

반응표면 분석법을 이용하여 Cellulase에 의한 키토산올리고당의 제조 조건 설정

주동식* · 이정석* · 김옥선* · 조순영*
동해대학교 관광외식산업학과, *강릉대학교 동해안해양생물자원연구센터

Preparation Condition of Chitooligosaccharide by Cellulase using Response Surface Methodology

Dong Sik JOO, Jung Suck LEE*, Ok Seon KIM* and Soon Yeoung CHO*

Dept. of Tourism and Foodservice Industry, Donghae University, Donghae 240-713, Korea

*East coastal Marine Bioresources Research Center, Kangnung National University, Kangnung 210-703, Korea

Optimal conditions for preparing of chitooligosaccharides from chitosan with cellulase was researched by response surface methodology. *Penicillium funiculosum* derived cellulase was most effective for chitooligosaccharides production as the point of hydrolyzing activity and commercial utility. The result which measures the change of degrading ratio at time course, 10 hr reaction showed a exponential increase and after that time degrading ratio was not changed. The optimal conditions determined by response surface methodology with central composite design of total 26 species were 0.5% of chitosan, 143 U enzyme, 49°C of reaction temperature, 13.2 hr of reaction time and pH 3.8. Major chitooligosaccharides produced from chitosan on optimal conditions were dimer and trimer.

Key words: Response surface methodology, Chitooligosaccharides, Cellulase, Chitosan

서 론

키토산은 D-glucosamine (2-amino-2-deoxy-D-glucose)이 β -1,4 결합한 동물성 다당으로 곤충과 갑각류 껍질, 곰팡이, 효모 등에 널리 분포하는 키틴 [(1 → 4)-linked-2-acet amido-2-deoxy- β -D-glucose)]을 70~80°C의 고온에서 강알칼리 처리로 탈아세틸화하여 쉽게 얻을 수 있고 (Austin et al., 1981; Knorr, 1984), 키토산 올리고당은 키토산을 염산처리 방법으로 만들 수 있다 (Rupley, 1964). 기능성 당류로 주목받고 있는 키토산과 키토산 올리고당은 항균작용 (Amako et al., 1987; Kendra and Hadwiger, 1984; Tokoro et al., 1989), 항암작용 (Suzuki et al., 1986; Nam et al., 1999), 면역기능 활성화작용 (Nishimura et al., 1986; Suzuki et al., 1982), 콜레스테롤 저하작용 (Maizuki et al., 1993; Sugano et al., 1992) 등의 다양한 생리 활성을 가지는 것으로 확인되었고, 이 같은 다양한 기능 특성을 응용하여 의약품 및 식품 소재로 이용하기 위한 많은 연구들이 행해지고 있다 (Sugano et al., 1978; Izume et al., 1992). 키토산 올리고당은 간단한 산분해법에 의해 제조될 수도 있으나 (Rupley, 1964), 산분해법은 올리고당 생산 수율이 낮고, 무작위적 분해에 의한 저분자당의 생산이 많으며, 반응 후 잔류하는 산의 제거 등 많은 문제점이 있다. 이러한 문제점을 극복하기 위해 효소분해법이 대안으로 제시되었는데 (Izume and Ohtakara, 1987), 이 방법은 온화한 조건에서 고중합도의 키토산 올리고당을 만들 수 있는 특징을 가지고 있다. 이와 관련하여 키토산 올리고당을 만들 수 있는 다양한 미생물 효소의 탐색이 이

루어졌으며 (Tominaga and Tsuzisaka, 1975; Price and Storck, 1975; Kazutoshi et al., 1992; Choi et al., 1997; Shin et al., 1998), 많은 연구가 진행되고 있다. 그러나 지금까지 개발된 효소에 의한 키토산 올리고당의 산업적 생산에는 값비싼 효소가 제약점으로 해결해야 할 문제이다.

한편, 키토산은 cellulase에 의해 가수분해가 일어난다는 사실이 알려져 있으며, chitosanase에 비해 가격이 매우 저렴한 cellulase를 이용한 특정 키토산 올리고당의 생산에 대한 보고는 제한적이며 (Hong and Kim, 1998), 이에 대한 더 많은 연구가 필요한 실정이다.

본 연구에서는 시판의 값싼 cellulase와 막반응기를 이용하여 키토산 올리고당을 생산할 목적으로 시판 cellulase의 키토산 분해능을 검색하였고, 아울러 반응표면 분석을 통하여 최적의 효소 농도, 반응 온도, 반응 시간 및 pH와 같은 반응조건을 살펴보았다.

재료 및 방법

키토산, 키토산 올리고당 및 cellulase

실험에 사용한 키토산은 최소 85% 이상 탈아세틸화된 것이었고, 키토산 올리고당 표준품 (dimer, trimer, tetramer, pentamer, hexamer, heptamer)과 cellulase는 각각 시판 제품을 구입 (Sigma Co., USA)하여 사용하였는데, *Trichoderma reesei* (C-1, 1.0 unit/mg), *Trichoderma viridie* (C-2, 1.0 unit/mg), *Aspergillus niger* (C-3, 0.3 unit/mg), *Aspergillus niger*-mutant (C-4, 1.0 unit/mg) 및 *Penicillium funiculosum* (C-5, 1.0 unit/mg) 유래의 cellulase였다.

*Corresponding author: dsjoo777@yahoo.co.kr

키토산 가수 분해 조건 최적화를 위한 실험 계획 및 회귀분석 Cellulase를 이용한 키토산 가수분해 조건의 최적화는 반응 표면 분석법 (response surface methodology) (Gontard et al., 1992)을 이용하였다. 즉, 예비실험을 통해 키토산 가수 분해율 (종속변수)에 미치는 변수 (독립변수)인 효소 농도 (x_1), 반응 온도 (x_2), 반응 시간 (x_3) 및 pH (x_4) 조건에 대한 실험 계획을 설계하여 Table 1과 같이 다섯단계로 부호화 하였고 (-2, -1, 0, 1 및 2) 이에 따라 실험값을 설정하였다. 중심합성계획 (central composite design) (Ismail et al., 1991)인 2차 모형으로 총 26개의 실험을 무작위로 수행하였으며 (Table 2), 반응표면 회귀분석은 SAS (statistical analysis system 6.0) program을 사용하였다 (Statistical Analysis System, 1989). 한편, 종속변수는 키토산 분해율로 하였으며, 이 때 4개의 독립변수에 대한 2차 회귀모형은 다음과 같다.

Table 1. Variables and their levels for central composite design

Variable	Symbol	Coded-variable levels ^a				
		-2	-1	0	1	2
Enzyme concentration ^b (unit)	x_1	40	71	102	133	164
Temperature (°C)	x_2	35	40	45	50	55
Time (hr)	x_3	4	7	10	13	16
pH	x_4	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0

^aPassage from coded variable(X_j) level to natural(X_j) level is given by the following equation: $x_1 = 31X_j + 102$, $x_2 = 5X_j + 45$, $x_3 = 3X_j + 10$, $x_4 = 0.5X_j + 4.0$.

^bSubstrate concentration reacted with each enzyme concentration is 0.5%.

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_4 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{14}x_1x_4 + b_{23}x_2x_3 + b_{24}x_2x_4 + b_{34}x_3x_4 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + b_{44}x_4^2$$

여기서 Y는 종속변수, x_1 , x_2 , x_3 , x_4 는 독립변수, b_0 는 절편 및 b_n 은 회귀계수이다. 또 회귀분석결과 임계점 (critical point)이 최대점 (maximum point)과 최소점 (minimum point)이 아니고 안장점 (saddle point)일 경우에는 능선분석 (ridge analysis)을 하여 최적점 (optimum point)을 구하였다.

환원당 측정

키토산 분해로 생성되는 환원당의 함량은 DNS 법 (Miller, 1959)으로 측정하였다. 즉, 기질과 효소 반응액을 10 N NaOH로 반응을 중지시킨 후 원심분리 (1,500×g, 10 min)하여 얻어진 상등액 0.5 mL에 1 mL DNS 용액을 첨가한 후 끓는 물에서 5분간 가열하였다. 가열 후 충분히 식힌 다음 550 nm에서 흡광도를 측정하여 D-glucosamine 표준으로 검량곡선을 작성하여 구한 상관식으로부터 환원당량을 정량하였다.

키토산 분해 및 분해율 측정

키토산 분해는 50 mL 시험관에 0.5% 키토산 용액 (pH 3.5) 10 mL와 효소를 40°C에서 반응시켜 키토산을 분해하였다. 반응은

Table 2. Central composite design arrangement and responses

Run	Independent variables ^a				Dependent variable Yield (%)
	x_1	x_2	x_3	x_4	
1	-1	-1	-1	-1	14.8
2	-1	-1	-1	1	13.9
3	-1	-1	1	-1	18.6
4	-1	1	-1	-1	20.1
5	1	-1	-1	-1	19.0
6	-1	-1	1	1	19.6
7	-1	1	1	-1	24.0
8	1	1	-1	-1	27.6
9	1	-1	-1	1	16.4
10	1	-1	1	1	21.3
11	-1	1	1	1	24.9
12	1	1	-1	1	20.5
13	1	1	1	-1	34.4
14	1	1	1	1	28.7
15	0	0	0	0	26.0
16	0	0	0	0	26.3
17	0	0	0	0	26.5
18	0	0	0	0	26.6
19	-2	0	0	0	17.9
20	2	0	0	0	27.1
21	0	-2	0	0	17.1
22	0	2	0	0	19.5
23	0	0	-2	0	13.0
24	0	0	2	0	29.4
25	0	0	0	-2	12.8
26	0	0	0	2	14.0

^aCoded variables.

최대 48시간까지 진행시켰고, 매 시간마다 반응액을 일정량 취하여 환원당을 측정하였고 (Miller, 1959), 분해율은 다음과 같은 방법으로 계산하였다.

$$\text{분해율 (\%)} = (\text{환원당 함량}) \times 100 / (\text{전당 함량})$$

TLC (thin layer chromatography)

TLC aluminum plate (silica gel, Kiesel gel, F₂₅₄, Merck Co.)를 110°C에서 1시간 전처리하여 데시케이터 중에 방냉한 다음 이 plate에 시료액을 10 μL loading 한 후 plate를 n-propanol과 30% ammonia water (2:1, v/v) 혼합액에 1차 전개하였다. 1차 전개가 끝난 다음 상온에서 완전 건조한 다음 동일한 조성의 전개액에서 2차 전개를 시켰다. 전개가 끝난 다음 상온에서 건조 후, 발색제 (0.1% ninhydrin in water-saturated n-butanol)를 분무하여 110°C에서 10분간 발색시켰다 (Choi et al., 1997).

결과 및 고찰

시판 cellulase의 키토산 가수분해율 및 효소의 선정

키토산 올리고당 제조에 적절한 효소의 선택을 위해 시판되고 있는 cellulase 5종을 기질과의 반응에 100 unit 씩 첨가하여 키토산

가수분해능을 확인한 결과 (Fig. 1), *Trichoderma reesei* 유래 효소인 C-1의 경우 가수분해율이 6.8% 정도였고, *Trichoderma viridie* 유래의 C-2, *Aspergillus niger* 유래의 C-3 및 *Aspergillus niger*의 변이종에서 유래한 C-4는 10% 내외의 낮은 가수분해율을 나타내었다. 그러나, *Penicillium funiculosum* 유래의 C-5는 31% 정도의 비교적 높은 분해율을 나타내었으며, 또한 이 효소는 다른 cellulase에 비해 상대적으로 값이 싼 효소로 응용에 있어서 가장 유리한 효소로 판단되었다. 한편, 이들 cellulase 가수분해물의 TLC 결과 (Fig. 2)도 다른 양상을 보여주고 있는데, 효소 C-1은 분해율도 낮지만 올리고당도 거의 생성되지 않았으며, C-2도 미량의 올리고당을 만드는 것으로 나타났다. 한편, C-3 효소 (3.53 \$/1,000 unit)는 분해율은 낮았지만 상대적으로 고중합도의 올리고당을 많이 만드는 효소로 확인되어 C-5 (0.11 \$/1,000 unit) 효소에 비해서는 값비싼 효소이지만 고중합도의 키토산 올리고당을 선택적으로 만드는데는 이런 효소의 사용도 고려할 필요가 있을 것으로 판단되었다. C-4와 C-5 효소의 키토산 가수분해물은 8개의 정도의 spot으로 유사한 TLC 패턴을 나타내었다. 아울러 C-5 효소는 3~5 정도의 중합도를 가지는 키토산 올리고당을 가장 많이 만드는 것으로 확인되었다. 이상의 결과에서 키토산 분해율, 효소의 가격 및 TLC 상의 올리고당 생산능 등을 총괄적으로 검토한 결과, 본 연구의 목적으로 가장 적절한 것으로는 C-5 효소로 판단되어 이 효소를 이용하여 키토산 올리고당 생산 조건의 최적화를 시도하였다.

반응시간에 따른 키토산의 가수분해율

선택된 C-5 효소의 반응 시간에 따른 키토산 분해율의 변화는 Fig. 3과 같다. 반응 10시간까지는 시간에 따라 분해율은 대수적으로 증가하였으며, 그 이후로는 완만한 분해율의 증가를 나타내

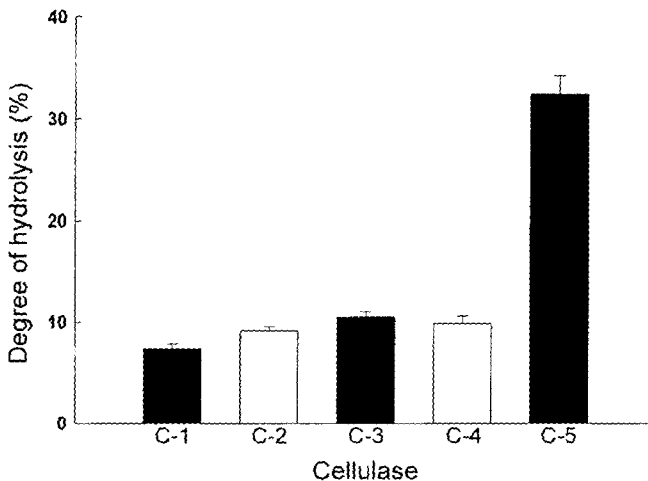


Fig. 1. Hydrolysis degree of chitosan treated with each cellulase. The enzyme were reacted on optimum pH and temperature for 10 hrs. C-1: cellulase from *Trichoderma reesei*, C-2: cellulase from *Trichoderma viridie*, C-3: cellulase from *Asp. niger*, C-4: cellulase from *Asp. niger* mutant, C-5: cellulase from *Pen. funiculosum*.

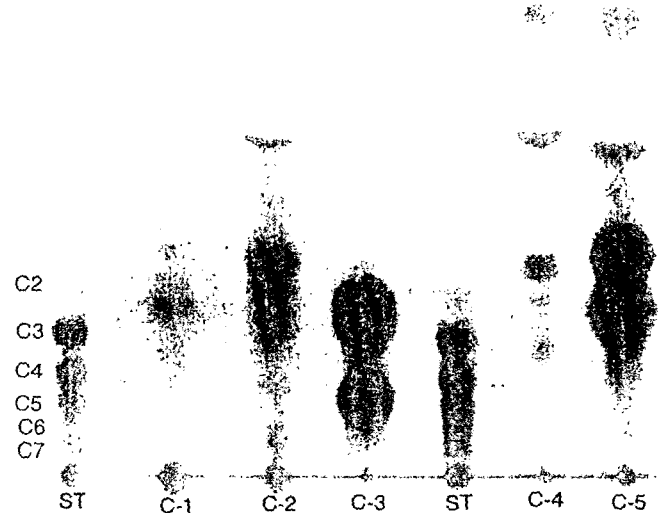


Fig. 2. TLC pattern of chitosan oligosaccharide standard and chitosan hydrolysates prepared from chitosan by several commercial cellulase. C-1: *Trichoderma reesei*, C-2: *Trichoderma viridie*, C-3: *Asp. niger*, C-4: *Asp. niger* mutant, C-5: *Pen. funiculosum*, ST: standard, C2: dimer, C3: trimer, C4: tetramer, C5: pentamer, C6: hexamer, C7: heptamer.

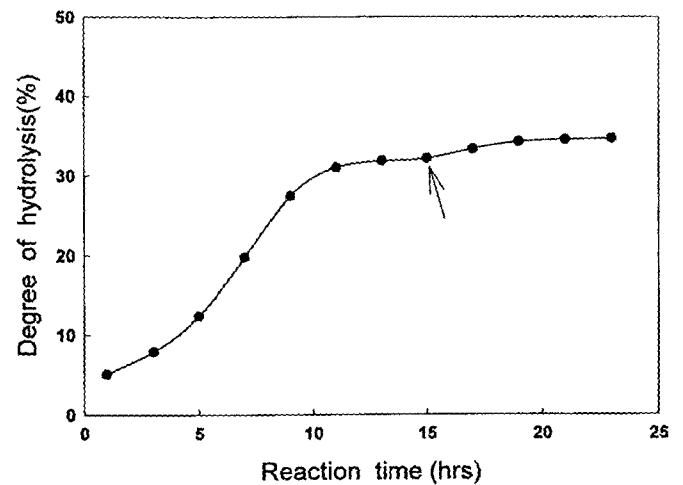


Fig. 3. Hydrolysis degree of chitosan with cellulase according to reaction time. Reaction conditions were 100 unit of enzyme concentration, 0.5% of substrate concentration, 4.0 of pH, and 40°C of temperature. Arrow indicates the time of enzyme addition of 50 unit.

었다. 한편, 반응 15시간에 효소를 추가 (50 unit)하여 반응을 시켜도 급격한 분해율의 상승은 없었으며, 24시간까지 완만하게 분해율이 증가하였다. 따라서 효소와 기질의 반응은 10시간을 기본 반응 시간으로 결정하였다.

반응표면 분석법에 의한 가수분해 조건의 최적화

Table 3에는 다중회귀분석 결과를 요약하였는데, 일차식 (linear regression)과 이차식 (quadratic regression)은 1% 수준에서 유의

Table 3. Model coefficients estimated by multiple linear regression of chitosan hydrolysis with cellulase

Parameter	Coefficient
Intercept	26.5 ^b
Linear	
X_1	4.3
X_2	5.1 ^b
X_3	6.4
X_4	-1.8 ^b
Quadratic	
X_1^2	-3.2 ^a
X_2^2	-6.4 ^b
X_3^2	-3.5
X_4^2	-11.0 ^b
Crossproduct	
$X_1 \cdot X_2$	-1.9
$X_1 \cdot X_3$	5.2
$X_1 \cdot X_4$	-7.4
$X_2 \cdot X_3$	3.2
$X_2 \cdot X_4$	-3.1
$X_3 \cdot X_4$	3.8

Superscript letters are significantly different: b; $p < 0.01$, c; $p < 0.05$, d; $p < 0.10$.

성 ($p < 0.01$)이 있으며, 교차식 (crossproduct regression)은 유의성이 없었다. 그리고 반응표면 분석법으로 계획한 결과값은 결정계수 (R-square)가 0.8829였으며, 잔차 (residual error)의 적합 결여 (lack of fit)가 1% 수준에서 유의성이 있는 것으로 보아 가정된 회귀모델이 자료를 설명할 수 있는 최상의 모델은 아니지만 자료의 적합은 가능하였고, 본 실험 계획 조건의 더욱 세밀한 해석에는 더 높은 차원의 모델 설정이 필요할 것으로 생각되었다. 본 연구에서는 중심합성계획에 의해 설계된 26개의 실험조건으로 키토산 분해 반응을 행한 후, 얻어진 실험값들을 최소제곱법에 의한 반응표면 분석 (RSREG) 처리하고, 두가지 독립변수 사이의 관계를 나머지 변수를 제로 수준 (coded-variable level)으로 놓고 3차원 그래프화하였다. 효소농도와 온도와의 관계 (Fig. 4)에서는 반응 온도 52°C까지는 온도가 높을수록 분해율이 높았으나, 그 이상의 온도에서는 분해율이 오히려 감소하였으며, 이 때 효소 농도보다는 반응 온도에 의존하는 경향을 나타내었다. 효소 농도와 반응 시간 (Fig. 5)은 서로 영향을 주어 효소 농도가 높고 반응 시간이 길수록 분해율은 크게 상승하여 효소 농도 164 unit와 반응 16시간에서 최대 45% 정도의 분해율을 유도할 수 있는 것으로 확인되었다. 효소 농도와 pH는 안장점을 이루는 상관성을 나타내었는데 (Fig. 6), pH 3.8~4.2와 효소 농도 130~160 unit 범위에서 최적의 분해 조건을 설정할 수 있을 것으로 판단되었다. 반응 시간 및 온도의 관계 (Fig. 7)에서는 반응 시간이 길어질수록, 온도는 52°C에서 최대의 분해가 일어나며, 반응 시간을 짧게 하고 반응 온도를 높이는 조건은 일정 온도 범위내에서는 의미가 있을 수 있으나, 52°C보다 높은 온도 조건은 효소의 적정 반응 온도 범위를 벗어나는 조건임이 확인되었다. 반응 온도와 pH와의 관계에서는 pH 3.8~4.2, 반응 온도가 48~52°C 범위에서 최대 분해율을 보였

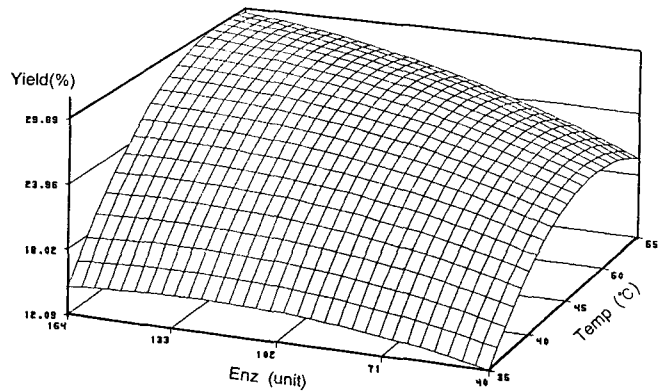


Fig. 4. Response surface for the effect of enzyme concentration and temperature on the hydrolysis of chitosan with cellulase at a constant time of 10 hr. The enzyme concentration indicates enzyme unit to 0.5% of substrate concentration.

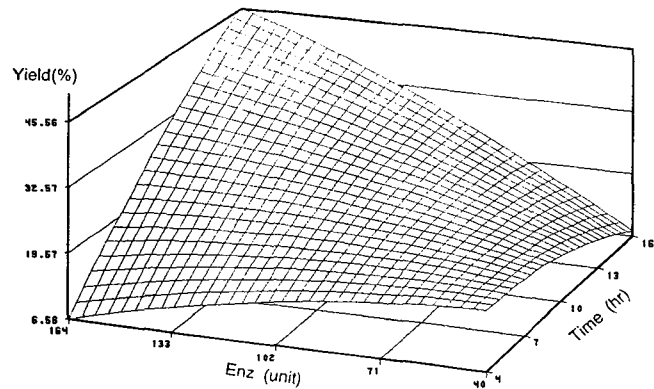


Fig. 5. Response surface for the effect of enzyme concentration and time on the hydrolysis of chitosan with cellulase at a constant pH of 4.0. The enzyme concentration indicates enzyme unit to 0.5% of substrate concentration.

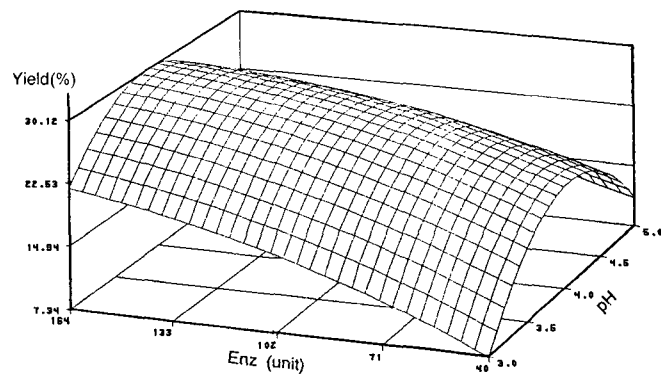


Fig. 6. Response surface for the effect of enzyme concentration and pH on the hydrolysis of chitosan with cellulase at a constant temperature of 45°C. The enzyme concentration indicates enzyme unit to 0.5% of substrate concentration.

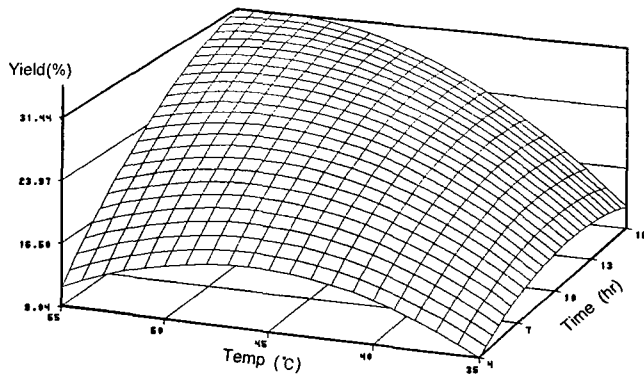


Fig. 7. Response surface for the effect of temperature and time on the hydrolysis of chitosan with cellulase at a constant pH of 3.8

으며, pH가 이 범위를 벗어나는 경우는 반응 온도에 따른 분해율의 변화가 큰 것으로 나타났다 (Fig. 8). 반응 시간과 pH와의 상관 (Fig. 9)에서는 pH 3.8~4.0 범위에서 반응 13시간 이상의 조건에서는 분해율이 30% 정도로 일정한 것으로 나타났으며, 반응 시간이 13시간 이하일 경우 pH 범위에 상관없이 분해율이 크게 감소하는 것으로 추정되었다. 키토산의 가수분해율은 다중 회귀분석의

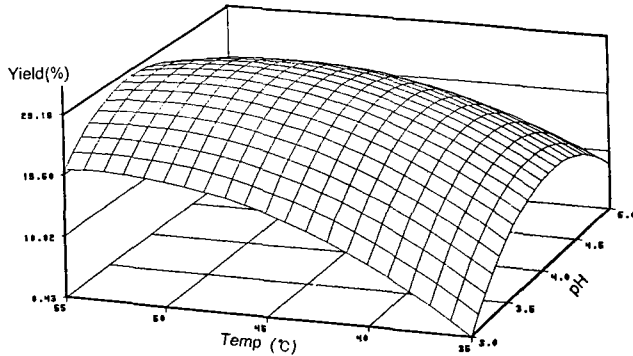


Fig. 8. Response surface for the effect of temperature and pH on the hydrolysis of chitosan with cellulase at a constant time of 12.5 hr.

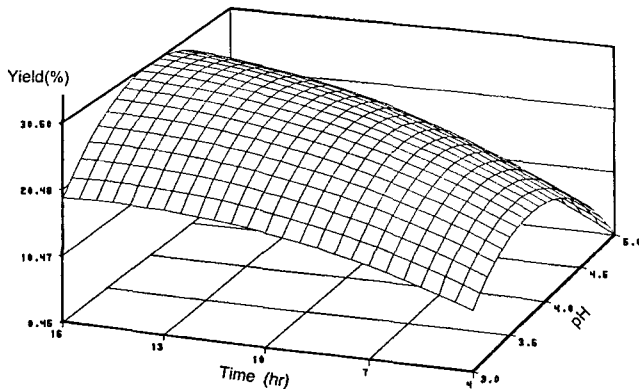


Fig. 9. Response surface for the effect of time and pH on the hydrolysis of chitosan with cellulase at a constant temperature of 48°C.

결과로부터 $Y(\%) = 26.5 + 5.1x_2 - 1.8x_4 - 3.2x_1^2 - 6.4x_2^2 - 11.0x_4^2$ 였으며, 정상점 (stationary point)에서의 분해율 예측치는 27.5%였으나, 정상점은 안장점을 나타내고 있어서 최고점이라고 할 수 없다. 따라서 능선분석을 통해 가장 분해율이 높은 점이 35.6%였다. 이 점을 반응표면분석법에 의한 최대 가수분해율을 나타내는 조건으로 결정하였으며, 이 때의 각 변수의 값은 기질 농도 0.5%에 대해 효소농도 143 unit, 반응온도 49°C, 반응시간 13.2시간 및 pH가 3.8이었다.

가수분해물의 성상

반응표면 분석법에 의해 설정된 최적의 반응 조건에서 얻어진 키토산 가수분해물의 조성을 TLC를 통해 확인한 결과 (Fig. 10), TLC 상에서 총 8~9개의 spot가 확인되어 다양한 형태의 키토산 올리고당이 생산되는 것으로 추정되었다. 아울러 표준품과의 비교로부터 dimer 또는 trimer가 주된 올리고당이었으며, tetramer나 hexamer의 함량은 높지 않았으며, monomer도 일부 생성되는 것으로 확인되었다.

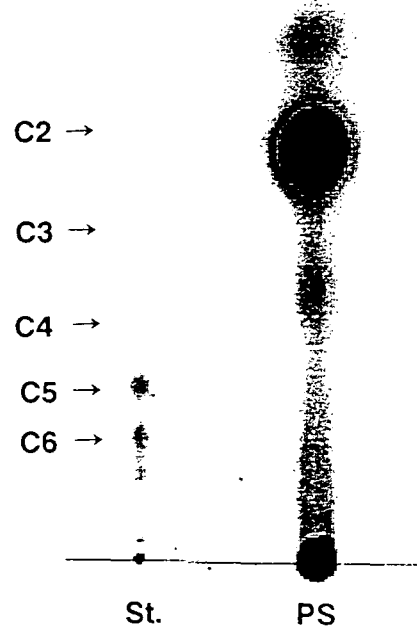


Fig. 10. TLC pattern of chitosan oligosaccharide prepared by cellulase in optimum condition for reaction obtained from response statistical methodology. St.: standard, PS: product, C2: dimer, C3: trimer, C4: tetramer, C5: pentamer, C6: hexamer.

요 약

Cellulase를 이용하여 키토산 올리고당을 제조하기 위한 최적 조건을 반응표면 분석법을 이용하여 설정하였다. 키토산 분해능과 산업적 활용의 측면에서 유리한 *Pen. funiculosum* 유래의 cellulase를 예비 실험을 통해 결정하였다. 이 효소의 적정 반응 조건

에서 경시적 키토산 분해율을 측정한 결과, 반응 10시간까지는 대수적 증가를 보였으나, 10시간 이후로는 완만한 분해율을 나타내었다. 중심합성계획에 의해 총 26개의 실험을 행한뒤 반응표면분석법으로 설정한 키토산 분해 최적 조건은 기질 농도 0.5%에 대해 효소 농도 143(U), 반응 온도 49°C, 반응 시간 13.2 hr 및 pH는 3.8 이었다. 본 연구에서 설정된 최적의 조건에서 얻어진 키토산 분해물은 dimer와 trimer가 주된 올리고당이었고, 소량의 tetramer와 hexamer 그리고 monomer 등의 총 8종 정도의 올리고당이 검출되었다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 지정 강릉대학교 동해안 해양생물자원 연구센터의 지원에 의한 것입니다.

참 고 문 헌

- Amako, K., S. Shimodori, T. Imoto, S. Miake 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.
- Austin, P.R., C.J. Brine, J.E. Castle and J.P. Zikakis. 1981. Chitin; New facets of research. *Science*, 212, 749~753.
- Choi, Y.J., E.J. Kim, Y.S. Kim and Y.C. Shin. 1997. Development of chitosanase for the production of chitooligosaccharides. *J. Chitin and Chitosan*, 2, 40~48 (in Korean).
- Gontard, N., S. Guilber and J.L. Cug. 1992. Edible wheat gluten film: Influence of the main process variable on film properties using response surface methodology. *J. Food Sci.*, 57, 190~199.
- Hong, S.P. and D.S. Kim. 1998. Chitosanalytic characteristics of cellulase from *Trichoderma viride* and *Trichoderma reesei*. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 30, 245~252 (in Korean).
- Ismail, Y.S., M.H. Rustom, L. Lopez and M.N. Baboo. 1991. Optimization of extraction of peanut proteins with water by response surface methodology. *J. Food Sci.*, 56, 1660~1663.
- Izume, M., S. Nagae, H. Hawagishi, M. Mitsutomi and A. Ohtakara. 1992. Action pattern of *Bacillus* sp. No. 7-M chitosanase on partially N-acetylated chitosan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 56, 448~453.
- Izume, M. and A. Ohtakara. 1987. Preparation of D-glucosamine oligosaccharides by the enzymatic hydrolysis of chitosan. *Agric. Biol. Chem.*, 51, 1189~1191.
- Kazutoshi, Y., J. Hosokawa, T. Kubo, M. Nishiyama and Y. Koba. 1992. Purification and properties of chitosanase from *Pseudomonas* sp. H-14. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 972~973.
- 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.
- Knorr, D. 1984. Use of chitinous polymers in food. *Food Tech.*, 38, 85~97.
- Maezaki, Y., K. Tsuji, Y. Nakagawa, Y. Kawai, M. Akimoto, T. Tsugita, W. Takekawa, A. Terada, H. Hera and T. Mitsuoka. 1993. Hypocholesterolemic effect of chitosan in adult males. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 1439~1444.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31, 426~428.
- Nam, M.Y., Y.H. Shon, S.K. Kim, C.H. Kim and K.S. Nam. 1999. Inhibitory effect of chitosan oligosaccharides on the growth of tumor cell. *J. Chitin and Chitosan*, 4, 184~188 (in Korean).
- Nishimura, K., C. Ishihara, S. Ukei, S. Tokura and I. Azuma. 1986. Stimulation of cytokine production in mice using deacetylated chitin. *Vaccine*, 4, 151~156.
- Price, J.S. and R. Storck. 1975. Production, purification, and characterization of an extracellular chitosanase from *Streptomyces*. *J. Bacteriol.*, 124, 1574~1585.
- Rupley, 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.
- Shin, Y.C., E.J. Kim, Y.J. Choi, J.J. Kim, Y.C. Yoon, C.M. Choi and Y.S. Kim. 1998. Commercial production and applications of chitosanase. *J. Chitin and Chitosan*, 3, 268~278 (in Korean).
- Statistical Analysis System. 1989. *SAS/STAT User's Guide*, Version 6, 4th ed., SAS Institute, Inc., USA.
- Sugano, M., K. Yoshida, H. Hashimoto, K. Enomoto and S. Hirano. 1992. Hypocholesterolemic activity of partially hydrolyzed chitosan in rats, in advances in chitin and chitosan (Ed. Brine, C.J., Sandford, P.A., J.P. Zikakis). Elsevier Applied Science, London and N.Y., pp. 472~478.
- Sugano, M., T. Fujikawa, Y. Hiratsuji and Y. Hasegawa. 1978. Hypercholesterolemic effects of chitosan in cholesterol-fed rats. *Nutr. Rept. Int.*, 18, 531~537.
- Suzuki, K., T. Mikami, Y. Okawa, A. Tokoro, S. Suzuki and M. Suzuki. 1986. Antitumor effect of hexa-N-acetyl-chitohexaose and chitohexaose. *Carbohydr. Res.*, 151, 403~408.
- Suzuki, S., Y. Okawa, Y. Okura, K. Hashimoto and M. Suzuki. 1982. Chitin and Chitosan. Ed. by S. Hirano and S. Tokura, Tottori Univ., Tottori, p. 210.
- 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.
- Tominaga, Y. and Y. Tsuzisaka. 1975. Purification and some enzymatic properties of the chitosanase from *Bacillus* R-4 which lysis *Rhizopus* cell walls. *Biochim. Biophys. Acta.*, 410, 145~155.

2002년 9월 18일 접수

2002년 11월 28일 수리