

Cephalosporium 발효시 균체의 형태학적 측면을 고려한 수학적 모델링 및 유가식 배양에의 응용

김의용 · 유영제*

서울대학교 공과대학 화학공학과

Mathematical Modeling with Cell Morphology and Its Application to Fed-batch Culture in *Cephalosporium* Fermentation

Kim, Eui-Yong and Young-Je Yoo*

Department of Chemical Engineering, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract — A kinetic model incorporating cell morphology in cephalosporin C biosynthesis by *Cephalosporium acremonium* was developed. The double-substrate kinetic model was used to describe cell growth. Methionine controlled the rate of growth while glucose ultimately controlled the extent of growth. The changes in specific product formation rate were associated with morphogenesis, especially cell differentiation. To increase the productivity of cephalosporin C, the proposed model equations were applied to a fed-batch culture. The algorithm to optimize the fed-batch culture consists of two steps; cell growth was maximized in the growth phase and then cephalosporin C production was maximized in the production phase. The increase of about 33% in the cephalosporin C titre was obtained by the optimal feeding scheduling in comparison with that of batch culture.

미생물 배양에 대한 균체증식 모델식은 여러 관점에서 생각할 수 있다. 기질의 농도, 온도, pH, 전단력과 같은 물리 화학적인 환경요인에 의해 겉으로 관찰되는 현상만을 고려한 단순한 형태의 모델로부터 복잡하게는 균체증식 과정시 RNA, DNA 등의 조성변화를 고려한 생화학적 모델(1)에 까지 다양한 형태의 수학적 모델식이 유도될 수 있다. 단세포에 대한 일반적인 식은 대다수의 박테리아에는 쉽게 적용될 수 있으나 곰팡이의 경우는 단세포인 효모로부터 균체의 형태학적 분화가 수반되는 고등 곰팡이까지 여러 종류가 존재하기 때문에 그 식은 복잡해질 수 있다. 대부분의 경우 액침 배양시 곰팡이의 증식형태는 박테리아에서와 비슷한 증식형태를 따른다. 또한 박테리아에서 많이 사용되고 있는 비성장속도와 제한기질의 관계를 나타내는 Monod식이 곰팡이의 경우에도

종종 적용된다(2). 그러나 이들간에는 다음과 같은 차이점이 있다. 첫째, 박테리아의 경우에도 간혹 발효조의 벽면에서 증식하는 경우가 있을 수 있으나 곰팡이의 경우 표면에서 증식하는 현상이 심한 경우가 종종 있는데 이들은 임펠러나 전극 등의 표면에서 증식하면서 많은 문제를 야기시킨다. 둘째, 박테리아는 입자(pellet)를 형성하지 않지만 곰팡이에서 이는 거의 일반적인 현상이다. 입자의 형성은 배양액의 점도를 낮출 수 있기 때문에 바람직한 증식형태라 볼 수도 있지만 입자내부로의 물질전달에 저항이 걸릴 수 있다는 단점이 있다. 셋째, 많은 곰팡이의 경우 균체의 형태학적인 분화 때문에 다양한 형태의 모양을 갖는 특징이 있다. 그러므로 박테리아에서와 같이 곰팡이의 균체증식을 확실적으로 묘사하기란 여러가지 어려움이 있다.

본 실험에서 사용한 *Cephalosporium acremonium*의 경우는 벽면 증식현상은 심각하지 않다. 그러나 이를 이용한 cephalosporin C(CPC)의 발효시 앞에서 언

Key words: Cephalosporin C, *Cephalosporium acremonium*, morphology, modeling, fed-batch culture

*Corresponding author

급한 바와 같이 균체가 증식함에 따라 형태학적으로 분화한다는 특징이 있다. 이와 같은 현상은 미생물 자체의 유전적 특성이기도 하지만 기질 등과 같은 주변환경에 의해서도 크게 영향을 받게 된다. 이와 같은 형태학적 분화는 β -lactam계 항생제의 생산과도 밀접한 관계가 있기 때문에 많은 사람들에 의해서 연구가 진행되었다(3-5). 형태학적인 분화과정은 매우 복잡하기 때문에 그 메커니즘을 완전히 파악하기 어렵지만 이들을 어느 정도 타당하게 묘사할 수 있는 모델식이 개발된다면 발효공정의 효율을 개선시킬 수 있는 유용한 도구로 사용될 수 있다.

1970년 Megee 등(6)은 *A. awamori* 표면 배양의 경우 균체의 분화를 고려하여 균사를 5단계로, 산물은 DNA, RNA, 단백질, 효소의 4단계로 분류하여 모델식을 제안하였는데 이들은 균사의 증식 및 분지(branching)를 균체의 분화와 산물의 생성에 연결시켰다. Matsumura 등(7,8)은 *C. acremonium* 균사체의 형태를 사상균사(hyphae), 팽윤균사 단편(swollen hyphal fragments), 분절포자(arthrospores)의 세 단계로 나누어 유용한 모델을 제안하여 유가식 배양에 응용하였다. 이들은 세포내 methionine이 CPC의 합성과 관련된 효소의 생성을 유도하는 CPC 생산의 조절자이며, glucose와 methionine의 동화에 의해 사상균사가 팽윤균사로 분화가 촉진되는 것으로 보았다. 한편 CPC의 생성은 관련효소에 비례한다고 가정하여 컴퓨터 모사를 하였는데 그 결과 팽윤균사 단편의 연속적인 생성, 세포내 methionine의 고농도 유지, glucose에 의한 탄소원 저해현상의 최소화가 CPC의 생산성을 증대시키는 중요한 요소라고 보고하였다. 한편 Chu와 Constantinides(9)도 CPC 발효시 균체의 분화단계를 박막균사(thin hyphae)와 세포벽이 두꺼운 세포(thick wall cell, 팽윤균사 및 분절포자)로 나누어 모델링하였다. Glucose의 존재는 균체의 분화속도를 억제하며 CPC의 생산은 세포벽이 두꺼운 세포내에 존재하는 제한효소(rate-limiting enzyme)의 양에 비례한다고 하였는데 Pontryagin 최대값 원리를 이용하여 CPC의 생산을 최대로 할 수 있는 최적온도와 pH를 예측하였다. 이상과 같은 균체 분화에 대한 모델식 이외에도 CPC 발효에 대한 모델식이 소수 있다. Trilli 등(10)은 반복 유가식 배양에서 CPC 생산에 대한 모델식을 제안하였으며 Khang 등(11)은 calcium alginate에 균체를 고정화

시켜 유효인자(effectiveness factor)를 구하였는데 이론값과 잘 일치함을 보였다.

실험방법 및 모델링

균사체의 형태학적인 분화를 고려한 모델식을 제안하기 위해서 3쌍의 플라스크 배양결과로부터 haemocytometer를 이용하여 시간에 따른 *Cephalosporium acremonium* 각 형태별로의 평균농도를 측정하였다. 여기서 사상균사(filamentous hyphae, X_F)와 팽윤균사는 격막의 유무에 관계없이 균체의 직경이 각각 $3\mu\text{m}$ 이하와 이상일 때로 정의하여 나누었으며 장팽윤균사(long swollen hyphae, X_{LS})와 단팽윤균사(short swollen hyphae, X_{SS})의 구분은 균체의 길이가 각각 $50\mu\text{m}$ 이상과 이하로 정의하여 분류하였다. 한편 최종적으로 분절된 단세포는 분절포자(arthrospores, X_A)로 분류하였다. 한편 균체 형태별로는 농도를 정확하게 계산하기 위해서 haemocytometer의 용기($1/400\text{mm}^2 \times 1/10\text{mm}$)로 30회에 걸쳐 농도를 계측한 후 이들의 평균값을 이용하여 데이터를 계산하였으며 입자와 같이 균체가 뭉친 경우는 입자내 균체의 형태 구성비가 균질상의 균체와 같다고 가정하여 입자상의 각 균체의 농도는 계측에서 제외하였다. 그외의 실험방법 및 조건은 참고문헌(12)에 기술한 바와 같다.

발효배지의 플라스크 액침 배양시 그 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 발효초기 균체는 glucose와 methionine의 동화에 의해 사상균사의 형태로 가늘고 길게

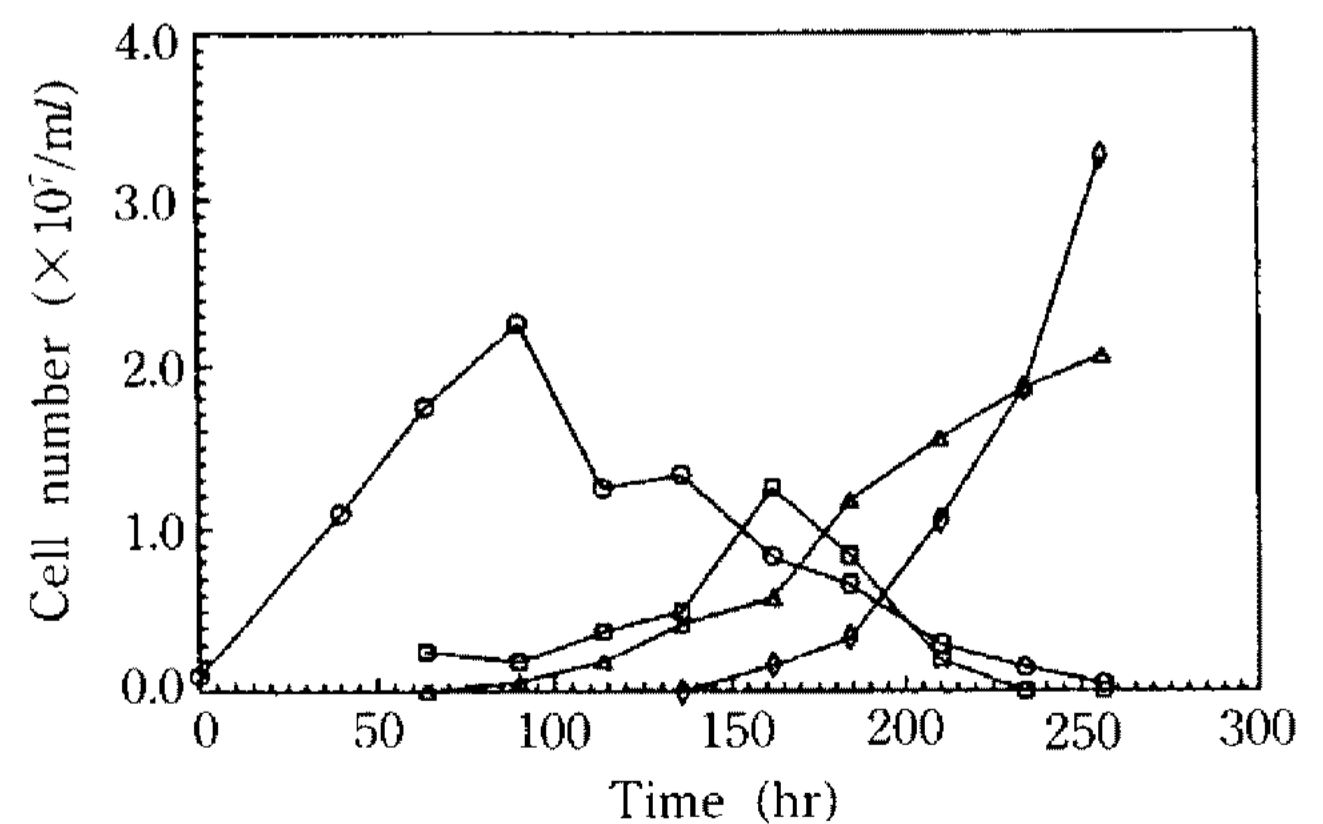


Fig. 1. Time course of each cell number of *C. acremonium* growing in fermentation medium (○: filamentous hyphae, □: long swollen hyphae, △: short swollen hyphae, ◇: arthrospores).

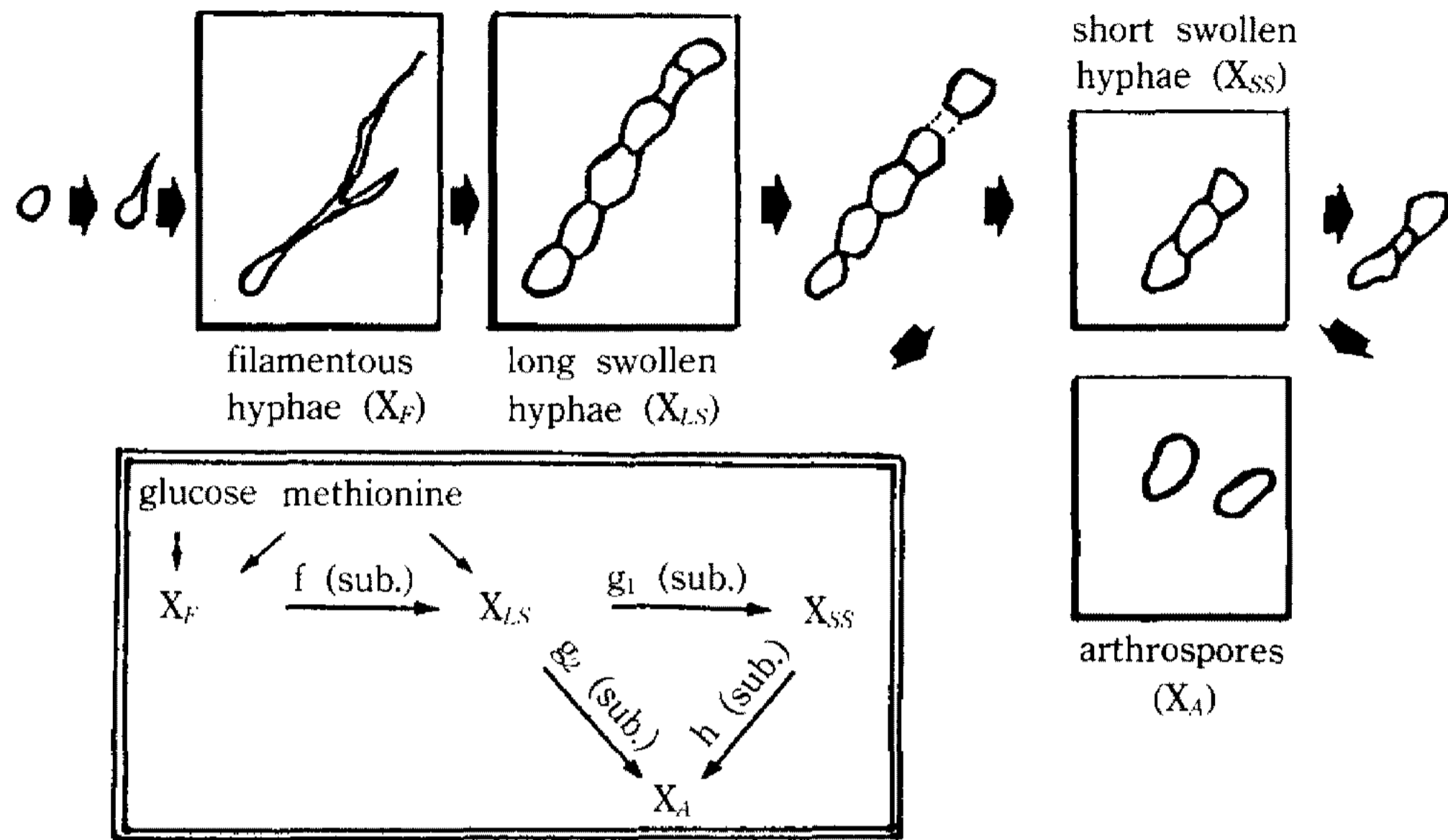


Fig. 2. Proposed cell differentiation pattern of *C. acremonium* in submerged culture.

증식하여 최대값을 보인 후 glucose가 점차 고갈되면서 생육상으로 분화가 수반되어 사상 균사가 부풀어 오르면서 장팽윤 균사로 전환되었다. 장팽윤 균사는 다시 최대값을 보인 후 methionine의 고갈과 더불어 단팽윤 균사로 전환되었으며 소량의 분절포자가 생성되었다. 한편 단팽윤 균사는 분절 포자로 전환되었다. 이상의 과정은 비가역적으로 진행되었다. Fig. 2는 현미경으로 관찰된 균체 분화 과정을 나타낸 것이다.

본 연구에서는 균체의 증식과 분화를 서로 개별적인 것으로 보았으나 Matsumura 등(7, 8)은 glucose와 methionine의 동화에 의해 사상 균사가 팽윤 균사 단편으로 분화가 촉진되는 즉, 균체의 증식과 분화를 동일 시점에서 일어나는 것으로 보았다. 그러나 일반적으로 균체 주변의 환경요인에 의해서 영양증식 구조(vegetative growth structure)가 억제되고 생식 구조(reproductive structure)의 형태로 분화가 진행됨은 널리 알려져 있다(13-15). 사상 균사의 형태를 갖는 균체의 경우, 균체에 의한 기질의 흡수 또는 이용속도가 일정하다면 영양증식이 일어나는 방향으로 진행되고(16) 이와 같은 조건하에서 균체는 주변 환경보다는 균 자체의 유전적 특성에 의해 조절받는다(17). 그러나 기질이 고갈되면 균체내에 불균형 시스템을 초래하여 균체를 분화 분절시키는 방향으로 대사상의 전환이 일어나게 된다(18, 19). 이와 같은 상태의 변화는 대사경로가 바뀌었음을 암시하기 때문에 이들 두 상태는 양립할 수도 있으나, 일반적으로

서로 상반되는 과정이다.

Smith(18)는 영양증식 구조와 생식 구조는 같은 시점에서 일어나는 개별적인 독특한 현상이기 보다는 대사과정상의 중간 제한물질(limiting metabolic intermediate)에 의해 경쟁적으로 일어나는 미생물 공정으로 간주하였는데 이와 같이 영양증식 구조와 생식 구조가 동시에 일어나지 않고 어느 한정된 대사경로상의 변위(metabolic shift)에 의해 분리된다면 이와 같은 분기점은 기질의 고갈에 의하여 일어나는 것으로 판단할 수 있다.

이상의 관점으로부터, 기질의 고갈에 의한 균체의 분화에 대하여 모델식을 제안하였다. 균체의 형태는 사상 균사(X_F), 장팽윤 균사(X_{LS}), 단팽윤 균사(X_{SS}), 분절 포자(X_A)의 4단계로 나누었으며 균체의 증식은 glucose와 methionine의 동화에 의한 double Monod kinetics를 이용하였고, 균체의 분화는 기질의 고갈과 균 자체의 유전적 인자를 고려하였다. 한편 균체의 자가 분해는 비교적 세포벽의 두께가 두꺼운 분절 포자에서는 일어나지 않고(20) 다른 세 가지 형태의 균체에서는 일어난다고 가정하였다. 이상의 과정을 수학적식으로 간단하게 표현하면 아래와 같다.

$$\frac{dX_F}{dt} = \mu X_F - f(\text{substrate})X_F - k_D X_F \quad (1)$$

$$\frac{dX_{LS}}{dt} = f(\text{substrate})X_F - \{g_1(\text{substrate}) + g_2(\text{substrate})\}X_{LS} - k_D X_{LS} \quad (2)$$

$$\frac{dX_{SS}}{dt} = g_1(\text{substrate})X_{LS} - h(\text{substrate})X_{SS} - k_d X_{SS} \quad (3)$$

$$\frac{dX_A}{dt} = g_2(\text{substrate})X_{LS} + h(\text{substrate})X_{SS} \quad (4)$$

균체의 증식단계

균체의 증식단계는 균체의 분화가 일어나기 전의 형태인 사상 균사가 증식하는 단계이다. 즉 기질을 소모하면서 사상 균사의 형태로 증식하며 이들은 다시 장팽윤 균사로 분화가 일어난다.

일반적으로 균체의 증식속도는 단일 제한기질의 함수(Monod, Blackman, Exponential kinetics model)로 표현되어 왔는데 이들 식들은 대다수의 생물 시스템을 이해하거나 산업적 규모의 공정을 개발하는데 있어서 많은 이론적 정보를 제공하여 왔다. 그러나 균체의 증식은 다중 기질(multi-substrate)에 의해서도 영향을 받을 수 있음이 밝혀져 있다. 이와 같은 모델은 하나의 기질(methionine)은 증식속도를, 또다른 기질(glucose)은 증식 정도를 궁극적으로 제어한다는 개념으로 개발되었다(21).

Megee 등(22)은 *Lactobacillus casei*의 배양시 glucose와 riboflavin의 두 가지 기질을 이용하여 균체의 증식속도를 묘사하는 double Monod kinetics를 처음 보고하였는데 그 후 많은 사람들(23, 24)에 의해 double substrate limited growth model이 매우 유용한 것으로 보고되었다. 산소의 역할이 매우 중요한 호기성 공정의 경우 미생물에 영양분이나 에너지를 제공하는 기질과 산소로 된 double Monod kinetics가 많이 보고되고 있다(25, 26). 또한 산업적으로 응용되는 복합 배지에서도 균체의 증식에 필요한 탄소원 이외에 아미노산, 비타민과 같은 대사경로상의 중간 물질에서도 이와 같은 현상이 목격되기도 하였다(27). 반면에 이와 같은 모델은 부적절하다는 보고도 일부 있으며(28) 약간 변형된 형태도 보고되어 있다(29).

본 연구에서는 변형된 double Monod kinetics를 이용하였다. 여기서 제한기질로 가정한 것은 glucose와 methionine이었는데 그 이유는 glucose는 균체증식에 필요한 에너지원으로 이것이 없으면 균체의 증식이 불가능해지며 methionine은 균체의 증식속도를 향상시키는 기질이었기 때문이다(12). Methionine의 영향에 대한 실험에서도 methionine이 glu-

cose의 동화를 촉진한다고 보고하였는데(12) 이로보아 *C. acremonium* 균체증식의 제한기질로 이들 두 가지를 고려하는 것이 타당하다.

즉,

$$\mu = \mu_m \left[\frac{G}{K_G + G + G^2/K_I} \right] \left[1 + \frac{M}{K_M + M} \right] \quad (5)$$

여기서 배지내에서 methionine이 없어도 균체의 증식속도는 느리지만 결국 증식이 가능하기 때문에 (12) 우측 항의 1을 고려하였다.

X_L 의 X_{LS} 로 분화

사상 균사는 균 자체의 유전적인 특성과 주변 환경의 변화에 의해 장팽윤 균사로 형태학적인 분화가 일어난다. 여기서 유전적 특성에 의한 분화(계수 k_{11})는 사상 균사의 농도에 비례하는 것으로 가정하였다. 한편 주변 환경에 의한 영향은 Fig. 3(A)에서도 볼 수 있듯이 배지내에서 충분한 양의 glucose가 존재하면 사상 균사로 영양 증식이 일어나고 그 이후 glucose가 소모되어 약 3 g/l 정도가 될 때 사상 균사의 농도가 최대값을 보인 후 장팽윤 균사로 분화되기 시작한다. 이와 같은 현상은 glucose의 농도가 낮아질수록 촉진되어 glucose가 완전 소모되는 시점에서 장팽윤 균사의 농도는 급격히 증가하게 된다. 한편 methionine은 균체에 의해 계속 소모되므로 이를 수학적 식으로 표시하면 다음과 같이 된다.

$$f(\text{substrate}) = \left[k_{11} + \frac{k_{12}}{K_A + G} \right] \left[1 + \frac{M}{K_M + M} \right] \quad (6)$$

X_{LS} 의 X_{SS} 로 분화

장팽윤 균사도 역시 균 자체의 유전적 특성과 주변 환경에 의해 단팽윤 균사로 분화가 진행된다. 여기서 유전적인 특성에 의한 분화(k_{21})는 장팽윤 균사의 균체 농도에 비례하는 것으로 가정하였다. 한편 Fig. 3(B)에서 볼 수 있듯이 배지내의 methionine의 농도가 약 1 g/l일 때 장팽윤 균사의 농도는 최대로 되고 그 후 methionine의 감소와 더불어 장팽윤 균사도 감소하였으며 이에 반하여 단팽윤 균사의 농도는 계속 증가하였다. 이상의 과정을 수학적 식으로 표시하면 아래와 같다.

$$g_1(\text{substrate}) = \left[k_{21} + \frac{k_{22}}{K_M + M} \right] \quad (7)$$

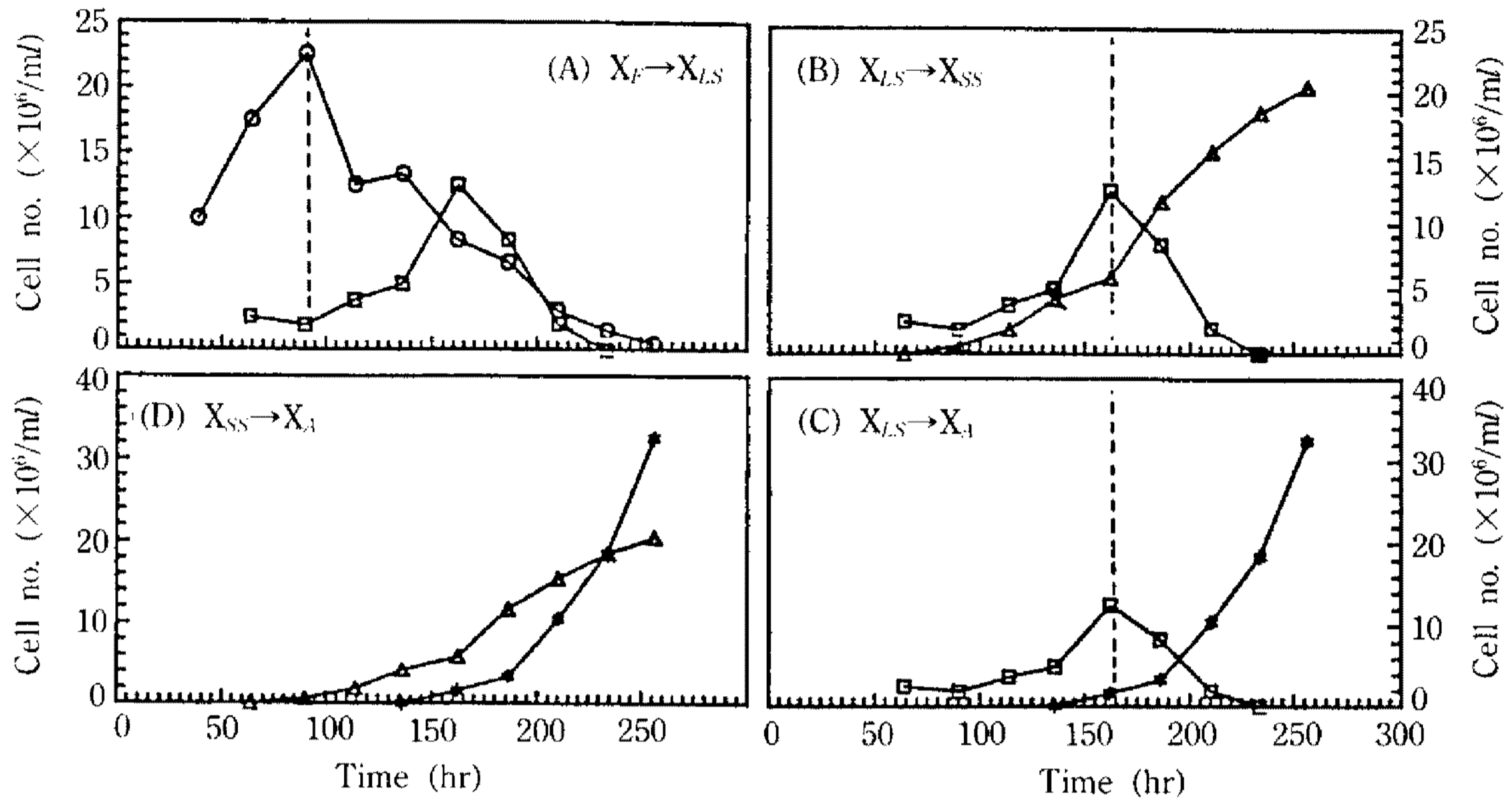


Fig. 3. Time course of each cell number of *C. acremonium* (○: filamentous hyphae, □: long swollen hyphae, △: short swollen hyphae, ★: arthrospores).

X_{LS} 의 X_A 로 분화

형태학적인 분화과정상 장팽윤 균사의 일부분이 직접 분절 포자로 분화가 진행됨이 현미경을 통하여 관찰되었으며 이들 과정을 Fig. 3(C)에 나타내었다. 이 과정은 장팽윤 균사가 단팽윤 균사로 바뀔 때의 부분적 과정을 속하므로 다음과 같이 표현될 수 있다.

$$g_2(\text{substrate}) = k_3 \cdot g_1(\text{substrate}) = k_3 \left[k_{21} + \frac{k_{22}}{K_M + M} \right] \quad (8)$$

X_{SS} 의 X_A 로 분화

단팽윤 균사가 분절 포자로 넘어가는 과정은 배지 내의 제한기질(glucose, methionine)이 거의 완전히 고갈된 후 일어나는 것으로 보아(Fig. 3(D)) 주변 환경의 변화에는 무관한 균 자체의 유전적 특성 때문일 것으로 추정된다. 그러므로 이 과정은 단지 단팽윤 균사의 농도에 비례한다고 가정할 수 있다.

$$h(\text{substrate}) = k_{31} \quad (9)$$

이상의 과정을 고려하여 균체의 형태학적 분화를 모델링하면 아래와 같다.

$$\frac{dX_F}{dt} = \mu_m \left[\frac{G}{K_G + G + G^2/K_I} \right] \left[1 + \frac{M}{K_M + M} \right] X_F$$

$$- \left[k_{11} + \frac{k_{12}}{K_A + G} \right] \left[1 + \frac{M}{K_M + M} \right] X_F - k_D X_F \quad (10)$$

$$\frac{dX_{LS}}{dt} = \left[k_{11} + \frac{k_{12}}{K_A + G} \right] \left[1 + \frac{M}{K_M + M} \right] X_F - [1 + k_3] \left[k_{21} + \frac{k_{22}}{K_M + M} \right] X_{LS} - k_D X_{LS} \quad (11)$$

$$\frac{dX_{SS}}{dt} = \left[k_{21} + \frac{k_{22}}{K_M + M} \right] X_{LS} - k_{31} X_{SS} - k_D X_{SS} \quad (12)$$

$$\frac{dX_A}{dt} = k_3 \left[k_{21} + \frac{k_{22}}{K_M + M} \right] X_{LS} + k_{31} X_{SS} \quad (13)$$

기질의 소모단계

Glucose는 사상 균사의 증식에 사용되며 methionine은 사상 균사와 장팽윤 균사의 증식에 사용되므로 다음과 같이 표현될 수 있다.

$$- \frac{dG}{dt} = \frac{1}{Y_1} \left[\frac{dX_F}{dt} \right]_{growth} = \frac{1}{Y_1} \mu_m \left[\frac{G}{K_G + G + G^2/K_I} \right] \left[1 + \frac{M}{K_M + M} \right] X_F \quad (14)$$

$$- \frac{dM}{dt} = \frac{1}{Y_2} \left\{ \left[\frac{dX_F}{dt} \right]_{growth} + \left[\frac{dX_{LS}}{dt} \right]_{differentiation} \right\}$$

$$= \frac{1}{Y_2} \left\{ \mu_m \left[\frac{G}{K_G + G + G^2/K_I} \right] \left[1 + \frac{M}{K_M + M} \right] + \left[k_{11} + \frac{k_{12}}{K_A + G} \right] \left[1 + \frac{M}{K_M + M} \right] \right\} X_F \quad (15)$$

Cephalosporin C의 생산단계

기질이 풍부한 배지에서 항생물질을 만드는 균들은 증식에 필요한 주변환경이 좋기 때문에 균체의 증식만을 하고 항생물질을 생합성하지 않으나 제한기질이 고갈된 상태에서는 스스로 생존하기 위하여 항생물질을 생합성하는 것으로 알려져 있다(30). 이런 균체 증식상과 산물의 생산상은 복합배지와 같이 균체 증식이 빨리 일어나는 경우에는 그 구별이 확연하지만 합성배지에서는 이들이 서로 겹쳐질 수 있다. 이와 같이 상의 전환(항생제의 생산)을 개시하게 하는 요인은 제한기질의 고갈과 연관이 있게 되는데 전술한 바와 같이 제한기질의 고갈은 또한 균체의 형태학적 분화와 밀접한 관련이 있다.

본 연구에서 CPC 생산에 관한 모델식은 균체의 형태학적 분화와 직접적인 관계가 있는 것으로 설정하였다. 이와 같은 관계는 이미 많은 사람들에 의해서 연구가 되었다(3, 4, 31, 32). 그러나 균체의 분화에 의해 항생제의 생산이 수반되는지 또는 반대로 항생제가 생산됨으로써 균체의 분화가 진행되는지는 생물학적 관점에서 정확하게 규명되어 있지 않다. 일부 문헌에서는 항생제가 포자를 형성시키는데 이용되는, 즉 differentiation effector로 작용한다는 보고도 있다(13, 33). 한편 개량 변이주 대부분의 경우 균체의 분화가 본래의 균과는 다르며(34) *C. acremonium*의 경우 CPC의 역가가 높은 균일수록 분화현상이 뚜렷하게 일어나는 것으로 알려져 있는데(4, 31, 35) 이상의 현상도 산물의 생성과 균체의 분화가 밀접한 관계가 있음을 말해주고 있다.

다음은 CPC 모델링을 위하여 CPC 농도 증가분에 대한 각 균체의 농도변화간의 선형성을 나타내는 지표인 상관계수를 Table 1에 나타내었다. 여기서 각각의 데이터는 CPC의 생성속도가 급증하는 부분까지 취했는데 그 이유는 발효말기 CPC의 분해가 촉진되어 데이터 해석에 오차가 개입될 수 있기 때문이다. 사상 균사의 경우 CPC의 생산과 균체 형태의 변화간에 전혀 선형성이 없는 것으로 나타났으며 장팽윤 균사의

Table 1. Correlation coefficient of each morphological type cell on CPC production.

Morphology	Relative constant
X_F	0.042
X_{LS}	-0.508
X_{SS}	0.700
X_A	0.603
$X_{SS} + X_A$	0.716

경우 CPC의 생성과 서로 반비례하는 것으로 나타났으나 이들의 상관계수는 -0.508로 역시 낮았다. 단 팽윤 균사와 분절 포자의 경우 상관계수가 0.7, 0.603으로 전자의 두 경우에 비해 비교적 높게 나타났다. 한편 이들을 1:1로 조합할 경우 상관계수는 0.716으로 제일 높게 나타났으며 그 조합비에 따라 상관계수가 높아지게 된다. 이상의 결과로부터 CPC 생성 모델식은 단팽윤 균사와 분절 포자의 생성속도를 고려하여 설정할 수 있음을 알 수 있다.

본 연구에서 CPC 생성속도에 대한 모델식을 다음과 같이 제안하였다.

$$\frac{dP}{dt} = \alpha' \frac{dX_{SS}}{dt} + \beta' \frac{dX_A}{dt} - k_p P \quad (16)$$

즉, CPC의 생성속도는 CPC의 생산단계시 균체의 지배적인 형태인 단팽윤 균사와 분절 포자의 생성속도에 비례한다고 가정하였으며 CPC 분해에 대한 비례상수(k_p)를 고려하였다. 외관상으로 식의 형태는 성장 관련 모델의 형태를 갖고 있지만 이들 균체의 생성은 균체의 분화과정에 속하므로 실제로는 비성장 관련 모델이다. 한편 CPC 분해는 CAH(Cephalosporin Acetyl Hydrolase) 효소에 의한 것임이 밝혀져 있으며(3) 더불어 효소의 작용과 무관하게 CPC의 고리가 1차 속도에 따라 분해됨이 관찰되었다(36).

변수추정 및 모델식 검토

균체증식에 관한 모델식은 glucose와 methionine의 변형된 double Monod kinetics를 이용하였는데 배지내 각각 제한기질의 유무에 따라 균체의 비성장속도는 Table 2와 같이 변하게 된다. 여기서 초기 배지내에 glucose가 첨가되지 않거나 발효중에 완전 고갈되면 균체의 증식은 더 이상 일어나지 않으며,

Table 2. Specific growth rate of filamentous hyphae with limiting substrate condition.

Substrate		Specific growth rate
G=0	M=0	$\mu_1=0$
G=0	M≠0	$\mu_1=0$
G≠0	M=0	$\mu_2=\mu_m\left(\frac{G}{K_G+G+G^2/K_I}\right)$
G≠0	M≠0	$\mu_3=\mu_m\left(\frac{G}{K_G+G+G^2/K_I}\right)\left(1+\frac{M}{K_M+M}\right)$

G: glucose, M: methionine

glucose가 존재하면 methionine의 유무에 따라 균체의 비성장속도는 영향을 받게 되는데 배지내에 methionine이 존재하는 경우가 없는 경우에 비해 비성장속도가 더 큼을 알 수 있다. 그러나 본 실험에서 사용한 배지(glucose/methionine=5.4)에서 methionine보다 glucose의 고갈시간이 빠르기 때문에 glucose가 잔존하는 경우 비성장속도는 μ_3 를 따라가게 되며 초기 배지에 methionine이 첨가되지 않은 경우 μ_2 를 따라가게 된다. 한편 K_M 의 크기에 따라 methionine의 의존도가 결정된다.

균체 분화에 관한 모델식은 제한기질에 의해 영향을 받는 것으로 설정하였다. 사상 균사에서 장팽윤 균사로 분화되는 과정의 매개변수 $f(\text{substrate})$ 는 수식상으로 glucose의 농도가 낮을수록, methionine의 농도가 높을수록 큰 값을 가지며 반대로 glucose의 농도가 높을수록 methionine의 농도가 낮을수록 작은 값을 갖게 된다. 이론상의 최대-최소값의 비는 $2[1+k_{12}/(k_{11}\times K_A)]$ 로 k_{12} 가 클수록 k_{11} , K_A 가 작을수록 기질의 농도에 따른 분화속도의 비가 더 커지게 된다. 한편 기질의 농도가 일정하다면 k_{11} , k_{12} 가 클수록 K_M , K_A 가 작을수록 분화가 촉진된다.

장팽윤 균사가 단팽윤 균사나 분절 포자로 분화되는 과정의 매개변수 $g_1(\text{substrate})$, $g_2(\text{substrate})$ 는 methionine의 함수로 설정하였다. Methionine의 농도가 낮을수록 분화속도는 커지며 반대로 methionine 농도가 높을수록 작아지는데 이론상의 이들 비는 $[1+k_{22}/(k_{21}\times K_M)]$ 으로 k_{22} 가 클수록 k_{21} , K_M 가 작을수록 methionine 농도에 따른 분화 속도비가 커지게 된다. 한편 기질농도가 일정한 경우 k_{21} , k_{22} 가 클수록 K_M 이 작을수록 분화가 촉진된다.

매개변수의 계산 및 추정

이상의 모델식은 7개의 상미분 방정식으로 이루어져 있으며, 여기에 포함된 매개변수는 모두 17개이다. 이들 매개변수 가운데 k_P 는 문헌치로부터 추정하였으며, k_{11} 과 k_{21} 은 실험결과에 맞도록 가정하였다. 나머지 14개의 매개변수는 서로 연관되어 있기 때문에 고유 매개변수의 절대값을 직접 구할 수 없다. 그러므로 다음과 같은 방법으로 결정하였다.

균체 분화과정의 특성을 보면, X_F 는 X_{LS} 로, 이것은 다시 X_{SS} 와 X_A 로, X_{SS} 는 X_A 로 분화되며, 모델식은 그에 맞도록 세워졌으므로 추정할 매개변수도 그러한 관계로 상호 연관되어 있다.

사상 균사(X_F)의 농도는 증식과 분화의 관계로 되어 있지만 균체의 증식기에 X_F 의 분화와 자가 분해는 증식에 비하여 상대적으로 작은 값이므로 식 (10)의 우변에서 두번째, 세번째 항은 무시할 수 있다. 식 (10)을 좌변으로 이항하고 오차 제곱의 합으로 표현하면 다음과 같다.

$$P_A = \sum_{min} \left\{ \frac{dX_F}{dt} - \mu_m \left[\frac{G}{K_G + G + G^2/K_I} \right] \left[1 + \frac{M}{K_M + M} \right] X_F \right\}^2 \tag{17}$$

또한 사상 균사의 경우 균체의 분화와 자가 분해를 모두 고려할 경우 위에서와 같은 방법으로 오차 제곱의 합으로 표현하면 다음과 같이 된다.

$$P_B = \sum_{min} \left\{ \frac{dX_F}{dt} - \mu_m \left[\frac{G}{K_G + G + G^2/K_I} \right] \left[1 + \frac{M}{K_M + M} \right] X_F + \left[k_{11} + \frac{k_{12}}{K_A + G} \right] \left[1 + \frac{M}{K_M + M} \right] X_F + k_D X_F \right\}^2 \tag{18}$$

여기서 dX_F/dt 는 X_F 와 시간의 데이터를 이용하여 내삽을 하고 그로부터 각 점들의 기울기를 구하여 얻었다. 식 (17)은 μ_m 과 K_G , K_I , K_M 의 값에 의존하여 변하게 되는데 그 값이 최소가 되도록 비선형 회귀 방법(Nonlinear regression method)을 이용하여 매개변수의 값을 정하였다. 이 과정에서 구한 매개변

Table 3. Estimated parameter values in the model.

Parameter	Value	Dimension	Search method
K_G	1.1554	g-glucose/l	experimental
K_M	0.7	g-methionine/l	experimental
K_I	123	g-glucose/l	experimental
K_A	1.06	g-glucose/l	estimated
k_{11}	0.0001	hr ⁻¹	assumed
k_{21}	0.0001	hr ⁻¹	assumed
k_{31}	0.0006	hr ⁻¹	estimated
k_D	0.0019	hr ⁻¹	estimated
k_p	0.01	hr ⁻¹	ref. (36)
k_{12}	0.0182	g-glucose/l/hr	estimated
k_{22}	0.0091	g-methionine/l/hr	estimated
k_3	0.5318	-	estimated
μ_m	0.0162	hr ⁻¹	experimental
α'	0.04	g-CPC/g-cell	estimated
β'	0.03	g-CPC/g-cell	estimated
Y_1	0.4037	g-cell/g-glucose	experimental
Y_2	3.8264	g-cell/g-methionine	experimental

수에서 우선 μ_m 을 고정하였으며 그중 μ_m , K_G , K_I 를 식 (18)에 직접 대입하였다. 그 후 식 (18)로부터 K_M , K_A , k_{12} 를 다시 같은 방법으로 계산하여 그 중 k_{12} 를 고정하였다. 한편 이 과정에서 구한 K_M 을 식 (17)에 다시 대입하여 K_G 와 K_I 를 다시 구하였다. 이와 같은 방법을 반복하여 각 매개변수의 변화 범위가 3% 이내로 될 때 그 매개변수의 값을 순차적으로 결정해 주었다.

한편 장팽윤 균사, 단팽윤 균사와 분절 포자의 경우 앞서와 같은 방법으로 식 (11), (12), (13)을 좌변으로 이항하고 오차 제곱의 합으로 표현하면 다음과 같다.

$$P_1 = \left\{ \frac{dX_{LS}}{dt} - \left[k_{11} + \frac{k_{12}}{K_A + G} \right] \left[1 + \frac{M}{K_M + M} \right] X_F + [1 + k_3] \left[k_{21} + \frac{k_{22}}{K_M + M} \right] X_{LS} + k_D X_{LS} \right\}^2 \quad (19)$$

$$P_2 = \left\{ \frac{dX_{SS}}{dt} - \left[k_{21} + \frac{k_{22}}{K_M + M} \right] X_{LS} + k_{31} X_{SS} + k_D X_{SS} \right\}^2 \quad (20)$$

$$P_3 = \left\{ \frac{dX_A}{dt} - k_3 \left[k_{21} + \frac{k_{22}}{K_M + M} \right] X_{LS} - k_{31} X_{SS} \right\}^2 \quad (21)$$

Table 4. Parameter sensitivity in the model.

Parameter	Sensitivity(%)	Parameter	Sensitivity(%)
K_G	-0.073	k_A	-1.356
K_M	-2.067	k_{12}	1.166
K_I	0.037	k_{22}	1.745
K_A	-1.239	k_3	0.440
k_{11}	0.007	μ_m	0.440
k_{21}	0.015	Y_1	3.072
k_{31}	-0.022	Y_2	-0.161

5% fudge basis

같은 방법에 따라 실험값으로부터 각각의 균체별 시간 때론 미분값을 구한 후, 이상의 3개 식을 동시에 풀어 k_{22} , k_{31} 과 k_3 를 구하였다. 이들 식은 서로 다른 오차범위를 갖고 있기 때문에 식 (22)에서와 같이 서로 다른 가중치를 두어 이들을 변화시켜 가면서 오차의 범위가 최소화되도록 동시에 P_C 를 풀었다.

$$P_C = \sum_{min} (\xi_1 P_1 + \xi_2 P_2 + \xi_3 P_3) \quad (22)$$

이상에서 구한 매개변수를 이용하여 같은 방법으로 식 (14)와 식 (15)로부터 Y_1 과 Y_2 를 계산하였다. 한편 같은 방법에 의하여 식 (16)으로부터 α 와 β 를 구하였다. 이상의 과정을 통하여 계산된 매개변수를 Table 3에 나타내었다.

매개변수의 민감도를 분석하기 위해서 매개변수에 5% fudge를 주어 CPC의 최대농도에 미치는 민감도를 계산하였는데 이 과정은 다음과 같이 표현된다.

$$G_i = \frac{\partial P_{max}}{\partial K_i} \quad (23)$$

여기서 G_i 는 변수 K_i 의 작은 변화가 CPC의 최대 농도에 미치는 영향을 나타내는데 그 결과를 Table 4에 나타내었다. Y_1 이 민감도가 제일 큰 것으로 나타났으며 다음은 K_M , k_{22} , k_D , K_A 의 순이었다. 나머지 매개변수의 민감도는 미미하였다. 민감도가 제일 큰 Y_1 은 glucose의 사상 균사에 대한 수율 상수(yield coefficient)로 본 연구에서 설정한 CPC 생산에 대한 모델은 분화된 균체의 양에 비례하는 것으로 가정하였기 때문에 CPC 생산에 대한 균체 농도의 중요성을 암시하고 있다. 또한 CPC의 생산과 직접적인 관련이 있는 장팽윤 균사의 단팽윤 균사 또는 분절 포자로의

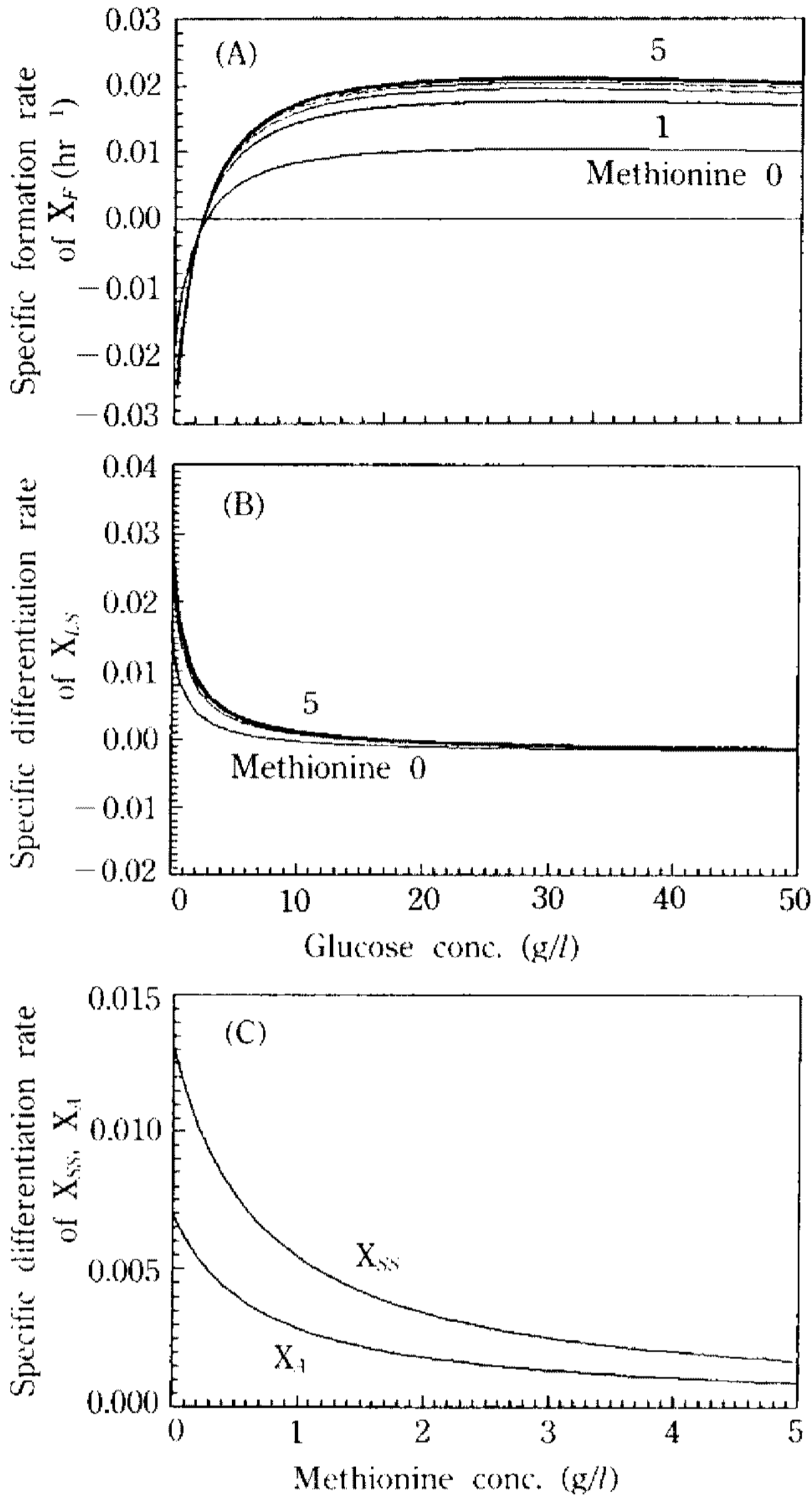


Fig. 4. Relationships between specific formation rate of X_f (A), X_{LS} (B), X_{SS} , X_4 (C) and limiting substrates, respectively.

분화에 대한 지표인 K_M , k_{22} 도 매우 민감한 것으로 나타났다.

회분배양에서의 모델식의 타당성

균체의 분화를 고려한 연립 모델식인 식 (10), (11), (12), (13)과 기질 소모 모델식인 식 (14), (15)를 동시에 풀기 위하여 4차 Runge-Kutta 방법을 사용하였다. 이와 같은 방법으로 계산된 단팽윤 균사와 분절 포자의 증가분을 계산하여 식 (16)으로부터 CPC의 농도를 계산하였다.

Methionine의 농도가 각각 0, 1, 2, 3, 4, 5 g/l일

때 glucose 농도변화에 따른 사상 균사의 비생성속도 (specific formation rate)를 Fig. 4(A)에 나타내었다. Glucose의 농도가 일정할 때 methionine의 농도에 의해 사상 균사의 비생성속도가 영향을 크게 받는데 특히 methionine의 농도가 낮아질수록 이들 값의 변화가 민감해진다. Glucose의 농도가 2 g/l가 되면 사상 균사의 비생성속도가 0이 되는데 이는 사상 균사의 증식속도와 장팽윤 균사의 분화속도가 같음을 의미하는 것으로 실험상으로 이들 값이 약 3 g/l로 확인된 결과와도 잘 일치하고 있다. Glucose가 2 g/l 이하로 감소하게 되면 사상 균사의 증식속도보다 장팽윤 균사로의 분화속도가 더 커지게 되며 이와 같은 조건 하에서 분화속도는 methionine 보다는 glucose의 농도에 더 민감하여 glucose가 배지에서 완전 고갈될 때 까지 분화가 촉진된다.

Fig. 4(B)는 사상 균사로부터 분화에 의해 생성된 장팽윤 균사의 비생성속도를 methionine의 농도가 0에서 5 g/l까지 변할 때 glucose의 농도에 따라 나타낸 수치모사 결과이다. Fig. 4(A)에서와 같이 장팽윤 균사의 생성속도는 methionine 농도에는 둔감하나 glucose 농도에 민감하여 glucose가 고갈될수록 장팽윤 균사로의 분화속도가 커짐을 알 수 있다.

Fig. 4(C)는 단팽윤 균사와 분절 포자의 비생성속도를 methionine 농도변화에 따라 나타낸 결과로 methionine의 농도가 낮아질수록 이들의 생성속도는 급증하게 되어 배지에서 완전 고갈되는 시점에서 이들의 값이 최대로 된다. CPC의 생성속도는 이들 두 가지 형태 균체의 생성속도와 직접적인 관련이 있기 때문에 CPC를 생산하는 단계에서는 배지내에 methionine의 고갈이 CPC의 생산성을 향상시키는데 매우 중요한 인자가 됨을 알 수 있다.

초기 배지에 methionine이 전혀 함유되지 않았을 때와 5 g/l, 10 g/l로 함유된 경우 시간의 경과에 따른 균체의 증식형태를 실험값과 수치모사 결과를 비교하여 Fig. 5(A)에 나타내었다. 초기 배지에 5, 10 g/l로 methionine이 첨가된 경우 그 농도에 관계없이 비슷한 증식 형태를 보였으나 methionine이 첨가되지 않은 배지에서는 균체의 증식속도가 상당히 지연됨이 실험적으로 관찰되었으며 이와 같은 결과는 수치모사의 결과와 잘 일치하고 있다. 여기서 methionine의 초기 농도에 관계없이 균체의 최대 농도는 거의 일정하며 균체의 증식속도는 초기 methionine의 농도에

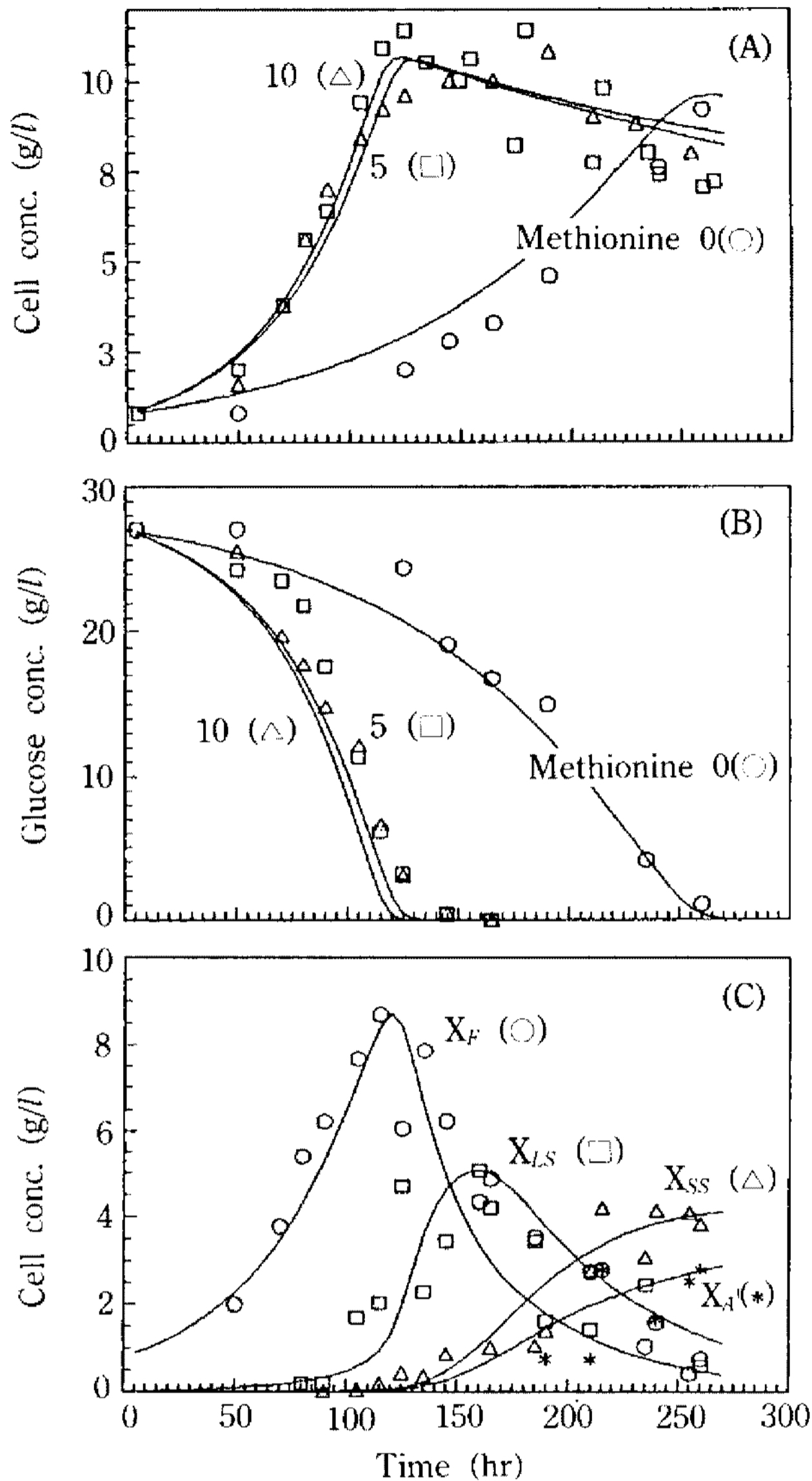


Fig. 5. Comparisons of the experimental data with simulation results in total cell concentration(A), glucose concentration(B) and each morphological type(C), respectively.

의해 크게 영향 받음을 알 수 있다. 이는 glucose의 초기 농도가 27 g/l로 고정된 경우의 결과인데 double Monod kinetics에서 균체의 주성분으로 작용하는 탄소원인 glucose는 균체의 증식 정도를 제어한다는 개념과 또한 methionine은 균체의 증식속도를 제어한다는 개념에 잘 부합되는 결과이다. 그러나 이와 같이 균체의 증식속도를 빠르게 하는데 필요한 methionine의 초기 농도가 5 g/l 이상이 되면 그 효과가 줄어들게 된다.

Fig. 5(B)는 methionine의 초기 농도변화에 따른 glucose의 소모속도를 실험과 수치모사의 결과를 비교하여 나타낸 것으로 methionine이 존재하는 경우

그 양에 관계없이 동일 시점에서 일찍 소모되나 methionine이 첨가되지 않은 경우 glucose의 소모속도는 상당히 지연되어 glucose가 배지에서 완전히 고갈되는데 걸리는 시간이 초기 methionine이 첨가된 배지에 비해 2배 이상되며 이의 실험결과는 수치모사 결과와 잘 일치한다. 이상의 결과는 methionine이 glucose의 동화를 촉진한다는 결과(12)를 확인해 주고 있는데 이를 Caltrider 등(38)은 methionine이 균체의 대사를 촉진시키기 때문이라 하였다. 결국 methionine에 의해 활발한 대사가 일어나 glucose의 소모를 촉진함으로써 methionine이 균체의 증식속도에 영향을 주는 것으로 판단된다.

Fig. 5(C)는 methionine의 초기 농도가 5 g/l일 때 시간 경과에 따른 사상 균사, 장팽윤 균사, 단팽윤 균사, 분절 포자의 변화 과정을 실험값과 수치모사 결과를 비교하여 보여주고 있는데 약간의 오차는 있으나 비교적 이들의 값이 잘 일치하고 있다. 발효초기 균체가 glucose와 methionine을 소모하면서 사상 균사의 형태로 증식한 후 이들이 다시 장팽윤 균사, 단팽윤 균사, 분절 포자로 분화가 진행되는 일련의 연속반응 형태를 보이고 있다. 이 변화과정은 전술한 바와 같이 제한 기질인 glucose와 methionine에 의해서 영향을 받게 된다. 여기서 오차는 haemocytometer를 이용하여 각각의 균체를 형태별로 계측하는 과정에서 발생할 수 있다. 특히 균체가 서로 뭉쳐 입자를 형성한 경우 형태별로의 계측이 불가능하여 균질상의 분산된 균체에서의 형태별 비율과 같다고 가정하여 계측하였으나 실제 입자 내부와 외부의 주변환경이 완전히 다르기 때문에 그 형태의 비율이 다를 수 있으며 또한 균체의 분화 과정시 형태별로의 분류가 확실하지 않은 경우가 종종있기 때문으로 실험오차가 개입될 수 있다.

Fig. 6은 methionine의 초기농도 변화에 대한 각각의 균체 형태의 변화과정을 시간에 따라 나타낸 수치모사의 결과이다. 사상 균사(Fig. 6(A))는 균체의 증식 과정과 밀접한 관련이 있기 때문에 분화가 시작되기 전, 즉 사상 균사가 최대값을 보이는 시점까지의 증가 형태는 Fig. 5(A)의 균체 증식 형태와 비슷하다. 그 이후 이들은 분화되면서 농도는 급격히 감소하게 되고 반면에 장팽윤 균사의 농도가 급증하게 된다(Fig. 6(B)). 장팽윤 균사의 농도는 제한기질인 glucose와 methionine의 초기농도에 의해 영향을 받

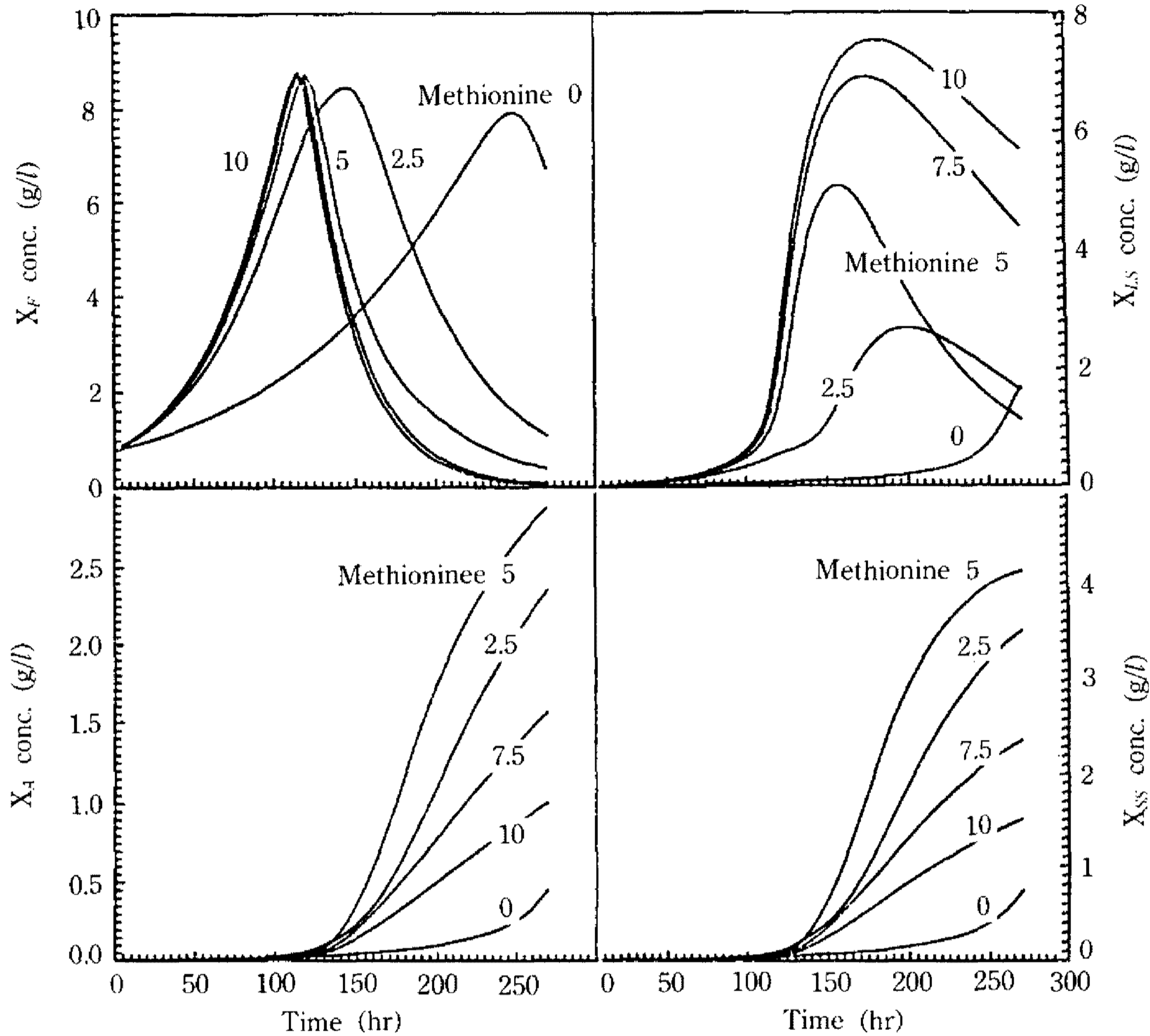


Fig. 6. Simulation results of the concentration of each morphological type with methionine concentration.

는다. 약 80~160시간, 즉 장팽윤 균사의 생성 초기 단계에서는 glucose의 고갈에 의해 이들의 생성이 촉진되는데 methionine의 초기농도가 5, 7.5, 10 g/l에서는 glucose의 고갈시점이 비슷하기 때문에(Fig. 5 (B)) 이들의 생성 형태도 비슷하다. 반면에 장팽윤 균사가 단팽윤 균사로 분화되는 과정은 methionine의 고갈에 의해 촉진된다. 그러므로 methionine의 초기 농도가 5 g/l일 때는 methionine이 배지에서 완전 고갈되기 때문에 이들의 생성속도와 분화속도가 균형을 이루어 약 5 g/l에서 최대로 된 후 감소하나 methionine의 농도가 7.5, 10 g/l인 경우 배지에서 완전 고갈되지 않아 단팽윤 균사로 전환이 지연되고 이에따라 장팽윤 균사의 농도가 초기 methionine이 5 g/l일 때 보다 증가된다. 한편 0, 2.5 g/l의 경우 glucose의 고갈시점이 지연되므로 이들의 생성속도도 지연된다. 이와 같은 methionine의 배지내 고갈 여부에 따라 단팽윤 균사(Fig. 6(C))의 생성속도가 영향을 받게 되고 또한 이에 비례하여 생성되는 분절 포자(Fig. 6(D))의 생

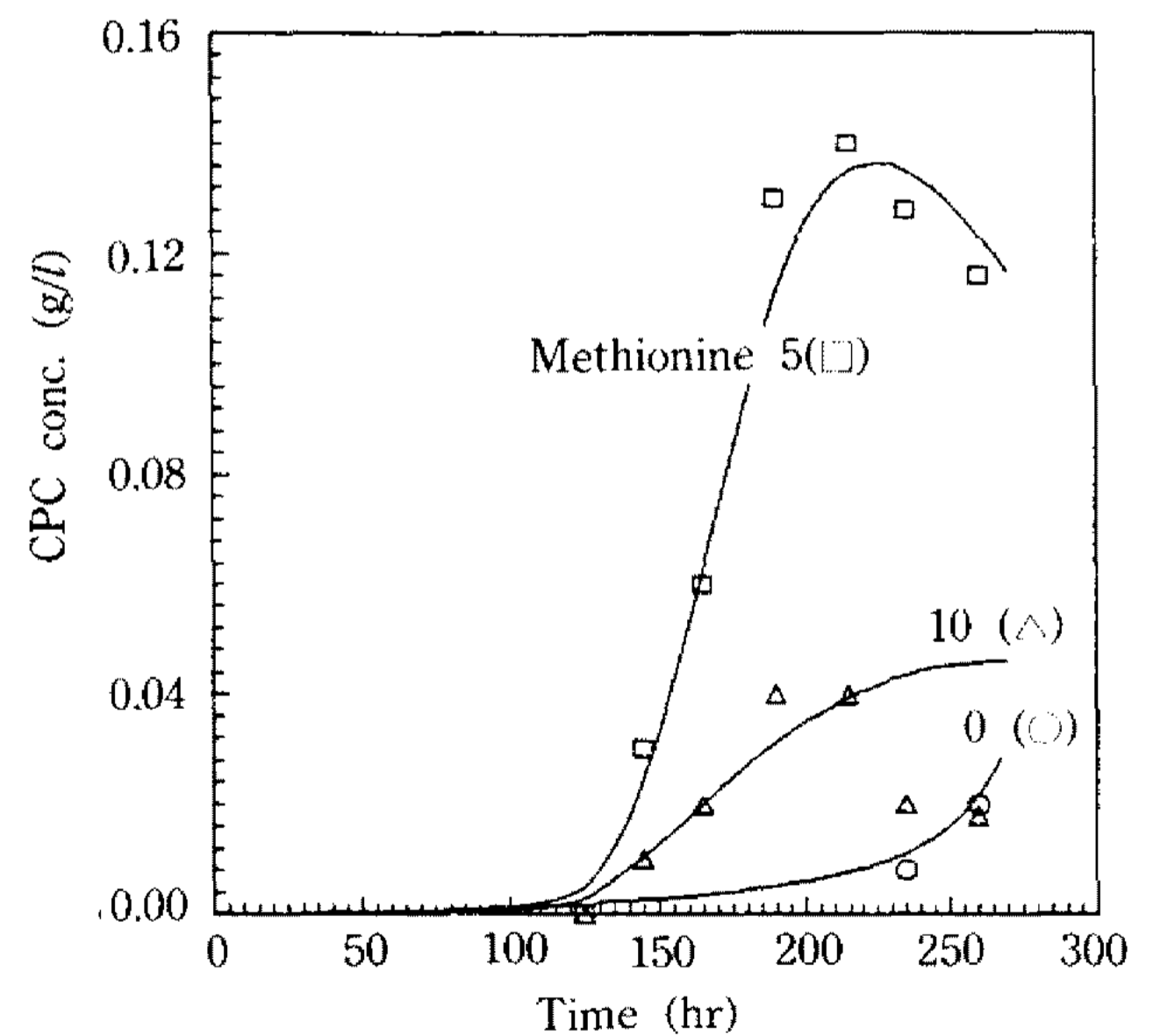


Fig. 7. Comparison of the experimental data with simulation results in cephalosporin C concentration.

성속도도 영향을 받게 된다. 여기서 배지내 methionine의 고갈은 Matsumura 등(31)에 의하면 세포내

methionine의 축적과 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되었다. 결국 제한기질에 의해 CPC 생산과 직접적인 관련이 있는 이들 두 가지 형태의 균체 생성속도가 영향을 받게 된다. 그 결과 CPC의 최대 농도가 영향을 받게 되는데 Fig. 7에는 methionine이 전혀 첨가되지 않은 경우와 5, 10 g/l 첨가된 경우 CPC 농도에 대한 실험값과 전산기 모사 결과를 비교하여 나타낸 것이다. Methionine이 10 g/l일 때는 발효 말기 데이터 분산이 있으나 전반적으로 이들은 서로 잘 일치하고 있다.

이상에서 나타난 것과 같이 실험값과 모델식을 이용한 전산기 모사의 결과는 잘 일치하고 있으므로 설정한 모델식이 타당성이 있는 것으로 판단되었다. 본 모델식은 균체의 형태를 고려하여 모델링을 하였으며 또한 CPC의 생산은 균체의 형태학적 분화와 밀접한 관계가 있으므로 이상의 모델식을 이용하여 균체의 형태를 원하는 방향으로 분화를 유도하거나 또는 최적인 상태로 제한기질을 이용하여 제어하게 되면 CPC의 생산성을 증가시킬 수 있을 것이다. 그러므로 다음은 모델식에서의 최적조건을 찾아 이를 유가식 배양에 응용하여 CPC의 생산성을 증대시키고자 하는 시도를 하였다.

유가식 배양에의 응용

유가방식 전산기 모사를 위한 최적화 기법으로는 Dynamic Programming을 사용하였다. 유가식 배양은 크게 균체의 성장과 관련된 산물공정, 성장과 비관련된 산물공정의 두 가지로 분류된다. 균체의 성장과 관련된 산물의 공정에서는 단순히 균체의 증식을 최대화 할 수 있도록 목적함수를 설정하게 되면 이것이 곧 산물의 생산을 최대화 하게 된다. 그러나 CPC 생산공정과 같은 성장 비관련 공정에서는 일반적으로 균체의 증식단계에서 균체의 증식속도나 농도를 최대화 한 후 생산단계에서는 산물의 생산을 최대화하는 서로 다른 두 단계의 최적화 과정이 필요하다. 본 연구에서 사용한 *Cephalosporium*과 같이 균체 형태의 특성상 고점도를 야기시키는 균사를 형성하는 경우 특히 균체의 증식과정에서 나타나는 사상 균사는 고점도를 나타내게 되어 결국 배양액으로부터 균체로의 산소나 기질의 전달 등 물질전달에 제한을 가져올 뿐만 아니라 교반에 소요되는 동력의 상당한 증가를

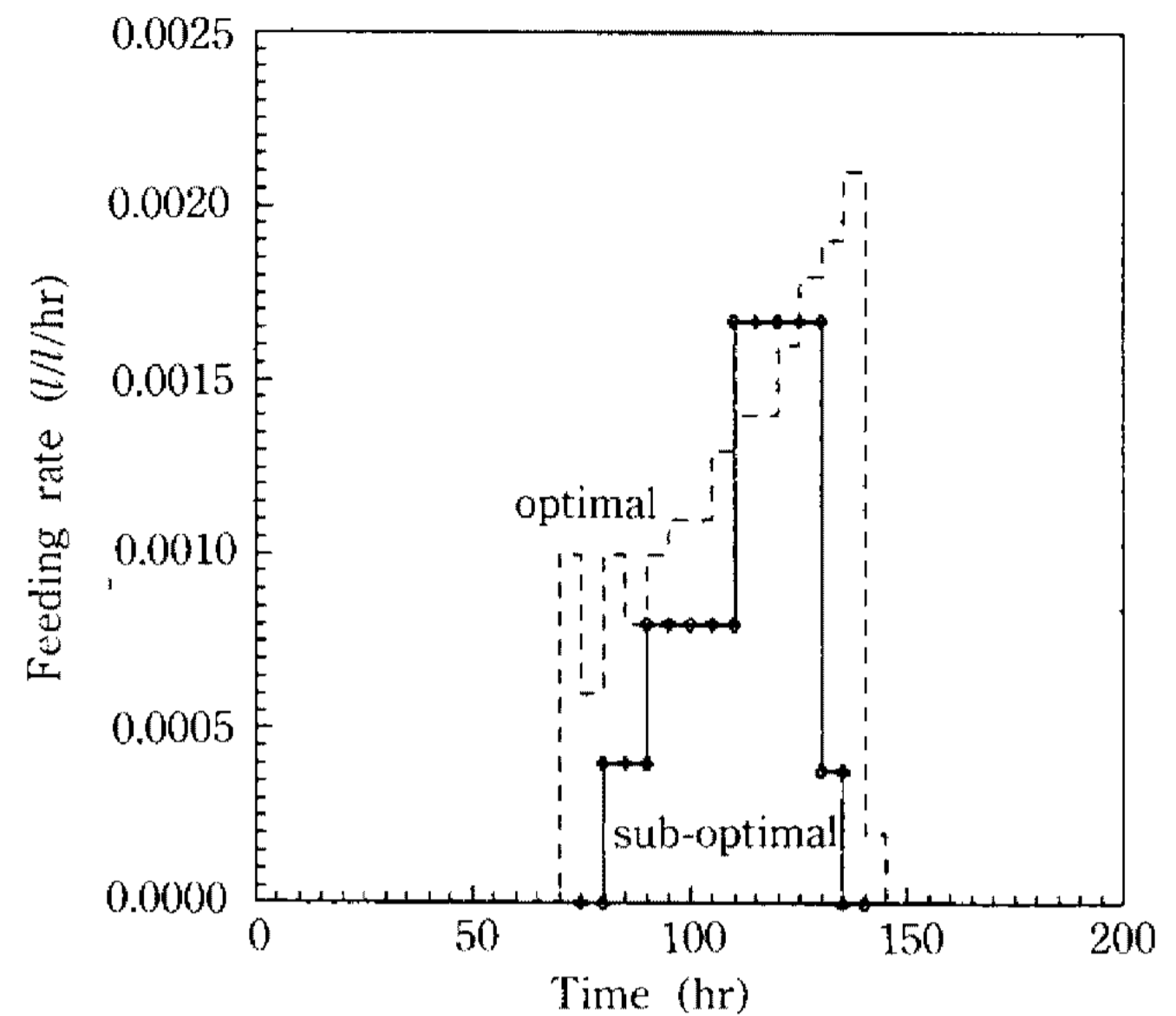


Fig. 8. Optimal and sub-optimal feeding policy ($G_i=13.5$ g/l, $M_i=5$ g/l, $G_j=300$ g/l, $M_j=25$ g/l).

가져오기 때문에 균체의 증식단계에서 무조건 증식을 최대화 할 수는 없다. 이와 같은 이유 때문에 본 연구에서는 실험에서 구한 일관성 지수(consistency index)와 균체 형태 및 농도간의 상관 관계식을 이용하여 균체 증식에 의한 점도의 최대값을 제한하도록 한 후 다음 단계로 넘어가 CPC 생산이 최대화 되도록 알고리즘을 구성하였다(37). 즉, 첫 단계에서 시간경과에 따라 균체의 농도를 최대화 할 수 있도록 주입기질의 유량을 최적화하다가 일관성지수가 일정값에 도달하게 되면 CPC의 생산을 최대화 하도록 주입기질의 양을 결정해 주게 된다.

앞서 기술한 바와 같이 모사 첫 단계에서 사상 균사의 농도가 증가하여 일관성 지수가 일정값에 도달하게 되면 둘째 단계로 CPC의 생산이 최대가 되도록 제한기질의 주입속도를 최적화하였다. 이를 위하여 초기 glucose와 methionine의 농도가 각각 13.5 g/l, 5 g/l이며 주입되는 농도의 비를 12($G_j=300$ g/l, $M_j=25$ g/l)로 고정하여 최적의 조건을 전산기 모사를 통해 찾았으며 그 결과를 직접 실험에 적용하였다. 그 결과 전산기 모사에 의한 최적의 기질 주입속도는 Fig. 8의 점선과 같이 나타났다.

그러나 일반적으로 생물공정은 미생물내의 메카니즘을 완전히 파악하기도 힘들뿐 아니라 시간 변위(time-shift), 점종 농도 및 상태에서의 오차, 시료채취에 의한 부피의 변화 등 외란에 의해 생물반응의 예견치 못한 상황이 일어날 수 있기 때문에 되먹임

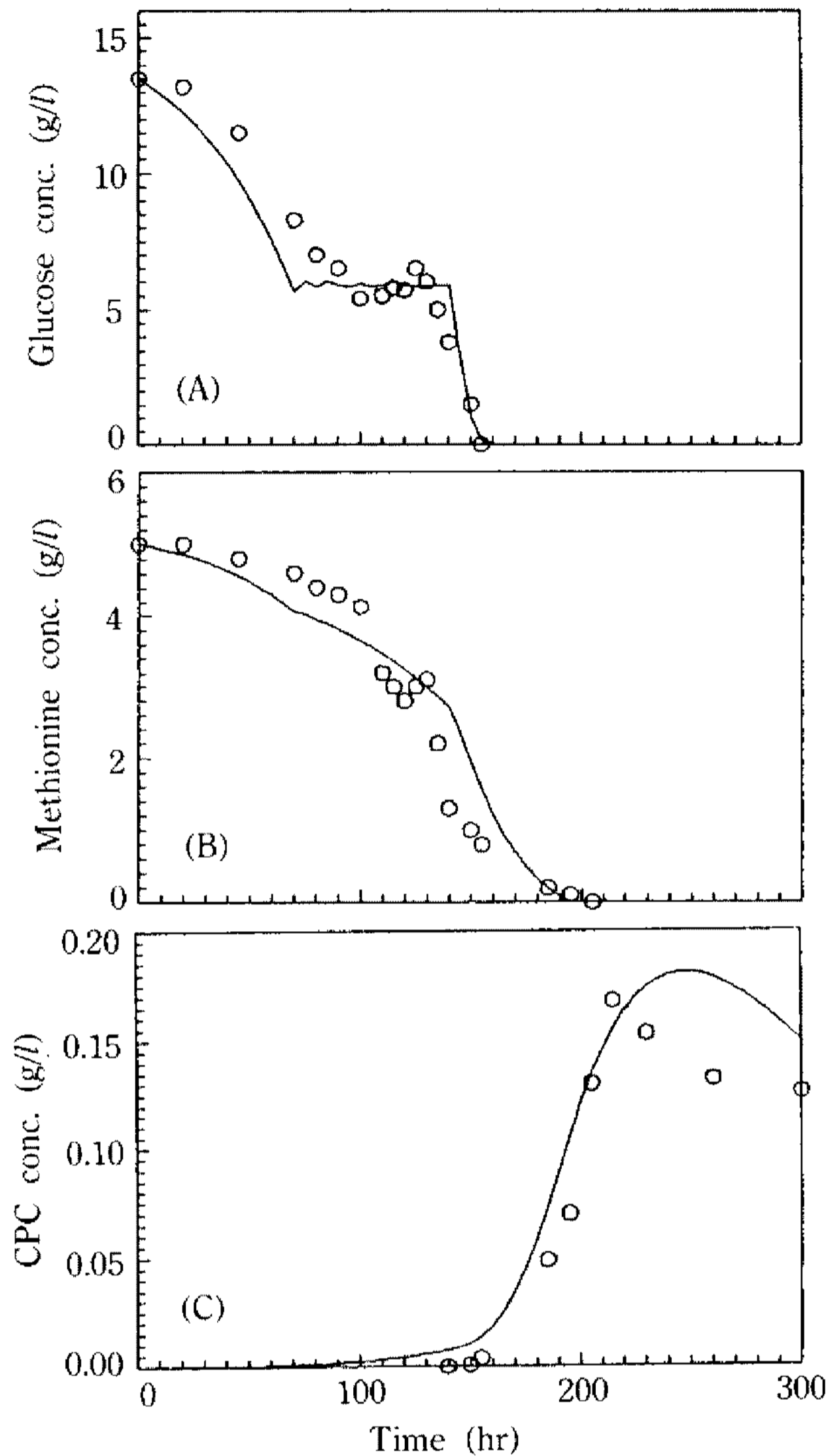


Fig. 9. Comparisons of the experimental data with simulation results in glucose concentration(A), methionine concentration(B) and cephalosporin C(C), respectively.

제어(feedback control)가 없이 시간에 따라 미리 예정된 기질의 주입 정책만으로 기질을 공급하는 순서제어(sequential control)로는 유가식 배양의 목적인 원하는 상태의 최적 배지조건을 맞출 수 없다. 그러므로 본 실험에서는 2시간 간격으로의 시료채취를 통하여 glucose의 농도를 분석하였으며 이를 이용하여 배지내 glucose의 농도를 이미 계산된 최적인 상태로 유지할 수 있도록 glucose의 농도를 제어변수로 정하였다. Peristaltic pump에 의한 수동적인 방법에 의하여 개폐식으로 기질의 주입속도를 조절하였다. 그 주입형태는 시간에 따른 평균값으로 계산하면 Fig. 8의 실선과 같이 크게 4단계로 나눌 수 있다. 이와 같은 과정을 통하여 주입된 glucose와 me-

thionine의 양은 각각 16.59 g/l, 1.38 g/l이었다. 그러므로 유가식 배양에서 소모된 glucose와 methionine의 총농도(초기농도+주입된 농도)는 각각 30.09, 6.38 g/l이었는데, 이는 최적조건에서의 회분방식에 비하여 제한기질의 농도가 각각 11.4%, 27.6%씩 증가된 것이다.

Fig. 9(A)와 Fig. 9(B)는 앞서서와 같이 glucose의 농도 조절에 의해 제어된 배지내 glucose와 methionine의 소모 형태를 전산기 모사의 결과와 비교한 것이다. Glucose의 경우 실험값과 미리 결정된 최적 농도 곡선은 잘 일치하고 있다. 한편 methionine의 경우 실험값과 최적농도의 곡선 사이에 약간의 오차는 있으나 그 경향성은 비교적 잘 따르고 있다. 그 결과 유가식 배양에서 생성된 CPC의 농도와 전산기 모사의 결과를 비교하여 Fig. 9(C)에 나타내었다. 이들 결과는 발효 초반부터 최대값에 도달할 때까지는 서로 잘 일치하고 있으나 그 이후에는 오차를 보이고 있다. 이와 같은 오차는 분화과정에서의 균체 형태별로 서로 자가분해의 정도가 다르기 때문으로 추정된다. 그러한 오차는 있으나 유가식 배양에 의한 최적화 실험을 통하여 균체의 최대농도는 회분식 배양에 비하여 11.5 g/l에서 13.5 g/l로 약 17%, CPC의 최대농도는 0.128 g/l에서 0.168 g/l로 약 33% 향상시킬 수 있었다. 이와 같이 유가식에서 CPC 농도가 증가된 원인은 제한기질의 조절에 의해 간접적으로 균체의 형태를 제어하므로써 결국 이를 바람직한 상태로 유도할 수 있었기 때문으로 판단된다. 유가식의 경우 전체적으로 회분식에 비하여 methionine은 1.38 g/l, glucose는 3.09 g/l가 더 공급되었는데 특히 glucose의 경우 총 소모량은 두 경우 모두 비슷하지만 유가식에서와 같이 기질을 공급하게 되면 CPC의 생산과 직접 관련이 있는 단행운 균사와 분절 포자의 생성속도(기율기)를 증대시킬 수 있다.

CPC의 발효에서와 같이 점도 또는 산소의 전달이 중요한 문제로 부각되는 발효에서는 물질전달에 제한을 받지 않을 정도로 최대 균체의 농도를 정하고 이로부터 임계값의 일관성 지수를 계산하면 이를 최적화의 지표로 직접 사용할 수 있다. 특히 분화가 존재하는 경우에는 본 방식에서와 같이 일관성 지수를 균체의 대표적인 형태의 함수로 결정하면 더욱 효율적인 최적화 공정이 가능하다. 한편 이와 같은 방법을 응용하면 원하는 형태의 균체 유도가 가능하다.

요 약

Cephalosporium 배양시 균체의 형태학적 측면을 고려한 cephalosporin C 생합성에 대한 모델식을 제안하였다. 제한기질로 glucose와 methionine을 고려한 double-substrate 모델을 설정하였는데 여기서 glucose는 균체의 증식 정도를, methionine은 균체의 증식속도를 제어하게 된다. Cephalosporin C의 생산은 균체의 형태학적 분화와 밀접한 관계가 있다. 한편 cephalosporin C의 생산성을 증대시키기 위해 모델식을 유가식 배양에 응용하였다. 균체 증식기에서 일단 균체의 증식을 최대로 한 후 생산기에서 cephalosporin C 생산을 최대로 할 수 있는 2단계 최적화 알고리즘을 사용하였다. 계산된 최적 주입방식에 따라 실험해 본 결과 회분식 배양에 비하여 cephalosporin C의 최대 역가를 약 33% 증가시킬 수 있었다.

사용 기호

G	: glucose concentration (g/l)
G_i	: parameter sensitivity defined by equation (22)
K	: consistency index (dynes sec ⁿ /cm ²)
K_A	: parameter in equation (6)
K_G	: saturation constant for glucose (g-glucose/l)
K_I	: inhibition constant (g-glucose/l)
K_M	: saturation constant for methionine (g-methionine/l)
k_D	: cell decay constant (hr ⁻¹)
k_P	: product decay constant (hr ⁻¹)
k_{11}, k_{21}	: parameters in equation (6) and (7), respectively (hr ⁻¹)
k_{12}	: parameter in equation (6) (g-glucose/l/hr)
k_{22}	: parameter in equation (7) (g-methionine/l/hr)
k_3	: parameter in equation (8)
k_{31}	: parameter in equation (9) (hr ⁻¹)
M	: methionine concentration (g/l)
P_i	: error summation defined by equation (17)-(22)
P_{max}	: maximum product concentration (g/l)
t	: time (hr)
X_i	: cell concentration of component i (g/l)
Y_1	: yield coefficient for glucose (g-cell/g-glucose)

cose)

Y_2 : yield coefficient for methionine (g-cell/g-methionine)

Greek letters

α'	: parameter in equation (16)
β'	: parameter in equation (16)
μ	: specific growth rate of organism (hr ⁻¹)
μ_m	: maximum specific growth rate of organism (hr ⁻¹)
ξ	: weight factor in equation (22)

Subscripts

A	: arthrospores
F	: filamentous hyphae
LS	: long swollen hyphae
SS	: short swollen hyphae

참고문헌

1. Young, T.B. and H.R. Bungay: *Biotechnol. Bioeng.*, **15**, 377 (1973)
2. Smith, J.E.: *The Filamentous Fungi*, Arnold, London, vol. 1, 79 (1975)
3. Nash, C.H. and F.M. Huber: *Appl. Microbiol.*, **22**, 6 (1971)
4. Queener, S.W. and L.F. Ellis: *Can. J. Microbiol.*, **21**, 1981 (1975)
5. Elander, R.P.: *Overproduction of Microbial Products*, FEMS Symposium, **13**, 353 (1982)
6. Megee, R.D., S. Kinoshita, A.G. Fredrickson and H.M. Tsuchiya: *Biotechnol. Bioeng.*, **12**, 771 (1970)
7. Matsumura, M., T. Imanaka, T. Yoshida and H. Taguchi: *J. Ferment. Technol.*, **59**, 115 (1981)
8. Matsumura, M., T. Imanaka, T. Yoshida and H. Taguchi: *Advances in Biotechnology*, Toronto, Pergamon Press, vol. 1, 297 (1981)
9. Chu, W.Z. and A. Constantinides: *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 277 (1988)
10. Trilli, A., V. Michelini, V. Mantovani and S.J. Pirt: *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, **27**, 219 (1977)
11. Khang, Y.H., H. Shankar and F. Senatore: *Biotechnol. Letters*, **10**, 861 (1988)
12. Kim, E.Y., Y.J. Yoo and Y.H. Park: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **17**, 611 (1988)
13. Demain, A.L. and J. Piret: *Regulation of Secondary Product and Plant Hormone Metabolism*, Pergamon Press, 183 (1979)
14. Hodgson, B.: *J. Theor. Biol.*, **30**, 111 (1970)
15. Martin, J.F. and A.L. Demain: *Microbiological Re-*

- views, **44**, 230 (1980)
16. Bu'Lock, J.D.: *The Filamentous Fungi*. Arnold, London, vol. 1, 35 (1975)
17. Smith, J.E. J.G. Anderson, S.G., Deans and D.R. Berry: *Biology of Conidial Fungi*. Academic Press, Inc., New York, vol. 2, 329 (1981)
18. Smith, J.E.: *The Filamentous Fungi*. Arnold, London, vol. 3, 214 (1978)
19. Turian, G: *Fungal Differentiation: A Contemporary Synthesis*, Marcell Dekker, New York (1983)
20. Smith, J.E.: *The Filamentous Fungi*. Edward Arnold, vol. 1, 1 (1975)
21. Bader, F.G.: *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 183 (1978)
22. Megee, R.D., J.F. Drake, A.G. Fredrickson and H.M. Tsuchiya: *Can. J. Microbiol.*, **18**, 1733 (1972)
23. Peringer, P., H. Blachere, G. Corrien and A.G. Lane: *Biotechnol. Bioeng.*, **16**, 431 (1974)
24. Bader, F.G., J.S. Meyer, A.G. Fredrickson and H. M. Tsuchiya: *Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 279 (1975)
25. Wisecarver, K.D and L.S. Fan: *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 1029 (1989)
26. Benefield, L. and F. Molz: *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 921 (1985)
27. Moser, A.: *Biotechnology*, Verlag Chemie, vol. 2, 243 (1985)
28. Ryder, D.N. and C.G. Sinclair: *Biotechnol. Bioeng.*, **14**, 787 (1972)
29. Mankad, T. and H.R. Bungay: *J. Biotechnol.*, **7**, 161 (1988)
30. Demain, A.L.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **235**, 601 (1974)
31. Matsumura, M., T. Imanaka, T. Yoshida and H. Taguchi: *J. Ferment. Technol.*, **58**, 197 (1980)
32. Smith, S. S.C. Warren, G.G.F. Newton and E.P. Abraham: *Biochem. J.*, **103**, 877 (1967)
33. Sarker, N. and H. Paulus: *Nature(London) New Biol.*, **239**, 228 (1972)
34. Calam, C.T.: *Process Development in Antibiotic Fermentations*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, 25 (1987)
35. Crueger, W. and A. Crueger: *Biotechnology*. Science Tech. Inc. 197 (1982)
36. Konecny, J., E. Felber and J. Gruner: *J. Antibiot.*, **26**, 135 (1973)
37. Kim, E.Y.: *Ph. D. Dissertation*, Seoul National University, Seoul (1991)
38. Caltrider, P.G., F.M. Huber and L.E. Day: *Appl. Microbiol.*, **16**, 1913 (1968)

(Received September 16, 1991)