

## *Rhizopus oligosporus* ATCC22959 균체에 의한 Chitosan의 생산

박 헌 국 · 이 계 호\*

동남보건전문대학 식품영양과, \*서울대학교 식품공학과

### Production of the Microbial Chitosan from *Rhizopus oligosporus* ATCC22959

Heon-Kuk Park and Ke-Ho Lee\*

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

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

#### Abstract

To increase the productivity of microbial chitosan from *Rhizopus oligosporus* ATCC22959, production medium and incubation conditions were optimized. The composition of the medium and the incubation conditions were like follows : starch+glucose(1:1) 3.0%, yeast extract 3.0%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05%,  $\text{MgSO}_4$  0.01%,  $\text{ZnSO}_4$  0.002%, pH 5.0, incubation temperature 30°C, and incubation time 96hours. The productivity of chitosan of optimized medium was about 6.4 times higher than that of basal medium.

Key words : *Rhizopus oligosporus*, chitosan

#### 서 론

Chitin은 1811년 Branconot에 의해 버섯으로부터 최초로 발견되었으며 1823년에 Ordier에 의해서 생물의 외피를 이루는 물질이라는 뜻의 그리스어인 chitin 이라 명명되었다. 또한 Chitosan은 1894년 Hoppe-Seyler에 의해 명명되었으며 이들의 구조는 19세기 후반에 이르러 밝혀졌다<sup>1)</sup>. Chitin은 N-acetylglucosamine이  $\beta$ -1,4 결합한 분자량 100만 이상의 소화되지 않는 천연 고분자 다당으로 하등동물의 껍질과 골격을 이루는 성분이다. 또한 대부분의 곰팡이 세포벽의 주된 fibrilla polymer로 존재하는 것으로 알려져 있다<sup>2)</sup>. Chitin은 연간 생산량이 1,000억톤 이상으로 추정되며 지구상에서 cellulose 다음으로 많이 생산되고 있다. Chitin에서 deacetylation 처리하여 얻은 것이 chitosan으로 그의 기능성 때문에 각광받기 시작하였고 미이용자원에 대한 연구가 활발하게 진행되면서 chitin과 chitosan이 상업화되기 시작했다.

Chitin과 chitosan은 독성이 없으며 흡착성, 보습성,

유화성, 생분해성을 나타내며 항균작용, 제산작용과 궤양억제작용, 콜레스테롤 및 triglyceride를 낮추는 약리작용, 장내 유용세균의 성장촉진, 항종양활성, 식물세포의 활성화작용, 면역부활작용 등 다양한 기능을 나타내는 것으로 알려져 있다. 따라서 chitin과 chitosan은 건강지향성 식품, 의약품, 식품보존제, 중금속 흡착제, 효소 고정화제, 화장품, 사료, 토양개량제 등 향후 다양한 분야에서 응용이 가능한 새로운 고부가가치의 생물자원으로 평가되고 있으며, 식품 및 의약품 분야에서만도 시장규모가 수백억원대에 이르는 것으로 추정되고 있다<sup>3)</sup>. 특히 glucosamine의 중합체인 chitosan은 chitin과 달리 각 포도당 잔기마다 함유되어 있는 1개의 유리 amino기( $-\text{NH}_2$ )에 의해 산성 용액에서 양으로 하전되기 때문에 각종 공업 분야에 다양하게 이용되고 있다<sup>4)</sup>. 즉, 효소 및 균체의 고정화제, 금속 이온의 착물화제, 점도 조절제, 접착제, 응집제 등으로써 공업적으로 널리 이용되고 있을 뿐만 아니라, 최근에는 면역부활성, 혈중 콜레스테롤 저하능을 이용한 의학 분야, 화장품, 기능성 식품, 화학공업 및 농업용 등 다양한 분야에 응용 가능한 신소재로서 기대가 높아지고 있다. Chit-

osan이 갖는 기능성 중에서 높은 항균 활성<sup>5-11)</sup>과 식물 조직에서 병원균에 대한 자체 방어 능력을 유도하여 곰팡이의 침해를 막는 효과<sup>12,13)</sup>가 있다는 생리활성에 관련된 보고가 있다. 또한 chitosan의 분해 산물인 chitosan oligomer는 항균 활성<sup>14,15)</sup>뿐 아니라 항암성<sup>16,17)</sup>과 면역부활성<sup>18)</sup>을 나타낸다고 보고되어 chitosan에 대한 연구가 더욱 각광을 받고 있다.

Chitosan은 새우나 게껍질과 같은 수산 폐기물을 이용하여 산업적으로 생산되고 있다. 이들 수산 폐기물을 적당한 크기로 분쇄하고 1N NaOH로 100℃에서 36시간 처리하여 단백질을 제거한다. 이 때, 껍질에 함유된 색소의 대부분도 제거된다. 다음에 2N HCl로 실온에서 48시간 동안 처리하여 CaCO<sub>3</sub>과 같은 무기염을 제거하여 수산 폐기물로부터 건조 중량의 13~17%의 chitin을 얻고, 이것을 다시 40%정도의 진한 NaOH로 115℃에서 6시간 동안 탈아세틸화 처리하여 chitosan을 생산하고 있다<sup>4)</sup>. 그러나 이와 같은 공정에 의해 chitosan을 생산할 경우 제품의 불균일성과 화학적 전환에서 드는 막대한 비용, 그리고 다량의 공해 폐기물 생성 등의 문제가 대두되었다. 따라서 최근에는 chitosan 성분을 균체의 세포벽 성분으로 함유하고 있는 미생물을 대량으로 배양하여 비교적 간단한 화학 처리법을 이용하여 생산하는 방법이 주목을 받고 있다<sup>19)</sup>.

집합균류(*Zygomycetes*)의 *Mucorales*(*Absidia* sp., *Mucor* sp., *Rhizopus* sp., *Phycomyces* 등)는 세포벽 조성중 chitosan의 함량이 다른 종의 곰팡이보다 높게 나타나므로 새로운 chitosan의 원료로 주목받고 있다<sup>20-30)</sup>.

본 연구에서는 집합균류 중 *Temphe*의 제조에 이용되는 *Rhizopus oligosporus* ATCC 22959 균체를 이용하여 chitosan을 생산하기 위한 최적 조건을 확립하였기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 균 주

실험에 사용한 균주는 *Temphe*의 제조에 이용되는 *Rhizopus oligosporus* ATCC22959로 PDA 사면 배지에 계대 보관하면서 사용하였다. 접종에 사용하기 위하여 35℃ PDA 사면 배지에 5일간 배양한 것에 10ml의 멸균 증류수를 가하여 포자 현탁액을 만들고 배지 200ml당 1.25×10<sup>6</sup>개의 포자를 접종하였다.

### 2. 배지 조성

Chitosan생산을 위한 기본 배지로는 glucose 10g,

yeast extract 5g, MgSO<sub>4</sub> 0.5g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2g을 1l의 증류수에 녹인 후 pH를 5.6으로 맞추어 사용하였다.

### 3. Chitosan추출

배양된 미생물 균체로부터 chitosan을 추출하는 방법은 Fig. 1과 같았다. 즉, 진탕 배양하여 얻어진 균체를 Büchner funnel을 이용하여 Whatman No. 41 filter paper를 이용하여 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 alkali insoluble fraction(AIF)을 얻었다. 이것을 증류수로 씻고 0.5N acetic acid를 최종 농도가 1%가 되도록 가한 뒤, 35℃에서 5시간 동안 교반하여 chitosan을 추출하였다. 이것을 다시 여과하여 여액을 얻은 후 여기에 1N NaOH를 가하여 pH 7.0으로 중화하고 실온에 3시간 방치하여 침전시키고 3500×g로 20분간 원

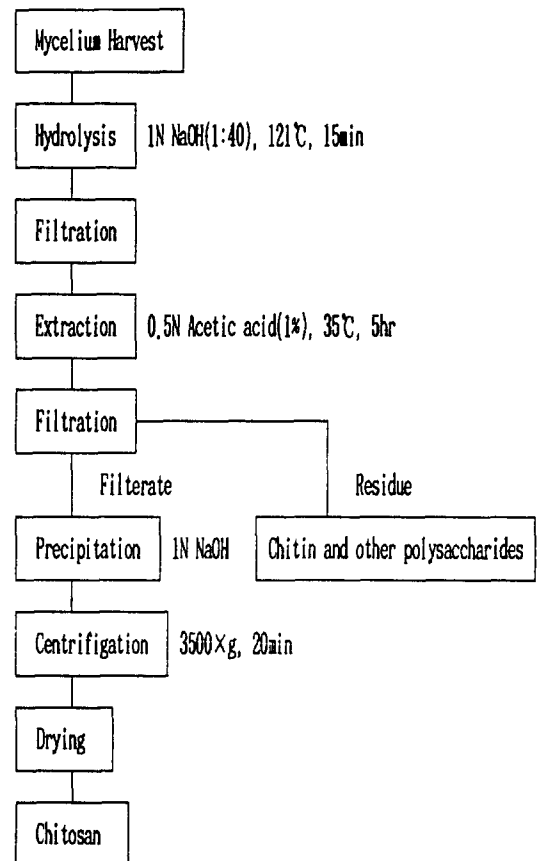


Fig. 1. Schematic diagram of procedure of chitosan extraction from filamentous fungi.

심 분리하여 chitosan을 얻었으며, 얻어진 chitosan은 여러 차례 증류수로 씻어 내어 염을 제거하였다. 이때 실험의 각 단계마다 냉동 건조하여 무게를 측정함으로써 수율을 계산하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 배양 온도의 영향

*Rhizopus oligosporus* ATCC22959의 배양 온도에 따른 chitosan의 생산 수율을 관찰한 결과는 Fig. 2와 같이 30°C에서 최대 생산성을 보였다.

### 2. 배지의 초기 pH의 영향

*Rhizopus oligosporus* ATCC22959의 배양시 배지의 초기 pH에 따른 chitosan의 생산 수율을 관찰한 결과는 Fig. 3과 같이 pH 5.0에서 최대 생산성을 보였다. 이는 *Rhizopus acetoinus* HUT 1219의 경우 pH 4.5~

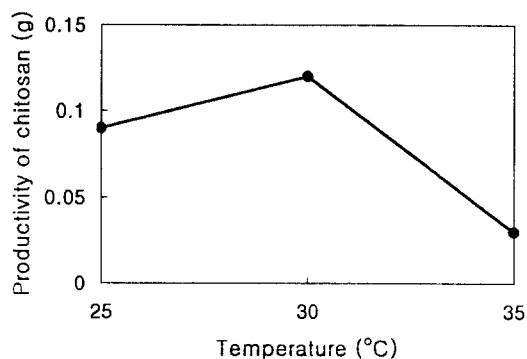


Fig. 2. Effect of temperature on the production of chitosan from *Rhizopus oligosporus* ATCC 22959.

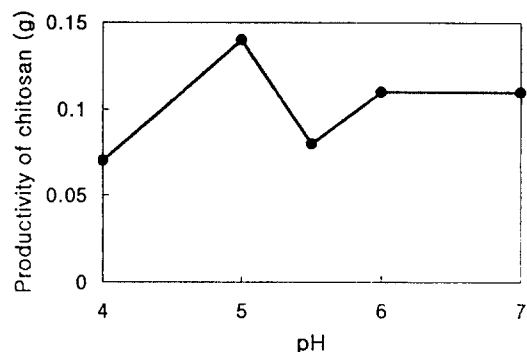


Fig. 3. Effect of initial pH on the production of chitosan from *Rhizopus oligosporus* ATCC 22959.

5.9에서 chitosan의 생산성이 가장 높았다는 久保 등의 보고<sup>28)</sup>와 일치하며, *Rhizopus japonicus*의 경우 pH 5.5에서 최대 생산성을 보였다는 박 등의 보고<sup>30)</sup>와 유사한 경향을 나타냈다.

### 3. 탄소원의 종류와 최적 첨가 농도

배지에 첨가하는 탄소원의 종류에 따른 영향에서는 Table 1과 같이 starch와 glucose를 1:1로 혼합한 것이 가장 좋은 것으로 나타났으며, 이는 *Rhizopus*속의 균주들은 전분을 분해하는 능력이 강하기 때문에 전분을 이용하여 균체의 생장이 왕성히 일어나기 때문인 것으로 판단된다. 한편 starch와 glucose를 탄소원으로 사용할 때의 최적 첨가 농도는 Fig. 4에 나타낸 바와 같이 3.0%에서 가장 높은 chitosan 생산성을 나타내었다.

### 4. 질소원의 종류와 최적 첨가 농도

배지에 첨가하는 질소원의 종류에 따른 영향에서는 Table 2와 같이 첨가한 질소원 중 무기태 질소원은 이

Table 1. Effect of carbon sources on the production of microbial chitosan from *Rhizopus oligosporus* ATCC22959

| Carbon sources        | Chitosan productivity (g) |
|-----------------------|---------------------------|
| Control (No C-source) | 0                         |
| Glucose               | 0.03                      |
| Starch                | 0.04                      |
| Cellulose             | 0.02                      |
| Xylose                | 0                         |
| Glucosamine           | 0                         |
| Glucose + Starch      | 0.09                      |

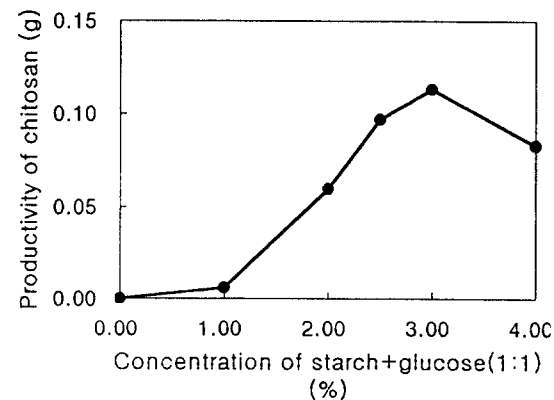


Fig. 4. Effect of the concentration of starch+glucose(1:1) on the production of chitosan from *Rhizopus oligosporus* ATCC22959.

**Table 2. Effect of nitrogen sources on the production of microbial chitosan from *Rhizopus oligosporus* ATCC22959**

| Nitrogen sources                                | Chitosan productivity (g) |
|---|---------------------------|
| Control (No N-source)                           | 0                         |
| Urea  | 0                         |
| Casein  | 0.02                      |
| Casamino acid                                   | 0.02                      |
| Peptone   | 0.03                      |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0                         |
| NaNO <sub>3</sub>                               | 0                         |
| Yeast extract                                   | 0.09                      |

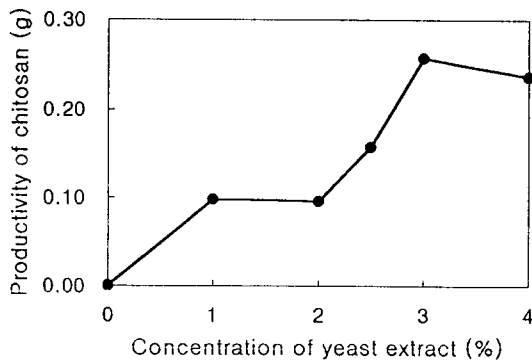
용율이 낮았고 유기태 질소원의 이용율이 높았다. 특히 무기태의 질소원 중에서도 NaNO<sub>3</sub>는 전혀 이용하지 못하였는데 이는 *Rhizopus*속의 균종은 질산태의 질소원을 이용하지 못한다는 사실과 잘 부합된다. 사용된 유기태의 질소원 중에서도 yeast extract가 가장 좋은 질소원이었으며, 이는 *Rhizopus japonicus*의 경우 최적 질소원이 yeast extract였다는 박 등의 보고<sup>30)</sup>와 일치하였다. 한편 yeast extract의 최적 첨가농도는 Fig. 5에 나타낸 바와 같이 3.0%를 첨가했을 경우 chitosan의 생산성이 가장 높았다.

**5. Mineral 첨가의 영향**

첨가한 각종 mineral이 chitosan의 생산성에 미치는 영향은 Table 3과 같았다. 즉, ZnSO<sub>4</sub>만이 chitosan의 생산에 좋은 영향을 주었으며 기타의 무기물은 chitosan의 생산에 영향을 주지 못하였다. 따라서 ZnSO<sub>4</sub>를 배지에 0.002% 첨가하였다.

**6. 최적 배지의 결정**

상기의 결과들을 종합하여 Table 4와 같이 *Rhizopus*



**Fig. 5. Effect of the concentration of yeast extract on the production of chitosan from *Rhizopus oligosporus* ATCC22959.**

**Table 3. Effect of various minerals on the production of microbial chitosan from *Rhizopus oligosporus* ATCC22959**

| Minerals             | Chitosan productivity (g) |
|----------------------|---------------------------|
| Control (No mineral) | 0.08                      |
| CuSO <sub>4</sub>    | 0.08                      |
| FeSO <sub>4</sub>    | 0.08                      |
| MnSO <sub>4</sub>    | 0.08                      |
| ZnSO <sub>4</sub>    | 0.11                      |
| CaCl <sub>2</sub>    | 0.08                      |

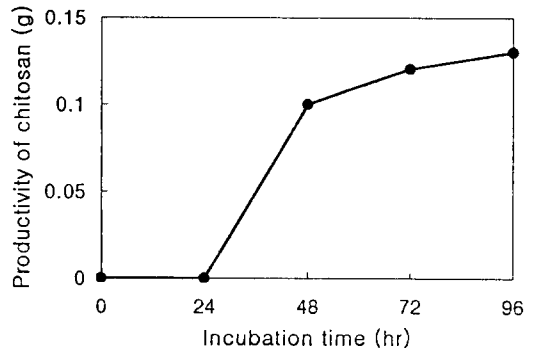
**Table 4. Optimal medium for the production of microbial chitosan from *Rhizopus oligosporus* ATCC22959**

| Ingredients                         | Content |
|-------------------------------------|---------|
| Yeast extract                       | 30 g    |
| Starch                              | 15 g    |
| Glucose                             | 15 g    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>     | 0.5 g   |
| MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O | 0.1 g   |
| ZnSO <sub>4</sub>                   | 0.02 g  |
| Distilled water                     | 1 L     |
| pH                                  | 5.0     |

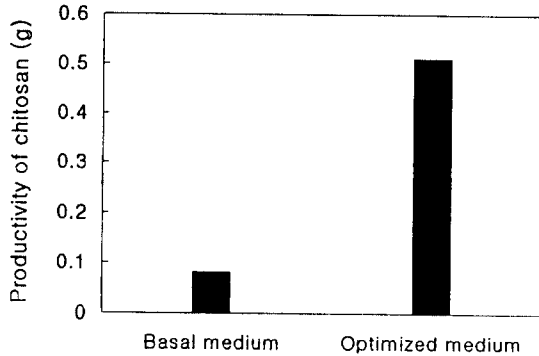
*oligosporus* ATCC22959를 이용하여 chitosan을 생산하기 위한 최적 배지의 조성을 결정하였다.

**7. Harvest time의 영향**

Table 4의 최적 배지에 *Rhizopus oligosporus* ATCC 22959를 접종한 후 배양 시간에 따른 chitosan의 생산성을 비교한 결과는 Fig. 6에 나타낸 바와 같이 시간이 경과함에 따라서 chitosan의 생산성이 높아짐을 보였다. 이와 같은 결과는 72시간에 chitosan의 생산성이 가장 높았다는 박 등의 결과<sup>30)</sup>와는 상이한 결과였다.



**Fig. 6. Effect of the incubation time on the production of chitosan from *Rhizopus oligosporus* ATCC22959.**



**Fig. 7. Comparison of the productivity of chitosan between basal medium and optimized medium.**

**8. Chitosan 생산 기본 배지와 최적 배지에서서의 chitosan 생산성 비교**

Chitosan의 생산을 위한 기본 배지와 최적 배지에 각각  $1.25 \times 10^5$ 개의 포자를 접종하여 배양한 후 chitosan의 생산성을 비교한 결과는 Fig. 7에 나타난 바와 같이 각각 0.08g/200ml와 0.51g/200ml로 약 6.4배 정도 수율이 증가하였다.

**요 약**

*Rhizopus japonicus* ATCC22959로부터 미생물성 chitosan을 생산하기 위한 최적 조건을 조사하였다. 탄 소원으로써 starch와 glucose(1:1)를 3.0%, 질소원으로 써 yeast extract를 3.0%, 무기염류로써 ZnSO<sub>4</sub>를 0.02% 첨가하고 pH를 5.0으로 맞춘 배지에 *Rhizopus japonicus* ATCC22959의 포자를 접종한 후 30℃에서 96시간 배양하는 것이었다. Chitosan생산을 위한 기본 배지와 최적 배지에 각각  $1.25 \times 10^5$ 개의 포자를 접종하여 배양한 후 chitosan의 생산성을 비교한 결과는 각각 0.08g/200ml와 0.51g/200ml로 약 6.4배정도 수율이 증가하였다.

**감사의 말**

이 연구의 일부는 1997년도 동남보건전문대학의 학술연구비 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

**참고문헌**

1. Muzarelli, R. A. A. : *In Chitin*, Pergamon press,

Oxford, p. 1 (1977).  
 2. G. G. Allan, J. R. Fox and N. Kong : *in Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan*, ed. by R. A. A. Muzzarelli and E. R. Pariser, MIT Sea Grant Report, 64 (1978).  
 3. 홍상필, 황재관, 김동수 : 키틴/키티산의 기능성과 올리고당의 생산기술, *식품과학과 산업*, 30(1), 44~52 (1997).  
 4. 박현국 : Chitosan의 생산과 이용, *동남보건전문대학 논문집*, 12, 13~28 (1995).  
 5. 宮尾茂雄 : 키틴산에 의한 浸漬의 保存性向上, *New Food Industry*, 33(10), 1~3 (1991).  
 6. 山本正次 : 키틴산製劑의 食品への 利用, *New Food Industry*, 33(10), 5~9 (1991).  
 7. 庄司禎 : 키틴산製劑의 浸漬への 應用, *New Food Industry*, 33(10), 10~15 (1991).  
 8. 內田泰 : 키틴·키틴산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).  
 9. 菅原久春 : 浸漬における 키틴산及 び銀ゼオライト의 抗菌果, *食品工業*, 1993-8, 34~49 (1993).  
 10. Shao W. Fang, Chin F. Li and Daniel Y. C. Shin : Antifungal activity of chitosan and its preservative effect on low-sugar candied kumquat, *Journal of Food Protection*, 57(2), 136~140 (1994).  
 11. 이승지, 엄재열, 이용현 : Chitosan이 겹무늬씩음병균 *Botryphaeria dothidea*의 생육에 미치는 영향, *산업미생물학 회지*, 24(3), 261~267 (1996).  
 12. 福井春雄, 藤原公, 村岡高志, 次田隆志 : 키틴 키틴산의 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).  
 13. 福井春雄, 正田敏幸, 藤原公, 村岡高志, 次田隆志 : 키틴 키틴산의 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).  
 14. 內田泰 : 키틴, 키틴산의 抗菌性, *フドケミカル*, 1888-2, 22~29 (1988).  
 15. 內田泰 : 키틴산, *日添協會報*, 7(8), 9~19 (1988).  
 16. Tokoro, A., Tatewaki, N., Suzuki, K., Mikami, T., Suzuki, S. and Suzuki, M. : Growth-inhibitory effect of Hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose against Meth-A solid tumor, *Chem. Pharm. Bull.*, 36(2), 784~790 (1988).  
 17. Mikami, T., Tokoro, A., Suzuki, K., Suzuki, S. and Suzuki, M. : Interferon(IFN)-inducing activity of chitoooligosaccharides, *Tohoku Yakka Daigaku Kenkyu Nempo*, 35, 177~182 (1988).  
 18. 鈴木茂生 : N-아세틸키도オリゴ糖과 키틴올리고糖의 免疫賦活作用, *日本農藝化學會誌*, 62(8), 1241~1243 (1988).  
 19. 島原健三 : 키틴 키틴산의 新製法, *纖維と工業*, 46(12), 547~552 (1990).  
 20. 島原健三 : 키틴質을 めぐる 醱酵生産, *四國工研會報*, 41, 14~21 (1990).  
 21. S. A. White, P. R. Farina and I. Fulton : *Appl. Environ. Microbiol.*, 38, 323 (1979).  
 22. W. J. McGahren, G. A. Perkinson, J. A. Growith, R. A. Leese and G. A. Ellestad : *Process Biochem.*, 19, 88 (1984).  
 23. 小林丘, 瀧口泰之, 島原健三, 山南隆徳 : *Absidia*屬における 키틴산의 分布および 性質, *日本農藝化學會誌*, 62(10), 1463~1469 (1988).  
 24. 小林丘, 治佳子, 瀧口泰之, 島原健三, 山南隆徳 : *Mucor*屬

24. 小林丘, 治佳子, 瀧口泰之, 島原健三, 山南隆徳 : *Mucor*屬におけるキトサンの分布および性質, *日本農藝化學會誌*, 62(10), 1471~1474 (1988).
25. 瀧口泰之, 宇田和弘, 小林丘, 島原健三, 山南隆徳 : *Mucoraceae*の數屬におけるキトサンの分布および性質, *日本農藝化學會誌*, 63(4), 853~856 (1989).
26. K. Shimahara, Y. Takiguchi, T. Kobayashi, K. Uda and T. Sannan. *Chitin and Chitosan* (ed. Skjak Break et al), p. 171, Elsevier (1989).
27. 島原健三, 瀧口泰之, 小林丘, 宇田和弘, 松永信子 : 絲狀菌の培養によるキトサンの製造 第I報 キトサン様物質生産株の選擇と培養中における同物質の消長, 旭素子工業技術奨勵會研究報告, 55, 291~297 (1989).
28. 久保隆昌, 吉原一年, 細川純, 西山昌史 : *Rhizopus acetoinus* HUT 1219 の生産するキトサンのアセチル化度に及ぼす培養pHの影響, *日本農藝化學會誌*, 66(11), 1541~1643 (1992).
29. Hiroshi Miyoshi, Kaori Shimura, Kimitsuna Watanabe and Kazukiyo Onodera : Characterization of some fungal chitosan, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56(12), 1901~1905 (1992).
30. 박헌국, 이계호 : *Rhizopus japonicus* 균체에 의한 키토산의 생산, *한국식품영양학회지*, 9(3), 336~340 (1996).

---

(1997년 10월 6일 접수)