

Rhizopus japonicus 균체에 의한 키토산의 생산

박헌국·이계호*

동남보건전문대학 식품영양과, *서울대학교 식품공학과

Production of Microbial Chitosan from *Rhizopus japonicus*

Heon-Kuk Park and Ke-Ho Lee*

Dept. of Food and Nutrition, DongNam Health Junior College, Suwon 440-714, Korea

* Dept. of Food Science and Technology, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

Abstract

Rhizopus japonicus had the highest chitosan productivity compared with the chitosan productivity among *Rhizopus* sp. strains. To increase the productivity of microbial chitosan from *Rhizopus japonicus*, production medium and incubation conditions were optimized. The composition of the medium and the incubation conditions were as follows : starch 2%, yeast extract 2.5%, KH_2PO_4 0.05%, MgSO_4 0.01%, FeSO_4 0.002%, MnSO_4 0.002%, ZnSO_4 0.002%, CaCl_2 0.002%, pH 5.5, incubation temperature 30°C, and incubation time 72hours. The chitosan productivity of optimal medium was about four times higher than that of basal medium compared with chitosan productivity.

Key words : *Rhizopus japonicus*, chitosan

서론

Chitin은 생체고분자물질로 하등동물의 껍질과 골격의 구조 성분이다. 키틴은 *N*-acetyl glucosamine이 β-1,4 결합한 소화되기 힘든 다당으로 대부분의 곰팡이 세포벽의 주요 fibrilla polymer로 존재한다¹⁾. 키틴을 탈아세틸화 처리하면 chitosan이 얻어지며, 다양한 기능성 때문에 이들은 각광받기 시작하여 상업화되기 시작했다.

글루코사민 중합체인 키토산은 키틴과 달리 아미노기를 가지고 있으므로 산성에서 플러스로 하전되기 때문에 효소 및 균체의 고정화제, 금속 이온의 착물화제, 점도 조절제, 접착제, 응집제 등 공업 분야에 다양하게 이용되고 있다²⁾. 최근에는 면역부활성, 혈중 콜레스테롤 저하력을 이용한 의약, 화장품, 기능성 식품, 화학공업 및 농업용 등 다양한 분야의 신소재로서 기대를 모으고 있다. 키토산이 갖는 기능성 중에는 높은 항균 활성^{3~9)}과 식물 조직에서 병원균에 대한 자체 방어 능력을 유도하여 곰팡이의 침해를 막는 효과가 있다^{10,11)}. 키토산의 분해 산물인 키토산올리고머는 항균 활성^{12,13)}뿐 아니라 항암성^{14,15)}과 면역부활성¹⁶⁾도 보고되어 더욱 각광 받고

있다.

키토산은 새우나 게껍질 같은 수산 폐기물에서 생산되고 있다. 이들 폐기물을 분쇄하여 1N NaOH로 100°C에서 36시간 처리하여 단백질을 제거한다. 이 때, 껍질에 함유된 색소도 대부분 제거된다. 다음, 2N HCl로 실온에서 48시간 동안 CaCO_3 과 같은 무기염을 제거하여 원료의 13~17% 정도의 키틴을 얻는다. 이것을 다시 40%정도의 NaOH로 115°C에서 6시간 동안 탈아세틸화하여 키토산을 생산한다²⁾. 그러나 이같은 공정으로 생산할 경우 제품의 불균일성과 화학적 전환에 막대한 비용이 들고, 폐기물에 의한 오염 문제가 있다. 따라서 최근에는 세포벽에 키토산을 함유한 미생물을 대량으로 배양한 후 간단히 화학 처리하여 생산하는 방법이 주목을 받고 있다¹⁷⁾. 접합균류(*Zygomycetes*)인 *Mucorales*(*Absidia* sp., *Mucor* sp., *Rhizopus* sp., *Phycomyces* 등)는 세포벽의 키토산 함량이 다른 곰팡이보다 높기 때문에 새로운 키토산의 원료로 주목받고 있다^{18~27)}.

본 연구는 접합균류 중 *Rhizopus*속을 대상으로 키토산의 생산성을 비교하여, 최적 조건을 찾은 결과이다.

재료 및 방법

1. 균 주

*Rhizopus*속의 균주들은 전국 각지에서 수집한 누룩에서 분리하여 서울대학교 식품공학과 식품미생물실에 보관 중인 것과 공시 균주를 PDA 사면 배지에 계대 보관하면서 사용하였다. 30℃ PDA 사면 배지에 5일간 배양한 것에 10ml의 멸균 증류수를 가해 포자 현탁액을 만들고 배지 200ml당 1.25×10^5 개의 포자를 접종하였다.

2. 배지 조성

키토산의 생산 기본 배지는 glucose 10g, yeast extract 5g, MgSO₄ 0.5g, KH₂PO₄ 2g을 1l의 증류수에 녹인 후 pH를 5.6으로 맞추어 사용하였다.

3. 키토산의 추출

배양된 미생물 균체로부터 키토산을 추출한 방법은 Fig. 1과 같다. 즉, 진탕 배양하여 얻은 균체를 Buchner funnel을 이용하여 Whatman No. 41 여지로 균체를 회수하고 무색의 여액이 나올 때까지 수세하였다. 여기에 1N NaOH를 1:40으로 넣고 Waring blender로 2분간 마쇄하여 120℃에서 15분간 처리한 후, 50℃로 냉각하고 감압 여과하여 알칼리 불용성 fraction(AIF)을 얻었다. 이것을 증류수로 씻고 0.5N acetic acid를 최종 농도 1%로 가한 뒤, 35℃에서 5시간 동안 교반하여 키토산을 추출하였다. 이것을 다시 여과한 여액에 1N NaOH를 가하여 pH 7.0으로 중화하고 실온에 3시간 방치하여 침전시키고 3,500×g로 20분간 원심분리하여 키토산을 얻었다. 그 후 여러 차례 증류수로 씻어 내어 염을 제거하였다. 실험의 각 단계별로 냉동 건조하여 쟈 무게로 수율을 계산하였다.

결과 및 고찰

1. 키토산 고생산성 균주의 선정

누룩에서 분리한 *Rhizopus*속의 균주 및 공시 균주를 YPD배지에 배양하면서 키토산의 생산량을 비교한 결과 Table 1과 같이 *Rhizopus japonicus*가 가장 우수하였다. 따라서 *Rhizopus japonicus*를 선정하여 실험하였다.

2. 배양 온도의 영향

*Rhizopus japonicus*의 배양 온도에 따른 키토산의 생산 수율은 Fig. 2와 같이 30℃에서 최대였다. 이는 *Rhizopus japonicus*의 최적 생육 온도와 일치하는 결과이

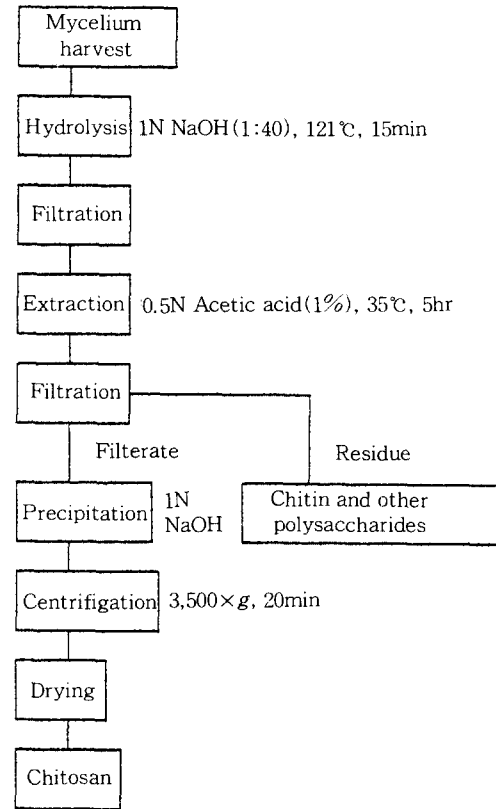


Fig. 1. Schematic diagram of procedure of chitosan extraction from filamentous fungi.

Table 1. Chitosan productivity from various *Rhizopus* species

Strains	Dry mass of mycellium(g)	Dry mass of chitosan (g)
<i>Rhi. japonicus</i>	1.21	0.10
<i>Rhi. javanicus</i>	1.10	0.07
<i>Rhi. oligosporus</i>	1.15	0.07
<i>Rhi. sp. CY-7</i>	0.77	0.02
<i>Rhi. sp. SY-1</i>	0.98	0.04
<i>Rhi. sp. A-1</i>	1.82	trace
<i>Rhi. sp. A-2</i>	1.35	0.05
<i>Rhi. sp. A-3</i>	1.62	0.05
<i>Rhi. sp. A-4</i>	1.58	0.05
<i>Rhi. sp. A-5</i>	0.88	0.03
<i>Rhi. sp. A-6</i>	3.96	0.05
<i>Rhi. sp. A-7</i>	1.86	0.07
<i>Rhi. sp. A-8</i>	1.19	0.05

다.

3. 배지의 초기 pH의 영향

배지의 초기 pH에 따른 키토산의 생산 수율은 Fig.

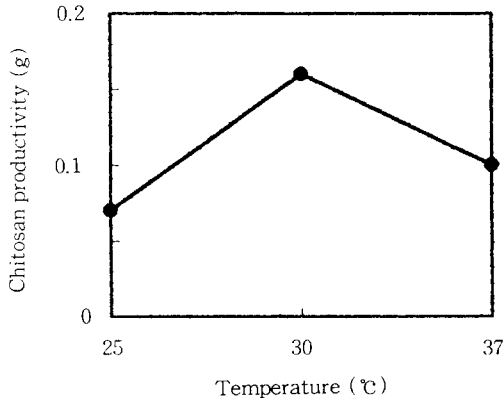


Fig. 2. Effect of temperature on production of chitosan from *Rhizopus japonicus*.

3과 같이 pH 5.5에서 최대였다. 이는 *Rhizopus acetoi-*
mus HUT 1219의 경우 pH 4.5~5.9에서 생산성이 가
장 높았다는 久保 등의 결과와 일치하고 있다.²⁶⁾

4. 탄소원의 종류와 최적 농도

배지에 첨가하는 탄소원은 Table 2와 같이 전분이
가장 좋은 것으로 나타났다. 이는 *Rhizopus japonicus*가
아밀라아제 분비력이 강하여 전분 분해 능력이 뛰어나
기 때문으로 보인다. 전분은 탄소원으로 사용할 때의 최
적 농도는 Fig. 4와 같이 2%였다.

5. 질소원의 종류와 최적 농도

탄소원에 따른 영향에서 Table 3과 같이 질소원 중
무기태의 질소원은 이용율이 낮았고, 유기태의 질소원
이용율이 높았다. 무기태의 질소원 중 NaNO₃는 전혀
이용하지 못하였는데, 이는 *Rhizopus*속의 균종은 질산

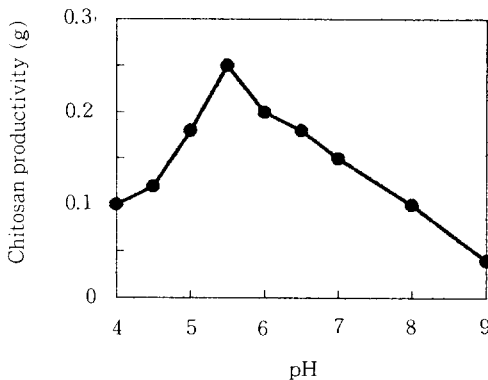


Fig. 3. Effect of initial pH on production of chitosan from *Rhizopus japonicus*.

Table 2. Effect of carbon sources on production of chitosan from *Rhizopus japonicus*

Carbon sources	Chitosan productivity (g)
Control	0.00
Glucose	0.22
Starch	0.38
<i>N</i> -Acetylglucosamine	0.04
Cellulose	0.06
Xylan	0.02
Glucosamine	0.00
Glucose + Starch	0.34

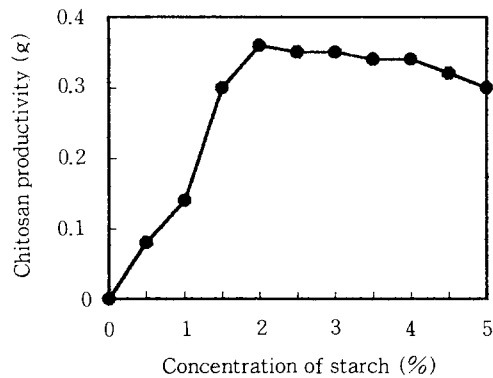


Fig. 4. Effect of concentration of starch on production of chitosan from *Rhizopus japonicus*.

Table 3. Effect of nitrogen sources on production of chitosan from *Rhizopus japonicus*

Nitrogen sources	Chitosan productivity (g)
Control	0.00
Urea	0.00
Casein	0.16
Casaminoacid	0.29
Peptone	0.34
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.07
NaNO ₃	0.00
Yeast extract	0.40

태의 질소원을 이용하지 못한다는 사실과 잘 부합된다.
유기태의 질소원 중 yeast extract가 가장 우수하였다.
Fig. 5와 같이 yeast extract를 질소원으로 2.5% 첨가
한 경우 키토산의 생산량이 최고치에 도달하였다. 그러
나 질소원 농도를 더 높여 주어도 키토산의 생산량은 변
화가 없으므로 최적 농도를 2.5%로 하였다.

6. 무기물의 영향

무기물이 키토산의 생산에 미치는 영향은 Table 4와
같이 CuSO₄외에 FeSO₄, MnSO₄, ZnSO₄, CaCl₂는 좋
은 영향을 주었다. 따라서 FeSO₄, MnSO₄, ZnSO₄,

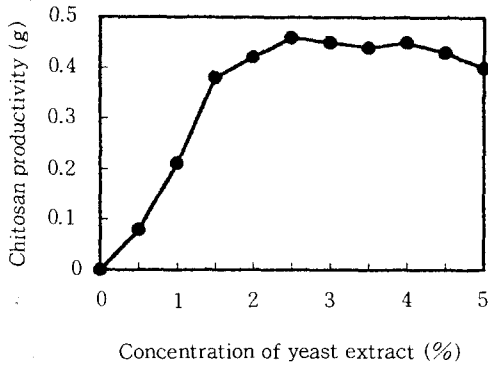


Fig. 5. Effect of concentration of yeast extract on production of chitosan from *Rhizopus japonicus*.

Table 4. Effect of various minerals on production of chitosan from *Rhizopus japonicus*

Minerals	Chitosan productivity (g)
Control	0.00
CuSO ₄	0.01
FeSO ₄	0.07
MnSO ₄	0.10
ZnSO ₄	0.09
CaCl ₂	0.11

CaCl₂를 배지에 각각 0.002%씩 첨가하였다.

7. 최적 배지의 결정

상기의 결과를 종합하여 Table 5와 같이 *Rhizopus japonicus*로 키토산을 생산하기 위한 최적 배지의 조성을 결정하였다.

8. Harvest time의 영향

Table 5. Optimal medium for production of chitosan from *Rhizopus japonicus*

Ingredient	Content (g)
Yeast extract	25.00
Starch	20.00
KH ₂ PO ₄	0.50
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.10
FeSO ₄	0.02
MnSO ₄	0.02
ZnSO ₄	0.02
CaCl ₂	0.02
Distilled water	1 L
	pH 5.5

Table 5의 최적 배지에 *Rhizopus japonicus*를 접종한 후 배양 시간에 따른 키토산의 생산량을 비교한 결과, Fig. 6과 같이 72시간에 최대에 달하였다. 72시간 이후에는 균체 양은 증가하지만 키토산 생산량은 감소하였다. 자세한 연구가 이루어져야 하지만, 72시간 이후에도 균체 증식이 일어나는 것으로 보아 생성된 키토산이 세포벽의 다른 성분과 단단히 결합하여 분리되지 않기 때문일 것으로 보인다.

9. 키토산 생산 기본 배지와 최적 배지에서의 키토산 생산성 비교

키토산 생산 기본 배지와 최적 배지에 각각 1.25 × 10⁵개의 포자를 접종하여 배양한 후 생산성을 비교한 결과, Fig. 7과 같이 0.16g/200ml 및 0.66g/200ml로 수율이 약 4배 정도 증가하였다.

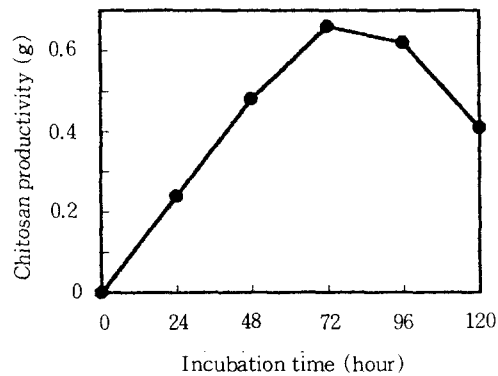


Fig. 6. Effect of incubation time on production of chitosan from *Rhizopus japonicus*.

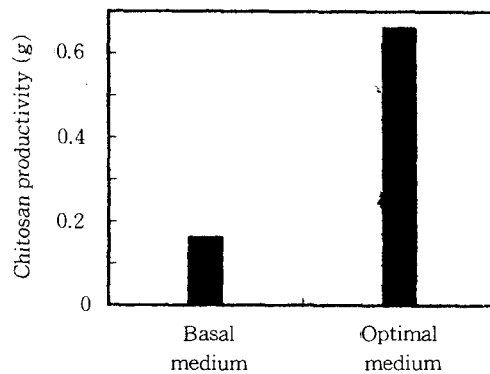


Fig. 7. Comparison of chitosan productivity between basal medium and optimal medium.

요 약

접합균류인 *Rhizopus*속 균주를 대상으로 키토산의 생산성을 비교한 결과 *Rhizopus japonicus*가 가장 우수하였다. 선발된 *Rhizopus japonicus*로부터 미생물 키토산을 생산하기 위한 최적 조건은 탄소원으로 전분을 2%, 질소원으로 yeast extract를 2.5%, 무기염류로 FeSO_4 , MnSO_4 , ZnSO_4 , CaCl_2 를 0.002%씩 첨가하고 pH를 5.5로 한 배지로, *Rhizopus japonicus*포자를 접종한 후 30℃에서 72시간 배양하였다. 키토산의 생산 기본 배지와 최적 배지에 각각 1.25×10^5 개의 포자를 접종하여 배양한 후 키토산 생산성을 비교한 결과, 각각 0.16g/200ml와 0.66g/200ml로 수율이 약 4배 정도 증가하였다.

참고문헌

- Allan, G. G., Fox, J. R. and Kong, N. : in *Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan*, ed. by Muzzarelli, R. A. A. and Pariser, E. R. MIT Sea Grant Report, 64 (1978).
- 박현국 : Chitosan의 생산과 이용. 동남보건전문대학 논문집, 12, 13-28 (1995).
- 宮尾茂雄 : 키토산による浸漬の保存性向上, *New Food Industry*, 33(10) 1-3 (1991).
- 山本正次 : 키토산製劑の食品への利用, *New Food Industry*, 33(10) 5-9 (1991).
- 庄司禎. 키토산製劑の浸漬への應用, *New Food Industry*, 33(10) 10-15 (1991).
- 内田泰 : 키토산·키토산および關連化合物의 抗菌性とその應用, *化學工業*, 38(10) 793-799 (1991).
- 菅原久春 : 浸漬における 키토산及び銀ゼオライト의 抗菌效果, *食品工業*, 1993-8, 34-49 (1993).
- Shao, W., Fang, Chin F. Li and Daniel, Y. C. Shin : Antifungal activity of chitosan and its preservative effect on low-sugar candied kumquat, *J. Food Prot.*, 57(2) 136-140 (1994).
- 이승지, 엄재열, 이용현 : Chitosan이 겉무늬썩음병균 *Botryphaeria dothidea*의 생육에 미치는 영향, *산업미생물학회지*, 24(3) 261-267 (1996).
- 福井春雄, 藤原公, 村岡高志, 次田隆志 : 키토산による作物의 生長促進效果 第1報 生長促進とその作用性, *日作四國支紀*, 26, 1-8 (1989).
- 福井春雄, 正田敏幸, 藤原公, 村岡高志, 次田隆志 : 키토산による作物의 生長促進效果 第2報 各種作物への栽培適用性, *日作四國支紀*, 26, 9-16 (1989).
- 内田泰 : 키토산, 키토산의 抗菌性, *フドケミカル*, 1888-2, 22-29 (1988).
- 内田泰 : 키토산, *日添協會報*, 7(8) 9-19 (1988).
- Tokoro, A., Tatewaki, N., Suzuki, K., Mikami, T., Suzuki, S. and Suzuki, S. : Growth-inhibitory effect of hexa-*N*-acetylchitohexaose and chitohexaose against Meth-A solid tumor, *Chem. Pharm. Bull.*, 36 (2) 784-790 (1988).
- Mikami, T., Tokoro, A., Suzuki, K., Suzuki, S. and Suzuki, M. : Interferon(IFN)-inducing activity of chitooligosaccharides, *Tohoku Yakka Daigaku Kenkyu Nempo*, 35, 177-182 (1988).
- 鈴木茂生. *N*-아세틸키토オリゴ糖と 키토オリゴ糖의 免疫賦活作用, *日本農藝化學會誌*, 62(8) 1241-1243 (1988).
- 島原健三 : 키토산 키토산의 新しい製造法, *纖維と工業*, 46(12) 547-552 (1990).
- 島原健三 : 키토산質をめぐる 醱酵生産, *四國工研會報*, 41, 14-21 (1990).
- White, S. A., Farina, P. R. and Fulton, I. : *Appl. Environ. Microbiol.*, 38, 323 (1979).
- McGahren, W. J., Perkinson, G. A., Growith, J. A., Leese, R. A. and Ellestad, G. A. : *Proc. Biochem.*, 19, 88 (1984).
- 小林丘, 瀧口泰之, 島原健三, 山南隆德 : *Absidia*屬における 키토산의 分布および性質, *日本農藝化學會誌*, 62(10) 1463-1469 (1988).
- 小林丘, 鍛冶佳子, 瀧口泰之, 島原健三, 山南隆德 : *Mucor*屬における 키토산의 分布および性質, *日本農藝化學會誌*, 62(10) 1471-1474 (1988).
- 瀧口泰之, 宇田和弘, 小林丘, 島原健三, 山南隆德 : *Mucoraceae*의 數屬における 키토산의 分布および性質, *日本農藝化學會誌*, 63(4) 853-856 (1989).
- Shimahara, K., Takiguchi, Y., Kobayashi, T., Uda, K. and Sannan, T. : *Chitin and Chitosan* (ed. Skjak Break et al.), p.171, Elsevier (1989).
- 島原健三, 瀧口泰之, 小林丘, 宇田和弘, 松永信子 : 絲狀菌의 培養による 키토산의 製造 第I報 키토산樣物質生産株의 選擇と培養中における 同物質의 消長, 旭素子工業技術獎勵會研究報告, 55, 291-297 (1989).
- 久保隆昌, 吉原一年, 細川純, 西山昌史 : *Rhizopus acetoi-mus* HUT 1219의 生産する 키토산의 아세틸化度に及ぼす培養pH의 影響, *日本農藝化學會誌*, 66(11) 1541-1643 (1992).
- Miyoshi, H., Shimura, K., Watanabe, K. and Onodera, K. : Characterization of some fungal chitosan, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56(12) 1901-1905 (1992).

(1996년 9월 12일 접수)