

## 균류키토산의 균체생산에서 기질농도 최적화에 관한 연구

김봉섭 · 서명교<sup>†</sup> · 노종수 · 이용희 · 이국의\*  
동의공업대학 환경정보시스템과, \*동의공업대학 화학공업과

### Optimization of Substrat Concentration in Cell Production of Fungal Chitosan

Bong Seob Kim · Myung Gyo Suh<sup>†</sup> · Jong Su Roh · Yong Hee Lee · Kook Eui Lee\*

Dept. of Environmental & Bio-Engineering, Dongeui Institute of Technology

\*Dept. of Chemical Industry, Dongeui Institute of Technology

(Received June 3, 2003; Accepted August 11, 2003)

#### ABSTRACT

In the process of producing chitosan from crustacean shell, the use of excessive acid and alkali is causing the problems of environmental pollution and of production cost. In this study, one way to solve these problems is to cultivate fungi, then, to extract chitosan from the cell wall. By means of flask incubation and batch cultivation, the optimum cultivation conditions for mass production of continuous cultivation was found. Four strains used for the production of fungal chitosan were *Gongronella butleri* IFO8080, *Absidia coerulea* IFO5301, *Rhizopus delemar* IFO4775, *Mucor tuberculisporus* IFO9256. In flask incubation to select strain of producing much chitosan by means of experiment of the effect of initial pH, *Absidia coerulea* IFO 5301 had highest yield in FCs,  $258.1 \pm 47.3$  mg/200 ml at pH 6.5. In flask incubation under the optimum cultivation condition, temperature 27°C, culture time 6days, glucose 2%, peptone 1%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 0.5%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1%, NaCl 0.1%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.01%, the yield of DCW brought the highest yields. In batch bioreactor, the optimum cultivation condition was that cell suspended solution was 70 ml, aeration rate 0.5 l/min, agitation rate 800 rpm, culture time 36 hr. In continuous bioreactor, the optimum substrate flow rate was 4 l/day.

**Keywords:** Chitosan, DCW, Fungal Chitosan(FCs), Bioreactor

## I. 서 론

인공 합성물질로 인한 지구 환경 문제가 심각하게 대두되고 있어, 천연 고분자 물질에 대한 인식이 더욱 높아지고 있다. 또한 천연 고분자 물질은 적당한 화학 수식을 통하여 분자구조 및 성분을 변화시킬 경우 그 가능성이 뛰어난 물질로 변화시킬 수 있으므로 많은 연구자들에게 관심의 대상이 되고 있다. 이러한 물질 중에서 지금 크게 주목받고 있는 것이 키토산이다.<sup>1-5)</sup>

키토산의 제조는 키토산 기원 생물의 종류에 따라 다르다. 크게 갑각류의 경우와 균류로 나눌 수 있다. 먼저 갑각류의 경우에는 두 가지 공정, 즉 묶은 알칼리

처리에 의한 탈단백질 공정과 묶은 산처리에 의한 탈회분 공정을 거쳐 키틴(chitin)을 제조한 다음, 다시 높은 온도의 진한 알칼리에서 탈아세틸화 시켜 최종 키토산을 제조한다. 이와같은 화학적인 처리 방법은 키토산의 순도를 저하시키는 문제를 유발하므로 바이오(bio)수법을 이용한 제조법이 그 대안이 되고 있다. 그 중의 한가지 방법이 균류로부터 키토산을 추출하는 방법이다. 균류 키토산은 천연에 유일하게 그 자체로 존재하기 때문에 키토산을 다량 함유한 균주를 찾아내어 이를 최적의 배양조건에서 균체를 생산하여 키토산을 추출한다면 분자량 등의 물리화학적 특성이 균일할 뿐만 아니라 생산비용도 절감할 수 있을 것이다.

균의 세포벽 지지체의 일부로 존재하는 키토산의 함량이 많은 균류는 *Mucorales*, *Phycomyces*, *Absidia* 속 등으로 보고되고 있다.<sup>6-8)</sup> Kobayashi 등<sup>7)</sup>은 *Absidia* 속의 36균주로부터 얻은 키토산의 수율은 10~244 mg/

<sup>†</sup>Corresponding author : Dept. of Environmental & Bio-Engineering, Dongeui Institute of Technology  
Tel: 82-51-860-3256, Fax: 82-51-860-3335  
E-mail : mongo@dit.ac.kr

200 ml)이었고 그 중 *Absidia butleri* HUT1001이 가장 높은 키토산 수율을 나타내었다고 보고하였으며, Shimahara 등<sup>9)</sup>은 *Mucoraceae*과의 125균주 실험에서 *Absidia* 속이 비교적 키토산 함량이 많은 것으로 보고하였다. 또한 Rane 등<sup>10)</sup>도 몇 종의 균류 실험에서 *Absidia coerulea* ATCC14076 및 NRRL1315가 가장 높은 수율이 나타났다고 보고하였다.

본 연구에서는 먼저 플라스크 배양에서 4 균주로부터 균체 및 키토산 수율이 높은 균주를 선정하였다. 그리고 회전식 및 연속식 생물반응기를 이용하여 균체 생산 최적 조건들을 선정하여 균류키토산의 원료가 되는 균체의 대량생산의 가능성을 얻고자 하였다.

## II. 연구방법

### 1. 사용균주 및 균배양

본 실험에 사용한 4균주는 *Gongronella butleri* IFO 8080, *Absidia coerulea* IFO 5301, *Rhizopus delemar* IFO 4775, *Mucor tuberculisporus* IFO 9256 등으로써 일본 발효학 연구소(東京)로부터 분양받았다. 균주의 보존을 위하여 Table 1의 PDA(potato dextrose agar) 배지에서 30일마다 계대배양하며 4°C에서 보존하였다. 전배양은 4균주를 PDA 사면배지에 각각 접종하여 27°C의 항온기에서 7~9일간 충분히 배양시킨 후, 다시 4°C의 냉장고에 보존하면서 본배양에 사용하였다.

본배양에 사용된 균주의 배지조성<sup>8)</sup>은 Table 2와 같다. 플라스크 배양에서는 500 ml 평저플라스크에 액체 배지 200 ml를 분주하였고 생물반응기 배양은 3 l의 액

Table 1. Medium composition for slant culture (g/l)

Composition	Contents
Potato	200.0
Dextrose	20.0
Agar	15.0

Table 2. Medium composition of strain for fungal chitosan production (g/l)

Composition	Contents
Glucose	20.0
Peptone	10.0
Yeast extract	1.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0
NaCl	1.0
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.1

체배지를 가한 다음, 121°C에서 15분간 멸균하였으며, 이를 실온에 방냉한 다음, 1N HCl로 초기 pH를 조절하였다. 균현탁액은 무균상에서 전배양한 시험관에 멸균증류수를 가하여 vortex mixer로 2~3분간 포자를 떨구어 포자 현탁액(약 5×10<sup>4</sup> spores/ml)을 제조하여 본 배양에 사용하였다.

### 2. 실험장치

플라스크 배양에서는 진폭 7 cm이고 회전수는 130 rpm인 회전형 진탕배양기(C-SKI-2)를 사용하였으며, 균체의 대량생산을 위해 사용된 생물반응기(KF-25L)는 Fig. 1과 같다. 반응조 내부의 부피는 5 l이며, 내경과 높이는 각각 17 cm와 24 cm로써 실제로 실험에 사용된 배지의 부피는 3 l였다. 배양온도를 조절하기 위하여 반응조 하부에 가열기와 냉각기가 부착되어 있으며, 교반속도(agitation rate)는 반응조 내부의 프로펠러에 의해서 speed controller로 조절하였고 유입공기는 air compressor로부터 오염을 막기위해 air filter를 거쳐 반응조 하부의 공기유입구로부터 공급하였으며, 공기유입량(aeration rate)의 조절은 공기유량계(air flowmeter)를 사용하였다. 그리고 반응조 상부에는 냉각관과 온도계가 있으며, 배양액의 pH 조절은 자동 pH 조절용 센서가 부착된 pH 메타를 이용하여 1N HCl과 1N NaOH

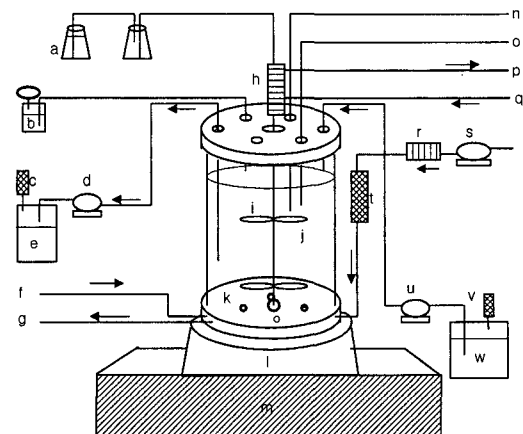


Fig. 1. Apparatus of continuous-type bioreactor.

- a: Ethanol
- b: Antiform
- c, t, v: Air filter
- d, u: Peristaltic pump
- e: Effluent sample vessel
- f, q: Water in
- g, p: Water out
- h: Condenser
- i: Propeller
- j: Bio-reactor vessel
- k: Air inlet port
- l: Heater
- m: Motor
- n: Thermometer
- o: pH meter
- r: Air flowmeter
- s: Air compressor
- w: Substrate vessel

로 조절하였다. 그리고 거품을 제거하기 위하여 소포제로 실리콘수지(KM 722)를 사용하였다.

연속식의 경우는 기질의 유입과 유출을 위하여 반응조 상단에 기질 유입구와 배출구를 장치하였으며, 기질의 일정한 유입을 위하여 정량펌프(peristaltic pump)를 사용하였다. 그리고 유출되는 균체는 계속하여 증식할 수 있으므로 주위를 얼음으로 채운 보관병에 회수하였다.

### 3. 균체생산 배양조건

플라스크 배양에서 최적의 균주를 선정하기 위하여 초기 pH, 배양온도, 배양시간을 달리하여 실험하였다. 먼저 500 ml의 평저플라스크에 200 ml의 배지를 가하여 고압증기멸균기에서 121°C, 15분간 멸균한 다음, 실온에서 방냉하였다. 여기에 1N HCl을 가하여 각각 pH 4.5, pH 5.0, pH 5.5, pH 6.0 및 pH 6.5로 초기 pH를 조절한 다음, 균현탁액을 각각 2 ml씩 가하여 130 rpm, 27°C의 5일간 진탕배양하였다. 배양 후 균체를 회수하여 수세한 다음, 에탄올에 하룻밤 방치하였으며, 이를 다시 수세 및 탈수한 다음, 동결건조하여 각 초기 pH에 따른 건조균체중량을 측정하여 최적의 초기 pH를 선정하였다.

배양온도는 24°C, 27°C 및 30°C로 달리하여 130 rpm에서 5일간 각각 진탕배양하여 건조균체의 수율을 비교하여 최적의 배양온도를 선정하였으며, 배양시간은 7일간 각각의 균주를 배양시키면서 매일 균체를 회수하여 건조균체량을 측정하여 최적배양시간을 선정하였다.

생물반응기를 이용한 최적의 균체생산조건을 선정하기 위하여 균의 농도, 교반속도, 공기유입량 및 배양시간 뿐만 아니라 연속식의 기질유입량의 영향을 실험하였다. 먼저 3l의 배지가 들어있는 반응조 전체를 고압증기 멸균기에서 121°C, 15분간 멸균한 다음, 플라스크 배양에서 선정된 초기 pH와 배양온도로 조정하였다. 여기에 균현탁액을 20~80 ml까지 10 ml 간격으로 각각 접종한 다음, 반응조내의 공기유입량 1.0 l/min, 교반속도 600 rpm에서 24시간 배양하였으며, 각각의 균현탁액의 농도에 따른 균체생산량을 비교하여 적정 균농도를 선정하였다. 반응조내의 교반속도는 speed controller로 조절하여 400~1,000 rpm까지 200 rpm 간격으로 각각 달리 적용하여 균을 24시간 배양하였으며, 각 회전속도에 따른 배양 후, 건조균체수율을 측정하여 적정 교반속도를 선정하였다. 그리고 공기유입량은 0.5~2.0 l/min까지 0.5 l/min 간격으로 조절하면서 24시간 배양하였으며, 각각에 대한 균체생산량을 구하여 적정 공기유입량을 선정하였다. 또한 배양시간은 24~48시간까지 12

시간 간격으로 달리 적용시켜 균을 배양 하였으며, 각 배양시간에 따른 건조균체량을 측정하여 적정 배양시간을 선정하였다.

연속식 생물반응기에서 반응조내로의 기질 유입속도(substrate flow rate)는 2 l/day, 4 l/day, 6 l/day로 하였으며, 이는 유입된 기질이 반응조내에 머무는 시간 즉, 수력학적 체류시간(HRT, hydraulic retention time)으로 나타내면, 각각 1.5 day, 0.75 day, 0.5 day이다. 이렇게 생산된 균체를 수세 및 동결건조하여 건조균체량을 얻어 최적의 조건을 선정하였다.

### 4. 분석 및 측정법

건조 균체중량(DCW, dry cell weight)은 각 배양조건에 따라 얻은 균체덩어리를 수세한 다음, G3 glass filter로 여과하고 에탄올에 하룻밤 정도 처리하였으며, 반복 수세한 후 동결건조하여 건조균체를 얻었으며, 균체 생산배지에 대한 건조 균체중량으로 나타내었다.

알칼리 불용물질(AIM, alkali insoluble materials)은 균의 세포벽 성분인 단백질 등의 골격적 성분을 분리해 내기 위하여 1N NaOH를 균체량에 대해 1:40(w/v)의 비로 가한 다음, 121°C에서 15분간 반응시켰다. 알칼리 처리된 것을 중화하기 위하여 반복하여 수세한 후, 탈수 및 동결건조하여 AIM을 얻었다. 즉, 알칼리 불용물질은 키토산량과 잔사량의 합계중량으로 구하였다.

그리고 알칼리 불용물질에는 키토산외에 다른 물질들도 함께 존재하므로 키토산을 분리해 내기 위하여 냉각관과 온도계, 그리고 stirrer를 장착한 3구 플라스크에 알칼리 불용물질을 넣은 다음, 2%의 초산을 1:50(w/v)의 비로 가하였으며, 이를 각각 95°C와 40°C의 기름욕 조상에서 12시간 반응시켰다. 불용물질과 용해물질을 분리하기 위하여 10,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상정액을 회수하였고 불용물질은 다시 2, 3차 산처리하여 상정액을 회수하였다. 회수된 상정액을 G3 glass filter로 여과하였고, 여과된 액을 진한 NaOH 용액을 사용하여 pH 8.5로 조절하여 4°C에서 12시간 방치하여 키토산을 침전시켰다. 이 침전물을 원심분리시켜 증류수로 수세 및 중화를 반복하여 동결건조시켜 균류 키토산(FCs, fungal chitosan)을 얻었으며, 균체 생산배지에 대한 균류 키토산량으로 구하였다. 시료액의 pH 측정은 pH meter(915PDC, ISTEK Co.)를 사용하여 측정하였으며, pH 조절은 1N HCl과 1N NaOH를 사용하였다.

실험에 대한 결과치는 5회 이상 실험에 의한 평균치와 표준편차로 나타내었다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 최적의 균주선정

초기 pH에 따른 4균주 *Absidia coerulea* IFO 5301, *Gongronella butleri* IFO8080, *Rhizopus delemar* IFO4775, *Mucor tuberculisporus* IFO9256의 DCW, AIM 및 FCs는 Table 3과 같았다. 각 균주들 중에서 *A. coerulea* IFO5301과 *G. butleri* IFO8080이 초기 pH에 따른 전반적인 건조균체 생산이 높았으며, *A. coerulea* IFO5301은 초기 pH 6.5에서 건조균체중량이 1,514.3±45.4 mg, *G. butleri* IFO8080은 초기 pH 5.5에서 2,044.0±45.5 mg으로써 가장 수율이 높았다. 그러나 초기 pH에 따른 알칼리 불용물질의 수율은 *A. coerulea* IFO5301의 경우, 481.7±81.7~605.7±21.4 mg/200 ml, *G. butleri* IFO8080은 446.0±21.7~546.6±47.8 mg/200 ml, *M. tuberculisporus* IFO9256은 180.1±23.6~315.4±10.0 mg/200 ml, *R. delemar* IFO4775은 113.1±32.3~174.3±13.5 mg/200 ml로써 *A. coerulea* IFO5301이 초기 pH 6.5에서 605.7±21.4 mg/200 ml로

4균주 중 가장 높은 수율을 나타내었으며, 그 다음으로 *G. butleri* IFO8080이 초기 pH 5.5에서 546.6±47.8 mg/200 ml였다. 또한 균류키토산의 생산에서는 *A. coerulea* IFO5301의 경우, 204.8±34.8~258.1±47.3 mg/200 ml로써 초기 pH 6.5에서 가장 수율이 높았다. Shimahara 등<sup>9)</sup>과 Rane 등<sup>10)</sup>도 균류 키토산 생산 실험에서 *A. coerulea*의 수율이 가장 높게 나타난다고 보고 하였으며, 이는 본 실험의 결과와 일치하였으므로 *A. coerulea* IFO5301을 균체 및 키토산 생산 최적 균주로 선정하였다.

그리고 선정된 *A. coerulea* IFO5301의 배양온도의 영향을 알아보기 위하여 각각 24°C, 27°C 및 30°C에서 5일동안 130 rpm에서 진탕배양하였으며, 균체생산 결과는 Table 4와 같이 나타났다. 24°C, 27°C 및 30°C의 배양온도에서 건조균체중량이 각각 1,379.71±26.03 mg/200 ml, 1,514.33±45.43 mg/200 ml 및 1,409.50±38.17 mg/200 ml로 나타났으며, 27°C에서 가장 많은 균체량을 얻을 수 있었는데, 이는 Rane 등<sup>10)</sup>이 보고한 *A. coerulea* ATCC14076, NRRL1315 등의 배양온도

Table 3. Yield of DCW, AIM and FCs from cultured fungal at different initial pH conditions

Initial pH	Strains		DCW <sup>1)</sup> mg/200 ml	AIM <sup>2)</sup> mg/200 ml	FCs <sup>3)</sup> mg/200 ml
4.5	<i>Absidia coerulea</i>	IFO5301	1,238.3 ± 12.0*	494.8 ± 11.1	211.3 ± 41.3
	<i>Gongronella butleri</i>	IFO8080	1,666.0 ± 23.5	446.0 ± 21.7	128.0 ± 21.1
	<i>Mucor tuberculisporus</i>	IFO9256	1,253.7 ± 21.5	315.4 ± 10.0	16.4 ± 43.1
	<i>Rhizopus delemar</i>	IFO4775	815.8 ± 34.7	174.3 ± 13.5	14.3 ± 22.0
5.0	<i>Absidia coerulea</i>	IFO5301	1,264.3 ± 20.0	506.0 ± 34.6	215.47 ± 17.7
	<i>Gongronella butleri</i>	IFO8080	1,935.1 ± 42.1	517.9 ± 50.2	147.77 ± 35.7
	<i>Mucor tuberculisporus</i>	IFO9256	968.0 ± 57.1	243.3 ± 41.9	13.40 ± 20.0
	<i>Rhizopus delemar</i>	IFO4775	530.3 ± 12.3	113.1 ± 32.3	9.01 ± 31.1
5.5	<i>Absidia coerulea</i>	IFO5301	1,226.3 ± 21.7	490.4 ± 27.3	209.24 ± 32.4
	<i>Gongronella butleri</i>	IFO8080	2,044.0 ± 45.5	546.6 ± 47.8	157.39 ± 11.9
	<i>Mucor tuberculisporus</i>	IFO9256	1,127.8 ± 34.2	283.0 ± 20.3	14.91 ± 66.1
	<i>Rhizopus delemar</i>	IFO4775	580.4 ± 10.3	124.3 ± 11.5	10.4 ± 24.4
6.0	<i>Absidia coerulea</i>	IFO5301	1,204.1 ± 23.2	481.7 ± 81.7	204.8 ± 34.8
	<i>Gongronella butleri</i>	IFO8080	1,726.2 ± 15.7	462.4 ± 50.3	132.4 ± 27.3
	<i>Mucor tuberculisporus</i>	IFO9256	717.9 ± 10.0	180.1 ± 23.6	9.1 ± 38.1
	<i>Rhizopus delemar</i>	IFO4775	536.0 ± 45.0	114.1 ± 75.2	9.2 ± 10.7
6.5	<i>Absidia coerulea</i>	IFO5301	1,514.3 ± 45.1	605.7 ± 21.4	258.1 ± 47.3
	<i>Gongronella butleri</i>	IFO8080	1,814.0 ± 10.0	485.4 ± 12.3	139.4 ± 20.0
	<i>Mucor tuberculisporus</i>	IFO9256	1,054.7 ± 23.4	264.8 ± 33.5	14.3 ± 27.4
	<i>Rhizopus delemar</i>	IFO4775	631.4 ± 01.2	134.5 ± 24.8	11.0 ± 01.5

<sup>1)</sup>Dry cell weight, 5days fermentation at 27.0°C, 130 rpm

<sup>2)</sup>Alkali insoluble materials, treatment with 1N NaOH for 15 min at 121°C

<sup>3)</sup>Fungal chitosan, treatment with 2% acetic acid for 12 hr at 95°C

\*Represents mean ± standard deviation, M ± S.D.

**Table 4.** Effect of temperature on production of dry cell weight by *Absidia coerulea* IFO5301\*

Temperature, °C	DCW, mg/200 ml (M ± S.D.)**
24	1,379.71 ± 26.03
27	1,514.33 ± 45.43
30	1,409.50 ± 38.17

\*Incubation condition, for 5 days at initial pH 6.5, 130rpm

\*\*Represents mean ± standard deviation

**Table 5.** Effect of incubation time on production of dry cell weight by *Absidia coerulea* IFO5301\*

Incubation time, days	DCW, mg/200 ml (M ± S.D.)**
4	1,425.35 ± 35.69
5	1,514.33 ± 45.43
6	1,624.84 ± 72.31
7	1,410.12 ± 48.01

\*Incubation condition, at initial pH 6.5, 130rpm, 27°C

\*\*Represents mean ± standard deviation

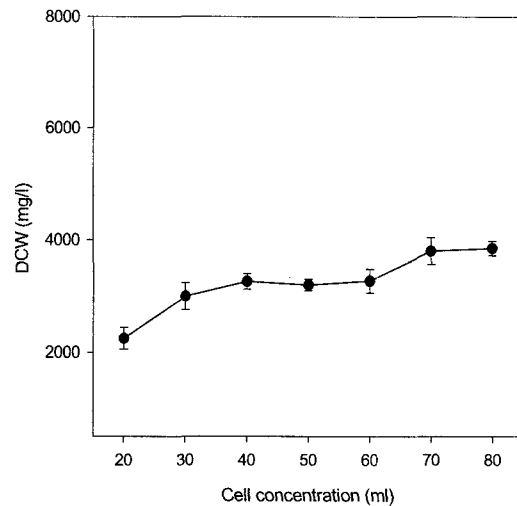
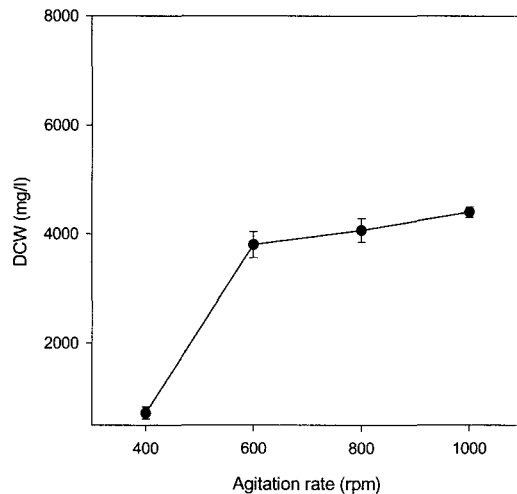
와 유사하였다.

또한 *A. coerulea* IFO5301의 배양시간에 따른 균체 생산의 영향을 알아보기 위하여 4일, 5일, 6일, 7일동안 배양시켰으며, 그 결과는 Table 5와 같이 나타났다. 배양시간 4일, 5일, 6일 및 7일에서 건조균체중량은 각각 1,425.35 ± 35.69 mg/200 ml, 1,514.33 ± 45.72 mg/200 ml, 1,624.84 ± 72.31 mg/200 ml 및 1,410.12 ± 48.01 mg/200 ml이었으며, 6일 배양에서 가장 높은 수율을 얻었고 그 이후는 약간 감소하는 경향을 볼 수 있었다.

## 2. 회분식 생물반응기를 이용한 균체생산

배양온도 27°C, 초기 pH 6.5 및 공기유입량 1.0 l/min, 교반속도 600 rpm에서 24시간 배양한 *A. coerulea* IFO5301 균주의 균현탁액 농도에 따른 균체수율은 Fig. 2와 같이 나타났다. 균현탁액의 농도 20 ml에서의 균체생산량은 2,248.17 ± 194.00 mg/l였으며, 80 ml에서는 3,848.67 ± 127.31 mg/l로써 균현탁액의 농도가 증가할수록 균체량은 증가하는 경향이었으며, 균현탁액의 농도 70 ml부터 균체생산량이 뚜렷이 증가하였으나, 그 이상에서는 거의 변화가 없는 것으로 나타났다. 그러므로 *A. coerulea* IFO5301로부터 균체생산에 있어서 균현탁액의 농도는 70 ml이 적절한 것으로 판단되었다.

교반속도에 따른 균체수율의 결과는 Fig. 3과 같이 나타났다. 이때의 배양조건은 균현탁액 70 ml 접종, 배양온도 27°C, 공기유입량 1.0 l/min 및 초기 pH 6.5이

**Fig. 2.** Effect of cell concentration on production of dry cell weight from *Absidia coerulea* IFO5301 for 24hr at aeration rate 1.0 l/min, 600 rpm, 27°C, initial pH 6.5 in batch-type bioreactor.**Fig. 3.** Effect of agitation rate on production of dry cell weight from *Absidia coerulea* IFO5301 for 24hr cell concentration 70 ml, aeration rate 1.0 l/min, 27°C, initial pH 6.5 in batch-type bioreactor.

었다. Fig. 3에서와 같이 기질의 교반속도는 접종된 균과 유입되는 공기의 접촉면적을 크게함으로써 균의 생육에 영향을 미치는 것으로 생각되었다. White 등<sup>4)</sup>에 의하면 회분식 배양기에서 교반속도를 300~500 rpm으로 증가시켰을 때, 건조균체중량이 2~5 g/l로 증가한다고 보고하였는데, Fig. 3에서도 교반속도 400 rpm에서 24시간 배양된 균체량은 720.43 ± 110.21 mg/l로써 매우

작았으나, 교반속도 600 rpm에서는  $3,801.33 \pm 240.25$  mg/l 그리고 800 rpm과 1,000 rpm에서는 각각  $4,064.00 \pm 220.11$  mg/l와  $4,400.33 \pm 100.07$  mg/l으로 증가하였다. 그러나 1,000 rpm의 교반속도에서는 생물반응기의 과부하와 심한 와류현상 등의 운전상의 문제점이 발견 되었으므로 본 실험에서는 최적의 교반속도를 800 rpm으로 적용하였다.

반응기내로 유입되는 공기의량은  $0.5 \sim 2.0$  l/min로 달리하여 균현탁액의 농도와 교반속도를 각각 70 ml와 800 rpm, 배양온도와 초기 pH는 각각  $27^\circ\text{C}$ 와 pH 6.5에서 24시간 배양하여 균체를 생산하였다. 공기유입량에 따른 균체생산량은 Fig. 4와 같이 나타났다. 공기유입량  $0.5$  l/min에서는  $5,733.51 \pm 82.10$  mg/l으로써 균체생산량이 많았으나,  $1.0$  l/min,  $1.5$  l/min 및  $2.0$  l/min에서는 각각의 균체량이  $4,064.00 \pm 220.11$  mg/l,  $3,815.82 \pm 138.43$  mg/l 및  $4,340.24 \pm 170.21$  mg/l으로써 대체적으로 감소하는 경향이였다. 교반속도와 공기유입량과의 관계에서 추정할 수 있는 것은 균의 생육에 있어서 적은량의 공기가 유입되더라도 반응기내의 집종된 배양균과 교반속도를 적절하게 조절한다면, 균체 생산을 증가시킬 수 있을 것으로 생각되었다.

그리고 배양온도  $27^\circ\text{C}$ , 초기 pH 6.5의 상태에서 균현탁액 70 ml를 접종하고 공기유입량  $0.5$  l/min, 교반속도 800 rpm으로 조절한 다음, 배양시간에 따른 영향을 알아본 결과는 Fig. 5와 같이 나타났다. 배양

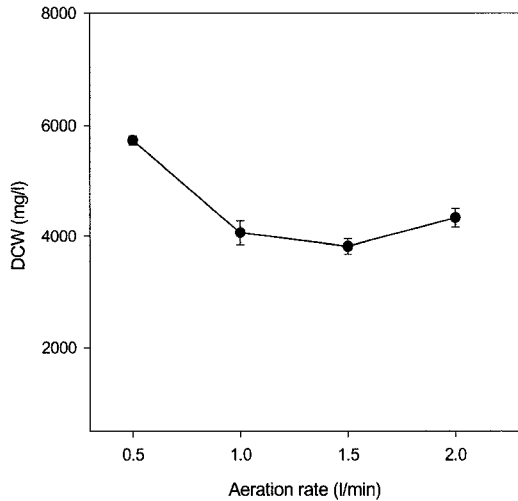


Fig. 4. Effect of aeration rate on production of dry cell weight from *Absidia coerulea* IFO5301 for 24hr at initial pH 6.5,  $27^\circ\text{C}$ , 800 rpm, cell concentration 70 ml in batch-type bioreactor.

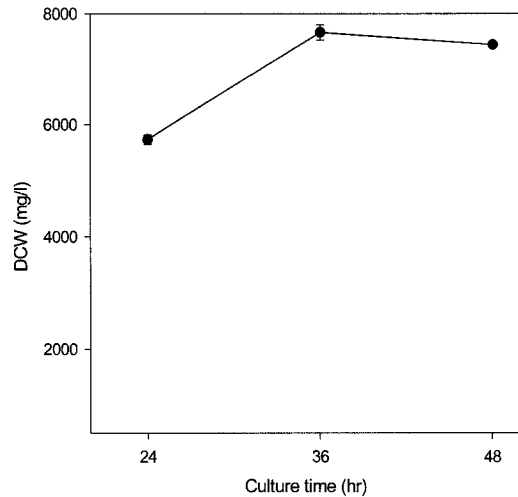


Fig. 5. Effect of culture time on production of dry cell weight from *Absidia coerulea* IFO5301 at  $27^\circ\text{C}$ , initial pH 6.5, 800 rpm, aeration rate  $0.5$  l/min, cell concentration 70 ml, in batch-type bioreactor.

시간 24 시간에서 균체량은  $5,733.51 \pm 82.10$  mg/l으로써 36시간의  $7,660.48 \pm 134.26$  mg/l에 비하여 약 1/2 정도였으나, 48시간 배양에서는  $7,440.36 \pm 151.22$  mg/l으로써 36시간에 비하여 균체량이 다소 낮을 뿐 큰 차이는 나타나지 않았다. McGahren 등<sup>6)</sup>에 의하면, *A. coerulea*를 24시간, 36시간, 48시간 배양하였을 때, 1 l당 건조균체중량은 14~19 g으로 배양시간에 따라 증가하였다고 보고한 바 있는데, 본 실험의 결과도 이와 유사하게 나타났다.

### 3. 연속식 생물반응기를 이용한 균체생산

*A. coerulea* IFO5301의 생육조건을 배양온도  $27^\circ\text{C}$ , 초기 pH 6.5, 균현탁액 70 ml, 공기유입량  $0.5$  l/min 및 교반속도 800 rpm에서 36시간 배양한 다음, 정상상태가 도달되면 기질을 일정하게 공급하는 연속식 배양으로 운전하였다. 최적의 수력학적 체류시간을 선정하기 위하여 기질유입량을 달리하여 실험한 결과, Fig. 6과 같이  $4$  l/day에서의 균체생산량이  $7,340.10 \pm 240.00$  mg/l로써  $2$  l/day 및  $6$  l/day에서의 각각  $6,230.18 \pm 460.12$  mg/l와  $5,040.00 \pm 610.43$  mg/l보다 많았다. 이러한 결과는  $2$  l/day에서는 정상상태에 도달한 균의 기질의 유입이 느려서 또한  $6$  l/day에서는 기질유입속도가 빨라 균체생산속도가 떨어진 것으로 생각되었다. 연속식 생물반응기를 이용하여 가장 최적의 생육조건에서 균체를 연속적으로 생산함으로써 균일한 제품의 균류키토산의 대량생산이 가능할 것으로 판단되었다.

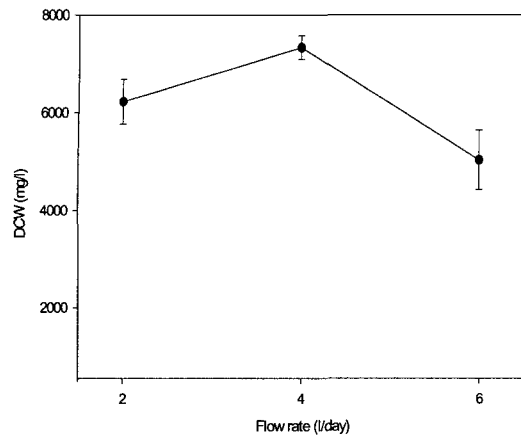


Fig. 6. Relationship between dry cell weight and flow rate for 36hr at 27°C, initial pH 6.5, cell concentration 70 ml, agitation rate 800 rpm, aeration rate 0.5 l/min in continuous-type bioreactor.

#### IV. 결 론

본 연구는 균류의 세포벽에 존재하는 키토산을 생산하기 위하여 적절한 균주를 선정하고 이로부터 균체를 대량생산하기 위한 조건을 얻고자 하였으며, 그 결과는 다음과 같다.

1. 실험에 사용된 4균주는 *Gongronella butleri* IFO8080, *Absidia coerulea* IFO5301, *Rhizopus delemar* IFO4775, *Mucor tuberculisporus* IFO9256이었다. 최적 균주 선정을 위한 초기 pH에서, 균류키토산의 수율은 *Absidia coerulea* IFO5301이 가장 높게 나타났으며, pH 6.5에서 258.1±47.3 mg/200 ml이었다.

2. 플라스크배양에서 *Absidia coerulea* IFO5301의 생육최적조건은 배양온도 27°C, 배양시간 6일 그리고 배지조성은 glucose 2%, peptone 1%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1%, NaCl 0.1%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.01%에서 건조균체중량(DCW)의 수율이 1,624.84±72.31 mg/200 ml로서 가장 높았다.

3. 생물반응기에서 생육최적조건은 균현탁액농도 70 ml, 공기유입량 0.5 l/min, 교반속도 800 rpm, 배양시간 36시간이었으며, 이때의 DCW는 7,660.48±134.26 mg/l로써 가장 높았다. 그리고 연속식 반응기 상태의 최적의 기질 유입량은 4 l/day로써 DCW는 7,340.10±240.00 mg/l이었다.

#### 참고문헌

- Hirano, S., Sato, N., Yoshida, S. and Kitagawa, S. : Chemical modification of chitin and chitosan, and their novel applications. In "Industrial polysaccharides : Genetic engineering structure/property relations and application", Ed. by Yalpani, M. Elsevier Science Publishers. 163-176, 1987.
- キチン,キトサン研究会編. : キチン,キトサン実験マニュアル. 技報堂出版, 1-17, 1991.
- Wu, A. C. M. and Bough, W. A. : A study of variables in the chitosan manufacturing process in relation and waste-treatment effectiveness. In "Proc. 1st int. conf. chitin/chitosan", (Muzzarelli, R. A. A. and Pariser, E. R. editors) MIT Sea Grant Program MITSG. 78-7. Massachusetts. 88, 1978.
- No, H. K., Samuel, P. M. and Keun, S. L. : Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste. *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 575-579, 1989.
- Bough, W. A., Salter, W. L., Wu, A. C. M. and Perkins, B. E. : Influence of manufacturing variables on the characteristics and effectiveness of chitosan products. I. Chemical composition, viscosity, and molecular-weight distribution of chitosan products. *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 1931-1943, 1978.
- Crestini, C., Kovac, B. and Giovannozzi-Sermanni : Communication to the editor production and isolation of chitosan by submerged and solid-state fermentation from *lentinus edodes*. *Biotechnol. Bioeng.*, **50**, 207-210, 1996.
- McGahren, W. J., Perkinson, G. A., Growich, J. A., Leese, R. A. and Ellestad, G. A. : Chitosan by fermentation. *Process Biochem.*, **19**, 88-90, 1984.
- Kobayashi, T., Takiguchi, Y., Shimahara, K. and Sanan, T. : Distribution of chitosan in *Absidia* strains and some properties of the chitosan isolated. *Nippon Nogeikagaku Kaishi.*, **62**, 1463-1469, 1988.
- White, S. A., Farina, P. F. and Pulton, I. : Production and isolation of chitosan from *Mucor rouxii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**, 322-328, 1979.
- Shimahara, K., Takiguchi, Y. and Kobayashi, T. : Screening of mucoraceae strains suitable for chitosan production. In Proceedings of the 4th international congerence on chitin/chitosan; sandford, P., Skja^k-Bre^k, G. and Anthonsen, T., editors). ; *Elsevier Applied Science. London.*, 171-178, 1988.
- Rane, K. D. and Hoover, D. G. : Production of chitosan by fungi. In Dekker, M.(ed). *Food Biotechnol.*, **7**, 11-33, 1993.