

키토산올리고당 생산을 위한 다단계 첨가방법

이 기 선·김 승 모·*임 현 수
여수대학교 생물공학과
(접수 : 1999. 10. 21., 게재승인 : 1999. 12. 17.)

Stepwise Addition Technology for the High Yield Production of Chitosanoligosaccharide

Ki-Sun Lee, Seung-Mo Kim, and Hyun-Soo Lim†
Department of Biotechnology, Yosu National University, Yosu 550-749, Korea
(Received : 1999. 10. 21., Accepted : 1999. 12. 17.)

Optimization of the chitosanoligosaccharide production was studied with chitosanase. The optimum conditions for the enzymic reaction have been determined. Enzyme stability was maintained above 90% after 6 days at pH 5.0. The optimum initial reaction rate was appeared in 1.0% of chitosan solution. The production yield of chitosanoligosaccharides was over at 0.4%~2.0% of chitosan. At 4.0% of chitosan solution, however, the production yield was decreased to 64.6%. To increase the yield, stepwise addition of substrate into the reactor was investigated. In this case, the yield was increased from 64.6% to 83.2% and the final concentrations of chitosanoligosaccharide was 12.26 mg/mL. By TLC analysis, most of the chitosanoligosaccharides produced were 3-5 mers.

Key Words : chitosanoligosaccharide, production yield, stepwise addition

서 론

키토산·키토산은 현재까지 독성이 알려지지 않는 천연물질로서 그 이용범위가 매우 다양하며, 특히, 키토산의 분해 산물인 키토산 올리고당은 식품첨가물, 항균·항암성(1), 면역강화 작용(2), 식물 생리 조절등과 같은 다양한 기능을 갖는 물질로서 많은 분야에서 이용할 수 있기 때문에 이를 생산하는 방법에 대한 연구들이 많이 진행되어 왔다. 일반적인 방법으로 Horowitz(3)등에 의한 산 가수분해법이 있으나, 단당의 생성율이 높고, 식품의 첨가 시 응용상의 문제점이 있어 보다 효율적인 방법으로서 효소를 이용하여 올리고당을 생산하려는 연구가 진행되어 왔다. 효소를 이용한 방법은 단당의 생성이 거의 없으며 고중합도의 올리고당 수율이 높은 장점이 있다. Chitosanase는 *Streptomyces* sp.(4), *Bacillus* sp.(5), *Actinomycetes*(6) and fungi 등과 같이 미생물로부터 분리하여 올리고당 생산을 위한 소재로 이용되고 있기도 하다(7, 8). 이러한 미생물로부터 분리된 효소의 일반적인 효소학적 특성들에 대해 보고되었다(9-11). 효소를 이용한 올리고당 생산에 따른 분리·정제의 방법들에 관한 연구도 진행되어

지고 있고, 고중합도의 올리고당을 생산하기 위해 높은 효소활성을 갖는 미생물의 탐색과, 기질의 담체화라든지, 효소의 고정화 방법을 이용하는 방법 등이 연구되어지고 있다. 그러나, 효소를 이용한 방법에 있어서의 단점은 효소가 고가라는 것이다. 이러한 미생물로부터 분리된 효소를 이용하여, 제조 공정 상에 있어서 기질과 효소를 이용하여 보다 효율적으로 올리고당을 생산하고자 하였다. 본 연구에서는 *Bacillus* sp. 유래의 미생물이 생산하는 효소를 이용하여 키토산 올리고당 생산의 최적화를 위해, 효소안정성, 효소동력학, 키토산의 분해도를 여러 가지 키토산 농도에 따라 조사하였다. 그런 다음, 올리고당의 생산을 증가시키기 위해 기질 첨가의 시간에 따른 방법을 연구하였다.

재료 및 방법

재 료

본 실험에서 사용된 키토산(M.W=approximately 20,000, DAC=81%, cps=2.9)은 Sehwa Co., (Yosu, Korea)에서 구입하였다. Chitosanase(from *Bacillus* sp. GM44, endo type)는 경상대학교 신용철 박사로부터 제공받았다. 실험에 사용된 효소는 pH 3-10 범위에서 안정하며, 효소 반응을 위한 최적의 pH와 온도는 각각 pH 5.0와 40℃였다. 효소의 첨가량은 100 mL에 대하여 20U로 첨가하였다. 키토산올리고당의 standard는 Seikagaku, Co., (Tokyo, Japan)에서 구입하였다.

†Corresponding Author : Department of Biotechnology, Yosu National University, Yosu 550-749, Korea
Tel : 0662-659-3306, Fax : 0662-659-3306
E-mail : bplab@yosu.yosu.ac.kr

효소의 안정성과 잔여 활성

효소의 활성은 키토산 용액으로부터 생성되는 환원당의 양을 DNS법(12)으로 측정하여 결정하였다. 효소의 안정성을 측정하기 위해 100 mM sodium acetate buffer(pH 5.0)에 녹인 1% 키토산 용액 1 mL과 40°C에서 교반 상태에 있는 효소액(2% acetic acid(pH 5.0)) 1 mL를 첨가하여 50°C에서 10분간 반응 후 10N NaOH 66 μ l 첨가하여 교반시킨 다음 3,000 \times g으로 20분간 원심 분리하여 잔여 기질과 반응 상등액을 분리하였다. 표준 곡선은 D-glucosamine을 사용하여 결정하였으며, Chitosanase 활성 단위(U)는 주어진 조건에서 분당 1 μ mole의 glucosamine을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다. 그리고, 잔여 효소활성의 측정은 반응상태에 있는 용액의 1 mL과 100 mM sodium acetate buffer(pH5.0)에 녹인 1% 키토산 용액 1 mL을 혼합하여 반응시킨 후 측정하였다.

키토산 분해반응

키토산을 2% acetic acid로 용해하여 0.1-4.0%(w/v) 키토산 용액(pH 5.0)을 만들었다. 키토산 분해 반응은 제조된 키토산 용액(pH 5.0) 100 mL에 효소액 20U/mL를 첨가하여 40°C에서 교반하면서 반응시켰다. 분해반응중 일정한 시간 간격으로 시료를 채취하여 올리고당의 생성량과 올리고당의 조성을 TLC로 분석하였다. 반응을 끝내기 위해 10N NaOH 2 mL를 첨가하여 반응을 중지시키고, filter paper(Wathman No. 4)로 여과 후 80°C에서 24시간 건조하여 키토산 올리고당의 겔보기 수율을 결정하였다.

기질의 다단계 첨가

수율을 증가시키기 위해 기질의 다단계 기질 첨가 방법을 조사하였다. 키토산을 2% acetic acid에 녹여 각각 1%(w/v)와 2%(w/v)의 키토산 용액(pH 5.0)을 만들었다. 1%(w/v)와 2%(w/v)의 키토산 용액(pH 5.0)에 효소액 20U/mL를 첨가하여 반응시킨 다음, 1% 키토산을 첨가하였다. 최종 농도 4%(w/v)가 될 때까지 3, 3.5, 4, 4.5, 5시간 간격으로 첨가하였다. 반응 중, 키토산 용액의 pH는 1M HCl를 첨가하여 조절하였다. 겔보기 수율은 상기의 방법으로 여과 후 건조하여 측정하였다.

Thin Layer Chromatography (TLC)

키토산 분해산물을 HPTLC plate silica 60 F₂₅₄(Merck)에 spotting한 후 n-propanol : ammonia water(32%) = (2:1)의 용매에 전개시켰다. 그후 TLC plate를 꺼내 상온에서 건조시킨 후 건조된 plate를 같은 전개 용매로 2차 전개시켰다. 2차 전개한 TLC plate를 건조시킨 후 표면에 0.1% Ninhydrin(Fluka AG)이 포함된 water-saturated n-butanol을 분무한 뒤 160°C에서 10분 정도 가열해 spot을 확인하였다.

결과 및 고찰

반응 조건과 생성

키토산 올리고당 생산의 최적화를 위해 효소를 사용하여, 효소안정성, 효소 동력학, 기질의 가수분해 등을 여러 가지 키토산 농도에 따라 조사하였다. 예비 실험에 있어서, 효소액의 pH에 따른 안전성을 조사한 결과 pH가 5.0일 경우 6일 후에도 90% 이상의 효소 활성을 유지하고 있었으며, pH 5.0과 6.0사이에서 6

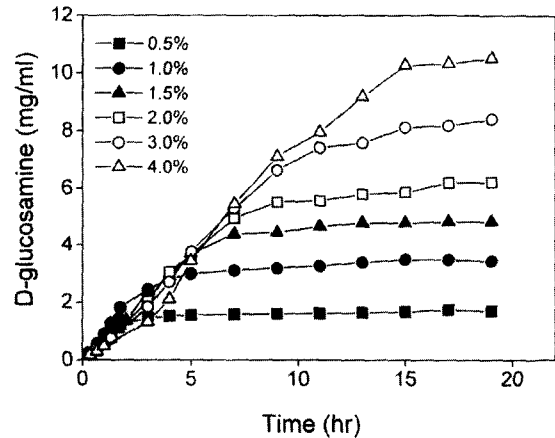


Figure 1. The production of chitosan oligosaccharide according to various concentration of chitosan.

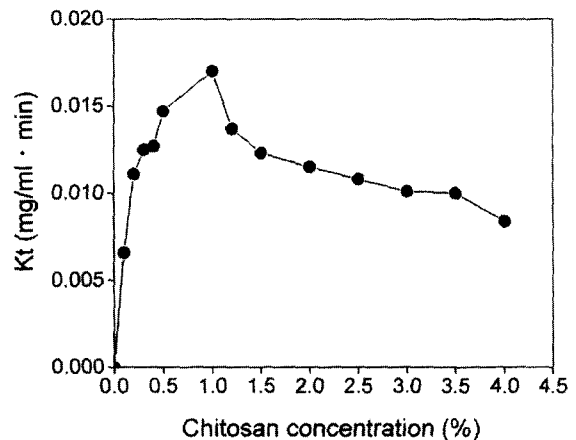


Figure 2. Initial enzyme reaction rate with various concentration of chitosan.

일 후 약 80% 이상 유지하고 있는 것으로 나타났다. 또한, 기질의 pH에 따른 초기 반응 속도에 있어서는 pH 5.0인 용액은 0.0171(mg/mL · min)을 나타냈으며, pH 5.5에서는 0.0187(mg/mL · min)을 나타내어 키토산 용액의 pH 5.5일 경우 초기 반응 속도가 빠른 것으로 나타났다. 그러나, 키토산 용액의 pH에 따른 최종 생성량에 있어서 많은 차이는 나지 않았지만, pH 5.0에서 3.64 mg/mL, pH 5.5에서 3.53 mg/mL, 6.0에서 3.42 mg/mL의 생성량을 나타내었다. 온도에 의한 차이는 초기 반응 속도에 있어서는 50°C가 더 빠르나, 최종 생성량에서는 40°C가 약 1.3 배 높았다. 그래서, 본 실험에 사용된 용액의 pH를 모두 5.0으로, 반응 온도는 40°C로 결정하였다. 키토산의 농도 변화에 따른 올리고당의 생산 농도의 변화를 Figure 1에 나타냈다. 각각의 키토산 농도에 대한 키토산 올리고당의 최종 생산량은 0.5% 키토산 용액에서 1.706 mg/mL, 1.0% 키토산 용액에서 3.438 mg/mL, 2.0% 키토산 용액에서 6.218 mg/mL, 3.0% 키토산 용액에서 8.408 mg/mL, 4.0% 키토산 용액에서는 10.521 mg/mL이 생성되었다. 올리고당의 생산은 기질의 증가에 의해 증가하였으나, 비례적인 것은 아니다. 그리고, 기질 농도에 따른 키토산 올리고당

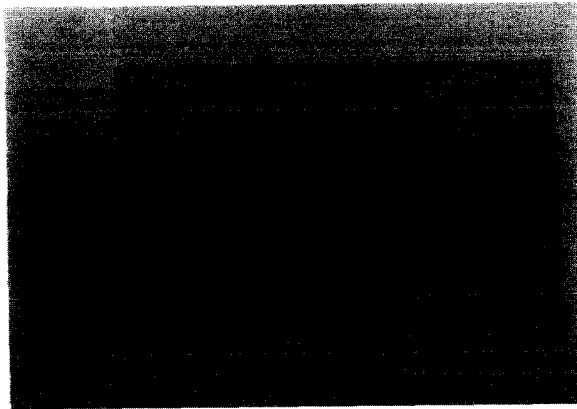


Figure 3. Thin-layer chromatography analysis of chitosan oligosaccharide compositions. S; standard.

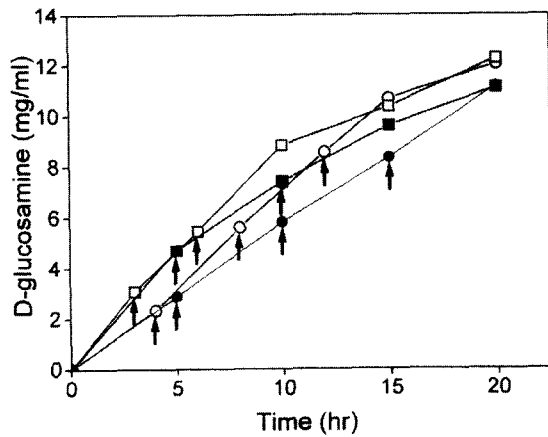


Figure 4. The production of chitosan oligosaccharide by the stepwise addition. ●; stepwise 1 (↑), ○; stepwise 2 (↑), ■; stepwise 4 (↑), □; stepwise 6 (↑).

의 겔보기 수율은 0.5~2.0%(w/v) 키토산 용액은 약 90% 이상, 그리고 4.0% 키토산 용액은 대략 64.6%가 분해되었다. 기질의 농도에 따른 효소의 초기 반응속도는 키토산 농도가 높아질수록 빨라졌으며, 1.0% 키토산 용액에서 0.0171(mg/mL·min)로 최대 반응속도를 나타냈다(Figure 2). 이는 효소의 기질에 대한 반응에 있어 1% 키토산 용액이 기질 저해 농도를 나타낸다고 볼 수 있다. 이러한 반응 상태는 효소가 기질저해로 인하여 기질의 농도를 높여도 반응속도에는 효과가 없음을 알 수 있다. 그리고, 분해 반응 중 pH 변화를 살펴보았으나 거의 없었다. TLC분석에 의한 올리고당의 조성은 주로 3-5당이였다(Figure 3).

기질의 다단계 첨가

각 기질 농도별 올리고당의 생성량과 전환율을 비교하면, 키토산 올리고당의 수율은 기질이 증가할수록 낮아졌다. 따라서, 수율을 증가시키기 위해 기질의 다단계 첨가방법을 이용하였다. 앞의 결과로 초기 기질 농도가 높을수록 수율이 낮아 이를 극복하기 위해 초기 반응 속도 및 수율이 높은 기질 농도 1%, 2%의 키토산 용액을 제조하여 시간 단계별로 기질을 첨가하여 최종 농도가 4%(w/v)가 되게 하였다. 초기 1% 키토산 용액에 효소를 첨가하여 반응시킨 다음, 3, 3.5, 4, 4.5, 5 시간 별로 1%의 기질을 첨가하였으며, pH 조절을 위해 1M-HCl 약간씩 첨가하였다.

Table 1. Apparent yield of chitosan oligosaccharide to stepwise addition method.

Reactor protocol	Adding time(hr) of 1% chitosan	Yield (%)
Stepwise 1	5, 10, 15	74.5
Stepwise 2	4, 8, 12	80.3
Stepwise 3	3, 6, 9	77.4
Stepwise 4	5, 10	75.4
Stepwise 5	4, 8	78.1
Stepwise 6	3, 6	83.2

Table 2. The remaining activity of enzyme according to various strategy.

Reaction type	Chitosan concentration (%)	Residual enzyme activity(%)
Batch	2.0	66.21
	3.0	64.14
	4.0	21.38
Stepwise addition	Stepwise 1	25.52
	Stepwise 4	23.47

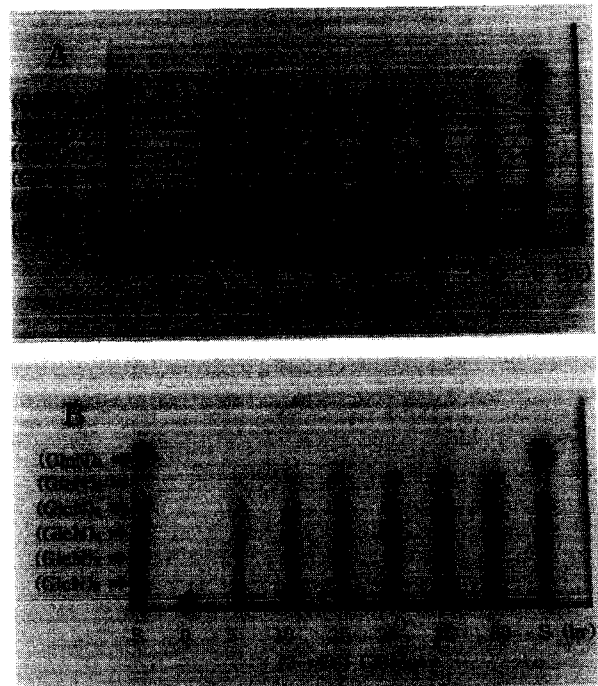


Figure 5. Thin-layer chromatography analysis of chitosan oligosaccharide compositions by the stepwise addition method. Stepwise 1(A), Stepwise 6(B).

이 결과, 키토산 올리고당의 최종 생성량과 분해도에 있어 5시간마다(stepwise 1) 기질을 첨가하였을 경우 11.17 mg/mL, 74.5%, 4시간마다(stepwise 2) 첨가한 경우 12.04 mg/mL, 80.3%, 그리고 3시간마다(stepwise 3) 첨가한 경우 11.60 mg/mL, 77.4%으로 각각 나타났다. 그리고, 초기 2% 키토산 용액에 효소를 첨가하여 반응시킨 다음, 3, 3.5, 4, 4.5, 5 시간 별로 1%의 기질을 첨가한 결과, 키토산 올리고당의 최종 생성량과 분해도에 있어 5시간마다(stepwise 4) 기질을 첨가하였을 경우 11.11 mg/mL, 75.4%, 4시간마다(stepwise 5) 첨가한 경우 11.50 mg/mL, 78.1%, 그리고

3시간마다(stepwise 6) 첨가한 경우 12.26 mg/mL, 83.2%으로 각각 나타났다(Table 1, Figure 4). 실험 결과로부터, Batch type과 기질의 단단계 첨가 방법을 비교하여 볼 때 키토산 올리고당의 겔보기 수율은 64.6%에서 83.2%로 증가하였고, 키토산 올리고당의 생산량은 10.52 mg/mL에서 12.26 mg/mL로 증가하였다(Figure 2, 4). Table 2에서 보듯 최종 4%의 기질 농도로서 Batch type과 기질의 단단계 첨가법을 비교해 보면, 동일한 반응 시간에서 효소의 잔존 활성은 거의 비슷하나 분해도 및 생성량은 증가하였다. 그러나, 실제 예상보다는 높은 수율이 나타나지 않았는데, 이는 기질과 효소가 공존하는 반응 시스템에서는 시간에 따라 효소의 잔존활성이 상당히 낮아 졌기 때문일 것이다. TLC분석에 의한 올리고당의 조성은 역시 주로 3-5당이였다(Figure 5). 이런 결과를 기초로 키토산 올리고당 생산을 위한 최적의 반응 조건은 pH5.0, 40℃에서 키토산의 초기 2% 농도에 기질을 3시간마다 첨가할 때 였다. 공정상의 수율 면에서 기질과 효소를 사용하여 산물을 생산 하고자 할 경우 효율을 더 높일 수 있었으며, 다른 효소와 기질을 이용한 생산에 있어 기초적인 자료로서 제공될 수 있을 것이다.

요 약

키토산 올리고당을 보다 효율적으로 생산하고자 효소와 기질 간의 특성을 조사 한 다음, 이를 바탕으로 기질을 단계별로 첨가하여 생산 효율을 높일 수 있었다. 본 실험에 사용된 효소의 안정성을 조사한 결과 pH 5.0에서 6일 후에도 약 90% 이상의 효소활성을 유지하였다. 기질의 초기 농도에 따른 겔보기 수율은 0.5~2% 키토산 용액은 약 90% 이상이였으며, 그이상의 농도일 경우 감소하였다. 그래서, 수율을 증가시키기 위해 초기 반응 속도 및 겔보기 수율이 높은 기질 농도에 기질을 단계 별로 첨가한 결과, 분해 반응에 있어 겔보기 수율은 64.6%에서 83.2%로 증가하였고, 이에 따라 키토산 올리고당의 생산량은 10.52 mg/mL에서 12.26 mg/mL로 증가하였다. TLC분석 결과 Batch type과 기질을 단계별로 첨가하였을 경우의 올리고당 조성은 주로 3-5당이였다. 키토산 올리고당 생산을 위한 최적의 반응 조건은 pH 5.0, 40℃에서 초기 반응 속도 및 수율이 높은 기질 농도인 2% 키토산 용액에 기질을 3시간마다 첨가할 때였다. 반응 시간에 따른 기질의 양과 효소를 보다 더 최적화하여 키토산 올리고당의 최종 농도와 겔보기 수율을 증가시킬 수 있었다.

REFERENCES

1. 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, *Korean J. of chitin and chitosan*, 2, 60-78.
2. Suzuki, S., Y. Okawa, K. Hashimoto, Y. Okura, M. Suzuki (1982), Immunoadjuvant effect of chitin and chitosan, 210-212, In Hirano, S. and Tokura, S. (eds), *Chitin and chitosan, The Japanese Society of Chitin and Chitosan*, Tottori University, Tottori.
3. Horowitz, S. T., S. Roseman, H. J. Blumenthal (1957), The preparation of glucosamine oligosaccharides I. Separation, *J. A. Chem.*, 79, 5046-5049.
4. Bouucher, I., A. Dupuy, P. Vidal, W. A. Neugebauer, and R. Brzeinski (1992), Purification and characterization of a chitosanase from *Streptomyces* N174, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38, 188-193.
5. Choi Y. J., E. J. Kim, Y. S. Kim, and Y. C. Shin (1997), Development of chitosanase for the production of chitosan oligosaccharides, *Korean J. of chitin and chitosan*, 2(3), 40-48.
6. Ando, A., H. Morosawa, H. Sato, M. Yadome, S. Okajima, M. Nakanishi, H. Shinoyama, and T. Fujii (1993), Primary structure of chitosanase produced by an *Actinomycete*, 49-50, Proceeding of the 7th Chitin/chitosan Symposium, *J. Soc. for chitin and chitosan*.
7. Izume, M. and A. Ohtakara (1987), Preparation of D-glucosamine oligosaccharides by the enzymatic hydrolysis of chitosan, *Agric. Biol. Chem.*, 51, 1189-1191.
8. Han, B. K., W. J. Lee, and D. H. Jo (1998), Separation and characterization of water-soluble oligomers from the reaction mixture of chitosan treated with chitosanolytic enzymes, *Korean J. of chitin and chitosan*, 3(3), 228-232.
9. Price, J. S. and R. Storck (1975), Production, purification, and characterization of an extracellular chitosanase from *Streptomyces*, *J. Bacteriol.*, 124(3), 1574-1585.
10. Lee, H. W., J. W. Choi, D. P. Han, M. J. Park, N. W. Lee, and D. H. Yi (1996), Purification and characteristics of chitosanase from *Bacillus* sp. HW-002, *J. Microbiology and Biotchnology*, 6(1), 19-25.
11. Jung, M. R., Y. Y. Jo, Y. T. Chi, and R. D. Park (1998), Development of microbial chitosanase for the production of high dp chitosan oligosaccharides, *Korean J. of chitin and chitosan*, 3(1), 6-8.
12. Miller, G. L. (1959), Use of Dinitrosalicylic reagent for determination of reducing. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.