

Aspergillus SP. 菌株에 의한 Gluconic Acid 生産條件에 관한 研究

梁鎬錫, 金東勳, 梁漢喆
高麗大學校 農科大學 食品工學科
(1980년 6월 9일 수리)

Studies on Conditions of the Gluconic Acid Production by a Mold isolated from the Soil of Seoul Area

Ho-Suk Yang, Dong-Hoon Kim, Han-Chul Yang

Department of Food Technology, College of Agriculture Korea University, Seoul, Korea.

(Received June 9, 1980)

ABSTRACT

Fungi which were capable of producing gluconic acid were isolated from soil and tree leaf samples, which had been collected in Seoul and its vicinity.

Among the 19 strains isolated, a strain named arbitrarily KUF-O4 was selected as a test strain chiefly because of its efficiency in gluconic acid production.

The strain was identified as an *Aspergillus* sp. through its morphological properties.

Optimum conditions for the gluconic acid production of KUF-O4 were investigated. The results obtained are as follows.

1. An incubation period of at least 30 hours was required for a good yield of gluconic acid.
2. A medium containing 10% glucose needed at least 3% CaCO₃ to maintain the optimum pH for the production of gluconic acid during fermentation.
3. As a carbon source, glucose was the most effective one among the carbon sources tested.
4. As a nitrogen source, an ammonium salt was more effective than any other form of nitrogen compounds.
5. As mineral source, a small amount of both KH₂PO₄ and MgSO₄ was found to be necessary to increase the efficiency of the gluconic acid production.

I. 序 論

有機酸 醱酵은 現在 醱酵工業에서 重要한 分野를 차지하고 있으며 醱酵過程을 거쳐 生産되는 有機酸들로서는 1860年 처음으로 英國에서 商業的 生産을 始作한 citric acid를 비롯하여 gluconic acid, lactic acid, malic acid, itaconic acid, acetic acid 등 20餘種에 이르고 있다¹⁾.

Gluconic acid는 calcium鹽 및 sodium鹽 또는 deatalactone의 形態로써 食品, 醫藥品 및 工業用으로 使用되고 있으며 隣國 日本에서는 1,000톤 이상이 年間 生産되고 있다²⁾.

Gluconic acid는 1880年 Boutroux³⁾가 처음으로 *Acetobacter*를 利用하여 生産을 實施한 이래 *Gluconobacter*⁴⁾, *Pseudomonas*^{5,6)}, *Achromobacter*⁷⁾ 등 bacteria, *Aspergillus*⁸⁾, *Penicillium*⁹⁾, *Mucor*¹⁰⁾,

*Pullularia*¹¹⁾ 등 fungi, *Candida*¹²⁾, *Mycoderma*¹³⁾ 등 yeast 를 利用한 生産研究가 이루어졌다.

Gluconic acid 의 醱酵過程을 통한 生産方式은 初期에는 固體培養方式이었으나, Schreger¹⁰⁾ Thies¹⁴⁾ Currie et al¹⁵⁾ 등에 의해 submerged culture 방식이 開發되어 現在에 이르고 있다.

우리나라는 gluconic acid 의 醱酵法에 의한 生産은 研究段階에 있으며 아직 工業적으로 生産되고 있지 않아 日本에서 輸入 使用되고 있는 實情이다.

Gluconic acid 醱酵 研究는 國內에서도 多角度로 檢討되어 왔으나 培養溫度, vitamin, essential amino acid 와 같은 growth factor 등 細部的 事項들에 대해서는 아직 研究가 未治하다.

本 研究는 gluconic acid 의 工業的인 醱酵 生産을 目的으로 自然에서 이 目的에 副應하는 微生物 菌株은 分離培養하여 그 細部的인 gluconic acid 生産條件을 檢討하였다.

即, 먼저 取扱이 容易한 fungi 을 自然에서 分離하고 gluconic acid 生産성이 優秀한 菌株을 選擇한 後, 最適 生産條件을 設定하는 研究를 實施하였다. 生産條件으로써는 環境要因에서부터 榮養要因에 걸쳐 廣範圍하게 研究檢討하였다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 實驗材料

(1) 菌 株 : 本 研究를 爲해 서울近郊의 土壤과 나무잎에서 分離한 19種의 菌株中 gluconic acid 의 生産성이 優秀한 菌株를 선정하여 KUF-04로 命名하여 使用하였다.

(2) 培 地 : 菌株의 分離 및 保存用 固體 培地는 Czapek-Dox agar¹⁶⁾을 使用하였으며, 本 實驗에 液體培地로써 使用된 前培養培金 및 本培養 基礎培地의 組成은 各各 table 1 및 table 2와 같다.

(3) 器 具 : 前培養은 振幅 5 cm, 振動數 110 rpm 의 reciprocal shaker 을 使用하여 實施하였으며 本培養은 振幅 5 cm, 回轉數 180rpm 의 rotary skaker 를 使用하여 實施하였다. 前培養에 使用된 flask 는 板口 flask 를, 本培養 flask 는 baffle flask 를 使用하여 實施하였다.

2. 實驗方法

(1) Calcium gluconate 의 定量

1) 容量法 : 試料 一定量을 取해 여기에 ammonium oxalate 를 添加하여 calcium oxalate 를 형성

Table 1. Composition of the medium used for pre-culture

Composition	Quantity
Glucose (Crystal Powder)	30.0g
Corn Steep liquor (50% w/w)	20.0g
NH ₄ Cl	9.0g
KH ₂ PO ₄	2.0g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.0g
CaCO ₃	10.0g
Distilled water	1,000.0ml

pH: 6.7

Sterilization: 30 minutes at 121°C

Table 2. Basal composition of the medium used for the production of calcium gluconate

Composition	Quantity
Glucose (Crystal powder)	100.0g
KH ₂ PO ₄	0.2g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.0g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2g
CaCO ₃	35.0g
Distilled water	1,000.0ml

pH: 7.2

Sterilization: 30 minutes at 121°C

시킨 後, H₂SO₄로 calcium oxalate 을 溶解하여 0.1 N-KMnO₄ solution 으로 Ca⁺⁺量을 定量, calcium gluconate 의 量을 求하였다.¹⁷⁾

2) 重量法 : broth 를 濾過시켜 얻은 濾液의 同量에 該當되는 95% ethyl alcohol 를 添加 ice bath 中에서 72時間 放置시킨 後 濾過乾燥하여 重量을 計量하여 calcium gluconate 量을 求하였다.¹⁸⁾

(2) 乾燥菌體量 : 試料 50ml 를 3,000rpm 에서 10分間 遠心分離 上澄液을 除去시킨 後 0.1N-HCl 30ml 로 3回 反覆洗滌하여 CaCO₃를 除去하였다. 증류수 30ml 로 다시 2回 洗滌 濾過하여 110°C 中에서 24時間 乾燥하여 重量을 秤量하였다.¹⁹⁾

(3) glucose定量 : Shaffer-Somogi micro-method²⁰⁾ 를 利用하였다.

(4) Calcium gluconate 의 確認實驗 : 試料 4~5 mg 을 取해 KBr 150mg 과 함께 잘 混合시킨 後 disk 를 만들어 Infra-red spectrophotometer 를 使用 그 spectrum 을 測定하여 確認하였다.²¹⁾

(5) 培 養 : 本實驗에 使用된 前培養은 500ml 板口 flask 에 50ml 培地를 注入 使用하였고 本培養

은 500ml baffle flask 에 50ml 培地를 注入 使用하였다, 殺菌은 121°C, 30分間 實施하였다.

III. 實驗結果 및 考察

1. 菌株의 選別

(1) 試料의 採取: 서울市 江西區 禾谷洞山과 新道林洞들판 여러곳, 특히 나무가 우거진 곳, 습기가 많은 곳 또는 적은 곳 등에서 土壤과 나무잎등 30個 試料를 採取하여 菌株 分離用으로 使用하였다.

(2) 純粹分離: 土壤과 나무잎 試料를 小量式 取하여 saline solution²²⁾에 넣어 10分間 Vortex-mixer 로 mixing 한 後 各各 $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}$ 로 dilution 시켰다. 別途로 Czapek-Dox agar 에 phosphoric acid 을 加하여 pH 를 4.0으로 調節하면서 細菌生育抑制劑 aureomycin $2\mu\text{g}/\text{ml}$ ²³⁾ 添加 固化시켰다. 이 培地에 試料稀釋液을 殖菌하여 7日間 培養한 後 fungi 만을 分離하고, 다시 이 過程을 3

Table 3. Production of gluconic acid by various microorganisms

Microorganism	Residual sugar g/100ml	Gluconic acid g/100ml	Sources
<i>Aspergillus niger</i>	2.70	4.70	K. U*
KUF-01	0.39	7.08	Wha Kok-Dong
KUF-02	5.68	0.90	soil "
KUF-03	4.83	0.23	" "
KUF-04**	0.45	7.82	" "
KUF-05	5.56	1.39	" "
KUF-06	5.00	1.37	" "
KUF-07	5.62	0.28	" "
KUF-08	5.68	0.21	" "
KUF-09	6.96	0.34	oak leaves
KUF-10	2.10	6.40	pine leaves
KUF-11	5.84	0.32	Shin Do LimDong
KUF-12	6.34	0.50	soil "
KUF-13	5.74	2.13	" "
KUF-14	6.74	0.25	" "
KUF-15	5.18	1.12	" "
KUF-16	5.28	0.22	" "
KUF-17	7.24	0.06	cherry leaves
KUF-18	7.12	0.06	poplar leaves
KUF-19	5.22	1.20	soil

*Strain from Dept. of Food Technology, College of Agriculture, Korea University.

**KUF-04 was selected as test strain.

回 反覆하여 純粹菌 19株와 別途로 高麗大學校 農科大學 食品工學科의 保存菌의 하나인 *Aspergillus niger* 菌을 使用하였다.

(3) 優秀菌株의 選別: 純粹分離시킨 菌株와 保存菌株들을 前培養 培地 (table 1)에 殖菌 24時間 增殖시킨 後, 다시 이 增殖된 菌을 本培養培地 (table 2)에 接種하여 28°C에서 40時間 gluconic acid 를 生成시켰다. 形成된 gluconic acid 는 容量法과 重量法에 의거 定量하여 가장 生産性이 優秀한 暫定的으로 KUF-04로 命名한 菌株를 選別하여 使用하였다.

2. 菌株의 同定

選別한 菌株 KUF-04를 Czapek-Dox agar 을 使用하여 slide culture²⁴⁾와 coverslip method²⁵⁾로 培養시켜 形態學의 特性을 調査하였다.

菌株의 同定보다는 gluconic acid 生産의 最適條件의 탐색이 本實驗의 主目的이 있었으므로 同定에 대해서는 많은 研究를 하지 못했으나 현미경으로 촬영한 사진 (Fig. 1, 2)과 形態學의 特性 (table 4)을 中心으로 관찰한 結果를 綜合하면 다음과 같다. 즉, hyphae 에 septa 가 있으며 conidiophore 가 뚜렷하며 頂上에 vesicle (Fig. 1, B)을 형성하며 구형으로 conidial head (Fig. 2, c)는 globose 로 색깔은 黑色이며 硬子는 二段으로 되어 있었다.

有性生殖胞子를 볼 수 없었고 또한 sporangio-phore 나 ascocarp 가 관찰되지 않았었다.

따라서 本菌은 Fungi Imperfecti 中 *Aspergillus*

Table 4. Morphological properties of KUF-04 strain

	<i>Aspergillus</i> sp. *	KUF-04
Hyphae	+	+
Septa	+	+
Conidia	+	+
Conidiophore	+	+
Foot cell	+	+
Vesicle	+	+
Vesicle	globose	globose
Conidial head	globose	globose
	black or brownish	black
	black	
Sterigmata	one or two series	two series
Ascocarp	-	-
Sporangiophore	-	-

*A typical *Aspergillus* sp.

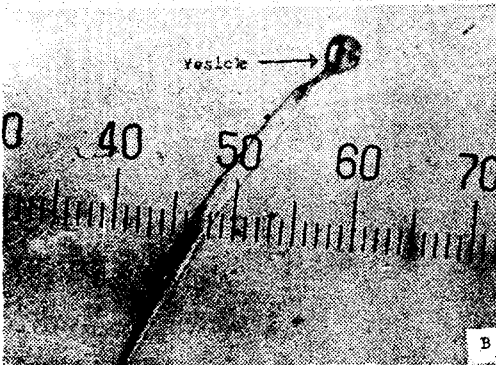
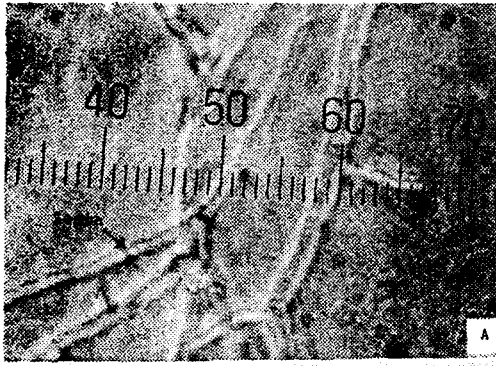


Fig. 1. Photomicrographs of KUF-04 strain
A; Mycelium ($\times 600$) B; Vesicle ($\times 150$)

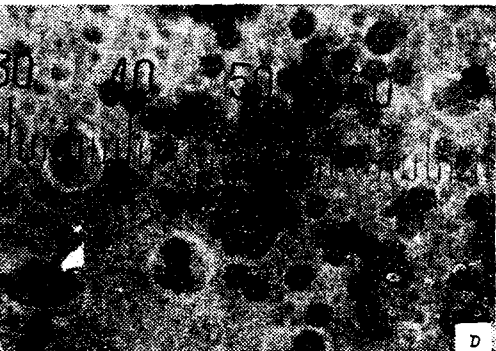
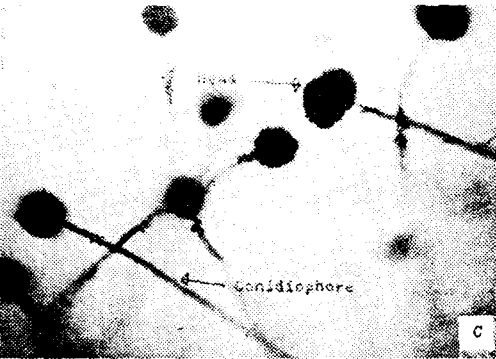


Fig. 2. Photomicrographs of KUF-04 strain
C; Conidiophore and conidial head ($\times 50$)
D; Conidia ($\times 600$)

sp.에 속하는 菌으로 推定된다.

3. Calcium gluconate 生産

(1) 醱酵法에 의한 calcium gluconate 生産

1) 前培養: 500ml 板口 flask 에 table-1의 前培養 培地 50ml 를 注入, spore 를 殖菌 28°C 24時間 진탕배양하였다.

2) 本培養: 500ml baffle flask 에 table-2의 本培養 培地 50ml 를 注入한 後에 追加하여 전배양한 培養液을 5% v/v 殖菌하고 28°C. rotary shaker 上에서 40時間 진탕배양시켜 calcium gluconate 를 生産하였다.

(2) Calcium gluconate 結晶

Broth 의 濾液을 Fig. 3의 方法으로 處理하여 calcium gluconate monohydrate 結晶을 얻었다. 處理된 500ml 의 broth 에서 乾燥된 calcium gluconate mono hydrate 로서 46g 얻었으며 이 量은 使用된 glucose 重量에 92%가 된다.

4. Calcium gluconate 의 確認

培養液으로 부터 얻은 calcium gluconate monohydrate 와 Fugisawa Seiyaku 製 標準品을 各各 Infra-red spectrophotometer 로 그 spectrum 을 測定한 結果 同一 peak 들을 가진 同一品임이 確認되었다.

5. Calcium gluconate 生成條件

(1) 溫度의 影響

供試菌株 KUF-04菌의 培養溫度 25°, 28°, 33°, 와 40°C 別로 Calcium gluconate 生産性을 檢討한 結果 40°C 에서 가장 糖消費도 많았고, calcium gluconate 生産量도 많았다. (Fig. 4).

Calcium gluconate 生産을 爲한 實驗들은 大개 27°C 와 30°C 로 固定하여 實施하였다. 工業化는 培養溫度가 높을수록 有利하다. 本實驗의 結果에서 40°C 에서까지도 培養시킬 수 있는 可能性이 提示되었다.

(2) 培養時間의 影響

培養溫度를 28°C. seed 量을 5% v/v. 로 하여 100時間까지 培養시켜 calcium gluconate 의 生産量을 調査한 結果 10時間에서 30時間까지 calcium gluconate 生産量이 急速하게 增加했으며 30時間以後는 別로 增加하지 않았었다. (Fig. 5).

이 結果는 Takao 와 Sasaki¹¹⁾들의 結果와 一致한다. Takao 들은 여러가지 菌株로 30°C 에서 5日

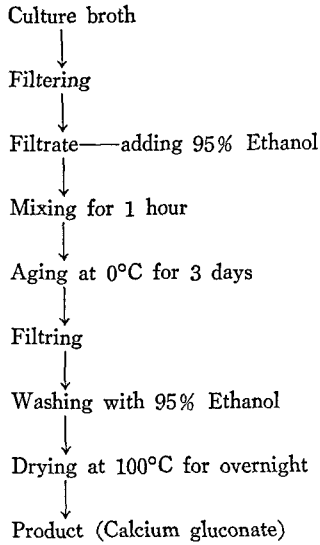


Fig. 3. Diagram for the preparation of calcium gluconate

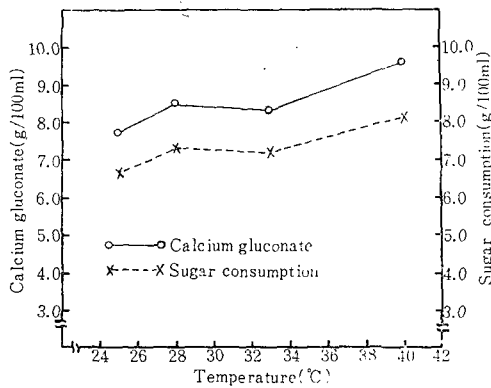


Fig. 4. Effect of incubation temperature on the quantity of calcium gluconate produced.

1. Cultivation was carried out on a rotary shaker (180 rpm) at the indicated temperature for 36 hours.
2. A 50ml of the medium was charged into each 500ml shaking flask.

間 培養한 實驗에서 40시간까지 生産량이 增加하였다고 보고하고 있으며 이 結果와 대체로 일치한다. 特異한 點은 Takao 들은 40시간

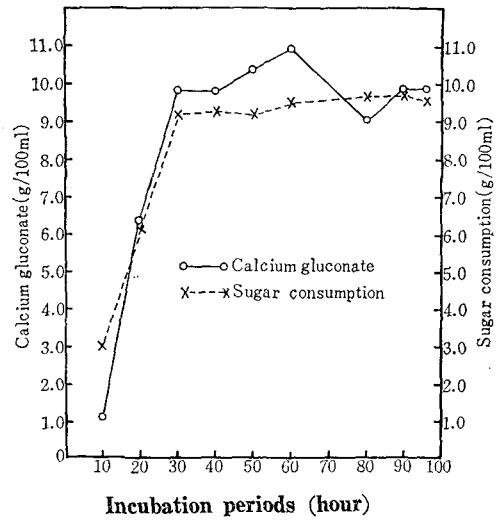


Fig. 5. Variations of the quantity of calcium gluconate produced with the length of the incubation period used.

1. Cultivation was carried out on a rotary shaker (180 rpm) at 28°C for 36 hours.
2. A 50ml of the medium was charged into each 500ml shaking flask.

까지 生産량이 계속 增加한 반면 本實驗에서는 30 시간까지 급격히 增加하여 最高生産量에 도달하는 시간이 10시간程度가 단축되었다.

(3) CaCO₃ 添加量의 影響

CaCO₃ 添加量에 따른 calcium gluconate의 生産量의 變化를 調査한 結果 3% 以下에서는 medium의 pH가 너무 酸性化되어 적합치 못하였으며 3% 以上에서는 一定한 生産量을 나타내었다(Fig. 6).

Sasaki¹¹⁾들의 研究結果도 CaCO₃농도가 0%에서는 calcium gluconate을 生成치 않았으며 3%에서 最高値를 나타낸 것으로 報告되고 있으며 이는 本實驗結果와 一致한다. 10% glucose 培地에서 生成된 gluconic acid을 完全히 中和하는데 理論的으로 는 CaCO₃ 2.75%가 소모된다.

(4) 炭素源의 影響

table-5에 나타난 바와 같이 여러가지 種類의 炭素源들 중에서 glucose가 가장 良好하며 starch는 不良한 結果를 보여주었다.

Sasaki²⁶⁾들은 glucose, maltose, sucrose, soluble starch 등 13種類를 使用하여 organic acid 生成量을 調査한 結果, 本實驗結果와 同一하게 炭素源으로

Table 5. Effects of carbohydrate sources on the quantity of calcium gluconate produced by KUF-04 strain

Sources	Consumed carbohydrate (g/100ml)	Calcium gluconate produced (g/100ml)	Percentage yield*	Conversion** rate
Glucose	9.36	9.52	95.2	92.7%
Sucrose	9.64	7.57	75.7	71.6%
Dextrose	8.74	4.36	43.6	45.5%
Soluble starch	9.10	3.67	36.7	36.7%

*Percentage yield = $\frac{\text{calcium gluconate (g)}}{\text{used carbohydrate (g)}} \times 100$

**Conversion rate = $\frac{\text{gluconic acid (g)}}{\text{consumed carbohydrate (g)}} \times 100$

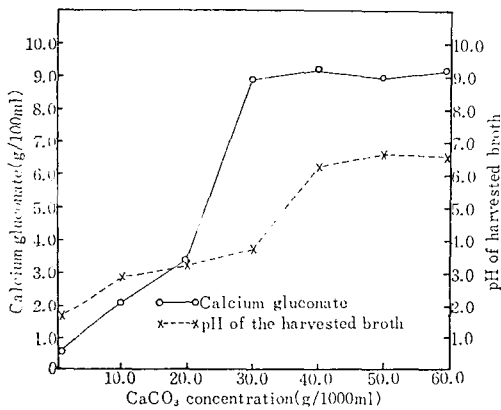


Fig. 6. Effect of CaCO₃ concentration on the quantity of calcium gluconate produced.

1. Cultivation was carried out on a rotary shaker (180 rpm) at 28°C for 36 hours.
2. A 50ml of the medium was charged into each 500ml shaking flask.

서 glucose가 가장優秀하고 starch는 不良하였다는 結論을 얻고 있다.

table 5에 나타난 바와 같이 glucose는 100% 가까이 轉換이 可能하므로 工業的인 규모에 原料로 使用될 수 있다.

(5) 窒素源의 影響

여더 種類의 窒素源을 0.5g/1,000ml의 濃度로 固定시킨 후 calcium gluconate生産量의 比較와, (NH₄)₂HPO₄ 및 (NH₄)₂SO₄의 濃度에 의한 calcium gluconate生産量을 調査하였다.

窒素源의 種類에 따른 研究에서는 NH₄態 窒素를 함유한 (NH₄)₂SO₄, (NH₄)₂HPO₄와 NH₄NO₃ 등이 NO₃態 窒素가 함유된 NaNO₃ 및 KNO₃, 有機態窒素源인 yeast extract 및 peptone 등의 結果보다 優秀性을 나타냈다. (table 6)

이 結果는 Sasaki²⁶⁾들의 結果와 거의 一致된다. Sasaki 들의 實驗結果는 窒素源으로써 (NH₄)₂SO₄, NH₄Cl, (NH₄)₂HPO₄ 및 NH₄NO₃들은 良好하였고, NaNO₃, urea 및 peptone 들은 나빴었다고 한다. 그러나 Taha²⁰⁾들의 結果는 ammonium monohydrogen phosphate > peptone > calcium nitrate > sodium nitrate > ammonium sulphate > ammonium nitrate > uric acid > urea 의 順으로 窒素源으로써 peptone 이 優秀하고 (NH₄)₂SO₄가 나쁜 것으로 보고하고 있다. 이 結果는 本研究와 一致되지 않는 結果이다. 이런 結果는 培養에 使用된 균이 Egyptian Mold Fungi 때문인 것으로 생각된다.

本實驗 結果에 나타난 calcium gluconate의 生産性이 優秀한 (NH₄)₂SO₄의 濃度에 따른 生産量 比較 實驗 結果는 0.1g/1,000ml에서 0.5g/1,000ml의 範圍에서 優秀하게 나타났으며 1.5g/1,000ml 濃도에서는 生産量이 감소하였다(Fig. 7).

糖消費量은 (NH₄)₂SO₄量의 增加에 따라 增加하는 추세로 나타났으며 dry cell weight는 (NH₄)₂SO₄ 含量에 正比例하였다. 菌體量이 增加하면 Calcium gluconate生産이 減少되는 것은 菌自體 增殖과 代謝에 glucose가 消費되기 때문인 것으로 생각된다.

(NH₄)₂SO₄濃도에 의한 結果는 Sasaki²⁶⁾들의 (NH₄)₂SO₄의 濃도 0~0.5% 範圍內에서 (NH₄)₂SO₄量이 增加될수록 calcium gluconate生産量이 增加하였다는 報告와 잘 一致한다.

(NH₄)₂HPO₄ 濃度의 影響은 糖消耗量에는 別差

Table 6. Effects of the nature of a nitrogen source on the quantity of calcium gluconate produced by KUF-04 strain

Nitrogen sources	Final pH of the harvested broth	Weight of carbohydrate consumed (g/100ml)	Weight of calcium gluconate produced (g/100ml)
(NH ₄) ₂ SO ₄	5.70	9.67	11.34
NaNO ₃	5.25	9.60	9.95
NH ₄ NO ₃	5.23	9.80	11.22
(NH ₄) ₂ HPO ₄	5.15	9.71	11.45
KNO ₃	5.55	9.65	9.62
Yeast extract	5.59	9.62	10.76
Peptone	5.83	9.29	9.62

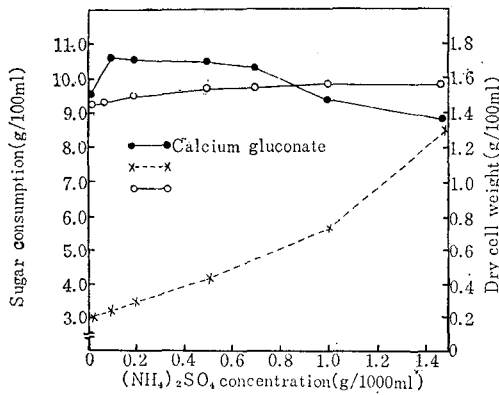


Fig. 7. Effect of (NH₄)₂SO₄ concentration on the quantity of calcium gluconate produced.

1. Cultivation was carried out on a rotary shaker (180 rpm) at 28°C for 36 hours.
2. A 50ml of the medium was charged into each 500ml shaking flask.

異를 나타내지 않았으나, 0.2g/1,000ml 以上の 농도에서는 濃度가 增加될수록 calcium gluconate 生産量이 상당히 減少되는 反面, dry cell weight는 增加하는 結果를 가져왔었다(Fig. 8).

本實驗 結果는 Taha²⁷⁾들의 實驗에서 (NH₄)₂HPO₄의 濃度 0.02g/1,000ml 와 0.06g/1,000ml의 濃度가 가장 優秀하였었다는 結果報告와 大體로 一致된다.

結論的으로 말해서 gluconic acid 生産에서 窒素源으로서 NH₄態 窒素源이 優秀하며, 濃度는 0.1g/1,000ml에서 0.5g/1,000ml의 낮은 쪽이 좋았

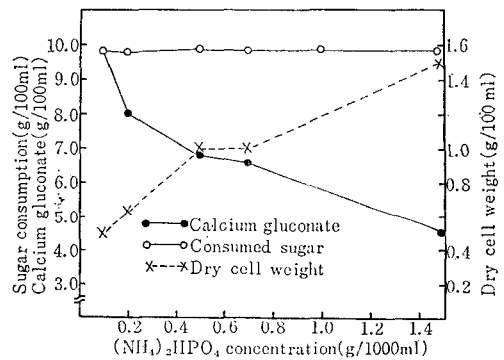


Fig. 8. Effect of (NH₄)₂HPO₄ concentration on the quantity of calcium gluconate produced.

1. The experiment was carried out on a rotary shaker (180 rpm) at 28°C for 36 hours.
2. A 50ml of the medium was charged into each 500ml shaking flask.

다고 말할 수 있다.

(6) KH₂PO₄ 濃度の 影響

KH₂PO₄의 添加 効果에 대한 結果는 無添加時에도 상당량의 calcium gluconate 量이 生成되었으나 0.1g/1,000ml 농도에서 더 優秀하였으며, KH₂PO₄의 濃度가 增加되면 오히려 減少되는 傾向이 있었다. 한편 residual sugar 농도는 KH₂PO₄量이 增加되면 減少되는 趨勢이었다(Fig 9).

Taha²⁷⁾들의 30°C로 6일간 培養시킨 結果를 보면 0.188g/1,000ml 濃度에서 가장 良好하였

Table 7. Effects of vitamins on the quantity of calcium gluconate produced

Vitamins	Final pH of the harvested broth	Weight of carbohydrate consumed (g/100ml)	Weight of calcium gluconate produced (g/100ml)	Percentage yield*
None	6.00	9.42	10.37	103.7
Thiamine	5.85	9.43	10.08	100.8
PABA**	6.25	9.45	8.94	89.4
Niacin	5.90	9.44	10.08	100.8
Riboflavin	6.05	9.49	10.31	103.1
Pantothenic acid	5.95	9.46	10.08	100.8
Pyridoxin	5.65	9.66	10.31	103.1
Biotin	6.10	9.26	9.85	98.5
Folic acid	5.80	9.60	9.74	97.4

*Percentage yield = $\frac{\text{calcium gluconate (g)}}{\text{used carbohydrate (g)}} \times 100$

**Para-amino-benzoic acid

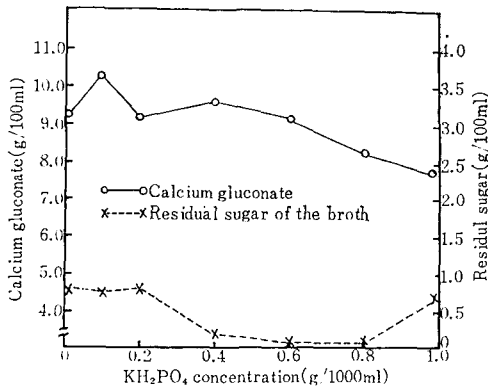


Fig. 9. Effect of KH_2PO_4 concentration on the quantity of calcium gluconate produced.

1. Cultivation was carried out on a rotary shaker (180 rpm) at 28°C for 36 hours.
2. A 50ml of the medium was charged to each 500ml shaking flask

濃도가 이보다 많거나 적으면 gluconate의生産量이減少되는 결과로 보고하고 있어서 本研究結果와 大體로 一致된다.

(7) MgSO_4 濃度の影響

MgSO_4 의 添加 効果에 대한 結果는 無添加時에 同 높은 水準의 Calcium gluconate가 生成되었으

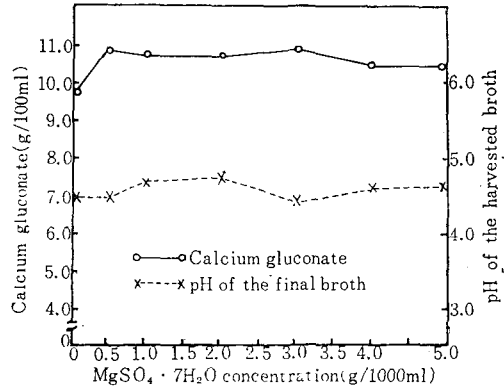


Fig. 10. Effect of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ concentration on the quantity of calcium gluconate produced.

1. Cultivation was carried out on a rotary shaker (180 rpm) at 28°C for 36 hours.
2. A 50ml of the medium was charged into each 500ml shaking flask.

며 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 濃度 0.50g/1,000ml에서 가장 優秀하였으며 濃度가 增加되면 反대로 多少減少하는 傾向을 보였다(Fig 10). 本結果는 Taha²⁷⁾들의 報告에서 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 濃度가 0.156g/1,000ml까지는 calcium gluconate生産量이 增加되나 濃度가 增加되면 減少되는 結果와 一致된다.

Table 8. Effects of amino acids on the quantity of calcium gluconate produced

Amino acids	Calcium gluconate produced (g/100ml)	Amino acids	Calcium gluconate produced (g/100ml)
Glycine	9.97	Aspartic acid	9.17
Lysine	9.73	Valine	9.85
Alanine	9.51	Isoleucine	8.02
Glutamic acid	9.73	Phenylalanine	9.51
Tyrosine	9.62	Tryptophan	9.17
Leucine	9.17	Serine	8.25
Histidine	9.73	Proline	9.37
Cystine	9.39	Threonine	7.79
Methionine	9.51	None	9.51
Arginine	9.05		

Calcium gluconate의生産량을增加시키기 위하여 MgSO₄는 重要な成分으로 생각되며 MgSO₄·7H₂O의濃度は 0.5g/1,000ml以下가 기대된다.

(8) Vitamin의影響

Table 7에表示된 여러種類의 vitamin들을 2 μg/ml濃도로 固定하여 KUF-04 菌株의 calcium gluconate生産性에 미치는 效果를 檢討한 결과 添加效果는 認定되지 않았다.

한편 Paraaminobenzoic acid의 添加는 不良한 結果를 나타내었으며 이는 계속 研究를 통하여 원인이 밝혀져야 할 것으로 생각된다.

(9) Amino acid의影響

Tanabe Seiyaku 製 amino acid 18種에 대하여 0.1g/1,000ml 농도에서 검토하였다.

Table 8에서 보여준 바와 같이 添加效果는 期待할 수 없었으며 오히려 vitamin들의 結果와 같이 isoleucine, serine, threonine들은 control과 比較하여 다소 不良하였다.

Amino acid의 添加效果에 관한 研究는 아직 잘 이루어지고 있지 않은 듯하며 本實驗 結果에 대하여는 계속 實驗을 통하여 究明되어야 할 것으로 生覺된다.

要 約

서울 近郊의 土壤과 나무잎을 試料로 採取하여 여기서 gluconic acid의 生産性이 優秀한 *Aspergillus* SP.로 同定된 暫定的으로 KUF-04로 命名한 菌株를 分離하여 여러가지 培養條件으로 gluconic acid 生産性을 研究하였다.

그 實驗 結果들을 要約하면 다음과 같다.

1. 培養時間은 30時間에서 40時間 사이가 適合하

였으며 40時間이 超過되면 오히려 生産량이 減少하였다.

2. CaCO₃는 10g/100ml의 Glucose를 培地에서 3g/100ml以上이 添加되어야 良好하였다.

3. 炭素源으로서는 Glucose의 chain이 갈수록 不良하였으며 glucose가 가장 適合하였다.

4. 窒素源으로서는 NH₄態 窒素가 NO₃態나 有機態 窒素보다 優秀한 結果이었으며 그濃度は (NH₄)₂SO₄로서 0.1g/1,000ml 내지 0.5g/1,000ml 이었다.

5. 無機鹽으로서는 KH₂PO₄와 MgSO₄를 少量 添加시키는 便이 生産性을 向上시켰으며 그濃度は 前者는 0.1g/1,000ml 이고 後者는 0.5g/1,000ml 이었다.

한편 微量添加物로서 Vitamin와 amino acid는 別다른 效果를 認知할 수 없었다.

以上과 같이 KUF-04菌株를 잘 이용한다면 앞으로 gluconic acid를 工業적으로 生産할 수 있을 것으로 期待된다.

參 考 文 獻

1. 徐正損, : 酒精工業, 26, 90 (1978)
2. "7078의 化學商品", 化學工業日報社, 日本, p. 789 (1978).
3. Boutroux, L. : Compt. rend., 91, 236 (1880).
4. Asai, T. : J. Agri. Chem. Soc. Japan, 11, 499 (1935).
5. Pervozvanskii, V. V. : Microbiology (U. S. S. R.), 8, 149 (1935).
6. Lookwood, L. Tabenkin B. and Ward, G. E. : J. Bact., 42, 51 (1942).

7. Squros P.L. and Hartsell, S.E. : *J. Bact.*, **64**, 811 (1952).
8. Mollilard, M. : *Copt. rend.*, **174**, 881 (1952).
9. May, O.E. Herrick, H. T. Thom C. and Chuch, M.B. : *J. Biol. Chem.*, **75**, 417 (1927).
10. Schreyer, : R. *Biochem. Z.*, **240**, 295 (1931).
11. Sakaki, Y. and Takao, : S. *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, **28**, 752 (1964)
12. Sakaki, Y. and Takao, S. : *J. Agr. Chem. Soc. Japan* **32**, 576 (1958).
13. Walker, T. K. and Ramachandran, K. : "Intern. Congr. Biochem., Abstrs. of Communications." 1st Congr., Cambridge, Engl., p. 556 (1949)
14. Thies, W. Parasitenk., *Zentr. Bakt. : Abs.*, **82**, 321 (1930).
15. Currie: J.N. U.S. Patent 1896811 (1933).
16. Booth, : C. "Method in Microbiology," Vol. 4, Academic press, New York, p. 66 (1971).
17. 朱忠烈 : "分析化學", 改訂版 探求堂, 서울, p. 486 (1975).
18. 柳洲鉉, 梁漢喆外 2 人 : "食品工學實驗", 第 II 券, 探求堂, 서울, p. 74 (1971).
19. Carlile, M.J. : "Method in Microbiology," Vol. 4, Academic press, New York, p. 252(1971).
20. Holowitz, W. : "Method of analysis of A. O. A. C., "Association of Official Analytical Chemists, Washington. D.C. 20044, p. 574 (1975).
21. "The Sadtler Standard Spectro," Vol. 1, Sadtler Research Lab. P. R. 108.
22. John N. Porter, : "Method in Enzymology," XL III, Academic press, New York, p. 37 (1975).
23. Raper K. B. and Fennell, D. I. : "The Genus *Aspergillus*," Robert E. Krieger Publishing Company, New York, p. 20 (1971).
24. Booth, : C. "Method in Microbiology" Vol. 4, Academic press, p. 20 (1971).
25. Williams S. T. and Cross, T. : "Methods in Microbiology," Vol. 4, Academic press, New York, p. 320 (1971).
26. Sasaki, Y. and Takeo, S. : *J. Ferment. Technol.* **48**, 368 (1970).
27. Egz Eldin M. Taha, Ahmed M. Gad and Mahassen H. Abasy, *Arohiv fur Mikrobiologie*, **36**, 109 (1960).