

Fractal 기하학을 이용한 균사의 성장과 구체 형성의 특성 분석

류 두 현

전주대학교 이공대학 미생물학과 생물공학연구소

Analysis of Filamentous Fungal Growth and Pellets Formation by Fractal Geometry

Doo-Hyun Ryoo

Biochemical Engineering Lab., Department of Microbiology, Jeonju University, Jeonju 560-759, Korea

ABSTRACT

The morphology of fungal growth, which is an important variable for separability and rheological property of fermented medium, was quantified with fractal geometry. Fractal dimensions were determined for submerged growth of two industrially important fungi, *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*. The tendency of pellet formation was related to the fractal dimension of fungi.

서 론

균류는 항생제, 효소, 식품첨가제 등 많은 종류의 대사생성물을 생산하는데 폭넓게 사용되어왔다. 균류를 산업적으로 이용하는 경우, 균류의 입체적 형태는 매우 중요한 변수이다. 균류는 액상배지에서 성장하는 경우, 서로 군집되지 않는 균사형으로 진행되거나, 군집하여 구체(pellet)를 형성하거나, 혹은 균사 및 구체 혼합형을 형성한다. 균사체의 형태는 발효배지의 유체 특성에 영향을 주며, 산소, 이산화탄소 등의 물질전달과 발효열의 제거 등에 영향을 미친다. 균류를 산업적으로 이용할 때 요구되는 바람직한 균사의 형태는 경우에 따라 다르다. *Penicillium chrysogenum*을 이용하여 항생제를 생산하는 경우, 구체형보다는 균사형의 경우가 생산성이 높으나, 효소를 생산하는 경우는 적당한 입자가 형성되는 경우가 유리하다고 알려져 있다(13).

균류의 성장 기구를 규명하고 균류를 사용하는 생물공정을 개선하기 위하여 적합한 성장 모델을 개발

하려는 노력이 경주되었다(2, 6, 14, 17, 18, 19). 그러나 균류 형태의 복잡성 때문에 적절한 성장 model의 개발 및 적용에 어려움이 있었다. 균류 형태의 복잡성을 정량화하기 위하여 이제까지는 “균사가 길다”, 혹은 “가지가 많다” 등의 서술적 표현이 주로 사용되거나, 균사의 길이, 균사의 직경, 가지의 개수 등이 주로 사용되어 왔다(9, 14). 균류가 구체를 형성하는 경우, 균류의 유전적 인자, 성장정도, 접종량, 배지의 성질, 온도, 점도 등이 복합적으로 작용하는 것으로 알려져 있다(13). 그러나 균사 구체의 형태에 가장 큰 영향을 주는 균사의 형태와의 관계를 연구한 경우는 전무한 실정이다.

최근들어 혼돈된 자연현상을 규명하고 이를 정량적으로 수식화하기 위한 방법의 일환으로 fractal이 사용되었다. Mandelbrot에 의해 고안된 해석 기하학의 일종인 fractal은 자연계의 무질서한 혼돈현상을 해석하기 위하여 사용되어 왔다(16). 이 이론은 무기입자의 침적이나, 계층 형성, 해안선 등 지형표시, 구름의 형성, 액상계면의 확산 등의 물리현상

과 허파의 구조, 단백질의 구조 등의 생물분야에서 자연현상과 형태의 복잡성을 규명하는데 적용되었다 (16).

본 연구에서는 *Aspergillus oryzae*와 *Aspergillus niger* 두 종류의 균류에 대하여 배지의 조성과 접종량이 변화하는 경우 균사의 형태를 영상분석장치를 이용하여 획득하고, 계통적으로 fractal dimension을 계산하여 균사의 형태를 정량화하는 방법을 개발하였다. 또한, 균사의 fractal dimension과 최근들어 균사의 형태를 정량화하는데 사용하였던 변수와의 상관관계를 살펴 보았다. 균류 구체의 형성에 미치는 fractal 차원으로 표현된 균사 형태의 영향도 살펴 보았다.

재료 및 방법

균주 및 포자 제조

국립환경보건원에서 구입한 *Aspergillus oryzae* (ATCC 1003)와 *Aspergillus niger* (ATCC 9029)를 한천배지를 사용하여 30°C에서 10일간 petridish에서 성장시켜 포자를 제조하였다. 사용된 배지의 조성은 1ℓ를 기준으로 sucrose (160g), KH₂PO₄ (400mg), NH₄NO₃ (1600mg), MgSO₄·7H₂O (1200mg), FeSO₄·7H₂O (0.26mg), ZnSO₄·7H₂O (0.67mg), 한천 (1.5g)이다.

접종 및 배양

Tween 80이 첨가된 무균수 (NaCl, 0.09%)를 첨가하여 포자용액을 제조하였다. 적당히 희석한 후 hemocytometer를 사용하여 포자농도를 알아낸 후 원하는 농도의 포자용액으로 제조하였다.

300ml의 삼각 플라스크에 100ml의 배지를 넣고, 원하는 포자농도로 접종한 후, 30°C, pH 6.0, 150rpm에서 48시간 동안 진탕 배양하였다. 사용된 배지는 sucrose가 10~160g/ℓ 이고 한천이 배제된 것 이외에는 포자 제조용 배지와 동일한 조성이 사용되었다.

Morphology 관찰

Nikon Optishot-2 현미경에 Sony video recorder (CCD-55)를 장착하여 image capturing board (Video Blaster, Creative Labs, U. S. A.)를 사용하여 연결된 IBM-PC용 디지털 영상분석장치를 사용하여 640×460 해상도의 영상을 획득할 수 있도록 구성하였다. 영상획득 program (I-photo, Creative

Table 1. Conditions to capture images of mycelium and pellets.

	Mycelium	Pellet
Shutter speed	1/100sec	1/4000sec
Light source	0	4
Zoom	maximum	macro
Filter	U. V.	U. V. and yellow
Subject lenz	× 4	× 5

Labs, U. S. A.)을 사용하여 얻어진 영상을, 영상분석용 program을 사용하여 분석, 처리하였다.

여러 조건으로 예비실험을 한 결과, 균사와 구체의 모양, 구체의 크기, 분포를 관찰하기 위하여 Table 1의 조건이 가장 적합한 것으로 판명되어 이후 동일한 조건에서 실험하였다. Table 1은 균사와 균사구체의 형상을 얻기 위하여 사용된 video camera의 노출시간과 배율, 현미경 광원의 세기 및 filter의 종류, 대물렌즈의 배율을 나타낸다.

Fractal의 계산

110 grey level로 균사를 binary image (흑-백 영상)로 전환한 후, grid의 크기를 변환시키면서 균사가 통과하는 grid의 개수를 측정하는 digitizing method를 사용하여 fractal 차원을 계산하였다 (14).

분석대상을 포함하는 grid의 크기를 변화시키는 경우 분석대상을 통과하는 grid의 개수는 다음과 같은 관계를 나타낸다.

$$N(L) = \alpha L^{d-\beta} \quad (1)$$

위에서 N은 분석대상이 통과하는 일정한 크기의 grid의 개수를 나타내며, L은 grid의 한변의 길이, d는 분석하려고 하는 영상의 차원을 나타낸다. 본 실험의 경우 2차원 현미경을 사용하였으며 d값은 2이다. β는 d보다 작은 양의 상수이며, α는 비례상수이다. 지수 d-β를 다음과 같이 표시하고 일반적으로 fractal dimension (D)라고 정의한다.

$$D = d - \beta \quad (2)$$

(1)식의 양변을 로그를 취하여 다음과 같이 정리할 수 있다.

$$\log N = \log \alpha + D \log L \quad (3)$$

즉, fractal 물체의 경우, grid의 크기(L)의 log 값을 변화시키면서 분석대상을 포함하는 grid의 수(N)의 log값을 그래프로 그리면 직선으로, 그 기울기가 fractal 차원이 된다.

Fractal 계산용 program은 grid의 크기를 연속적으로 변화시키며 통과하는 grid의 개수를 자동으로 측정하도록 작성하였다. 분석하고자 하는 영상의 크기가 클수록 측정하는데 긴 시간이 소요되었으며, 350×350pixel 크기의 영상을 분석하는 경우 1분이내가 소요되었다. Fig. 1. (a), (b)와 (c)는 *Aspergillus oryzae* 균사의 fractal 차원을 계산하기 위한 영상처리 과정을 보여준다. Fig. 2는 Fig. 1의 균사에 대하여 grid의 크기와 개수의 대수값을 구한 후, 상관관계를 나타낸 것이다. 이때 대수값을 구하기 위한 grid의 크기는 mm로 환산된 값이다. 균사의 형태가 fractal의 특성을 나타내기 위하여서는 최소 grid의 크기가 균사의 직경보다 커야 한다. 따라서 균사의 평균직경인 5μ 이상의 grid의 경우에 대하여 선형회귀분석을 실시하였다. 대부분의 균사의 경우 실험 데이터의 총변동 중 회귀선에 의하여 설명되는 변동이 차지하는 비율을 나타내는 결정계수(coefficient of determination)인 R²가 0.95 이상의 좋은 상관 관계를 나타냈다.

구체의 크기 측정

구체를 포함하는 발효액을 적당히 희석한 후, petridish에 넣고 colony counter 위에 올려 놓은 후 video camera의 macro 기능을 사용하여 직접 영상을 획득하였다. Threshold를 사용하여 binary 영상으로 만들고, 전체 화면 중 검정색(grey level 0)으로 나타나 있는 부분의 면적을 계산한 후 화면에 있는 전체의 pellet 수를 이용하여 평균 직경으로 환산하는 다음 식을 이용하였다.

$$\phi = 2 \sqrt{(\text{total pellet area} / \pi)} \quad (4)$$

구체 형태의 계산

Table 1의 조건으로 얻어진 구체의 영상을 binary 영상으로 전환하였다. 구체의 roughness(r)와 compactness(c)는 각각 다음과 같이 정의된다(11).

$$r = \text{perimeter}|_{180} / \sqrt{(4\pi \text{ area}|_{180})} \quad (5)$$

$$c = \text{area}|_{130} / \text{area}|_{180} \quad (6)$$

위에서 area|₁₃₀, area|₁₈₀은 binary 영상으로 전환할 때 각각 grey level 130과 180보다 진한 것을 구

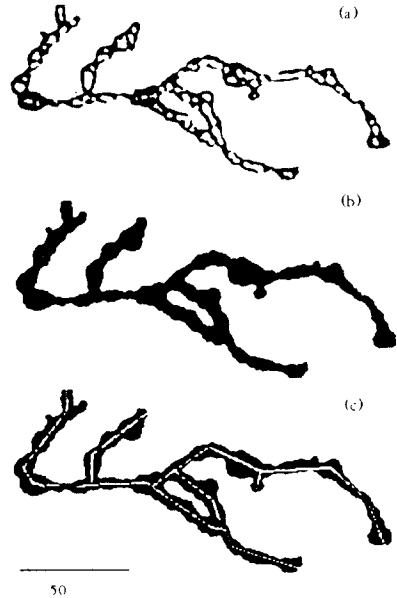


Fig. 1. Image processing procedure with *A. oryzae* mycelium; (a) Captured image of a mycelium, (b) Binary image, (c) Digitized method to obtain the total length of mycelium.

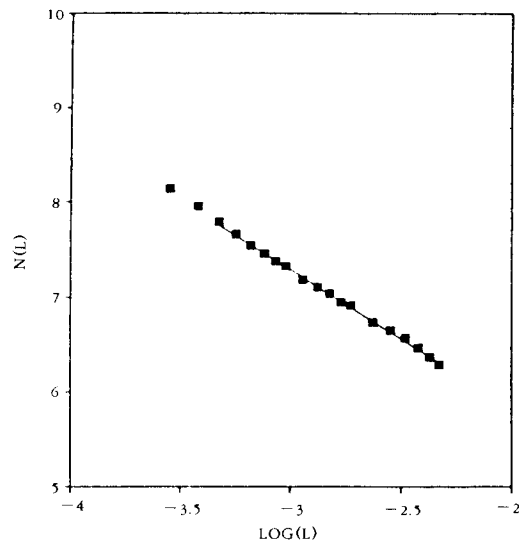


Fig. 2. Relationship between grid length (L) and grid number (N) overlapped by mycelium.

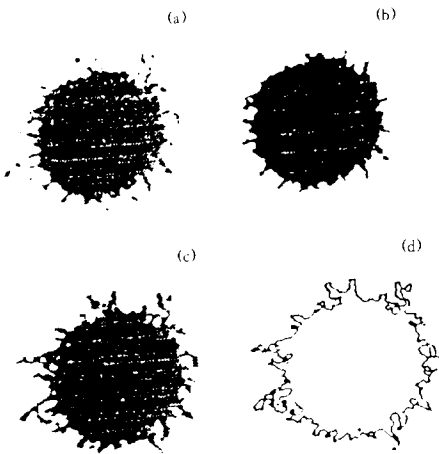


Fig. 3. Image processing with an *A. oryzae* pellet; (a) Captured image of a pellet, (b) Filtered image by grey level 130, (c) Filtered image by grey level 180, (d) Perimeter of filtered image by grey level 180.

체 영역으로 간주하였음을 의미하고, $\text{perimeter}|_{180}$ 은 grey level 180보다는 진한 것을 구체로 간주한 경우 구체의 경계면의 길이를 나타낸다. Roughness는 완전한 구체의 경우 그 값이 1이고 굴곡이 있는 복잡한 구체의 경우 큰 값을 갖는다. Compactness는 구체가 얼마나 조밀하게 구성되어 있느냐를 나타내는 상대적 척도이며, 구체 중 세포가 밀집되어 진하게 나타나는 부분(grey level 130)에 비하여 군사가 존재한다고 판단된 전체의 영역(grey level 180)의 비율이 클수록 구체가 엉성하게 구성되어 있음을 나타낸다.

Fig. 3 (a)는 구체의 원래 영상을 나타내고, (b)와 (c)는 130, 180 grey level로 구체를 filtering한 영상의 변화를 나타낸다. Filtering에는 threshold 방식이 사용되었다. 일정한 grey level로 threshold하는 경우, 지정된 영상 중 grey level보다 밝기가 어두운 부분 (grey level이 적거나 같은 부분)을 제외한 나머지 부분이 제거된다. 130으로 threshold한 경우 180으로 threshold한 경우보다 세포의 밀도가 높은 부분만을 구체로 간주하게 됨을 알 수 있다.

결과 및 고찰

발효조건에 따른 Fractal의 변화

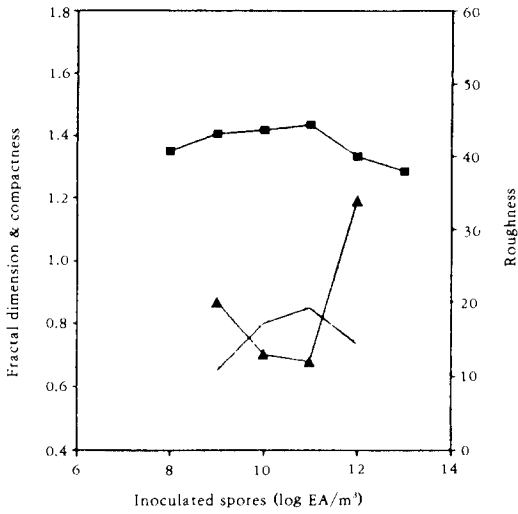
Aspergillus oryzae, *Aspergillus niger* 두 경우에 대하여, Fig. 4(a), (c)와 같이 접종포자의 수를 $10^8 \sim 10^{13}$ EA/m³ 변화시키는 경우 군사의 fractal 차원의 영향을 조사하였다. *A. niger*의 경우 10^{13} EA/m³의 고농도로 포자로 접종하는 경우 구체가 형성되지 않았고, 1.2 정도의 낮은 fractal 차원을 나타내었다. 즉, 군사의 형태가 단순하고 가지의 수가 적은 길쭉한 형태의 군사가 형성되었다. 접종포자의 농도를 낮춤에 따라 fractal 차원은 초기에는 증가하다가 매우 낮은 접종농도(10^9 EA/m³ 이상)에서는 다시 감소하였다. *A. oryzae*의 경우 10^{13} EA/m³의 포자 농도에서도 매우 작은 구체가 형성되는 것을 살펴볼 때 구체가 형성되지 않는 접종포자의 농도는 10^{13} EA/m³보다 약간 큰 것으로 판단된다. 그러나 *A. niger*의 경우와 같이 접종포자의 농도를 낮춤에 따라 fractal 차원이 증가하다가 낮은 포자의 농도에서 다시 감소함을 알 수 있었다.

지난 몇 년 동안 접종 포자농도, 탄소원의 농도, pH 등 생리학적 조건과 교반속도, 온도 등 공정변수의 변화에 따른 군사의 형태 변화를 관찰하기 위한 연구가 수행되어 왔다(1, 12, 14, 17, 18, 19, 20). 이러한 연구에서는 군사의 형태를 정량화하기 위하여 가지의 수, 총 군사의 길이, 평균 군사의 길이, 평균 군사의 직경 등의 새로운 변수들이 고안되어 사용되었다. 그러나 이와 같은 변수들은 군사 형태의 대체적인 모양을 설명하는데는 부족하나마 사용될 수 있었으나, 생리 및 공정변수의 변화에 따른 군사 형태의 변화를 정량화하는 데에는 적당하지 않았다. Fractal 차원은 여러 조건의 군사 형태에 대한 영향을 적절히 표현할 수 있어, 군사를 이용하는 공정의 개발 및 최적화에 긴요하게 사용될 수 있으리라 판단된다.

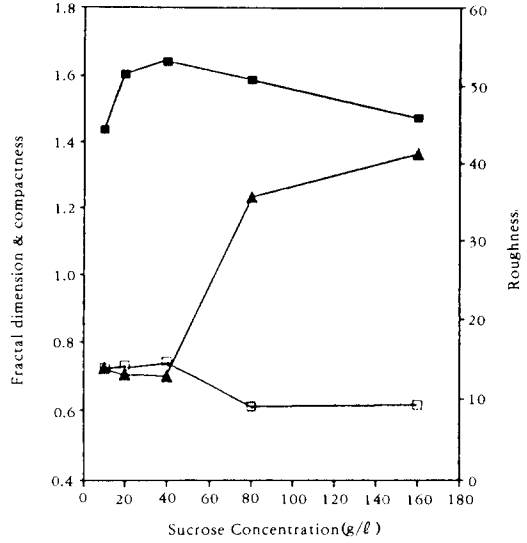
Fig. 4(b)에서 나타난 바와 같이 *A. oryzae*에서, 10^{12} EA/m³의 일정한 초기 포자의 농도에서 sucrose의 농도를 10g/l ~ 160g/l로 변화시키는 경우 농도가 증가함에 따라 군사의 fractal 차원이 증가하다가 감소하였다. 반면, *A. niger*의 경우는 경향이 뚜렷하지 않았다(Fig. 4(d)).

발효조건에 따른 구체 형태의 변화

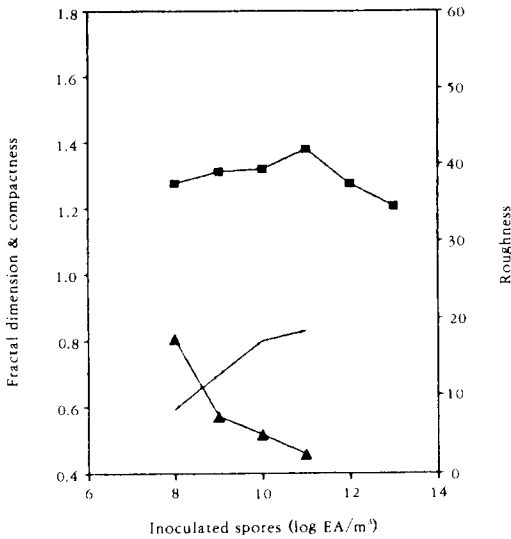
*A. niger*의 경우 접종포자의 농도가 10^{13} EA/m³ 이상의 경우 구체가 형성되지 않았다. 접종포자의 농도가 감소함에 따라 구체가 형성되며, 구체의 평균 직경이 점점 증가하였다(Fig. 5). 두 종류 모두 초기 접종포자의 농도가 10^9 EA/m³ 이하인 경우 군



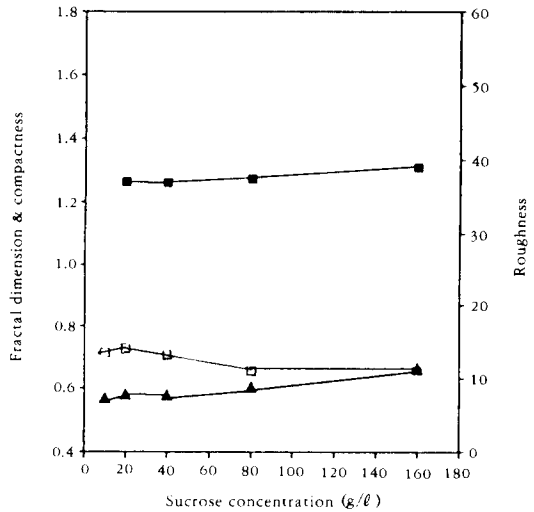
(a)



(b)



(c)



(d)

Fig. 4. Relationship between fractal dimensions and morphology of mycelial pellet; (a) *A. oryzae* at different inoculations and 80g/l of sucrose concentration, (b) *A. oryzae* at different sucrose concentrations and 10¹² EA/m³ of inoculation, (c) *A. niger* at different inoculations and 80g/l of sucrose concentration, (d) *A. niger* at different sucrose concentrations and 10¹² EA/m³ of inoculation. (■), (▲) and (□) are for fractal, roughness and compactness, respectively.

체의 평균 직경이 2mm 이상까지 되었다. 앞에서 설명한 바와 같이 *A. oryzae*의 경우는 구체를 형성하기 시작하는 접종포자농도가 10¹³ EA/m³

보다 더 큰 것으로 판단된다. 두 종류의 균류 모두의 경우 fractal 차원이 증가함에 따라 구체의 compactness는 증가함을 보였다. 즉, 균사의 가지가 많

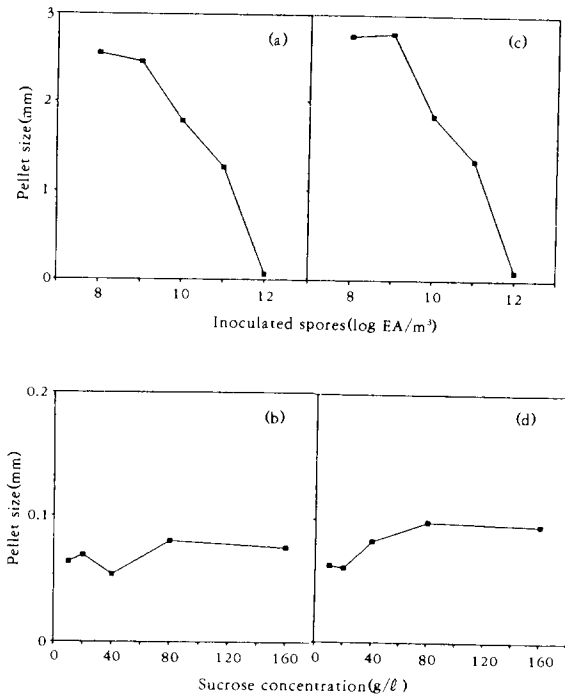


Fig. 5. Variation of average pellet size; (a) *A. oryzae* at different inoculations, (b) *A. oryzae* at different sucrose concentrations, (c) *A. niger* at different inoculations and (d) *A. niger* at different sucrose concentrations.

고, 복잡하게 생긴 큰 fractal 차원을 갖는 균사의 경우 더 밀집된 구체를 형성함을 나타낸다.

이러한 결과는 높은 fractal 차원을 갖는 균사가 균사 자체의 물리적인 입체장애에 기인하여 엉성한 구체를 형성하리라는 일반적인 추측에 상반되는 결과이다. 그러나 이와 같은 현상은 균사의 구체가 하나의 포자가 발아하여 성장하여 형성되지 않고, 여러 포자에 의해 형성된 균사가 서로 엉키어 형성됨을 반증한다. 만약 하나의 균사 구체가 하나의 포자의 발아로 생성되었다면 균사의 fractal 차원이 증가할수록 즉, 가지가 많고 복잡한 형태의 균사일수록 더 엉성한 구체를 형성하여야 하기 때문에 compactness가 감소하여야 한다. 따라서 균사 구체의 형성에는 여러 균사의 상호 엉킴 기전이 크게 작용함을 알 수 있다. 두 종류의 균류 모두의 경우, 구체는 단일 포자에 의해 형성되지 않고 여러 포자에서 발아된 균사의 상호작용으로 형성됨을 나타낸다. 이제까

지 균체로 이루어진 구체의 형성 과정에 대하여 단일 포자에서 발아하여 생성되는 기구 (non-coagulative type)와 여러 포자에서 발아한 후 균사간에 응집하거나 엉키어 생성되는 기구 (coagulative type), 또는 앞의 두 가지의 복합적인 작용 등으로 추측되었다 (13, 15). 이러한 구체의 형성 기구는 균사의 종류에 의하여 결정된다고 설명되어 왔다. 그러나 위에서 살펴 본 바와 같이, 동일한 종류의 균류도 여러 변수의 변화에 따라 구체의 형성 기구가 달라짐을 알 수 있다. 이와 같이 균사의 fractal 차원과 구체의 compactness는 구체의 형성 기구를 밝히는 데 정량적인 기준이 될 수 있다.

한편 fractal 차원이 증가하면 구체의 roughness가 감소한다. 즉, 균사의 fractal의 차원이 감소할수록 균사의 생김새가 단순해지고 길쭉해져 균사가 서로 잘 엉키지 않고 구체의 외부 부분에 구체를 형성하는 균사의 일부분이 돌출하여 구체의 roughness는 증가한다.

요 약

균류를 이용하는 생물공정의 생산성, 분리성, 유변학적 성질에 영향을 미치는 중요한 변수인 균류의 형태를 fractal 차원을 사용하여 정량화하였다. 산업적으로 중요한 균류인 *Aspergillus oryzae*와 *Aspergillus niger*가 초기의 접종 포자량과 탄소원의 농도를 변화시켜 액상배지에서 성장하는 경우, 디지털 영상 분석장치를 사용하여 fractal 차원을 계산하였다. 균사가 형성하는 구체의 특성과 fractal로 표현된 균사의 형태와의 상관관계를 구하였다. 일반적으로 낮은 fractal 차원의 균사가 낮은 밀도(compactness)의 구체를 형성하고 외부의 모양이 불규칙적이었다.

감 사

이 논문은 1992년도 교육부지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구비에 의하여 연구되었습니다. 또한 전주대학교 유전공학연구소 연구비에서 일부 지원을 받았습니다. 아울러 실험을 도와준 최창선 군에게 사의를 표합니다.

참고 문헌

1. H. L. Adams and C. T. Thomas (1988), *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 707.

2. M. Aynsley, A. C. Ward and A. R. Wright (1990), *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, 820.
3. D. E. Brown and M. A. Zainudeen (1978), *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 1045.
4. J. Buchs, N. Mozes, C. Wandrey and P. G. Rouxhet (1988), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **29**, 119.
5. G. S. Byrne and O. P. Ward (1989), *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 912.
6. I. Y. Caldwell and A. P. J. Trinci (1973), *Arch. Microbiol.*, **88**, 1.
7. P. G. Huls, N. Nanninga, E. A. van Spronsen, J. A. C. Valkenburg, N. O. E. Vischer and C. L. Woldringh (1992), *Biotechnol. Bioeng.*, **39**, 343.
8. P. Meakin (1986), *J. Theor. Biol.*, **118**, 101.
9. B. Metz, E. W. de Bruijn and J. C. van Suijdam (1981), *Biothechnol. Bioeng.*, **23**, 149.
10. M. Obert, P. Pfeifer and M. Sernetz (1990), *J. Bacteriol.*, **172**, 3, 1180.
11. E. Olsvik, K. G. Tucker, C. R. Thomas and B. Kristiansen (1993), *Biotechnol. Bioeng.*, **42**, 1046.
12. H. L. Packer and C. R. Thomas (1990), *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, 870.
13. U. Reichl, R. King and E. D. Gilles (1992), *Biotechnol. Bioeng.*, **39**, 164.
14. A. P. J. Trinci (1974), *General. Microbiol.*, **81**, 225.
15. S. E. Vecht-Lifshitz, S. Magdassi and S. Braun (1990), *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, 890.
16. T. Vicsek (1989), *Fractal Growth Phenomena*. World Scientific Publishing Co. Singapore.
17. G. Viniegra-Gonzalez, G. Saucedo-Castaneda, F. Lopez and E. Favela-Torres (1993), *Biotechnol. Bioeng.*, **42**, 1.
18. H. Yang, R. King, U. Reichl and E. D. Gilles (1992), *Biotechnol. Bioeng.*, **39**, 49.
19. H. Yang, U. Reichl, R. King and E. D. Gilles (1992), *Biotechnol. Bioeng.*, **39**, 44.
20. M. G. Wiebe, A. P. J. Trinci (1991), *Biotechnol. Bioeng.*, **38**, 75.