

## 영지의 액체배양에 있어서 균사체 형태에 미치는 Ammonium Phosphate의 영향

이규민 · 이신영\*

강원대학교 환경생물공학부 및 연세대학교 생물산업소재연구센터, 엠바이오텍(주)

### Influence of Ammonium Phosphate on Mycelial Morphology during Submerged Cultivation of *Ganoderma lucidum*

Kyu-Min Lee and Shin-Young Lee\*

Division of Environmental and Biological Engineering, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea  
Bioproducts Research Center of Yonsei University, Seoul 120-749, Korea  
MBiotec Co. Ltd., Incheon 445-920, Korea

**ABSTRACT:** The mycelial morphology during submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* using by air-lift fermenter system were analyzed by image processing system and the characterization of mycelial morphology were investigated. In submerged culture using medium with different ammonium phosphate concentrations, the various morphological forms of *G. lucidum* mycelium were observed. The filamentous forms such as non-branched long filamentous mycelium, non-branched short mycelium, branched long filamentous mycelium, branched short mycelium, entangled mycelium and clump were observed, and also, the pelleted forms such as smooth pellet, rough pellet and hollow rough pellet were observed. The mycelial morphology was changed from the filamentous to the pelleted forms by addition of ammonium phosphate. The fractal dimensions of pelleted and filamentous forms were 1.05 and 1.3, respectively, while the fractal dimension of mixtures of pelleted and filamentous forms was 1.16. Therefore, the fractal dimension was found to be more effective index for the detection of the mycelial morphology and morphological change during batch cultivation. The circularity was also found to be useful for evaluating the surface growth of pelleted mycelium.

**KEYWORDS:** *Ganoderma lucidum*, Submerged culture, Image analysis, Mycelial morphology, Ammonium phosphate effect

일반적으로 사상균은 배지조성이나 배양조건 등에 따라 균사체의 생리가 변화되며, 그 결과로서 균사체 농도의 증가와 함께 필라멘트 또는 펠렛 형태의 다양한 균사 형태 변화를 동반한다(Metz *et al.*, 1981; Suijdam and Metz, 1981; Fatile, 1985; Hannson and Seifert, 1987; Braun and Vecht-Lifshitz, 1991). 또 배양액의 물성도 크게 변하여 물질전달 및 열전달 등의 전달현상에 큰 영향을 미치게 된다. 이러한 물성의 변화는 다시 균사체 생육 및 균사 형태를 변화시키며, 결국 생성물의 생산성을 크게 변화시키는 등, 복잡한 상관관계를 갖게 된다(Roles *et al.*, 1974; Charles, 1978; Pace, 1980).

Whittaker와 Long(1973)이 *Aspergillus candidus*의 균집을 관찰한 이후, 지금까지 균류의 필라멘트 및 펠렛 형태에 대한 많은 연구가 있었는데, 현재 이들 균류의 복잡한 형태는 많은 경우 생산성과 상관관계를 가지는 것으로 보고 되어, 그 중요성이 점차 널리 인식되기에 이르렀다(Whittaker and Long, 1973; König *et al.*, 1982; Metz and Kossen, 1977). 예로서 구연산, itaconate, polygalacturonase의 생산은

*Aspergillus niger*의 펠렛 크기에 의존하는 반면, *Penicillium chrysogenum*에 의한 페니실린 생산은 펠렛 및 필라멘트 생육이 모두 중요하고, *Asp. niger*에 의한 펙틴 효소 생산 및 *Rhizopus arrhizus*에 의한 fumaric acid 생산에서는 필라멘트 생육이 더 좋다는 등, 많은 보고가 있었다. 그러나 이들 연구대상은 주로 하등 균류에 대해서 이루어졌고, 고등 균류인 담자균류에서는 형태 연구가 매우 미흡하다. 특히, 액체배양 시 *Ganoderma lucidum* 균사체의 형태에 관한 연구에 대해서는 보고된 바 없다.

일반적으로 필라멘트형 곰팡이의 액체배양에서 생육 형태에 영향을 주는 인자들로서는 접종수준, 전단력, 배지조성 및 pH 등을 포함하지만(Fatile, 1985; Hannson and Seifert, 1987; Braun and Vecht-Lifshitz, 1991; Shin and Byun, 1991; Byrne and Ward, 1989), 접종수준 및 전단력은 주로 일정하게 유지되므로 배지 조성 및 pH가 균사 생육에 가장 큰 영향을 준다. 특히, 배지조성 중 질소원 농도가 중요한 것으로 알려지고 있는데, Pirt와 Callow(1959)는 *P. chrysogenum*에 대해 배지 중  $(NH_4)_2SO_4$ 가 펠렛 생육을 일으키는 반면, 질소원으로서의 corn steep liquor는 펠프형 생육을 일으킨다고 하였다. 또 *Myrothecium verrucaria*의 펠

\*Corresponding author <E-mail: sylee@kangwon.ac.kr>

랫 생육에 대한 배지중 질소농도의 영향을 조사한 결과에서는 고농도(100~500 mmol  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )의 질소원은 단단하고 부드러운 펠렛을 형성한 반면, 낮은 농도(1~5 mmol)에서는 매우 헐겁고 fluffy한 펠렛이 형성된다고 보고된 바 있다 (Darby와 Mandes, 1954).

한편, Byrne와 Ward(1989)는 *R. arrhizus*의 형태가 peptone의 농도 10~20 g/l 및 1~5 g/l일 때는 clump와 펠렛 형태로 나타나며, 질소원의 농도와 펠렛의 빈도수가 반비례한다고 보고하였다. 이 등(1999)에 의하면 영지의 액체 배양에서도 ammonium phosphate가 영지의 액체 배양 중 균사체 및 세포의 다당 생산에 있어 중요한 역할을 하며, 따라서 ammonium phosphate 첨가 농도의 적정 조절로 최적 균사 생육 및 세포의 다당 생산이 가능한 것으로 보고한 바 있다. 본 연구에서는 영지의 액체 배양 중 이 ammonium phosphate의 첨가에 따른 균사체의 다양한 형태 변화를 화상분석하여 해석하였고, 이로부터 영지 액체배양 중의 균사 형태학적 특성을 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 보존

본 연구의 사용 균주는 농촌진흥청 농업과학기술원 보관 균주인 *G. lucidum* ASI 7004이다. PDA(Difco) 평판 배지에서 30°C로 7일간 배양한 후 4°C에서 보존하였고, 3개월마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

### 배지조성

종균배양에 사용한 배지는 *G. applanatum*의 진탕배양용 배지이며(Sone *et al.*, 1985), 본 배양에는 이 등(1998)이 *G. lucidum*의 액체배양에 의한 세포의 다당 생산의 최적배지로 보고한 배지이다. 배지는 121°C에서 15분간 가압 살균 후 사용하였고, 살균 시 염의 침전을 방지하기 위하여 탄소원, 질소원, 무기염류는 각각 분리 살균한 후 혼합하여 사용하였다. pH는 살균 후 0.1 N HCl 또는 0.1 N NaOH로 조절하였다.

### 배양

전배양은 PDA 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 접종하여 실시하였다. 30°C에서 7일간 배양한 다음, 다시 종균용 배지 50 ml를 함유한 250 ml의 삼각 플라스크에 5%(v/v)의 전배양액을 접종하였고, 30°C에서 100 rpm으로 5일간 진탕배양하였다. 전 배양액은 균질기(동양(주), model 0820)로 30초 동안 균질화시켜 본 배양의 접종용으로 사용하였고, 매 실험마다 새로이 배양하여 사용하였다. 본 배양은 이 등(1998)이 자체 제작한 3 l 용량(working volume: 2 l)의 air-lift fermenter를 사용하여 접종량 5%(v/v), 온도 30°C, pH 5, 통기속도 2.5 vvm의 조건하에서 실

시하였다. 이때, 통기로 인하여 발생한 거품은 Antiform 289(Sigma)를 사용하여 제거하였고, 배지 중 ammonium phosphate는 0~11 g/l의 농도범위에서 변화시키면서 실험하였다.

### 균체 및 세포외 다당

균체량은 배양액을 10,000×g에서 15분간 원심분리하고 침전된 균사체를 filter paper(No. 2, Advantec)로 여과한 다음, 증류수로 2~3회에 걸쳐 수세하였고, 70°C에서 24시간 건조한 후, desiccator에서 항량이 될 때까지 방치하면서 건조중량(mycelial dry weight; MDW)을 측정하여 정량하였다. 세포외 다당은 원심분리(10,000×g, 15분)하여 균사체를 제거한 후 얻은 배양 여액에 2배 량의 acetone을 가하여 침전물을 얻었으며, 이를 70°C에서 24시간 건조한 다음 중량을 측정하여 조 다당(crude exo-polysaccharide, EPS)으로 정량하였다.

### 균사체의 형태분석

균사체 형태는 image capturing board를 사용하여 image analysis system(Optimas Co., USA)으로 분석하였다. 장치는 CCD camera(Panasonic, wv-CP410) 또는 microscope(Olympus, CHS-213E), PCI video frame grabber(FlashPoint Ver. 3.11, Integral Tech. Inc), image software(Optimas 6.1, Optimas Co.)로 구성되었다. 균사의 형태 관찰을 위하여 시료 1 ml를 무작위로 취한 다음, glacial acetic acid 5 ml와 50%(v/v) ethanol 200 ml를 함유한 13 ml의 40% formaldehyde로 고정시켜 20배로 희석한 후, slide glass에 희석한 시료 0.5 ml를 분사하여 통기 건조하였고, absolute alcohol로 수세한 다음, methylene blue로 염색하여 형태관찰용 시료로 하였다(Packer and Thomas, 1990). Glass cubic(가로 4 cm×세로 3 cm×높이 1.5 cm)에서 관찰할 경우는 염색하지 않고 그대로 시료로 하였다. 시료의 화상분석을 위한 camera의 노출, 명암, arithmetic operation 및 threshold 범위 등의 화상분석 조건은 Table 1과 같다. 분석 시 camera로 촬영한 화상은 640×480 pixels 및 256 grey level의 해상도로 촬영하였으며, 오차를 최소화하기 위하여 400×400 pixels로 수정하였다. Image software(Optimas 6.1)를 이용하여 면적, 길이, 직경, 원형도 등 각종 형태변수를 구하였으며, fractal 차원은 면적 및 둘레길이 값으로부터 다음 식(1)을 이용하여 계산하였다(Aratani *et al.*, 1988).

Table 1. Conditions of parameters for an analytical image of *Ganoderma lucidum*.

Parameter	Condition
Camera control	Brightness 0
	Contrast 130
	Window 256
	Level 160
Arithmetic operation	Multiply
Conditional dilate	127~200 threshold

$$S_n^{1/2} \propto X_n^{1/D} \quad (1)$$

즉,  $\log S_n$ 과  $\log X_n$ 을 도시하여 얻어지는 곡선의 기울기 (2/D)로부터 D값을 구하였다.

여기서  $S_n$ 은 area(mm<sup>2</sup>),  $X_n$ 은 perimeter(mm), 그리고 D는 Fractal dimension(-)이다.

한편, 원형도(circularity)는 다음 식 (2)를 이용하여 계산하였다(Cox and Thomas, 1992).

$$\text{Circularity} = (X_n^2/S_n \times 4\pi) \quad (2)$$

### 결과 및 고찰

#### 액체 배양 중 염지 균사 형태의 관찰

*G. lucidum*의 액체배양 중 균사체의 형태를 배지조성 및 배양 조건을 달리하여 영상분석하였으며, 그 결과 관찰된 다양한 형태를 Fig. 1과 2에 나타내었다. Fig. 1은 배양 중 나타나는 균사의 필라멘트 형태를 나타낸 것으로, non-branched long filamentous mycelium, non-branched short mycelium, branched long filamentous mycelium, branched short mycelium, entangled mycelium 및 각종 clump의 형태가 관찰되었다(Suijdam and Metz, 1981). Non-branched long filamentous mycelium은 균사가 길고, 가지가 적은 형태이며, 이는 배양의 초기 pH 4~6 상태에서 주로 관찰되었다. Non-branched short mycelium은 균사의 길이가 짧고

가지가 적은 형태로 낮은 pH, 배양 후기에 주로 볼 수 있었다. 또 branched long filamentous mycelium은 낮은 교반력, 풍부한 영양배지, 좋은 통기 조건 및 고농도의 ammonium phosphate 첨가 시와 pH 4~6으로 pH 조절 시의 배양 중기에 주로 볼 수 있는 반면, branched short mycelium은 저 농도의 ammonium phosphate 첨가 시와 세포의 다량의 생산이 왕성한 배양 말기에 주로 볼 수 있었다. Entangled mycelium은 균사가 길쭉한 타원형의 형태로 생육하며, ammonium phosphate의 결핍 시와 pH 3~7에서의 배양 중기 이후에 주로 나타났고, clump는 균사 중심의 core 크기가 작고, 펠렛 외부로 균사의 생장이 활발히 일어나면서 pH 4~6에서의 배양 중기에 주로 나타났다.

한편, Fig. 2는 펠렛 형태를 나타낸 것으로, smooth pellet, rough pellet 및 hollow rough pellet 형태를 관찰할 수 있었다(Braun and Vecht-Lifshitz, 1991). Smooth pellet은 펠렛의 표면이 매끄러운 형태로, 고 농도 ammonium phosphate 첨가시 및 pH 2나 pH 7에서 주로 나타났었다. Rough pellet은 펠렛의 가장자리 표면이 거친 형태로, 왕성한 균사의 생육이나 pH 3~4에서의 배양 초기~중기에 나타났으며, 특히 고 농도 ammonium phosphate의 첨가시에 현저하게 나타났다. Hollow rough pellet은 rough pellet의 크기가 커지면서 중앙 부분이 계속 사멸하여 공동이 생긴 형태로, 균사의 생육조건이 나쁜 배양 중기 이후에 주로 나타났다.

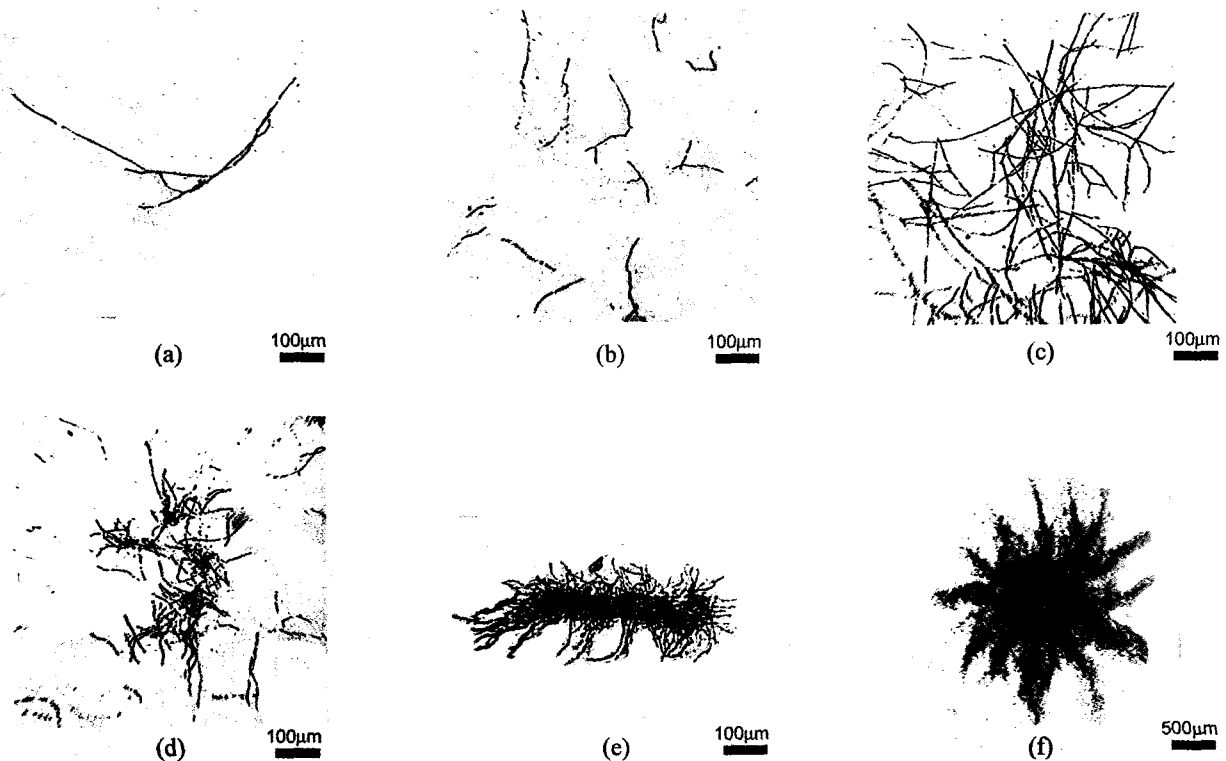


Fig. 1. Various filamentous forms of *G. lucidum* in submerged culture under different medium compositions and culture conditions. (a) Non-branched, long filamentous mycelium, (b) Non-branched, short mycelium, (c) Branched, long filamentous mycelium, (d) Branched, short mycelium, (e) Entangled mycelium, (f) Clump

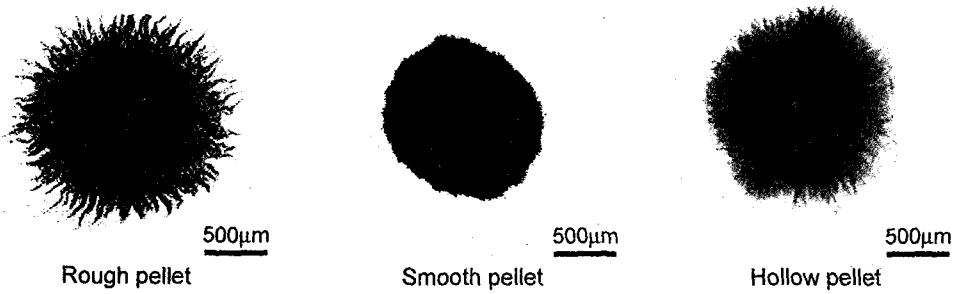


Fig. 2. Various pelleted forms of *Ganoderma lucidum* in submerged culture under different medium compositions and culture conditions.

**균사 형태에 미치는 ammonium phosphate 첨가 농도의 영향**

Ammonium phosphate 첨가의 유무에 따라 균사의 형태 변화가 현저하였으므로 이의 첨가 농도를 달리하여 균사 형태의 배양 경시변화를 관찰하고, 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 접종 후 배양 1일에는 0~11 g/l의 ammonium phosphate를 첨가한 모든 처리구에서 펠렛 형태의 균사체 생육이 관찰되었다. Ammonium phosphate의 첨가 농도가 낮은 경우(< 3 g/l)에는 배양 시간이 경과하면서 펠렛의 크기는 작고 빈도수가 증가되었으며, 배양 2일 후부터 필라멘트 형태의 균사 생육이 관찰되기 시작하였고, 배양이 더욱 진행됨에 따라 필라멘트 형태의 균사형태가 주로 관찰되었다. 이와 같은 배양 중의 형태 변화는 *P. chrysogenum* 에서 잘 관찰되고 있는데, Treskatis 등(1997)은 발효 중 균사 floc과 함께 펠렛 비율이 크게 변하여 발효 초기에는 균사 floc은 70%, 펠렛은 30%이었으나, 대수기 중 rough pellet의 비율은 50%로 증가한 반면, 균사 floc은 30%로

감소하였으며, smooth pellet의 비율이 20%까지 증가하였다고 하였다. 또 정지기에서 smooth pellet 및 균사 floc의 증가와 함께 rough pellet의 감소가 관찰되었다고 하였다. 그러나 본 연구에서는 ammonium phosphate의 첨가 농도가 3 g/l 이상의 경우에는 배양이 진행됨에 따라 주로 펠렛 형태의 균사 생육이 관찰되었고, 균사체의 빈도수 또한 증가되었다. 또 7 g/l 이상의 ammonium phosphate를 첨가한 경우에는 pellet의 크기는 커지는 반면, 그 빈도수는 이보다 낮은 농도의 ammonium phosphate 첨가 시보다 낮은 것을 관찰할 수 있었다. 사상균의 펠렛형성 기작은 아직 정확하게 밝혀지지 않았으므로, 이와 같이 고농도 ammonium phosphate 첨가구에서의 펠렛 형성 및 펠렛 크기의 증가에 대한 이유는 알 수 없다. 하지만 정전기적 반발력이나 특정 결합간의 경쟁 관계가 세포간 접촉의 원인으로 생각하고 있는데(Vecht-Lifshitz 등, 1990), Dik 등(1992)에 의하면 ammonium phosphate도 균사체 간의 결합형성을 촉진한다고 하였다. 따라서 본 연구의 결과도 이와 관련되

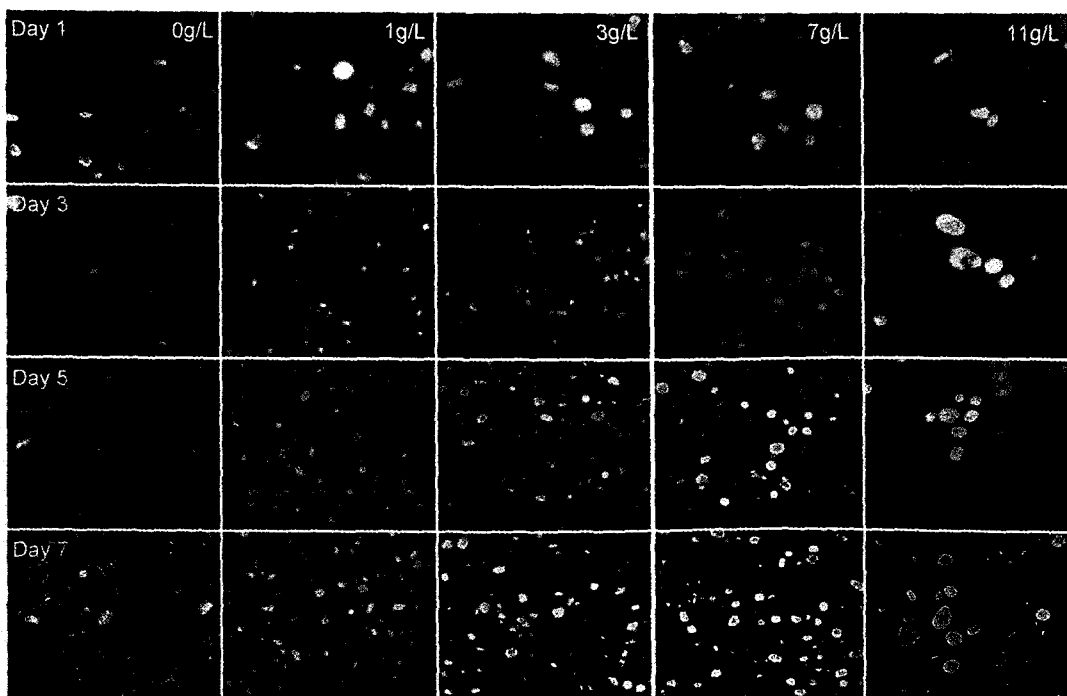


Fig. 3. Morphological forms of *G. lucidum* mycelia grown in the broth with different concentrations of ammonium phosphate.

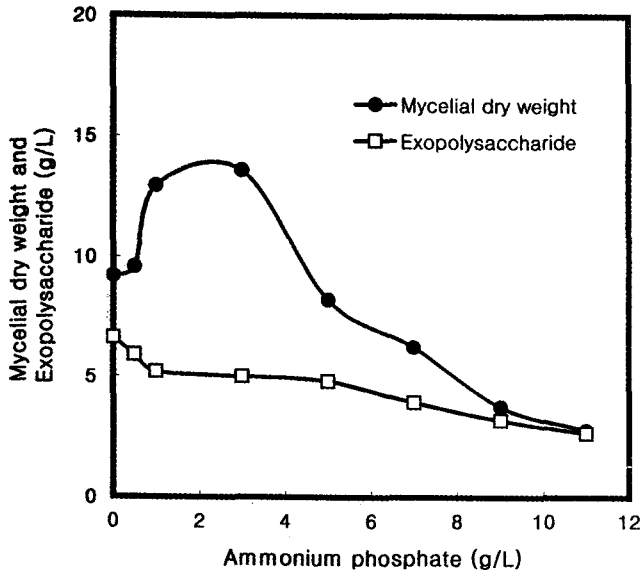


Fig. 4. Effect of ammonium phosphate on mycelial growth and exopolysaccharide production after 8 days cultivation in the submerged culture of *Ganoderma lucidum*.

는 것으로 생각되었으나 더 이상의 검토는 하지 않았다.

한편, 배양 중 ammonium phosphate의 무첨가 및 첨가 (11 g/l) 시 나타나는 균사체의 형태는 ammonium phosphate의 첨가 유무에 상관없이 배양 1일째에는 펠렛 형태를 나타내었다. 그러나, ammonium phosphate의 무첨가 시에는 배양경과에 따라 hairy pellet ⇒ clumped mycelium ⇒ entangled mycelium의 형태로 분화된 반면, ammonium phosphate의 첨가 시에는 배양 시간의 경과에 따라 펠렛의

크기가 증가하였고, 펠렛 표면의 균사생육이 감소하였으며, 전 배양기간 중 펠렛 형태를 유지하였다. 따라서 배양액 내 고농도의 ammonium phosphate는 펠렛 형성이나 펠렛의 크기와 밀접한 관계를 가짐을 알 수 있는데, 균사체 생육 및 배양 생성물인 세포의 다당과도 밀접한 관계를 보였다. 즉 Fig. 4에서 볼 수 있는 바와 같이, 균사 생육은 ammonium phosphate 농도 1~3 g/l에서 최대 값을 가지나, 세포의 다당 생성은 ammonium phosphate의 농도가 증가하면 점차 감소함을 알 수 있다. 결국, 적정 농도의 ammonium phosphate 첨가로 *G. lucidum*의 액내배양 시, 안정성이나 발효 생산성의 제어가 가능할 것으로 판단되었다.

균사 형태 변화의 해석

영지 액체배양 중 균사 형태 변화의 보다 정량적인 관찰을 위해서 fractal 차원과 원형도를 조사하였다. Fig. 5는 배양 시에 관찰되는 필라멘트형 균사체, 펠렛형 균사체 및 이들 두 가지 형태가 모두 존재할 경우의 fractal 차원을 계산한 결과이다. 면적과 둘레 길이의 관계로부터 산출한 fractal 차원의 값은 필라멘트형 균사체와 펠렛형 균사체에서 각각 1.31 및 1.02로 계산되어, fractal 차원은 서로 다른 극단적인 균사형태에서 서로 다른 값을 나타냄을 보였다. 그러나 두 가지 형태가 모두 존재하였을 경우의 fractal 차원의 값은 1.16으로, 기대할 수 있는 바와 같이, 필라멘트형 및 펠렛형 균사체의 중간 값을 나타내었다. 따라서 fractal 차원은 펠렛과 필라멘트형이 함께 존재하는 각종 균사 형태를 구분하는 지표 값으로 매우 유용하게 사용할 수 있을 것으로 생각되었다. Patankar 등(1993)은 필라멘트 및 펠렛형 증식의 fractal 차원은 각각 2.5 및 1.4~2.3의 범

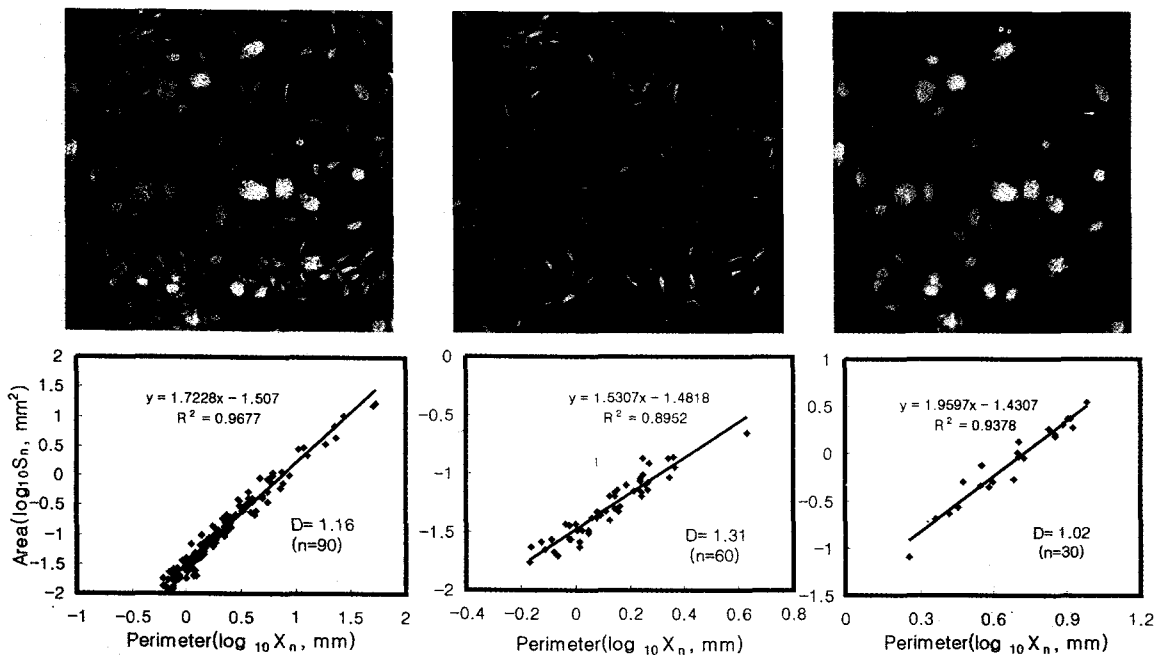


Fig. 5. Calculation of fractal dimension for projected morphologies of *G. lucidum* mycelium (D and n present fractal dimension and number of samples, respectively).

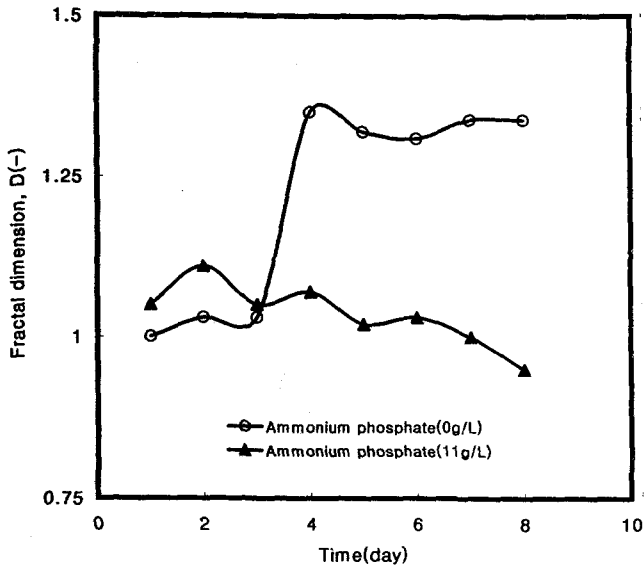


Fig. 6. Changes of fractal dimension for *G. lucidum* mycelium cultured in the absence and presence of ammonium phosphate.

위를 갖는다고 하여, 본 연구에서 인용된 수식에 의하여 계산된 완전한 구체의 fractal 차원 값이 1인 것과는 차이가 있었으나 경향은 비교적 일치하였다. 이러한 차이는 fractal 차원의 계산법의 차이에 기인한다. 류(1994)도 균사의 fractal 차원과 펠렛의 compactness 및 roughness 간의 상관 관계를 이용하여 펠렛의 형태분석을 시도한 결과, fractal 차원이 형태 분석에 매우 유효함을 보고하였다. 또 이러한 fractal 차원의 변화는 배양 중 균사형태의 변화와도 매우 상관성이 높은 것으로 나타났다. 즉, Fig. 6은 배

양 중기 이후 필라멘트 및 펠렛 형태로 각각 생육하였던 ammonium phosphate의 무첨가구와 첨가구(11 g/l)하에서 fractal 차원의 배양 경시 변화인데, 배양 초기 균사체의 fractal 차원의 값은 모두 0.97~1.07이었다(펠렛형). 그러나 ammonium phosphate의 무첨가구에서는 배양 3일부터 fractal 차원의 값이 1.31~1.35로 변화하였으며(필라멘트형), 11 g/l의 ammonium phosphate 첨가구에서는 배양 전 기간 중 fractal 차원의 값이 0.95~1.11 범위로 크게 변화하지 않았다. 이는 Fig. 3에서 이미 살펴본 ammonium phosphate의 첨가에 따른 형태의 경시변화와 잘 일치하여서 fractal 차원의 배양 경시변화는 배양 중 형태변화의 정량화 수단으로 이용될 수 있음을 보였다.

한편, Fig. 7은 ammonium phosphate 무첨가 구 및 첨가 구(0 및 11 g/l)에서의 원형도를 비교한 결과로, 이 때, 완전한 원의 경우의 원형도는 1의 값을 갖는다. 배양경시 변화를 보면 ammonium phosphate 무첨가구에서는 균사 생육이 왕성한 증식기(3~5일)에서는 원형도가 높은 쪽의 빈도수가 증가하고, 분포 또한 넓은 범위를 가지는 반면, 정지기에 이르면 원형도의 값이 각각 3.18 및 2에서 최대의 빈도수를 나타내었다. 그러나 ammonium phosphate 첨가구의 경우는 구체 형태에 근접하는 것을 볼 수 있었다. 이러한 결과는 배양경과에 따라 pellet core의 원형도가 2.8에서 2.2로 감소하였다고 보고한 Cox와 Thomas(1992)의 보고와 잘 일치하였다. 또 ammonium phosphate 무첨가구에서의 원형도의 평균값(1.91~3.86)은 배양경과에 따라 증가하는 경향을 나타내어 fractal 차원의 변화와도 유사한 경향을 보였다. 특히, 원형도 값은 펠렛 표면의 균사생장의 정도를 간접적으로 추측할 수 있을 것으로 판단되었다. 따라서, 이를 보다 면밀히 검토하기 위하여 ammonium pho-

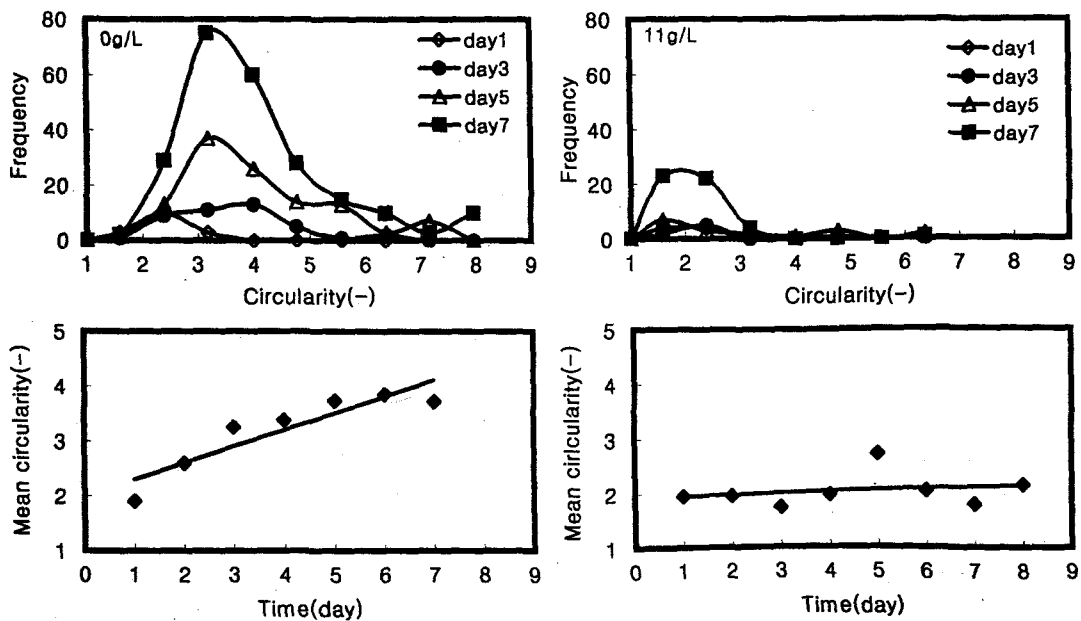
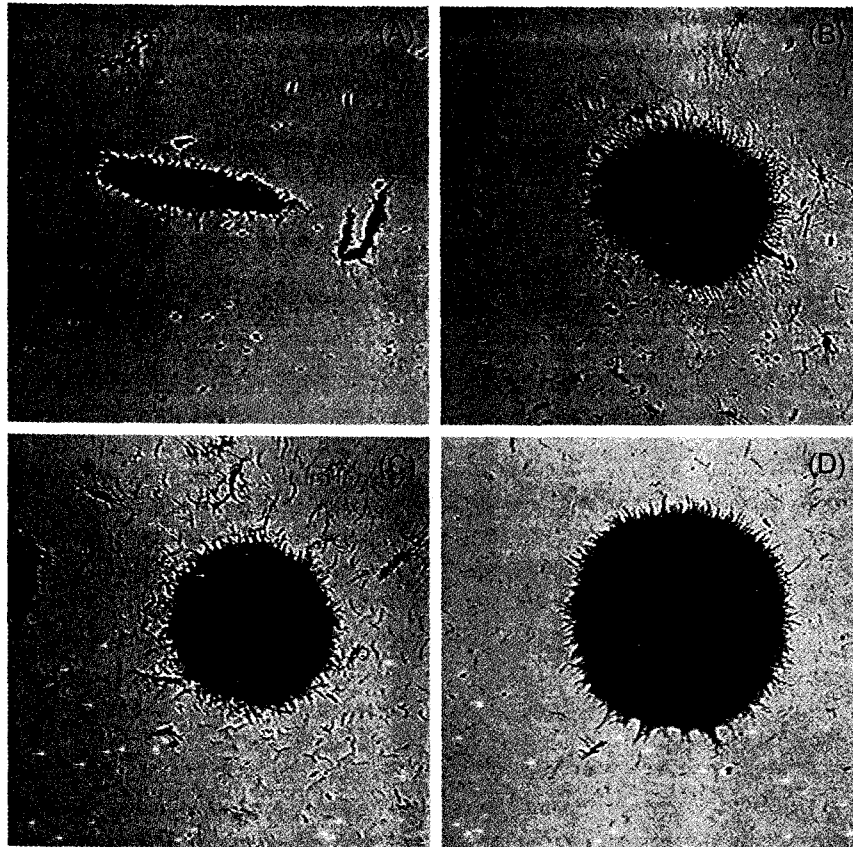
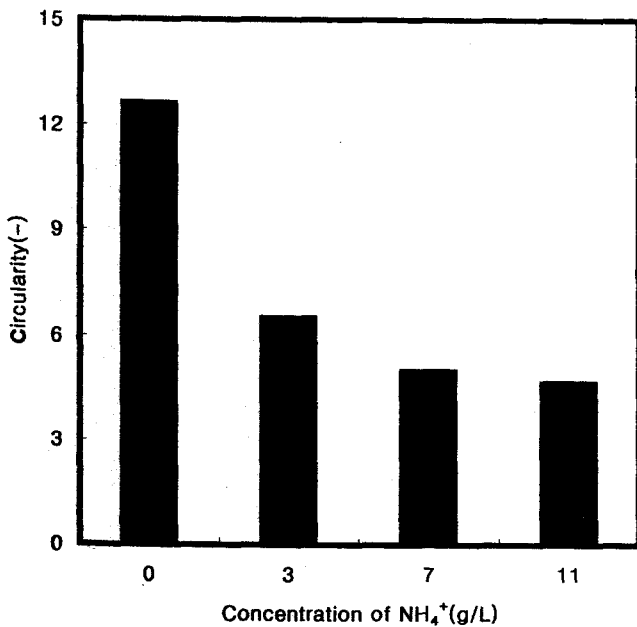


Fig. 7. Effect of ammonium phosphate on the circularity (top) and mean circularity (bottom) of *G. lucidum* mycelium during batch cultivation.



**Fig. 8.** Effect of ammonium phosphate on the morphology of entangled and pelleted mycelium (Samples were taken at 4 days of cultivation).  
(A) : 0 g/l, (B) : 3 g/l, (C) : 7 g/l, (D) : 11 g/l

sphate를 0~11 g/l로 첨가하였을 때 펠렛 표면의 균사생육의 형태를 현미경으로 확대 관찰하였으며, 그 결과를 Fig.



**Fig. 9.** Effect of ammonium phosphate on circularity of pelleted mycelium after 4 day of batch cultivation.

8에 나타내었다. 그림에서와 같이, ammonium phosphate를 3 g/l 첨가하였을 때, 펠렛 표면의 균사생육 정도가 고농도 첨가시보다 왕성함을 관찰할 수 있었다. Fig. 8로부터 원형도를 분석한 결과인 Fig. 9에서는 펠렛의 경우, 3 g/l에서 원형도 값이 높은 값을 보여 Fig. 8의 결과와 잘 일치하였다. 따라서 펠렛 표면의 균사생육 정도를 판단함에 있어 원형도는 매우 유용한 것으로 생각되었다.

이상의 실험으로부터 ammonium phosphate는 펠렛의 형성과 매우 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었고, fractal 차원은 필라멘트형 및 펠렛형 균사체의 형태 분류와 배양 중의 형태 변화에, 그리고 원형도는 펠렛 표면의 균사생육 정도의 판정 지표로 유용하게 사용할 수 있을 것으로 생각되었다.

### 적 요

버섯의 액체배양에 의한 균사체 및 세포의 다당 발효의 안정성과 생산성 증진을 도모하기 위하여, 영지(*Ganoderma lucidum* ASI 7004)의 액체배양 중, 배지조성(0~11 g/l의 ammonium)을 달리하여 균사체 형태 및 분화의 경시변화를 영상분석 시스템을 이용하여 분석하였다. 배지 조성 및 배양 조건에 따른 균사체 형태의 배양경시변화를 영상분

석한 결과, non-branched long filamentous mycelium, non-branched short mycelium, branched long filamentous mycelium, branched short mycelium, entangled mycelium 및 각종 clump의 필라멘트 형태와, smooth pellet, rough pellet 및 hollow rough pellet의 펠렛 형태 등, 다양한 형태를 관찰할 수 있었다. Ammonium ion이 낮은 경우에는 필라멘트 형태의 균사 생육이 주인 반면, 높은 농도로 갈수록 펠렛 형태의 균사 생육이 주로 관찰되었다. 이러한 형태의 변화를 수치화 하는 수단으로 fractal 차원을 이용하여 형태를 분류한 결과, 11 g/l의 ammonium phosphate 농도에서 주로 나타나는 균사형태의 fractal 차원은 1.05 이었으나(펠렛형), ammonium phosphate의 결핍 시에 주로 나타나는 균사 형태의 fractal 차원은 1.3이었다(필라멘트형). 또 필라멘트형 및 펠렛형 균사체가 공존할 때의 fractal 차원은 1.16으로, 이들의 중간 값을 나타내었다. 따라서, fractal 차원은 균사 형태의 변화를 측정하는 지표 값으로 매우 유용할 것으로 생각되었다. 또 원형도는 펠렛형 균사체의 표면에서 균사 생육 정도를 판정하는데 유용한 것으로 나타났다.

### 감사의 글

본 논문은 연세대학교 생물산업소재연구센터의 일부 연구비 지원(97-K3-0407-02-02)에 의거 수행된 연구 결과입니다.

### 참고문헌

- Aratani, T., Fujii, T., Morikawa, T. and Miyazaki, K. 1988. Evaluation of floc form by fractal dimension. *J. Chem. Eng.*, **14**(3): 395-400.
- Braun, S. and Vecht-Lifshitz, S. E. 1991. Mycelial morphology and metabolite production. *Trends in Biotechnol.*, **9**: 63-68.
- Byrne, G. S. and Ward, O. P. 1989. Effect of nutrition on pellet by *Rhizopus arrhizus*. *Biotechnol. Bioeng.*, **33**: 912-914.
- Charles, M. 1978. Technical aspects of the rheological properties of microbial cultures, *Advances in Biochemical Engineering*, **8**: 1-62.
- Cox, P. W. and Thomas, C. R. 1992. Classification and measurement of fungal pellets by automated image analysis. *Biotechnol. Bioeng.*, **39**: 945-952.
- Dik, T. B., Özlügen, M. and Bozoğlu, F. 1992. Salt, EDTA, and pH effects on rheological behavior of mold suspensions, *Enzyme Microb. Technol.*, **14**: 944-948.
- Edelstein, L. 1983. A model for pellet size distributions in submerged mycelial cultures, *J. Theor. Biol.*, **105**: 427-452.
- Fatife, A. 1985. Rheological characteristics of suspensions of *Aspergillus niger*: Correlation of rheological parameters with microbial concentration and shape of the mycelial aggregate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **21**: 60-64.
- Hansson, G. and Seifert, G. 1987. Effects of cultivation techniques and media on yields and morphology of the basidiomycetes *Armillaria melia*. *Applied Microbiol. Biotechnol.*, **23**: 468-473.
- König, B., Schügerl, K. and Seewald, C. 1982. Strategies for penicillin fermentation in tower-loop reactors, *Biotechnol. Bioeng.*, **24**: 259-280.
- Lee, K. M., Lee, S. Y. and Lee, H. Y. 1999. Effect of ammonium phosphate on mycelial growth and exopolysaccharides production of *Ganoderma lucidum* in an air-lift fermenter. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **9**(6): 726-731.
- Lee, S. Y., Kang, T. S. and Lee, M. C. 1998. Condition of exo-polysaccharide production from submerged mycelial culture of *Ganoderma lucidum* by using air-lift fermenter system. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **13**(5): 1-7.
- Metz, B., De Bruijn, E. W. and van Suijdam, J. C. 1981. Method for quantitative representation of morphology of molds. *Biotechnol. Bioeng.*, **23**: 149-162.
- Metz, B. and Kossen, N. W. F. 1977. *Biotechnology review: The growth of molds in the form of pellets - A literature review. Biotechnol. Bioeng.*, **19**: 781-799.
- Pace, G. W. 1980. Rheology of mycelial fermentation broths. Pp. 95-100. In Smith, J. E., Berry, D. R. and Kristiansen, B. Eds. *Fungal Biotechnology*. Academic Press, London.
- Packer, H. L. and Thomas, C. R. 1990. Morphological measurements on filamentous microorganisms by fully automatic image analysis. *Biotechnol. Bioeng.*, **35**: 870-881.
- Patankar, D. B., Liu, T. and Oolman, T. 1993. A fractal model for the characterization of mycelial morphology, *Biotechnol. Bioeng.*, **42**: 571-578.
- Pirt, S. J. and Callow, D. S. 1959. Continuous flow culture of the filamentous mould *Penicillium chrysogenum* and the control of its morphology. *Nature*, **184**: 307-310.
- Roles, A. J., Verg, V. and Voncken, R. M. 1974. Rheology of mycelial broths. *Biotechnol. Bioeng.*, **16**: 181-208.
- Ryoo, D. H. 1994. Analysis of filamentous fungal growth and pellet formation by fractal geometry. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **9**(5): 512-517.
- Shin, Y. C. and Byun, S. M. 1991. Effect of pH on the elaboration of pullulan and the morphology of *Aureobasidium pullulans*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**(2): 193-199.
- Sone, Y., Okuda, R., Wada, A., Kishida, A. and Misaki, A. 1985. Structures and antitumor activities of the polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*. *Agricultural Biological Chemistry*, **49**(9): 2642-2650.
- Suijdam, J. C. V. and Metz, B. 1981. Influence of engineering variables upon the morphology of filamentous molds. *Biotechnol. Bioeng.*, **23**: 111-148.
- Treskatis, S. K., Orgeldinger, V., Wolf, H. and Gilles, E. D. 1997. Morphological characterization of filamentous microorganisms in submerged cultured cultures by on-line digital image analysis and pattern recognition. *Biotechnol. Bioeng.*, **53**: 191-202.
- Vecht-Lifshitz, S. E., Magdassi, S. and Braun S. 1990. Pellet formation and cellular aggregation in *Streptomyces tendae*. *Biotechnol. Bioeng.*, **35**: 890-896.
- Whitaker, A. and Long, P. A. 1973. Fungal pelleting. *Proc. Biochem.*, **11**: 27-31.