

## 구연산 발효에 관한 연구

(제 1 보) 균주선정 및 배지 개량

이상선\* · 박무영

한국과학기술연구소 · 한국과학원  
(1978년 11월 21일 수리)

## Studies on the Citric Acid Fermentation

(Part 1) Strain Screening and Medium Improvement

Sang Sun Lee\* and M. Y. Pack

Korean Institute of Science and Technology · Korea Advanced Institute of Science, Seoul, Korea  
(Received Nov. 21, 1978),

### Abstrat

Out of 11 organic acid producing strains isolated from fruits, soil, and air, one strain was selected for the study of the citric acid fermentation using Sakaguchi's medium. The organism was identified as *Aspergillus niger*. When *Asp. niger* was shaken at 30°C in a cotton plugged 500 ml Erlenmeyer flask with 100 ml of Sakaguchi's medium containing 10% of glucose (Difco), 0.6% of peptone, and mineral, citric acid were produced at the level of 17 gram per liter in 14 days. The citric acid was also produced at the level of 35 gram per liter after the improvements of Sakaguchi's medium—the adaptation, peptone addition, aeration, methanol addition, and glucose addition.

### 서 론

청량음료, 제약, 식품첨가물 등으로 막대한 수요를 가진 구연산은 옛날부터 감귤과 같은 과일에서 얻어 왔으나, 1893년 Wehmer<sup>(1)</sup>에 의해서 미생물이 구연산을 생산한다는 보고가 있는 후 미생물에 의한 구연산 생성이 활발히 연구되어 왔다.

구연산 생성균으로 알려진 균주는 *Aspergillus niger*, *Asp. clavatus*, *Asp. usamii*, *Asp. japonica*, *Penicillium leutum*, *Pen. citrinum*, *Mucor pisifor-*

*ms*, *Ustilina valgaria*<sup>(1,2,3,4,5)</sup>, *Hansenula anomala*<sup>(6)</sup>와 이들의 mutant 들이다.

발효방법에 따른 균주가 일반적으로 액침배양 (submerged culture)에 구연산 생성효율이 좋지 않다는 보고<sup>(7)</sup>가 있으나 Perlman<sup>(8)</sup>은 구연산 생성 균주 70 균주를 이용하여 액침배양이 잘 된다는 것을 증명하였다.

미생물에 의한 구연산 생성원리는 옛날부터 여러가지 학설이 있었으나, 확실한 것은 TCA cycle에서 acetyl CoA 와 oxaloacetic acid 와 축합하여 만들어지며<sup>(9)</sup>, 이 경로는 생체 내에서 생물의 필

수조건의 생합성과정에서, 여러 가지의 amino acid 를 만들 수 있는 전구물질 (precursor)인 glutaric acid, succinic acid, oxaloacetic acid, malic acid 등과 일치한다<sup>(10)</sup>.

또 이들의 물질들이 질소원의 공급에 따라서 생체 필수한 물질을 만들게 되므로 발효에 대한 제한 억제요인 (limiting factor)이 없어지게 되므로써 구연산 발효과정에 이러한 질소원의 공급은 미생물의 성장과 구연산생성에 미쳐서 중요한 요인이 된다<sup>(11,12)</sup>.

발효방법에 있어 균주가 산소를 요구하므로써, 표면배양, 액침배양 및 고체배양등이 개발되어 그 기술은 항생제 생산 공업과 더불어 발전하였다. 표면배양은 Wehmer 때부터 시작된 발효 방법으로 산소 공급이 많은 표면에 균사가 얽혀 구연산이 생성되는데, 이때 포자형성 (sporulation)이 심하고 구연산 이외의 다른 유기산이 많이 생성된다.<sup>(1,13)</sup> 특히 발효기간이 길며, 공장화 (scale up)하는데 문제점이 많아서 오늘 날에는 사용되지 않고 있다.

액침배양이 구연산생산에 응용된 것은 1945년 경<sup>(1)</sup>으로, 계속적으로 교반을 하면 다른 유기산이 많이 생성되었으므로 액침배양이 구연산 발효에 적합치 못하다고 하였으나, 여러가지 원인<sup>(3,14,15)</sup>이 밝혀진 뒤에, 현재의 발효방법에서는 액침배양이 구연산 생성에는 가장 이상적인 것으로 되어 있다.

코오지 배양 (koji culture)은 특히 동양의 주정 공업 (alcohol fermentation)에서 곡류를 당화시키기 위한 효소생산에 이용하기 위한 것이다. 또한 이러한 방법에 의한 구연산 생성은 *Aspergillus* 속의 여러 균주를 실험한 것<sup>(16,17)</sup>이 있으나 좋은 성적은 없다.

본 실험은 구연산 생성을 목적으로 자연계에서 구연산 생성률이 높은 균주 *Asp. niger* 를 분리 동정하였다. 또한 분리된 균주에 대한 배지조성 및 발효조건을 개선하여 발효액당 구연산 생산을 검토한 바 일부의 실험 결과를 보고한다.

## 실험 방법 및 재료

### 1. 균주의 분리

고성능 구연산 생성 균주를 찾기 위하여, 먼저 자연계에서 유기산 생성균을 다음과 같이 분리하였다. 각종 토양 및 과일 시료를 60% EtOH 용

액에 넣고 40°C 에서 10 분간 처리한 후<sup>(18)</sup>, 멸균수로 희석하여 10% CaCO<sub>3</sub> 첨가 Sakaguchi<sup>(23)</sup>배지를 평판배양하였다. 균주보관은 PD agar 에 계대한 후 균이 자란 뒤 0°C 냉장고에 보관하였다.

### 2. 발효방법 및 포자 준비

구연산 발효는 500 ml Erlenmyer flask 에 Sakaguchi 배지 100 ml 를 넣고 포자혼탁액 6% (v/v)를 접종시킨 다음 30°C 에서 진탕배양하였다. 발효배지는 Sakaguchi 배지를 이용하여 점차 개량하였다. 포자준비는 보관 중인 균주를 2~5 회 계대배양한 다음 5% 밀가루 배지에서 사면배양한 뒤에 멸균수로 포자를 채취한 후에 5% glucose 용액인 Skaguchi 배지에 넣고 18~24 시간동안 진탕배양하였다. 이때 pellet 형성이 가장 잘 된 것을 골라서 접종용 포자 혼탁액으로 사용하였다.

### 3. 정량

배지속에 있는 포도당의 정량은 Somogyi-Nelson method<sup>(24)</sup>로 하였다. 총 유기산의 측정엔 발효용액 10 ml 를 취하여 0.1N NaOH 로 적정하였으며, 구연산 정량은 acetic anhydro pyrimidine 방법<sup>(21)</sup>에 따랐다. 균체성장은 증류수로 3 회 씻은 뒤에 80°C vacuum drying 하여 무게로써 표시하였다.

### 4. 실험값의 계산

정량실험에 있어서 standard curve 를 만들 때 least square method 로 하였으며, 발효과정에 관한 실험치는 모두가 두번씩 하여 평균 값을 나타내었다.

## 실험 결과 및 고찰

### 1. 고성능 균주 선정

자연계에서 분리한 유기산 생성균은 모두 11종의 균주를 분리하여, 이중에 CaCO<sub>3</sub>을 녹여, 투명 한 띠를 형성하는 속도가 빠른 5 균주를 선정하여 B. F. I. H. K 로 기호를 붙였다 (Table 1). 이상의 5 균주와 이미 구연산 생성균주로 알려진 A (*Aspergillus usamii*; 서울대학교 자연대학 식물학과에서 분양받음)와 구연산 및 총 유기산 생성능력을 비교한 것이다. 즉 흙에서 분리된 H가 구연산 생성량은 *Asp. usamii* 에 비하여 적으나 총 유기산량이 월등히 높으므로 발효조건에 따라서 구연산 생성량이 A 보다 높아질 가능성이 있으므로 이상의

**Table 1.** Comparison between Strains Isolate on the Citric Acid Production, Total Acidity after 14 Days of Surface Culture with Sakaguchi's Medium.

Strain	Citric acid (g/l)	Total acidity*
A	2.7	7.0
B	1.3	4.0
F	—	3.0
H	1.6	16.0
I	0.3	3.0
K	1.3	14.0

\*ml of 0.1 N NaOH used to neutralize 10 ml of culture solution. Phenolphthalein was used as an indicator.

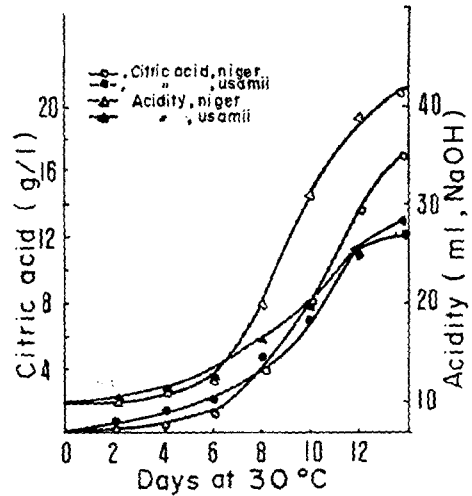
**Table 2.** Effect of Strain Adaptation on Citric Acid Production and Total Acidity during Surface Fermentation in Sakaguchi's Medium, (*Asp. usumii* and *Asp. niger* were adapted for 6 months by transferring once a week at 30°C).

Strain	Before adaptation		After adaptation	
	Citric acid (g/l)	Total acidity (ml, NaOH)	Citric acid (g/l)	Total acidity (ml, NaOH)
<i>Asp. usumii</i>	2.7	7.0	6.0	12.0
<i>Asp. niger</i>	1.6	16.0	5.5	17.0

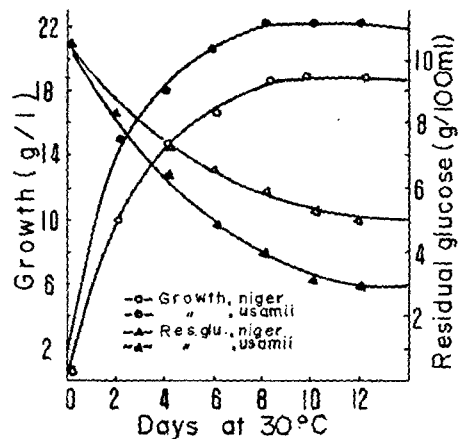
두 균주로 적응화 과정을 거쳐서 2차 선정하였다. Table 2는 구연산 생성과 총 유기산 생성에 관한 두 균주의 적응화 효과를 나타낸 것이다. 분리된 균주를 Sakaguchi 배지로 30°C에서 6개월동안 계대배양하여, Table 2와 같이 구연산 생성을 2~3 배로 올릴 수가 있었다. 이것은 균주 자체가 Sakaguchi 배지에 구연산 생성의 TCA cycle에 대한 metabolic pathway가 퇴화 내지 둔화 (dummy) 되므로써 구연산 양이 증가된 것으로 생각된다(18, 22).

구연산 생성균주 2차 선정으로 분리된 2종의 균주로 6개월 동안 적응시킨 다음 Sakaguchi 배지에 12일 동안 발효시키면서 그 성장, 기질의 사용, 총 유기산 및 구연산 생성을 비교하였다(Fig. 1와 2).

그 결과 *Asp. usumii*는 성장과 기질 이용면에서 균주 H보다 좋았다(Fig. 1). 또한 총 유기산 및 구연산 생성은 반대로 균주 H가 좋았으며 14일 후에는 구연산 생성률이 *Asp. usumii*에 비하여 1.4 배가 높은 17g/l를 나타내었다. 그래서 앞으로 구



**Fig. 1.** Comparison between Strains of *Asp. usumii* and *Asp. niger* on the Citric Acid Production and Total Acidity.



**Fig. 2.** Comparison between Strains of *A. usumii* and *Asp. niger* on the Growth and Substrate Utilization.

연산 생성에는 균주 H로 하였으며, 이에 대한 균주의 동정은 Raper & Fernell(18)의 분류기재로 실험하였다. Czapeck's agar에 배양시켜서 나타난 균사 및 포자의 형태학적 특징 (stigmateria, vesicle, and condiospore)으로 *Asp. niger*로 동정되었다.

## 2. 발효조건의 개선

Fig. 3은 Sakaguchi 배지에서 다른 성분을 일정하고 peptone의 양만을 변화시켜 발효하였을 때, 이것이 구연산 및 유기산 생성에 미치는 영향을 조사한 것이다. 구연산 생성은 peptone 양이 4.5g/l

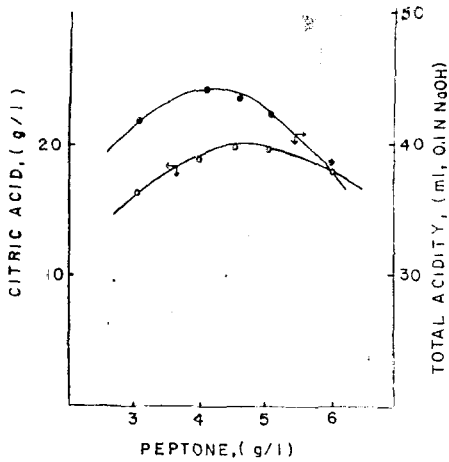


Fig. 3 Effect of Peptone Concentration on the Citric Acid Production and Total Acidity Determined after 12 Days of Fermentation by *Asp. niger*.

일때 가장 좋았으며 이때 약 20 g/l를 생산하여 Sakaguchi 배지로서의 최고량 17 g/l 보다 약 18%의 증가를 보였다. 이것은 생체에서 구연산이 만들어지는 TCA cycle에서 중간 대사물질이 생체 필수 amino acid를 공급<sup>(12)</sup>하고 있기 때문에 peptone (질소원)의 양에 따라 미생물의 생장이 억제되고 구연산이 많이 생성된 것으로 사려된다<sup>(16,17)</sup>.

또한 진탕발효시 발효용액의 부피를 변화시켜 공급되는 공기량을 조절하였을 때 일어나는 여러가지 영향을 조사한 것은 Table 3과 같다. 일정한 부피를 가진 Erlenmeyer flask 속에 발효용액이 줄어들수록 균의 성장, 포도당의 소비량, 구연산 및 유기산 생성량이 모두 증가하였으나, 그 비율은 각각 다르게 나타났다. 이 실험으로 볼 때 분리된 *Asp. niger*의 구연산 생성은 산소의 주입에 많은 영향을 가진 것으로 나타났다.

Table 4와 Table 5는 methanol 2%첨가와 포도당을 10% 용액에서 14% 용액으로 증가시켰을 때

Table 3. Effect of Aeration on the Growth, Substrate Utilization, Citric acid Production and Total Acidity during Fermentation with *Asp. niger*.

Volume of medium in 500 ml Erlenmeyer flask, ml.	After 4 days				After 8 days			
	Dry wt. (g/l)	Residual glucose (g/l)	Citric acid (g/l)	Total acidity (ml, NaOH)	Dry wt. (g/l)	Residual glucose (g/l)	Citric acid (g/l)	Total acidity (ml, NaOH)
100	22.8	83.	1.10	9.6	24.0	55.	4.82	18.8
75	23.4	80.	2.01	12.0	26.0	47.	5.54	26.0
50	24.4	76.	2.90	20.2	27.2	35.	20.000	44.4

Table 4. Effect of Methanol Addition on the Citric Acid Production Total Acidity by *Asp. niger* with 50 ml of Modified Sakaguchi's Medium in 500 ml Erlenmeyer Flask and Shaked 10 Days.

Medium	Citric acid (g/l)	Total acidity (ml, NaOH)
Modified Sakaguchi's medium	20.	44.4
Modified Sakaguchi's medium + methanol (2%) added	24.0	46.8

일어난 영향을 조사한 것이다. Methanol의 첨가는 Mayer<sup>(23)</sup>의 방법에 따라서 발효 개시 전에 첨가하였다. 이것은 플라스크내 유리에 포자형성을 억제시키기 위한 것으로 포자형성됨에 따라 구연산 형성을 못 하는 손실을 막고자 함이었다.

포도당의 증가는 구연산 생성에 현저한 효과를 보았으며 (Table 5), 구연산 생성량은 24 g/l에서 35

Table 5. Effect of Glucose on the Citric Acid Production and Total Acidity by *Asp. niger* with 50 ml of Methanol Added Modified Sakaguchi's Medium in 500ml Erlenmeyer Flask and Shaked for 10 Days.

Medium	Citric acid (g/l)	Total acidity (ml, NaOH)
Modified Sakaguchi's with 10% glucose	24.0	44.0
Modified Sakaguchi's medium with 14% glucose	35.0	56.0

g/l로 증가하였다. 이러한 것은 기질을 많이 첨가하면 이에 따른 구연산의 생성률이 높아지기 때문이다<sup>(24)</sup>.

## 요 약

자연계에서 유기산을 생성하는 균주 11 균주를

분리하여 그 중에 구연산 생성균 1종을 선정하여, 동정한 결과 *Aspergillus niger* 로 나타났다. 분리된 균주로 500 ml 삼각 flask 에 Sakaguchi 배지 100 ml 를 넣고 30°C 에서 발효한 결과 구연산이 17 g/l 가 생성되었다. 또한 Sakaguchi 배지를 개량한 결과 즉 배지적응, peptone 첨가, 통기 효과, methanol 첨가 및 포도당 첨가 결과 구연산이 35 g/l 가 생성되었다.

### 참 고 문 헌

- 1) Precott, S. C. and G. D. Cecil: *Industrial Microbiology*, 3rd Eds, McGraw Hill Book Co., P. 533, (1958).
- 2) Leland, A. U. and R. J. Hickey: *Industrial Fermentation* Vol. 1, Chapter 13, Chemical Publishing Co., Inc. (1954).
- 3) Karrow, E. O. and S. A. Waksman: *Ind. & Eng. Chem.*, **39**, 821 (1954).
- 4) Shu, P. and M. J. Johnson: *J. Bact.*, **54**, 161 (1947).
- 5) Martin, S. M. and W. R. Waters: *Ind. Eng. Chem.*, **44**, 2229 (1952).
- 6) Oh, M. J., Y. Park, and S. K. Lee: *Korean J. Food Sci. and Tech.*, **5** (4), 5 (1973).
- 7) Amelung, H.: *Chem., Eng.*, **54**, 118 (1930).
- 8) Perlman, O.: *Econ. Botany*, **3**, 360 (1930).
- 9) Ramakuskman, C. V.: *Biochem. and Biophysic*, **55**, 403. (1955).
- 10) Mahler, H. R. and E. H. Cordes: *Biological Chemistry* 2nd Eds. A Happer International edition (1971).
- 11) Khan, A. H. and T. K. Ghose.: *J. Ferm. Tech.*, **51**, (10), 734 (1973).
- 12) Alford, G. C. A. and S. S. Ussman: *The Fungi* Vol. 1, Chapter 30, Academic Press (1965).
- 13) Gerhardt, P., W. W. Dorrell, and I. L. Boldwin: *J. Bact.*, **52**, 555 (1946).
- 14) Ping, Shu and J. J. Marvin: *J. Bact.*, **56**, 577 (1948).
- 15) Yuichi, N. and J. J. Marvin: *J. Bact.*, **82**, 538(1961).
- 16) 照田堯造, 芝崎勲, 望月務: 醸工(日本), **35**, 105 (1957).
- 17) 照井堯造, 芝崎勲, 望月務: 醸工(日本), **36**, 109 (1958).
- 18) Kenneth. B. R. and D. I. Fennell: *The Genus Aspergillus*, Chapter 8. The Williams and Williams and Willkins Co. Baltimore (1965).
- 19) 友田宣者, 坂口謹一郎, 山田正一, 朝勇宣: 微の利用業, 共立出版株式會社 (1960).
- 20) Whister, R. L. and M. L. Wolform: *Method in Carbohydrate Chemistry*, Chapter 8. Academic Press (1962).
- 21) Spence, A. F. and J. M. Lowestein: *Biochem. J.*, **103**, 342 (1973).
- 22) Harold. C. H.: *Morphology of Plants*, Chapter 12, Haper International edition (1967).
- 23) Mayer, A. J.: *J. Appl. Microbiol.*, **1**, 1 (1953).
- 24) Aiba, S., E. Humphrey, and N. F. Millis: *Biochemical Engineering* 2nd Eed. Univ. of Tokyo Press. p. 4 (1976).