

## 구연산 발효에 관한 연구

(제 2 보) 국산 포도당을 기질로하고 *Asp. niger* 에 의한 발효

이 상 선\*·박 무 영

\*한국과학기술 연구소·한국과학원  
(1978년 11월 26일 수리)

## Studies on the Citric Acid Fermentation

(Part 2) The Citric Acid Fermentation by *Asp. niger* as the Substrate  
of Local Commercial Glucose

Sang Sun Lee\* and M. Y. Pack

\*Korean Institute of Science and Technology · Korea Advanced Institute of Science, Seoul, Korea  
(Received Nov. 26, 1978).

### Abstract

When *Asp. niger* was shaken at 30°C in 500 ml Erlenmeyer flask with 50 ml of the medium containing 14% of Korean local commercial glucose brand, 0.45% of peptone, and mineral, the citric acid was produced at the level of 37~43 gram per liter in 8 days, and the citric acid production at medium containing X glucose brand was better than that containing Y glucose brand. When the contaminated minerals were removed from the local glucose by Ambelite-IR 120 and peptone by potassium ferrocyanide followed by readjustment of ferric ion content in the medium to 10 mg per liter, the citric acid formation reached 53 gram per liter, a production level of three times higher than that with the original Sakaguchi's medium. The further physiological studies and the mutation of isolated *Asp. niger* will be needed.

### 서 론

구연산 발효에 있어, 계속적인 액침배양 (submerged culture)이 구연산 생성에 응용된 것은 1945년 경이었으나, 액침배양에 따른 구연산 생산의 효율이 좋지 못하고, 또 구연산 대신 다른 유기물이 많이 생성되어서 문제점이 많았다<sup>(1)</sup>. 이러한 것은 아직 구연산 생성원리에 대한 부족한 인식때문

으로 판명되었으며, 현재로 구연산 생성의 문제점으로 알려진 것은 금속이온에 의하여 구연산 생성이 저하된다는 것이 밝혀졌으므로, Bone, Char<sup>(2)</sup>, Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>·18H<sub>2</sub>O<sup>(3)</sup>, ion exchanger resin<sup>(4)</sup>, Ambelite<sup>(5)</sup>등으로 배지에 있는 금속이온을 제거함으로써 구연산 생성물을 높일 수가 있었다. 그래서 현재로는 배지를 처리한 후의 액침배양이 구연산 생성에 가장 이상적인 것으로 되어 있다.

또한 구연산 발효에 있어서 경제적으로 문제가

되는 것은 탄수화물로서 glucose, sucrose, beet molasses, cane molasses, starch, wheat bran 등이 있으며, 발효의 사용 여부는 그 지역의 자원 및 경제적인 여건에 따라서 결정된다. 구연산 발효바지의 대부분을 차지 하는 탄수화물에는 금속이온이 문제가 된다. 미량의 철이온, 구리이온, magnesium ion<sup>(3-6)</sup>은 균주의 성장을 좋게 해 주는 대신에 구연산 생성물을 저하시키고 있다. 미생물 균주의 종류 및 돌연변이(mutation)형으로 구연산생성을 좋게 하려는 시도는 여러 군데에서 있으나<sup>(4,5)</sup>, 탄수화물 속에 들어 있는 금속이온 제거보다는 좋은 결과가 나오지 못하였다<sup>(3,4,7)</sup>.

발효하기 전에 원료물질의 처리 과정에서 potassium ferricyanide와 potassium ferrocyanide도 금속이온을 chelate 시키는 방법도 흔히 사용되고 있으나<sup>(8,9,10)</sup>, 여기에 따른 유해현상도 보고되었다<sup>(6)</sup>, 이러한 결점을 보완하기 위하여 이온교환 수지(ion exchanger)를 채택함으로써 해결되었으나<sup>(4,5,7)</sup>, 경제적인 문제로 구연산 생산가가 높게 나타났다.

우리나라 포도당 상품의 생산과정은 일반적인 포도당 제조 과정과 비슷하며, 곡물(감자, 고구마, 옥수수)에서 추출한 전분(starch)을 산분해하여 얻는 것이다. 이러한 과정에 금속이온은 적은 것으로 나타났다.

따라서 본 실험은 국산 상품 포도당 두 회사 제품을 이용하여 구연산 생성을 검토하여 좋은 결과를 얻었으므로 그 결과의 일부를 보고한다.

## 실험방법

### 1. 상품 포도당

시중에서 팔고 있는 포도당중에 두 회사 제품을 골라서 X, Y로 표시하였으며, 이들에 대한 분석은 Somogyi-Nelson method 및 적정방법으로 하여 Difco dextrose 기준으로 백분율을 나타내었다.

### 2. 발효방법 및 정량

전보에 따랐다<sup>(13)</sup>.

### 3. 이온교환수지 사용

포도당 속에 있는 금속이온을 제거하기 위하여 Ambelite IR-120을 사용하였다. Ambelite IR-120 중에 알맹이가 균일한 것을 골라서 N NaOH 용액 속에 담근 다음 완전히 Na<sup>+</sup>이온을 결합시킨 뒤에 N HCl 용액으로 30 분동안 담근 후 20% (v/v) Ag

NO<sub>3</sub>로 반응시켜서 흰 앙금이 형성되지 않을 때까지 증류수로 씻었다. Column 조작은 공기가 들어가지 않도록 package하고 0.1~0.2 bed volume/min 속도로 금속이온을 제거하였다. Peptone 내에 있는 금속이온을 처리하기 위하여는 potassium ferrocyanide 방법으로 하였으며<sup>(9,10)</sup>, ferric ion 첨가효과는 ferric sulfate를 사용하였다.

## 4. 균주

전보에 분리된 *Asp. niger*를 이용하여 실험에 사용하였다.

## 실험결과 및 고찰

### 1. 상품 포도당의 이용

상품 포도당은 시판되고 있는 두 회사의 것을 구입하여 (X, Y)로 표기하였다. Difco dextrose와 비교하여 환원당 함량을 조사한 결과는 Table 1과 같이 나왔으며, X제품의 경우 Y제품에 비하여 환원당 함량이 떨어지고 있다. 이것은 제품회사의 process 및 기질의 처리에 의해서 나타난 것으로 볼 수 있다.

Table 1. Purity Comparison between Two Local Commercial Glucose Products.

Glucose Brand	Relative purity (%) Determined by	
	Fehling-Lephman	Somogyi-Nelson
X	90	89
Y	97	97

Based on Difco dextrose as 100%

이때 구연산 발효로써 양 X, Y 제품을 대치시켰을 때의 결과는 Fig. 1과 Fig. 2와 같다. 두 제품이 균의 생장이나 기질을 사용하는 면에서 별 차이를 나타내지 않았으나(Fig. 1), 구연산 및 총 유기산 생성에는 유의차를 보였다(Fig. 2). 이 차이는 발효 후기(8~12일)에 가서 뚜렷하였고, 특히 구연산 생성에서 Y제품은 발효 8일 후기에 구연산의 감소를 보였는데, X제품은 계속적 구연산 생성을 증가시켜 12일 후는 43g/l로써 Y제품에 비해 약 20%의 차이를 보였다. 원료 상품 포도당의 순도는 Table 1과 같이 X제품이 불순물이 많은데도 구연산 발효에 좋은 결과가 나왔다. 또한 Difco dextrose에 비하여 구연산이 많이 생산된 것(전보의 결과)은 우리나라 포도당 제품이 포도당 생산과정에

서 목물 전분을 산 분해 과정으로 하기 때문에 미량성분이 적은 것으로 생각되어 진다. 또한 X제품이 Y제품에 비하여 구연산 발효가 많은 이유는 잘 알 수가 없었다.

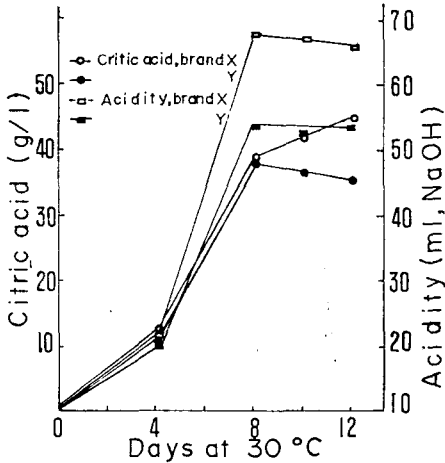


Fig. 1 Comparison between Two Local Commercial Glucose Products for Their Effects on the Citric Acid Production and Total Acidity during Fermentation with *Asp. niger*.

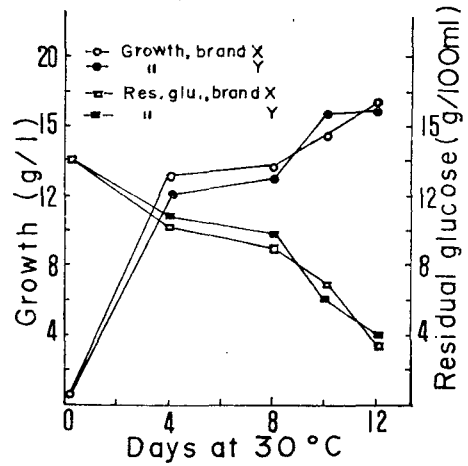


Fig. 2 Comparison between Two Local Commercial Glucose Products for Their Effects on the Growth and Substrate Utilization during Fermentation with *Asp. niger*.

## 2. 철분이온의 효과

제품 X를 Ambelite IR-120 으로 처리하고 peptone은 potassium ferrocyanide 로 처리하여 배지에

Table 2. Effects of Ferric Ion Concentration on the Growth during Fermentation with *Asp. niger*.

Days	None			2.5 mg/l of Fe			7.5 mg/l of Fe		
	Growth (g/L)	Citric acid (g/L)	Acidity (ml, NaOH)	Growth (g/L)	Citric acid (g/L)	Acidity (ml, NaOH)	Growth (g/L)	Citric acid (g/L)	Acidity (ml, NaOH)
4	8.5	9.3	15.4	11.3	11.2	10.3	16.2	6.3	10.9
8	11.8	9.2	15.0	15.1	18.2	26.3	20.0	21.2	42.0
12	11.9	9.1	22.0	15.4	14.2	26.0	20.5	44.3	60.2

혼입되어 있는 미량 금속이온을 제거한 다음 배지에 ferric ion 만을 첨가하여, 그것이 발효에 미치는 영향을 본 결과는 Table 2 와 같다. 먼저 pellet의 성장의 경우는 철분이온의 첨가에 뚜렷한 효과를 나타내고 있었으며, 철분첨가가 적을수록 균 성장이 좋지 않은 것으로 나타났다. 또한 구연산 생산은 철이온 (0, 2.5 mg, 7.5 mg) 첨가 범위에서 7.5 mg/l 일때 가장 좋게 나타났다. 이때 구연산 생성은 44.3 g/l 로 제품 X에 비해서 약간 생성이 좋았다.

Fig. 3에 있어서는 위 Table 2에서 못다한 철

이온 별로 본 것으로 10 mg/l 의 철분을 구연산 발효에 첨가하였을 때 구연산 생성이 가장 좋아서 53 g/l 였다. 농촌 진흥청 발행 식품 분석표 (1974)를 참조하면 우리나라에서 생산되는 포도당 (상품 표시 없이 평균치) 100 g 당 철 이온 10 mg 이 포함되어져 있다. 이것을 Fig. 3에서 비교하여 볼 때 14%포도당을 발효배지에 첨가하므로 약 14 mg 이상의 철이온이 포함되어져 있다는 것을 알 수가 있다 (Fig. 3). 제품 포도당 (X)의 경우에는 제품 포도당 (Y)에 비해 불순물 (Table 1)이 많은데 함유기산 및 구연산이 많이 나온것은 구연산

발효에 좋은 효과를 주는 어떤 물질(UGF)가 포함되었으리라 생각한다.

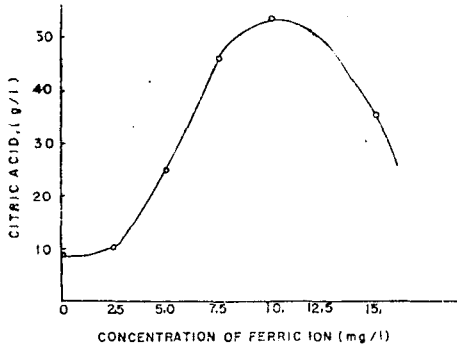


Fig. 3 Effect of Ferric Ion Concentration on Citric Acid Production by *Asp. niger*. Citric acid was determined after 10 days of fermentation with medium containing local commercial glucose (brand Y).

또한 여기서 공업적인 개념으로 관찰할 때 8일째가 12일째보다 구연산 생성량은 적지만 (Fig. 2) 시간적인 것을 감안해서 두 개의 제품 포도당에 대한 구연산 생산은 별다른 차이가 없었다. 철이온은 TCA cycle의 효소 중에 aconitase<sup>(11)</sup>의 구성분이지만, pellet의 성숙에 관련되어지는 필수무기염류로서 구연산이 가장 많이 생성할 때가 10mg이었다. Table 2는 배지조성 물질에서 미량으로 존재하는 금속이온을 제거한 뒤에 구연산 생성 및 균

의 성장 상태를 ferric ion의 양에 따른 조사로서, 이론적으로 ferric ion이 적을 때 구연산 생성이 많으나 전체적인 면으로 보면 구연산 생성에 있어 어느 정도로 pellet의 성숙이 있어야 구연산이 많이 생성된다는 것이 나타났다. 이미 서론에 서술한 것과 같이 균주에 따라 요구하는 ferric ion의 양이 크게 차이가 나오는 것은 균주의 능력 및 이온교환수지의 능력에 따라서 다르게 나온 것으로 생각된다.

Table 3은 주로 최근에 나온 논문과 과거에 구연산 발효에 성능이 좋게 나온 자료로, 본 실험과 비교한 것이다.

이때 구연산의 정량에 대한 문헌<sup>(5)</sup>을 제외하고는 모두가 균주가 소모한 탄수화물에 총 유기산을 NaOH로 적정할 것이기에 많은 유기산이 포함되어 있다고 생각되어진다. 이러한 것을 감안하여 본다면 이 실험에서 구연산 발효 1)과 구연산 발효 2)에 사용한 *Asp. niger*의 구연산 생산능력이 다른 균주에 비해서 손색이 없으며, 좀 더 상세한 생리조사, 적응화 (adaptation) 및 mutation을 할 여지가 많다.

우리나라 자원 중에 구연산 발효로 탄수화물은 포도당, 전분립 (starch), 밀기울 등이 있으나, 액침 배양에서는 포도당 밖에 사용할 수가 없었다. 또한 실험에 Sakaguchi 배지를 사용한 이유는 Sakaguchi 배지가 일본(日本)에서 개발된 배지로 다른 배지보다 우리나라 자원에 적합하기 때문이다.

Table 3. Data Concerning the Production of Citric Acid by the Submerged Process

Carbohydrate Source	Reagent used in treatment of substrate	Yield (%)*	Duration of fermentation	Reference
Cane molasses*	Potassium ferrocyanide	63.3	9 days	12
Cane molasses*	Potassium ferrocyanide	61.9	12 days	8
black strap* molasses	Potassium ferrocyanide	68.0	10 days	6
Glucose	Potassium ferrocyanide	71.2	7 days	8
Glucose (cereulose)	Aluminium hydroxide	67.0	9 days	4
Sucrose	Ambelite	75.0	10 days	6
Domino* sucrose	Chelating exchange resin	80.0	10 days	5
Glucose (Y)	None	43	12 days	Figure 2
Glucose (X)	Ambelite IR-120	53	10 days	Figure 3

\*Based on Sugar consumed

### 요 약

전보에 개발된 배지에 국산 포도당을 이용한 발효 결과, 구연산 생성은 37~43 g/l이었다. 제품 X

의 경우는 제품 Y에 비해 구연산 생성이 우수하여 43 g/l가 생성되었다. 국산 포도당을 Ambelite-IR-120으로 처리하고, peptone도 potassium ferrocyanide로 처리하여 금속이온을 제거한 뒤에, 10 mg/l의 철 이온을 첨가하였을 때 구연산 생성은 53 gm

/l에 달하였다. 또한 원래 Sakaguchi 배지에 비해 3배나 많이 구연산이 생성되었다. 분리 동정된 *Asp. niger*를 다른 문헌과 비교하였을 때 큰 손색이 없었으며, 앞으로의 생리연구 및 mutation 연구가 필요하겠다.

#### 참 고 문 헌

- 1) Prescott, S.C. and G.D. Cecil: *Industrial Microbiology*, 3rd eds., McGraw Hill Book Co., p. 533 (1958).
- 2) Karrow, E.O. and S.A. Waksman: *Ind. & Eng. Chem.*, **39**, 821 (1947).
- 3) Ping, Shu and J.J. Marvin: *J. Bact.*, **56**, 577 (1948).
- 4) Yuichi, N. and J.J. Marvin: *J. Bact.*, **82**, 538 (1961).
- 5) Marroquim, A.S., R. Caneno, and M. Ledyma: *J. Appl. Microbiol.*, **20**(1), 888 (1970).
- 6) Perlman, D., W.W. Dorrell and M.J. Johnson: *Arch. Biochem.*, **10**(3), 131 (1946).
- 7) Khan, A.H., and T.K. Ghose: *J. Ferm. Tech.*, **51**(10), 734 (1973).
- 8) Martin, S.M. and W. R. Waters: *Ind. & Eng. Chem.*, **44**, 2229 (1952).
- 9) Gerharolt, P., W.W. Dorrell, and I.L. Baldwin: *J. Bact.*, **52**, 555 (1946).
- 10) Meyer, A. J. *J. Appl. Microbiol.*, **1**, 7 (1953).
- 11) Ramakuskman, C.V.: *Arch. Biochem. and Biophysics*, **55**, 403 (1955).
- 12) Perlman, O.: *Econ. Botany*, **3**, 360 (1943).
- 13) Lee, S.S. and Park, M.Y.: *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **6**(4), 161 (1978)