

생물응집제로서 폐영지박 Chitosan-glucan 복합물의 이용성

오준현 · 조홍연¹ · 양한철*

고려대학교 식품공학과, ¹고려대학교 식품생명공학과

Utilization of Chitosan-glucan Complex Extracted from *Ganoderma lucidum* Wastes as Biofloculant

Chun-Hyun Oh, Hong-Yon Cho¹ and Han-Chul Yang*

Department of Food Technology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

¹Department of Food and Biotechnology, Korea University, Chochiwon 339-700, Korea

Abstract — For the purpose of development of non-toxic and biodegradable flocculant, chitosan complex was isolated from *Ganoderma lucidum* wastes. The isolated complex was identified as the expected chitosan-glucan complex by IR spectra. The complex was extracted by treatment of 50% NaOH solution at 120°C for 5 hrs, namely optimal condition and solubilized with 2% acetic acid for further use as flocculant. Preliminary experiments showed that the solubilized complex had higher flocculation activity of 1.3 fold than commercial chitosan at 400 mg/l concentration in soybean curd wastewater. Also the solubilized complex removed 83% of MLSS and 60% of COD in the soybean curd wastewater treated by photosynthetic bacteria, 50% of turbidity and 21% of MLSS in sugar industry wastewater, and 90% of turbidity and 89% of MLSS in alcohol fermentation wastewater. Bacterial cell flocculation activities of the solubilized chitosan-glucan complex were 89% in *Bacillus subtilis* broth, 81% in *Streptococcus lactis* broth, and more than 90% in *Escherichia coli* broth after standing for 2 days. The results reveal that chitosan-glucan complex from *Ganoderma lucidum* wastes can substitute for commercial chitosan as non-toxic and biodegradable flocculant.

Chitin과 chitosan은 cellulose와 함께 지구상에서 가장 풍부한 biomaterial의 하나로 갑각류와 곤충의 상피조직, 곰팡이의 세포벽 등에 주 구성분으로 존재하고 있다(1-3). 최근에 이르러 응집성을 비롯한 다양한 chitosan의 기능이 밝혀짐에 따라 chitosan 함유 소재 및 관련 유도체들에 대한 새로운 생리, 약리 기능의 탐색, 갑각류의 껍질 이외 천연소재 급원의 개발, 미생물에 의한 polyhexosamine계 물질생산 등의 연구가 주목을 받고 있다(4-9). 현재 시판되고 있는 chitosan의 대부분은 갑각류의 껍질로부터 크게 탈단백 공정과 탈회 공정에 의해 chitin을 생산하는 단계와 chitin의 탈아세틸화 공정에 의한 chitosan을 생산하는 단계를 거쳐 공업적으로 생산되고 있다(10).

영지(*Ganoderma lucidum* (Fr.) Karsten)는 구멍장이 버섯과에 속하는 담자균류로 단단한 세포벽을 가지고 있다(11, 12). 버섯류의 세포벽은 원섬유 성분과

무정형 성분과의 혼합으로 구성되어 있으며 원섬유 성분은 glucose의 β -1, 4 결합을 갖는 중합체인 chitin과 cellulose이며, 무정형 성분으로 단백질, mannan 이외에 β -1, 3, β -1, 6 및 α -1, 3 결합을 가지는 glucan으로 이루어져 있다(13). 인공재배가 성공한 이래 영지의 유효성분을 이용한 의약품 및 드링크제가 시판되고 있으나 현 유기용매 또는 열수에 의한 추출율은 고형분 기준 10% 내외에 머물고 있는 실정에 있다.

따라서 본 연구에서는 식품산업 폐수처리시 발생하는 슬러지의 자원화를 목표로 균체의 효율적인 회수와 사료, 토양개선편제, 유기질 비료 등으로의 용도 개발을 위해 안전성과 원료가 확보된 chitosan-glucan 복합물을 폐영지박으로부터 추출한 후 응집제로서의 이용가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

사용 균주

Key words: Cell flocculation, chitosan-glucan complex, *Ganoderma lucidum* wastes

*Corresponding author

본 실험에 사용한 균주 중 광합성세균은 전보(14)에서 보고한 바 있는 균체생산용 균주 *Rhodospirillum rubrum* P17을, 그 이외 *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus lactis* 등은 연구실 보관 균주를 사용하였다.

사용배지 및 대상폐수

광합성세균 seed culture용 배지는 Cohen-Bazire (15), Sawada *et al.*(16)가 사용한 배지를 변형시켜 탄소원으로 각각 2 g/l의 농도 Na-acetate(AA), Na-propionate(PA)를 첨가하였고 *E. coli* 및 *Bacillus subtilis*는 LB 배지, *Streptococcus lactis*는 MRS 배지를 사용하였다. 대상폐수는 P사의 두부공장 폐수, J사의 주정폐수, C사의 제당폐수 및 M농장에서 배출되는 돈분폐수를 4°C 이하에서 보관하면서 사용하였다.

폐영지박으로부터 chitosan-glucan 복합물, chitosan 및 glucan의 제조

I제약회사의 영지박을 열풍건조기에서 2~3일 건조시켜 homogenizer로 마쇄한 10 g에 50%(W/V) NaOH 100 ml을 가하여 120°C oil bath에서 환류시키면서 4 시간 추출한 후 증류수로 세척액이 중화될 때까지 수세, 감압여과한 다음 동결건조하여 chitosan-glucan 복합물을 제조하였다(17). Chitosan과 glucan은 chitosan-glucan 복합물 5 g에 0.5N acetic acid 500 ml을 첨가하여 1분간 homogenization시킨 후 균질화된 용액을 100°C oil bath에서 환류시키면서 12 시간 추출하고 10,000×g에서 10분간 원심분리하였다. 이로부터 얻은 침전물을 증류수로 중화될 때까지 수세한 후 48시간 동결건조하여 glucan을 제조하였으며, chitosan은 상등액을 1N NaOH로 pH 8.5로 조정하여 얻은 침전물을 수세한 후 48시간 동결건조시켜 제조하였다(Fig. 1).

응집도 측정

응집도의 측정은 각 시료들에 농도별로 응집제를 첨가, 20초간 vortexing한 후 1시간 정지에 의해 형성된 상등액을 사용하여 각종 폐수들에 대한 응집능은 turbidometer(Turner TD-40 Nephelometer)로 탁도를 측정, NTU(Nephelometric Turbidity Unit)로 나타내었으며 광합성세균으로 처리한 두부공업폐수, Kaolin 용액, 균체 현탁액 등에 대한 응집활성은 전보(14)에서와 같이 660 nm에서 흡광도를 측정, 아래 식에 따라 결정하였다.

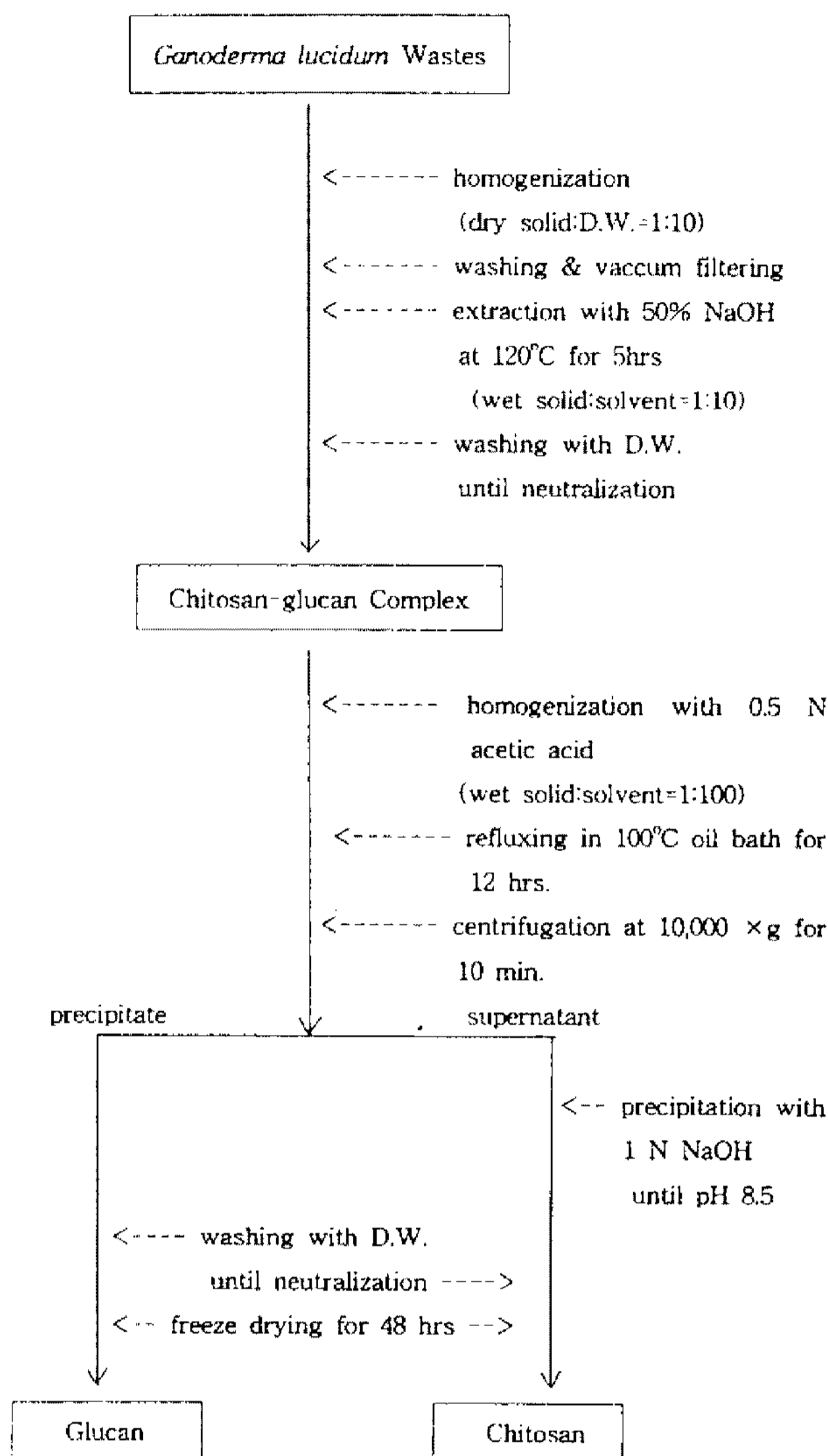


Fig. 1. Overall process for preparation of chitosan-glucan complex as flocculant from *Ganoderma lucidum* wastes.

$$\text{Flocculation activity} = \frac{\text{Abs. at 660 nm at 0 min} - \text{Abs. at 660 nm at 60 min}}{\text{Abs. at 660 nm at 0 min}} \times 100$$

MLSS(Mixed Liquor Suspended Solids) 및 COD (Chemical Oxygen Demand)의 측정

MLSS의 양은 103~105°C의 건조기에서 미리 건조한 유리섬유 여과지(Whatman, G/FB)로 시료를 여과하고 2시간 건조시킨 다음 desiccator에서 방냉후의 무게와 여과전의 유리섬유 무게의 차이로 측정하였다(18). COD는 산화제 중크롬산카리(K₂Cr₂O₇)를 이용 유기물을 화학적으로 산화시킬 때 소모된 산소량으로 측정하였다(18):

Infra-Red(IR) Spectra의 검정

시판용 chitosan과 폐영지박으로부터 추출한 상기의 chitosan-glucan 복합물, chitosan과 glucan, 시판용 curdlan을 막자사발로 분말화한 시료를 전보(14)에서와 같이 처리, 조제한 후 Ft-IR spectrophotometer (BOMEM Michelson Series MB 102-C15)를 사용하여 spectra를 검정하였다.

Glucosamine의 정량

Glucosamine의 정량은 Johnson(19)의 방법에 따라 아래와 같이 흡광도를 측정하고 glucosamine의 표준곡선으로부터 환산, 정량하였다. 시료 20 mg을 5 ml sealing tube에 넣고 6N HCl 3 ml을 첨가한 후 100°C에서 12시간 가수분해시켰다. 가수분해물에 2 차 증류수 40 ml을 첨가하고 1N NaOH로 pH를 7.0으로 조정된 후 이를 이온교환수지(Sep-pak, C:18)를 사용하여 색소를 제거한 다음 증류수로 100 ml volumetric flask에 채웠다. 이 용액 1 ml과 acetylac-tone reagent 1 ml을 screw cap tube에 넣고 100°C water bath에서 30분간 가열한 후 실온에서 30분 냉각시키고 5 ml의 absolute ethanol과 1 ml의 Ehrlich reagent(2.67%(W/V) p-dimethylaminobenzoaldehyde 용매 absolute ethanol:35% HCl=1:1)를 가하여 혼합한 다음 실온에서 25분간 방치, 530 nm에서 흡

광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

Chitosan-glucan 복합물의 최적 추출조건

폐영지박으로부터 chitosan-glucan 복합물의 최적 추출조건을 검토하기 위해 NaOH 농도(40~50%(W/V)), 온도(100~120°C) 및 추출시간(3~5시간)들이 추출물의 glucosamine 함량에 미치는 영향을 각 추출 조건에서 비교 검토하였다. Table 1에서와 같이 chitosan-glucan 복합물의 추출중량은 NaOH 농도와 온도가 높고, 추출시간이 길어질수록 최대 3.88 g에서 최소 2.48 g까지 감소하는 경향을 나타내었으나 glucosamine 함량은 약 2.3배 증가되었다. 이는 알칼리 추출이 진행됨에 따라 glucan, 단백질, 지질 등이 알칼리에 의해 용해되어 중량은 감소되는 반면 chitosan-glucan 복합물 중의 glucosamine 함량은 알칼리에 불용성인 chitosan 이외의 물질들이 제거됨으로써 상대적으로 증가하는 결과를 나타내었다. 상기의 각 추출조건에서 glucosamine의 최대 추출율을 보인 조건은 NaOH 농도 50%, 120°C에서 5시간 추출시 추출율은 83.5%이었으며 이 결과는 Shimahara 등(20)이 보고한 *Absidia* 속에서 37~50%, *Actinomucor* 속에서 12%, *Circinella* 속에서 21~47%, *Mucor* 속

Table 1. Conditions for preparation of chitosan-glucan complex from *Ganoderma lucidum* wastes

NaOH Conc. (%)	Temp. (°C)	Time (hr)	Extract Weight (g)	Glucosamine Contents (mg/g)	Total Glucosamine (mg)	Glucosamine* Yield (%)
40	100	3	3.88	76.5	296.8	57.1
40	100	4	3.72	81.2	302.1	58.1
40	100	5	3.57	85.3	304.5	58.6
40	110	3	3.77	79.5	299.7	57.6
40	110	4	3.58	84.2	301.4	58.0
40	110	5	3.42	92.7	317.0	61.0
40	120	3	3.12	97.4	303.9	58.4
40	120	4	2.95	100.6	296.8	57.1
40	120	5	2.80	115.3	322.8	62.1
50	100	3	3.28	95.1	311.9	60.0
50	100	4	3.08	104.7	322.5	62.0
50	100	5	2.87	114.3	328.0	63.1
50	110	3	2.67	116.0	309.7	59.6
50	110	4	2.44	140.0	341.6	65.6
50	110	5	2.25	147.0	330.8	63.6
50	120	3	2.54	128.5	326.4	62.8
50	120	4	2.52	142.5	359.1	69.1
50	120	5	2.48	175.0	434.0	83.5

*Glucosamine yield was calculated by total glucosamine (mg)/glucosamine of raw material (520 mg)×100.

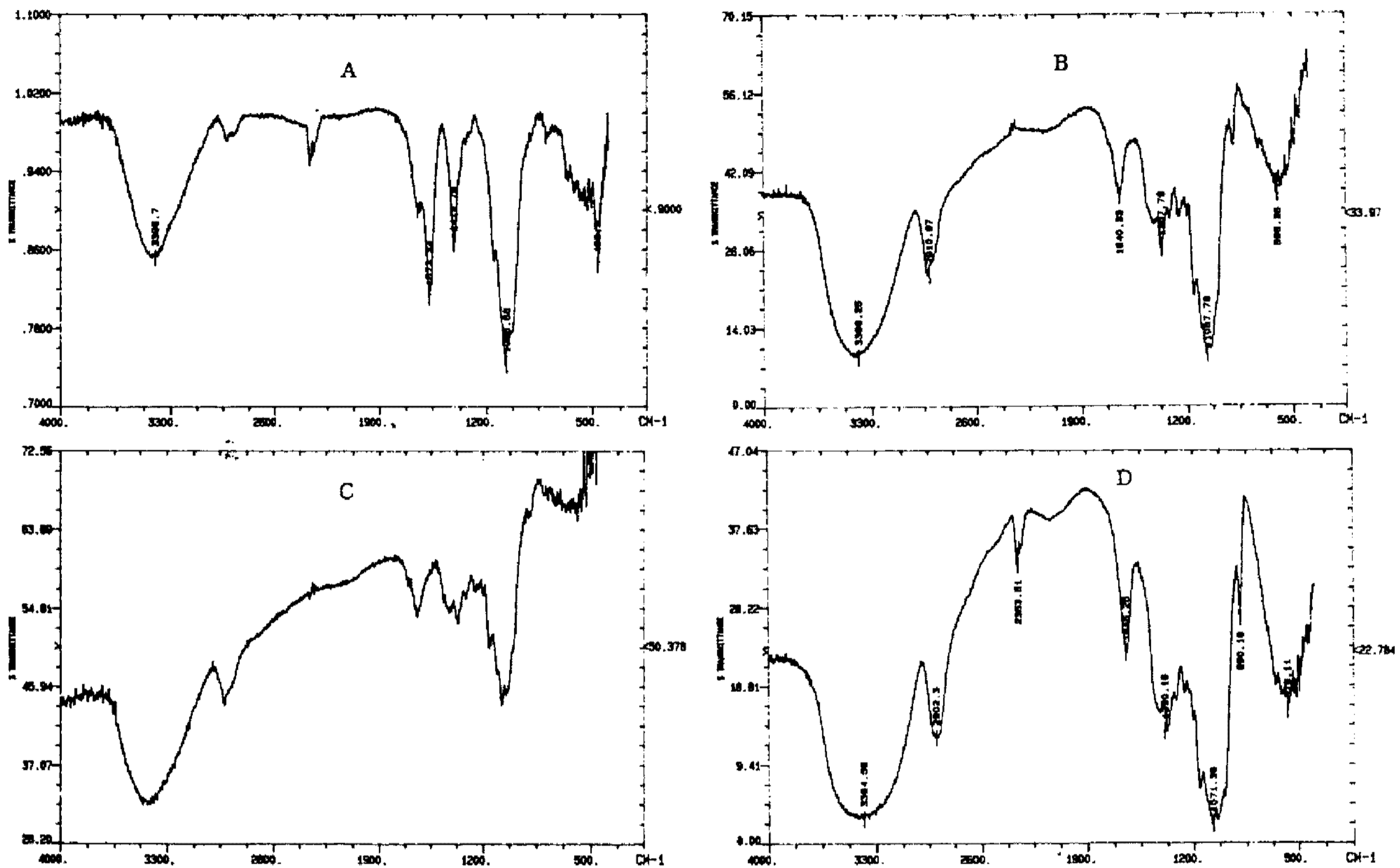


Fig. 2. IR spectra of chitosan (A), glucan (B) and chitosan-glucan complex (C) isolated from *Ganoderma lucidum* wastes and commercial curdlan (D)

에서 7~15% 등의 추출수율과 비교할 때 폐영지박의 추출수율이 매우 우수함을 알 수 있었다.

Chitosan-glucan 복합물의 IR spectra

Sannan 등(17, 21)은 chitin 또는 chitosan이 특이적으로 1665, 1550 cm^{-1} 에서 peak를 가지며 이들은 각각 amid I이라는 C=O peak와 NH 굽힘에 의한 amid II에 해당하고 탈아세틸화도가 높을수록 이 peak들이 약해짐을 보고한 바 있다. Chitosan-glucan 복합물로부터 추출한 chitosan의 IR spectrum을 검토한 결과, Fig. 2(A)의 폐영지박 chitosan은 1665, 1550 cm^{-1} 부근에서 chitosan의 특징적 peak를 보였으며 Sannan의 검량식을 이용하여 구한 탈아세틸화도는 약 74%로 산출되었다. Fig. 2의 (B)는 chitosan-glucan 복합물 중 추출된 glucan의 IR spectrum으로 chitosan의 spectrum과 상이한 pattern을 보였으며 Fig. 2의 (D)의 curdlan과 거의 유사한 spectrum을 나타냄으로써 glucan으로 추정되었다. Fig. 2의 (C)는 chitosan-glucan 복합물의 IR spectrum으로 각각 chitosan과 glucan의 특징적 peak를 나타냄으로써 영지박 추출물은 chitosan과 glucan이 주성분으로 구성되어 있음을 알 수 있었다.

Chitosan-glucan 복합물의 COD 및 MLSS 제거 효과

Table 1에 나타난 83.5%의 높은 glucosamine의 수율에도 불구하고 Fig. 1의 공정에 따라 얻은 chitosan의 총량은 glucan에 비해 상대적으로 적은 값을 나타내었다. 따라서 chitosan-glucan 복합물의 응집활성을 측정함으로써 제조공정의 단순화와 β -1,3-glucan이 함유된 생물응집제의 실용화 가능성을 검토하고자 하였다(Fig. 3). 제조한 chitosan-glucan 복합물을 chitosan의 가용화를 위해 2% 초산용액에서 4시간 동안 교반한 후 광합성세균 처리 두부공업폐수에 농도별로 첨가한 결과 400 mg/l의 농도에서 MLSS 83%와 COD 60%의 제거율을 나타냄으로써 MLSS 제거율에서 87%를 보인 시판용 chitosan과 비슷한 효과를, COD 제거율은 시판용 chitosan 40%에 비해 약 20% 정도 향상된 효과를 보였다(14). 또한 660 nm에서의 흡광도로부터 산출되는 flocculation activity가 chitosan 처리시보다 약 1.3배 높은 값을 나타냄으로써 상등액의 투명도가 증가하였다. COD 제거율과 투명도 증가에 관한 chitosan-glucan 복합물의 기작은 아직 밝혀진 바 없으나 chitosan 단독 첨가에 비해 우수한 효과를 갖는 점과 glucan 단독 첨

가시에는 영향을 미치지 않는 점으로부터 β -1,3-glu-
can은 chitosan의 응집능을 상승시키는 효과를 나타
내는 것으로 추측되었다.

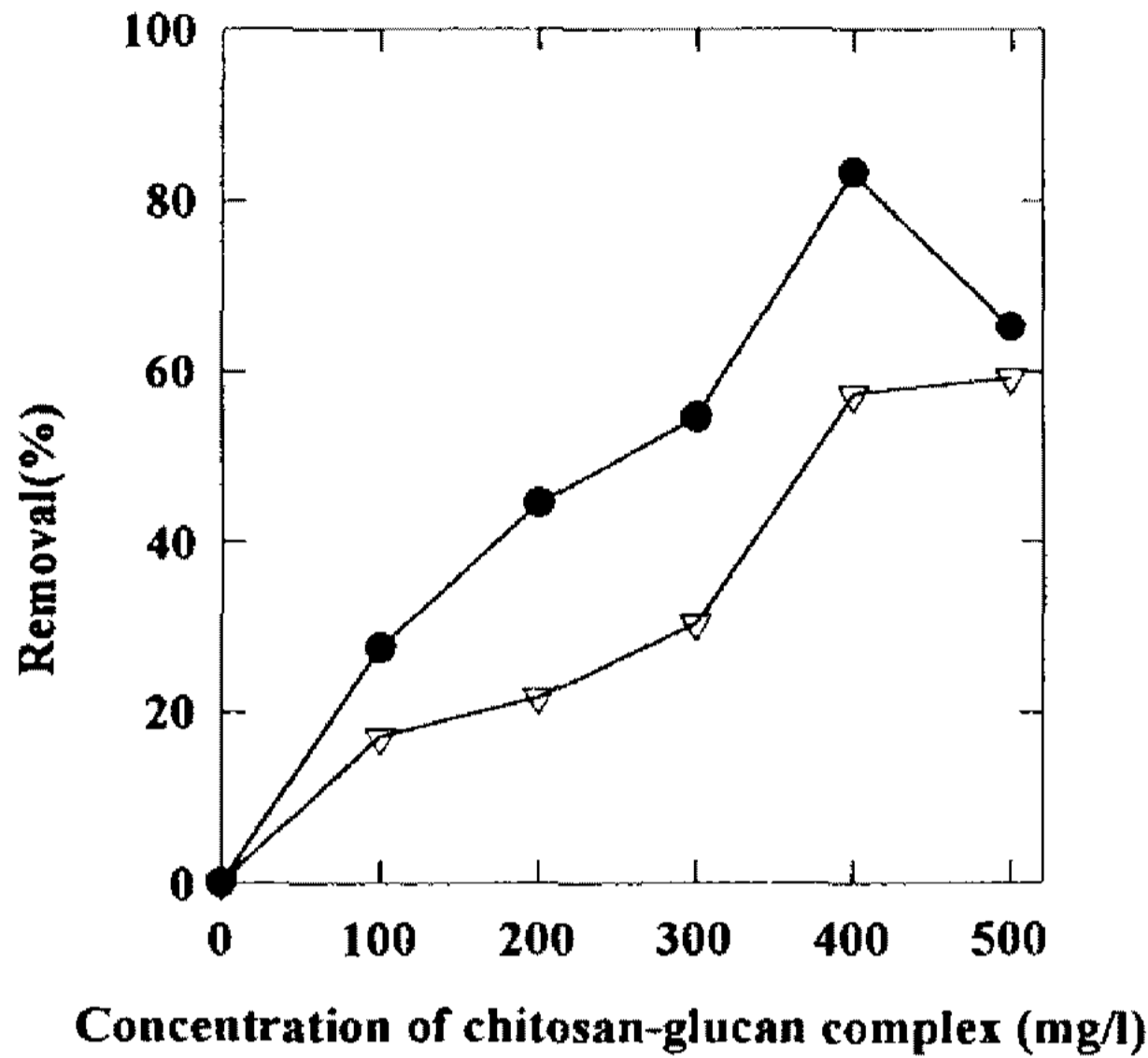


Fig. 3. COD and MLSS removal from photosynthetic bacteria treated soybean curd wastewater by chitosan-glucan complex.

The chitosan-glucan complex stock solution of 5,000 mg/l in 2% acetic acid was prepared by stirring for 4 hrs at room temperature for solubilize chitosan moiety.

The samples for measurement of COD (▽-▽) and MLSS (●-●) are taken from supernatant of wastewater after flocculation at pH 7 for 1 hr.

각종 폐수에 대한 탁도 및 MLSS 제거효과

각종의 고농도 유기폐수를 대상으로 chitosan-glu-
can 복합물의 응집능을 탁도와 MLSS의 증감에 따라
검토한 결과는 Table 2와 같다. 탁도의 감소와 MLSS
의 제거율을 공업용 chitosan과 비교할 때 chitosan-
glucan 복합물은 두부공업폐수, 제당폐수, 주정공업
폐수에서 비슷하거나 높은 효과를 나타내었으며 돈
분폐수에서는 효과가 미미하였다. 이는 Fig. 1에 따라
폐영지박으로부터 제조한 chitosan-glucan 복합물이
폐수처리 후 부생하는 슬러지용 응집제로서 뿐만 아
니라 식품산업 폐수처리시 전처리 공정에도 이용될
수 있음을 보여준 결과로 혐기성 소화 또는 희석함
없이 고농도 유기폐수의 정화처리 가능성을 나타내
었다.

미생물 세포들에 대한 flocculation 효과

폐수처리 공정의 반응오니와 균체의 효율적인 응
집성을 조사하기 위해 광합성세균 외에 대표적인 세
균들에 대한 chitosan-glucan 복합물의 응집효과를
0.85% 생리식염수와 두부공업폐수에 균체를 각각 현
탁시킨 계를 사용하여 검토하였다(Table 3). 대조구인
kaolin에 대하여 공업용 chitosan보다 chitosan-glu-
can 복합물은 낮은 응집활성을 나타내었으나 *Bacillus su-*
*btilis*의 경우 현탁매질에 관계없이 공업용 chitosan과
비슷한 응집능을 보였고 *Streptococcus lactis*에 대해
서는 응집활성이 81.2%로 공업용 chitosan보다 2.6배
높은 효과를 나타내었다. 한편 *E. coli*에 대한 chito-

Table 2. Reduction of turbidities and MLSS in various wastewater by commercial chitosan and chitosan-glucan complex

Wastewater	Turbidity (NTU)			MLSS (g/l)		
	Raw waste-water	Commercial chitosan	Chitosan-glucan complex	Raw waste-water	Commercial chitosan	Chitosan-glucan complex
Soybean curd wastewater	293.6	230.2(21.7)*	218.2(25.7)	1.52	0.56(63.2)	0.49(67.8)
Sugar industry wastewater	25.2	15.1(40.1)	12.7(49.6)	0.28	0.20(28.6)	0.22(21.4)
Alcohol fermentation wastewater	1112.5	183.3(83.6)	112.2(90.0)	4.72	0.54(88.6)	0.52(89.0)
Swine wastewater	177.4	134.5(24.2)	161.0(8.9)	1.70	1.46(14.1)	1.60(5.89)

Final concentration of commercial chitosan and chitosan-glucan complex in each wastewater was 40 mg/l and 400 mg/l of optimal concentrations established by previous experiment, respectively (14).

* () are percentage of removal efficiencies in comparison with raw wastewater.

Table 3. Flocculation effects of commercial chitosan and chitosan-glucan complex on kaolin, various cells in saline and soybean curd wastewater

	Abs. at 660 nm		Flocculation activity (%)*
	0 min	60 min	
Kaolin** + chitosan	1.418	0.363	74.4
Kaolin + complex	1.418	0.732	48.4
<i>Escherichia coli</i> + chitosan	1.2	1.196(0.572)***	0.3(52.3)
<i>E. coli</i> + complex	1.2	1.183(0.120)	1.4(90.0)
<i>Bacillus subtilis</i> + chitosan	1.2	0.016	98.7
<i>Bacillus subtilis</i> + complex	1.2	0.132	89.0
<i>Streptococcus lactis</i> + chitosan	1.2	0.827	31.1
<i>Streptococcus lactis</i> + complex	1.2	0.226	81.2
<i>E. coli</i> in wastewater + chitosan	1.2	1.143(0.484)	4.8(59.7)
<i>E. coli</i> in wastewater + complex	1.2	1.102(0.106)	8.2(91.2)
<i>B. subtilis</i> in wastewater + chitosan	1.2	0.123	89.8
<i>B. subtilis</i> in wastewater + complex	1.2	0.152	87.3
<i>S. lactis</i> in wastewater + chitosan	1.2	0.691	42.4
<i>S. lactis</i> in wastewater + complex	1.2	0.196	83.7

Final concentration of commercial chitosan and chitosan-glucan complex in each solution was 40 mg/l and 400 mg/l, respectively.

*Flocculation activity was calculated as described under Material and Methods after standing for 1 hr.

**The concentration of kaolin stock solution was 5,000 mg/l.

*** () are the absorbances and flocculation activities measured after standing for 2 days.

san과 chitosan-glucan 복합물의 첨가는 응집능을 초기에는 전혀 관찰할 수 없었으나 48시간까지 정치시간의 연장에 의해 복합물 첨가시 90% 이상의 높은 응집활성을 보임으로써 공업용 chitosan보다 약 1.5배 효과가 있음을 알 수 있었다.

요 약

식품산업폐수처리시 부생되는 sludge의 효율적인 회수와 회수된 균체의 용도개발을 위한 천연 고분자 응집제의 개발을 목적으로 폐영지박으로부터 chitosan-glucan 복합물의 최적추출조건과 응집제로서의 특성을 검토하였다. Chitosan의 새로운 급원으로서 폐영지박으로부터 chitosan 복합물을 분리, IR 분석을 행한 결과 chitosan-glucan 복합물임을 확인하였다. 50% NaOH, 120°C에서 5시간 동안 추출된 복합물의 glucosamine 추출수율은 83.5%이었으며 chitosan-glucan 복합물의 응집효과를 검토하기 위해 상온에서 4시간 동안 2% acetic acid로 용출시킨 복합물은 400 mg/l 농도에서 공업용 chitosan보다 1.3배 우수한 응집효율을 나타내었다. 응집제로서 chitosan-glucan 복합물의 특성을 검토한 결과 두부공업폐수에서 MLSS 83%와, COD 60%, 제당폐수에서 탁도 50%와 MLSS 21%, 주정폐수에서 탁도 90%와 MLSS 89%의 제거

율을 나타내었다. 균체에 대한 응집효과는 광합성세균 외 *Bacillus subtilis*에 대해 89%, *Streptococcus lactis*에 대해서는 81%, *E. coli*는 2일 정치후 90%의 양호한 응집효과를 나타내었다. 이 결과들은 공업용 chitosan과 비교할 때 응집능이 같거나 보다 우수한 효과를 보임으로써 폐영지박으로부터 생분해성 응집제의 개발 가능성과 높은 실용성을 제시해 주었다.

감사의 글

본 연구는 과학재단의 연구비(91-0204-10) 지원에 의하여 수행된 연구의 일부로 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Gardner, K.H. and J. Backwell. 1975. Refinement of the structure of β -chitin. *Biopolymer* 14: 1581.
2. Hackman, R.H. and M. Goldberg. 1965. Studies on chitin, The nature of α -, β -chitins. *Aust. J. Biol. Sci.* 18: 935.
3. Muzzarelli, R.A.A. 1987. Chitin "The polysaccharides" Vol. 3. Aspinall, G.O. Pp. 417. ed Academic press, New York.
4. Bough, W.A. 1975. Reduction of suspended solids

- in vegetable canning waste effluents by coagulation with chitosan. *J. Food Sci.* **40**: 297.
5. 橋本正憲. 1986. 키토산의 식품工場における凝集劑としての利用. *Food Chemical.* **11**: 61.
 6. Agerkvist, I., L.B. Erikson, and S.O. Enfords. 1988. Slective flocculation with chitosan in *E. coli* cell homogenates. Pp. 543. In "Proceedings of the 4th international conference on chitin and chitosan".
 7. Peniche-Covvas, C., L.W. Alvarez, and W. Argelles-Monal. 1992. The adsorption of Mercuric ions by chitosan. *J. Applied Polymer Sci.* **46**: 1147.
 8. Qin, Y. 1993. The chelating properties of chitosan fibers. *J. Applied Polymer Sci.* **49**: 729.
 9. Knorr, D. 1983. Dye binding properties of chitin and chitosan. *J. Food Sci.* **48**: 36.
 10. Castellanos-Peres, N., M. Maldonado-Vega, G. Fernandez-Villagomez, and S. Caffarel-Mendez. 1988. An evaluation of the coagulating ability of chitosans from different crustacea species and fungi. Pp. 567. In "Proceedings of the 4th international conference on chitin and chitosan".
 11. Sanford, P.A. 1988. Chitosan: Commercial uses and potential applications. Pp 51. In "Proceedings of the 4th international conference on chitin and chitosan".
 12. Muzzarelli, R.A.A., F. Tanfani, and G. Scapini. 1980. Chelating, film-forming, and coagulating ability of chitosan-glucan complex from *Aspergillus niger* industrial wastes. *Biotechnol. Bioeng.* **22**: 885.
 13. 이재동. 1991. 이론과 실제, 균학연구. Pp. 19. 세문사.
 14. 오준현, 조홍연, 양한철. 1995. Chitosan에 의한 광합성 세균처리 두부 폐수의 균체 응집 효과. 한국산업미생물학회지 **23**: 763
 15. Cohen-Bazire, G., W.R. Sistrion, and R.Y. Stainer. 1957. Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria. *J. Cell Comp. Physiol.* **49**: 25.
 16. Sawada, H. and P.L. Rogers. 1977. Photosynthetic bacteria in waste treatment: Pure culture studies with *Rhodospirillum rubrum*. *J. Ferment. Technol.* **55**: 297.
 17. 한정준. 1992. *Portunus trituberclatus* 폐기물과 *Aspergillus niger* mycellium으로부터 분리한 chitosan의 물성에 관한 연구. 고려대학교 석사학위 논문.
 18. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18th Ed., American Public Health Association, Inc., New York (1992).
 19. Johnson, A.R. 1971. Improved method of hexosamine determination. *Anal. Biochem.* **44**: 628.
 20. Shimahara, K., Y. Takiguchi, T. Kobayashi, K. Uda, and T. Sannan. 1988. Screening of mucoraceae strains suitable for chitosan production, Pp. 171. In "Proceedings of the 4th international conference on chitin and chitosan".
 21. Sannan, T., O. Kurita, and Y. Iwakura. 1978. Studies on chitin 7. IR spectroscopic determination of degree of deacetylation. *Polymer* **19**: 458.

(Received 27 September 1995)