양상을 실시간으로 모니터링하고 조절할 수 있는 시스템 개발을 시도하였다. 이 논문에서는 산업적으로 응용가능한 배양공정 온라인 분석방법을 확립하여 *P. linteus* WI-001 배양중 실시간으로 균사체량(cell mass), 산소섭취속도(oxygen uptake rate) 및 세포 비성장속도를 분석하였다. 이 온라인 분석 데이터는 실지로 배양중 배양조건 변화등을 신속하게 파악할 수 있을 뿐 아니라 배양조건 조절등 매우 효과적인 분석 시스템으로서 기대된다[2].

재료 및 방법

균주 및 배양배지

본 실험에 사용한 *P. linteus* WI-001은 강원도 양양에서 채집한 자실체로부터 균사체를 분리하였으며, 이 자실체로부터 균사조직을 무균적으로 떼어 내어 준비된 고체배지상에 옮겨 순수 분리 배양하였다. 균주는 potato dextrose agar(PDA, Difco, USA) slant에 배양하여 4°C 냉장고에

*Corresponding author
Tel. 82-31-673-2041, Fax. 82-31-676-4671
E-mail: kimjl@whanin.co.kr

보관하면서 필요할 때마다 PDA 고체배지에 이식한 후 균 사체 직경이 5 cm 이상 자랐을 때 균사체 가장자리에서 의 료용 무균칼로 가로 5 mm, 세로 5 mm의 절편을 떼어 균 사체 확대배양을 하였다. 종배양을 위해 사용한 성장배지는 PDA 고체배지 및 potato dextrose broth(PDB, Difco, USA) 액체배지를 사용하였다. *P. linteus* WI-001 배양을 위한 생산용 배지는 조성은 20 g/l glucose, 10 g/l yeast extract, 2.5 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g/l K_2HPO_4 , 0.2 g/l KH_2PO_4 이며, 배지 구성성분은 균사체량 측정에 적합하게 물에 잘 용해되는 것으로 구성하였다. 생산배지의 초기 pH는 5.5로 조정하였으며, 배양중에는 pH를 조절하지 않았다.

배양 및 분석방법

1차 종배양은 100 ml의 성장배지를 넣은 500 ml의 baffle 삼각플라스크에 접종하여 진탕배양기(Vision scientific Co, Korea)에서 25°C, 120 rpm으로 7일간 배양하였다. 1차 종배양 완료 후 균사체 ball을 균질화 시키고자 waring blender(Cole parmer Co, USA)로 5초간 균질화 시킨 후 2차 종배양으로 200 ml 생산배지를 넣은 1 l baffle 삼각플라스크에 10%(V/V)로 접종한 후 25°C, 120 rpm으로 5일간 진탕배양하였다.

배양에 사용된 발효기는 7 l 용량(working volume 4 L)의 상부형 발효기(Kobiotech, Korea)로서 자동 온도 조절기, 교반속도 조절기, 용존산소농도(DO) 센서 및 pH 센서를 부착하고 있으며 데이터 수집 및 제어 프로그램(LOKAS, Korea)과 연결되어 자동으로 제어되었다. 산소의 공급은 공기압축기를 이용하여 여과필터를 거쳐 발효기 안으로 투입되게 하였으며 유량은 0.25-1.5 vvm으로 조절하였다. 교반속도는 100-150 rpm으로 용존산소농도에 따라 변화시키면서 배양하였다.

균사체농도를 측정하기 위하여 매시간 마다 채취한 시료를 여과장치에서 Whatman paper 2로 여과한 후 균사체를 증류수로 세척하고 다시 여과하였다. 이 과정을 2회 반복한 후에 수분측정기(Mettler toledo, Switzerland)에서 온도를 105°C로 조정한 후 건조무게를 측정하였다.

배양공정 데이터 수집 및 분석

배양공정 데이터 수집 및 분석을 위해 Autolab LKbio930 (LOKAS, Korea) 시스템을 사용하였다(Fig. 1). Autolab software는 배양 데이터 수집, 분석 및 배양공정 조절을 위한 프로그램이다. 본 실험에서는 발효기에 배양중 발생하는 가스분석을 위해 가스분석기(LOKAS, Korea)를 연결하였다. 배양기간동안 배양기 내부로 공급 및 배출되는 가스를 매 60초 간격으로 측정하고, 측정된 데이터를 온라인으로 분석하였다.

배양 인자 온라인 분석

Fig. 1. Schematic diagram for data acquisition and parameter analysis system.

Q_i : volumetric flow meter for inlet air, P_i , P_o : total pressure sensor for inlet and outlet flows air, T_i , T_o : thermometer for inlet and outlet air stream

발효기로부터 배출되는 가스를 이용하여 배양인자인 산소섭취속도, 세포 비성장속도 및 균사체량 등을 실시간으로 분석할 수 있다[1,3].

1. 산소섭취속도 (Oxygen uptake rate, OUR)

배양중 산소섭취속도 측정은 세포대사를 예측하는데 매우 중요한 요소이다. 일반적으로 온라인으로 산소섭취속도를 측정하는 가장 효과적인 방법은 발효기로 들어가서 배양세포에 의해 이용되고 배출되는 가스 중 산소의 양을 측정하는 oxygen-balance method로 알려져 있다[1]. 이 경우 산소섭취속도는 다음의 식에 의해 계산될 수 있다.

$$OUR = \frac{1}{RV} \left(\frac{Q_i P_i y_i}{T_i} - \frac{Q_o P_o y_o}{T_o} \right) \quad (1)$$

여기서

OUR : oxygen uptake rate (mmol/L/hr)

Q_i , Q_o : volumetric air flow rate (L/hr)

P_i , P_o : total pressure of inlet and outlet air (atm)

T_i , T_o : temperature of inlet and outlet air (K)

y_i , y_o : mole fraction of oxygen at inlet and outlet air

R : universal gas constant

2. 총 산소섭취량 및 균사체 건조중량

$$OUR = Y_{o/x} \frac{dX}{dt} = \frac{1}{Y_{x/o}} \frac{dX}{dt} \quad (2)$$

$$\frac{dX}{dt} = Y_{x/o}(OUR) \quad (3)$$

$$\int_0^x dX = Y_{x/o} \int_0^t (OUR) dt, \text{ at } t=0, X \Rightarrow 0$$

$$\approx Y_{x/o} \sum_{t=0}^t (OUR)\Delta t$$

따라서 $\bar{X}(t) = Y_{x/o} SOUR(t)$ (4)

여기서

$SOUR(t)$: total oxygen consumed until time, t (mmol/L)

$\bar{X}(t)$: calculated cell concentration by use of OUR (g/L)

X : cell concentration from experiment (g/L)

$Y_{x/o}$: cell yield based on oxygen (g cell/mmol O₂)

한편 t시간까지의 총산소섭취량은 다음과 같다[6].

$$SOUR(t) = SOUR(t-1) + \frac{1}{2}[OUR(t-1) + OUR(t)]\Delta t \quad (5)$$

여기서

$OUR(t)$: oxygen uptake rate at t (mmol/L/hr)

$OUR(t-1)$: oxygen uptake rate at t-1 (mmol/L/hr)

$SOUR(t)$: total oxygen consumed until time, t (mmol/L)

$SOUR(t-1)$: total oxygen consumed until time, t-1 (mmol/L)

3. 세포 비성장속도(μ)

세포 비성장속도(specific growth rate)는 아래와 같이 나타낼 수 있다.

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \frac{Y_{x/o} OUR(t)}{Y_{x/o} SOUR(t)} = \frac{OUR(t)}{SOUR(t)} \quad (6)$$

결과 및 고찰

산소섭취속도(OUR) 온라인 분석

산소섭취속도의 측정을 위하여 그림 2에 나타낸 바와 같이 발효기로 공급되고 배출되는 가스로부터 산소 농도를 측정하였다. 배양기간 동안 공급되는 가스중의 산소농도는 거의 일정하게 유지되었으나, 발효기로부터 배출되는 산소농도는 배양기간이 경과함에 따라 감소하는 경향을 보였다. 그림 2의 산소농도 변화량으로부터 배양 균사체의 호흡율이 매우 왕성함을 알 수 있다.

한편 식 (1)에 의해 배양 중 온라인으로 계산이 가능한 산소섭취속도는 발효기간 동안 세포의 대사상태를 나타내

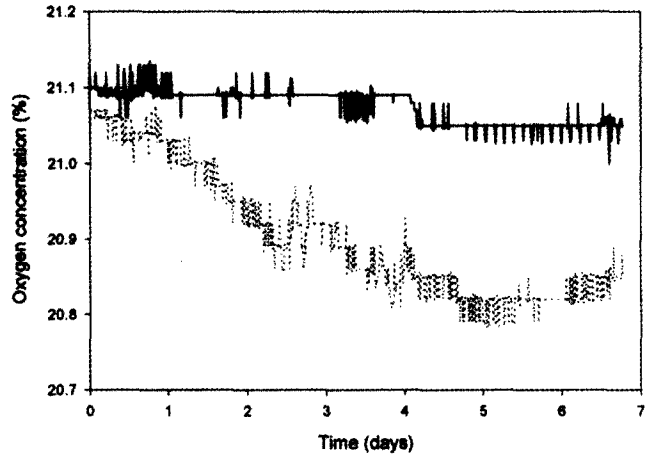


Fig. 2. Time course profile of oxygen concentration in *P. linteus* WI-001 fermentation.

—: Inlet oxygen, ···: Outlet oxygen

주는 중요 지표이다. 또한 배양기간 동안 누적된 산소섭취속도로부터 총 산소섭취량을 계산하는 경우 (식 (5) 이용), 식 (6)에 의해 세포의 비성장속도 또한 예측할 수 있으므로 산소섭취속도의 정확한 측정은 매우 중요한 의미를 지닌다. 그림 3에 측정된 산소섭취속도를 제시하였다. 배양 4일째 2.1 mmol/l/hr 까지 증가되는 양상을 보이다가 그 이후로는 점차 감소하여 배양 말기에는 1.2 mmol/l/hr를 나타내었다. 배양 4일 이후 산소섭취속도가 일정하게 유지되는 것은 세포내 대사가 둔화됨으로써 세포성장도 일정하게 유지되는 것으로 해석할 수 있다.

세포 비성장속도 온라인 분석

세포 비성장속도(specific growth rate)는 산업적으로 유용한 대사산물의 생합성 속도에 영향을 미치는 매우 중요한 요소이다. 본 실험에서는 배양기간 동안 세포 비성장속

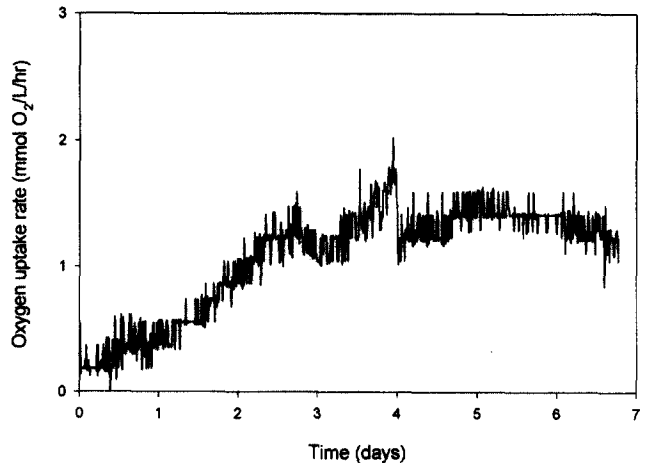


Fig. 3. Time profile of oxygen uptake rate (OUR) in *P. linteus* WI-001 fermentation.

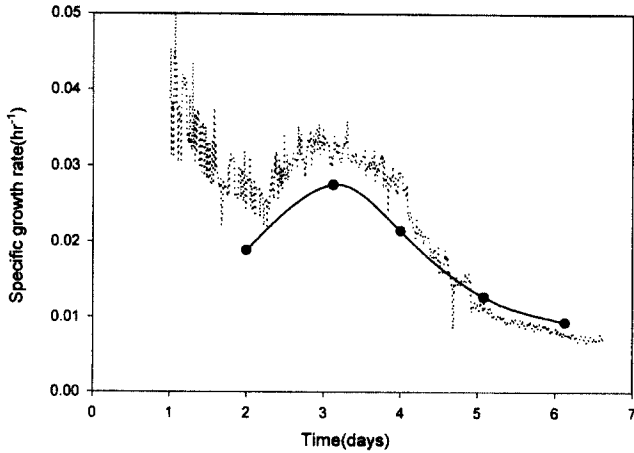


Fig. 4. Comparison of specific growth rate measured based on on-line data of oxygen uptake rate and off-line data of dry cell weight.

●: Off-line measured specific growth rate, ∴: On-line measured specific growth rate

도를 실시간으로 모니터링함으로써 배양 균사체의 대사상태를 정확하게 파악하고자 하였다. “재료 및 방법”에서 서술한 바와 같이 총 산소섭취량과 산소섭취속도에 대한 분석 데이터를 이용하여 배양기간 동안 실시간으로 세포 비성장속도를 계산할 수 있었다. 그림 3의 산소섭취속도와 식 (5)에 의해 계산된 총 산소섭취량을 이용하여 추정된 세포 비성장속도는 최고 0.3 hr^{-1} 이었으며 그 이후 점차 감소하여 배양 6일째 0.08 hr^{-1} 를 나타냈다. 그림 4에 가스분석기의 온라인 데이터를 이용해서 실시간으로 예측된 세포 비성장속도와, 세포농도에 대한 오프라인의 실험적 데이터에 의해 계산된 세포 비성장속도를 비교해서 나타내었다. 실험결과 온라인 또는 오프라인으로 계산된 세포 비성장속도가 거의 일치하는 경향을 보이는 것을 확인할 수 있었다.

균사체량 온라인 분석

실험적으로 시료채취에 의해 얻어진 건조균사체량과 산소섭취속도의 분석을 통해 얻어진 총 산소섭취량의 연관성을 linear regression 분석에 의해 산소에 근거한 세포수율 $Y_{x/o}$ (cell yield based on oxygen)를 산출하였다. 그 결과 그림 5에 나타낸 바와 같이 배양기간 중 수집한 데이터로부터 얻은 $Y_{x/o}$ 는 $0.084 \text{ g cells/mmol O}_2$ 이었으며 배양기간 동안 총 산소섭취량으로부터 건조균사체량을 유추할 수 있는 정확도는 약 98.5%로 나타났다. 이 $Y_{x/o}$ 는 *P. linteus* WI-001 발효에 의해 실험적으로 5회 이상 배양한 실험 데이터로부터 계산된 결과를 이용하였다.

그림 6에서는 식 (4)를 이용해서 예측된 균사체량과 실험적으로 오프라인 분석을 통해 얻은 균사체량을 비교한 실험결과를 나타내었다. 배양기간 동안 실제 실험적으로 구한 균사체량과 총 산소섭취량을 기초로 실시간으로 온라인 분

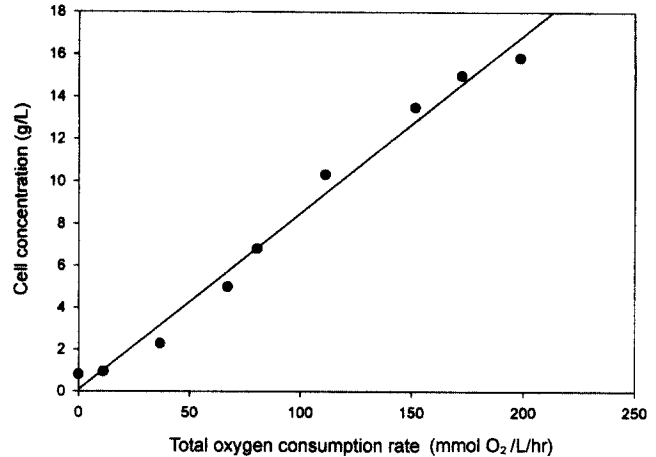


Fig. 5. Calculation of cell yield based on oxygen ($Y_{x/o}$) by use of correlation between total oxygen consumption rate and dry cell weight.

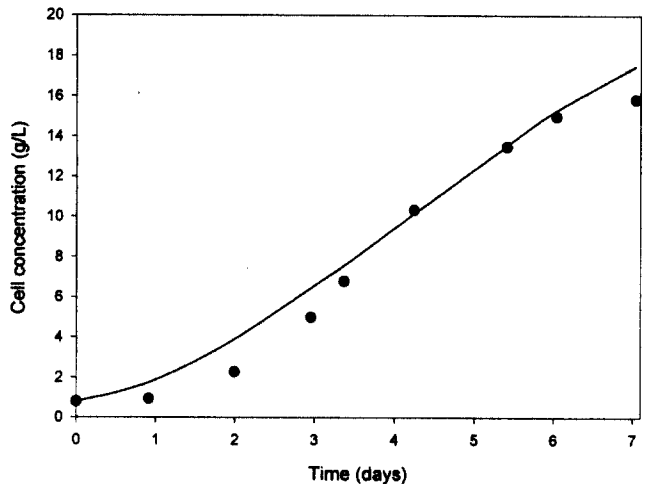


Fig. 6. Comparison of cell concentration estimated based on on-line data of total oxygen consumption against actual dry cell weight.

●: Off-line measured cell mass, —: On-line estimated cell mass

석에 의해 예측한 균사체량이 대체로 일치함을 알 수 있었다. 이는 *P. linteus* WI-001 균사체의 산업적 대량배양시 시료채취를 하지 않고도 실시간으로 균사체의 총 산소섭취량을 온라인으로 분석함으로써 건조균사체량을 유추할 수 있음을 제시하는 결과이다. 한편 온라인과 오프라인 데이터가 배양 초기와 배양 후반부에 어느 정도 차이가 나는 이유는 배양 균사체의 총 산소섭취량을 기초로 한 $Y_{x/o}$ 산출시 세포증식 전 기간에 걸쳐 동일한 $Y_{x/o}$ 값을 적용하였기 때문인 것으로 판단된다.

요 약

P. linteus WI-001 발효시 중요한 배양인자를 온라인으로

예측하기 위해 발효기로부터 배출되는 산소를 가스분석기로 측정 후, 컴퓨터를 이용하여 그 결과를 분석하였다. Oxygen-balance method에 의해 세포대사의 중요 지표인 세포의 산소섭취속도 (OUR)를 계산할 수 있었으며, 이 산소섭취속도를 기초로 총 산소섭취량을 온라인 컴퓨터 상에서 계산하여 균사체의 비성장속도를 실시간으로 측정할 수 있었다. 또한 *P. linteus* WI-001 배양중 시료채취에 의해 얻은 균사체 농도와 총 산소섭취량과의 연관관계를 분석함으로써 산소에 근거한 세포수율인 $Y_{x/o}$ 를 계산할 수 있었으며, 이를 토대로 균사체 생산량을 온라인으로 간편하게 예측할 수 있는 시스템을 확립할 수 있었다.

REFERENCES

1. Buckland, B. C. 1985. Fermentation exhaust gas analysis using mass spectrometry. *Biotechnology* 3: 982-988.
2. Chen, W., C. Graham, and R. B. Ciccarelli, 1997. Automated fed-batch fermentation with feed-back controls based on dissolved oxygen (DO) and pH for production of DNA vaccines. *J. Industrial Microbiol. & Biotechnol.* 18: 43-48.
3. Eyer, K., A. Oeggerli, and E. Heinzle. 1995. On-line gas analysis in animal cell cultivation: II. Methods for oxygen uptake rate estimation and its application to controlled feeding of glutamine. *Biotech. and Bioeng.* 45: 54-62.
4. Gbewonyo, K., D. Dimasi, and B. C., Buckland, 1989. Characterization of oxygen transfer and power absorption of hydrofoil impellers in viscous mycelial fermentations. *Biotechnology process* 34: 128-133.
5. Gbewonyo, K., D. Jain, G. Hunt, S. W. Drew, and B. C., Buckland, 1989. On-line analysis of avermectin fermentation cell growth kinetics in an industrial pilot plant. *Biotech. and Bioeng.* 34: 234-241.
6. Pirt, S. J. 1975. Principles of Microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publication, Oxford.
7. Tabata, K., W. Ito, T. Kojima, S. Kawabat, and A. Misaki. 1981. Ultrasonic degradation of schizophyllan, an antitumor polysaccharide produced by *Schizophyllum commune* Fries. *Cabohydrate Res.* 89: 121-135.

(Received July 19, 2000)