

Chitosanase의 분해에 의한 Chitooligo당의 분리 정제

류병호 · 빈재훈 · 이성호*

경성대학교 식품공학과, *경남전문대학 식품가공과

Purification and Separation of Chitooligosaccharides Hydrolyzed by Chitosanolytic Enzyme

Ryu Beoung-Ho, Bin Jae-Hoon, Lee Sung-Ho*

Department of Food Science and Microbiology,

Kyungsung University, Pusan 608-736, Korea

*Department of Food Science and Nutrition,

Kyungnam Junior College, Pusan 617-701, Korea

Abstract

This studies were carried out to purification and separation of chitooligosacchariches which containing excellent biological active substance. After deacetylation of chitosan (DAC%), DAC-45%, DAC-70%, DAC-95% and DAC-99% were used substrates and hydrolyzed by chitosanase (*Bacillus pumilus* BN-262) DAC-99% has excellent hydrolyzate which contained several chitooligosaccharides. Therefore, chitosan was hydrolyzed DAC-90 as substrate by chitosanase, and then purified and separated of chitooligosaccharides Gel filtration and HPLC. This oligosaccharides composed with GlcN₆, GlcN₂, GlcN₃, GlcN₅ and GlcN₆.

Key words : chitosan, chitosanase, chitooligosaccharides.

서 론

키틴, 키토산은 지구상에서 풍부한 천연 생물자원의 하나로 키틴의 연간 생산량은 1×10^9 ton으로 추정되고 있으며^{1, 2)} 이와 비교되는 셀룰로오스는 D-glucose가 β -(1, 4)결합한 키틴과 유사한 구조를 가진 물질로 연간 1×10^{14} ton이 생산된다고 추정되어 키틴도 셀룰로오스 만큼 자연에 많이 존재한다고 말할 수 있다.³⁻⁵⁾ 이와 같은 키틴은 양적으로 풍부하지만 대부분 이용되지 않거나 폐기되고 있으며 실제 지금까지는 이용범위가 한정되어 있다. 키틴은 N-acetyl-D-glucosamine 잔지가 여러개 β -(1, 4) 결합을 하고 있는 다당류(poly- β -1, 4-N-acetyl-D-glucosamine)이고, 키틴의 탈 아세틸물이 키토산이다.³⁾ 최근 chitin, chitosan이 생리활성물질로 알려지면서 이에 대한 연구가

활발히 진행되고 있다.⁶⁻¹¹⁾ 특히 각종 oligo당이 생리활성 물질로 밝혀지고 있는 가운데 chitin oligo당이 마우스에 대하여 면역기능 및 항종양 활성을 나타내었고⁷⁾ chitosan oligo당은 식물병원균인 *Fusarium sorani*에 대하여 항균활성을 나타내며¹²⁾ 토마토엽의 protease 저해제의 합성 유도인자이며,¹³⁾ chitin oligo당은 멜론의 chitinase을 활성화시키며,¹⁴⁾ 또 장내 유용세균의 생육인자⁸⁾로 밝혀지고 있다. 미 이용자원으로 알려진 chitin, chitosan을 분해하여 oligo당으로서 이용하면 폐기되는 자원의 재활용 측면에서도 바람직한 일이다. 따라서 본 연구는 키토산을 분해하여 oligo당으로 만들어 생리활성물질로 이용할 목적으로 chitosanase로 분해하였는 바 약간의 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재 료

키토산 (Flonac-N, Kyowa Yushi Co.)을 사용하

였으며 Chitosanase는 *Bacillus pumilus* Bn-262로부터 얻은 chitosanase(和光純藥)을 사용하였다.

2. Chitosanase의 활성 측정

키토산 분해효소의 활성(chitinolytic enzyme activity)은 colloidal chitosan을 분해하는 동안에 방출하는 환원당을 측정한다. Chitosanase의 활성은 Uchida 등의 방법¹⁵⁾에 따라 실험하였다.

효소반응 혼합액을 McIlvaine buffer로 만든 0.5% 키토산 2ml을 3000×g에서 5분 동안 원심분리한 후 측정하였다. 이때 chitosanase의 활성(1 unit)은 N-glucosamine를 표준물질로 하여 효소반응에서 환원당이 1분당 μmole 을 내는 효소의 수로서 나타내었다.

β -glucosaminase(β -GlcNase)의 활성은 Tomimaga와 Tsujisaka의 방법¹⁶⁾으로 측정하였다. 즉 β -GlcNase(1 unit)은 chitotritol을 기질로 하여 표준품으로 GlcN으로서 환원당 1 μmole 을 내는 효소의 수로서 나타내었다.

3. 환원당의 정량

Column chromatography에 의한 환원당의 측정은 GlcN을 표준물질로 하여 실험하였다.¹⁷⁾

4. Chitosanase에 의한 키토산의 분해

키토산을 분해하기 위하여 0.1M-acetate buffer, pH 6.0에 현탁시킨 탈아세틸화가 서로 다른 0.5% 키토산용액(탈아세틸화시킨 키토산(deacetylated chitosan) 45%(DAC-45), 70%(DAC-70), 75%(DAC-75) 및 99%(DAC-99)을 각각 60ml를 chitosanase (5 units) 100 μl 을 넣은 후 35℃에서 일정시간 동안 분해하기 위하여 반응시킨 다음 효소 반응을 정지하기 위하여 5분 동안 끓인 후 반응용액을 3000×g에서 원심분리한 다음 HPLC로 분석하였다.¹⁸⁾

이때 HPLC의 조건은 Radial-Pak μ Bondapak NH₂ column(8.0×100mm, water Associates)로서 acetonitrile-water mixture(65:35)을 1분당 1.0ml로 유속으로 조절하고 210nm에서 GlcN(n=1-6)은 refractive index(RI)에 의하여 측정하였다.

5. Chitooligo당의 분리

DAC-99% 14g을 물 1.5l에 현탁시킨 후 초산을 가하여 용해시킨 후 그 용액을 pH 6.0으로 조절하여 키토산 초산염 용액으로 만든다. 이를 chitosanase를 넣어 키토산 효소 분해 용액으로 한다.

키토산 효소 분해 용액 200ml에 chitosanase(12 unit)를 가하고 35℃에서 24시간 동안 교반시키면서 반응시켰다. 그 반응액을 0.1N-HCl로서 pH 2.7로 조절한 후 진공 농축하였다. 그 농축액을 200ml의 매탄올을 가하여 생성하는 침전을 원심분리하여 제거하였다. 그 상등액을 아세톤을 가하여 침전시키고 이를 원심분리하여 모은 후 이 침전을 다시 아세톤으로 씻은 후 감압건조하여 chitooligo당을 만들었다. 키토산 oligo당 2.0g을 물 40ml의 물에 용해시킨 후 그 용액을 Dowex 50w(H⁺ form, column 2.8×30cm)에 흡착시킨 다음 column을 100ml의 물로 씻은 후 흡착부위를 용출하여 얻었다.¹⁹⁾

6. Oligosaccharides의 효소적 분해에 의한 당 조성

0.5% oligosaccharide(F-1, F-2, F-3 및 F-4)의 각각 100 μl , 0.04M-인산완충액(pH 5.5) 50 μl 및 β -GlcNase(0.023 units) 50 μl 의 반응혼합액을 35℃에서 24시간 동안 반응시킨 다음 5분동안 끓인 후 효소 반응을 정지시킨 후 oligosaccharide의 당 성분을 분석하였다.¹⁹⁾

한편 F-5 및 F-6의 oligosaccharide의 당 분석은 0.4% F-5 및 0.6% F-6의 각각 4ml에 0.04M-인산 완충 용액(pH 5.5) 2ml와 1ml β -GlcNase (1 unit)의 반응 혼합액을 35℃에서 24시간 반응시킨 후 반응액을 5분 동안 끓인 후 효소반응을 중지시켜 이를 Bio-Gel P-2 여과에 의하여 분리하였다.

Chitooligosaccharide의 분석은 UV/VIS detector, 830RI RI-detector(Japan. Spectroscopic Co.)이며, Detector는 Model 7125, Rheodyne Inc.)를 사용하였고 이때 분리 column은 Radial-PAK μ Bondapak NH₂(8.0×100mm)을 사용하였다. 이때의 용리액으로는 acetonitrile:water(65:35)

을 사용하였다.

결과 및 고찰

1. 효소에 의한 Chitosan의 분해 조건

Chitosan을 산 가수분해하여 만든 chitooligo당은 Horowitz에 의하여 처음으로 제조되었으나¹⁶⁾ 이 방법은 키토산에 비하여 많은 양의 염산을 사용하며 반응 시간이 장시간 소요된다. 그러므로 chitooligo당을 제조할 때 산 가수분해 후 중화공정이 없고 분리공정에서 chitosan oligo당이 유리 아미노기가 있는 점을 이용하여 이온 교환 크레마토그래피를 사용하여 분획한 바 있다. 그러나 이러한 방법을 4시간 이상의 반응에서는 oligo당의 수율이 저하하고 단당인 GlcN의 양이 현저히 증가하므로 oligo당의 분리고정의 효율을 저하시키는 요인이 된다.¹⁷⁾

본 연구에서는 이러한 점을 보완하기 위하여 산 가수분해법 대신에 효소에 의한 oligo당의 분해를 시도하였다.

본 실험에서는 탈 아세틸화도가 다른 탈 아세틸 키토산(deacetylated chitosan)인 45%, 70%, 75% 및 99%의 deacetyl chitosan (DAC-45, DAC-70, DAC-75 및 DAC-99)을 실험에 사용하였다. 이들 탈 아세틸 키토산을 chitosanase로서 분해할 때 반응 시간에 따른 분해율은 Fig. 1에 나타내었다. 탈 아세틸화 키토산을 분해할 때 DAC-99가 분해율이 가장 높았다.

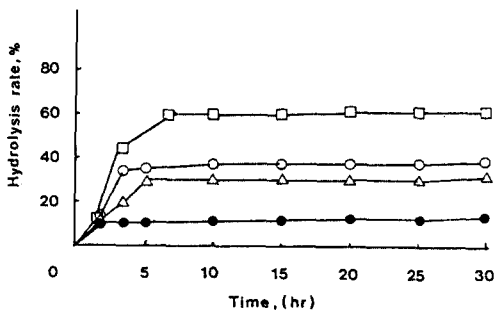


Fig 1. Times course of the hydrolysis by different degrees of deacetylation by chitosanase

●-●, chitosan DAC-45; △-△, chitosan DAC-70; ●-●, chitosan DAC-75; □-□, chitosan DAC-99.

이들 탈 아세틸 키토산은 반응초기에는 탈 아세틸화도에 따라 분해율이 차이가 있었으나, 효소반응을 5시간 시킨 후에는 DAC-45, DAC-70, DAC-75 및 DAC-99의 분해시간이 경과하더라도 분해율은 그다지 증가하지 않았다.

한편 탈 아세틸화도가 다른 키토산을 24시간 동안 배양한 후 키토산의 분해물을 HPLC로 나타내었다 (Fig. 2). 이들 키토산 분해물을 표준물질과 chromatogram을 비교해 보면 DAC-45의 분해물의 peak는 나타나지 않았으나, DAC-70은 GlcN₂, GlcN₃ 및 GlcN₄의 peak를 확인할 수 있었다. 본 실험에서 균일계 및 불균일계의 탈 아세틸화 키토산인 DAC-70% 및 DAC-75%의 탈 아세틸 키토산의 oligosaccharide는 크게 차이가 나지 않았으나, 99% 탈 아세틸화 키토산 GlcN₂, GlcN₃, GlcN₄, GlcN₅ 및 GlcN₆이 생성되었으며 HPLC로 잘 분리된 peak를 찾아볼 수 있었다. 따라서 키토산의 DAC-99%가 chitosanase의 효소기질로서 가장 적합하다고 생각된다. Izume 등¹⁹⁾도 chitosan을 분해할 때 탈 아세틸화가 가장 높은 것이 oligo당 분해능이 가장 높았다고 한 바 본 연구와 비슷한 결과를 나타내었다. 키토산 분해효소가 키토산 분자 중에서 GlcN-GlcN의 특이한 결합을 절단한다고 판단된다. 이상의 결과로서 키토산의 탈 아세틸화가 높을수록 키토산 분해효소인 chitosanase에 의한 oligosaccharides의 분해물이 증가하는 것으로 보이며, 반면에 탈 아세틸화도가 낮은 DAC의 경우 이들 분해물의 oligosaccharide의 종류에는 큰 차이를 찾아볼 수 없었다.

2. Oligosaccharides의 분리 및 정제

키토산의 탈 아세틸화도가 99%인 DAC-99의 분해 산물을 확인하기 위하여 DAC-99를 효소반응시켜 분해하여 얻은 분해물을 Bio-Gel P-2로서 Gel여과를 실시하였다.

DAC-99% 14g을 물 1.5l에 현탁시킨 후 초산을 가하여 용해시킨 다음 그 용액을 pH 6.0으로 조절하여 키토산 초산염 용액으로 만들었다. 이를 chitosanase을 넣어 키토산 효소 분해 용액으로 하였다.

키토산 효소 분해 용액 200ml에 chitosanase(12 unit)를 가하고 35℃에서 24시간 동안 교반시키면서

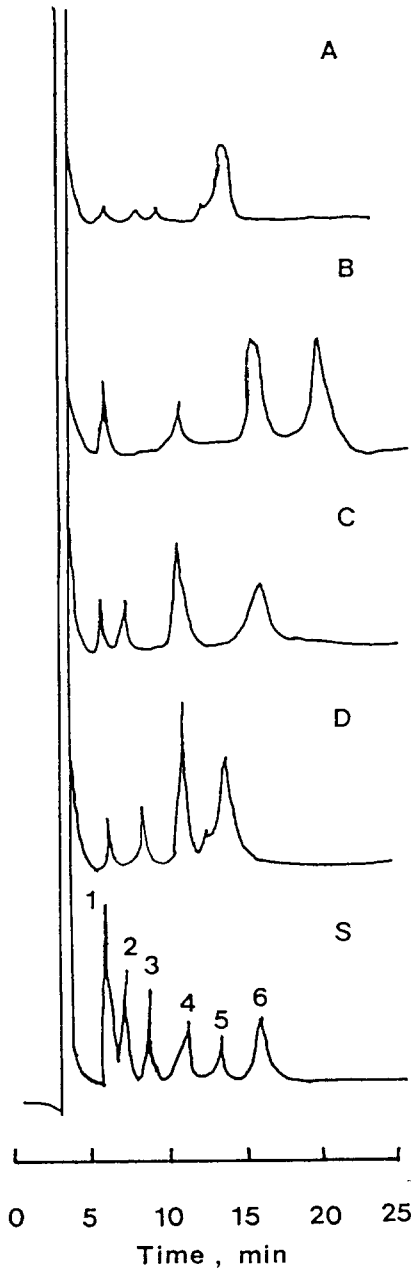


Fig 2. HPLC chromatograms of products in the hydrolysis of chitosan DAC-45(A), chitosan DAC-70(B), chitosan-75(C), and chitosan DAC-99(D), by chitosanase. S. Standard(GlcN)_n (n=126), peak 1, GlcN; 2, GlcN₂; 3, GlcN₃; 4, GlcN₄; 5, GlcN₅; 6, GlcN₆. The hydrolysis products after 24hr were separately applied on columns Radial-PAK μ Bondapak NH₂-column (8.0×100mm). Degradation products were eluted with acetonitrile-water (65:35), and monitored by the refractive index.

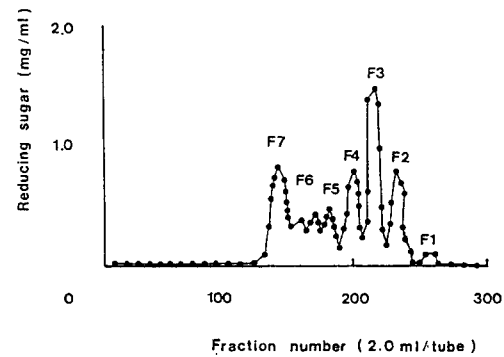


Fig 3. Gel filtration of the hydrolyzate of chitosan by chitosanase on Bio-Gel P-2 (2.8×200 cm).

반응시켰다. 그 반응액을 0.1N-HCl로서 pH 2.7로 조절한 후 진공 농축하였다. 그 농축액을 200ml의 메탄올을 가하여 생성하는 침전을 원심분리하여 제거하였다. 그 상정액을 아세톤을 가하여 침전시키고 이를 원심분리하여 모은 후 이 침전을 다시 아세톤으로 씻은 다음 감압 건조하여 chitooligo당을 만들었다. 이를 Bio-Gel P-2을 column(2.8×200cm)에 충전시킨 후 sodium formate (pH 4.2) 완충액으로 평형되게 한 다음 시간당 0.1ml의 유속으로 sodium formate 완충액으로 용출시켰다.

Fig. 3에서 보는 바와 같이 DAC-99의 분해산물은 7개의 peak로 분해되어 분리되었다. Fraction No. 1~No. 7까지를 각각 분리하여 이들 각각을 35°C 이하에서 감압농축한 후 농축물을 24시간 동안 투석한 후 진공동결 건조하였다. 이때 Fraction No. 1에서 No. 7의 수율은 7mg, 40mg, 98mg, 67mg, 40mg, 37mg 및 42mg 이었다. Fraction 중에서 F-1은 흡습성이 있는 불완전 화합물이었다. Fig. 3에 나타낸 F-3, F-4 및 F-7은 HPLC에 의하여 μ -Bondpack-NH₂ column으로 분리한 바 균일계로 분리하였다.

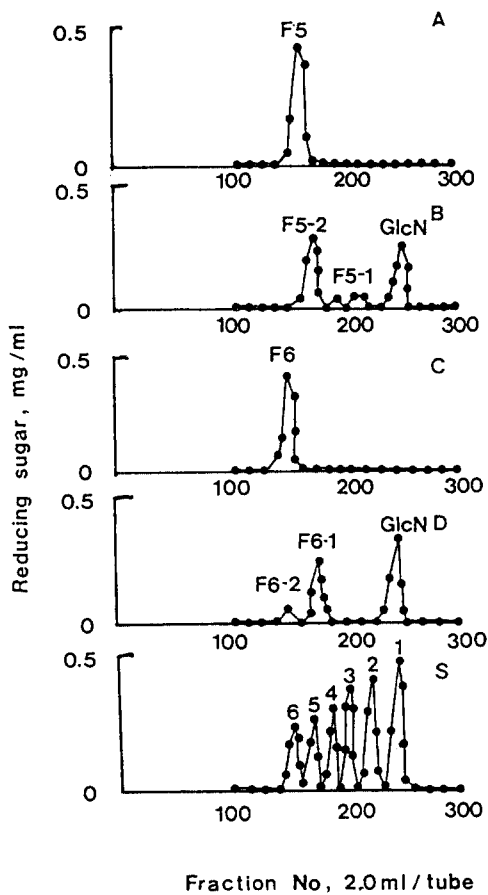


Fig 4. Gel filtration of the oligosaccharides produced in the hydrolysis of F-5 and F-6 by chitosanase.

A : F 5 ; B, hydrolysis products of F 5 ; C, F 6 ; D, hydrolysis products of F6 ; S, standard (GlcN)_n (n=1-6). The hydrolyzates after the incubation for 24hr were loaded on a Bio-Gel P-2 column(2.8×200cm) and eluted with sodium formate buffer(pH 4.2) at a flow rate of 10ml/hr. A reaction mixture containing 4ml of oligosaccharide (0.4% for F5 or 0.6% for F6), 2ml of 0.04M phosphate buffer(pH 5.5) 2ml of chitosanase (1 unit) was incubated for 24hr at 35°C.

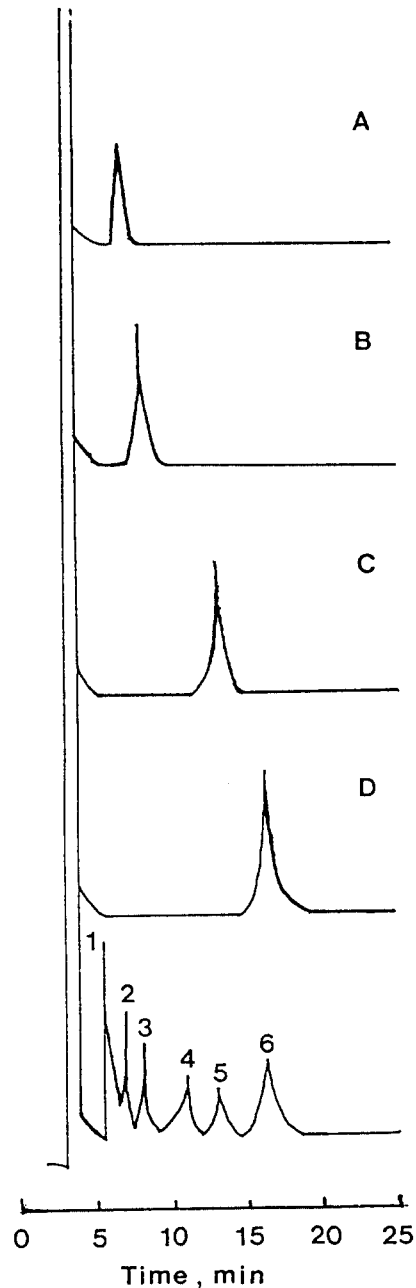


Fig 5. HPLC of Fraction F-5 and F-6 obtained from Bio-Gel P-2 column chromatography. A ; 5-1, B ; 5-2, C ; 6-1, D ; 6-2.

Samples were loaded on μ -Bondapak NH₂ column (8.0×100mm) and eluted with acetonitrile water (65:35). The absorbance was monitored at 210nm with a UV detector.

한편 F-5와 F-6의 구성당을 확인하기 위하여 증류수에 녹혀 그 분해물을 Bio-Gel P-2로서 Gel-filtration에 의하여 Fraction별로 분리하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 F-5의 분해물은 GlcN, F-5, F-5-2 등 3개의 peak가 나타났으며 F-6 역시 GlcN, F-6-1 및 F-6-2 등 3개의 peak를 나타내었다.

Fig. 5에서 보는 바와 같이 F-5와 F-6을 gel-Filtration으로 분획한 retention times을 oligo당의 표준류인 GlcN, GlcN₂, GlcN₃, GlcN₄, GlcN₅ 및 GlcN₆와 비교해 보면 F-5의 GlcN, F-5-2 등 3개의 peak에서 GlcN, GlcN₅, GlcN₂와 거의 비슷하였다. 그리고 F-6에서의 GlcN, F-6-1 및 F-6-2 등 3개의 peak를 oligo당의 표준품과 retention times을 비교해 보면, GlcN, GlcN₂, GlcN₆와 비슷한 retention times인 것을 찾아볼 수 있었다.

이런 분석결과에서 F-5와 F-6는 GlcN, GlcN₂ 및 GlcN₃을 가지고 있는 chito-oligosaccharide임을 알 수 있다. Mitsatomi 등²⁰⁾은 N-acetylated chitosan을 부분적인 분해를 하기 위하여 *Aeromonas hydrophila*의 chitinase로 분해하여 chitooligo당을 분해하여 GlcN (GlcNAc)₃ 등 hetero-oligo당을 분획하였다. 또 Yamasaki 등²¹⁾은 *Enterobacter* sp. G-1로부터 얻은 chitosan 분해효소로 분해하여 GlcNAc_{2,6}의 예당을 얻은 바 있다. 그리고 Izume 등¹⁷⁾은 chitosan을 효소로 분해하여 N-acetylchitooligosaccharide를 제조하였다고 하였다¹⁷⁾. 이들 연구에서는 *Bacillus* sp.로부터 chitosanase를 정제하여 (GlcNAc)₅, (GlcNAc)₆ 및 (GlcNAc)₇을 얻었다.

본 실험에도 Gel-filtration에 의한 분획된 chitooligosaccharide는 GlcN, GlcN₂, GlcN₃, GlcN₅ 및 GlcN₆인 것으로 추정할 수 있다. 한편 Yamasaki 등²²⁾은 *Enterobacter* sp. G-1의 chitosan 분해효소를 고정화하여 연속적으로 1% chitosan을 분해하여 oligo당을 제조한 바 있다.

본 연구에서는 chitosan분해효소를 사용하여 분해한 결과 chitooligo당인 조성을 GlcN, GlcN₂, GlcN₃, GlcN₅ 및 GlcN₆을 얻을 수 있었다.

요 약

키토산을 효소로 분해하여 생리활성물질이 우수한 chitooligo당을 분리하여 정제를 시도하였다. Chitosan을 탈 아세틸화 시킨 후 탈 아세틸화도(DAC)도가 DAC-45%, DAC-70%, DAC-75% 및 DAC-99%를 기질로 하여 chitosanase(*Bacillus pumilus* BN 282)로 분해한 결과 DAC-99가 분해능이 가장 우수하였다.

따라서 DAC-90을 이용하여 chitosanase로 분해한 다음 gel filtration하여 Biol-2 gel chromatography로 분획한 획분을 HPLC로 분리 정제한 결과 chitooligo당의 조성은 GlcN, GlcN₂, GlcN₃, GlcN₅ 및 GlcN₆임을 확인하였다.

감사의 말

본 연구는 1994년도 산학협동재단과 순천당제약(주)의 연구비지원으로 수행하였으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Muzzarelli, R.A.A., Chitin, Pergamon press, (1977).
- Hirano, S. and Tokura, S., chitin and chitosan, Proceedings of the Second International Conference on chitin and chitosan., *Japan Soc Chitin and Chitosan*, (1982).
- 平野茂博: キチン, キトサンの 利用. 天然高分子の 最新技術., シ-엠시-201 (1982).
- 平野茂博: 食品素材として キチン, キトサン 研究의 現狀と 將來性, フト케ミカル, 11, 25 (1986).
- 栗田惠輔: 未利用 바이오マス資源, 키친高度有效利用への開發, *Petrotech*, 15(3), 241 (1992).
- 戶倉清一: 키친, 키토사ンの 生理活性について

- て, フトケミカル, 11, 29 (1986).
7. Suzuki, K, Mikami, T., Okawa, Y., Tokoro, A., Suzuki, S., and Suzuki, M. Antitumor effect of hexa N-acetyl chito hexose and chito heptose., *Carbohydr. Res.*, **151**, 402 (1986).
 8. 南條文雄, 坂井和男 : キチン, キトサンオリゴ糖の製造と機能特性, フトケミカル, **10**, 54 (1989).
 9. Nishimura, H., Nishi, N., and Tokara, S ; Biocactive chitin derivatives. Activation of mouse peritoneal macrophages by o-(carboxymethyl) chitins., *Carbohydr. Res.*, **146**, 251 (1986).
 10. 坂井和男, 南條文雄, 唯氷泰市 : キチン, キトサンオリゴ糖の生産と利用, 澱粉科學, **37**(2), 79 (1990).
 11. 鶴谷 正, 吉川武 : 橋かけ キチン膜の製造とその抗菌性, SEN-I, GAKKAISHI, **47**(4), 190 (1991).
 12. Kendra, D.F. and L.A. Hadwiger : "Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation" *Exp. Mycol.*, **8**, 276-281 (1984).
 13. M. Walker-Simmons and A.R. Clarence : "Proteinase inhibitor synthesis in tomato leaves" *Plant. Physiol.*, **76**, 787-790 (1984).
 14. Roby, D., A. Gacelle and A. Toppan : "Chitin oligosaccharides as elicitors of chitinase activity in melon plants" *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **143**, 886-892 (1987).
 15. Uchida, Y., Ohtakara, A., : Chitosanase from *Bacillus* species., *Methods Enzymol.*, 161 B 501 (1988).
 16. Tominaga, Y., and Tsujisaka., Y. : Purification and some properties of the chitosanase from *Bacillus* R-4 which lyses *Rhizopus* cell walls, *Biochim. Biophys. Acta.*, **410**, 145 (1975).
 17. Izumi, M. and Ohtakara, A. Preparation of D-glucosamine oligosaccharides by the enzymatic hydrolysis of chitosan, *Agric. Biol. chem.*, **51**, 1189 (1987).
 18. Horositz., S.T., Rosseman, S. and Blumenthal, H.J. The preparation of glucosamine oligosaccharides, *J. Amer. Chem. Soc.*, **79**, 1537 (1989).
 19. Izume, M., Nagal, S., Kawagishi, H. and Ohtakara, A. Preparation of N-acetyl chitooligosaccharides from enzymatic hydrolyzates of chitosan, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1327 (1992).
 20. Mitsutoni, M., Ohtakara, A., Fukamizo, T., and Goto, S., Action pattern of *Aeromonas hydrophilus* chitinase on partially N-acetylated chitosan, *Agric. Biol. Chem.*, **54**(4), 871 (1990).
 21. Yamasaki, Y., Hayashi, I., Nakagawa, T., Kawamukai, M. and Matsuda, H. Purification and mode of action of chitosanlytic enzyme from *Enterobacter* sp. G-I., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**(3), 444 (1993).
 22. Yamasaki, Y., Fukumoto, I., Kumagai, N., Ohta, Y., and Nakagawa, T. Continuous chitosan hydrolyzate production by immobilized chitosanlytic enzyme. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**(10), 1546 (1992).

(1995년 4월 13일 수리)