

곰팡이 유지 생산에 관한 연구 (제 2 보) 전분 이용성 곰팡이의 분리 및 배지조성에 관하여

신동화 · *김창식
(농개공, 식품연구소, *동국대학교 식품공학과)
(1981년 12월 28일 수리)

Production of Fungal Lipids

(Part 2) Isolation of Starch Utilizing Mold and Its Optimum Compositions of Growth Media

Dong-Hwa Shin and Chang-Sik Kim*

Food Research Institute, Agriculture and Fichery Development Corporation,
Department of Food Technology, Dongguk University*

(Received December 28, 1981)

Summary

A potential fungal lipid producer from starch, which was identified as *Mucor plumbeus*, was isolated from natural sources and its optimum cultivation condition for lipid production was investigated.

The *Mucor plumbeus* FRI 0007 showed the highest felt weight and lipid content which were 2.09 ± 0.24 g per 50ml of medium and 37.43% on dry weight basis respectively after 20 days incubation on the medium containing 21% of starch as a carbon source. The urea was the best nitrogen source as compared with sodium nitrate, potassium nitrate, magnesium nitrate, ammonium nitrate and ammonium acetate and its optimum concentration was 2.14g/l, showing 2.39 ± 0.07 g felt/50ml of medium and 50.73% lipid content on dry weight basis after 25 days incubation.

Besides the starch as a carbon source and urea as a nitrogen source, the *Mucor plumbeus* FRI 0007 utilized $ZnSO_4$, $MgSO_4$, NaH_2PO_4 , K_2SO_4 and $FeCl_3$ as mineral sources. However, it did not require all the above 5 minerals in group indispensably for its growth and lipid accumulation. The lipid and economic coefficient of *Mucor plumbeus* FRI 0007 grown on the medium containing 0.44g K_2SO_4 /l or 5.00g $MgSO_4$ /l solely were 14.96 and 15.37 and 31.12 and 26.10 which was higher than those on the medium containing the above 5 minerals.

서 론

미생물이 탄소원을 기질로 하여 지방질을 생산한다는 사실은 오래전 부터 알려져 왔으며^(1,2) 바다말⁽³⁾, 세균,⁽⁴⁾ 효모 및 곰팡이^(3,5) 등으로 분류되어 균종에 따른 지방질 생산량과 생산 지방질의 조성 등과 아울러 배양조건에 관한 많은 연

구가 이루어졌다.

세균류는 증식 속도가 빠르고 배양이 간단하나 균체가 적고 균체 회수 및 추출상의 어려움과 독성 문제⁽⁶⁾ 때문에 현재까지는 효모 및 곰팡이에 관하여 많은 연구가 수행되었으며 주된 대상 균종은 *Candida*,⁽⁷⁻⁹⁾ *Lipomyces*,⁽¹⁰⁻¹²⁾ *Rhodotorula*,^(3,13,14) *Aspergillus*,^(15,16) *Penicillium*,^(15,19)

Fusarium⁽⁷⁻⁹⁾ 및 *Mucor*^(20,21) 등으로 이들의 배양에서 사용한 탄소원은 포도당, (22-27) 과당, (6, 18, 28) *Xylose*,^(18, 19, 28-30) *raffinose*,⁽²⁹⁾ *arabinose*⁽²⁹⁾ 맥아당 (18, 28, 31) 및 자당 (19, 30, 33) 등 주로 단당류와 2당류이며 이외에 글리세린 (19, 28, 30, 32) 과 알칸^(8, 34, 35) 등이며 전분은 탄소원으로 직접 이용한 경우는 별로 많지 않으나 일부 연구 결과에 의하면 (18, 29) 균체량 및 지방질 함량이 지극히 낮다고 보고되어 있다.

본 연구에서는 우리나라에서 단당류나 2당류에 비하여 비교적 가격이 싸고 또 잠재 생산 가능성이 높은 전분을 직접 탄소원으로 하여 상당량의 균체를 생산하고 균체중 지방질 함량도 비교적 높은 균주를 선발하였고 선발된 균주의 최적 배지 조성을 확인하였기로 이를 보고하는 바이다.

실험방법

균주의 분리 및 동정

균주 선발 : 감자, 고구마, 양송이 폐상퇴비, 퇴비류 및 기타분리원으로 부터 분리하였고 서류는 표면을 씻은 액을, 다른 분리원은 1g 내외를 멸균수로 적당히 희석한 액 약 1ml를 취하여 2cm 두께로 잘라서 살균한 고구마에 접종하였다. 이것을 37°C에서 2~7일간 배양하면서 colony 형성을 관찰하고 적당한 시간에 독립된 colony를 spatula(직경 0.5cm)로 분리하였다. 이 균체를 Table 1^(15,16)과 같은 조성의 한천 평판 배지를 이용하여 순수 분리를 3회 반복한 후 현미경으로 순수성을 확인하였다. 순수 분리된 균주는 같은 사면배지에 접종하여 보관하고, 다음 실험에 사용하였다.

균주의 선정 : Table 1과 같은 조성의 액체배지 50ml를 250ml 삼각 플라스크에 넣고, 수증기압 10psi에서 15분간 가압 살균한 후 보관중인 사면 배양으로 부터 spatula를 이용하여 각 균

주를 접종하고, 37°C에서 15일간 배양한 다음, 균체량 및 지방질 함량을 측정하였다. 여기에서 균체량 1g 이상, 지방질 함량 20% 이상되는 균주를 일차 선발하였고, 이들중 균체 및 지방질 함량이 가장 높은 균주를 최종 선발하여 본 실험 대상 균주로 정하였다.

선발균주의 동정⁽³⁶⁻³⁹⁾ : Sabouraud 한천 평판배지와 감자 한천평판배지에 접종하여 25, 37. 및 41°C에서 각각 배양하고, 배양 시간 및 온도에 따른 colony의 형태, 색깔 변화 및 성장 유무와 발육 속도 등을 육안으로 관찰하였고, 슬라이드 배양에 의해서 균사의 격벽 유무, 포자낭 병의 형태, 포자낭 및 포자 형태와 크기, 중축 형태 및 접합포자 등을 현미경으로 조사하여 동정하였으며, 균체 관찰을 위하여 염색액으로는 lactophenol cotton blue를 이용하였다.

배양조건

최적 전분 농도 : Table 1과 같은 액체배지에서 가용성 전분(Wako 회사제, 1급)의 함량을 9, 13, 17 및 21% 되게 조제한 배양액 50ml를 250ml 삼각 플라스크에 넣고 수증기압 10psi에서 15분간 가압 살균한 다음 이 배지에 보관중인 사면배양으로 부터 spatula를 이용하여 균체를 접종하였고, 37°C에서 정지배양 하였다. 배양 10일 쯤부터 매 5일 간격으로 각각 5개의 삼각 플라스크를 취하여 균체량 및 지방질 함량을 측정하여 평균치와 표준편차로 표시하였고 균체량과 지방질 함량이 가장 많은 실험구를 최적 전분농도로 결정하였다.

최적 질소원 및 그 농도 : Table 1의 배지 조성 중 가용성 전분의 농도는 전 실험에서 결정된 최적 농도를 따랐고 질소원으로는 NaNO₃, KNO₃, MgNO₃, (NH₂)₂ 및 CH₃COONH₄를 질소량으로 계산하여 300~2,000mg/l 되게 각각 첨가한 후 전 실험과 동일하게 처리하였고 25일

Table 1. The Composition of Medium for Isolation

Soluble starch	130.00g	K ₂ SO ₄	0.44g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.05g	FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.16g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	5.00g	NaNO ₃	4.78g
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	7.30g	Fill up with distilled water	1/
		pH	3.5

간 배양하면서 균체량 및 지방질 함량을 비교하여 최적 질소원 및 그 농도를 결정하였다.

최적 무기질원 및 그 농도 : Table 1의 조성 중 전분과 질소원의 농도는 전 실험에서 결정된 농도를 택하였고 각 처리구 별로 각 무기질 함량을 달리하였다. 즉 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 는 0.01, 0.05 및 0.1g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 는 2.5, 5 및 7.5g/l, $KH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 는 4, 7.3 및 10g/l, K_2SO_4 는 0, 22, 0.44 및 0.66g/l, 그리고 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 는 0.08, 0.16 0.24g/l 되게 첨가한 배지와 Table 1과 같은 조성의 무기질중 일종만을 첨가하지 않은 배지와 각 무기질 중 일종만을 단독으로 첨가한 배지, 그리고 무기질을 전혀 첨가하지 않은 배지로 구분하여 조제한 후 전 실험과 동일하게 처리하였다. 25일간 배양한 후 균체 및 지방질 함량을 비교하여 최적 무기질원 및 그 농도를 결정하였다.

선정 배지조성에 의한 배양.

전 실험의 결과에 따라 다음과 같은 조성의 배지를 이용하여 배양하였다. 즉 기초배지로 가용성 전분 210g/l 및 $(NH_2)_2CO$ 2.14g/l 첨가하였고 여기에 A 배지는 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 만을 5g/l 첨가하였고, B 배지는 K_2SO_4 만을 0.44g/l, C 배지는 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 5g/l 및 K_2SO_4 0.44g/l를 혼합하여 첨가하였으며 D 배지는 Table 1과 같은 무기질원을 동일하게 첨가하였으나 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 만은 0.24g/l 첨가하였다. 이와 같은 조성으로 배지를 조제한 후 전 실험과 동일하게 처리하여 배양기간별 균체량 및 지방질 생산량을 측정하였다.

균체 및 배양액 분석

균체량 측정 : 배양이 끝난 플라스크로부터 균체를 분리하여 증류수로 5회 이상 세척하고 묻어있는 당류 및 가용성 물질을 완전히 제거한 다음 포장하여 $-30^\circ C$ 에 저장하였다. 균체량 측정은 균체를 동결 건조한 후 무게를 칭량하였으며 이것을 지방질 함량 측정에 사용하였다.

균체중 지방질 함량 측정^(1,20,40,41) : 동결 건조된 균체를 40메쉬 이상으로 분쇄한 후 이 시료 약 2g을 Soxhlet 장치에서 methanol로 16시간 추출후 감압 농축하여 메탄올을 제거하고 $90^\circ C$

건조기에서 2~3 시간 건조후 칭량하여 조지방량으로 하였다.

배양액 중의 당 정량 : 배양이 끝난 배양액은 거르고 균체는 5회 씻어 이 씻은 액을 거른 액과 합쳐 일정량으로 정용한 다음 이를 분석용 시료로 하였다. 환원당 정량은 AOAC법⁽⁴²⁾에 따르고 환원당량을 전분량으로 환산하여 전분 이용 효율을 계산하였다.

배양액의 pH 측정 : 배양액의 pH는 Expandmatic ss-2(Beckman 회사제) pH 메타로 측정하였다.

결과 및 고찰

균주 선발 및 동정

균주 선발 : 각 분리원으로 부터 분리된 균주수와 이들이 생산하는 균체량 및 지방질의 양을 보면 전분 이용성이 있는 총 199균주 중 53.7%인 107균주가 배지 50ml당 0.5g 이하의 균체를 생산하였고 1g 이상을 생산하는 경우는 전체의 2.5%인 5균주에 불과하였으며 지방질 함량은 전체의 91.9%인 183균주가 15% 이하이었고 3.5%인 7균주만이 20% 이상이었다. 또 분리원 별로 보면 서류에서 균체량 및 지방질 함량이 비교적 높은 균주가 분리되었다. 이들 분리균주 중 균체량이 1g 이상이며 지방질 함량이 20% 이상인 균주는 FRI 0007 및 FRI 0267 균주였으며, 균체량 1.4g, 지방질 함량 24.1%인 FRI 0007 균주를 균체 및 지방질 생산을 위한 최우수 균주로 선발하였다.

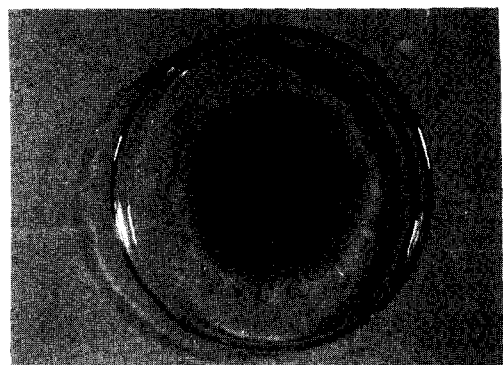


Fig. 1. The Aerial Mycelium of FRI 0007 Grown on Potato Agar Plate.

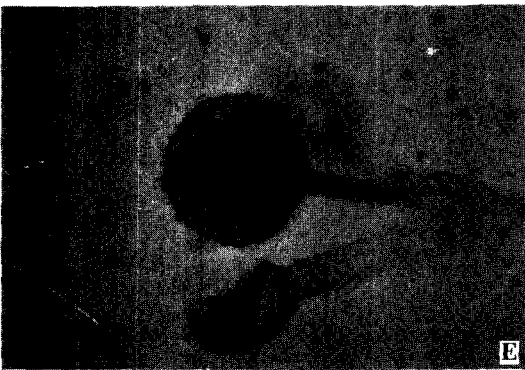
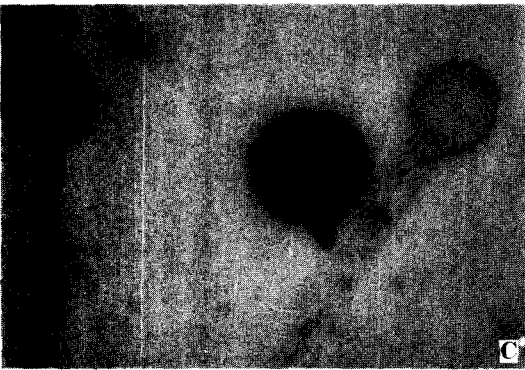
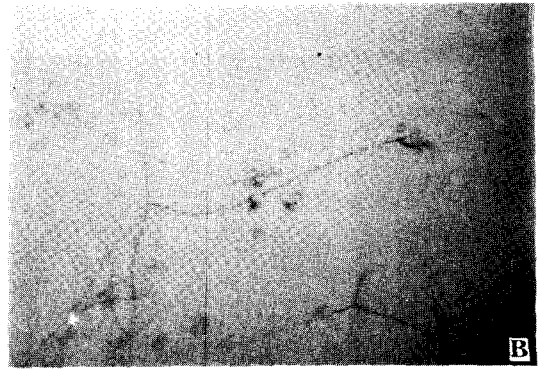
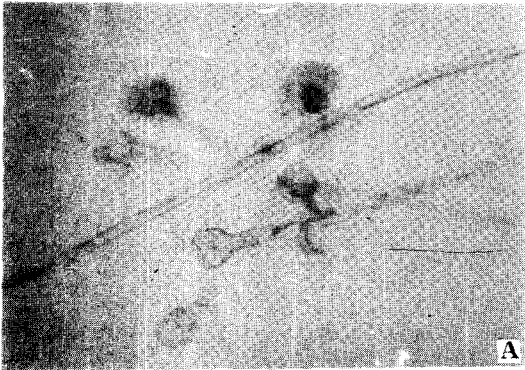


Fig. 2. Microphotograph of FRI 0007

- a: Showing no septum and rhizoid of hyphae.
- b: Branched sporangiophores born at any point on hyphae.
- c: A many-spored sporangium and globe of terminating hyphae.
- d: A sporangium with fine needle-shaped crystals.
- e: A pear-shaped columella of sporangium.
- f: Forming of a zygote.

선발균주의 동정 : 형성된 분리균 FRI0007의 colony를 육안으로 관찰한 결과 25, 37 및 41°C 중 37°C에서 가장 빨랐으며 형성된 colony는 스텔모양의 기중균사(Fig. 1)로 색깔은 배양 초기에는 흰색이고 4~5일 후에는 선명치 않은 회색이며 7일에는 갈색을 띤 회색으로 변화하였다.

균사체의 현미경 관찰에서 균사체에는 격벽이 없고 가근과 표복지가 없으며(Fig. 2a), 균사 어느 위치에서나 수직의 포자낭병이 발견되는데 하나의 포자낭병에서 여러개의 가지를 형성하며(Fig. 2b) 그 끝이 팽대, 내생포자를 포함하는 포자낭을 만든다(Fig. 2c). 포자낭막이 터지면 둥글거나 혹은 타원형의 포자가 분산되며 41°C에서 잠자 한천 평판배지에 2~3일간 배양하면 생성된 포자낭막의 표면에 바늘 모양의 침들이 나타나며(Fig. 2d) 증축은 달걀 혹은 서양배 모양을 하고 있다(Fig. 2e). 한편, 다른 2개의 균사가 접합하여 접합포자를 형성하는 특징이 있다(Fig. 2f). 이상의 결과로부터 FRI0007 균주는 *Mucor plumbeus*로 동정하였다.

전분 농도에 따른 균체량 및 지방질 함량

Mucor plumbeus FRI0007의 증식배지에 탄소원으로 전분을 공급하는 경우 균체 생산과 균체 중 지방질의 함량을 가장 높게 하는 전분의 농도를 알기 위하여 전분 농도별 배양기간에 따른

균체량 및 이의 지방질 함량을 측정하여 그 평균치를 표시한 결과는 Table 2와 같다.

즉 배지중 전분 농도에 따라 생성된 균체량과 지방질 함량은 각각 차이가 있었는데 전분농도가 9%인 경우 균체량은 배양 15일째에 최고에 이르러 $0.93 \pm 0.08 \text{g}/50 \text{ml}$ 이었고 지방질은 배양 5일째에 최고에 도달하여 21.34%이었다. 13%인 경우 균체량은 15일째에 $1.38 \pm 0.12 \text{g}/50 \text{ml}$, 지방질 함량은 26%이었고, 17%인 경우 균체량과 지방질 함량은 15일째에 각각 $1.61 \pm 0.20 \text{g}/50 \text{ml}$ 및 34.06%로 최고이었으며, 21%인 경우 균체량은 20일째에 $2.09 \pm 0.24 \text{g}/50 \text{ml}$, 지방질 함량은 15일째 41.68%에 도달하여 모든 처리구 중 균체량은 전분농도가 21%인 20일에서, 지방질 함량은 같은 전분농도에서 15일째 가장 높았다.

이상의 결과에 의하면 균체량과 지방질 함량이 최고에 도달하는 기간은 모두 일치하지는 않고 있다. 다른 연구자에 의하면 *Penicillium javanicum*은 포도당이 21.3~60.3%인 배지에서 배양하는 경우 균체량은 21.3%에서 가장 높았으나 지방질 함량은 41.6%에서 높았다고 보고하였으며 *Aspergillus nidulans*, *Fusarium*속 균주, *Penicillium frequentans*도 포도당 함량을 2.5%에서 7.5%로 증가시키에 따라서 균체량은 증가하나 지방질의 함량에는 큰 차이가 없다고 보고하고 있어 본 연구 결과와 비슷한 경향을 보이고 있다.

Table 2. Influence of Starch Concentration in Medium on Felt and Lipid Formation by *Mucor plumbeus* FRI 0007

Starch concentration (%) ^a	Measurement	Incubation day ^d			
		5	10	15	20
9	Felt wt (g) ^b	0.69 ± 0.03	0.77 ± 0.16	0.93 ± 0.08	0.85 ± 0.07
	Lipid Content (%) ^c	21.34	18.39	14.00	16.59
13	Felt wt (g)	0.63 ± 0.06	0.83 ± 0.03	1.38 ± 0.12	1.24 ± 0.33
	Lipid content (%)	19.43	19.24	25.09	26.00
17	Felt wt (g)	0.44 ± 0.05	0.79 ± 0.09	1.61 ± 0.20	1.52 ± 0.43
	Lipid content (%)	20.23	23.30	34.06	32.90
21	Felt wt (g)	0.41 ± 0.08	0.80 ± 0.14	2.00 ± 0.30	2.09 ± 0.24
	Lipid content (%)	20.09	23.92	41.68	37.43

a. The same medium as Table 1 except starch.

b. Felt weight from 50ml of medium.

c. Extracted by Soxhlet with methanol for 16 hours.

d. Incubated at 37°C.

질소원과 그 농도에 따른 균체량 및 지방질 함량

미생물에 의한 지방질 생산에 있어서는 탄소원과 함께 질소원의 종류나 농도가 대단히 중요하여^(16, 18, 19, 31) Table 2와 같이 균체량 및 지방질 함량이 최고치에 도달한 전분 21% 배지에 각 질소원을 단계 농도별로 첨가하여 배양 기간별 균체량 및 지방질 함량을 측정된 결과는 Table 3과 같다.

즉 질산나트륨, 질산칼륨, 질산마그네슘, 요소 및 초산암모늄을 각각 첨가하여 배양한 결과 각 질소원으로 부터 상당량의 균체 및 지방질이 생산되었는데 일반적으로 배양초기에는 질소함량이 높을수록 생산되는 균체량이 많은 경향이며 최고 균체량에 도달하는 기간은 질소원 및 그 농도에 따라 약간의 차이는 있으나 대개 25일이었으며 지방질 함량은 초산카륨을 제외하고는 균체량이 가장 많을 때 최고치에 도달하였고 질소함량 및 배양기간에 따른 일정한 경향을 찾아볼 수 없었다. 각 질소원별로 균체량 및 지방질 함량이 가장 높은 농도와 배양기간을 보면 질산나트륨의 경우는 4.78g/l 첨가하여 25일 배양한 경우로 이때 균체량은 $1.89 \pm 0.05\text{g}/50\text{ml}$, 지방질은 46.12%이었고 질산칼륨은 7.22g/l 첨가하여 25일 배양하였을 때 균체량은 $1.87 \pm 0.17\text{g}/50\text{ml}$, 지방질은 49.08%이었으나 15일 배양시의 지방질 함량 52.61%보다는 낮았다. 또 질산마그네슘을 9.15g/l 첨가하여 25일 배양하였을 경우 균체량은 $2.38 \pm 0.28\text{g}/50\text{ml}$, 지방질 함량은 47.50%이었고 요소는 2.14g/l 첨가하여 25일 배양에서 균체량은 $2.39 \pm 0.07\text{g}/50\text{ml}$, 지방질 함량은 50.73%이었고 초산암모늄을 5.50g/l 첨가하였을 때 25일 배양에서 균체량은 $1.71 \pm 0.29\text{g}/50\text{ml}$, 지방질함량은 47.31%이었다. 이와같이 질소원에 따른 균체량 및 지방질 함량을 비교한 결과 요소를 2.14g/l 사용한 경우에 있어서 플라스크당 균체 및 지방질 수득량이 다른 질소원 보다 가장 높았다. 이와같은 현상은 균중에 따라 각종 질소원에 대한 이용도가 다르다는 보고와 같으며, *Penicillium lilacinum*⁽¹⁹⁾과 *Aspergillus terreus*, *Cladosporium herbarum* 및 *Cl. fulvum*⁽¹⁶⁾은 각각 포도당과 자당을 탄소원으로 하여 질산나트륨을 공급하였을 경우 균체량 및 지방질

함량이 다른 질소원보다 높으며 *Rhizoctonia solani*, *Phythium irregulare* 및 *Alternaria tenuis*⁽²⁶⁾와 *Fusarium oxysporum*⁽⁴³⁾은 질산칼륨을 공급하는 경우 가장 높았다. *Penicillium lilacinum*⁽¹⁸⁾은 질산마그네슘의 경우 다른 질소원보다 균체량은 높았으나 지방질함량은 질산나트륨보다 낮았고 *Aspergillus ochraceus*⁽¹⁶⁾, *Rhodotorula gracilis*⁽²⁷⁾ 및 *Mucor sp.*⁽²⁶⁾는 요소를 이용하는 경우 다른 질소원보다 균체량 및 지방질 함량이 높았다.

이상의 결과에서 *Mucor plumbeus* FRI 0007은 질소원으로 요소를 이용하는 경우 균체량 및 지방질 함량이 다른 질소원에 비하여 높으며 전분 농도 21%에서 최적농도는 2.14g/l임을 알 수 있었다.

각종 무기질과 그 농도에 따른 균체량 및 지방질 함량

미생물을 이용한 지방질 생산 실험에서 사용되는 모든 합성배지에는 무기질이 함유되어 있으며^(15, 17, 31) 일반적으로 칼륨, 마그네슘, 철 등이 중요한 것으로 알려져 있다.^(18, 31, 33, 44)

따라서 전분 21%와 요소 2.14g/l이 함유된 기초배지에 이들 주요 무기질의 종류와 농도를 달리하여 실험한 결과는 Table 1와 같다. 즉 황산아연을 0.01~0.10g/l 첨가한 결과 0.05g/l에서 균체량은 최고에 도달하여 $1.99 \pm 0.21\text{g}/50\text{ml}$ 이 생성되었고 지방질은 0.10g/l에서 49.28%에 이르나 전체적으로 황산아연 첨가량에 따른 큰 변화는 없는 것으로 판단되었다. 황산마그네슘을 단일 무기질로 첨가하였을 경우는 다른 무기질류와 함께 혼합하여 사용한 경우보다 균체량 및 지방질 함량이 가장 높아서 균체량은 $2.67 \pm 0.32\text{g}/50\text{ml}$, 지방질 함량은 54.8%이었다. 이 결과를 Table 3중 요소 사용구와 비교하여 볼 때 균체량은 약 11.7%, 지방질 함량은 약 4.07%가 높았다.

이와같은 현상은 *Aspergillus nidulans*,^(31, 44) *Penicillium lilacinum*⁽¹⁸⁾과 *Penicillium javanicum* 및 *Penicillium spinulosum*⁽⁴⁴⁾을 배양하였을 때 황산마그네슘을 첨가하여 실험한 결과와 비슷하나 이들은 다같이 여러 무기질을 사용하면서 마그네슘의 함량을 달리하므로서 균체 및 지

Table 3. Influence of Nitrogen Sources in Felt and Lipid Formation by *Mucor plumbeus* FRI 0007

Nitrogen compound (g/l) ^a		Measurement	Incubation day ^d			
Source	Weight (g/l)		10	15	20	25
NaNO ₃	1.82	Felt wt (g) ^b	0.41 ± 0.02	0.66 ± 0.16	0.44 ± 0.22	0.46 ± 0.22
		Lipig (%) ^c	40.26	46.67	33.68	31.20
	3.30	Felt wt (g)	0.58 ± 0.02	0.95 ± 0.08	0.64 ± 0.03	0.74 ± 0.06
		Lipid (%)	38.63	49.21	38.98	41.60
4.78	Felt wt (g)	0.84 ± 0.06	1.39 ± 0.23	1.67 ± 0.03	1.89 ± 0.05	
	Lipid (%)	41.50	43.32	45.10	46.12	
6.07	Felt wt (g)	0.86 ± 0.03	1.35 ± 0.07	1.15 ± 0.03	1.24 ± 0.12	
	Lipid (%)	33.37	41.80	37.42	37.52	
KNO ₃	2.16	Felt wt (g)	0.47 ± 0.30	0.67 ± 0.12	0.46 ± 0.07	0.51 ± 0.04
		Lipid (%)	37.7	41.13	27.65	29.67
	3.61	Felt wt (g)	0.61 ± 0.02	0.99 ± 0.23	0.92 ± 0.28	0.81 ± 0.04
		Lipid (%)	39.09	50.04	48.52	38.74
5.68	Felt (g)	1.03 ± 0.17	1.35 ± 0.16	1.12 ± 0.07	1.10 ± 0.03	
	Lipid (%)	50.18	52.55	40.76	34.76	
7.22	Felt wt (g)	1.10 ± 0.13	1.84 ± 0.26	1.43 ± 0.12	1.87 ± 0.17	
	Lipid (%)	43.98	52.61	43.80	49.80	
Mg(NO ₃) ₂ •6H ₂ O	5.49	Felt wt (g)	0.58 ± 0.03	1.05 ± 0.11	1.08 ± 0.26	1.40 ± 0.15
		Lipid (%)	37.99	53.00	47.04	56.82
	9.15	Felt wt (g)	1.00 ± 0.09	1.68 ± 0.11	1.62 ± 0.23	2.38 ± 0.28
		Lipid (%)	41.45	46.78	38.07	47.50
14.41	Felt wt (g)	1.32 ± 0.19	1.95 ± 0.13	1.99 ± 0.28	2.04 ± 0.15	
	Lipid (%)	39.60	39.38	30.94	25.61	
18.31	Felt wt (g)	1.38 ± 0.18	2.01 ± 0.14	1.77 ± 0.06	1.76 ± 0.18	
	Lipid (%)	32.55	31.27	52.22	26.02	
(NH ₂) ₂ CO	1.28	Felt wt (g)	0.66 ± 0.01	0.82 ± 0.01	0.82 ± 0.02	1.29 ± 0.17
		Lipid (%)	30.76	28.44	25.72	44.76
	2.14	Felt wt (g)	0.81 ± 0.01	1.19 ± 0.14	1.82 ± 0.04	2.39 ± 0.07
		Lipid (%)	31.95	39.9	40.37	50.73
3.37	Felt wt (g)	1.15 ± 0.06	1.45	1.75 ± 0.15	2.09 ± 0.03	
	Lipid (%)	31.25	41.45	34.44	38.40	
4.29	Felt wt (g)	1.28 ± 0.02	2.29 ± 0.19	2.09 ± 0.31	2.16 ± 0.48	
	Lipid (%)	41.13	42.87	30.02	43.77	
CH ₃ COONH ₄	1.65	Felt wt (g)	0.39 ± 0.01	0.40 ± 0.05	0.47 ± 0.11	0.58 ± 0.10
		Lipid (%)	27.87	23.46	25.02	33.40
	2.75	Felt wt (g)	0.51 ± 0.02	0.61 ± 0.03	0.65 ± 0.02	0.75 ± 0.19
		Lipid (%)	32.57	22.50	25.04	34.05
4.33	Felt wt (g)	0.74 ± 0.04	0.74 ± 0.04	1.15 ± 0.22	1.25 ± 0.23	
	Lipid (%)	32.40	31.38	35.69	44.99	
5.50	Felt wt (g)	0.45 ± 0.05	0.70 ± 0.08	1.14 ± 0.72	1.71 ± 0.29	
	Lipid (%)	38.45	33.93	27.10	47.31	

a. Basal medium contains 21% of starch and all minerals as Table 1.

b.-d. See foot notes in Table 2.

방질 함량이 변화되는 것으로 보고하였고 단독 사용에 관한 보고는 없는데 본 실험의 결과는 대단히 흥미로운 현상이나 *Saccharomyces cerevisiae*에서 마그네슘은 Acetyl-CoA로부터 지방산 합성을 촉진한다는 보고도⁽⁴⁵⁾ 있어 이와도 관계가 있지 않을까 생각된다.

인산이수소나트륨의 경우는 첨가량이 증가함에 따라 균체량은 증가하는 경향이며 지방질 함량은 10g/l 첨가하였을 때 최고에 이르게 되나 다른 처리구와 비교할 때 균체량 및 지방질 함량은 높지 않았다. 황산칼륨 첨가 결과를 보면 첨가량이 0.22g/l에서 0.66g/l로 증가함에 따라 균체량 및 지방질 함량이 약간 감소하는 경향을 보이고 있으나 황산칼륨만을 0.44g/l 첨가한 경우 다른 실험구에 비하여 균체량 및 지방질 함량이 다같이 높아서 균체는 2.75±0.16g/50ml, 지방질 함량은 54.68%에 이르고 있다.

이와같은 현상은 *Penicillium soppi*⁽³³⁾에서 황

산칼륨 함량을 0.11g/l로부터 0.22g/l로 증가시키기에 따라 균체량 및 지방질 함량이 증가하며 *Aspergillus nidulans*에서는 칼륨의 양이 9.8mg/l, *Penicillium javanicum*과 *Penicillium spinulosum*에서는 1.954mg/l일 때 최적조건이 된다는 보고와⁽⁴⁴⁾ 비슷하나 이들은 무기질을 복합적으로 사용하여 함량변화에 따른 최적조건을 검토한 것이며 칼륨 단일 첨가에 의한 실험보고는 없어 이런 현상은 마그네슘의 경우와 함께 더 연구되어야 할 과제라 생각된다. 염화제 2철의 경우는 첨가량이 0.08g/l에서 0.24g/l로 증가함에 따라 균체량은 증가하는 추세이나 지방질 함량은 일정한 경향을 찾기는 어려웠다. 첨가량이 0.24g/l일 때 균체량은 2.58±0.33g/50ml 이었고 이 때 지방질 함량은 54.43%이었다. 이와같은 결과는 *Lipomyces starkeyi* 배양⁽¹²⁾에서 철의 농도를 0.04, 0.10 및 0.50mg/l로 증가시키기에 따라 균체량 및 지방질 함량이 증가하였고 1mg/l

Table 4. Influence of Mineral Sources on Felt and Lipid Formation *Mucor plumbeus* FRI 0007

Minerals ^a	Level	0.00 g/l	0.01 g/l	0.05 g/l	0.10 g/l	Only ZnSO ₄ added 0.05 g/l	No minerals added
ZnSO ₄ •7H ₂ O	Felt wt (g) ^b	1.54 ± 0.09	1.77 ± 0.07	1.99 ± 0.21	1.96 ± 0.23	0.61 ± 0.18	Trace
	Lipid content (%) ^c	39.01	40.50	47.12	49.28	—	—
MgSO ₄ •7H ₂ O		0.00 g/l	2.50 g/l	5.00 g/l	7.50 g/l	only MgSO ₄ added 5 g/l	No minerals added
	Felt wt (g) Lipid content (%)	1.40 ± 0.12 48.28	1.98 ± 0.20 51.89	1.96 ± 0.17 46.20	2.32 ± 0.39 49.42	2.67 ± 0.32 54.8	Trace —
NaH ₂ PO ₄ •2H ₂ O		0.00 g/l	4.00 g/l	7.30 g/l	10.00 g/l	only NaH ₂ PO ₄ added 7.30 g/l	No minerals added
	Felt wt (g) Lipid content (%)	1.67 ± 0.34 42.00	1.92 ± 0.18 42.61	2.15 ± 0.28 44.78	2.35 ± 0.18 42.52	0.07 —	Trace —
K ₂ SO ₄		0.00 g/l	0.22 g/l	0.44 g/l	0.66 g/l	only K ₂ SO ₄ added 0.44 g/l	No minerals added
	Felt wt (g) Lipid content (%)	2.54 ± 0.21 48.30	2.63 ± 0.35 57.18	2.56 ± 0.47 54.56	2.48 ± 0.28 49.94	2.75 ± 0.16 54.68	Trace —
FeCl ₃ •6H ₂ O		0.00 g/l	0.08 g/l	0.16 g/l	0.24 g/l	only FeCl ₃ added 0.16 g/l	No minerals added
	Felt wt (g) Lipid content (%)	2.18 ± 0.50 50.58	2.15 ± 0.30 46.12	2.52 ± 0.31 56.00	2.58 ± 0.33 54.43	0.09 —	Trace —

a. Basal medium contains 21% of starch, 2.14 g/l of urea and all minerals as Table 1.

b. Felt weight from 50ml of medium after 25 days incubation.

c. See foot in Table 2.

로 높아지면 균체량 및 지방질 함량은 오히려 감소한다고 하였는데 Table 4에서 보면 철은 50mg/l 첨가한 경우가 더 소량 첨가한 경우보다 균체량은 더 높은 경향을 보였다.

이상의 결과를 종합적으로 고찰하여 볼 때 첫째, 무기질원을 전연 공급하지 않았을 경우 *Mucor plumbeus* FRI 0007은 전혀 생육하지 않았으며, 둘째, 첨가한 무기질 5종 중 어느 한 가지를 제외하였을 경우에도 균체량 및 지방질 함량에서 다른 처리구에 비하여 약간 떨어지는 경향은 보이고 있으나 어느 구에서도 성장이 완전히 저해받지는 않는 것으로 보아서 5종의 무기질 중 4종이 존재하면 1종은 필수 요소가 아닌 것 같으며, 셋째, 5종의 무기질 중 황산마그네슘 혹은 황산칼륨을 무기질원으로 단독 공급하였을 경우가 5종의 무기질을 복합으로 공급하였을 경우보다도 오히려 균체량은 10% 이상, 지방질량은 약 4% 상승된다는 결과를 얻었다. 이와같은 현상은 현재까지 사상균 및 효모를 이용한 지방질 생산실험에서 그 예를 찾아보기 힘든 것으로 *Mucor plumbeus* FRI 0007 특유의 생리적

현상이라 추측되어 이에 관한 더 구체적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

선정배지에서의 균체량 및 지방질함량

Table 4의 결과를 고찰하여 균체량 및 지방질 함량이 높은 황산마그네슘만을 5.00g/l 첨가한 B배지, 황산마그네슘 5.00g/l과 황산칼륨 0.44g/l을 같이 첨가한 C배지, 그리고 Table 1과 같은 무기질에 염화제 2철만을 0.24g/l 첨가한 D배지에 대하여 배양기간별 균체량 및 지방질 함량을 측정된 결과는 Table 5와 같다.

즉, 전체적으로 배양기간에 따라 균체량은 증가하는 경향이며 배양초기부터 생성된 균체량은 배지 조성별로 차이가 있었다. 우선 전체 배양기간 중 배지 50ml당 균체량을 보면 A배지에서는 배양 10일에 1.21±0.20g에서 25일에는 2.58±0.17g으로, B배지는 1.56±0.09g에서 2.02±0.19g으로, C배지는 1.16±0.30g에서 2.12±0.11g으로, 그리고 D배지는 1.00±0.08g에서 2.01±0.05g으로 증가하여 모두 배양 25일에 균체량이 최고에 달하였다. 한편 균체 중 지방질 함량을

Table 5. The Felt and Lipid Formation on each Chosen Medium by *Mucor plumbeus* FRI 0007

Medium ^a	Measurement	Incubation day ^d			
		10	15	20	25
A medium	Felt wt (g) ^b	1.21 ± 0.20	2.00 ± 0.35	2.11 ± 0.17	2.58 ± 0.17
	Lipid content (%) ^f	47.85	49.11	46.55	48.04
	Lipid (g)/flask	0.58	0.98	0.98	1.24
B medium	Felt wt (g)	1.56 ± 0.09	1.59 ± 0.12	2.00 ± 0.24	2.02 ± 0.19
	Lipid content (%)	57.07	57.38	61.90	58.72
	Lipid (g)/flash	0.89	0.91	1.24	1.19
C medium	Felt wt (g)	1.16 ± 0.30	1.52 ± 0.43	1.90 ± 0.22	2.12 ± 0.11
	Lipid content (%)	50.89	63.94	58.69	60.88
	Lipid (g)/flask	0.64	0.97	1.12	1.29
D medium	Felt wt (g)	1.00 ± 0.08	1.44 ± 0.13	1.60 ± 0.07	2.01 ± 0.05
	Lipid (%)	51.40	44.22	46.34	54.91
	Lipid (g)/flask	0.51	0.64	0.74	1.10

a. Each medium consists of basal medium (21% starch and 2.14 g/l urea) plus minerals as shown below:

A medium; MgSO₄•7H₂O (5.00 g/l)

B medium; K₂SO₄ (0.44 g/l)

C medium; MgSO₄•7H₂O (5.00 g/l) + K₂SO₄ (0.44 g/l)

D medium; All minerals in Table 1 except FeCl₃•6H₂O (0.24 g/l)

b.-d. See foot notes in Table 2.

보면 A배지와 C배지는 배양 15일에 각각 49.11% 및 63.94%로 최고에 도달하였고 B배지는 20일에 61.90% 그리고 D배지는 25일에 54.91%에 달하였다. 이 결과를 배지 50ml에서 생산된 총 지방질량으로 표시하면 A배지는 1.24g, C배지는 1.29g, D배지는 1.10g으로 배양 25일에 최고에 도달하였고 B배지는 20일에 최고에 도달하여 1.24g을 생산하였다.

Pruess 등⁽⁴⁰⁾에 의하면 배양액 50ml를 기준으로 *Aspergillus*속 중 19종에 대한 실험을 실시하여 그 중 균체량이 가장 높은 것은 *Aspergillus cinamomeus*로 1.81g을 생산하였고 지방질 함량이 가장 높은 것은 *Aspergillus nidulans*로 그 함량은 19.9%이었으며 배양액 50ml당 0.33g의 지방질을 생산하였고 Singh 등⁽⁴⁶⁾에 의하면 자당이 20% 함유된 배지에서 *Aspergillus nidulans*는 3.28g의 균체로 부터 27%의 지방질을 생산할 수 있어 배양액 50ml당 0.88g의 지방질을 생산하였다고 보고하였다. 같은 자당을 이용하여 *Cladosporium herharum*⁽¹⁶⁾은 배지 50ml당 2.5g의 균체와 이중 지방질 함량이 29%로 0.72g의 지방질을 생산하였고, *Aspergillus terreus*⁽⁴⁷⁾는 균체 2.12g 중 지방질 46.60%로 50ml당 0.99g의 지방질을 생산하였다고 보고하였다. 또 유장에 포도당을 첨가하여 *Penicillium frequentans*⁽²³⁾를 배양한 결과, 균체량 1.24g, 지방질함량 10.5%로 지방질 생산량은 0.14g/50ml이었다고 보고되었다. 전분을 기질로한 경우는 *Penicillium lilacinum*⁽¹⁸⁾에서 균체량은 1.28g, 지방질함량은 20.9%로 배양액 50ml당 0.27g의 지방질을 생산하였으며 *Aspergillus nidulans*, *Penicillium javani-*

cum 및 *Penicillium spinulosum*⁽³¹⁾는 전분을 탄소원으로 사용하는 경우 다른 당류에 비하여 이용효율이 대단히 낮은 것으로 보고하였다.

이상의 결과를 Table 5와 대비하여 보면 *Mucor plumbeus* FRI 0007은 전분을 잘 이용하여 균체내에 지방질을 축적하며 포도당과 자당을 이용하는 다른 균종의 경우보다 비교적 많은 균체를 생산하고 또 지방질 함량도 높은 것을 알 수 있다.

따라서 *Mucor plumbeus* FRI 0007을 이용하여 지방질을 생산하는 경우 전분농도는 21%, 질소원은 요소가 바람직하며 그 농도는 2.14g/l가 적당하다. 이때 무기질류는 복합으로 첨가하는 것보다 황산마그네슘이나 황산칼륨 단독 또는 이것을 혼합하여 사용하는 경우 다른 조성의 배지에 비하여 생산되는 균체량 및 지방질 함량이 높았다. 본 실험에서 소비된 탄소원의 양에 대하여 생성된 균체량 및 지방질량을 비교한 결과는 Table 6과 같다.

즉, 소비 전분량에 대한 지방질 생산률은 황산칼륨을 단독으로 사용한 B배지에 있어서 가장 높아 15.37이고 다음이 황산마그네슘을 첨가한 A배지로 14.96인데 자당을 이용하여 *Penicillium soppi*⁽³³⁾를 배양한 경우 최고 지방질 생산율은 12.5이었고 *Aspergillus nidulans*는 17.2, *Penicillium javanicum*은 약 8.0, 그리고 *Aspergillus spinulosum*^(31, 48)은 약 10이었으며 *Penicillium lilacinum*⁽¹⁸⁾은 최고 13.8이었다고 보고되었다. 포도당을 이용하는 경우에는 *Aspergillus n nidulans*에서 13.9, *Penicillium javanicum*은 7.5, 그리고 *Penicillium spinulosum*⁽³¹⁾은 8.8로

Table 6. Lipid and Economic Coefficient in Each Medium

Medium ^a	Felt wt (g/50ml)	Lipid of felt (%)	Lipid wt (g/50ml)	Utilized starch wt (g/50ml)	Lipid coefficient ^b	Economic coefficient ^c
A	2.58 ± 0.17	48.04	1.24	8.29	14.96	32.12
B	2.02 ± 0.19	58.72	1.19	7.74	15.37	26.10
C	2.12 ± 0.11	60.88	1.29	8.85	14.58	23.95
D	2.01 ± 0.05	54.91	1.10	7.98	13.78	25.19

a. The same composition as Table 5.

b. The weight of lipid produced/100g of starch consumed.

c. The weight of felt produced/100g of starch consumed.

서 전분을 탄소원으로 하는 *Mucor plumbeus* FRI0007보다 약간 높은 것도 있으나 대부분 낮은 경향을 보였다. 사용된 전분량에 대한 균체 생산량을 대비한 균체 생산물은 A배지가 31.12로 가장 높고 다음이 B배지로 26.10을 나타내고 있는데 자당을 탄소원으로 하여 *Aspergillus terreus*를 배양한 경우 최고 30.5, 그리고 *Aspergillus ochraceus*⁽¹⁶⁾는 27.8이었으며 *Penicillium aurantiobrunneum*⁽¹⁷⁾의 경우 2회 배양에서 최고 35.03까지 얻을 수 있다고 보고하였고 전분을 이용한 연구보고는 찾아보기 어려우나 본 실험에서 사용한 *Mucor plumbeus* FRI 0007은 전분으로 부터도 포도당이나 자당과 비슷하거나 오히려 높은 균체 생산물을 얻을 수 있었다.

요 약

서류 및 각종 퇴비를 분리원으로 하여 전분 이용성이 좋은 균주는 분리하였고 이 균주를 이용하여 균체 및 지방질을 가장 많이 얻기 위한 최적 배양조건을 구명할 결과는 다음과 같다.

1. 선발된 우수 균주는 *Mucor plumbeus*로 동정되었다.

2. 이 균주는 전분을 탄소원으로 이용하여 그 함량이 21%임 경우 배양 20일 째에 균체량은 배지 50ml당 $2.09 \pm 0.24g$ 이고 지방질량은 건조 균체당 37.43%이었다.

3. 질소원으로서는 질산나트륨, 질산칼륨, 질산마그네슘, 요소, 및 초산암모늄 중 요소를 이용하는 경우 균체 및 지방질 생산량이 가장 높았고 그 최적 농도는 $2.14g/l$ 으로 배양 25일에서 균체량은 배지 50ml당 $2.39 \pm 0.07g$, 지방질 함량은 건조균체당 50.73%이었다.

4. 무기질원으로 황산아연, 황산마그네슘, 인산이수소나트륨, 황산칼륨 및 엽화제 2철은 모두 *Mucor plumbeus* FRI0007 생장에 필요하나 필수적으로 요구되지는 않으며 황산칼륨을 $0.44g/l$ 혹은 황산마그네슘을 $5.00g/l$ 만을 첨가하는 경우에 소비 전분량에 대한 지방질 생산물은 14.96 및 15.37, 균체 생산물은 31.12 및 26.10으로 다른 처리구 보다 높았다.

References

- 1) Lundin, H.: *J. Inst. Brewing*, **56**, 17 (1950).
- 2) Gill, C.O., Hall, M.J. and Ratledge, C.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**, 231 (1977).
- 3) Woodbine, M.: *Prog. in Industrial Microbiol.* **1**, 179 (1959).
- 4) Kuchmak, M. and Dugan, L.R. Jr.: *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **40**, 734 (1963).
- 5) Wassef, M.K.: *Advan. Lipid Res.*, **15**, 159 (1970).
- 6) Whiteworth, D.A. and Ratledge, C.: *Prog. Biochem.*, **9**, 14 (1974).
- 7) Thorpe, R.F. and Ratledge, C.: *J. Gen. Microbiol.*, **72**, 151 (1972).
- 8) Gill, C.O. and Ratledge, C.: *J. Gen. Microbiol.*, **78**, 337 (1973).
- 9) Babij, T., Moss, F.J. and Ralph, B.J.: *Biotechnol. Bioeng.*, **11**, 593 (1969).
- 10) Suzuki, T., Takigawa, A. and Hasegawa, K.: *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 2653 (1973).
- 11) Starkey, R.L.: *J. Bacteriol.*, **51**, 33 (1946).
- 12) Naganuma, T., Uzuka, Y., Tamaka, K. and Koga, T.: *Japan J. Agr. Chem.*, **49**, 335 (1975).
- 13) Kessell, R.H.J.: *J. Appl. Bacteriol.*, **31**, 220 (1968).
- 14) Allen, L.A., Barnard, N.H., Fleming, M. and Hoolis, B.: *J. Appl. Bacteriol.*, **27**, 27 (1964).
- 15) Singh, J. and Sood, M.G.: *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **50**, 485 (1973).
- 16) Singh, J. and Sood, M.G.: *J. Sci. Food Agr.*, **23**, 1113 (1972).
- 17) Singh, J. and Chopra, R.S.: *J. Sci. Ind. Res.*, **21C**, 135 (1962).
- 18) Phillip, S.E. and Walker, T.K.: *J. Sci. Food Agr.*, **9**, 223 (1958).
- 19) Duncan, B. *Mycologia*, **65**, 211 (1973).
- 20) Summer, J.L. and Morgan, E.D.: *J. Gen. Microbiol.*, **59**, 215 (1969).
- 21) Mumma, R.O., Fergus, C.L. and Sekura, R.O.: *Lipids*, **5**, 100 (1970).
- 22) Ward, G.E., Lockwood, L.B. and May, O.E.: *Ind. Eng. Chem.*, **27**, 318 (1935).
- 23) Abraham, M.J. and Srinivasan, R.A.: *J. Food and Technol.*, **16**, 11 (1979).
- 24) Borrow, A., Jefferys, F.G., Kessell, R.H.J., Lloyd, E.C., Lloyd, P.B. and Nixon I.S.: *Can. J. Microbiol.*

- 7, 227 (1961).
- 25) Bhatia, I.S., Raheja, R.K. and Sukhija, P.S.: *J. Sci. Food Agr.*, **24**, 779 (1973).
 - 26) Bhatia, I.S., Raheja, R.K. and Chahal, D.S.: *J. Sci. Food Agr.*, **23**, 1197 (1972).
 - 27) Enebo, L. and Iwamodo, H.L.: *Acta Chem. Scan.* **20**, 439 (1966).
 - 28) Tatsumi, C. and Nagagawa, M.: *J. Ferment. Associ., Japan*, **12**, 573 (1959).
 - 29) Gunasekaran, M.: *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **65**, 539 (1975).
 - 30) Prescott, S.C. and Dunn, C.C.: *Industrial Microbiology*, McGraw Hill, 3rd ed., pp. 654-665 (1959).
 - 31) Garrido, J.M. and Walker, T.K.: *J. Food Sci. Agr.*, **7**, 233 (1956).
 - 32) Barber, H.H.: *Biochem. J.*, **23**, 1158 (1929).
 - 33) Murray, S. and Walker, T.K.: *J. Food Sci. Agr.* **7**, 237 (1956).
 - 34) Miller, T.L., Lie, S. and Johnson, M.J.: *Biotechnol. Bioeng.*, **6**, 299 (1964).
 - 35) Walker, J.D. and Cooney, J.J.: *Appl. Microbiol.*, **26**, 705 (1973).
 - 36) Smith, G. and Raistrick, H.: *An Introduction to Industrial Mycology*, Edward Arnold LTD, pp. 35-39 (1960).
 - 37) Emmons, C.W., Binford, C.H., Utz, J.P. and Knorr, Chung, K.J.: *Medical Mycology*, Lea and Febiger, Phil., pp. 525 (1977).
 - 38) Hazen, E.L., Gordon, M.A. and Reed, F.C.: *Laboratory Identification of Pathogenic Fungi Simplified*, Chales C. Thomas Co., pp. 192-193 (1970).
 - 39) Alexopoulos, C.J.: *Introductory Mycology*, 2nd ed., John Wiley and Sons, Inc., pp. 184-210 (1962).
 - 40) Pruess L.M., Einchingner, F.C. and Peterson W.H.: *Zentr. Bakt. Parasit.* **89**, 370 (1934).
 - 41) Shigyo, F. and Takeuchi, M.: *Japan J. Agri. Chem.*, **46**, 27 (1972).
 - 42) AOAC: *Official Methods of Analysis of the Association of Official Chemists*, ed. Horwitz W., 13th ed. 8, 8 019, 31 038, 31, 040 (1980).
 - 43) Bhatia, I.S. and Arneja, J.S.: *J. Sci. Food Agr.*, **29**, 611 (1978).
 - 44) Garrido, J.M., Woodbine, M. and Walker, T.: *Am. Real. Soc. Fis. Quim.*, **40**, 829 (1953).
 - 45) Rasmussen, R.K. and Klein, H.P.: *J. Bacteriol.*, **95**, 157 (1968).
 - 46) Singh, J. and Datt, I.: *J. Sci. Ind. Res.*, **17C**, 7 (1958).
 - 47) Yoo, J.Y., Shin, D.H., Yim, H. and Min, B.Y.: *Korean J. Food Sci. and Technol.*, **12**, 97 (1980).
 - 48) Garrido, J.M. and Walker, T.K.: *Am. Real. Soc. Fsp Fis. Quim*, **49**, 839 (1953).