

Aspergillus niger 의 休止菌體에 의한 Gluconic Acid生成에 關한 研究

*鄭之官, *梁鎬錫, *申圭微, 梁漢喆
高麗大學校 農科大學 食品工學科
*現在: (株)鍾根堂, 中央研究所

Studies on the Production of Gluconic Acid by Resting Cell System of *Aspergillus niger*

Chi-Kwan Chung*, Ho-Suk Yang*, Kyu-Chul Shin*, Han-Chul Yang

Dept. of Food Technology, College of Agriculture, Korea University

*Present address: Central Research Institute, Chong Kun Dang Corporation, Guro-Ku, Seoul.

Abstract

The production of gluconic acid from glucose by the resting cell system of *Aspergillus niger* was studied. It was found that the conversion products from glucose by the resting cell system were markedly influenced by the pH, temperature, substrate concentration, aeration, metal ions, cultivation time and storage conditions of the resting cells.

Conversion products were identified as gluconic acid by the thin layer chromatography and infrared spectrophotometry.

These conversions were greatly stimulated by addition of Mg^{++} , and Sn^{++} , but showed inhibitory effects by Cu^{++} , Hg^{++} , Cd^{++} , Ag^+ and cyanide. For the optimum cell storage, it was effective to be kept at $-25^{\circ}C$ in 0.05M phosphate buffer solution of pH 7.0.

The gluconic acid production by the resting cell system was more effective than those of the fermentation with respect to cultivation time, yield, recovery and re-use of the cell.

I. 序 論

Gluconic Acid 와 그 誘導體들은 1930 年代 이후 醫藥品, 酪農製品, 포장食品, 통조림, 병포장食品 등 食品加工 및 飲料水 등의 酸化를 일으키기 쉬운 食品의 酸化 防止劑로서 食品工業에 널리 사용되고 있으며, 近年에는 金屬表面 處理劑 두부製造時 蛋白質凝固劑로서 특히 수요가 많으며, 그 밖에 concrete 의 減水劑 등 그 용도가 다양하게 개발되어 사용량이 급증되어왔다. 이와같이 使用 用途의 增加와 需要增加에 따라 gluconic acid 생산 방법도 매우 다양하게 개발되어 初期에는 주로 平面靜置

培養方式에 의해 생산하다가 培養期間이 길고 生産성이 낮았기 때문에 Currie¹⁾ 등 (1933)이 다시 通氣 교반에 의한 回轉드럼型式 醱酵槽을 거쳐 지금은 거의가 大型 스테이스 醱酵槽에서 液沈培養에 의해 생산하고 있다.

한편으로 産業的인 면에서 生産性向上을 위하여 多方面으로 製造法이 變遷하여 hypobromite 를 촉매로 한 化學的 酸化法^{2,3)}과 *Aspergillus* 속⁴⁻¹⁵⁾, *Penicillium* 속^{6,10,16,17)}, *Pullularia* 속¹⁸⁻²⁰⁾ 등 곰팡이類나, *Pseudomonas* 속^{4,21,22)}, *Acetobacter* 속²¹⁾ 등의 細菌類와 *Candida* 속²³⁾ 등의 酵母類의 菌株을 利用한 醱酵法에 의해서 포도당의 aldehyde 기

를 酸化시켜 생산하고 있다.

현재 사용하고 있는 gluconic acid 製造法은 포도당 水溶液에 직접 菌體를 培養하여 醱酵的으로 포도당을 酸化시키기 때문에 菌體가 成長하는 데 필요한 有機鹽을 營養源으로 添加하여야 하며, 또 生成된 gluconic acid 를 中和시키고 菌體의 成長을 돕기 위해서 CaCO₃ 를 넣어야만 한다.

이때 生成된 高濃度の calcium gluconate는 醱酵液 中에서 結晶으로 析出되어 菌體의 成長 및 포도당의 酸化過程을 阻害시키는 醱酵物質이 되고 있다.^{8, 24, 25)} 따라서 이 calcium gluconate의 結晶化를 막기 위해서 崩산 및 崩산소다를 添加함으로²⁶⁾ 最終醱酵酸物에서 이들 不純物을 제거하는 데 큰 問題點으로 되어 있다.

이와같은 缺點을 제거하기 위해서 微生物로부터 抽出한 酵素의 酸化法에 관심을 갖게 되어 1928년 Müller^{10, 27)}에 의해서 glucose oxidase 가 *Asp. niger* 와 *Pen. glaucum*의 菌體로부터 처음으로 分離된 후 Coulthard¹⁶⁾ (1945), Keilin 등^{6, 28)} (1948, 1952)을 비롯해 수많은 研究者들에 의해서 순수화된 酵素의 結晶을 얻게 되었다. 당시 Baker²⁹⁾등 (1953)이 酵素의 酸化法에 의한 gluconic acid 生産에 대해서 特許를 얻은 이후 포도당 酸化酵素를 생산하는 菌體에서 酵素의 抽出精製에 관한 연구는 많이 報告되어왔다.^{5, 6, 28, 30~32)}

포도당이 gluconic acid 로 酸化하는 反應界^{15, 33)}에서는 $2 \text{ glucose} + \text{O}_2 \xrightarrow[\text{catalase}]{\text{glucose oxidase}} 2 \text{ gluconic acid}$ 와 같이 glucose oxidase 와 catalase 두가지 酵素만이 필요하기 때문에 이들 酵素의 抽出 및 精製費用이 gluconic acid 生産原價에 비해서 高價로 되어 實用化되지 못하고 있다.

그러나 1970年代 이후 酵素의 固定化方法이 開發됨에 따라 이를 應用하여 포도당 酸化酵素를 固定화시키는 方法^{30~38)}은 菌體로부터 酵素를 抽出·精製해야 하므로써 많은 努力과 費用이 필요하지만 休止菌體를 利用하여 glucose 로부터 직접 gluconic acid 를 생산하는 방법은 酵素의 抽出·精製가 필요하지 않을 것으로 생각된다.

한편 Porges²⁴⁾ (1941)와 Hatcher¹⁵⁾ (1972) 등은 醱酵法에 의해서 副生되는 廢菌系를 사용하여 gluconic acid 生産을 檢討한 적이 있었으나 休止菌體를 利用하여 glucose 로부터 직접 gluconic acid 를 생산한 연구는 없었다.

본 연구에서는 향후 菌體 固定化에 의한 gluconic acid 生産을 實現하기 위하여 Yang⁴¹⁾ 등이 gluconic

acid 生産性이 우수한 菌株로 分離·同定한 *Asp. niger* KUF-04의 休止菌體를 利用 gluconic acid 生産에 따른 最適 反應條件 및 菌體保存方法을 통해서 醱酵法과 比較하여 얻은 研究 結果를 보고코자 한다.

II. 材料 및 方法

1. 使用菌株

이 試驗에 使用된 菌株는 Yang 등⁴¹⁾이 gluconic acid 生産性이 우수한 菌株로 分離·同定한 *Asp. niger* KUF-04을 Czapek-Dox agar slant 培地에 계대하여 28°C에서 7일간 培養 포자를 완전히 形成시킨 후 5°C 低溫室에서 保存하여 사용하였다.

2. 反應條件

Reaction mixture로서 2% glucose를 含有한 0.05M phosphate buffer(pH6.20)을 300ml E. flask에 10ml씩 분주한 후 준비된 休止菌體 懸탁액 5ml를 加하여 total volume을 15ml로 하였다. 反應은 28°C reciprocal shaker (진폭 5cm, 120rpm)에서 6~8시간 시켰다.

3. 休止菌體 生産

休止菌體는 glucose 3%, KH₂PO₄ 0.2%, NH₄Cl 0.9%, MgSO₄ · 7H₂O 0.1%, (NH₄)₂SO₄ 0.2%, CaCO₃ 1.0%의 培地(pH 6.7)를 7l Shake flask에 1 liter씩 분주한 후, 별도로 30時間 동안 發芽시킨 培養液을 10% 식균하여 28°C reciprocal shaker (진폭 5cm, 120rpm)에서 30~35時間 培養後 Fig. 1과 같이 준비하였다.

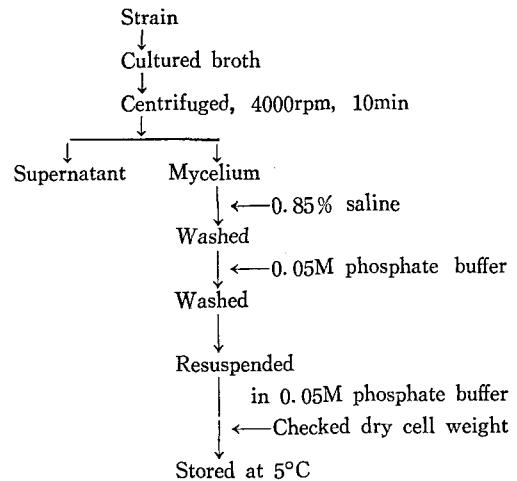


Fig. 1. Preparations of Resting Cells of *Asp. niger* KUF-04.

4. 休止菌體의 保存

休止菌體는 0.05M 인산 buffer(pH7.0)로 懸탁액

을 만들어 5°C 低溫室에 保存하였다가 사용 직전 0.05M 인산 buffer (pH6.2)로 한번 세척하여 사용하였다.

5. 轉換物의 同定

Reaction mixture에서 反應中 生成된 轉換物의 確認은 thin layer chromatography (silica gel 60F 254 precatd, 0.25mm, Merck)에 의해서 하였으며, 이 때 사용한 展開溶媒^{20, 43, 44}로 methylethylketone-acetic acid-2% boric acid 9 : 1 : 1 (v/v/v.)의 比率로 사용하였다.

Detection agent로는 hydroxylamine-HCl을 methanol에 포화시켜 KOH로 중화시킨 후 분무하고 다음에 다시 6% trichloroacetic acid (TCA)溶液에 FeCl₃(6%)를 녹여서 분무건조시킨 후, authentic gluconic acid(Shimakyu's pure chemicals, Osaka, Japan)와 동일한 Rf치인지를 比較 確認하였다.

그리고 休止菌體에 의해서 (30l jar fermentor에서 培養) 얻은 calcium gluconate을 精製하여 infrared spectrophotometer (KBr)로 確認하였다.

6. Gluconic Acid의 定量

Calcium gluconate 定量은 Sumiki⁴⁵, May⁴⁶ 등의

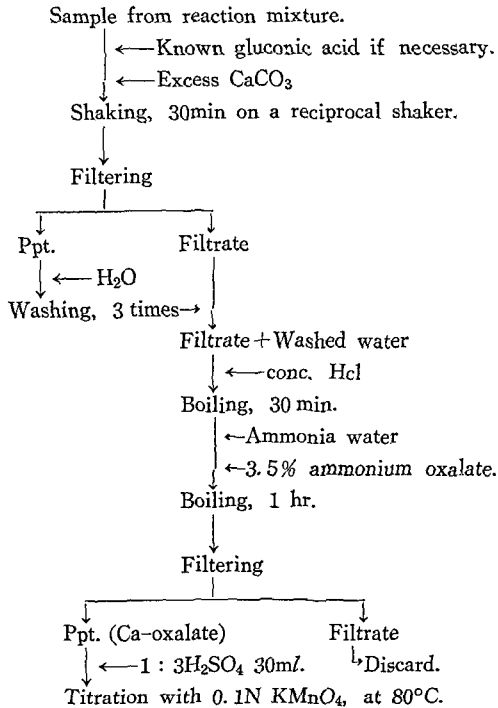


Fig. 2. Analysis Method of Gluconic Acid^{45, 46} with Modifications.

방법을 다소 modification하여 사용하였다(Fig. 2).

상기 방법은 모두 試料中에 gluconic acid含量이 50~250 mg 범위일 때 오차범위 ±3%로서 正確性은 갖지만, 試料中 gluconic acid含量이 50 mg 이하일 경우, Table 1에서처럼 분석오차가 크기 때문에 Fig. 2와 같이 既知의 gluconic acid을 試料中에 더 添加하여 定量한 후 다시 既知의 含量만큼 控除하였다.

Table 1. Recovery Test of Gluconic Acid in 1% Gluconic Acid Solution by the Method of May et al.

Sample	Theoretical Content of Gluconic Acid (mg/ml)	Analytical Content (mg/ml)
1ml	10	12.4
3	10	12.9
6	10	10.8
9	10	9.85
12	10	9.70
15	10	9.67
20	10	9.80

* Calcium gluconate was purchased from Katayama Chemicals (Osaka, Japan).

7. 糖 定量

Shaffer-Somogi micromethod⁴²에 의거 定量하였다.

8. Ammoniacal nitrogen 定量

Folin 법¹⁹에 의해서 定量하였다.

9. Calcium gluconate의 回收

Calcium gluconate의 回收는 Yang 등⁴¹이 試驗한 방법에 따라 ethanol에 의한 沈澱法으로 回收하였다.

III. 結果 및 考察

1. 休止菌體의 最適 培養時間

Gluconic acid 형성 酵素들의 活性이 가장 높은 상태에서 休止菌體를 얻기 위해서 培養時間에 따라 經時적으로 最適 수거 時期를 檢討한 結果(Fig. 3), 菌體量이 최고에 달할 때인 培養 30時間에서 最高의 gluconic acid 生産 活性을 보였다.

2. Gluconic acid의 同定

休止菌體法에 의한 glucose부터 生成된 轉換物을 同定하기 위해서 thin layer chromatogram에서 確認된 結果, reference로 사용한 authentic gluconic acid (Shimakyu's Pure Chemicals, Japan)와 동일

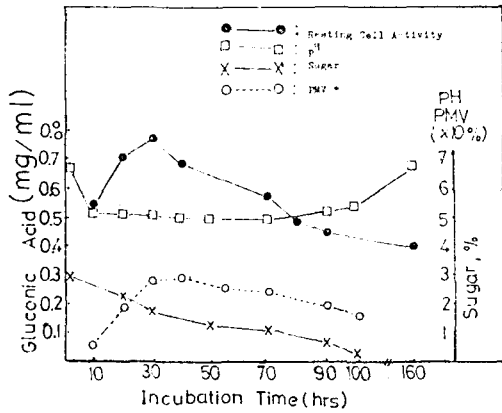


Fig. 3. Time Course of Cell Cultivation to obtain Resting Cells of the Activity.

- Cultivation for resting cell preparations was carried out on a reciprocal shaker (stroke in 5 cm, 120rpm) at 28°C, Containing I liter of the medium in 7 liter shaking flask.
- Reaction mixture contained 2% glucose and cells in 15 ml sodium phosphate buffer solution per 300 ml E. flask.
- Reaction was carried out on a reciprocal shaker (120rpm) at 28°C for 8 hrs.
- *Packed Mycelium Volume.

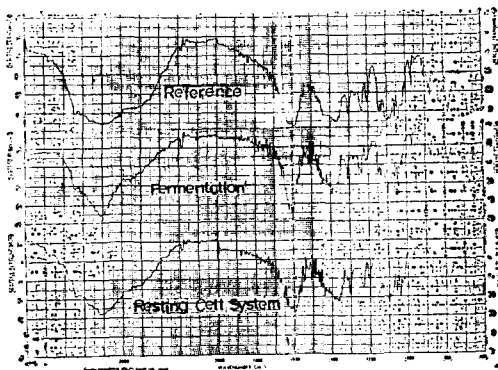


Fig. 5. Infrared Spectrum of Calcium Gluconate

한 Rf 치를 보였다(Fig. 4). 그리고 glucos^o로부터 생성된 轉換物를 50m^l 씩 spot 하여 反應時間에 따라 gluconic acid 生成程度를 관찰한 結果, 反應 1

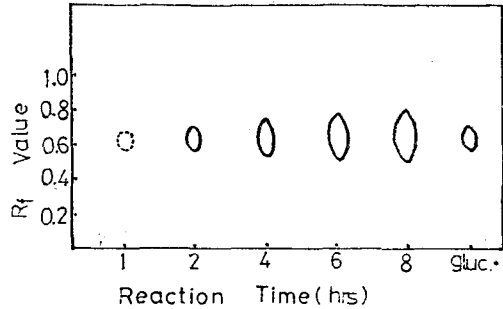


Fig. 4. Thin Layer Chromatogram of Gluconic Acid Converted from Glucose according to Reaction Time.

- Reaction mixture: 2% glucose and 15mg cells/ml of *Asp. niger* KUF-04 in 15ml of 0.05M sodium Phosphate buffer (pH 6.2), 28°C.
- Solvents (methylethylketone-acetic acid -2% boric acid-9 : 1 : 1).
- Detections i) Hydroxylamine hydrochloride saturated methanol solution neutralized with methanolic potassium hydroxide was sprayed first.
- ii) Then 6% FeCl₃ in 6% trichloroacetic acid solution was sprayed.
- * Authentic gluconic acid (Shimakyu's Pure Chemicals, Japan).

시간에는 희미한 spot 를 보였으나 反應 2시간 이후 spot 는 선명하게 증대되면서, 反應 6시간 이후에는 거의 같은 크기의 spot 를 보였다. Fig.5는 休止菌體法에 의해서 轉換된 gluconic acid 를 calcium gluconate 形態로 回收하여 authentic calcium gluconate (Katayama Chemical, Japan)와 함께 I.R spectrum (KBr)에서 確認하였다.

3. 反應條件 檢討

1) 基質의 種類

反應液 中 基質로서 glucose 가 가장 gluconic acid 로의 轉換速度가 빨랐으며, 그 다음이 sucrose > raffinose > fructose 의 順으로 轉換力이 낮아졌다 (Table 2).

2) 基質濃度の 效果

Fig.6 과 같이 glucose 濃도가 1~2% 含有된 反應液은 pH drop 이 양호하고 glucose 로부터 gluconic acid 의 收率도 거의 95% (對糖收率)였으나 glucose 濃도를 3% 이상으로 할 때 對糖收率は 점차 떨어졌다.

Table 2. Effect of Carbon Sources in the Reaction Mixture

Carbon Sources (2%)	Gluconic Acid (mg/ml)	Relative Activity (%)
D(+)-Glucose	17	100
D-Galactose	5.2	30.1
D(-)-Fructose	7.4	43.1
L-Arabinose	2.7	15.7
D(+)-Xylose	5.2	30.1
Sucrose	12.8	75.2
Lactose	4.5	26.1
Maltose	5.2	30.1
D-Mannitol	2.7	15.7
Trehalose	4.0	23.5
Melibiose	4.5	26.1
D(+)-Cellobiose	4.5	26.1
Raffinose	8.5	49.7
L(+)-Rhamnose	3.4	19.6
Dextrin	6.7	39.2
L(-)-Sorbitose	5.2	30.1
Inulin	5.4	31.4

- i) Reaction was carried out on a reciprocal shaker (120rpm) at 28°C for 7 hr.
 ii) Cell conc.: 20mg/ml in 15ml reaction mixture.

glucose 농도를 3% 이상으로 添加時 反應中 生成된 gluconic acid로 反應液의 pH가 떨어져 最適 反應 pH 범위를 벗어나기 때문에 阻害作用을 하는 것으로 思料된다.

Scott 등²¹⁾은 精製된 glucose oxidase의 最適作用 pH 범위가 基質의 濃도와 酸素의 存在에 따라 다소 차이가 있으나 대개 pH 5.1~5.9까지로 하고 있음을 감안할 때 反應液 中에 生成된 gluconic acid을 中和하지 않고서는 基質濃도를 2% 이상 높이는 것은 바람직하지 않은 것으로 思料된다.

3) 菌體濃도의 效果

Glucose 2%를 含有하는 反應液에서 酵素源으로 사용된 最適菌體 濃도를 檢討하기 위해서 菌體濃도를 2.5~25mg/ml (dry cell weight)로 변화시킨 結果, 菌體濃도 15 mg/ml (DCW)까지는 菌體濃도 증가에 따라 gluconic acid의 生成이 比例的으로 증가하였으므로 (Fig. 7), 適正 菌體濃도는 15 mg/ml 이면 적합한 것으로 思料된다.

4) pH 效果

休止菌體法에 의해서 菌體가 갖는 gluconic acid 形成酵素들의 最適反應 pH를 檢討한 結果, Fig. 8

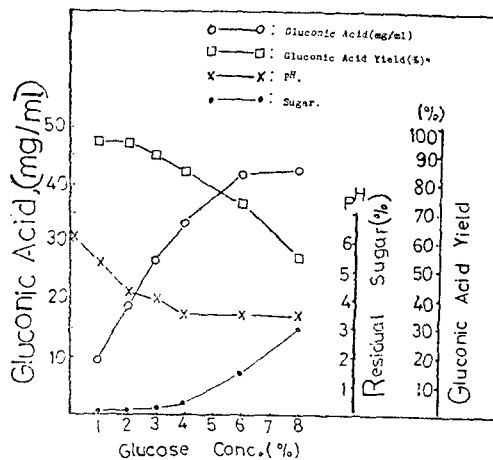


Fig. 6. Effect of Concentration of Glucose by Resting Cell System (15mg cells/ml).

—Reaction mixture contained glucose and 15mg cells/ml in 15ml sodium phosphate buffer solution per E. baffled flask of 300ml.

—Reaction was carried out on reciprocal shaker (stroke in 5cm, 120rpm) at 28°C for 7 hr.

* Gluconic acid yield

$$\frac{\text{Gluconic acid formed (g)}}{\text{Glucose added (g)}} \times 100$$

에서 나타난 바와 같이 反應時 pH가 8.0 이상 알칼리 부근에서는 gluconic acid 形成酵素들의 活性이 크게 制限을 받았으며, pH 5.0 이하의 酸性에서 서도 gluconic acid 形成酵素들의 活性이 低下되었다.

本 試驗에서는 *Asp. niger* KUF-04의 休止菌體의 最適反應 pH는 5.5 부근으로 나타났다. 上記 pH 5.5는 Pazur²⁰⁾ Keilin⁶⁾ 등의 *Asp. niger*로부터 抽出·精製된 glucose oxidase의 最適反應 pH와 일치했다.

반면에 Scott²¹⁾ 등은 精製된 glucose oxidase의 活性은 反應 pH와 glucose 存在 有無에 따라 크게 影響을 받기 때문에 pH 8.1에서 glucose 존재하에는 (反應時間 40分) 20%만이 失活되었으나, pH 8.1에서 glucose가 없을 때는 같은 反應時間에서 90%의 失活이 있었다고 報告한 事實은 反應 pH와 反應基質濃도는 어느 정도 상관성이 있음을 보여 주고 있다.

그러나 Bose⁵⁾ (1947)는 *Asp. niger*의 乾燥菌體를 갖고 酵素源으로 試驗한 結果 反應時 最適 pH

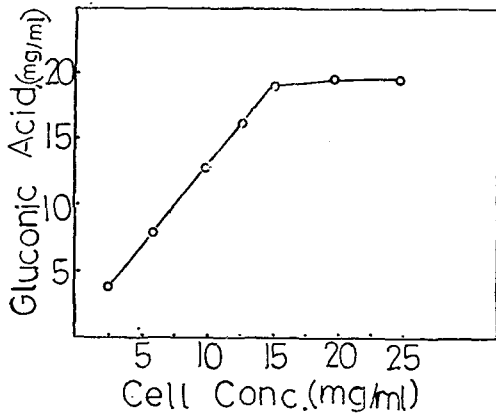


Fig. 7. Effect of Cell Concentrations on the Reaction.

- Reaction mixture contained 2% glucose and cells in 15ml sodium phosphate buffer solution per E. flask of 300ml.
- Reaction was carried out on a reciprocal shaker(stroke in 5cm. 120rpm) at 28°C for 7 hr.
- Cells were kept at 5°C for 3 days before use.

가 6.5 라고 한 사실은 본 실험에서 反應最適 pH 5.5 와는 차이가 있다.

5) 溫度效果

反應時 溫度는 酵素의 最適 活性度 면에서 뿐 아니라 通氣效果 면에서도 중요하므로 (Ohlmeyer. 1957)^{21,23} 休止菌體가 갖는 最適反應 溫度를 檢討한 結果 (Fig. 9), 28°C 에서 最適이었으며, 33°C, 37°C 高溫쪽일수록 좋지 않았다.

Bose⁵⁾ (1947)은 일찌기 *Asp. niger*의 乾燥菌體에 의한 gluconic acid 形成酵素들에 대한 研究에서 32°C 에서 試驗하였음을 볼 수 있었다.

한편 精製된 glucose oxidase의 最適反應溫度가 30°C^{30,48)} 인 점으로 미루어 休止菌體가 갖는 gluconic acid 形成酵素群의 適正 反應溫度는 28°C ~ 30°C 인 것으로 思料된다.

6) 通氣效果

Glucose에서 gluconic acid를 얻는 데는 $2 \text{ glucose} + \text{O}_2 \xrightarrow[\text{catalase}]{\text{glucose oxidase}} 2 \text{ gluconic acid}$
^{48,49)} 같이 gluconic acid의 生成을 위해서 酵素의 存在는 필수적이다.

300 ml E. flask 에 反應液 15 ml 을 넣어서 通氣

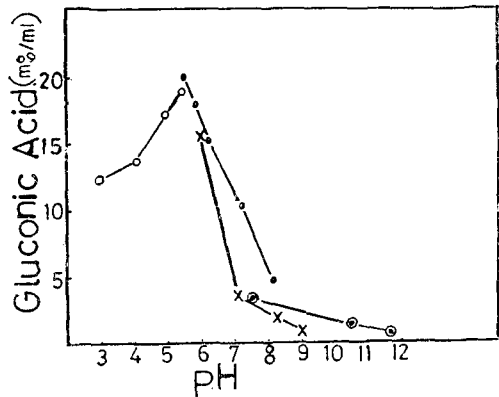


Fig. 8. Effect of pH on the Conversion of Gluconic acid from Glucose by Resting Cell System of *Asp. niger* KUF-04.

- Reaction mixture contained 2% glucose and 8mg cells/ml in 15ml sodium phosphate buffer solution.
- Reaction was carried out on a reciprocal shaker(stroke in 5cm, 120rpm) at 28°C for 7hr.
- : 0.05M sodium acetate-HCl buffer.
- : 0.05M sodium phosphate buffer.
- *—*: Tris-HCl buffer.
- : 0.05M sodium phosphate-NaOH buffer.

에 대한 影響을 檢討한 結果 (Fig. 10-1), 飜糖 培養할 쪽이 정치 배양시에 비해서 gluconic acid 生成速度가 빠르고 같은 反應時間에서도 生成量이 많았다.

Fig. 10-2 는 rotary shaker (200 rpm)과 reciprocal shaker (120rpm)에서 shaking type 에 따른 通氣效果를 비교한 것인데 rotary type 이 最大 生成을 보이는 데 6時間을 보인 반면 reciprocal type 은 8시간이 걸렸다.

上記 試驗에서 glucose로부터 gluconic acid의 生成時 通氣條件 및 通氣方法은 反應時間에 影響을 미칠 뿐 아니라 生成物의 增減에도 크게 關係하였다.

7) 인산 buffer 濃度效果

Glucose로부터 gluconic acid로 轉換時 反應液中 인산 buffer의 最適 使用濃度를 檢討한 結果 (Fig. 11), 反應液 中 인산 buffer 濃度가 0.001~0.05M 범위내에서 양호한 結果를 보였다.

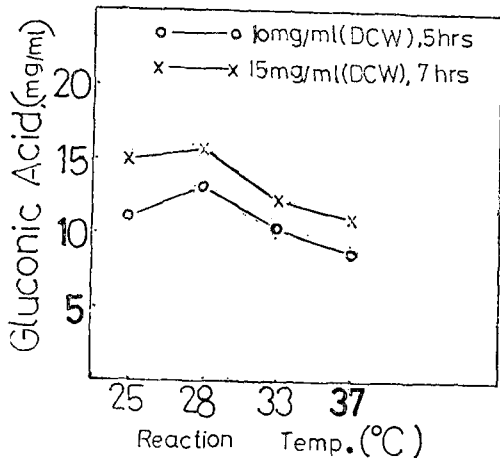


Fig. 9. Effect of Reaction Temperature on the Conversion of Gluconic acid from Glucose by Resting Cell System of *Asp. niger* KUF-04.

—Reaction mixture contained 2% glucose and 15mg cells/ml in 15ml sodium phosphate buffer per a 300ml E. flask.

—Reaction was carried out on a reciprocal shaker (stroke in 5cm, 120rpm) at 28°C, 7 hours.

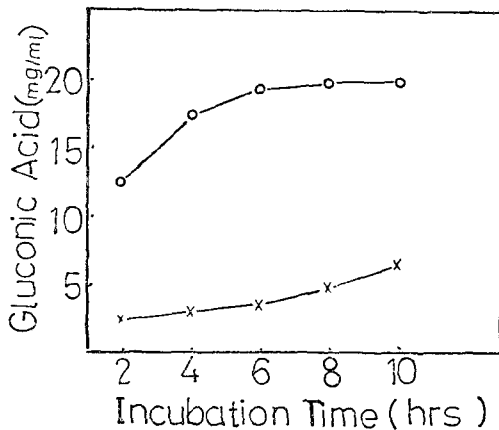


Fig. 10-1. Effect of Aeration(I) on the Cultivation Methods for the Conversion of Gluconic Acid from Glucose by Resting Cell System of *Asp. niger* KUF-04.

—Reaction mixture contained 2% glucose and 15mg cells/ml in 15ml sodium phosphate buffer per E. flask of 300ml.

—Reaction was carried out on a reciprocal shaker (stroke in 5cm, 120rpm) at 28°C.

○—○ : Shaking culture, reciprocal shaker (120rpm) 28°C (15ml/300ml E. flask).

— : Standing culture, 28°C. (15ml/300ml E. flask).

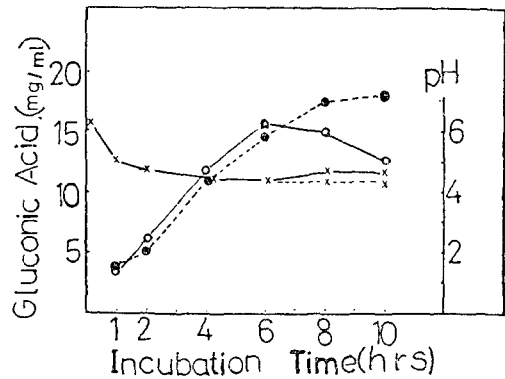


Fig. 10-2. Effect of Aeration(II) on the Shaking Type for the Conversion of Gluconic Acid from Glucose by Resting Cell System of *Asp. niger* KUF-04.

—Reaction mixture contained 2% glucose and 8.3 mg cells/ml in 15ml sodium phosphate buffer per E. Flask of 300ml.

—Reaction was carried out at 28°C.

○—○ : Rotary shaker (stroke in 5cm, 200rpm).

●—● : Reciprocal shaker (stroke in 5cm, 120rpm).

×—× : pH after reaction on a rotary shaker.

×—× : pH after reaction on a reciprocal shaker.

本實驗에서는 0.05M 인산 buffer 를 사용하였는데 Ichikawa⁷⁾ 등이 菌體를 利用한 glucose oxidase 活性에 관한 研究에서 1/15M 인산 buffer 를 사용한 것은 上記 實驗의 범위와 합치된다고 볼 수 있다.

8) CaCO₃ 添加效果

2% glucose 를 含有하는 15ml 의 反應液에서 생기는 free acid 을 中和하는 데 0.52% 의 CaCO₃ 가 필요하지만 Fig. 12 에서 나타난 바와 같이 CaCO₃

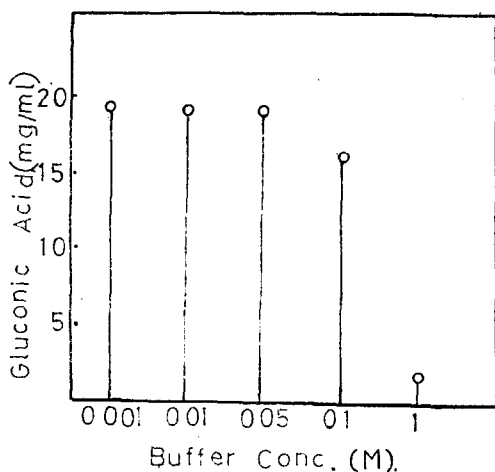


Fig. 11. Effect of Concentrations of Phosphate Buffer on the Reaction.

- Reaction mixture contained 2% glucose and 7.7 mg cells/ml in 15 ml sodium phosphate buffer per E. flask of 300ml.
- Reaction was carried out on a reciprocal shaker (stroke in 5cm, 120 rpm) at 28°C for 8 hrs.
- Cells were stored for 3 days before use.

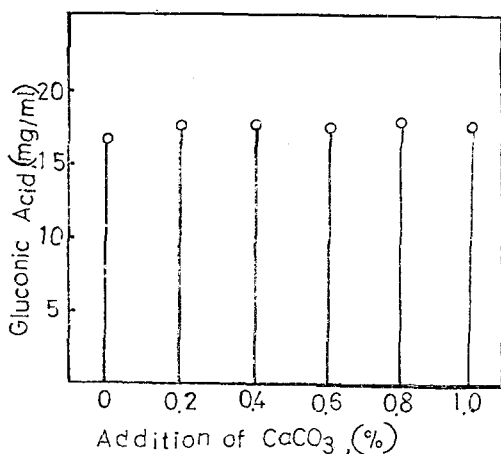


Fig. 12. Effect of Concentration of CaCO₃ in 2% Glucose Mixture by Resting Cell System.

- Reaction was carried out in 2% glucose mixture containing 8.8mg cells/ml on a reciprocal shaker (120rpm) at 28°C for 7 hours.

0.2% 이상 첨가에 의한 효과는 없었다. 일정 반응 시간 내에서 2% glucose 함유 반응액에서 생성되는 산이 많지 않기 때문에 CaCO₃에 의해 중화할 필요성은 적은 것으로 생각된다.

Chughtai⁷⁾ 등 (1966)도 *Asp. niger*에 의한 醱酵에서 CaCO₃의 첨가는 (26g/l) 첨가하지 않았을 때 收率 48.2%에 비해서 62.13%로 收率을 向上시켰다고 하였으며, TaKaO 등²³⁾ (1964)도 곰팡이 *Pullularia* 속에 의한 gluconic acid 醱酵에서 CaCO₃의 첨가는 收率에 影響을 미쳤다고 하였으나 이들은 모두 10% glucose 배지에서 CaCO₃의 효과를 檢討한 結果들이다.

本 實驗의 結果 2% glucose 함유 反應液에서는 反應中에 生成되는 free acid에 의한 阻害는 적은 것으로 보인다.

그리고 反應時 必要量 이상의 過量의 CaCO₃ 存在 時에도 反應에 別다른 影響을 주지 않았다.

9) 金屬 ion 効果

金屬이온의 存在에 따른 反應效果와 gluconic acid 醱酵에 關聯된 몇가지 化合物의 存在에 관한 影響을 檢討한 結果 (Table 3), Cu⁺⁺의 存在는 control에 비해서 35% 정도의 비교적 많은 阻害作用이 있었으며, Hg⁺⁺, Cd⁺⁺, Ag⁺, cyanide의 存在는 control에 비해서 10~15% 정도의 阻害效果를 가져왔다.

반면에 Mg⁺⁺, Sn⁺⁺은 反應을 促進시키는 效果를 보였다. Scott⁴⁸⁾는 *Aspergillus* 속에서 얻은 glucose oxidase가 Cu⁺⁺, cyanide의 存在(0.2~0.8mg/ml)로 gluconic acid의 收率低下를 가져왔다고 하였다.

반면에 Keilin⁶⁾은 *Penicillium notatum* 菌糸에 의한 glucose oxidase에 관한 研究에서 菌糸의 呼吸은 cyanide에 민감한 反應을 보였지만, glucose를 酸化하는 때는 cyanide가 阻害作用을 하지 않았다고 報告하였다.

Müller 등²⁷⁾은 glucose oxidase는 金屬 ion의 存在로 反應에 影響을 미치지 않는 것으로 報告하였으나, 本 研究의 結果에는 Cu⁺⁺, Hg⁺⁺, Cd⁺⁺, Ag⁺, cyanide은 약간씩 阻害作用을 나타내었다.

Arsenite의 添加 效果에 관한 研究에서 Chughtai 등¹¹⁾이 4×10³M의 arsenite 添加에 의해서 citric acid와 oxalic acid의 生産이 抑制되는 반면에 gluconic acid 生成이 促進되었다고 報告하였으나, 本 試驗에서는 arsenite 添加에 따른 別다른 效果를 얻지 못하였다.

그리고 boron 化合物인 borax (Na₂B₄O₇)의 添加

Table 3. Effect of Metal Ions and Other Compounds on the Gluconic Acid Production by Resting Cell System.

Salts Used ($1.3 \times 10^{-3}M$)	Gluconic Acid (mg/ml)	Relative Activity (%)
None	16.7	100
*CuSO ₄	10.9	65.1
CoCl ₂	16.6	99.1
MgSO ₄	18.8	112.6
FeSO ₄	16.6	99.1
MnCl ₂	15.2	91.2
ZnCl ₂	15.3	91.6
BaCl ₂	16.5	99.1
SnCl ₂	18.4	110.0
Li ₂ SO ₄	16.4	98.0
† HgCl ₂	14.2	84.8
† CdSO ₄	14.0	84.0
Na ₂ MoO ₄	15.3	91.5
Na ₂ WO ₄	15.8	95.0
† Ag ₂ SO ₄	14.0	84.0
AlCl ₃	17.4	104
† KCN	14.6	87.4
NaAsO ₂	16.6	99.1
Na ₂ B ₄ O ₇	16.8	100.6

- i) Reaction mixture; 2% glucose soln. + 6mg cells /ml
 ii) Reaction was carried out on a reciprocal shaker (120rpm) at 28°C for 8 hours.

효과는 高濃度の calcium gluconate의 存在時 結晶 形成防止를 위해서 사용할 수 있으나 그 毒性때문에 休止菌體가 갖는 gluconic acid 形成酵素들의 活性이 鈍化되는지 여부를 檢討한 結果, 1.3×10^3M 濃度에서 阻害效果를 나타내지 않았다.

10) Mg⁺⁺ 濃度效果

Table 3에서 金屬이온의 效果에 관한 研究에서 Mg⁺⁺를 $1.3 \times 10^{-3}M$ 로 添加하였을때 (MgSO₄·7H₂O를 添加) Mg⁺⁺은 反應에 促進效果를 보였으므로 Mg⁺⁺의 最適濃度を 檢討한 結果, 1~100 mM의 Mg⁺⁺이 존재시는 10~15% 促進效果가 認定되었으며, 그 以下の 低濃度에서도 control에 比해서 反應促進效果를 가져왔다 (Table 4).

4. 休止菌體의 保存條件 檢討

1) 保存時 pH 效果

休止菌體法에 의한 反應效果를 높이기 위해서 休止菌體들의 保存條件이 매우 중요시되므로 休止

Table 4. Effect of Mg⁺⁺ Concentration in the Reaction Mixture

Mg ⁺⁺ (mM)	Gluconic Acid (mg/ml)	Relative Activity (%)
None	16.7	100
0.0001	18.0	107.8
0.01	17.6	106.0
1	18.8	112.6
10	19.3	115.0
50	18.8	112.6
100	18.6	111.8

- i) Reaction mixture; 2% glucose soln. + 6mg cells /ml
 ii) Reaction was carried out on a reciprocal shaker (120rpm) at 28°C for 8 hours.

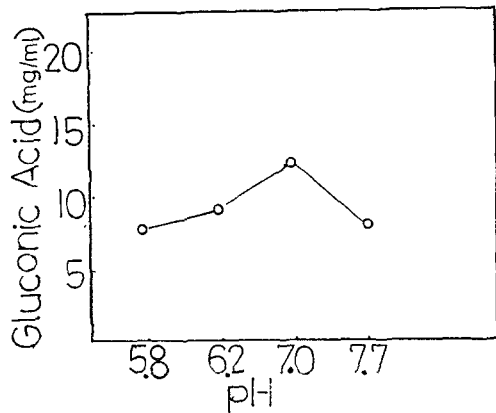


Fig. 13. Effect of Various pH Used for Cell Retention at 5°C

—Reaction was carried out on a reciprocal shaker (stroke in 5cm, 120rpm) at 28°C for 8 hr.

—Cells used for test had been kept at 5°C with various concentrations of pH for 6 days.

菌體 현탁액의 最適보존 pH에 대해서 試驗한 結果 (Fig. 13), pH 7.0 부근에서 5°C로 유지한 것이 活性이 제일 높았다.

2) 保存時 buffer 濃度效果

休止菌體 保存時 最適 인산濃度を 검토한 結果 (Fig. 14), 인산 buffer 0.001~0.05M에서는 양호한 保存效果를 보였다.

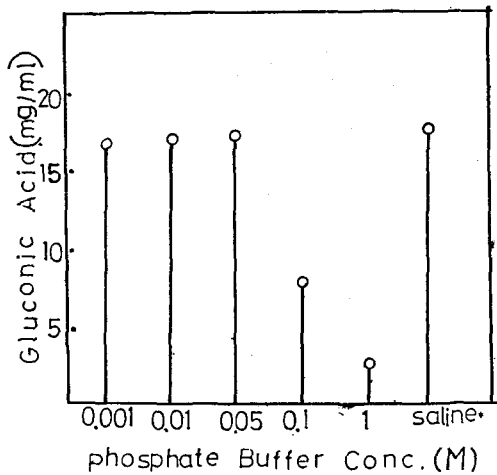


Fig. 14. Effect of Phosphate Buffer Concentration on the Gluconic Acid Production during Cell Storage at 5°C.

- Reaction mixture contained 2% glucose and 7.7 mg cells/ml in 15 ml sodium phosphate buffer per E. flask of 300 ml.
- Reaction was carried out on a reciprocal shaker (stroke in 5cm, 120rpm) at 28°C for 8 hrs.
- Cells used for this test were kept for 5 days at 5°C with the various concentrations of phosphate buffer.

* Saline : 0. 85 %.

3) 休止菌體의 保存溫度 影響

休止菌體의 保存溫度에 따라 어느 정도 안정한 지를 관찰하기 위해서 5°C, 25°C, 37°C, -25°C 에서 保存後 경시적으로 活性을 檢討한 結果(Fig. 15), 5°C 保存 時는 3~5 일간 保存 後 점차 活性이 떨어졌으며, 25°C 保存 時는 3 日 이후에 급격히 낮아졌고, 37°C 保存 時는 18 時間 이후 계속 活性이 낮아져 14 日 후에는 전혀 活性이 없었다. 그러나 -25°C 에서 14 일간 凍結 보존한 것은 活性의 變化가 없었으므로 保存 效果는 제일 좋았다.

일반적으로 精製된 glucose oxidase 는 低溫에서 매우 안정성이 높기 때문에 3°C 에서 수년간 보존 하여도 損失이 없었다³⁰⁾고 하였으나, 本 試驗에 사용 한 休止菌體가 갖는 gluconic acid 形成 酵素들은 保存 方法 및 保存 期間에 따라 活性의 變化가 컸다.

5. 休止菌體의 再使用 檢討

한번 反應에 사용된 Cell 들의 活性을 檢討하기

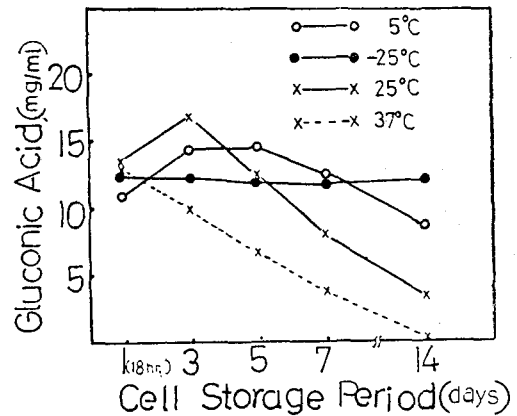


Fig. 15. Effect of Storage Temperature of Resting Cells of *Asp. niger* KUF-04 on the Gluconic Acid Production.

- Reaction mixture contained 2% glucose and 11.6 mg cells/ml sodium phosphate buffer per E. flask of 300 ml.
- Reaction was carried out on a reciprocal shaker (stroke in 5cm, 120rpm) at 37°C for 5 hr.

위해서 여과법으로 菌體를 回收한 後 反復하여 反應에 사용된 結果, Fig. 16 에서와 같이 3 번 反復 사용으로 gluconic acid 形成 酵素들의 活性은 減少 하지 않았다.

그러나 4 번째는 다소 減少가 일어났다. 이와 유사한 實驗으로 Porges²⁶⁾(1940)는 醱酵法에 의해서 副生되는 *Asp. niger* 의 廢菌絲를 適當量의 營養 素를 添加하여 9 회 反復 사용으로도 酵素의 活性이 減少되지 않았음을 報告하였다.

Hatcher¹⁵⁾(1972)는 한번 사용된 *Asp. niger* 의 菌體를 더 이상 營養素의 添加없이 2 회까지 사용 할 수 있었다고 했으며 3 회째는 菌體의 活性을 復元시키기 위해서 少量의 영양분을 添加하여 gluconic acid 收率을 97.9% 까지 얻을 수 있었다고 하였다.

이와 같이 몇몇 研究者들의 實驗結果와 比較해 볼때 *Asp. niger* 가 갖는 gluconic acid 形成 酵素들의 안정성은 매우 큰 것으로 思料된다.

6. 醱酵法과 休止菌體法과의 收率 比較

30L. jar fermenter 에서 scale up 하여, 休止菌體 法에 의한 gluconic acid 生産을 檢討한 結果, 反應

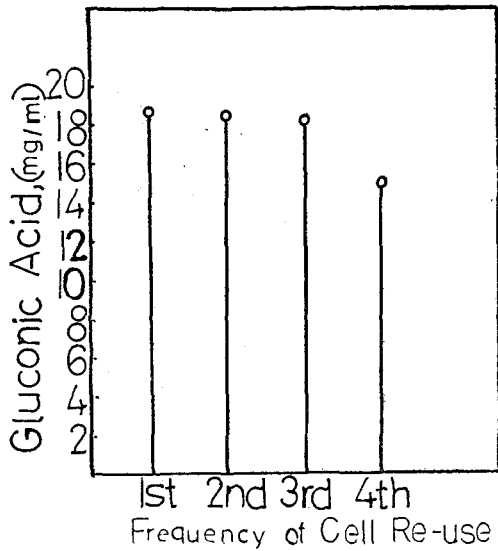


Fig. 16. Activity of Recycled Cells on the Gluconic Acid Production by Resting Cell System.

- Reaction mixture contained 2% glucose and 11.6 mg cells/ml in 15 ml sodium phosphate buffer per E. flask of 300ml.
- Reaction was carried out on a reciprocal shaker (stroke in 5cm, 120rpm) at 28°C for 7 hr.
- Cells used for re-use were washed with sodium phosphate buffer (pH 6.3) twice.

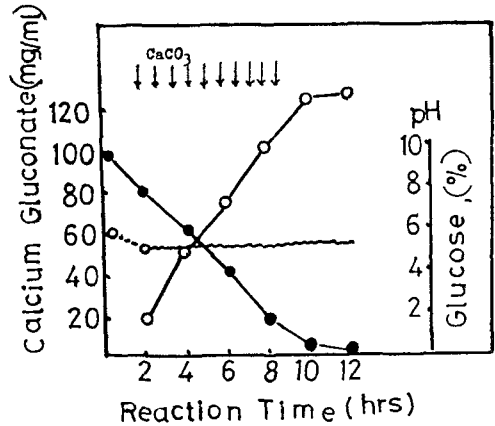


Fig. 17. Gluconic Acid Production by Resting Cell System in 30l Jar Fermentor.

- Charge Vol.; 15 L, Aeration; 1 VVM, 500rpm, Temp.; 28°C, Cell Conc.; 23.7 mg/ml (DCW).
- ; Gluconic Acid.
- ; Sugar Consumption.
- ; pH Control.

10시간내에 糖消費에 比例하여 gluconic acid 生産을 직선으로 增加하였다(Fig. 17).

Table 5는 30l jar fermentor에서 醱酵法과 休止

Table 5. Gluconic Acid Production by Resting Cell System was compared with the conventional fermentation process.

	Conventional Fermentation	Resting Cell System
Reaction period (hr.)	17	10
Glucose %, Initial	10	10
Final	0.30	0.06
Ca-gluconate yield obtained, %	110.3	117.2(W/W)
Conversion yield, % to theoretical yield	88.4	94.2
Gluconic acid yield, $\frac{\text{gluconic acid}}{\text{glucose added}} \times 100$	95.7(%)	101.96(%)
Conditions;		
Charge volume(l)	15/30	15/30
Enzyme source, seed volume	1.5l (10%) (pH5.4 PMV 21% 17mg—DCW/ml)	mycelium from 15l cultured broth
Cell concentration in reaction mixture	1.8mg—DCW/ml	23mg—DCW/ml
Aeration (VVM)	1	1
Agitation (rpm)	500	500
Inner pressure (Kg/cm ²)	0.4	0.4

Temperature (°C)	28°C [±]	28°C
Initial pH	6.2	6.2
pH control CaCO ₃	5.0~5.5	5.0~5.5
Medium used	sterilized	not sterilized
Composition of medium;		
Glucose	10(%)	10(%)
CaCO ₃	3.1	3.1
KH ₂ PO ₄	0.02	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1	
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.02	

菌體法에 의하여 生成된 calcium gluconate 을 回收하여 收率을 比較한 結果, 休止菌體法에 의한 gluconic acid 生産이 醱酵法에 비해서 收率이 좋고 反應時間이 짧고 보다 단순화된 培地 조성으로 인해서 回收가 간단하고, 또한 菌體의 再使用이 가능하였으므로 原價 節減面에 利點이 클 것으로 생각된다.

IV. 要約

Aspergillus niger 의 休止菌體法에 의한 glucose로부터 gluconic acid 生産에 대해서 研究한 結果, gluconic acid 生産은 反應 pH, 溫度, 基質濃度, 通氣條件, 金屬 ions, 休止菌體의 保存狀態 및 反應時間에 따라 크게 影響을 받았다.

休止菌體法에 의해서 glucose로부터 轉換된 生成物質은 thin layer chromatography 와 infrared spectrophotometer 에 의해서 gluconic acid 로 確認되었으며, glucose로부터 gluconic acid 生成反應에서는 Mg⁺⁺, Sn⁺⁺의 添加로 促進效果를 보였으나, Cu⁺⁺, Hg⁺⁺, Cd⁺⁺, Ag⁺ 및 Cyanide 는 阻害效果를 나타냈다.

休止菌體의 最適保存 條件으로는 0.05 M phosphate buffer (pH7.0)에서 -25°C 保存時가 제일 安定하였다.

休止菌體法에 의한 gluconic acid 生産은 醱酵法에 비해서 培養時間이 짧고 收率이 良好하고, 精製時 回收가 간단할 뿐 아니라 菌體의 반복사용이 가능하였다.

참고 문헌

- 1) Currie, J. N. and Carter, R. H.: U. S. Patent 1, 896, 811 (1933).
- 2) U. S. Pat. No. 1, 643, 368.
- 3) Isbell, H. S., Frush, H. L. and Bates, F. J.:

Industrial and Engineering Chemistry, **24**, 375 (1932).

- 4) Yamada, K.: Fermentation and Industry (Japan), **34**(9), 661 (1976).
- 5) Bose, S. K.: J. Indian Chem. Soc., **24**, 327-337 (1947).
- 6) Keilin, D. and Hartree, E. F.: Biochem., **J.** **42**, 221-337 (1948).
- 7) Ichikawa, Y.: Yakugaku Kenkyu (Japan), **32** (2), 23-31 (1960).
- 8) Moyer, A. J., Umberger, E. J., and Stubbs, J. J., Herrick, H. T., and May, O. E.: Ind. Eng. Chem., **29** 777-81 (1937).
- 9) Korean Patent Specifications, No. 480, 1-5 (1980).
- 10) Müller, D.: Enzymologia, **10**, 40-47 (1941).
- 11) Chughtai, M. I. D. and Walker, T. K.: Biochem. J., **48**, 524-527 (1951).
- 12) Taha, E. E. M., Gad, A. M. and Abbasy, M. H.: Archiv. für Microbiologie, **36**, 109-115 (1960).
- 13) Mahmoud, S. A. Z. El-Sawy, M. and Nour El-Din Ibrahim, O. O.: Zbl. Bakt. Abt. II, Bd. **131**(5), 361-374 (1976).
- 14) Chughtai, I. D. and Walker, T. K.: Biochem. J., **56**, 484-7 (1954).
- 15) Herbert J. Hatcher et al: U. S. Pat. 3, 669, 840 (1972).
- 16) Couthard, C. E. et al.: Biochem. J., **39**, 24-36 (1945).
- 17) Chughtai, M. I. D. and Aman Ujjah shah, : Pakistan J. Sci. Res., **18**(1), 75-82(1966) (Eng).
- 18) Su, Y. C., Liu, W. H. and Jang, L. Y.:

- Proceedings of The National Science Council (China), **10**(2), 143-159 (1977).
- 19) Folin, O.: *Z. Physiol. Chem.*, **37**, 161 (1902).
 - 20) Takao, S., and Sasaki, Y.: *Agr. Biol. Chem.*, **28**(11), 752-756 (1964).
 - 21) Scott, D.: *Economic Microbiology*, Vol. 2, p. 99-108, Academic Press, New York (1978).
 - 22) Lock wood, L.B., Tabenkin, B. and Ward, G.E.: *J. Bacteriol.* **42**, 51-61 (1941).
 - 23) Takao, S.: *J. Agr. Chem. Soc. (Japan)*, **34**, 406-8 (1960).
 - 24) Porges, N., Clark, T.F., Aronovsky, S.I.: *Ind. Eng. Chem.*, **33**, 1065-67 (1941).
 - 25) Gastrock, E.A., Porges, No, Wells P.A., and Moyer, A.J.: *Ind. Eng. Chem.*, **30**, 782-9 (1928).
 - 26) Moyer, A. J., Umberger, E.J., and Stubbs, J.J.: *Ind. Eng. Chem.*, **32**, 1379-83(1940).
 - 27) Müller, D.: *Biochem. Z.*, **199**, 136 (1928).
 - 28) Keijin, D. and Hartree, E.F.: *Biochem. J.*, **50**, (331 1952).
 - 29) Baker, D. L.: U.S. Patent 2,651,592.
 - 30) Patur, J.H.: *Methods in Enzymology*, Vol. IX, 32-86 (1966).
 - 31) Nakamatsu, T., Akamatsu, T., Miyajma, R., and Shiio, I.: *Agr. Biol. Chem.*, **39**(9), 1803-1811 (1978).
 - 32) Louis Goldsmith et al: U.S. Pat. 2,926,122 (1960).
 - 33) Ohlmeyer, D.W.: *Food Technology*, **11**, 503-507 (1957).
 - 34) Miyamura, M. and Suzuki, S.: *Nippon Kagaku Kaishi (Japan)*, **7**, 1274 (1972).
 - 35) Herring, W.M., Laurence, R.L. and Kittrell, J. R.: *Biotech. and Bioeng.*, **14**, 159 (1974).
 - 36) Kapoulas, H.A., Korus, R. and O'Driscoll, K.: *Biotech. and Bioeng.*, **16**, 159 (1974).
 - 37) Messing, R.A.: *Ibid.*, **16**, 897 (1974).
 - 38) Korean Patent Specifications, No. 480, p.1-5 (1980).
 - 39) Müller, H.M.: *Arch. Mikrobiol.*, **53**(1), 77-91 (1966) (Ger).
 - 40) Müller, H.M.: *ibid.*, **53**(3), 277-87 (1966) (Ger).
 - 41) Yang, H.S., Kim, D.H., and Yang, H.G.: *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **8**(2), 93-102 (1980).
 - 42) Holowitz, W.: *Method of Analysis of A.O. A. C.*, p.574 (1975).
 - 43) Sasaki, Y. and Takao, S.: *J. Ferment. Technol.*, **48**(6), 368-373 (1970).
 - 44) Kagawa, Y.: *J. Biochem (Japan)*, **51**, 134 (1962).
 - 45) Sumiki, Y.: *Bull. Agr. Chem. Soc. (Japan)*, **5**, 10 (1929).
 - 46) May, O.E., Herrick, H.T., Moyer, A, J, and Wells, P.A.: *Ind. Eng. Chem.*, **26**, 575 (1934).
 - 47) Sumki et al: *Food Analysis Handbook*, 2nd Ed., p.342-343, Ken Chosha Publishing Co. Japan (1973).
 - 48) Scott, D.: *Enzymes in Food Processing*, p. 219-231, Academic Press, New York (1975).
 - 49) Scott, D.: *J. Agr. Food Chem.*, **1**(11), 727-30 (1953).