

키틴·키토산 올리고당의 제조

김 세 권 / 부경대학교 교수

머 리 말

키틴은 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)이 β -1, 4결합한 다당류로서 게나 새우 등의 갑각류 껍질, 곤충의 외골격, 버섯이나 균류의 세포벽에 단백질과 복합체로서 함유되어 있으며, 식물계에서는 셀룰로오스와 같이 생물체의 지지나 보호의 역할을 담당하고 있다. 키틴은 지구상에서 연간 약 1,000억톤 정도로 생산되고 있으며, 현존하는 최후의 생물자원이라고 할 수 있다. 키토산은 키틴을 강알카리로 탈아세틸화시켜 얻을 수 있으며, D-글루코사민(GlcN)이 β -1, 4결합한 구조를 가지고 있다.

키틴·키토산의 이용은 해양 생물자원의 유효이용이 주목을 받은 이후 급속히 발전하였으나, 그 응용분야로는 공업용 재료로서 폐수처리제 혹은 중금속흡착제¹⁻²⁾, 생물공학적인 재료로서 효소고정화용 담체, 크로마토그래피용 수지 및 기능성막³⁻⁵⁾, 농업용 재료로서 병충해 예방제⁶⁾, 의료용 재료로서 인공피부⁷⁻⁸⁾ 등 대부분 고분자물질로서 이용되어 왔다. 그러나 최근 10여년 전부터 키틴·키토산 및 그 유도체가 면역증강 및 부활작용에 의한 항암활성⁹⁾, 항균활성¹⁰⁾, 체

내 콜레스테롤 개선작용¹¹⁾ 및 고혈압 억제작용¹²⁾ 등 여러 가지 생리활성을 가지고 있다는 사실이 밝혀짐으로써 현재 생리기능성 신소재로서 연구개발이 활발히 진행되고 있다. 그런데, 키틴·키토산은 자체로서 대단히 고분자물질이고, 또한 셀룰로오스나 카라기난과 같이 사람의 위장관(gastrointestinal tract)에서 소화흡수되지 못한다. 즉 그 위장관에서는 β -1, 4 글리코시드 결합(glycosidic linkage)을 분해할 수 있는 효소가 존재하지 않는다¹³⁾. 따라서 키틴·키토산의 생체내 활성물질로서 효율적으로 이용하기 위해서는 그들의 올리고당을 생산할 필요가 있다.

현재 키틴·키토산 올리고당 중 중합도 6과 7의 올리고당이 높은 면역기능개선효과에 의한 항암작용¹⁴⁾ 및 항균작용¹⁵⁾을 가지고 있다는 것이 보고되고 있어 앞으로 이들보다 좀 더 고중합도의 올리고당으로부터 새로운 기능성의 개발이 기대되고 있다. 이를 위해서는 효율적으로 올리고당을 생산할 수 있는 기술개발이 요구되어지고 있다.

따라서 본고에서는 키틴·키토산 올리고당의 생산에 관하여 산가수분해법과 효소

적 가수분해법에 의한 제조방법을 중심으로 소개하고자 한다.

1. 산가수분해에 의한 키틴·키토산 올리고당의 제조

키틴올리고당은 N-아세틸글루코사민이 β -1, 4결합으로 10개 내외로 결합한 올리

고당이며, 키토산 올리고당은 N-글루코사민이 키틴과 동일한 결합으로 형성된 것을 말한다. 키틴·키토산 올리고당은 키틴·키토산으로부터 진한염산을 사용하는 산가수분해법이 일반적으로 행하여져 왔으며 그림 1에서 보는 것과 같이 여러 경로를 통하여 제조가 가능하다.

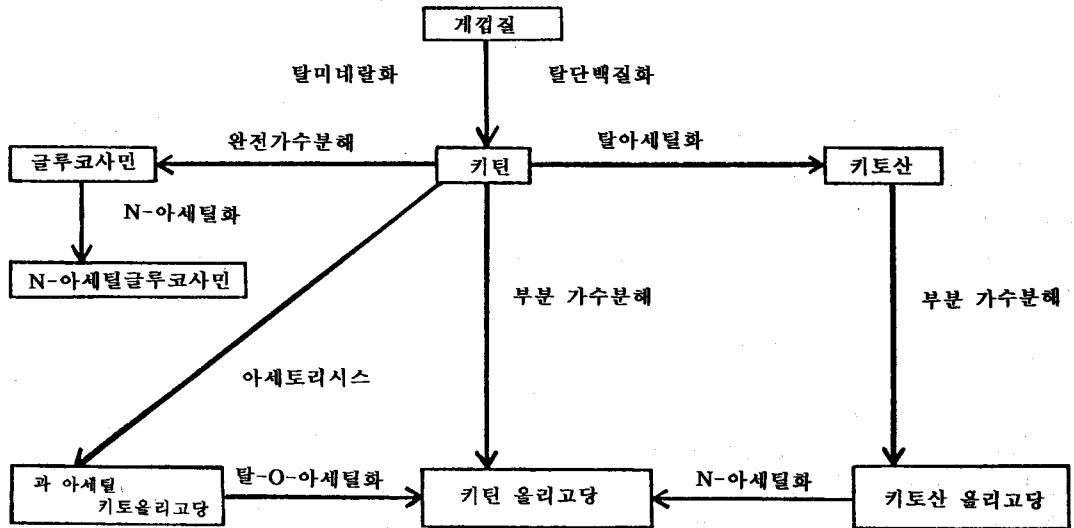


그림 1. 키틴으로부터 올리고당을 제조할 수 있는 경로

현재 키틴올리고당과 키토산올리고당을 총칭하여 키토올리고당이라 칭하고 있지만 엄밀하게 말한다면 키토산올리고당을 키토올리고당으로, 키틴올리고당을 N-아

세틸키토올리고당으로 구별지어 부르는 것이 올바른 명명법이다. 표 1에 키틴·키토산올리고당과 관련된 명명법과 약어 표시를 나타내었다.

표 1. 키틴·키토산 올리고당에 사용되고 있는 명명법과 약어

	키틴		키토산	
	명명법	약어	명명법	약어
올리고당 혼합체	Chitin oligosaccharide N-Acetylchitooligosaccharide	NACOS (GlcNAc) _n	Chitosan oligo-saccharide Chitooligosaccharide	COS (GlcN) _n
Monomer	2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranose N-Acetylglucosamine	NACOS-1, GlcNAc	2-amido-2-deoxy- β -D-glucopyranose Glucosamine	COS-1, GlcN
Dimer	N-Acetylchitobiose	NACOS-2, GlcNAc ₂	Chitobiose	COS-2, GlcN ₂

	키 틴		키 토 산	
	명 명 법	약 어	명 명 법	약 어
Trimer	N-Acetylchitotriose	NACOS-3, GlcNAc ₃	Chitotriose	COS-2, GlcN ₃
Tetramer	N-Acetylchitotetraose	NACOS-4, GlcNAc ₄	Chitotetraose	COS-2, GlcN ₄
Pentamer	N-Acetylchitopentaose	NACOS-5, GlcNAc ₅	Chitopentaose	COS-2, GlcN ₅
Hexamer	N-Acetylchitohexaose	NACOS-6, GlcNAc ₆	Chitohexaose COS-2, GlcN ₆	
Heptamer	N-Acetylchitoheptaose	NACOS-7, GlcNAc ₇	Chitoheptaose	COS-2, GlcN ₇

1) 산분해에 의한 키틴 올리고당의 제조

키틴 올리고당은 1964년 Rupley¹⁶⁾가 라이소자임(lysozyme)의 기질로서 각종 키틴올리고당을 얻기 위하여 키틴을 강염산으로 부분가수분해하여 활성탄-셀라이트 칼럼에 의해 분리정제한 것이 지금까지 가장 일반적이고 광범위하게 이용되고 있다. 그러나 키틴을 산가수분해하는 것은 N-아세틸글루코사민의 단당 생산량이 많고 생리활성이 기대되는 5당(GlcNAc₅) 이상의 올리고당 생산량이 매우 낮다는 것이 문제로 지적되고 있다. 최근 키틴의 산가수분해에 의한 개량된 방법으로는 플루

오르화수소에 의한 가수분해¹⁷⁾, 아세토리시스(acetolysis: 황산수용액에서의 무수초산 첨가에 의한 키토산 가수분해)법¹⁸⁾, 소노리시스(sonolysis: 염산용액에서의 염산과 초음파에 의한 키틴가수분해)법¹⁹⁾ 등이 보고되고 있다. 여기에서 강염산분해에 의한 키틴올리고당의 제조 중 가장 최적의 검토조건으로 볼 수 있는 Sakai 등²⁰⁾에 의한 보고와 개량법 중 Takahashi 등¹⁹⁾에 의한 소노리시스법에 대하여 기술하겠다.

Sakai 등²⁰⁾은 키틴올리고당을 효율 좋게 생산할 목적으로 키틴을 진한염산으로 최적 적정시간동안 가수분해한 후 중화하여 활성탄 칼럼을 거쳐서 얻어진 올리고당을

표 2. 40°C에서 산가수분해에 의해 생성된 키틴 올리고당의 수율

반응시간 (hr)	수율(%)				
	GlcNAc ₂	GlcNAc ₃	GlcNAc ₄	GlcNAc ₅	GlcNAc ₆
1.5	5.3	6.4	6.3	5.5	3.9
2.0	7.1	8.2	8.0	6.9	4.9
2.5	9.9	10.0	8.2	5.2	3.4
3.0	12.0	10.7	7.9	5.2	2.2

HPLC로 분석한 결과(표 2), 키틴의 산가수분해 과정 중 아세틸기의 가수분해를 억제할 수 있는 반응온도 40°C에서 수행하였을 때 반응시간의 경과에 따라 올리고당의 수율은 점자적으로 증가하였으나 GlcNAc₅와 GlcNAc₆ 등 고중합도 올리고

당은 2시간동안의 가수분해에서 최고로 증가한 후 더 이상의 반응시간에서 감소하는 경향을 나타낸 것으로 보고하였다.

Takahashi 등¹⁹⁾은 진한염산으로 키틴을 가수분해하는 중에 초음파 조사(ultrasound irradiation)를 병행하는 소노리시스

법을 수행한 결과, (GlcNAc)₁₋₇의 함량은 초음파처리(sonication)시간이 120분 경과

할 때까지는 비례적으로 증가하였으며, 이때 고중합도 올리고당(GlcNAc)₅₋₇의 함량도

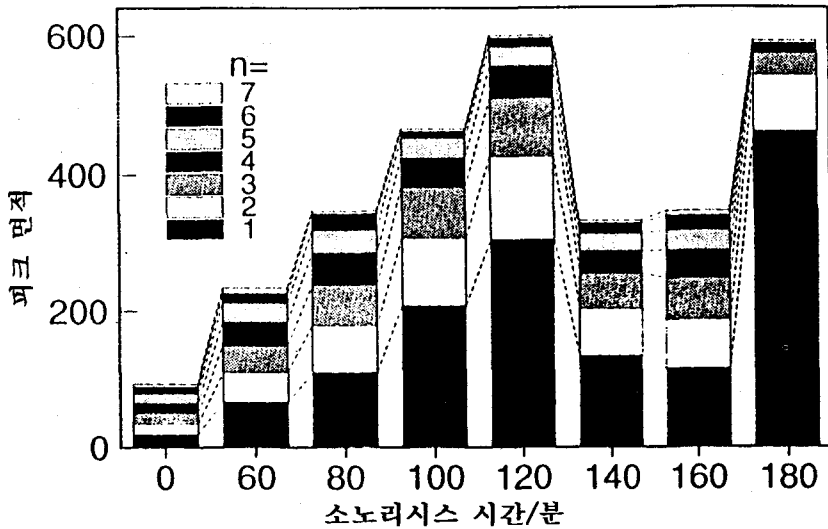


그림 2. Sonolysis작용에 의해 얻어진 키틴 올리고당(GlcNAc)n의 조성. 올리고당은 진한 염산 20ml에 키틴 3g을 반응시켜서 제조하였다.

가장 높았다(그림 2). 특히 산-소노리시스는 소노리시스를 병행하지 않은 산가수분해보다 2-4배 높은 가수분해율을 나타낸 것으로 보고하였다(그림 3).

2) 산분해에 의한 키토산 올리고당의 제조

키토산 올리고당은 키틴 올리고당과는 달리 탈아세틸화된 구조를 가지고 있기 때문에 묽은 산성용액에 녹으며 녹일 수 있으며, 산가수분해에 대한 저항성이 강한 성질을 가지고 있다. 또한 가수분해시 아세틸기의 분해에 대한 염려가 없어 높은 온도에서 분해시킬 수 있다.

산가수분해법에 의한 키토산 올리고당의 제조는 1957년 Horowitz 등²¹⁾에 의해 처음으로 수행되었다. 키토산의 산가수분해에서도 키틴의 경우와 마찬가지로 낮은 생리활성 물질인 저분자 올리고당 및 단당의 생성은 피할 수 없다. 따라서 높은 수율과 고중합도 올리고당의 효율적 생산을 위한 최적조건의 검토가 필요하다.

Sakai²⁰⁾는 키토산에 5배량의 농염산을 첨가하여 80°C에서 1~8시간 가수분해한 후, Dowex 50W 이온교환수지칼럼에서 0→4N 염산농도구배에 의해 각각의 올리고당을 분리하여 조사한 결과(표 3), 4시간

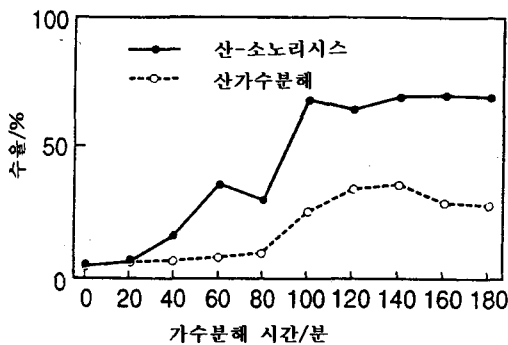


그림 3. 가수분해 시간에 따라 산-소노리시스와 산가수분해에 의한 올리고당의 수율 비교. 올리고당 제조는 그림 2와 동일

표 3. 80℃에서 산가수분해에 의해 생성된 키토산 올리고당의 수율

반응시간 (hr)	수율(%)					
	GlcN	GlcN ₂	GlcN ₃	GlcN ₄	GlcN ₅	GlcN ₆
1.0	12.8	13.9	12.4	2.6	2.5	2.3
2.0	20.8	16.6	13.0	3.2	2.5	1.4
4.0	24.3	15.3	11.3	3.0	2.3	—
6.0	50.8	10.9	6.2	0.9	—	—
8.0	66.7	4.3	—	—	—	—

이상의 가수분해에서는 올리고당의 수율은 감소하고 단당의 수율은 크게 증가하였으며, 최적 분해시간으로는 1시간이 가장 적당하다고 하였다.

3) 올리고당의 분리

키토신의 가수분해액으로부터 각각의 올리고당을 회수하는 데에는 활성탄 칼럼이 광범위하게 이용되고 있다²²⁾. 이 방법은 활성탄이 올리고당을 특이적으로 흡착하고 또 단당이나 중화에 의해서 생성된 염을 흡착하지 않은 특성을 있기 때문이며, 용출시킬 때에는 50% 에탄올을 이용한다. 올리고당의 분리정제에는 0→50% 에탄올 농도구배에 의해 GlcNAc₂~GlcNAc₇을 순차적으로 용출된다. 올리고당의 검출은 아세틸기에 의한 210nm 흡광도로 측정할 수 있다. GlcNAc₂와 GlcNAc₃는 약 10%, GlcNAc₄와 GlcNAc₅는 5~10%, GlcNAc₆와 GlcNAc₇은 3~5%의 수율로 키토신에서 얻을 수가 있다. 얻어진 올리고당을 HPLC에 의해 순도를 분석해 보면 중합도가 높을수록 순도가 떨어지며, GlcNAc₇의 경우에는 순도가 50%이하로 매우 낮기 때문에 고순도의 올리고당을 조제하기 위해서는 겔여과법이나 분취용 HPLC를 사용하면 가능하다. 또한 키토신의 가수분해 후 중화에 의해 생성된 염을 제거하기 위해서는 이온교환막 전기투석장치를 이용할 경우 가능하며 공업적생산에서의 응용에도 적합하다.

키토신의 산가수분해물에는 다량의 단당이 함유되어 있으며, 이것은 분리공정에서 악영향을 미칠 수 있기 때문에 문제가 되고 있다²²⁾. 이러한 단당은 에탄올 및 물에 대한 키토산 올리고당의 용해도 관계를 이용하여 간단히 제거할 수 있다. 즉,

표 4. 20℃의 용매에서 키토산 올리고당의 용해도

	용해도(%)	
	메탄올	물
GlcN	0.4	37
GlcN ₂	5.4	190
GlcN ₃	37.0	177
GlcN ₄	45.0	158
GlcN ₅	4.6	86
GlcN ₆	1.7	68

표 4에서 보는 것과 같이 단당과 올리고당이 메탄올 및 물에 대한 용해도에서 단당만이 메탄올에서 상당히 녹기 어렵기 때문에 이러한 성질을 이용하여 단당을 제거한 후, Dowex 50W 이온교환 크로마토그래피로 분리하면 아주 용이하게 분리할 수 있다.

또한, 키토산 올리고당은 메탄올/물을 이용한 분별침전법에 의해 대략적으로 분리할 수 있다. 즉, 올리고당 혼합물은 메탄올 농도를 변화시킨 용매에 대하여 분별침전을 시킨 후 4개의획분으로 분리하였다. 50% 메탄올 불용획분(획분 A), 50%

메탄올 가용획분~90% 메탄올 불용획분 (획분 B), 90% 메탄올 가용획분~100%

표 5. 메탄올/물 용매에 의한 키틴산 올리고당의 분리

획분	올리고당의 조성
A	> GlcN ₁₆
B	GlcN ₈ ~GlcN ₁₆
C	GlcN ₅ ~GlcN ₈
D	GlcN ₂ ~GlcN ₄

메탄올 불용획분(획분 C) 및 100% 메탄올 가용획분(획분 D)로 나누고, 이것을 HPLC로 분석한 결과 표 5에서와 같이 획분 A에는 GlcN₂~GlcN₄, 획분 B에는 GlcN₅~GlcN₈, 획분 C에는 GlcN₈~GlcN₁₆, 마지막으로 획분 D에는 GlcN₁₆ 이상이 각각 분포되어 있음을 알 수 있었다.²³⁾

키틴산 올리고당의 각각을 순도 좋게 분리하기 위해서는 이온교환수지칼럼에 의해서 가능할 수 있다. 즉, Dowex 50 W×4(H⁺) 칼럼(8×100cm)에 올리고당을 흡착시킨 후 1.1, 1.9, 2.6, 3.1, 3.7, 4.1M의 염산을 사용하여 단계적으로 용출시킨 후 닐히드린 발색법으로 570nm에서의 흡과도를 측정하여 검출한다.²²⁾ 또한 村木 등²⁴⁾은 강산성 양이온수지인 Dowex 50W×4(H⁺)를 사용하는 대신 약산성 양이온수지인 TSKgel CM-토요펠 650S(H⁺)를 사용하여 올리고당을 분리하였으며, 이것은 용출시 0.01N 염산과 같은 저농도의 산을 사용한다는 점에서 잇점이 있는 것으로 보고하였다.

2. 효소분해에 의한 키틴·키틴산 올리고당의 제조

1) 효소분해에 의한 키틴 올리고당의 제조

키틴·키틴산을 분해하는 효소는 세균, 방선균, 곰팡이 등과 같은 미생물에 주로 분포되어 있으며, 원형질체의 제조에 이용되고 있다. 키틴 분해에 관여하는 효소는 키틴가수분해효소(chitinase)와 라이소자임으로 나눌 수 있으며, 키틴가수분해효소는 미생물, 식물 및 곤충에 널리 분포되어 있

지만, 소, 양²⁵⁾, 염소²⁶⁾를 제외한 대부분의 포유동물에는 존재하지 않는다. 이들 포유동물들은 라이소자임에 의해서 분해하고 있기 때문에 키틴의 인공피부 이식재료로서 이용될 수 있다. 미생물이 생산하는 키틴 분해효소는 키틴가수분해효소와 β-N-아세틸글루코사민가수분해효소가 있다. 미생물 유래 키틴가수분해효소는 대부분 엔도(endo)형으로서 키틴의 β-1, 4 결합을 랜덤하게 가수분해하여 2당 이상의 올리고당을 주로 생산한다. 또한 β-N-아세틸글루코사민가수분해효소는 키틴 올리고당 및 GlcNAc₂에 작용하여 GlcNAc를 유리시킨다. Takiguchi와 Shimahara²⁸⁾는 호열성 세균을 이용하여 GlcNAc₂만 특이적으로 생산하는 방법을 보고한 바 있다. 그러나 아직까지 5당 이상의 생리활성 올리고당을 특이적으로 생산하는 균주는 발견되지 않고 있다. 여기에서는 키틴가수분해효소와 라이소자임에 대하여 서술하고 또한 Usui 등⁵³⁾이 보고한 저중합도 올리고당으로부터 고중합도 올리고당의 효율적 생산에 관한 흥미로운 연구내용을 함께 서술하고자 한다.

키틴 분해효소인 키틴가수분해효소를 이용하여 키틴 올리고당을 제조하는 것은 오래전부터 수행되어져 왔으나, 키틴이 물을 비롯한 묽은 산과 알칼리에 불용성이어서 효소에 의한 분해작용을 받기가 상당히 어렵기 때문에 올리고당의 수율은 산가수분해법에 비하여 매우 낮다.

澗口와 島原²⁹⁾은 해수로부터 분리동정한 키틴분해균 *Vibrio anguillarum* E-388a를 콜로이드 키틴을 함유한 배지에서 16일간 배양한 배양액으로부터 다량의 N-아세틸키토비오스(GlcNAc₂)를 회수하는데 성공하였다. 그들은 또한 온천수로부터 분리한 호열성세균 *Bacillus licheniformis* X-7u를 이용하여 N-아세틸키토비오스의 생산을 시도한 결과, 배양중에 함유되어 있는 키틴의 약 90%를 4일이내에 분해시켜 다량의 N-아세틸키토비오스와 미량의 N-아세틸키토비오스를 얻었다.²⁹⁾ 이 방법은 분해균의 생육과정에서 생산되는 키틴가수분해효소를 직접 배양액 중에서 키틴에 작용시켜 키틴올리고당을 제조할 수 있는 매우 간단한 방법이라 할 수 있다. 그러나 키틴올리고당이 면역증진효과 및 항종양

효과, 식물방어에 관여하고 있다고 생각되는 키틴가수분해효소활성을 유도하는 유발자(elicitor)활성 등과 같은 생리활성은 대부분 6당 및 7당이상의 고중합도 올리고당에서 발현된다는 점을 고려해 볼 때 고중합도의 올리고당을 생산하는 분해균주의 개발이 요구되고 있으나, 지금까지 개발된 키틴가수분해효소는 저중합도(2~4)의 올리고당은 비교적 효율 좋게 조절할 수 있으나 고중합도(6당이상)의 올리고당의 수율은 매우 낮기 때문에 산업적 응용은 곤란한 실정에 있다.

고중합도 키틴 올리고당을 생산하기 위한 연구로, Usui 등²⁸⁾은 *Nocardia orientalis* IFO 12806이 생산하는 키틴가수분해효소가 가수분해반응을 촉매할 뿐만 아니라 강력한 당전이반응을 수반한다는 사실을 밝혀내고, 저중합도 올리고당을 이용하여 고중합도 올리고당을 효율적으로 생산하는 방법을 시도하였다. 즉, 효소를 고기질 농도 5%의 GlcNAc₄ 존재하에서 0.1M 초산완충액(pH 5.5) 중, 40°C에서 22시간반응을 행하였다. 반응액은 시간경과에 따라 차츰 백색의 혼탁액으로 변한 다음 결국 침전을 생성하고, 이것을 회석가용화하여 Bio-Gel P-4 겔여과크로마토그래피를 한 결과, 기질에 비하여 GlcNAc₆이 21% 얻어졌다는 사실을 보고하였다(그림 4). 또

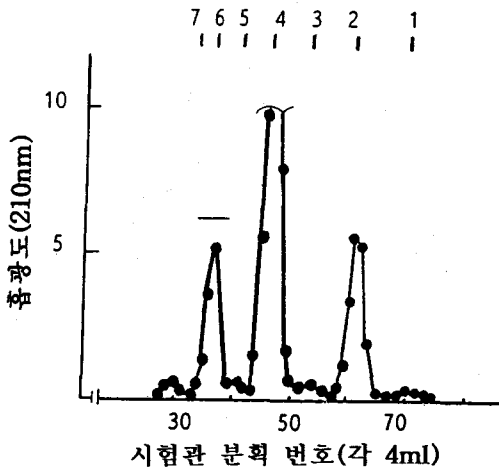


그림 4. GlcNAc₄에 키틴가수분해효소를 작용시켜 얻어진 당전이 반응 생성물의 겔크로마토그래피. 크로마토그래피는

Bio-Gel P-4(200 메쉬) 칼럼(2.6×95cm)으로 50°C에서 수행되었으며, 유출속도는 시간당 12ml이다.

한 2.5% GlcNAc₅를 기질로 하였을 때는 GlcNAc₇이 기질에 비하여 약 18% 얻었다고 하였다³⁰⁾. Usui 등³¹⁾은 *Trichoderma reesei* KDR-11 유래 키틴가수분해효소의 당전이반응에서, 황산암모늄이 함유된 완충용액을 사용함으로써 GlcNAc₆와 GlcNAc₇의 생산량을 크게 증가시킬 수 있었다고 보고하였다. 이러한 결과를 보면 이 효소는 2당 단위로 당사슬을 절단하는 매우 특이성이 높은 당전이작용을 가지고 있다는 것으로 알 수 있다. 그림 5에서 나

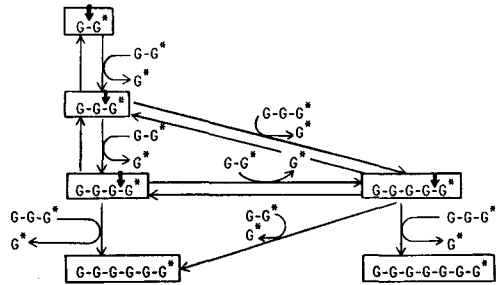


그림 5. Chitinase에 의한 당전이 반응 메카니즘. E, 키틴가수분해효소; G, N-아세틸글루코사민; G*, 환원말단잔기.

타난 당전이반응에 대한 메카니즘을 살펴 보면, 먼저 이 효소는 우선 GlcNAc₄를 분해하여 GlcNAc₂를 생성한 후 이것이 기질인 GlcNAc₄와 반응하여 GlcNAc₆를 합성하는 것으로 판단된다. 이때 황산암모늄을 0~25%까지 첨가시켰을 경우 황산암모늄의 첨가량이 증가할수록 당전이반응이 좀더 효과적으로 일어났으며, 20%의 황산암모늄의 첨가로 GlcNAc₆의 최대생성에 걸리는 시간은 2배로 빨라졌으며 이때의 수율은 1.6배 증가하였다(그림 6).

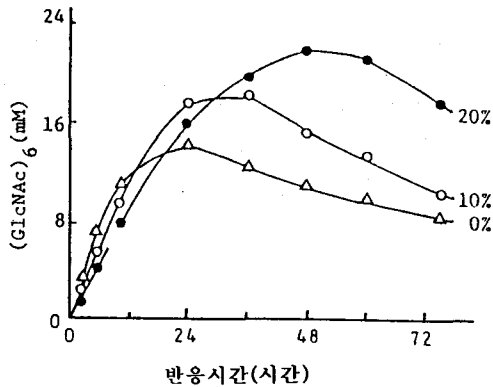


그림 6. 키틴가수분해효소를 매개체로 한 당

전이 반응에서 반응시간 경과에 따른 GlcNAc₆의 생성에 있어서 황산암모늄의 영향. 키틴가수분해효소의 당전이 반응은 0.05M 초산완충용액(pH 5.5)에 0, 10, 20, 및 25%의 황산암모늄과 60mM의 GlcNAc₄를 각각 첨가시켜 수행되었다. GlcNAc₆의 함량은 HPLC에 의해 측정되었다.

최근, Aiba³²⁾는 키틴을 키토산가수분해효소로 가수분해시킬 경우, 기질이 절단되는 부위가 일정하지 않은데 비하여 키토산을 기질로 사용하게 되면 일정한 부위에 존재하는 GlcNAc잔기 때문에 일정한 크기로 가수분해될 수 있다고 판단하여,

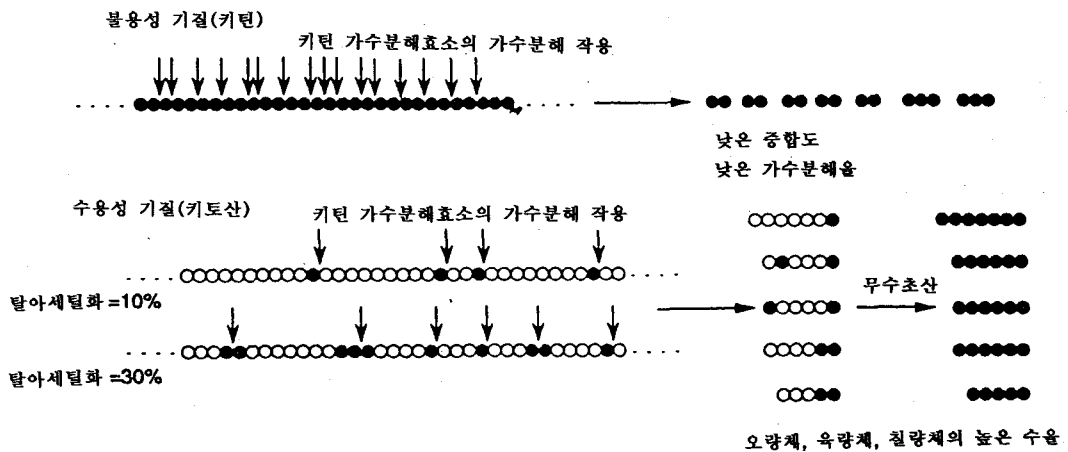


그림 7. 효소반응에 의한 키토산 가수분해와 초산무수물에 의한 N-아세틸화반응으로 N-아세틸키토올리고당을 제조하는 방법.

그림 7에서 보는 것과 같이, 우선 키토산을 기질로 하여 고중합도의 키토산 올리고당을 제조한 후 이것을 무수초산 존재 하에 N-아세틸화하여 키틴 올리고당의 제조를 시도하였다. 아세틸화도 22%인 키토산 200mg에 *Streptomyces griseus* 키틴가수분해효소 1mg을 첨가하여 37°C에서 7일간 반응시켰을 때 트리오스, 테트라오스, 펜타오스 및 헥사오스가 각각 23.5%, 25.5%, 19.6% 및 12.3%로 매우 높게 나

타났으며, 키토산의 아세틸화도는 10~30%가 가장 적당한 것으로 보고하였다. Aiba와 Muraki³³⁾는 생산단가를 감소시키기 위하여 최근에 키토산에 대한 활성작용을 가지고 있는 셀룰로오스가수분해효소, 헤미셀룰로오스가수분해효소 및 리파제와 같이 비교적 값이 싼 효소를 이용하였을 때, 헤미셀룰로오스의 경우 9~22%의 탈아세틸화 키토산을 가수분해하여 20% 이상의 헥사오스를 얻었다고 보고하였다.

한편, 라이소자임은 GlcNAc 잔기 사이의 β -1, 4결합을 특이적으로 분해하는 효소로서 키틴의 가수분해에 관여한다. 라이소자임은 6개의 소단위체로 되어 있으며, 문자로서 A부터 F까지로 나타낸다. 그 중에서도 C와 E 소단위체가 GlcNAc와의 결합에 관여하여 부분적으로 N-아세틸화된 올리고당의 생성반응을 촉진하게 된다³⁴⁾. Nordtveit 등³⁵⁾은 라이소자임이 부분적으로 N-아세틸화된 키토산을 분해할 때, 초기 가수분해속도에는 3개 혹은 4개 이상의 아세틸화된 잔기를 함유하고 있는 육량체들이 가장 크게 기여하며, 95% 이상 아세틸화된 키토산(5% 탈아세틸화된 키틴)은 라이소자임에 의해서 전혀 가수분해가 진행되지 않는다고 보고한 바 있다. 라이소자임의 가수분해력이 키토산의 아세틸화도에 미치는 영향에 대한 검토에서 아세틸화도가 0.12에서 0.60으로 증가할수록 반응은 비례적으로 급격하게 증가한다는 사실을 밝혔다³⁶⁾. 따라서 라이소자임의 가수분해는 키틴에 가까울수록 높은 분해도를 나타낸다는 사실을 알 수 있다.

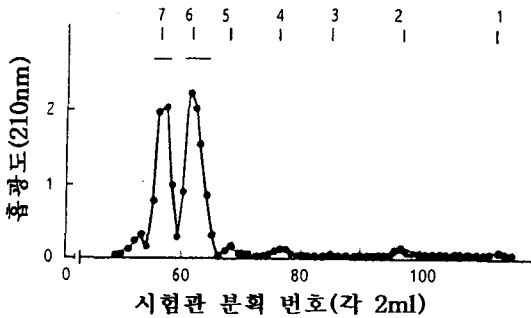


그림 8. GlcNAc에 라이소자임을 작용시켜 얻어진 당전이 반응 생성물의 겔크로마토그래피. 크로마토그래피는 50°C에서 Bio-Gel P-4(200-400 메쉬) 칼럼(2×100cm)으로 수행되었으며, 유출속도는 시간당 12ml이다.

라이소자임이 가수분해효소이지만 당전이반응에도 작용하는 효소로 잘 알려져 있다. Usui 등³⁷⁾은 계란 흰자 라이소자임을 이용하여 키틴 올리고당의 최소단위인 GlcNAc₂에서 고중합도 올리고당의 개발을 시도하였다. GlcNAc₂를 10% 기질농도로 하여 30% 황산암모늄을 함유한 0.1M 초산완충액(pH 4.0) 중에 라이소자임 1%를 첨가하여 70°C에서 반응을 진행시켰는데, 시간이 경과할수록 백색의 현탁물질이 다량으로 침전되기 시작하여 8시간 반응종료 후 원심분리하여 모은 다음 다시 녹여서 Bio-Gel P-4 겔여과크로마토그래피하였을 때, 그림 8에서와 같이 GlcNAc₆과 GlcNAc₇이 각각 9.5% 및 6.5%(GlcNAc₂ 기질에 대한 중량%) 생성되었다. 이러한 결과는 라이소자임은 당전이반응에 의해 GlcNAc₂에서 고중합도의 올리고당을 매우 용이하게 생성한다는 사실을 알 수 있다.

2) 효소분해에 의한 키토산 올리고당의 제조

키토산을 가수분해하는 대표적인 효소인 키토산가수분해효소는 토양 미생물과 몇몇 식물에 널리 분포하고 있으며, 특히 식물에서는 병원성 곰팡이에 대한 방어수단에 관여하고 있다³⁸⁾. 키토산가수분해효소가 키틴가수분해효소와 구별되는 것은 다른 종류의 효소에 비해 명확하지는 않지만, 결국 키토산의 아세틸화도에 따라서 분해능을 달리하고 있다³⁹⁾. 키틴가수분해효소는 N-아세틸화가 큰 다당류를, 키토산가수분해효소는 상대적으로 낮은 N-아세틸화도를 가지고 있는 키토산을 각각 효율적으로 분해하고 있다⁴⁰⁻⁴²⁾. 또한 키토산가수분해효소는 대부분 키틴가수분해효소보다 분자량이 낮다고 하는 특징을 가지고 있다³⁸⁾.

대부분의 박테리아와 곰팡이는 세포외로 키토산가수분해효소를 분비한다⁴³⁾. 세포내 키토산가수분해효소는 식물⁴⁴⁾과 접합균류(zygomycete) 곰팡이⁴⁵⁾에서 발견되었다. 그 이외에도 *Bacillus megaterium* P1, *B. licheniformis* UTK⁴⁶⁾, *Mucor rouxii*⁴⁵⁾, *Cucumis sativus* 그리고 몇몇 식물종⁴⁴⁾에서 다양한 형태의 키토산가수분해효소가 발견되었다. Osswald 등⁴⁷⁾은 *Citrus sinensis*로부터 11종의 동위형(isoform)을 가지고 있는 효소를 분리하였으며, 그 중에서 4종

류는 키틴가수분해효소와 키토산가수분해효소 활성을 모두 가지고 있었으며, 나머지는 키틴가수분해효소 활성만 가지고 있었다고 하였다.

키토산가수분해효소는 추출된 개체나 종에 따라서 가수분해 작용 패턴이 서로 다르며, 그것은 사용된 기질의 아세틸화도에 따라 결정된다⁴⁸⁾. 지금까지 문헌에서 보고된 키토산가수분해효소들은 엔도형이 대부분이며, 이것은 가수분해물로서 이량체, 삼량체 및 사량체 등의 키토산 올리고

당을 생산한다. Nanjo 등⁴⁹⁾은 *Nocardia orientalis*의 배양액으로부터 새로운 형태의 엑소형 키토산가수분해효소(키토산 혹은 그 올리고당의 비환원형 말단으로부터 글루코사민 단당류만을 유리시킴)를 분리하여, 엑소-β-D-글루코사민가수분해효소로서의 특성을 밝혔다. 지금까지 보고된 여러 가지 종으로부터 유래된 키토산가수분해효소들의 생화학적 성질에 대하여 표 6에 정리하였다.

표 6. 키토산가수분해효소의 특성과 작용모드

효소를 생산하는 미생물	분자량 (kDa)	최적pH	최적온도 (°C)	키토산에 대한 반응속도상수		특정기질에 대한 활성 (units/mg 단백질)	최수율 (%)	기질 키토 효소의 아세틸화도(%) ※	효소의 작용모드
				Km (mg/ml)	Vmax				
<i>Streptomyces</i> sp. No. 6 ⁹²⁾	29(GF) 26(SDS)	4.5 - 6.5	50	0.668	ND	105	28	-	-
<i>Streptomyces griseus</i> ⁹³⁾	35(SDS)	8.0	37	2.1	96.5 U/mg	2.76	22	-	-
<i>Streptomyces N-174</i> ⁷⁹⁾	29.5(SDS)	5.5	65	0.088	ND	59.8	27	1-21	ND
<i>Amycolatopsis</i> sp. CsO-2 ⁹⁴⁾	27(SDS)	5.3	55	ND	ND	38.8	63	0	ND
<i>Nocardia orientalis</i> ⁷⁸⁾	24(GF) 26(SDS)	5.0-6.0	50	ND	ND	61.4	31	30	GlcN-GlcN 혹은 GlcNAc 사이의 결합을 절단
<i>Mycobacter</i> AL-1 ⁷³⁾	31(GF) 28.9(AA)	5.0&6.8	70	0.3	0.75 × 10 ⁻⁹ mol/min	800	2	-	-
<i>Bacillus</i> R4 ⁷⁴⁾	31(GF)	5.6	40	ND	ND	35.6	17.4	-	-
<i>Bacillus circulans</i> ⁹⁵⁾	ND	4.5-7.0	60	ND	ND	13.8	14	20	ND
<i>Bacillus</i> sp. No. 7-M ⁹⁶⁾	30(GF) 41(SDS)	6.0	50	33	ND	319	18.2	ND	GlcN-GlcN 사이의 결합을 절단
<i>Bacillus circulans</i> MH-K1 ⁷⁶⁾	27(GF) 32(SDS)	6.5	50	0.63	12.5 umol/min/ml	160	43	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i> ch-1 ⁸⁷⁾	31(SDS)	NA	NA	NA	ND	NA	12	-	-
UTK ch-2	26(GF)	NA	NA	NA	ND	NA	34	-	-
<i>Bacillus</i> sp. PI-7S ⁹⁰⁾	25(GF) 43(SDS)	5.0	37	ND	ND	NA	NA	1	ND
<i>Bacillus megaterium</i> P1 ⁶⁸⁾	43(SDS) 23(GF)	4.5-6.5	50	0.82	286.3 U/mg	154.8	35	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp. H-14 ⁹⁷⁾	35(SDS)	4.0	30	ND	ND	51.8	55.2	0	ND
<i>Enterobacter</i> sp. G-1 ⁹⁸⁾	50(SDS)	7.0	50	-	ND	5.84	25.8	20	GlcNAc-GlcNAc 사이의 결합을 절단
<i>Penicillium islandicum</i> ⁹⁷⁾	30(GF)	4.5-6.0	45	1.4	2.7 umol/min	10.1	42	30-60	GlcNAc-GlcN 사이의 결합을 절단
<i>Fusarium solani</i> f. sp. phaseol ⁸¹⁾	36(SDS)	5.6	40	ND	ND	5.7	10	30	ND
<i>Mucor rouxii</i> Ch A	76(SDS)	5.0	55	50	8.13	ND	42.7	72	39
Ch B ⁸⁶⁾	58	5.0	55	50	8.65	ND	102.3	25	ND
<i>Rhodotorula gracilis</i> ⁹⁹⁾	100(GF)	4.5	45	0.83	142 U/mg	200	34	-	-

SDS: SDS-전기영동법; GF: 겔여과법; AA: 아미노산 분석; NA: 유용하지 않는 데이터; ND: 불검출.; ⁹키토산가수분해효소 A에 대해서만 한정된 데이터.
※ 최적 효소활성에 대한 것

또한 표 6에서는 여러 가지 종에 유래된 따라서 키토산가수분해효소의 서로 다른 가수분해 작용 패턴을 나타내었다. 이것은 앞에서도 서술하였 듯이 기질인 키토산의 중합도와 아세틸화도에 따라 크게 의존하고 있다. 지금까지 보고된 대부분의 키토산가수분해효소들은 엔도형의 작용패턴을 가지는 것들을 중심으로 개발되어져 왔다. 이들 효소에 의한 키토산의 가수분해는 단당류의 생성이 없이 이량체, 삼량체 및 사량체를 비롯한 각종 분자량의 올리고당을 생산하기 때문에 키토산 올리고당의 생리활성 측면에서 볼 때, 키토산가수분해효소의 작용패턴은 상당히 중요하게 다루어져야 한다. 키토산가수분해효소의 가수분해율과 키토산의 아세틸화도의 관계에 관한 보고로서, *Bacillus circulans* MH-K-1⁵⁰⁾과 *Streptomyces* N-174⁵¹⁾ 유래 키토산가수분해효소들은 비교적 넓은 범위의 아세틸화도를 가진 키토산 기질에도 효율적으로 가수분해반응을 촉매하는 것으로 알려져 있다. 반대로, *F. solani*⁴³⁾와 *N. orientalis*⁵¹⁾ 유래 키토산가수분해효소들은 30% 아세틸화도를 가지고 있는 키토산에서만 그리고 *Enterobacter* G-1 효소는 20% 아세틸화도의 키토산에서만 각각 최적활성을 보인다⁵²⁾. *Bacillus licheniformis* UTK의 키토산가수분해효소는 65~80% 탈아세틸화된 키토산에서 최적활성을 나타낸다⁵³⁾. *P. islandicum* 유래 키토산가수분해효소의 가수분해작용에 의해 생성된 올리고당은 그 환원말단 부분에 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)을 가지고 있는 이량체 혹은 삼량체가 주성분인 특징을 가지고 있다. 이 효소는 키토산의 N-아세틸글루코사민과 글루코사민 사이를 특징적으로 분해한다는 것을 의미하고 있다. 그렇게 때문에 50%의 아세틸화도를 가진 키토산에서 이효소는 최적활성을 나타내고 있다⁶⁷⁾. *Bacillus circulans* MH-K1 키토산가수분해효소는 80% 탈아세틸화 키토산에서 최적활성을 나타낸다⁵³⁾. *P. islandicum* 유래 키토산가수분해효소의 가수분해작용에 의해 생성된 올리고당은 그 환원말단 부분에 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)을 가

지고 있는 이량체 혹은 삼량체가 주성분인 특징을 가지고 있다. 이 효소는 키토산의 N-아세틸글루코사민과 글루코사민 사이를 특징적으로 분해한다는 것을 의미하고 있다. 그렇기 때문에 50%의 아세틸화도를 가진 키토산에서 이 효소는 최적활성을 나타내고 있다⁵⁴⁾.

Bacillus circulans MH-K1 키토산가수분해효소는 80% 탈아세틸화 키토산에서 활성이 가장 높다. 이 효소는 키토산 분자내에서 N-아세틸글루코사민 잔기가 어떤 위치에 있느냐에 따라서 올리고당의 생성에 영향을 미치게 된다⁵⁰⁾. *N. orientalis* 유래 키토산가수분해효소는 최대활성을 위해 4개 이상의 글루코사민을 가진 키토산을 요구하고 있는데, 이 효소는 글루코사민과 글루코사민 혹은 N-아세틸글루코사민 사이의 결합을 절단할 수 있지만, N-아세틸글루코사민과 글루코사민 사이의 결합은 절단하지 못하는 특성을 보인다⁵¹⁾. *Enterobacter* sp. G-1 유래 효소는 콜로이달 키틴, 콜로이달 키토산(80% 탈아세틸화도) 그리고 NACOS(이량체-육량체)를 가수분해시키지만, COS(이량체-육량체)나 100% 탈아세틸화된 콜로이달 키토산은 가수분해하지 못하는데, 이것은 이 효소의 촉매활성부위가 N-아세틸기를 인식한다는 것을 의미하고 있다⁵²⁾. 100% 탈아세틸화 키토산에 가장 높은 활성을 보이는 효소는 *Bacillus* sp. P1-7S⁵⁵⁾, *Amycolatopsis*⁵⁶⁾ 및 *Pseudomonas* sp. H-14⁵⁷⁾ 등이 있다. *Bacillus* 유래 효소들은 키토산의 분자구조 중 GlcN-GlcN에 대해서만 특이적으로 절단하고 있다. 그리고 대부분의 이들 효소들은 적어도 3 혹은 4개 이상의 글루코사민 혹은 N-아세틸글루코사민 잔기를 함유한 기질일 경우에만 활성을 나타내는 것이 공통점이다⁵⁵⁾.

Sakai 등²⁶⁾은 *Bacillus* R-4에서 키토산가수분해효소를 이용하여 키토산 올리고당을 생산하기 위하여 80%와 100% 탈아세틸화된 키토산을 가수분해시킨 결과, 80% 탈아세틸화 키토산은 100% 탈아세틸화 키토산에 비해 명확하게 분해율이 낮았으며(그림 9), 6시간 가수분해반응에서

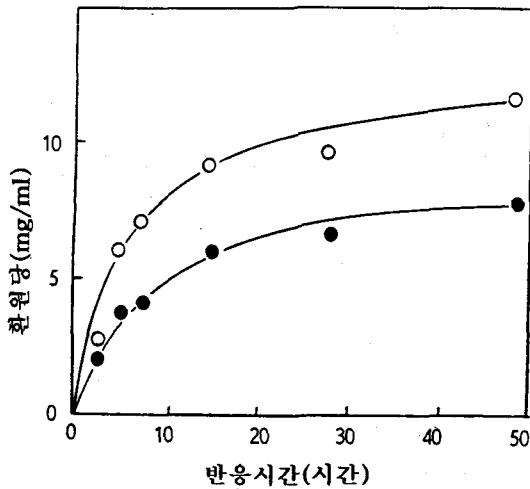


그림 9. *Bacillus* R-4 유래 키토산가수분해효소에 대하여 각각 100% 탈아세틸화 키토산(○)과 80% 탈아세틸화 키토산(●)을 기질로 하였을 때의 가수분해를 비교. 반응은 2.0g의 기질과 2.0U의 효소를 50mM 초산완충용액(pH 5.5)에 녹여 혼합물의 최종 부피를 200ml로 한 후 40°C에서 반응시켰다.

는 $\text{GlcN}_2 \sim \text{GlcN}_6$ 가 주생성물이며, 48시간 반응하였을 경우에는 $\text{GlcN}_2 \sim \text{GlcN}_4$ 가 주생성물임을 확인하였다. 이때 각 올리고당의 수율은 GlcN_2 가 14%, GlcN_3 가 32%, GlcN_4 가 30% 생성되었다고 보고하였다.

Izume와 Ohtakara⁵⁸⁾는 *Bacillus* sp. No-7M 유래 정제 키토산가수분해효소(52.5U)를 이용하여 효소분해에 의해 중합도 2~5의 키토산 올리고당을 높은 수율로 얻기 위하여, 5% 키토산 유산용액(pH 5.4) 50ml에 키토산가수분해효소 52.5U를 첨가하여 37°C에서 6시간 반응을 시킨 다음 역상칼럼을 이용한(TSK-gel NH_2 -60 칼럼, $4.6 \times 25\text{cm}$) HPLC로 분리하였을 때 그림 10과 같이 중합도 2~6의 올리고당을 얻었다. 반응시간의 경과에 따른 생성된 올리고당의 조성은 1시간 반응에서는 $\text{GlcN}_3 \sim \text{GlcN}_8$ 였으나, 더 이상의 시간이 경과할 수록은 GlcN_5 이상의 올리고당은 감소하는 반면에 $\text{GlcN}_2 \sim \text{GlcN}_4$ 의 올리고당

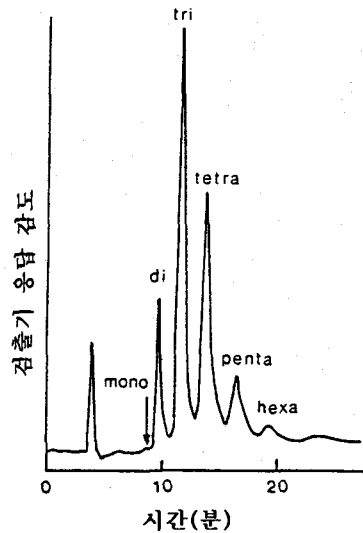


그림 10. *Bacillus* sp. No. 7-M 유래 키토산가수분해효소로 키토산을 가수분해하였을 때 생성된 올리고당의 HPLC 패턴

은 점차 증가하였고, 8시간 가수분해하여도 단당류인 글루코사민은 매우 적은 양만이 검출되었다고 보고하였다⁵⁹⁾.

한편, 셀룰로오스와 키토산은 글루코오스의 C-2 위치에 수산기와 아미노기의 차이를 제외하고는 상당히 유사한 화학구조를 가지고 있기 때문에 셀룰로오스를 가수분해하는 효소인 셀룰로오스 가수분해효소를 이용하여 키토산을 가수분해하여 키토산 저분자화 물질 내지 올리고당을 생산하고 있다⁶⁰⁾. 夜久⁶⁰⁾는 키토산용액(1~3%)에 부분정제된 시판 셀룰로오스 가수분해효소를 0.1~0.2% 농도로 첨가하여 40~60°C에서의 효소반응을 진행시켰을 때, 60°C에서의 30분 효소반응에 의해 분해율은 78.3% 그리고 50°C에서 30분 효소분해에 의해 32.5%였으며, 올리고당의 조성은 대부분 $\text{GlcN}_2 \sim \text{GlcN}_9$ 이며, 비교적 고차 올리고당을 생성시킬 수 있다고 보고한 바 있다.

현재, 키토산 올리고당을 생산하는데 있어서 가장 초점이 되는 부분은 효소적 가수분해로 생리활성이 우수한 고중합도 올

리고당(오랑체 이상)만을 특이적으로 생산하는 효소의 개발이다. 키틴 올리고당은 몇몇 키틴가수분해효소^{31, 32)}와 라이소자임³⁷⁾을 이용하여 당전이반응으로 고중합도 키틴 올리고당을 생산할 수 있으나, 키토산 올리고당의 생산에서는 아직 이러한 효소가 개발되지 못하였다. 그러나 키틴에 비하여 키토산은 산성영역의 수용액에서 녹기 때문에 대량 생산이 가능하다. 이에 대한 연구로서 Yamasaki 등⁵³⁾에 의한 고정화 효소를 이용한 키토산 가수분해물의 생산이 있다. 즉, *Enterobacter* sp. G-1을 물리적 흡착법으로 키토펄(Chitopearl: 키토산으로 만든 상업용 담체)에 고정화시킨 효소로 1% 키토산용액을 17일간 연속적으로

가수분해할 수 있으며, 이때 최초 효소활성의 50%를 유지하고 있다고 보고하였다.

저자 등⁶¹⁾은 *Bacillus pumilus* 유래 키토산가수분해효소를 키틴에 물리적 흡착법으로 제조한 고정화 효소가 유리 효소에 비하여 90%이상의 높은 활성을 유지하고 있음을 확인하고, 이것을 키토산 올리고당의 생산에 이용하였다. 60°C에서 2시간 반응으로 고차 올리고당인 GlcN₄~GlcN₆이 약 90%이상 함유하고 있었으며, 반응속도에서 고정화효소는 유리효소에 비해 반응속도는 낮지만, 높은 농도의 기질에서 전혀 기질저해반응을 보이지 않았기 때문에 대량 생산에 이용할 수 있는 가능성을 밝혔다(그림 11). 또한 저자는 효소적 가수

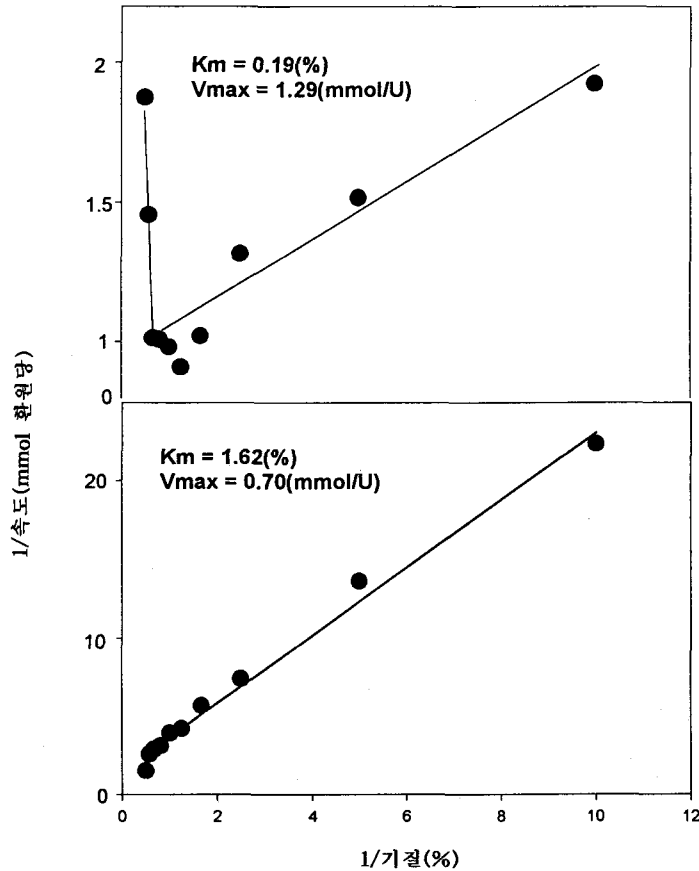


그림 11. 유리효소(위)와 고정화 효소(아래)의 K_m 및 V_{max} . 키토산에 대한 효소반응속도는 Lineweaver-Burk 플롯으로 계산하였다.

분해에 의한 키토산 올리고당의 생산을 산업적으로 적용시켰을 때, 대량으로 소모되는 효소의 높은 생산비용을 절감하기 위하여 효소의 재이용을 위한 새로운 생산 시스템의 개발을 시도하였다. 이를 위하여 최근 식품공정에서 크게 각광을 받고 있는 한외여과막을 생물반응기와 결합시킨 한외여과막 효소반응기를 키토산 올

리고당의 생산에 적용시켰다. 그러나 이것은 키토산의 높은 점성으로 인하여 막에서 막힘(fouling)현상이 일었기 때문에 고정화효소가 충전된 칼럼반응기를 통하여 일차적으로 키토산을 저분자화하여 키토산의 점성을 대폭적으로 감소시킨 후 한외여과막 반응기가 도입된 생산공정

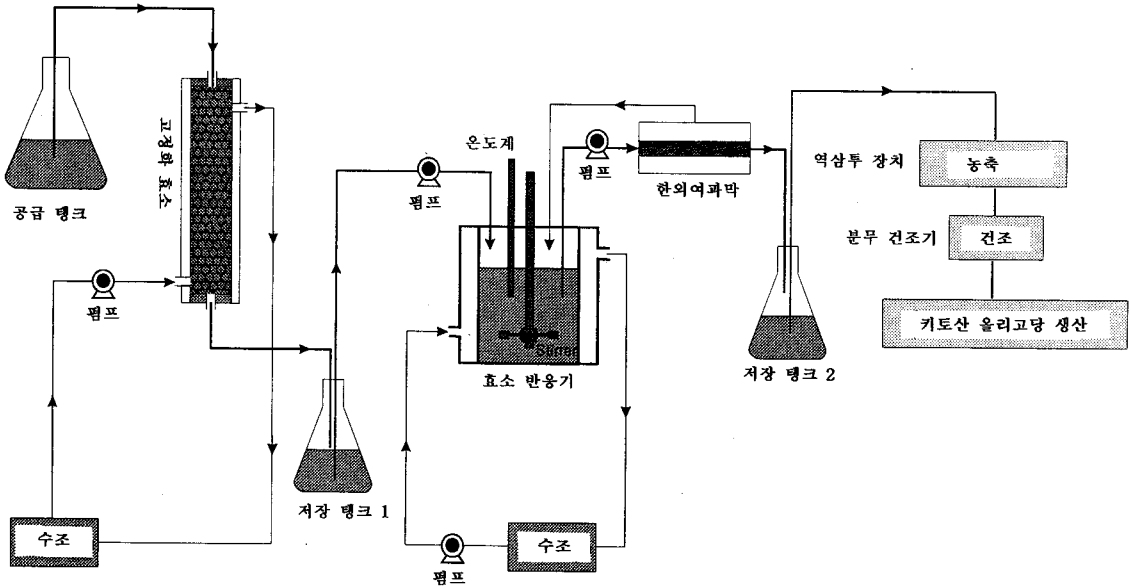


그림 12. 고정화 효소 반응기가 결합된 한외여과막 효소 반응기 시스템을 이용한 키토산 올리고당의 연속적 생산 개략도.

시스템(그림 12)에 적용시킨 결과, 연속적이면서도 대량적 키토산 올리고당의 생산이 가능하게 되었다. 이 시스템의 장점은 사용하는 막의 종류에 따라 원하는 분자량의 키토산 올리고당을 생산할 수 있으며, 생리활성을 거의 기대할 수 없는 GlcN₃ 이하의 올리고당 및 단당류는 막을 통하여 순환되는 동안 막의 외부로 빠져나게 제거할 수 있다^{62, 63}. 저자 등은 실질적으로 이 시스템을 이용하여 키토산 올리고당의 분자량 크기의 범위를 3종류(MW 10KDa~5KDa, 5KDa~1KDa, 1KDa 이하)로 나누어 항균활성 및 항암활성과 같은 생리활성을 검토한 바 있다¹⁵.

맺 음 말

키틴·키토산 올리고당이 높은 생리활성을 가지고 있다는 사실이 밝혀진 이후에 이들 올리고당을 효소적으로 생산하려는 연구가 많이 시도되고 있다. 그러나 아직까지도 산가수분해법에 의한 올리고당의 생산이 이루어지고 있으나, 이러한 방법은 올리고당의 조성을 조절하기가 어렵고, 특히 고중합도 올리고당의 수율이 매우 낮다고 하는 결정적인 결점을 가지고 있다. 또한 인체의 유해성 논란으로 인하여 국내 보건복지부 식품규정에서는 이를 금지

시키고 있는 실정이다. 현재 많은 연구자들에 의해 키토산 올리고당을 효율적으로 생산하고자 많은 효소가 탐색되고 있으나 아직까지 유용한 올리고당만을 특이적으로 생산하는 효소는 개발되지 않고 있다. 키토산의 경우 당전이반응에 관여하는 효소를 이용하여 높은 생리활성 올리고당을 합성하는 방법이 개발되었지만, 키토산은 아직 이에 관한 연구가 보고된 바 없다. 그러나 키토산이 키토산에 비해 약산성의 수용액에서 잘 녹기 때문에 새로운 공정의 개발로 대량 생산이 가능하며, 이를 위해 한외여과막 효소 반응기를 이용함으로써 효소의 재이용으로 인한 생산비 절감, 원하는 분자량 크기의 올리고당 생산 가능, 올리고당의 연속적 대량생산이 가능한 점 등의 여러 가지 잇점을 달성할 수 있었다.

현재로서는 높은 활성을 가지고 있는 효소를 개발하는 것이 가장 절실한 실정이며, 또한 키토산 올리고당과 같이 키토산 올리고당도 당전이반응에 관여하는 효소를 개발하여 유효한 올리고당의 합성을 효율적으로 생산할 수 있는 방안이 마련되길 기대한다.

끝으로 키토산·키토산 올리고당이 여러분야에서 우수한 생리활성을 나타내고 있는 만큼 생체내에서의 안전성에 관한 사항들을 명확하게 검토한 후 의약품으로서도 활용할 수 있기를 바라며, 또한 꾸준한 연구개발에 의하여 이들 올리고당의 용도를 더욱 다양하게 개발할 필요가 있다고 본다.

참고문헌

- 1) Gordon, D. T. and Williford, C. B. : ACS Symposium Series 214, *Unconventional Source of Dietary Fibers*, pp. 156-184 (1983).
- 2) Bough, W. A. and Landes, D. R. : *J. Dairy Sci.*, 59, 1874(1976).
- 3) 전유진, 김세권 : 한국생물공학회지, 9, 312(1994).
- 4) Aiba, S., Izume, M., Minoura, N., Fujiwara, Y. : *British Polym. J.*, 17, 38 (1985).
- 5) Urugami, T. and Saito, M. : *Sepa. Sci. Technol.*, 24, 541(1989).
- 6) Ghaouth, A. E. Arul, J. and Asselin, A. : *Proceeding from the 5th International Conference on Chitin and Chitosan*, Vol. 5, pp. 440-452, New Jersey, USA(1991).
- 7) 大浦武彦, 階川英彦 : 西日本皮膚科, 54, 998(1992).
- 8) 安瀬正紀, 千島康稔, 西條正城 : 西日本皮膚科, 54, 1182(1992).
- 9) Nishimura, K., Ishihara, C., Ukei, S., Tokura, S. and Azuma, I. : *Vaccine*, 4, 151(1986).
- 10) 内田 泰 : *フードケミカル*, 2, 22 (1988).
- 11) 奥田拓道 : *月刊フードケミカル*, 2, 33 (1995).
- 12) 加藤秀夫 : *キチン・キトサン健康讀本*1, No. 2, pp. 46-49, 東洋醫學舎(1995).
- 13) Weiner, M. L. : *Proceeding from the 5th International Conference on Chitin and Chitosan*, Vol. 5, pp. 663-672, New Jersey, USA(1991).
- 14) Suzuki, S., Watanabe, T., Mikami, T., Matsumoto, T. and Suzuki, M. : *Proceeding from the 5th International Conference on Chitin and Chitosan*, pp. 96-105, New Jersey, USA(1991).
- 15) 전유진, 김세권 : 한국키토산연구회지, 2(3), 60(1997).
- 16) Rupley, S. A. : *Biochim. Biophys. Acta.*, 83, 245(1964).
- 17) Bosso, C., Defaye, J., Domard, A., Gadelle, A. and Pedersen, C. : *Carbohydr. Res.*, 156, 57(1986).
- 18) Kurita, K., Tomita, K., Ishii, S., Nishimura, S.-I., and Shimoda, K. : *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.*, 31, 2393(1993).
- 19) Takahashi, Y., Miki, F. and Nagase, K. : *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 68, 1851

- (1995).
- 20) Sakai, K., Nanjo, F. and Usui, T.: *Denpun Kagaku*, 37, 79-86(1990).
- 21) Horowitz, S. T., Roseman, S. and Blumenthal, H. J.: *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 5046(1957).
- 22) 坂正和男: キチン・キトサンハンドブック, キチン・キトサン研究会編, pp. 209-218, 技報堂出版(1995).
- 23) 夜久富美子: 月刊フードケミカル, 2, 91(1993).
- 24) 村木永之介, 夜久富美子: *Chemistry Express*, 6, 121(1991).
- 25) Lundblad, G., Elander, M., Lind, J. and Slettingren, K.: *Eur. J. Biochem.*, 100, 455(1979).
- 26) Lundblad, G., Hederstedt, B., Lind, J. and Steby, M.: *Eur. J. Biochem.*, 46, 367(1974).
- 27) Takiguchi, Y. and Shimahara, K.: *Agric. Biol. Chem.*, 53, 1537(1989).
- 28) Usui, T., Hayashi, Y., Nanjo, F., Sakai, K. and Ishido, Y.: *Biochim. Biophys. Acta*, 923, 302(1987).
- 29) 滝口・島原: 日本農藝化学會誌, 63, 167(1989)
- 30) Nanjo, F., Sakai, K., Ishikawa, M., Isobe, K. and Usui, T.: *Agric. Biol. Chem.*, 53, 2189(1989).
- 31) Usui, T., Matsui, H. and Isobe, K.: *Carbohydr. Res.*, 203, 65(1990).
- 32) Aiba, S.: *Carbohydr. Res.*, 265, 323(1994).
- 33) Aiba, S. and Muraki, E.: 2nd ASIA PACIFIC CHITIN SYMPOSIUM, pp. 236-241, Bangkok(1996).
- 34) Amano, K. and Ito, E.: *Eur. J. Biochem.*, 85, 97(1978).
- 35) Nordtveit, R. J., Varum, K. M. and Smidsrod, O.: *Carbohydr. Polym.*, 23, 253(1994).
- 36) Nordtveit, R. J., Varum, K. M. and Smidsrod, O.: *Carbohydr. Polym.*, 29, 163(1996).
- 37) 碓永泰市, 磯部清志, 松井秀憲: 第3回 キチン・キトサン・ポジウム講演要旨集, pp. 30-31(1988).
- 38) Grenier, J. and Asselin, A.: *Mol. Plant Microb. Interact.*, 3, 401(1990).
- 39) Osswald, W. F., Shapiro, J. P., McDonald, R. E., Niedz, R. P. and Mayer, R. T.: *Experientia*, 49, 888(1993).
- 40) Pelletier, A. and Sygusch, J.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 844(1990).
- 41) Pelletier, A., Lemire, I., Sygusch, J., Chornet, E. and Overend, R. P.: *Biotechnol. Bioeng.*, 36, 310(1990).
- 42) Nanjo, F., Ishikawa, M., Katsumi, R. and Sakai, K.: *J. Biol. Chem.*, 265, 10088(1990).
- 43) Shimosaka, M., Nagawa, M., Ohno, Y. and Okazaki, M.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 57, 231(1993).
- 44) Ouakfaoui, S. E. and Asselin, A.: *Phytochemistry*, 31, 1513(1992).
- 45) Alfonso, C., Martinez, M. J. and Reyes, F.: *FEMS Microbiol. Lett.*, 95, 187(1992).
- 46) Uchida, Y., Tateishi, K., Shida, O., Kodowaki, K.: Adv. Chitin Chitosan (ed. C. J. Brine, P. A. Sandford and J. P. Zikakis), pp. 282-291, Elsevier, London(1992).
- 47) Osswald, W. F., Shapiro, J. P., Doorstdar, H., McDonald, R. E., Niedz, R. P., Nairn, C. J., Hearn, J. and Mayer, R. T.: *Plant Cell Physiol.*, 35, 811(1994).
- 48) Seino, H., Tsukuda, K. and Shimasue, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, 55, 2421(1991).
- 49) Nanjo, F., Katsumi, R., Sakai, K.: *J. Biol. Chem.*, 265, 10088(1990).
- 50) Yabuki, M., Uchiyama, A., Suzuki, A., Ando, A. and Fuji, T.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 34, 255(1988).
- 51) Sakai, K., Katsumi, R., Isobe, A. and Nanjo, F.: *Biochem. Biophys. Acta*, 1097, 65(1991)

- 52) Yamasaki, Y., Hayashi, I., Ohta, Y., Matsuda, H. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 57, 444(1993).
- 53) Yamasaki, Y., Fukumoto, I., Kumagai, N., Ohta, Y., Nakagawa, T., Kawamukai, M. and Matsuda, H. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 56, 1546(1992).
- 54) Fenton, D. and Eveleigh, D. E. : *J. Gen. Microbiol.*, 126, 151(1981).
- 55) Uchida, Y. and Ohtakara, A. : *Meth. Enzymol.*, 161, 501(1988).
- 56) Okajima, S., Ando, A., Shinoyama, H. and Fujii, T. : *J. Ferment. Bioeng.*, 77, 617(1994).
- 57) Yoshihara, K., Hosokawa, J., Kubo, T., Nishiyama, M. and Kobo, Y. : *Biotechnol. Biochem.*, 56, 972(1992).
- 58) Uchida, Y., Izume, M. and Ohtakara, A. : *Chitin and Chitosan*(ed. Skjak-Braek, G., Anthonsen, T. and Sandford, P.), pp. 373-382, Proceedings from the 4th International Conference on Chitin and Chitosan held in Trondheim, Norway(1988).
- 59) Izume, M. and Ohtakara, A. : *Agric. Biol. Chem.*, 51, 1189(1987).
- 60) 夜久富美子, 四國工研究會報, 42, 15 (1991).
- 61) 전유진, 박표잠, 변희국, 송병권, 김세권 : 한국생물공학회지, 13, 147 (1998).
- 62) Se-Kwon Kim and You-Jin Jeon : Proceeding of the International Symposium and 1997 Spring Meeting of the Japanese Society for Chitin and Chitosan, pp. 144-145, Shizuoka (1997).
- 63) 전유진 : 부경대학교 박사학위논문 (1998).