

## Cunninghamella blakesleeana IFO 4443의 변이주로부터 키토산의 생산

류병호<sup>†</sup> · 김희숙 · 원용돈\* · 임복규\*\*

경성대학교 식품공학과

\*부경대학교 고분자공학과

\*\*부산지방식품의약품청

## Chitosan Production from Mutant of *Cunninghamella blakesleeana* IFO 4443

Beung-Ho Ryu<sup>†</sup>, Hee-Suck Kim, Yong-Don Won\* and Bok-Gu Lim\*\*

Dept. of Food Sciences and Biotechnology Kyungsung University, Pusan 608-736, Korea

\*Dept. of Polymer Engineering Pukyung University, Pusan 608-736, Korea

\*\*Pusan Regional Food and Drug Administration Office, Pusan 608-080, Korea

### Abstract

A method for lab scale production and isolation of chitosan from mycelia of *Cunninghamella blakesleeana* IFO 4443 mutant was developed. Mutant of *Cunninghamella blakesleeana* IFO 4443-10 obtained by UV radiation was cultivated in 5L jar fermentor at 30°C for 3days. The fungus were grown well at pH 4.5. Chitosan was readily extracted from mycelia walls with alkali treatment. The maximum yield of chitosan obtained was 1012mg/L and degree of deacetylation was 84.6%.

**Key words:** *Cunninghamella blakesleeana* IFO 4443, chitosan

### 서 론

키토산, 키토산은 지구상에서 풍부한 천연 생물자원의 하나로 키토산의 연간 생산량은  $1 \times 10^9$  ton으로 추정되고 있다. 이와 비교되는 셀룰로오스는 D-glucose가  $\beta$ -(1,4) 결합한 키토산과 유사한 구조를 가진 물질로 연간  $1 \times 10^{11}$  ton이 생산된다고 추정되어 키토산도 셀룰로오스 만큼 자연에 많이 존재한다고 말할 수 있다(1-3). 키토산은 N-acetyl-D-glucosamine 잔기가 여러개의  $\beta$ -(1,4) 결합을 하고 있는 다당류(poly- $\beta$ -1, 4-N-acetyl-D-glucosamine)이고, 키토산의 탈 아세틸 화합물이 키토산이다(4). 자연계에 풍부한 생물 자원인 키토산은 식품, 의약품, 화장품 및 공업용으로 이용이 증가되고 있으며 새로운 기능성 소재로서 많은 연구 개발이 이루어지고 있다(5). 그러나 기능성 고분자재료로 주목받고 있는 키토산은 공업적으로는 새우·게껍질을 산 및 알칼리로 탈회 및 탈탄백하였으나 키토산 제조과정 중 발효하는 폐수는 BOD가 높아서 하천이나 해양의 오염원으로 문제되고 있다(6,7).

요즈음에 와서 이러한 점을 해결하기 위하여 Mucoraceae

과에 속하는 사상균의 세포벽에 키토산이 들어 있다는 Bartnicki-Garcia의 보고(8)에 의하여 미생물에 의한 키토산의 대량 배양을 하기 시작하였고 White 등(9)은 *Mucor rouxii*로, McGahren 등(10)은 *Absidia coerulea*를 사용하여 생산한 바 있다. 또한 *Mucor rouxii*와 *Phycomyces blakesleeanus*에서 세포벽에 키토산이 함유되어 있다는 보고가 있고(11), *Absidia* 속에서 키토산이 많이 들어 있는 것으로 알려져 있으며, 곰팡이를 배양하여 만든 키토산은 그 품질면에서도 우수하였다고 하였다(11).

곰팡이를 대량 배양한 후 키토산의 추출방법은 새우와 게껍질에 비하여 탈회 및 알칼리처리 등의 공정이 불필요하다. 특히 곰팡이에 의한 키토산의 생산은 균일한 제품의 제조가 기대되고, 키토산을 대량 축적하는 균의 배양으로 키토산의 새로운 제조법이 가능하다(12).

지금까지는 키토산·키토산은 새우·게껍질에서 분리하였으나 Mucoraceae에 의한 발효생산을 함으로서 곰팡이에 의한 키토산·키토산의 생산 가능성을 제시하여 주고 키토산·키토산을 발효생산함으로써 키토산·키토산의 생성 메커니즘을 규명할 수 있어 앞으로 기능성이 우

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

수한 신소재로서 대량생산에 활용할 수 있을 것이다.

본 연구는 곰팡이 중에서 키토산을 대량 생성하는 균주 중 *Cunninghamella blakesleeana* IFO 4443을 변이시켜 얻은 변이주로부터 키토산의 발효생산을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 균주

*Cunninghamella blakesleeana* IFO 4443을 UV로 변이시켜 얻은 변이주를 사용하였다.

### 배지

본 배양의 배지조성은 corn 20g, polypepton 5g,  $(\text{NH}_4)_2\text{K}_2\text{HPO}_4$  1g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g,  $\text{KCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1g 및  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01g을 증류수 1L에 녹이고 pH 4.5로 조정하였다.

### 변이주의 분리 및 선별

*Cunninghamella blakesleeana* IFO 4443을 3일간 배

양한 후 원심분리하고 생리 식염수로 3회 세척한 다음  $1.0 \times 10^7$  spores/ml로 희석한 후 10ml를 petri dish에 가하여 미리 20분 이상 쪼개 놓은 자외선 살균등( $2.080\text{erg}/\text{mm}^2$ )의 수직하에서 30, 40 및 50초 조사 후 agar평판배지에 도말하여 배양하고 생성된 spore를 수회계 대하여 얻은 변이주를 선별하였다.

### 키토산의 생산

상기배지 10ml를 300ml의 삼각플라스크에 취하고  $30^\circ\text{C}$ 에서 3일간 배양한 후 배양액 100ml를 여과하여 균체를 본 배양의 발효조(5L 용량, Marubishi Co.)에 접종한 후  $30^\circ\text{C}$ 에서 3일간 발효시켰다.

### 건조 균체량

배양액 일정량을 glass filter로 여과한 다음 모든 균체를 충분히 수세한 후 감압하에서 건조하여 무게를 평량하였다.

### 키토산의 추출

배양액을 glass filter로 여과하여 얻은 균체를 2.0%

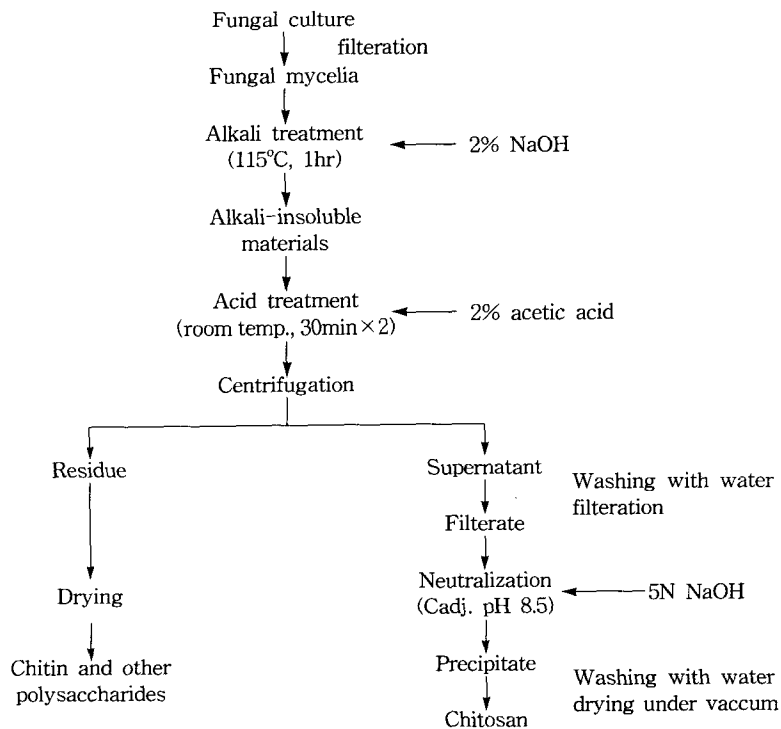


Fig. 1. Chitosan preparation from mycelium of *Cunninghamella blakesleeana* IFO 4443-10 mutant.

NaOH용액 50ml에 넣은 후 115°C에서 1시간 동안 처리한 다음 12,000×g에서 20분간 원심분리하였다. 원심분리하여 얻은 침전물로서 2회 씻은 후 2.0% 초산 50ml로서 상온에서 1시간 교반하면서 가용성 부분을 추출하였다. 잔사를 다시 같은 방법으로 추출하고 수세한 후 여과한 여과액을 모아서 5N-NaOH로서 pH 8.5로 조절하여 석출시키고 여과하여 침전물을 수세한 다음 감압하에서 건조하였다(Fig. 1)(10).

IR spectrums

IR spectrums은 Perkin-Elmer 1720×FT-IR spectrophotometer를 사용하여 4,000cm<sup>-1</sup>에서 400cm<sup>-1</sup>로 측정하였다. 키토산의 박막은 1.0% chitosan을 함유하는 0.5% 초산용액을 glass판 상에 도포하여 건조시킨 후 ethanol 중에 팽윤시켜 떼어낸 다음 데시케터내에서 암모니아로서 초산을 중화하여 증류수로서 씻은 후 감압건조하였다. 별도로 표준품으로서 게(大日精化 Co.) 및 새우(Katogichi Co.)의 키토산을 사용하였다.

탈아세틸화도(Degree of deacetylation) Colloid 적정법에 따라 실험하였다(12).

결과 및 고찰

C. blakesleeana IFO 4443 변이주의 키토산의 생산량

Cunninghamella blakesleeana IFO 4443을 UV조사에 의하여 돌연변이시킨 변이주 중 Cunninghamella blakesleeana IFO 4443보다 키토산의 생성능이 우수한 변이균주를 선별하여 300ml 삼각 flask에 선별된 변이주를 접종하여 배양한 다음 키토산의 함량을 측정하여 키토산 생산능이 제일 좋은 균주를 Cunninghamella blakesleeana IFO 4443-10이라 하였다. 본 실험에서 선별된 변이주 중 C. blakesleeana IFO 4443의 키토산 함량이 건조 균사체 무게당 940mg/l이었으나 C. blakesleeana IFO 4443-10의 키토산 생성량은 건조 균사체 무게로서 1012mg/l이었다.

C. blakesleeana IFO 4443-10의 균체로부터 키토산의 추출

C. blakesleeana IFO 4443-10를 5L용량의 발효조에서 48시간 배양시킨 후 배양액을 glass filter로 여과하여 얻은 균체를 Fig. 1의 방법에 따라 chitosan을 추출하였다.

C. blakesleeana IFO 4443-10를 배양한 후 균체에서

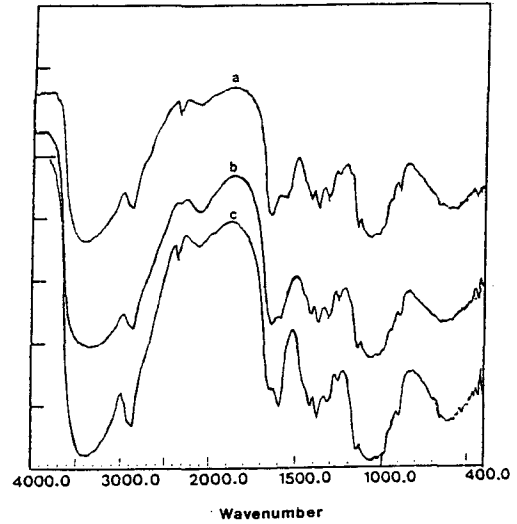


Fig. 2. Infrared absorption spectra of chitosan films. Chitosan films were prepared from standard, crab (a), prawn shell(b) and alkali insoluble chitosan(c) obtained from Cunninghamella blakesleeana IFO 4430-10.

추출한 알칼리 불용 키토산을 표준품으로 게 및 새우에서 추출한 키토산과 비교하기 위하여 IR-spectra를 측정 한 결과 Fig. 2에 나타내었다. C. blakesleeana IFO 4443-10에서 추출한 알칼리 불용성 키토산의 IR spectra는 표준품으로 사용한 키토산과 유사하였다.

배양시간 및 배지조성에 따른 키토산의 수율

C. blakesleeana IFO 4443-10를 옥수수 첨가배지와 쌀 첨가배지로 구분하여 48~96시간동안 배양하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 키토산의 수율은 배양이 72 시간에서 가장 좋았고 96시간 발효에서는 오히려 감소하였다. 그리고 쌀과 옥수수를 첨가했을 때 각각 1012±10.2mg/l 및 728±3.5mg/l의 키토산을 얻어 옥수수의 배지에서보다 쌀을 첨가한 배지에서 더 높은 수율을 얻을 수 있었다. 미생물들로부터 얻어지는 키토산의 양은 균의 종류 및 균주에 따라 다르며, Mucoraceae에 속하는 균주들로부터 65~900mg/l의 양을 생산할 수 있었

Table 1. Effect of harvest times of mycelium and growth medium on chitosan yield

Mycelium harvest times (hour)	Chitosan yield, mg/L	
	Rice medium	Corn medium
48	648± 7.4	294±2.8
72	1012±10.2	728±3.5
96	634± 3.9	446±7.3

으며(10), 특히 *Rhizopus* 균주들로부터 330~645mg/l이 얻어진 바 있다. Hwang(13)은 *Rhizopus oryzae*의 mycelia로부터 700mg/l의 키토산을 얻을 수 있었다고 보고하였다.

따라서 본 연구에서 사용된 *C. blakesleeana* IFO 4443-10이 쌀을 첨가한 배지에서 다소 높은 함량의 키토산을 얻을 수 있었다.

#### pH 변화에 따른 키토산의 수율

Fig. 3은 배양기간 중에 pH 변화(3.0~7.0)에 대한 균체의 생산량과 키토산의 수율을 나타내었다. *C. blakesleeana* IFO 4443-10은 pH 4.0~6.0의 비교적 광범위한 영역에서 우수한 생육특성을 보였으며, pH 4.5에서 최대의 생육조건을 나타내었으나, 이후 pH가 증가함에

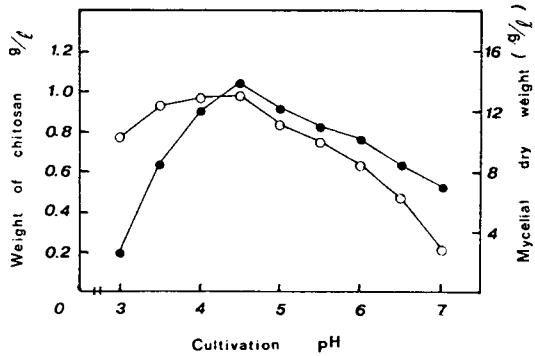


Fig. 3. Effect of cultivation pH on chitosan production and growth rate of *C. blakesleeana* IFO 4443-10. The *C. blakesleeana* IFO 4443-10 was cultivated in a jar fermentor(5L) at 30°C for 3days. Mycelial dry weight: ○-○, Chitosan yield: ●-●

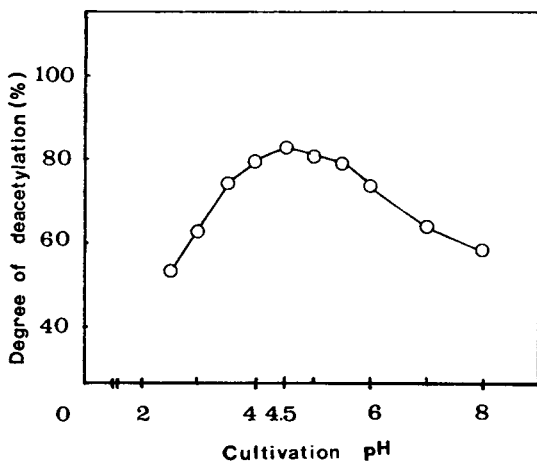


Fig. 4. Effect of the cultivation pH on the degree of deacetylation of the chitosans obtained from *C. blakesleeana* IFO 4443-10.

따라 균사체량이 서서히 감소하는 경향을 보였다. 또한 pH에 따른 키토산의 생성량은 pH가 4~5사이에서 가장 좋았으며 pH 4.5에서는 키토산의 생성량이 1,012mg/l로서 가장 높았다.

#### 키토산의 탈 아세틸화도

키토산의 탈아세틸화도를 Fig. 4에 나타내었다. 탈아세틸화도는 배양시 pH에 따라서 크게 변화하였으며 pH 4.5에서 탈아세틸화도는 84.6%로 가장 높았다. pH 4.5 전 후에는 저하되기 시작하였다.

키토산을 생산하는 곰팡이 중에서 *Mucor rouxii*의 세포벽 중의 키토산은 키틴이 생합성 하는 단계에서 키틴 탈아세틸화효소에 의하여 전환되어 생성된다는 보고가 있고(9), *Rhizopus acetoinus* HUT 1219도 키토산의 생성에는 키틴 탈아세틸화 효소량, 또는 그 활성에 여러 인자가 영향을 준다고 하였다(14).

*Mucor rouxii*는 배지의 조성변화에 따라서 탈아세틸화도가 다른 키토산이 생성된다고 하였다(10). 세포벽 중에 키틴의 탈아세틸화에는 많은 다른 요인이 관계하고 있으며, 특히 본 실험에서는 pH의 변화에 따라 탈아세틸화가 다른 키토산을 얻을 수 있었다. 그러므로 *C. blakesleeana* IFO 4443-10으로부터 키토산의 발효시에 배양액의 pH에 따라 탈아세틸화도를 제어할 수 있을 것으로 생각된다.

#### 요 약

키토산을 생산하기 위하여 *Cunninghamella blakesleeana* IFO 4443을 자외선조사하여 생성능이 우수한 *Cunninghamella blakesleeana* IFO 4443-10의 변이주를 분리하였다. 본 변이주인 *C. blakesleeana* IFO 4443-10을 30°C에서 pH 4.5에서 3일간 발효하여 mycelia 발효액을 알칼리로 처리하여 chitosan을 얻었다. 이때 chitosan의 수율은 1012mg/l로 높았으며 탈아세틸화는 84.6%이었다.

#### 감사의 글

본 연구는 1996년도 경성대학교 지원 연구비에 의하여 이루어진 것으로 깊은 감사를 드립니다.

#### 문 헌

1. 平野茂博: キチン, キトサン の 利用. 天然高分子の最新技術, シ-엠시, p.201(1982)

2. 平野茂博 : 食品素材として キチン, キトサン 研究の現状と 将来性. *フトケミカル*, **11**, 25(1986)
3. 栗田恵輔 : 未利用 バイオマス資源, キチン高度有効利用への開発. *Petrotech*, **15**, 241(1992)
4. Allan, G. C., Fox, J. R. and Knog, N. : "Proc. Ist Intern. Conf., chitin/chitosan"(ed. Muzzareli, R. A. A., Pariger, E. R.), MIT sea Grant program, Massachusetts, p.64 (1978)
5. 戸倉清一 : キチン, キトサンの 生理活性について. *フトケミカル*, **11**, 29(1986)
6. Anon : Chitin and its derivative : Opportunities in diverse Niches, \$335 million U.S. market foreseen. *Bioprocess Technol.*, **9**, 4(1987)
7. Knorr, D., Beaumint, M. D. and Pandya, Y. : Potential of acid-soluble and water-soluble chitosans in biotechnology. In "*Chitin and chitosan*" Skjak-Braek, G., Anthonsen, T. and Sanford, P.(eds.), Elsevier Applied Science, New York, p.101(1989)
8. Bartnicki-Garcia, S. : Cell wall chemistry morphogenesis and taxonomy of fungi. *Ann. Rev. Microbiol.*, **22**, 87 (1968)
9. White, S. A., Farina, P. F. and Pulton, I. : Production and isolation of chitosan from *Mucor rouxii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**, 323(1976)
10. McGahren, W. J., Perkinson, G. A., Growich, J. A., Leese, R. A. and Ellestad, G. A. : Chitosan by fermentation. *Process Biochem.*, **19**, 88(1984)
11. Knorr, D. and Klein, J. K. : Production and conversion of chitosan with cultures of *Mucor rouxii* and *Phycomyces blakesleeanus*. *Biotechnol. Lett.*, **8**, 1(1986)
12. 戸倉清一 : キチン, キトサン 実験 マニュアル. キチン, キトサン 研究会編. 技報堂出版, p.51(1991)
13. Hwang, Y. D. : Chitosan production from *Rhizopus oryzae* mycelia. *Biotechnol. Lett.*, **12**, 911(1990)
14. Kubo, T., Yoshihara, K., Hosokawa, J. and Nishiyama, M. : Effect of the cultivation pH on the degree of deacetylation of chitosan produced by *Rhizopus acetoinus* HUT 1219. *Nippon Nogeikagaku Kaishi.*, **66**, 1641(1992)

(1996년 11월 25일 접수)