

糸狀菌에 의한 枸橼酸醱酵에 관한 研究

(第Ⅲ報) 選定菌에 의한 枸橼酸醱酵

成洛癸 · 金明燦 · 沈奇煥 · 鄭德和

慶尙大學校 農科大學 食品加工學科

Studies on the Citric Acid Fermentation with Fungi

(Part III) Citric Acid Fermentation with Selected Strains

Nack Kie Sung, Myung Chan Kim, Ki Hwan Shim and Duck Hoa Chung

Dept. of Food Science and Technology, College of Agriculture, Gyeong

Sang National University, Jinju, Korea

Abstract

For the purpose of studies on the citric acid production, some experiments were carried out with isolated strains. The results obtained were as follows.

- 1) The optimal culture media of the strain M-80 in surface culture contained 140g of sucrose, 3.0g of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.5g of KH_2PO_4 , 0.25g of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3.0mg of Fe^{++} , 1.0mg of Zn^{++} , 0.5N HCl to a pH of 5.0 and distilled water to 1.0 liter; and that of the strain M-315 in surface culture contained 140g of sucrose, 2.0g of NH_4NO_3 , 1.0g of KH_2PO_4 , 0.25g of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.0mg of Fe^{++} , 2.0mg of Zn^{++} , 0.05mg of Cu^{++} , 0.5N HCl to a pH of 4.5 and distilled water to 1.0 liter. While that of the strain M-315 in submerged culture contained 140g of sucrose, 2.5g of NH_4NO_3 , 1.5g of KH_2PO_4 , 0.3g of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3.0mg of Fe^{++} , 0.1mg of Cu^{++} , 0.5N HCl to a pH of 4.5 and distilled water to 1.0 liter.

The optimal temperature and size of inoculum were mostly 28-30°C, 10^7 - 10^8 spores/50ml, respectively.

- 2) Through the course of citric acid production, the growth of strains had nearly been completed, pH value was rapidly decreased below 2.0 and the content of sugar was also reduced, while the accumulation of citric acid in media was remarkably begun in about 3-4 days. The yields of citric acid generally reached the maximum level in 8-10 days in surface or submerged fermentation process.
- 3) Methanol was effective citric acid production when they were added to fermentation media. In the case of surface culture, by addition of 2% (strain M-80), 3% (strain M-315), the yields of citric acid was increased 6.5%, 20.6%, respectively and 5.0% yield was increased by addition of 3% methanol in submerged culture media of the strain M-315.
- 4) Chromatography analysis of culture broth after fermentation under optimal culture conditions detected that the majority of acid in media was citric acid. 72.1mg/ml, 98.1mg/ml, of citric acid were determined in surface culture media by strains of M-80, M-315, and 59.8 mg/ml of citric acid was contained in the submerged culture media by the strain M-315.

緒 論

일찌기 Thom 및 Currie¹⁾는 *Aspergillus*屬의 많은 菌株에 대하여 체계적인 실험을 한 결과 강력한 구연산생산균주를 발견하였으며 15% sucrose와 무기영양원을 함유하는 배지에서 표면배양하여 55%의 수율을 얻었다. 그 후 Bernhauer 등²⁾은 표면배양 시 배양액 100ml 당 $10^6 \sim 5 \times 10^8$ 개의 spore를, 尾崎 등³⁾은 표면적 250m², 배양액 28kl의 대형발효조에 약 600억의 spore를 공기접종법에 의하여 접종하는 것이 좋았다고 하였다. 그러나 순수한 sucrose 대신 粗炭水化合物原料를 사용할 경우 배지의 무기염 조성의 control이 곤란하게 되어 다시 이들 원료의 진처리방법이 연구되기 시작하였다. 그 중 제일 먼저 ferrocyan 化合物을 첨가하는 방법이 제안되었는데 이 ferrocyan 化合物은 aconitase의 cofactor로서 필요한 Fe⁺⁺의 농도를 감소시킴으로써 구연산생산을 촉진시키는 것으로 알려져 있다⁴⁾.

한편 gluconic acid, fumaric acid, lactic acid 등이 액내배양법에 의해 생산됨에 따라 구연산도 Warkman, Johnson 등^{5,6)}에 의해 액내배양법이 연구되기 시작하였다. 그러나 액내배양 시 구연산발효배지의 대부분을 차지하는 탄수화물 속에 함유되어 있는 Fe⁺⁺, Cu⁺⁺, Mg⁺⁺ 등은 균주의 성장을 좋게 해주는 대신 구연산 생성을 저하시키기 때문에 이를 해결하기 위해 미생물균주의 돌연변이로 구연산생성을 많게 하려고 시도하였으나 급속이온 자체를 제거하는 것 보다 좋은 결과를 얻지 못하였다.

저자 등은 발효법에 의한 구연산생산에 필요한 기본적인 문제점을 파악하기 위하여 전보⁷⁾에서 분리선정된 균의 발효조건 및 각종첨가물의 영향을 검토하고 배양물을 분석한 결과 몇가지 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

實驗材料 및 方法

1. 使用菌株

전보⁷⁾에서 분리동정한 M-80 (*Aspergillus usamii* mut. *shirousamii*)과 M-315 (*Aspergillus niger*)를 공시균으로 실험에 사용하였다.

2. 培養方法

1) 前培養

표면배양 시는 stockculture 상의 공시균을 포자형성배지에 접종하여 7일간 사면배양하여 사용하였고, 액내배양시는 포자형성배지에 사면배양되어

있는 균의 포자현탁액을 기본배지 50ml가 들어있는 500ml 진탕플라스크에 넣어 36시간동안 seed culture를 행한 후 그 액 1ml씩을 접종하였다.

2) 本培養

표면배양은 전보⁷⁾에서의 A배지를, 액내배양은 F배지를 기본배지로 삼아 다음과 같이 본 배양을 행하였다. 즉 표면배양은 기본배지 50ml을 250ml 삼각플라스크에 넣고 1kg/cm² 하에서 15분간 살균하여 포자형성배지에서 전배양시켜 놓은 균을 접종하여 28~30°C 환온기에서 7~10일간 배양하였다. 또한 액내배양은 기본배지 50ml를 250ml 삼각플라스크에 넣거나, 500ml 진탕 플라스크에 넣은 후 상법에 따라 살균하여 전배양한 균을 접종하여 rotary shaker (200r. p. m., 28~30°C)에서 7~10일간 배양하였다.

3. 培養物の 分析

1) 總酸 및 枸橼酸의 定量

전보⁷⁾에 따랐다.

2) 培養液 中の 生成酸의 檢定

① paper chromatography에 의한 定性

전보⁷⁾와 같이 鈴木 等の 方法을 참고로 하였다.

② partition chromatography에 의한 定量

Marvel法⁸⁾과 Bullen法⁹⁾을 참고하여 아래와 같이 행하였다.

③ 試料의 조제

각 배양물 3ml을 취하여 증류수 17ml을 가하고 H₂SO₄로서 pH2.0으로 한 후 액체 soxhlet 장치를 사용하여 90시간 ether추출을 한다. ether추출이 끝나면 Water bath에서 ether를 제거하고 chloroform과 buthanol로 洗液한 다음 그 중 1/10을 취하여 partition chromatography용 시료로 하였다.

④ 有機酸의 partition chromatography

Mallinkrodt製 silicic acid 20g에 0.5N H₂SO₄ 12

Table 1. Composition of Eluting Solution

- | |
|---------------------------------------|
| 1) 100ml chloroform 100% |
| 2) 100ml chloroform 95% + butanol 5% |
| 3) 100ml chloroform 90% + butanol 10% |
| 4) 100ml chloroform 85% + butanol 15% |
| 5) 100ml chloroform 80% + butanol 20% |
| 6) 100ml chloroform 75% + butanol 25% |
| 7) 100ml chloroform 70% + butanol 30% |
| 8) 100ml chloroform 60% + butanol 40% |
| 9) 100ml chloroform 50% + butanol 50% |

ml 을 가하여 잘 혼합한 후 chloroform 70~80ml 을 가하고 직경 1.7cm, 길이 48cm 의 chromatographic tube 에 주입하고 소정의 시료를 첨가 후 Table 1 과 같은 전개액 (0.5N-H₂SO₄ 로 포화시킨 것) 으로 전개하고 각 획분은 siphon 으로 6ml 씩 취하고 0.01N-NaOH 로서 0.1% phenol red 를 지시약으로 하여 정량하였다.

표준유기산의 분리는 acid mixture 10~80mg 을 만들어 chloroform 2-4ml 로 녹인 용액과, 녹지 않는 유기산은 n-butanol 0.8ml 로 녹이고 여기에 chloroform 1.2ml 을 가하여 혼합한 용액을 합하여 column 상에 첨가하고 Table 1 과 동일한 전개액으로 1 분간 2~3ml 속도로 용출시켜 정량하였다.

3) 기타성분의 분석
전보⁷⁾에 따랐다.

實驗結果 및 考察

1. 營養要求度 및 醱酵條件

일반적으로 구연산 생성균주의 발효조건에 관해서는 상당한 실험이 되어있지만 연구자 혹은 사용균주에 따라 그 결과가 모두 다르게 나타나 있다^{2,6)}.

저자 등도 전보에서 선정된 균주의 영양요구도 및 발효조건을 개선하기 위하여 표면배양은 분리균 M-80, M-315 를, 액내배양은 분리균 M-315 를 공시균으로 하여 이후의 실험을 행하였다.

1) 탄소원의 종류와 농도

구연산 발효의 탄소원으로서의 각종 다당류, 소당류, 단당류, 알콜, 유기산, 탄화수소 등을 들 수 있는데 균주에 따라 이들 탄소원의 자화성은 크게

차이가 있다고 보고되었다¹⁰⁾.

본 실험에서도 구연산발효에 있어서 각 균주들의 최적 탄소원을 선정하기 위하여 기본배지의 탄소원 대신에 8종류의 탄소원을 14%씩 첨가하여 구연산생산을 조사하였다. 그 결과 Table 2 에서 보는 바와 같이 표면 및 액내배양에서 모두 탄소원 으로서는 Sucrose 가 제일 좋았는데 특기할 것은 분리균 M-80 이 가용성전분을 잘 자화하면서 구연산 생성능이 있다는 점이다. 前記한 바와 같이 분리균 M-80 (*Aspergillus usamii* mut. *shirousamii*) 은 내산성 amylase 를 분비하여 전분당화력과 유기산생성력이 강하다는 것을 감안할 때 이 균주를 사용하여 공업용 전분질원료를 이용할 수 있는 방안이 있을 것으로 생각된다.

한편 구연산 생산에 필요한 Sucrose 의 최적농도를 조사한 결과 Table 3 에서 보는 바와 같이 대체로 14% 첨가하였을 경우 높은 수율을 보였고 그 이상의 농도에서는 對糖收率 이 감소하였다.

2) 질소원의 종류와 농도

분리균의 구연산발효에 적당한 질소원을 조사하기 위하여 기본배지의 질소원 대신에 각종 질소원을 동일하게 첨가하여 배양한 결과 Table 4 에서 보는 바와 같이 M-80 은 (NH₄)₂SO₄ 가, M-315 는 표면 및 액내배양에 관계없이 NH₄NO₃ 가 양호한 것으로 나타났다.

M-315 의 경우는 Doelger 등¹¹⁾이 *Aspergillus niger* 의 구연산생성에 있어서 질소원으로서 NH₄NO₃ 가 적당하다는 것과 일치하고 있다.

이들 질소원을 각각 농도별로 첨가하여 실험한 결과 Fig. 1 과 같이 표면배양의 경우 M-80 은 0.3

Table 2. Effect of Various Carbon Sources on Citric Acid Fermentation

Cultural method No. of strain Carbon sources	Citric acid (mg/ml)			Yield (%)		
	Surface culture		Submerged culture	Surface culture		Submerged culture
	M-80	M-315	M-315	M-80	M-315	M-315
Sucrose	56.2	57.8	48.3	40.1	41.2	34.5
Lactose	14.3	21.0	25.9	10.2	15.0	18.5
Glucose	47.4	49.7	36.4	33.8	35.5	26.0
Galactose	42.4	38.6	33.6	30.3	28.2	24.0
Dextrine	54.4	13.0	5.9	38.8	9.2	4.2
Soluble starch	53.7	10.6	7.5	38.4	7.5	5.3
Potato starch	18.5	8.3	3.8	13.2	6.3	2.7
Sweetpotato starch	19.7	9.2	4.1	14.0	6.5	2.9
Corn starch	16.3	7.5	3.0	11.6	5.2	2.1

Table 3. Effect of Sucrose Concentration on Citric Acid Fermentation

Cultural method No. of strain Conc. of sucrose	Citric acid (mg/ml)			Yield (%)		
	Surface culture		Submerged culture	Surface culture		Submerged culture
	M-80	M-315		M-80	M-315	
5	16.0	17.2	10.2	32.0	34.4	20.4
10	36.7	38.4	28.2	36.7	38.4	28.2
12	49.2	51.2	39.1	41.0	42.6	32.6
14	58.1	59.9	49.8	41.5	42.7	35.5
16	60.8	61.2	55.1	38.0	38.3	34.4
18	62.1	63.2	58.3	33.2	35.1	31.2
20	65.7	69.5	61.2	30.4	32.2	31.2

Table 4. Effect of Various Nitrogen Sources on Citric Acid Fermentation

Method No. of strain N-sources	Citric acid (mg/ml)			Yield (%)		
	Surface culture		Submerged culture	Surface culture		Submerged culture
	M-80	M-315		M-80	M-315	
NH ₄ Cl	53.7	57.8	47.7	38.4	41.2	34.1
NH ₄ NO ₃	58.2	61.1	50.3	41.2	43.6	35.9
NaNO ₃	41.8	50.6	37.6	29.8	36.1	26.8
NH ₄ H ₂ PO ₄	31.0	41.2	34.4	22.1	29.4	24.6
(NH ₄) ₂ SO ₄	60.1	56.3	45.2	42.9	40.2	32.3
(NH ₂) ₂ CO	57.0	53.8	48.0	40.7	38.4	34.3
(NH ₄) ₂ CO ₃	35.0	31.2	30.7	25.0	22.3	21.9
Peptone	54.9	55.7	42.8	39.2	39.8	30.5

%의 (NH₄)₂SO₄가, M-315는 0.2%의 NH₄NO₃가 좋았고 액내배양의 경우 M-315의 최적 질소요구량은 0.25% NH₄NO₃로 나타났다.

한편 尾崎 等¹²⁾은 생리적 산성질소원이 NaNO₃나 peptone 보다 양호하다고 하였으며 NaNO₃, peptone 등을 첨가할 경우 0.3%첨가에서는 oxalic acid가 생성되지 않았으나 그 이상에서는 상당량이 생성되었다고 報告하였다.

3) 檸檬酸, 加里鹽의 종류와 농도

일반적으로 미생물생육에 첨가되는 檸檬酸, 加里鹽은 KH₂PO₄, K₂HPO₄로서 필수 무기성분으로 중요한 위치를 차지하고 있다. 본 실험에서도 공시균의 구연산생산에 있어서 적당한 檸檬酸, 加里鹽을 알아보기 위하여 기본배지의 檸檬酸, 加里鹽 대신 檸檬酸加里化合物을 같은 농도로 첨가하여 실험한 결과 Table 5에서 보는 바와 같이 KH₂PO₄와 K₂HPO₄가 다른 화합물보다 양호한 결과를 보였다.

또한 KH₂PO₄의 최적농도를 조사한 결과 Fig. 2

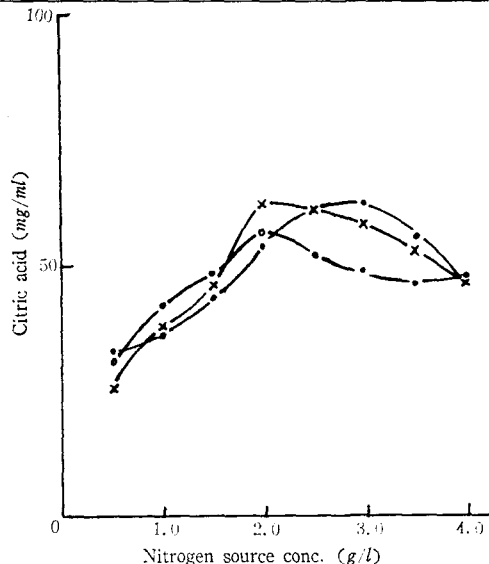


Fig. 1. Effect of Nitrogen Source Concentration on Citric Acid Fermentation.
 ···· M-80 (Surface culture)
 ××× M-315 (Surface culture)
 ○—○ M-315 (Submerged culture)

Table 5. Effect of Potassium and Phosphorus Sources on Citric Acid Fermentation

Method No. of strain K. P. sources	Citric acid (mg/ml)			Yield (%)		
	Surface culture		Submerged culture	Submerged culture		Submerged culture
	M-80	M-315	M-315	M-80	M-315	M-315
KH ₂ PO ₄	61.7	62.45	51.0	44.1	44.6	36.4
K ₂ HPO ₄	60.9	62.15	51.1	43.5	44.4	36.5
KCl	54.1	53.94	43.1	38.7	38.5	30.8
KNO ₃	43.1	54.64	43.7	30.8	39.0	31.2
K ₂ SO ₄	50.5	45.23	34.0	36.1	32.5	24.3

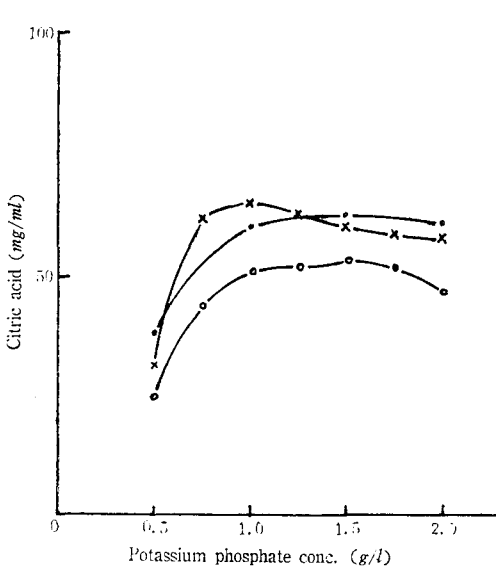


Fig. 2. Effect of Potassium Phosphate Concentration on Citric Acid Fermentation.

·—· M-80 (surface culture)
 ×—× M-315 (Surface culture)
 ○—○ M-315 (Submerged culture)

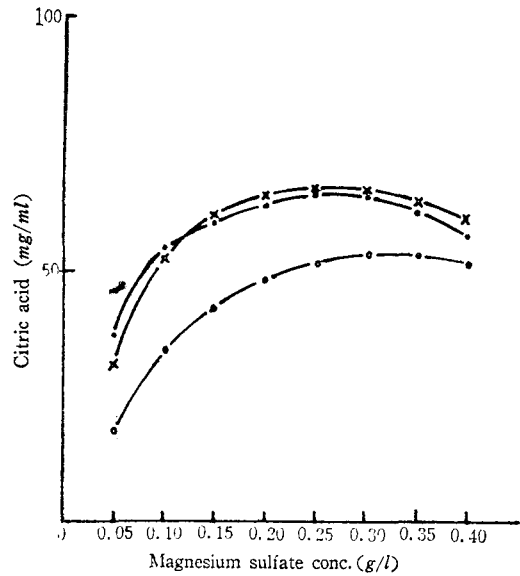


Fig. 3. Effect of Magnesium Sulfate Concentration on Citric Acid Fermentation.

·—· M-80 (Surface culture)
 ×—× M-315 (Surface culture)
 ○—○ M-315 (Submerged culture)

와 같이 표면배양의 경우 M-80은 0.15%, M-315는 0.1%, 액내배양의 경우는 0.15%에서 각각 좋았다.

4) 마그네슘염의 농도

마그네슘염이 구연산생산에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MgSO₄·7H₂O를 0~0.04% 첨가한 결과 Fig. 3에서와 같이 표면배양은 0.025%, 액내배양의 경우는 0.03%가 각각 좋았다.

5) 微量金屬元素의 影響

구연산발효에 있어서 미량금속원소들은 균의 생육이나 生酸에 직접 혹은 간접으로 영향을 미치며 앞에서 말한 바와 같이 공업용원료를 사용할 경

우 aconitase의 cofactor로서 작용하는 Fe⁺⁺를 비롯하여 Zn⁺⁺, Mn⁺⁺, Cu⁺⁺, Ca⁺⁺, Al⁺⁺, Mo⁺⁺, Cr⁺⁺ 등이 生酸을 저해 혹은 촉진한다고 하였다¹⁰⁾. 본 실험에서는 여러가지 미량원소 중 대표적인 Fe⁺⁺, Mn⁺⁺, Zn⁺⁺ 등의 生酸에 미치는 영향을 살펴보았는데 그 결과 (Table 6) Fe⁺⁺의 첨가량은 M-80의 경우 3 mg/l, M-315의 경우 표면 및 액내배양에서 모두 2 mg/l이었을 때 生酸이 각각 47.6%, 49.1%, 39.3%로서 약간 촉진되었으나 그 이상의 농도에서는 오히려 저해되었다. Shu 등¹³⁾은 액내배양에서 Fe⁺⁺를 1.3mg/l, 滋賀¹⁴⁾은 3mg/l 첨가하였을 때 酸生産을 촉진한다고 하였으나 尾崎 등¹⁵⁾은 표면배양 때

Table 6. Effect of Metallic Ions on Citric Acid Fermentation

Metallic ions	Method No. of strain Conc. (mg/l)	Citric acid (mg/ml)			Yield (%)		
		Surface culture		Submerged culture	Surface culture		Submerged culture
		M-80	M-315	M-315	M-80	M-315	M-315
Fe ⁺	0	64.9	67.4	53.9	46.3	48.1	38.15
	1	65.2	97.9	54.3	46.5	48.5	38.7
	2	65.3	68.8	55.1	46.6	49.1	39.3
	3	66.7	65.2	53.2	47.6	46.5	38.0
	4	66.0	61.3	52.5	47.0	43.7	37.5
	5	65.2	56.1	50.0	46.4	40.0	35.7
	6	62.4	4907	46.1	44.6	35.5	32.9
Mn ⁺⁺	0	66.7	69.4	54.8	47.6	49.5	39.1
	0.1	68.6	68.8	53.6	49.0	49.1	38.2
	0.2	67.2	67.3	52.3	48.0	48.1	37.3
	0.3	65.9	66.9	50.0	47.1	47.8	35.7
	0.4	64.3	65.2	46.9	45.9	46.6	33.5
	0.5	61.5	63.8	42.7	43.9	45.6	30.5
	0.6	58.2	59.8	40.1	41.6	42.7	28.6
Zn ⁺⁺	0	67.2	69.8	53.4	48.0	49.8	38.1
	1	69.0	70.4	54.1	49.2	50.3	38.6
	2	66.9	71.8	54.8	47.7	51.2	39.1
	3	63.4	71.0	55.3	45.2	50.7	39.5
	4	62.9	69.3	53.6	44.9	49.5	38.2
	5	60.3	64.7	51.4	43.0	46.2	36.7
	6	55.8	56.2	47.4	39.8	40.1	33.8
Cu ⁺⁺	0	69.2	70.8	54.1	49.4	50.5	38.6
	0.05	68.4	71.5	54.9	48.6	51.1	39.2
	0.10	67.6	69.8	55.1	47.8	49.8	39.4
	0.15	66.1	66.2	53.8	47.2	47.2	38.4
	0.20	64.5	62.1	52.3	46.0	44.3	37.3
	0.25	60.8	57.8	50.6	43.4	41.2	36.1
	0.30	57.7	51.2	47.4	41.2	36.5	33.8

에 Fe⁺의 適量은 0.0001~0.0005%이며 허용 한도는 0.01%이라고 하여 많은 량의 첨가효과를 밝힌 바 있다. 또한 Mn⁺⁺의 경우에 있어서는 Bernhauer 等¹⁶⁾에 의하면 Fe⁺와는 달리 전혀 영향을 미치지 않는다고 한 반면 Perlman 等¹⁷⁾은 촉진한다고 하였는데 저자들의 실험에서도 별다른 효과를 찾아 볼 수가 없었다. Mn⁺⁺은 isocitrate dehydrogenase의 cofactor로서 알려져 있으며 이에 대해 Horitsu 等¹⁸⁾은 50~200ppm의 Mn⁺⁺을 첨가함으로써 증가되었다고 보고한 바있다.

한편 Zn⁺⁺은 Fe⁺와 함께 *Aspergillus niger*의 생

육과 生酸을 촉진하지만 그 량은 균주에 따라 다르게 나타나는데 Chrzaszcz 等¹⁹⁾은 Zn⁺⁺이 生酸에 미치는 영향이 거의 없다고 한 반면 Perlman 等¹⁷⁾은 발효 폐지에 첨가된 Zn⁺⁺은 구연산생성에 좋은 촉진제가 된다고 하였다.

본 실험에서도 Zn⁺⁺을 0~6mg/l 첨가하여 조사한 결과 M-80은 1mg/l의 적은 량을 요구하였으나, M-315는 액내배양과 표면배양에 각각 2mg/l, 3mg/l 첨가하였을 때 약 2% 정도의 수율이 향상되었다.

Cu⁺⁺는 표면배양의 경우 M-80은 다른 研究者들

의 결과^{16,17)}와 같이 유해하였으며 M-315는 표면 배양에는 0.05mg/l, 액내배양에는 0.1mg/l로 미량 첨가하므로써 약간의 효과를 보였다가 그 이상은 저해하는 경향을 나타내었다.

6) 초기 pH의 영향

구연산 생성에 있어서 pH가 生成酸의 종류 및 생성량에 중요한 영향을 미치며 生酸에 적합한 pH는 연구자에 따라 아주 다르다. 坂口等²⁰⁾은 *Aspergillus oryzae*에 있어서 초기의 pH를 높게 하는 것이 좋다고 하였으나 Bernhauer等²¹⁾은 낮은 pH

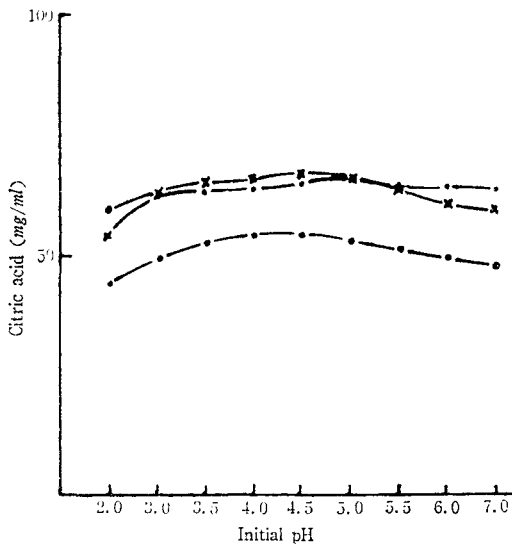


Fig. 4. Effect of Initial pH on Citric Acid Fermentation

- · · M-80 (Surface culture)
- × × × M-315 (Surface Culture)
- ○ ○ M-315 (Submerged culture)

Table 7. Effect of Temperature on Citric Acid Fermentation during Cultural periods

Strain	Temperature (°C)	Citric acid (mg/ml)	Yield (%)	Mycellium weight
M-80	26	60.3	45.0	2.104
	28	68.4	48.8	2.405
	30	67.9	48.5	2.601
	32	66.3	47.3	2.716
M-315	26	62.5	46.4	2.285
	28	68.08	49.0	2.108
	30	69.8	49.8	2.467
	32	67.2	48.0	2.587

가 오히려 구연산생성에 적합하며 높은 pH에서는 oxalic acid나 gluconic acid같은 불필요한 酸을 생성한다고 하였다.

저자 등도 앞에서 얻은 각종염류농도를 최적으로 조절하여 0.5N HCl 및 0.5N NaOH로써 pH를 맞춘 후 초기 최적 pH를 조사하였다. 그 결과 Fig. 4에서 처럼 M-80은 pH5.0, M-315는 표면 및 액내배양 모두 pH 4.5에서 최적을 나타내었다.

7) 배양온도

배양온도를 26°C, 28°C, 30°C, 32°C로 하여 앞서 얻은 조건으로 표면배양한 결과 Table 7에서와 같이 M-80은 28°C, M-315는 30°C에서 다소 양호한 결과를 보이고 있으며 대체로 28~30°C에서 큰 차이는 없었다.

8) 접종량에 따른 효과

Gerhardt等²²⁾에 의하면 구연산생성 시 종균의 접종량이 많을수록 酸生成에 효과가 크다고 하였으

Table 8. Effect of Amount of Spore Inoculation on Citric Acid Fermentation

Dilution No.	Method No. of strain Spore/50ml	Citric acid (mg/ml)			Yield (%)		
		Surface culture		Submerged culture	Surface Culture		Submerged culture
		M-80	M-315		M-80	M-315	
1	1×10 ⁸	69.7	71.6	54.4	49.7	51.4	38.8
2	1×10 ⁷	68.0	71.4	54.5	48.5	51.0	38.9
3	1×10 ⁶	67.3	70.2	53.3	48.0	50.1	38.0
4	1×10 ⁵	59.5	61.0	50.1	42.5	43.5	35.7
5	1610 ⁴	47.3	53.2	44.2	33.7	38.0	31.5
6	1×10 ³	41.6	42.2	26.1	29.7	30.1	18.6
7	1×10 ²	31.8	28.7	15.7	22.7	20.5	11.2
8	1×10	19.0	9.7	7.4	13.5	6.9	5.2

Bernhauer 等²⁾은 배양액 100ml 당 100만~5,700만의 포자를 접종시키는 것이 적당하다고 하였다. 본 실험에서도 포자현탁액을 hematometer 에 의해 포자 수 $1 \times 10^4 \sim 10^8$ 개/ml 로 조절하여 배양액 50 ml 에 1ml 씩 접종한 결과 Table 8 과 같이 대체로 접종포자수가 많을수록 좋은 결과를 보였다.

9) 培養日數의 영향

前記의 최적배양 조건으로서 표면 및 액내 배양을 하면서 경시적으로 조사한 결과 M-80의 표면 배양의 경우는 Fig. 5 와 같이 접종한 지 1일이 지나면 菌蓋를 형성하기 시작하고 pH의 하강과 급격한 당의 소비가 이루어지기 시작하였다. 3~4일이 지나면 균체증식이 거의 끝나고 본격적으로 酸生成이 시작되어 이로부터 약 3일동안 대부분의 구연산이 축적되는 것 같았다. pH는 3일이 지나면 2.0 이하로 떨어져 이후는 2.0~1.8 사이에서 유지되며 환원당도 급격히 이용되기 시작하여 5일째는 이미 85%를 이용하였으며 10일째는 대부분의 당이 균체생육 및 酸生成에 이용되었다. 구연산생성량은 8일째 69.7mg/ml로서 최대량을 기록하였다. 그 이상의 발효기간이 계속되면 구연산생성 대신 축적된 구연산이 분해되어 다른酸으로 되거나 균체생육에 이용되는 것으로 생각된다.

M-315의 표면 배양의 표면배양에서는 M-80과는 약간 달리 구연산생성량도 9일째에 71.3mg/ml로서 다소 높은 수율을 보였고 균체량은 오히려 적었으며 M-80과 같이 pH가 2.0 이하로 떨어지면 균체의 증식이 불량한 대신 당 소비와 함께 구연산의 축적이 이루어지는 것 같았다.

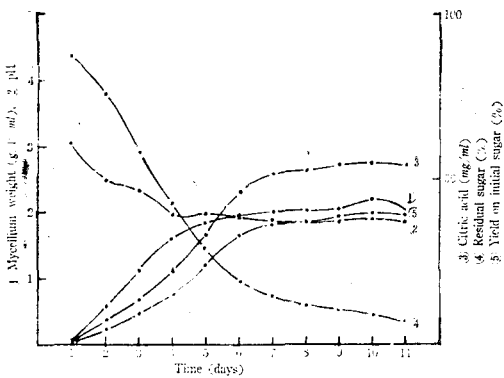


Fig. 5. Chemical Changes during Fermentation by M-80 in Surface Culture.

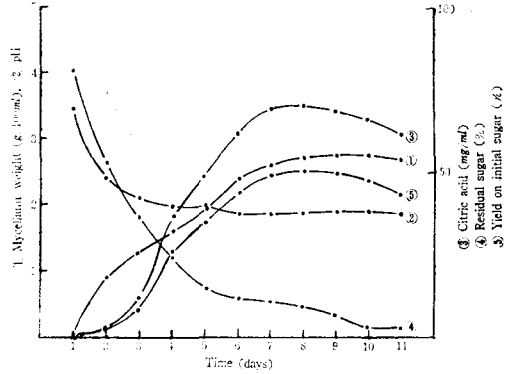


Fig. 6. Chemical Changes during Fermentation by M-315 in Surface Culture.

한편 M-315의 액내배양에서는 Fig. 7과 같이 표면배양보다 낮은 수율을 보였는데 여기에는 균주의 선정, 플라스크배양에서의 나쁜 발효조건을 비롯한 여러가지 요인이 작용한 것으로 생각되어진다. 특히 이때는 당의 소비속도가 표면배양에서 보다 늦었으며 酸生成量도 접종 10일만에 54.4mg/ml로 나타났는데 통기상태와 그의 발효조건을 개선할 경우 다소 수율이 변화될 것으로 생각되며 이에 대해서는 앞으로 더욱 연구를 계속해 나갈 것이다.

2. 各種 添加物에 따른 影響

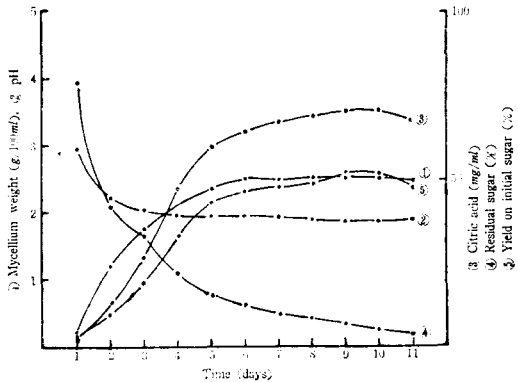


Fig. 7. Chemical Changes during Fermentation by M-315 in Submerged Culture.

Table 9. Effect of methanol on Citric Acid Fermentation

Conc. of methanol	Method No. of Strain	Citric acid (mg/ml)			Yield (%)			Mucellium weight (g/100ml)		
		Surface culture		Submerged culture	Surface culture		Submerged culture	Surface culture		Submerged culture
		M-80	M-315	M-315	M-80	M-315	M-315	M-80	M-315	M-315
BK		69.4	70.8	54.74	49.6	50.6	39.1	2.682	2.512	2.113
1		70.8	74.6	57.54	50.6	53.3	41.1	2.031	2.106	1.874
2		77.1	81.5	61.74	55.1	58.2	44.1	1.543	1.681	1.442
3		71.1	100.5	58.8	50.8	71.8	42.0	1.278	1.199	1.162
4		57.7	90.6	55.16	41.2	64.7	39.4	1.042	1.142	0.943
5		49.3	78.7	49.0	35.2	56.2	35.0	0.781	0.925	0.692
6		41.6	68.8	42.12	29.7	49.1	30.8	0.672	0.601	0.471

구연산발효의 生酸促進劑로서는 $CaCl_2$, H_2SeO_3 , 粉乳, methanol, NaCN, NaF 등을 비롯하여 상당 수가 있으나 그 결과는 균주에 따라 다르며 동일한 균주라도 분리 후 보존기간 등에 따라 일정하지 않다. 본 실험에서는 일반적으로 발효에 영향을 주는 것으로 알려져 있는 각종첨가물을 첨가해 본 결과 methanol 외는 큰 효과를 얻지 못하였다.

Moyer²³⁾는 *Aspergillus niger* NRRL 567의 구연산발효에서 methanol, ethanol의 1~3% 첨가와 isopropanol 2% 첨가 시 구연산생성이 증가된다고 하였고 사용균의 methanol에 대한 효과는 pH와도 관계가 있으며 pH 1.95일 때는 2%의 methanol을 첨가할 때가 가장 좋았는데 배지에 methanol을 첨가함으로써 미량금속원소에 대한 내성을 증가시키어 blackstrap molasses와 같은 crude한 탄소원의 사용을 용이하게 할 수 있다고 하였다. 본 실험에서도 methanol의 효과를 알아 보기 위하여 발효 배지를 살균하여 접종전에 무균적으로 methanol을 0~6% 첨가하여 본 결과 현저한 효과를 보였다.

즉 Table 9에서와 같이 표면배양에서는 2% methanol 첨가로써 약 6.3%의 수율이 증가되었고, 특히 M-315의 경우는 3%의 첨가로 20.4%의 현저한 증가로 仕込糖에 대해 70.1%의 酸生成을 보였으며 酸의 증가와는 달리 균체의 생육과 포자형성은 극히 불량하였다. M-315의 액내배양의 경우에도 2%의 첨가로 5%의 수율향상을 가져왔다.

3. 培養物의 分析

1) 生成酸의 檢定

前記의 최적발효조건으로 발효시킨 배양물 중에 생성된 酸을 定性하기 위하여 P.P.C法으로 전개하여 발색시킨 결과는 Table 10과 같다. 즉 표준산으로서 citric acid를 포함한 6종을 0.5% 수용액으로 하여 탈염한 배양액과 동시에 전개시켜 발색시킨 결과 표준물질 citric acid와 배양액을 전개시켜 나타나는 spot와 같은 Rf치를 보였고 M-80 및 M-315 표면배양액에서는 oxalic acid의 흔적을 찾아 볼 수 있었으나 배양액 중의 대부분의 산이 구연산인 것으로 확인되었다. 그런데, 표준액의

Table 10. Qualitative Analysis Fermented Solution by Paper Chromatography

Organic acid	Rf value	Strain No. of exp.	Method		Surface Culture				Submerged culture	
					M-80		M-315		M-315	
			1	2	1	2	1	2		
Succinic acid	0.83		—	—	—	—	—	—	—	—
Lactic acid	0.79		—	—	—	—	—	—	—	—
Malic acid	0.64		—	—	—	—	—	—	—	—
Citric acid	0.58		+	+	+	+	+	+	+	+
Tartaric acid	0.48		—	—	—	—	—	—	—	—
Oxalic acid	0.39		—	trace	trace	—	—	—	—	—

발색에서 lactic acid는 spot가 깨끗하게 나타나지 않았으며 특히 succinic acid와 비슷한 Rf치를 나타내고 있어서 식별하기 어려웠다.

2) 生成酸의 定量

우선 7가지의 각종 표준유기산을 前記의 方法에 따라 partition chromatography를 행하고 그 酸

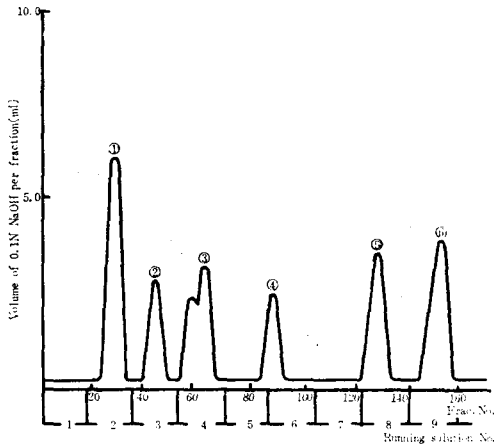


Fig. 8. Chromatogram of Standard Organic Acid

- ① Acetic acid ② Formic acid
- ③ Lactic, succinic acid ④ Malonic acid
- ⑤ Oxalic acid ⑥ Citric acid

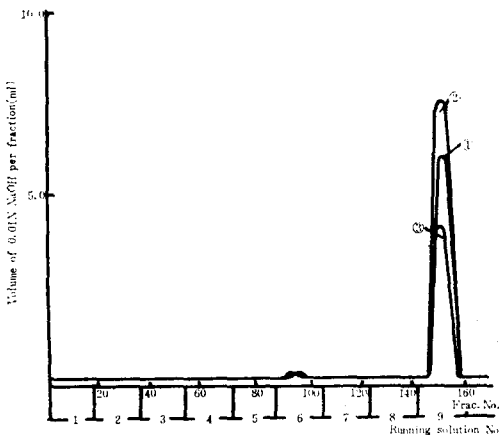


Fig. 9. Chromatogram of Various Fermented Solutions

- ① Fermented Solution of M-80 in Surface culture
- ② Fermented Slnution of M-315 in Surface culture
- ③ Fermented Solution of M-315 in Submerged culture

이 용출되어 나오는 위치를 확인한 결과 Fig. 8과 같이 나타났다. 이어서 각종배양물을 Fig. 9 표준 유기산에서의 경우와 같이 partition chromatography를 행한 결과는 Fig. 9과 같았으며 M-80 및 M-315 표면배양액에서는 oxalic acid 및 citric acid의 위치에서 두개의 peak가 M-315의 액내배양액에서는 citric acid 위치에서 하나의 peak가 나타났는데 이를 정량한 결과 M-80의 표면배양액에서는 oxalic acid 0.6mg/ml, citric acid 72.1mg/ml이 정량되었고 M-315 표면배양액에서는 oxalic acid 1.1mg/ml, citric acid 98.1mg/ml이, M-315액내배양액에서는 citric acid만 59.8mg/ml이 정량되어 공시균들은 유기산 중 구연산만을 거의 선택적으로 생성하는 균주라고 생각되었다.

要 約

전보에서 분리선정된 균의 발효조건 및 각종첨가물의 영향을 검토하고 배양물을 분석한 결과는 다음과 같다.

1. 선정균의 최적배양 조건은 표면배양의 경우, M-80은 sucrose 140g, $(NH_4)_2SO_4$ 3.0g, KH_2PO_4 1.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25g, Fe^{3+} 3.0mg, Zn^{2+} 1.0mg, D. W. 1l, pH 5.0이었고, M-315는 sucrose 140g, NH_4NO_3 2.0g, KH_2PO_4 1.0g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25g, Fe^{3+} 2.0mg, Zn^{2+} 2.0mg, Cu^{2+} 0.05mg, D. W. 1l, pH 4.5이었으며, M-315의 액내배양의 경우 sucrose 140g, NH_4NO_3 2.5g, KH_2PO_4 1.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3g, Fe^{3+} 3.0mg, Zn^{2+} 3.0mg, Cu^{2+} 0.1mg, D. W. 1l, pH 4.5이었다. 배양온도는 28~30°C, 포자접종량은 배양액에 $10^7 \sim 10^8$ 개/ml 접종하였을 때 酸生成이 가장 좋았다.

2. 선정균의 생육상태와 酸生成關係를 경시적으로 조사한 결과 배양 3~4일 후에 균체의 증식은 거의 끝나고 pH는 2.0 이하로 저하되었으며 구연산은 이때부터 급속히 축적되기 시작하여 표면배양의 경우, M-80은 8일, M-315는 9일, M-315의 액내배양의 경우는 10일간 배양하였을 때 구연산생성량이 최고치에 달하였다.

3. Methanol의 첨가는 구연산생성에 좋은 영향을 미쳤으며 표면배양의 경우 M-80, M-315의 배양액에 2.0%, 3.0% 첨가하였을 때 각각 6.5%, 20%의 수율이 향상되었고, M-315의 액내배양액에는 3.0%의 첨가로 5.0%의 수율이 향상되었다.

4. 최적조건하에서 발효시킨 분리균의 배양물을 분석한 결과 대부분이 구연산만을 선택적으로 축

적하고 있었고, 표면배양의 경우 M-80, M-315 배양액에 각각 72.1mg/ml, 98.1mg/ml이, M-315의 액내배양액에는 59.8mg/ml 구연산이 정량되었다.

參 考 文 獻

- 1) Thom, C. and Currie, J. N. : *J. Agri Research.*, **7**, 1 (1916).
- 2) Bernhauer, K., Knobloch, H. and Iglauer, A. : *Bio. Z.*, **309**, 151 (1941).
- 3) 尾崎淺一郎, 原田良浩, 福本軍次, 竹下和夫, 渡邊達雄, 鈴木憲 : 日本醱酵協會誌, **14**, 457 (1956).
- 4) Anthony, H. Rose: *Industrial Microbiology*, Butter Worth and Co. Ltd., p.170 (1963).
- 5) Warkman, M. J. and Karrow, E. D. : *Ind. Eng. Chem.*, **39**, 821 (1947).
- 6) Johnson, M. J. and Shu, P. : *Ind. Eng. Chem.*, **40**, 1202 (1948).
- 7) 成洛葵, 金明燦, 沈奇煥, 鄭德和 : 韓國産業微生物學會誌, **8** (1), 47 (1980).
- 8) Marvel, C. S. and Jr. Rands, R. D. : *J. Ame. Chem. Soc.*, **72**, 2642 (1950).
- 9) Bullen, W. A., Varmer, J. E. and Burrell, R. C. : *Analytical Chemistry*, **24** (1), 187(1952).
- 10) Porges, N. : *Amer. J. Bot.*, **19**, 559 (1932).
- 11) Doelger, W. P. and Prescott, S. C. : *Ind. Eng. Chem.*, **26**, 442 (1934).
- 12) 尾崎淺一郎, 福本軍次, 鈴木憲 : 醱酵協會誌, **13**, 134 (1955).
- 13) Shu, P. and Johnson, M. J. : *J. Bact.*, **56**, 577 (1948).
- 14) 滋賀達二 : 日本農藝化學會誌, **27**, 118(1953).
- 15) 尾崎淺一郎, 竹下和夫, 渡邊幸雄 : 醱酵協會誌, **13**, 333 (1955).
- 16) Bernhauer, K. : *Bio. Z.*, **197**, 287 (1928).
- 17) Perlman, D., Dorres, W. W. and Johnson, M. J. : *ch. Ab.*, **40**, 7508 (1946).
- 18) Horitsu, H. : *J. Ferm. Assoc. Japan*, **32** (2), 46 (1974).
- 19) Chrzaszcz, T., Zakomorny. U. M. : *Prezm. Ch.*, **22**, 296 (1938).
- 20) 坂口謹一郎, 中尾清磨 : 日本醸造協會誌, **25** (8), 121 (1930).
- 21) Bernhauer, K. : *Bio. Z.*, **172**, 313 (1926).
- 22) Gerhardt, P., Dorrel, W. and Baldwin, I. L. : *J. Bact.*, **52**, 555 (1946),
- 23) Moyer, A. J. : *Appl. Microbiol.*, **1**(1), 1(1953).