

## 키틴 고정화 효소를 이용한 키토산 올리고당의 생산

전 유 진 · 박 표 잠 · 변 희 국 · <sup>1</sup>송 병 권 · † 김 세 권

부경대학교 화학과, <sup>1</sup>부산지방식품의약청

(접수 : 1997. 10. 16., 게재승인 : 1997. 12. 23.)

### Production of Chitosan Oligosaccharides Using Chitin-Immobilized Enzyme

You-Jin Jeon, Pyo-Jam Park, Hee-Guk Byun, Byung-Kwon Song<sup>1</sup>, and Se-Kwon Kim<sup>†</sup>

Department of Chemistry, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

<sup>1</sup>Pusan Regional Food & Drug Administration, Pusan 608-080, Korea

(Received : 1997. 10. 16., Accepted : 1997. 12. 23.)

Enzymatic hydrolysis using an immobilized enzyme was carried out to produce chitosan oligosaccharides (COSs) from chitosan effectively. Chitosanase was immobilized on eight different carriers by physical adsorption. The enzyme immobilized on chitin had higher activity than those immobilized on the other carriers in spite of its lower adsorption. The activity of chitin-immobilized enzyme was more than 90% of the original activity. Optimal temperature of the immobilized enzyme increased by about 15°C and its thermostability was excellent in relatively wide range of temperature. But its effects on pH did not improve compared to the free enzyme. The immobilized enzyme produced 153 mg/g chitosan of the reducing sugar for 3hrs of hydrolytic incubation time. The total content of higher oligomers, tetramer to hexamer, among amount of total COSs obtained for 2hrs was more than 90%. In kinetic parameters for both enzymes, immobilized enzyme showed lower affinity for substrate and reaction rate than free enzyme, however, no reduction of the rate for high substrate concentrations. Consequently, chitin-immobilized enzyme could effectively hydrolyse chitosan and produce the higher COSs without activity decrease in comparison with the free enzyme.

Key Words : chitosan, oligosaccharide, chitin, immobilization, enzymatic hydrolysis

### 서 론

키틴·키토산은 천연에 존재하는 고분자 물질 중 가장 다양하게 이용할 수 있는 biomaterials이다. 수산가공공장에서 연간 약  $1.5 \times 10^8$ 톤 정도 폐기되고 있는 갑각류 껍질로부터 추출한 키틴은 그 양적으로 대단히 풍부하지만, 용해성이 매우 낮기 때문에 널리 이용되지 못하였으나, 생체친화성이 우수하여 인공피부나 수술용 봉합사 등 의료용 재료로서 일부 제한적으로 이용되어 왔다(1). 키토산은 키틴을 탈아세틸화하여 제조될 수 있으며, 초기에는 주로 키토산의 강력한 흡착력을 이용한 폐수처리제나 중금속 흡착제(2-5) 및 고정화 효소용 담체나 크로마토그래피용 수지(6-8)와 같은 고분자 소재로서 널리 이용되었다. 또한, 키토산의 여러 가지 생리기능성들, 즉 항균작용, 항암작용 및 면역활성 증강작용 등이 밝혀짐으로써 최근에는 기능성 식품 및 의약품 소재로서의 용도개발이 활발히 연구되고 있고(9-18), 농업용

으로서 씨앗을 코팅시킴으로써 병충해를 예방하고 수확을 증가시킨다든지(19) 혹은 동물의 사료로서 이용되고 있다(14,15).

키틴·키토산은 천연 고분자 다당류인 셀룰로오스 (cellulose)나 카라기난 (carrageenan)과 마찬가지로 우리 인간의 위장관 (gastrointestinal tract)에서 소화되거나 흡수되지 못한다. 즉 위장관에는  $\beta$ -1,4 글리코시드 결합 (glycosidic linkage)을 분해할 수 있는 효소가 존재하지 않는다(20). 따라서 키틴·키토산을 섭취하더라도 체내에서 흡수되는 것은 리소자임에 의해서 분해된 극히 일부의 올리고당에 한정될 수 밖에 없다.

키틴·키토산이 발현하는 여러 가지 생리활성 중 가장 많은 관심을 끄는 것은 면역활성 증강 내지 부활에 의한 항암활성이다. 이에 관한 연구에서 보면, 키토산으로서 항암활성이 가장 높은 것은 탈아세틸화도가 약 70%인 DAC-70으로 알려져 있는데 (13,14,21), 이러한 결과들은 대부분은 마우스의 복강이나 정맥 내 투여에 의한 것이므로 구강에 의한 섭취에서의 효과는 의문시 되고 있다. Suzuki 연구팀은 키틴·키토산을 가수분해하여 얻어진 올리고당의 항암활성에 관한 보고에서, 각각 N-acetyl-D-glucosamine (키틴 구조의 기본단위) 및 D-glucosamine (키토산 구조의 기본단위)의 중합도가 6(hexamer)인 N-acetylchitooligosaccharide (NACOS-6) 및 COS-6 이상의 고차 올리

† Corresponding Author : Department of Chemistry, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea.  
Tel : 051-620-6375, Fax : 051-628-8147,  
e-mail : sknkim@dolphin. pknu.ac.kr

고당은 sarcoma 180 복수종양세포, Meth-A 및 MM-46 고형 종양세포, 그리고 Lewis lung carcinoma 등에 높은 항암활성을 보였다고 보고한 바 있다(16-18, 22-26).

이와 같은 올리고당은 카틴·키토산의 효율적 이용이라는 측면에서 대단히 주목을 받고 있으나, 올리고당의 제조는 지금까지 대부분 염산에 의한 화학적 방법에 의존하고 있다. 그러나 이러한 방법은 낮은 기능성의 저중합도 올리고당 및 단당류의 대량 생성, 인체 안전성 논란, 환경오염 유발 등과 같은 몇가지의 문제점들이 지적되고 있다.

키토산 가수분해효소 (Chitosanase)를 이용한 키토산 올리고당의 제조는 화학적 방법보다 많은 잇점에도 불구하고 현재까지 실용화가 되지 않고 있는데, 그 이유는 효소가 너무 고가일 뿐만 아니라 그 활성도 매우 낮으며, 또한 생성된 올리고당과 효소와의 효율적인 분리가 이루어지고 있지 않기 때문인 것으로 판단된다. 그러나 효소를 고정화시킴으로써 값비싼 효소의 재이용, 효소의 높은 안정성 및 생성물과 효소와의 효율적 분리 등이 가능하게 된다.

본 연구에서는 효율적인 키토산 올리고당의 생산을 위하여 고정화효소를 이용한 키토산의 효소적 가수분해를 시도하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

키토산은 탈아세틸화도가 89%, 점도 20cps이며, chitosanase (*Bacillus pumilus* BN-262 유래)와 키토산 올리고당 표준품 (중합도 2에서 7까지)은 일본 Wako Pure Chemical Industries, LTD.에서 구입하였으며, D-glucosamine은 Sigma Co.(St. Louis, USA)에서 구입하였다. 고정화용 담체로 사용한 silica gel과 Sephadex는 Sigma Co.로부터, 키토산과 Chitopearl은 Wako Pure Chemical Industries, LTD.로부터 각각 구입하였다. 그외 사용된 모든 시약은 분석용 등급을 사용하였다.

### 키토산 유산염 용액의 제조

키토산 100g을 초순수 1L에 분산시키고 1M 유산용액 550mL를 첨가하여 키토산을 녹인 후, 초순수 8.2L를 첨가한 다음 포화중탄산나트륨 (NaHCO<sub>3</sub>) 용액을 가하면서 용액의 pH가 5.5로 되도록 조절한 후 전체부피가 10L 되도록 초순수를 첨가하여 1% 키토산 용액을 제조하였다.

### 키토산 가수분해효소의 고정화

고정화 효소는 고정화 담체에 물리적인 흡착법으로 얻었다. 효소 5units (694 units/g protein)를 1mL의 0.1M sodium acetate buffer (pH 5.5)에 녹여서 각종 고정화용 담체 (silica gel, Sephadex G-25 및 G-100, chitin, Chitopearl BCW-2501, 3001, 3010, 3501) 200mg에 첨가하여 4°C에서 2시간 방치한 후, 초순수 250mL로 세정하였다. 고정화 담체에 대한 효소의 물리적 흡착율은 초순수 250mL로 세정한 후 그 여액을 Lowry법(27)으로 단백질 함량을 측정하여 고정화 전후의 단백질량의 비로 계산하였다.

### 고정화 효소의 활성 측정

고정화된 효소의 활성은 1% 키토산 용액 10mL에 고정화 효

소 20mg을 첨가하여 이전의 논문에서 밝혀진 *Bacillus pumilus* BN-262 유래 chitosanase의 최적온도인 45°C에서 60분동안 반응시키고(28), 효소 불활성화를 위하여 100°C에서 10분간 가열한 후 Blix의 방법(29)에 따라 유리된 D-glucosamine 함량을 측정하여 생성된 환원당 (mg/g·chitosan)의 양으로 나타내었다.

### 키토산 올리고당 조성의 분석

고정화 효소에 의해 생성된 키토산 올리고당의 조성 분석은 TSKgel NH<sub>2</sub>-60 역상 칼럼 (4.6×250mm, TOSOH Manufacturing Co., Ltd.)의 고속액체크로마토그래피 (high performance liquid chromatography: HPLC, Spectra Physics P2000)로 분석하였다. 즉, 반응액 1mL와 아세트니트릴 1mL를 혼합하여 그 중 20μL를 컬럼에 주입하고 60% 아세트니트릴로 유출속도를 분당 0.8mL로 조절하여 용리시켰다. 키토산 올리고당의 피크는 굴절률 검출기(refractive index detector)로 검출하였다.

### 고정화 효소의 최적 조건

담체에 대한 고정화 효소의 최적 흡착율과 활성은 고정화용 담체의 첨가량을 변화시키면서 담체에 대한 흡착율과 고정화 효소에 대한 키토산 분해활성을 측정하였다. 고정화 효소의 최적 온도와 온도 안정성(열안정성)은 온도를 30~70°C까지 변화시키면서 60분동안 반응 후 활성을 측정하였고, pH와 pH 안정성은 pH를 각각 3~6 및 3~8까지 변화시키면서 활성을 측정하였다. 이때 사용된 완충용액은 0.1M citric acid로 각각의 pH에 맞게 조절하여 제조하였으며, 열안정성 및 pH 안정성에서는 특정의 조건 하에서 60분동안 방치한 후 잔존하는 효소의 활성을 측정하였다. 저장기간에 대한 효소의 활성은 최적온도에서 일정한 시간동안 저장한 후 남아 있는 효소의 활성을 측정하였다.

### 반응시간에 따른 고정화 효소의 가수분해 활성 및 올리고당의 조성분석

고정화 효소와 유리 효소에 대한 각각의 최적 반응조건 하에서 반응시간 경과에 따른 가수분해 활성을 환원당 생성량으로 측정하였으며, 각각의 반응시간에서 생성된 가수분해물로부터 올리고당의 조성은 TSKgel NH<sub>2</sub>-60 칼럼이 장착된 HPLC로 분석하였다.

### 고정화 효소의 K<sub>m</sub> 및 V<sub>max</sub>

고정화 효소에 의한 키토산의 가수분해 속도는 기질농도 변화에 따라 측정하여 Lineweaver Burk plot로 계산하였다.

## 결과 및 고찰

### 고정화 효소의 흡착율 및 그 활성

Chitosanase를 고정화용 담체 (silica gel, Sephadex G-25 및 G-100, chitin, Chitopearl BCW-2501, 30001, 3010, 3501)에 물리적으로 흡착시켰을 때의 흡착율을 Figure 1(a)에 나타내었다. 키토산계 입상다공성 재질 (chitosan beads)인 Chitopearl은 BCW-3010을 제외하고는 대부분 60% 이상의 흡착율을 보였으며, 특히 BCW-2501과 3001은 약 95% 이상의 높은 흡착율을 나타내었다. 그리고 silica gel과 chitin은 각각 72% 및 62%의

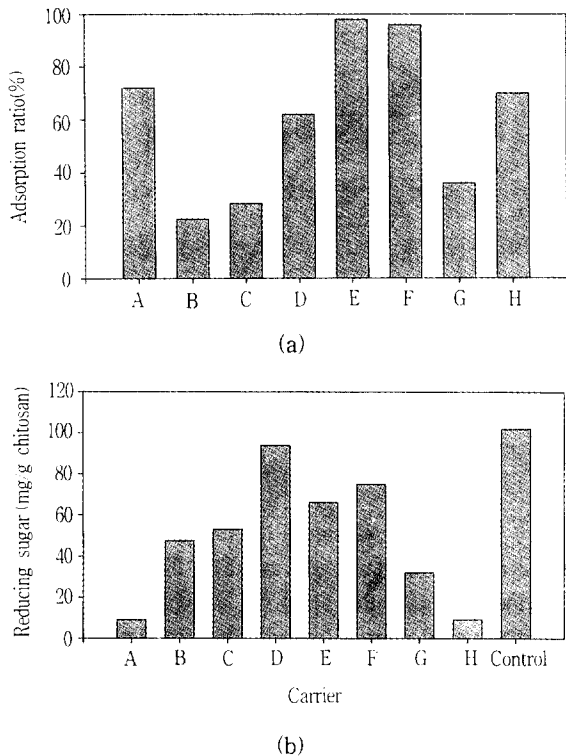


Figure 1. Adsorption ratio (a) and activity (b) of the immobilized enzyme prepared with chitosanase and various carriers. Control is the free enzyme. The used carriers were silica gel(A), Sephadex G-25(B), Sephadex G-100(C), chitin(D), Chitopearl 2501(E), Chitopearl 3001(F), Chitopearl 3010(G) and Chitopearl 3501(H) and the amount of enzyme was 5 units. The adsorption ratio of the immobilized enzyme was calculated as the ratio of the amount of protein in solution before and after immobilization. A reaction mixture containing 10mL of 1% chitosan solution(pH 5.5) and 20mg of the immobilized enzyme was incubated at 45°C for 60min. The enzyme activity was expressed as the amount of reducing sugar (D-glucosamine) produced from chitosan, mg/g chitosan.

흡착율로서 비교적 높았으나 Sephadex계 크로마토그래피용 수지의 흡착율은 모두 약 20% 이하로 매우 낮았다.

각각의 담체에 흡착된 고정화 효소의 활성은 1% 키토산 유산염 용액에 고정화 효소를 첨가하여 45°C에서 60분동안 반응시킨 후 키토산으로부터 생성된 환원당 (유리 glucosamine) 함량으로 측정하여 Figure 1(b)에 나타내었다. 키토산계 다공성 재질 중 흡착율이 가장 우수한 BCW-2501과 3001의 환원당 함량은 각각 66 및 75 mg/g chitosan으로서 다소 높았지만 chitin보다는 20~30 mg/g chitosan 정도 낮았다. Silica gel은 키토산보다 높은 흡착율을 나타내었으나 활성은 거의 실패된 것으로 보아 효소의 활성부위가 silica gel과 binding하고 있을 것으로 판단되었다. 따라서 chitosanase를 이용한 고정화 효소의 제조는 chitin을 담체로 사용하는 것이 가장 효율적인 것으로 나타났으며, 이는 고정화시키지 않은 유리 효소보다 단지 약 8%만의 활성 감소를 보였다.

키토산은 몇몇 효소에 대하여 고정화용 담체로서 유용하다는 보고(30-32)가 알려져 있다. 그러나 대부분의 고정화는 glutaraldehyde와 같은 결합제(cross linking agent)를 이용하여 담체와 효소 간의 가교결합에 의해 제조되고 있다. 이는 담체에 대하여 효소의 강력한 결합이 가능하지만, 제조과정의 복잡하고 활성의 저하된다는 단점이 있다. 이에 비해 물리적 흡착법에 의한 고정화 효소의 제조는 방법이 간단하고 활성의 감소가 적지만 결합이 강하지 못하다는 단점을 가지고 있다. Chitosanase를 키토산에 물리적 흡착법으로 고정화하였을 때는 흡착율은 낮았으나 그 활성은 유리 효소의 90% 이상을 보였다. 또한 키토산은 그 자체의 강한 반응성에 의해 Chitopearl과 같은 키토산 비드를 제조하여 고정화용 담체로서 이용되고 있다(33-35). Chitopearl은 키토산의 아민기에 여러 가지 유도체를 결합한 가교화 키토산 입상 다공질재이며, 키토산의 물리적 강도, 효소활성의 발현 및 고정화 안정성 등을 보완하여 제조되었다. 따라서 여기에서 사용된 Chitopearl은 대부분 높은 흡착율을 나타냈으나 고정화 효소의 활성에서는 오히려 흡착율이 다소 낮은 키토산이 높게 나타났다.

일정량의 효소용액에 고정화 담체로서 키토산의 양을 점차적으로 증가시켰을 때 키토산 고정화 효소의 흡착율과 활성을 측정하여 Figure 2에 나타내었다. Chitosanase 5 units에 키토산의 양을 10mg~500mg까지 점차적으로 증가시켜 첨가하였을 때의 흡착율은 첨가된 키토산의 양에 비례적으로 증가하였으며, 키토산 500mg일 때 최대 흡착율 (약 92%)을 보였다. 키토산 고정화 효소의 활성은 키토산 200mg 첨가하였을 때까지 비례적으로 급격하게 증가하여 환원당 생성량이 116mg/g chitosan였으나 그 이상의 키토산의 첨가에서는 오히려 고정화 효소의 활성이 감소하였다. 이러한 결과는 키토산의 효소적 가수분해 반응에서 사용된 기질의 양에 비해 키토산의 양이 너무 과잉으로 첨가되어 효소반응의 저해를 일으킨 것으로 판단된다. 따라서 chitosanase 5 units를 고정화 시키기 위해 필요한 키토산 담체의 최적 첨가량은 200mg이었다.

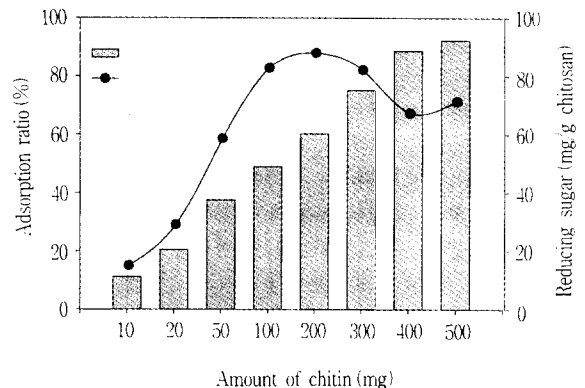


Figure 2. Adsorption ratio and activity of the immobilized enzyme according to the amount of the added chitin. Various amounts of chitin were added to 5 units of enzyme and both assays were performed under the same conditions as described in Figure 1.

온도 및 pH에 대한 고정화 효소의 활성 및 안정성

키토산을 고정화 담체로 하여 제조한 고정화 효소의 온도 및 pH에 대한 최적활성조건 및 그 안정성을 고정화하지 않은 유리 효소와 비교하여 검토하였다. Figure 3에서 유리 효소의 최적은

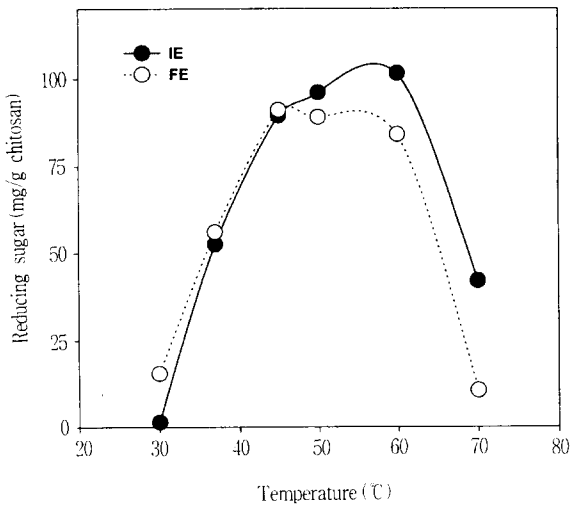


Figure 3. Effect of temperature for the activity of the immobilized enzyme (IE) and free enzyme (FE). In all experiments not specially mentioned, the amounts of IE and FE used were 20mg and 0.5 unit, respectively.

도는 45°C이며 60°C 이상의 온도에서는 급격한 감소를 보인 반면에 키틴 고정화 효소의 최적조건은 60°C이며 70°C에서도 최적활성조건에 비하여 약 40% 이상의 활성을 유지하였다. Figure 4에서 나타낸 온도에 대한 안정성에서는 유리 효소가 50°C 이상의 온도에서 급격한 감소를 보이며 70°C에서는 거의 활성을 잃은데 비하여 고정화 효소는 70°C까지 완만한 감소를 보였으며 이때의 활성은 최고활성의 약 60% 이상을 유지하였다. 이와 같은 결과에 따라 chitosanase를 키틴에 고정화시킴으로써 열안정성은 향상된 것을 알 수 있었다.

키틴은 C-2 위치의 유리 아미노기에 의해 pH 4~6의 약산성 영역에서 쉽게 용해되며, 일반적으로 키틴산을 분해하는 chitosanase는 대개 이 영역에서 최적활성을 가진다. 본 실험에서 사용된 *Bacillus pumilus* 유래의 chitosanase의 최적 pH는 5.5였으며 이것을 키틴에 고정화된 효소의 경우에도 같은 경향을 보였다(Figure 5). 단지 고정화 효소는 유리 효소보다 pH 4.5 이하의 산성 영역에서는 오히려 급격한 활성저하를 보여 pH의 감소에 의해 chitosanase의 활성부위가 키틴에 의해 상당히 저해받을 수 있었다. pH의 안정성에서도 Figure 6에 나타낸 것과 같이 유리 효소는 pH 4~6의 범위에서 비교적 일정한 활성을 보인데 반하여 고정화 효소는 pH 6에서만 유리 효소와 동일한 활성을 보였을 뿐 pH 5.5 이하의 영역과 pH 7 이상의 약알칼리성 영역에서는 모두 유리 효소보다 안정성이 낮은 것을 보였다. 따라서 chitosanase를 키틴에 고정화시킨 고정화 효소는 pH에 대하여 아무런 효과가 나타나지 않은 것으로 알 수 있었다.

Yamasaki 등(33)은 고정화 효소에 의한 키틴산의 가수분해에서, *Enterobacter* sp. G-1 유래 chitosanase를 Chitopearl에 흡착법으로 고정화시킨 효소의 최적 pH영역은 유리 효소보다도 좁을 뿐만 아니라 pH 안정성도 낮았으며, 최적온도에서도 60°C 이상에서 급격하게 활성이 낮았고 열안정성도 유리 효소에 비해 거의 개선되지 않았다. Hayashida와 Flor(31)는 고정화 amylase에 의한 전분의 가수분해에서, 키틴 고정화 효소의 pH 및 온도

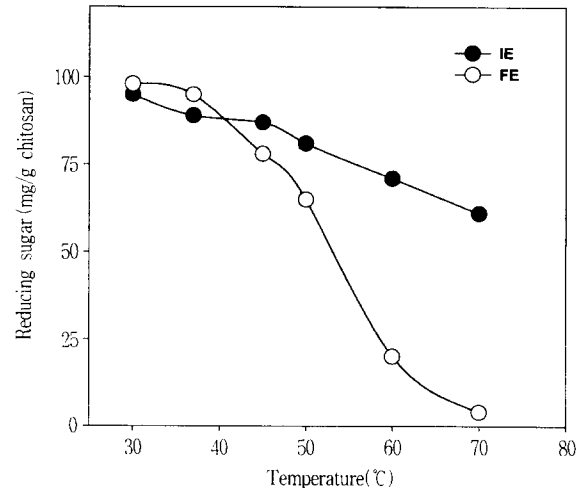


Figure 4. Effect of temperature on stability of the immobilized enzyme (IE) and free enzyme (FE). The thermostability of enzyme was measured from the activity remaining after pre-incubation at various temperatures for 60min. The incubation conditions were the same as above except for temperature, 60°C (IE) and 45°C (FE).

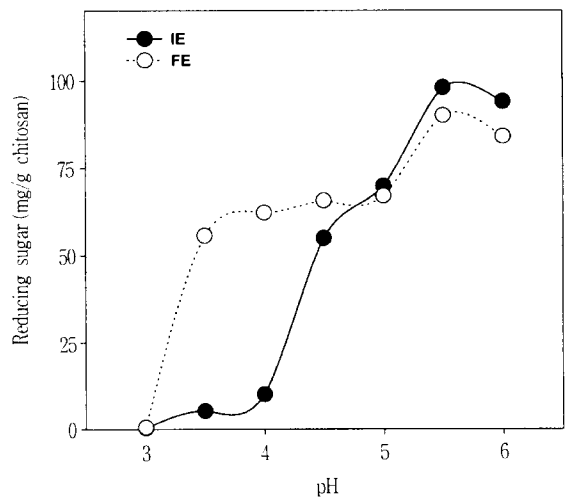


Figure 5. Effect of pH for the activity of the immobilized enzyme (IE) and free enzyme (FE).

효과는 유리 효소에 비해 약간 낮았다고 보고한 바 있다.

Chitosanase는 다른 종류의 효소에 비해 pH에 매우 민감하게 작용하며, 고정화하여도 pH안정성이나 열안정성에 대해 크게 기대할 수 없었으나, 본 연구결과의 키틴 고정화 효소는 열안정성에서 크게 개선된 것을 알 수 있었다.

#### 저장시간에 따른 고정화 효소의 안정성

고정화 효소와 유리 효소를 각각의 최적 반응온도인 60°C와 45°C에서 일정시간 방치한 후 활성을 측정하여 저장시간에 따른 효소의 안정성에 대한 결과를 Figure 7에 나타내었다. 고정화 효소와 유리 효소 모두 저장시간이 2시간 경과한 후부터 활성의

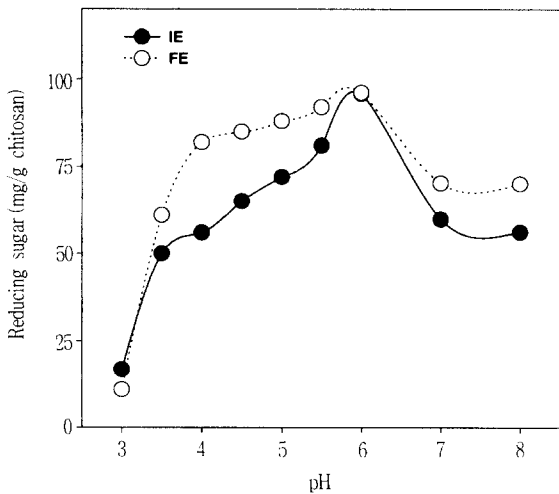


Figure 6. Effect of pH on stability of the immobilized enzyme (IE) and free enzyme (FE). The stabilities of the enzymes were measured from their activities indicated at each optimum conditions after pre-incubation at various pHs for 60min.

감소가 일어나기 시작하였으며, 4시간까지의 저장시간에서는 모든 효소에서 동일한 활성을 보였다. 그러나 그 이상의 저장시간이 경과하였을 경우에는 유리 효소는 급격한 활성의 감소를 보인데 비하여 고정화 효소는 완만한 감소를 보였다. 24시간동안 저장한 후의 고정화 효소의 활성은 약 50% 남아 있었으며, 이때 유리 효소보다 약 2배 높은 활성을 보였다. 이러한 결과는 저장온도가 유리 효소는 45°C 인데 반하여 고정화 효소는 60°C로 15°C 높은 데도 불구하고 좀 더 안정한 것으로 보아, 역시 효소를 키틴에 고정화하는 것이 효소의 열안정성 측면에서 훨씬 유리한 것으로 나타났다.

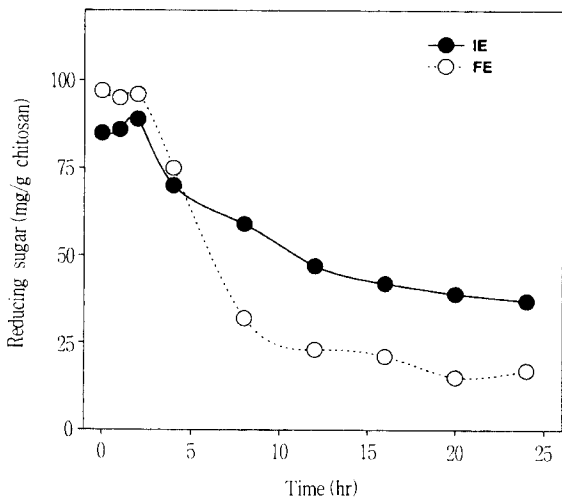


Figure 7. Changes of the activities of the immobilized enzyme (IE) and free enzyme (FE) on different pre-incubation time. The activities of both enzymes were measured by the same conditions as the above after pre-incubation for different time.

**반응시간에 따른 고정화 효소의 활성 및 올리고당 조성의 변화**

키틴에 고정화된 효소의 키틴산 가수분해반응을 반응시간 경과에 따라 생성된 환원당 함량을 측정하여 유리효소와 비교하였다. Figure 8에서 보는 것과 같이 반응초기 40분까지는 유리 효소가 높은 가수분해 활성을 보였으나 반응 1시간 이후부터는 키틴 고정화 효소의 가수분해 활성이 더 높았다. 두 효소의 최적 반응시간은 모두 3시간이었으며, 그 이후의 반응시간이 경과하여도 환원당 생성량은 거의 변화가 없어 가수분해반응이 더 이상 진행되지 않은 것으로 판단된다. 고정화 효소에 의해서 생성된 환원당의 함량은 153mg/g chitosan으로서 유리 효소의 것보다 약 18% 높았다.

반응시간의 경과에 따라 생성된 올리고당의 조성을 TSKgel NH<sub>2</sub>-60 칼럼의 HPLC로 분석하여 Figure 9에 나타내었다. 유리 효소에 의해 생성된 키틴산 올리고당(chitosan oligosaccharides: COSs)은 비교적 고차 올리고당인 COS-4~6(tetramer~hexamer)까지의 함량이 반응 1시간까지 계속적으로 증가를 보이다가 그 이후 차츰 감소하기 시작하였다. 반응 1시간에서의 올리고당 조성의 함량은 COS-6, COS-5 및 COS-4가 각각 37%, 36% 및 20%였으며, 이들을 합하면 전체 고차 올리고당의 함량이 93%에 달한다. 2시간 반응에서의 올리고당 조성비는 1시간의 경우와 거의 유사한 경향을 보였으며, 3시간 반응시간 경과 이후부터는 COS-6의 올리고당이 분해되어 존재하지 않았다.

키틴 고정화 효소에 의한 반응시간 경과에 따른 고차 올리고당 조성의 함량을 보면, 전체적으로 유리 효소의 경우와 유사한 경향을 보였으며, 반응 2시간 경과에서 COS-4~6의 총 함량은 약 87%로 가장 높았다. 다만 COS-6의 함량은 반응 1시간에서 31%로 가장 높았으며 그 이후 시간이 경과할 수록 감소하였으나 유리 효소의 경우처럼 완전히 없어지지지는 않았다.

키틴산은 고분자 뮤코 다당류로서 항균작용과 항암작용 등의

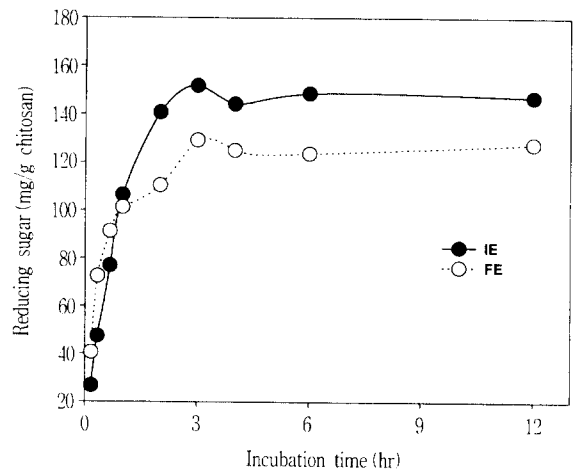


Figure 8. Enzymatic hydrolysis of chitosan by the immobilized enzyme (IE) and free enzyme (FE) for different incubation time. Hydrolysis reaction by IE was carried out at pH 5.5 and 60°C in 100mL of 1% chitosan solution with 200 mg of IE. Reaction by FE was performed the same conditions as in that of IE, except for 5 units of FE and 45°C.

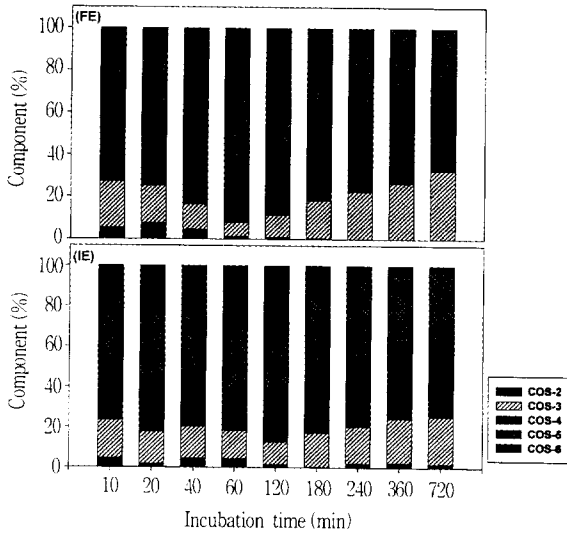


Figure 9. Components of chitosan oligosaccharides(COSs) produced by enzymatic hydrolysis of the immobilized enzyme (IE) and free enzyme (FE). The products obtained from the hydrolysis reaction of Figure 8 were chromatographed by HPLC on TSKgel NH<sub>2</sub>-60 column(4.6×25cm). One mL of the reaction solution after incubation for a special time was mixed with 1mL of acetonitrile, and 20μL of the sample was applied on the column. HPLC was done with 60% acetonitrile as the mobile phase, flow rate of 0.8mL per min, and refractive index detector at ×8 attenuation.

생리활성을 가지고 있으나 그 자체로는 체내에서 소화흡수가 되지 않아 기능성 식품이나 의약품으로서의 이용에 한계가 있다. 그러나 키틴산으로부터 올리고당으로 변환은 용해도의 증가, 물성의 변화 및 체내 흡수율의 증가 등에서 개선될 수 있다. 키틴산 올리고당 중에서도 COS-2~3과 같은 저분자 올리고당이나 단당류인 D-glucosamine은 생리활성이 거의 없는 것으로 알려져 있다. 따라서 비교적 고차 올리고당의 효율적 생성에 많은 관심이 모아지고 있다. 특히 중합도 6(hexamer)인 COS-6과 같은 올리고당은 항암작용(16-18)이나 항균작용(9)이 매우 높기 때문에 키틴산 올리고당의 생산에서 반드시 고려되어야 할 사항이다.

*Bacillus pumilus* BN-262 유래 chitosanase는 고차 올리고당을 효율적으로 생성시키는 유용한 효소이며, 이를 키틴에 결합시킨 고정화 효소에서도 고차 올리고당의 생성에서는 거의 변화가 없었다.

**고정화 효소의 K<sub>m</sub> 및 V<sub>max</sub>**

키틴에 고정화된 효소의 반응속도에서 K<sub>m</sub>은 1.62% 그리고 V<sub>max</sub>는 0.76 mmol/U로서 유리 효소의 K<sub>m</sub>(0.19%) 및 V<sub>max</sub>(1.29 mmol/U)에 비하여 kinetic parameter에서 덜 효율적으로 나타났다(Figure 10). 즉, 효소를 고정화시킴으로써 기질 친화성과 반응속도가 매우 낮아졌다. 그러나 유리 효소는 1% 이상의 높은 기질농도의 경우, 효소 반응속도에서 기질저해가 일어난 반면 고정화 효소에서는 최고 2% 기질에서도 기질저해는 일어나지 않았다. 이러한 사실은 유리 효소의 높은 기질 친화성과 높

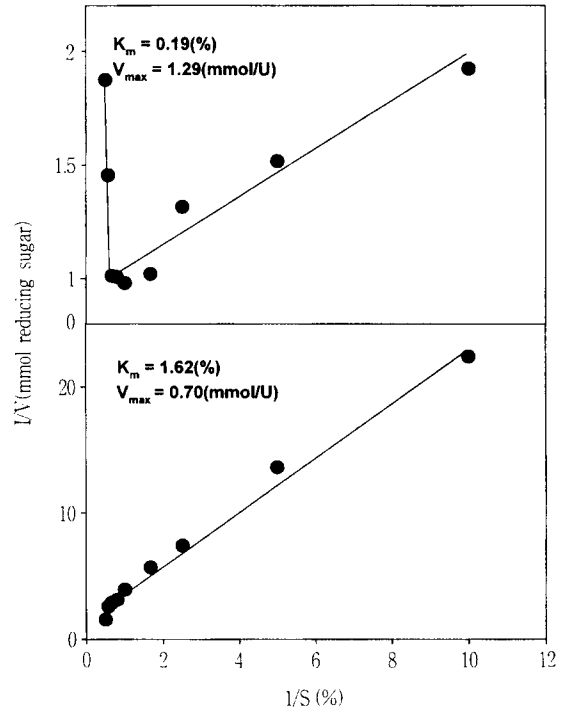


Figure 10. K<sub>m</sub> and V<sub>max</sub> of free enzyme(upper) and immobilized enzyme(down). The K<sub>m</sub> and V<sub>max</sub> for the velocity of enzymatic hydrolysis of chitosan were calculated from the Lineweaver Burk plots.

은 반응속도로 인한 영향인 것으로 판단된다. 이와 같이 두 효소의 반응속도 결과는 반응시간 경과에 따른 키틴산의 가수분해 활성에 대한 결과에서 초기반응 1시간 이전의 결과를 뒷받침하는 것으로서, 결국 키틴에 고정화된 효소에 의한 키틴산의 가수분해는 높은 기질농도에서 충분한 반응시간에 의해 보다 효율적인 올리고당의 생산이 가능할 것으로 기대된다.

**요 약**

키틴산 올리고당을 효율적으로 생산하기 위하여 고정화 효소를 이용한 키틴산의 효소적 가수분해를 시도하였다. Chitosanase는 Chitopearl계 고정화 담체에 대해서 높은 흡착율로 결합되었다. 키틴에 고정화된 효소는 비록 흡착율은 낮았지만 그 활성은 가장 높게 나타났다. 키틴 고정화 효소는 유리 효소에 비해 약 90% 이상의 활성을 유지하였다. 고정화 효소의 최적 온도는 60℃로서 유리 효소보다 15℃ 더 높았으며, 열에 대한 안정성도 유리 효소보다 넓은 온도범위에서 우수하였다. 그러나 고정화 효소는 pH에 대해서는 어떠한 뚜렷한 효과도 보이지 않았다. 고정화 효소의 저장 안정성은 유리 효소보다 더 높은 저장온도인 60℃에서도 더 안정한 것으로 나타났다. 키틴 고정화 효소에 의한 키틴산의 가수분해반응은 반응 3시간까지 급격한 증가를 보이다 그 이후의 반응시간 경과에서도 더 이상 증가를 보이지 않았다. 고정화 효소에 의해 생성된 올리고당의 조성은 효소의 반응시간에 따라 크게 의존하였으며, 2시간의 반응에서 비교적 고차 올리고당인 COS-4~6의 함량은 약 90%

이상이었다. 두 효소에 대한 반응속도상수에서, 고정화 효소는 유리 효소에 비해 낮은 기질친화성과 낮은 반응속도를 보였지만, 높은 기질농도에서도 전혀 기질저해반응은 일어나지 않았다. 따라서 키틴 고정화 효소는 유리 효소에 비해 활성의 감소없이 효율적으로 키틴산을 가수분해할 수 있었으며, 고차 올리고당의 생성량도 매우 높았다.

## 감 사

본 연구는 1995 농림부 첨단기술개발사업[(주) 키토라이프와 의 산학협동과제]연구비의 지원에 의하여 수행된 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. 木船紘爾 (1988), 키틴·키토산의生體適合材料としての利用, 別冊フードケミカル-I 키틴·키토산의科學, pp. 87-94, 食品化學新聞社, 東京.
2. 橋本正憲 (1995), 水處理材, 키틴·키토산핸드ブック, 키틴·키토산研究會編, pp. 486-504, 技報堂出版, 東京.
3. Gordon, D. T. and C. B. Williford (1983), Chitin and Chitosan: Influence on Element Absorption in Rats, ACS Symposium Series 214, Unconventional Source of Dietary Fibers, pp. 156-184.
4. Landes, D. R. and W. A. Bough (1976), Effect of Chitin - A Coagulating Agent for Food Processing Wastes - in the Diets of Rats on Growth and Liver and Blood Composition, *Bull. Environm. Contam. & Toxicol.*, **15**, 555-563.
5. Bough, W. A. and D. R. Landes (1976), Recovery and Nutritional Valuation of Proteinaceous Solids Separated from Whey by Coagulation with Chitosan, *J. Dairy Sci.*, **59**, 1874-1880.
6. Seo, H. and Y. Kinemura (1988), Preparation and Some Properties of Chitosan Porous Beads, in Proceeding of the 4th International Conference on Chitin and Chitosan, Vol. 4, pp. 585-588, Trondheim, Norway.
7. Luong, J. H., A. L. Nguyen, and K. B. Male (1987), Recent Developments in Downstream Processing Based on Affinity Interaction, *Trends in Biotechnol.*, **5**, 281-286.
8. Muzzarelli, R. A. A., G. Barontini, and R. Rocchetti (1976), Immobilized Enzymes on Chitosan Columns:  $\alpha$ -Chymotrypsin and Acid Phosphatase, *Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 1445-1454.
9. 内田 泰 (1988), 키틴·키토산의抗菌性, 月刊フードケミカル, No. 2, 22-29.
10. Kendra, D. F. and L. A. Hadwiger (1984), Characterization of the Smallest Chitosan Oligomer That Is Maximally Antifungal to *Fusarium solani* and Elicits Pisatin Formation in *Pisum Sativum*, *Exp. Mycol.*, **8**, 276-281.
11. Amako, K., S. Shimodori, T. Imoto, S. Miyake, and A. Umeda (1987), Effects of Chitin and Its Soluble Derivatives on Survival of *Vibrio cholerae* O1 at Low Temperature, *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 603-605.
12. Shimojoh, M., K. Masaki, K. Kurita, and K. Fukushima (1996), Bactericidal Effects of Chitosan from Squid Pens on Oral *Streptococci*, *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **70**, 787-792.
13. K. Nishimura, C. Ishihara, S. Ukei, S. Tokura, and I. Azuma (1986), Stimulaton of Cytokine Production in Mice Using Deacetylated Chitin, *Vaccine*, **4**, 151-158.
14. Nishimura, K., S. Nishimura, N. Nishi, F. Numata, Y. Tone, S. Tokura, and I. Azuma (1985), Adjuvant Activity of Chitin Derivatives in Mice and Guinea Pigs, *Vaccine*, **13**, 379-384.
15. Nishimura, K., S. Nishimura, N. Nishi, S. Tokura, and I. Azuma (1984), Immunological Activity of Chitin and Its Derivatives, *Vaccine*, **2**, 93-99.
16. Suzuki, K., T. Mikami, Y. Okawa, A. Tokoro, S. Suzuki, and M. Suzuki (1986), Antitumor Effect of Hexa-N-Acetylchitohexaose and Chitohexaose, *Carbohydr. Res.*, **151**, 403-408.
17. Tokoro, A., N. Tatewaki, K. Suzuki, T. Mikami, S. Suzuki, and M. Suzuki (1988), Growth-Inhibitory Effect of Hexa-N-Acetylchitohexaose and Chitohexaose against Meth-A Solid Tumor, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 784-790.
18. Tokoro, A., M. Kobayashi, N. Tatewaki, S. Suzuki, and M. Suzuki (1989), Protective Effect of N-Acetylchitohexaose on *Listeria monocytogens* Infection in Mice, *Microbiol. Immunol.*, **33**, 357-367.
19. Sandford, P. A. (1988), Chitosan: Commercial Uses and Potential Applications, in Proceeding of the 4th International Conference on Chitin and Chitosan, Vol. 4, pp. 51-69, Trondheim, Norway.
20. Weiner, M. L. (1991), An Overview of the Regulatory Status and of the Safety of Chitin and Chitosan as Food and Pharmaceutical Ingredients, in Proceeding of the 5th International Conference on Chitin and Chitosan, Vol. 5, pp. 663-672, Princeton, USA.
21. 戸倉清一 (1988), 키틴, 키토산의生理活性について, pp. 5-11, 別冊フードケミカル-I 키틴·키토산의科學, 食品化學新聞社, 東京.
22. 鈴木茂生 (1996), 키틴および키토산의水溶性低級オリゴ糖の生物活性の検討, *Fragrance J. 臨時増刊* No. 15, 61-68.
23. Tsukada, K., T. Matsumoto, K. Aizawa, A. Tokoro, R. Naruse, S. Suzuki, and M. Suzuki (1990), Antimetastatic and Growth-Inhibitory Effects of N-Acetylchitohexaose in Mice Bearing Lewis Lung Carcinoma, *Jpn. J. Cancer Res.*, **81**, 259-265.
24. 鈴木茂生 (1988), N-아세틸키토オリゴ糖と키토オリゴ糖の免疫賦活作用, *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **62**, 1241-1243.

25. Suzuki, K., Y. Okawa, S. Suzuki, and M. Suzuki (1987), Candidacidal Effect of Peritoneal Exudate Cells in Mice Administered with Chitin and Chitosan, *Microbiol. Immunol.*, **31**, 375-379.
26. Suzuki, K., A. Tokoro, Y. Okawa, S. Suzuki, and M. Suzuki (1985), Enhancing Effects of N-Acetyl-chitooligosaccharides on the Active Oxygen-Generation and Microbicidal Activities of Peritoneal Exudate Cells in Mice, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 886-888.
27. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall (1951), Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
28. Kim, S. K. and Jeon, Y. J. (1997), Production of Chitosan Oligosaccharide Using Enzyme in an Ultrafiltration Membrane Reactor, Proc. of the International Symposium and 1997 Spring Meeting of the Japanese Society for Chitin and Chitosan (Japanese Society for Chitin and Chitosan eds.), pp. 144-145, Shizuoka, Japan.
29. Blix, G (1948), The Determination of Glucosamine and Galactosamine, *Acta Chem. Scand.*, **2**, 467-469.
30. Stanley, W. L., G. G. Watters, B. G. Chan, and S. H. Kelly (1976), Feather Protein as a Support for Immobilizing Enzyme, *Biotech. Bioeng.*, **18**, 1351-1358.
31. Hayashida, S. and P. Q. Flor (1982), Raw Starch-Digestive Chitin-Immobilized Amylase from a Protease-Glycosidase-Less Mutant of *Aspergillus awamori* var. *kawachi*, *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1639-1645.
32. 전유진, 김세권 (1994), 에탄올 내에서  $\alpha$ -Chymotrypsin에 의한 Acetyltyrosine의 에스테르화 반응, *한국생물공학회지*, **9**, 312-318.
33. Yamasaki, Y. I. Fukumoto, N. Kumagai, Y. Ohta, T. Nakagawa, M. Kawamukai, and H. Matsuda (1992), Continuous Chitosan Hydrolysate Production by Immobilized Chitosanolytic Enzyme from *Enterobacter* sp. G-1, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1546-1551.
34. Yoshida, M., K. Oishi, T. Kimura, M. Ogata, and T. Nakakuki (1989), Continuous Production of Maltose Using a Dual Immobilized Enzyme System, *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 3139-3142.
35. Kimura, T., M. Yoshida, K. Oishi, M. Ogata, and T. Nakakuki (1989), Immobilization of Exo-Maltotetrahydrolyase and Pullulanase, *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 1843-1848.