

## 부분 가수분해된 수용성 키토산의 제조와 그 항균성에 관한 연구

김 천 호\* · 이 응 석 · 함 영 태 · 김 병 용\*\* · 손 태 일†

중앙대학교 생물공학과, \*한국과학기술연구원 생체재료연구센터, \*\*경희대학교 식품공학과  
(1997년 12월 22일 접수, 1998년 11월 2일 채택)

### Synthesis of Partially Hydrolyzed Water-soluble Chitosans and their Antibacterial Activities

Chun Ho Kim\*, Eung Suack Lee, Young Tae Hahm, Byung Yong Kim\*\*, and Tae Il Son†

Department of Biotechnology, Chungang University, Seoul 156-756, Korea

\*Biomaterials Reseach Center, KIST, Seoul 130-650, Korea

\*\*Department of Food Technology, Kyunghee University, Seoul 130-701, Korea

(Received December 22, 1997; accepted November 2, 1998)

**요 약:** 아질산염을 이용한 키토산의 부분가수분해 반응에서 반응이 진행됨에 따라서 탈아세틸화도는 감소하였으며 가수분해된 각 fraction에서의 탈아세틸화도는 50% 이하로 확인되었다. GPC 를 이용하여 이들 각 유도체의 수평균분자량을 확인한 결과, 물-메탄올에 의한 침전물은 6000에서 4000의 분자량을 가지고 있었으며, 메탄올-아세톤에 의해서는 2000 이하의 분자량을 가지는 것을 얻을 수 있었다. 이때 다분산도는 1.7 이하로 분자량 분포가 좁은 분해물을 얻을 수 있었다. 각 fraction 별로 분자량에 따른 항균효과를 *E. coli* HB 101과 *Bacillus subtilis* PP 2에 대해서 시험한 결과 분자량이 5100인 fraction B(H<sub>2</sub>O:MeOH=1:5)가 가장 우수하였고, 모든 시료에서 그람양성균인 *Bacillus subtilis* PP 2에 대한 항균능이 그람음성균인 *E. coli* HB 101에 비해 우수하였다.

**Abstract:** Chitosan was partially degraded by using nitrous acid. The deacetylation degree of chitosan decreased with its degree of hydrolysis. Deacetylation degree of each fraction was less than 50%. The degraded product was fractionated by means of precipitation using aqueous methanol solution or aqueous methanol-acetone solution. The molecular weight of each fraction was distributed between 6000 and 4000, and below 2000 for being precipitated using aqueous methanol solution and aqueous methanol-acetone solution respectively. They had narrow molecular weight distributions, and their polydispersities were less than 1.7. The antibacterial activities for each fraction were evaluated against *Bacillus subtilis* HB 101 and *E. coli* PP 2, gram-positive bacteria and gram-negative bacteria, respectively. Fraction B (Mw=5100) showed high antibacterial activity. All fractions were more active against *Bacillus subtilis* than *E. coli*.

**Key words:** *Bacillus Subtilis*, *E. coli*, GPC, Depolymerization, Nitrous Acid

### 1. 서 론

키토산은 게, 새우 등의 갑각류의 외골격과 조류나 균류와 같은 식물의 세포벽에 함유되어 있는 천연고분자로서 셀룰로오스와 유사한 구조를 가지고 있으며 자연계에 풍부하게 존재하고 있다. 그러나, 키토산은 용해성이 좋지 않아서 셀룰로오스만큼 이용되지 못하였지만, 1970년대 키토산의 용매 개발이후 그 탈아세틸화 화합물인 키토산과 함께 무해·무독성, 생분해성 등의 특성을 가진 기능성 고분자 재료[1-3]로서 뿐 아니라, 특정 기능성을 높이기 위해 이들의 유도체를 이용한 연구 또한 활발하다. 천연생체고분자인 키토산의 탈아세틸화물인 키토산은 유리아민기를 가지고 있기 때문에 키토산과 달리 산과 염을 형성하여 물에 용해되며, 키토산 염의 수용액은 고분자 전해질로서 성질을 나타내지만, 그 분자량은 수십만 이상으로 높고, 그 염 용액 역시 이온화되기 때문에 아주 높은 점도를 나타낸다[1]. 이 점이 생리식염수 등을 이용한 고농도 용액을 제조하고자 할 때는 오히려 단점으로 작용할 수가 있기 때문에, 고분자인

키토산을 저분자화하여 수용성인 점도가 낮은 저분자 키토산 또는 키토산 올리고당을 제조하는 것 역시 키토산 이용상의 중요한 부분이라고 할 수 있다.

이와 함께 키토산 및 그 염산염에 의한 분해물이 식물병원성의 곰팡이에 대한 생육억제효과를 나타내는 것은 Allan[4]을 필두로 Kendra 등[5]과 Uchida[6]에 의해 밝혀지면서 이들의 항균능에 대한 연구가 급속히 진행되었다. 이와 같이, 키토산 및 그들의 유도체에서 나타나는 항균성은 이들 물질이 가지고 있는 polycation성 및 단백질과의 구조적 유사성으로부터 유래된다고 추측할 수 있으며, 그 결과 세균 및 곰팡이에 대한 선택적인 항균능이 나타남을 알 수 있다. 지금까지 발표되고 있는 키토산의 항균성 메커니즘을 종합해보면, ① 키토산은 아민기를 가진 높은 cation성 고분자이고, 미생물의 세포벽을 구성하는 sialic acid 과 인지질 등의 음이온성 물질과 정전기적으로 결합되기 때문에 미생물의 자유도가 구속되어 성장을 억제되게 한다는 것[7]과, ② 키토산이 저분자화되어 미생물의 세포내로 침투함으로써 유전자 DNA에서 RNA로의 전사를 방해하여 성장을 억제한다[8]는 두 가지로 크게 요약되고 있지만 아직까지 명확히 밝혀지지는 못하였다. 그러나, 이미 Kim 등[9, 10]은 키토산에 아민기를 도입시킴으로써, 아민기와 그 치환된 작용

† 주 저자 (e-mail: tisohn@cau.ac.kr)

기에 따라 키틴에서는 발현되지 않는 항균성이 나타나며, 그 항균능은 분자량과 도입된 작용성기에 크게 영향을 받는다는 것을 밝혔으며[9], 한편 키틴산에 알킬 길이가 다른 4차 암모늄기를 도입했을 때 알킬기의 길이에 따라 즉, 소수성의 증가에 따라 항균능은 비례하여 증가됨을 이미 발표[10]한 바 있다.

본 연구에서는 이와같이 키틴산에 있어서 발현되는 항균성이 키틴산의 유리 아민기에 의해 나타나지만, 분자간 및 분자내의 견고한 수소결합 등으로 인해 산성영역에서만 용해되는 등 용해성이 제한적이기 때문에, 먼저 키틴산을 부분가수분해시켜 수용성 키틴산 유도체를 제조하였고, 이들 각 가수분해물을 이용하여 키틴산의 분자량이 항균능에 미치는 영향을 조사하여 최적의 분자량을 찾고자 하였다. 즉, 키틴산의 유리 아민기를 아질산과 반응시켜 탈아민화를 거치면서 피라노오스 고리가 파괴되고 저분자화되어 용이하게 키틴산의 부분 가수분해물을 제조할 수 있기 때문에 키틴산을 수용성으로 만드는 접근방법으로서 아질산 분해법에 의한 저분자화를 시도했으며, scale-up에 따른 분해물질의 정제 및 특성을 살펴 보았다. 또한, 이들 제조된 각 키틴산 부분 가수분해물들의 분자량에 따른 그람양성균인 *Bacillus subtilis* PP 2와 그람음성균인 *Escherichia coli* HB 101에 대해서 항균효과를 조사함으로써 최적의 분자량을 찾고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시약 및 시료

아질산염으로 분해된 키틴산은 키틴산 Floanc C (공화테크노스사)를 사용하였으며 염산, 초산, 수산화나트륨 등은 Kanto Chemical Co.의 시약 1급을, NaBH<sub>4</sub>는 Wako Pure Chem.사의 시약 1급을 그대로 사용하였다. 그 외 시약은 특급시약을 그대로 사용하였으며 유기용매는 감압증류하여 사용하였다.

2.2. 아질산 분해 및 분별침전

키틴산 25 g을 4% 초산 수용액에 용해시킨 다음, 얼음 중탕에서 교반하면서 10% 아질산 나트륨 수용액을 키틴산의 유리 아민에 대해 적정 물 비를 첨가하였다. 소정 시간 후, 우유빛의 용액을 암모니아수로 중화한 다음, NaBH<sub>4</sub>를 고체 그대로 소량씩 첨가하면서 탈아민화 반응 중에 생성된 말단기를 환원시켰다. 아질산 분해로 얻어진 키틴산 분해생성액을 여과하여 불용성 물질을 제거하고, 물, 메탄올, 아세톤을 이용한 서로 다른 혼합비를 가진 혼합용액을 이용하여 분별침전시킨 다음, 얻어진 각 fraction (A, B, C 및 D) 별로 침전물은 같은 혼합비의 용매로 수차례 세척하고 아세톤, 에테르순으로 세척하여 자연 건조시켰다 (Figure 1).

2.3. 기기 및 분석

2.3.1. 분자량 측정

얻어진 키틴산 가수분해물인 각 fraction별의 분자량은 겔 투과 크로마토그래피 (gel permeation chromatography: GPC) 를 이용하여 Universal method 법으로 구하였으며 그 측정 조건은 다음과 같다.

- Column : Asahi Pack GFA-30F
- 이동상 : 0.5% acetate buffer (pH 4.0)
- 유속 : 0.5 mL/min
- 검출계 : RI detector (SP6040 Differential Refractometer Electronics Unit)
- 표준물질 : pullulan standard
- Column 온도 : 50 °C

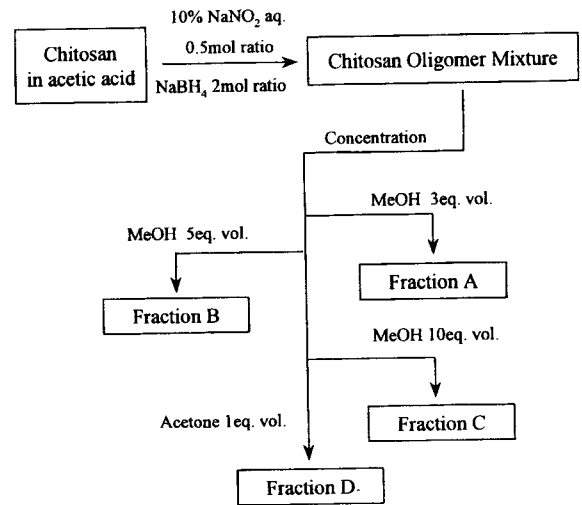


Figure 1. Preparation of chito-oligomers for the depolymerization of chitosan with nitrous acid.

2.3.2. 탈아세틸화도 측정

키틴산 0.5 g을 평량하고 이것을 5% 초산 용액 (v/v)에 용해시켜 정확하게 100 g으로 한다. 이 초산 용액에 용해시킨 키틴산 용액 1 g을 200 mL의 비이커에 정확하게 취하고, 증류수 30 mL를 첨가하고 충분히 교반한다. 지시약으로는 0.1% toluidine blue 2-3 방울을 떨어 뜨린 다음, N/400 potassium polyvinyl sulfate 용액으로 적정하여 다음식을 이용하여 탈아세틸화도[11]를 구하였다.

$$\text{탈아세틸화도 (\%)} = \frac{\frac{X}{161}}{\frac{X}{161} + \frac{Y}{203}} \times 100$$

$$X = \frac{1}{400} \times \frac{1}{1000} \times f \times 161 \times v$$

$$Y = 0.5 \times \frac{1}{100} - X$$

f = N/400 potassium polyvinyl sulfate 용액의 factor

v = N/400 potassium polyvinyl sulfate 용액의 소모량

2.4. 항균성검사[12]

키틴산 분해물질의 항균성을 조사하고자, 각 fraction 별로 1%의 수용액을 그람음성균주인 *E. coli* HB 101과 그람양성균주인 *Bacillus subtilis* PP 2의 배양액에 첨가하여 균의 성장 억제력을 측정하였다. LB broth에 하룻밤 배양하여 정지기에 있는 배양균 50 μL를 새로운 1%의 키틴산 분해물질을 함유한 10 mL LB broth에 접종한 다음, 두 시간 간격으로 8시간까지 분광광도계 (spectrophotometer) 를 이용하여 OD<sub>600</sub>에서 cell 농도의 변화를 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 키틴산 분해물의 제조

키틴산에 아질산을 첨가하면 글루코사민 잔기상의 아미노기가 탈아미노화하여 반응이 일어나며, 계속해서 피라놀 전이반응에 의해 말단에 2,5-anhydro-D-mannose를 가지는 키틴산올리고당이 생성[13]된다. 여기서 생성된 2,5-anhydro-D-mannose는 알데히드기를 가지기 때문에 불안정하여 부생성물이 생성되기 쉽다. 따라서 수소화붕소나트륨으로 환원시킴으로서 탈아미노 반응시 생성된 알

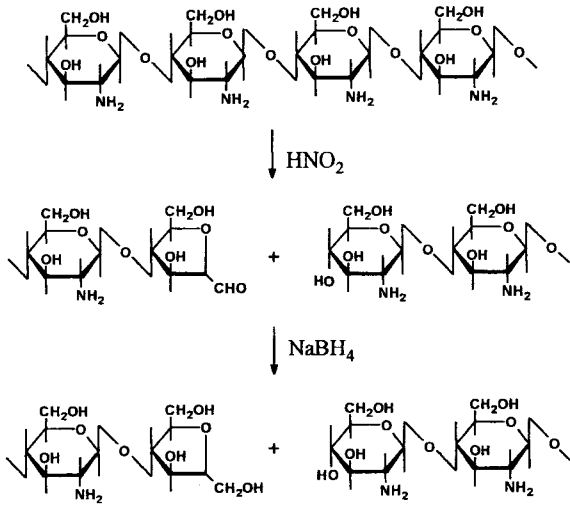


Figure 2. Schematic structure of low molecular weight chitosan.

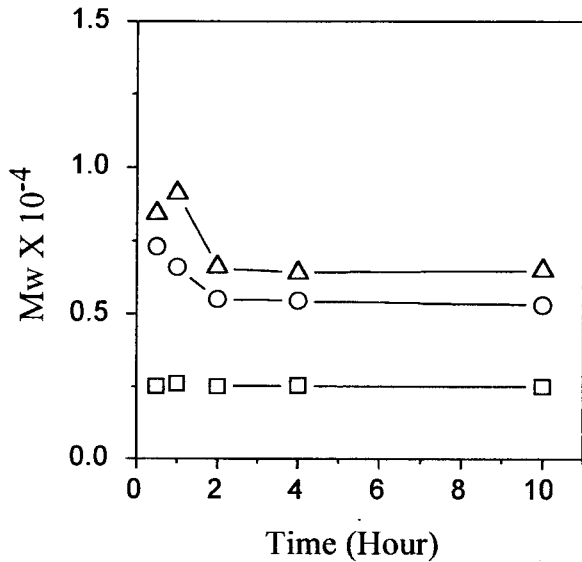


Figure 3. The time course of molecular weight for the depolymerization of chitosan with nitrous acid (mol. of nitrous acid/glucosamine unit:  $\Delta$ ; 0.3,  $\circ$ ; 0.5,  $\square$ ; 0.7).

데히드를 안정한 알코올형인 2,5-anhydro-D-mannitol로 전환시켰다 (Figure 2).

### 3.2. 아질산 분해 시간에 의한 분자량의 변화

아질산 분해에 의해서 생성되는 분해산물에 대한 분자량을 Figure 3에 시간에 따라 분석하여 나타내었다. 사용된 아질산이 키토산의 유리 아미노기에 대하여 0.3 당량인 경우에는 서서히 분해되기 때문에 반응이 완료되는 데에는 2시간 이상의 시간이 소요되고 있으며, 그 후에는 안정되어 거의 일정하게 나타나며, 0.5 당량의 경우에는 30분 이내에 거의 모든 반응이 완료됨을 볼 수 있다. 따라서, Scale-up시켜 키토산 (250 g)으로부터 분해산물의 제조는 키토산의 유리 아미노기에 대해서 아질산 나트륨 0.5 몰을 사용했으며, 반응시간은 2시간으로 하여 충분히 반응시켰다. 점성도가 상당히 떨어진 반응액은 중화 후 환원시키고, 물, 메탄올, 아세톤 등으로 혼합비가 다른 혼합용매로 분별침전을 행한 후, 이를 분별 침

Table 1. The Yield of Each Fraction of Partially Hydrolyzed Chitosan by Precipitation

Fractions	solvent	yield (%)
Fraction A	H <sub>2</sub> O : MeOH = 1 : 3	4.3
Fraction B	H <sub>2</sub> O : MeOH = 1 : 5	8.6
Fraction C	H <sub>2</sub> O : MeOH = 1 : 10	11.1
Fraction D	MeOH : Acetone = 1 : 3	32.6

Table 2. Deacetylation Degree and Molecular Weight Distribution of Each Fraction of Partially Hydrolyzed Chitosan

Fractions	Deacetylation degree (DAC)	$\overline{M}_w$	$\overline{M}_w / \overline{M}_n$
Fraction A	33	5900	1.66
Fraction B	45	5100	1.60
Fraction C	46	4100	1.40
Fraction D	27	1800	1.21

전한 혼합용매의 내용과 이때 침전된 각 생성물의 수량과 분자량 등을 Table 1과 2에서 각각 나타내었다. 표에서 나타나 있는 것과 같이 본 실험에서 출발물질로 사용한 키토산의 탈아세틸화도는 85%였지만, 키토산 가수분해물질의 탈아세틸화도는 모두 50% 이하임을 볼 수 있다. 이는 앞서 언급한 바와 같이 키토산에 아질산을 첨가함으로써 키토산의 유리 아민기가 아질산과 반응하여 질소 가스가 발생하게 되는 탈아미노화[13]에 기인한 것으로 설명할 수 있다. 한편 이들의 수평균분자량을 GPC로 측정된 결과 (Figure 4)를 보면 물-메탄올의 혼합 용매에서 얻은 분해물의 분자량이 6000에서 4000인 것에 대하여, 메탄올-아세톤의 혼합 용매에서 얻은 것은 2000이하였다. 그러나 이들 부분가수분해 혼합물의 다분산도는 1.7이하로 비교적 분자량 분포가 좁은 분해산물을 얻었음을 알 수 있었다.

### 3.2. 키토산 분해물질의 항균성

키토산 분해물질의 추출 방법에 따른 각 fraction별 특성을 분석한 결과, 수용성은 fraction C와 D가 높았고, fraction B가 가장 적었다. 용해된 fraction에서는 각기 다른 여과성을 보였는데, fraction C와 D는 막 여과기 (0.45  $\mu$ m)에서 높은 여과성을 보인 반면, fraction A와 B는 매우 낮은 여과성을 보였다. 또한 다른 살균법인 압열멸균법 (autoclaving)에서는 모든 fraction에서 색깔이 변색되는 갈변화 현상을 보였다.

항균성 조사에서는 정상기에 있는 균을 새로운 배지에 접종하여 대수기에서의 키토산 분해물질에 의한 항균효과를 측정하였다. 그람양성 균주인 *Bacillus subtilis*가 그람음성 균주인 *E. coli*보다 높은 성장억제 효과를 나타내었다. 각 fraction 별 항균효과 시험에서는 시료의 멸균 방법이나 균주에 따라 차이를 보였지만, 일반적으로 모든 처리군에서 fraction B가 높은 항균효과를 나타내었다 (Figures 5~8). 그람음성 균주인 *E. coli*에서는 fraction A에서 가장 높은 항균억제 효과를 보였고, 다음은 fraction B의 순이었으며, 그람양성 균주인 *Bacillus subtilis*에서는 모든 키토산 분해물질 fraction에서 항균효과가 높게 나타났는데, 그 중에서도 fraction B가 가장 높은 항균효과를 보였고 다음은 fraction A였다.

전반적으로 항균능은 *E. coli*보다 *Bacillus subtilis*에 대해 더 활성을 나타내었고, 이는 그람 음성균과 그람 양성균간의 세포벽의

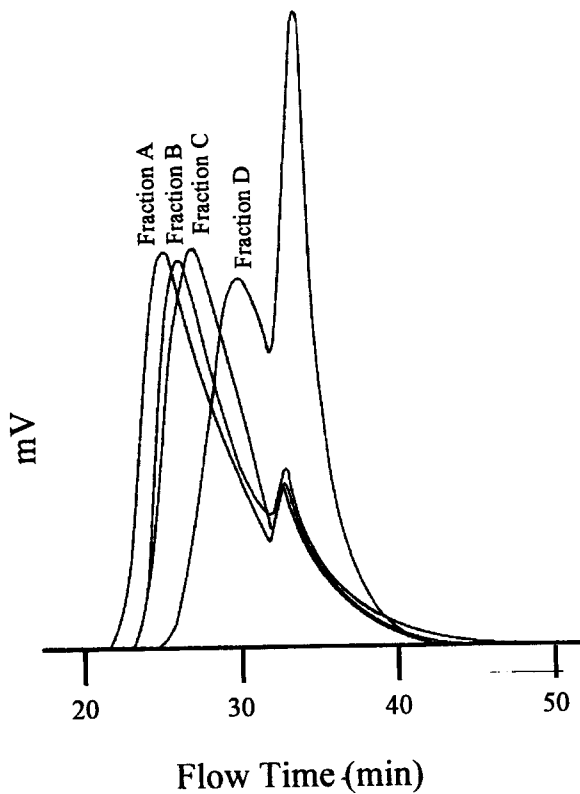


Figure 4. GPC analysis of each fraction of partially hydrolyzed chitosan by precipitation.

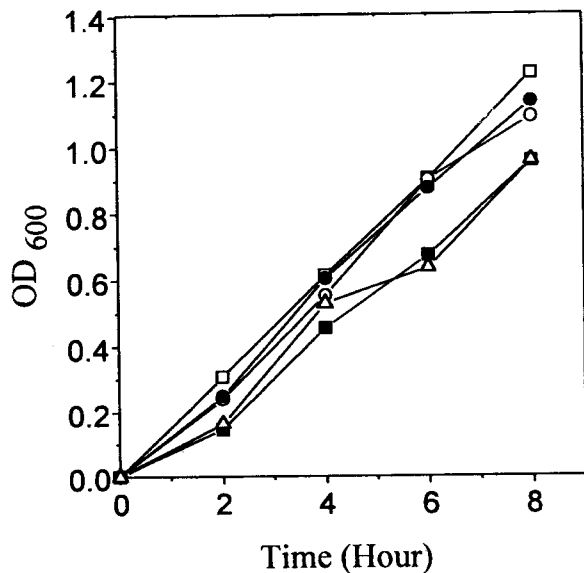


Figure 5. Antimicrobial effects of 1% chitosan fractions against *E. coli* (Sterilized by filtration: □; blank, ○; fraction A, ■; fraction B, ●; fraction C, △; fraction D).

구조적인 차이에 기인한 것[14]으로 추측된다. 그람 양성균은 cytoplasmic membrane 외부에 견고한 peptidoglycan 층을 가진 하나의 단순한 세포벽 구조를 이루고 있다. 이 peptidoglycan 층은 상대적으로 두껍지만 수많은 기공을 가진 그물구조를 이루어 이질분

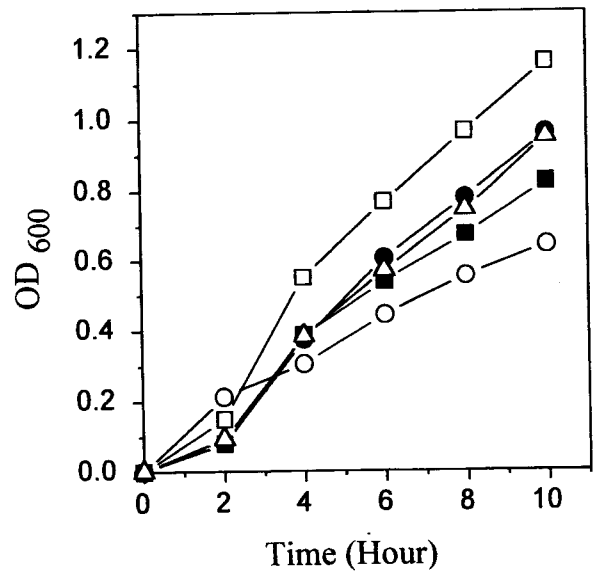


Figure 6. Antimicrobial effects of 1% chitosan fractions against *E. coli* (Sterilized by autoclave: □; blank, ○; fraction A, ■; fraction B, ●; fraction C, △; fraction D).

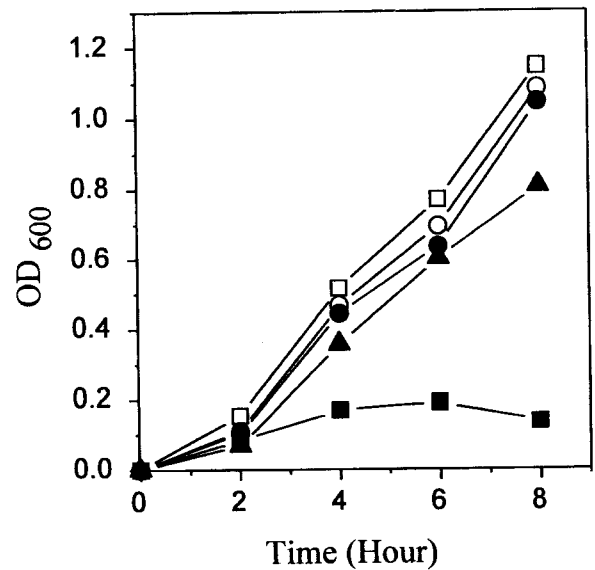


Figure 7. Antimicrobial effects of 1% chitosan fractions against *Bacillus subtilis* (Sterilized by filtration: □; blank, ○; fraction A, ■; fraction B, ●; fraction C, △; fraction D).

자가 어려움 없이 세포로 침투할 수 있다. 이와 달리, 그람 음성균은 다소 복잡한 세포벽 구조를 가진다. 즉, peptidoglycan 층 외부에 외막이라 불리는 다른 막이 형성되어 있고, 이 외막은 cytoplasmic membrane과 매우 유사한 구조를 가지고 있는 이중 막 구조를 가지고 있기 때문에 항생제 등의 외부 침입에 대한 장애막과 같은 역할을 할 수 있으며, 이로써 그람 양성균에 대한 활성이 그람 음성균에 비해 높다는 것을 설명할 수 있다.

따라서 키토산 분해물질에 의한 항균효과의 정확한 항균 기작은 아직 정확히 밝힐 수는 없지만, 키토산 분해물질의 세포내로의 흡수가 보다 용이한 그람양성균주편이 보다 높은 항균효과를 보여주

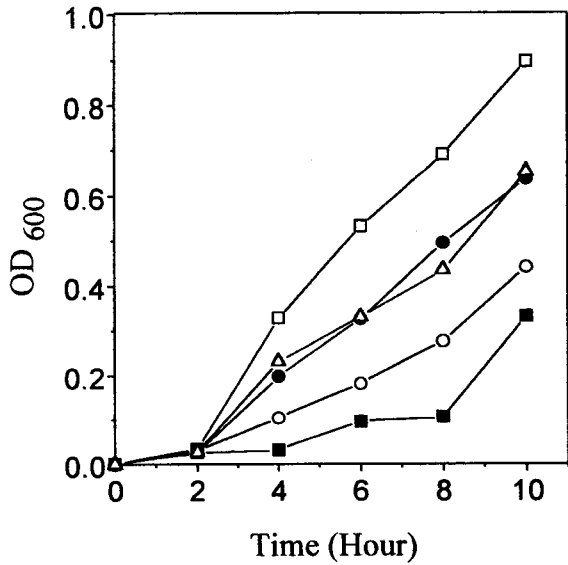


Figure 8. Antimicrobial effects of 1% chitosan fractions against *Bacillus subtilis* (Sterilized by autoclave: □; blank, ○; fraction A, ■; fraction B, ●; fraction C, △; fraction D).

고 있다. 이러한 사실은 세포내 흡수율이 낮을 것으로 예상되는 그람음성균에서는 그람양성균주보다는 세균의 성장 억제효과가 낮으나, 지속적인 효과를 보이며, 그람양성균주에서는 배양 초기에 높은 억제효과를 보이는 반면, 배양액내의 키토산 농도가 낮아지는, 즉 배양시간이 길어질수록 균의 생장율이 오히려 회복되는 결과에서 잘 보여주고 있다.

이상과 같이 키토산의 각 분해물의 분자량의 변화에 기인한 항균효과의 차이는 항균작용 메카니즘[15]과 두 균류사이의 구조적인 차이[14,15]로 설명할 수 있다.

양전하를 띤 일반적인 항균제에 있어서 항균성의 메카니즘[15]을 살펴보면, "① 박테리아 세포 표면에 흡착 → ② 세포벽을 통한 확산 → ③ 세포질 막과의 결합 → ④ 세포질 막의 파괴 → ⑤ K<sup>+</sup> 이온, DNA 그리고 RNA 같은 세포질 구성물의 방출 → ⑥ 세포사망"과 같은 과정을 거치게 된다. 이 메카니즘 중에서 박테리아 세포 표면은 항상 음이온으로 하전되어 있고, 음전하인 세포 표면에 양이온의 흡착은 고분자 양이온이 양이온 단량체보다 전하밀도가 높기 때문에 흡착이 많이 일어날 수 있다고 예측할 수 있으며, 또한 세포질 막과의 결합에서 막 자체에 음으로 대전된 각 성분들이 있기 때문에 양이온성을 띤 단량체보다 고분자 양이온이 막과의 결합을 훨씬 촉진시킬 수 있을 것으로 추정되고 있으며, 고분자 키토산 역시 이와 동일한 메카니즘으로 항균력을 발휘하는 것으로 추측되고 있다. 그러나, 과정 ①, ③, ④는 고분자량을 가진 polycation에서 향상될 수 있지만, 과정 ②는 특히 이중 막 구조를 이루고 있는 *E. coli*의 경우 더욱 어려울 것이다. 따라서 적정 분자량 범위에 의해 과정 ①, ③, ④를 촉진시킬 수 있을 것이며, 각 fraction 별의 적정 항균효과가 달라지는 것으로 추정된다.

4. 결 론

키토산을 아질산으로 부분가수분해시킨 후, 분별침전법으로 분자

량이 다른 각각의 수용성 키토산 유도체를 제조하였고, 이들 각 가수분해물을 이용하여 키토산의 분자량이 항균능에 미치는 영향을 조사하여 다음의 결과를 얻었다.

1) 탈아미노반응에 사용된 아질산의 농도가 키토산의 아미노기에 대하여 0.3 당량인 경우에는 2시간 이상, 0.5 당량의 경우에는 30분 이내에 모든 반응이 완료되었으며 반응이 진행되므로서 키토산의 유리 아민 함량이 감소되었다.

2) 각 키토산 부분가수분해물들의 수평균분자량을 GPC 로 측정 한 결과, 물-메탄올의 혼합 용매에서는 6000에서 4000 사이, 메탄올-아세톤의 혼합 용매에서는 2000 이하의 분해물을 얻을 수 있었으며, 이들 모두 1.7 이하의 다분산도를 가지고 있었다.

3) 그람양성 균주인 *Bacillus subtilis*가 그람음성 균주인 *E. coli* 보다 높은 성장억제 효과를 나타내었다. 각 fraction 별 항균효과 분석에서는 시료의 멸균 방법이나 균주에 따라 차이를 보였지만, 일반적으로 모든 처리군에서 fraction B가 높은 항균효과를 나타내었다.

4) 전반적으로 항균능은 *E. coli*보다 *Bacillus subtilis*에 대해 더 활성을 나타내었고, 이는 그람 음성균과 그람 양성균간의 세포벽의 구조적인 차이에 기인한 것으로 추측하였다.

참 고 문 헌

1. R. A. A Muzzarelli, "Chitin," Pergamon Press, Oxford (1977).
2. S. Hirano and Y. Noisiki, *J. Biomed. Mat. Res.*, **19**, 413 (1985).
3. K. Kojima, M. Yoshikuni, and T. Suzuki, *J. Appl. Polym. Sci.*, **24**, 1587(1979).
4. C. R. Allan and L. A. Hadwiger, *Exp. Mycol.*, **3**, 285(1979).
5. D. F. Kendra and L. A. Hadwiger, *Exp. Mycol.*, **8**, 276 (1984).
6. Y. Uchida, *Food Chemical*, **2**, 22(1988).
7. H. Seo, K. Mitsunashi and H. Tanibe, in *Advances in Chitin and Chitosan*, eds. C. J. Brine, P. A. Sandford and J. P. Zikakis, p. 34, Elsevier Applied Scienced, London(1992).
8. L. A. Hadwiger et al., in *Chitin in Nature and Technology*, eds. by R. A. A. Muzzarelli, C. Jeuniaux and G. W. Gooday, p. 209, Plenum Press(1986).
9. C. H. Kim, S. Y. Kim and K. S. Choi, *Polym. Adv. Technol.*, **8**, 319(1997).
10. C. H. Kim, J. W. Choi, H. J. Chun and K. S. Choi, *Polym Bull.*, **38**, 387(1997).
11. K. Kina, K. Tamura, and N. Ishibashi, *Jpn. Anal.*, **23**, 1082 (1974).
12. C. R. Dason, H. A. Frank and C. G. Cavaietto, *J. Food. Sci.*, **42**, 273(1977).
13. G. G. Allan and M. Peyron, in *Proceedings from the 4th International Conference on Chitin and Chitosan*, eds. by G. Skjåk-Bræk, T. Anthonsen and P. Stanford, p. 443, Norway (1988).
14. N. Kawabata, *Kobunji Kako*, **34**, 583(1985).
15. T. J. Franklin and G. A. Snow, *Biochem. of Antimicrobial Action*, Chapter III, Chapman & Hall, London(1981).