

균체 지질 생산에 관한 연구

金一榮 · 鄭東孝

중앙대학교 식품가공학과

Studies on the Production of Lipid by Microorganism

Il-Young Kim and Dong-Hyo Chung

Department of Food Science and Technology, Chung-ang University, Seoul

Abstract

A potential lipid producing strain of *Penicillium* sp. was isolated from natural source. *Penicillium* sp. was cultivated in an appropriate medium containing 6% of glucose as a carbon source, ammonium nitrate as a nitrogen source, C : N ratio 200, pH 4.0 for a period of 17 days at 35°C. Under the condition, the lipid content was 64.2% of dry cell weight. The total lipid produced was 13.7g/ 100g of glucose consumed. The proportion of nonpolar and polar lipid fractions was 92.2% and 7.8%, respectively. The nonpolar lipid compositions of lipid produced under optimum condition were 5.3% of free fatty acids, 6.8% of free sterols, 9.3% of partial glycerides and 72.0% of triglycerides. The major fatty acids of total lipid were 20.1% of palmitic acid, 21.6% of linoleic acid and 53.3% of oleic acid.

서 론

세계 인구의 증가와 식량자원의 고갈등으로 닥쳐 올지도 모르는 미래의 위기를 극복하기 위해서는 농산물의 증산과 더불어 새로운 대체자원의 개발이 필요하다. 이러한 관점에서 단백질과 지질의 대체원의 하나로서 미생물이 흥미로운 연구과제로 대두되었다⁽¹⁾.

미생물을 이용한 지질 생산은 제 1차 세계대전 당시 독일에서 Liner가 *Endomyces vernalis*를 이용하여 시도한 이래 계속적인 연구가 이루어져 세포내 지질을 다량 함유하고 있는 각종 미생물을 분리하였다⁽²⁾.

지질 생산을 위한 미생물의 선택 기준은 산업적, 영양학적 측면과 배양공정을 만족되어야 한다. 이러한 관점으로 볼때 세균류에 의한 지질 생산은 균체회수 및 추출의 어려움과 독성이 있고⁽³⁾, 조류는 특정한 조건(조사량, 기후)에서만 배양이 가능하며 지질함량이 낮은 이유로 지질 생산에 적합하지 않다는 것이다⁽⁴⁾. 이에 반하여 효모, 곰팡이는 지질생성률이 높으며 독성을 나타내는 균종이 적고 특히 곰팡이가 생산하는 지질은 분포화도가 높은 것이 특징이라 하겠다⁽⁵⁾.

그 대표적인 예로 효모 중에는 *Candida curvata*⁽⁶⁾, *Lipomyces stakeyi*⁽⁷⁾, *Candida bogoriensis*⁽⁸⁾, *Rhodotorula gracilis*⁽⁹⁾ 등이며 곰팡이에는 *Mucor plumbeus*⁽¹⁰⁻¹¹⁾, *Moriella isabellina*⁽¹²⁾, *Fusarium oxysporum*⁽¹³⁾, *Penicillium javanum*⁽¹⁴⁾, *Aspergillus terreus*⁽¹⁵⁾ 등이 있다.

미생물 지질 생산은 각 균주와 환경 및 영양학적 요인이 다르므로 주로 이들의 지질생산 조건과 지질에 관한 연구가 행해지고 있다⁽¹⁶⁻²⁰⁾. 또한 값싼 탄소원을 이용한다는 측면에서 폐자원을 재활용하거나^(6,21,22), *n*-alkane^(7,23,24)등을 이용한 지질 생산 가능성을 보여주고 있다.

본 실험에서는 미생물에 의한 지질 생산을 위하여 자연계로부터 *Penicillium*속의 한 균주를 분리 선정하여 이 균주의 지질생산 조건을 조사하였다. 한편 생산된 지질을 비극성 지질, 극성 지질을 분리하여 비극성 지질의 조성과 지방산 조성을 연구한 일부의 실험 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

지질 생산균의 분리 및 선정

가. 균주의 분리

여러 지역에서 수집한 토양 및 퇴비를 분리원으로 하여 1g씩을 멸균수로 현탁시킨 후, 이 현탁액을 적당히 희석하여 malt yeast extract agar배지에서 3일간 평판배양하였다. 생성된 특립 colony를 다시 2회 순수분리하여 분리된 균주는 같은 조성의 사면배지에 접종 보관하고 다음 실험에 사용하였다.

나. 균주의 선발

목적하는 균주 선정을 위하여 Table 1⁽¹⁹⁾의 액체배지를 250 ml 드리 삼각플라스크에 100 ml씩 분주한

다음, 가압살균(15 lbs, 10 min) 후 사면배지에 보관한 시험균을 접종하였다. 30°C, 35°C에서 15일간 정치배양한 후 균체량 및 지질함량을 측정하였다. 여기에서 균체량 1g 이상, 지질함량 10% 이상되는 균주를 1차 선별하고, 이들 중 지질함량이 높은 균주를 최종 선별하여 본시험의 균주로 사용하였다.

선발 균주의 동정

선정된 균을 potato dextrose agar, malt yeast extract agar 등에 평판배양하여 독립된 colony의 성장상태, 색깔 등을 관찰하고 slide culture 상에서의 균사의 격막 유무, conidiophore의 분지형태, penicillus의 형태등을 관찰하여 Barnett⁽²⁵⁾의 동정법에 의하여 선발 균주를 동정하였다.

지질 생산균의 배양

지질생산 조건을 살펴보기 위하여 배양기간, 탄소원, 탄소원 농도, 질소원, C:N ratio, 배양 초기 pH, 진탕배양등의 조건을 달리하여 배양하였다. 즉, 배양기간은 포도당 농도를 6%로한 액체배지에 2일간격으로 29일간 배양하였고, 탄소원은 glucose, fructose, galactose, lactose, sucrose, maltose, dextrin, starch 등을 사용하였으며, 탄소원의 농도는 1~10%되도록 조절하였다. 또 질소원은 ammonium sulfate, ammonium nitrate, potassium nitrate, ammonium chloride, urea, sodium nitrate등을 0.024 g/200 ml nitrogen concentration로 조절하여 사용하였고, 액체배지의 C:N ratio는 C:N ratio를 20, 40, 60, 80, 100, 200, 300으로 조절하였으며, 배양초기 pH는 액체배지에 N HCl, N NaOH를 첨가하여 pH를 pH 3.0~8.0으로 조절하여 35°C, 17일간, 진탕배양(100 rpm)하였다.

이와 같이 배양조건을 달리하여 배양한 후 균체량

지질함량, 소비당을 측정하였다.

당 측정

당은 dinitrosalicylic acid에 의한 비색법^(26,27)을 사용하였다. 즉, 배양이 끝난 배양액을 적절히 희석하여 시료 1 ml, DNS용액 3 ml를 가하여 5분간 비등하여 발색시킨 다음, 방냉하여 증류수 20 ml를 가한 후, Spectronic 2000 (540 nm)로 흡광도를 측정하였다. 별도로 glucose를 standard로 하여 calibration curve를 작성하고 소비당을 측정하였다.

균체량 측정

배양이 끝난 배양액과 균체를 분리하여 물로 당류 및 가용성 물질을 제거한 다음, 건조기(100°C ± 2)에서 건조하여 균체량을 측정하였다.

지질의 추출

건조 균체로부터 지질의 추출은^(28,29) chloroform:methanol (2:1, v/v) 혼합용매와 균체를 homogenizer로 마쇄하여 Büchner여두로 여과하고, 여과 잔사를 chloroform, methanol로 재추출하여 여과액을 분액여두에 옮겼다. 0.88% KCl용액을 첨가하여 혼합 정치시킨후, chloroform층을 분리하였다. 이 용매를 rotary vacuum evaporator로 감압농축하여 지질을 얻었다.

지질의 분별 정량

가. 비극성 지질과 극성 지질의 분리 정량

Silicic acid column chromatography^(30,31)로 비극성 지질과 극성 지질을 다음과 같이 분리하였다. 즉, Silicic acid를 증류수로 씻어 부상된 미립자의 콜로이드성 입자를 제거하고 methanol로 씻은 후, 110°C에서 12시간 활성화시켰다. Silicic acid 20g을 chloroform 50 ml로 slurry를 만든 후, column(10 mm × 30 cm, glass)에 충전시키고, 시료 500 mg을 chloroform 2 ml에 녹여 주입한 다음, 질소 가스로 flow rate (2 ml/min)를 조절하면서 chloroform 500 ml, methanol 500 ml 순으로 용출하여 비극성 지질과 극성 지질을 분리하였다. 각 지질의 분리 확인은 TLC로 관찰하였고, 용매는 rotary vacuum evaporator로 제거한 후, 중량법으로 의해 그 함량을 계산하였다.

나. 비극성 지질의 분리

시판용 silica gel G 60 plate (Merck Co, thickness 0.25 mm)를 110°C에서 1시간 활성화시킨 후, 시료 지질을 spotting하고, petroleum ether: ethyl ether: acetic acid (80:20:1, v/v)⁽³²⁾의 전개용매로 상승 일차원

Table 1. Composition of liquid medium for lipid production

| | |
|---------------------------------------|--------|
| Glucose | 30g |
| KH ₂ PO ₄ | 3g |
| NH ₄ NO ₃ | 3g |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 0.3g |
| FeSO ₄ · 7H ₂ O | 10mg |
| CaCl ₂ · 2H ₂ O | 1.2mg |
| CuSO ₄ · 5H ₂ O | 0.2mg |
| ZnSO ₄ · 7H ₂ O | 1mg |
| Distilled water | 1000ml |
| pH | 5.5 |

법에 의해 전개시켰다. 발색은 5% phosphomolybdic acid (isopropanol : methanol=7 : 3, v/v) spray reagent 를 뿌려, 115~120°C에서 15분간 발색시켜 문헌 상의 Rf치로⁽³³⁾지질의 종류를 추정하였다.

위와같이 TLC에 의해 분리된 각 spot은 TLC scanner (Shimazu Cs-920, zig-zag scanning, chart speed 5cm/min)로 각 peak면적을 구하여 비극성 지질의 조성비율 상대적인 백분율로 표시하였다.

다. 지방산 분석

균체에서 추출 분획한 각종 지질을 BF₃-methanol 로 메틸 에스테르화한⁽³⁴⁾ 후, 기체-액체 크로마토그래 피(GLC)로 지방산을 정량하였다. GLC의 분석 Varian aerography series 2700 (FID)을 사용하여 유리관 (5'×1/4")에 10% EGSS-X가 첨가된 100~200 mesh Chromosorb W (AW-DMCS)로 충전하고, 관 온 도는 165°C, 감출기 온도는 250°C에서, 운반기체 의 유속은 질소를 45ml/min, 공기는 300ml/min, 수소는 40ml/min로 조절하였고, 도표지의 속도는 10mm/min로 한 조건에서 분석 정량하였다.

결과 및 고찰

지질 생산균의 선정

지질 생산 균주를 선발하기 위하여 토양, 퇴비등의 분리원으로 부터 100여종의 균주를 순수분리하여 정 치배양한 결과 Table 2와 같이 지질함량이 10%이상 인 균주는 전 균주의 8%이었는데 이중 비교적 지질 함량이 높은 J-8 균주(균체량 2.97g/100ml, 지질함량 12.7%)를 지질 생산을 위한 우수 균주로 선발하였다.

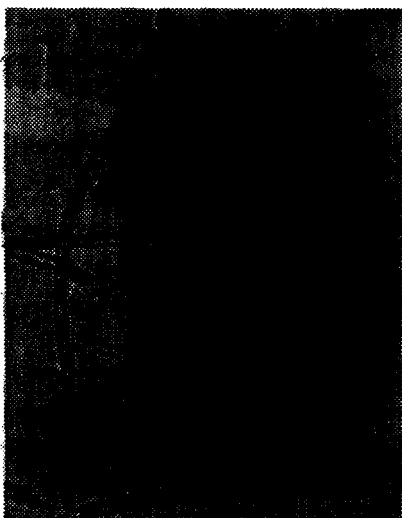


Fig. 1. Microphotograph of *Penicillium* sp.

Table 2. The dry cell weight and lipid content of isolated strains

| Strain | DC(g/100ml) ^a | LC(%) ^b | Sources |
|--------|--------------------------|--------------------|-------------|
| A-9 | 2.68 | 9.5 | Arable soil |
| C-3 | 2.85 | 11.0 | Arable soil |
| D-2 | 3.43 | 10.1 | Compost |
| E-5 | 2.72 | 11.6 | Arable soil |
| H-2 | 2.57 | 10.6 | Arable soil |
| J-8 | 2.97 | 12.7 | Arable soil |

Culture medium is the same as Table 1.
a: Dry cell weight, b: Lipid content

선발균주의 동정

Potato dextrose agar, malt yeast extract agar배지 에 30°C, 35°C에서 평판배양한 결과, 35°C, malt yeast extract agar배지에서 잘 자라 배양 3일째 부 터 colony를 식별할 수 있었으며, colony의 색은 초 기에 회백색이었다가 차츰 녹색으로 변하였다.

Slide culture상에서 관찰한 결과, 균사에 격막이 있 고 균사로 부터 conidiophore가 그 선단에서 penicil- lus를 형성하였다. Penicillus의 형태는 monoverticil- lata이며, phialospore는 구형이며 투명하였다.

위와 같은 결과를 Barnett⁽²⁵⁾의 결과와 비교할 때 *Penicillium* sp.로 동정되었다.

지질 생산균의 배양

가. 배양기간

배양기간이 경과함에 따른 *Penicillium* sp.의 균체중 식, 지질함량, 배양액 중의 glucose잔류량을 조사한 결과는 Fig.2와 같다. 이 결과에서 보면, 배양 3일째 부터 균체량을 측정할 수 있었으며, 균체량이 급격히 증가하여 19일째에 2.72g/200 ml로 최고였다. 지질함 량은 17일째에 54.1%로 최고치를 나타냈다. 그리고 지질생성물도 17일째에 12.7g으로 가장 경제적인 배 양기간이었다. 당의 소비는 5일째 부터 점차적으로 증가하여 23일째에 완전히 소비되었다. 따라서 당이 고갈됨에 따라 균체량, 지질함량이 서서히 감소하는 경향을 나타냈다.

Aspergillus nidulans⁽³⁵⁾는 glucose 17%, 배양 8일 에 지질함량이 52.8%이고, *Penicillium spinulosum*의 경우는 배양 10일에 지질함량이 38.1%였다. 이는 본 실험보다 배양기간은 짧으나, 배양기간에 따른 지질함 량은 본 실험이 높았다.

나. 탄소원의 영향

탄소원의 종류가 *Penicillium* sp.의 균체중식과 지질 생산에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 3과 같

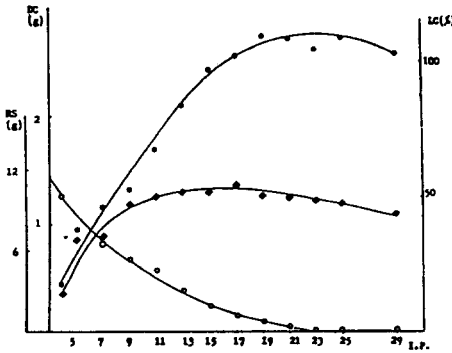


Fig. 2. Effect of incubation period on dry cell weight, residual sugar in the medium and lipid content of *Penicillium* sp.

◆—◆ Lipid content, ●—● Dry cell weight, ○—○ Residual sugar

Culture medium contains 6% of glucose, 0.69g/200ml of NH₄NO₃ and all minerale as Table 1.

다. Table 3에서와 같이 균체량에 대한 지질함량으로 봤을때 maltose가 56.9%로 가장 높았고, glucose는 maltose와 비교하여 볼때, 지질함량이 54.1%로 조금 낮았으나 균체량(2.55g/200ml)과 지질생산량(1.38g/200ml)이 높아 지질 생산에 가장 적합한 탄소원이었다. 한편 dextrin이나 starch에서도 비교적 높은 지질 함량을 나타내고 있어 값싼 농산물 폐기물을 이용한 지질생산 가능성을 보여 주고 있다.

Fusarium oxysporum⁽¹³⁾의 탄소원으로 glucose가 가장 지질 생산이 높았다고 보고하였고, Duncan⁽³⁶⁾은 *Penicillium linacinum*에 대하여 탄소원으로 sucrose, mannitol, maltose가 모두 효과적이라고 보고하였다.

다. 탄소원 농도의 영향

탄소원의 농도가 *Penicillium* sp.의 균체증식과 지질 생산에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 4와 같이 glucose의 농도에 따라 생성된 균체량과 지질함량은 각각 차이를 보여, glucose의 농도가 10%일때 지질함량이 57.3%, 지질생성물 12.2g이었고, glucose의 농도가 6%일때는 지질함량 54.1%로 지질함량은 다소 낮았으나 지질생성물은 12.7g으로 가장 높았다. 또한 소비당을 측정한 결과 6%이하에서는 당의 소비가 커 배양액중의 잔류당이 1g이하였으나, 6%이상에서는 탄소원의 농도가 증가함에 따라 잔류당이 증가하여 최고 6.6g이 배양액 중에 잔존하였다.

이와 같은 결과를 보아 탄소원의 농도를 증가시키에 따라 균체량, 지질함량이 증가추세를 나타내고 있으나, 지질생성물을 고려하여 볼때 탄소원의 농도 6%

Table 3. Effect of carbon source on cell and lipid formation by *Penicillium* sp.

| Carbon source | DC(g.200ml) ^a | TL(g ^b) | TL/DC(%) ^c |
|---------------|--------------------------|---------------------|-----------------------|
| Glucose | 2.55 | 1.38 | 54.1 |
| Fructose | 2.07 | 0.63 | 30.4 |
| Galactose | 1.39 | 0.67 | 48.2 |
| Lactose | 0.89 | 0.06 | 6.70 |
| Sucrose | 1.19 | 0.50 | 42.0 |
| Maltose | 1.23 | 0.70 | 56.9 |
| Dextrin | 1.34 | 0.72 | 53.7 |
| Starch | 2.28 | 1.00 | 43.8 |

Medium contains carbon source(12g/200 ml), NH₄NO₃ (0.069g/200 ml) and all minerals as Table 1.

a: Dry cell weight, b: Total lipid, c: Lipid content

Table 4. Effect of carbon source concentration on cell and lipid formation by *Penicillium* sp.

| Glucose concentration (%) | DC(g/200ml) ^a | TL(g) ^b | TL/DC(%) ^c | SC(g) ^d | Lco.(g) ^e |
|---------------------------|--------------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|----------------------|
| 1 | 0.77 | 0.08 | 10.3 | 2.0 | 4.0 |
| 2 | 1.51 | 0.26 | 17.2 | 3.1 | 8.4 |
| 3 | 1.96 | 0.57 | 29.1 | 5.7 | 10.0 |
| 4 | 2.04 | 0.70 | 34.1 | 7.4 | 9.5 |
| 5 | 2.26 | 1.03 | 45.4 | 8.1 | 12.1 |
| 6 | 2.55 | 1.38 | 54.1 | 10.9 | 12.7 |
| 7 | 2.65 | 1.44 | 54.5 | 12.5 | 11.5 |
| 8 | 2.61 | 1.40 | 53.7 | 12.4 | 11.4 |
| 9 | 2.78 | 1.51 | 54.4 | 12.7 | 11.9 |
| 10 | 2.86 | 1.64 | 57.3 | 13.4 | 12.2 |

Medium contains 0.069g/200ml of NH₄NO₃ and all minerals as Table 1.

a: Dry cell weight, b: Total lipid, c: Lipid content, d: Sugar consumed e: Lipid coefficient (total lipid weight produced/100g of glucose consumed)

가 가장 적절하였다.

*Penicillium javanicum*³⁷은 glucose 21.3~60.3%인 배지에서 배양하는 경우 균체량은 21.3%에서 가장 높았고, 지질함량은 41.6%에서 가장 높았다고 보고하였다. 이는 본 실험과 비교해 볼때 탄소원의 농도가 대단히 높았다.

라. 질소원의 영향

질소원의 종류가 *Penicillium* sp.의 균체증식과 지질 생산에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 5와 같이 질소원의 종류에 따라 균체량 및 지질함량이 차이를 나타내어, ammonium sulfate의 경우 균체량 1.05g/

Table 5. Effect of nitrogen source on cell and lipid formation by *Penicillium* sp.

| Nitrogen source | DC(g/200ml) ^a | TL(g) ^b | TL/DC(%) ^c | SC(g) ^d | Lco.(g) ^e |
|-------------------|--------------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|----------------------|
| Ammonium sulphate | 1.05 | 0.72 | 46.8 | 6.7 | 10.7 |
| Sodium nitrate' | 2.04 | 0.72 | 35.3 | 9.0 | 8.0 |
| Potassium nitrate | 1.78 | 0.67 | 37.5 | 8.2 | 8.2 |
| Ammonium choride | 1.88 | 0.59 | 31.2 | 7.7 | 7.7 |
| Urea | 1.59 | 0.43 | 27.0 | 5.4 | 8.0 |
| Ammonium nitrate | 2.55 | 1.38 | 54.1 | 10.9 | 12.7 |

Medium contains 6% of glucose, 0.024g/200 ml of nitrogen concentration and all minerals as Table 1. a~e: See foot notes in Table 4.

200 ml. 지질함량 46.8%였으며 ammonium nitrate인 경우에는 균체량 2.55 g/200ml, 지질함량 54.1%로 다른 질소원보다 우수한 질소원이었다.

한편 다른 균주의 질소원 이용도를 보면, *Phytium irregulare*³⁸⁾ *Aspergillus terreus*¹⁶⁾는 ammonium chloride를, *Mucor plumbeus*³¹⁾ *Aspergillus ochraceus*²¹⁾는 urea를, 또 *Fusarium oxysporum*¹³⁾는 potassium nitrate, urea, sodium nitrate를 질소원으로 하였을 때 지질함량이 높았다고 한다.

이상의 결과를 보아 각 균종 간의 질소원에 대한 이용도가 각기 다르다는 것을 알 수 있다.

마. C: N ratio의 영향

탄소원으로 glucose, 질소원으로 ammonium nitrate를 이용하여 C: N ratio를 달리 하였을 때 *Penicillium* sp.의 균체 증식과 지질생산에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig.3과 같다. 이 결과에서 보면 C: N ratio가 적을수록 균체량은 증가하여 C: N ratio 20 일때 4.17 g/200ml로 가장 많았고, C: N ratio가 증가함에 따라 균체량은 감소하여 C: N ratio 300 일때 1.60 g/200 ml로 가장 적었다. 지질함량은 C: N ratio가 증가함에 따라 증가 추세를 보여 C: N ratio 200 일때 54.1%로 최고치를 나타냈다. 그러나 C: N ratio 300에서는 질소원의 부족으로 인하여 지질함량이 감소하여 35.6%이었다. 또한 소비당을 측정된 결과 낮은 C: N ratio에서는 당을 거의 소비하여 버렸고, 높은 C: N ratio로 갈수록 배양액 중의 잔류당이 증가하여 C: N ratio 300 일때 잔류당이 5.3g이었다. 이는 질소원의 첨가량이 증가됨에 따라 균체 증식이 증가되어 당의 소비가 증가됨을 알 수 있다.

Duncan³⁶⁾은 *Penicillium linacium*이 C: N ratio 160 일때 지질함량이 최고에 이르렀다 하였으며 Bhaite³⁸⁾는 *Phytium irregulare*이 C: N ratio 300 일때 최적이라 하였다. 본실험에서는 C: N ratio 200 일때 최적이었다.

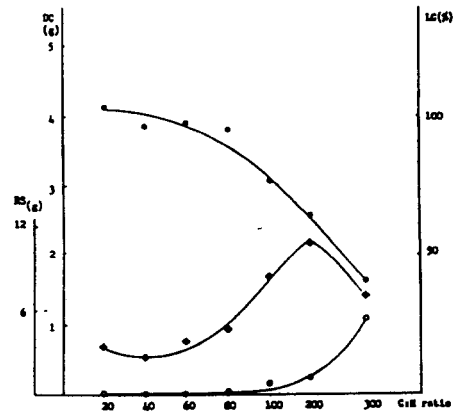


Fig. 3. Effect of C: N ratio on dry cell weight, residual sugar in the medium and lipid content of *Penicillium* sp.

◆—◆ Lipid content, ●—● :Dry cell weight, ○—○ Residual sugar

Carbon source: glucose, Nitrogen source: NH₄, NO₃
Incubation period: 17 day., Incubation temp.: 35°C
Vol. of culture medium, 200ml, containing 12g of glucose.

바. 배양 초기 pH의 영향

배양 지질생산에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 6과 같이, 넓은 pH범위에서 비교적 높은 지질함량을 나타내며, pH 4.0에서 지질함량 64.2%로, pH 5.0에서 균체량 2.56 g/200 ml로 최대를 나타냈다.

이와 같은 결과는 배양 pH가 균체 지질 생성에 있어서 큰 요인이 되지 않는다는 것과 달리, 배양 pH가 큰 영향을 주며, *Rhodotorula gracilis*³⁹⁾의 경우와 같이 pH가 낮아짐에 따라서 지질함량이 증가됨을 알 수 있다.

또한 각 균종의 적정 pH *Fusarium oxysporum*¹³⁾의 경우 pH 5.5 일때 최대 지질축적율을 보인다는 보고와 같이 각기 다름을 알 수 있다⁽⁴⁰⁾.

Table 6. Effect of initial pH on cell and lipid formation by *Penicillium* sp.

| pH | DC(g/200 ml) ^a | TL(g) ^b | TL/DC(%) ^c | SC(g) ^d | Lco. (g) ^e |
|-----|---------------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|
| 3.0 | 1.69 | 0.82 | 48.5 | 8.9 | 9.2 |
| 4.0 | 2.26 | 1.45 | 64.2 | 10.6 | 13.7 |
| 5.0 | 2.56 | 1.37 | 53.5 | 9.8 | 14.0 |
| 6.0 | 2.25 | 1.10 | 49.0 | 9.7 | 11.3 |
| 7.0 | 1.63 | 0.72 | 44.2 | 8.8 | 8.2 |
| 8.0 | 1.05 | 0.48 | 45.2 | 8.3 | 5.8 |

Medium contains 6% of glucose, 0.069g/200 ml of NH₄NO₃ and all minerals as Table 1.

a~e: See foot notes in Table 4.

Table 7. Effect of shaking on cell and lipid formation by *Penicillium* sp.

| Method of culture | DC(g/200 ml) ^a | TL(g) ^b | TL/DC(%) ^c | SC(g) ^d | Loc. (g) ^e |
|-------------------|---------------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|
| Stationary | 1.56 | 0.29 | 18.6 | 6.8 | 4.3 |
| Shaking 60 | 1.57 | 0.46 | 29.5 | 7.1 | 6.5 |
| Shaking 100 | 2.26 | 1.45 | 64.2 | 10.6 | 13.7 |

Medium is the same as shown in Table 6 and pH is 4.0.

a~e: See foot notes in Table 4.

사. 진탕효과

진탕배양이 *Penicillium* sp.의 균체증식과 지질생산에 미치는 영향을 정지배양과 비교한 결과는 Table 7과 같다. Table 7에서 보는 바와 같이, 정지배양의 경우 균체량 1.56 g/200 ml 지질함량 18.6%였으나 진탕배양의 경우 회전속도를 100 rpm으로 했을 때 균체량 2.26 g/200 ml 지질함량 64.2%로 진탕배양함으로써 균체량 및 지질함량이 증가하였다.

이와 같은 결과는 *Penicillium soppi*, *Aspergillus nidulans*⁽⁴¹⁾의 경우 균체 및 지질 생산이 진탕배양하면 감소된다는 보고와는 상반되는 것이나, *Aspergillus fischeri*의 경우와는 비슷한 경향을 나타냈다.

지질의 분별 정량

가. 비극성 지질과 극성 지질의 함량

Penicillium sp가 최대 지질생산 조건에서 생산한 지질을 silicic acid column chromatography로 비극성 지질 및 극성 지질을 분리한 결과는 Table 8과 같이 비극성 지질은 92.8%, 극성 지질은 7.8%이었다.

미생물이 생산하는 지질 중의 비극성 지질과 극성 지질의 함량은 배양기간, 온도, pH⁽¹⁸⁾, 질소원, 탄소원, 기타 요인에 따라 차이가 있는 것으로 보고되어

Table 8. Content of nonpolar lipid and polar lipid in *Penicillium* sp.

| | DC(g) ^a | TL(g) ^b | TL/DC ^c (%) | NL(%) ^d | PL(%) ^e |
|-------------------------------|--------------------|--------------------|------------------------|--------------------|--------------------|
| <i>Penicillium</i> sp. lipid' | 2.25 | 1.45 | 64.2 | 92.2 | 7.8 |

a: Dry cell weight, b: Total lipid, c: Lipid content, d: Non polar lipid fractions, e: polar lipid fractions

Table 9. Nonpolar lipid composition of lipid produced by *Penicillium* sp.

| | Nonpolar lipid(%) ^a | | | | |
|------------------------------|--------------------------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|
| | PG ^b | FS ^c | FFA ^d | TG ^e | ES ^f |
| <i>Penicillium</i> sp. lipid | 9.3 | 6.8 | 5.4 | 72.0 | 6.6 |

a: Percentage distribution by area not weight, b: Partial glycerides, c: Free sterols, d: Free fatty acids; e: Triglycerides, f: Esterified sterols

있는데 본 실험에서는 이러한 요인에 의한 변화를 관찰하지 못하였다.

나. 비극성 지질의 조성

상기의 비극성 지질을 TLC로 분리하여 비극성 지질의 조성을 조사한 결과는 Table 9와 같이 free fatty acids 5.3%, free sterols 6.8%, partial glycerides 9.3%이며 주성분은 triglyceride로 72.0%를 차지하고 있다.

다. 지방산의 조성

상기의 지질을 gas liquid chromatography로 지방산을 분석한 결과는 Table 10과 같은데 총지질의 주요 지방산은 palmitic acid, linoleic acid, oleic acid였으며 가장 함량이 높은 지방산은 oleic acid로 53.3%였고 이들 주요 지방산이 전체 지방산의 90% 이상을 차지하고 있었다. 또한 비극성 지질과 극성 지질의 지방산도 총지질의 조성비와 비슷하였다.

이와 같은 사실은 *Candida carvata*⁽⁴²⁾, *Phythium irregulare*⁽³⁸⁾가 생산하는 지질의 지방산 조성비와 비슷하였으며 식물성 유지인 땅콩⁽⁴²⁾, olive oil⁽⁴³⁾의 주요 지방산과도 비슷한 경향을 나타내고 있다.

요 약

자연제로 부터 지질생산 균주, *Penicillium* sp.을 분리하였다. 이 균의 최적 지질생산 조건은 탄소원으로 포도당 6%, 질소원으로 ammonium nitrate, 배양기

Table 10. Fatty acid composition of total lipid, nonpolar and polar fraction of lipid produced by *Penicillium* sp.

| Lipid fraction | Fatty acid (%) ^a | | | | | | UFA ^b |
|-----------------|-----------------------------|------|------|------|------|------|------------------|
| | 14:0 | 16:0 | 18:0 | 18:1 | 18:2 | 18:3 | |
| TL ^c | tr. | 20.1 | 5.0 | 53.3 | 21.6 | tr. | 74.9 |
| NL ^d | tr. | 20.1 | 5.0 | 53.9 | 29.8 | tr. | 74.7 |
| PL ^e | tr. | 15.2 | 3.2 | 34.6 | 47.1 | tr. | 81.7 |

a: Percentage distribution by area b: Percent of unsaturated fatty acids

c: Total lipid d: Nonpolar lipid fractions e: Polar Lipid fractions

tr.: Trace amount detected less than 0.6%.

간 17 일, C:N ratio 200, 배양 초기 pH 4.0, 진탕배양(100 rpm), 35°C 이었고 이때 생산된 균체량은 2.26 g/200 ml, 지질함량은 64.2%, 지질생성물 13.7 g이었다. 최적 지질생산 조건에서 생산된 지질 중에 비극성 지질의 함량은 92.2%, 극성 지질은 7.8% 이었다. 비극성 지질의 조성은 free fatty acid, free sterol, partial glyceride, triglyceride이며 이들중 triglyceried가 72.0%로 대부분을 차지하고 있다. 총지질의 주요 지방산은 oleic acid 53.3%, linoleic acid 21.6%, plamitic acid 20.1%로 oleic acid가 가장 많이 존재하며 이들 주요 지방산이 전체 지방산의 90% 이상을 차지하고 있다. 식물성 유지인 땅콩 olive oil의 지방산 조성과 비슷한 경향을 나타내고 있다.

문 헌

- Woodbine, M.: *Progress in Industrial Microbiology*, Heywood London, 181 (1959)
- Weete, J. D.: *Lipid Biochemistry of Fungi and Other Organism*, Plenum press, p.9 (1980)
- Withworth, D.A. and Ratledge, C.: *Proc. Biochem.*, 9, 14 (1974)
- Priestley, G.: *Food from Waste*, Applied Science Publishers Ltd., p.144 (1976)
- Wassef, M.K.: *Advan. Lipid Reds.* 15, 159 (1970)
- Moon, N.J. and Hommond, E.G.: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 55, 698 (1978)
- Starkey, J.D.: *J. Gen. Bacteriol.*, 51, 33 (1946)
- Culter, A.J. and Light, R.J.: *Can. J. Micro.*, 28, 223 (1982)
- Allen, L.A., Barnard, N.H., and Hollis, B.: *J. Appl. Bact.*, 27, 27 (1964)
- 유진영, 신동화, 임호, 민병용, 서기봉: 한국식품과학회지, 12, 97 (1981)
- 유진영, 이형춘, 신동화 서기봉: 산업미생물학회지, 10, 87 (1982)
- Suzuki, O. Yamashina, T. and Yokokki, T.: *Yukagaku*, 31, 921 (1982)
- Bhatia, I.S. and Arenja, J.S.: *J. Sci. Fd. Agric.*, 29, 611 (1978)
- Ward, G.E. and Jamisor, G.S.: *J. Am. Chem. Soc.*, 56, 973 (1934)
- Singh, J. and Sood, M.G.: *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 50, 485 (1972)
- Singh, J. and Sood, M.G.: *J. Sci. Fd. Agric.*, 23, 1113 (1972)
- Bhatia, I.S. and Areneja, J.S.: *J. Sci. Fd. Agric.*, 29, 619 (1978)
- Bhatia, I.S., Raheja, R.K. and Chahal, D.S.: *J. Sci. Fd. Agric.*, 24, 779 (1973)
- Suzuki, O., Yamashina, T. and Yokochi, T.: *Yukagaku*, 30, 854 (1981)
- Suzuki, O., Yokochi, T. and Yamashina, T.: *Yukagaku*, 30, 863 (1981)
- Suzuki, O., Jiami, Y. and Napasato, S.: *Agric. Biol. Chem.*, 43, 1343 (1979)
- Walper, J.D. and Cooney, J.J.: *Applied Micro.*, 26, 705 (1973)
- Watanabe, D., Hirai, M. and Kashiwazaki, H.: *Hakko kyoka-shi*, 33, 128 (1975)
- Suzuki, O., Yokochi, T. and Yokachima, T.: *Yukagaku*, 31, 993 (1982)
- Barnett, H.L., and Hunte, B.B.: *Illustrated Genes of Imperfect Fungi*, Burgess publishing Company, p.90 (1972)
- 정동효, 장현기: 최신식품분석, 진로연구사 p.179 (1976)
- Miller, G.L.: *Anal. Chem.*, 31, 426 (1959)
- Christie, W.W.: *Food Analysis*, Pergmon press, p. 22 (1982)
- Folch, J., Lee, M. and Slone Stanly, G.H.: *J. Biol. Chem.*, 226, 497 (1957)
- Kate, M.: *Techniques of Lipidology*, North Holland Publishing Co., p.397 (1972)
- Hirsch, J. and Ahrens, E.M., Jr.: *J. Biol. Chem.*, 233, 311 (1958)
- Kate, M.: *Techniques of Lipidology*, North Holland Publishing Co., p.428 (1972)

33. Kuksis, A.: *Hand Book of Lipid Research Fatty acid and Glyceride*, Plenum press, p.134 (1978)
34. Metcalfe, L.D., Schmitz, A.A. and Pelka, J.R.: *Anal. Chem.*, **38**, 514 (1966)
35. Garrido, J.M. and Walker, J.K.: *T. Sci. Fd. Agr.*, **7**, 233 (1956)
36. Duncan, B.: *Mycologia*, **65**, 211 (1973)
37. Garrido, J.M., Woodbine, M. and Walker, T.K.: *An. Real. Soc. Fis. Quim.*, **40**, 829 (1953)
38. Bhatia, I.S., Raheja, R.K. and Sukhija, D.S.: *J. Sci. Fd. Agric.*, **24**, 779 (1973)
39. Kessell, R.H.J.: *J. Appl. Bact.*, **31**, 220 (1968)
40. Cantrell, H. F.: *Mycologia*, **63**, 31 (1971)
41. Gad, A.M., Murray, S. and Walker, T.K.: *J. Sci. Fd. Agric.*, **10**, 597 (1959)
42. Sonders, T.H.: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **57**, 12 (1980)
43. Fedeli, E.: *Progress in Chemistry of Fat and other Lipids*, **15**, 57 (1977)
(1985년 1월 17일 접수)