

곰팡이 유지 생산에 관한 연구
(제 4 보) 배양조건이 *Mucor plumbeus*의 유지
생산에 미치는 영향에 대하여

유진영 · 이형춘 · 신동화 · 서기봉
농어촌개발공사 식품연구소
(1981년 12월 28일 수리)

Production of Fungal Lipid
(Part IV) Effect of Cultural Conditions on the Growth and Lipid
Accumulation of *Mucor plumbeus*

Jin Young Yoo, Hyeong Choon Lee, Dong Hwa Shin and Kee Bong Suh

Food Research Institute, Agriculture and Fishery Development Corporation,
Banwool, Hwaseong-gun, Kyonggi-do, 170-31

(Received December 28, 1981)

Abstract

The cultural conditions of *Mucor plumbeus* FRI 0007 were investigated for the maximum production of felt and lipid. It was found that the lower the pH and the higher the incubation temperature, the higher accumulation of the felt and lipid. Shake culture rendered higher lipid accumulation and lower felt accumulation than static culture. Maximum production of felt and lipid content were 47.8 g/l and 50.73%, respectively, when the organisms were static-cultured at a temperature of 37 °C and pH of 3.5 for 25 days.

Iatroscan thinchromographic analysis showed that the higher amount of triglyceride was obtained when static-cultured at a low pH. Fatty acid composition of the microbial lipid was affected by the incubation temperature, types of nitrogen source and speed of agitation: lower degree of saturation was observed as the incubation temperature decreased and the speed of agitation increased. Fatty acids of monoglyceride and diglyceride were mainly palmitic and oleic acids and those of triglycerides were mainly palmitic, oleic acids.

서 론

미생물을 이용한 지방질의 생산은 사용된 기질의 농도⁽¹⁾ 및 종류⁽²⁾ 뿐만 아니라 배양조건^(3,4)에 의해서도 영향을 받는다고 한다. 저자들은 전보^(5,6)에 이어 온도, pH 및 진탕배양 등 배양 조건을 달리하여 *Mucor plumbeus*를 배양한 후 이때의 균체 및 지방질의 생산, 생산된 지방질

의 구성, 지방산의 조성을 확인하여 이들의 영향을 조사하여 보고하는 바이다.

재료 및 방법

시험 균주

본 연구에 사용한 균주는 저자등이 분리 동정⁽⁵⁾

한 *Mucor plumbeus* FRI 0007을 사용하였다.

균체의 회수, 건조 및 지방질의 분석

사용배지 및 배양

전보^(5,6)에 준하여 실시하였다.

배지는 탄소원으로 가용성 전분(Wako 1급), 질소원으로는 NaNO₃, MgNO₃, (NH₂)₂CO, CH₃COO NH₄를, 무기질로는 ZnSO₄·7H₂O, FeCl₃·6H₂O, K₂SO₄, MgSO₄, NaH₂PO₄·2H₂O를 조합하여 사용하였다. 이 때 pH를 3.5에서 8.0까지 조절하여 250ml 삼각플라스크에 분주하고 10 psi에서 10분살균한 후 균을 접종, 배양하여 pH의 영향을 조사하였으며, 균체의 접종량을 배지 50ml당 1 spatula (φ 5mm) 및 포지수를 10³~10⁷ 되게 접종하여 접종량의 영향을, 온도는 25°C, 30°C, 37°C, 45°C에서 배양하여 온도의 영향을 조사하였으며 배양기간은 15일 또는 25일로 하였다. 진탕배양은 50~100rpm에서 행하여 그 효과를 조사하였다.

결과 및 고찰

배양온도의 영향

배양온도가 *Mucor plumbeus* FRI 0007의 균체생산 및 지방질의 축적에 미치는 영향을 조사하기 위하여 전분배지에 접종하고 온도별로 25일간 배양한 결과물(Table 1)에 나타내었다. 본 연구의 결과를 볼때 균체량은 25°C에서 1.92g/50ml이던 것이 온도가 상승됨에 따라 증가되어 37°C에서는 2.39g/50ml로 되었다. 지방질의 경우도 같은 경향을 보여 25°C일 때 34.99%이던 것이 37°C에서는 50.73%로 증가되었는데, 이와 같이 균체량과 지방함량이 온도의 상승에 따라

Table 1. Influence of Incubation Temperature on the Felt and Lipid Accumulation by *Mucor plumbeus* FRI 0007 Incubated at 37°C for 25 Days.

Temp.	Felt wt. (g) ^a	Lipid(%) ^b	Final pH
25°C	1.92±0.08	34.99±2.20	3.97
30°C	2.13±0.08	34.79±2.11	3.98
37°C	2.39±0.08	50.73±2.24	3.51

a. Dry weight per 50ml of medium

b. Extracted by soxhlet for 16 hours

Basal medium : Starch 210 g, zinc sulfate 0.05 g, ferric chloride 0.16 g, potassium sulfate 0.44 g, magnesium sulfate 5g, and sodium dihydrogen phosphate 7.3g per liter, pH 3. 5.

Medium : Basal medium plus 2.14g of urea.

Table 2. Fatty Acid Composition of Lipid Produced by *Mucor plumbeus* FRI 0007 Incubated for 25 Days as a Function of Incubation Temperature.

Temp.	C 14:0	C 14:1	C 16:0	C 16:1	C 18:0	C 18:1	C 18:2	C 18:3	Sat'd
25°C	0.4 ^a	0.4	23.3	3.8	1.8	49.7	16.9	3.7	25.1
30°C	0.6	0.4	22.3	3.7	1.8	47.9	18.0	5.3	24.1
37°C	0.7	0.4	23.1	2.5	1.2	44.9	21.3	6.1	24.3
45°C	1.1	0.5	27.7	1.8	1.4	42.2	21.9	3.3	29.1

a. Area percentage

Medium is the same as table 1.

증가되는 것은 *Rhizopus arrhizus*⁽⁷⁾, *Saccharomyces cerevisiae*,⁽³⁾ *Rhodotorula gracilis*⁽⁸⁾ 에서의 결과와 비슷한 경향이나 온도의 상승에 따라 지방질의 축적이 적어진다는 보고^(3,9,10,11)도 있어 이와 같은 균체량과 지방질의 함량 변화는 균종마다의 생육에 적당한 온도가 있어서 온도를 변화시킬 때 이에 적응하기 위하여 균체성분이 변화⁽¹²⁾함으로서 생긴 것이라고 생각된다.

배양온도가 지방질의 지방산조성에 미치는 영향을 조사하여 (Table-2)에 나타내었다. 본 실험의 결과를 보면 지방질의 포화도는 25°C 일때 25.1 이던 것이 45°C 일때 29.1로 증가되었다. 이와 같은 결과는 배양온도가 지방질의 포화도에 영향을 주어 배양온도가 증가됨에 따라 포화도가 증가되는 *Candida sp*^(10,13), *Mucor pusillus*,⁽¹⁴⁾ *Saccharomyces cerevisiae*⁽¹⁵⁾와는 비슷한 경향이나 온도가 낮을수록 포화도가 증가된다는 Pearson등⁽¹⁶⁾의 보고 및 온도에 따른 변화가 없다는 *Staphylococcus aureus*⁽¹⁷⁾, *Bifidobacterium. sp*⁽¹⁸⁾ *Lactobacillus sp*⁽¹⁸⁾에 대한 결과와는 상이한 경향이다. 지방산의 조성을 보면 배양온도가 증가됨에 따라 팔미트산, 리놀레산

의 함량은 증가하고, 팔미톨레산, 스테아르산, 올레산의 함량은 감소하여서 Gerasiomova등⁽⁴⁾의 *Blakeslea trispora* 및 *Cunninghamella elegans*에 대한 결과와는 상이한 점이 있으나 올레산이 증가된다는 점에서 Gunasekaran등⁽⁷⁾의 결과와 비슷한 경향이다.

질소원의 영향

질소원으로 NaNO₃를 4.77g, MgNO₃를 9.15g, (NH₂)₂CO를 2.14g, CH₃COO NH₄를 5.5g 각각 사용하여 이들이 균체지방산의 조성에 미치는 영향을 조사하여 (Table 3)에 나타내었다. 본 실험의 결과를 볼때 질소원의 영향이 나타나서 팔미트산, 팔미톨레산, 스테아르산은 MgNO₃를 사용한 배지에서, 올레산은 CH₃COO NH₄ 배지에서, 리놀레산과 리놀덴산은(NH₂)₂CO 배지에서 가장 함량이 많은 것으로 나타내었다. 이와 같은 것은 *Penicillium crustosum*, *Aspergillils niger* 및 *Fusarium oxysporium*에 대한 Bhatia 등^(19,20)의 보고와 같이 질소원의 종류에 따라 균체지방산의 조성이 변화함을 나타내주는 결과이다.

Table 3. Influences of Nitrogen Sources on the Fatty Acid Composition of Lipid Produced by *Mucor plumbeus* FRI 0007 Incubated at 37°C for 25 Days.

Medium ^a	C14:0	C14:1	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
NaNO ₃	0.6 ^b	0.6	23.0	2.9	2.1	47.0	19.1	4.8
MgNO ₃	0.8	0.4	25.6	3.3	3.3	45.0	18.4	3.2
(NH ₂) ₂ CO	0.7	0.4	23.1	2.5	1.2	44.9	21.3	6.1
CH ₃ COONH ₄	0.6	0.4	21.6	2.9	2.0	49.9	19.1	3.3

a. Basal medium is the same as shown in table 1.

b. Area percentage.

Table 4. Fatty acid Composition of Constituent Lipid Class of Lipid Produced by *Mucor plumbeus* FRI 0007 Incubated at 37°C for 25 Days.

Lipid class	C 14:0	C 14:1	C 16:0	C 16:1	C 18:0	C 18:1	C 18:2	C 18:3	Sat'd
Monoglyceride	trace	trace	51.9 ^a	2.5	18.3	28.2	—	—	70.2
Diglyceride	2.9	1.1	41.8	3.7	4.2	46.2	—	—	48.9
Triglyceride	0.8	0.5	29.0	5.2	2.4	50.0	11.2	0.8	32.2

a. Area percentage

Medium contains the same chemicals as table 1 except 0.24g FeCl₃·6H₂O

지방질에 있는 글리세리드의 지방산 조성

Mucor plumbeus FRI 0007이 생산하는 지방질을 TLC에 의해 분리한후 분리된 글리세리드의 지방산 조성을 조사하였다(Table 4). *Mucor plumbeus* FRI 0007의 경우 모노-글리세리드는 주로 팔미트산(51.9%), 스테아르산(18.3%), 올레산(28.2%)으로 구성되어 있으며, 디-글리세리드는 팔미트산(41.8%)과 올레산(46.2%)으로, 트리-글리세리드는 팔미트산(29%), 올레산(50%), 리놀레산(11.2%)으로 구성되어 있었다. 또 그 함량을 볼때 팔미트산, 스테아르산과 같은 포화지방산은모노->디->트리-글리세리드의 순으로 모노-글리세리드에 많았고 올레

산, 리놀레산과 같은 불포화 지방산은 반대로 트리-글리세리드에 많은 것으로 나타났다. 이와 같은 결과를 볼때 *Mucor plumbeus* FRI 0007의 글리세리드를 구성하고 있는 지방산 조성은 그 종류와 함량을 볼때 Gunasekaran등²¹⁾이 보고한 *Rhizopus arrhizus*, Bhatia등²²⁾이 보고한 *Phythium irregulare*, 및 Yokoyama등²³⁾이 보고한 *Candida sp*의 triglyceride를 구성하는 지방산 패턴과는 매우 다른 경향을 보여주었다.

pH의 영향

pH가 *Mucor plumbeus* FRI 0007의 균체생산 및 지방질의 축적에 미치는 영향을 검토한 결

Table 5. Effect of pH of Medium on Felt and Lipid Accumulation by *Mucor plumbeus* FRI 0007 Incubated at 37°C for 25 Days

pH	Felt wt. (g) ^a	Lipid (%) ^b
3.5	2.58±0.17	48.00
4.0	2.22±0.06	53.60
5.0	2.30±0.06	37.03
6.0	2.28±0.12	32.40
7.5	1.96±0.06	32.50
8.0	1.86±0.02	31.90

a and b. see footnote on table 1.

Medium contains starch 210g, urea 2.14g, MgSO₄ 5g per liter. pH 3. 5.

Table 6. Effect of pH on the Lipid Class Composition of Lipid Produced by *Mucor plumbeus* FRI 0007 Incubated at 37°C for 25 Days.

pH	PL	MG	FS	FFA	TG
3.5	9.3±1.1 ^a	trace	11.4±0.6	14.0±1.3	65.4±1.0
4.0	9.3±1.5	trace	11.0±0.6	18.0±2.9	61.6±1.6
5.0	9.6±1.1	0.2±0.1	11.1±2.0	21.5±5.3	57.7±3.7
6.0	10.6±2.9	0.4±0.2	12.4±2.4	18.5±0.8	58.9±3.0
7.5	14.2±2.3	0.2±0.0	14.0±1.3	33.6±2.4	38.0±3.1
8.0	9.3±2.8	0.3±1.8	15.5±1.8	37.3±1.8	37.6±2.2

a. Weight percentage.

Medium is the same as table 5.

PL : Polar lipid MG : Monoglyceride FS : Free sterol
 FFA : Free fatty acid TG : Triglyceride

과는 (Table 5)와 같다. 즉 pH3.5~8.0의 범위 내에서 pH가 낮아짐에 따라 균체량이 증가되어 25일 배양했을 경우 pH 3.5에서 2.58g/50ml로서 최대이였으며 지방질의 함량은 pH4.0에서 53.6%으로 최대이고 pH3.5일 때 48.0%로서 지방질의 함량은 pH가 낮아짐에 따라 증가하는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 pH가 균체 지방질의 생성에 있어서 큰 요인이 되지 않는다는 Lockwood등⁽²⁴⁾의 보고와는 달리 pH가 영향을 주며 각 균종의 적정 pH는 *Fusarium oxysporium*의 경우 pH5.5일 때 최대 지방축적율을 보인다는 보고⁽²⁰⁾와 같이 각 균종에 따라 다르며,⁽²⁵⁾ *Mucor plumbeus*의 경우 *Rhodotarla gracilis*⁽²⁶⁾의 경우와 같이 pH가 낮을수록 지방질 함량이 증가됨을 나타내 주는 것이다. 또 pH가 지방질의 구성에 미치는 영향을 조사한 결과는 (Table 6)과 같다. 즉 모노-글리세리드와 유리스테롤은 pH가 낮아짐에 따라 감소하여 B-hatia등⁽²⁰⁾이 보고한 *Fusarium oxysporium*의 결과와 비슷한 경향이나 유리지방산은 pH8.0일 때 37.3%이던 것이 pH3.5일 때 14.0%로 감소하였고 트리-글리세리드는 pH8.0일 때 37.6%이던

것이 pH3.5일 때 65.4%로 증가된 반면 극성지방질은 pH6.0-7.5에서 그 함량이 가장 높았다.

진탕의 효과

진탕배양이 균체생산, 지방질구성 및 지방산 조성에 미치는 영향을 조사한 결과는 (Table 7~9)와 같다. 본 실험의 결과를 보면 *Mucor plumbeus* FRI 0007의 경우 균체량은 15일 정지배양했을 때 2.00g/50ml로서 진탕배양의 경우보다 많은 경향으로 *Aspergillus fischeri*⁽²⁷⁾ 및 *Rhodotorula gracilis*⁽²⁸⁾의 경우 진탕에 의해 균체의 증식을 촉진시킬 수 있다는 보고와는 상반된 것이다. 지방질의 경우는 진탕배양을 했을 때 오히려 그 함량이 높아서 75rpm일 때 60.3%로 Allen등⁽²⁸⁾의 보고와 비슷한 경향이다. 지방질의 구성을 보면 (Table 8)에서와 같이 유리지방산과 유리스테롤의 경우 진탕기의 회전속도가 증가됨에 따라 감소되고, (Table 9)를 보면 팔미트산의 함량은 감소했으나 스테아르산, 올레산, 리놀렌산은 증가하며 리놀렌산은 거의 일정하였으며 지방질의 포화도는 감소되

Table 7. Effect of Agitation on the Felt and Lipid Accumulation by *Mucor plumbeus* FRI 0007 Incubated at 37°C for 15 Days.

Rpm	Felt wt. (g) ^a	Lipid (%) ^b
Static	2.00±0.35	49.10
50	1.41±0.09	55.20
75	1.24±0.14	60.30

a and b. See footnote on table 1.

Medium is the same as table 5.

Table 8. Effect of Agitation on Lipid Class Composition of Lipid Produced by *Mucor plumbeus* FRI 0007 Incubated at 37°C for 15 Days.

Rpm	PL	MG	FS	FFA	TG
Static	9.4±1.9 ^a	0.3±0.2	19.3±7.9	25.7±1.4	45.2±6.5
50	4.0±1.6	trace	13.4±0.5	27.1±1.7	55.5±2.2
75	7.0±1.0	trace	6.9±1.4	11.8±1.8	74.3±2.0

a. Weight percentage.

Medium is the same as table 5.

는 경향을 보여 통기가 지방질에는 영향을 주지 않는다는 Kleinzeller²⁹⁾와 Starkey³⁰⁾의 보고와는 다른 경향이었다.

접종량의 영향

균체의 접종방법 및 접종량이 균체의 생산에 미치는 영향을 조사한 결과는 (Table 10)과 같다. 즉 포자의 현탁액을 사용한 경우엔 서로 큰 차이를 보이지 않았으며 다만 spatula로 균체를 직접 접종한 경우가 2.58 g/50ml로서 가장 많은 균체생산을 보여 주었다.

요 약

Mucor plumbeus FRI 0007 균주의 배양조건에 따른 균체생산량 및 지방질의 생산량을 검토한 결과 온도는 37°C, pH3.5에서 정지배양하는

것이 최적조건이며, 25일간 배양했을때 균체량은 2.39g/50 ml, 지방질의 함량은 50.73% 이었다. 균체량과 지방질의 함량은 온도가 증가할수록, pH가 낮을수록 증가하였으나 진탕배양의 경우 균체량은 감소하나 지방질의 함량은 증가되었다. 트리-글리세리드의 함량은 pH가 낮을 때, 그리고 진탕배양을 했을때 그 함량이 높았다. 지방산의 조성은 온도, 질소원의 종류 및 진탕에 의한 영향을 받았으며 온도가 낮을때 그리고 진탕을 했을때 포화도가 낮았다. 지방질을 구성하고 있는 모노-글리세리드와 디-글리세리드는 팔미트산과 올레산으로 트리-글리세리드는 주로 팔미트산, 올레산 및 리놀레산으로 결합되어 있으며 포화도는 모노-글리세리드가 가장 높았다.

Table 9. The Effect of Agitation on the Fatty Acid Composition of Lipid Produced by *Mucor plumbeus* FRI 0007 Incubated at 37°C for 15 Days.

Fatty acid	Static	50 rpm	75 rpm	100 rpm
C 14:0	1.1 ^a	0.7	0.5	0.7
C 16:0	30.8	31.2	28.4	25.3
C 16:1	2.6	1.7	1.9	2.1
C 18:0	2.2	1.8	2.7	3.6
C 18:1	39.4	38.9	46.1	42.3
C 18:2	21.0	22.4	16.7	21.3
C 18:3	3.1	3.5	3.8	4.8
Sat'd	34.1	33.7	31.6	29.6

a. Area percentage

Medium is the same as table 5.

Table 10. Effect of Number of Spores in Inoculum on the Felt Accumulation by *Mucor plumbeus* FRI 0007 Incubated at 37°C for 25 Days.

Number of spores	1 Spatula ^a /50ml	10 ⁷ /50ml	10 ⁵ /50ml	10 ³ /50ml
Felt wt. (g) ^b	2.58±0.17	2.05±0.02	2.15±0.27	2.03±0.26

a. Diameter of spatula is 5mm

b. See footnote on table 1.

Medium is the same as table 5.

참고문헌

- 1) Prill, E. A., Wenck, P. R. and Peterson, W. H. : *Biochem. J.* **29**, 21 (1935).
- 2) Gunasekaran, M and Weber, D. J. : *Phytochem.* **11**, 1 (1972).
- 3) Hunter, K. and Rose, A. H. : *Biochim. Biophys. Acta*, **260**, 639 (1972).
- 4) Gerasimova, N. M., Kiseleva, S. I. and Bekhtereva, M. N. : *Microbiol.* **42(8)**, 248 (1973).
- 5) Shin D. H. and Kim C. S. : Korean J. appl microbiol, Bioeng., **10(1)** 15 (1982)
- 6) Shin D. H. and Kim C. S. : Korean J. appl microbiol, Bioeng., **10(2)**, 79 (1982)
- 7) Gunasekaran, M. and Weber, D. J. : *Trans. Br. Mycol. Soc.* **65(3)**, 539 (1975).
- 8) Steinberg, M. P. and Ordal, Z. J. : *Agric. Food Chem.* **2(10)**, 873 (1954).
- 9) Enebo, L. and Iwamoto, H. : *Acta Chem. Scand.*, **20(2)**, 439 (1966).
- 10) Kates, M. and Baxter, R. M. : *Can. J. Biochem. Physiol.*, **40**, 1213 (1962).
- 11) Gregory, M. E. and Woodbine, M. : *J. Exp. Botany*, **4(12)**, 314 (1953).
- 12) Bishop, D. G. and Still, J. L. : *J. Lipid Res.*, **4**, 87 (1963).
- 13) Brown, C. M. and Rose, A. H. : *J. Bacteriol.* **97**, 261 (1969).
- 14) Sumner, J. L. and Morgan, E. D. : *J. Gen. Microbiol.*, **59**, 215 (1969).
- 15) Chang, S. B. and Matsor, R. S. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 1529 (1972).
- 16) Pearson, L. K. and Raper, H. S. : *Biochem. J.*, **29**, 21 (1927).
- 17) Vaczi, L., Redai, J. and Rethy, A. : *Acta Microbiol. Acad. Scient. hung.*, **14(3)**, 293 (1967).
- 18) Veerkamp, J. H. : *J. Bacteriol.*, **108(2)**, 861 (1971).
- 19) Bhatia, I. S., Raheja, R. K. and Chahal, D. S. : *J. Sci. Fd. Agric.*, **23**, 1197, (1972).
- 20) Bhatia, I. S. and Arneja, J. S. : *J. Sci. Fd. Agric.* **29**, 611 (1978).
- 21) Gunasekaran, M., Weber, D. J. and Hess, W. M. : *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **59(2)**, 241 (1972).
- 22) Bhatia, I. S., Raheja, R. K. and Sukhija, P. S. : *J. Sci. Fd. Agric.*, **24**, 779 (1973).
- 23) Yokoyama, M. and Kaneda, T. : *Yugakaku*, **21(12)**, 900 (1972).
- 24) Lockwood, L. B., Ward, G. E., May, O. E. Herrick, H. T. and O'Neill, H. T. : *Zbl. Bakt. Abt.* **2(90)**, 411 (1934)
- 25) Cantrell, H. F. and Dowler, W. M. : *Mycologia*, **63**, 31 (1971).
- 26) Kessel, R. H. J. : *J. Appl. Bacteriol.*, **31**, 220 (1968).
- 27) Prill, E. A., Wenck, P. R. and Peterson, W. H. : *Biochem. J.*, **29**, 21 (1935).
- 28) Allen, L. A., Barnard, N. H., Fleming, M. and Hollis, B. : *J. Appl. Bacteriol.*, **27(1)**, 27 (1964).
- 29) Kleinzeller, A. : *Biochem. J.* **38**, 480 (1944).
- 30) Starkey, R. L. : *J. Bacteriol.* **51**, 33 (1946).