

碩士學位論文

濟州道産 温州柑橘 廢棄物에서
半固體培養法에 의한 枸橼酸生産

濟州大學校 大學院
農化學科



高 泰 巖

1986年 12月

濟州道産 温州柑橘 廢棄物에서
半固體培養法에 의한 枸橼酸生産

指導教授 康 順 善

高 泰 巖

이 論文을 農學碩士學位 論文으로 提出함.



高泰巖의 農學 碩士學位 論文을 認准함.

審査委員長 高 正 三
委 員 康 順 善
委 員 柳 堉 中

濟州大學校 大學院

1986年 12月

CITRIC ACID PRODUCTION FROM CHE-JU
MANDARIN ORANGE WASTE BY
SEMI-SOLID CULTURE OF
ASPERGILLUS NIGER

Tae-Am Ko

(Supervised by Professor Soon-Seon Kang)



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF AGRICULTURE

DEPARTMENT OF AGRICULTURAL CHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1986. 12

目 次

Summary	1
I. 緒 論	2
II. 材料 및 方法	4
III. 結果 및 考察	8
1. 枸橼酸生産性 우수菌株의 선발	8
2. 使用原料의 分析	9
3. 枸橼酸生産을 위한 最適培養條件	10
1) 水分含量 및 糖濃度	10
2) pH	12
3) 培養時間 및 培養溫度	14
4) 添加物の 效果	17
5) 培養容器的 空間率	18
IV. 要 約	20
V. 參考文獻	21

Summary

In order to produce citric acid from Mandarin orange waste, a useful strain was isolated from field soil, collected in Cheju Island. The strain was identified as *Aspergillus niger* 8501S. The optimum conditions of citric acid production from Mandarin orange peel and the concentrated press liquor(citrus molasses) with semi-solid cultivation were investigated, and the result were as follows.

1. The optimum conditions of citric acid production was found to cultivate the strain at 30°C for 4 days on the medium consisted in 6g of dried citrus peel and 14ml of diluted citrus molasse(sugar concentration ; 14%).
2. The optimum pH for the citric acid production was pH 4.0-5.0, and pH adjustment of media was not necessary as pH of the citrus molasse was 4.2.
3. The highest citric acid production was found when the strain was cultivated at 35°C for 48hrs firstly(growing stage of microbes), treated the culture at 10°C for 2hrs, and then incubated at 30°C for 46hrs(citric acid producing stage).
4. The addition of 2%(V/V) methanol or 1%(V/V) ethanol to the media increased the citric acid production up to 109.2% and 105.0%, respectively. The addition of nitrogen, phosphate and inorganic to the basal medium showed no remarkable effect on citric acid production.
5. Vacancy ratio of 75% on plate culture promoted citric acid production compared with standard culture.

I. 緒 論

제주도 農業生産所得의 主宗을 이루고 있는 감귤은 1960年代 부터 재배가 시작되어 제주도의 가장 重要한 경제작물로서, 과거 20여년간 재배면적의 확대와 아울러 그 生産量도 매년 증가하고 있다. 그 결과, 감귤生産量은 1965年 1,083^M/T에서 1985년에는 387,000^M/T(제주도, 1986)에 이르고 있다.

감귤은 大部分 生果로 消費되어 왔으나, 生産量의 增加로 一部는 加工用으로 利用되어 1985년에 감귤주스, 통조림등의 加工量은 60,000^M/T(제주도, 1986)이 消費되었으며, 生産量에 비례하여 加工用 감귤은 더욱 증가할 것으로 예상된다.

감귤加工 과정에서 廢棄되는 廢果皮 및 搾汁粕의 量은 전체處理量의 45~50%를 차지하는 막대한 양으로 극히 一部가 飼料로서 利用되고 있을 뿐이고 大部分은 廢棄되고 있는 실정이다. 감귤加工副産物은 多量의 Pectin을 함유한 高粘性物質로서 活性汚泥法에 의한 處理가 곤란한 半固體廢棄物이다. 이러한 감귤加工副産物의 有效利用은 資源의 再利用뿐만아니라 환경오염의 해결에 그 重要性을 가지고 있다고 하겠다.

감귤加工副産物에는 20~30%의 全糖을 함유하고 있어, 이를 炭素源으로 하여 효모에 의한 飼料用SCP(Single cell protein) 生産(高橋 等, 1980)과 고체배양법에 의한 감귤粕으로부터 MBP(Microbial Biomass Product)의 生産(岡田 等, 1982), 감귤粕을 利用한 高蛋白質生産 麴菌의 분리(岡田 等, 1984), 감귤廢棄物의 可溶化 및 糖化에 관한 연구(西尾 等, 1979)등, 廢棄物을 利用한 多數의 연구보고가 있고, 국내에서는 姜 等(1983)의 감귤外皮의 가축사료로서의 利用시험, 梁(1985)의 감귤加工副産物의 사료이용가능성 조사에 대한 연구보고가 있다.

1784年 Scheel 에 의해 “천연 구연산”이 lemon juice 로 부터 처음으로 결정 분리되어 Italy(특히 Sicily), California, Hawaii, West Indies 에서 生産되었다. 그 후, Wehmer(1893)에 의해 Penicillium 속의 菌株를 사용한 表面培養(Surface Culture)에서 “醱酵에 의한 구연산” 生産이 처음 시도되었고, Thom 및 Currie(1917)는 구연산生産菌인 *Aspergillus niger* 를 分離하여 Currie(1917)의 研究結果를 基礎로 1923年 Chas. Pfizer & Co. Inc.(New York)에서 表面培養法을 이용한 구연산生産을 最初로 工業化시켰다. 그 후 Karrow(1947)와 Perlman(1949)등의 液內培養法(Submerged Culture)에 의한 구연산生産의 연구로 1951年 Miles Lab.

이 이를 工業化 시킨 이래 주로 液內培養法에 의한 구연산을 生産하고 있다. 近年에 와서는 *Asp. niger* 변이균주에 의한 구연산生産(Hannan 등, 1973) 및 효모를 이용한 n-Paraffins 에서 液內培養法에 의한 구연산生産(Tabuchi 등, 1974. Nakanishi, 1972), *Candida lipolytica* 의 변이균주에 의한 n-Paraffins 으로부터 구연산生産(Akiama, 1973) 등 많은 연구가 진행되고 있다.

구연산生産에 있어서 醱酵方法도 表面培養法, 液內培養法 및 半固體培養法 등이 開發되었으나, 使用原料 및 使用菌株, 醱酵生産에 따른 환경, 시설 및 培養方法에 따라 이해득실이 있어서 다양한 조합으로 구연산을 生産하고 있는 실정이다.

Cahn(1935)은 Beet Sugar 및 Cane Sugar pulp 에 糖液(pineapple-juice)을 흡수시켜 半固體培養法으로 구연산生産을 처음 시도하였으며, 宇佐美 等(1977)은 高濃度の pineapple bagasses 를 原料로 한 半固體培養法에 의한 구연산生産에서, 液內培養法이나 表面培養法 보다 糖濃도가 비교적 높을 때에도 구연산生産이 가능했고, 醱酵기간의 단축과 他유기산이 生成되지 않는 利點이 있다고 보고하였다.

본 연구는 제주도에서 生産되는 溫州감귤중 감귤加工工程에서 廢棄되는 果皮와 搾汁粕을 醱酵源으로 하여, 道內 土壤에서 분리한 구연산生産성이 우수한 *Aspergillus niger* 8501S를 사용하여 半固體培養法으로 구연산生産을 위한 培養基 礎條件을 검토 하였다.

II. 材料 및 方法

1. 菌株의 分離

구연산生産 菌株을 分離하기 위하여 제주도내에서 收集한 각종 토양, 부패과일 및 전분박 등 菌分離用 試料 50점에서 각각 1g를 시험관에 넣고 멸균수 5ml를 가한 후 진탕하여 상등액 1ml를 취하여, 酸生成여부를 확인하기 위하여 B. C. G를 첨가한 分離用培地(Table 1-A)에 접종후, 30°C에서 5일간 배양하여 有機酸生成 Colony를 분리한후, 같은 組成의 培地에서 평판배양법으로 數回 배양하고 현미경 관찰을 통하여 有機酸生成菌 11菌株을 순수 분리하였다.

供試菌株의 分離는 250 ml Erlenmyer flask에 菌선발용培地(Table 1-B) 60ml를 넣어 高溫加壓 살균후, 사면배양하여 보관중인 1次 分離菌株을 2~3회 계대배양한 포자현탁액 1ml(포자수 $10^4 \sim 10^6$)를 접종시켜 30°C에서 5일간 진탕배양하여 배양액을 원심분리(3500 rpm, 20min)한 후, 구연산生産량을 측정하여 구연산生産성이 우수한 菌株을 선발하고 本 實驗의 供試菌株로 하였다.

Table 1. Composition of isolation and screening medium

Constituents	Isolation medium(A)	Screening medium(B)
Glucose	30g	100g
NaNO ₃	2.0g	2.0g
K ₂ HPO ₄	1.0g	1.0g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5g	0.5g
KCl	0.5g	0.5g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.005g	0.005g
B.C.G	0.001g	-
Agar powder	20g	-
Dist. water	1000ml	1000ml
Initial pH	5.0	5.0

Sterilized at 120°C for 20 min.

- : Not addition.

2. 감귤加工副産物の 試料調製

加工用 감귤은 一次 溫水침지후 剝皮工程에서 廢棄되는 30~35%의 果皮(Outer peel and Inner peel)와 쥬스 搾汁工程에서 10~15%의 搾汁粕이 副産物로 廢棄된다.

本 實驗에서는 濟州市 소재 감귤加工工場에서 나오는 감귤加工 副産物을 2회 收集(1985. 11. 28, 1986. 1. 20)하여 4℃ 냉장고에 보관하여 사용하였다.

試料調製는 搾汁粕을 搾汁機(Hanil Stainless Co.)로 再壓搾한 후 搾汁液을 가열농축(70~75℃, 10min)한 감귤당밀(citrus molasses)과 再壓搾후 남은 殘渣와 果皮를 혼합하여 乾燥후 분쇄한 감귤껍질(Mandarin orange peel)를 試料로 하였다(Figure 1 참조).

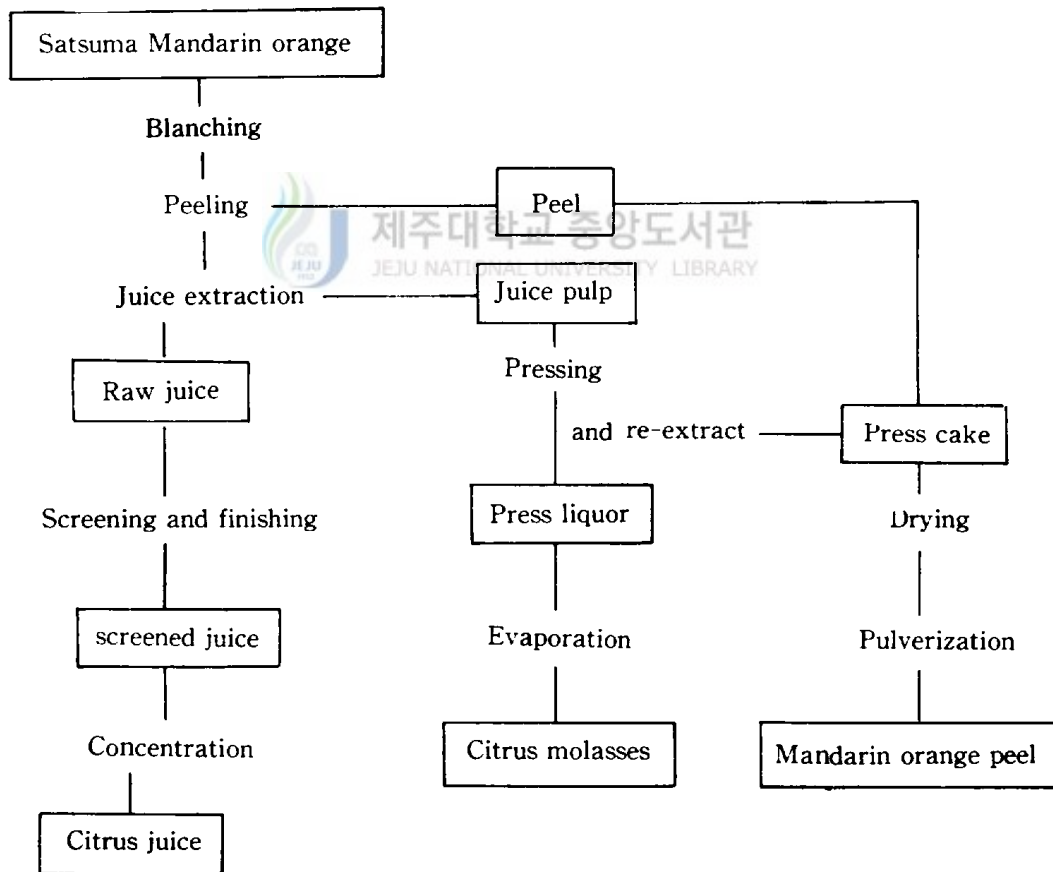


Figure 1. Flow sheet of citrus processing and preparation of Mandarin orange by-product.

3. 培養方法

건조, 분쇄한 감귤껍질을 通氣性과 糖液의 吸着性を 고려하여 10 mesh 이하인 것과 10 mesh 이상인 것으로 구분한 다음 이것을 같은 비율로 혼합하여 担體 (Carrier)로 사용하였고, 적당한 糖濃度가 되도록 희석한 감귤당밀의 一定量을 넣어 혼합한후, 직경 9 cm petri-dish(實容積 100 ml)에 取하여 증기살균후, Koji 증한천사면 배지에서 10일간 培養한 *Aspergillus niger* 8501S의 孢子分散液 1 ml(포자수 10^6 내외)를 접종하여 培養하였다.

標準培養條件은 감귤껍질 6g에 糖濃度 14%(W/V)의 감귤당밀 14 ml를 첨가한 培地를 30℃에서 4일간 培養하였다.

4. 分析方法

1) 감귤껍질 및 감귤당밀의 成分分析

(1) 固型物 및 灰分은 당밀의 一般分析法(食品工學實驗, 1975)에 準하여 分析하였고, 總窒素는 Micro-Kjeldahl法(作物分析 委員會編, 1980), 인산은 Ammonium molybdate法(作物分析 委員會編, 1980), Fe, Ca, K, Mg은 Atomic absorption spectrophotometer (Model SP9, pye unicom Ltd.)에 의해 分析하였다.

(2) 감귤껍질중 糖은 80% Ethanol로 추출후, 0.5 ml의 2.5% Zinc Sulfate와 0.5 ml의 0.15N Barium hydroxide를 加하여 除蛋白한 후, 원심분리(3500rpm, 20min)하여 그 상등액을 糖分析試料로 하였고, 당밀은 감귤껍질에서와 같은 방법으로 除蛋白한 후 원심분리하여 상등액을 糖分析試料로 하였다.

① 還元糖; 試料용액 1 ml를 取하여 Somogi-Nelson法(作物分析 委員會編, 1980)으로 比色定量하였다.

② 總糖; 試料용액 4 ml를 환류냉각관을 부착한 flask에 넣고, 1% HCl 용액 10ml를 加하여 100℃ 수욕중에서 2.5시간 加水分解 시킨후, 1 N NaOH 용액으로 中和한 다음 濾過하여 Somogi-Nelson法으로 比色定量하였다.

(3) 구연산은 Ethanol를 加하여 抽出한 試料溶液 5ml에 대하여 10% Trichloroacetic acid 1 ml를 加하여 除蛋白한후, 원심분리(3500rpm, 20min)하여

그 상등액 1 ml를 取하여 Pentabromoacetone 法(Pucher 등, 1936)에 의해 분석하였다. 즉, 除蛋白한 試料溶液 1 ml를 glass-stoppered tube 에 넣고 18N H₂SO₄ 0.1ml, 1M KBr 0.4ml를 加하여 실온에서 10분간 방치하였다. 이어서 5% KMnO₄ 1ml를 넣어 氷冷후, 6%의 H₂O₂를 한방울씩 넣어 過량의 KMnO₄를 제거하였다. 그후, 12.5ml의 Ligroin 을 加하여 10분간 진탕한 다음 원심분리(3,500rpm, 20분)하여 Pentabromoacetone 를 抽出하였고, 여기에 4%의 thiourea 5ml를 加하여 발색시켜 430m μ 에서 흡광도를 측정하여 定量하였다.

2) 培養物의 分析

(1) 구연산은 배양종료후 培養物에 60℃의 溫水를 10배량 加하여 10분간 교반시켜 구연산을 抽出, 濾過하여 濾過液을 前述한 바와 같이 比色定量하고 培養前 培地에 함유된 구연산량을 빼서 生成된 구연산량으로 하였다.

(2) Oxalic acid 는 P. P. C.法(作物分析 委員會編, 1980)으로 전개후 Ninhydrin 으로 발색시켜 生成有無를 확인하였다.



III. 結果 및 考察

1. 枸橼酸生産性 우수菌株의 선발

Table 2. Morphological characteristics of *Aspergillus niger* 8501S

Colony character	
rate of growth	ordinarily rapid growth
texture	closely rough velvety
color above	carbon black
color reverse	orange brown
Conidial heads	
color	dark brown
form	globose
size	80-108 μ
Conidiophore	
color	dark brown
markings	comparatively smooth
length	1.5-2.5mm
diameter	15-35 μ
Vesicle	
color	pale brown
shape	globose to subglobose
size	45-50 μ
Sterigmata	
color	commonly pale brown
form	biseriate
Primary sterigmata	
length	15-20 μ
width	3.5-4.0 μ
secondary sterigmata	
length	5.0-6.0 μ
width	2.5-3.0 μ
Conidia	
color	dark brown
shape	globose
size	3.5-4.0 μ

The pH was adjusted at 5.0 before sterilization, and the incubation time was 5 days at 30°C

道 내에서 分離된 有機酸生成菌 11菌株중 液體培養法으로 구연산生産性이 우수한 菌株를 2次 선발하여 “The genus *Aspergillus* (1973)”, “균류도감(1978)”의 方法에 따라 동정하였으며, Czapek’s Agar 培地에서 30°C, 5일간 培養배양하였을 때 菌系 및 胞子の 형태학적 특징은 Table 2와 같으며 *Aspergillus niger* 8501S로 동정하였다. 본 菌株는 Koji 증 한천사면培地에서 계대배양 하면서 供試菌株로 사용하였다.

Aspergillus niger 8501S는 비교적 生育이 빠른편이며 基底菌系層은 배양초기에 白色~黃色이고 배양시간의 경과에 따라 培養基全面에 黑色의 胞子가 형성되었다. 分子子頭 및 分子子の 형성은 매우 빠른편이고, 集落裏面은 無色에서 黃色으로 변하였다.

2. 使用原料의 分析

구연산醱酵에 있어서 炭素源으로는 糖蜜, 粗糖 또는 澱粉質原料등이 이용되는데, 使用菌株에 따라 이들 炭素源의 自化성은 크게 차이가 있는 것으로 알려져 있다(野口, 1960).



Table 3. Chemical compositions of Satsuma Mandarin orange peel and citrus molasses

components	Centents(% w/w)					
	Dry solids	Ash	Total sugar	Reducing sugar	Total nitrogen	potassium
Byproducts						
Peel	86.2	1.45	25.6	14.4	1.07	0.42
Citrus molasses	50.7	0.92	34.2	23.3	0.62	0.39

Components	Centents(% w/w)					
	Iron	Phosphorous	Calcium	Magnecium	Citric acid	pH
Byproducts						
Peel	0.01	0.04	0.20	0.03	1.04	-
Citrus molasses	0.01	0.03	0.16	0.01	0.85	4.2

감귤加工工程에서 副生되는 廢果皮 및 搾汁粕의 糖함량은 감귤의 生産地, 수확 시기, 品種에 따라 차이가 있으며, 廢果皮 및 搾汁粕에 함유되어 있는 N, P, K, 등은 微生物生育의 窒素源 및 無機成分으로서 이용된다. 液內培養法에 의한 구연산 醱酵는 배지중의 窒素源 및 無機物의 種類와 濃度에 따라 구연산 축적 및 oxalic acid 生成有無에 영향을 미치나, 半固體培養法으로는 이러한 성분함량에 대한 영향이 적다고 하였다(Usami, 1977).

감귤당밀의 수소이온 농도는 有機酸(주로 구연산)을 함유하여 pH 4.2였고, 감귤껍질은 窒素 및 灰分含量이 비교적 많아 担體로서의 역할뿐만 아니라 微生物生育의 營養源으로도 유리한 점을 가지고 있는 것으로 보였다.

과즙제조공장에서 廢棄되는 副産物를 收集後, 供試材料로 조제한 감귤당밀(Citrus molasses) 및 감귤껍질(Mandarin orange peel)의 주요 一般成分은 Table 3과 같으며, 本 實驗에서 감귤당밀을 主原料로 한 半固體培養法은 原料당밀 및 감귤껍질의 成分的 長點과 培養法의 특징을 조합한 醱酵法이라 할 수 있다.

3. 枸橼酸生産을 위한 最適培養條件

1) 水分含量 및 糖濃度

구연산醱酵는 Mycelial mat 를 형성하는 세포중에서 糖이 Endoenzyme 에 의해 구연산으로 전환된다(Economic microbiology, 1978).

表面培養인 경우, 그 表面에 구연산이 生成되므로 배지의 표면적은 크게하고 박층인 것이 구연산醱酵에 유리하다(Lewis, 1979). 이러한 점에서 배지의 수분함량은 菌蓋形成과 구연산生成에 영향을 주게된다.

本 實驗에서 감귤껍질 6g에 증류수를 加하여 30℃, 3일간 배양하였을 때의 適定水分含量을 검토한 결과, Table 4와 같이 최초배지의 水分含量이 57.5%일때 對糖 구연산收率은 급격히 증가하기 시작하여 최초배지의 水分含量 63.5%에서 最高의 구연산收率을 얻었다. 따라서 培地의 適定水分含量은 55~70%였고, 이때 對糖收率은 64% 이상의 구연산生産이 가능한 것으로 나타났다. 이 결과는 吉田等(1980)의 전분박을 原料로 한 固體培養法에 의한 구연산 醱酵에서, 培地의 適定水分含量을 55~75%로 보고한 것과 거의 비슷하였다.

Fig.2에서는 감귤당밀을 첨가하는 경우, 첨가한 당밀의 糖濃度와 구연산收率의

관계를 나타내고 있다.

최고의 구연산수율은 糖濃度 14%(W/V)의 당밀 14 ml 를 첨가한 때가 收率 61.5%(배지의 수분함량 64.3%)로 가장 높았다. 糖濃度가 낮을 때는 担體의 吸着을 나쁘게 하여 酸生成이 감소되었으며, 첨가한 당밀의 糖濃度가 20%(W/V)이상

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
3	43.3	42.7
4	49.0	51.0
5	53.6	52.3
6	57.5	64.8
7	60.7	66.5
8	63.5	68.6
9	66.0	67.5
10	68.1	66.0
11	70.0	64.5
12	71.6	63.9
13	73.1	62.8
14	74.5	62.0
15	75.7	61.2
16	76.8	60.7
17	77.8	60.0
18	78.7	58.7
19	79.6	56.9
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(%)

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

에서는 구연산生成이 현저히 감소되었다.

이는 滲透壓과 粘性的의 증가로 인하여 菌體生育이 저해되는 것으로 생각된다. 이상의 결과에서 첨가하는 감귤당밀의 적정량을 감귤껍질 6g에 糖濃度 14%의 당밀 14ml로 결정하여 표준조성배지로서 실험을 실시하였다.

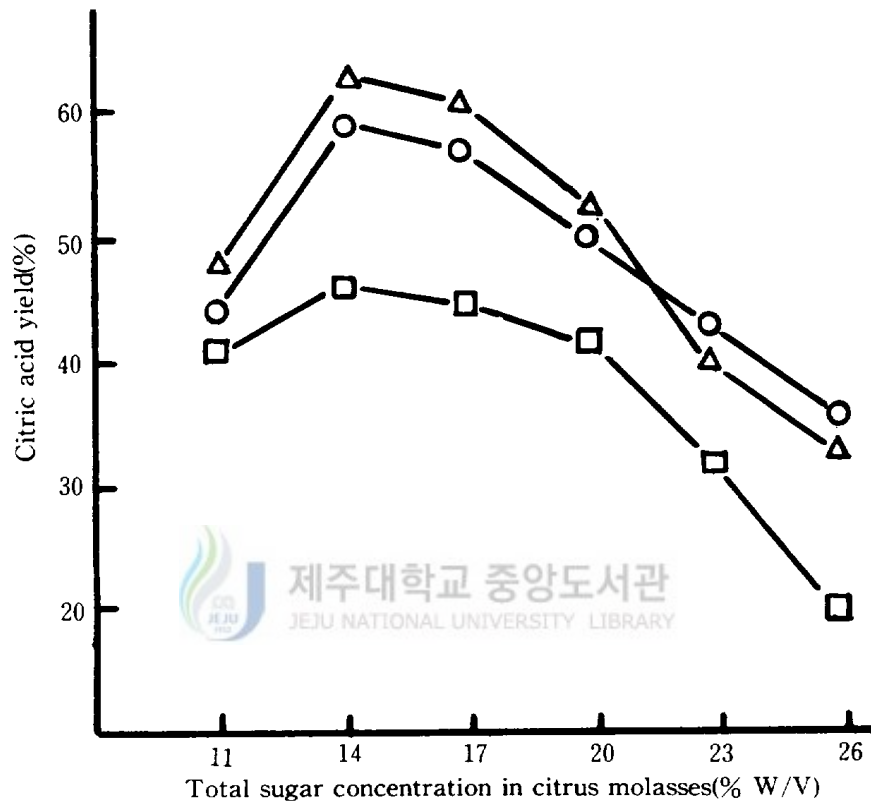


Figure 2. Effect of total sugar concentration in citrus molasses added to a petri-dish containing 6g of Mandarin orange peel on citric acid production.

Incubation : 4 days at 30°C.

Symbols of molasses added : 11ml. □-□,

14ml. △-△, 17ml. ○-○.

2) pH

구연산生成에 있어서 배지의 pH는 生成되는 酸의 種類 및 生成量에 중요한 영향을 미치며, 구연산生成에 적합한 pH는 使用菌株, 使用原料 및 培養方法등에 따라 다르다. Bernhauer 등(1928)은 배지의 pH가 산성쪽에서 구연산生成이 적합하

며, pH가 높을 때는 구연산이외에 oxalic acid가 생성된다고 하였다. 그러나 坂口 등(1930)은 *Asp. oryzae*를 이용한 구연산生産에서 초기의 pH를 높게 하는 것이 좋다고 하였다. 또한 Currie(1917)는 구연산醱酵의 최적 pH는 3.4~3.5라 하였고, Doelger 등(1934)은 1.6~2.2, Moyer(1953)은 4.0이라 하였다. 이와 같이 낮은 pH범위에서의 구연산醱酵는 세균의 오염이나 다른 사상균의 生育이 어렵기 때문에 공업적으로 유리한 점이 있다.

本 實驗에서는 감귤당밀의 pH를 HCl 또는 NaOH용액으로 pH 2.5~6.0 범위로 조절한후 각각의 구연산生産을 검토한 결과, 최적 pH범위는 4.0~5.0이었다 (Fig. 3).

따라서 醱酵原料인 감귤당밀의 pH는 4.2이므로 pH를 조절할 필요가 없었으며 이 범위에서 oxalic acid는 검출되지 않았다.

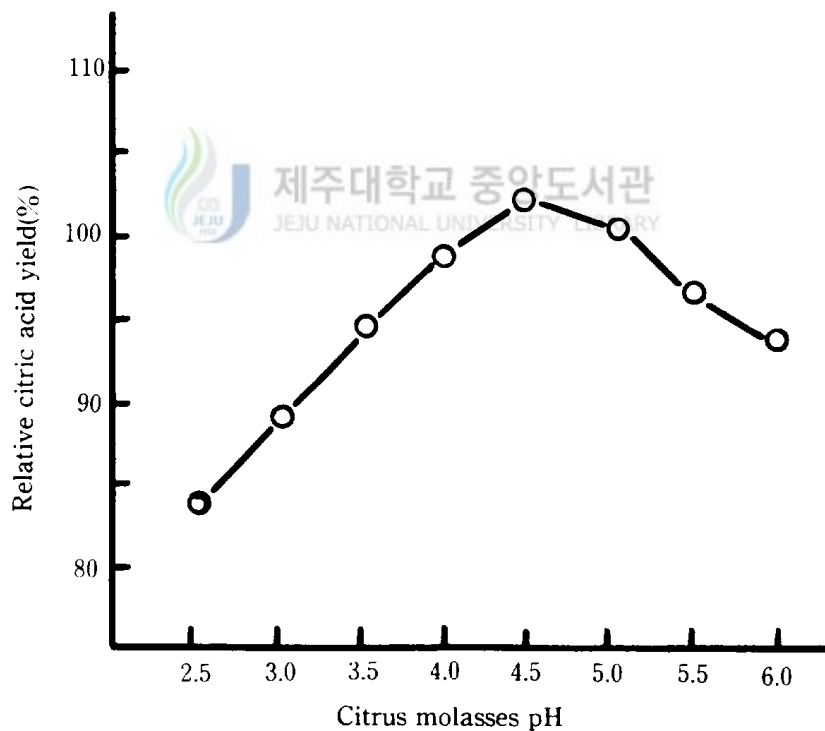


Figure 3. Effect of initial pH of citrus molasses on citric acid production.

Incubation: 4 days at 30°C.

The relative citric acid yield was obtained by taking the yield at pH 4.2(not adjusted) as 100%.

3) 培養時間 및 培養溫度

Asp. niger 에 의한 구연산醱酵에서 培養溫度는 28~33°C가 대부분이며, 30°C附近에서 가장 많다. 그러나 最適培養溫度는 使用菌株, 培地組成 및 培養方法에 따라 다르다. Doelger 등(1934)은 26~28°C가 適溫이라 하였고, Usami 등(1977)은

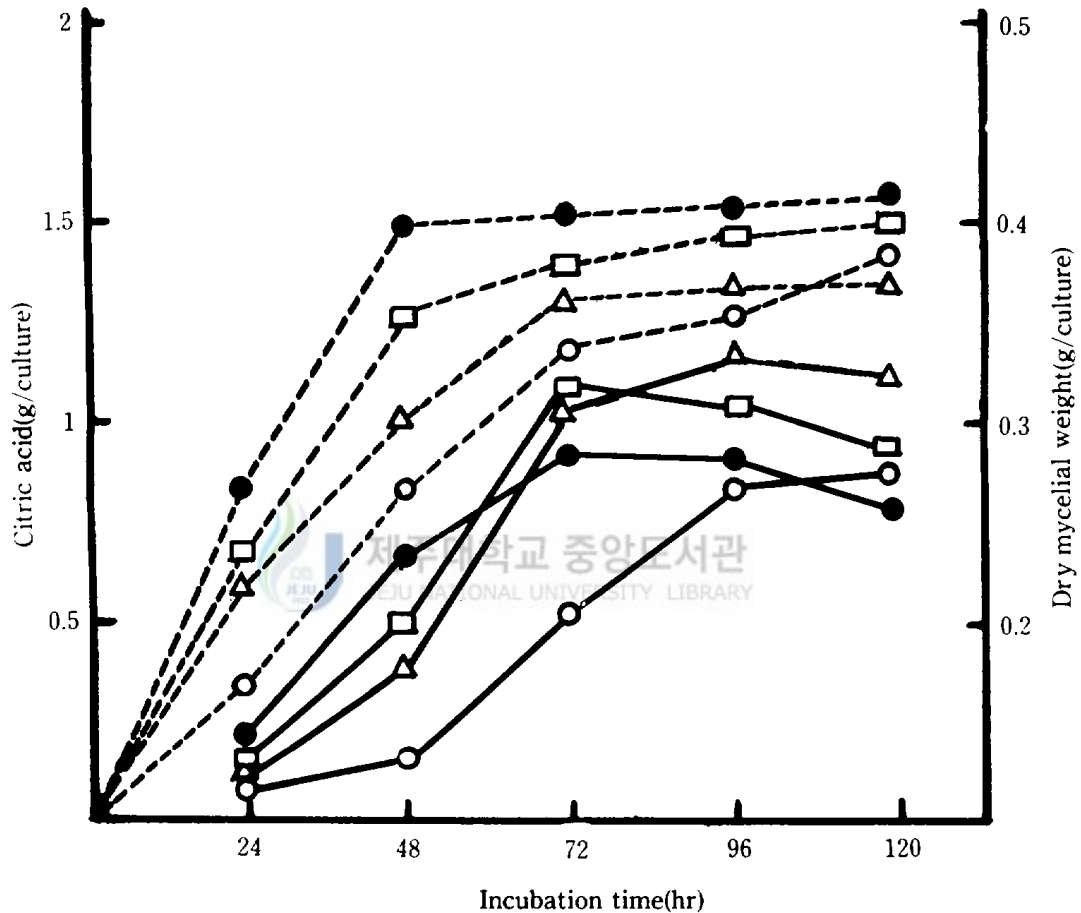


Figure 4. Effect of temperature on citric acid production and growth.

Fermentation was carried out in a petri-dish containing 3g of glass-wool and 14ml of citrus molasses(14% w/v sugar concentration).

..... Dry mycelial weight

—— Citric acid

○---○ : 28°C

△---△ : 30°C

□---□ : 32°C

●---● : 35°C

30°C에서 구연산收率이 가장 높았다고 하였다.

本實驗에서는 petri-dish에 glass-wool 3g과 糖濃度 14%의 감귤당밀 14 ml를 첨가하여 28~35°C의 온도범위에서 배양하였을때, 배양기간의 경과에 따른 *Asp. niger* 8501S의 生育과 구연산生産을 검토한 결과, Fig. 4와 같이 *Asp. niger* 8501S의 生育適溫은 35°C였고, 구연산축적이 가장 높은 온도는 30°C였다.

한편, 野口(1967), 宇佐美등(1981)은 培養前期(菌體 증식기)와 培養後期(酸 축적기)로 나누어 培養溫度를 조절하는 방법이 醱酵 全期間을 일정한 온도로 배양하는 것 보다 유리하다고 하였다. 따라서, 배양중 온도를 변화시켜 배양한 결과는 Fig. 5와 같으며, 培養前期에 35°C로 배양한 다음 저온처리(10°C, 2시간)를 하고 培養後期를 30°C로 유지했을 경우가 培養全期間을 一定溫度로 유지했을 때보다 酸

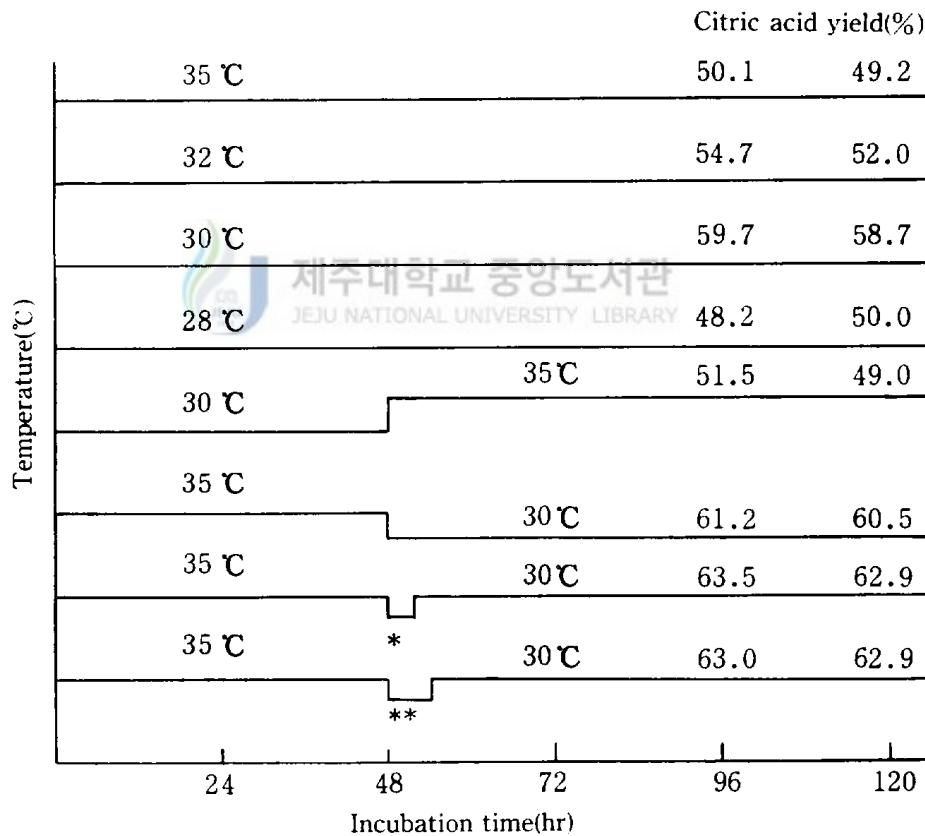


Figure 5. Effect of incubation temperature on citric acid production.

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

- * : 2hr at 10°C.
- ** : 4hr at 10°C.

生産이 향상됨을 알 수 있었다. 이것은 生育適溫에서 배양한 후, 菌體增殖정지기 (Stationary phase)에서 온도변화를 주어 대사전환을 촉진시켜 구연산을 축적토록 하는 것으로 보여지며, 이와같이 菌體增殖과 구연산生産機構를 조절하는 방법이 구연산生産에 유리한 것으로 생각된다.

Fig. 6은 培養全期間을 30℃로 유지했을 때의 醱酵경과를 나타낸 것으로, 구연산生産은 24시간 이후부터 급격히 증가하여 96시간에서 消費糖에 대한 구연산收率은 82.1%로 最大가 되었으며, 그 이후에는 약간 감소하는 경향이였다. 따라서 구연산生産은 96時間에서 거의 이루어진 것으로 생각되며, 이것은 本 實驗에 사용한 감귤껍질이 担體로서 吸水性과 通氣性을 가지고 있으며, *Asp. niger* 生育에 요구

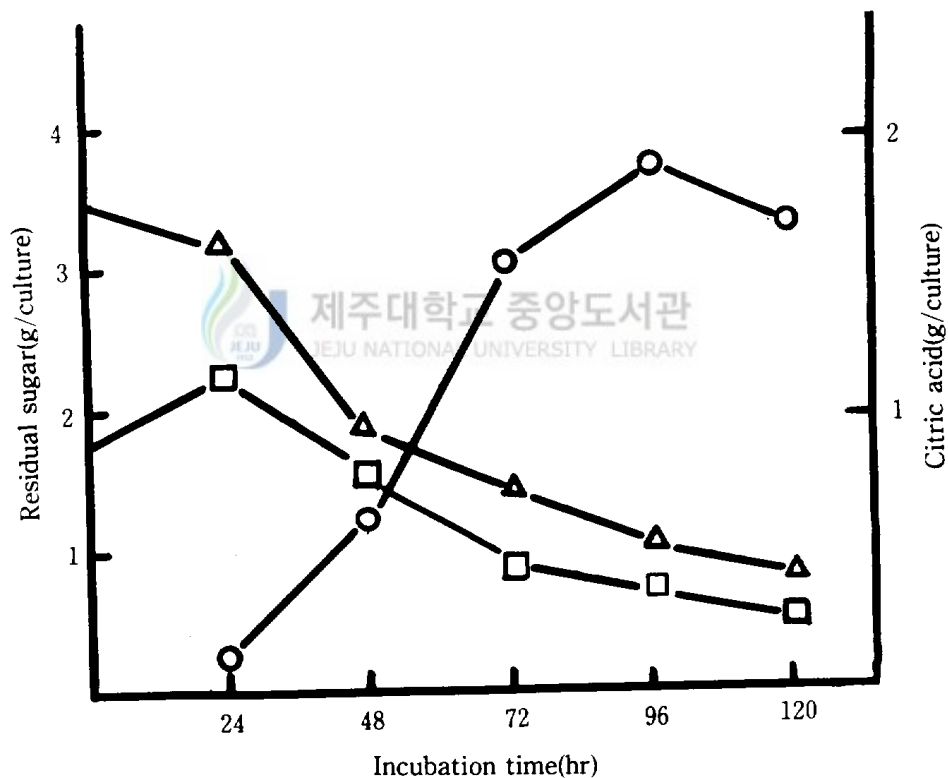


Figure 6. Timecourse of citric acid production. Fermentation was carried out in a petridish containing 6g of Mandarin orange peel and 14ml of citrus molasses(14% W/V sugar concentration)at 30℃.

- , Citric acid.
- △—△, total sugar.
- , Reducing sugar.

되는 炭素源 이외에 無機物成分을 함유하고 있어 사상균 증식에 적합하며, 또한 당밀 및 감귤껍질에는 많은 還元糖이 함유되어 있고 培地중 糖濃度가 高濃度(17.5%)에서도 醱酵가 가능하며, 液內培養이나 固體培養보다 早期에 구연산축적이 이루어지는 것으로 생각된다.

4) 添加物の 效果

구연산醱酵에서 粗炭水化物을 사용할 경우에 生産性を 向上시키기 위하여 原料의 前處理 또는 Methanol, Ethanol 등의 酸生産 促進物質을 첨가하는 경우가 있으며, 그 효과는 菌株의 種類, 培地の 性質에 따라 다르다. Moyer(1953)는 cane sugar bagasses를 担體로 sucrose 및 molasses를 原料로 한 半固體培養法에서, 培地에 醱酵促進劑로 Methanol를 첨가하여 酸收率을 증가시켰고, 野口 等(1962)은 당밀培地에 Methanol 2.5%을 첨가한 경우 酸生成이 현저히 촉진되었다고 하였다. 최근 宇佐美 等(1977)도 pineapple bagasses를 原料로 한 半固體培養法에서 Methanol(1.5%)를 첨가할 경우 구연산生成이 증가하였다고 했고, 李 等(1978)은 Sakaguchi's培地에 Methanol 2%첨가하였을 때 酸生成이 증가한다고 하였다. 이와같이 구연산生産에서 Carbon source의 첨가 이외에 *Asp. niger*의 生育을 위하여 窒素源 및 無機源의 공급을 필요로 하는데, Currie(1917)는 液體培養에서 窒素源 및 無機源의 最適量은 NH_4NO_3 2~2.5%, KH_2PO_4 0.75~1.0%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02~0.25%이고 그 以上 첨가하면 菌體生育은 증가하나 구연산生産은 감소한다고 하였다.

本 實驗에서는 감귤껍질을 함유한 감귤당밀培地에 炭素源(Methanol 또는 Ethanol), 窒素源(NH_4NO_3), 無機源(KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)을 첨가하였을 때, 酸生成효과를 검토하여 Table 5와 같이 첨가물에 대한 구연산收率을 相對值로 나타내었다. Methanol 2%, Ethanol 1%를 첨가하였을 때, 酸生成이 다소 증가하는 경향이 있으나 그 以上 첨가했을 때는 오히려 酸生成이 억제되었고, 窒素源 및 無機源의 첨가는 酸生成에 거의 영향을 주지 않았으며, 過量 첨가하는 酸生成을 억제하였다. 따라서 本 實驗에 사용한 감귤껍질 및 당밀을 原料로 한 培地에서는 醱酵에 적합한 營養源이 함유되고 있어, 별도로 炭素源, 窒素源 및 無機源을 첨가할 필요성이 없음을 확인하였다.

Table 5. Effect of additives on citric acid production

Additives	Amounts(%)	Relative citric acid yield(%)
Control	-	100
Methylalcohol	1.0(V/V)	106.5
	2.0	109.2
	3.0	101.3
	4.0	92.5
	Ethylalcohol	1.0(V/V)
Ethylalcohol	2.0	100.0
	3.0	94.7
	4.0	91.0
	NH ₄ NO ₃	0.04(W/V)
0.06		100.5
0.08		99.2
0.10		97.4
KH ₂ PO ₄		0.10(W/V)
	0.15	100.1
	0.20	101.0
	0.25	98.9
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.03(W/V)
0.05		101.3
0.07		100.5
0.09		100.1

Fermentation was carried out on the standard medium containing indicated additives.

5) 培養容器的 空間率

靜置培養인 경우 醱酵容器的 空間率은 通氣狀態, 醱酵熱 및 醱酵期間에 영향을 준다. 糖은 滲透壓에 의해서 細胞內로 들어가고 生成된 酸은 細胞膜을 통과해서 培養液中에 확산되며, 醱酵은 表面에서 이루어지므로 表面積을 크게하는 것이 유리하다. Bernhaur 等(1941)의 液層의 깊이를 13~23mm에서 最高의 收量을 얻었다고 하였다.

Petri-dish 의 容器空間率과 구연산收率을 검토한 결과, Table 6과 같이 空間率 75%에서 가장 酸收率이 높았다. 容器空間率이 적을때의 酸收率은 標準培養條件과 비교하여 큰 차이를 확인하지는 못하였으나 약간 감소하는 경향을 보였다. 이는 산소의 부족으로 인하여 菌體生育이 저해되어 酸生成은 촉진되는 반면, 菌蓋 (Mycelial mat)하부에 함유된 糖의 消費가 완전히 이루어지지 않은 것으로 판단된다. 또한, 容器空間率이 클 때는 菌體生育은 標準培養條件에서 보다 비교적 빠르나 酸收率은 낮았다.

Table 6. Effect of vacancy ratio of petri-dish on citric acid production

Vacancy ratio(%)*	Citric acid yield(%)
60	58.9
65	60.0
70	60.6
75	61.8
79**	60.1
85	54.7
90	52.5

*Vacancy ratio is the ratio of the space volume to the petri-dish volume.

Space volume is the volume of water needed to fill the petri-dish containing medium.

**Standard culture condition.

Total amount of medium added to a petri-dish ranged from 9 to 39g.

이상과 같은 실험의 결과로서, 평균 54~64%의 구연산收率을 얻을 수 있었고, 앞으로 Scale up 에 필요한 제반문제는 더 검토되어야 할 연구과제라고 생각된다.

IV. 要 約

道內에서 收集한 土壤에서 구연산生産性이 우수한 *Aspergillus niger* 8501S를 분리한 후, 濟州産 溫州柑橘(Satsuma Mandarin orange)의 加工副産物을 이용하여 半固體培養法으로 구연산生産의 培養條件을 검토하였다.

1. 감귤껍질 6g에 糖濃度 14%의 감귤당밀 14 ml 를 첨가한 培地(水分含量 64.3%)로 30°C, 4 일간 培養하였을 때 구연산收率은 가장 높았다.

2. 醱酵의 適定 pH는 4.0~5.0이었으며, 감귤당밀의 pH가 4.2로서 pH를 별도로 조절할 필요가 없었다.

3. 醱酵時間을 菌體증식기와 酸축적기로 나누어 온도조절을 하였을 때는, 菌體증식기 35°C에서 배양후, 2時間 저온처리(10°C)를 하여 酸축적기에 30°C로 배양하였을 때가 비교적 구연산收率이 증가하였다.

4. 添加物에 의한 구연산生産 촉진효과는 Methanol 2% 또는 Ethanol 1%를 첨가할 때 酸生成은 각각 109.2%, 105.0%로 다소 증가했으며, 窒素源(NH₄NO₃), 無機源(KH₂PO₄, MgSO₄·7H₂O)을 첨가했을 때는 구연산生成에 영향이 없었고 過量 첨가시는 酸축적을 억제하였다.

5. 醱酵容器(petri-dish)의 空間率은 75%의 空間率에서 구연산收率이 가장 높았다.

V. 参 考 文 献

- Akiyama, S., T. Suzuki, Y. Sumino, Y. Nakao, H. Fukuda, 1972. Production of citric acid from n-paraffins by fluoroacetate sensitive mutant strains *Candida lipolytica*. *Agric. Biol. Chem.*, 36(2) : 339~341.
- Akiyama, S., T. Suzuki, Y. Sumino, Y. Nakao, H. Fukuda, 1973. Induction and citric acid productivity of fluoroacetate sensitivity mutant strains of *Candida lipolytica*. *Agric. Biol. Chem.*, 37(4) : 879~884.
- Bernhauer, K., 1928. Zum chemismus der citronensäurebildung durch pilze(I). Die säurebildung aus verschiedenen kohlenstoffverbindungen(II). Die citronensäurebildung aus gluconsäure. *Biochem. Zeit.*, 197 : 309~342.
- Bernhauer, K., H. Knobloch, 1941. Über die säurebildung aus zucker durch *Aspergillus niger*. *Biochem. Zeit.*, 307~306.
- 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*. *J. Biol. Chem.*, 31 : 15~37.
- Doelger, W. P., S. C. Prescott, 1934. Citric acid fermentation. *Ind. Eng. Chem.*, 26 : 1142.
- 食品工學實驗, 1975. 延世大食品工學科編, 探求堂, p. 594.
- Hannan, M. A., F. Rabbi, A. T. M. Faizur Rahman, N. Choudhury, 1973. Analysis of some mutants of *Aspergillus niger* for citric acid production. *J. Ferment. Technol.*, 52(8) : 606~608.
- 作物分析委員會編, 1980. 營養珍斷のための栽培植物分析測定法, 養賢堂 p. 272~343.
- 西尾尚道, 奥夫, 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.
- Kang, S. L. and J. H. Choe, 1983. Feeding value of dried citrus peel in broiler

- diets. Proceedings of the second symposium of the international network of feed information centers.
- Karow, E. O., 1947. Production of citric acid in submerged culture. *Ind. Eng. Chem.*, 39 : 821~825.
- Lockwood, L. B., 1979. Production of organic acid by fermentation. *Microbial technology*, 357~369.
- 神立誠編, 1978. 最新食品分析法, 東京同文書院, p. 179~181.
- 韓國生化學會 教材편찬위원회, 1980. 탐구당, 實驗生化學, p. 140~143.
- 梁昇柱, 1985. 柑橘副産物の 飼料化에 관한 研究, 博士學位論文.
- 이상선, 박무영, 1978. 구연산발효에 관한 연구(균주선정 및 배지개량), 한국산업미생물학회지, 6(4) : 161~164.
- 松下雲郎, 森友彦, 新田, 1971. 有機酸との他の分析と 特殊試験, 講談社, p. 3~33.
- Moyer, A. J., 1953. Effect of alcohols on the mycological production of citric acid in surface and submerged culture(I).
Nature of the alcohol effect. *App. Microbiol.*, 1 : 1~7.
- Nakanishi, T., M. Yamamoto, K. Kimura, K. Tanaka, 1972. Fermentative production of citric acid from n-paraffin by Yeast. *J. ferment. Technol.* 50(12) : 855~867.
- 野口祐一, 阪東良子, 1960. クエン酸發酵に関する研究(糖蜜培地のクエン酸發酵に於してメタノール, エタノールの酸生成に及ぼす影響). *發工*, 40(1) : 485~488.
- 野口祐一, 1962. クエン酸發酵に関する研究(微量金屬のクエン酸生産に及ぼす影響). *發工*, 40(4) : 163~171.
- 野口祐一, 荒尾修, 1967. クエン酸に関する研究(酸生産に及ぼす培地と培養温度の關係並びに培養温度變化に就いて). *發工*, 3 : 491~493.
- 長谷川武治, 1976. 微生物の分類と同定. 東京大學出版會, p. 20~35.
- 岡田憲幸, 太田輝夫, 海老根英雄, 1982. かんきつ粕の固體培養によるMBPの生産. *食總研報*, 41 : 9~13
- 岡田憲幸, 伊藤寛, 太田輝夫, 1984. かんきつ粕利用による高タンパク生産麹菌

- の選擇, 食總研報, 45 : 123~126.
- Perlman, D., H. A. Lardy, M. J. Johnson, 1944. Determination of citric acid in fermentation media and biological materials. *Ind. Eng. Chem.*, 16 : 515~526.
- Perlman, D., W. W. Dorrell, M. J. Johnson, 1946. Effect of metallic ions on the production of citric acid by *Aspergillus niger*. *Arch. Biochem.*, 10(3) : 131~143.
- Perlman, D., 1949. Mycological production of citric acid—The submerged culture method. *Econ. Botany.*, 3 : 360~374.
- Raper, K. B., D. I. Fennell, 1965. "The genus *Aspergillus*." Williams & Wilkins Co. 445.
- 성낙계, 김명찬, 정덕화, 1980. 사상균에 의한 구연산발효에 관한 연구. 한국산업미생물 학회지, 8(3) : 181~191.
- Stanier, R. Y., E. A. Adelberg, J. Ingraham, 1976. The microbiol world(Fourth edition). Prentice-Hall, Inc., Englewood cliffs, New jersey. p. 275~291.
- 鈴木隆雄, 小原哲二郎, 岩尾裕之, 1978. 食品分析ハンドブック(第2版). 建帛社. p. 334~341.
- Tabuchi, T., S. Hara, 1974. The mechanism of citrate fermentation in *Candida lipolytica*. *J. Agri. Chem.*, 48(7) : 417~424.
- 高橋慧, 島川武, 相原宏, 菅家通夫, 1980. かんきて粕を利用する酵母によるSCPの生産に関する研究(第5報), 愛媛工試報告, 242(18) : 20~27.
- 高橋慧, 奥島貞安, 島川武, 1980. かんきつ粕を利用する酵母によるSCPの生産の關する研究(第6報), 愛媛工試報告, 242(18) : 28~33.
- Tabuchi, T., M. Tamaka, Y. Tahara, M. Abe, 1970. Studies on organic acid fermentation in yeasts(Production of citric acid from n-paraffins by yeast) *J. Agri. Chem.*, 44(12) : 562~566.
- Thom, C., J. N. Currie, 1917. *Aspergillus niger* group. *J. Agri. Research*, 7 : 1~15.
- 宇佐美昭次, 福富直樹, 1977. ハイナツフル加工殘渣 搾汁を原料とする半固體培養法によるクエン酸發酵. 發工, 55(1) : 44~50.

宇田川俊, 椿啓介, 1978. 菌類圖鑑, 講談社, 100~1044.

Wehmer, C., 1893. *Note sur la fermentation citrique*, *Bull. Soc. Chim.*, 9 : 728
~730. *Préparation d'acide citrique de synthèse, par la fermentation du
glucose. Compt. Rend.*, 117~332.

柳田友道, 1984. 微生物科學(3), 學會出版, p. 107~203.

吉田忠, 大森大陸, 中西透, 1980. 推積培養によるクエン酸の生産(原料の前處
理). 日本發酵工學會大會 要旨集, p. 355

吉田忠, 大森大陸, 中西透, 1981. 推積培養によるクエン酸の生産(培養條件の
討), 日本發酵工學會大會要旨集, p. 356



謝 辭

本 實 驗 을 遂 行 함 에 있 어 서 實 驗 設 計 에 서 부 터 論 文 作 成 에 이 르 기 까 지 모 든 與 件 을 마 련 해 주 시 고 始 終 아 낱 없 는 지 도 와 격 려 를 해 주 신 指 導 教 授 康 順 善 博 士 님 께 깊 이 감 사 드 리 오 며, 항 상 보 살 품 과 가 르 침 을 주 신 金 滌 玉 教 授 님, 柳 長 杰 教 授 님, 高 正 三 教 授 님, 尹 彰 勳 教 授 님, 柳 基 中 教 授 님 께 도 衷 心 으 로 感 謝 를 드 립 니 다.

아 울 러 여 러 가 지 실 험 편 의 와 자 료 작 성 에 많 은 도 움 을 주 신 高 正 殷 선 생 님 과 農 化 學 科 대 학 원 생 들 에 께 도 고 마 운 뜻 을 표 하 는 바 입 니 다.

