

# 키틴과 키토산 분해 미생물 유래 효소의 식품에의 이용

Food application of enzymes derived from microorganisms degrading chitin and chitosan

박제권<sup>1\*</sup>  
Jae Kweon Park<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>가천대학교 바이오나노대학 생명과학과

<sup>1</sup>Department of Life Science, College of Bio-nano, Gachon University

## Abstract

Most reports demonstrated the substrate specificity-based kinetic properties of chitin or chitosan degrading enzymes. However, there is virtually less information on the high quality and quantity production of chitin or chitosan hydrolysates having a larger than (GlcN)<sub>7</sub> from the hydrolysis of high molecular weight chitosan using specific enzymes and their biological activity. Therefore, the production of such molecules and the discovery of such enzyme sources are very important. Fortunately, the author has established a mass production method of chitosan hydrolysates (GlcN)<sub>n</sub>, n=2-13 that have been characterized as a potent antioxidant substance,

as well as antifungal and antibacterial activities against *Penicillium* species and highly selective pathogenic bacteria. In addition, preclinical studies using (GlcN)<sub>n</sub>, n=5-25 demonstrated that these molecules played a very important role in maintaining biometric balance. Collectively, it is implicated that the application of these mixed substances to foods with significant biological activity is very encouraging.

Key words: chitin, chitosan, enzyme, catabolic cascade, biological activity, food application

\*Corresponding author: Jae Kweon Park  
Department of Life Science, College of Bio-nano, Gachon University, Korea  
Tel: +82-31-750-4763  
Fax: +82-31-750-8576  
E-mail: jkpark@gachon.ac.kr  
Received February 3, 2020; revised February 19, 2020; accepted February 19, 2020

## 서론

현대생활의 다양성에 따른 식품산업에의 효소 이용은 매우 다변화되었으며, 종류를 헤아릴 수 없을 만큼 많아졌다. 예를 들어 전분을 이용한 여러 가공 산업에서 포도당, 과당, 고농축과당시럽 등을 옥수수, 밀, 감자 등을 주원료로 사용하여 생산하고 있다. 이들은 생물·생화학적 특성에 따라 제과, 음료 아이스크림, 부용제 등으로 널리 사용되고 있다. 특히 고농도 과당시럽 제조에 필요한 효소가 glucose isomerase로 설당을 대용할 단맛이 비교적 적은 고농축과당을 만들어 사용하여왔다. 하지만, 산업적 활용을 위한 효소의 열안정성, 기질에 대한 특이성은 매우 중요하며, 특히 일반적으로 효소가 매우 고가이기에 반복적 사용이 가능하다면 경제적 파급효과에 큰 영향을 미칠 것으로 판단된다. 따라서 특이적 지지체에의 효소고정화(enzyme immobilization) 방법(Kilara, 1979; Sinha 등, 2012; Song 등, 2014)이 개발되어 왔으며, 그 결과 목적물을 매우 효율적으로 생산할 수 있는 시스템으로 이어지게 되었다. 이 효소 뿐만 아니라, 다양한 효소들의 고정화에 대한 연구는 수 많은 연구 자료를 통해 확인할 수 있어 앞으로 많은 발전이 크게 기대된다. 그 밖에 식품분야에서 이용되는 다양한 효소들과 응용에 대한 보고는 그 사례가 너무 많고 소개된 범위도 방대하다. 예를 들어, 효소는 제과/제빵산업, 주스/음료, 양조 및 조미료 산업 분야에 다양한 방법이나 소재로 이용되고 있다.

생물체를 구성하는 4대 거대분자로는 이미 잘 알려진 바와 같이 단백질, 지방, 핵산 그리고 일반적으로 탄수화물이라 통용되는 다당체로 크게 구분할 수 있으며, 각각의 해당되는 분자에 대한 분해, 역으로 합성에 관여하는 수 많은 효소들의 작용이 밝혀져 있다. 예를 들어, glycosylase, lipase, protease, ATP synthase 그리고 당전이 효소인 glycosyltransferase 등 해당되는 효소의 종류와 기능(Chen, 1979; Montilla

등, 2013)은 열거하기 매우 힘들 정도로 다양하다. 뿐만 아니라 최근에는 새로운 효소 개발에 많은 투자와 노력을 하고 있는데, 산업적 응용을 위해서는 생체 내 촉매로서의 역할 뿐 만 아니라 더불어 생화학적 특성이 우수하여 열, pH, 빛, 첨가 가능한 여러 형태의 유/무기 염 등에 의한 영향을 받지 않거나 매우 적게 받는 효소들의 발굴이 진행되고 있다. 그 중에서도 생육조건이 매우 열악한 극한 환경 미생물이나 동, 식물, 해양 생물 유래 효소나 소재들을 사용하는 예가 늘고 있다. 예를 들어, 초고온성 미생물효소(hyperthermophilic enzyme), 극저온미생물 효소(hyperpsychrophilic enzyme) 그리고 고압성 미생물(barophile)이나 호염성 미생물(halophile) 유래의 효소 등이 있다(Robb 등, 1992; Macdonald 등, 2002; Van-Thuoc, 2015). 또한, 높은 산성이나 알칼리 조건에서도 생육이 우수한 미생물로부터 분리한 효소들의 특성을 밝히는 연구가 이뤄지고 있어서, 향후 이들의 활성기반 적합성에 따라 더욱 다양한 형태로 여러 분야에 응용될 수 있을 것이며, 일부 사용되고 있는 실정이다. 반면 일부 시각에서는 환경오염이나 파괴 등의 문제를 삼고 있으나, 대량의 원료를 채취하는 등의 행위가 아닌 효소원 분리를 위한 소량의 샘플 채취로 크게 우려될 일은 아니라 판단된다. 하지만, 더욱 큰 차별화를 위해 지나친 욕심으로 무분별한 시료나 샘플 채취 등을 감행하고 있어 생물종의 다양성에 영향을 미칠 수 있음은 충분히 가능한 일이라 사전 충분한 상호 협의를 거치는 등의 행정적 절차를 밟아 진행함이 바람직하다 하겠다. 이러한 산업적으로 중요한 효소원 발굴은 물론 효율적 사용을 위해 생물 공학적 기술이 개발되고 발전함에 따라 그 진보 또한 크게 이뤄졌음을 알 수 있다. 유전자 재조합 및 효소공학 기술개발에 따른 특정 효소의 대량생산 기술의 확립은 효소의 재조합 단백질의 분리, 정제, 활성 연구에 이르기까지 매우 다양한 분야에 적용/응용되어 오고 있다. 따라서 이미 선진 기업이나 연구소들은



차별화된 노하우를 바탕으로 효소시장이나 이를 이용한 제품 생산 및 시장 확보를 위한 총체적 노력을 기울이고 있다. 따라서 새로운 효소원 소재 개발과 새로운 기능을 탑재한 여러 고품질 제품 개발을 위한 산학연 협동연구는 물론 국가적 지원을 통한 독자적이고 독창적인 노하우 개발은 필수이다.

이미 상기 기술한 바와 같이 효소 다양성과 기능은 그 범위가 방대해 지금까지 수행해온 연구 범위에 맞춰 키틴과 키토산 관련 식품으로 이용 가능한 효소의 작용과 부산물의 이용에 관련된 사항을 정리하고자 한다.

## 본론

### 1. 키틴(chitin)과 키토산(chitosan)

키틴은 지구상에 가장 풍부하게 존재하는 천연고분자, 즉 다당체로 셀룰로오스(cellulose) 다음 두 번째로 많은 바이오매스(biomass)로 알려져 있다. 키틴은  $\beta$ -D-glucose의 C-2 hydroxyl기가 acetylamino 기로 치환된 N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) 이 ( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4) 결합에 의해 구성된 고분자(Dweltz 등, 1968)로서 게나 새우껍질에서 주로 생산되고 있으며, 여러 갑각류의 외피 구성에 중요한 물질이다. 키틴질은 연간 해양에서만 약 1.2 giga-ton 정도 생산되고 있는 것으로 알려져 있는데, 오래전에는 게나 새우를 포획 후, 가공 처리한 껍질은 해양폐기물로 버려졌으나 키틴과 키토산이 알려지면서부터 고기능성 물질생산 원료로 주목받았다. 키틴은 강산에 녹기는 하지만 이후 사용할 수 없다. 이러한 이유로 여러 가지 수용액화 방법이 개발되고 응용되어 왔으나 화학적 수식(chemical modification) 없이 사용하기 매우 힘든 고분자로 알려져 소재로의 활용에도 매우 제한적이다. 반면, 고온, 강 알칼리 용액 처리에 따른 탈아세틸화된 것이 키토산(chitosan)이다. 오랫동안 많은 연구결과가 뒷받침

을 해오듯이, 키토산은 분자량 크기와 탈아세틸화도에 따라 다양한 생리활성을 나타낸다. 예를 들면, 여러 병원성 미생물이나 곰팡이에 대한 항균/항진균 활성, 상처치료, 지혈, 면역증강, 항암, 중금속 흡착 등 다양한 생리활성이 보고되고 있다. 이러한 생리활성을 기반으로 키틴이나 키토산의 여러 식품, 의약품, 환경 산업 분야 등에서 다양하게 응용되고 있다(Sano 등, 1991; Zhao 등, 2006; Sarasam 등, 2008; Aam 등, 2010). 그럼에도 불구하고 실생활에 사용되는 제품은 거의 없다는 것이 연구자로서 매우 아쉽게 생각되며, 그 이유에 대답을 얻고자 노력 중이다. 무엇이 문제인가? 이에 대한 답변으로 본론에서는 이러한 고분자 키틴/키토산이나 유도체의 여러 분야에 적용에 있어서 우리가 이해해야 할 수 많은 내용 중 키틴/키토산 분해 기작 및 이들 분해산물의 생물 생화학적 특성을 빌어 식품적용 가능성에 대하여 미력하나마 정보를 제공하고자 한다.

### 2. 키틴 / 키토산 가수분해 및 이용

키틴/키토산 분리정제 방법과 이를 활용한 연구는 상기 기술한 바와 같이 고분자 상태로 이용이 매우 제한적이고 어려움이 많다는 사실에 입각해서 이를 저분자화하여 구조 및 각각의 분해산물의 크기에 따른 생리활성 연구로 이어졌다해도 과언이 아닐 것이다. 제조 방법이나 원료의 기본적인 특성에 따라 다소 차이가 있을 수 있겠으나, 일반적으로 키틴/키토산은 불용성 고분자라는 특성 때문에 이들을 가수분해하여 저분자화 시켜 식품에 첨가물이나 화장품, 의약품 전구체 등으로 활용하기 위한 끊임없는 노력을 기울이고 있다. 예를 들면, 키토산의 단량체인 글루코사민(glucosamine, GlcN)이 퇴행성관절염의 통증 완화제로서 처방되거나 이용되고 있으며, 최근에는 키틴의 단량체인 엔아세틸글루코사민(N-acetylglucosamine, GlcNAc) 또한 글루코사민과 유사한 효과가 있는 것으로 알려짐에 따

라 키틴/키토산의 가수 분해물에 대한 관심은 매우 높은 실정이다.

### 2.1. 산 처리 가수분해

키틴/키토산의 가수분해는 과거 황산이나 염산 등 강산을 이용한 산 처리에 따른 가수분해를 많이 사용해 왔으나, 친환경적 측면을 고려하여 현재는 생물효소학적 방법을 이용한 가수분해가 더욱 주목을 받고 있다(Rinaudo 등, 1993; Allan 1995; Brugnerotto 등, 2001). 분명, 산에 의한 가수분해는 처리속도가 빠르고 경제적 측면에서 생물효소학적 처리방법보다 훨씬 적은 비용으로 가능하지만, 여러 후속적 처리나 환경오염 등의 문제를 고려해보면 생물효소학적 방법으로 전환을 기대할 수밖에 없다고 판단된다. 방법도 문제이겠지만, 사실 산이나 효소 처리의 가장 중요한 목적이 되짚어 보지 않으면 안 될 것이다. 단순히 키틴/키토산의 저분자화가 목적이 아닌 어떠한 특정 기능을 하는 타겟 분자를 얼마나 효율적으로 생산하는가에 따라 그 생물학적 기능을 명확히 밝히고 식품이나 화장품 분야는 물론 더 나아가 의약분야에 이르기까지 산업적 활용이 크게 기대되기 때문이다. 따라서 이는 학술적으로도 경제적으로 매우 중요한 요소로 특이적 크기의 가수분해 산물을 효율적으로 생산 가능하다면 산 처리나 생물효소학적 처리 역시 매우 중요한 방법으로 재조명 되어야 한다. 상기 기술한 바와 같이, GlcN이나 GlcNAc을 대량 생산하기 위해서는 사실상 효소처리방법보다 고온에서 산 처리 방법이 훨씬 효율적이고, 생산적이다. 일부 연구자들은 그룹에도 불구하고 효소 공학적 방법을 연구개발, 효소활성 극대화, 가수분해산물 생산 효율이나 수율 최적화를 위해 끊임없이 노력 중이며, 산 처리 방법을 능가할 생물효소학적 처리방법을 개선하고 있음은 향후 다가올 미래에 매우 큰 지침돌이 될 것으로 기대한다.

### 2.2. 생물효소학적 가수분해

고분자 상태의 키틴/키토산의 활용이 매우 제한적이라는 내용은 어쩌면 아직 이들 고분자 상태로의 이용에 대한 인간의 기술력 부족일 수도 있겠다는 생각이 앞선다. 어쩌면 고분자 상태에서의 이용은 외용적 적용 제품으로 활용가능성이 크고, 반면 저분자 상태의 물질들은 식품이나 화장품용을 구성하는 여러 구성 물질과의 혼합성이 우수한 형태로의 개발에 적합할 것으로 생각된다. 따라서 고분자 상태로의 응용연구에 대한 연구에 더욱 박차를 가할 필요도 충분하다 생각되어 부분적인 가수분해에 따른 여러 분자량 크기 조절 및 이들의 생리활성에 대한 연구를 진행하여 왔다. 관련된 내용에 대해서도 간추려 기술하고자 한다.

키틴/키토산 분해효소가 미생물, 동·식물, 곤충 그리고 사람에게 모두 존재한다는 사실이 밝혀지면서 관련 효소 생산이나 분해산물의 산업적 이용에 크게 활용되기 시작했다. 관련 효소로서 chitinase(키틴분해효소)와 chitosanase(키토산분해효소)에 대한 다양한 연구가 수행되었고(Kimoto 등, 2002; Goo, 2014; Kashif, 2019), 특히 인간에게서도 키틴분해효소가 존재한다는 것이 확인되면서 어쩌면 여러 갑각류의 섭취에 따른 알레르기 반응에 대한 방어 작용으로 작용할 것이라는 보고에 따라 세간의 관심이 더욱 고조되고 있다. 산업적으로 이용 가능한 여러 종류의 키틴/키토산 가수분해 효소를 생산하는 미생물의 분리와 동정, 유전자 탐색 및 재조합 기술에 따른 대량 생산 등이 가능해져 키틴/키토산 가수분해는 비교적 손쉽게 이뤄지고 있다. 많은 연구자들이 오래전부터 진행해 왔으나, 1990년대 초 대부분 키틴이나 키토산 분해 미생물 분리와 이들이 생산하는 효소의 분리, 정제 그 효소학적 특성을 밝히는 연구가 주로 행해져 왔다(Park 등, 1997; Park 등, 1999). 따라서 여러 가수분해 효소들과 X-ray를 이용한 3차 구조, 유전자 재조합 기술들이 세균, 고세균, 동·식물 등 거의 모든 생물종으로부터 보고



되었다. 많은 데이터를 바탕으로 다양한 종류의 가수분해 효소들은 그 아미노산 서열에 따라 CAZy (Carbohydrate Active Enzymes) Database에 분류되며, 셀룰로오스, 키틴 과 키토산 가수분해효소는 14개의 glycosyl hydrolase (GH) family들로 분류되어 있다(Adachi 등, 2004; Petersen 등, 2009). 그 동안은 키틴을 포함 여러 다당체를 분해하는 분해 작용 기작 규명에 관련 내용에 치중해 왔거나, 또는 대부분 이러한 키틴/키토산 분해 효소들의 작용기작에 따른 분류나 정제에 따른 생물효소학적 특징을 결정한 내용을 기반으로 총설이나 논문들이 작성되어 보고되었다. 예를 들면, GH18로 구분된 키틴분해효소는 retaining, 그리고 GH19 키틴분해효소는 inverting 효소작용을 갖는 메커니즘을 통해 당쇄 결합을 분해하는 것으로 알려져 있다. 간략히 기술하자면, retaining 방식은 하나의 음이온성 아미노산이 친핵체(nucleophile)로 작용하고 다른 하나의 음이온성 아미노산(주로 glutamic acid)이 산 또는 염기로 작용하여 가수 분해 후 anomeric form을 유지되는 방식으로 알려져 있다. 반면, inverting 방식은 두 개의 음이온성 아미노산이 모두 산 또는 염기로 작용하여 가수분해 후 anomeric form이 불특정하게 변하는 것으로 알려져 있다. 이러한 작용방식에 따라 가수분해 산물의 구조적 변화 등에 대한 연구가 오랫동안 이뤄졌으나, 시간의 흐름에 따라 지금은 기질에 대한 특이적 활성을 지닌 효소의 생산이나 이를 이용한 산업적 적용에 대한 연구보고가 증가하고 있다. 이로 말미암아 더욱더 이러한 기본적인 분해 메커니즘이나 작용 방식에 대한 이해가 필요해지고 있다고 생각된다. 또한, 일반적으로 효소의 기능을 특정하기 위해서 가장 잘 알려진 것 중 하나가 작용 방식에 따라 endo-형과 exo-형으로도 분류하는데, 키틴이나 키토산을 분해하는 거의 모든 대부분의 효소들 역시 endo-형과 exo-형으로 나뉘어 작용하고, 이들을 생산하는 미생물들은 최종가수분해 산물을 탄소원이나 질소원으로 이

용하고 있다. 뿐만 아니라, 유전자의 상동성 비교에 따른 효소들의 구분이 일반적인 내용이었으나, 본고에서는 이들 각각의 특성에 대한 내용 기술은 피하고, 수년간 키틴분해 미생물 분리 및 유전적 특성과 각각의 효소들의 특징에 대한 연구 결과를 기반으로 해양 미생물 중 하나인 *Vibrio* sp. 의 전체적인 키틴 분해에 관련된 메커니즘에 대한 내용을 기술하고자 한다.

### 2.3. 키틴분해 메커니즘에 관여하는 효소들

다양한 생물체에서의 키틴이나 키토산 분해효소 및 관련 효소들 역시 대부분 glycosyl hydrolase family로 구분된다. 특이적 차이점으로, 키틴 분해효소의 경우 주로 키틴만을 특이적으로 분해하는 것과 달리, 키토산 분해효소의 경우는 다른 구조적으로 유사한 기질에 대해서도 어느 정도 유의적인 기질 특이성을 보이는 키토산 분해 효소들(bifunctional chitosanases)이 있다는 것이 중요한 차이점이다. 키틴/키토산 분해에 관련하는 미생물의 분리, 효소 분리정제에 따른 효소학적 특성연구는 *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., 그리고 *Vibrio* sp. 에 대한 연구가 가장 많은 것으로 확인 된다(Bassler 등, 1991; Park, 2009; Park 등, 2012). 반면, 키토산분해효소(EC 3.2.1.132)는 *Streptomyces* sp. N174의 키토산분해효소로 GH46 단백질 중에 최초로 3차 구조가 규명되었으며(Boucher 등, 1992), bifunctional chitosanases는 원래 GH8로 포함되어 cellulase family D로서 분류되어 왔으나 키토산 뿐만 아니라, xylanase, licheninase (EC 3.2.1.73) 등( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4) 결합당을 가수 분해하는 다양한 효소 활성들이 보고되고 있다(Linston, 2004; Thomas 등, 2014; Zhao, 2018). 따라서 키틴이나 키틴올리고당에 특이적으로 작용하는 것으로 알려진 탈아세틸라제(Cai 등, 2006)를 포함해서 상기 기술한 바와 같이, 이러한 다양한 효소들의 기질 특이성에 대한 연구도 매우 중요하지만, 이러한 효소들의 작용기작

을 활용하여 어떠한 분야에 적용할 것이냐에 따라 새로운 접근 및 해석이 필요할 것으로 판단된다. 효소의 기질 특이성을 결정짓는 요소를 단지 기질에 대한 친화성이나 반응 최적조건에 따른 효소활성 정도를 결정하는 단계를 포함하여, 효소의 가공에 의한 기질의 새로운 물질로의 전환을 통해 이들이 어떠한 생리, 생물학적 기능을 갖느냐에 따라 새로운 효소연구에의 지표가 설정될 수 있을 것으로 감히 예견해 본다.

키틴질은 자연계에서 셀룰로오스 다음 두 번째로 많이 생산되는 천연 고분자라고 알려져 있을 만큼 우리 주변에서 쉽게 접할 수 있다. 하지만, 해양 생태계 만을 고려하면 오히려 셀룰로오스 보다 훨씬 많을 것으로 생각된다. 사람들에 의해 포획되어 처리되고 난 뒤 폐기물로 다시 바다에 버려지거나 자연적으로 죽음에 처한 게나 새우들의 껍질은 결국 다시 해양생태계로 환원되어 여러 생물학적 먹이사슬계를 통해 새로운 생물학적 요소로 사용되어 질 것이다. 이러한 과정에 있어서 키틴질 분해를 통해 이들을 탄소원이나 질소원으로 생육에 사용하는 해양 미생물 중 가장 대표적인 것이 바로 비브리오 중 (*Vibrio sp.*)들로 해양 생태계 복원이나 유지에 매우 중요한 역할을 하고 있음을 밝히고자 오랜 연구를 통해 키틴질 분해 메카니즘이 규명되었다(Keyhani, 1996; Bouma, 1996; Keyhani, 1997; Keyhani 등, 1996; Keyhani 등, 2000; Keyhani, 2000; Keyhani 등, 2000). 이에 앞서 일반 대장균(*Escherichia coli*)에서도 *exo*-type 효소인 *N*-acetylglucosaminidase가 작용하여 키틴 가수분해 산물인 키틴 올리고당을 단당의 GlcNAc로 전환, 이를 에너지원으로 사용할 수 있다는 내용의 연구 결과가 보고되었다. 이들은 실제 유전자 재조합을 통해 효소의 생화학적 특성을 규명한 반면, 이에 앞서 *Nature*에 실렸던 대장균의 전장유전체(whole genome) 분석결과 및 유전자 상동성 기반으로 유전자의 이름을 결정하는 과정에서 이들은 *chitinase*로 유전자 명을 제시하였다(Keyhani

등, 1997).

전체적인 키틴분해에 관여하는 효소들의 특징을 나열해 보면, 우선 키틴질이 다량 함유된 배양액에 *Vibrio sp.* 균을 배양하게 되면, 이 균주는 우선 키틴질에 탁월한 친화력을 갖고 점착하는데 이는 아마도 세포외막 단백질의 어떠한 기질에 대한 친화성에 의한 것으로 판단된다. 이후, *endo*-type의 세포외 키틴 분해효소(*extracellular chitinase*)를 분비하고 이를 이용해 키틴질은 무작위로 분해하여 보통은 2~6 개의 GlcNAc으로 구성된 올리고당을 제조한다. 완전한 분해 기작이 밝혀지기 전까지 이때 시간차에 따라 *exo*-type의 효소도 분비되어 만들어진 올리고당을 비환원 말단부터 하나씩 절단하여 이후 이화작용(*catabolic cascade*)에 따라 최종적으로 분해되는 것으로 생각하여 왔다. 또 하나의 의문은 거대분자인 키틴질을 분해하기 위해 처음 키틴아제 발현을 유도하는 물질은 무엇인가에 대한 것이었다. 일부 논문에서는 키틴 올리고당이나 단당의 분자가 작용체로 사용될 것이란 가설을 내세우고 있으나, 좀 더 명확한 연구 결과를 제시할 필요가 있다고 하겠다. *In vitro* 상에서는 1-3 당의 GlcNAc을 포함하는 배양 배지에서 미생물이 이러한 분해효소를 발현하는 점을 고려하면 이러한 *chitinase*의 의해 분해된 분해산물이 더욱 효소의 발현을 가속화 할 수 있음은 어찌면 자명한 일이라 하겠다. 그런 측면에서 최종 분해산물인 단당의 GlcNAc은 어떠한 과정을 걸쳐 더욱 분해될 것인가 하는 관점에서 확인된 것이 미생물 세포 외막과 이중층 사이를 변형 없이 통과한 GlcNAc은 *Pyruvateenol phosphate* 유래 *Phosphate Transferase System (PTS)*를 이용한 GlcNAc의 인산화에 따른 GlcNAc-6-Pi로 되어 세포내로 유입시켜 이후 후속적인 단계를 통해 완전 분해됨을 확인하였다. 여기서 만일 미생물의 세포막을 통과하는 것이 유일한 크기의 GlcNAc 이라면, 기본적으로 *endo*-type 효소보다 *exo*-type 효소의 량이 더 많아야 할 것이라는 논제를 둘 수 있다. 이를



관찰해보고자(GlcNAc)<sub>2</sub>를 순수 분리하여 이것이 어떠한 과정을 걸쳐 분해되는지 연구를 지속적으로 수행하였다. 오랫동안 많은 관련 연구자들은 이를 분해하는 효소, 즉 chitinase를 찾고자 노력을 기울여왔으나 연구 중이었던 *Vibrio* sp.에서는 이를 가수 분해하는 효소활성을 찾을 수 없었다. 따라서 이후 본인이 그 작용에 관여하는 효소의 특성을 밝히기 전에는 해답을 아무도 모르고 있었다. 뿐만 아니라, 연구 팀은 *Vibrio* sp.가 (GlcNAc)<sub>2-6</sub>의 크기까지 특이적 변화 없이 세포 이중층 사이로 흡입할 수 있다는 결과를 제시하고, 이후 cytoplasmic membrane, 즉 원형질막을 어떻게 통과하는지에 대한 기초연구를 위해 chitin catabolic cascade에 관여하는 유전자들의 여러 operon을 포함하는 유전체를 분리, 각각의 operon에 해당하는 유전자를 클로닝 하고 유전자 발현 및 효소의 분리정제와 효소학적 특성에 박차를 가하였다. 관련된 연구 논문이 지속적으로 보고되었으나 (GlcNAc)<sub>2</sub> 가수분해 관련된 논문은 보고된 바 없었다. 과연 그럼 어떻게 세포내로 흡입 또는 분해될 것인가?

주어진 유전자 군에는 약 11개의 키틴 분해관련 유전자들이 나열되어 있었다. 그들 중 3개의 operon이 미해석으로 남겨져 있었으며, 이들의 효소학적 특성을 규명하면 총 11개의 유전자의 발현에 따른 각각의 효소들에 의한 키틴분해 기작이 명확해 진다는 것은 너무도 당연한 일이었다. 여기에는 glucose and *N*-acetylglucosamine permeases, glucosamine-6-phosphate deaminase, *N,N*-diacetylchitinase, chitoporin, periplasmic  $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase, periplasmic chitinotriase 등의 효소학적/동력학적 특성이 밝혀졌다(Keyhani, 1996; Bouma, 1996; Keyhani, 1997; Keyhani 등, 1996; Keyhani 등, 2000; Keyhani, 2000; Keyhani 등, 2000). 다만, 미지로 남겨졌던 세 개의 유전자 중 가장 중간 부분에 위치한 유전자를 클로닝하고 이를 해석해보고자 하였으며, 그 결과 이 효소는 지금까지 생각해왔던 그러한 가수분해 효소가 아닌 인산

화를 통해 분해하는 phospholyase 중의 하나였다. 이는 완전히 새로운 결과였으며, chitinase와는 별개의 작용방식으로 (GlcNAc)<sub>2</sub>을 무기인산 존재 하에 GlcNAc-1-Pi와 GlcNAc로 분해하는 효소였다. 또한 분해된 산물의 농도 평형에 따라 이 효소는 역으로(GlcNAc)<sub>2</sub>를 합성하는 효소이기도 하다. 결국 GlcNAc-1-Pi와 GlcNAc로 분해된 산물은 이후 복잡한 과정을 통해 완전 분해될 수 있음을 알 수 있는데, (GlcNAc)<sub>2</sub> 이외의 다른 올리고당에 대해서는 활성이 확인되지 않아 아마도 이는(GlcNAc)<sub>2</sub> 특이적 인산화 효소임이 확실하다. 따라서 인산화에 따른(GlcNAc)<sub>2</sub> 분해 관련된 최초의 보고이기에 매우 값진 결과라 할 수 있겠다(Park 등, 2000).

GlcNAc분자의 세포내에서의 변화는 아마도 hexose kinase에 의해 GlcNAc-1-Pi로 되거나 이전 탈아세틸화 효소에 의해 GlcN으로 전환될 가능성이 매우 높는데, 대사 경로상에서의 어느 쪽이 우선이냐 보다는 생물학적 조건에서의 필요성에 따라 유전자 발현 및 효소활성이 서로 다르게 작용할 가능성은 충분하다. 사전 연구 결과에 있어서 *Vibrio* sp. 들은 glucose는 물론 GlcN을 단일 탄소원으로 제공했을 때 배양이 가능하였던 것을 고려하면, 분명 GlcN을 어떠한 방식으로든 세포 내로 유입해 사용하는 기작이 있을 수밖에 없는데, 세포내 키틴 올리고당 탈아세틸라제(chitin oligosaccharides deacetylase)의 유전자 클로닝에 따른 역할이 알려짐에 따라 GlcNAc 분자들을 일부 탈아세틸화시켜 GlcN을 갖는 분자로의 전환에 관한 연구결과가 보고된바 있다. 다만, 단일분자의 GlcN 세포내 유입이나, 키틴분해 이화작용 중 세포내로 유입된 키틴 올리고당의 탈아세틸화에 따른 GlcN으로의 전환 및 분해 과정에 따라 유입된 GlcN이나 분해과정 중 생성 가능한 GlcN의 분해과정에 대한 연구 결과는 전무했던 상태로, 결국 GlcN-specific kinase에 의해 인산화 된다는 사실을 밝혔다. 이에 대한 후속적 연구가 더욱 필요하다 생각되지만, 매우 특이한 사항으

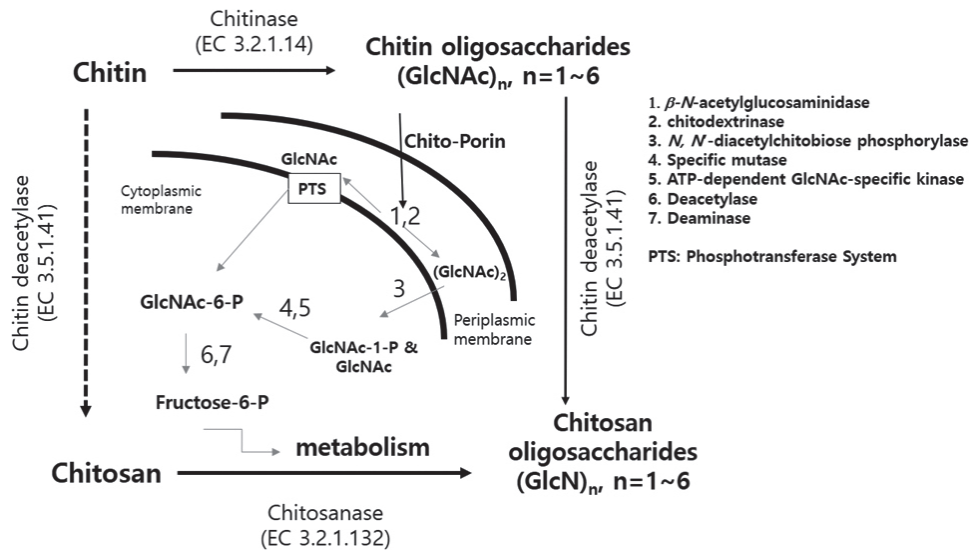


Figure 1. The schematic chitin catabolic cascade of a marine bacterium *Vibrio* sp. Enzymes with low enzyme activity or substrate specificity are indicated by dotted line. Most of enzymes involved in chitin degradation and metabolism were presented in gray arrows.

로 다른 amino 당들에 대해서 유의적 활성이 전혀 보이지 않았으며, 오로지 GlcN에 대해서만 매우 높은 유의적 활성을 나타내어 GlcN-specific kinase라 명명되었다(Park 등, 2002). 또한, 명확한 근거는 없지만, 육상계로부터 과량의 셀룰로오스 성분이 해양으로 유입되고, 이를 분해하는 미생물들의 역할에 의해 키틴질의 생태계로의 환원과 유사하게 이들도 분해되어 사용된다면 어떠한가? 라는 의문 속에 세 번째 유전자 클로닝을 통해 효소의 특성이 규명되었다. 결과적으로, 키틴과는 상관없는 셀룰로오스 유래 올리고당을 분해하는 glucosidase로 밝혀져 키틴분해 유전자 군의 가운데 부분에 놓여 있는 이들 세 유전자들은 각각 (GlcNAc)<sub>2</sub> 인산화효소, GlcN-specific kinase 그리고 glucosidase로 명확히 밝혀졌다(Figure 1)(Park 등, 2000; Park et. al., 2002; Park 등, 2002).

이를 통해 최종적으로 키틴 분해 관련 유전자들의 역할은 물론 어떠한 방식으로 분해되는가를 한 눈에 살펴볼 수 있는 결과에 까지 이르렀기에 해양 미생물 뿐만 아니라 다른 키틴을 분해하는 생물체

에서의 기본적 작용 메커니즘 또한 이와 매우 유사할 것이라 생각된다. 더불어 키틴 뿐만 아니라 키토산 분해에 관여하는 전체적인 메커니즘은 아직 밝혀지지 않았으나, 이 또한 매우 유사할 것으로 생각되는 바 앞으로 이완 관련된 후속 연구 결과가 크게 기대되는 바이다. 한 가지 더 부연 설명하자면, 키틴이나 키토산을 분해하는 미생물들과 이들 키틴/키토산 분해산물에 의해 생육억제나 내성을 갖지 못해 사멸하는 미생물들의 차이를 명확히 밝힐 수 있다면, 여러 부작용이 많은 합성 항생물질 대체 물질로의 활용 가능성도 고려해볼 중요한 연구 과제라 하겠다.

#### 2.4 키틴/키토산 분해산물과 효소의 식품에의 적용

키틴 분해산물이나 관련 효소를 식품에 적용/이용하기 위해 상기 기술한 바와 같이 탄소원/질소원으로 사용하는 미생물 기반 키틴 분해 메커니즘에 관여하는 여러 효소들의 특징을 이해하는 것이 매우 중요하다. 더 나아가 동·식물 그리고 인간에 이르기까지 폭 넓은 응용연구가 필요하겠으나, 천연





Table 1. The biochemical characteristics of chitinases purified from various microorganisms.

Organisms	Optimum pH	Optimum temperature (°C)	Molecular weight (kDa)	Substrate specificity	References
<i>Aspergillus terreus</i>	5.6	50	60	none determined	Farag 등, 2016
<i>Enterobacter</i> sp. G-1	7.0	40	60	chitin, colloidal chitin, and ethylenglycol chitin	Park □, 1997
<i>Humicola grisea</i>	3.0	70	50	(GlcNAc) <sub>2</sub> , (GlcNAc) <sub>3</sub> , colloidal chitin	Kumar 등, 2018
<i>Paenibacillus pasadenensis</i> CS0611	5.0	50	41	chitin, colloidal chitin, crab shell powder	Guo 등, 2017

Table 2. The biochemical properties of chitosanases purified from various microorganisms.

Organism	Optimum pH	Optimum temperature (°C)	Molecular weight (kDa)	Substrate specificity	References
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> TKU024	6.0	50	27	chitosans with different deacetylation degree	Wang 등, 2011
<i>Bacillus cereus</i> D-11	6.0	60	41	colloidal chitosans, glycol chitosan, chitosan powder, chitin	Gao 등, 2008
<i>Matsuebacter chitosanotabidus</i> 3001	4.0	30~40	34	chitosan, glycol chitosan, colloidal chitosan,	Park 등, 1999
<i>Paenibacillus</i> sp. 1794	4.8	80~85	40	chitosan, CM-cellulose, chitosan	Zitouni 등, 2013
<i>Serratia marcescens</i> TKU011	5.0	50	21	chitosans with different deacetylation degree	Wang 등, 2008
<i>Streptomyces griseus</i> HUT 6037	5.7	60	34	Partially deacetylated chitosan, CM-cellulose, (GlcN) <sub>6</sub>	Tanabe 등, 2003
<i>Streptomyces roseolus</i>	5.0	50	41	colloidal chitosan, glycol chitosan, glycol chitin	Jiang et. al., 2012

고분자로서 이미 생체적합성과 분해성 그리고 낮은 독성 등의 평가로 우수한 바이오소재임이 밝혀진 키틴, 키토산 그리고 이들 분해산물에 대한 응용연구는 크게 문제될 일이 없을 것으로 생각된다(Sakairi 등, 1999; Brugnerotto 등, 2001; Auzely, 2003). 다만, 이들 관련 분해를 촉진하거나 합성하는 효소들의 식품에의 직접적인 이용은 아직 밝혀야만 할 많은 숙제들이 남겨져 있다고 생각된다. 따라서 키틴이나 키토산을 기질로 하여 특정 분자량 크기의 가

수분해 산물에 대한 많은 연구가 수행되었고, 이들의 면역증진, 항산화, 항균/항진균, 그리고 항암 활성 등에 대한 결과물은 손쉽게 접할 수 있을 만큼 많은 보고가 되어왔다(Shen 등, 2009; Tomida 등, 2009; Park 등, 2011; Kim, 2017). 저자 역시도 형질 전환에 이은 효소의 대량 발현과 mutagenesis를 이용한 돌연변이 유도 및 이를 활용한 분해산물의 분자량 크기 조절 등에 대한 수많은 연구를 수행해 왔으나 아직도 어느 특정 분자량 크기를 산업적으로

이용할 만큼의 생산이 매우 어려운 상태이다. 최소 6개 이상의 GlcNAc이 결합된 크기의 분자를 대량 생산하기에는 매우 힘든 상태로, 아직도 효소 공학적 측면에서의 연구 노력이 필요하다.

여러 효소학적 활용을 연구해 오던 중 고분자 키토산을 가수분해하여 분자량 분포를 MALDI-TOF mass spectra 분석을 통해 확인해본 결과, (GlcN)<sub>n</sub>, n=2-13에 해당하는 분해산물들을 확인하였으며 (Kim 등, 2015), 최근 (GlcN)<sub>n</sub>, n=5-25에 이르는 가수분해산물 획득이 가능해졌다(unpublished data). 그 전체 수율이 약 70% 이상에 해당하는 획기적인 효소처리방법을 고안, 사용 중에 있다. 하지만 아직도 이러한 분자 크기의 매우 유의적인 항균과 항진균, 항산화 효과 등이 확인되어 건강기능식품 또는 의약학적 측면에서의 이용도 고려되고 있으나 (Zheng 등, 2016; Yang 등, 2017), 단일 분자 크기의 최종 정제된 산물의 수득이 매우 어려워 진퇴양난에 빠져 있는 실정이다. 하지만, 높은 수율과 이를 이용한 생리활성 연구에 대한 높은 기대감으로 본격적인 분리정제에 모든 노력을 기울이고자 노력 중이다. 아무리 우수한 분리정제 기술을 보유하고 있다고 해도 사실상 이러한 분자 크기의 가수분해 산물을 정량적으로 평가했을 때 어느 정도 유의적으로 생산할 수 있는 기술력 확보가 더욱 시급한 일일 수 있다. 다행히 현재 여러 차례의 반응을 통해 재현성이 우수한 효소 처리 방법의 확보는 향후 여러 연구나 응용소재로의 활용에 있어서 매우 고무적인 일이라 하겠다.

결과적으로 활성이 우수한 효소와 이를 사용했을 때 생산되는 특정 분자량 크기의 부산물, 그리고 시장가치를 함께 고려해보면 효소의 재사용이 가능하거나 혹은 매우 저가로 공급 되어야 할 것이며, 특정 분자량 크기의 부산물의 선택적 혹은 범용적이고 유의적인 활성에 대한 평가가 중요한 지표가 될 것이기에 이에 합당하는 효소의 새로운 발굴이나 기능에 대한 연구가 지속적으로 수반되어야 할

것이다. 이러한 특징들을 고려한 키틴이나 키토산 분해에 관련된 미생물 효소의 효율적 가치를 위해 기존의 온도, pH, 빛 그리고 염의 농도에 대한 안정성이 우수하고 높은 활성을 유지하는 효소원 발굴과 생산, 그리고 동력학적 특성 연구에 대한 많은 보고가 있다(Table 1 & 2).

하지만, 상기 기술한 시장가치를 위한 효소원 개발은 아직 미해결 과제로 생각된다. 또한, 재사용을 위한 효소고정화(immobilization of enzyme) 방법도 여러 연구자들에 의해 보고되고 사용되었으나 (Song 등, 2014), 사실상 산업적 응용에 이르기까지는 비용적 측면과 활성 유지 및 전처리 등의 과정을 통틀어 확인해보면 해결해야 할 선행 과제들이 매우 많다는 것을 알 수 있다. 또한 효소 공학적 기법을 활용한 대량생산 시스템 구축에 따른 효소의 발현과 정제 등의 과정을 포함해서 필요로 하는 특정 분자량 크기의 최종생산물의 높은 함량을 위해 최적화해야 할 요소들이 많아 효소활성 최적화 조건과 실제 필요로 하는 결과물 생산성과의 상대 비교는 대부분의 효소의 동력학적 특성을 주로 연구해 온 개념으로 접근하여 해석하기 매우 어려운 점이 많다. 왜냐하면, 여기에는 기질 특이성에 따른 효소 활성을 평가하고 특징짓는 연구로 원하는 대상물질의 생산성과는 크게 연관 짓거나 결론을 이끌어낸 사례들이 거의 없기 때문이다. 저자는 이러한 부분에 대해 논의하고 학술적 가치를 이끌어 내려고 시도해왔으나 최종 특정분자량 크기의 결과물을 얻고, 이들의 생리/생물학적 특성을 규명하기 이전에는 더욱 중요성을 크게 강조하기 어렵다는 사실도 알고 있다. 하지만, 이러한 맥락에서 새로운 효소원을 발굴하고 이들의 활성 기반으로 제조된 생산물의 크기 분포는 상기 기술 한 바와 같이 의약학적 응용가능성은 물론 건강기능식품을 포함한 다양한 식품분야에 사용될 수 있는 그 가능성을 크게 제시하고 있다고 판단되며, 어느 분야에 적용을 요하든 보다 큰 고부가가치 창출을 위해서는 향후 단일 분



자의 분리정제 및 이들의 활성 연구에 매우 큰 역할을 할 것으로 기대하고 있다.

## 결론

기존의 수많은 연구 결과물들에 대한 내용은 주로 키틴이나 키토산 분해 효소들의 기질 특이성 기반 동력학적 특성에 대한 내용을 언급하고, 이를 바탕으로 효소 활성의 특징을 규명하는 일에 대한 내용이 전부라 해도 과언은 아닐 것이다. 현재 키토산 가수분해 산물의 경우 (GlcN)<sub>n</sub>, n=1~6까지는 어느 정도 생산 및 정제가 가능한 일이다. 하지만 그 이상의 크기를 갖는 분자들의 생산 및 이들의 생리활성에 대한 내용은 사실상 찾아볼 수 없다. 어쩌면 생산할 수 있는 방법이나 효소의 부재로 판단된다. 사실상 (GlcN)<sub>n</sub> 이상의 특정한 분자량 크기를 갖는 단일 분자의 대량생산 방법이 알려진 바 없어, 이러한 분자의 생산법이나 효소원 발굴은 더없이 중요한 과제라 하겠다. 다행히도 본 저자는 여러 다양한 분자량 크기의 키토산 가수분해산물(GlcN)<sub>n</sub>, n=2-13 의 대량생산 방법을 구축하였으며, 최근에는 분자량 크기가 주로 (GlcN)<sub>n</sub>, n=5-25 해당된다는 사실을 확인하였다. 따라서 이들이 갖는 중요 특성을 규명하는 과정에서 밝힌 선택성이 우수한 병원성 세균들에 대한 항균활성과 베타 오렌지 등에 유해한 곰팡이에 대한 항진균성 그리고 전임상 실험을 통해 부분적으로 확인된 생체 밸런스 유지에 매우 중요한 역할을 하고 있다는 기초 연구 결과를 확인하였다. 특히, 이들 혼합 물질의 유의적 생리활성에 따른 식품에의 응용은 매우 고무적인 상태라 판단되며, 인체에 이로운 여러 식품 제조에 있어서 활성소재로의 활용이 충분하지 않을까 생각된다. 더 나아가, 의약학적 이용에 있어서는 특정 분자량 크기의 단일분자 정제와 특성 연구를 기반으로 향후 다가적인 측면에서 매우 높은 고부가가치 창출 가능한 소재로의 활용도 충분히 가능할 것으로 전망하고 있어, 이러한 새로운 기능의 효소원 발굴과 키틴

이나 키토산 유래 특정 분자량 크기의 가수분해 산물의 활용 연구에 더욱 많은 관심을 갖길 바라고 있다.

## 참고문헌

- Aam BB, Heggset EB, Norberg AL, Sorlie M, Varum KM, Eijsink VG. Production of chitoooligosaccharides and their potential applications in medicine. *Mar. Drugs* 8: 1482-1517 (2010)
- Adachi W, Sakihama Y, Shimizu S, Sunami T, Fukazawa T, Suzuki M, Yatsunami R, Nakamura S, Takenaka A. Crystal structure of family GH-8 chitosanase with subclass II specificity from *Bacillus* sp. K17. *J. Mol. Biol.* 343: 785-795 (2004)
- Allan GG, Peyron M. Molecular weight manipulation of chitosan II: Prediction and control of extend of depolymer-ization by nitrous acid. *Carbohydr. Res.* 277: 273-282 (1995)
- Auzely R, Rinaudo M. Controlled chemical modifications of chitosan characterization and investigation of original properties. *Macromol. Biosci.* 3: 562-565 (2003)
- Bassler BL, Yu C, Lee YC, Roseman S. Chitin utilization by marine bacteria: Degradation and catabolism of chitin oligosaccharides by *Vibrio furnissii*. *J. Biol. Chem.* 26: 24276-24286 (1991)
- Boucher I, Dupuy A, Vidal P, Neugebauer WA, Brzezinski R. Purification and characterization of a chitosanase from *Streptomyces* N174. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38: 188-193 (1992)
- Bouma CL, Roseman S. Sugar transport by the marine chitinolytic bacterium *Vibrio furnissii*: Molecular cloning and analysis of the glucose and *N*-acetylglucosamine permeases. *J. Biol. Chem.* 271: 33457-33467 (1996)
- Brugnerotto J, Desbrie' res J, Heux L, Mazeau K, Rinaudo M. Overview on structural characterization of chitosan molecules in relation with their behavior in solution. *Macromol. Symp.* 168: 1-20 (2001)
- Cai J, Yang J, Du Y, Fan L, Qiu Y, Li J, Kennedy JF. Purification and characterization of chitin deacetylase from *Scopulariopsis brevicaulis*. *Carbohydr. Polym.* 65: 211-217 (2006)
- Chen WP, Anderson AW. Purification, immobilization, and some properties of glucose isomerase from *Streptomyces flavogriseus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 1111-1119 (1979)
- Dwartz NE, Colvin JR, McInnes AG. Studies on chitin(b-(1-4)-linked 2-acetamido-2 -deoxy-D-glucan) fibers from the diatom *Thalassiosira fluviatilis*, Hust ed. III. The structure of chitin from X-ray diffraction and electron microscope observations. *Can. J. Chem.* 46: 1513-1521 (1968)
- Farang AM, Abd-Elnabey HM, Ibrahim HAH, El-Shenawy M. Purification, characterization and antimicrobial activity of chitinase from marine-derived *Aspergillus terreus*, Egypt. *J. Aquat. Res.* 42: 185-192 (2016)
- Gao XA, Ju WT, Jung WJ, Park RD. Purification and characterization of chitosanase from *Bacillus cereus* D-11. *Carbohydr. Polym.*

- 72:513–520 (2008)
- Goo BG, Park JK. Characterization of an alkalophilic extracellular chitinase from *Bacillus cereus* GU-02. *J. Biosci. Bioeng.* 117: 684–689 (2014)
- Guo X, Xu P, Zong M, Lou W. Purification and characterization of alkaline chitinase from *Paenibacillus pasadenensis* CS0611. *Chinese J. Catal.* 38: 665–672 (2017)
- Jiang X, Chen D, Chen L, Yang G, Zou S. Purification, characterization, and action mode of a chitinase from *Streptomyces roseolus* induced by chitin. *Carbohydr. Res.* 355: 40–44 (2012)
- Kashif SA, Park JK. Enzymatically Hydrolyzed water-soluble chitosan as a potent anti-microbial agent. *Macromol. Res.* 27(6): 551–557 (2019)
- Keyhani NO, Li X, Roseman S. Chitin catabolism in the marine bacterium *Vibrio furnissii*: Identification and molecular cloning of a chitoporin. *J. Biol. Chem.* 275: 33068–33076 (2000)
- Keyhani NO, Rodgers ME, Demeler B, Hansen JC, Roseman S. Analytical sedimentation of the IIAChb and IIBChb proteins of the *Escherichia coli* *N,N'*-diacetylchitobiose phosphotransferase system: Demonstration of a model phosphotransfer transition state complex. *J. Biol. Chem.* 275: 33110–33115 (2000)
- Keyhani NO, Roseman S. The chitin catabolic cascade in the marine bacterium *Vibrio furnissii*: Molecular cloning, isolation and characterization of a periplasmic chitodextrinase. *J. Biol. Chem.* 271: 33414–33424 (1996)
- Keyhani NO, Roseman S. The chitin catabolic cascade in the marine bacterium *Vibrio furnissii*: Molecular cloning, isolation and characterization of a periplasmic *b*-*N*-acetylglucosaminidase. *J. Biol. Chem.* 271: 33425–33432 (1996)
- Keyhani NO, Roseman S. Wild-type *Escherichia coli* grows on the chitin disaccharide, *N,N'*-diacetylchitobiose, by expressing the cell operon. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 14367–14371 (1997)
- Keyhani NO, Wang L-X, Lee YC, Roseman S. The chitin catabolic cascade in the marine bacterium *Vibrio furnissii*: Characterization of an *N,N'*-diacetyl-chitobiose transport system. *J. Biol. Chem.* 271:33409–33413 (1996)
- Keyhani NO, Wang L-X, Lee YC, Roseman S. The chitin disaccharide, *N,N'*-diacetylchitobiose, is catabolized by *Escherichia coli*, and is transported/phosphorylated by the phosphoenolpyruvate: glyucose phosphotransferase system. *J. Biol. Chem.* 275: 33084–33090 (2000).
- Kilara A, Shahani KM. The use of immobilized enzymes in the food industry: A review. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 12: 161–198 (1979)
- Kim JW, Lee CG, Hwang YJ, Park JK. Active molecular chitosan (AMC-S1): Preparation and characterization of antibacterial activity. *J. Chitin Chitosan* 20(4): 280–286 (2015)
- Kim JW, Park JK. Synergistic antimicrobial properties of active molecular chitosan with EDTA-divalent metal ion compounds. *J. Phyto-pathol.* 165: 641–651 (2017)
- Kimoto H, Kusaoke H, Yamamoto I, Fujii Y, Onodera T, Taketo A. Biochemical and genetic properties of *Paenibacillus* glycosyl hydrolase having chitinase activity and discoidin domain. *J. Biol. Chem.* 277: 14695–14702 (2002)
- Kumar M, Brar A, Vivekanand V, Pareek N. Process optimization, purification and characterization of a novel acidic, thermostable chitinase from *Humicola grisea*. *Int. J. Biol. Macromol.* 116: 931–938 (2018)
- Linton SM, Greenway P. Presence and properties of cellulase and hemicellulase enzymes of the gecarcinid land crabs *Gecarcoidea natalis* and *Discoplax hirtipes*. *The J. Exp. Biol.* 207: 4095–4104 (2004)
- Macdonald, A. G. , Martinac, B. , Bartlett, D. H. High pressure experiments with porins from the barophile *Photobacterium profundum* SS9. *Progr. Biotechnol.* 19: 311–316 (2002)
- Montilla A, Ruiz-Matute AI, Corzo N, Giacomini C, Irazoqui G. Enzymatic generation of chitooligosaccharides from chitosan using soluble and immobilizedglycosyltransferase (Branchzyme). *J. Agric. Food Chem.* 61: 10360–10367 (2013)
- Park JK, Choi DJ, Kim SM, Choi HN, Park JW, Jang SJ, Choo YK, Park YI. Purification and characterization of a polysialic acid-specific sialidase from *Pseudomonas fluorescens* JK-0412. *Biotechnol. Bio-process Eng.* 17: 526–537 (2012)
- Park JK, Chung MJ, Choi HN, Park YI. Effects of the molecular weight and the degree of deacetylation of chitosan oligosaccharides on antitumor activity. *Int. J. Mol. Sci.* 12: 266–277 (2011)
- Park JK, Morita K, Fukumoto I, Yamasaki Y, Nakagawa T, Kawamukai M, Matsuda H. Purification and characterization of the chitinase (ChiA) from *Enterobacter* sp. G-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61: 684–689 (1997)
- Park JK, Shimono K, Ochiai N, Shigeru K, Kurita M, Ohta Y, Tanaka K, Matsuda H, Kawamukai M. Purification, characterization, and gene analysis of a chitinase (ChoA) from *Matsuebacter chitosanotabidus* 3001. *J. Bacteriol.* 181: 6642–6649 (1999)
- Park YM, Ghim SY. Enhancement of the activity and pH-performance of chitinase from *Bacillus cereus* strains by DNA shuffling. *Biotechnol. Lett.* 31: 1463e1467 (2009)
- Park JK, Keyhani NO, Roseman S. Chitin catabolism in the marine bacterium *Vibrio furnissii*: Identification, molecular cloning, and characterization of a *N,N'*-diacetylchitobiose phosphorylase. *J. Biol. Chem.* 275: 33077–33083 (2000)
- Park JK, Wang L-X, Patel HV, Roseman S. Molecular cloning and characterization of a unique beta-glucosidase from *Vibrio cholerae*. *J. Biol. Chem.* 277: 29555–29560 (2002)
- Park JK, Wang L-X, Roseman S. Isolation of a glucosamine-specific kinase, a unique enzyme of *Vibrio cholerae*. *J. Biol. Chem.* 277: 15573–15578 (2002)



- Petersen L, Ardevol A, Rovira C, Reilly PJ. Mechanism of cellulose hydrolysis by inverting GH8 endoglucanases: A QM/MM metadynamics study. *J. Phys. Chem. B* 113: 7331-7339 (2009)
- Rinaudo M, Milas M, Le Dung P. Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. *Int. J. Biol. Macromol.* 15: 281-285 (1993)
- Robb FT, Park JB, Adams MWW. Characterization of an extremely thermostable glutamate dehydrogenase: a key enzyme in the primary metabolism of the hyperthermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*. *Bioch. Biophys. Acta*, 1120: 267-272 (1992)
- Sakairi N, Nishi N, Tokura S. Cyclodextrin-linked chitosan: synthesis and inclusion complexation ability. In: El-Nokaly MA, Soini HA, editors. *Polysaccharide applications: cosmetics and pharmaceuticals*, ACS Symposium Series 737: 68-84 (1999)
- Sano H, Matsukubo T, Shibasaki K, Itoi H, Takaesu Y. Inhibition of adsorption of oral *Streptococci* to saliva treated hydroxyapatite by chitin derivatives. *Bull. Tokyo Dent. Coll.* 32: 9-17 (1991)
- Sarasam AR, Brown P, Khajotia SS, Dmytryk JJ, Madihally SV. Antibacterial activity of chitosan-based matrices on oral pathogens. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 19: 1083-1090 (2008)
- Shen KT, Chen MH, Chan HY, Jeng JH, Wang YJ. Inhibitory effects of chitooligosaccharides on tumor growth and metastasis. *Food Chem. Toxicol.* 47: 1864-1871 (2009)
- Sinha S, Dhakate SR, Kumar P, Mathur RB, Tripathi P, Chand S. Electrospun poly-acrylonitrile nanofibrous membranes for chitosanase immobilization and its application in selective production of chitooligosaccharides. *Biores. Technol.* 115: 152-157 (2012)
- Song JY, Alnaeli M, Park JK. Efficient digestion of chitosan using chitosanase immobilized on silica-gel for the production of multisize chitooligosaccharides. *Proc. Biochem.* 49: 2107-2113 (2014)
- Tanabe T, Morinaga K, Fukamizo T, Mitsutomi M. Novel chitosanase from *Streptomyces griseus* HUT 6037 with transglycosylation activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67: 354-364 (2003)
- Thomas L, Joseph A, Gottumukkala, LD. Xylanase and cellulase systems of *Clostridium* sp.: An insight on molecular approaches for strain improvement. *Biores. Technol.* 158: 343-350 (2014)
- Tomida H, Fujii T, Furutani N, Michihara A, Yasufuku T, Akasaki K, Maruyama T, Otagiri M, Gebicki JM, Anraku M. Antioxidant properties of some different molecular weight chitosans. *Carbohydr. Res.*, 344: 1690-1696 (2009)
- Van-Thuoc D, Huu-Phong T, Minh-Khuong D, Hatti-Kaul R. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by a moderate halophile *Yangia* sp. ND199 using glycerol as a carbon source. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 75: 3120-3132 (2015)
- Wang SL, Peng JH, Liang TW, Liu KC. Purification and characterization of a chitosanase from *Serratia marcescens* TKU011. *Carbohydr. Res.* 343: 1316-1323 (2008)
- Wang SL, Tseng WN, Liang TW. Biodegradation of shellfish wastes and production of chitosanases by a squid pen-assimilating bacterium, *Acinetobacter calcoaceticus* TKU024. *Biodegrad.* 22: 939-948 (2011)
- Yang F, Luan B, Sun Z, Yang C, Yu Z, Li X. Application of chitooligosaccharides as antioxidants in beer to improve the flavour stability by protecting against beer staling during storage. *Biotechnol. Lett.* 39: 305-310 (2017)
- Zhao X, Gänzle MG. Genetic and phenotypic analysis of carbohydrate metabolism and transport in *Lactobacillus reuteri*. *Int. J. Food Microbiol.* 272: 12-21 (2018)
- Zhao H, Wu B, Wu H, Su L, Pang J, Yang T, Liu Y. Protective immunity in rats by intranasal immunization with *Streptococcus mutans* glucan-binding protein D encapsulated into chitosan-coated poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres. *Biotechnol. Lett.* 28: 1299-1304 (2006)
- Zheng B, Wen ZS, Huang YJ, Xia MS, Xiang XW, Qu YL. Molecular weight-dependent immunostimulative activity of low molecular weight chitosan via regulating NF- $\kappa$ B and AP-1 signaling pathways in RAW264.7 macrophages. *Mar. Drugs* 14: E169 (2016)
- Zitouni M, Fortin M, Scheerle RK, Letzel T, Matteau D, Rodrigue S, Brzezinski R. Biochemical and molecular characterization of a thermostable chitosanase produced by the strain *Paenibacillus* sp. 1794 newly isolated from compost. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97: 5801-5813 (2013)