

糸狀菌에 의한 枸橼酸醱酵에 관한 研究

(第Ⅱ報) 選定菌의 保存 및 紫外線照射 効果

成洛癸, 金明燦, 沈奇煥, 鄭德和

慶尙大學校 食品加工學科

(1980년 2월 28일 수리)

Studies on the Citric Acid Fermentation by Fungi

(Part II) Preservation of the Selected Strains and the Effect of UV-Irradiation

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

Gyeong-Sang National University, Jinju, Korea.

(Received February 28, 1980)

Abstract

These experiments were conducted to manage more safe the selected strains and improve their characteristics. The results obtained were as follows:

Preservation on soil at the range of 0 to 5 C was suitable and there were no remarkable changes on their abilities to produce citric acid until 10 months preservation. The successive transfer of spore slightly stimulated the selected strain, M-315 to produce citric acid and the spore precultured on sporulation medium for 7-10 days was desirable as inoculum.

Under UV-irradiation from the selected strains, 109 mutants whose morphological characteristics were changed were isolated. Among them, the mutant M-80-12 was shown 3.2% increase on acid producing ability than that of its parent.

線 論

대부분의 微生物들은 一般微生物과 같이 시간의 經過에 따라 자신이 지니고 있던 본래의 形態的 特性이나 生理的 性質에 退化現象이 나타나는 것이 불가피하여 특히 醱酵工業에 있어서는 관련균의 성질을 그대로 유지시키거나 개선하는 일이 극히 중요한 과제로 다루어지고 있다.

일찌기 Wehmer 등¹⁾은 이에 대한 報文을 발표한 바 있고 尾崎 등²⁾도 菌保存時의 溫度 등의 여러 조건을 변화시켜 보다 안전한 균의 관리법에 관하여 檢討하였으며 Greene 등³⁾의 乾燥保存法, McGinnis 등⁴⁾의 蒸留水保存法을 비롯하여 菌保存

에 관한 상당한 연구가 이루어졌다,

한편 관리중의 균의 性질을 개선하기 위하여 井口 등⁵⁾을 醬油用麴菌 *Aspergillus sojae*에 紫外線을 照射한 후 protease의 [活性變化를 指摘하였고 飯塚 등⁶⁾도 黑麴菌에 ⁶⁰Co의 γ 線을 照射한 결과 變異株의 糖化力 및 液化力이 原株보다 우수하게 되었다고 報告하였으며 Hannan 등⁷⁾은 γ 線과 紫外線을 *Aspergillus niger*에 照射하여 구연산 生成能이 향상된 變異株를 分離하였다. 國內에서도 李 등⁸⁾의 Vitamin B₂ 및 B₁₂ 生成菌의 變異株에 대한 報文이 있고 金 등⁹⁾, 裴 등¹⁰⁾은 *Bacillus subtilis*와 *Escherichia coli*의 紫外線變異株에 의해서 amino 酸 및 核酸關聯生質의 生産을 檢討한 바 있다.

著者 등도 前報¹¹⁾에 이어 選定菌을 장기간 보다 안전하게 관리하고 균의 성질을 개선하기 위한 몇 가지 실험을 하여 그 결과를 보고한다,

實驗材料 및 方法

1. 低用菌株

前報¹¹⁾에서 分離 同定된 菌株, M-80(*Aspergillus usamii* mut. *shirousamii*)와 M-315 (*Aspergillus ficuum*)을 供試菌으로 使用하였다.

2. 菌株의 保存

1) 保存溫도의 영향

맥아즙 및 국즙한천배지에 供試菌을 接種하고 28°~30°C에서 5일간 배양하여 포자를 착색시킨 후 0~5°C, 실온, 28~30°C에서 6개월 保存한 다음 포자형성배지에 접종하여 28°~30°C에서 7일간 前培養하여 살균된 基本培地 Currie 배지에 접종한 후 표면배양을 하여 生酸能을 조사하였다.

2) 保存期間의 영향

맥아즙 및 국즙한천배지에 菌을 접종하여 28~30°C에서 5일간 사면배양하여 포자를 착색시킨 후 2~10개월 동안 保存했다가 前培養한 후 표면배양을 행하여 生酸能을 조사하였다.

3) 保存培地에 따른 영향

맥아즙한천배지, 국즙한천배지, 포자형성배지, 산성액체배지, soil 배지 등의 각종 배지에 菌을 접종하여 28~30°C에서 5일간 사면배양하여 6개월후에 前培養한 후 醱酵培地에서 生酸能을 조사하였다.

4) 계대배양효과

계대배양을 11회 반복하면서 살균된 기본배지에 접종하여 표면배양을 행한 후 계대배양회수에 따른 生酸能을 조사하였다.

5) 전배양효과

맥아즙배지에 보관중인 供試菌을 포자형성배지

및 산성액체배지에 접종하여 5~20일간 전배양하여 포자 1백급이를 살균된 기본배지에 접종한 후 7일간 表面培養하여 전배양日數에 따른 영향을 검토하였다.

3. 紫外線照射方法

松島 등¹²⁾의 方法과 그의 實驗農藝化學을 참고하였다. 즉 포자형성배지에 選定菌株를 接種하여 7~10일간 30°C에서 배양하여 포자를 충분히 착색시킨 후 멸균 증류수 10ml을 加하여 백급선으로 현탁시킨다. 포자현탁액을 다른 살균시험관에 부어 격렬히 흔들어 살균한 여지에 여과하고 여액 중의 포자수를 Thoma의 血球計數器를 사용하여 적당한 포자농도($10^4 \sim 10^5/ml$)가 되게 한다. 이 포자현탁액 5ml을 직경 10cm의 petridish에 부어 magnetic stirrer로서 교반하면서 紫外線燈으로부터 17cm 거리에 놓고 1~10분간 조사한다. 상기와 같이 조사한 액을 100 배희석하고 그액 0.2ml를 Czapeck's 배지로 평판건조시켜 놓은 petridish에 균일하게 부어 30°C 항온기에서 培養시키면서 발생하는 colony를 3~5일간 관찰하며 형태적으로 변이하였다고 생각되는 colony를 사면배양하였다.

4. 醱酵方法 및 定量

表面培養法에 의해 醱酵시킨 培養物을 前報 에 따라 定量하여 비교하였다.

實驗結果 및 考察

1. 選定菌의 保存

1) 保存溫도의 影響

대부분의 미생물은 주위의 환경 즉 온도, 습도, 保存培地의 영양조건 등 여러가지 인자에 의해 크게 影響을 받기 때문에 本實驗에서는 菌株의 保存溫度가 生酸力에 어떠한 영향을 미치는가를 조사하기 위해 0~5°C, 실온, 28~30°C에서 6개월간 保存한 결과 Table 1에서 보는 바와 같이 대

Table 1. Effect of temperature on citric acid fermentation of strains during preservation

Medium	Temperature	Citric acid (mg/ml)		Yield(%)	
		M-80	M-315	M-80	M-315
Malt extract agar	0~5°C	55.9	56.9	39.9	40.7
	Room temp.	55.6	55.3	39.7	39.5
	28~30°C	52.0	54.0	37.1	38.7
Koji extract agar	0~5°C	55.6	56.1	39.7	40.1
	Room temp.	55.2	55.7	39.4	39.7
	28~30°C	53.2	55.2	38.0	39.4

Table 2. Effect of preservation period on citric acid fermentation ability of strains

No. of exp.	Medium	Month	Citric acid (mg/ml)		Yield (%)	
			M-80	M-315	M-80	M-315
1	Malt extract agar	2	53.9	56.0	38.5	40.0
2		4	53.8	56.1	38.4	40.1
3		6	53.8	55.3	38.4	39.5
4		8	53.2	55.9	38.0	40.0
5		10	53.4	55.4	38.1	39.6
6	Koji extract agar	2	53.9	56.7	38.5	40.5
7		4	53.9	56.1	38.5	40.1
8		6	53.6	56.7	38.2	40.5
9		8	53.7	56.9	38.3	40.7
10		10	53.5	56.1	38.2	40.1

채로 0~5°C에서 保存하는 것이 좋았다.

한편 尾崎 등²⁾은 10C 실온과 30°C에서 保存하는 것이 양호한 반면 5~15°C, 0~5°C의 습기찬 곳에 保存하면 포자의 착생이 불량하고 酸生成力이 낮아진다고 하였으며 Bernhauer 등¹³⁾은 竹片에 의한 포자보존이 菌의 性質을 유지하는데 가장 좋다고 하였다.

2) 保存期間과 生酸力

Table 2는 菌의 保字期間과 生酸力의 관계를 알아 본 결과이다. 즉 극습한천배지 및 맥아즙한천배지에 菌을 동시에 各各 10개씩 접종시킨 후 28~30°C에서 5일간 사면배양하여 포자를 착생시켜 0~5°C에서 保存하면서 2개월마다 포자형성배지에 접종하여 7일간 前培養한 후 前記와 같은 方法으로 表面培養하여 分析하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 대체로 10개월까지도 큰 變化를 보이지 않고 있으며 비교적 M-315 M-80에 비해 안정한 것으로 생각되며 長期間保存에 대해서는 더욱 研究할 必要가 있다고 생각된다.

3) 保存培地의 종류에 따른 影響

保存培地의 종류에 따른 酸生成能 變化를 알아

보기 위하여 맥아즙한천배지, 극습한천배지, 포자형성배지, 산성액체배지, soil 등의 各種培地에 供試菌을 접종한 후 그 영향을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 그 結果 단기간 保存한 때문인지 크게 차이는 없었으나 특히 산성액체배지에서 保存한 경우는 두 菌株가 각각 30.9%, 31.1%로서 다른 배지와 현저한 차이를 나타내었으며 soil에서도 다소 좋았다. Table에서의 結果를 미루어 볼 때 菌株를 되도록 건조한 상태에서 保存하는 것이 좋다는 尾崎 등²⁾의 意見과 일치하였으며 좀더 확실한 結果를 얻기 위하여는 보다 장기간 관찰해 볼 必要性이 있다고 생각된다.

4) 계대배양효과

保存中 菌株의 퇴화를 막기 위한 報文^{14,15)}은 상당히 있는데 本實驗에서는 일정기간마다의 계대배양효과를 알아보기 위하여 11회 계대배양을 반복한 結果는 Table 4와 같다.

Table 4에서 보는 바와 같이 M-80의 경우는 큰 效果를 볼 수 없었고 M-315는 맥아즙한천배지에서는 效果가 없었으나 산성액체배지에서 1.3%의 收率 증가로 계대배양의 效果를 약간 얻을 수

Table 3. Effect of medium on citric acid fermentation of strains during preservation

Medium	Citric acid (mg/ml)		Yield (%)	
	M-80	M-315	M-80	M-315
Malt extract agar	54.2	56.4	38.7	40.3
Koji extract agar	54.6	55.6	39.0	39.7
Sporulation medium	54.1	55.2	38.6	39.4
Acid liquid medium	43.3	43.5	30.9	31.1
Soil	54.9	56.1	39.2	40.1

Table 4. Effect of successive spore transfers of the culture on citric acid fermentation

No. of inoculation series	Strain	Citric acid (mg/ml)				Yield (%)			
		M-80		M-315		M-80		M-315	
		Malt extract agar	Acid liquid medium	Malt extract agar	Acid liquid medium	Malt extract agar	Acid liquid medium	Malt extract agar	Acid liquid medium
1		54.2	54.5	56.0	55.9	38.7	38.9	40.0	39.9
2		53.4	53.4	56.7	56.1	38.1	38.1	40.5	40.1
3		53.8	53.9	55.3	56.4	38.4	38.5	39.5	40.3
4		53.1	54.2	54.9	54.5	37.9	38.7	39.2	38.9
5		53.5	54.5	56.6	54.7	38.3	38.9	40.4	39.1
6		54.3	53.6	56.1	54.3	38.8	38.3	40.1	38.8
7		54.0	53.5	55.9	55.2	38.6	38.2	39.9	39.4
8		53.8	54.2	55.2	56.1	38.4	38.7	39.4	40.1
9		54.3	54.2	54.7	56.8	38.8	38.7	39.1	40.6
10		54.0	53.8	55.9	55.9	38.6	38.4	39.9	39.9
11		53.8	54.0	55.7	57.5	38.4	38.6	39.8	41.1

Table 5. Effect of preculture day on citric acid fermentation of strains

Strain	Preculture days	Citric acid (mg/ml)		Yield (%)	
		Sporulation medium	Acid liquid medium	Sporulation medium	Acid liquid medium
M-80	5	54.9	48.3	39.2	34.5
	7	55.3	53.5	39.5	38.2
	10	55.3	53.8	39.5	38.4
	15	54.2	53.4	38.7	38.1
M-315	5	55.7	50.4	39.8	36.0
	7	55.6	54.6	39.7	39.0
	10	55.2	54.5	39.4	38.9
	15	54.5	55.0	38.9	39.3

있었다. 대체로 M-315가 M-80에 비해 형태 및菌白體의 性質의 安定性이 강하거나 菌을 강한 酸性培地에 계대배양하므로써 菌의 性質이 회복내지는 유지되는 것이라고 생각된다.

Doelger 등¹⁴⁾은 10일 간격으로 18번의 계대배양을 하여 酸生成效果를 얻었고 尾崎 등²⁰⁾도 기계대배양에서는 약간의 效果를 얻었으나 2~6개월마다의 장기계대배양을 하였을 때는 오히려 酸生成能이 감퇴한다고 發表하였다.

5) 前培養日數에 따른 影響

本醱酵前 使用할 菌株를 우량하게 育成하기 위하여 前培養效果를 實驗한 結果는 Table 5와 같다.

Table에서 보는 바와 같이 포자형성배지에서는 5~10일간 배양한 菌을 接種하는 것이 대체로 좋

았으며, 액체산성배지에서 보다 菌의 生育이 늦어 7~10일 사이의 포자를 접종하는 것이 양호하였는데 이후의 實驗에서는 7일후의 포자를 사용하였다.

2. 選定菌의 紫外線照射效果

1) 生存率 및 形態의 變異

紫外線照射量과 포자의 生存率에 관하여 實驗하기 위해 照射液을 1분간격으로 10분간 照射하여 그 0.2ml을 平板培養하여 24시간마다 發生하는 colony를 산출하여 非照射 孢子數에 대한 %를 生存率로 나타낸 結果는 Fig. 1과 같았는데 M-80의 경우 3분간照射로서 약 55%, 8분간의 照射에서 99.5%가 사멸하였고 M-315는 M-80보다 紫外線照射에 대한 生存率이 낮아 2분간 照射에서 약 45%가 7분간 照射에서 99% 사멸하였는데 어느

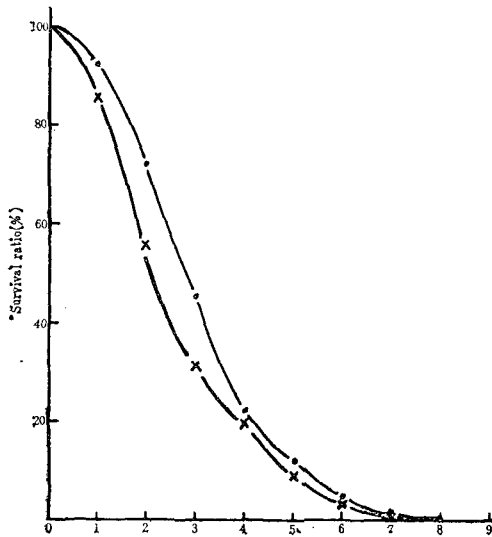


Fig. 1. Survival ratio curve
 ○—○ M-80, ×—× M-315.

菌株도 10分 이상의 照射에서는 生存하지 못하였다.

따라서 選定菌株의 變異를 유발시키기 위해서 紫外線照射時間을 대체로 7~8分間으로 하였으며 同一한 方法으로 紫外線照射를 오랫동안 반복 하면서 분리한 각 변이주로 모자착생의 다소, 菌叢의 色調等を 관찰하였다. 그 結果 Table 6에서 보는 바와 같이 대체로 두 菌株를 各各 4 group으로 分類하였는데 light 및 heavy는 原菌과 形態는 비슷하지만 포자의 착생정도에 차이가 있었고,

Table 6. Classification of UV-mutants

Strain	Type of mutant	Number of strain	Representative strain
M-80	Heavy	11	M-80-3
	Light	17	M-80-15
	Black	2	M-80-12
	Albino	14	M-80-27
	Total	44	
M-315	Heavy	23	M-315-42
	Light	27	M-315-29
	Bluish green	4	M-315-11
	Brown	11	M-315-55
			M-315-23
	Total	65	

albino type, brown type, black type는 菌·의 色調가 各各 原菌과는 다르게 나타난 것이며 대체로 變異株의 63.6%, 76.9%가 原株의 形質을 保存하고 있었다.

2) 變異株의 生酸能試驗

變異株中 1次的으로 비구적 形態的變異가 뚜렷하고 酸生成力이 강한 것을 選擇한 후 原株와 비교하여 枸橼酸生成能을 檢討한 結果는 Table 7과 같이 비록 形態的變異는 뚜렷하였지만 酸生成力에는 큰 變化가 없었고 變異株 M-80-12만이 M-80의 38.9%보다 3.2% 증가된 42.1%의 收率을 얻었으며 生成酸을 P.P.C.法에 의해 定性한 結果 대체로 citric acid 만을 선택적으로 生成하는 것으로 보였다.

그리고 Tabuchi 等^{16,17)}도 *Candida lipolytica*의 紫外線變異株의 枸橼酸生成能을 檢討한 바가 있는데 이와같이 微生物의 돌연변이가 微生物工業發展

Table 7. Comparisons of citric acid producing ability of mutants

No. of strain	pH	Sugar fermented ratio (%)	Citric acid (mg/ml)	Yield (%)
M-80	1.87	81.1	54.5	38.9
M-80-3	1.89	78.6	54.7	39.1
M-80-12	1.91	82.5	59.6	42.6
M-80-15	1.90	82.7	54.6	39.0
M-80-27	1.88	83.1	55.6	39.7
M-315	1.89	80.9	58.7	41.9
M-315-11	1.85	79.6	57.5	41.1
M-315-23	1.90	81.8	58.8	42.0
M-315-29	1.94	83.4	58.4	41.7
M-315-42	1.87	82.7	57.7	41.2
M-315-55	1.91	88.1	59.2	42.3

에 크게 기여하고 있다는 사실을 생각할 때 이에 대한 研究의 必要性을 더욱 느낄 수 있으며 著者 등도 앞으로 이 分野에 관심을 갖고 實驗을 계속 해 나갈 것이다.

要 約

選定菌을 장기간 보다 안전하게 관리하고 菌의 성질을 개선하기 위하여 실험한 결과는 다음과 같다.

1) 選定菌은 대체로 0~5°C에서 soil 培地에 保存하는 것이 좋았으며 保存期間 10개월까지는 酸生成力에 큰 변화를 보이지 않았다.

2) 選定菌 M-315는 強酸性地에 계대배양하므로서 酸生成能이 약간 향상되었으며 中균으로는 포자형성배지에 7~10일간 배양한 균의 포자로 접종하는 것이 좋았다.

3) 選定菌에 紫外線을 照射시킨 결과 형태적으로 변화된 變異株 109株을 分離하였고 그 중 酸生成力이 3.2% 향상된 變異株 M-80-12를 얻었다.

參 考 文 獻

- 1) C. Wehmer: *Bio. Z.*, **197**, 418 (1928).
- 2) 尾崎淺一郎, 福本軍次, 鈴木憲: 醱酵協會誌, **13**, 231 (1955).
- 3) Greene, H. C. and Fred. E. B.: *Ind. Eng. Chem.*, **26**, 1297 (1934).
- 4) McGinnis, M. R., Padhye, A. A. and Ajello,

- L.: *Appl. Microbiol.*, **28**, 218 (1974).
- 5) 井口信義: 農化誌, **24**, 283 (1951).
- 6) 飯塚 廣, 新井英夫: 農化誌, **35** (12), 1218 (1961).
- 7) M. A. Hannan, F. Rabbi, A. T. M. Faizur Rahman and N. choudhury: *J. Ferment. Technol.*, **51** (8), 606 (1973).
- 8) 李啓瑚, 張健型: 微生物학회지, **3**, 9 (1966)
- 9) 金浩植, 李春寧, 李啓瑚, 金尙淳: 한국농화학회지, **11**, 137 (1969).
- 10) 裴武, 李啓準: 微生物학회지, **10**, 73, (1972).
- 11) Sung, N. K., Kim, M. C, Shim, K. H. and Chung, D. H.; *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **8** (1), 47 (1980).
- 12) 松島欽一, 嶋田 協: 日本農藏化學會誌, **41** (12), 671 (1967).
- 13) K. Bernhauer, A. Iglaur, U. H. Knobloch: *Boi. Z.*, **307**, 393 (1941).
- 14) W. P. Doelger and S. C. Prescott; *Ind. Eng. Chem.*, **26**, 442 (1934).
- 15) T. Chrazacz, U. M. Zakomorny; *Prezm. ch.*, **22**, 296 (1938).
- 16) T. Tabuchi, M. Tanaka and M. Abe; *Agr. Biol. Chem.*, **42**, 440 (1968).
- 17) T. Tabuchi, M. Tanaka and M. Abe; *Agr. Biol. Chem.*, **43**, 154 (1969).