

## 기질의 담체화를 이용한 키토산올리고당의 생산

김 승 모 · 이 기 선 · <sup>1</sup>최 춘 순 · 최 명 락 · \*임 현 수  
여수대학교 생물공학과, <sup>1</sup>광주보건대학 식품가공과  
(접수 : 2000. 7. 5., 게재승인 : 2000. 8. 21.)

## The Production of Chitosanoligosaccharides Using Chitosan Bead

Seung-Mo Kim, Ki-Sun Lee, <sup>1</sup>Choon-Soon Choi, Myeong-Rak Choi, and Hyun-Soo Lim\*  
Department of Biotechnology, Yosu National University, Yosu 550-749, Korea  
<sup>1</sup>Department of Food Technology, Kwangju Health College, Kwangju 506-701, Korea  
(Received : 2000. 7. 5., Accepted : 2000. 8. 21.)

Preparation for the simplified separation of chitosanoligosaccharides from enzymatic hydrolysate was investigated. Two different types of chitosan beads as substrate were prepared as organic-based bead by W/O emulsion method and water-based bead by alkaline treatment. The average size of organic-based bead was 200  $\mu\text{m}$  and that of water based beads were 4000  $\mu\text{m}$ , 200  $\mu\text{m}$ , 30  $\mu\text{m}$  in diameter, respectively. Enzyme stability was maintained over 80% at pH 6 after 24 hours. The optimal condition for the production of chitosanoligosaccharides was at pH 6.0, 50°C, and 40U (200U/g-chitosan). According to final oligosaccharide concentration, water-based bead showed the similar result with that of organic-based bead, even though it had smaller surface area attacked by chitosanase than that of organic-based bead. It is probable that the structure of water-based chitosan bead was looser than that of organic-based bead, so enzyme penetrated easily into the bead structure. For the oligosaccharide production versus surface area, the different size of water-based beads was investigated. Maximal production yield was observed in the 30  $\mu\text{m}$  beads. Consequently, the water-based chitosan bead was better than the organic-based bead in this reaction system.

**Key Words** : simplification, chitosanoligosaccharide, enzymatic hydrolysis, organic-based bead, water-based bead

### 서 론

키토산은 지구상에서 연간 천억톤 이상 생산되고 있는 천연자원으로, 이를 활용하면 환경 오염을 감소시킬 수 있고, 또한 폐자원을 재활용하여 고부가가치의 새로운 자원을 얻을 수 있다. 키토산을 탈아세틸화하여 얻어지는 키토산은 1970년 경 폐수 처리용 중금속 흡착제로 최초로 사용된 이후 식품, 의약품 및 화장품 등 여러 공업분야에서 이에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(1,2). 키토산은 생체에 무해하면서 세균에 대한 항균성을 나타내고 있어 천연 식품방부제로 사용되고 있으며, 질병에 대한 면역성 및 저항력을 향상시켜줄 뿐만 아니라 암에 대한 저항력 및 콜레스테롤 저하능까지 알려져 최근 건강 보조식품으로 개발되고 있다. 이중 키토산 올리고당은 글루코사민(GlcN)이  $\beta$ -(1-4)결합한 물질이며, 키

틴을 가열한 진한 알칼리로 처리하여 얻어진 키토산을 부분 가수분해하여 제조할 수 있다(3). 올리고당은 일반적으로 단당이나 고분자 다당체와 비교해서 독특한 물성과 생리활성을 갖는다. 기존에 알려진 대부분의 올리고당은 전분 유래의 올리고당이며, 이들은 보수성, 저감미성, 결정방지성 등의 식품학적 특성이 있으며, 특히 장내 유익균을 증식시켜 정장작용을 함으로써 건강식품소재로서 널리 사용되고 있다. 그러나 키토산 및 키토산 올리고당의 경우 면역성 증진작용(4,5), 항종양 활성(6,7), 항균작용(8-10)과 같은 독특한 생리활성을 갖는 점이 기존의 전분 올리고당과 차별화되는 특징이다. 또한 면역성을 증가시키는 다당체로서 알려진 효모의  $\beta$ -글루칸, 곰팡이 및 버섯 균사체 등의 경우 다당체에서만 생리활성이 발견된 것에 비해서, 키토산 및 키토산의 경우 단당류를 포함한 올리고당에서 생리활성이 발견된 것이 특징이다. 키토산 올리고당의 제조는 강산을 사용하는 산가수분해법이 일반적으로 행해져 왔는데, 키토산을 진한 염산으로 가수분해하여 얻는다(11). 그러나 산가수분해법은 단당과 저중합도의 올리고당의 생산이 많고, 강염산을 사용함으로써 인체의 안전성 문제와 환경오염 유발 등의 문제점이 지적되고 있다. 키토산으

\*Corresponding Author : Dept. of Biotechnology, Yosu National University, Yosu 550-749, Korea  
Tel : 82-61-659-3306, Fax : 82-61-659-3306  
E-mail : bplab@yosu.yosu.ac.kr

로부터 키토산 올리고당의 효소적인 방법에 의한 제조는 온화한 반응조건을 사용하고, 2당 이상의 올리고당의 수율이 높으며, 안정성 측면에서 바람직한 제조방법으로 인식되어 이에 관한 연구가 진행되었다. 그러나, 아직까지 chitosanase의 상업적 대량생산이라는 측면에서 이들 효소를 이용한 올리고당의 생산은 경제적 측면에서 한계가 있다. 또한 기존의 산과 효소의 반응에 의해 제조된 키토산 올리고당을 손쉽게 분리, 정제하는 방법에 관한 연구는 미진한 형편이다. 따라서 본 연구에서는 효소적 방법을 통해 생산되는 키토산 올리고당의 효율적인 분리를 위하여 효소 반응 후 올리고당을 미반응 기질과 손쉽게 분리할 수 있는 새로운 공정을 개발하고자 기질인 키토산을 담체화 하여 효소 반응 조건의 최적화 반응을 검토하고, 이들의 수율과 올리고당의 조성을 분석하였다.

## 재료 및 방법

### Chitosan과 chitosanase

본 실험에 사용한 chitosan은 (주)세화에서 제공받은 것으로 분자량 (M.W.)이 20,000, 탈아세틸화도 (DAC)는 81%이고, 점도는 2.9 cps이다. 이를 2% acetic acid (pH 2.83)에 녹여 swing bucket type centrifuge에서 3000×g로 15분간 원심분리를 하여 상등액을 취하여 실험하였으며, 효소인 chitosanase는 경상대학교 신용철 교수팀으로부터 받은 *Bacillus sp.* GM44 유래의 것을 실험에 사용하였다. Chitosanase의 활성단위(U)는 주어진 조건에서 분당 1  $\mu$ mole의 glucosamine을 생산하는 효소의 양으로 정의하였다(12).

### 반응 system

반응 용기는 100 mL volume의 Spinner flask (Bellco Glass, Inc. USA)를 사용하여 여기에 100 mM의 sodium acetate buffer를 solvent system으로 사용하였다. 반응시 일정한 온도를 유지하기 위하여 자석 교반기를 배양기에 장치하여 실험하였다.

### Chitosan bead의 제조

5 g의 키토산을 2% acetic acid 100 mL에 녹여 3000×g에서 20분간 원심분리한 후 상등액을 키토산 bead의 제조에 사용하였다. 유기상의 bead는 W/O emulsion방법(13)을 이용하여 제조하였는데, Toluene과 Chloroform을 73:27의 비율로 혼합한 후 여기에 최종 농도가 1% 되도록 유화제인 Tween 80을 첨가하여 충분히 혼합되도록 하였다. 혼합된 유기용매 100 mL을 격렬히 교반하면서 여기에 10%의 에탄올이 첨가된 10 N NaOH를 첨가한 후 키토산 용액을 주사기로 적하시킨 후 5분간 교반하였다. 제조된 bead를 125  $\mu$ m의 스크린으로 회수하였다.

수상의 방법을 이용한 bead의 제조는 알칼리 수용액에 키토산 산성용액을 적하하여 키토산 용액의 방울에 있던 초산이 알칼리 용액중으로 침출되어져 나오면서 bead가 형성되는 원리로 제조하였다(14,15). 증류수 100 mL에 10%의 NaOH (10N)와 1%의 Tween 80 용액을 첨가하여 천천히 교반하면서 5% 또는 7%의 키토산 용액을 주사기를 이용하여 적하하거나 스프레이를 이용하여 분무하여 bead를 제조하였

다. 제조된 키토산 bead는 여액이 중성이 될 때까지 증류수로 세척한 후 100 mM sodium acetate buffer (pH 6.0)로 충분히 swelling 시킨 후 건조하지 않고 습윤 상태로 보관하였다.

### 효소의 안정성 측정

Chitosanase의 pH 안정성을 측정하기 위한 온도의 설정은 40°C에서 16시간까지 90% 이상의 활성을 유지하며, pH 3~10의 범위에서 비교적 안정하였다는 보고(12)에 따라 40°C에서 실시하였다. 이때 chitosan bead가 pH 5.5 이하에서는 용해되기 때문에 효소의 pH를 6 이상으로 하여 안정성을 조사하였다. 1%의 키토산을 pH 5.0의 100 mM sodium acetate buffer에 녹인 후 pH 6~9의 2% acetic acid를 제조하여 여기에 20 U/g의 효소액을 첨가하였다. 두 용액을 40°C에서 각각 천천히 교반하면서 반응 시간별로 1 mL씩 취하여 50°C에서 10분간 반응시켰다. 반응 후 10 N의 NaOH를 66  $\mu$ L를 첨가하여 효소를 실험시킨 후 3000 rpm에서 20분간 원심분리하여 잔여 기질과 반응 상등액을 분리하여 DNS 방법(16)으로 효소의 잔류 활성을 측정함으로써 효소의 pH 안정성을 조사하였다.

### Chitosan bead의 최적 반응조건

유기상 비드의 최적 반응 pH를 찾고자 Spinner flask 내의 pH를 6,7,8,9로 맞춘 후 각각의 flask에 20 U/g의 chitosanase를 첨가, 40°C에서 각 pH에 따른 분해반응을 측정하였으며, 온도의 변화에 따른 최적 반응조건을 찾고자 40°C에서 60°C까지 변화시키면서 각각의 온도에서 효소 첨가량에 따른 분해반응을 측정하였으며, 위의 최적 조건을 수상 bead에 적용하여 각각의 분해도를 비교하였다.

### 효소의 가수분해를 이용한 키토산 올리고당 생산

Chitosan bead를 최종 농도가 0.2% 되도록 100 mL의 Spinner flask에 채운 후 충분히 swelling하여 pH를 6.0으로 맞추었다. 여기에 chitosanase를 첨가하는 것으로 가수분해 반응을 시작하였다. 이때 보고된 바(17)와 같이 효소가 전단응력에 비교적 약하기 때문에 천천히 교반하였다. 분해반응 중 일정시간 간격으로 교반을 멈추고 bead가 가라앉은 후 상등액을 채취하여 분해도를 측정하였다.

### 반응 시스템으로부터 키토산 올리고당의 분리

반응이 끝난 후 반응 시스템으로부터 생산물과 효소액의 혼합액을 여과지를 이용하여 분리하였다 (Figure 1-A). 여과된 혼합액을 100°C의 끓는 물에 10분간 가열하여 효소를 실험시켰다. 이를 다시 0.2  $\mu$ m의 주사기 여과지로 여과하여 당분석에 사용하였다.

### 키토산 올리고당의 분석

환원당 정량은 DNS법(16)을 이용하여 측정하였는데, 표준곡선을 D-glucosamine을 사용하여 정하였다. 또한, 최종 반응산물의 올리고당 조성을 확인하기 위하여 TLC를 사용하였다. Chitosan bead의 분해산물을 HPTLC plate silica 60 F254 (Merck)에 점적 한 후 *n*-propanol : ammonia water (32%) = (2 : 1)의 용매에 2회 전개시켰다. 건조된 plate를 발색시약인

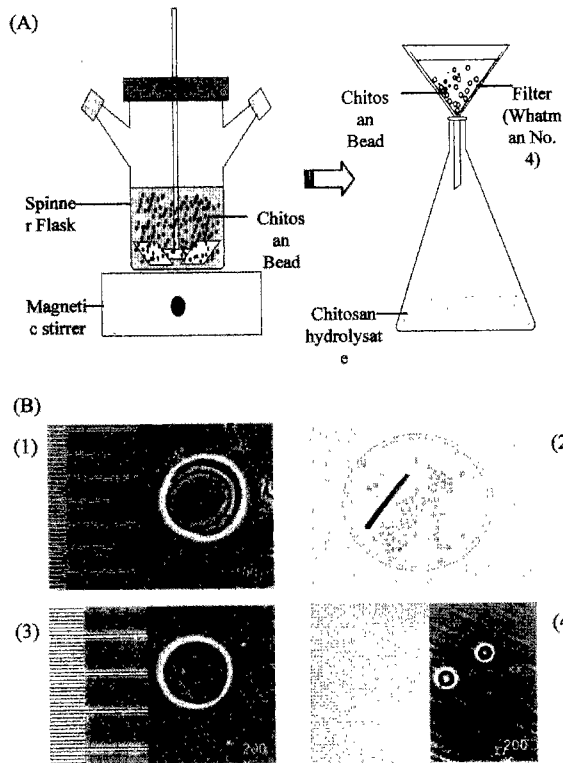


Figure 1. (A) Schematic diagram for enzyme reaction system and simplified filtration of products and substrate after reaction. (B) Organic based Chitosan Bead(OB) and Water based chitosan Beads(WB, Ws, Wss). (1): OB(200 μm in diameter), (2): WB(4000 μm), (3): Ws(100 μm), (4): Wss(30 μm).

0.1% ninhydrin이 포함된 water-saturated *n*-butanol에서 전개시킨 후 160℃에서 10분간 가열해 발색시켰다. Chitosan bead 분해산물의 평균분자량을 측정하기 위하여 gel permeation chromatography를 행하였는데, 이때 Ultrahydrogel 250 (Waters)와 Ultrahydrogel 500 (Waters)를 직렬로 연결하여 분석하였다. 분리에 사용된 이동상은 5% acetic acid (pH 4.01)을, 검출기로는 Reflective index detector를 사용하였다. 이때의 flow rate는 0.8 mL/min이었다. 그리고 키토산 가수분해반응으로 얻은 키토산 올리고당의 조성을 분석하기 위하여 HPLC를 사용하였다. 컬럼으로는 TSK gel Amide-80 column (Tohso, Japan)을 이용하였으며 분석에 사용된 이동상은 acetonitrile : 250 mM phosphoric acid(4:6)이었고, 검출기는 Reflective index detector를 사용하였다. 이때 용출 속도는 0.8 mL/min이었고, 표준 올리고당 (SEIKAGAKU, Japan)을 이용하여 peak 면적으로부터 올리고당의 함량을 정량하였다.

## 결 과

### Bead의 제조

Bead의 제조과정을 Figure 1에 나타내었는데, chitosan의 산성 수용액을 알칼리 용액에 의해 coacervation 시키는 방법으로 제조하였다(15). 유기상의 bead 제조시는 키토산 용액의 농도를 5%로 정하였는데, 4%이하로 하면 고형화 되는 시간이 너무 길어 꼬리 끌림 현상이 일어났고, 반대로 농도가

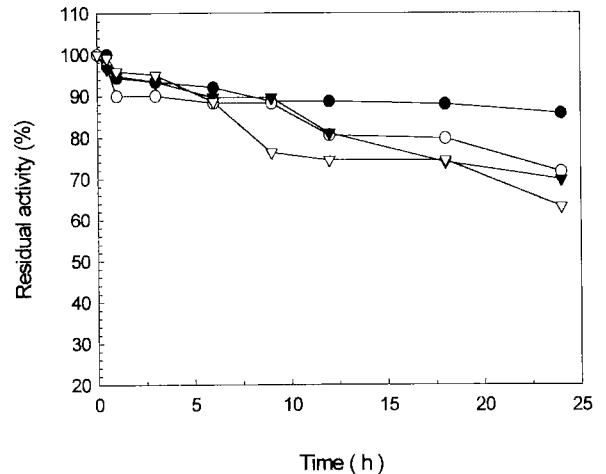


Figure 2. Stabilities of chitosanase at various pHs. Symbols : pH6.0 (●), pH7.0(○), pH8.0(▼), pH9.0(▽).

너무 높은 경우에는 고형화 되는 시간이 짧아져 찌그러진 형태의 bead가 제조되었다. 또한 본 실험에서는 에멀전상에 10%의 10N NaOH를 사용, 키토산 용액의 농도와 적절한 조화를 이루어 직경이 200 μm인 비교적 둥근 형태의 유기상 bead를 얻을 수 있었다. 수상 bead 역시 기본적으로 산-알칼리에 의한 중화반응으로 제조하였는데, 유기상 bead의 제조 방법에서처럼 액상의 분리가 없어 주사기나 노즐을 통하여 나오는 키토산 용액의 크기에 의해 bead의 형태가 많이 좌우되었다. 즉, 느린 교반 속도에서 상분리 없이 coacervation 현상이 일어나는 것이므로 적하되는 용액의 크기와 상태대로 고형화 되기 때문에 여겨진다. 주사기를 사용한 bead 제조 시에는 5%의 키토산 용액을 사용하여 직경이 4000μm의 둥근 형태의 수상 bead를 얻을 수 있었으며, 분무기를 사용할 때는 5%와 7%의 키토산 용액을 사용하여 직경 100μm와 30μm의 수상 bead를 얻을 수 있었다. 그리고, 단위 bead당 부피와 면적은 OB(200 μm)는  $4.2 \times 10^6$ ,  $1.3 \times 10^5$ , WB(4000 μm)는  $3.3 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^7$ , Ws(100 μm)는  $5.2 \times 10^5$ ,  $3.14 \times 10^4$ , Wss(30 μm)는  $1.52 \times 10^3$ ,  $2.8 \times 10^3$ 로 각각 조사되었다.

### 효소의 안정성 측정

기질로 사용될 chitosan bead가 pH 5.5 이하에서 용해되기 때문에 pH 6.0 이상의 조건에서 효소의 안정성을 측정하였다. Figure 2에서 보듯이 각 pH 별로 효소의 안정성을 24시간 동안 조사한 결과 pH 6에서 85% 이상의 활성을 보인 반면 pH 7 이상의 범위가 되면 활성이 감소하는 것을 알 수 있었다. 따라서 본 효소의 pH 안정성을 볼 때 pH 6에서 반응하는 것이 유리한 것으로 판단되었다.

### pH 변화에 따른 유기상 bead의 키토산 올리고당 생산

Chitosan의 최종 농도가 0.2%가 되도록 반응 시스템에 bead를 넣고 pH를 각각 6, 7, 8, 9로 맞추어 충분히 swelling 한 후 100 U/g의 chitosanase를 처리한 후 반응 시간에 따른 분해도를 측정하는 것을 Figure 3에 나타내었다. pH 6일 경우 6시간까지 점진적으로 분해도가 증가되었으나 그 이후로는 크게 진행되지 않은 반면 pH 7 이상일 경우 반응이 거의 진

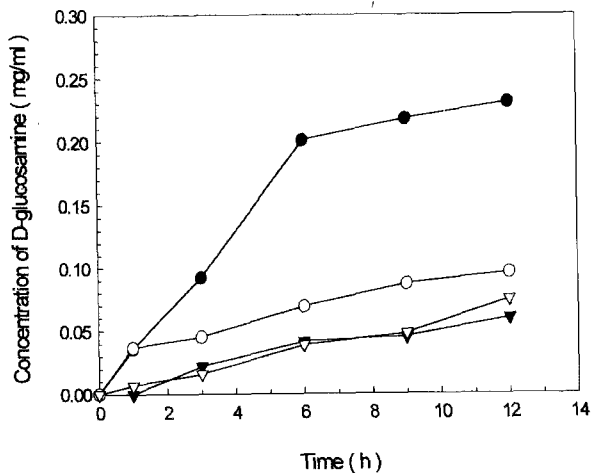


Figure 3. Time course of chitosan hydrolysis with chitosanase at various pH. Symbols : pH6.0(●), pH7.0(○), pH8.0(▼), pH9.0(▽).

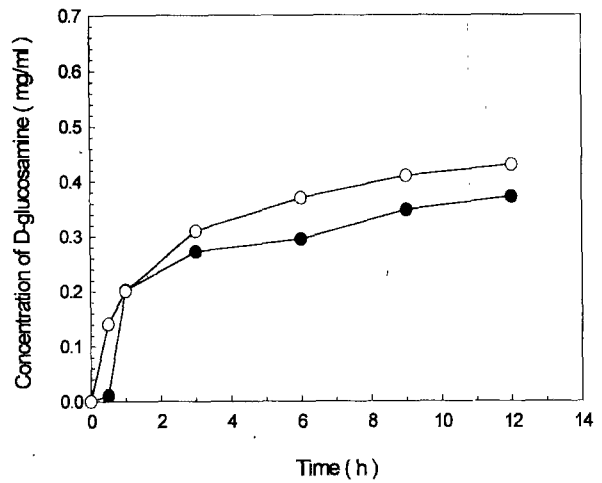


Figure 5. Comparison of chitosan hydrolysis rate of water-based bead (●) and organic-based bead(○).

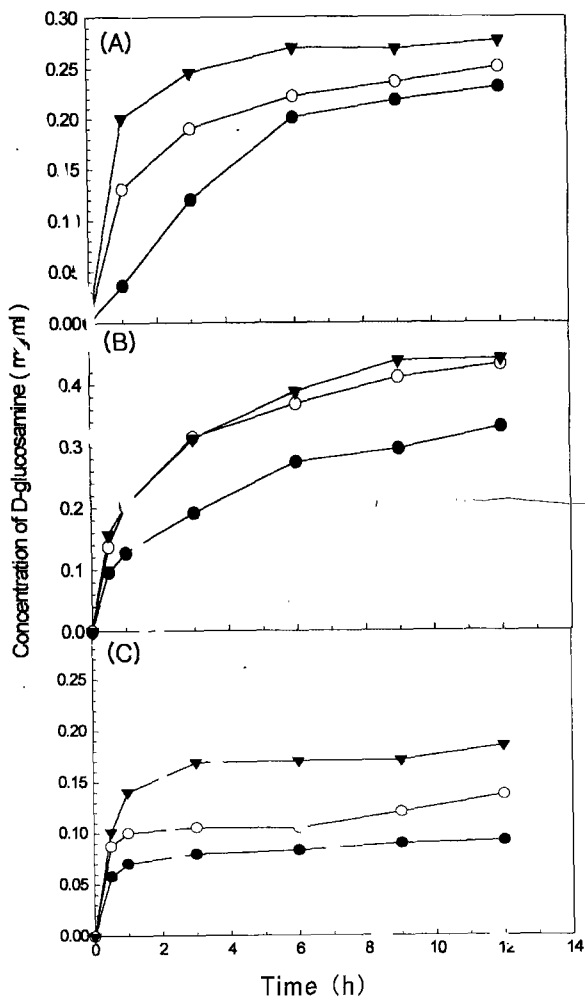


Figure 4. Chitosan hydrolysis with various concentration of chitosanase at 40°C (A), 50°C (B), 60°C (C). Symbols ; 20U(100U/g) (●), 40U(200U/g)(○), 80U(400U/g)(▼).

행되지 않았으며 분해도에 있어서도 pH 6에서 보다 50% 이상 감소하였다. 이는 본 반응 시스템에 사용된 효소가 pH

3~9에서 활성을 나타낸다고 하지만 중성 이상의 알칼리성 영역에서보다는 산성 영역에서 보다 높은 활성을 나타내기 때문인 것으로 판단된다.

**효소량과 온도의 변화에 따른 유기상 bead의 키토산 올리고당 생산**

Figure 4은 효소의 첨가량과 온도의 변화에 따른 chitosan bead의 분해도를 조사하기 위하여 반응 시스템의 온도를 각각 40, 50, 60°C로 다르게 설정하여 각각의 시스템에 20 (100 U/g), 40 (200 U/g), 80U (400 U/g)의 chitosanase를 첨가한 후 반응 시간에 따른 분해도를 측정된 결과이다. 분해도는 시간이 지남에 따라 증가폭이 점차로 감소하였으며, enzyme의 농도가 높을수록 초기 분해도가 빠르고, 최종 분해도 역시 높게 나타나는 것을 알 수 있었지만, enzyme의 양이 많아지는 만큼의 분해도의 증가는 얻기 어려웠다. 그러나, 50°C의 반응 시스템에서는 40U (200 U/g)의 enzyme을 처리한 시스템과 80U (400 U/g)의 enzyme을 처리한 시스템의 분해도가 거의 차이가 없었다. 따라서 본 반응 시스템의 최적 enzyme unit을 40U로 결정할 수 있었으며, 40°C에서보다 높은 활성을 나타내는 50°C에서 반응 하였을 때 더욱 높은 분해도를 나타내었다. 60°C의 경우에서는 효소가 곧 실패된 것으로 판단되었다. 따라서 본 반응 시스템의 최적 온도를 50°C로 선택할 수 있었다.

**최적 조건을 적용한 수상 bead의 키토산 올리고당 생산**

Figure 5은 유기상 bead의 가수분해 반응 중 최적 조건인 50°C, 40U을 수상의 방법에 의해 제조된 수상 bead에 적용시킨 결과이다. 유기상 bead(지름 200 μm)와 비교하여 수상 bead(지름 4000 μm)의 경우 초기 반응에서는 유기상 bead의 경우가 더 높은 분해도를 나타내었지만, 최종 분해도에서는 큰 차이를 보이지 않은 것을 알 수 있었다. 일반적으로 입자가 작으면 표면적은 커지게 마련인데 W/O 에멀전에 의해 만들어진 유기상 bead는 일반적으로 작은 크기를 갖고 있고, 수상 bead의 경우 크기가 커 상대적으로 유기상 bead가 표면적이 크게 나타난다. 표면적이 커지게 되면 효소와 접촉할

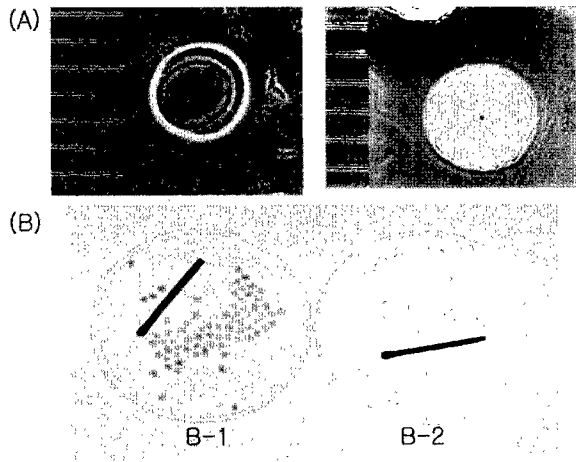


Figure 6. Photographs of organic-based chitosan beads(A) (diameter : about 200 $\mu$ m) and water-based chitosan beads(B) (diameter : about 4000 $\mu$ m and about 2000 $\mu$ m) before(B-1) and after drying(B-2).

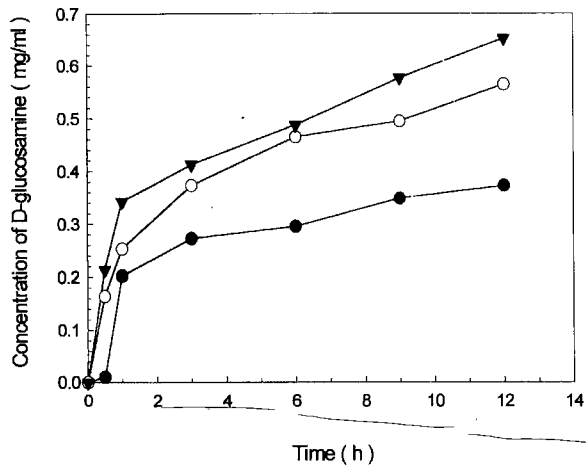


Figure 7. Comparison of chitosan hydrolysis rate of different size of water-based chitosan bead. Symbols ; 4000  $\mu$ m in diameter (WB)(●), 100  $\mu$ m in diameter (Ws)(○), 30  $\mu$ m in diameter (Wss)(▼).

수 있는 면적이 커지므로 동일한 반응조건이라면 유기상 bead의 분해도가 더 높아야 하지만 두 bead의 분해도에는 큰 차이가 없었다. W/O emulsion법의 경우 NaOH 용액이 chitosan 고분자의 산성 수용액과 빠른 물질교환에 의해 내부까지 침투하여 중화반응을 일으켜 단단한 구조를 가질 수 있으나, 수상 bead의 경우 물질교환이 비교적 느리게 진행되어 유기상 bead에 비하여 좀 더 느슨한 구조를 가지는 형태로 만들어진다. 따라서 초기에는 표면적이 넓은 유기상 bead의 분해도가 높았지만 시간이 지날수록 수상 bead로의 효소 침투가 좀 더 유리하게 작용하였다고 생각한다. 따라서 이를 알아보기 위하여 chitosan bead의 수축 정도를 측정하였다. 유기상 bead와 수상 bead를 증류수로 충분히 세정한 후 에탄올의 농도를 10%에서 100%로 충분히 swelling 하면서 천천히 교환하여 주는 solvent dehydration 방법으로 수분을 제거하였다. 완전히 건조된 Chitosan bead를 습윤상태의 bead와 크기를 비교, 측정하였는데, Figure 6과 같이 유기상 bead는

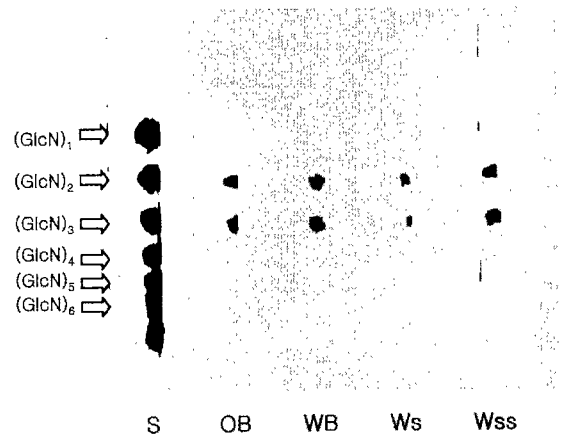


Figure 8. Thin layer chromatograms of chitosan hydrolysates at 50 $^{\circ}$ C.

거의 수축되지 않은 반면 수상 bead는 지름이 1/2로 줄어들어 수상 bead가 유기상 bead에 비하여 상대적으로 느슨한 구조를 가진다는 것을 알 수 있었다.

#### Bead의 크기 변화에 따른 키토산 올리고당의 생산 비교

유기상 bead에 비하여 높은 환원당 생산성을 나타내는 수상 bead의 크기에 따른 분해도를 평가하기 위하여, spray를 이용하여 지름이 100  $\mu$ m인 수상 bead(Ws)와 지름이 30  $\mu$ m인 수상 bead(Wss)를 제조하여 실험에 임하였다. 각각의 bead를 최적 반응 조건인 50 $^{\circ}$ C, 40 U에서 분해도의 변화를 살펴 보았다. 이를 Figure 7에 나타내었는데, 예상대로 bead의 크기가 작을수록, 즉 효소와 접촉할 수 있는 표면적이 넓어질수록 높은 분해도를 나타내었으며, 초기 분해도 역시 bead의 크기가 작아질수록 높게 나타남을 알 수 있었다.

또한 chitosanase에 의해 분해된 chitosan bead의 최종 반응 산물을 TLC로 분석하였을 때 Figure 8과 같은 결과를 얻었다. TLC에서 보는 바와 같이 키토산 분해물은 단당을 포함하지 않았으며, 반응 조건에 관계없이 DP 2, 3의 올리고당을 함유하고 있었다.

#### HPLC와 GPC를 이용한 최종 반응물의 올리고당 조성 확인

생산된 최종 반응 산물의 올리고당의 조성을 알아보기 위하여 HPLC를 사용하였다. 분해물의 조성은 표준 올리고당 (SEIKAGAKU)인 (GlcN)<sub>1</sub>~(GlcN)<sub>6</sub>을 이용하여 peak 면적으로부터 올리고당의 함량을 정량하였다. 그 결과 Figure 9에서 보는 바와 같이 유기상 bead의 조건에서 DP 2, 3과 미량의 DP 4이 검출되었으며, 수상 bead의 조건에서는 bead의 크기에 관계없이 DP 2, 3과 DP 4, 5까지 검출되었다. 유기상 bead의 경우에는 분해물 중 총 올리고당 함량(HPLC로 분석 가능한 1당~6당의 함량)은 건조무게의 약 43% 정도였으며, 이 중 1당은 검출되지 않았고, 2당이 65%, 3당이 27%, 그리고 4당이 6.5%였고, 수상 bead의 경우 WB는 올리고당의 함량이 건조무게의 약 40%였고, 2당이 44%, 3당이 25%, 4당이 21%였다. Ws와 Wss의 경우 올리고당 함량이 각각 56%, 64% 정도이고, 2당의 함량은 52%, 44%, 3당은 20%, 22%, 4당은 16%, 14%, 그리고 5당은 12%, 20%였다. 이 결과를 Figure 10에 나타내었다. 또한 키토산 분해물의 평균 분자량

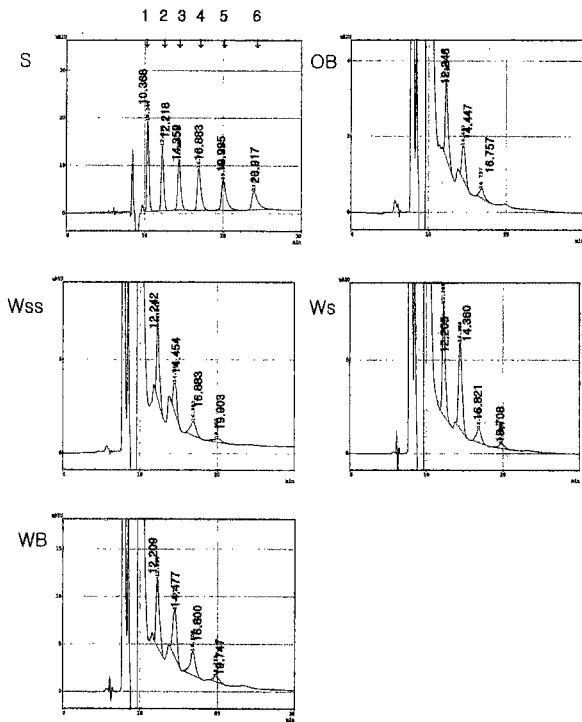


Figure 9. HPLC chromatograms of chitosan hydrolysates. S:standard,OB: organic-based(200 $\mu$ m), Wss(30 $\mu$ m), Ws(100 $\mu$ m), WB(4000 $\mu$ m): water-based.

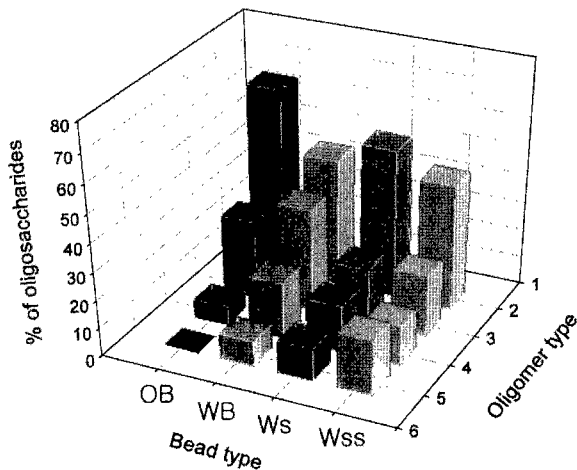


Figure 10. Effect of bead type on the conversion yield of oligosaccharides and product distribution.

을 측정하기 위하여 GPC를 사용하였지만 분석에 사용한 칼럼의 detection limit이 높아 peak의 정확한 분리는 이루어지지 않았고, 유기상과 수상 bead 모두 M.W. 540 부근에서 peak를 확인할 수 있었으며, 고분자는 전혀 검출이 되지 않았다. 따라서 본 반응 시스템을 사용하여 효과적으로 올리고당을 생산하였음을 알 수 있었다.

요 약

키토산의 가수분해 산물인 키토산 올리고당의 효율적이고 단순화된 분리를 위하여 기질인 키토산을 담체화 하여 효소

를 이용한 올리고당의 생산에 있어서 product의 새로운 분리법에 대한 가능성을 연구하였다. 기질로 사용한 chitosan bead를 W/O emulsion 상분리법을 이용한 유기상의 방법과 키토산 용액을 알칼리 용액에 적하하는 수상의 방법으로 제조하였는데 bead가 효소와 접촉하는 표면적을 최대로 하기 위하여 구형으로 제조하였다. 이때 유기상 bead의 지름은 200  $\mu$ m였고, 수상 bead의 경우 4000  $\mu$ m, 100  $\mu$ m, 30  $\mu$ m였다. pH와 온도, 효소의 양을 변화시켜 가면서 반응 시스템에서 최적의 유기상 bead의 가수분해 조건을 조사한 결과 pH 6.0, 온도는 50 $^{\circ}$ C, 그리고 효소의 양은 40U이 최적임을 알 수 있었다. 유기상 bead의 최적 가수분해 조건을 수상 bead에 적용시켜 반응성을 살펴보았는데 반응에 사용된 수상 bead의 표면적이 유기상 bead에 비하여 낮음에도 불구하고 거의 동일한 분해도를 나타내었다. 수상 bead의 경우 크기가 작을수록 높은 분해도를 나타냈으며, 각 bead를 사용하였을 때 생산된 최종 산물의 올리고당의 조성을 HPLC와 GPC로 분석하였는데, 유기상 bead로부터 생산된 올리고당의 조성은 주로 2~4당이었으며, 수상 bead로부터 생산된 올리고당의 조성은 2~5당이었고, 평균 분자량은 M.W. 540과 M.W. 380이었다.

REFERENCES

- Hirano, S. (1989), Production and application of chitin and chitosan in Japan, in Chitin and Chitosan, pp37-43, Elsevier, New York.
- Austin, P. R., C. J. Brine, J. E. Castle, and J. P. Zikakis (1981), Chitin: New facets of research, *Science*. **212**, 749-753.
- Zikakis, J. P. (1984), Chitin, Chitosan, and related enzymes, Academic Press Inc. New York.
- Suzuki, S., Y. Okawa, Y. Okura, K. Hashimoto, and M. Suzuki. (1982), Immunoadjuvant effect of chitin and chitosan, p. 210-212. In Hirano, S. and Tokukara, S. (eds), Chitin and Chitosan, The Japanese Society of Chitin and Chitosan, Tottori University, Tottori.
- Sujuki, K., A. Tokoro, Y. Okawa, S. Suzuki, and M. Suzuki (1985), Enhancing effect of N-acetyl-chitooligosaccharides on the active oxygen-generating and microbicidal activities of peritoneal exudate cells in mice, *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 886-888.
- Suzuki, K., Mikami, Y. Okawa, A. Tokoro, S. Suzuki, and M. Suzuki (1986), Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose, *Carbohydr. Res.* **151**, 403-408.
- Tokoro, A., N. Tatewaki, K. Suzuki, T. Mikami, S. Suzuki, and M. Suzuki (1988), Growth-inhibitory effect of hexa-N-acetylchitohexaose against Meth-A solid tumor, *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 784-790.
- Suzuki, K., Y. Okawa, K. Hashimoto, S. Suzuki, and M. Suzuki (1984), Protecting effect of chitin and chitosan on experimentally induced murine candidiasis, *Microbiol. Immunol.* **28**, 903-912.
- Kobayashi, M., T. Watanabe, S. Suzuki, and M. Suzuki (1990), Effect of N-acetylchitohexaose against *Candida albicans* infection of tumor-bearing mice, *Microbiol. Immunol.* **34**, 413-426.
- Tokoro, A., M. Kobayashi, N. Tatewaki, K. Suzuki, Y. Okawa, T. Mikami, S. Suzuki, and M. Suzuki (1989),

- Protective effect of N-acetyl chitohexaose on *Listeria monocytogenes* infection in mice, *Microbiol. Immunol.* **33**, 357-367.
11. Ruply, J. A. (1964), The hydrolysis of chitin by concentrated hydrochloric acid, and the preparation of low-molecular-weight substrates for lysozyme, *Biochim. Biophys. Acta.* **83**, 445-455.
  12. Choi, Y. J., E. J. Kim, Y. S. Kim, and Y. C. Shin (1997), Development of chitosanase for the Production of Chitosan oligosaccharides, *Korean J. of chitin and chitosan*, **2(3)**, 40-48.
  13. Ha, B. J., O. S. Lee, S. K. Park, and Y. S. Lee (1998), Preparation of chitosan beads, microcapsules, microspheres and vesicles and their biochemical application, *Korean J. of chitin and chitosan*, **3(1)**, 67-74.
  14. Han, S. M. and Y. B. Kim (1999), Selective adsorption abilities of metal ions by cross-linked N-Methylthiobenzyl-chitosan bead and chitosan beads, *Korean J. of chitin and chitosan*, **4(1)**, 39-44.
  15. Ha, B. J., O. S. Lee, and Y. S. Lee (1996), Swelling properties and releasing characteristics of chitosan beads containing bisamino-PEG, *J. of Korean Ind. & Eng. Chemistry.* **7(1)**, 59-66.
  16. Miller, G. L. (1959), Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
  17. Shin, Y. C., E. J. Kim, E. J. Choi, J. J. Kim, Y. C. Yoon, C. M. Choi, and Y. S. Kim (1998), Commercial production and applications of chitosanase, *Korean J. of chitin and chitosan*, **3(3)**, 268-278.