

Chitosan과 Chitooligosaccharides의 응집성

박 헌 국

동남보건대학 식품영양과

Aggregation Property of Chitosan and Chitooligosaccharides

Heon-Kuk Park

Dept. of Food and Nutrition, Dongnam Health College, Suwon 440-714, Korea

Abstract

Chitooligosaccharides were prepared by enzymatic hydrolyzing of crab shell chitosan. Low molecular weight chitooligosaccharide I, 64.3% of which was composed of trimer, tetramer, and pentamer, was obtained by hydrolyzing chitosan with the chitosanase originated *Bacillus pumilus* BN-262. High molecular weight chitooligosaccharide II, 49.3% of which was composed of chitooligosaccharides over heptamer, was obtained by hydrolyzing chitosan with the cellulase originated *Trichoderma viride*. Aggregation property of chitosan and chitooligosaccharides was tested. Chitosan was aggregated with inorganic compounds containing divalent negative ions or organic compounds containing negatively charged polymer compounds such as proteins and nucleic acids. Chitooligosaccharide I which was hydrolyzed moderately was not precipitated with inorganic compounds but was precipitated with organic compounds containing polymer compounds. Chitooligosaccharide II which was hydrolyzed slightly was precipitated with inorganic compounds containing divalent negative ions or organic compounds containing negatively charged polymer compounds such as proteins and nucleic acids.

Key words: chitosan, chitooligosaccharides, aggregation property.

서 론

건강한 생활을 유지하기 위해서는 균형 잡힌 식생활이 중요하다라는 사실이 잘 알려져 있지만 외식 기회의 증가와 가공식품의 이용량이 매년 증가하면서 균형 잡힌 식생활을 영위하지 못하고 있다¹⁾. 외식은 한정된 메뉴 이외에는 선택할 수 없기 때문에 영양의 불균형을 초래하기 쉽고 가공식품은 가공 단계에서 주요 성분이 파괴되기 쉽다. 산업화가 신속히 진행되면서 여성의 취업률이 늘어나게 됨으로써 시간과 노력이 필요한 요리가 식탁에서 사라지고 간편하게 조리할 수 있는 요리가 주로 식탁에 오르게 되어 영양의 불균형은 날로 심화되고 있는 실정이다. 또한 산업화의 진행이 빨랐던 우리나라의 경우 노인 인구는 매우 빠르게 증가하고 있으나 이에 대한 국가의 대응이 늦

어져 커다란 사회 문제로 대두되고 있다. 이렇게 균형 잡히지 않은 식생활과 노령인구의 증가로 인하여 암, 심장병, 뇌졸중 등을 비롯한 성인병과 노인성 치매 등이 증가하게 되었으며, 성인병과 노인성 질환의 증가는 의료비와 사회복지비를 증가시켜 국민의 부담을 증가시키고 있다. 성인병은 발생하면 의학적인 방법으로 치료하기가 어렵기 때문에 식생활 개선을 통한 예방이 가장 효과적인 것으로 알려져 있다. 따라서 기능성 식품은 질병을 예방함으로써 국민건강증진에 크게 기여할 수 있을 것으로 판단된다²⁾. 현재 많은 종류의 기능성 식품이 제조되어 판매되고 있으며, 그 중에서도 chitosan과 chitooligosaccharides는 기능성이 높은 천연의 식품소재로서 관심이 집중되고 있다.

Chitin은 새우나 게 등을 비롯한 해산 갑각류의 가공 폐기물로 버려지는 부패, 악취 발생 등의 환경공해

* Corresponding author : Heon-Kuk Park

를 일으키며 처리비용 등 여러 가지 문제를 야기하던 물질이지만 최근에는 부가가치가 높은 chitosan 및 chitooligosaccharides로 가공되기 때문에 폐기물의 자원화와 미이용 자원의 개발 등 여러 가지 측면에서 기대가 모아지고 있는 다당류이다. 더욱이 chitosan은 polycation의 성질을 가지고 있어서 현재 응집제로서 각종 공업 분야에 널리 이용되고 있으며 최근에는 그 외에도 다양한 생리적 기능성을 가지고 있다는 사실이 밝혀지면서 의료, 생화학, 화장품, 식품, 화학 공업 및 농업용 등 다양한 분야에 응용 가능한 신소재로서 기대가 높아지고 있다³⁻¹⁰⁾.

그러나, chitosan은 생리적 기능은 우수하지만 물에 용해되지 않고 점도가 높으며 짠맛이 나기 때문에 식품을 비롯한 기타 응용분야에의 이용이 제한되고 있다. 따라서 많은 연구자들은 이와 같은 물리적인 장애를 개선함으로써 chitosan 자체가 갖는 우수한 생리적 기능을 이용할 뿐만 아니라 항종양성을 비롯한 새로운 생리적 기능성을 갖는 chitosan 유도체의 개발을 시도하고 있다. Chitosan 유도체 중에서도 chitooligosaccharides는 chitosan의 가수분해로 얻어지는 저분자 화합물이므로 물에 잘 용해되며 점도가 낮고 용액이 단맛을 낼 뿐만 아니라 chitosan이 갖지 않는 새로운 생리적 기능성을 갖는 것으로 알려지면서 관심이 집중되기 시작하였다¹¹⁻¹⁶⁾. 이에 따라서 chitooligosaccharides를 생산하는 것과 관련된 연구는 많이 진행되어 왔으나^{11,17-24)} chitooligosaccharides가 갖는 생리적 기능성에 관한 연구와 chitooligosaccharides의 이용에 관한 연구는 아직도 극히 미미한 실정이다.

본 연구에서는 chitosan과 chitooligosaccharides를 이용하는데 있어서 큰 제한요건이라고 알려져 있는 응집성에 대하여 조사하였다.

실험방법

1. Chitooligosaccharides의 제조

1) Chitooligosaccharide I

0.8% lactic acid 수용액에 chitosan이 5%가 되도록 첨가하여 완전히 녹이고 포화 NaHCO₃ 수용액을 가하여 pH를 5.5가 되도록 조절하였다. 제조된 chitosan 용액에 *Bacillus pumilus* BN-262 유래의 chitosanase를 반응액 ml당 0.05unit씩 가하고 45°C에서 3시간동안 반응시켰다. 분해된 용액은 중화하여 불용성 물질을 제거하고 ultrafiltration한 다음 분무건조 하여 실험에 사용하였다.

Table 1. Conditions for HPLC analysis of chitooligosaccharides

Column	TSK-Gel Amide-80, 4.6×250mm (TOSOH Co., Japan)
Mobile phase	Acetonitrile : 250mM H ₃ PO ₄ = 4:6
Flow rate	0.6ml/min
Injection volume	15 μl
Detector	RI detector

2) Chitooligosaccharide II

Chitosan 90g에 1 l의 증류수를 가하여 30분간 방치함으로써 팽윤시키고 0.1N lactic acid 1 l를 소량씩 첨가하면서 완전히 녹였다. 5시간 경과 후 0.425M NaHCO₃를 가하여 pH를 5.6으로 맞추었다. pH를 조절된 용액은 하룻밤 방치하고 50°C 항온수조로 옮겨 용액의 온도가 50°C에 도달한 다음 *Trichoderma viride* 유래의 cellulase를 가하였다. 이를 6시간 동안 처리하여 반응시키고 가열함으로써 효소를 불활성화시킨 다음 NaOH 수용액으로 pH가 7.0이 되도록 중화하고 침전물을 원심분리하여 제거하였다. 얻어진 가수분해물은 냉동건조하여 실험에 사용하였다.

2. Chitooligosaccharides의 조성 분석

Chitooligosaccharides 50mg에 용매(acetonitrile : 250mM H₃PO₄ = 4 : 6) 3ml를 가하여 녹이고 실온에서 하룻밤 방치한 후, 원심분리하고 membrane filter로 여과하여 불용성 성분을 제거한 용액을 제조하였으며 이를 HPLC 분석용 시료로 사용하였다. Chitooligosaccharides의 HPLC 분석 조건은 Table 1에 나타내었다.

3. Chitooligosaccharides의 응집성

0.4% Chitosan 및 chitooligosaccharides 용액과 0.2M 무기화합물 또는 0.2% 유기물질의 수용액을 동량씩 혼합하여 121°C에서 15분간 처리한 후 실온까지 식혀서 응집 및 침전 생성 여부를 확인하였다.

결 과

1. Chitooligosaccharides의 조성

Chitooligosaccharide I 과 II의 중합도별 함량은 Fig. 1 및 Fig. 2와 같았다. 즉, chitooligosaccharide I은 trimer, tetramer, pentamer가 전체 올리고당 중 64.3%에 달하는 비교적 저분자 화합물로 구성된 chito-

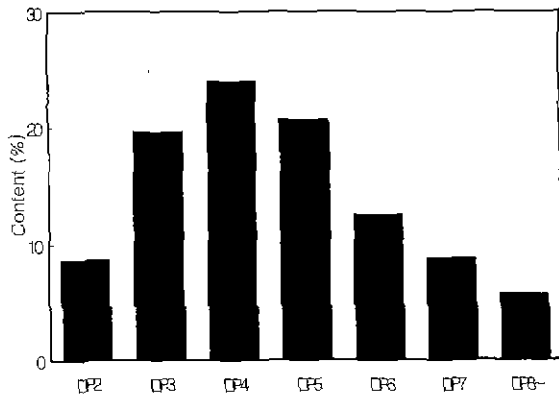


Fig. 1. Composition of chitooligosaccharide I. DP2, dimer; DP3, trimer; DP4, tetramer; DP5, pentamer. DP6, hexamer; DP7, heptamer; DP 8~, above octamer

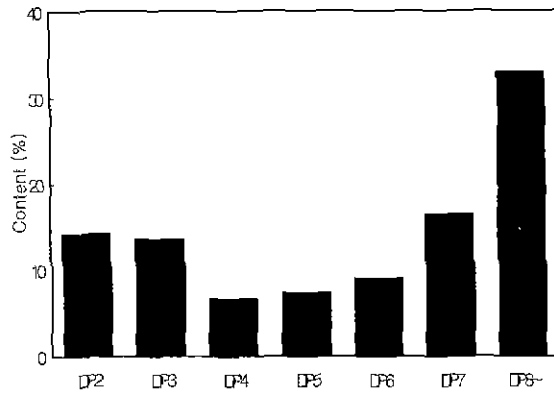


Fig. 2. Composition of chitooligosaccharide II. DP2, dimer; DP3, trimer; DP4, tetramer; DP5, pentamer, DP6, hexamer; DP7, heptamer; DP 8~, above octamer

oligosaccharides의 혼합물이었다. 반면에 chitooligo-saccharide II는 중합도 7 이상의 것이 전체 올리고당 중 49.3%에 달하는 상대적으로 분자량이 큰 화합물로 구성된 chitooligosaccharides의 혼합물이었다.

2. Chitooligosaccharides의 응집성

Chitosan 및 chitooligosaccharides의 응집성을 조사한 결과는 Table 2 및 Table 3과 같았다. 무기염의 경우 chitosan과 분자량이 비교적 큰 chitooligosaccharide II는 2가의 음이온 화합물과 응집하거나 침전을 형성하였다. 그러나 분해가 많이 이루어진 chitooligosaccharide I은 무기염과 반응하여 응집하거나 침전을 형성하지 않았다. 유기물질의 경우 chitosan은 단백질과 같이 고분자의 화합물을 함유한 배지성분과는

Table 2. Aggregation property of chitosan and chitooligosaccharides with inorganic compounds

Chemicals	Chitosan	Chitooligo-saccharide I	Chitooligo-saccharide II
CaCl ₂	-	-	-
CuCl ₂	-	-	-
CuSO ₄	A ¹	-	P ²
MgCl ₂	-	-	-
MgSO ₄	A	-	P
NaCl	-	-	-
Na ₂ SO ₄	A	-	P
KCl	-	-	-
K ₂ SO ₄	A	-	P
ZnCl ₂	-	-	-
ZnSO ₄	A	-	P
KH ₂ PO ₄	-	-	-
K ₂ HPO ₄	-	-	P
NaNO ₃	-	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	A	-	P

¹A · Aggregation

²P · Precipitation

Table 3. Aggregation property of chitosan and chitooligosaccharides with organic compounds

Chemicals	Chitosan	Chitooligo-saccharide I	Chitooligo-saccharide II
Agar	A ¹	P ²	P
Glucose	-	-	-
Sucrose	-	-	-
Urea	-	-	-
Yeast extract	A	P	P
Peptone	A	-	-
Proteous peptone	A	P	P
Tryptone	A	P	P
Soytone	A	P	P
Tryptose	A	P	P
Casamino acid	-	-	-
Beef extract	A	P	P
Malt extract	A	-	-
Yeast nitrogen base	A	P	P
Bram heart infusion	A	P	P
Nutrient broth	A	-	-
Potato dextrose broth	A	-	-
Tryptic soy broth	A	P	P
Sodium citrate	A	-	P

¹A · Aggregation

²P · Precipitation

응집이 일어났으며, chitooligosaccharides는 고분자 화합물을 함유하는 배지성분과 반응하여 침전을 형성하였는데 분해가 많이 일어난 chitooligosaccharide I의 경우 chitooligosaccharide II에 비하여 침전 생성량이 적었다.

고 찰

Chitooligosaccharides는 여러 연구자들에 의하여 항균성, 콜로니 형성 억제능, 항종양성, 면역부활작용 등을 비롯한 생리적 기능성을 갖는 것으로 알려지면서 다수의 건강식품회사에서 제조되어 판매되고 있다. Chitooligosaccharides의 제조법으로는 염산, 질산과 같은 무기산을 이용한 산분해법, chitosanase, cellulase, lysozyme 등의 효소를 이용한 효소분해법, 당전이를 일으키는 효소에 의한 역합성법이 있는 것으로 알려져 있다. 현재 우리나라의 식품첨가물공전에는 효소분해법에 의하여 제조된 chitooligosaccharides만이 허가되어 있으며 산분해법에 의하여 제조된 chitooligosaccharides는 사용이 금지되어 있다. 또한 당전이를 일으키는 효소에 의한 역합성법은 아직까지 그 가능성에 대한 언급만이 있을 뿐 역합성에 의하여 chitooligosaccharides를 생산하였다고 하는 직접적인 보고가 없었다. 따라서 생리적 기능성이 우수한 chitooligosaccharides를 얻기 위하여서는 적절한 chitosan 분해효소의 검색이 절대적으로 필요하다. Chitosan을 *Bacillus pumilus* BN-262 유래의 chitosanase로 처리한 경우에는 trimer, tetramer, pentamer가 전체 올리고당 중 64.3%에 달하는 비교적 저분자의 chitooligosaccharides로 구성된 chitooligosaccharide I을 얻을 수 있었다. 그러나 *Trichoderma viride* 유래의 cellulase로 처리한 경우에는 중합도 7 이상의 것이 전체 올리고당 중 49.3%에 달하는 상대적으로 분자량이 큰 chitooligosaccharides로 구성된 chitooligosaccharide II를 얻을 수 있었다. 따라서 생리적 기능성이 높은 것으로 알려진 hexamer 이상의 chitooligosaccharides를 다량으로 생산하기 위해서는 새로운 유형의 chitosanase를 생산하는 미생물을 탐색하거나 chitosanase의 처리 조건을 달리하여 분해가 덜 일어나도록 하거나 cellulase와 같은 chitosan의 분해에 적합치 않은 효소를 처리함으로써 chitosan의 부분적인 분해를 유도하는 것이 필요할 것으로 판단된다.

Chitosan 및 chitooligosaccharides는 생리적 기능성이 우수하다는 것이 알려지면서 식품에의 적용이 시도되었다. 그러나 chitosan 및 chitooligosaccharides

는 분자내에 다수의 $-NH_2$ 기를 가지므로 산성용액에 녹아서 양으로 하전되는 성질을 가지고 있다. 따라서 양으로 하전된 이들 분자는 음으로 하전된 고분자 물질이나 2가 이상의 음이온과 만나면 응집을 일으키므로 식품에의 응용이 제한되는 경향이다. Chitosan 및 chitooligosaccharides의 응집성을 조사한 결과 chitosan은 2가의 음이온을 함유하는 무기염과 반응하여 응집이 일어났고 비교적 분자량이 큰 chitooligosaccharide II는 무기염과 반응하여 침전이 일어났으나 분자량이 작은 chitooligosaccharide I은 응집하거나 침전이 일어나지 않았다. 이와 같은 사실은 chitosan 및 chitooligosaccharides는 분자 내에 $-NH_2$ 기를 가지고 있어서 물에 녹으면 양으로 하전되므로 공존하는 2가의 음이온과 반응하여 분자간에 가교를 형성하기 때문에 응집 또는 침전이 일어나는 것으로 생각된다. 그러나 분자량이 작은 chitooligosaccharide I의 경우는 분자량이 작고 분자의 길이가 짧기 때문에 분자간의 가교를 형성하지 못하므로 응집 또는 침전이 형성되지 않는 것으로 생각된다. 유기물질의 경우는 거의 대부분의 화합물과 반응하여 응집하거나 침전이 일어났다. 이와 같은 사실은 무기염과는 다른 양상을 나타냈는데 이는 양으로 하전된 chitosan 및 chitooligosaccharides가 음으로 하전된 비교적 고분자의 단백질 분자와 반응하여 가교역할을 하며 결합하여 응집하거나 침전이 일어나는 것이라고 생각된다. 따라서 chitooligosaccharide I의 경우 저분자 화합물이므로 저분자의 무기물과 반응하여 응집하거나 침전을 형성하지 못하나 유기 고분자 화합물과는 반응하여 가교를 형성함으로써 침전이 일어나는 것으로 판단된다.

요 약

Chitosan을 *Bacillus pumilus* BN-262 유래의 chitosanase로 처리한 경우에는 trimer, tetramer, pentamer가 전체 올리고당 중 64.3%에 달하는 비교적 저분자의 chitooligosaccharides로 구성된 chitooligosaccharide I을 얻을 수 있었다. 그러나 *Trichoderma viride* 유래의 cellulase로 처리한 경우에는 중합도 7 이상의 것이 전체 올리고당 중 49.3%에 달하는 상대적으로 분자량이 큰 chitooligosaccharides로 구성된 chitooligosaccharide II를 얻을 수 있었다. 따라서 생리적 기능성이 높은 hexamer 이상의 chitooligosaccharides를 얻기 위해서는 chitosanase의 처리 조건을 달리하여 분해가 덜 일어나도록 하거나 cellulase와 같은 효소를 처리함으로써 chitosan의 부분적인 분해를 유도하는

것이 필요하다고 판단되었다. Chitin과 chitooligosaccharides의 응집성에 대하여 조사하였다. 고분자의 chitosan은 2가 음이온을 함유하는 무기화합물 및 고분자의 유기화합물과 반응하여 응집이 일어났다. 분해가 많이 일어난 chitooligosaccharide I은 무기물질과는 침전하지 않았으나 고분자화합물을 함유하는 유기화합물과는 반응하여 침전이 일어났다. 분해가 적게 일어난 chitooligosaccharide II는 2가 음이온을 함유하는 무기화합물 및 고분자의 유기화합물과 반응하여 침전이 일어났다.

참고문헌

1. 송병춘, 맹원재 : 현대인의 식생활과 건강, 건국대학교 출판부, 서울, p. 67~82 (1996).
2. 박현서, 이영순, 구성자, 한명주, 조여원 : 식생활과 건강, 효일문화사, 서울, p. 239~253 (1997).
3. Maezaki, Y., Tsuji, K., Nakagawa, Y., Kawai, Y., Akimoto, M., Tsugita, T., Takekawa, W., Terada, A., Hara, T. and Mitsuoka, T. : Hypocholesterolemic effect of chitosan in adult males, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57(9), 1439~1444 (1993).
4. 田口智子, 加藤秀夫, 奥田拓道, 多嘉良稔 : 日本農藝化學會誌67(大會講演 要旨集), p.315 (1993).
5. 内田泰 : キチン・キトサンの抗菌性, *フードケミカル*, 1988-2, 22~29 (1988).
6. 内田泰 : キチン・キトサンおよび関連化合物の抗菌性とその応用, *化學工業*, 1991-10, 37~43 (1991).
7. 福井春雄, 藤原公, 村岡高志, 次田隆志 : キチン・キトサンによる作物の生長促進効果 第1報 生長促進とその作用性, *日作四國支紀*, 26, 1~8 (1989).
8. 福井春雄, 正田敏幸, 藤原公, 村岡高志, 次田隆志 : キチン・キトサンによる作物の生長促進効果 第2報 各種作物への栽培適用性, *日作四國支紀*, 26, 9~16 (1989).
9. Suzuki, S., Okawa, Y., Okura, Y., Hashimoto, K. and Suzuki, M. : in *Chitin and Chitosan Proceedings of the Second International Conference on Chitin/Chitosan*, ed. by Hirano, S. and Tokura, S. The Japanese Society of Chitin and Chitosan, Tottori Univ., Tottori, p.210 (1982).
10. 石倉俊治 : キチンとキトサン, *月刊フードケミカル*, 1993-6, 62~64 (1993).
11. Uchida, Y., Izumi, M. and Ohtakara, A. : Preparation of chitosan oligomers with purified chitosanase and its application, *Annual Review of Japanese Society for Chitin and Chitosan*, pp. 93~102 (1988).
12. 戸倉清一 : キチン,キトサンの生理活性について, 別冊 *フードケミカル-I*, 食品化學新聞社, pp. 5~11 (1987).
13. 戸倉清一 : キチンおよびキトサンの免疫賦活性, *月刊フードケミカル*, 1995-2, 19~24 (1995).
14. Tokoro, A., Tatewaki, N., Suzuki, K., Mikami, T. and Suzuka, S. : Growth-Inhibitory effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose against Meth-A solid tumor, *Chem. Pharm. Bull.*, 36(2), 784~790 (1988).
15. Hadwiger, L. A., Fristensky, B. and Riggleman, R. C. : In *Chitin, chitosan and related enzymes*, Academic Press, Orlando, p.291 (1984).
16. 欠吹念 : 最後のバイオマスキチンキトサン, 校報堂出版, p.1 (1988).
17. Horowitz, S. T., Roreman, S. and Blumenthal, H. J. : The preparation of glucosamine oligosaccharide - I. Separation, *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 5046~5049 (1957).
18. Izumi, M. and Ohtakara, A. : Preparation of D-glucosamine oligosaccharides by the enzymatic hydrolysis of chitosan, *Agri. Biol. Chem.*, 51(4), 1189~1191 (1987).
19. Aiba, S. : Studies on chitosan: 4. Lysozymic hydrolysis of partially N-acetylated chitosan, *Int. J. Biol. Macromol.*, 14, 225~228 (1992).
20. Muraki, E., Yaku, F. and Kojima, H. : Preparation and crystallization of D-glucosamine oligosaccharides with dp. 6~8, *Carbohydrate Research*, 239, 227~237 (1993).
21. 坂井和男 : キチン・キトサンオリゴ糖の開発と現状, 別冊 *フードケミカル-I*, 食品化學新聞社, pp. 106~111 (1987).
22. 坂井和男, 南條文雄, 碓氷泰市 : キチン・キトサンオリゴ糖の生産と利用, *澱粉科學*, 37(2), 79~86 (1990).
23. 김순영 : *Aspergillus fumigatus* KH-94로부터 분리한 Chitosanase의 특성과 된장중 Chitooligosaccharide의 면역분석법 개발, 서울대학교 박사학위논문 (1997).
24. 홍상필, 김동수 : *Trichoderma viride* 및 *Trichoderma reesei* 유래 Cellulase의 키토산 분해 특성, *한국식품과학회지*, 30(2), 245~252 (1998).

(1999년 12월 15일 접수)