

## *Hansenula anomala* var. *anomala* 에 의한 구연산 生産에 關한 研究

吳 萬 鎭 · 朴 允 仲 · 李 錫 健

忠南大學校 農科大學  
(1973년 8월 29일 수리)

## Studies on the Citric Acid Production by *Hansenula anomala* var. *anomala*

by

Man-Jin Oh, Yoon-Joong Park, and Suk-Kun Lee

College of Agriculture, Chung Nam University

(Received August 29, 1973)

### Abstract

A potent citric acid producing strain was selected by an extensive screening test of the yeasts isolated from the various sources. These experiments were conducted to identify the selected strain and investigate the cultural conditions for citric acid production. The results obtained were as follows:

1. The selected strain of yeast was identified to *Hansenula anomala* var. *anomala* by a taxonomic study of Lodder.
2. The optimum conditions for citric acid production in the basal medium containing 10% glucose were: temperature 30° C, the concentration of CaCO<sub>3</sub> 3% and the velocity of oscillation 110 oscillations/min.
3. As a nitrogen source of the basal medium NH<sub>4</sub>Cl(0.1%) was the most effective for citric acid production. Organic nitrogen sources such as peptone were adequate for growth of the strain but not for citric acid production.
4. The most effective concentration of glucose was 10% in yield ratio of citric acid from sugar.
5. The addition of defatted rape seed, defatted perilla or defatted rice bran to the medium was effective for citric acid production. When 5% extract solution of defatted rape seed was added, the citric acid production was increased as much as 40% as compared with the case of adding yeast extract(0.2%).
6. The most effective concentration of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O in the medium(for citric acid production) was 0.05% and 0.025% respectively.
7. Under the optimum cultural conditions, the growth of the strain was continued up to 5 days and the increase of citric acid production was continued up to 6 days, showing the yield ratio of 46% to glucose.

### 緒 論

微生物에 의한 구연산 生産에 關한 研究는 1893年

Wehmer 가 *Citromyces* 屬菌이 蔗糖溶液에서 구연산을 生成한다고 發表한 以後 많은 研究 報告가 있었다.

1903年 Thom 및 Church는 *Penicillium* 屬에 의한 구연산 生産을 試圖한 바 있으나 이 方法은 醱酵 期間이

길며 雜菌의 汚染度가 높고 菌의 退化가 빨라 實用化되지 못하였다. 그 後 Thom 等<sup>(1)</sup>, Currie<sup>(2)</sup>, Amelung<sup>(3)</sup>, Doelger 等<sup>(4)</sup> 많은 사람에 의하여 *Asp. niger* 에 의한 表面 培養法이 研究 報告되었으며 1947 年 以後 Waksman 等<sup>(5)</sup>, Johnson 等<sup>(6)</sup>, 掘井 等<sup>(7)</sup>은 *Asp. niger* 의 液內 培養法을 研究 發表하였다.

1950 年 以後에는 照井<sup>(8)</sup>, 望月 等<sup>(9)</sup>이 *Asp. niger* 를 使用하여 澱粉粕과 당밀을 原料로 한 구연酸의 生産에 관하여 研究 報告한 바 있다. 또한 Chughtai<sup>(10)</sup> 坂口 等<sup>(11)</sup>은 *Asp. niger* 에 依하여 糖質을 主原料로 구연酸을 生産할 때에는 原料中의 重金屬 ion 을 除去하기 爲하여 原料의 前處理를 하거나 生酸促進劑로서 NaCN, 粉乳 等を 添加할 必要가 있다고 하였다. 特히 1960 年 野口 等<sup>(12)</sup>은 *Asp. niger* 를 使用하여 당밀 培地에 植菌 前에 3% 의 methanol 를 添加시켜 振盪 培養하던 2 倍 程度의 收率을 增加시킬 수 있다고 報告한 바 있다.

또 高見<sup>(13)</sup>는 *Asp. niger* 를 使用하여 蔗糖 培地에 表面 培養時에는 植菌 1 日後에 NaF 를 添加하여  $10^{-4} \sim 2 \times 10^{-10}$  M 濃度로, 深部 培養時에는  $10^{-5}$  M 濃度로 하면 約 2 倍 程度의 收率을 올릴 수 있었으며 特히 表面 培養에서 보다 深部培養에서 效果가 현저하였다고 報告한 바 있다.

1968 年 田淵 等<sup>(14)</sup>은 포도당과 탄산칼슘 含有 培地에서 酵母의 振盪 培養法에 依하여 구연酸 生産을 試圖한 結果 *Saccharomyces*, *Pichia*, *Debaromyces*, *Hansenula*, *Candida*, *Torulopsis*, *Trichosporon* 屬 等이 구연酸 生産能이 있다고 報告하였다.

그 後 田淵<sup>(15)</sup> 等은 回轉 振盪機에서 10% glucose 와 5% CaCO<sub>3</sub> 를 添加한 培地를 使用하여 培養할 때 *Candida lipolytica* 는 對糖 60% 程度의 구연酸을, *Candida guillermontii* var. *membranefaciens* 는 對糖 25~30% 程度의 구연酸을 生産한다고 報告하였다. 또 同氏 等<sup>(16)</sup>은 別途로 分離한 *Candida lipolytica* 의 紫外線 照射變異株의 구연酸 生産能을 檢討한 結果 炭素源으로서 6% 의 liquid-paraffin 과 탄산칼슘을 添加한 培地를 使用하여 26°C, 220 rpm 의 回轉式 培養器에 6 日間 培養하여 原料 paraffin 에 對하여 140~150% 의 구연酸을 生産할 수 있었으며 生産 구연酸의 20~30% 가 isocitric acid 였다고 報告하였다.

現令 우리나라에서는 해마다 增加하고 있는 구연酸의 需要를 充當하기 爲하여 中間 生産物인 구연酸 石灰를 輸入하여 製品化하고 있는 實情이며 아직 一貫工程에 依한 구연酸의 工業生産이 되지 않고 있다. 또한 구연酸 生産에 關한 研究 報告는 거의 찾아볼 수 없다. 이러한 現實에 비추어 筆者는 酵母에 依한 구연酸의 生産에 關한 基礎 資料를 얻기 爲하여 自然界에서 314 株

의 有機酸 生成能이 있는 酵母를 分離하였으며 그 中 PPC 에 依하여 구연酸 生産能이 있는 102 株의 酵母로부터 特히 生産能이 強한 1 菌株를 選定하여 同定함과 아울러 生産 條件을 檢討한 結果 몇가지 興味있는 事實을 얻었으므로 이에 報告하는 바이다.

## 實驗 方法

### 1. 구연酸 生産菌의 分離와 同定

#### 1) 菌株의 分離

##### (1) 分離源

食品, 空氣, 靑果物, 꽃의 密槽 等を 分離源으로 하였다.

##### (2) 一次分離

###### a. 分離培地

下記와 같은 田淵 等<sup>(14)</sup>의 變形 培地를 一次 分離培地로 使用하였다.

Glucose 10%	Yeast extract 0.2%
NH <sub>4</sub> Cl 0.2%	Sodium propionate 0.2%
CaCO <sub>3</sub> 1.0%	Agar 2.0%

###### b. 分離方法

上記 分離 培地를 加壓 殺菌한 다음 chloramphenicol 0.01% 를 添加하고 petri dish 에 分離하여 平板을 만든 後 이것에 前記 各種 試料의 小量을 20% 의 포도당과 0.2% 의 yeast extract 를 含有하는 培養液 中에 30°C 2 日間 集植 培養하고 그의 一白金耳滅菌水 懸濁液을 白金線으로 劃線한 後 30°C 로 4 日 동안 培養하면서 colony 周圍에 탄산칼슘 分解環이 나타나는 菌中 酵母라고 認定되는 것 만을 有機酸 生産酵母菌으로서 分離하였다.

空氣로 부터의 分離는 上記 組成의 平板培地를 所定 場所에서 10~20 分間 뚜껑을 열었다가 닫은 後 上記 方法과 同一한 方法으로 分離하였다.

##### (3) 二次分離

###### a. 分離培地

下記와 같은 田淵 等<sup>(14)</sup>의 구연酸 生産能 檢出培地를 二次 分離培地로 하였다.

Glucose 10%	Yeast extract 0.4%
NH <sub>4</sub> Cl 0.2%	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.1%
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.1%	CaCO <sub>3</sub> 3.0%

###### b. 分離方法

上記 二次 分離培地를 500 ml 振盪 flask 에 30 ml 씩 分注하고 115°C 에서 20 分間 殺菌한 後 이것에 1% CaCO<sub>3</sub> 含有 malt agar slant 에서 30°C 2 日間 前培養한 一次 分離菌株를 一白金耳量씩 接種하여 30°C 에서 4 日間 振盪培養(130 osills/min, stroke 3.5 cm)하고 培養液의 生成 有機酸을 判別하였다.

培養液 中의 生成 有機酸의 判別에 있어서는 먼저 3N

-HCl 로 培養液을 pH 2.0 으로 하여 菌體 以外의 浮遊物을 完全 溶解하고 그 少量을 濾紙(Whatman No. 1)에 spotting 한 다음 n-butanol : formic acid : H<sub>2</sub>O(4: 1.5: 1)<sup>(18)</sup>를 展開 溶媒로 하여 30°C 에서 16時間 展開시킨 後 完全 風乾하고 B.P.B 液으로 呈色하여 揮發酸을 判別하였다. 揮發酸의 判別은 pH 2.0 으로 한 培養液에 ammonia 水를 加하여 alkali 性으로 하고 揮發酸을 암모늄鹽으로 한 다음 3/2 N-NH<sub>4</sub>OH 로 飽和시킨 n-butanol<sup>(18)</sup>을 溶媒로 하여 上記한 바와 같이 展開, 乾燥한 後 구연酸을 含有하고 있는 B.P.B 液으로 呈色 比較하였다.

#### (4) 優秀菌株의 選定

##### a. 培養方法

前記의 二次 分離에 있어서와 同一한 方法으로 培養하였다.

##### b. 구연酸 定量

Saffran<sup>(19)</sup> 等의 方法에 따라 먼저 培養液을 pH 2.0 으로 一定量이 되게 稀釋한 後 그의 2 ml 에 1.0% trichloroacetic acid 2 ml 를 混合하고 遠心分離(2,000 rpm 10 min)하여 蛋白質을 除去한 上澄液을 試料로 하였다.

#### 2) 選定菌株의 菌學的 性質

Lodder<sup>(20)</sup>의 yeast 分類法에 따라 調査하였다.

##### (1) 細胞의 크기와 形態

試驗管에 YM 培地(yeast extract 3 g, malt extract 3 g, peptone 5 g, glucose 10 g, distilled water 1 l)를 10 ml 씩 分注하여 115°C, 15 min 동안 殺菌한 後 鏡檢하였다.

##### (2) Colony 의 形態와 構造

15% gelatin 을 含有한 YM 培地를 petri dish 에 分注하고 17°C 에서 1個月間 培養하면서 觀察하였다.

##### (3) Pellicle, Ring 및 Sediment 의 形成

試驗管에 YM 培地를 5 ml 씩 分注하여 25°C 에서 3~15 日間 培養하면서 觀察하였다.

##### (4) Ascospore 의 形成

改良 Gorodkova agar(peptone 1%, NaCl 0.5%, glucose 0.1%, agar 3%)와 V-8 juice agar 等을 使用하여 25°C 에 1週間 培養 後 Möller<sup>(21)</sup>法으로 染色鏡檢하였다

##### (5) Pseudomycelium 의 形成

Glucose-potato-agar 를 使用하고 25°C 에서 glass slide 에 培養하여 4 日에서 7 日사이에 經時的으로 鏡檢하였다.

##### (6) 糖類 醱酵性

0.5% yeast extract 를 含有하고 있는 溶液에 供試糖類를 各各 2% 가 되게 添加하고 raffinose 일 경우에는 4% 로 添加한 培地를 試驗管에 5 ml 씩 分注하고 Durham tube 를 넣어 115°C 에서 15 min, 殺菌한 後 供試菌을 接種하고 25°C 에서 1週間 培養하면서 醱酵 與否를 觀察하였다.

##### (7) 炭素源의 資化性

炭素資化性培地[(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%, agar 2%] 18 ml 를 試驗管에 넣어 water bath 上에서 40°C 에 維持한 것과 供試菌 菌體 1 白金耳의 滅菌水懸濁液 2 ml 를 無菌上에서 petri dish 에 注加 混化하고 바로 yeast autolysate 한방울을 添加하여 充分히 混和, 固化시키고 25°C 의 定溫器 中에 넣어 表面의 凝結水를 除去한 後 Auxanographic method<sup>(22)</sup>에 따라 各種의 炭素源을 少量 附着시켜 25°C 에서 1週間 培養한 後 觀察하였다. 또 無糖基礎培地[(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5%] 0.5 ml 와 0.5% 의 炭素源液 4.5 ml 를 따로 殺菌한 後 無菌의으로 混合하여 供試菌을 接種하고 25°C 에서 1週間 培養한 後 觀察하였으며 control 로서는 糖類無添加培地를 使用하였다.

##### (8) Nitrate 資化性

窒酸鹽資化性培地(glucose 2%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 %, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%, Bacto agar 2%) 18 ml 와 供試菌 菌體 一白金耳의 滅菌水懸濁液 2 ml 를 充分히 混和한 다음 固化 시키고 Auxanographic method<sup>(22)</sup>에 따라 KNO<sub>3</sub>를 附着시켜 25°C 에서 1週間 培養하면서 觀察하였으며 Control 로서는 窒素源을 附着하지 않은 것과 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 를 附着한 것을 使用하였다.

##### (9) Vitamin 要求性

Vitamin 要求性培地(vitamin free base 0.17g, distilled water 10 ml)를 試驗管에 넣고 115°C, 15 min 殺菌한 後 供試菌을 接種하여 25°C 에서 3~7 日間 培養하면서 觀察하였다.

##### (10) 耐鹽性

耐鹽性試驗培地(glucose 2%, peptone 1%, yeast extract 0.5%)에 NaCl 을 여러가지 濃度(1% 間隔으로 1~15%)로 添加하고 이들 溶液 10 ml 液을 試驗管에 分注하여 115°C 에서 15 分間 殺菌 後 供試菌을 接種하고 25°C 에서 1週間 培養하여 觀察하였다.

##### (11) 耐滲透壓性

耐滲透壓性試驗培地(glucose 50%, yeast autolysate 1%, agar 3%) 5 ml 液을 試驗管에 分注하고 115°C 에서 15 min 殺菌, 固化한 後 供試菌을 接種하여 25°C 에서 7 日間 培養하여 觀察하였다.

##### (12) Gelatin 液化性

Malt extract gelatin 培地(10°C balling malt extract, 15% gelatin)를 使用하여 115°C 에서 15 min 殺菌 後 petri dish 에 부어 供試菌을 接種하고 18°C 에서 1週間 培養하여 觀察하였다.

##### (13) Starch 生産性

Glucose 資化性을 檢討한 後 形成된 colony 上에 iodine 溶液을 滴下하여 澱粉反應으로 調査하였다.

(14) 生育最高溫度

Glucose-yeast extract-peptone water(glucose 2%, b-actor peptone 1%, yeast extract 0.5%) 10 ml 씩을 試驗管에 分注하여 供試菌을 接種하고 2°C 間隔으로 測定된 定溫器에 넣어 1 週 後에 生育與否를 觀察하였다.

(15) Ester 生成

5% glucose 溶液을 100 ml 三角 플라스크에 20 ml 씩 分注하여 yeast autolysate 한방울을 넣고 121°C, 15 min 殺菌하여 供試菌을 接種하고 25°C, 5 日間 培養하여 ester 生成有無를 냄새로 判別하였다.

2. 구연酸 生産 條件

1) 基本培地の 調製

基本培地로서는 下記와 같은 田淵等<sup>(14)</sup>의 培地를 500 ml 振盪frask에 30 ml 씩 分注하고 115°C, 15 min 殺菌하여 使用하였다.

- Glucose 10%                      KH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.05%
- NH<sub>4</sub>Cl 0.2%                      MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%
- Yeast extract 0.2%              CaCO<sub>3</sub> 3.0%

2) 培養

1% CaCO<sub>3</sub> 含有 malt agar slant 에 30°C, 2 日間 前培養한 供試菌 一白金耳量 씩을 上記 培地에 接種하고 振盪速度에 관한 試驗 外에는 110 oscills /min, 培養日數에 관한 實驗 外에는 5 日間, 培養溫度에 관한 外에는 30°C 로 培養하였다.

3) 生産구연酸의 測定

培養液은 3N HCl 로 pH 2.0 으로 調整하여 菌體 以外의 物質을 溶解한 다음 蒸溜水로 一定量으로 稀釋하고 培養液 中の 구연酸을 前記한 Saffran 等<sup>(19)</sup>의 方法을 使用하여 測定하였다.

4) 菌株의 產育度 測定

培養液은 上記 3)과 同一한 方法에 依하여 菌體 外의 物質을 溶解한 다음 菌體懸濁液을 75 倍 量의 蒸溜水로 稀釋하여 Erma-photoelectric spectro photometer, model LS-b 를 使用하여 wave length 580 mμ 에서 吸光度를 測定한 값을 75 倍하여 培養原液의 UOD 值(unit optical density)로 換算하여 生育度를 測定하였다.

結果 및 考察

1. 菌株의 分離와 優秀菌株의 同定

前記한 實驗方法에 依하여 有機酸生成能이 있는 酵母 314 株를 分離하였으며 이들로 부터 구연酸生産能이 있는 102 株를 選擇한 바 이들의 구연酸生産能은 Fig. 1 에 表示한 바와 같다.

基本培地에서 對糖 25% 以上の 구연酸을 生産한 菌株은 2 株 뿐이었으며 그 中 長期貯藏된 蔗糖에서 分離된 strain No. 13 은 구연酸生産能이 強力하였으므로 이

後 이 菌株을 優秀菌株로 選定하여 實驗하였다.

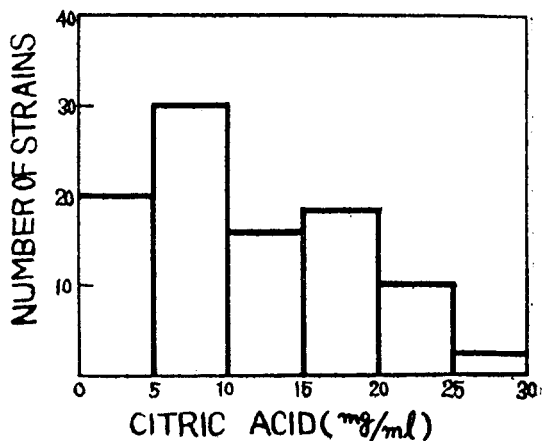


Fig. 1. Screened unknown yeast strains and their citric acid producing ability

選定된 strain No. 13 의 菌學的 性質을 檢討한 結果는 Table 1 과 같다.

Table 1. Microbiological characteristics of the selected strain

i) Growth on YM medium

After 3 days at 25°C, cells are spheroidal or ellipsoidal(1.7~5.8×4.2~9.2)μ, single in pairs or small group.

A thin, white, smooth creeping, pellicle and sediment was formed.

ii) Growth on YM gelatin medium

After 1 month at 17°C, giant colony liquified the medium and formed the pellicle with white and deep wrinkles.

iii) Slide culture on potato glucose agar

Pseudomycelium and blastospore was formed but true mycelium was not formed.

iv) Formation of ascospores on gorkdkowa medium

The cells contained one to four globe, hat shaped ascospores.

v) Fermentation.

Glucose+, Glactose+(latent), Sucrose+, Lactose- Maltase+, Raffinose+(1/3), Melibiose-, Soluble Starch-

(iv) Assimilation of carbon compounds

Glucose+, Galactose+, D-Ribose+, L-Rhamnose-, L-Sorbose-, Sucrose+, Maltose+, Cellobiose+, Lactose-, Melibiose+, Raffionose+, Inulin-, Soluble Starch-, D-Xylose-, D-Arabinose-, Melezitose+, Ethanol+, Glycerol+, D-Mannitol+, α-Methyl-D-glucoside+, Salicin+, DL-lactic acid+, Succinic acid+

- + Citric acid+, Inositol-, Sorbitol+, Galactitol-, Trehalose+, Erythritol+, Ribitol+,
- vii) Assimilation of potassium nitrate : positive
- viii) Growth on vitamin-free medium : positive
- ix) Sodium chloride tolerance : 13~14%(w/v)
- x) Growth on 50%(w/v) glucose-yeast extract agar : positive
- xi) Gelatin liquefaction : positive
- xii) Starch formation : negative
- xiii) Maximum temperature of growth : 45~47°C
- xiv) Ester formation : positive

選定菌의 菌學的 性質은 Table 1에 表示한 바와 같다. Lodder<sup>(20)</sup>의 分類法에 따라 同定한 바 globe 또는 hat shape의 ascospore와 pseudomycelium을 形成하고 nitrate를 資化하며 vitamin free medium이나 高溫에서도 生育이 可能하고 또 sucrose, maltose, glucose 등을 資化하며 lactose, melibiose, soluble starch 등을 資化하지 못하며 sucrose를 잘 醱酵하고 滲透壓培地에서 잘 生育하고 raffinose를 資化하여 pellicle과 sediment를 形成하는 點 등으로 보아 *Hansenula anomala*의 變種 *Hansenula anomala* var. *anomala*로 同定되었다.

2. 구연산 生産條件

1) CaCO<sub>3</sub> 含量과 培養日數

豫備實驗으로서 基本培地의 組成에서 CaCO<sub>3</sub>를 除外한 培地를 使用하여 選定菌株를 培養하였던 바 初期에 生成된 구연산으로 인하여 發育이 곧 停止하였으며, 培養中 pH 低下를 抑制할 必要가 있다고 認定되었으므로 基本培地에 CaCO<sub>3</sub>를 여러가지 濃度로 添加하여 구연산 生産에 미치는 影響을 檢討한 바 Table 2에 表示한 바와 같이 各 濃度別로 對糖收率에 있어서 若干의 差異가 있었으며 3% CaCO<sub>3</sub>를 添加하는 것이 가장 效果의이었다.

Prescott 등<sup>(23)</sup>은 *Asp. niger*의 培養에 있어서는 培養液의 initial pH를 3.4~3.6으로 調整하여야 하며 CaCO<sub>3</sub>를 中和劑로 添加할 必要가 없다고 하였고 Bolacto<sup>(24)</sup>는 最適 pH를 維持하기 爲하여 Na acetate buffer 溶液을

Table 2. Effect CaCO<sub>3</sub> on citric acid production (at 30°C, in basal medium)

CaCO <sub>3</sub> %	Initial pH	Amount of citric acid production at indicated cultural days(mg/ml)					
		3	4	5	6	7	8
1%	6.8	13.3	19.0	24.0	25.5	26.0	26.0
2	7.2	12.0	20.6	26.0	29.4	31.6	32.8
3	7.2	11.6	21.7	28.5	30.7	33.2	34.5
4	7.2	11.0	19.0	27.0	28.6	29.8	30.7
5	7.2	9.7	17.0	23.3	26.5	28.0	29.6

加하여 生産收率을 올릴 수 있다고 한바 있는데 本實驗의 結果로 볼때 酵母의 培養에 있어서는 *Asp. niger*의 경우와는 달리 CaCO<sub>3</sub>의 添加가 必要하다고 認定된다.

田淵 등<sup>(15,16)</sup>은 *Candida lipolytica*와 *Candida lipolytica*의 紫外線變異株의 培養에 있어서 CaCO<sub>3</sub>를 添加하여 實驗하였으나 CaCO<sub>3</sub> 濃度의 影響에 對하여는 檢討報告가 없어 本實驗의 結果와는 比較할 수 없었다.

本實驗의 結果로 보면 培養 3日에 있어서는 CaCO<sub>3</sub>의 濃度가 1%에서 가장 좋았으며 CaCO<sub>3</sub>의 濃度의 增加에 따라 구연산 生産量이 減少하였으나 4~8日에 있어서는 3% 濃度에서 가장 良好한 結果를 나타냈다.

2) 培養溫度

基本培地로 培養溫度를 달리하여 培養한 結果는 Fig. 2에 表示한 바와 같이 33°C에서는 菌의 生育이 良好하나 구연산 收得率은 30°C에 比해서 低下하였고 30°C가 구연산 生産의 最適溫度이었으며 이때 菌株의 生育은 33°C에 比해서 低下되었다.

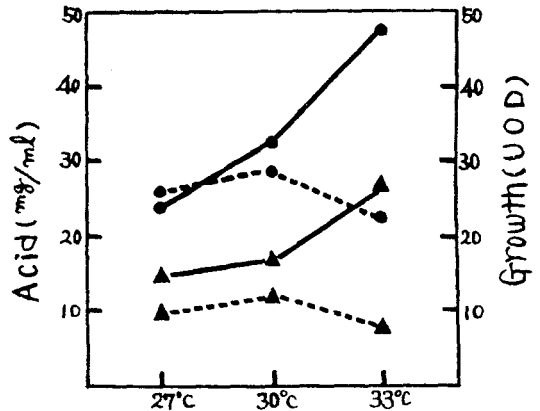


Fig. 2. Influence of cultural temperature on citric acid production(in basal medium)

▲.....▲ : acid(3 days)    ▲——▲ : growth(3 days)  
●.....● : acid(5 days)    ●——● : growth(5 days)

本實驗의 結果는 *Asp. niger*에 있어서 野口 등<sup>(12)</sup>이 報告한 0.05~0.1% NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 含有培地에서의 生産適溫과 거의 一致하였으며 또 田淵 등<sup>(16)</sup>이 *Candida lipolytica*로 liquid paraffin을 炭素源으로한 培地에서 培養했을때 生産適溫이 26°C라고 報告한 것과는 若干의 差異가 있었다.

Table 3. Effect of velocity of oscillation on citric acid production(after 5 days, at 30°C, in basal medium)

Velocity (oscills. /min) stroke 3.5 cm	Amount of citric acid (mg/ml)
0	4.6
90	25.6
110	28.5
125	26.9
145	26.2

3) 振盪速度

基本培地를 使用하여 振盪速度가 구연酸 生成에 미치는 影響을 檢討한 結果는 Table 3 과 같으며 110 oscills/min 内外의 振盪速度가 適當하였다.

4) 培地の 組成

(1) 窒素源의 影響

本 菌의 구연酸 生成에 適當한 窒素源을 調査하기 위하여 基本培地 中の NH<sub>4</sub>Cl 代身에 各種 無機 및 有機窒素源을 窒素含量이 同一하게 되게 添加하여 구연酸 生成에 미치는 影響을 檢討한 結果는 Fig. 3 에 表示한 바와 같다.

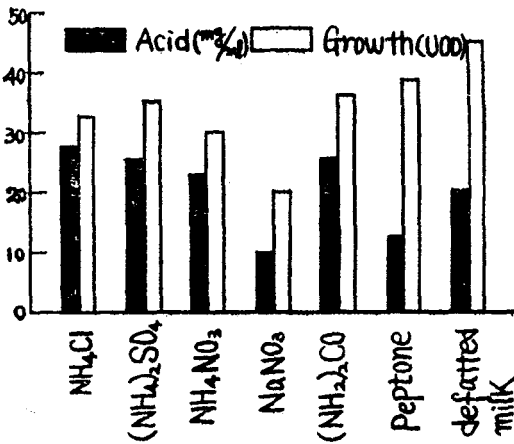


Fig. 3. Effect of nitrogen sources on citric acid production(after 5 days, at 30°C)

本 實驗의 結果로 보면 암모니아態나 尿素態窒素는 效果가 높았고 窒酸態窒素는 菌體生育이나 酸生成에 있어서 不良하였으며 peptone 이나 脫脂粉乳添加에 있어서는 酸生成은 암모니아態나 尿素態窒素보다 低下하였으나 體菌 生育度는 良好한 傾向을 나타냈다.

田淵 等<sup>(15)</sup>은 *Candida lipolytica* 의 구연酸 生成에 있어서 窒素源으로서 NH<sub>4</sub>Cl 이 良好하다고 하였으며 Thome 等<sup>(1)</sup> Amelung<sup>(3)</sup>, Doelger<sup>(4)</sup>, 野口 等<sup>(12)</sup>은 *Asp. niger* 의 구연酸 生成에 있어서 窒素源으로서 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 가 良好하다고 한바 있다.

本 實驗에 있어서는 粉乳添加가 菌體의 生育만을 增加시키고 酸生成은 弱한 結果를 나타냈다. 또한 NH<sub>4</sub>Cl 의 添加 濃度에 따른 影響을 檢討한 바 Fig. 6 에 表示한 바와 같이 約 0.1% 添加時에 구연酸 生成이 良好하였으며 菌體生育度의 增加에 比例하여 收得量도 增加하는 傾向을 나타낸다.

田中 等<sup>(14)</sup>은 glucose 를 炭素源으로 했을때 *Candida lipolytica* 培養에서 0.1% 의 NH<sub>4</sub>Cl, *Candida brumptii* 培養에서 0.3% 의 NH<sub>4</sub>Cl, *Candida guilliermondii* var. *membranefaciens* 培養에서 0.05% 의 NH<sub>4</sub>Cl 가 窒素源

으로서 適當하다고 報告하였으며 田淵 等<sup>(16)</sup>은 *Candida*

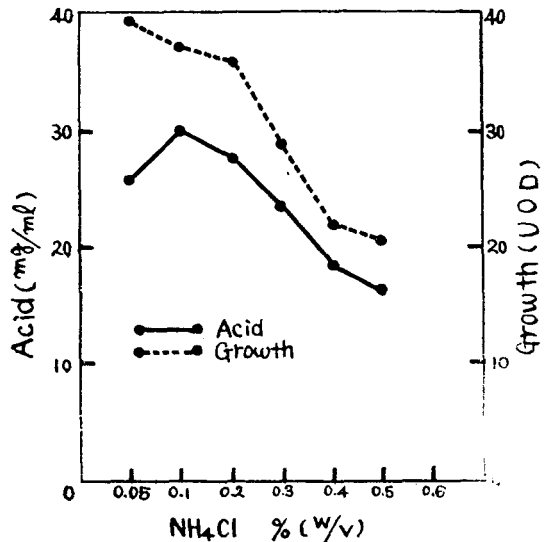


Fig. 4. Effect of ammonium chloride on citric acid production(after 5 days, at 30°C)

*lipolytica* 의 紫外線變異株培養에서 liquidparaffin 을 炭素源으로 했을 때 0.3% 의 NH<sub>4</sub>Cl 이 適當하다고 報告하였다.

著者의 實驗에 있어서는 田中 等<sup>(14)</sup>의 *Candida lipolytica* 의 實驗結果와 一致하였으며 其他의 報告와는 相當한 差異가 있었다.

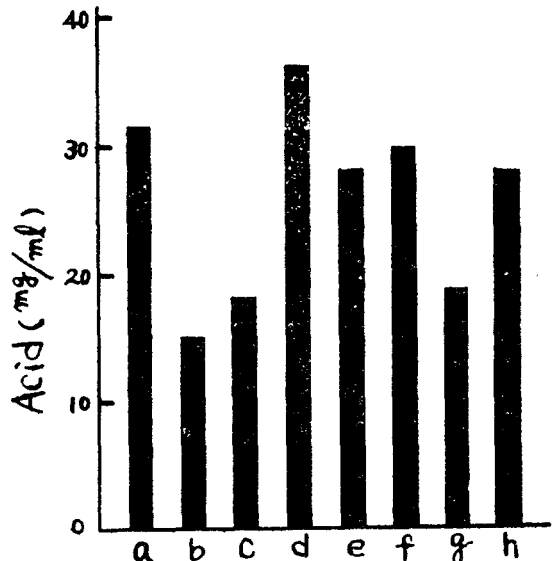


Fig. 5. Effect of defatted wastes on citric acid production(after 5 days, at 30°C)

a : defatted rice bran, b : barely bran, c : wheat bran, d : defatted rape seed, e : defatted perilla f : defatted milk powder, g : defatted soybean h : yeast extract(0.2%)

(2) 糖 및 粕類 添加의 影響

糖 및 粕類는 酵母生育에 必要한 微量因子와 蛋白質을 主成分으로 하는 有機態窒素를 比較의 多量 含有하므로 選定酵母의 구연酸 生産에 있어서 效果를 나타낼 수 있다고 推定되어 基本培地의 yeast extract 代身에 各種의 糖 및 粕類를 2% 添加했을 때의 影響을 檢討한 바 그 結果는 Fig. 5 과 같다.

本 實驗에서 菜種油粕 添加時는 yeast extract 添加의 경우에 比하여 구연酸 生産에 있어서 顯著한 效果를 나타냈으며 脫脂米糠, 脫脂粉乳도 若干 效果가 있었다.

(3) 菜種油粕 添加의 影響

前項의 實驗에 있어서 菜種油粕의 有効成分이 水溶性成分인가 어떤가를 살피고 또 그 濃度의 影響이 어떤가를 살피기 爲하여 菜種油粕을 各 濃度別로 直接添加한 것과 水道水로 常壓에 1時間 沸騰시킨 抽出液을 使用하여 實驗한 바 그 結果는 Fig. 6 과 같다.

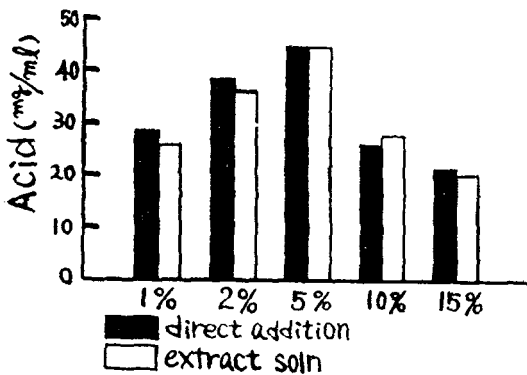


Fig. 6. Effect of amount of rape seed waste added to basal medium on citric acid production (after 5 days, at 30°C)

本 實驗의 結果로 보아 菜種油粕은 直接添加한 경우와 抽出液으로서 添加한 경우와 거의 差가 없으므로 菜種油粕 中の 有効成分은 水溶性인을 알 수 있었으며 有効成分은 一種의 生産促進因子라고 推定된다. 菜種油粕을 直接添加하거나 또는 抽出液으로 使用時 5% 程度 添加에서 가장 效果가 顯著하였으며 이 때에는 구연酸 生産이 約 40% 增加되었다.

(4) Glucose 添加濃度의 影響

本 菌의 구연酸 生産에 있어서 基本培地의 yeast extract 代身에 5% 菜種油粕 抽出液을 使用하여 炭素源으로서 glucose, sucrose 및 maltose 를 各 10% 使用한 경우의 구연酸生成을 檢討한 바 glucose 가 가장 良好하였다. 그러므로 炭素源의 工業原料로서는 포도당 또는 포도당 含有物을 使用하는 것이 效果의이라고 생각된다.

田淵 等<sup>(15)</sup>은 *Candida lipolytica*의 培養에서 glucose를

炭素源으로 한 경우 對糖 50~60%, *Candida lipolytica* 紫外線變異株<sup>(17)</sup>의 培養에서 liquid paraffin 을 炭素源으로 한 경우 paraffin 에 對하여 140%의 구연酸을 生産할 수 있다고 報告한 바 있다. yeast extract 代身에 5% 菜種油粕을 使用한 基本培地의 glucose 濃度를 달리하여 實驗하였으며 glucose 濃度가 구연酸 生成에 미치는 影響을 보면 Table 4 와 같다.

本 結果를 보면 glucose 5~10% 添加時에는 거의 비슷한 對糖比率를 얻었으며 또 濃度가 높을수록 對糖收率は 減少하였다.

Table 4 Effect of concentration of glucose on citric acid production(after 5 days, at 30°C)

Glucose(%)	Acid(mg/ml)	Yield(%)
5.0	20.6	41.2
7.5	30.6	41.3
10.0	40.5	40.5
15.0	42.6	28.4
20.0	40.0	20.0
25.0	39.5	15.8

*Asp. niger*의 培養에서 Currie 等<sup>(2)</sup>, Amelung<sup>(3)</sup>, Prescott 等<sup>(23)</sup>은 포도당 濃度를 9.8~10.2%로 할 때 掘津<sup>(25)</sup>은 포도당 11.4%와 당밀 0.6% 混用할 때 구연酸生成이 效果的이었으며 포도당과 당밀 混用時는 당밀의 量을 增加 시키면 生産은 低下되었고 反對로 菌體生育은 增加한다고 報告하였다.

(5)  $KH_2PO_4$  및  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  添加量의 影響

K 및 Mg 鹽이 구연酸 生成에 미치는 影響을 檢討하기 위하여 基本培地에서 yeast extract 代身에 5% 菜種油粕抽出液을 使用하고 培地 中の  $KH_2PO_4$  및  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

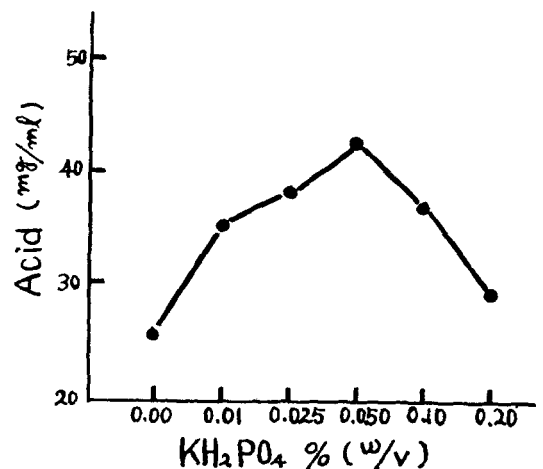


Fig. 7. Effect of concentration of  $KH_2PO_4$  on citric acid production(after 5 days, at 30°C)

의 濃度를 變化시켜 구연酸 生成에 미치는 影響을 檢討한 바 Fig. 7 과 8 에 表示한 바와 같이  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  는 0.05%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  는 0.025% 添加했을때 가장 良好하였다.

Doelger 等<sup>(4)</sup> 은 *Asp. niger* 를 使用한 表面 培養에서 0.1% 의  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  와 0.023% 의  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  를 添加하는 것이 適當하다고 하였으며 Shu 等<sup>(6)</sup> 은 *Asp. niger* 의 液內培養에서 0.25% 의  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  와 0.02% 의  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  가 効果的이라고 하였고 田中等<sup>(14)</sup> 은 *Candida lipolytica* 의 구연酸 生産에 있어서  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  의 濃度는 0.09%, *Candida brumptii* 의 경우 0.05%, *Candida guilliermondii* var. *membranefaciens* 의 경우 0.15% 가 適當하다고 報告하였다.

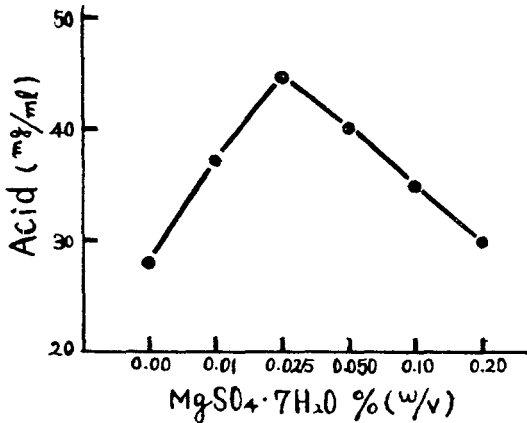


Fig. 8. Effect of concentration of  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  on citric acid production(after 5 days, at 30°C)

本 實驗에 있어서 供試菌의 구연酸 生産에 適當한  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  의 濃度는 田中等<sup>(14)</sup> 의 *Candida brumptii* 의 結果와 비슷하였으며  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  의 濃度는 Doelger 等<sup>(4)</sup>, Shu 等<sup>(6)</sup> 의 報告와 거의 一致하였다.

5) 最適培地와 培養日數

供試菌을 最適培地(10% glucose, 0.1%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.05%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.025%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 5% 菜種粕浸出液 3%  $\text{CaCO}_3$ )에 接種하여 30°C, 110 oscills/min 의 振盪培養機에서 24~192 時間까지 培養하면서 구연酸 生産과 菌體 生育 過程을 살펴 본 結果는 Fig. 9 에 表示한 바와 같다. 即 菌體 生育은 5日까지, 구연酸 生産量은 6日까지 增加하였으며 그 後 一定한 狀態로 停止되었다.

이러한 實驗 結果는 野口 等<sup>(26)</sup> 이 報告한 *Asp. niger* 의 生産期間(8日) 보다는 짧고 田淵 等<sup>(19)</sup> 이 報告한 *Candida lipolytica* 의 生産期間(6日)과 거의 一致하였다.

上記 最適培地를 使用하여 30°C 에서 110 oscills/min 內外의 速度로 振盪하면서 6日間 培養하였을 때 對糖 46% 程度의 구연酸을 얻을 수 있었다.

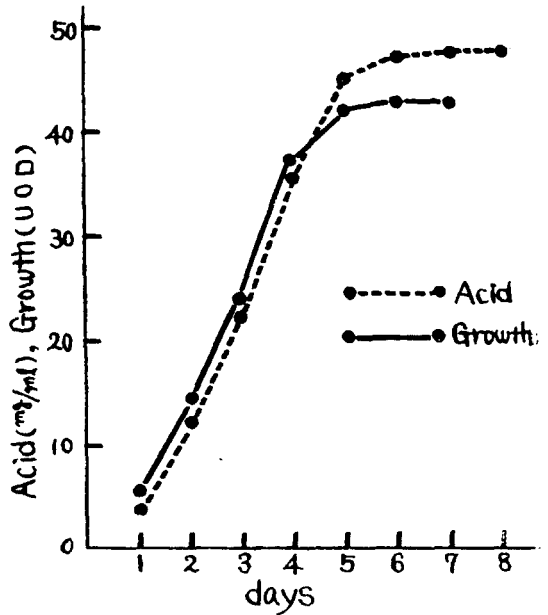


Fig. 9. Effect of cultural period on citric acid production(after 5 days, at 30°C)

摘 要

各種 試料로 부터 구연酸 生成能 이 있는 酵母를 檢索하여 優秀菌株로서 Strain No. 13 을 選定하고 이를 同定함과 아울러 구연酸 生産條件을 檢討한 結果는 다음과 같다.

1) 選定菌株는 Lodder 의 分類法에 依하여 *Hansenula anomala* var. *anomala* 로 同定되었다.

2) 10% glucose 를 含有하는 基本培地에 있어서 구연酸 生産의 最適條件은  $\text{CaCO}_3$  添加濃度 3%, 培養溫度 30°C, 振盪速度 110 oscills/min 이었다.

3) 培地 中の 窒素源으로서는 0.1%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  이 가장 좋았으며 peptone 等の 有機窒素源은 菌株 生育에 있어서  $\text{NH}_4\text{Cl}$  보다 좋았으나 구연酸 生産은 低下되었다.

4) 糖質로서 glucose 를 使用하는 경우 구연酸의 對糖收率은 glucose 濃度 10% 程度에서 가장 良好하였다.

5) 菜種油粕, 들깨粕, 脫脂米糠 等은 구연酸 生成을 增加시켰으며 0.2% yeast extract 使用時에 比하여 5% 菜種油粕 抽出液 使用時는 구연酸이 約 40% 增産되었다.

6) 培地 中の  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  의 最適濃度는 0.05%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  의 最適濃度는 0.025% 이었다.

7) 最適條件下에서 菌의 生育은 5日까지, 구연酸 生成은 6日까지 繼續 增加하였으며 6日 培養時 對糖 46% 의 구연酸을 얻었다.



## 參 考 文 獻

- 1) Thom, C and Currie J. N. : *J. Agr. Research*, **7**, 1 (1916).
- 2) Currie, J. N. : *J. Biol. Chem.*, **31**, 15 (1917).
- 3) Amelung, H. Z. : *Physiol. Chem.*, 166 (1927).
- 4) Doelger, W. P. and Prescott S. C. : *Ind. Eng. Chem.*, **26**, 442 (1934).
- 5) Waksman, M. J. and Karow E. D. : *Ind. Eng. Chem.*, **39**, 821 (1947).
- 6) Johnson, M. J. and Shu P. : *Ind. Eng. Chem.*, **40**, 1202 (1948).
- 7) 掘井和男 : 醸酵協會誌(日本), **7**, 83 (1949).
- 8) 照井堯造 : 生産と技術, **2**, 8 (1950).
- 9) 照井堯造, 芝崎勲, 望月務 : 日本醸酵工學會誌, **35**, 105 (1957).
- 10) Chughtai, I. D. and T. K. Waker : *J. Biochem.*, **56**, 484 (1954).
- 11) 板口謹一郎, 馬場明 : 日本農藝化學會誌, **18**, 1033 (1942).
- 12) 野口祐一, 陳東良子 : 日本醸酵工學會誌, **38**, 485 (1960).
- 13) 高見亘 : 醸酵協會誌(日本), **25**, 374 (1967).
- 14) 田中優行, 田原康者, 田淵武士, 阿部又三 : 日本農藝化學會誌, **44**, 499 (1970).
- 15) 田淵武士, 田中優行, 阿部又三 : 日本農藝化學會誌, **42**, 440 (1968).
- 16) 田淵武士, 田中優行, 阿部又三 : 日本農藝化學會誌, **43**, 154 (1969).
- 17) 田淵武士, 田中優行, 阿部又三 : 日本農藝化學會誌, **44**, 562 (1970).
- 18) 小原哲二郎, 岩尾裕之, 鈴木隆雄 : 食品分析ハンドブック, 建帛社. p. 328 (1969).
- 19) Saffran, M. and Densted D. F. : *J. Biol. Chem.*, **175**, 849 (1949).
- 20) Lodder, J. : *The Yeasts, A taxonomic study*, p. 247 (1970).
- 21) 微生物ハンドブック編集委員會 : 微生物ハンドブック, 技報堂. p. 998 (1957).
- 22) Lodder, J. : *The Yeasts, A taxonomic Study*, p.83 (1970).
- 23) Prescott, S. C. and Dunn C. G. : *Ind. Microbiology, 1st Ed.*, 541 (1940).
- 24) Bolacto, V. : *Ann. Chem. Applicata*, **25**, 515 (1935).
- 25) 掘津浩章 : 醸酵協會誌(日本), **29**, 497 (1971).
- 26) 野口祐一, 阪東良子 : 日本醸酵工學會誌, **38**, 488 (1960).