

## 감귤과피를 기질로 한 *Aspergillus niger* 의 구연산 발효

강신권<sup>1\*</sup> · 박형환<sup>1</sup> · 이재호<sup>1</sup> · 이윤수<sup>1</sup> · 권익부<sup>1</sup> · 성낙계<sup>2</sup>

<sup>1</sup>롯데그룹 중앙연구소 <sup>2</sup>경상대학교 식품공학과

### Citric Acid Fermentation from Mandarin Orange Peel by *Aspergillus niger*

Kang, Shin-Kwon<sup>1\*</sup>, Hyung-Hwan Park<sup>1</sup>, Jae-Ho Lee<sup>1</sup>, Youn-Soo Lee<sup>1</sup>,  
Ik-Boo Kwon<sup>1</sup> and Nack-Kie Sung<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Lotte Group R&D Center, 4-20 Yangpyong-dong, Yongdeungpo-Ku, Seoul 150-104, Korea

<sup>2</sup>Department of Food Science and Technology, Gyeong Sang National University,  
Jinju 660-701, Korea

Most of orange peels are disposed from orange juice manufacturing process. Thus, our purpose is to utilize these orange peels as fermentation substrate. We have investigated culture conditions and factors influencing citric acid production by an isolated strain, *Asp. niger*. Citric acid production was much higher in semisolid culture than in submerged culture and the particle size of ground orange peels was favored at 20 mesh in semisolid culture. The optimal pH and temperature were 4.5-5.0 and 30°C respectively and the temperature cycling at 35°C for 20 hrs during exponential phase, 10°C for 4 hrs and 30°C during stationary phase showed higher citric acid production than did at fixed temperature, 30°C. The addition of NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0.2%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1%, methanol 2.5%, ethanol 1.5%, to culture medium promoted citric acid production but the addition of trace metal ions as nutrients had not effect on the acid production in orange peel medium. Under the optimal culture conditions, maximum yield of citric acid was 80.4% in solid medium. Almost of all original components of citrus peel was consumed by *Asp. niger* during fermentation.

감귤과즙 제조공정에 따라 부생되는 부산물은 수분함량이 높아 부패되기 쉽고 또한 부산물에 대한 특별한 처리방안이 없어 자연 그대로 방치되어 자연 오염의 원인이 되고 있다. 감귤과피의 효과적인 처리는 폐자원의 재활용 뿐만 아니라 식품, 동물사료 및 유용물질의 생산에 기여할 수 있으며 특히 폐감귤과피는 sucrose, glucose 와 같은 다량의 수용성 탄수화물과 조단백질 등을 함유하고 있어 미생물의 발효기질로서 적합하다. 다른 섬유성 농산 폐자원은 달리 세포막에 다량의 pectin 질을 함유하고 있어 이를 분해할 수 있는 균주를 이용한다면 다른 어느 폐자원보다 발효기질로서의 이용도가 높다고 하겠다.

감귤과피의 재이용에 관한 연구는 Walker(1) 등 여러 연구자들(2, 3)에 의해 건조사료로서 이용 가능

성에 대한 연구가 광범위하게 진행되어 왔으나 감귤과피는 수분이 85% 정도로 높고 점조성이 강하기 때문에 건조사료로서는 경제적인 면에서 부적합하다고 인정되어 여러 방법이 모색되고 있다. 그 예로 Handrickson(4), Joslyn(5) 등은 감귤 가공 부산물로서 peel oil, pectin, flavonoids, seed oil 의 제조를 보고하였고 Sakamoto(6) 등은 감귤 착즙액이나 과피 가수분해물을 feed yeast, vinegar, butylene glycol, citric acid, lactic acid 등의 발효생산을 위한 탄소원으로 이용할 수 있음을 보여 주었다. 그외 吉川(7) 등은 과즙압착박을 이용하여 식용 버섯류의 자실체를 생산하였으며 Kumagai(8) 등은 *Asp. niger* 에 의한 구연산 생산을 보고하였다. 구연산 발효생산에 있어서는 무엇보다도 값싼 발효기질의 개

Key words: Mandarin orange peel, citric acid, *Asp. niger*

\*Corresponding author

**Table 1. Culture medium for the citric acid production.**

Submerged culture	Semisolid culture	Synthetic medium (g/l)	
Dried orange peel 6g/	Dried orange peel 6g/	Sucrose	150
100 ml Tap water	6 ml Tap water	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	20
		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10
		MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.5

**Table 2. Operating conditions for the organic acid analysis by HPLC.**

Column	Aminex HPX-87H (Bio-Rad)
Mobile phase	0.008 N-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Flow rate	0.7 ml/min
Sensitivity	0.2AUFS
Chart speed	0.5 cm/min
Injection volume	10 $\mu$ l

발이 중요하다 할 수 있는데 이미 cane molasses를 비롯하여 beet molasses, starch, bagasse, pineapple 당밀 등을 이용한 많은 연구가 진행되어 왔다. 그러므로 본 연구에서는 대부분 폐기 처리되고 있는 감귤과피를 발효기질로 하여 구연산을 생산할 목적으로 저자 등이 분리한 *Asp. niger*를 이용하여 감귤과피 배지상에서의 최적 발효조건과 구연산 생산에 미치는 제인자들의 영향을 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주 및 기본배지

본 실험에 사용된 균주는 감귤과피로부터 분리 동정된 감귤과피의 자화능이 우수하고 구연산 생성능이 높은 *Aspergillus niger* GFM-0014를 사용하였다. 실험재료로는 감귤과즙공장에서 나오는 온주 감귤과피를 열풍건식 건조장치에서 70-90°C로 건조 분쇄하여 사용하였다. 또한 기본배지는 Table 1과 같다.

#### 배양방법

*Asp. niger* GFM-0014를 potato dextrose agar slant에서 30°C로 10일간 전배양하여 포자 현탁액 (1×10<sup>8</sup> spore/ml)을 제조한 후 이 액을 접종하였고 액체 배양의 경우 500 ml Erlenmeyer flask에 물

**Table 3. Operating conditions for the sugar analysis by HPLC.**

Column	$\mu$ -Bondapak carbohydrate (Waters)
Mobile phase	80% CH <sub>3</sub> CN
Flow rate	2 ml/min
Sensitivity	Atten. 16X
Chart speed	0.5 cm/min
Injection volume	10 $\mu$ l

100 ml, 감귤과피 6g을 넣어 120 rpm, 30°C에서 7일간 배양하였으며 고체 배양의 경우 직경 9cm의 petridish에 감귤과피 6g, 물 6ml를 첨가하여 30°C incubator에서 3일간 배양하였다.

#### 분석방법

감귤과피 및 배양액의 일반성분 분석은 상법에 준하였고, Hesperidin, Naringin은 Davis 법(9), Pectin은 Calcium pectate 법(10), 총당은 Phenol sulfuric acid 법(11), 환원당은 DNS 법(12), 미량 금속이온은 Atomic absorption spectrophotometer (Perkin Elmer 2280, USA)을 이용 분석하였으며 유기산 조성은 HPLC(Waters M740, Millipore, USA)로 Table 2와 같은 조건으로, 당의 조성은 HPLC(Waters M590, Millipore, USA)로 Table 3과 같은 조건으로 분석하였고 Citric acid는 Saffran(13)의 방법으로 분석하였다.

### 결과 및 고찰

일반적으로 구연산 생성균주의 발효조건에 대해서는 액체배양, 표면배양 등을 중심으로 많은 연구(14)가 진행되어 왔지만 연구자와 사용균주에 따라 다양한 차이가 있었고 특히 발효기질이 다르면 최적 발효조건에 있어 큰 차이가 있다. 따라서 구연산 생산에 영향을 미치는 온도, pH, 수분함량, 무기염, 질소원, 금속이온, 첨가물 등 여러가지의 영향 인자들을 조사하였다.

#### 원료의 성분

감귤의 구성은 크게 양낭(segment)과 내피(segment membrane) 및 외피(peel)로 구성되어 있으며 구성성분은 품종, 산지 및 수확시기에 따라 차이가 있다. 본 실험에 사용된 온주 감귤과피의 일반성분 결과는 Table 4와 같다.

**Table 4. Chemical composition of Mandarin orange-peel.**

Components	Contents [% (w/w)]	Components	Contents [% (w/w)]
Moisture	12.4	Crude fat	1.3
Carbohydrate	78.5	Citric acid	1.14
Total sugar	34.4	Potassium	0.64
Reducing sugar	14.1	Calcium	0.20
Pectin	25.3	Magnesium	0.03
Hesperidin	5.2	Iron	0.012
Naringin	2.9	Copper	Trace
Crude fiber	4.3	Zinc	Trace
Crude protein	4.8	Manganese	Trace
Crude ash	1.5		

**Table 5. Effect of the particle size of orange peel on the production of citric acid.**

Size (mesh)	Citric acid (%) <sup>a</sup>	
	Submerged culture <sup>b</sup>	Semisolid culture <sup>c</sup>
4	38.0	50.7
8	40.5	54.3
12	43.4	59.6
16	45.6	63.9
20	50.7	65.6
24	50.9	64.2
28	51.3	60.4

a: Citric acid content / Total sugar content = %  
 b: The cultivation was carried out for 7 days at 30°C in orange peel medium (6%)  
 c: The cultivation was carried out for 3 days at 30°C in orange peel medium (100%, w/v)

Table 4에서 보는 바와 같이 탄수화물이 78.5%로 대부분이며 그 중 총당이 34.4%, pectin이 25.3%로 다량 함유되어 있다. 발효기질로서 이용하려면 pectin의 분해가 선행되어야 할 것으로 생각된다.

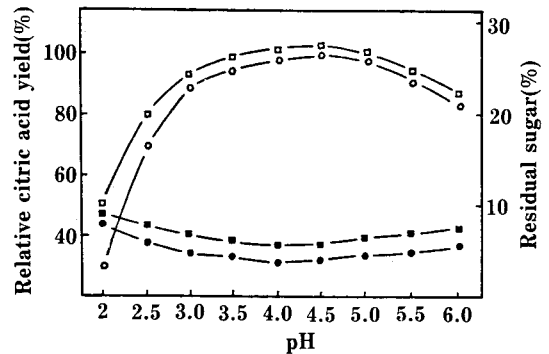
**감귤과피의 입자크기**

감귤과피의 입자에 따라 액체 배양과 고체 배양을 한 결과 Table 5와 같이 액체 배양에서는 미분말일수록 구연산 생산 뿐만 아니라 균 증식이 좋았으며 고체 배양일 경우 20 mesh의 입자크기에서 구연산 생산능이 가장 우수하였고 그 이상의 미분쇄 분말은 오히려 생산능을 감소시켰다.

西尾(15) 등은 감귤과피의 당화 과정에서 과피분

**Table 6. Effect of initial moisture content of orange peel on citric acid production.**

Water added (ml/6g orange peel)	Initial moisture content (%)	Citric acid (%)	Residual sugar (%)
2	34.3	40.3	7.7
4	47.4	52.1	7.9
6	56.2	65.6	6.2
8	62.4	65.4	6.2
10	70.2	63.2	6.4
12	70.8	60.7	6.8
14	73.7	55.8	7.1
16	76.1	42.5	7.4



**Fig. 1. Effect of pH of orange peel medium on the citric acid production in submerged culture.**

○-○: Submerged culture  
 □-□: Semisolid culture  
 ●-●: Residual sugar in submerged culture  
 ■-■: Residual sugar in semisolid culture

말은 20 mesh 정도일 때가 좋다고 한 바와 같이 고체 원료를 발효에 이용할 경우 20 mesh 내외가 이상적이며 이 때 과피분말 자체가 oxygen carrier로서 작용하여 구연산 생산에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

**고체배지의 수분함량**

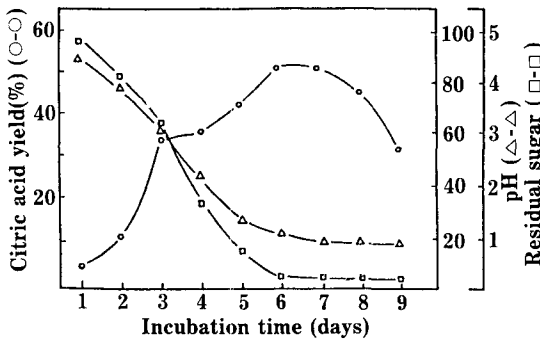
감귤과피 6g에 농도별로 수분을 첨가한 결과 배지의 적정 수분함량은 60% 내외였고, 이 때 당의 이용도 양호하였다 (Table 6).

배지의 수분함량은 배양물의 통기상태에 직접 관련하는 중요한 인자로 수분함량이 높으면 배지 자체의 점조성이 높아지므로 발효열이나 통기상태 유지 등의 문제로 별도의 carrier를 첨가하는 수도 있으나, 본 실험 결과에 의하면 과피 자체만으로도 배양

**Table 7. Effect of incubation temperature on citric acid production.**

Patterns of incubation temperature	Submerged culture		Semisolid culture	
	3 days	6 days	3 days	6 days
A	31.5	46.6	60.4	34.9
B	34.4	50.9	65.6	32.8
C	32.7	47.4	61.9	31.7
D	30.5	41.8	58.7	28.5
E	31.7	43.6	59.4	29.7
F	34.8	52.9	68.7	36.9
G	35.7	54.2	69.5	38.1

A: 28°C B: 30°C C: 32°C D: 35°C  
 E: 30°C for 20 hrs → incubation at 35°C  
 F: 35°C for 20 hrs → incubation at 30°C  
 G: 35°C for 20 hrs → 10°C for 3 hrs → incubation at 30°C



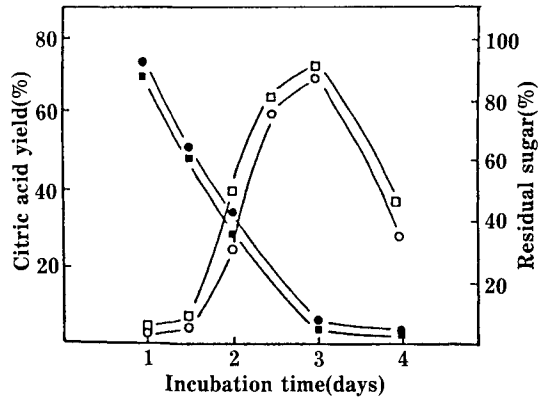
**Fig. 2. Time course of citric acid production in submerged culture.**

이 가능한 것으로 추측된다.

**pH의 영향**

배양액의 초기 pH를 2.0-6.0의 범위로 조정하여 검토한 결과 Fig.1 과 같이 최적 초기범위는 pH 4.5-5.0 이었다.

본 실험에서 감귤과피를 6% 첨가한 액체 배양에서는 pH가 5.1 이므로 pH 조절없이도 구연산 생산이 가능한 것으로 나타났다. 한편 pH가 5 이상에서는 구연산외에 oxalic acid가 축적된다는 Bernhauer (16) 등의 보고가 있으며 Diver(17) 등은 배지의 pH가 1.8 이하로 떨어져도 산생성이나 균 생육에 아무런 나쁜 영향이 없다고 한 것으로 보아 낮은 pH는 오염방지 뿐만 아니라 oxalic acid, gluconic acid 등 다른 산의 생산을 억제시키는 장점이 있다고 했다(17).



**Fig. 3. Time course of citric acid production in semisolid culture.**

○-○: Citric acid yield at 30°C  
 ●-●: Residual sugar at 30°C  
 □-□: Citric acid yield at 35°C for 20 hrs, 10°C for 4 hrs, 30°C for 72 hrs  
 ■-■: Residual sugar at temperature cycling

**배양온도의 영향**

*Asp. niger* 에 의한 구연산 발효에서는 배양온도와 산 생성과의 관계에서 일반적으로 28-33°C가 좋은 것으로 알려져 있다(18). 본 실험에서는 28-35°C의 온도범위를 검토한 결과 30°C가 최적온도를 나타냈다(Table 7).

한편 Usami(19) 등은 구연산 발효시에 균체 증식기인 전반기와 구연산 생성기인 후반기를 구별하여 온도차를 두어 배양하여 발효 전 기간을 일정한 온도로 배양하는 것보다 구연산 생산이 증가된다고 보고하였다. 따라서 이런 요소를 고려하여 배양 전기인 20 시간까지는 35°C, 배양 후반기에는 30°C로 유지하고 또한 그 기간 중 4 시간 동안 10°C 저온처리를 하는 온도변화를 주어 배양한 결과 일정온도 배양한 것보다 구연산 수율이 높았다. 이것은 균 증식적온에서 급속히 생육시킨 후 생장곡선이 평형에 도달했을 때 온도변화를 주어 증식을 억제시킴으로써 대사전환을 촉진시켜 산을 축적토록 하는 것으로 사료된다.

**배양시간의 영향**

액체 배양에서 배양시간에 대한 구연산 축적은 6 일째가 가장 좋았으며(Fig.2), 고체 배양에서는 30 시간 이후부터 구연산 축적이 급속히 증가하여 배양 3 일째 당에 대한 수율이 65.6%로 최대치에 달했고 3 일 이후부터는 생성량이 급속히 감소하였다(Fig.3).

감귤과피 기질은 많은 양의 환원당이 존재하기 때

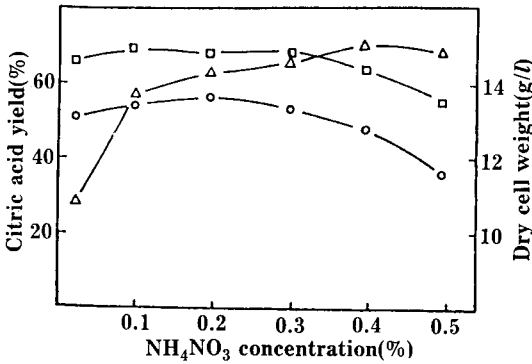


Fig. 4. Effect of NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> concentration on citric acid production.

○-○: Citric acid yield on submerged culture  
 □-□: Citric acid yield on semisolid culture  
 △-△: Dry cell weight on submerged culture

문에 비교적 빨리 구연산 축적이 일어나는 것으로 생각되며 배양 3일 이후로 구연산 생산이 현저히 감소하는 것은 포자 형성으로 인한 *Asp. niger*의 급속한 산 소비에 기인한 것으로 생각된다(20).

영양원 첨가에 따른 영향

**Ammonium nitrate의 첨가효과** : 구연산 발효에서 질소원의 종류와 농도에 따른 연구는 이미 많은 연구자들에 의해 발표되어 왔다. 그러므로 본 실험에서도 각종 유, 무기질소원을 검정한 결과 Ammonium nitrate가 가장 적합하였으며 그 농도별 결과는 Fig.4와 같이 0.2%에서 가장 좋았다.

**K, P의 첨가효과** : 다른 미생물과 마찬가지로 *Asp. niger* 역시 phosphorous compound에 크게 영향을 받는다(21). 비록 phosphate가 곰팡이의 생육에는 꼭 필요할지 모르지만 구연산의 생산에 미치는 영향에 대해서는 다소 논란의 여지가 있다. 본 실험에서는 여러 연구자들의(22) 보고를 토대로하여 K, P원을 조사해 본 결과(Table 8) 액체 배양에서 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.15%, 반고체 배양에서는 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1% 각각 55.6, 68.7%로 구연산 생산이 최대로 나타났으며 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>는 0.1% 이상 첨가시에는 오히려 구연산 생성능이 감소하는 것으로 나타났는데 이런 결과는 감귤과피 속에 과량의 Zn<sup>++</sup>, Fe<sup>++</sup>가 함유되어 있어 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>가 소량 첨가되어도 구연산 생성량이 증가된다는 Tomilson(23)의 결과와 일치하였다. 그러나 KCl, KNO<sub>3</sub> 및 K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 등은 균의 증식은 촉진시키나 구연산 생산은 저해시키는 결과를 보여주었다.

미량 금속이온의 첨가효과

미량 금속은 *Asp. niger*의 생육 뿐만 아니라 특히

Table 8. Effect of potassium and phosphorus sources on citric acid production.

K, P sources	Concentration (%)	Submerged culture		Semisolid culture
		citric acid (%)	dry cell weight (mg/50ml)	citric acid (%)
Control	-	50.7	1,198	65.6
	0.05	53.3	1,304	67.4
	0.10	54.9	1,341	68.7
	0.15	55.6	1,424	68.1
	0.20	54.2	1,225	66.3
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.05	52.3	1,308	64.8
	0.10	50.4	1,304	60.2
	0.15	48.1	1,390	57.5
	0.20	42.5	1,268	49.8
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.05	50.9	1,311	66.2
	0.10	50.4	1,304	65.1
	0.15	49.1	1,387	62.2
	0.20	41.8	1,380	50.3
KCl	0.05	47.3	1,396	64.3
	0.10	45.8	1,390	63.8
	0.15	40.7	1,386	60.6
	0.20	37.2	1,374	52.4
KNO <sub>3</sub>	0.05	46.7	1,390	63.2
	0.10	42.5	1,388	60.1
	0.15	40.1	1,371	54.2
	0.20	36.8	1,369	50.5
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.05	46.7	1,390	63.2
	0.10	42.5	1,388	60.1
	0.15	40.1	1,371	54.2
	0.20	36.8	1,369	50.5

유기산 생성에 있어서는 커다란 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. Cocker(24) 등을 비롯한 많은 연구자들은 발효기질에 따라 차이는 있지만 구연산 생산 뿐만 아니라 균 증식에 중요한 역할을 하며 또한 너무 과량 존재하거나, 결핍되면 균의 형태적 변화를 야기시킨다고 하였다. 감귤과피 기질에서 구연산 생성 촉진 미량 금속이온으로 알려진 Fe<sup>++</sup>, Mn<sup>++</sup>, Zn<sup>++</sup>, Cu<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup> 등을 첨가하여 배양한 결과는 Table 9와 같다.

*Asp. niger*의 경우 미량 금속이온의 종류에 따라 다소 상이하나 어느 적정 농도까지는 균 생육과 구연산 생산에 필요하다. Shu(14) 등은 Fe<sup>++</sup>, Zn<sup>++</sup> 등은 구연산 생산에 좋은 영향을 미친다고 하는 반면, 균체 생육은 촉진시키나 구연산 생산과는 관련

Table 9. Effect of metal ions on citric acid production.

Metal ions	Conc. (ppm)	Submerged culture				Semisolid culture	
		Orange peel		Synthetic medium			
		Citric acid(%)	Dry cell weight (mg/50 ml)	Citric acid(%)	Dry cell weight (mg/50 ml)		Citric acid(%)
Control	-	50.7	1,196	81.4	1,570	65.6	
	2	50.2	1,246	81.8	1,589	64.8	
	4	49.7	1,328	82.7	1,604	64.2	
	Fe <sup>2+</sup>	6	46.9	1,241	83.6	1,614	63.2
		8	45.4	1,221	84.9	1,625	62.5
		10	41.0	1,191	82.2	1,618	68.7
Mn <sup>2+</sup>	0.2	50.4	1,249	81.6	1,594	65.2	
	0.4	48.7	1,287	82.4	1,608	62.3	
	0.6	44.1	1,219	83.1	1,621	60.7	
	0.8	45.3	1,193	80.3	1,217	54.7	
	1.0	41.7	1,186	78.7	1,543	49.8	
Cu <sup>2+</sup>	2	48.2	1,192	81.8	1,592	64.2	
	4	47.5	1,167	80.7	1,583	60.7	
	6	42.3	1,160	76.4	1,576	57.5	
	8	40.1	1,124	72.5	1,554	54.2	
	10	38.7	1,110	70.7	1,532	50.3	
Zn <sup>2+</sup>	2	50.4	1,202	82.5	1,582	65.7	
	4	48.7	1,204	83.4	1,594	62.4	
	6	45.2	1,193	81.5	1,602	58.7	
	8	44.7	1,174	78.8	1,574	54.2	
	10	40.8	1,154	72.3	1,560	51.5	
Mg <sup>2+</sup> (g/l)	0.1	53.2	1,242	81.5	1,594	67.4	
	0.2	52.7	1,254	83.7	1,644	65.1	
	0.3	48.4	1,248	84.5	1,678	64.5	
	0.4	42.5	1,211	81.1	1,674	58.2	
	0.5	40.7	1,198	76.2	1,622	57.8	

이 없다고 했다(23).

이상의 실험결과 및 여러 연구자들의 보고를 비교해 보면 합성배지에서는 Mn<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>, Fe<sup>++</sup> 등의 적당량 첨가가 구연산 생산 및 균체 생육을 촉진시킨 반면 감귤과피 배지에서 억제되는 것은 과피 자체에 함유되어 있는 여러 종류의 금속이온 때문인 것으로 추측할 수 있고, 또한 수종의 금속이온이 공존해 있을 때 구연산 생산이 억제된다는 보고(20)와 일치한다.

#### 각종 발효 촉진제의 첨가효과

Sucrose 대신에 천연원료로부터 구연산을 생산할 경우 배지 내에 무기염 조성의 조절이 곤란하여 중금속을 제거하는 방법을 사용하거나 저분자 알콜류 등의 구연산 생산 촉진제를 첨가하여 구연산 생산을 유도한 연구가 보고되고 있는 바(25), 본 실험에서는 합성배지와 비교하여, methanol, ethanol, n-propanol, sodium monofluoroacetate 의 영향을 조사하였다.

**Table 10. Effect of alcohols on citric acid production.**

Additions	Concentration(%)	Submerged culture				Semisolid culture	
		Orange peel		Synthetic medium			
		Citric acid(%)	Dry cell weight (mg/50 ml)	Citric acid(%)	Dry cell weight (mg/50 ml)		
Control	-	50.7	1,196	81.4	1,570	65.6	
	1	59.2	964	83.4	1,240	74.9	
	Methanol (v/v)	2	64.8	826	85.2	1,010	78.9
		3	73.6	787	85.6	940	68.9
		4	65.7	701	81.2	860	64.1
Ethanol (v/v)	5	49.4	615	75.6	725	64.3	
	0.5	59.8	1,024	82.8	1,290	66.7	
	1	69.4	984	83.7	1,148	72.3	
	1.5	69.7	854	84.2	1,074	74.4	
	2	69.2	802	83.9	979	75.3	
n-Propanol (v/v)	2.5	63.4	786	80.7	833	67.5	
	0.5	51.4	1,104	81.8	1,480	65.9	
	1	50.9	952	80.2	1,310	66.7	
	1.5	48.7	902	78.6	1,178	64.3	
	2	43.4	810	74.2	980	60.5	
Sodium monofluoroacetate(w/v)	2.5	40.7	743	72.8	884	59.1	
	0.1	54.2	1,074	83.5	1,457	67.4	
	0.2	50.1	1,013	81.6	1,401	66.7	
	0.3	48.3	948	80.7	1,323	62.3	
	0.4	42.7	875	78.5	1,247	61.7	
	0.5	40.6	810	78.1	1,167	61.5	

**Table 11. Effect of inoculum and methanol concentration on citric acid production and sporulation in semisolid culture.**

Methanol added (% v/v)	1% Inoculum		2% Inoculum		3% Inoculum	
	Citric acid(%)	Sporulation*	Citric acid(%)	Sporulation*	Citric acid(%)	Sporulation*
0	65.5	+++	66.2	+++	65.4	+++
1.5	75.7	Ns	73.2	++	70.2	++
2.0	78.9	Ns	74.7	++	72.2	++
2.5	72.4	Ns	79.2	Ns	78.7	Ns
3.0	68.9	Ns	79.1	Ns	79.3	Ns

\*Ns: no sporulation    ++: partial sporulation  
 +++: complete sporulation

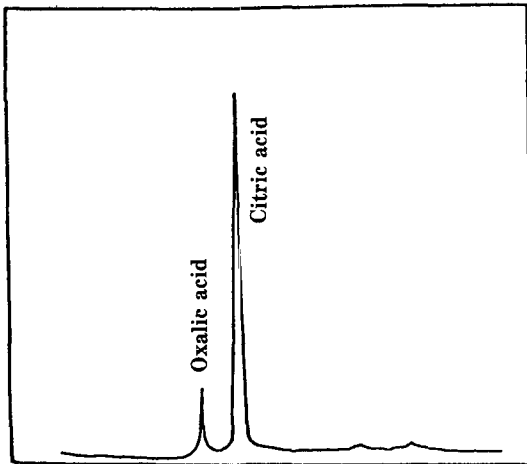


Fig. 5. Analysis of citrate product by HPLC.

Methanol은 합성배지와 감귤과피 배지의 액체 배양에서는 3%, 고체 배양에서는 2% 첨가시 78.9%로 구연산 생산을 보였으며, n-propanol과 sodium monofluoroacetate는 균 증식 뿐만 아니라 구연산 생산을 억제시켰다. Waksman(26) 등은 저분자 alcohol류가 *Asp. niger* 생육에 저해작용을 일으킨다고 하였으며 실제로 methanol의 경우는 sporulation과 생육을 억제시키고, 구연산 생산을 촉진시키는 것으로 알려져 있다.

#### 포자 현탁액의 접종량과 methanol 첨가의 영향

구연산 최대 생산과 관련하여 균체 접종량 및 methanol의 농도를 달리하여 구연산 생산 및 포자 형성 정도를 조사하여 Table 11과 같은 결과를 얻었다.

위의 결과에서 methanol 2.5%, 접종액 2%를 첨가하였을 때 구연산이 대당 79.2%로 가장 높았고 특히 methanol의 첨가는 포자 형성시기를 지연시킨 것으로 나타났다.

Moyer(25) 등은 조탄수화물을 기질로 할 경우 methanol은 균 증식 및 구연산 생산에 나쁜 영향을 미치는 중금속물질의 작용을 저해시켜 배지에 영양적으로 더 좋은 균형을 이루면서 생산을 증가시킬 수 있다고 하였다.

#### HPLC에 의한 배양물 중 유기산의 분석

배양물에 구연산 이외, 유기산의 부생물을 HPLC로서 검토한 결과 Fig.5에서와 같이 소량의 oxalic acid 외에 대부분이 구연산으로 판명되었다. 成(27) 등은 *Asp. niger*에 의한 구연산 발효시 소량의

oxalic acid가 부생되었을 뿐 거의 선택적으로 구연산을 생산한다고 하였는데, 이것은 균주에 따라 구연산 이외의 다른 산을 부생시킬 수도 있으며 부생된 산이 구연산으로의 전환이 가능할 것으로 사료되며 이에 대한 생화학적 연구가 계속되어야 할 것이다.

## 요 약

농산 폐자원 중에서도 감귤 가공공정에 따라 부생되는 감귤과피를 발효 기질로서의 이용을 목적으로 분리균 *Asp. niger*를 사용하여 구연산 발효에 미치는 배양조건 및 영향인자를 조사하였다. 그 결과 고체 배양에서의 최적조건 즉 감귤과피와 물을 동량 혼합하고 여기에  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0.2%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1%, Methanol 2.5%를 첨가하여 pH 4.5로 조절한 다음 포자 현탁액( $1 \times 10^8$  spore/ml) 2%를 접종하여 균체 증식 초기에 35°C, 20시간 배양하고 4시간 저온 처리한 다음 구연산 생성기에서 30°C로 48시간 배양했을 때 당에 대해 80.4%의 높은 수율의 구연산을 얻었다.

## 참고문헌

1. Walker, S.S.: *Fla. Agr. Exp. Sta. Bull.*, **135**, 131 (1917).
2. Davis, R.N. and A.R. Kemmerer: *J. Dairy Sci.*, **31**, 973 (1948).
3. Kirk, W.G., E.M. Kelly and H.J. Fulford: *Fla. Agr. Sta. Bull.*, **575**, 3 (1956).
4. Handrickson, R. and J.W. Kesterson: *Hgr. Exp. Sta. Bull.*, 698 (1966).
5. Joslyn, M.A.: *Fruit and vegetable juice*, Avi., Westport Connecticut, Chap. 13 (1961).
6. Sakamoto, R., I. Shooro and M. Arai: *J. Ferment. Technol.*, **60**, 327 (1982).
7. 吉川 光日: *醸酵工學會誌*, **57**, 467 (1979)
8. Kumagai, K., S. Usami and S. Hattori: *J. Ferment. Technol.*, **59**, 461 (1981).
9. Davis, W.B.: *Ind. Eng. Chem. Anal.*, **19**, 476 (1947).
10. 小原, 鈴木: *食品分析 Handbook*, 建帛社(1980)
11. Montgomery, R.: *Biochem. Biophys. Acta.*, **48**, 591 (1961).
12. Miller, G.L.: *Anal. Biochem.*, **2**, 127 (1960).
13. Hess, B., R. Haechkel and K. Brand: *Biochem. Biophys.*, **24**, 824 (1966).
14. Shu, P.A. and M. H. Johnson: *Ind. Eng. Chem.*, **40**,



- 1202 (1948).
15. 西尾尚道, 奥幸夫, 河村大造: 醸酵工學會誌, **57**, 354 (1979)
  16. Bernhauer, K.: *Biochem. Zeit.*, **197**, 309 (1928).
  17. Divers, M.: Ph.D. Thesis, University of Strathclyde, England (1979).
  18. Martin, S.M. and W.R. Waters: *Ind. Eng. Chem.*, **44**, 2229 (1952).
  19. 宇佐美昭次, 福富直樹: 醸酵工學會誌, **55**, 44 (1977)
  20. Shu, P.A. and M.J. Johnson: *J. Bacteriol.*, **56**, 577 (1948).
  21. Yangita, T. and F. Korgane: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **8**, 201 (1962).
  22. Steel, R., C.P. Lentz and S.M. Martin: *Can. J. Microbiol.*, **1**, 299 (1955).
  23. Tomilson, N., J.J.R. Campbell and P.G. Russel: *J. Bacteriol.*, **61**, 17 (1951).
  24. Cocker, R. and R.N. Green Shield: In genetics and physiology of Asp., Academic Press, N.Y., 361 (1977).
  25. Moyer, A.J.: *J. Appl. Microbiol.*, **1**, 1 (1953).
  26. Waksman, S.A. and E.O. Karow: *U.S. Patent*, 2394 (1946).
  27. 成洛發, 金明燦, 沈寄煥, 鄭德和: 韓國產業微生物學會誌, **8**, 199 (1980)

(Received July 14, 1989)