

碩士學位論文

세균성 키토산 분해 효소와
키토산 필름



濟州大學校 大學院

제주대학교 중앙도서관
食品工學科
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

許 承 晚

1999年 12月

세균성 키토산 분해효소와
키토산 필름

指導教授 高 榮 煥

許 承 晚

이 論文을 工學 碩士學位 論文으로 提出함

1999年 12月



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

許承晚의 工學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 金 在 河

委 員 河 璣 桓

委 員 高 榮 煥



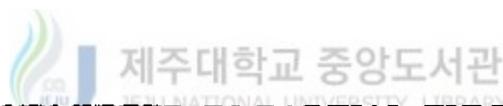
濟州大學校 大學院

1999年 12月

A Bacterial Chitosanase and Chitosan Films

Seung-Man Heo

(Supervised by professor Young-Hwan Ko)



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF ENGINEERING

DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND ENGINEERING
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1999. 12.

목 차

Summary	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	9
1. 사용균주	9
2. 사용시약	9
3. 사용기기	10
4. 방법	11
1) 1% chitosan 제조	11
2) 1% γ -PGA 제조	11
3) 조효소액의 정제	11
① 한외여과	11
② 염석	12
③ 탈염	12
④ Gel permeation chromatography	12
4) 표준검량곡선 작성	13
5) 활성측정	13
6) 단백질 정량, 비활성측정 그리고 turnover number	16
7) Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)	16
8) Chitosanase 활성염색	17

9) 환의여과막을 이용한 chitosan oligosaccharide 생산	17
10) Thin layer chromatography(TLC)	18
11) High performance thin layer chromatography(HPTLC)	18
12) 정제된 효소의 특성	19
① 기준 반응시간의 결정	19
② 최적 반응온도	19
③ 열 안전성	19
④ pH 안전성	19
13) Chitosan과 γ -PGA 혼합필름 제조	20
① 필름제조	20
② 인장강도 측정	20
③ 흡습성	21
④ 용해성	21
⑤ 생분해성	21
III. 결과 및 고찰	22
1. 효소액의 정제	22
2. 비활성(specific activity)과 turnover number	25
3. SDS-PAGE 분석	25
4. Thin layer chromatography(TLC)	29
5. Chitosan oligosaccharides의 생산	29
6. 효소활성의 온도의존성	32
① 최적반응온도	32
② 열 안전성	32
7. 효소활성의 pH 의존성	35



8. Chitosan과 γ -PGA 혼합필름 제조	38
① 인장강도	38
② 용해성	41
③ 흡습성	41
④ 생분해성	41
요 약	45
참고문헌	47



Summary

Chitosan is a polymer of D-glucosamine linked by β -(1 \rightarrow 4) covalent bonds. It is obtained through deacetylation of chitin that occurs mainly in the shells of crustaceans and the exoskeletons of insects. It is also found in fungal cell walls. Having relatively rich natural resources, chitin and their derivatives are widely utilized in industries. Among those are chitosan oligosaccharides that are reported to have some biological activities. The production of chitosan oligosaccharides require hydrolysis of chitosan by acid or enzyme. Chitosanase, the chitosan-depolymerizing enzyme, was purified from unidentified bacterial culture and its characteristics were determined. The potential application of chitosan to film manufacture was also investigated.

Cell-free culture of the unidentified bacteria was filtered with ultramembrane(NMWL, 1K) to remove low molecular weight compounds. Ammonium sulfate was added to the filtrate at the level of 90% saturation to induce precipitation of proteins. The precipitated proteins were desalted with sephadex G-10 column and fractionated through sephadex G-100 gel permeation chromatography. Specific activity of the enzyme before purification was 5.8 U/mg and was increased up to 9.7 U/mg through purification procedures. SDS-PAGE analysis of proteins and enzyme activity staining revealed only one kind of chitosanase in the bacterial culture. Its molecular weight was about 30,000 dalton with one kind of subunit. The catalytic unit could

highly be a monomeric protein.

TLC-analysis of enzymatic hydrolysis products of chitosan showed that the enzyme generated dimeric through hexameric oligomers of D-glucosamine without producing monomeric D-glucosamine.

Its optimum temperature for catalytic activity was 40°C and the catalytic activity dropped rapidly at the temperatures higher than 45°C, which reflected its low heat stability. The enzyme was stable for at least one hour at neutral pH ranges from 5.0~9.0.

Homopolymeric films made of only chitosan and heteropolymeric films made of both chitosans and γ -poly(glutamic acid)(γ -PGA) were compared. Degree of water absorption and solubility in water of heteropolymeric films were lower than those of homopolymeric films. Heteropolymeric films had lower elasticity but higher tensile strength than homopolymeric films.



I. 서 론

Chitin은 N-acetyl-D-glucosamine이 β -(1→4)결합으로 중합된 사슬형 고분자로서(Fig. 1), 게껍질의 70%, 곤충 껍질의 30~60%, 연체동물 표피의 40% 내외를 차지한다(이, 1994). Chitin은 1811년 Branconot에 의하여 버섯에서 최초로 발견되었으며, 1823년 Ordier에 의하여 생물의 외피를 이루는 물질이란 뜻의 그리스어인 chitin이라 명명되었다(Muzarelli, 1977). Chitin은 분자량 100만 이상의 천연고분자 다당으로 갑각류, 곤충류, 균류 등에 의해서 연간 약 1000억톤 이상 생산되는 것으로 추산되고 있는 귀중한 생물자원이며 이의 탈아세틸화물인 chitosan과 함께 새로운 신소재로서 주목받고 있다(홍과 김, 1995).

한편, chitosan은 1894년 Hoppe-Seyler에 의해 명명되었으며 이들의 구조는 19세기 후반 cellulose와 거의 같은 시기에 해명되었다(Muzarelli, 1977). Chitosan은 D-glucosamine이 β -(1→4) 결합으로 중합된 사슬형 고분자 다당류로서(Fig. 1), 자연계에 널리 분포하는 chitin을 고온에서 강알칼리 용액으로 탈아세틸화하여 만들 수 있다(이, 1994).

Chitin과 그 유도체들은 의료, 식품, 의류, 폐수처리 및 화장품과 같은 분야에 널리 이용되고 있다. Chitin은 물에 녹지 않으나 chitosan은 pH 5.0 정도의 약산성에서 물에 녹기 때문에 chitin보다 응용가능 범위가 넓어서 치과영역, 안과영역, 인공피부, 수술, 섬유공업, 식품공업 등에서 사용되며 항암활성, 면역증강활성, 혈중콜레스테롤 저하, 지방흡착 작용 등 여러가지 생리적 활성을 지닌 것으로 보고되고 있다. 그리고 chitosan이

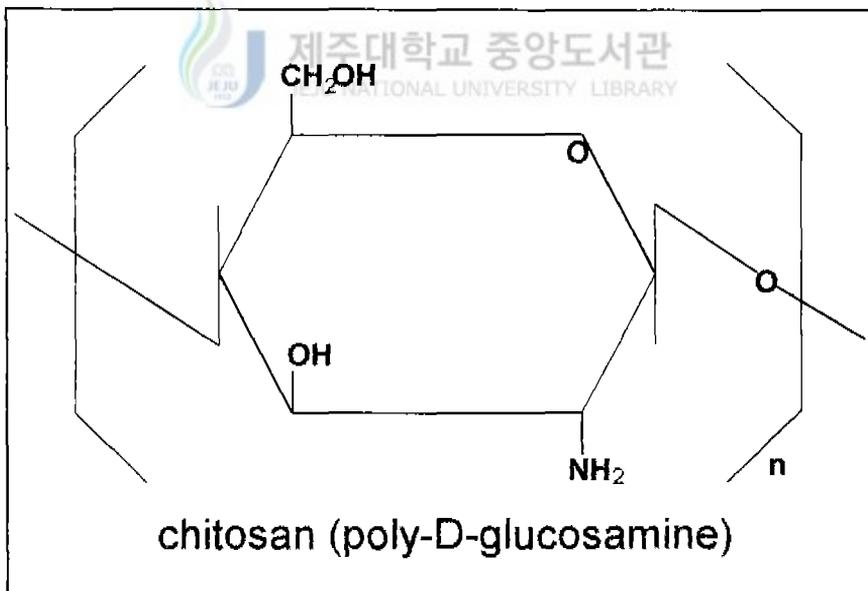
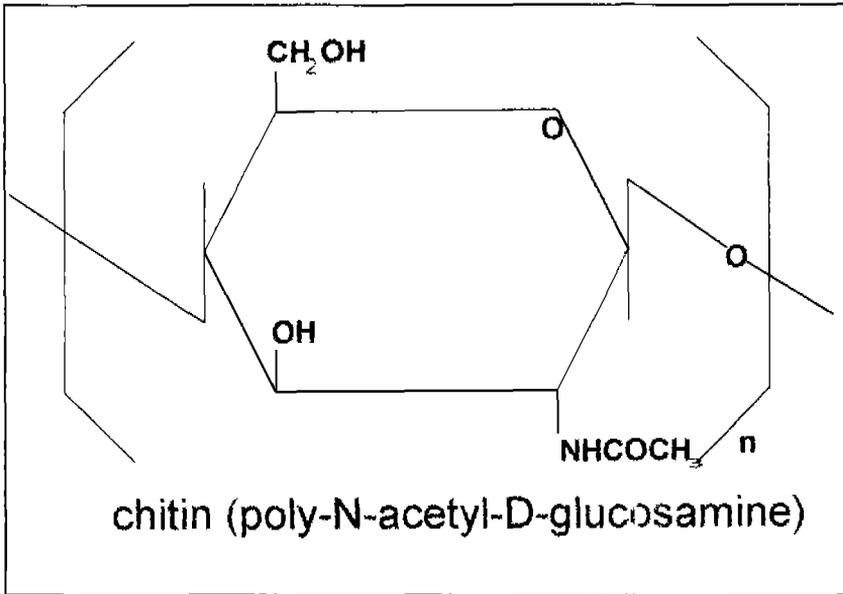


Fig. 1. The Structures of chitin and chitosan.

물에 녹을 경우 $-NH_2$ 기가 $-NH_3^+$ 형으로 전환되어 최근 관심이 고조되고 있는 biocation체로서, 치아질환의 예방, 응집제로의 사용, 콜레스테롤치 저하작용, 항세균활성등 여러가지 생리활성을 갖는 것으로 보고되고 있다 (이, 1997b).

따라서, chitin 및 chitosan은 건강지향성 식품, 의약품, 식품보존제, 중금속 흡착제, 효소 고정화제, 화장품, 사료, 토양개량제 등 향후 다양한 분야에 응용가능한 새로운 고부가가치 생물자원으로 평가되고 있으며, 90년대 식품 및 의약품 분야에서만 시장규모가 수 백억원대에 이르는 것으로 추정되고 있다. 한편 chitin은 일반용매에 녹지 않는 특성이 있고, chitosan 용액은 점도가 높은 특징이 있다. 또한 chitosan은 단백질이 존재하거나 pH가 상승시 응집되는 성질을 보이며 쓰거나 뚝은 맛을 나타내는 등 chitin 및 chitosan은 물성이나 기호성 등에 제약이 있어서 식품 및 의약품 등 관련분야에 응용하기 위해서는 선결되어야 할 과제가 많다(홍 등, 1997).

통상 게, 새우 등 무척추 동물의 껍질을 강산, 강알칼리로 처리하여 얻어진 chitin을 고온에서 강알칼리로 2~4시간 처리함으로써 N-acetyl기를 제거하여 공업적으로 chitosan을 생산하고 있다. 그러나 수산 폐기물로부터 chitosan을 얻는데 필요한 강산과 강염기 물질의 환경오염 문제가 대두되고 지속적인 원료공급의 제한성 등으로 인하여 최근에는 곰팡이 세포벽으로부터 직접 chitosan을 생산하는 연구가 진행되었다. *Rhizopus*속 곰팡이의 세포벽에 chitosan이 33% 내외로 존재하고 있어 발효법에 의한 chitosan 생산을 연구하고 있으며(이, 1997a), *Mucoraceae*류 곰팡이에서의 chitosan은 chitin synthetase와 chitin deacetylase가 함께 작용해서 형

성된다는 연구도 있었다(Davis와 Bartnicki-Garcia, 1984). 또 효소작용으로 탈아세틸화된 chitosan은 고온의 강알칼리 처리에 의해 얻어지는 chitosan보다 분자량과 탈아세틸화 정도에 있어서 불균질성이 낮아, 효소 처리법이 고품질의 chitosan을 생산하기에 보다 더 적합하다는 보고도 있다(Kafetzopoulos 등, 1993).

이 (1994)는 계깍질로부터 chitosanase를 생산하는 *Aspergillus* sp. S-11을 분리하였는데 정제된 효소의 분자량은 30kDa였으며, 효소의 특성을 조사한 결과 60℃, pH 4.0~5.0에서 최대활성을 나타내었다고 보고하였다. 김 (1988)은 chitosan 분해 효소 생산성이 우수한 균주 *Streptomyces* sp. KH-1 배양액의 효소 역가는 0.6 Unit/ml이었으며, 정제 효소의 최적 pH는 4.5~5.5, 최적 온도는 50~60℃이었다고 보고하였다. 한 (1996)은 누룩곰팡이 중에서 chitosanase를 생산하는 *Aspergillus* sp. JS4를 분리하여, 분자량 110,000Da(chitosanase I)와 28,000Da(chitosanase II)인 두 종류의 효소를 얻었다. I은 chitosan을 주로 monomer와 약간의 dimer로 분해하는 것으로 보아 exo-type의 효소이며, II는 chitosan을 trimer이상의 oligomer로 분해하는 endo-type의 효소라고 보고하였다.

지금까지 수많은 chitosanase가 연구되었는데, 연구초기에는 낮은 활성과 높은 가격으로 경제성이 부족하였으나, 90년대 들어서면서 높은 활성을 갖는 chitosanase가 발견되고 대량 배양으로 효소 생산원가가 낮아짐에 따라 효소분해법으로 chitosan oligosaccharide를 생산할 수 있게 되었다.

지금까지 알려진 일반적인 chito oligosaccharide(chitin 또는 chitosan을

가수분해하여 얻어지는 oligomer로 chitinoligosaccharide와 chitosanoligosaccharide을 포함하는 의미)의 제조 방법으로는 강산을 사용하는 화학적인 분해법과 chitin 및 chitosan 분해효소를 이용하는 생물학적인 분해법이 있다. 화학적인 방법에 의한 chitooligosaccharide의 생산 기술로는 염산가수분해법이 주로 이용되고 있는데, 이 방법은 다양한 조건하에서 chitin 및 chitosan을 진한 염산으로 분해한 후 활성탄이나 ion chromatography로 분리정제를 행하는 것이다. 그러나 염산분해법은 강산의 사용으로 인하여 안전성이 의문시 될 뿐만 아니라 환경오염 유발, 중화시 과도한 염의 발생, 고차 올리고당의 수율저하, 염산분해 중 탈아미노화 및 착색과 같은 화학반응 등이 수반되는 것이 문제점으로 지적되고 있다. 효소를 이용한 chitooligosaccharide의 제조기술은 특정 올리고당의 선택적 대량생산 및 안전성 측면에서 우수한 제조방법으로 인식되어 많은 연구가 진행되고 있다. 일반적으로 endochitosanase에 의한 chitosan의 분해는 단당의 생산이 거의 없어 chitosanoligosaccharide의 제조에 유효하다고 알려져 있다(이, 1998).

식용필름(edible film)은 산소 및 이산화탄소 등의 가스와 수증기압의 투과저해성(barrier)을 가지고 있으며, 지질과 용질의 이동을 지연시키고 기계적 취급성(mechanical handling properties)을 용이하게 하며 구조를 유지하고 향기성분을 보유하며 식품첨가물을 운반하는 역할을 한다. 그러므로 코팅등의 용도로 식품외부에 사용하거나, 수분활성도가 현저히 다른 요소들로 구성된 식품과 식품 사이에 사용되어 왔다. 식용필름을 식품에 코팅하여 사용할 경우, 식품에서 주변환경으로의 제한적인 수분 손실이나 산소의 흡수를 감소시키며, 서로 다른 식품성분들간의 수분 이동을 방지

하여야 한다(Song과 Kim, 1999).

과실이나 육류는 부패되기 쉬워서 보존기간을 연장시킬 수만 있다면 생산자와 소비자를 만족시킬 수 있으므로 바람직하다. Chitosan으로 제조한 필름은 생분해성과 낮은 산소투과도를 나타낸다. 그러나 아직까지는 brittleness, 습강도 등 물리적 성질이 기존제품에 미치지 못하여(Ryu 등, 1999) chitosan에 γ -poly(glutamic acid)(γ -PGA)를 혼합하여 고분자 필름을 제조하였다.

본 연구에서는 chitosan의 이용가능성과 새로운 천연고분자 소재로서의 가능성을 제시할 기초 자료를 얻고자 반응시간, 반응온도, 열안전성, pH안전성 등의 특성을 조사하였으며, chitosan에 γ -PGA를 혼합한 식용 film을 제조하여 인장강도, 용해성, 흡습성, 생분해성 등 물리적 성질을 실험하였다.



II. 재료 및 방법

1. 사용균주

키토산 분해효소 생산균주로는 미동정의 세균을 사용하였다. 세균의 배양 후 균체를 제거하고 무세포 배양액을 -20°C 에 냉동 보관하면서 필요한 양만큼 해동하여 조효소액으로 사용하였다.

2. 사용시약

Chitosan(탈아세틸화도 85%이상)과 D-glucosamine 그리고 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS)는 Sigma사 제품을 사용하였다.

SDS-PAGE 분자량 표준물질(low range)과 SDS-PAGE용 gel(Ready Gels 12%)은 Bio-RAD사 제품을 사용하였다. SDS-PAGE에 사용한 염료인 bromophenolblue는 Osaka사 제품을 그리고 destaining과 HPTLC의 전개용매인 acetic acid는 Tedia사 제품을 사용하였다. Sephadex G-10, sephadex G-100, 활성염색에 사용한 시약인 congo red, agarose gel을 만들기 위한 agarose(melting temp. approx. 65°C , gelling temp. approx. 30°C)와 SDS를 제거하기 위한 Triton X-100 (octyl phenoxy polyethoxyethanol)은 Sigma사 제품을 사용하였으며, Triton X-100은 100mM sodium acetate(pH 5.0)에 1%로 첨가하여 사용하였다.

TLC 전개용매로 사용된 n-propanol은 Wako사, ethyl acetate는 Kanto사, 암모니아수는 Isizu사, HPTLC 전개용매인 isopropyl alcohol은 James

Burrough사, 그리고 pyridine은 Junsei사 제품을 각각 사용하였다.

TLC 전개용매와 기타 실험에 사용한 모든 시약은 특급 또는 1급 제품을 사용하였다.

3. 사용기기

흡광도 측정을 위해 Hewlett Packard 8453 UV-visible spectrophotometer를, 항온반응에는 water bath(Eyela, Digital water bath SB-651, Japan)를 사용하였다. 실험에 사용한 각 완충액의 pH는 Meter Delta 340(model ser. No. M3691)를 사용하여 조절하였다.

Chromatography용 column으로 100ml buret(2cm×50cm)을, fraction collector는 Model KMC-2000(Vision scientific co. Ltd.)을 각각 사용하였다. 원심분리기로는 eppendorf centrifuge 5415C(Germany)를 사용하였다.

균주 보관용 냉동고는 Siemens사(GS21UO3RK, Germany) 제품을 사용하였다.

한외여과장치는 Pall Filtron사(USA)의 model 7529-10를 사용하였고 membrane은 Omega사 제품(NMWL : 1K)을 사용하였다.

Texture analyzer는 TA-XT2(Haslemere Surrey GU27, England)를 사용하였다. HPTLC는 Camag사(Swiss)의 Linomat IV를 사용하였고, silical gel은 silical gel 60F₂₅₄(Merck, Germany)를 사용하였다. 시료를 농축하기 위한 회전진공농축기는 Eyela사(N-N Series) 제품을 사용하였다.

4. 방법

1) 1% chitosan 제조

기질인 chitosan은 100mM sodium acetate buffer(pH 4.5)에 용해시킨 후 Whatman filter paper No. 2로 진공압 여과하여 얻은 여액을 기질로 사용하였다.

2) 1% γ -PGA 제조

필름제조에 사용한 γ -poly(glutamic acid)(γ -PGA)는 순수분리 정제된 것으로 100mM sodium acetate buffer(pH 5.0)에 용해시켜 사용하였다.

γ -PGA는 *Bacillus*속 세균에 의해서 생산되는 단백질과 유사한 화합물로 식용이 가능하며, 분자량이 $8.4 \times 10^4 \sim 1.15 \times 10^6$ 에 달하는 수용성 천연고분자로(Troy, 1973) *Bacillus species*의 capsule을 구성하는 주성분으로 알려져 있으며, *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a에 의해서 생산된 것이다(Ko와 Gross, 1998).

3) 조효소액의 정제

① 한외여과

세균의 무세포 배양액을 한외여과기로 여과하여 분자량 1,000dalton 이하의 물질을 제거하고, 시료를 농축하였다.

② 염석

한외여과액에 ammonium sulfate를 90% 포화되게 천천히 녹이고 4℃에서 12시간 방치시킨 후 10,000rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액을 버리고 침전물을 회수하였다. 침전물을 100mM sodium acetate buffer(pH 5.0)에 용해시킨 후 탈염 시료로 사용하였다.

③ 탈염

100ml buret column에 먼저 유리섬유를 채운 다음, 유리섬유에서 공기를 빼내기 위하여 유리막대로 가볍게 두들긴 후 증류수에 장시간 현탁시킨 sephadex G-10을 채우고 증류수를 제거하기 위하여 100mM sodium acetate buffer(pH 5.0)를 흘려 100mM sodium acetate buffer(pH 5.0)에 용해된 시료 2ml를 loading하였다. Flow rate는 0.5ml/min로 fraction collector를 이용하여 2.0ml씩 분획하였다. 분획한 시료 80개에 대해 단백질량을 측정하고 활성이 있는 부분을 모아서 gel permeation chromatography 시료로 이용하였다.

④ Gel permeation chromatography

100ml buret column에 먼저 유리섬유를 채운 다음, 유리섬유에서 공기를 빼내기 위하여 유리막대로 가볍게 두들긴 후 증류수에 장시간 현탁시킨 sephadex G-100을 채우고 증류수를 제거하기 위하여 100mM sodium acetate buffer(pH 5.0)를 흘려 탈염 후 농축된 시료 2.0ml를 loading하였다. Flow rate는 0.5ml/min로 fraction collector를 이용하여 2.0ml씩 분획하였다. 분획한 시료 80개에 대해서 단백질량을 측정하고 활성이 있는 부

분을 모아 분석용 효소시료로 사용하였다.

4) 표준검량곡선 작성

100mM sodium acetate buffer(pH 5.0)에 녹인 D-glucosamine을 각각 10~250($\mu\text{g}/\text{ml}$)의 농도가 되게 시험관에 넣고 DNS시약을 섞어서 100℃에서 5분간 증탕시킨 다음, 흐르는 수돗물에 냉각하고 550nm에서 흡광도를 측정하여 당정량용 표준검량곡선으로 사용하였다(Fig. 2).

5) 활성측정

Fig. 3.과 같이 시험관에 기질(1% chitosan) 0.95ml와 효소 0.05ml를 넣고 섞은 다음, 37℃에서 20분간 반응시킨 후 1N-NaOH 0.1ml를 가하여 반응을 중지시키고 10,000rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 얻은 상층액중 0.7ml를 취하여 동량의 DNS시약과 섞고 100℃에서 5분간 증탕한 후 흐르는 수돗물로 실온까지 냉각한 다음 550nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구로는 효소 반응액 대신 완충액만을 넣어 똑같이 실험한 액을 사용하였다. 효소역가 1 unit(U)은 정해진 조건하에서 1분간에 1 μmole 의 D-glucosamine을 유리하는 효소의 양으로 정의하였다.

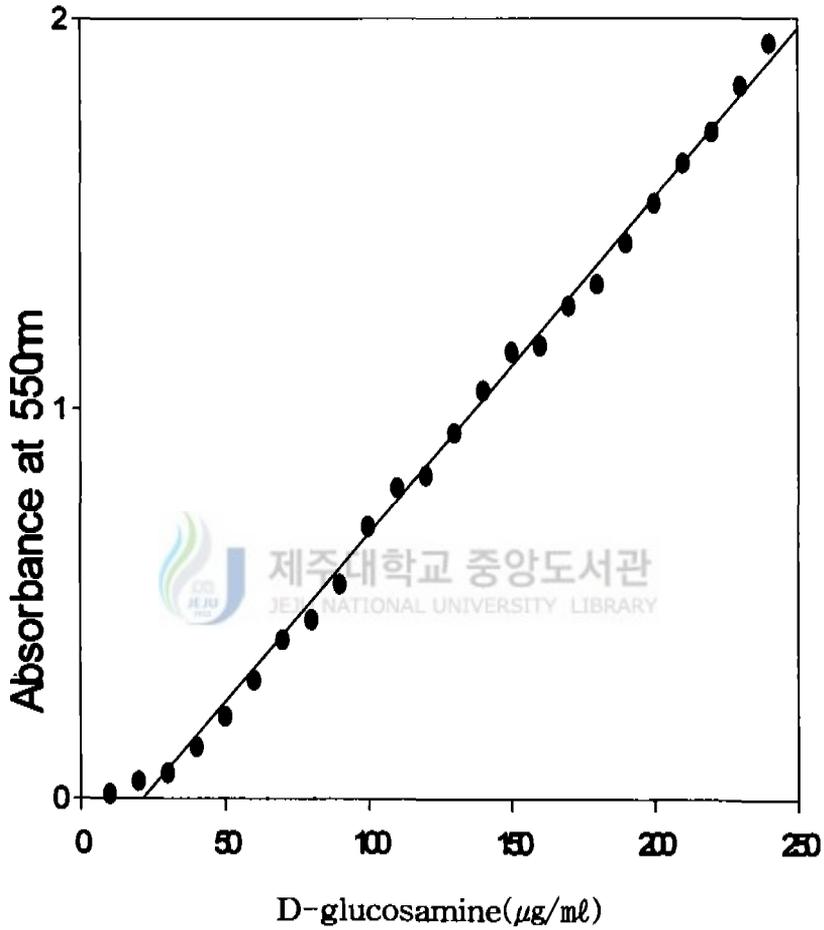
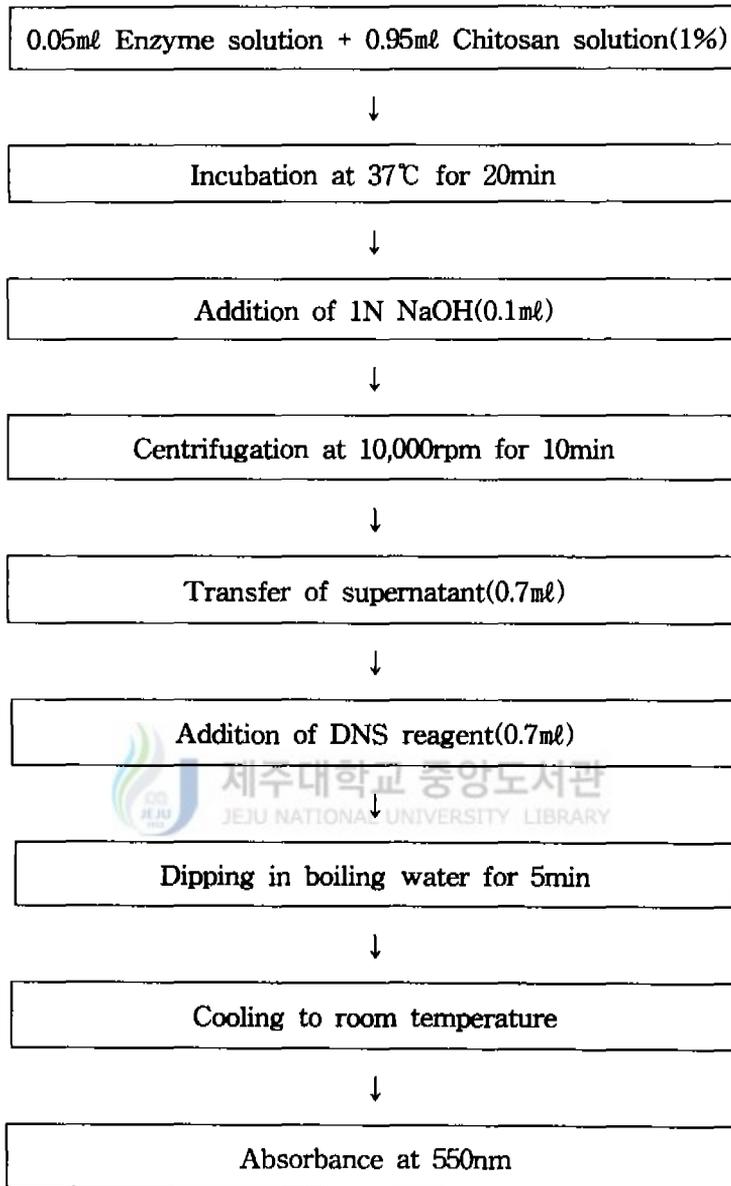


Fig. 2. Calibration curve for D-glucosamine assay by DNS method.



*One unit was defined as enzyme quantity which produced 1μ mole of the sugar determined as glucosamine per minute under the provided condition

Fig. 3. Method for assaying chitosanase activity.

6) 단백질 정량, 비활성(specific activity) 측정 그리고 turnover number

단백질은 대부분 280nm의 자외부에서 최대 흡광도를 나타낸다. 이는 단백질중에 함유된 트립토판, 티로신, 페닐알라닌 등 방향족 아미노산의 작용에 의한다. 동일한 농도라도 단백질의 흡광도는 종류에 따라 다르다. 이것은 단백질마다 함유된 방향족 아미노산의 함량이 다르기 때문이다.

단백질 농도는 다음 식 (1)에 의한 spectrophotometric method로 계산하였다.

$$\text{Protein}(\text{mg/ml}) = 1.45A_{280\text{nm}} - 0.74A_{260\text{nm}} \dots \dots \dots (1)$$

효소활성(U/ml)과 단백질 농도(mg/ml)로부터 비활성(specific activity)(U/mg)과 한 개의 효소분자가 단위시간당 처리하는 기질분자의 수에 해당하는 turnover number도 계산하였다.



7) Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE는 mini eletrophoresis kit(Bio-Rad)를 사용하여 12% polyacrylamide gel로 25mA에서 2시간 전기영동 한 후 0.05% coomassie brilliant blue R-250으로 30분간 염색하였고, destaining은 7% acetic acid 로 12시간 정도 실시하였다.

단백질 분자량의 표준물질로는 SDS-PAGE molecular weight standards(low range)를 사용하였으며, phosphorylase b(97,400Da), serum albumin(66,200Da), ovalbumin(45,000Da), carbonic anhydrase(31,000Da),

trypsin inhibitor(21,500Da) 그리고 lysozyme(14,400Da)을 함유한 것이다.

8) Chitosanase 활성염색

SDS-PAGE gel 상에서의 chitosanase 활성염색은 다음과 같은 방법으로 실시하였다. 먼저 SDS-PAGE를 실시한 후 gel을 1% Triton X-100이 포함된 완충용액(100mM sodium acetate buffer, pH 5.0)에 담그어 교반하면서 SDS를 제거하였다. 그 후 100mM sodium acetate buffer (pH 5.0)에 0.02% chitosan과 1.5% agarose를 용해시켜 만든 agarose gel위에 SDS-PAGE gel을 overlay하여 37°C에서 1시간 동안 반응시키고 agarose gel을 0.1% congo red로 1시간 정도 염색시킨 다음, 증류수로 과잉의 잔존 congo red를 세척하여 chitosanase 활성 band를 확인하였다.



9) 한외여과막을 이용한 chitosan oligosaccharide 생산

한외여과장치는 Pall Filtron corporation(model 7529-10, USA)사의 제품을 사용하였고, membrane은 NMWL 1K 카세트를 사용하였다. 0.5% chitosan(100mM sodium acetate buffer, pH 4.5) 1ℓ를 효소 0.8ml(9.7 U/mg)와 섞자마자 한외여과장치를 가동시켰다. 반응온도 20°C에서 1시간 20분동안 반응시켰고, 이때 한외여과막을 통과한 생성물의 양은 590ml이었다. 생성물을 HPTLC(high performance thin layer chromatography)로 분석하였다.

10) Thin layer chromatography(TLC)

1% chitosan(pH 4.5) 0.95ml와 효소 0.05ml를 시험관에 넣어 37°C에서 5분, 10분, 15분, 20분, 25분, 30분 그리고 1시간씩 각각 반응시킨 후 각각의 키토산 분해산물을 silica gel plate(Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck, Germany)에 spotting한 후, n-propanol : H₂O : ethylacetate : 암모니아수 (6:3:3:1(V/V))를 용매로 사용하여 전개시켰다. 1차전개 후 TLC plate를 상온에서 말린 다음 다시 동일한 전개용매로 2차 전개시켰다. 건조된 TLC plate 표면에 에탄올에 녹인 0.2% ninhydrin을 분무한 뒤, 110°C에서 10분간 가열 건조시켜 발색된 spot를 확인하였다.

11) High performance thin layer chromatography(HPTLC)



HPTLC는 Camag사의 Linomat IV(Swiss)를 사용하였으며, 한외여과막을 통과한 생성물을 silica gel plate(Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck, Germany)에 질소가스를 3ml/sec의 속도로 넣어주면서 spotting한 후, 전개용매로 isopropyl alcohol : acetic acid : pyridine : water의 12 : 5 : 5 : 8 혼합용액을 사용하여 전개시켰다. 전개가 끝난 후 아세톤에 녹인 0.25% ninhydrin에 적셔 건조한 뒤 plate상에서 분리된 각각의 성분에 대하여 스펙트럼의 가시광선 영역과 자외선 영역에서 일정한 파장의 빛으로 chromatogram을 조사함으로써 흡광도와 형광을 측정하여 정량분석을 실시하였다.

12) 정제된 효소의 특성

① 기준 반응시간의 결정

효소를 0.05ml씩 취하여 시험관에 넣고, 기질 0.95ml를 가하여 잘 혼합한 후 37℃에서 각각 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60분간씩 반응시켜 생성된 D-glucosamine의 양을 정량함으로써 활성측정에 적합한 기준 반응시간을 결정하였다.

② 최적 반응온도

효소를 0.05ml씩 취하여 시험관에 넣고, 기질 0.95ml를 가하여 잘 혼합한 후 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60℃에서 각각 20분간 반응시켜 생성된 D-glucosamine의 양을 정량하여 반응온도별 효소의 활성을 비교하였다.



③ 열 안전성

효소를 0.05ml씩 취하여 시험관에 넣고, 25~60℃(5℃ 간격)의 수욕상에서 1시간 동안 담갔다 꺼낸 다음 기질 0.95ml를 섞고 37℃에서 20분간 반응시켜 전처리 온도별로 생성된 D-glucosamine의 양을 정량하였다.

④ pH 안전성

각 pH의 buffer 0.95ml를 개별 시험관에 취하고 효소를 각 0.05ml씩 첨가하여 vortexer로 잘 혼합한 후 실온(25℃)에서 1시간 동안 방치했다. 그 중 0.05ml씩 취하여 기질 0.95ml와 섞어서 37℃에서 20분간 반응시켰다. 생성된 D-glucosamine을 정량하여 전처리 pH별로 남아있는 효소의 활성

을 측정하였다.

pH 3은 100mM glycine-HCl buffer, pH 4는 100mM citrate-phosphate buffer, pH 5는 100mM acetate buffer, pH 6에서 7은 100mM phosphate buffer, pH 8에서 9는 100mM Tris-HCl buffer, pH 10에서 11은 100mM carbonate-bicarbonate buffer를 각각 사용하였다.

13) Chitosan과 γ -PGA 혼합필름 제조

① 필름제조

Chitosan 필름은 10×20cm의 유리판에 1% chitosan 용액 10ml를 골고루 퍼지게 한 다음, 50℃에서 습기가 없을 때까지 건조하여 시료로 사용하였다. 시료는 실내에서 꺼낼 경우 금방 수분을 흡수하기 때문에 필요시마다 곧 바로 만들어 사용하였고, 부득이한 경우는 desiccator안에서 보관하면서 사용하였다.

Chitosan과 γ -PGA 혼합필름은 서로 섞이게 되면 즉시 침전을 형성하는데 여기에 증류수를 가하여 여러번 세척한 다음 침전물을 유리판 두 개로 압착하여 물기를 뺀 후 chitosan 필름과 마찬가지로 방법으로 필름을 제조하였다.

② 인장강도측정

필름의 인장강도(tensile strength, TS)는 Texture analyser TA-XT2 (Haslemere Surrey GU27, England)로 측정하였다. 이때 필름의 크기는 15(W)×50(L)mm 이었고, 3mm의 grip을 사용하여 5mm의 grip 간격에서 10

mm/sec의 speed로 인장강도를 5회 반복 실험한 후 평균을 구하였다. Chitosan과 γ -PGA 의 혼합필름과 비교하기 위하여 일상생활에서 사용하는 일반 비닐(polyethylene film B)과 식품 포장에 사용하는 비닐랩(polyethylene film A) 그리고 chitosan 필름의 인장강도도 구하였다.

③ 흡습성

Chitosan 필름과 chitosan과 γ -PGA 의 혼합필름을 만든 후 즉시 무게를 측정하였고, 실온에 방치 후 1시간마다 무게를 측정하여 무게가 더 이상 증가하지 않을 때까지, 5회 반복 측정한 후, 무게의 증가분에 대한 평균을 구하였다.

④ 용해성

Chitosan 필름과 chitosan과 γ -PGA 의 혼합필름을 만든 후 무게를 측정하였고, 증류수에 1시간 동안 현탁시켰다가 꺼내어 건조기에서 50℃에서 물기가 없을 때까지 건조한 다음, 무게를 측정하여 무게 감소분으로 용해성을 구하였고, 5회 반복 측정한 후 평균을 구하였다.

⑤ 생분해성

Chitosan과 γ -PGA 혼합필름이 자연상태에서 생분해될 수 있는지 가능성을 조사하기 위하여 혼합필름을 100mM sodium acetate buffer(pH 5.0)에 현탁한 후 키토산 분해효소를 섞고, 반응시간의 경과에 따른 환원당 D-glucosamine 생성량을 DNS법으로 정량하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 효소액의 정제

세균의 무세포 배양액을 한외여과기로 여과하여 분자량 1,000dalton 이하의 물질을 제거하고, 시료를 농축하였다. 이어서 90% 포화수준에서 ammonium sulfate로 염석시켜 10,000rpm에서 30분간 원심분리하고 침전물을 분리하였다. 시료중의 염을 제거하기 위해 분리된 침전물을 100mM sodium acetate buffer(pH 5.0)에 용해시킨 후 gel permeation chromatography(sephadex G-10)를 이용하여 시료를 분획하였다. 분획한 시료 80개에 대한 280nm에서의 흡광도를 측정하여 2개의 단백질 peak를 얻었다(Fig. 4). 그중 1개의 peak에서 활성이 나타나 이 부분(fraction No. 32~42)을 모아서 gel permeation chromatography(sephadex G-100)로 분획하였다. 분획한 시료 80개에 대한 280nm에서의 흡광도를 측정하여 6개의 단백질 peak를 얻었다(Fig. 5). 그중 1개의 peak에서 활성이 나타나 이 부분(fraction No. 40~46)을 모아서 진공동결 건조시켜 본 실험의 시료로 사용하였다.

정제된 효소를 사용하기 위해서 소량의 100mM acetate buffer(pH 5.0)에 용해시켰다. 효소액중의 단백질 농도를 spectrophotometric method로 계산한 결과, 0.1mg/ml이었다.

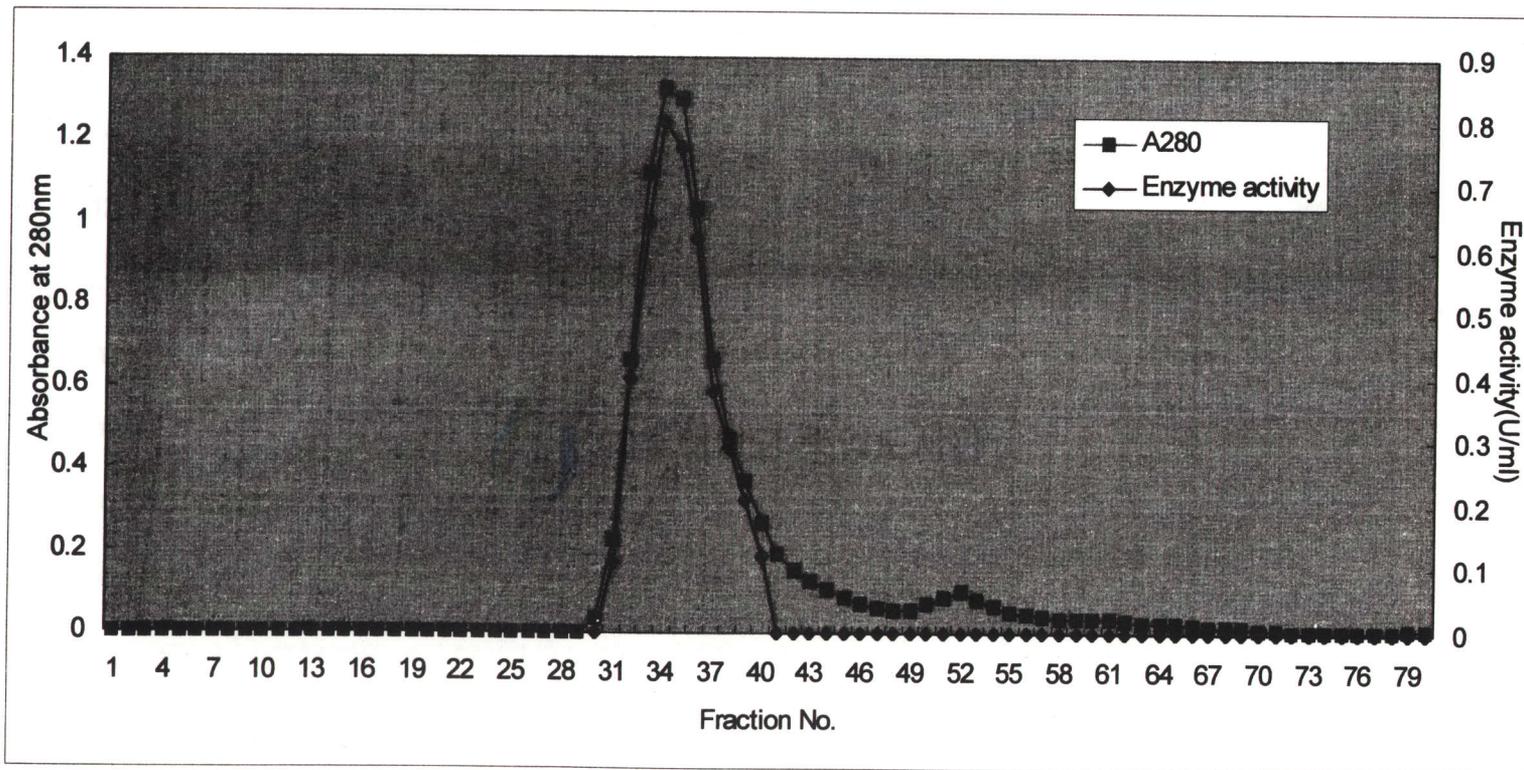


Fig. 4. Gel permeation chromatogram of chitosanase on sephadex G-10.

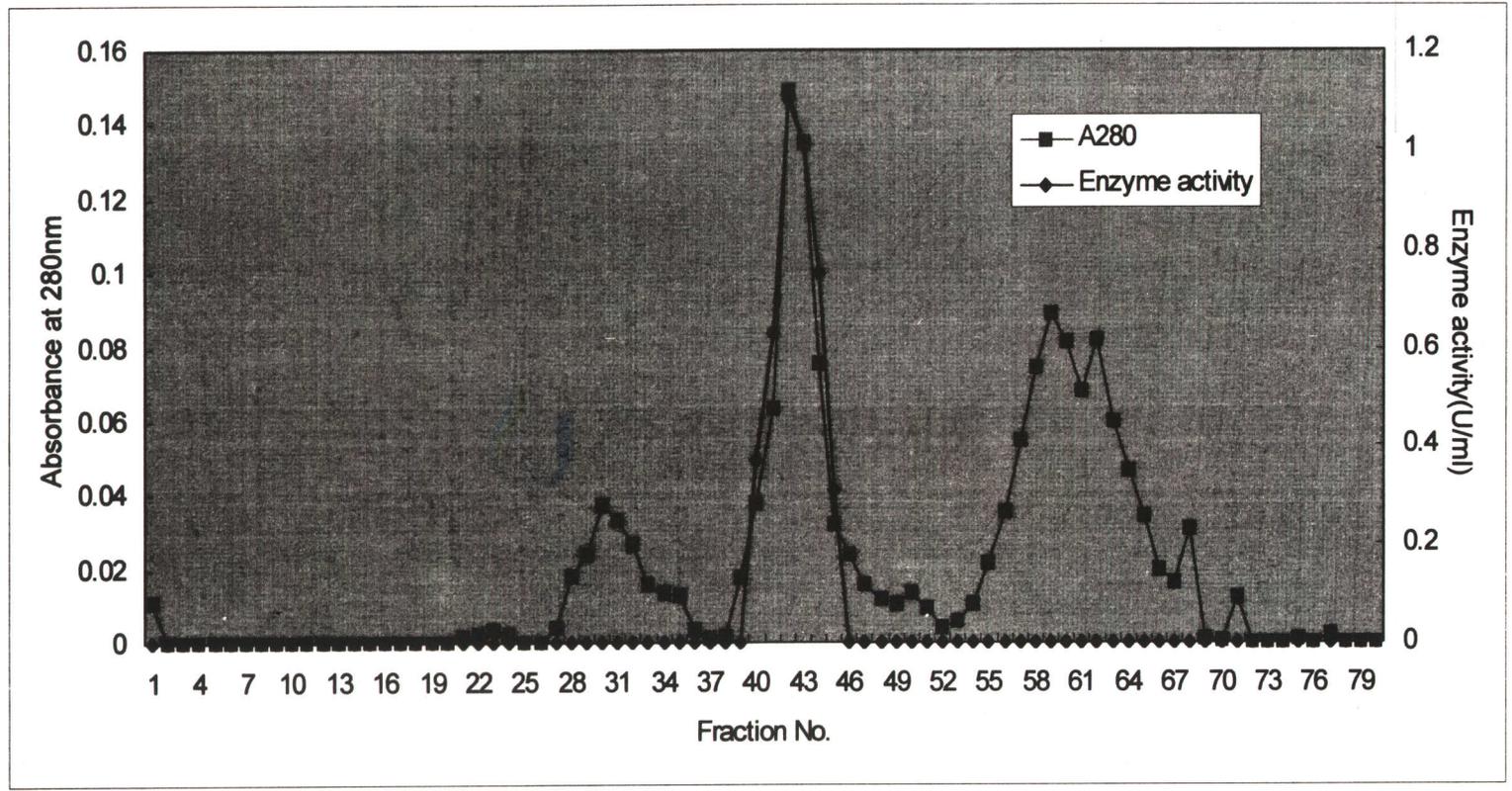


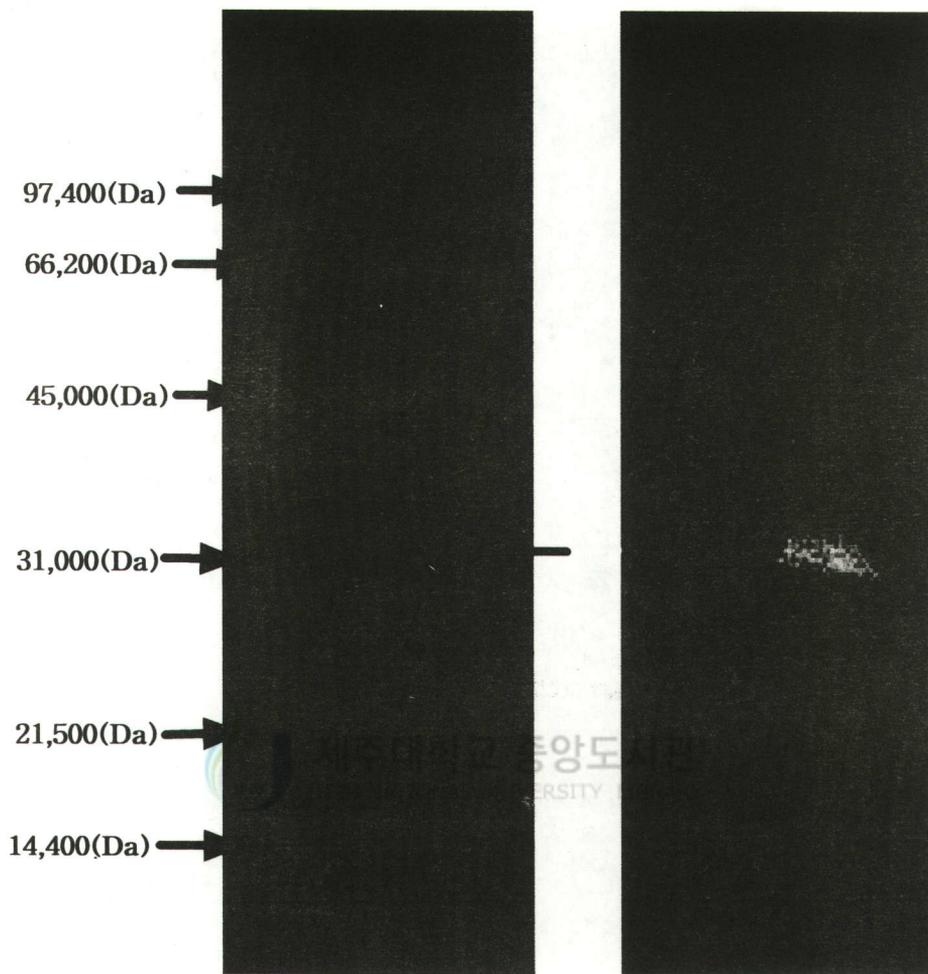
Fig. 5. Gel permeation chromatogram of chitosanase on sephadex G-100.

2. 비활성(specific activity)과 turnover number

정제전 효소의 비활성은 5.8 U/mg이었고, 정제된 효소의 비활성은 9.7 U/mg이었다. 정제과정을 통하여 약 2배 가까운 활성의 증가를 나타냈다. 이 (1998)는 정제전 효소의 비활성은 6.0 U/mg이었고, 정제된 효소의 비활성은 32.8 U/mg이라고 보고하였는데 이에 비해 비활성은 떨어짐을 알 수 있었다. 한편, 한 개의 효소분자가 단위시간당 처리하는 기질분자의 수에 해당하는 turnover number는 5/sec이었다.

3. SDS-PAGE 분석

효소의 정제여부를 확인하기 위하여 SDS-PAGE로 분석한 결과 효소를 정제하기 전에는 주요밴드 한 개와 미량의 여타 단백질이 나타났는데 (Fig. 6A), 효소의 활성염색을 통하여 주요밴드가 chitosanase에 해당되며, 본 세균은 1종의 chitosanase만을 생산함을 알 수 있었다(Fig. 6B). 따라서 본 효소의 활성단위는 한 개의 subunit로 이루어진 단백질일 가능성이 높은 것으로 생각된다. 그리고 정제된 효소의 분자량은 약 30,000dalton 이었다(Fig. 7과 8).



Standard Chitosanase

A. Protein staining

B. Activity staining

Fig. 6. SDS-PAGE of chitosanase before purification.

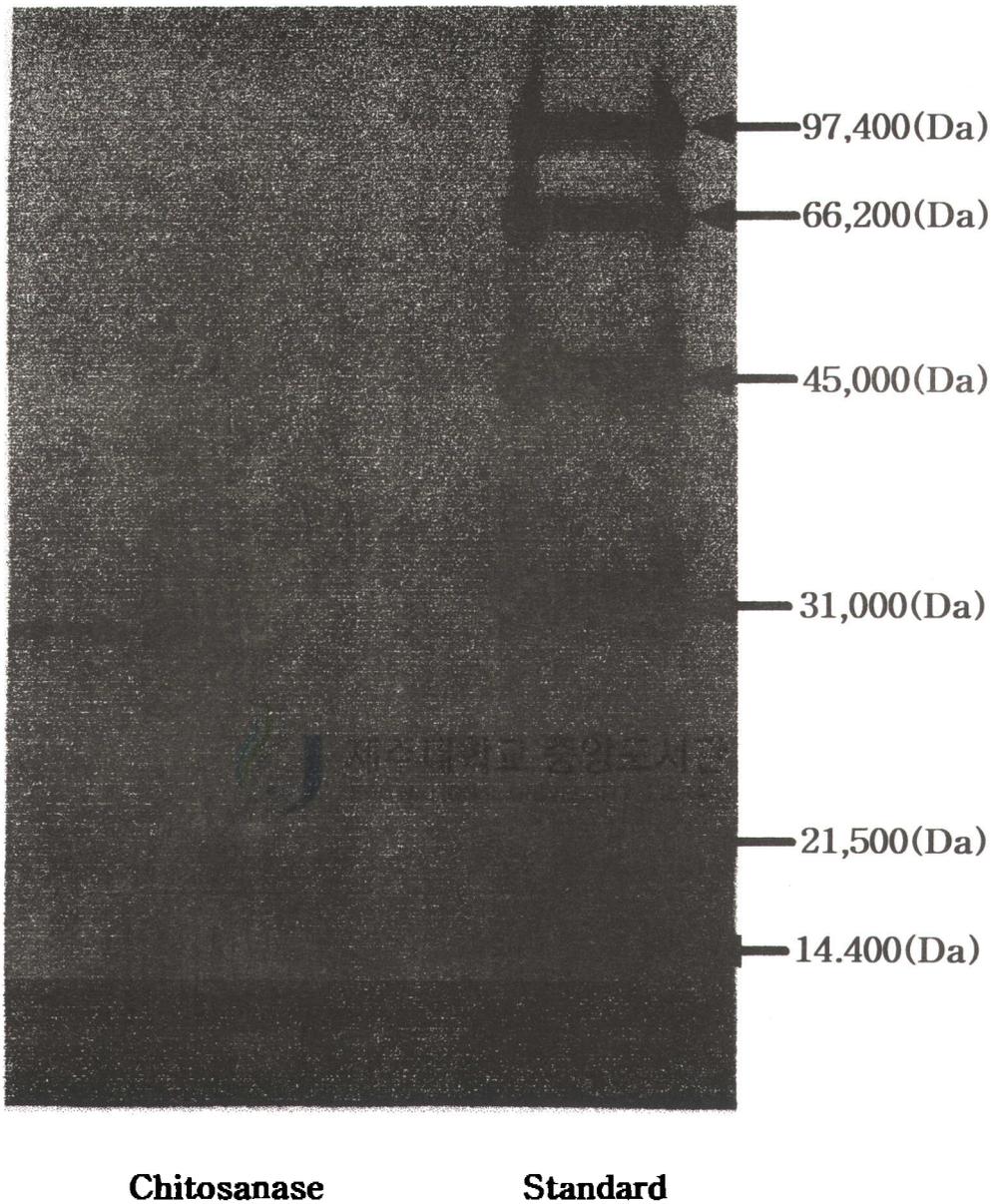


Fig. 7. SDS-PAGE of chitosanase after purification.

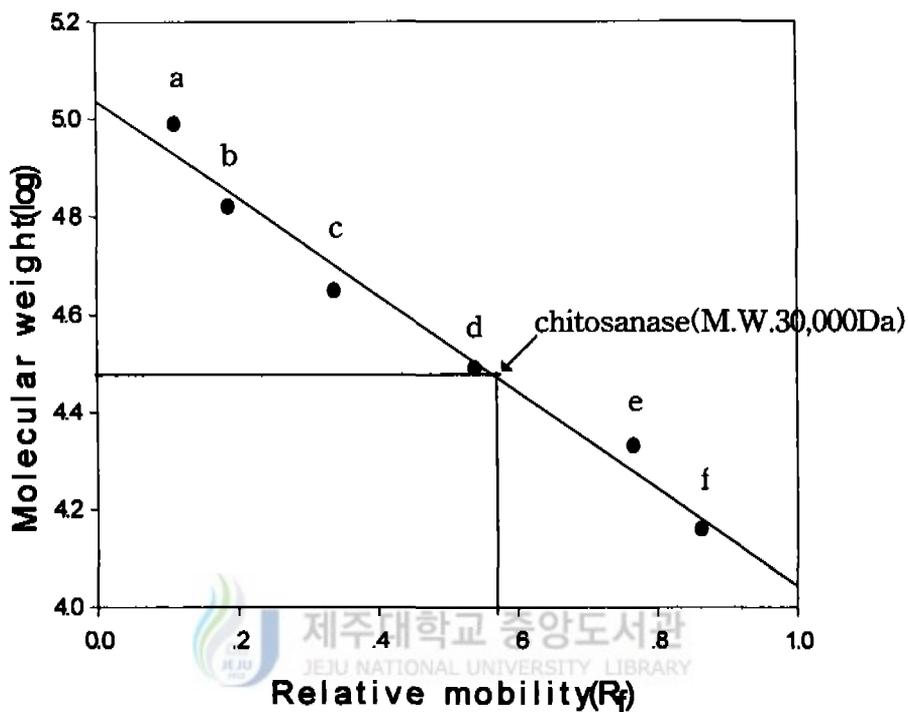


Fig. 8. Molecular weight determination of chitosanase.

- a. Phosphorylase b (97,400Da)
- b. Serum albumin (66,200Da)
- c. Ovalbumin (45,000Da)
- d. Carbonic anhydrase (31,000Da)
- e. Trypsin inhibitor (21,500Da)
- f. Lysozyme (14,400Da)

4. Thin layer chromatography(TLC)

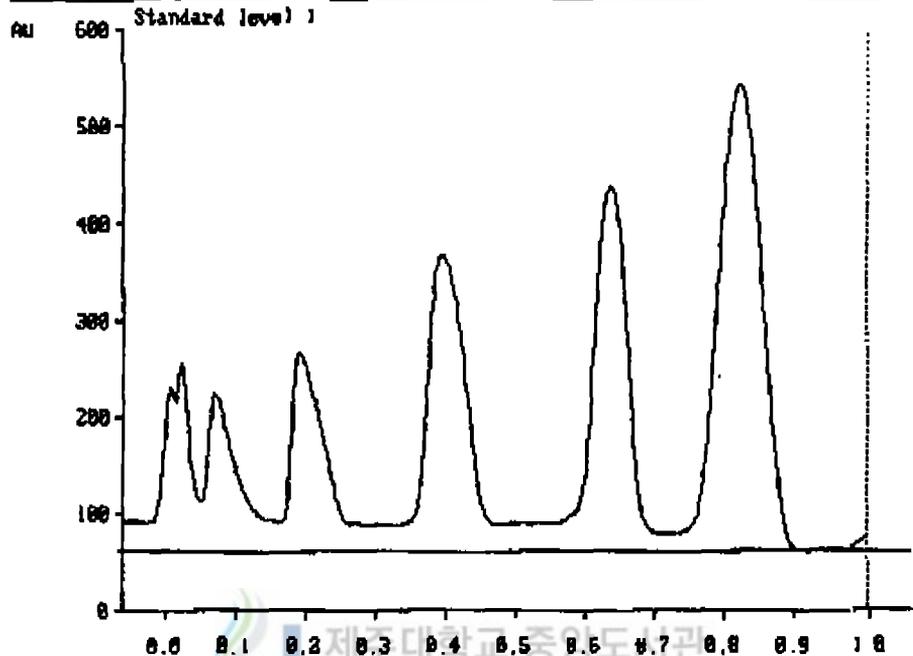
1% chitosan(pH 4.5) 0.95ml와 효소 0.05ml를 시험관에 넣어 37℃에서 5분, 10분, 15분, 20분, 25분, 30분 그리고 1시간씩 각각 반응시킨 후 각각의 키토산 분해산물을 silica gel plate에 spotting한 후, 전개용매로 전개시켰다. 1차전개 후 TLC plate를 상온에서 말린 다음, 다시 동일한 전개용매로 2차 전개시킨 후 건조된 TLC plate 표면에 에탄올에 녹인 0.2% ninhydrin을 분무한 뒤 110℃에서 10분간 가열 건조시켜 발색된 spot를 확인한 결과, 반응시간에 관계없이 주로 이량체가 나타났고, 단량체는 확인되지 않았다.

5. Chitosan oligosaccharides의 생산



D-glucosamine 분자량 표준물질로 단량체에서 칠량체까지를 HPTLC로 분석한 결과는 Fig. 9와 같다. 5% 수용액의 표준물질은 단량체에서부터 칠량체까지의 peak가 명확히 구분될 정도로 분리되었다. Fig. 10은 0.5% chitosan 1 l 에 chitosanase 0.8ml(0.97 U/ml)를 첨가하여 20℃에서 1시간 20분동안 반응시키면서 한외여과막(NMWL, 1K)을 통과한 생성물을 HPTLC로 분석한 결과이다. 이 결과를 표준물질과 비교하여 볼 때, 이량체에서 육량체까지의 과당류(oligomer)가 생성되었으며 효소분해 반응의 분해산물로 단량체를 생산하지 않는 것으로 나타나 한 (1996)과 이 (1997b)의 보고와는 다른 결과를 나타내었다. 그리고 최소기질 분해 단위는 삼량체인 것으로 생각된다. 한편, chitosan을 장시간 효소로 분해시켰을

SPECTRUM : N: KPB_SSSS Hanpung-bio Co.LTD. 8/OCT/1999 17 07
 Method Scan Calibration Spectrum Data End HPLC



Wavelength: 490 nm [91.0 AU, -0.06 RF, 40Hz] [RF]
 Track: 1, noise level: 0.183AU - raw data file: KPB_SSSS
 U9.84 S-N:0401A000 CANAG SOFTWARE (c) 1996 SCANNER 3: 031004

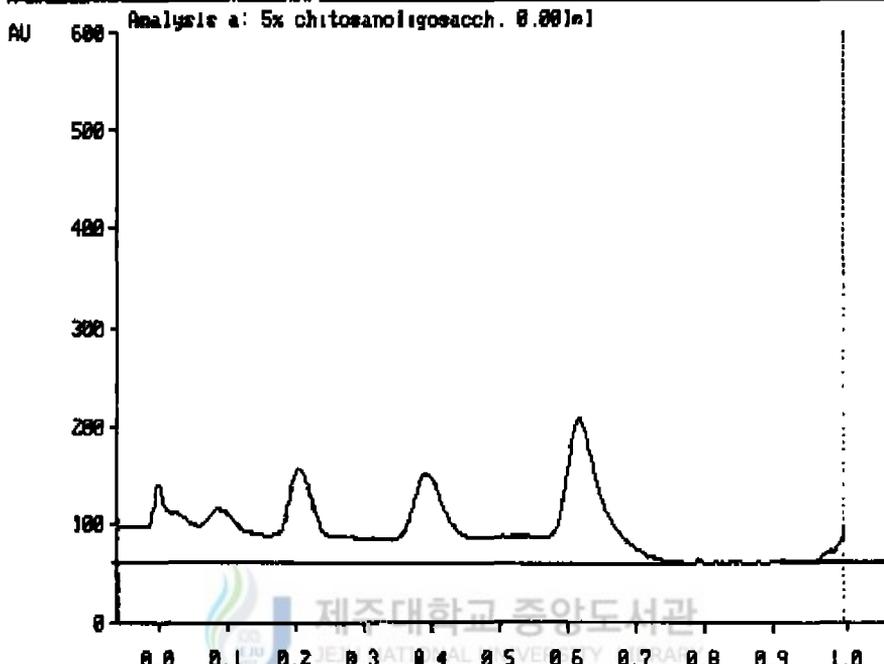
Track 1, Standard level 1

Peak #	start		max			end		area	
	Rf	H	Rf	H	(%)	Rf	H	F	(%)
1	-0.02	2.5	0.01	140.7	7.95	0.01	126.8	2028.4	2.73
2	0.01	28.8	0.02	169.3	9.57	0.05	26.0	2761.9	3.72
3	0.05	26.0	0.07	137.7	7.78	0.15	8.5	4644.8	6.25
4	0.16	8.0	0.19	183.7	10.35	0.26	8.5	7020.1	9.45
5	0.33	10.1	0.39	291.6	16.48	0.47	14.0	13988.2	18.83
6	0.56	19.1	0.63	768.8	20.55	0.71	12.5	16394.3	22.06
7	0.72	12.7	0.82	477.2	26.98	0.92	0.0	27465.5	36.96

Total height = 1768.8 total area = 74303.7

Fig. 9. Analysis of standard chitosan oligosaccharides by HPTLC.

SPECTRUM .N: KPB_SSSS Jungung-bio Co.LTD. B/OCT/1999 17:07
 Method Scan Calibration Spectrum Date End HELP



Wavelength: 490 nm (96.8 AU, -0.06 Rf, HOME) CRF3
 Track: 2, noise level: 0.103AU, raw data file: KPB_SSSS
 U4.04 S/N:0401A888 CANON SOFTWARE (c) 1996 SCANNER 3: 831884

Track 2, Analysis a: 5% chitosan oligosacch. 0.001ml

Peak #	start		max			end		area	
	Rf	H	Rf	H	(%)	Rf	H	F	(%)
1	-0.02	2.0	-0.00	47.8	13.76	0.06	6.2	1125.4	8.07
2	0.06	5.2	0.09	29.9	7.20	0.14	5.4	891.2	5.39
3	0.16	1.4	0.20	72.0	19.99	0.25	5.0	2167.8	15.54
4	0.34	4.8	0.39	75.4	20.93	0.45	13.7	3191.7	22.88
5	0.57	15.9	0.61	139.2	38.63	0.73	1.7	6575.5	47.13
Total height -			360.3			total area -			13951.6

Fig. 10. Analysis of enzymatic degradation products of chitosan by HPTLC.

때는 이량체만 나타나서, chitosan은 최종적으로 이량체 단위까지 완전히 분해되는 것으로 나타났다. 따라서, chitosanoligosaccharides의 생산에는 한외여과막을 이용한 분해반응이 효과적임을 알 수 있었다.

6. 효소활성의 온도 의존성

정제된 chitosanase를 사용하여 1% chitosan 0.95ml에 효소 0.05ml를 가한 다음, 37℃에서 각각 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60분간 반응시킨 결과 20분만에 최대활성에 도달하였다. 이 결과로 본 연구에서의 최적반응 시간은 20분으로 정하였다. Fig. 11은 반응시 relative activity(%)가 가장 높은 경우를 100%로 하여 상대적인 활성값으로 비교한 것이다.

① 최적 반응온도



정제된 chitosanase를 사용하여 25~60℃(5℃ 간격)에서 20분간 반응시켜 효소의 활성을 비교한 결과 Fig. 12에서와 같이 최적반응온도는 40℃이었으며, 45℃ 이상에서는 그 활성이 점차 감소되었다. 이 (1995)와 이 (1994)는 최적반응 온도가 60℃라고 보고하였으며, 이 (1997b)는 최적온도가 50℃라고 보고한바 있다.

② 열 안정성

정제된 효소를 25~60℃(5℃ 간격)에서 1시간 동안 전처리한 후 남아있는 효소의 활성을 측정하였을 때, 45℃까지는 활성을 유지하다가 50℃에서부터 활성이 감소하기 시작하여 60℃에서는 활성이 나타나지 않았다

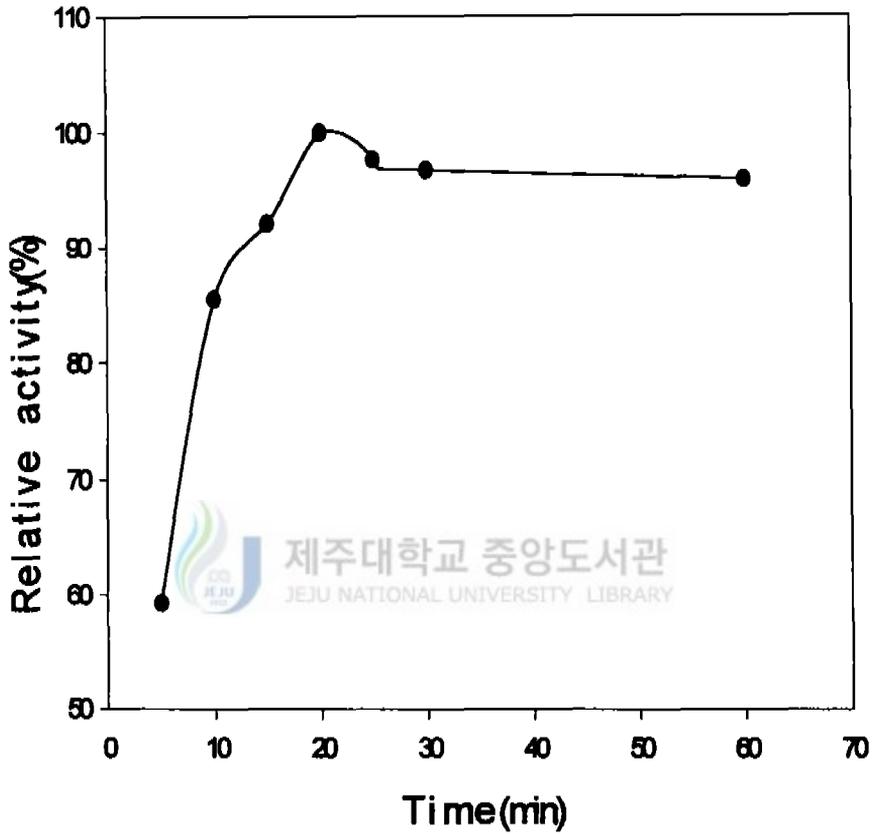


Fig. 11. Effect of reaction time on chitosanase activity.

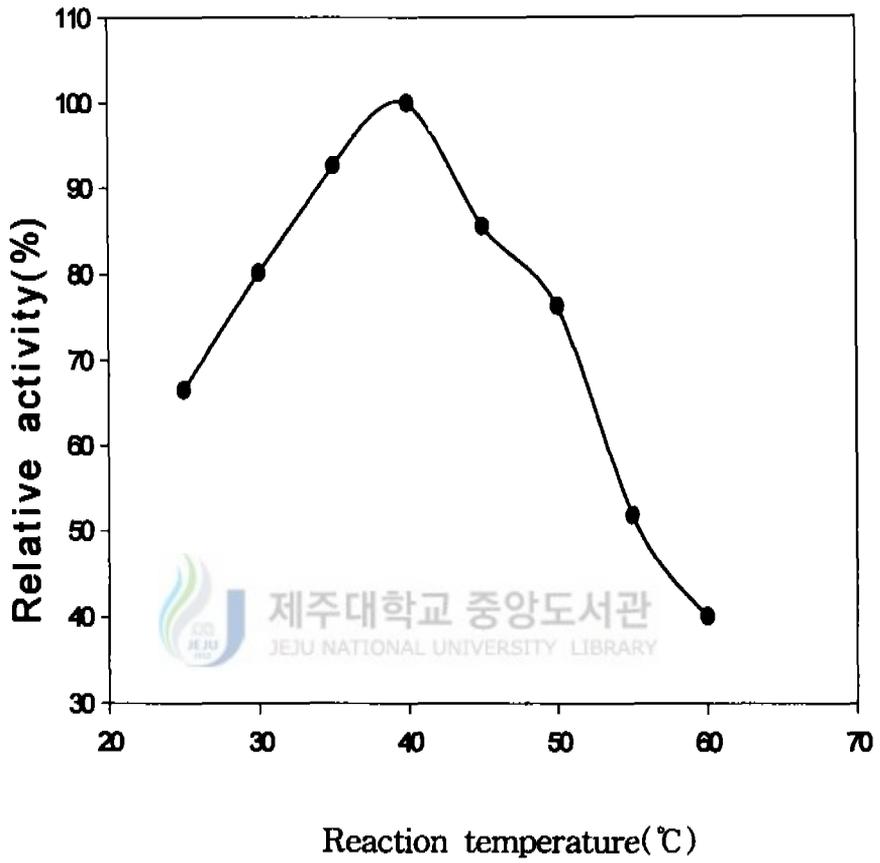


Fig. 12. Effect of reaction temperature on chitosanase activity.

Fig. 13은 효소의 열안전성을 실험한 결과이다. 위의 결과를 통하여 본 효소는 내열성이 비교적 약함을 알 수 있었다.

7. 효소활성의 pH의존성

정제된 chitosanase를 사용하여 pH 3.0~11.0까지의 각 buffer에서 1시간동안 전처리한 후 남아있는 효소의 활성을 측정하였을 때 Fig. 14에서와 같이 pH 5~9사이에서는 pH의 영향을 거의 받지 않았으며 pH 4이하에서나 pH 10이상에서는 불안정하여 효소의 활성이 처음 활성에 비해 80% 이상 감소하였으며, 대체적으로 염기성보다 산성쪽에서 효소가 안정함을 나타내었다.



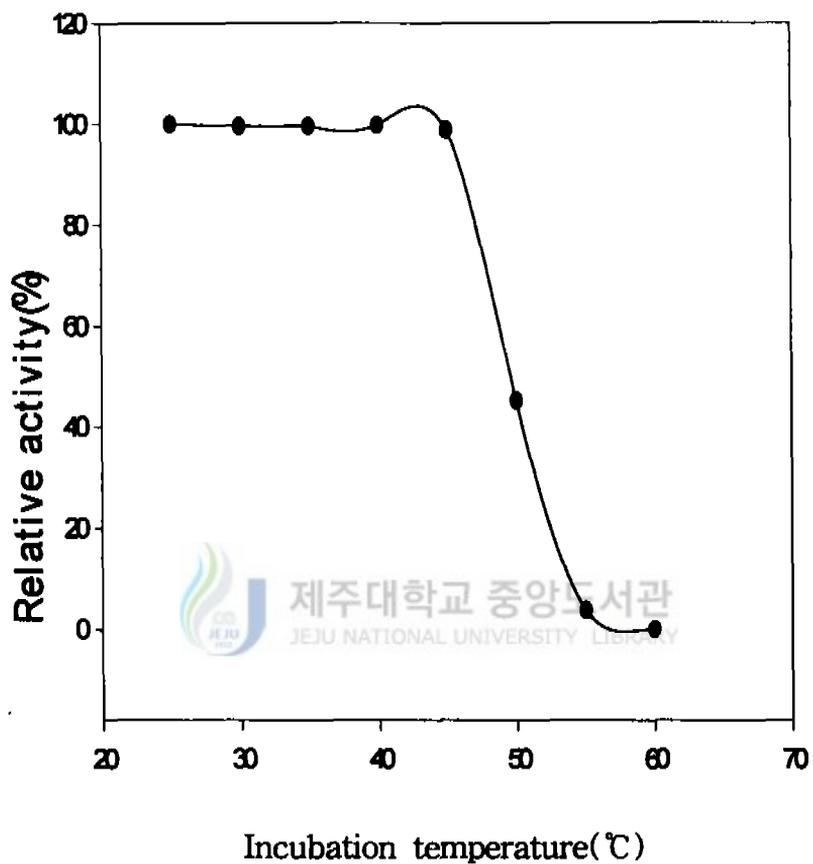


Fig. 13. Stability of chitosanase at various incubation temperatures.

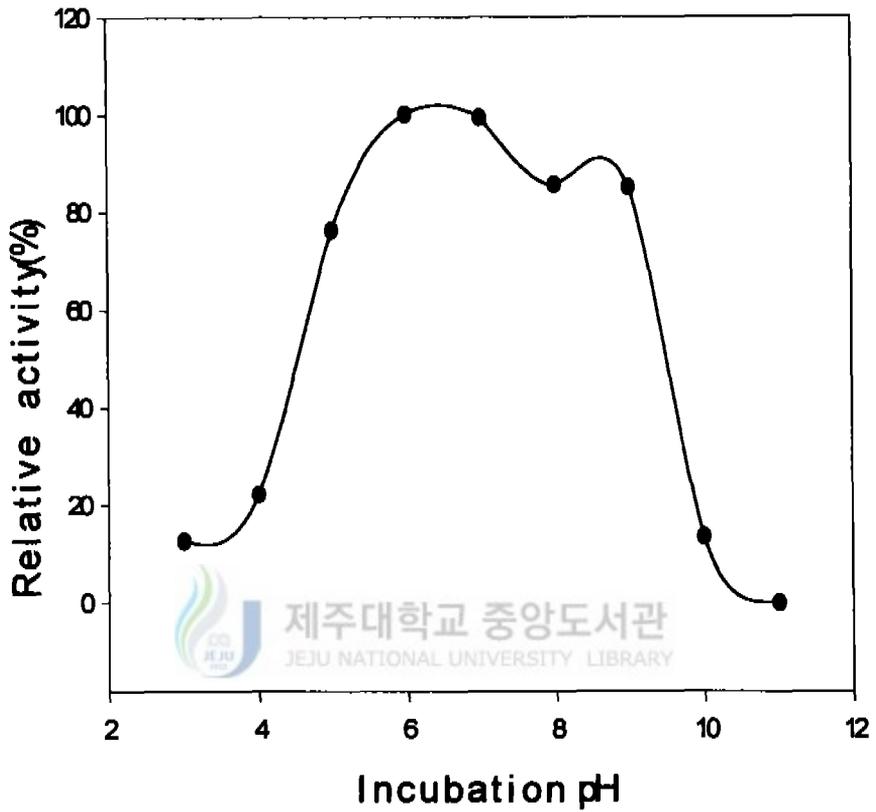


Fig. 14. Stability of chitosanase at various incubation pH.

8. Chitosan과 γ -PGA 혼합필름 제조

① 인장강도

일반비닐(polyethylene film B), 비닐랩(polyethylene film A), chitosan 필름(chitosan homopolymer), chitosan과 γ -PGA 혼합필름(γ -PGA-blended chitosan heteropolymer)을 비교하기 위하여 인장강도를 측정하였다. 우선 grip이 들어간 길이를 보면 비닐랩이 4.91mm로 가장 많이 들어갔으며 다음으로 일반비닐, chitosan 필름 순이었으며, chitosan과 γ -PGA 혼합필름이 가장 적게 들어갔다(Fig. 15). 비닐랩은 특유의 늘어나는 성질 때문에 grip이 가장 많이 들어간 것으로 생각되고, chitosan과 γ -PGA 혼합필름은 플라스틱처럼 딱딱하여 늘어나지 않고 grip이 들어가는 순간 부서지는 경향을 나타내었다. 신장에 소요되는 힘은 들어간 길이와는 반대 경향으로 비닐랩이 가장 적었고, 일반비닐, chitosan 필름 순이었으며 chitosan과 γ -PGA 혼합필름에 가장 많은 힘이 소요되었다(Fig. 16). 비닐랩은 늘어나면서 비닐랩이 받는 힘이 감소하였고 chitosan과 γ -PGA 혼합필름은 늘어나는 성질이 적어 처음 많은 힘을 많으면서 필름에 구멍이 생김과 동시에 필름이 깨지는 현상이 나타났다. Ryu 등(1999)에 의하면 chitosan 필름이 기존 제품과 같은 물리적 성질을 만족시키지 못하여 합성 고분자와의 블랜드 방법에 의한 연구가 시도되고 있다고 하였는데, 천연 고분자인 chitosan과 γ -PGA 혼합필름은 기존 제품에 비해 3배 정도의 인장강도를 나타내어 새로운 고분자 소재로서 앞으로 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

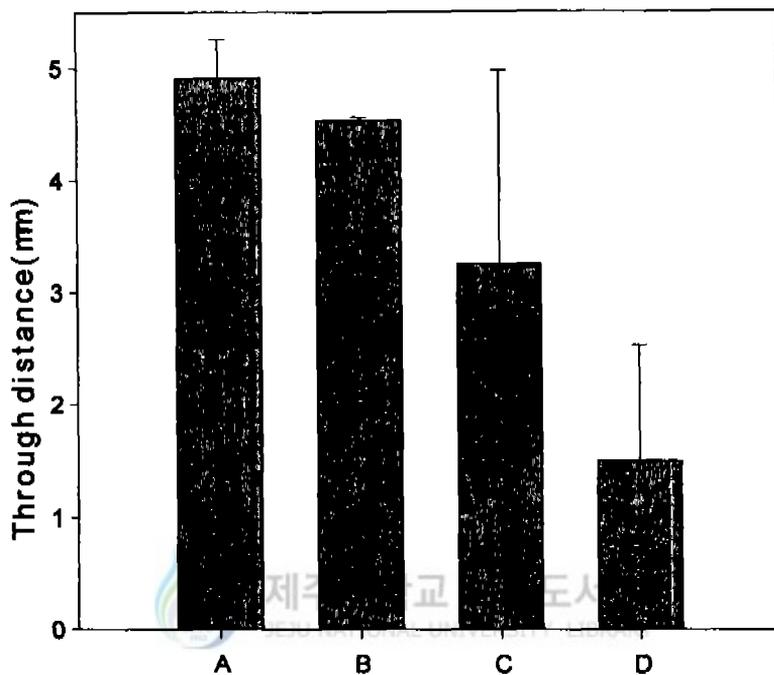


Fig. 15. Through distance of some polymeric materials.

- A. Commercial polyethylene film A
- B. Commercial polyethylene film B
- C. Chitosan homopolymer
- D. γ -PGA-blended chitosan heteropolymer

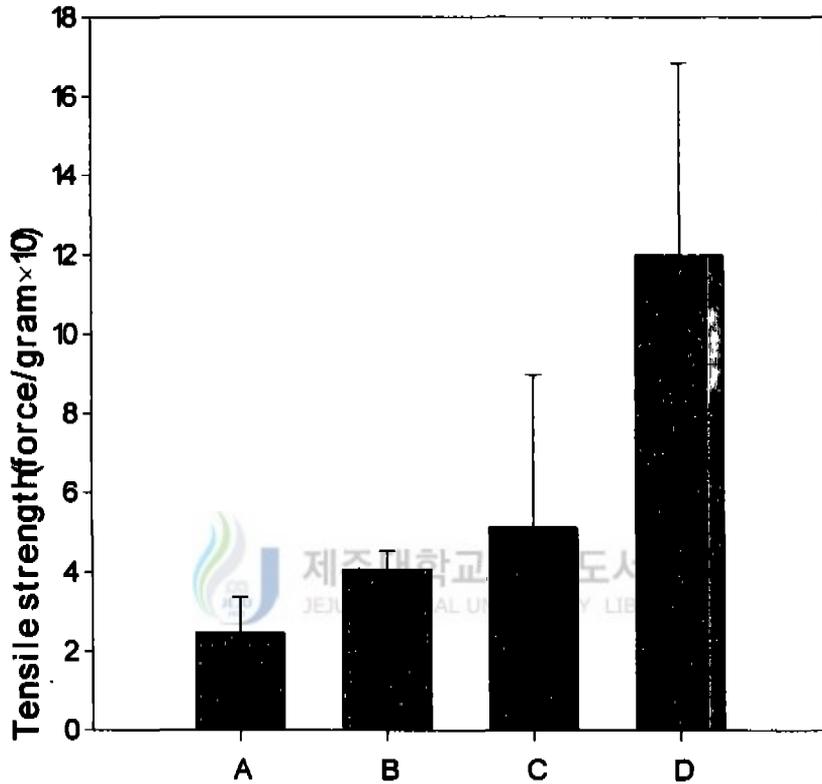


Fig. 16. Tensile strength of some polymeric materials.

- A. Commercial polyethylene film A
- B. Commercial polyethylene film B
- C. Chitosan homopolymer
- D. γ -PGA-blended chitosan heteropolymer

② 용해성

Chitosan 필름과 chitosan과 γ -PGA 혼합필름의 증류수에 대한 용해성을 조사한 결과, 증류수 침지 1시간만에 chitosan 필름은 38.15%의 무게 감소를 나타내었고, chitosan과 γ -PGA 혼합필름은 5.3%의 무게 감소를 나타내었다(Fig. 17). 이는 chitosan 단일필름은 물에 잘 용해되나, 혼합필름은 물에 잘 용해되지 않음을 보여주는 결과로 판단된다.

③ 흡습성

Chitosan 필름과 chitosan과 γ -PGA 혼합필름이 상온에서 대기중의 수분을 흡수하여 증가되는 무게의 변화를 측정된 결과, chitosan 필름이 44.46%의 무게 증가를 나타내었고, chitosan과 γ -PGA 혼합필름이 18.41%의 무게 증가를 나타내었다(Fig. 18). Chitosan 필름을 제조하여 대기중에 방치할 경우 금방 수분을 흡수하여 필름의 표면에 물방울이 맺혀 있는 것을 볼 수 있었는데, 반하여 chitosan과 γ -PGA 혼합필름은 장시간 대기중에 방치하여도 물방울이 맺혀있는 현상을 볼 수 없었다. 이를 통하여 chitosan과 γ -PGA 혼합필름이 용해성과 흡습성뿐만 아니라 인장 강도에 있어서도 기존의 chitosan 필름과 현저히 차이를 나타내어 새로운 천연고분자 소재로 연구할 가치가 있다고 생각된다.

④ 생분해성

Chitosan과 γ -PGA의 혼합필름에 키토산 분해효소를 넣어 반응시킨 후, 생성된 환원당 D-glucosmine을 DNS법으로 정량한 결과, 처음부터 1시간 30분까지는 분해가 안되었으나 3시간 이후부터 분해가되기 시작하여 시간이 지날수록 계속 분해됨을 알 수 있었다(Fig. 19).

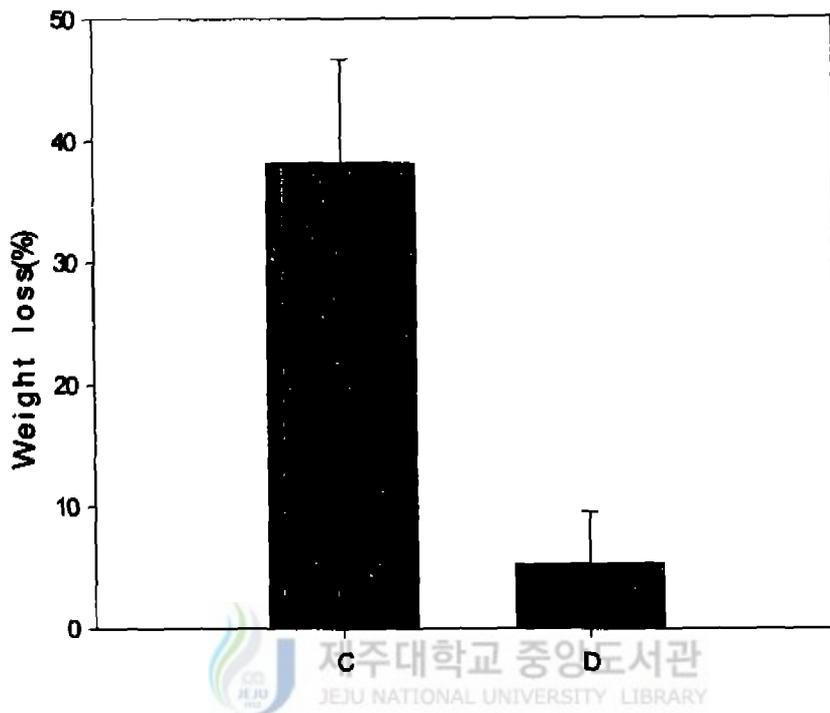


Fig. 17. Weight loss of chitosan-based polymers by solubilization in distilled water.

C. Chitosan homopolymer

D. γ -PGA-blended chitosan heteropolymer

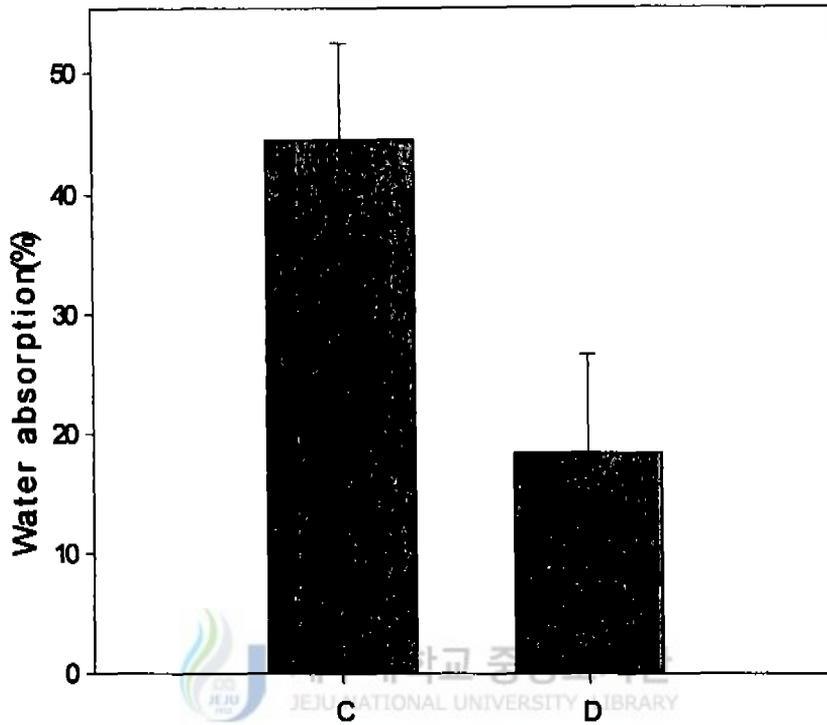


Fig. 18. Absorption of water in the air by chitosan-based polymers.

C. Chitosan homopolymer

D. γ -PGA-blended chitosan heteropolymer

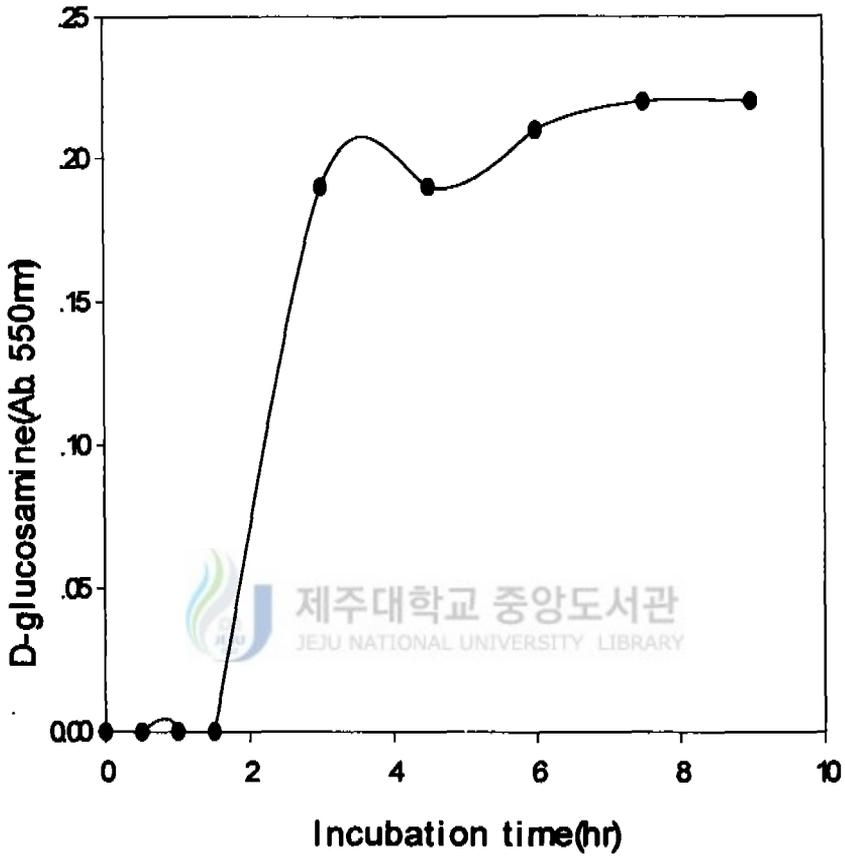


Fig. 19. Degradation of γ -PGA-blended chitosan heteropolymeric film by chitosanase.

요 약

Chitosan은 D-glucosamine이 β -(1→4) 결합으로 중합된 homopolymer이다. Chitosan은 chitin을 탈아세틸화(deacetylation)하여 제조할 수 있으며, chitin은 새우, 게 등 갑각류의 껍질이나 곤충 또는 사상균체의 세포벽 구성으로 자연계에 비교적 풍부한 천연자원이다. Chitin, chitosan 또는 그 분해산물이나 유도체들의 산업적 효율성이 밝혀지면서, 이에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 그 중의 한 분야가 효소 분해법을 이용한 chitosan oligomer(chitosan oligosaccharides)의 생산이다. chitosan oligosaccharides의 생물학적 활성은 광범위한 것으로 알려지고 있다. 본 연구에서는 chitosan을 분해하는 미동정 세균의 배양액으로부터 chitosan 가수분해효소(chitosanase)를 분리·정제하여, 주요 특성을 조사하였고, 생분해성 필름의 제조에 chitosan의 이용가능성을 제시하였다. 세균의 무세포 배양액을 한외여과기(NMWL, 1K)로 여과하여 저분자량의 화합물을 제거한 다음 황산암모늄을 가하여 90% 포화시키고, 침전된 단백질을 회수하여 gel permeation chromatography(Sephadex G-10과 G-100)로 chitosanase를 정제하였다. 정제전 효소의 비활성은 5.8U/mg이었으나 정제과정을 통하여 9.7U/mg으로 증대되었다. 정제전후를 통하여 SDS-PAGE 법에 의한 단백질의 분석과 효소활성 염색으로 한 종류의 chitosanase가 확인되었으며, 그 분자량은 약 30,000dalton 이었고, subunit는 한 종류인 것으로 추정되었다. Chitosanase에 의한 기질의 분해산물을 한외여과와 TLC로 분석한 결과, 이 효소는 이량체에서 육량체

까지의 oligomer를 생산하였으며, 단량체를 생산하지 않는 특징이 있었다. 효소반응 최적온도는 40℃이었고, 45℃ 이상에서는 효소의 활성이 급격히 저하되어, 비교적 열안정성이 낮았다. 또한, 이 효소는 pH 5.0~9.0 범위에서 1시간 방치해도 활성변화가 미미하여, 비교적 광범위한 중성영역에서 안정하였다. Chitosan으로만 제조한 동형필름(homopolymeric film)과 chitosan과 γ -PGA를 혼합하여 제조한 이형필름(heteropolymeric film)을 비교하였을 때, 이형필름의 흡습성과 물에 대한 용해도가 동형필름에 비하여 낮았다. 또한 이형필름은 동형필름에 비하여 신축성이 약한 대신에, 인장강도가 3배 정도 강하였다. 기존의 생물고분자가 지닌 최대의 단점이 물에 대한 용해성과 흡수성인 점을 고려할 때, chitosan과 γ -PGA의 혼합필름은 새로운 고분자로서 더욱더 연구되어야 할 것이다.



참 고 문 헌

Ahn, C. B. and E. H. Lee, 1992. Utilization of chitin prepared from the shellfish crust(Functional properties of chitin, chitosan and microcrystalline chitin). *Bull. Korean Fish Soc.*, 25(1), pp. 45-50.

Cha, J. M., S. G. Jin, H. C. Koh and I. W. Lee, 1996. Isolation and characterization of *Serratia* sp. JM producing chitinase. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 11(1), pp. 92-99.

Choi, Y. J., E. J. Kim, Y. S. Kim and Y. C. Shin, 1997. Development of chitosanase for the production of chitoooligosaccharides. *The Korean Society for Chitin and Chitosan*, 2(3), pp. 40-48.

Choi, Y. J., K. J. Ha, E. J. Kim, S. M. Byun and Y. C. Shin, 1996. Chitinase and chitosanase for the production of oligosaccharides from chitin and chitosan. *Ann. RCNBMA*, Vol 5, pp. 21-27.

Cooper, T. G., 1977. The tools of biochemistry. John Willy & Sons, Inc., pp. 169-193.

Davis, L. L. and S. Bartnicki-Garcia, 1984. The co-ordination of chitin and chitosan synthesis in *Mucor rouxii*. *J. Gen. Microbiol.*, Vol(130),

pp. 2095~2102.

Gregory, A. B., A. M. Cromwick and R. A. Gross, 1994. γ -poly(glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* 9945a: physiological and biochemical studies. *J. Macromol.*, 16(5), pp. 265-275.

한범구 · 이우진 · 조도현, 1997. 공업적 이용을 위한 동물성 키틴분해효소의 탐색. *한국농화학회지*, 40(2), pp. 95-100.

한정숙, 1996. *Aspergillus* sp. JS4가 생산하는 두 유형의 chitosanase 정제 및 특성. 서울대학교 대학원 석사학위 논문.

Han, K. H. and S. D. Kim, 1999. Selection and identification of *Promicromonospora* sp. KH-28 producing chitinase and antifungal antibiotic. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27(3), pp. 191-196.

Hong, B. S., H. G. Yoon, D. H. Shin and H. Y. Cho, 1996a. Isolation of microorganism producing thermostable chitinase and some cultural characteristics for chitinase production. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24(5), pp. 560-566.

Hong, B. S., H. G. Yoon, D. H. Shin and H. Y. Cho, 1996b. Purification and characterization of thermostable chitinase from *Bacillus*

licheniformis KFB-C14. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24(5), pp. 567-573.

홍상필 · 김동수, 1995. 생물 신소재 키틴/키토산의 이용. *식품기술*, 8(2), pp. 49-60.

홍상필 · 황재관 · 김동수, 1997. 키틴/키토산의 기능성과 올리고당의 생산 기술. *식품과학과 산업*, 30(1), pp. 44-52.

황철원 · 김호상 · 성기영 · 은무영, 1998. 토양에서 분리된 *Xanthomonas* sp. chitinase 유전자 cloning과 *E. coli*에서의 발현. *한국농화학회지*, 41(2), pp. 125-129.



Jeon, Y. J., P. J. Park, H. G. Byun, B. K. Song and S. K. Kim, 1998. Production of chitosan oligosaccharides using chitin-immobilized enzyme. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 13(2), pp. 147-154.

Jeon, Y. J. and S. K. Kim, 1997. Antitumor, antibacterial and calcium absorption acceleration effects of chitosan oligosaccharides prepared by using ultrafiltration membrane enzyme reactor. *The Korean Society for Chitin and Chitosan*, 2(3), pp. 60-78.

Kafetzopoulos, D., A. Martinou and V. Bouriotis, 1993. Bioconversion of

chitin to chitosan ; Purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol(90), pp. 2564~2568.

Kim, D. H., C. Lee, K. O. Kim and Y. C. Lee, 1999. Physicochemical and sensory properties of water soluble chitosan. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 31(1), pp. 83-90.

Kim, J. B., 1992. Properties of chitobiase produced by *Streptomyces* sp. *Korean J. Food & Nutrition*, 5(3), pp. 132-136.

Kim, S. Y., D. H. Shon and K. H. Lee, 1997. Development of ELISA system for the detection of chitooligosaccharides in food. *The Korean Society for Chitin and Chitosan*, 2(3), pp. 93-104.

Ko, Y. H. and R. A. Gross, 1998. Effects of glucose and glycerol on γ -poly(glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* 9945a. *Biotechnology and Bioengineering*, 57(4), pp. 430-437.

김천형, 1988. *Streptomyces* sp. KH1에 의한 chitosanase 생산 및 그 특성. 서울대학교 대학원 석사학위 논문.

Lee, E. Y. and G. J. Woo, 1999. Separation of highly purified

antimicrobial lysozyme using ultrafiltration and characteristics of membrane fouling. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 31(2), pp. 458-464.

Lee, E. Y. and K. Kim, 1998. Kinetics on the specificity of enzymatic hydrolysis of chitin. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 13(1), pp. 44-51.

Lee, S. J. and M. R. Kim, 1999. Mechanical properties of polyethylene films containing hydroxypropylated potato starch. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 28(2), pp. 423-428.

Lee, S. Y., T. S. Kang, J. Y. Kim, C. S. Shim and K. S. Kim, 1995. Functional and rheological properties of γ -PGA by alkalophilic *Alcaligenes* sp. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 10(5), pp. 547-542.

Lee, W. J., B. K. Han, I. H. Park, H. I. Oh and D. H. Jo, 1995. Effects of reaction temperature, time and particle size on the physicochemical properties of chitosans. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 27(6), pp. 997-1002.

Lee, Y. C. and J. S. Im, 1996. The effect of molecular size and degree of phosphorylation on the emulsion stability of microcrystalline chitin. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 28(6), pp. 1009-1013.

이상조, 1994. *Aspergillus* sp. S-11이 생산하는 chitosanase의 특성. 경북대학교 농업개발대학원 석사학위 논문.

이성빈, 1997a. *Aspergillus fumigatus* KH96이 생산하는 두 유형의 chitosanase 정제 및 효소특성. 서울대학교 대학원 석사학위 논문.

이승철, 1995. *Penicillium* sp. SC75로부터 chitosanase의 생산과 정제 및 그 효소특성. 서울대학교 대학원 석사학위 논문.

이아린, 1997b. *Aureobacterium* sp. YL의 분리 동정 및 chitosanase 특성에 관한 연구. 이화여자대학교 대학원 석사학위 논문.

이정석, 1998. 低濃度 酸分解方法에 의한 機能性 키틴·키토산 加水分解物の 製造 및 利用. 부경대학교 대학원 박사학위 논문.

Muzarelli, R.A.A., 1977. In chitin. Pergamon press, Oxford, p. 1.

Park, H. Y. and S. I. Kim, 1997. Enezyme properties and gene structure of rice chitinases. *The Korean Society for Chitin and Chitosan*, 2(3), pp. 7-26.

Pelletier, A. and J. Sygusch, 1990. Purification and characterization of three chitosanase activities from *Bacillus megaterium* P1. *Appl.*

Environ. Microbiol., 56(4), pp. 844-848.

박노동 · 정미라 · 조유영 · 지연태, 1997. 키토산 분해효소를 생산 분비하는 *Bacillus* sp. P16의 선발 및 특성. 한국농화학회지, 40(5), pp. 369-374.

판철호 · 이은아 · 조도현 · 김수일, 1998. 지황 chitin 분해효소의 전기영동 양상 및 분류. 한국농화학회지. 41(7), pp. 505-509.

Ryu, J. W., H. Y. Lee and S. Y. Oh, 1999. Degradation and preparation of blend films using natural polymers chitosan and algin. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 28(2), pp. 417-422.

Shimosaka, M., M. Nogawa, X. Y. Wang, M. Kumehara and M. Okazaki, 1995. Production of two chitosanases from a chitosan-assimilating bacterium, *Acinetobacter* sp. strain CHB101. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(2), pp. 438-442.

Song, T. H. and C. J. Kim, 1999. Effect of calcium addition on physicochemical properties of cellulose-based edible films. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 31(1), pp. 99-105.

Troy, F. A., 1973. Chemistry and biosynthesis of the poly(γ -D-glutamyl) capsule in *Bacillus licheniformis*: characterization and

structural properties of the enzymatically synthesized polymer. *The J. of Biological Chemistry*, 248(1), pp. 316-320.

Tsukamoto, T., D. Koga, A. Ide, T. Ishibashi, M. H. Matsushige, K. Yagishita and T. Imoto, 1984. Purification and some properties of chitinases from Yam. *Dioscorea opposita* Thumb, *Agric. Biol. Chem.*, 48(4), pp. 931-939.

Wortman, A. T., C. C. Somerville and R. R. Colwell, 1986. Chitinase determinants of *Vibrio vulnificus*: gene cloning and applications of a chitinase probe. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52(1), pp. 142-145.

Yabuki, M., K. Mizushima, T. Amatatsu, A. Ando, T. Fujii, M. Shimada and M. Yamashita, 1986. Purification and characterization of chitinase and chitobiase produced by *Aeromonas Hydrophila Subsp. Anaerogenes* A52. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 32, pp. 25-38.

감사의 글

대학원이란 곳을 선택하여 2년이라는 기간이 끝나 그 결실을 맺게 되었습니다. 결실을 맺게 될 때까지 저에게 많은 도움을 주시고 오늘의 이 자리를 있게 해주신 고영환 교수님께 진심으로 감사를 드립니다. 기꺼이 논문 심사를 맡아 논문을 다듬어 주시면서 많은 조언과 격려를 하여주신 김재하 교수님, 하진환 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 그리고 항상 격려와 조언을 아끼지 않으신 송대진 교수님, 강영주 교수님, 김수현 교수님, 임상빈 교수님께도 깊은 감사를 드립니다.

효소를 제공해 주시고 많은 조언을 해주신 건풍바이오 오찬금 사장님, 박승림 이사님과 그리고 HP TLC 실험을 하는데 도움을 준 김성철 선생님에게도 감사를 드립니다.

실험을 하면서 도움을 준 현정리와 격려를 해주신 정완석 선생님, 허윤희 선생님 그리고 대학원 선·후배님들에게도 감사를 드립니다.

힘들 때 힘이 되어준 용환이, 호순이에게도 감사를 드립니다.

끝으로 제가 있기까지 고생을 마다하지 않으시고 기도해주시는 어머니, 형님들과 누나, 장래를 약속해주신 은주와 저를 언제나 사랑해 주었던 작고하신 아버지께 이 작은 결실을 드립니다.