

Candida lipolytica 變異株에 의한 枸橼酸醱酵

全孝坤 · 成洛癸 · 朴奭圭*

慶尙大學校 食品加工學科

*慶南大學校 食品工學科

(1985년 8월 1일 수리)

Citric acid Fermentation by Mutant Strain of *Candida lipolytica*

Hyo Kon Chun, Nack Kie Sung and Seok Kyu Park*

Department of Food Science and Technology, Gyeong Sang National University, Jinju, Korea

*Department of Food Engineering, Kyungnam University, Masan, Korea

(Received August 1, 1985)

In order to increase citric acid productivity, several attempts were made; isolation and characterization of the mutant strain produced citric acid in a high yield, citric acid fermentation in a medium containing relatively higher amount of glucose and citric acid production by the use of semicontinuous cell recycle system. By the treatment of *Candida lipolytica* S-109 with NTG, a mutant J-24 was selected as the highest producer of citric acid among the strains formed larger CaCO_3 lytic zone. It produced 72g/l citric acid in 10% glucose medium. Because mutant J-24 produced 85g/l citric acid and showed 53% yield in 16% glucose medium, several factors were adjusted to increase the yield in 16% glucose medium. $0.8-1.0 \times 10^{-3}$ P/C ratio, 0.15% urea, 0.25% yeast extract were suitable at citric acid production in 16% glucose medium. Under this condition, J-24 strain produced 93g/l citric acid and showed 58% yield. Semicontinuous cell recycle system was used to prolong the effective production phase, to minimize the product inhibition and to shorten the lag phase. The productivity of semicontinuous cell recycle system was 0.79g/l.h while that of batch system was 0.53g/l.h

효모는 종래의 구연산발효에 사용되는 곰팡이에 비하여 발효기간이 짧고 大量連續培養이 가능하며 균체를 회수하여 再利用할 수 있다는 잇점이 있어 구연산 발효균주로서 많이 이용되고 있으며 이에 대한 많은 연구가 진행되고 있다^(1-9,14).

효모에 의한 구연산생성은 배지내의 질소원이 결핍된 후 미생물체내의 AMP 함량이 감소한 후에 일어난다고 보고되어 있으며⁽¹⁻²⁾, 그 生成機作은 사용되는 기질, 즉 *n*-alkane, glucose, oil등에 따라 다르다^(5,9). 또한 구연산의 축적량을 증가시키기 위한 대사계의 필수조건은 구연산 전구체인 acetyl CoA 및 oxalacetate 의 충분한 공급과 구연산 catabolism의 억제 및 TCA cycle 중간물질의 anaplerotic

반응의 억제인 것으로 추정된다⁽⁵⁾.

본 실험에서는 NTG 처리에 의한 균주의 개량으로 구연산 생성능이 향상된 變異株를 分離하였고, 비교적 높은 糖濃度의 培地組成으로 배양액내의 구연산 축적량을 증가시켰으며, 또한 생산기를 효율적으로 연장하고 생산물저해를 억제하기 위하여 菌體循環式 半連續培養⁽⁷⁾을 실시한 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

供試菌株

경상대학교 식품가공학과 발효학연구실에서 분리

Table 1. The composition of media used (%)

Ingredient	Media	Basal*	YEPD	Citrate**
Glucose		10	5	
Na-Citrate				0.7
Peptone			0.5	
Yeast extract		0.2	0.2	0.01
(NH ₂) ₂ CO		0.1	0.1	0.2
KH ₂ PO ₄		0.05	0.05	0.05
MgSO ₄ · 7H ₂ O		0.06	0.06	
CaCO ₃		1.0		

* : basal media for citric acid production⁽⁸⁾

** : media for comparison of citric acid assimilating ability

동정한 *Candida lipolytica* S-109와 그 NTG (N-methyl-N' nitro-N-nitrosoguanidine) 유도변이균주를 사용하였다⁽⁸⁾.

培地 및 培養方法

본 실험에 사용한 배지는 Table 1과 같다.

플라스크培養에서는 25 ml 배지를 300 ml 플라스크에 분주하여 살균한 후 공시균주를 24 시간 전배양한 액을 0.5 ml 접종하여 30 °C 에서 진탕배양 (stroke 5 cm, oscillation 170/min) 하였다. Jar fermentor 실험에서 回分式培養의 경우는 1l의 배지를 2l jar fermentor에 분주하여 살균한 후 전배양한 액 500 ml 를 접종하여 배양 (500 rpm, 0.5v vm, 30 °C) 하였으며 菌体循環式半連續培養⁽⁷⁾의 경우는 회분식과 같은 조건에서 96시간 배양한 후 1시간 정치하여 균체를 침강시킨 다음 상정액 500 ml를 빼내고 새로운 배지 500 ml 를 무균적으로 첨가하여 40시간 배양한 후 1시간 정치하여 다시 상기조작을 반복하였다.

枸橼酸, 菌体量 및 殘糖의 測定

구연산의 정량은 Saffran법⁽⁹⁾과 pentabromoacetone법⁽¹⁰⁾을 사용하였고 잔당은 Somogyi법⁽¹¹⁾에 의하여 측정하였으며 균의 생육은 건조균체량으로 측정하였다.

變異菌株의 分離方法

親株인 *Candida lipolytica* S-109를 YEPD 배지에서 24시간 진탕배양하고 원심분리 (5,000 rpm, 8 min) 하여 얻어진 균체를 멸균수로 3회 세척한 다음 0.1 M Tris buffer (pH 7.0) 로써 10⁷~10⁸ cells/ml 현탁액을 만들어 NTG (0.4 mg/ml) 를 28 °C 에서 30분간 처리한 후 생리식염수로 NTG 를 씻어낸 다

Table 2. Conditions of gas chromatographic analysis

Column : 15% DEGS/Chromosorb W, 60~80 mesh/3mm × 2 m stainless steel
Column temp : initial 100 °C, final 190 °C, 3 °C/min
Carrier gas (N ₂) : 60 ml/min
Chart speed : 5 mm/min
GC model : Shimadzu GC-6AM

음 회석하여 CaCO₃를 함유한 배지에 평판하여 3일간 배양한 후 형성된 colony 중에서 CaCO₃ lytic zone이 큰 colony를 선별하였다^(3,12).

培養液中的 酸의 分析

배양액에 동량의 2N HCl을 첨가하여 구연산염을 녹여낸 후 원심분리하여 얻은 상정액 2 ml를 감압건조하여 1 ml methanol로써 녹여낸 다음 황산-메탄올혼합액 (1:9, v/v)을 첨가혼합하여 26 °C 에서 16시간 정치한 후 냉각하여 2 ml 냉증류수를 첨가하고 NH₄OH 수용액 (1:1)으로 중화 (bromothymol blue)시킨 다음 냉증류수로써 10 ml로 정용하였다⁽¹³⁾. 정용한 액 10 ml와 chloroform 10 ml를 분액여두로서 혼합하여 정치시켜 얻은 chloroform층을 무수 Na₂SO₄ 1g을 함유한 주사약병에 옮긴 후 Table 2와 같은 조건에서 GLC로 분석하였다.

결과 및 고찰

變異株의 分離 및 特性

1) 변이균주의 구연산생성능

친균주(親菌株)보다 구연산생성능이 향상된 4개의 NTG유도 변이균주를 분리·선별하였으며 (Table 3) 특히 변이균주 J-24는 6일간 배양에 의하여 72 g/l

Table 3. Isolated mutants

Strains	Citrate (g/l)	DCW (g/l)*	Residual sugar (%)
S-109	56	8.65	1.03
I-32	65	8.25	0.94
J-24	72	8.17	0.52
K-18	68	7.98	0.50
K-112	67	8.32	0.73

* dried cell weight

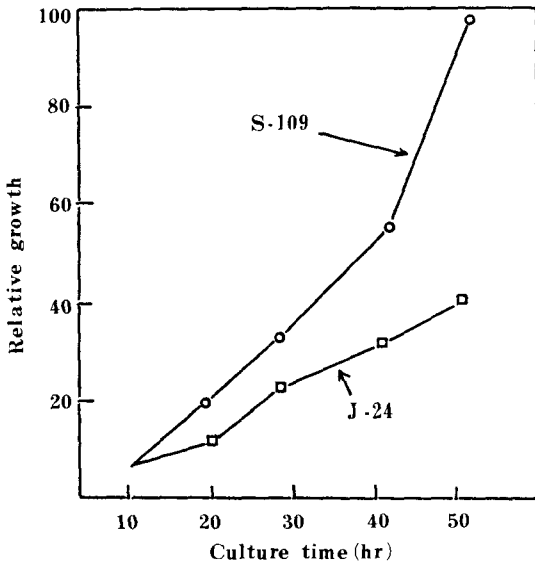


Fig. 1. Growth responses of parent strain S-109 and mutant strain J-24 to citric acid.

구연산을 생성하여 친균주보다 30% 정도 향상시켰으나 균체생성은 약간 떨어지는 것으로 나타났다.

또한 곰팡이에 비하여 첨가한 당에 대한 수율이 우수하였고 발효기간은 곰팡이가 7~10일인데 비하여 6일로서 비교적 짧았다.

2) 변이균주의 구연산자화능

변이균주의 TCA cycle에서 구연산 이후 대사경

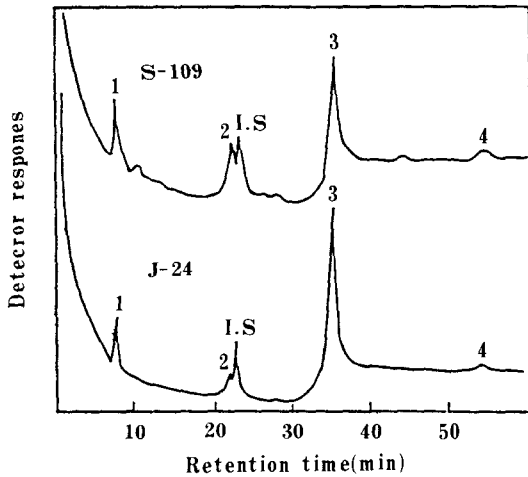


Fig. 2. Gas chromatograms of methyl esters of organic acids produced by parent strain S-109 and mutant strain J-24.

1 : fumarate, 2 : malate, 3 : citrate, 4 : isocitrate, I.S : internal standard

로의 blocking 정도를 간접적으로 추정하기 위하여 친균주와 변이균주의 구연산자화능을 비교하여 본 결과는 Fig. 1과 같았으며, 변이균주의 구연산자화능이 친균주의 높 정도로 구연산 이후의 대사계가 완전 blocking 되지 않고 부분적으로 blocking된 것으로 나타났다.

3) 변이균주의 유기산 조성

친균주와 변이균주 J-24의 배양액중의 유기산 조성을 분석한 결과(Fig. 2), 친균주가 생성하는 산의 69%는 구연산이었으며 그외에 종래 보고된^(12,14) 효모와는 달리 fumarate, malate가 부생되었다. 변이균주가 생성하는 산의 88%는 구연산이었지만 아직도 fumarate 및 malate가 약간 부생된다는 사실과 구연산자화능이 아직 존재한다는 점에서 변이균주 J-24는 더욱 변이시킬 여지가 있는 것으로 사료된다.

炭素源이 枸橼酸生産 및有機酸組成에 미치는 영향 효모에 의한 구연산생성에 중요한 탄소원인 glu-

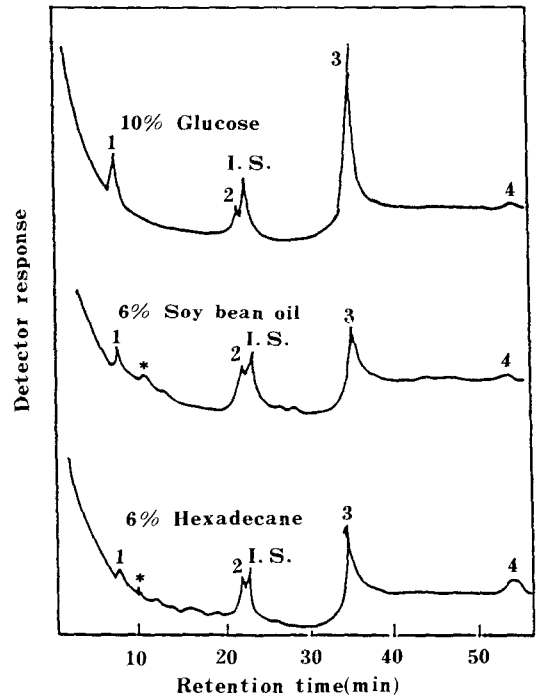


Fig. 3. Gas chromatograms of methyl esters of organic acids produced from 10% glucose, 6% Soy bean oil and 6% n-hexadecane by mutant strain J-24.

1 : fumarate, 2 : malate, 3 : citrate, 4 : isocitrate * : succinate

Table 4. Effect of glucose, *n*-hexadecane and soy oil on citrate production and cell growth

C source	Citrate (g/l)	Yield (%)	DCW (g/l)
Glucose	72	72	8.14
<i>n</i> -Hexadecane	47	78.3	7.29
Soy oil	40	66.7	9.72

content of C source (glucose: 10%, soy oil : 6%, *n*-hexadecane : 6%)

$$\text{yield} = \frac{\text{content of citrate produced}}{\text{content of C source added}} \times 100$$

case, *n*-hexadecane 및 Soy oil이 유기산조성에 미치는 영향을 Fig. 3 및 Table 4에 나타내었다. 첨가한 각 탄소원에 대한 수율은 거의 비슷하였으나 glucose일 때가 구연산축적량이 다른 두 탄소원에 비하여 많았다. 유기산조성은 *n*-hexadecane, soy oil인 경우가 glucose에 비하여 isocitric acid 및 succinate의 부생이 많았으며, 이것은 이들 탄소원의 대사경로의 차이에 기인되는 것으로 생각된다^(5, 9, 15).

Glucose에서 구연산을 생성하기 위해서는 구연산 이후 대사경로가 blocking 되어야 하기 때문에 oxalacetate를 보충하기 위해서는 pyruvate carboxylase의 활성이 중요한 역할을 한다고 보고된^(11, 12) 바 있지만 본 실험의 균주는 malate, fumarate가 부생되는 것으로 보아 충분한 량의 oxalacetate가 생성되어 pyruvate carboxylase는 크게 중요한 역할을 하지 못하는 것으로 추정된다.

16% glucose 배지에서의 枸橼酸生産

비교적 높은 농도의 glucose배지에서 구연산발효

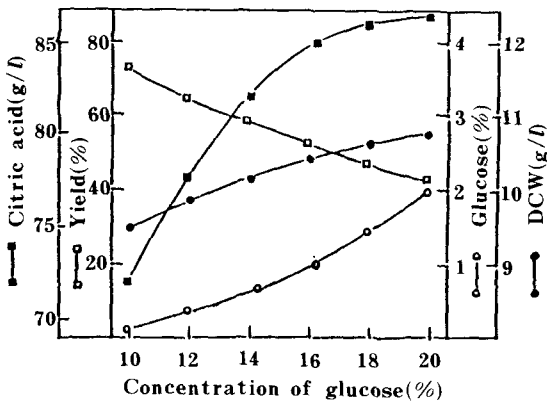


Fig. 4. Effect of Glucose concentration on citrate production, cell growth, glucose consumption and yield.

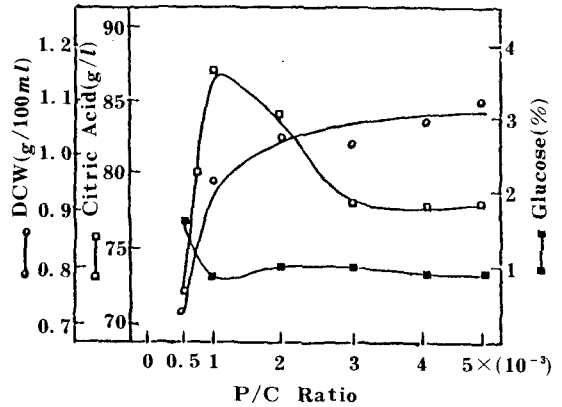


Fig. 5. Effect of P/C ration on citric acid production, cell growth and glucose consumption in the medium containing 16% glucose.

를 실시한다면 짧은 시간에 많은 량의 구연산을 생성하여 배양액중의 구연산축적량을 향상시킬수 있고 발효공정에 소모되는 energy를 절약할 수 있으므로 糖수율이 가장 높은 10% glucose농도 이상에서 농도별 구연산축적량을 조사한 결과 (Fig. 4), 16%까지는 급격히 증가하다가 그 이상의 농도에서는 완만하였다.

53% 수율을 나타내는 16% glucose 배지에서 구연산생성 및 균체생성에 적합한 P/C比⁽⁶⁾, urea, yeast extract 농도를 조사한 결과, P/C比는 0.8~1.2 × 10⁻³에서 가장 많은 량의 구연산을 생성하였으며 그 이상에서는 오히려 감소하는 경향으로 나타났다. P 원은 당대사 중요한 역할을 하는 성분이므로 P

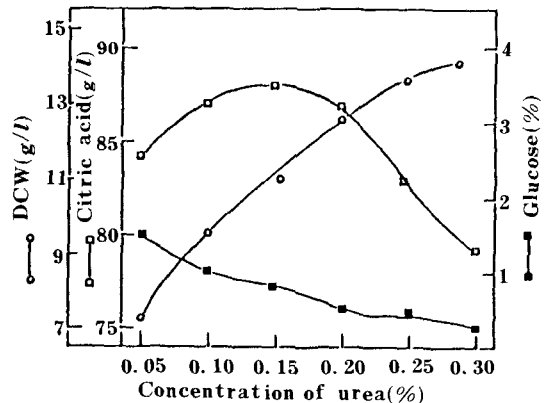


Fig. 6. Effect of concentration of urea on citric acid production, cell growth and glucose consumption in the medium containing 16% glucose.

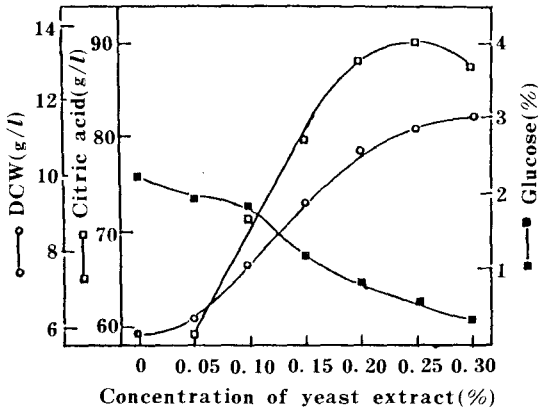


Fig. 7. Effect of concentration of yeast extract on citric acid production, cell growth and glucose consumption in the medium containing 16% glucose.

원이 많을수록 균체생육에만 영향을 미치고 적당히 결핍된 상태에서 구연산이 생성되는 것으로 생각된다. 16% glucose 배지에 적합한 urea 및 yeast extract 농도는 각각 0.15, 0.25%였으며 (Fig. 6, 7), 그 외에 중화제인 CaCO₃ 농도 및 첨가시기를 조정하여 93 g/l의 구연산을 축적하여 58%의 수율을 보였다.

菌体循環式 半連續培養⁷

2 l mini jar fermentor로 회분식 배양을 할 때 일어나게 되는 여러가지 발효기간중의 경시적 변화를 Fig. 8에 나타내었다.

배양 7일에 82 g/l의 구연산을 생성하여 플라스크 배양에서 보다 구연산생성능이 약간 떨어졌는데

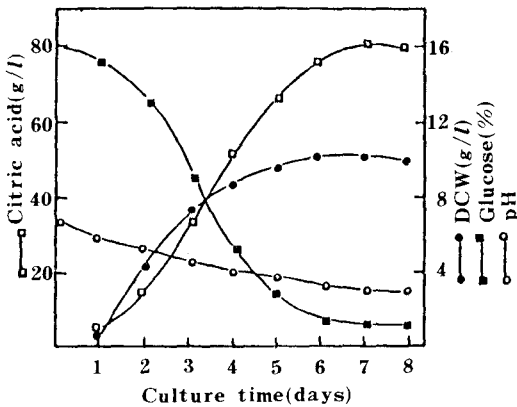


Fig. 8. Time course of citric acid production, pH, cell growth and glucose consumption in 2l mini jar fermenter.

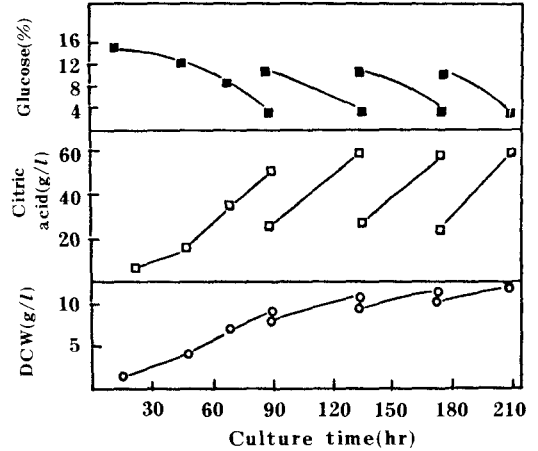


Fig. 9. Results of semicontinuous cell recycle fermentation with mutant strain J-24 using 16% glucose.

그 이유는 CaCO₃가 교반을 방해하기 때문인 것으로 생각된다.

배양초기에서 96시간까지의 구연산생성능은 0.53 g/l·h였고 구연산생성능이 가장 왕성한 시기인 60~90시간 사이에는 0.80 g/l·h였다. 균체순환식 반연속배양시 jar fermentor내의 구연산생성, 균체생육, glucose소모를 Fig. 9에 나타내었으며 200시간 배양한 결과 158 g의 구연산을 생성하여 0.79 g/l·h의 생산성을 나타내어 회분식에 비하여 1.5배 증가되었다.

요 약

효모의 구연산 생산성을 향상시키기 위하여 구연산 생성이 향상된 변이균주를 분리·사용하여 비교적 높은 당농도에서의 구연산발효 및 균체 순환식 반연속배양에 의한 구연산발효 실험을 실시하였다. 친균주인 *Candida lipolytica* S-109를 NTG 처리하여 친주균에 비하여 구연산생성능이 30%정도 향상되고 fumarate, malate, isocitrate 생성이 억제된 변이균주 J-24를 분리하였다. 친균주 S-109와 변이균주 J-24를 10% glucose 함유 배지에서 6일간 배양하여 각각 56 g/l, 72 g/l의 구연산을 생성하였다. 배양액내의 구연산축적량을 향상시키기 위한 비교적 높은 glucose 농도는 16%였으며 85 g/l의 구연산을 생성하여 53% 수율을 보였다. P/C 비, urea 및 yeast extract 농도를 각각 0.8~1.0 × 10⁻³, 0.15%, 0.25%로 할 때 93 g/l의 구연산을 축적하여 58% 수율

로 향상되었다. 효율적인 생산기를 연장하고 생산물 저해를 억제하며 유도기를 단축하기 위하여 균체순환식 반연속배양을 실시한 결과 그 생산성이 0.79 g/l·h로서 회분식의 0.53 g/l·h에 비하여 1.5배 높았다.

참고문헌

1. Aiba, S. and Matsuoka: *Eur. J. Appl. Microbial Biotechnol.*, **5**, 249 (1978).
2. Aiba, S. and Matsuoka: *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 1373 (1979).
3. Akiyama, S., T. Suzuki, Y. Sumino; *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 885 (1973).
4. Bartels, P. D. and P. K. Jensen: *Biochem. Biophys. Acta.*, **582**, 246 (1979).
5. Dellweg, H.: *Biotechnol.*, **3**, 419 (1983).
6. Furukawa, T., T. Ogino, T. Matsuyoshi: *J. Ferment. Technol.*, **60**, 281 (1982).
7. Furukawa, T., T. Ogino, T. Matsuyoshi: *J. Ferment, Technol.*, **60**, 377 (1982).
8. Sung N. K., S. G. Kang: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **11**(4), 271~276 (1983).
9. 田淵式士, 田原康孝, 田中優行, 抑内志保子: 日本農芸化学会誌, **44** (10), 617~622 (1973).
10. 小原哲二郎, 鈴木隆雄, 岩尾裕之: 食品分析ハンドブック, 建帛社, 第二版
11. Somogyi, M.: *J. Biol. Chem.*, **117**, 771 (1937).
12. 石川辰夫: 微生物遺傳學實驗法, 共立出版株式会社, 196 (1982).
13. Tabuchi, T. and N. Serizawa: *Agi. Biol. chem.*, **39**, 1049 (1975).
14. 田中優行, 田原康孝, 田淵式士, 阿部又三: 日本農芸化学会誌, **44** (11), 449~504 (1970).
15. 長谷川武治: 酵母におけち 適応と 制御, 日本学会出版センター, 191~207 (1977).