

곰팡이 유지 생산에 관한 배양조건의 영향

손병호 · 정태명* · 김용균 · 최상욱

밀양농잠전문대학 식품제조과 * 경상대학교 화학과

Effect of Cultural Conditions on the Lipid Production by Moulds.

Son, Byung-Hyo, Jeong, Tae-Myoung, Kim, Yong-Gyun and Chai, Sang-Ouk

Department of Food manufacturing, Miryang National
Agricultural and Sericultural Junior college

* Department of chemistry, Geongsang National University.

Aspergillus niger var. *macrosporus*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium notatum* and *Penicillium spinulosum* were cultured under different cultural conditions. The lipids produced by these species and fatty acid compositions of lipids were investigated. The maximum lipid contents produced by each species were 17.8% for *Asp. niger* var. *macrosporus*, 31% for *Asp. fumigatus*, 12.6% for *P. notatum* and 17.5% for *P. spinulosum*, respectively. The major fatty acid compositions were palmitic acid, stearic acid, oleic acid and linoleic acid. *Asp. niger* var. *macrosporus* and *Asp. fumigatus* were highest oleic acid during all incubation periods and *P. notatum* and *P. spinulosum* were linoleic acid. Degree of unsaturation was higher *Penicillium* than *Aspergillus*. The fatty acid compositions were changed depending on the incubation temperature, but hardly showed a certain tendency except linoleic acid and degree of unsaturation that were higher at lower temperature.

미생물이 생산하는 유지의 지방산 조성은 일반적으로 동일하지 않는데 이는 균종에 또는 동일 균종 일지라도 배양온도(Furuya et al., 1980; Sumner et al., 1969), 배지의 조성(Bhatia et al., 1978; Furuya et al., 1980), 배양기간(Singh et al., 1956; Sumner et al., 1969) 및 C/N율(Bhatia et al., 1978)에 따라서 많은 차이가 있다고 알려져 있고 이에 관한 많은 연구가 이루어져 있다. 그러나 일부 미생물에 있어서는 온도의 증가에 따라 지질의 불포화도가 증가 되었다는(Gad et al., 1964; Gregory et al., 1953; Shaw, 1966) 보고가 있는가 하면 온도가 낮을수록 불포화도가 증가 하였다는(Kates et al., 1964; Shaw, 1966; Singh et al., 1956) 보고도 있었다. 반면에 온도와 지방산 조성

의 관계가 상호 관련성이 없는 것으로 나타 난(Bowman et al., 1967; Prill et al., 1935) 보고도 있었다. 본 연구에서는 *Aspergillus niger* var. *macrosporus*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium notatum* 및 *Penicillium spinulosum*의 4가지 균주를 배양온도 및 배양기간의 영향이 균체 및 지질생성 그리고 지방산 조성에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주

Aspergillus niger var. *macrosporus*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium notatum* 및 *Penicillium spinulosum*의 4 균주를 한국 종균

협회에서 구입하여 potato dextrose agar에 접종하여 1~5°C에서 보관하고 1개월마다 계대하여 공시균주로 사용하였다.

균체배양

공시균주의 배지는 Singh와 Sood(1972)가 사용한 배지로서 Sucrose 120 g, MgSO₄·7H₂O 5.0 g, K₂SO₄ 0.44 g, FeCl₃·6H₂O 0.16 g을 증류수 1l에 용해하여 500ml삼각플라스크에 100ml씩 분주하고 10psi에서 10분간 살균하여 각 균주를 1 spatula (φ 0.5mm)씩 채취, 접종하여 배양온도 및 배양기간에 대해 조사했다. 배양기간은 30°C에서 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 및 20일 간 각각 배양시켰으며 배양온도는 20°C부터 45°C까지 5°C간격으로 9일간 각각 배양하였다.

균체량 및 지질량 측정

균체량은 Singh(1966)의 방법으로 측정하였으며 건조균체를 80mesh가 되도록 마쇄한 것을 Soxhlet 장치를 이용하여 diethyl ether로 24시간 환류시킨 후 40°C rotary evaporator 로서 감압농축하여 용매를 제거한 후 항량이 될때까지 desicator에서 건조시켜 조지질량으로 하였다.

지방산 분석

추출한 지질에 10% alcohol성 KOH용액을 첨가하여 1시간 환류시켜 검화한 후 diethyl ether로 불검화물을 추출 제거한 후 총 지방산을 얻었으며 총 지방산에 1% P-toluene sulfonic acid methanol 용액을 가하고 30분간 환류하여 지방산의 methyl ester를 얻었다. 지방산 methyl ester를 Gas-Liquid chromatography (G-LC)에 의하여 분리 정량하였으며 표준지방산 ester는 supelco 회사의 제품을 사용하였고 G-LC는 Shimadzu GC-6AM으로서 column은 chromosorb WHP (80~100mesh)를 사용하였으며 column온도는 164°C, 검출기 온도는 180°C, 운반기체는 질소로써 유속 60ml/min인 조건하에서 지방산을 분석하였으며 표준지방산 methyl ester의 RRT(Relative Retention Time)와 비교하여 지방산의 종류를 확인하고 peak의 면적은 chromatography 자동분석기 (shimadzu, chromatopac C-EIB)에 의하여 백분율

로 나타내었다.

결과 및 고찰

균체량과 균체 지질량의 변화

배양기간에 따른 변화; 배양기간의 변화에 의한 각 균주의 균체량과 지질량의 변화를 Fig. 1과 2에 각각 나타냈다. 건조균체량(Fig. 1)에 있어서 *Aspergillus*속의 균주는 배양기간이 늘어남에 따라서 균체량도 증가하는 것으로 나타났으나 *Aspergillus niger* var. *macrosporus*는 배양 11일까지, *Aspergillus fumigatus*는 배양 15일까지 계속 증가했다. 한편 *Penicillium*속의 균주는 배양 13일까지 계속 증가를 했는데 *Penicillium notatum*이 *Penicillium spinulosum*에 비하여 증식이 좋았으며 *Penicillium*속의 균주보다는 *Aspergillus*속의 균주가 증식이 더 좋은 것으로 나타났다. 균체 지질량에 있어서(Fig. 2) *Aspergillus fumigatus*는 배양 15일까지 계속 증가를 보여 15일간 배양했을때 31%로 가장 높게 나타났으나 다른 균주들은 전 배양기간 동안 20%를 넘지 못하는 수준이었는데 전반적으로 *Aspergillus fumigatus*의 균체

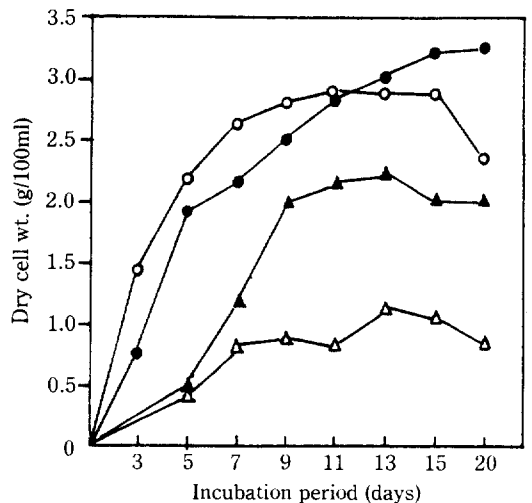


Fig. 1. Effect of incubation periods on cell formation by moulds.

- ; *Asp. niger* var. *macrosporus*
- ; *Asp. fumigatus*
- △—; *P. notatum*
- ▲—; *P. spinulosum*

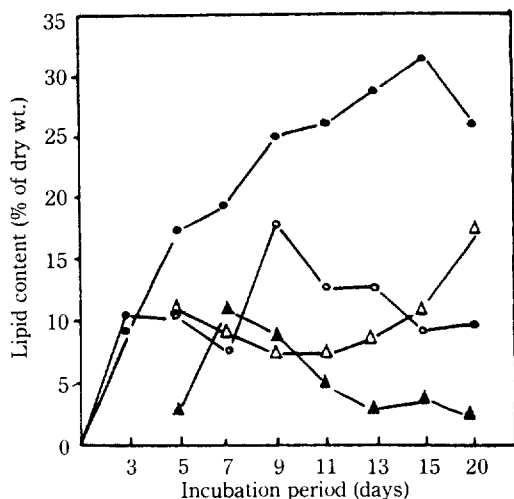


Fig. 2. Effect of incubation periods on lipid formation by moulds.

지질량이 다른 균주에 비해 훨씬 높았다. 한편 *Aspergillus niger* var. *macrosporus*의 지질량은 9 일간 배양했을때 17%로 가장 높았으나 그 후 점차 감소되었고 *Penicillium spinulosum*은 5 일간 배양했을때 11%였으나 그 후 다소의 증감을 보이다가 배양 20일째 균체 지질량이 17.5%로 가장 높았다. *Penicillium notatum*은 7 일간 배양했을때 11%로 최대량을 보였으나 그 이후부터는 감소되었다. Garido et al. (1958)은 *Aspergillus nidulans*, *Penicillium javanicum*, *Penicillium spinulosum*에 대해, Wix et al. (1959)은 *Aspergillus ustus*, *Penicillium oxalicum*, *Penicillium frequentans*, *Penicillium notatum*을 이용하여, Chesters et al. (1965)은 *Mortierella vinacea*로 배양 기간별 균체량 및 지질량에 관한 보고에서 균종간 혹은 동일 균종일 지라도 배지 조성, 정치배양 및 진탕배양에 따라 차이가 있고 또한 어떤 일정한 경향을 나타내지 않는다는 보고와 비교해 볼 때 이는 본 연구와 비슷한 경향을 보였다.

배양온도에 따른 변화; 배양온도를 20°C에서 45°C 까지 5°C 간격으로 배양한 각 균주의 건조 균체량과 균체지질량을 Fig. 3과 4에 각각 나타냈다. 배양온도의 변화에 따른 건조균체량(Fig. 3)의 변화에서 공시 균주 모두가 온도가 상승함에 따라 증가하다가 40°C에서 최대량을 나타냈는데 각 균주의 최대 건조물량은 *Asp. niger* var.

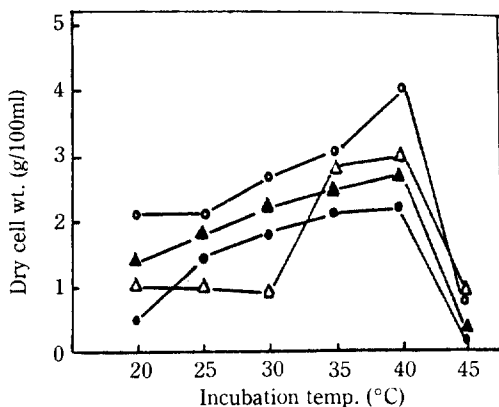


Fig. 3. Effect of incubation temperature on cell formation by moulds.

*macrosporus*가 4g/100ml, *Asp. fumigatus*가 2.3g/100ml, *P. spinulosum*이 3g/100ml 그리고 *P. notatum*이 2.8g/100ml로 각각 나타났다. 한편 균체 지질량(Fig. 4)에 있어서는 30°C에서 *Asp. fumigatus*가 25.6%, *Asp. niger* var. *macrosporus*는 17.8%로서 각각 가장 높은 함량을 보였고 *P. spinulosum*과 *P. notatum*은 35°C에서 각각 13.8%, 12.6%로 가장 높은 함량을 보였다. 그리고 공시 균주중 지질함량은 *Aspergillus*속의 균주가 *Penicillium*속의 균주에 비해 지질함량이 높고 그중 *Aspergillus fumigatus*가 지질축적율이 가장 높은 것으로 나타났다. 한편 Enevo(1966)와 Kates(1962)는 온도가 높아질수록 지질 축적율이 오히려 감소한다는 보고와 본 실험 결과와 비교해 볼 때 서로

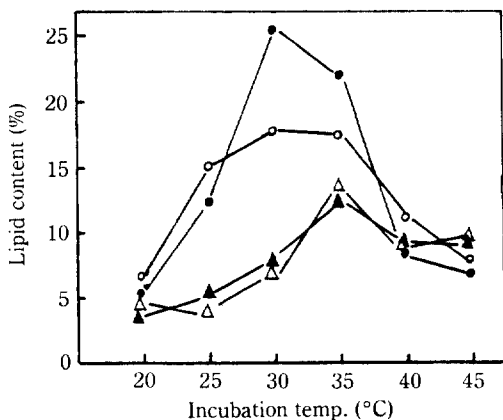


Fig. 4. Effect of incubation temperature on lipid formation by moulds.

상반된 것으로 나타났으나 Weber (1966)와 Shaw (1966)는 온도가 높아질수록 지질의 축적율도 증가한다고 했으며 Weete (1980)는 균체의 생육온도와 지질생성과는 반드시 일치하지 않는다는 보고로 미루어 볼 때 배양온도와 균체 지질생성에는 균종간에 많은 차이가 있는 것으로 보였다.

지방산 조성의 변화

각 배양기간 및 배양온도에서 얻어진 유지의 지방산조성을 GLC로 분석한 결과 주요 지방산은 C_{16:0}, C_{18:0}, C_{18:1}, C_{18:2}이었으며 기타 지방산들 즉, C_{14:0}, C_{16:1}, C_{18:3}, C_{20:4} 등은 3%미만이어서 본 연구의 보고에서 제외시키고 주요 지방산들 만 Table 1과 2에 각각 나타냈다.

배양기간의 영향; 각 배양기간에서 얻은 균체 지질의 주요 지방산조성을 Table 1에 나타냈다. Table 1에서 보는 바와같이 *Aspergillus* 속의 균주나 *Penicillium* 속의 균주가 배양 기간에 따라 지방산의 조성이 약간씩 달라지나 어떤 일정한 경향을 발견할 수 없었고 단지 전체 배

양기간을 통하여 *Aspergillus* 속의 균주는 *Penicillium* 속의 균주에 비하여 Oleic acid의 함량이 높았으나 *Penicillium* 속의 균주는 오히려 linoleic acid의 함량이 높았으며 또한 지방의 불포화도 역시 *Penicillium* 속이 *Aspergillus* 속의 균주보다 높은 것으로 나타났다. 그리고 *Asp. niger var. macrosporus*는 지방산 함량이 oleic acid, linoleic acid, palmitic acid, stearic acid의 순으로 되어있으나 *Asp. fumigatus*는 oleic acid, palmitic acid, linoleic acid, stearic acid의 순으로 되어 있고 *Penicillium notatum*은 linoleic acid, palmitic acid, oleic acid, stearic acid로 되어있으나 *Penicillium spinulosum*은 linoleic acid, oleic acid, palmitic acid, stearic acid의 순으로 이루어져 있었다. 또한 이들 주요 지방산의량을 합하여 보면 공시균주 모두가 평균 92% 정도로 대두유, 야자유, 낙화생유등의 식물성 유지 (Rose, 1978)와 비슷했다. 한편 다른 *Aspergillus* 속의 균종 및 *Penicillium* 속의 균종과 지방산 조성을 비교 (Weete, 1980) 하면 palmitic acid, stearic acid

Table 1. Effect of incubation period on the fatty acid composition of experimental molds.

Incubation period (days)	<i>Aspergillus niger var. macrosporus</i>								<i>Aspergillus fumigatus</i>							
	3	5	7	9	11	13	15	20	3	5	7	9	11	13	15	20
Fatty acid																
16:0	19.7	21.1	18.1	20.8	26.1	19.6	18.0	20.1	25.2	22.4	24.4	25.1	30.1	24.7	24.5	24.0
18:0	8.0	4.6	6.3	8.8	9.9	6.9	6.9	7.2	12.1	9.9	12.9	12.7	17.4	12.1	12.9	13.1
18:1	45.2	39.1	47.0	39.6	38.2	43.2	44.9	44.2	33.5	37.8	36.7	36.5	31.7	37.5	36.7	36.1
18:2	22.1	23.8	23.5	26.2	21.1	25.2	25.7	24.1	21.6	25.4	22.2	22.2	17.5	21.4	23.1	23.5
Degree of unsaturation	0.92	0.90	0.96	0.94	0.83	0.95	0.98	0.94	0.79	0.91	0.83	0.83	0.68	0.83	0.84	0.85
	<i>Penicillium notatum</i>								<i>Penicillium spinulosum</i>							
	-	20.8	30.6	26.3	22.8	22.7	22.7	19.4	-	19.2	21.9	37.6	19.1	25.9	19.7	20.7
	-	1.9	7.0	6.6	6.0	5.8	5.4	4.9	-	3.4	2.1	5.8	2.9	2.8	3.0	2.6
	-	9.2	13.6	12.6	14.0	13.2	13.3	11.9	-	25.1	21.8	34.9	26.0	25.2	27.3	27.1
	-	54.2	40.2	47.6	50.3	50.0	51.4	57.3	-	44.1	42.8	10.1	44.8	37.9	43.2	39.2
	-	1.21	0.97	1.11	1.17	1.16	1.19	1.29	-	1.16	1.16	0.62	1.18	1.05	1.16	1.10

* Degree of unsaturation expressed as $\Delta/\text{mole} = 1.0X (\% \text{monoene}/100) + 2.0X (\% \text{diene}/100) + 3.0X (\% \text{triene}/100)$

Table 2. Effect of incubation temperature on the fatty acid composition of experimental molds.

Incubation temp. (°C)	<i>Asp. niger var. macrosporus</i>						<i>Asp. fumigatus</i>					
	20	25	30	35	40	45	20	25	30	35	40	45
Fatty acid												
16:0	19.0	14.2	19.2	20.6	24.4	16.0	13.7	20.4	24.4	36.3	22.6	-
18:0	8.9	6.1	6.6	7.5	6.7	10.4	7.8	10.1	12.7	14.3	12.8	-
18:1	51.1	47.7	46.1	52.2	45.5	41.2	31.3	33.3	33.7	39.5	36.1	-
18:2	14.4	26.2	23.4	15.3	17.6	24.9	35.5	31.5	25.4	2.4	10.6	-
Degree of unsaturation	0.82	1.02	0.97	0.85	0.85	0.95	1.05	0.99	0.87	0.47	0.76	-
	<i>Pen. notatum</i>						<i>Pen. spinulosum</i>					
	17.6	21.2	31.4	21.0	26.0	31.5	36.6	20.1	19.4	21.1	27.0	28.2
	7.1	6.4	6.9	7.6	7.8	8.1	6.9	7.1	2.9	7.7	8.3	9.2
	8.5	14.5	16.6	44.5	40.3	33.3	19.9	27.7	28.7	49.1	42.5	35.0
	53.0	48.4	37.2	22.6	20.7	18.6	21.1	34.3	41.0	18.3	16.0	20.4
	1.18	1.16	0.97	0.93	0.85	0.74	0.66	1.00	1.13	0.88	0.78	0.79

oleic acid 및 linoleic acid의 함량이 *Asp. dauci* (84%), *Asp. flavus* (98.1%), *Asp. nidulans* (94.1%), *Asp. niger* (82.1%), *Asp. terreus* (77%), *P. atrovenetum* (92.6%), *P. chrysogenum* (87.6%), *P. cyaneum* (87.5%), *P. soppi* (84%) 등으로 비교적 높은 조성을 보이고 있는데 이러한 지방산 조성은 균종 혹은 동일한 균종 일지라도 탄소원 및 질소원의 종류 그리고 C/N율등에 의해 지방산 조성이 달라진다는 (Bhatia et al., 1978) 보고와 비교해 볼 때 본 실험의 결과와 다소 증감에 차이가 있는 것으로 생각된다.

배양온도의 영향; 배양온도별 주요 지방산의 조성을 Table 2에 나타냈다. 배양온도별 주요 지방산의 변화를 보면 이것 역시 배양기간의 영향과 마찬가지로 각 균종에 따라 지방산의 조성 비율이 약간씩 달라지기는 하지만 일정한 경향을 발견할 수 없었는데 oleic acid의 경우 실험에 사용된 모든 균종에서 35°C까지는 함량이 증가 하였으나 온도가 상승함에 따라 감소하는 경향을 보였다. 그리고 *Aspergillus fumigatus*와 *Penicillium notatum*에서만 linoleic acid가 배양온도가 상

승함에 따라 감소하고 아울러 지방의 불포화도 역시 낮아지는 경향을 보였다. 한편 Shaw(1966)와 Kates(1962)는 저온 일수록 미생물에 의하여 불포화도가 높은 지방산이 생성 되었으며 온도의 변화가 지방산의 합성을 조절한다고 했고 Nagai(1966)는 포화지방산으로의 전환은 여러 가지 cofactor들과 함께 desaturase 효소들에 의해 조절되는데 이는 산소용해도와 관계 된다고 했다. 또한 Sumner(1969)도 지방의 불포화도는 산소의 용해도에 의해 영향을 받는데 산소의 용해도는 배양 온도에 의해 좌우된다고 했다. 즉 배양액 중의 산소 용해도는 고온 일수록 용해도가 감소하고 저온에서는 증가하여 이 산소에 의해 곰팡이 균체 지질의 불포화도가 증가한다는 보고와 비교해 볼 때 *Asp. fumigatus*와 *P. notatum*은 온도가 증가함에 따라 linoleic acid의 함량이 감소되고 아울러 지방의 불포화도가 감소되는 결과와 일치 하였으나 *Asp. niger var. macrosporus*와 *P. spinulosum*과는 관련성이 없는 것으로 나타나 앞으로 이에 관해 더 연구해야 할 과제라 생각한다.

적 요

Aspergillus niger var. *macrosporus*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium notatum* 및 *Penicillium spinulosum*의 곰팡이를 배양 온도 및 배양 기간을 달리하여 배양하고 이들 곰팡이가 생산한 지질량과 지질의 지방산 조성을 분석하였다. 이들 곰팡이에 의해 생성된 최대 지질량은 *Aspergillus niger* var. *macrosporus*가 17.8%, *Aspergillus fumigatus*가 31%, *Penicillium notatum*이 12.6% 그리고 *Pen. spinulosum*이 17.5%였다. 이들 균주가 생산한 지질의 주요 지방산은 palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid였으며 *Asp. niger* var. *macrosporus*와 *Asp. fumigatus*는 전체 배양 기간 동안 oleic acid의 함량이 가장 높았으나 *P. notatum*과 *P. spinulosum*은 linoleic acid의 함량이 가장 높았다. 그리고 지질의 불포화도는 *Penicillium*속이 *Aspergillus*속보다 높았다. 한편 지방산 조성은 배양온도에 따라 변화를 보였으나 대부분 일정한 경향을 나타내지 않았는데 *Aspergillus fumigatus*와 *Penicillium notatum*에서 저온 일수록 linoleic acid와 불포화도가 높아졌다.

REFERENCES

1. Bhatia, I. S. and J. C. Armeja, 1978, Effect of different cultural condition on the chemical composition of lipids of *Fusarium oxysporum*. *J. Sci. Food Agric.* **29**; 611-618.
2. Bloomfield, D. K. and K. Bloch, 1960. The formation of Δ^9 -unsaturation fatty acids. *J. Biol. chem.* **235**; 337-345.
3. Bowman, K. D. and R. D. Mumma, 1967. The lipids of *Phytium ultimum*, *Biochem. Biophys. Acta*, **144**; 501-510.
4. Chester, C. G. C and J. F. Peberby, 1965. Nutritional factors in Relation to growth and fat synthesis in *Mortierella vinacea*. *J. Gen. Microbiol.* **4**; 127-134.
5. Enevo, L., and H. Iwamota, 1966. Effects of cultivation temperature on fatty acid composition in *Rhodotorula gracilis* *Acta. Chem. Scand.* **20**; 439-443.
6. Furuya, T., T. Nagumoto, T. Itoh, and H. Kaneko, 1980. The effect of growth temperature on the lipids in an extremely thermo-acidophilic bacterium. *Agri. Biol. Chem.* **44(3)**; 517-521.
7. Gad, A. M. and M. M. Hassen, 1964. Chemistry of mould fat, VI. Influence of temperature and incubation on Carbohydrate fat conversion in mould *Aspergillus fischeri*. *J. chem. U.A.R.* **7**; 31-41.
8. Garido, J. M. and T. K. Walker, 1958. The Mycological formation of fat in cultures grown with agitation and aeration. *J. appl. Bact.* **21(2)**; 291-298.
9. Gregory, M. E. and M. Woodbine, 1953. Microbiological Synthesis of fat. *J. Experi. Botany.* **4**; 314-318.
10. Kates, M. and R. M. Baxter, 1962, Lipid composition of mesophilic and Psychrophilic yeasts as influenced by environmental temperature. *can. J. Biochem. Physiol.* **40**; 1213-1221.
11. Madhosingh, C, 1977. Sterol and fatty acid Metabolism in *Fusarium oxysporum*. *Agric. Biol. chem.* **41(7)**; 1233-1238.
12. Nagai, J. and K. Block. 1966. Enzymatic desaturated of Stearyl acyl carrier protein. *J. Biol. chem.* **241**; 1925-1930.
13. Prill, E. A., P. R. Wenck, and W. H. Peterson, 1935. Factors influencing the amount and nature of the fat produced by *Aspergillus fischeri*. *J. Biochem.* **29**, 21-26.
14. Rose, A. M. 1978. Economic Microbiology. Academic press. 2; 263-296.
15. Shaw, R. 1966. The fatty acids of Phycomycetes fungi and the significance of the r-linolenic acid component. *Comp. Biochem. Physiol.* **18**; 325-331.
16. Singh, J. and T. K. Walker. 1956. Changes in the composition of the fat of *Aspergillus nidulans* with age of the culture. *Biochem.* **62**; 286-289.
17. _____, and M. G. Sood, 1972. Influence of nitrogen sources on the synthesis of fat from sucrose by *Aspergillus terreus*. *Aspergillus ochraceus*, *Cladosporium fluum*, *cladosporium herbarum* and *Penicillium gladioli*. *J. Sci. Food Agric.* **23**; 1113-1118.
18. Summer, J. r., E. D. Morgan and H. C. Evans.

1969. The effect of growth temperature on the fatty acid composition of fungi in the order Mucorales. *Can. J. Microbiol.* **15**; 515-520.
19. Weber, P. and R. Shaw. 1966. The polyunsaturated fatty acids of microorganisms. *Advan. Lipid Res.* **4**; 107-114.
20. Weete, J. D. 1980. Lipid Biochemistry. plenum press. 9-95.
21. Wix, p. and M. Woodbine. 1959. *Mycological Synthesis* of fat from whey, II. Comparative studies with shaken and stationary cultures using selected moulds. *J. appl. Bact.* **22(2)**; 175-183.

(Received July 16, 1985)