

濟州道産 溫州柑橘 廢棄物에서 半固體培養法에 의한 枸橼酸醱酵*

康順善, 高泰巖*

Citric Acid Fermentation from Che-ju Mandarin Orange Waste by Semi-Solid Culture of *Aspergillus niger*

Kang Soon-seon, Ko Tae-am*

Summary

For the purpose of Citric acid production study with Mandarin orange waste, one strain which is identified as *Aspergillus niger*, was isolated and selected from soils, fruits in Che ju region.

The medium used to investigate the optimum conditions for the semi-solid fermentation, consisted of the dried orange peel and the concentrated liquor (Molasses) obtained by pressing the Mandaring orange waste.

1. When fermented with 14ml of the molasses mixed with 6g the dried peel at 30°C for 4days (64.3% moisture), 14% (W/V) of total sugar in the molasses was most optimal.
2. The favorable pH for the Citric acid fermentation was found to be 4.0-5.0, indicating that no adjustment of media pH was necessary as pH of the molasses was 4.2.
3. The highest Citric acid production was observed when the fermentation was conducted at 35°C for first 48hrs (growing stage of microbes), followed by the low temperature treatment 10°C for 2hrs. and continued at 30°C for 48hrs (Citric acid producing stage).
4. 2%(V/V) Methanol and 1% (V/V) Ethanol of the media increased the Citric acid production up to 109.2% and 105.0%, respectively. Addition of Inorganic sources such as NH_4NO_3 , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, gave no increase.

序 論

제주도 농업생산소득의 주종을 이루는 감귤의 재배는 1965년 이후 매년 증가하여 왔다. 그 결과, 감

귤생산량은 1965년 1,083톤에서 1985년에는 370,000톤에 이르고 있다. (제주도, 1984. 제주도감귤통계, 1984)

감귤은 대부분 생과(生果)로 소비되어 왔으나, 생산량의 급증으로 인하여 일부는 가공용으로 전용되

* 本 研究는 1985年度 韓國科學財團의 支援에 依해 이루어졌음.
農科大學 教授, 農科大學 助敎*

어 1985년에 그 가공량은 60,000%이 소비되었으며, 생산량과 비례하여 더욱 증가할 것으로 예상된다. 이러한 가공 과정에서 폐기되는 미이용 부분인 폐과피 및 착즙박의 양은 전체 처리량의 45~50%를 차지하는 막대한 양으로, 극히 일부가 사료로서 이용되고 있을 뿐이다. 감귤폐기물은 다량의 Pectin을 함유한 고점성(高粘性)으로 활성오니법(活性汚泥法)에 의한 처리가 곤란한 반고체폐기물(半固體廢棄物)로서 자원의 유효이용과 환경오염의 방지면에서 그 중요성을 가지고 있다.

감귤폐기물에는 20~30%의 전당(全糖)이 함유하고 있음으로, 이를 탄소원으로 한 사료용 SCP생산(Okada, 1982, Takahashi, 1980)과 반고체배양법에 의한 *Candida Utilis*를 배양하여 Protein함량을 18.5% 증가시킨 보고가 있다(Lafuente, 1977).

1893년 Wehmer등이 *Penicillium*균속의 표면배양에서 구연산 생성을 발견한 후, Thom 및 Currie는 *Asp. niger* 균속에 속한 구연산 생성균을 분리하여 1917년 Currie의 기초연구로, 1923년 Chas. Pfizer & Co., Inc.에서 구연산생성 표면발효법을 최초로 공업화시켰다. 1951년에 Miles Lab.이 공업화된 액침배양법을 사용한 이래 주로 액침배양법에 의한 구연산생산을 하고 있으며, 근년에 와서 효모를 이용한 n-paraffin에서 액침배양법으로 구연산 생산의 실용성 개발에 대한 많은 연구가 진행되고 있다(Tabuchi, 1972, Akiama, 1972). 발효방법도 표면배양, 액침배양 및 반고체배양법등이 개발되었으나, 사용주원료 및 사용균주, 원료사정, 시장사정, 발효생산에 따른 환경, 시설 및 배양방법에 따라 이해득실이 있어 다양한 조합으로 구연산을 생산하고 있다. Cahn(1935)은 Beet sugar 및 Cane sugar pulp에 Pineapple-Juice를 흡수시켜 반고체배양법으로 구연산생산을 처음 시도하였으며, Lakshminarayana(1975)은 Sucrose 및 molasses 원료에 발효촉진제로 methanol를 첨가하여 반고체배양법으로 높은 구연산 생산수율을 얻었고, Usami(1977)는 당농도가 높은 Pineapple bagasse를 원료로 하여 반고체배양법으로 산생성을 보고하고 있다.

본실험은 제주도에서 생산되는 감귤을 이용한 감귤가공 공정에서 폐기되는 과피와 착즙박을 발효탄소원으로 하여 구연산 생산을 목적으로, 자연계에서

분리한 구연산 생성물이 우수한 *Aspergillus niger*를 이용하여 반고체배양법으로 구연산 생산의 배양기초 조건을 검토하였으므로 그 결과를 보고하는 바이다.

材料 및 方法

1. 균주의 분리

구연산생성균주를 분리하기 위하여 제주도내에서 수집한 각종토양, 부패과일 및 전분박의 균분리용 시료 50점을 멸균수로 각각 희석하여, 유기산생성을 검지하기 위하여 B.C.G를 첨가한 환천분리용 배지(Table 1(A))로 30°C, 5일간 배양후 산생성 생육 Colony를 같은 배지에서 평판배양법으로 수회 배양하여 현미경관찰로 순수한 11균주를 분리하였다. 구연산 발효시험은 250ml Erlenmyer flask에 60ml의 균분리용배지(Table 1(B))를 취한후, 사면배양하여 보관중인 1차 분리균주를 2~3회 계대배양한 포자현탁액 2%(V/V)를 접종시킨후, 30°C, 5일 진탕 배양하여 배양액을 원심분리후(3,000rpm, 20min), 구연산 생성을 측정하여 산생성능이 우수한 균주를 분리, 본 실험의 공시균주로 하였다.

2. 원료

가공용 감귤은 온수침지후 박피공정에서 폐기되는 과피(Outer peel, Inner peel) 30~35%와 쥬스 착즙공정에서 부생되는 착즙박(Juice pulp) 10~15%가 부산물로 폐기된다.

본 실험의 원료는 제주도 소재 감귤가공공장에서 2회 채취(1985. 11. 28, 1986. 1. 20)하여 4°C냉장고에 보관하여 사용하였다. 시료조제는 착즙박을 착즙기로 재압착시킨 착즙액을 가열농축한 후 감귤당밀(Citrous molasses)로 하였으며, 재압착후 남은 잔사와 과피를 혼합하여 건조후 분쇄한 것을 진피(Mandarin orange peel)로 하였다. (Fig.1 참조)

3. 배양 방법

단체(Carrier)로 사용될 진피를 Long size(10mesh 이하)와 Short size(10mesh이상)로 절단 구분하여

Table 1. Composition of culture medium for isolation

Constituents	Amounts	
	1st. screening med.(A)	2nd. screening med.(B)
Glucose	30 g	100 g
NaNO ₃	2.0 g	2.0 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g	1.0 g
MgSO ₄	0.5 g	0.5 g
KCl	0.5 g	0.5 g
FeSO ₄	0.005 g	0.005 g
B.C.G	0.001 g	-
Agarpower (Difco)	20 g	-
Dist. water	1 000 ml	1,000 ml
Initial PH	5.0	5.0

Sterilized at 15Lb, 120°C for 20min.

-: Not addition.

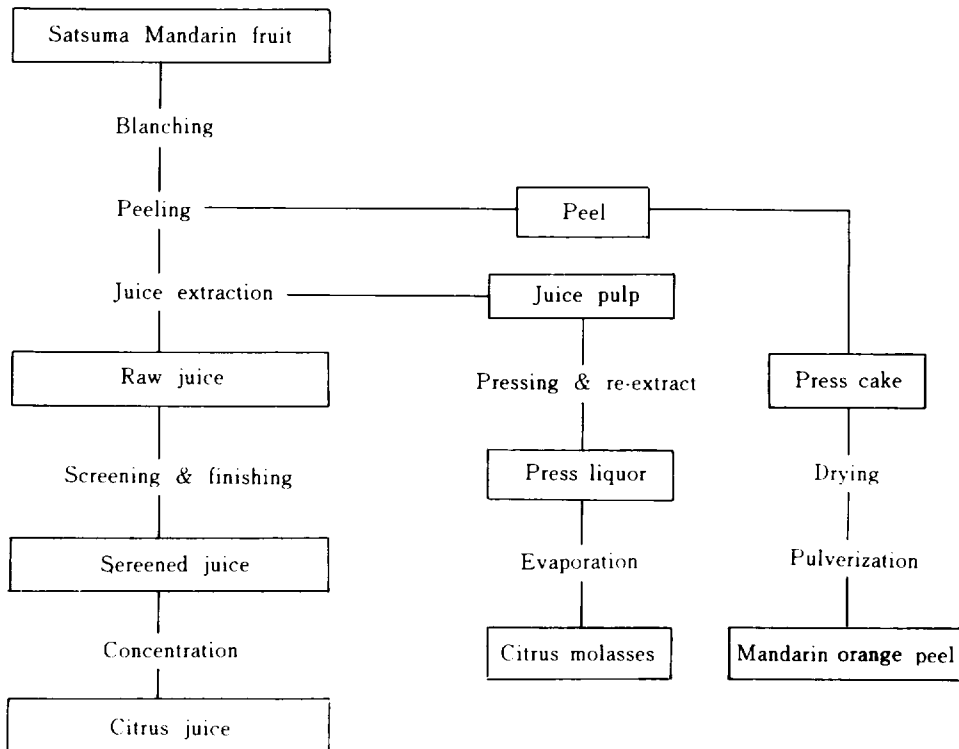


Fig. 1. Flow sheet of citrus processing & preparation of Mandarin orange byproduct

등량혼합한 것을 6g 취하고, 소정당농도가 되도록 희석한 감귤당밀 일정량을 넣어 혼합한 후, 직경 9cm petri dish(실용적 100ml)에 취하여 상법에 준하여 증기살균후, Koji즙 한천사면배지상에서 10일간 배양한 *Asp. niger* 포자분산액 1ml를 접종(접종포자수 10^6 내외)하여 배양하였으며, 표준배양조건은 당농도 14%(W/V)의 감귤당밀 14ml를 첨가한 배지를 30°C에서 4일간 배양하였다.

4. 분석 방법

배양종료후 배양물에 60°C의 온수를 10배량 가하여 10분간 교반시켜 구연산을 추출후, 흡인여과하여 여과액을 분석시료로 하였다.

1) 구연산정량은 Pentabromoacetone법으로 비색정량하여 배양전 배지에 함유된 구연산량을 제해서 생성 구연산량으로 하였다.

2) Oxalic acid는 P.P.C법(鈴木等)으로 전개후 발색시켜 생성 유무를 확인.

3) 환원당의 정량은 80% Ethanol로 추출후 Somogi-Nelson법으로 비색정량.

4) 전당(全糖)은 1% HCl 용액으로 100°C, 2.5시간 가수분해 시킨후 중화시켜 Somogi-Nelson법으로 측정.

5) 진피 및 감귤당밀의 각성분

Dry solids 및 회분은 당밀의 일반분석법에 준하여 측정하였고, 당 및 구연산량은 상기 분석방법과 같은 방법으로 정량하였으며, 전질소(全窒素)는 Micor-Kjeldahl법, 인산은 Ammonium molybdate법, Fe, Ca, K, Mg은 Atomic absorbance Analyzer에 의해 측정하였다.

結果 및 考察

Table 2. Morphological properties of *Asp. niger* 8501S

Morphological properties	<i>Asp. niger</i> 8501s
A. Color	
1) Colony (above, reverse)	carbon black (above) orange brown (reverse)
2) Conidial head	dark brown
3) Sterigmata	pale brown
4) Conidiospore	dark brownish
5) Vesicle	pale brown
6) Conidia	dark brown
B. Measurement	
1) Conidiospore	30u
2) Vesicle (dia)	45u
3) Conidia (dia)	3.5u
C. Shape	
1) Vesicle	globose to subglobose
2) Conidia	globose
3) Conidial head	globose
D. Sterigmata (uniseriate or biseriate)	
	biseriate

The pH was adjusted at 5.0 before sterilization and the media were autoclaved at 120°C for 20min. culture time was 5 days at 30°C.

1. 구연산 생성능 우수균주의 선발

평판배양법으로 분리된 유기산 생성균 11주중, 액침배양으로 구연산 생성능이 우수한 균주를 2차 선발하여 The Genus *Aspergillus*(1973), 균류도감(1978), Kiyook(1968)의 방법에 따라 동정하였으며, Czapek's agar배지에서 30°C, 5일 평판배양하였을 때 그 형태학적 특징(Sterigmata, Vesicle, and Conidiospore)으로 보아 *Aspergillus niger*속의 균으로 확인하였다.

2. 사용원료 분석

폐과피 및 착즙박의 당함량은 감귤산지, 수확시기에 따라 차이가 있으며, 온주감귤의 전당의 농도를 보면, 평균치 6.72±0.92%이다. 그 구성당은 주로 glucose, fructose가 많고 sucrose와 maltose는 적다. 과즙제조 공장에서 폐기되는 부산물을 수집후, 공시재료로 조제한 감귤당밀(Citrous molasses) 및 진피(Mandarin orange peel)에 대한 주요 일반성분은 Table 3에 나타내었다.

Table 3. Chemical compositions of Satsuma mandarin orange peel and citrous molasses

Components Byproducts	Contents (% w/w)											
	Dry solids	Ash	Total sugar	Reducing sugar	Total nitrogen	Potassium	Iron	Phosphorous	Calcium	Magnesium	Citric acid	PH
Peel	86.2	1.45	25.6	14.4	1.07	0.42	0.01	0.04	0.20	0.03	1.04	-
Citrous molasses	65.4	0.92	34.2	23.3	0.62	0.39	0.01	0.03	0.16	0.01	0.85	4.2

액침배양법에 의한 구연산발효는 배지중의 질소원 및 무기물의 종류와 농도에 따라 구연산 축적 및 oxalic acid 생성 유무에 영향을 미치나, 반고체배양법으로는 이러한 성분함량에 대한 영향이 적다고 보고되고 있다(Usami, 1960. Usami, 1977).

진피는 단체(Carrier)로서의 역할뿐만 아니라 비교적 질소 및 회분함량이 높아 미생물의 발육원으로서 유리한 점이 있다. 당밀은 유기산(주로 구연산)을 함유하여 pH4.2였다. 본 연구에서 감귤당밀을 주원료로 한 반고체배양법은 원료당밀 및 진피의 성분적 장점과 배양법의 특징을 조합한 발효법이라 할 수 있다.

3. 구연산 생성에 따른 최적배양조건

1) 배지수분 함량 및 당농도

구연산발효는 Mycelial mat를 형성하는 세로중에서 당이 Endoenzyme촉매에 의해 구연산으로 전환된다. 표면배양인 경우, 그 표면에 구연산이 생성되므로 배지 표면적을 크게하고 박층인 것이 구연산발

효에 유리한 것으로 되어 있다. 이러한 점에서 배지의 수분함량은 균자증식과 구연산생성에 영향을 주게 된다. 전분박을 원료로 고체배양법에 의한 구연산발효는 배지수분 함량이 55~75%가 적당하다고 照井(1957), 吉田(1980)등은 보고하고 있다. 본 실험에서 진피를 원료로 한 반고체배양법에서는 진피 6g에 가수(加水) 하였을 때 적정배지수분 함량은 55~70%였고 이때 대당수율(對糖收率)은 64%이상의 구연산발효가 가능한 것으로 나타났었다(Table 4). 따라서 전분박을 원료로 한 고체배양에서의 수분함량과 같은 수준이었다.

Fig. 2에서는 감귤당밀을 첨가하는 경우 첨가한 당밀의 당농도와 구연산수율의 관계를 나타내고 있다. 최고의 구연산수율은 당농도 14%(W/V)의 당밀 14ml를 첨가한 때가 수율 61.5%(배지의 수분함량 64.3%)로 가장 높았다. 첨가한 당밀의 당농도가 20%(W/V) 이상에서는 구연산생성이 현저히 감소하고 있어, 이는 침투압이 높고, 배지의 점성에 기인한 단체의 흡착효과로 인한 영향이 균체생육을 저해하는 것으로 생각된다. 이상의 결과에서 첨가하

Table 4. Effect of initial moisture contents on citric acid production from Mandarin orange peel

Water added (ml)	Initial moisture contents (%)	Citric acid Yield (%)
2	36.2	30.0
5	53.6	52.3
8	63.5	68.6
11	70.0	64.5
14	74.5	62.0
17	77.8	60.0
20	80.0	56.8

Fermentation was carried out in a petri dish of 9cm diameter containing 6g of Mandarin orange peel at 30°C for 3 days.

Citric acid yield (%)

$$= \frac{\text{Citric acid production}}{\text{Total sugar contents}} \times 100$$

는 감귤당밀의 적정량을 진피 6g에 당농도 14%(W/V)의 당밀 14ml로 결정하여 표준조성배지로서 실험을 실시하였다.

2) pH

구연산생산에 있어서 pH는 생성산의 종류 및 생성량에 중요한 영향을 미치며, 구연산발효에 적합한 pH는 사용균주, 사용원료, 배양방법 등 연구자에 따라 다르다. Bernhauer(1928)등은 낮은 pH에서 구연산생산이 적합하며, 높은 pH에서는 Oxalic acid가 부생된다고 하였으나, 坂口(1930)등은 *Asp. oryzae*를 이용한 구연산생산에서 초기의 pH는 높게 하는 것이 좋다고 하였다. 높은 산성에서의 구연산발효는 오염세균이나 다른 사상균의 혼입이 어렵기 때문에 공업적으로 유리한 점이 있다. 본 실험에서는 감귤당밀의 pH를 HCl 및 NaOH로 pH2.5~6.0 범위로 조절하여 구연산생산을 검토한 결과, 최적 pH 범위는 pH4.0~5.0이었다(Fig.3).

발효재료인 감귤당밀의 pH는 4.2이므로 pH 무조절로도 좋은 구연산생성 결과를 얻었으며, Oxalic acid는 전혀 검출되지 않았다.

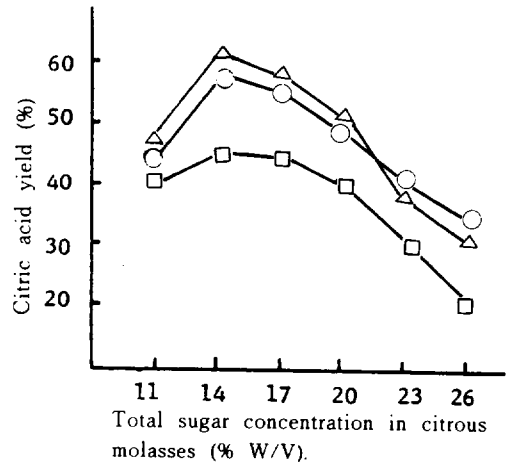


Fig. 2. Effect of total sugar concentration in citrus molasses added to a petridish containing 6g of Mandarin orange peel on citric acid production.
Incubation: 4days at 30°C.
Symbols of molasses added: 11ml □—□, 14ml, △—△, 17ml. ○—○.

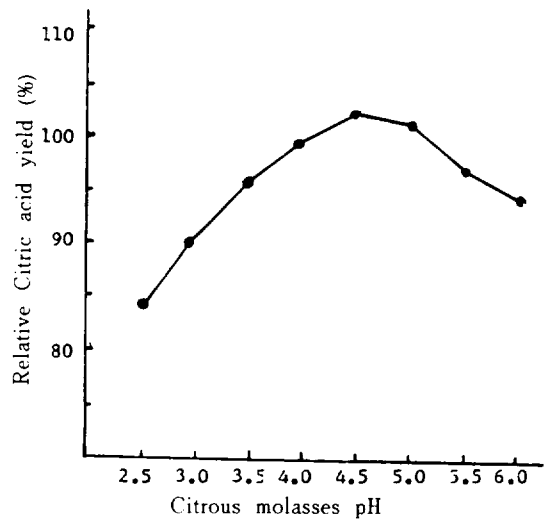


Fig. 3. Effect of initial pH of citrus molasses on citric acid production.
Incubation: 4days at 30°C.
The relative Citric acid yield was Obtained by taking the yield at pH 4.2(not adjusted) as 100%.

다. 배양일수 및 배양온도

*Aspergillus niger*에 의한 당질계의 구연산발효는 사용균주, 배양방법, 영양조건에 따라 차이가 있으나 일반적으로 28°C~33°C를 최적온도 범위로 한 것이 많다.

본 실험에서는 28~35°C 온도범위를 검토한 결과, 배양전기간(全期間)을 일정온도로 유지할 경우의 구연산축적이 가장 높은 최적온도는 30°C로 검토되었다. 한편, 中澤(1973), 野口(1967), 宇佐美(1981) 등은 배양전반기(균체증식기)와 배양후반기(산축적기)로 구분하여 온도를 관리하는 방법이 발효전기간을 일정온도로 배양하는 것보다 유리하다고 보고하고 있다. 이러한 요소를 고려하여 배양도중 온도변화에 의한 배양시험을 한 결과, Fig.4와 같이 배양전기(균체증식기)에 35°C, 배양후반기(산축적기)를 30°C로 유지하고 그 기간중 단시간(2hr) 동안 저온처리(10°C)를 했을 경우에 배양전기간을 일정온도로 유지했을 때 보다 비교적 산수율이 높았다.

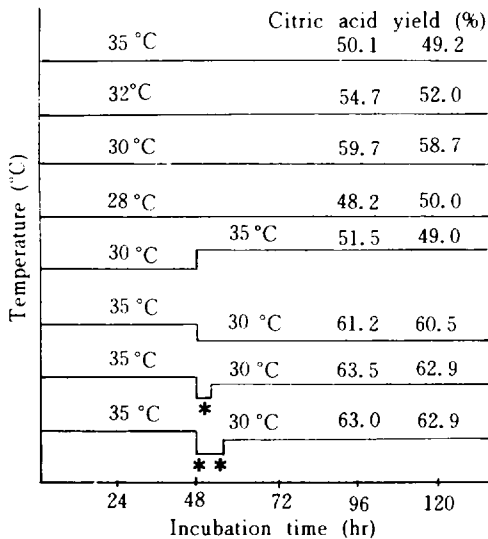


Fig. 4. Effect of incubation temperature on Citric acid production.

Citric acid yield was determined at 96hr, 120hr.

* : 2hr at 10°C

** : 4hr at 10°C

이것은 균증식적온에서 급속히 생육시킨 후, 생장 곡선평형에 도달했을 때 온도 변화를 주어 증식을 억제시키므로서 대사전환을 촉진시켜 산을 축적토록 하는 것으로, 증식과 산축적에 중복이 없는 Pattern을 이용하는 방법이 구연산생성에 유리한 것으로 사료된다.

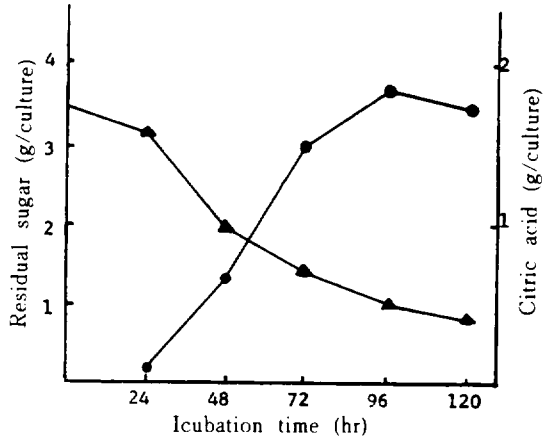


Fig. 5. Timecourse of citric acid production. Fermentation was carried out in a petri-dish containing 6g of Mandarin orange peel and 14ml of citrous molasses (14% W/V sugar concn.) at 30°C.

●—●, Citric acid.
▲—▲, Residual sugar.

Fig.5는 발효경과를 나타낸 것으로 산축적은 24시간 이후부터 급격히 증가하여 96시간때 대소비당 구연산수율은 82.1%로 최대로 증가하여, 120시간에는 거의 증가가 없었으므로 발효시간은 96시간이 최적 조건으로 사료됐다. 이것은 진피가 단체(Carrier)로서 흡수성과 통기성을 가지고 있으며, *Asp. niger* 생육에 요구되는 탄소원 이외에 무기물성분을 함유하고 있어 사상균증식에 적합하며, 당밀 및 진피는 많은 환원당이 함유되고 있고, 배지중 당농도 17.5%(W/V)로 비교적 고농도에서도 발효가 가능하며 액침배양이나 고체배양보다 조기에 구연산축적이 이루어진 것으로 생각된다.

라. 첨가물의 효과

Sucrose 대신 조단수화물 원료를 사용할 경우 배지에 무기염조성의 조절이 곤란하게 되는데 일찌기 Chughtai(1954) 등은 당밀중의 중금속을 전처리하거나 생산촉진제를 첨가하였다. 野口(1962) 등은 Sucrose 배지에 Methanol 3% 첨가로 균체증식을 억제하고 산을 증가시켰다. Moyer(1953) 및 Lak-Shminarayana(1975)는 Cane sugar bagasse를 단체로 Sucrose 및 Molasse를 원료로 한 반고체배양법에서, 배지에 발효촉진제로 Methanol를 첨가하여 산수율을 증가시켰고, 野口(1962)은 당밀재배에 Methanol 2.5%를 첨가한 경우 산생성이 현저히 촉진 되었다고 보고하고 있다. 최근에 와서 宇佐美(1981)등도 Pineapple bagasse를 원료로 한 반고체배양법에서 Methanol 1.5%(V/V)첨가 하였을 때 구연산생성이 증가한다고 보고하고 있다. 본 실험에서는 진피를 함유한 감귤당밀의 배지에 탄소원(Methanol, Ethanol), 질소원(NH_4NO_3) 및 무기원(KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)를 첨가하였을 때 산생성 효과를 검토하였다. Table 5에 표시되어 있는 바와 같이 각종 첨가물에 대한 구연산수율을 상대치(무첨가일 경

Table 5. Effect of additions on citric acid production

Additions	Amounts (%)	Relative citric acid yield(%)
None	-	100
Methylalcohol	1.0 (v/v)	106.5
	2.0	109.2
	3.0	101.3
Ethylalcohol	1.0 (v/v)	105.0
	2.0	100.0
NH_4NO_3	0.06 (w/v)	100.5
KH_2PO_4	0.20	101.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05	101.3

Fermentation was carried out on Mandarin orange peel and citrous molasses containing medium plus indicated additions.

우 100%)로 나타난 것이다. Methanol 2%(V/V), Ethanol 1%(V/V)를 첨가했을 때 산생성이 다소 증가하는 경향이 있고, 그 이상 첨가했을 때는 오히려 산생성을 억제하는 작용을 하고 있다. 질소원 및 무기성분의 첨가는 산생성에 거의 영향을 주지 않았으며, 과량첨가시는 산생성을 억제하고 있음이 검토되었다. 따라서 본 실험에 사용된 감귤과피 및 당밀을 원료로 한 배지에서는 발효에 적합한 영양원이 함유되어 있어, 별도로 탄소원, 질소원 및 무기성분을 첨가할 필요성이 없음을 확인하였다.

摘 要

제주도내에서 수집한 균분리용시료, 토양, 부패과일등에서 구연산 생산성이 우수한 *Aspergillus niger*를 분리한 후, 제주산감귤(Satsuma mandarin orange)의 가공부산물을 이용하여 반고체배양법으로 구연산발효 조건을 검토하였다.

1. 진피 6g에 당농도 14%의 감귤당밀 14ml를 첨가한 배지(수분함량 64.3%)로 30°C, 4일간 반고체배양하였을 때, 대당구연산수율을 61.5%로 가장 높았다.

2. 발효의 적정 pH는 4.0~5.0이었으며, 감귤당밀의 pH가 4.2로서 pH를 조절할 필요가 없었다.

3. 발효기간을 균증식기와 산축적기로 나누어 온도관리를 하였을 때는, 균증식기 35°C에서 배양후, 단시간(2hr) 저온처리(10°C)를 하여 산축적기에 30°C로 배양하였을 때가 비교적 산수율이 증가되었다.

4. 첨가물에 의한 발효촉진 효과를 검토한바, Methanol 2%(V/V), Ethanol 1%(V/V) 첨가때 산생성은 각각 109.2%, 105.0%로 다소 증가했으나 큰 효과는 없었고, 질소원(NH_4NO_3), 무기원(KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)을 첨가했을 때, 산생성에 영향이 없었으며, 오히려 과량첨가시는 산축적을 억제하고 있다.

5. 감귤가공폐기물의 유효이용과 환경오염원의 처리라는 관점에서 금후 공업화 할 수 있는 Scale up 및 발효형식의 검토는 더 추진되어야 할 연구과제이다.

參 考 文 獻

- Akiyama, S., Suzuki, Y. H. Fukuda, Y. Sumino. 1973. Induction and citric acid productivity of fluoroacetate-sensitive mutant strains of *candida lipolytica*. *Agri. Biol. Chem.*, 37(4): 879-884.
- Akiyama, S., T. Suzuki, Y. Sumino, Y. Nakao, H. Fukuda, 1972. Production of citric acid from n-paraffins by fluoroacetate sensitive mutant strains of *candida lipolytica*. *Agri. bio. Chem.*, 36(2): 339-341.
- Bernhauer, K., 1928. Zum chemismus der citronensäurebildung durch pilze(I). die säurebildung aus verschiedenen kohlenstoffverbindungen(II). Die citronensäurebildung aus glucosäure. *Biochem. Zeit.*, 197: 309-342.
- Cahn, F. J., 1935. Citric acid fermentation on solid materials. *Ind. Eng. Chem.*, 27: 201.
- Currie, J. N., 1917. The citric acid fermentation of *Aspergillus niger*. *Jour. Biol. Chem.*, 31: 15-37.
- Nakanish, T., M. Yamamoto, K. Kimura, K. Tanaka. 1972. Fermentive production of citric acid from n-paraffin by yeasts. *J. Ferment. Technol.*, 50(12): 855-867.
- Ogawa, T., A. Fazeli. 1976. Additive effect of ferrocyanide treatment and step change of pH on citric acid production from iranian beet molasses with *Asp. niger*. *J. Ferment. Technol.*, 54(2): 63-66.
- Okada, N., T. Ohta, U. Ebine. 1982. production of microbiol biomass product from citrus peel by solid fermentation. *Rept. Natl. Food res. Inst.*, 4: 9-13.
- Raper, K. B., D. I. Fennell, 1973. The genus *Aspergillus*. The williams and wilkins Co. Baltimore, 293-340.
- Tabuchi, T., S. Hara. 1972. The mechanism of citrate fermentation in *candida lipolytica*. *J. Agri. Chem.*, 48(7): 417-424.
- Takahashi, S., T. Shimakawa, H. Aihara, M. Kanke. 1980. Production of yeast single cell protein from orange waste (part 4).
- Wehmer, C., 1893. Note sur la fermentation citrique. *Bull. Soc. Chim.*, 9: 728-730. Préparation d'acide citrique de synthèse, par la fermentatin du glucose. *Compt. Rend.*, 117: 332.
- 愛媛縣工業試驗場業績, 241: 20-27.
- 西尾尙道, 奥幸夫, 河村大造, 永井史郎, 1979. みかん廢棄物(みかん外皮)の可溶化および糖化. *醸工*, 57(5): 354-359.
- 宇佐美昭次, 福富直樹, 1977. ペイナシブル加工殘搾汁を原料とする半固體培養法によるワエン酸醱酵. 日本醱酵工學會大會講演要旨集: 55-156.
- 吉田, 大森, 中西, 1980. 日本醱酵工學會大會要旨集: 179.
- 野口祐一, 1962. ワエン酸醱酵に関する研究(第9報). *醸工*, 40(4): 171-178.
- 宇佐美昭次, 熊谷和夫, 服部達彦, 1981. 黒かびの半固體培養にする 温州みかん廢物かうのワエフ酸の生産.
- 岡田憲幸, 伊藤寛, 太全輝夫, 1984. かんきつ粕利用による高ワンペワ生産醱菌の選擇. *食總研報*, 45: 123-126.