

664.024
L2937

최 중
연구보고서

키틴 원료 신소재 개발과 활용 및 새로운
천연조미료 개발에 관한 연구

Development and Utilization of the New
Biomaterials from Chitin and Production of a New
Natural Seasoning

주관연구기관 : 아주대학교 화학생물공학부
참여기업 : 삼아벤처
협동연구기관 : 세종대학교 식품공학과
협동연구기관 : 전남대학교 농화학과

농림부

최 종
연구보고서

키틴 원료 신소재 개발과 활용 및 새로운
천연조미료 개발에 관한 연구

Development and Utilization of the New
Biomaterials from Chitin and Production of a New
Natural Seasoning

사 업 구 분 : 첨단농림수산물기술개발과제
연구(개발) 분야 : 첨단가공기술개발

주관연구기관 : 아주대학교 화학생물공학부
참 여 기 업 : 삼아벤처
협동연구기관 : 세종대학교 식품공학과
협동연구기관 : 전남대학교 농화학과

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “키틴 원료 신소재 개발과 활용 및 새로운 천연 조미료 개발
에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1998. . . .

주관연구기관명 : 아주대학교
총괄연구책임자 : 조도현
연 구 원 : 박연희
연 구 원 : 주동표
연 구 원 : 신용철
연 구 원 : 이우진
협동연구기관명 : 세종대학교
협동연구책임자 : 오훈일
협동연구기관명 : 전남대학교
협동연구책임자 : 박노동

요 약 문

I. 제 목

키틴 원료 신소재 개발과 활용 및 새로운 천연 조미료 개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

홍게(*Chitinonectes opilio*)는 우리나라 동해 근해와 남동해안 근해에서 주로 어획되는 연안해안자원으로서 그 생육이 빠르고 번식력이 아주 강한 갑각류이다. 지난 10여년간 동해안에서의 홍게 어획량을 보면 다른 수산자원과는 달리 지속적으로 동일 수준을 유지하는 것이 특징이라 하겠다(연간 4만ton). 거의 가공은 게살만을 분리하여 이용하였을 뿐이기 때문에 가공 부산물인 게껍질이 미국에서는 1950년대에 커다란 공해문제로 대두되었었다. 그후 게껍질의 활용방안을 연구한 끝에 게껍질에는 다량의 천연고분자인 키틴이 들어있다는 것이 밝혀져 게껍질로 부터 키틴을 얻게 되었다. 이 키틴은 게, 새우 뿐만 아니라 곤충, 곰팡이류 등에 분포하고 있으며 그 구조는 N-acetyl-glucosamine이 5,000개 이상 $\beta(1\rightarrow4)$ 결합으로 이루어진 다당류의 중합체로서 셀룰로오스 다음으로 지구상에서 가장 많이 존재하는 천연 탄수화물자원일 뿐 아니라 또한 아민기를 갖고 있으므로 양전하를 띠고있는 유일한 천연고분자 물질이다. 전세계적으로 이용가능한 키틴의 양은 200만ton에 달하며 주로 게껍질과 크릴새우가 산업용으로 이용되고 있는 중요자원이다. 우리나라에서는 속초를 중심으로 하여 연간

약 4만ton 정도의 계가 어획되며 또한 수천ton의 크릴이 국내로 반입이 되고 있으며 이 크릴의 반입은 계속하여 증가일로에 있다.

또한 키틴제조에서 단백질제거 처리후 다량의 산성폐수가 방출되고 있으나 이 폐수처리방법 및 이 폐수에 포함되어 있는 유효성분의 이용기술이 전무한 실정이다. 뿐만 아니라 고온, 고농도의 알카리 사용문제 및 생산공장의 공정이 연속으로 이루어지지 않는 등의 문제로 에너지를 과다히 낭비하고 있다.

따라서 본 연구에서는 제1과제로 새로운 천연조미료 개발 및 제조공정 개선을, 제2과제로 미생물, 효소 생산 및 응용, 제3과제에서는 키토산의 식품에의 응용, 제4과제는 농업용, 의료용 소재의 개발·연구를 하였다. 이와 같이 천연조미료 개발 및 공정개선은 물론, 미생물, 효소 생산과 이용, 식품에서의 응용 및 농업 및 의료용 소재 개발을 함으로서 본 연구는 기술적인 측면, 경제 산업적인 면은 물론 문화, 사회적인 측면에 다음과 같은 기여를 할 것이다.

본 연구의 중요성을 기술적인 면에서 보면 이러한 공정의 개발은 우선 천연조미료의 제조와 키토산 및 키토산-키틴 올리고당 제조가 단일 공정으로 연결되어있어 보다 경쟁력이 증가하고 부가가치가 증가함은 물론 반응액 및 유용물질의 회수가 가능하여 국제적인 경쟁력을 가질 수가 있다. 또한 키틴 키토산 분해능이 뛰어난 미생물을 선발, 대량 생산 기술을 확립하였으며 식품응용성의 기초자료를 확립하여 이를 근거로 하여 마요네즈의 저장성 및 키토산 동치미 주스를 개발하여 식품에의 응용기술을 축적하였으며 키틴 키토산 및 유도체를 합성하여 농업 생산성 및 의약적 응용인 항암, 항감염성, 면역증진제 및 인공피부로서의 응용가능 기술을 확립하였

다.

두번째로 경제·산업적인 측면에서 살펴보면 현재까지 우리나라 동해안의 홍게 가공공장에서는 게를 거의 1차 가공단계에 해당되는 게 육질을 회수하여 게살의 형태로 일본에 수출하고 남은 가공폐기물인 게껍질로부터 저 품질의 폐수처리용 키토산의 원료가 되는 키틴으로 가공하여 연간 120ton 가량을 일본에 수출하여 왔으며 키토산은 10여개 회사에서 80여 ton을, 올리고당은 40여 ton을 생산한다. 그러나 게살을 분리한 후의 부산물을 이용하여 게의 엑기스를 제조하고 이를 원료로 새로운 천연조미료를 생산함과 동시에 남은 게 껍질을 이용하여 부가가치가 높은 식품용, 의약품 화장품용 및 농업생산 증진용의 고품질 키틴, 키토산 및 올리고당을 생산함으로써 국제경쟁력이 제고됨은 물론 수산자원의 고부가가치화에 의한 게 수요의 증가로 어민의 소득증대를 도모할 수 있을 것이다. 뿐만 아니라 본 연구결과에 의거하여 홍게 종합가공공장이 소규모의 자본으로 설치 운영이 가능하여 어민의 고용증대를 이룩할 수 있어 어민의 안정한 직장이 형성될 것이다.

마지막으로 사회·문화적 측면에서 살펴보면 기본 의·식·주의 해결에 따른 국민 생활수준의 향상과 인구의 노령화에 따라 건강에 대한 관심이 지극히 고조되고 있는 우리나라에서도 본인이 고통을 받는 것을 원하지 않을 뿐 아니라 고통을 당하는 것을 보는 것을 거부하고 있는 사회로 발전하고 있다. 따라서 국민보건증진, 질병예방, 건강보조식품 및 무공해성 식품에 대한 관심도가 아주 높아서 현재 본 연구에서 추구하는 게를 이용한 키틴원료 신소재 개발과 활용 및 새로운 천연 조미료 개발에 관한 연구는 보다 더 경제적이고 환경 친화적 산업이 될 것이다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구에서 수행한 4가지 세부과제명과 연차별 연구내용은 다음과 같다. 각 세부 과제별 상세 내용은 따로 기술하였다.

제1세부과제: 천연 조미료 개발 및 공정개선

- 1차년도: 추출 최적화 및 효소에 의한 단백질 제거
- 2차년도: 농축액의 물성 측정, 반응물 재사용 및 유용물질 회수
- 3차년도: formulation, 건조 및 수학 model제시와 simulation

제2세부과제: 미생물, 효소생산 및 응용

- 1차년도: 키틴 키토산 분해 우수균주 선발
- 2차년도: 키틴 키토산 분해효소 특성 규명 및 유전자 클로닝
- 3차년도: 키토산 분해효소 생산 최적화 및 올리고당 생산

제3세부과제: 식품에의 응용

- 1차년도: 키틴, 키토산 제조 및 식품학적 물성 연구
- 2차년도: 키토산 첨가에 의한 마요네즈의 저장성 연구
- 3차년도: 키토산 동치미 주스의 개발 및 특성 연구

제4세부과제: 농업 및 의약품 소재 개발

- 1차년도: 키토산 및 키틴 유도체제조
- 2차년도: 식물병원성 미생물 생육억제 효과, 면역증진, 항암 및 항감염성 연구
- 3차년도: 식물생장 조절 검색 및 화상치료제, in vivo 실험

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

본 연구의 4가지 세부과제인 새로운 천연조미료 개발 및 제조공정 개선, 미생물, 효소 생산 및 응용, 식품에서의 응용 및 농업 및 의료용 소재의 개발 연구의 결과를 요약하면 다음과 같고 상세한 내용은 각 세부과제 별로 기술하였다.

제1세부과제: 새로운 천연조미료 개발 및 제조공정 개선

게살에서 천연조미료 성분추출의 최적조건을 확립하여, 농축액을 제조하였으며 이 농축액의 물성을 측정하고 일반 천연조미료와 향기위주 천연조미료에 따라 base formulation을 정하고 최종 formulation을 완성하였다. 완성된 최종 formulation으로 분말형, 과립형 및 액상형의 3가지 형태의 조미료를 시험 생산하여 품목허가를 취득하여 생산중이다. 제조공정 개선에서는 NaOH의 재사용이 가능해지고 폐 NaOH는 산성폐수를 다량 배출하는 업체와 계약에 의하여 해결하도록 하였다. 점도가 다른 키토산 및 Ca-키토산을 개발하였다. 탈 아세틸화도에 관한 수학적 model을 개발하여 simulation을 도모하였다. 또한 미반응 기질의 및 효소의 재사용 공정을 개발하였고, 수용성 올리고당제조 및 이를 다량으로 순수 분리할 수 있는 기술을 개발하였다.

제2세부과제: 미생물, 효소 생산 및 응용

Endo-chitinase 생산 세균을 40여종 1차 선발하여 endo-chitinase 활성이 가장 높은 균주 *Bacillus* sp.인 GM13을 얻었으며 GM 13 균주의 chitinase를 클로닝하였다. 또한 유용 chitosanase 생산 균주로

Bacillus sp.인 GM44을 분리, 동정한 후 GM 44균주의 chitosanase를 분리, 정제하고, 효소 특성을 조사하고 GM 44균주의 chitosanase에 의한 분해산물 특성을 조사하였다. 이를 기초로 하여 chitosanase의 생산조건을 최적화하여 venture기업체에 의하여 실험생산에 돌입하였으며, 본 chitosanase를 이용한 chitosan oligomer 생산기술을 확립하여 효소생산과 더불어 상품화 단계에 있다.

제3과제: 식품에서의 응용

조 키틴으로 부터 정제된 키틴을 제조하였으며 NaOH용액을 처리하여 저분자 및 고분자의 분자량이 다른 4종류의 키토산을 제조하여 식품으로서의 물성을 규명하고 나아가서 식품변질에 관여하는 4종류의 미생물에 대한 생육저해 시험을 수행하여 키토산의 식품에의 응용가능성을 조사하였다. 이를 바탕으로 하여 일차적으로 마요네즈 변질 미생물 억제, 이화학적 변화 및 관능 검사에서 키토산-50이 100ppm이 최적으로 저장 기간을 2배 연장 시키는 것으로 나타났다. 두 번째로는 동치미 주스 제조에서는 키토산-140이 1000ppm에서 최적의 물성과 가장 높은 관능적 평가를 얻었으며, 저장기간을 2.5배 연장시킬 수가 있었다.

제4과제: 농업 및 의료용 소재의 개발 연구

키토산을 염산으로 가수분해시 60분 80℃가 올리고당의 생산이 가장 좋았으며, 효소에 의한 가수분해에서는 dp가 2~4까지가 60%, dp가 5~7까지가 30%, 7이상이 10%가 생성되었으며, [¹⁴C]-키틴을 포함한 키토산의 다양한 유도체를 합성하여 FT-IR로 확인하였다. 식물성 병원균인 *Fusarium*

sp. 와 *Phytotera* sp. 에서는 키토산 용액 0.1%이상에서 생장이 현격히 감소함을 보였다. 콩나물 성장에 대한 키토산의 효과는 시중제품 “Indol B” 보다 우수한 촉진효과를 보였으며 토마토씨 발아에서는 키토산용액(0.2%)에 침지하는 것이 관주나 토양에 포함하는 경우보다 높은 효과를 나타냈다. Pentamer는 NO의 생산을 증진시켰으며, 대식세포의 증식을 촉진시켰고 *Listeria*와 *Candida*의 감염을 방어하는 효과가 있었다. 또한 chitin-PEG IPNs, chitin-alginate complex, chitosan-PLL graft 등을 제조하여 이들의 물리적 성질과 생물학적 적합성 등을 다양하게 검증하였다. Chitin-alginate complex에 Ag-sulfadiazine을 침지한 후 DHEA를 같이 투여한 것이 가장 항균, 화상치료효과가 좋았고, 세포독성이 없으며, 조직학적으로 양호하였다.

SUMMARY

This research project is composed of 4 parts:

1. Development of a new natural seasoning based on red crab, and improvement of manufacturing process.
2. Production and application of chitinolytic and chitosanolytic microorganisms and enzymes.
3. Application of chitin and chitosan to foods.
4. Development of new materials for agricultural and medico-pharmaceutical applications.

Results obtained in each part can be summarized as follows and more detailed contents are described in the corresponding subjects.

Part 1. Development of a new natural seasoning and improvement of manufacturing process

This subject was aimed to develop a new seasoning based on red crab (*Chitinonecetes opilio*) and to improve the process for the production of chitin, chitosan and the oligomers.

I. Development of a new natural seasoning

Optimal conditions for hot water extraction and alcohol extraction were established. We also investigated the physico-chemical properties of the concentrate of these extracts. To make base formulation for a new seasoning optimal proportion of additional extracts (onion extract, radish extract, galic extract, etc) are combined with the concentrate of red crabs. The mixing ratio of hot water extract and alcohol extract was optimized for base formulation. In addition, recovery flavor was added to improve flavor quality. To produce a flavor-enhanced additive, addition of alcohol extract was made to the mixture of the concentrate of enzyme hydrolysate and hot water extract. For vacuum and spray drying, the temperature, time, pressure, addition of sugar, gum and dextrin were tested for optimal combination. As final products of a new natural seasoning based on red crabs, we have produced three different types in appearance: granular type, powder type and liquid type. The liquid type is already on market.

II. Improvement of manufacturing process

The removal of protein from crab shell by enzyme was achieved to the level of 60%. Based on the optimization of reaction time, temperature and particle size, a specified chitosan can be produced.

To recover high Ca^{2+} from crab shell, we developed a process for producing Ca^{2+} -chitosan and characterized the physico-chemical properties. As valuable by-product, protein was recovered and its amino acid composition was determined. The recycling of NaOH was carried out and its final disposal was proposed to minimize the cost of chitosan production. The recycling of enzymes and unreacted substrate was also studied. We developed a process for producing chitin and chitosan oligomers using enzyme from gizzard of broiler and papain. The enzymes from broiler converted chitin and chitosan into water soluble oligomer with an efficiency of 30% and 63%, respectively, while papain hydrolyzed chitin and chitosan into corresponding oligomers with an yield of 14% and 68%, respectively.

A method of mass separation of water soluble oligomer was developed with a column of Bio-Gel P-2. The main constituents of hydrolysates by broiler's enzyme were di- and trimer of N-acetylglucosamine for chitin and trimer of glucosamine for chitosan. However, the major reaction product of papain hydrolysis was dimer of the corresponding sugar for both chitin and chitosan. The thermostability of both papain and broiler's enzyme was

excellent, as they retained 80% of activities for 3 days at 60°C, particularly papain maintained its activity at 70% even after 3 days at 70°C.

We also proposed a mathematical model to predict reaction conditions to produce a specific chitosan.

Part 2. Production and application of chitinolytic and chitosanolytic microorganisms and enzymes.

I. Studies on the production of chitin oligomer by microbial chitinase

For the production of chitin oligomer from red crab shells, the production of chitinase from microbial source has been investigated. The strains capable to grow on the medium containing chitin as a sole carbon source have been isolated from 300 samples collected from South Coast. By TLC analysis of the hydrolyzed products, GM13 showing endo-chitinase activity has been selected. The endo-chitinase activity was higher than the well known endo-chitinase producing strains, *Serratia marcesens* or *S. liquefaciens*. GM13 is Gram-positive strain of variable shape: coccus, rod or short rod with flagella. The strain GM13 was identified as *Arthrobacter* sp. by the morphological, biochemical and the carbon assimilation tests. The screening of the thermostable

enzyme producing strain and the endo-chitinase producing fungi was unsuccessful. The endo-chitinase production of GM13 was studied under various conditions. The enzyme production was induced by chitin and repressed by glucose. During the culture of GM13 in MC medium, the chitinolytic activity reached at the maximum after 54 hours of culture and the endo-chitinase showed the highest activity after 48 hours of culture. The results showed that the ratio of endo-chitinase to chitinolytic activity was maximum at 42 hours of culture, indicating relatively early production of endo-chitinase than exo-chitinase. For the production of chitin oligomer from chitin, the hydrolysed products were analyzed by TLC after 4 hours of reaction of chitinase from GM13 with the swollen chitin. The results showed that the chitin dimer was the main product and the small amount of trimer and heptamer were obtained.

In conclusion, the strain *Arthrobacter* sp. GM13, selected by screening large numbers of endo-chitinase producing microorganisms, showed high endo-chitinase activity than other well known bacteria. However, the degradation products of chitin by GM13 endo-chitinase were mainly dimer and the yield of higher oligomer was low due to the high activity of the enzyme on the oligomer. The chitinase obtained from thermophilic strains produced chitin dimers from chitin. Therefore these strains are not applicable for the production of chitin oligomer. The results suggest that the

microorganisms degrade chitin to monomer or dimer for the utilization as a carbon source. However, the further study should be continued to screen microbial source capable to produce chitin oligomers.

II. Studies on the production of chitosan oligomer by microbial chitosanase

For the production of chitosan oligomer from red crab shells, the production of chitosanase from microbial source has been investigated. The strains capable to grow on the medium containing chitosan as a sole carbon source have been isolated from 300 samples collected from South Coast. By the determination of chitosanase activity and TLC analysis of the hydrolyzed products, three strains producing chitosan trimer and the higher oligomers were selected. Among three strains, GM44 which showed the highest chitosanase activity and produce relatively higher oligomers was selected for the production of endo-chitosanase. This strain was tentatively identified as *Bacillus* sp. by morphological, biochemical test and the analysis of fatty acid composition of the cell. The endo-chitosanase activity of GM44 has been studied under various conditions. The growth and the chitosanase production was the highest at 30 °C. As a carbon source, soluble starch was the most suitable for the production of chitosanase, followed by glucose. In

contrast, chitosanase production was decreased by using chitosan as a carbon source. The maximum chitosanase production was obtained when the concentration of soluble starch was 2%. For nitrogen source, the yeast extract showed the best results.

For the purification of endo-chitosanase of GM44, the cells were cultured at 30°C for 70 hours. The supernatant was concentrated by PEG, dialysed and fractionated by column chromatography. The fraction containing chitosanase was concentrated by centricon and purified by FPLC. The specific activity of the purified chitosanase was 1,744 U/mg showing 24 times higher activity than supernatant (72 U/mg) and the yield was 46.5%. By SDS-PAGE of the purified chitosanase, only one protein band was detected, which was confirmed as chitosanase by chitosanase activity staining. The molecular weight of the chitosanase was estimated approximately 45 kDa. The analysis of N-terminal amino acid sequence of GM44 chitosanase showed 90% of homology with that of endo-cellulase of *Bacillus* sp. KSM330, however the homology was not observed with other chitosanase. The characteristics of the endo-chitosanase from GM44 were investigated. The results showed that optimum temperature was 70°C and 90% of the activity was retained for 16 hours at 40°C. At 50°C, 80% of the activity was lost after 16 hours. The optimum pH was 5.0. The enzyme showed high specificity to chitosan and showed very low activity on chitin, or CM-cellulose as a substrate. When

the activity was compared using chitosan with different degree of deacetylation, the maximum activity as obtained with the chitosan of 82% of deacetylation. The degradation pattern of chitosan by the enzyme showed that dimer or trimer could not be hydrolyzed and tetramer to heptamer were hydrolysed with low rate. When 4% of chitosan solution was added with chitosanase of 20 U to 40 U, chitosan was completely hydrolyzed within 24 hours. The analysis of the produced oligomers showed that the oligomers larger than hexamer consisted over 40% at the early phase then decreased to 25% after 20 hours of reaction. Using acetic anhydride, chitin oligomers were obtained by acetylation of chitosan oligomers. An attempt was made to produce chitosanase from recombinant *E. coli* strain. *E. coli* transformant showing chitosanase activity was obtained using pUC19 vector. Cloned chitosanase from *Bacillus* sp. GM44 was also expressed in *Bacillus subtilis* using *Bacillus, E. coli* shuttle vector. However, the recombinant *E. coli* and recombinant *Bacillus subtilis* DB431 showed 1.5 U/ml and 30 U/ml of chitosanase activity, respectively, which was lower than that of parent strain *Bacillus* sp. GM44. Several experiments should be carried out to increase chitosanase production by incorporating strong promoter of rRNA.

Part 3 . Application of chitin and chitosan to foods

I. Physical properties of chitin and chitosan for application to foods

Four kinds of chitosan were prepared by treating crude chitin with 1N HCl followed by 1N NaOH. The physicochemical properties and antimicrobial activity of the chitosan were investigated.

Moisture, crude ash and nitrogen contents of prepared chitosans ranged from 5.86~6.72%, 0.46~1.12%, 6.53~7.15%, respectively. The molecular weights of chitosan-45, 50, 55 and 60 were determined as 59,000, 32,500, 25,500 and 12,000, respectively. Chitosans prepared with higher concentrations of NaOH solution showed the lower molecular weights. According to I.R. spectrum, the degree of deacetylation of chitin and chitosan(45~60) were 45%, 88~94% respectively. Chitin had higher water holding and fat binding capacities than chitosans, but there were no significant differences among 4 chitosans. In the dye binding properties, chitin had a dye binding capacity of 11.16mg/g sample, but chitosans except chitosan-45, almost did not bind the dye. It was assumed that -NH₂ functional group in the chitin was removed along with the acetyl functional group because of strong deacetylation condition.

Antimicrobial activities of chitosans were tested against *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fructivorans*, and

Zygosaccharomyces bailii which are known as spoilage microorganisms of mayonnaise, as well as *Streptococcus mutans*, a bacteria related to dental calculus and *Serratia liquefaciens*, a tofu spoilage bacteria. Antimicrobial activities of chitosan-50, 55 were slightly higher than those of chitosan-45, 60. It was assumed that a certain range of chitosan molecular weight could be necessary for effective antimicrobial activity.

II. Effect of chitosan addition on the storage stability of mayonnaise

The effect of addition of chitosan having a high antimicrobial activity on the storage stability of mayonnaise has been studied during storage at 25° and 37°C. In the antioxidative activity test of chitosan-50 when added to mayonnaise, all samples did not show any significant differences when mayonnaise samples were stored at 25°C. However, when the samples were stored at 37°C, the preservation of mayonnaise with 100ppm addition of the chitosan was more effective than that of 500, 1000ppm. There was no significant difference of POV value among samples when stored at 25°C. However, the POV value of mayonnaise with 100ppm chitosan increased to a less extent as compared to those of others which were increased rapidly after 6 weeks storage at 37°C. TBA value of mayonnaise with 100ppm addition of chitosan did not increase significantly as

compared to those of others which showed an initial increase until 6 weeks of storage at 37°C. Although there was no significant difference in the emulsion stability among the samples when stored at 25°C, mayonnaise with 100ppm addition of chitosan retained over 93% emulsion stability even after 10 weeks storage at 37°C.

In microbial challenge test, addition of 100ppm chitosan-50 to mayonnaise prevented or extinguished the growth of *Lactobacillus fructivorans*, and *Zygosaccharomyces bailii*.

III. Development and quality characteristics of chitosan added donchimi juice

Three kinds of chitosan with the same deacetylation degree of 78% were prepared from the crude commercialized chitin obtained from *Chitinonecetes opilio* at three different temperatures of 100, 120 and 140°C in 50%(w/v) NaOH solution for 3 hrs, 20 min and 10min, respectively.

Antimicrobial activities of obtained chitosans were tested against *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarium* which are known as important main microorganisms of dongchimi fermentation. Antimicrobial activities of chitosan obtained at 140°C for 10min (chitosan-140) was the highest among the 3 chitosans. Chitosan-140 was therefore selected as the chitosan sample for further studies on the effect of chitosan addition in dongchimi

during fermentation at three different temperatures of 4, 10 and 20°C. Addition of 1000ppm chitosan significantly prevented the lowering of pH values in all dongchimi samples and showed the lowest titratable acidity.

Addition of 1000ppm of chitosan Ch-140 to dongchimi fermentation seemed to inhibit the growth of lactic acid bacteria therefore lowering the acid content. It therefore caused the shelf-life extension and gave a prolonged palatable period in the dongchimi. The odor and taste of acidic and sour note were also reduced, therefore improving total acceptability significantly. The turbidity of dongchimi juice was reduced and the firmness of the radish were less reduced, therefore making the product more acceptable and advantageous for use as a beverage application.

Part 4. Development of chitin and chitosan based materials for agricultural and medico-pharmaceutical applications.

I. Development of new materials for agricultural applications.

We have prepared chitosan oligomers using microbial enzyme and chemical hydrolysis. When reaction time of acid hydrolysis was prolonged, the yield of hydrolysis was 80% with a substantial increase in monomer content. The optimal reaction condition was 60

minutes and 80°C, respectively for obtaining oligomers of DP>4. A chromatographic procedure using Dowex 50 resin was established. Fraction 3, 4 and 5 mainly contained trimer, tetramer and pentamer, respectively. In contrast, ultrafiltration was found to be less effective in separation of these oligomers. Upon microbial degradation of chitosan by some strains isolated in our laboratory, we produced 60% of dp=2~4, 30% of dp=5~7, 10% of dp more than 7. We also prepared N-[¹⁴C]-labelled N-acetylchitosan, carboxymethylchitin, chitosan sulfate, O-acetylsalicylchitosan, trifluoroacetylchitosan. These derivatives were characterized by FT-IR. The inhibitory effect of chitosan on plant pathogens was carried out by observing the growth ring after incubation of 7 days. The test organisms were *Fusarium* sp. and *Phytophthora* sp. When the concentration of chitosan was about 0.1%, a significant inhibition was observed, while chitin did not show any effect. When the soybean sprout was treated with chitosan, its growth was higher than that treated with commercial "Indol B". We also observed an active growth of fine row of soybean sprout. The field study of chitin and chitosan on the growth of tomato and soybean was performed. When tomato seed was soaked in chitosan solution (0.2%, 3times), the growth rate was highest, compared with irrigation and direct mixing with soil. For soybean, direct mixing with soil was better than soaking.

II. Regulation of immune functions by chitosan derivatives.

The antibacterial activities of synthetic chitosans were variable depending upon the microbial species and the most effective concentration to inhibit the growth of *E. coli* and *Listeria monocytogenes* was about 0.25 to 0.5%. The pentamer chitosan (DP5) has in vitro stimulatory effect on the NO production by J774 macrophage cells in the absence or presence of interferon- γ . However, the NO production was not enhanced by other chitin derivatives, such as Chitosan A, Chitochem, Chitoenzyme, and low number of oligomers (DP1, DP2, DP3). F1 fraction which contains oligomers bigger than 15-mers showed a strong stimulatory effect on murine macrophages (RAW264.7 and J774) by enhanced NO and TNF- α production and mRNA expression. When BALB/c mice were treated with chitosan derivatives before microbial challenge, DP5 and F1 showed a considerably increased host immunity to *Listeria* and *Candida* infections, respectively.

III. Development of chitin and chitosan based artificial skin.

We synthesized PEG macromer-chitin IPN, chitosan-alginate complex and chitosan-poly-L-leucine complex. The physico-chemical properties of these candidate products for artificial skin were studied using FT-IR, DSC, intron, and SEM. After chitosan-alginate complex was

soaked in the solution of Ag-sulfadiazine, the release of this drug was linear as a function of time. The antimicrobial effect was excellent with this material. Wound dressing made of this complex also showed no cytotoxic effect against L929 cell line. The wound healing effect was most prominent when chitosan-alginate contained Ag-sulfadiazine and DHEA. However chitosan alone showed almost same healing effect. The reason should be elucidated why the effect of chitosan-alginate soaked in Ag-sulfadiazine was inferior to that of chitosan alone. The histological observations revealed that the chitosan-alginate containing DHEA and Ag-sulfadiazine was best among 3 treatments.

CONTENT

Part 1. Development of a new natural seasoning and improvement of manufacturing process

I. Development of a new seasoning	49
Chapter 1. Introduction	49
Chapter 2. Materials and methods	51
Section 1. Materials	51
Section 2. Methods	51
1. Optimization of extraction for a natural seasoning, and protein removal by enzymes	51
2. Concentration of the extract and physicochemical properties of the concentrate	52
3. Formulation, drying and production of a new natural seasoning	52
Chater 3. Results and discussion	56
Section 1. Optimization of extraction for a natural seasoning, and protein removal by enzymes	56
1. Optimization of extraction	56
2. Optimization for enzymatic hydrolysis of crude protein	57
3. Optimization of favor extraction from roasted crab	58
Section 2. Concentration of the extract and physicochemical properties of the concentrate	59

1. Organoleptic test	59
2. Determination of density and total crude protein by Kjeldahl method	59
3. Somogyi-Nelson method for reducing sugar	60
4. Amino acid composition of the concentrate	60
5. Absorption spectra of the concentrate	60
Section 3. Formulation, drying and production of a new natural seasoning	60
1. Formulation of the concentrate	60
2. Optimization for during conditions	61
3. Production of a granular-type seasoning	62
4. Production of liquid seasoning	62
Section 4. Conclusion	62
II. Improvement of manufacturing process	64
Chapter 1. Introduction	64
Chapter 2. Materials and methods	66
Section 1. Materials	66
Section 2. Methods	66
1. Protein removal by enzymes, and production of various chitosans	66
2. Recovery of valuable by-products, and recycling of reaction mixture	67
3. Mass separation of chitin and chitosan oligomers, and	

development and simulation of a mathematical model	69
Chapter 3. Results and discussion	72
Section 1. Protein removal by enzymes, and production of various chitosans	72
1. Optimization of protein removal by enzymes	72
2. Production of various chitosans	73
Section 2. Recovery of valuable by-products, and recycling of reaction mixture	79
1. Production of Ca ²⁺ -chitosan for Ca ²⁺ recovery	79
2. Recovery of valuable by-products	82
3. Recycling of reactants of chitosan production	82
4. Recycling of enzymes and substrate	86
5. Thermostability of enzymes for oligomer production	87
Section 3. Mass separation of chitin and chitosan oligomers, and development and simulation of a mathematical model	94
1. Mass separation of chitin and chitosan oligomers	94
2. Development of a mathematical model for chitosan production	98
Section 4. Conclusion	103
III. References	106

**Part 2. Application of microbial enzymes for the production of
chitin/chitosan oligomer**

I. Studies on the production of chitin oligomer by microbial chitinase	111
Chapter 1. Introduction	111
Chapter 2. Materials and methods	119
Section 1. Materials	119
Section 2. Methods	119
1. Screening of endo-chitinase producing bacteria	119
2. Screening of thermostable chitinase producing bacteria	120
3. Screening of chitinase producing fungi	120
4. Preservation of strains	121
5. Identification of selected strains GM13	121
6. Determination of chitinase activity	121
7. Induction of chitinase by chitin	123
8. Analysis of degradation products	123
9. Preparation of swollen chitin	124
10. Cloning of the GM13 chitinase gene	124
Chapter 3. Results and discussion	126
Section 1. Isolation and selection of chitinase producing microorganisms	126
1. Screening of endo-chitinase producing bacteria	126
2. Screening of thermostable chitinase producing bacteria	129
3. Screening of chitinase producing fungi	130

Section 2. Characteristics of chitinase production of GM13	131
1. Identification of GM13	131
2. Characteristics of chitinase production of GM13	133
Section 3. Purification of chitinase of <i>Arthrobacter</i> sp. GM13	136
Section 4. Characteristics of 65kDa endo-chitinase	142
1. Comparison of 65kDa endo-chitinase with chitinase of <i>Serratia</i> <i>liquefaciens</i>	142
2. Influence of temperature, pH and metal ions	144
3. Substrate specificity	150
4. Degradation pattern of chitin oligomer	153
5. Enzyme kinetics of 65kDa endo-chitinase	153
6. Antifungal activity	154
Section 5. Production of chitin oligomer using <i>Arthromacter</i> sp. GM13 chitinase	155
1. Production of chitin oligomer	155
2. Cloning of GM13 chitinase gene	156
Section 6. Conclusion	158
II. Studies on the production of chitosan oligomer by microbial chitosanase	160
Chapter 1. Introduction	160
Chapter 2. Materials and methods	162
Section 1. Materials	162
Section 2. Methods	162

1. Isolation of chitosanase producing bacteria	162
2. Isolation of chitosan monomer producing bacteria	163
3. Identification of selected strain GM44	163
4. Electron microscopy(TEM) of selected strains	164
5. Influence of culture temperature on the chitosanase production of <i>Bacillus</i> GM44	164
6. Determination of chitosanase activity	164
7. Production of chitosanase from GM44	165
8. Purification of chitosanase	165
9. Protein determination	166
10. SDS-PAGE of chitosanase	166
11. N-terminal amino acid sequencing	167
12. Production of chitosan oligomer	167
13. Analysis of chitosanase degradation products	167
14. Acetylation of chitosan	168
15. Chitosanase production by recombinant strain	168
Chapter 3. Results and discussion	171
Section 1. Isolation and identification of endo-chitosanase producing bacteria	171
1. Isolation of chitosanase producing bacteria	171
2. Isolation of chitosan monomer producing bacteria	171
3. Identification of selected strain GM44	172
Section 2. Production of endo-chitosanase	176

1. Influence of culture temperature	176
2. Influence of carbon and nitrogen source	176
Section 3. Purification of chitosanase	179
1. Purification of chitosanase	179
2. SDS-PAGE of chitosanase	181
3. N-terminal amino acid sequencing	182
Section 4. Characteristics of endo-chitosanase	182
1. Influence of temperature and pH, substrate specificity	182
2. Influence of deacetylation on the degradation	185
3. Degradation pattern of chitosan oligomers	187
Section 5. Production of chitosan oligomers	188
1. Production of chitosan oligomers using chitosanase from <i>Bacillus</i> sp. GM44	188
2. Acetylation of chitosan	192
3. Chitosanase production by recombinant strain	193
4. Large scale purification of chitosanase	194
Section 6. Conclusion	194
III. References.	198

Part 3. Application of chitin and chitosan to foods

I. Physical properties of chitin and chitosan for application to

foods	207
Chapter 1. Introduction	207
Chapter 2. Materials and methods	209
Section 1. Materials	209
Section 2. Methods	209
1. Preparation of chitin and chitosan	209
2. Proximate analysis and determination of Ca content	209
3. Measurement of viscosity and molecular weight	211
4. Measurement of degree of deacetylation	211
5. Functional properties of chitin and chitosan	211
6. Inhibitory effect of chitosan against microorganisms	212
Chapter 3. Results and discussion	214
Section 1. Physicochemical characteristics of chitin and chitosan	214
1. Proximate analysis and Ca content	214
2. Molecular weight	215
3. Deacetylation degree of chitin and chitosan	216
4. Functional characteristics of chitin and chitosan	219
Section 2. Effect of chitosan on the growth inhibition of microorganisms	224
Section 3. Conclusion	232
II. Studies on the effect of chitosan addition on the storage stability of mayonnaise	234
Chapter 1. Introduction	234

Chapter 2. Materials and methods	236
Section 1. Materials	236
Section 2. Methods	236
1. Preparation of mayonnaise	236
2. Measurement of fat rancidity	236
3. Measurement of emulsion stability	237
4. Measurement of viscosity	238
5. Challenge test of microorganisms	238
Chapter 3. Results and discussion	239
Section 1. Changes in physicochemical properties of mayonnaise	239
1. Changes in POV value	239
2. Changes in TBA value	242
3. Emulsion stability	245
4. Measurement of viscosity	246
Section 2. Results of challenge test of microorganisms	250
Section 3. Conclusion	255
III. Development and quality characteristics of chitosan added dongchimi juice	257
Chapter 1. Introduction	257
Chapter 2. Materials and methods	260
Section 1. Materials	260
Section 2. Experimental methods	260
1. Preparation of chitosan with the same degree of deacetylation	260

2. Physicochemical and microbiological characteristics of chitosan	262
3. Preparation of chitosan added dongchimi	263
4. Measurement of fermentation characteristics of chitosan added dongchimi	264
Chapter 3. Results and discussion	268
Section 1. Physicochemical and microbiological characteristics of chitosan	268
1. Physicochemical characteristics	268
2. Effect of chitosan on the growth inhibition of lactic acid bacteria	270
Section 2. Fermentation characteristics of chitosan added dongchimi	271
1. Physicochemical characteristics	271
2. Changes in the numbers of microorganisms	291
3. Changes in the sensory properties	300
Section 3. Conclusion	309
IV. References	313

Part 4. Development of new materials for agricultural and medico-pharmaceutical applications

I. Development of new materials for agricultural applications	322
Chapter 1. Introduction	322
Chapter 2. Experimental Methods	324
1. Preparation of chitosan oligomers	324
2. Synthesis of chitosan derivatives	325
3. Analysis	329
4. Biological activity of chitin derivatives	329
Chapter 3. Results and discussion	332
Section 1. Preparation of chitosan oligomers	332
1. Preparation of oligomers by acid hydrolysis	332
2. Preparation of chitosan oligomers using microbial enzyme	337
Section 2. Synthesis of chitosan derivatives	343
Section 3. Biological activity of chitin and chitosan derivatives	346
1. Effect of chitosan on the growth of soybean sprout	346
2. Inhibitory effect on the growth of plant pathogens	348
3. Influence of chitin derivatives on the growth of plant	349
Section 4. Conclusion	353
II. Regulation of immune function by chitosan derivatives	354
Chapter 1. Introduction	354
Chapter 2. Experimental Methods	355
1. Experimental animals	355
2. Materials	355
3. Microorganisms	356

4. Animal cell culture	356
5. Preparation of immune complex in mouse	357
6. Pretreatment of immune complex	357
7. Inoculation of microorganisms into mouse	357
8. Antimicrobial activity of chitosan	358
9. Measurement of TNF- α	358
10. Measurement of nitric oxide(NO)	359
11. PCR by reverse transcriptase	359
Chapter 3. Results and Discussion	361
Section 1. Antimicrobial activity of synthesized chitosans	361
Section 2. Enhancement of immune response	362
1. Effect of chitosan administration to mouse on the infection	362
2. Effect of immune complex and chitosan on the infection of <i>Candida</i>	364
Section 3. Anticancer effects	365
1. Effect on the macrophage TNF- α	365
2. Effect on the production of NO in two cell lines	367
3. Effect of chitosan F1 on the mRNA expression of iNOS and TNF- α	370
Section 4. Conclusion	371
III. Development of chitin and chitosan based artificial skin	372
Chapter 1. Introduction	372
Chapter 2. Experimental Methods	374

1. Synthesis of poly(ethylene glycol)-macromer	374
2. Preparation of PEG-chitin IPN	375
3. Synthesis and characterization of chitosan-alginate complex	376
4. Preparation and properties of wound dressing	376
5. Chitosan-PLL graft	378
Chapter 3. Results and discussion	379
Section 1. Synthesis and identification of PEG-chitin IPN	379
1. Synthesis and identification of PEG macromer	379
2. Characterization of PEG-chitin IPN	380
Section 2. Synthesis and characterization of chitosan-alginate complex as artificial skin	384
1. Synthesis and characterization of chitosan-alginate complex	384
2. Chitosan-alginate complex as artificial skin	390
Section 3. Graft of poly-L-leucine to chitosan	393
Section 4. In vivo burn healing and histological observation	397
Section 5. Conclusion	399
IV. References	401

목 차

제 1 세부과제(주관). 천연조미료 개발 및 제조공정 개선(아주대)

I. 새로운 천연조미료 개발	49
제1장 서론	49
제2장 재료 및 방법	51
제1절 재료	51
제2절 실험방법	51
1. 천연 조미성분 추출 최적화 및 단백질 가수분해 조건 확립	51
2. 조미성분 추출 농축액의 물성 측정	52
3. 천연조미료의 Formulation, 건조 및 생산	52
제3장 결과 및 고찰	56
제1절 천연 조미성분 추출 최적화 및 단백질 가수분해 조건 확립	56
1. 추출 조건 및 농축 최적화	56
2. 계살 단백질의 효소분해	57
3. 계껍질의 열처리에 의한 향미성분 추출 최적화	58
제2절 추출농축액의 물성 측정	59
1. 농축액의 맛, 색깔 및 냄새	59
2. 비중 및 총단백질량	59
3. 총당 및 환원당	60
4. 추출 농축액의 아미노산 조성 분석	60
5. 흡수 spectrum	60

제3절 천연조미료의 formulation, 건조 및 생산	60
1. 농축액의 formulation	60
2. 농축액의 건조법 확립	61
3. 농축액의 과립형 조미료 제조	62
4. 액상 시제품 조미료 제조	62
제4절 결론	62
II. 제조공정의 개선	64
제1장 서론	64
제2장 재료 및 방법	66
제1절 재료	66
제2절 실험방법	66
1. 키틴의 효소에 의한 단백질 제거 최적화와 다양한 키토산 제조	66
2. 유용 물질 및 반응물의 회수 및 재사용	67
3. 키틴, 키토산 올리고당의 대량분리방법 및 키토산 제조의 수학적 model 개발 및 simulation	69
제3장 결과 및 고찰	72
제1절 키틴의 효소에 의한 단백질제거 최적화와 다양한 키토산의 제조	72
1. 단백질 분해효소에 의한 계 껍질의 단백질 제거	72
2. 다양한 키토산 제조	73
제2절 유용 물질 및 반응물의 회수 및 재사용	79
1. Ca ²⁺ 포함 키토산의 제조	79
2. 키토산 제조시 반응물의 재사용	79
3. 단백질 및 peptide성 유용 부산물의 회수	82

4. 효소 및 미반응 기질의 재사용	86
5. 올리고당 생산을 위한 효소 열 안정성	87
제3절 키틴 키토산 올리고당의 대량분리 방법 및 키토산 제조의 수학적 model 개발 및 simulation	94
1. 키틴 키토산 올리고당의 다량분리	94
2. 키토산 제조조건의 수학적 model 개발 및 simulation	98
제4절 결론	103
III. 참고문헌	106

제 2 세부 과제(주관). 미생물, 효소 생산 및 응용(아주대)

I. 미생물에 의한 키틴 올리고머 생산	111
제1장 서론	111
제2장 재료 및 방법	119
제1절 재료 및 시약	119
제2절 실험 방법	119
1. Endo-chitinase 생산 세균의 스크리닝	119
2. 내열성 chitinase 생산 세균의 스크리닝	120
3. 키틴 분해 곰팡이 스크리닝	120
4. 분리균주의 보관	121
5. 분리균주 GM13의 동정	121
6. Chitinase 효소활성 측정	121

7. 키틴에 의한 chitinase 유도성 조사	123
8. 키틴 분해산물의 분석	123
9. Swollen chitin 제조	124
10. Chitinase의 클로닝	124
제3장 결과 및 고찰	126
제1절 키틴 분해 효소 생산 미생물의 분리 및 선발	126
1. Endo-chitinase 생산 세균 스크리닝	126
2. 내열성 chitinase 생산 세균 스크리닝	129
3. Chitinase 생산 곰팡이의 스크리닝	130
제2절 선발 균주 GM 13이 생산하는 chitinase의 특성	131
1. 분리균주 GM13의 동정	131
2. GM 13의 chitinase 생산 특성	133
제3절 <i>Arthrobacter</i> sp. GM13이 생산하는 chitinase의 순수 분리	136
제4절 65kDa endo-chitinase의 특성	142
1. <i>Serratia liquefaciens</i> chitinases와의 비교	142
2. 온도, pH 및 금속이온의 영향성 조사	144
3. 기질의 특이성	150
4. 키틴 올리고머 분해 pattern	153
5. 65kDa endochitinase의 enzyme kinetics	153
6. Antifungal activity	154
제5절 <i>Arthrobacter</i> sp. GM13의 endo-chitinase를 이용한 키틴올리고머 생산	155
1. 키틴올리고머 생산	155

2. Chitinase 유전자 클로닝	156
제6절 결론	158
II. 미생물에 의한 키토산 올리고머 생산	160
제1장 서론	160
제2장 재료 및 방법	162
제1절 재료 및 시약	162
제2절 실험방법	162
1. 키토산 분해 미생물의 분리	162
2. 키토산 단량체(글루코사민)를 생산하는 미생물의 탐색	163
3. 분리균주 GM44의 동정	163
4. 전자현미경 관찰	164
5. 배양온도에 따른 분리균주 <i>Bacillus</i> sp. GM44의 chitosanase 생산	164
6. Chitosanase 활성측정	164
7. Chitosanase의 생산	165
8. Endo-chitosanase의 순수분리	165
9. 단백질 정량	166
10. Chitosanase의 전기영동	166
11. N-말단 아미노산 서열 결정	167
12. 키토산 올리고당 생산	167
13. 키토산 분해산물의 분석	167
14. Acetic anhydride를 이용한 키토산의 acetylation	168
15. 재조합 대장균을 이용한 chitosanase 생산	168
제3장 결과 및 고찰	171

제1절 Chitosanase 생산 균주의 분리 및 동정	171
1. Chitosanase 생산 균주 스크리닝	171
2. 키토산 단량체를 생산하는 미생물의 탐색	171
3. 분리균주 GM44의 동정	172
제2절 Endo-chitosanase 생산	176
1. 배양온도에 따른 분리균주 <i>Bacillus</i> sp. GM44의 균체 성장 및 chitosanase 생산	176
2. 탄소원과 질소원에 따른 chitosanase의 생산	176
제3절 Endo-chitosanase의 순수분리	179
1. GM 44 균주의 endo-chitosanase의 분리	179
2. Chitosanase의 SDS-PAGE 전기영동	181
3. N-말단 아미노산 서열결정	182
제4절 순수분리된 chitosanase의 특성	182
1. 온도, pH의 영향 및 기질특이성	182
2. Chitosanase의 탈아세틸화도에 따른 키토산 분해성 비교	185
3. Chitosanase의 키토산올리고머 분해 pattern 연구	187
제5절 키토산 올리고머의 생산	188
1. <i>Bacillus</i> sp. GM13의 chitosanase를 이용한 키토산 올리고머 생산	188
2. Acetic anhydride를 이용한 키토산의 acetylation	192
3. 재조합 대장균을 이용한 chitosanase 생산	193
4. Chitosanase의 대량 분리정제 방법 개발	193
제6절 결론	194
III. 참고문헌	198

제 3 세부과제(협동). 키틴, 키토산의 식품에의 응용(세종대)

I. 식품에의 응용을 위한 키틴, 키토산의 물성연구	207
제1장 서론	207
제2장 재료 및 방법	209
제1절 재료	209
제2절 실험방법	209
1. 키틴, 키토산의 제조	209
2. 일반성분 및 Ca 정량	209
3. 점도 및 분자량 측정	211
4. 키틴, 키토산의 탈아세틸화도 측정	211
5. 키틴, 키토산의 기능적 특성	211
6. 미생물의 생육억제 조사	212
제3장 결과 및 고찰	214
제1절 키틴, 키토산의 이화학적 특성	214
1. 일반성분 및 Ca 함량	214
2. 분자량	215
3. 키틴, 키토산의 탈아세틸화도	216
4. 키틴, 키토산의 기능적 특성	219
제2절 미생물 생육억제 효과	224
제3절 결론	232

II. 키토산 첨가에 의한 마요네즈의 저장성 연구	234
제1장 서 론	234
제2장 재료 및 방법	236
제1절 재료	236
제2절 실험방법	236
1. 마요네즈의 제조	236
2. 산패도 측정	236
3. 유화안정성 측정	237
4. 점도 측정	238
5. 미생물 challenge test	238
제3장 결과 및 고찰	239
제1절 마요네즈의 이화학적 특성 변화	239
1. 과산화물가의 변화	239
2. TBA가의 변화	242
3. 유화안정성	245
4. 점도 측정	246
제2절 미생물 challenge test 결과	250
제3절 결 론	255
III. 키토산 동치미 주스의 개발 및 특성조사	257
제1장 서 론	257
제2장 재료 및 방법	260
제1절 재료 및 시약	260
제2절 실험방법	260

1. 동일한 탈아세틸화도를 갖는 키토산의 제조	260
2. 키토산의 물리화학적 및 미생물학적 특성 측정	262
3. 키토산이 첨가된 동치미의 제조	263
4. 키토산이 첨가된 동치미의 발효 특성 측정	264
제3장 결과 및 고찰	268
제1절 키토산의 물리화학적 및 미생물학적 특성	268
1. 물리화학적 특성	268
2. 젖산균 생육 억제 효과	270
제2절 키토산이 첨가된 동치미의 발효 특성	271
1. 물리화학적 특성	271
2. 미생물수의 변화	291
3. 관능적 성질의 변화	300
제3절 결 론	309
IV. 참고문헌	313

제 4 세부과제(협동). 농업용 및 의료용 소재의 개발 연구(전남대)

I. 농업용 소재의 개발 연구	322
제1장 서 론	322
제2장 실험방법	324
1. 키토산 올리고머(oligomers)의 조제	324
2. 키토산 유도체의 합성	325

3. 분석	329
4. 키틴 유도체의 생물활성	329
제3장 결과 및 고찰	332
제1절 키틴산 올리고머의 조제	332
1. 산가수분해에 의한 올리고머의 조제 및 분리	332
2. 미생물 효소를 이용한 키틴산 올리고머 제조	337
제2절 키틴산 유도체의 합성	343
제3절 키틴 및 키틴산 유도체의 생물활성	346
1. 콩나물 생장에 미치는 키틴산의 영향	346
2. 식물 병원 미생물 생육 억제 효과 검정	348
3. 식물 생장에 미치는 키틴 유도체의 영향	349
제4절 결론	353
II. 키틴산 유도체들의 면역기능 조절 연구	354
제1장 서론	354
제2장 실험방법	355
1. 실험동물	355
2. 시약 및 배지	355
3. 공시균	356
4. 세포 배양	356
5. 마우스에서의 면역복합체 생산	357
6. 면역혈청과 면역복합체 전처리	357
7. 마우스의 <i>Candida</i> 및 <i>Listeria</i> 감염	357
8. 키틴산의 항균작용 측정	358

9. TNF- α 의 측정	358
10. NO의 측정	359
11. 역전사-중합효소 연쇄 반응 (RT-PCR)	359
제3장 결과 및 고찰	361
제1절 합성 키토산의 병원성 미생물 항균효과	361
제2절 면역증진효과	362
1. 키토산 투여가 마우스의 <i>L. monocytogenes</i> 감염에 미치는 영향	362
2. 면역 복합체와 키토산이 <i>Candida</i> 감염에 미치는 영향	364
제3절 항암효과	365
1. 대식 세포의 TNF- α 생산에 미치는 영향	365
2. 두가지 cell line에서의 NO 생산에 미치는 영향	367
3. iNOS 및 TNF- α mRNA 발현에 미치는 키토산 F1의 영향	370
제4절 결론	371
III. 키토산 소재를 이용한 인공피부 개발 연구	372
제1장 서론	372
제2장 실험방법	374
1. PEG macromer의 합성	374
2. PEG-chitin IPN의 제조	375
3. 키토산-알긴산 복합체 형성 및 물성 조사	376
4. Wound dressing의 제조 및 물성 조사	376
5. 키토산에 PLL의 graft화 반응	378
제3장 결과 및 고찰	379
제1절 PEG macromer-chitin IPN의 합성 및 특성	379

1. PEG macromer의 합성 및 확인	379
2. PEG-chitin IPN의 물성 측정	380
제2절 키토산-알긴산 복합체 합성 및 인공피부로서의 특성	384
1. 복합체의 합성 및 특성	384
2. 복합체의 인공 피부로서의 특성	390
제3절 키토산에 Poly-L-leucine의 graft화 반응	393
제4절 쥐를 이용한 화상치유 실험 및 조직 검사	397
제5절 결론	399
IV. 참고문헌	401

본 문

제1세부과제. 천연조미료 개발 및 제조공정 개선

I. 새로운 천연조미료 개발

제1장 서론

최근 화학조미료에 대한 소비는 감소하는 반면 천연조미료 시장이 증가일로에 있는 것이 세계적인 추세로 우리나라의 경우는 조미료 시장이 2,200억원 규모이다. 이 중에서 천연조미료 시장이 1,200억원으로 반이상을 차지하고 있으며, 이러한 증가추세는 계속될 것으로 보인다. 이 천연조미료 중에서 게살 및 게액기스의 국내시장 규모는 200억 정도로 추정된다. 그 시장자체가 아직 초기단계이기 때문에 marketing에 따라 잠재력은 무한하다고 볼 수 있으며 또한 대 일본 수출 추정량이 약 150억원에 달한다. 따라서 홍게(*Chitinonecetes opilio*)을 이용한 새로운 천연조미료를 개발하는 본 연구에서는 게살로부터 조미 성분을 다양한 추출용매를 이용하여 추출, 농축한 후에 이 농축물의 물성을 측정하고 천연조미료의 flavor를 높이기 위해 농축 회수액을 첨가하는 것을 시도하였다. 일반 천연조미료는 열수추출 농축액과 단백질 분해 농축액을 조합하였으며 flavor위주의 천연조미료에는 이들과 함께 알콜추출액을 첨가하였다. Base formulation을 위한 열수추출액의 종류와 농도를 정하여 건조방법에

따라서 분말형, 과립형, 액체형의 세가지 제품을 제조하기 위한 제반조건을 최적화 하였으며 액상 천연조미료는 제조허가를 취득해 시판하고 있다.

이상과 같이 천연조미료를 만들고 남은 계껍질을 다음과제인 제조공정 개선 연구에서 연속공정으로 키틴, 키토산을 만들어서 폐기물이 거의 없는 공정을 이룬 것은 향후 게 엑기스의 국내 및 일본시장을 감안할 때 그 전망이 매우 밝다 하겠다.

제2장 재료 및 방법

제1절 재료

홍게는 속초, 가락시장 및 충주시장에서 구입하였으며, 알콜, 단백질분해효소는 식품용을 구입하였다.

제2절 실험방법

1. 천연 조미성분 추출 최적화 및 단백질 가수분해 조건 확립

가. 추출최적화

1) 열수추출

60℃ ~ 100℃의 범위에서 열수추출하여 고형분과 단백질의 추출수율을 한국 식품공업 실험법에 준하여 조사하였다.

2) 알콜추출

계살을 90℃에서 30분간 삶은 후에 95%주정으로 50℃ ~ 78℃의 범위에서 주정을 25%, 50%, 75% 농도에서 추출하여 고형분과 단백질의 추출수율을 비교하였다.

나. 단백질 가수분해 조건 확립

계살에서 단백질의 제거를 위하여 papain, bacterial protease, fungal protease를 계살 무게의 0.05%-0.5% 범위로 첨가하고, pH를 5.0으로 조절한 후 효소 분해 시간을 1시간으로 하여 회수된 상등액의 고형분 수율을 비교하였다.

다. 계껍질의 열처리에 의한 향미성분 추출 최적화

계껍질은 90℃, 100℃, 110℃ 및 120℃에서 5분 간격으로 로스팅 하면서 풍미를 조사하였다.

2. 조미성분 추출 농축액의 물성 측정

가. 관능검사 및 비중 측정

맛, 냄새 및 빛깔은 관능검사로 실시하였으며 비중은 일정한 부피를 취하여 무게를 측정하여 계산하였다.

나. 총단백질 측정

총단백질은 micro-kjeldahl법으로 측정하여 계산하였다.

다. 환원당의 정량

환원당의 정량은 Somogyi-Nelson법을 이용하였으며 표준품으로는 포도당을 사용하였다.

라. 농축액의 흡수 spectrum

흡수 spectrum은 210nm에서 400nm까지 UV-Visible Spectrophotometer로 spectrum을 얻었다.

3. 천연조미료의 Formulation, 건조 및 생산

가. 농축액의 formulation

농축 추출액을 액상, 과립형 혹은 분말형으로 제품화하기 전의 공

정으로 base formulation을 정하고 농축액 제조시 휘발성 성분을 회수한 농축 회수액의 영향 등을 조사하였으며 최종 formulation을 확정지었다.

1) 추출 조미료의 base formulation

열수추출 농축액과 효소분해 농축액을 비율을 달리하여 조합하여 최적 조합비를 구하였다.

2) Base formulation에서의 농축 회수액의 영향

Flavor를 증진시키기 위하여 농축 회수액의 첨가 효과를 검토하였다.

3) 향기위주의 조미료 개발

향기위주의 조미료개발에서는 효소분해 농축액과 알콜추출 농축액과 열수추출 농축액을 비교하였다.

4) 최종 formulation

Base formulation을 100으로 하였을 때에 base formulation에 콩나물 엑기스, 무 엑기스, 버섯 엑기스, 농축 간장, 마늘 엑기스, 생강 엑기스, 및 파 엑기스의 최적 첨가량을 연구 중에 있다.

나. 진공 건조 방법에 의한 농축액의 건조법 확립

진공건조법에 의한 농축액의 분말 천연조미료 제조를 위하여 당의 종류, 농도, 건조기의 온도, 압력, 건조시간의 최적화를 하였다.

1) 당의 영향

표준 base formulation에 첨가물로써 당의 종류(유당과 말토올리고당)와 농도를 달리하여 시험하였다.

2) 온도의 영향

35에서 10도 간격으로 변화시켜서 가장 적절한 성상의 분말을 얻을 수 있는 범위를 찾았다.

3) 압력의 영향

농축회수물의 이탈을 방지할 수가 있는 진공의 정도를 측정하였다.

4) 농축시간의 영향

농축시간을 2-8시간 까지 변경시켜서 적합한 범위를 모색하였다.

다. 분무건조법에 의한 분말 조미료 제조

분무건조법에 의한 분말 천연 조미료 제조를 위하여 첨가제로 사용하는 검류 및 dextrin의 종류와 농도의 최적화를 하였다.

1) 검류의 영향

표준 base formulation에 보조제로써 수종의 gum을 농도별로 용해시켜 조사하였다.

2) Dextrin류의 영향

Maltodextrin과 cyclodextrin 중에서 우수한 Dextrin을 선정하고 농도를 정하였다.

라. 농축액의 과립형 조미료 제조

유당에 결합제로써 전분을 alpha화 시켜서 base formulation과의 비율을 조절하였다..

마. 액상 시제품 조미료 제조

표준 base formulation에 식염을 5-20%까지 가하여 40C에서 4주간 보관시험을 하였다.

제3장 결과 및 고찰

제1절 천연 조미성분 추출 최적화 및 단백질 가수분해 조건 확립

홍계로부터 증미성분 추출의 최적화를 위하여 열수 및 알콜로 추출하여 최적조건을 확립하고 맛 성분의 전구체인 단백질 가수분해조건을 확립하고 게 껍질을 가열하여 향미성분을 추출하였다.

1. 추출조건 및 농축 최적화

가. 열수추출

1) 열수추출 조건 및 농축

100℃에서 2시간 추출의 최적조건을 결정하였다. 진공농축에 따르는 품질의 변화를 조사한 결과 1/3농축까지는(Brix.18) 품질의 변화가 없었으나 1/4농축품은 품질의 열화가 인정되었다.

2) 열수 추출 농축 회수액

증류물을 재증류 하였을 때 처음 5~10%까지의 분획은 강한 향미가 있으나 15% 이상에서는 거의 느낄 수 없었다.

나. 알코올 추출

1) 95%알코올 추출

95%알코올 추출조건은 78℃에서 1시간 추출이 최적조건이었으며 진공농축에 따르는 품질의 변화를 조사한 결과 1/2농축까지는 품질

의 변화가 없었으나 1/3농축부터는 품질의 열화가 인정되었다.

증류물을 재증류하였을 때 처음 5%분획이 향미가 강하였고 10% 분획도 인정되었으나 15%분획부터는 약하거나 미미하였다.

2) 50%알코올 추출

50% 알코올로 78℃에서 90분간 추출의 조건이 가장 좋았으며 진공농축에 따르는 품질의 변화를 조사한 결과 1/2농축과 1/3농축품간에 품질차이가 있었고 1/4농축품은 열화가 인정되었다.

증류물을 재증류하였을 때 처음 5%분획이 향미가 강하였고 10% 분획도 인정되었으나 15%분획부터는 약하거나 미미하였다.

2. 게살 단백질의 효소분해

가. 첨가효소량

첨가한 단백질 분해효소 모두 0.1%까지 고형분 수율이 빠르게 증가하다가 그 이상의 농도에서는 완만하여지거나 평형에 도달하였다. 가수분해 산물의 관능적 특성은 fungal protease가 가장 우수하였으며 0.1%첨가 농도 이상에서는 차이가 없었으므로 첨가농도는 0.1%가 가장 효과적으로 판단되었다.

나. 적정반응시간

적정 분해 시간을 선정하기 위해, 효소 0.1%를 첨가하고 분해 시간을 달리하여 고형분과 단백질수율을 비교하였다. 고형분 수율은 분해 1시간까지 증가하다가 1시간 이후부터는 수율의 증가가 아주 완만하거나 오히려 감소하는 경향을 보여 적정 가수분해 시간은 1시간

으로 하였으며 이 때에 수율은 6.5%로 최고치에 달하였다.

다. 효소반응물의 농축

Fungal protease 0.1% 첨가하고 50℃에서 1시간 효소분해하여 여액을 진공농축 하였을 때 1/3 농축 까지는 품질의 변화가 없었으며 1/4부터 열화가 인정되었다.

라. 효소반응 침전물의 재사용

효소분해 후 여과된 침전물은 풍미가 없어서 재사용이 곤란한 것으로 판단되었다. 이를 다시 단백질을 5% NaOH, bacterial protease, fungal protease, papain으로 가수분해하여 향미를 조사하였으나 재사용은 곤란할 것으로 보였다.

3. 계껍질의 열처리에 의한 향미성분 추출 최적화

가. 온도 및 시간의 영향

계껍질은 90℃, 100℃, 110℃ 및 120℃에서 5분 간격으로 로스팅 하면서 풍미를 조사한 결과 110℃에서 10분 내지 15분간 로스팅한 것이 가장 좋았다.

나. 추출용매

110℃에서 10분간 로스팅한 계껍질을 열수, 알코올, 50% 희석 알코올로 추출한 결과 알코올 추출품이 가장 우수하였다. 로스팅한 계껍질을 알코올로 추출할 때 다음과 같은 사항을 관찰하였다.

온도가 높을수록 고형분수율이 증가하는 경향이었으나 50℃와 60℃에서는 큰 차이가 없었고 70℃와 78℃사이에서는 현저한 증가를 나타내었다.

추출시간에 따른 변화는 1시간 30분까지는 증가하는 경향이었으나 그후에는 증가는 거의 없어서 대부분이 용출된 것으로 추정하였다.

78℃, 1.5시간 추출 조건에서 수율이 0.4%의 고형분 수율로서 가장 높았다.

제2절 추출농축액의 물성 측정

맛, 냄새, 비중, 총 단백질량, 총당 및 환원당 정량, 아미노산 조성 증미성분의 흡수 spectrum 및 TLC로 확인하였다.

1. 농축액의 맛, 색깔 및 냄새

색은 약간의 갈색으로 열수 추출물과 효소분해물 간의 차이가 없었으며 약간의 침전물이 있었다. 냄새는 두 시료 모두 거의 고유 풍미를 보존하였다. 맛은 열수 추출물과 효소 분해물이 거의 고유의 맛을 간직하고 있으며 열수 추출물의 염도가 더 높았다.

2. 비중 및 총단백질량

비중은 효소 분해물은 1.05, 열수 추출물은 1.07로 측정되었다.

총 단백질은 효소 분해물은 93mg/ml이며 열수 추출물은 86mg/ml로 시료간에 차이가 없었다.

3. 총당 및 환원당

총당은 효소분해물은 22mg/ml이며 열수추출물은 20mg/ml로 시료간에 차이가 없었다.

환원당은 효소분해물은 8.6mg/ml이며 열수 추출물은 3.4mg/ml로 차이를 보였다.

4. 추출 농축액의 아미노산 조성 분석

단백질성 아미노산 조성에서 glycine은 다른 아미노산 평균 함량보다 4배 정도, arginine함량은 다른 아미노산 평균 함량보다 7배 가량 높았다.

5. 흡수 spectrum

260nm에서 최대 흡광도를 나타냄으로써 nucleotides 성분이 다량 함유되어 있음을 시사하였다.

제3절 천연조미료의 Formulation, 건조 및 생산

천연 조미료의 생산을 위하여 조미료의 base formulation, flavor위주 조미료와 일반조미료의 개발 및 가공 형태에 따른 분말형, 과립형 및 액상조미료를 개발하였다.

1. 농축액의 formulation

가. 추출 조미료의 base formulation

열수추출 농축액과 효소분해 농축액을 비율을 달리하여 조합한 결과 50:45로 혼합할 때에 가장 우수하였다.

나. Base formulation에서의 농축 회수액의 영향

Flavor를 증진시키기 위하여 농축 회수액의 첨가 효과를 검토한 결과 열수추출 농축시 회수액을 5% 첨가하였을 때 가장 맛이 우수하였다.

다. 향기위주의 조미료 개발

향기위주의 조미료개발에서는 효소분해 농축액 보다는 알콜추출 농축액과 열수추출 농축액의 비가 25:75가 가장 냄새와 맛이 좋았다.

라. 최종 formulation

Base formulation을 100으로 하였을 때에 이것에 콩나물 엑기스 8%, 무 엑기스 5%, 버섯 엑기스 및 농축간장액 2-3%, 마늘 엑기스, 생강 엑기스는 각각 0.1-0.2%가 파 엑기스의 최적 첨가량이었다.

2. 농축액의 건조법 확립

가. 진공건조법에 의한 농축액의 건조법 확립

표준 base formulation에 첨가물로서 당의 종류와 농도를 달리하여 시험한 결과 20%의 유당이 가장 우수하였으며, 55-60℃의 온도범위가 가장 적절한 성상의 분말을 얻을 수가 있었다.

압력의 영향은 농축회수물의 이탈을 방지할 수가 있는 700mmHg가 가장 적합하였고 농축시간은 4~8시간 범위가 적합한 것으로 나타났다.

나. 분무건조법에 의한 분말 조미료 제조

1) 검류의 영향

표준 base formulation에 보조제로써 수종의 gum을 농도별로 용해시킨 결과 0.5%의 아라비아 검이 가장 적절하였다.

2) Dextrin류의 영향

Maltodextrin과 cyclodextrin 중에서 maltodextrin이 우수하였으며 최적 농도는 20%수준이었다.

3. 농축액의 과립형 조미료 제조

유당에 결합제로써 전분을 alpha화 시켜서 base formulation과의 비율을 조절하고 있다.

4. 액상 시제품 조미료 제조

표준 base formulation에 식염을 5-20%까지 가하여 40℃에서 4주간 보관시험을 하였다. 12%이상은 보관상태가 양호하였으므로 액상조미료 제조에서는 12% 식염 첨가품을 액상 조미료로 하였다.

제4절 결론

계살을 이용한 새로운 천연 조미료를 개발하기 위하여 열수 추출시에는 100℃ 2시간을 최적으로 하여 진공 농축으로 18 Brix 까지 농축하는 것이 가장 효과적이었다. 이때에 농축 회수액을 5-10%에 강한 향내가 있었다.

알콜 추출에서는 78℃에서 1시간 추출이 최적이었으며 총 부피를 1/2로 줄이는 것이 적합하였다. 계살의 단백질 가수분해로 fungal protease가 우수하였으며 0.1%가 최적 사용 농도였다. 또한 농축 비는 총 부피의 30%로 하였다. 농축액의 물성에서 열수 추출물과 효소 분해물의 고유한 맛과 향기를 갖고 있었으며 빛깔은 약간 갈색이었다. 이들의 비중은 모두 1.05-10.7 부근이었으며 또한 총 단백질 량도 80-93mg/ml로 별 차이가 없었다.

Base formulation은 열수 추출 농축액과 효소분해 농축액의 비를 50:45로 하는 것이 가장 적합하였으며 flavor를 증진시키기 위하여 농축 회수 액을 5%가 할 때 가장 맛이 우수하였다. 향기 위주 조미료에서도 단백질 분해 농축액 대신에 알콜 추출 농축액과 열수 추출농축액의 비가 25:75가 가장 냄새와 맛이 우수하였다.

최종 formulation은 base formulation을 100으로 하였을 때 부재료 액기스의 비율은 콩나물 액기스 8%, 버섯 및 농축간장 2-3% 기타 성분이 0.1-0.2%를 첨가 하였다. 진공건조와 분무건조의 조건, 첨가 당으로는 20% 유당 0.5%아라비아 검, 20% maltodextrin의 첨가가 가장 효율적이었다. 액상 조미료에서는 식염이 12%가 가장 적절하였다.

II. 제조공정의 개선

제1장 서론

미국에서는 1980년대에 게살을 가공하고 남은 게껍질이 큰 공해문제로 대두되었다. 그 후 게껍질로부터 다량의 천연고분자 물질인 키틴을 얻게 되었다. 이 키틴은 게, 새우 뿐 만 아니라 곤충, 곰팡이류 등에 분포하고 있고 그 구조는 N-acetylglucosamine이 5000개 이상 β -(1 \rightarrow 4)결합을 한 다당체로서 전세계적으로 이용 가능한 키틴 양은 200만 톤으로 cellulose다음으로 풍부하다. 우리나라에서는 속초를 중심으로 하여 연간 약 4만톤 정도의 게가 어획되며 또한 수천톤의 크릴이 국내로 반입되고 있다.

전통적인 키틴 생산 방법은 게 껍질을 약 산과 약 alkali에 처리하여 CaCO_3 와 단백질을 제거하여 키틴을 생성하고 이 키틴에 진한 NaOH(40-50%)을 가하여 가열시켜 탈아세틸화를 유도하여 키토산을 만든다. 이러한 키토산은 제조하는 데에 있어서 사용하는 NaOH는 40-50%가 가장 적절한 것으로 알려져 왔으나 반응시간 및 온도에 대하여서는 체계적이지 못하다. 본 연구에서는 반응 시간과 온도에 대한 체계적인 연구를 시행하여 특정한 특성을 갖는 키토산을 제조할 수 있으며 단백질 제거에 NaOH대신에 적절한 단백질 분해 효소를 이용하는 것을 시도하였다. 또한 반응 불용 부산물인 단백질을 회수하여 아미노산 조성을 비교하였으며 가장 사용량이 많은 NaOH의 재사용 및 최종 폐기 방법을 제안하였다. 또한 키틴, 키토산 올리고당을 제조하는 조건과 효소 사용된 효소인 닭 모래 주머니 효소를 개발하였으며

이와 병행하여 파파인을 사용하여 분해 정도, 분해물의 주성분, 효소 및 미반응 기질의 재활용을 시도하였다. 또한 분해시킨 수용성 올리고당을 손쉽게 분리하는 방법을 확인하였고 올리고당을 다량으로 순수 분리 할 수 있는 방법을 Bio-Gel P-2를 이용하여 확립하였다. 마지막으로 반응 온도와 탈아세틸화도에 관련된 수학 model을 제시하여 simulation함으로써 반응시간과 온도에 따른 예측이 가능하였다. 현재 국내에서 생산되는 키토산의 총량은 약 80ton 규모이며 올리고당은 약 40ton의 규모로서 10여 개의 회사에서 생산하고 있다. 이들이 들어 있는 상품의 가격은 칼슘 제제, 스쿠알렌, 알로에 다음으로 약 500억에 달하여 1997년 상반기에는 1996년에 비하여 폭발적인 상승을 보이고 있다. 또한 일본에서 키토산 생산량은 1,050ton으로 약 10개의 회사에서 제조하고 있다. 따라서 이와 같은 제조공정의 개선은 이들 중소 규모의 공장에 유용 부산물의 회수와 반응물의 재사용을 통하여 폐기물량을 줄일 뿐만 아니라 생산원가 절감을 가져다 주며 제시한 model을 이용하여 반응시간, 온도를 예측함으로써 보다 더 정확한 공정화가 가능하였다.

제 2 장 재 료 및 방 법

제1절 재 료

키틴, 키토산 제조를 위한 시료는 홍계에서 천연조미료를 제조후 남은 게껍질을 사용하였다. 단백질 분해효소는 비전상사의 제품을 사용하였다.

제2절 실험방법

1. 키틴의 효소에 의한 단백질 제거 최적화와 다양한 키토산 제조

진한 농도의 NaOH대신 식품용 효소인 papain, 세균성 단백질 분해효소, 곰팡이 단백질분해효소를 이용하여 단백질을 제거하고 물성이 다른 키토산과 colloidal chitin을 제조하였다.

가. 효소에 의한 게 껍질로부터 단백질 제거 최적화

효소에 의한 단백질 제거를 위하여 식품에서 흔히 사용하는 단백질 분해효소인 papain(Collupulin), bacterial protease, fungal protease(Sumzyme)를 처리하여 단백질 제거효과를 조사하였다.

1) 효소종류에 따른 효과

식품용 papain(Collupulin), bacterial protease, fungal protease(Sumzyme)을 가하여 반응시간(8~48시간), pH(3~8), 첨가량(4~16mg)을 달리하여 게 껍질에서 단백질을 제거하여 키틴을 제조하는 연구를 수행하였다. 반응액을 증류수로 2회 세척하여 50C에서 건조하였다.

2) 잔존 질소 측정법

Micro-Kjeldahl법으로 잔존질소의 함량을 측정하였다.

나. 다양한 키토산 제조

동일한 탈아세틸화도를 갖으면서 점도가 상이한 키토산과 Ca-키토산을 제조하였다.

1) 고점도 및 저점도 키토산 제조

탈아세틸화도 80% 내외의 고점도 키토산과 저점도의 키토산을 제조하기 위하여 50%(w/w) NaOH용액에서 100℃, 120℃, 140℃에서 시간에 따라 키토산을 제조하여 수돗물로 세척 후 열풍 건조하였다.

2) 탈아세틸화도 측정

PVSK를 이용한 colloidal적정법으로 탈아세틸화도를 측정하였다.

3) 점도 측정

Brookfield viscometer로 점도를 측정하였다.

다. Colloidal chitin의 제조

효소반응의 기질로 사용되는 colloidal chitin의 제조에 일반적으로 사용되는 농염산은 취급에 문제점이 있으므로 이를 대체하기 위하여 H_2SO_4 , H_3PO_4 를 이용하여 대체하는 방안을 조사하였다.

2. 유용 물질 및 반응물의 회수 및 재사용

계 껍질의 30%-40%를 차지하고 있으며 단백질 및 당류와 결합하고

있는 Ca과 단백질을 회수하고 NaOH, 미반응 기질, 키틴 및 키토산 분해효소의 재사용을 실험하였다.

가. Ca 회수를 위한 Ca 함유 키토산 제조

계 껍질에 풍부한 Ca^{2+} 을 식품에 응용하고자 calcium을 함유한 키토산 제조를 시도하였다. 사용 NaOH의 농도는 50%(w/w) NaOH를 사용하였고 120℃ 및 140℃에서 20분 간격으로 처리하여 탈아세틸화도, 회분함량, 용해성 수분흡수성 및 지방흡수성을 측정하였다.

나. 반응물의 재사용 및 유용물질의 회수

키토산 제조시 가장 사용 용량이 많은 NaOH와 단백질 분해효소 및 재활용을 시도하였고 유용 부산물인 peptides와 단백질을 회수하여 아미노산 조성을 분석하였다. 또한 올리고당 제조 시 사용되는 키틴-키토산 분해효소의 재사용과 미반응 기질의 재사용을 연구하였다.

1) 키토산 제조시 반응물의 재사용

가) NaOH용액의 재사용

키토산 제조시 사용한 50%(w/w)의 NaOH용액의 비중을 비중계로 측정하고 HCl로 적정하여 사용하는 50% NaOH용액의 물성변화를 측정하고 재사용 가능 횟수를 측정하였다.

나) 단백질 분해효소의 재사용

계껍질에서 사용한 단백질 분해효소의 반응 상등액의 단백질 및 당을 정량하였고 재사용 가능성을 측정하였다.

2) 키토산 제조시 유용부산물의 회수

가) Peptides성 효소분해물은 pH를 조절하면서 회수율을 측정하였

으며 NaOH에 의하여 용해된 단백질은 중화하여 dialysis시킨후에 정량하였다

나) 아미노산 조성 분석

추출 농축물, 단백질 분해효소에 의하여 분리된 단백질, NaOH에 의하여 제거된 단백질을 6N HCl로 가수분해한 뒤에 HCl을 제거하고 일정 부피로 맞춘 뒤에 sulfo-salicylic acid 10%-ethanol용액으로 처리하여 다시 침전을 제거한 후에 Pharmacia Biochrom20 아미노산 자동분석기로 분석하였다.

3) 올리고당 제조시 효소 및 기질의 재사용

키틴 분해효소의 기질로는 콜로이드 상태의 키틴을 키토산 분해효소의 기질로는 1차년도에 제조한 탈아세틸화도가 80%인 키토산을 용액으로 만든 다음 pH를 5.2로 조절하여 측정하였다. 산업적으로 올리고당 생산을 위하여서는 가능한 한 고농도의 기질을 사용하여야 하며 미반응 기질의 재사용을 검토하였다.

다. 올리고당 생산을 위한 효소의 열 안정성

식품 공업용 효소인 조 파파인과 닭에서 분리한 키틴분해효소의 열안정성을 50℃, 60℃, 70℃에서 측정였다.

3. 키틴, 키토산 올리고당의 다량분리방법 및 키토산 제조의 수학적 model 개발 및 simulation

연속공정을 위하여 반응액으로부터 수용성 키틴 키토산 올리고당을 분리하고 이를 겔 여과법을 이용하여 순수 분리하는 한편 키토산 제조

의 수학model을 개발하여 simulation을 하였다.

가. 키틴, 키토산 올리고머의 다량 분리

1) 수용성 올리고당의 분리

효소반응 물질을 pH에 따른 용해도의 차이를 이용하여 수용성 올리고당을 분리하였다.

2) 겔 여과법에 의한 수용성 올리고당의 순수분리

수용성 올리고당을 충전제로써 BioGel P2을 용출 용매로써 증류수를 이용하여 분획당 2ml 로 유속을 0.6ml/min의 조건으로 조성을 분석하고 당을 순수 분리하였다.

나. 키토산 제조조건의 수학 model 개발

키토산의 규격은 점도와 탈아세틸화도에 따라 결정된다. 탈아세틸화도는 NaOH의 농도, 반응시간, 반응온도 및 particle size의 영향을 받는 것으로 생각된다. 탈아세틸화도는 NaOH의 농도가 50%일때 가장 효과적인 것으로 보고되고 있으나 반응시간 및 반응온도에 따른 연구는 거의 보고되지 않았으며 particle size에 대한 영향은 전혀 보고된 바 없다. 그러나 반응온도와 반응시간은 키토산 제조시 경제적인 조업에 큰 영향을 미치는 인자이므로 이에 대한 체계적인 연구와 아울러 탈아세틸화도를 예측할 수 있는 모델식의 개발이 요청되고 있다. 이에 따라 본 연구에서는 실측한 데이터에 기초하여 탈아세틸화도와 반응온도, 시간 및 particle size 사이의 정량적인 관계식을 도출하였다.

1) 반응온도, 시간 및 particle size에 따른 탈아세틸화도의 변화.

50%(w/w) NaOH 용액을 사용하여 particle size(1×4~5cm 및 0.5×0.5cm)로 100℃, 120℃, 140℃에서 반응시간 달리하여 탈아세틸화도를 측정하였다.

2) Model의 설정

$$\text{탈아세틸화도} = A \exp[-(1+t)^n] \quad n = \alpha + \beta T$$

여기서

t : 반응시간 (min)

T : 반응 온도 (K)

A, α, β : 상수

식(1)의 상수 A, α, β 는 Marquardt-Leybenverg algorithm을 사용하여 실측치를 최소 오차내에서 모사할 수 있는 값을 추정하였으며 이를 Table에 수록하였다.

제3장 결과 및 고찰

제1절 키틴의 효소에 의한 단백질 제거 최적화와 다양한 키토산의 제조

진한 농도의 NaOH 대신 식품용 효소인 papain, 세균성 단백질 분해효소, 곰팡이 단백질 분해효소를 이용하여 단백질을 제거하고 점도가 다른 키토산과 colloidal chitin을 제조하였다.

1. 단백질 분해효소에 의한 게 껍질의 단백질 제거

키틴 제조를 위하여 게 껍질에 종래에 사용하던 2N NaOH 대신에 효소를 처리한 결과는 다음과 같다.

가. 단백질 분해능력

곰팡이 단백질 분해 효소가 50mg/ml 농도에서 단백질의 50%가 제거되어 가장 높았고 최적 pH는 두 사용 효소 모두 5.0 이었다.(Fig.2) 그 다음이 papain 이었다. 게껍질의 양을 고정하고 곰팡이 단백질 분해효소의 양과 시간에 따른 단백질 분해능력을 측정하였다(Fig.2). 이와 같은 단백질 제거능력은 NaOH에 의한 단백질 제거 공정을 대체할 수는 없으나 특수 peptide를 얻기 위하여서는 시도할 만한 방법이 될 수 있을 것이다.

나. 상등액의 수율

반응 상등액에 포함되어있는 게 껍질 유래 수용성 단백질 량이 효

소액의 2배 이상이 되어서 단백질 및 peptide의 회수와 분리·정제가 필요하다.

2. 다양한 키토산 제조

가. 고점도 및 저점도 키토산 제조

1) 고점도 키토산 제조

고점도(200cps)의 키토산을 얻으려면 100℃, 2시간, 120℃, 20분 이내에서 제조하여야 한다(Fig.3).

2) 저점도 키토산 제조

140℃에서 제조시는 10분만에 점도가 30cps정도 이하로 관찰되었다.

3) 입자크기의 영향

입자의 크기를 달리한 키토산의 제조실험에서는 입자의 크기가 작은 경우에 동일 반응시간에서 탈아세틸화도는 10%정도 증가하였으나 점도는 30%정도 감소하였다(Fig.4).

4) 반응후 잔류시간

반응후 NaOH용액에 방치한 시간에 따라 탈아세틸화도의 변화는 적었으나 상대적으로 점도의 감소가 큰 것으로 나타났다(Fig.5).

나. Colloidal 키토산의 제조

진한 염산(35%), 50% 황산, 인산(85%)에서 비슷한 성질을 나타내는 colloidal 키토산을 제조하였고 효소반응의 기질로 사용한 결과 비슷한 분해능력이 관찰되었다.

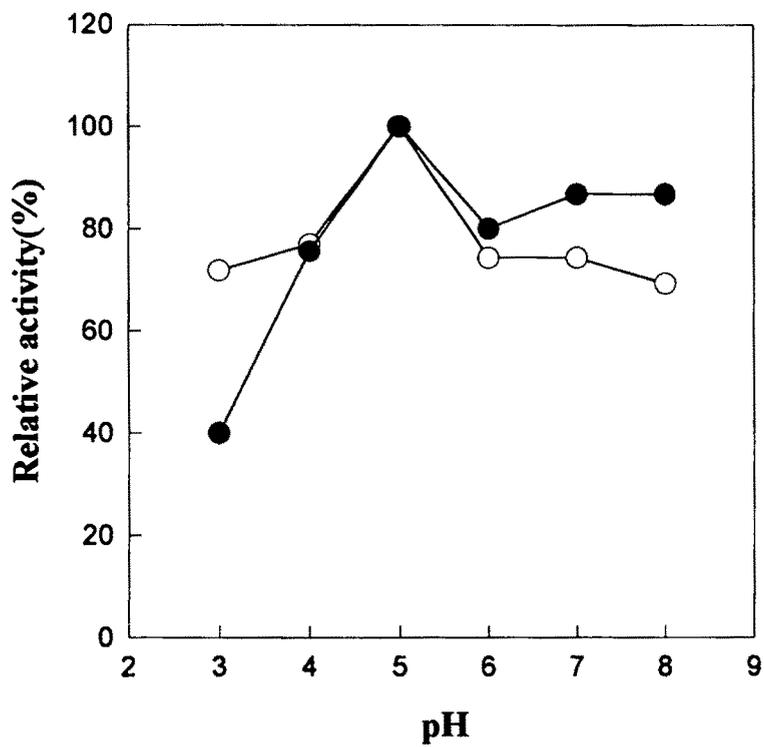


Fig.1. Effects of pH on deproteinization of crab shells
Sumzyme(●), Collupulin(○)

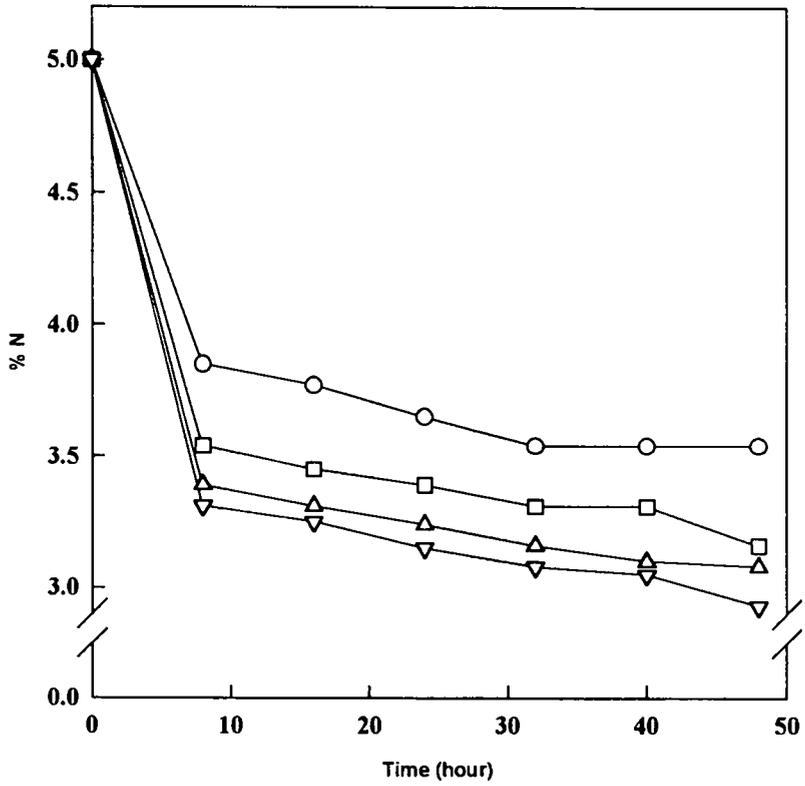


Fig.2. Effects of time and protease concentration on deproteinization of crab shells.

4mg(○), 8mg(□), 12mg(△), 16mg(▽)

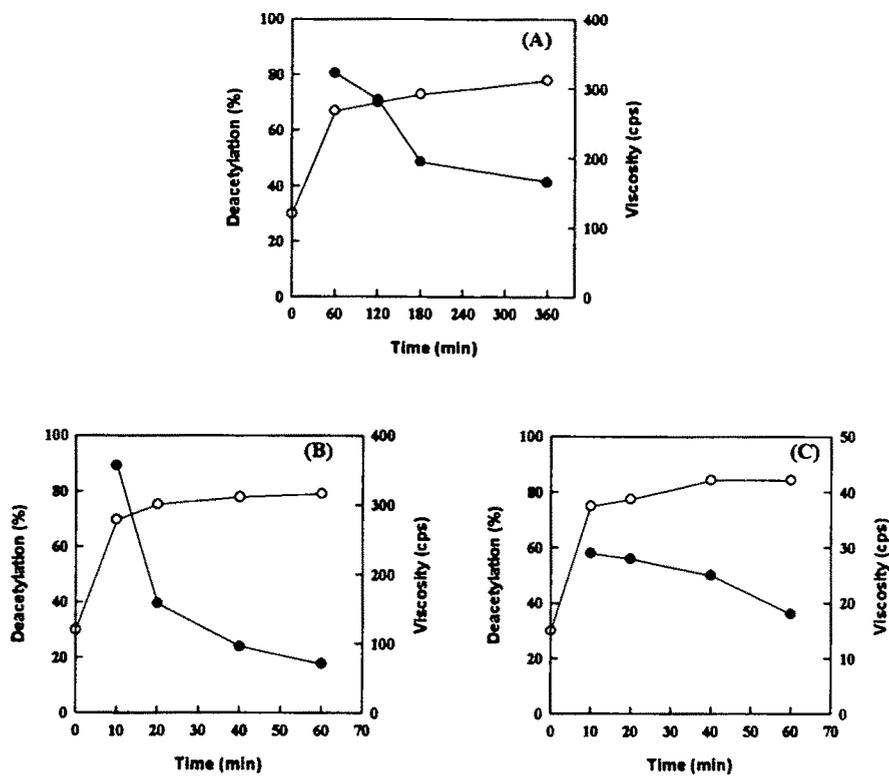


Fig.3. Effect of the reaction temperature and time on the degree of deacetylation and the viscosity of chitosan obtained from the uncut chitin.

(A) 100°C, (B) 120°C, (C) 140°C

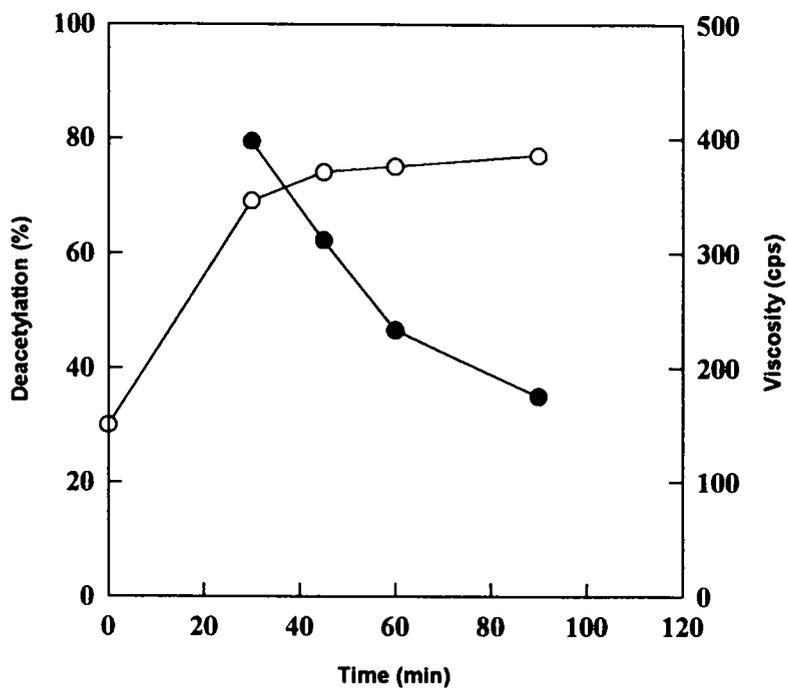


Fig.4. Effect of size reduction on the deacetylation and viscosity of chitosan obtained from the chitin at 100°C.

○: degree of deacetylation, ●: viscosity

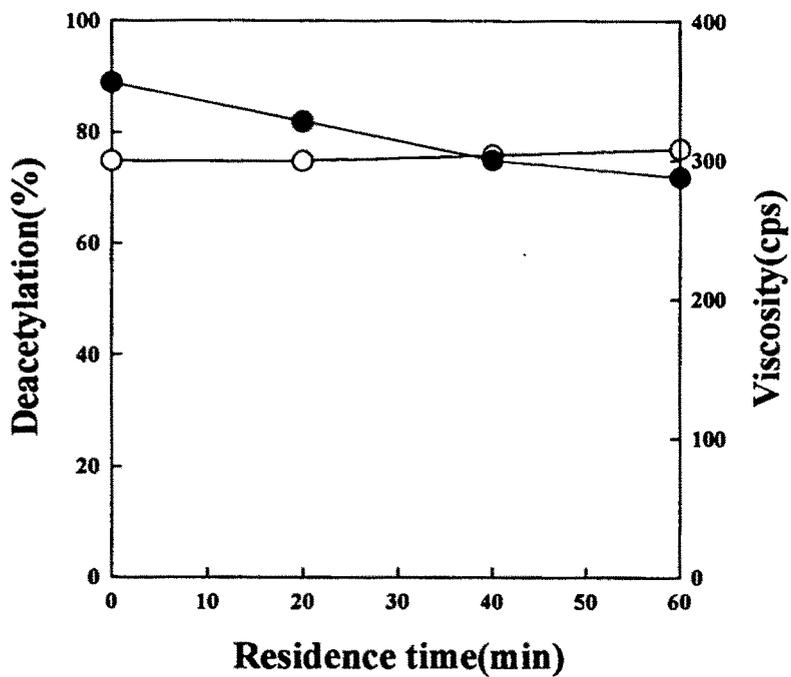


Fig.5. Effect of the residence time at 80°C on the deacetylation and the viscosity of chitosan obtained from the uncut chitin.

○: degree of deacetylation, ●: viscosity

제2절 유용 물질 및 반응물의 회수 및 재사용

계 껍질의 30%-40%를 차지하고 있으며 단백질 및 당류와 결합하고 있는 Ca과 단백질을 회수하고 NaOH, 미반응 기질, 키틴 및 키토산 분해효소의 재사용을 실험하였다.

1. Ca²⁺포함 키토산의 제조

가. 제조방법

120℃ 및 140℃에서 반응시간별로 계껍질에서 탈단백 과정이나 탈 CaCO₃ 없이 바로 50% NaOH를 처리하여 반응온도 별로 키토산을 제조 하였다.

나. Ca-키토산의 물성

1) cutting mill로 분쇄시 키틴으로 동일온도 제조한 키토산에 비하여 분쇄가 잘되는 특성을 보였고 회분은 5% 내외였다. (Fig. 6)

2) 반응 온도 및 반응시간에 따른 탈아세틸화도의 변화

50% NaOH 수용액으로 처리하였을 때에 80%의 탈아세틸화도를 얻으려면 120℃에서 60분 이상 처리하거나 140℃에서 40분 이상 처리하여야 됨을 알 수가 있다. (Fig. 7)

3) 용해도 및 점도

모든 시료가 10~20cps의 점도를 보였으며 140℃에서 40분 이상, 120℃에서 80분 이상의 시료는 1% 초산에 완전히 용해되었고 나머지 시료들은 불용성이 관찰되었다.

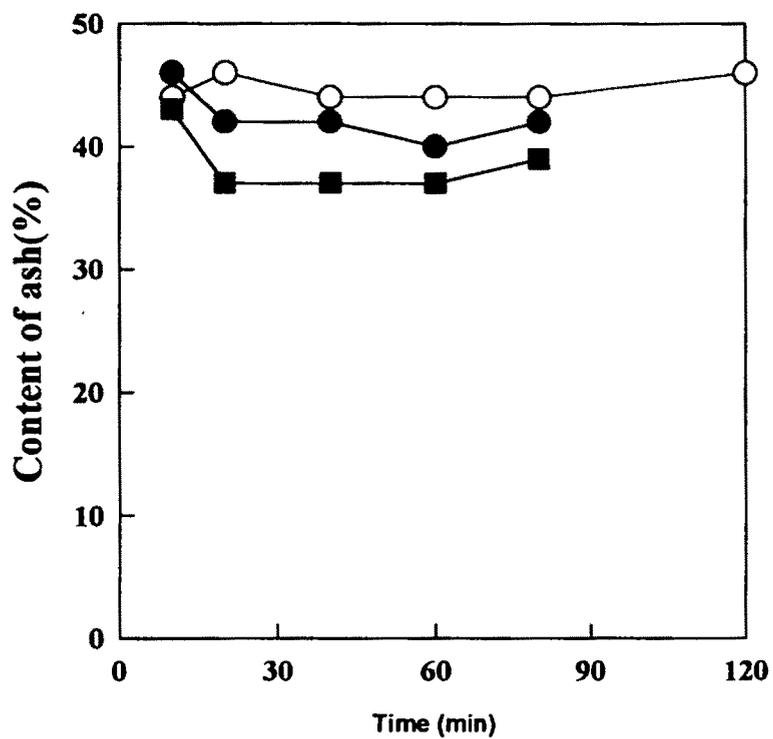


Fig.6. Effect of reaction temperature and time on the ash content.

100°C (○), 120°C (●), 140°C (■)

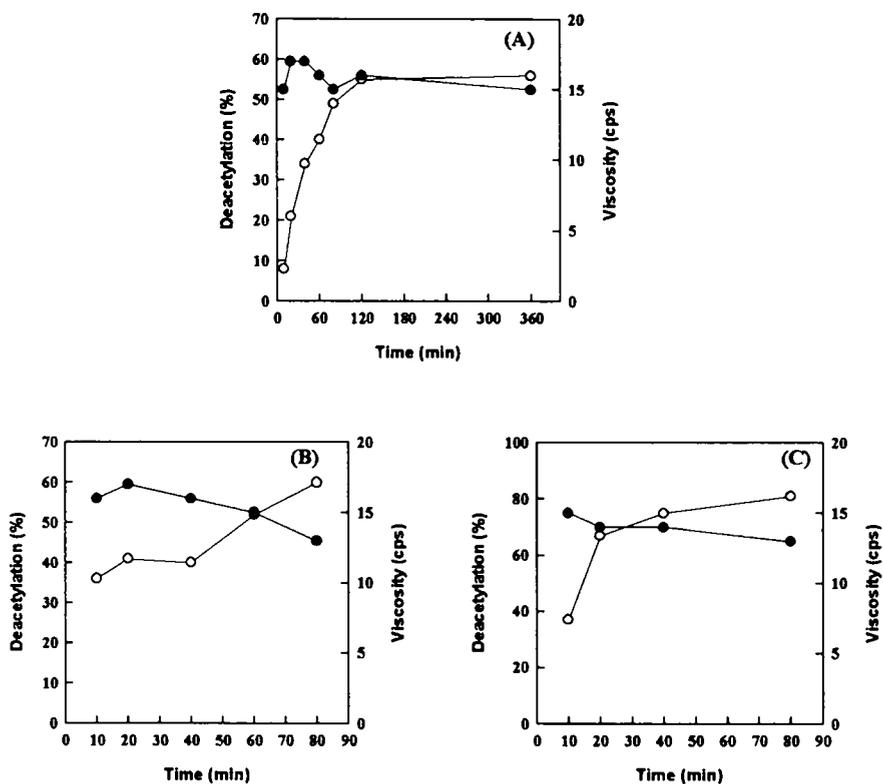


Fig.7. Effect of reaction temperature and time on the degree of deacetylation and the viscosity of Ca-chitosan.

(A) 100°C, (B) 120°C, (C) 140°C

4) 수분 흡수성

반응시간이나 반응 온도에 무관하게 200~250%의 수분을 흡수하였다(Fig. 8).

5) 지방 흡수성

반응시간이나 반응 온도에 무관하게 90~100%의 지방을 흡수하였다(Fig. 9).

2. 키토산 제조시 반응 물질의 재사용

가. NaOH의 재사용

반응액의 재사용은 반응전의 비중이 1.53인 50% NaOH용액이 1회 사용한 후에는 비중이 1.52로 사용하지 않은 것과 비중의 차이가 없었으나 2회 사용 후에는 1.49로 감소하였으며 HCl로 적정시 14%정도 NaOH농도가 감소한 것으로 측정되어서 2회까지는 재사용이 가능한 것으로 볼 수 있다.

나. 단백질 제거효소의 재사용

1회 사용 후 효소활성도가 90%를 유지하며 2회까지 사용이 가능했다.

3. 단백질 및 peptide성 유용 부산물의 회수

가. Peptides성 효소분해물 회수 및 아미노산 조성

- 1) 마른 계집질 100g당 12g정도의 peptide성 효소분해물을 얻었다.
- 2) pH가 감소함에 따라 침전되는 단백질의 양이 증가 하였으며 pH 2 이하에서는 변화가 없었다.
- 3) alanine의 함량이 다른 아미노산 보다 현격하게 높았으며,

glycine의 함량은 valine, leucine 및 tyrosine함량 수준이었다.

나. NaOH에 의하여 추출된 단백질회수 및 아미노산 조성

- 1) 마른 계껍질 100g당 단백질 17~20g을 회수하여 문헌치와 일치함을 보였다.
- 2) 열수 추출 농축물과는 달리 glycine 및 arginine의 함량이 상대적으로 높지않았다.
- 3)전체적으로 소수성 아미노산의 함량이 높은 것으로 밝혀졌다.

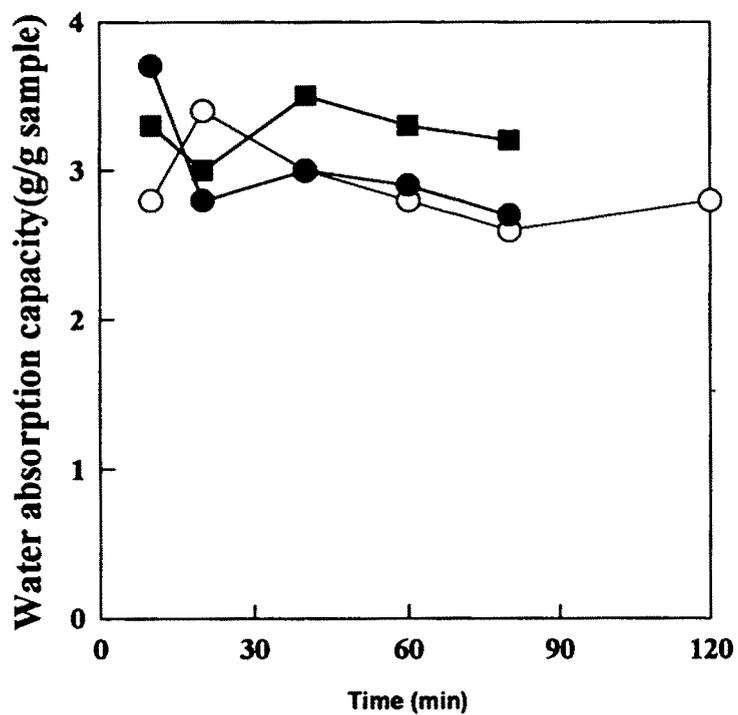


Fig.8. Effect of reaction temperature and time on the water absorption capacity.

100°C (○), 120°C (●), 140°C (■)

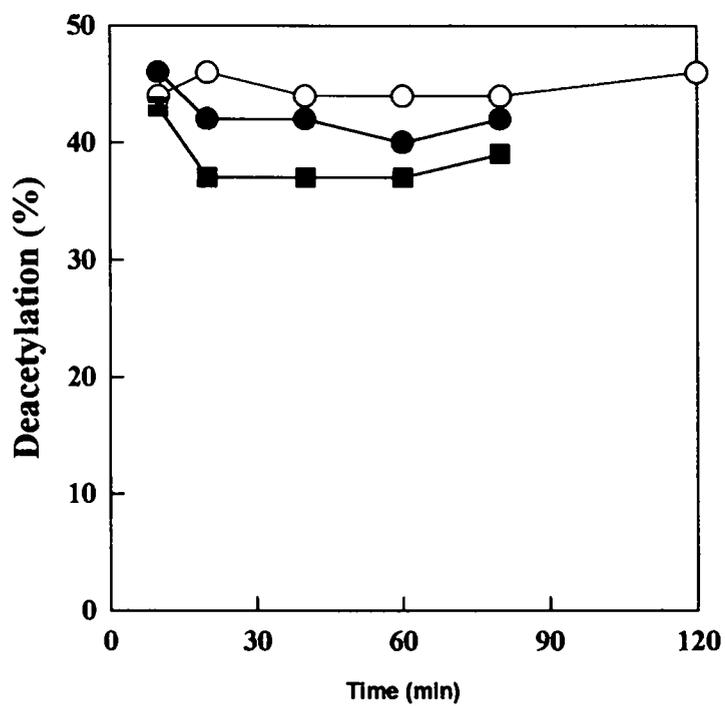


Fig.9. Effect of reaction temperature and time on the oil absorption capacity.

100°C (○), 120°C (●), 140°C (■)

4. 효소 및 미반응 기질의 재사용

가. 분해효소

1) 키틴 분해

키틴 분해의 경우에는 분해효소 종류에 관계없이 3회 정도까지 재사용이 가능하였다. 키틴양은 건조한 colloidal chitin으로 효소 단백질 1mg당 0.1 %가 최적이었다 이 때에 colloidal chitin에 키틴 분해효소가 흡착되어 있으므로 원심분리나 막분리한 후에 효소 첨가 없이 재순환 시켜 사용할 수 있다. 단 이 경우에 반응용액을 새로 갈아주어야만 원래의 활성 유지가 가능하였다.

2) 키토산 분해

키토산의 경우에는 기질의 최대 농도가 5%이었다. 키토산의 경우에는 한번 사용한 후에는 완전히 효소활성이 상실되었다. 이는 키토산을 녹이기 하여 pH를 낮추게 되면 분해효소의 활성이 손실되는 것으로 열 안정성과는 관련이 없었다. 따라서 키토산을 녹여 pH를 조절한 후에 효소액을 가하면 3회 이상 사용이 가능하였다.

나. 기질의 재사용

1) 키틴

기질로써 colloidal chitin을 사용하기 때문에 반응후 원심분리하여 남은 기질과 효소를 동시에 회수할 수가 있다.

2) 키토산

반응 후에 2M KOH로 pH를 8.0으로 조절하여 수용성 올리고당과 미반응 기질을 침전으로 회수하여 다시 사용한다.

5. 올리고당 생산을 위한 효소 열 안정성

식품용 파파인과 닭 소화기에서 분리한 키틴 분해효소로 50, 60, 70℃에서 열 안정성을 시험하였다.

가. 조 파파인

1) 키틴 분해활성

β -N-acetylglucosaminidase활성과 endochitinase활성이 모두 60℃에서 3일간 안정하였다. 또한 70℃에서도 2일까지는 80%를 유지하였고 3일째에도 50%수준을 유지하여 열에 아주 안정함을 보였다(Fig.10).

2) 키토산 분해활성

50℃에서는 2일까지는 안정하였으나 3일째에는 효소활성이 30%가량 감소하였다. 60℃와 70℃에서는 2일, 3일이 지나감에 따라 효소활성이 비례적으로 감소하는 경향을 보였다(Fig.11).

3) 단백질 분해활성

조 파파인의 단백질 분해능은 온도에 관계없이 3일째에는 10%미만을 나타내었다(Fig.12).

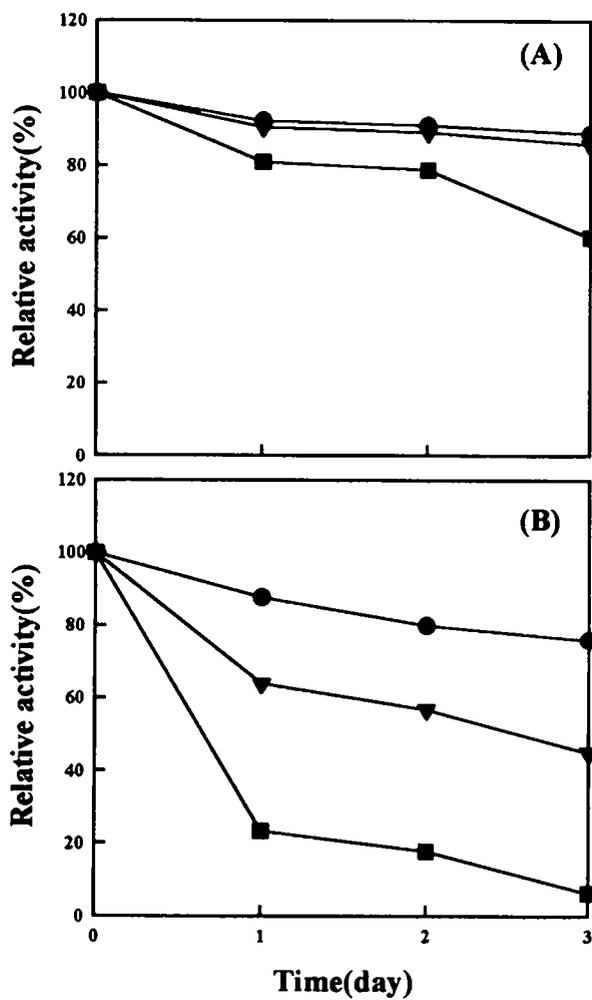


Fig.10. Thermostability of chitinase activity of papain
 (A) endochitinase, (B) β -N-acetylglucosaminidase

50°C : ●-●, 60°C : ▼-▼, 70°C : ■-■

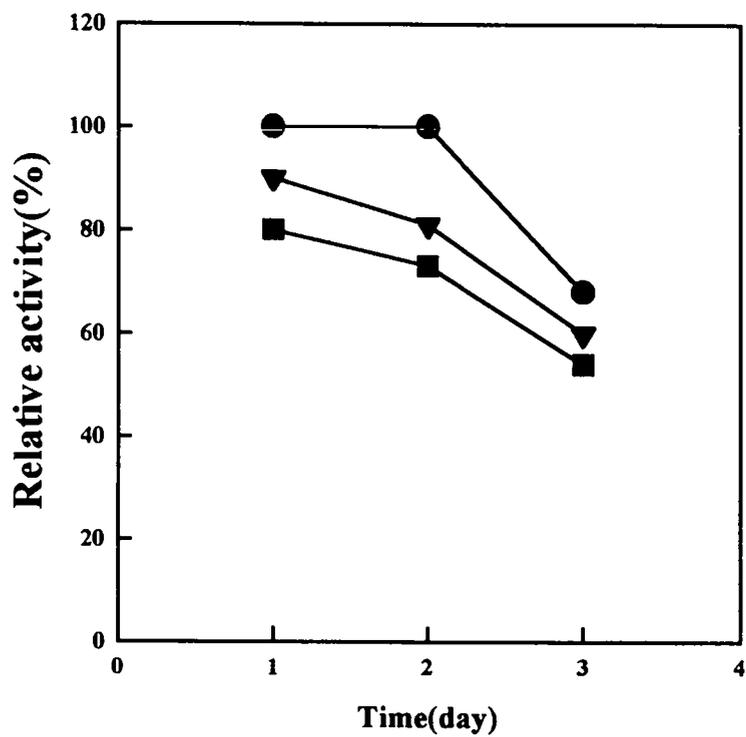


Fig.11. Thermostability of chitosanase activity of papain.

50°C : ●-●, 60°C : ▼-▼, 70°C : ■-■

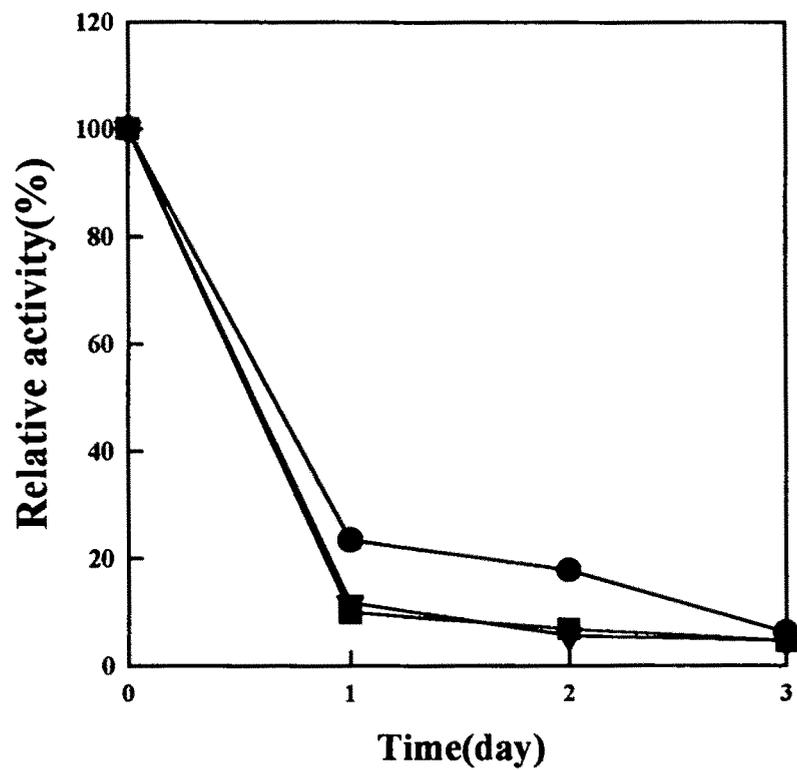


Fig.12. Thermostability of protease activity of papain

50°C: ●-●, 60°C: ▼-▼, 70°C: ■-■

나. 닭에서 분리한 키틴 분해효소

1) 키틴 분해활성

닭에서 분리한 키틴 분해효소의 경우에도 50℃, 60℃에서는 조파파인과 비슷한 안정성을 보였으나, 70℃에서는 서서히 활성이 감소하여 2일째에는 β -N-acetylglucosamidase활성은 소실되었다. Endochitinase활성의 경우 50℃와 60℃에서는 비슷한 양상을 보이며 70℃의 경우 3일 후에 10%정도의 활성만을 보였다(Fig.13).

2) 키토산 분해활성

40~60℃까지는 3일째가 되어도 80%이상의 활성을 유지한 반면에 70℃에서는 1일째에 60%의 활성을 보여 급격한 감소를 보였다(Fig.14). 2일과 3일에서는 비슷한 효소활성을 유지하여 키틴분해시와는 다른 양상을 보이고 있다.

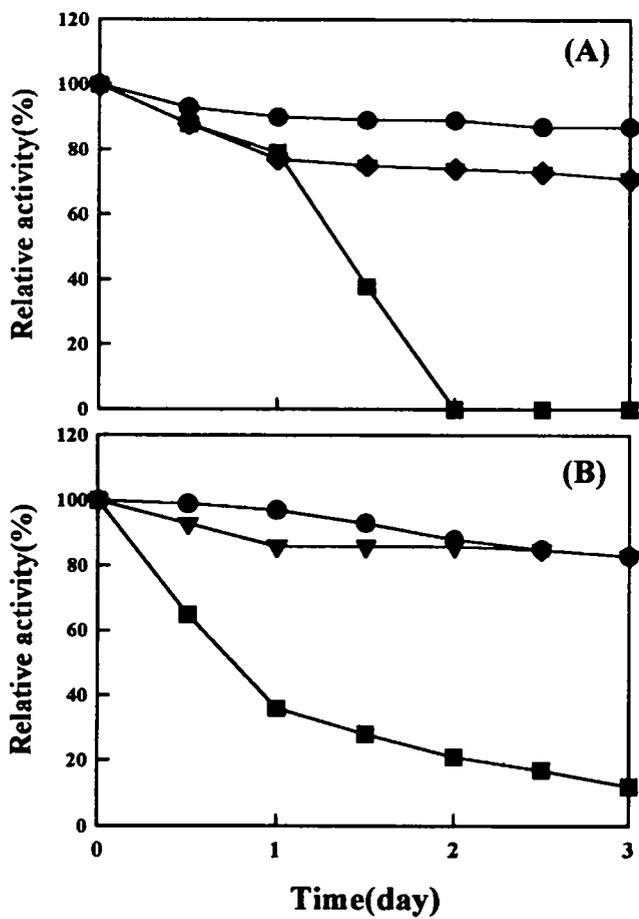


Fig.13. Thermostability of chitinase activity of the broiler gizzard tissue.

(A) β -N-acetylglucosaminidase, (B) endochitinase

50°C (●), 60°C (▼), 70°C (■)

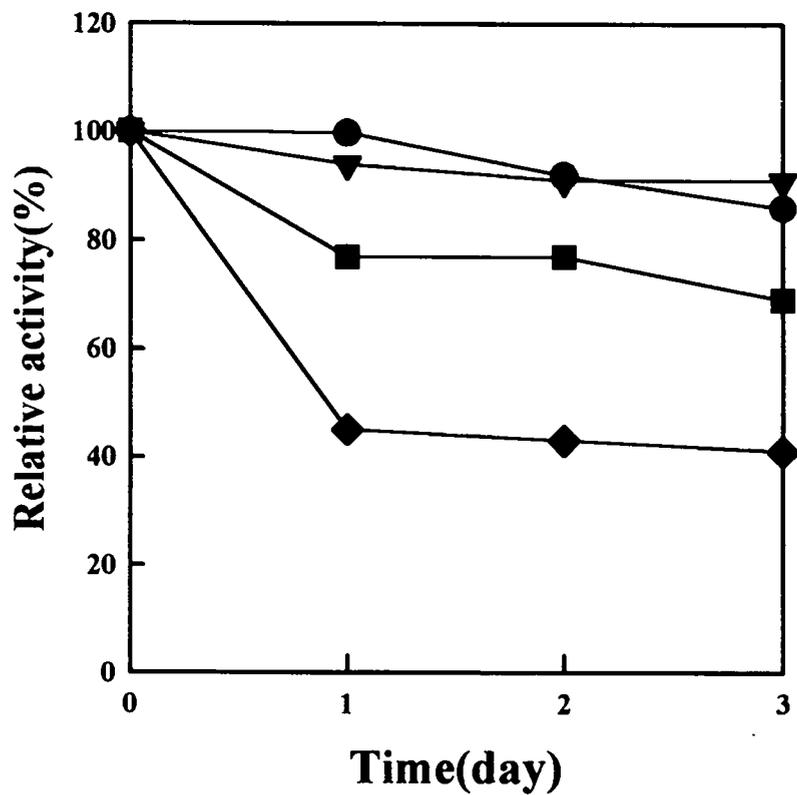


Fig.14. Thermostability of chitosanase activity of the broiler gizzard tissue.

40°C (●), 50°C (▼), 60°C (■), 70°C (◆)

제3절 키틴, 키토산 올리고당의 대량분리 방법 및 키토산 제조의 수학적 model 개발 및 simulation

연속공정을 위하여 반응액으로부터 수용성 키틴 키토산 올리고당을 분리하고 이를 겔 여과법을 이용하여 순수 분리하는 한편 키토산 제조의 수학적model을 개발하여 simulation을 하였다.

1. 키틴·키토산 올리고당의 대량분리

가. 수용성 올리고당의 분리

1) 키틴 올리고당의 수율

키틴의 경우에는 40~50%가 수용성으로 나타났다.

2) 키토산 올리고당

반응액을 pH 7로 조정하여 수용성 올리고당과 비수용성 기질을 분리하였으며(Fig.15) 키토산은 30-40%가 효소에 의하여 가용성으로 전환되었다.

나. 수용성 올리고당의 조성 및 순수 분리

1) 겔 여과법의 조건확립

겔 여과법의 충전제로는 Bio-Gel P-2를 용출 용매로는 증류수를 용출속도는 0.6ml/min로, 2ml를 한 분획량으로 하였다.

2) 올리고당의 주 구성성분

분획한 결과 키틴올리고당은 닭과 파파인의 경우 주성분이 dimer와 trimer이고(Fig.16), 키토산 올리고당은 파파인은 dimer가

닭의 경우는 trimer가 주를 이루었다(Fig.17). Membrane 분리에
비하여 단일 일괄 공정으로 특정한 범위의 수용성 올리고당은 물론
키토산의 다량 분리도 가능하겠다.

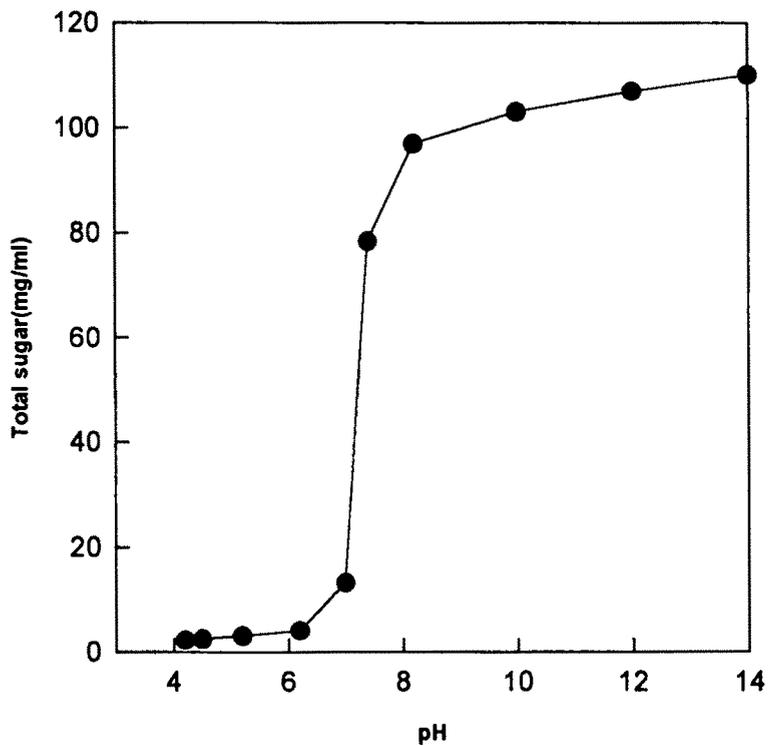


Fig.15. Separation of water-soluble chitosan oligomers
from substrate chitosan by pH adjustment.

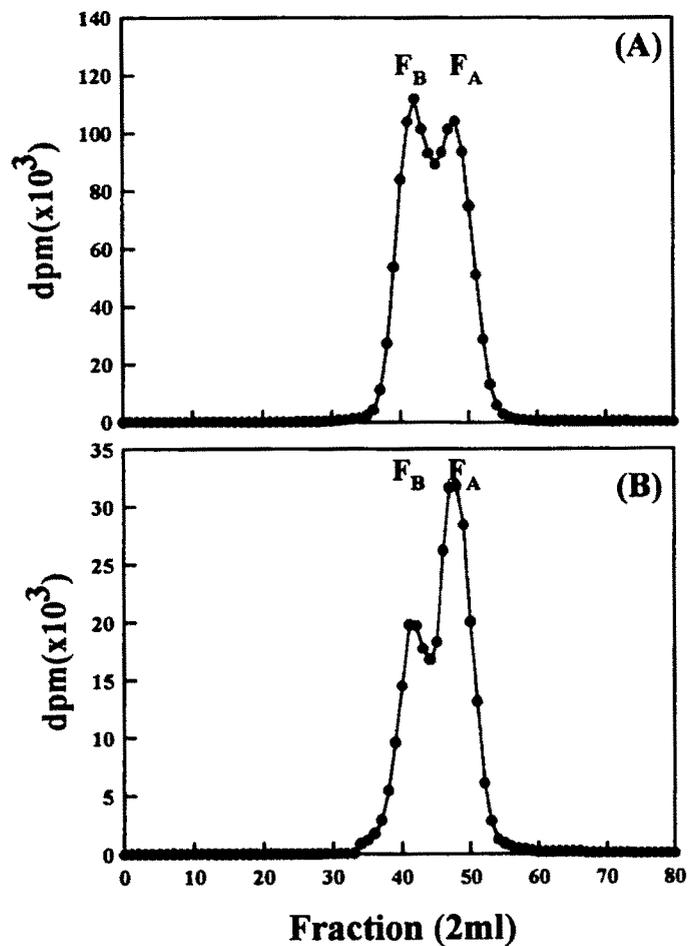


Fig.16. Separation of water-soluble chitin oligomers on Bio-Gel P-2. FA: (GlcNAc)₂, FB: (GlcNAc)₃
 (A) broiler gizzard tissue, (B) papain

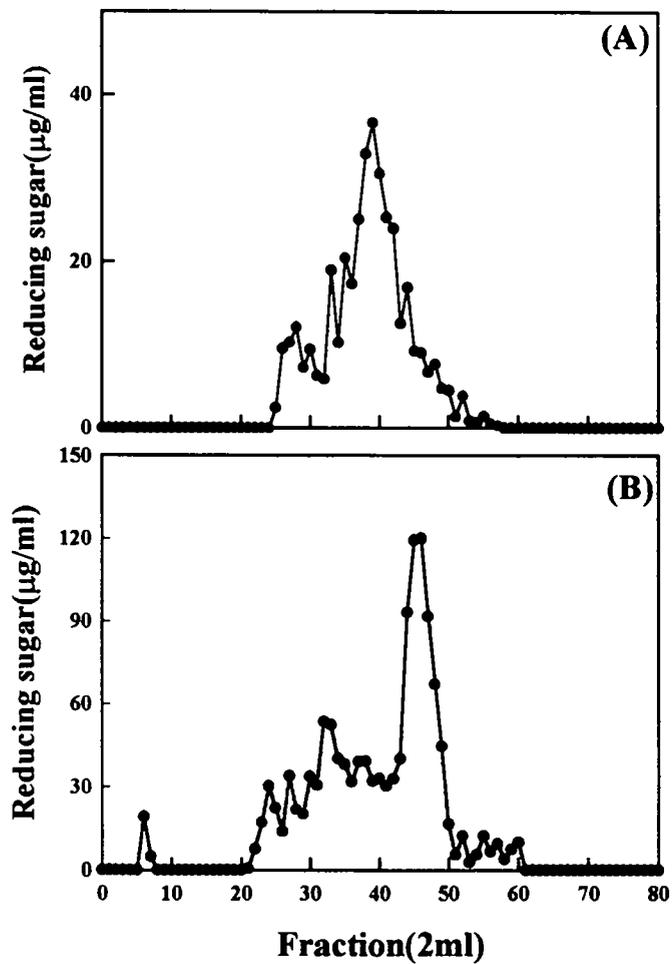


Fig.17. Separation of water-soluble chitosan oligomers on Bio-Gel P-2.

(A) broiler gizzard tissue, (B) papain

2. 키토산 제조조건의 수학적 model 개발 및 simulation

가. 반응온도, 시간 및 particle size에 따른 탈아세틸화도의 변화.

50%(w/w) NaOH 용액을 사용하여 particle size(1×4~5cm 및 0.5×0.5cm)로 100℃, 120℃, 140℃에서 반응시간 달리하여 탈아세틸화도를 측정하였다.

나. 탈아세틸화도의 정성적 고찰

탈아세틸화도는 반응 시간이 진행됨에 따라 처음에는 급격히 증가하나 증가속도가 점점 둔화되어 80% 내외의 값에 도달됨을 알 수 있으며 반응온도가 상승하면 탈아세틸화도가 증가하고 반응시간이 감소됨을 관찰할 수 있다. 또한 동일한 온도를 유지하면서 particle size가 감소하면 반응시간이 단축됨을 알 수 있다(Table 1).

Table 1. Variation of Degree of Deacetylation (Experimental)

Particle size (cm)	Temperature (℃)	Time (min)	Deacetylation (%)
1×4~5	100	0	30.00
		60	67.00
		120	70.00
		180	73.00
		360	78.00
1×4~5	120	0	30.00
		10	69.70
		20	75.14
		40	77.83
		60	79.05
1×4~5	140	0	30.00
		10	75.00
		20	77.49
		40	84.38
		60	84.30
0.5×0.5	100	0	30.00
		30	69.00
		45	74.00
		60	75.00
		90	77.00

다. 수학적 model 개발

이러한 정성적인 관찰에 기초하여 탈아세틸화도와 반응 시간, 반응 온도 및 particle size 사이에 다음과 같은 경험적인 모델 식을 가정하였다.

$$\text{탈아세틸화도} = A \exp[-(1+t)^n] \quad (1)$$

$$n = \alpha + \beta T$$

여기서

t : 반응시간 (min)

T : 반응 온도 (K)

A, α , β : 상수

식(1)의 상수 A, α , β 는 Marquardt-Leybenverg algorithm을 사용하여 실측치를 최소 오차 내에서 모사할 수 있는 값을 추정하였으며 이를 Table 2에 수록하였다.

Table 2. Value of the constants in Eq.(1)

Constant	particle size(cm)	value
A	1×4~5	83.83
	0.5×0.5	91.73
α		5.148
β		- 0.01482

1) 어느 경우나 실측치와 추정치는 잘 부합되고 있으며(Fig.18)

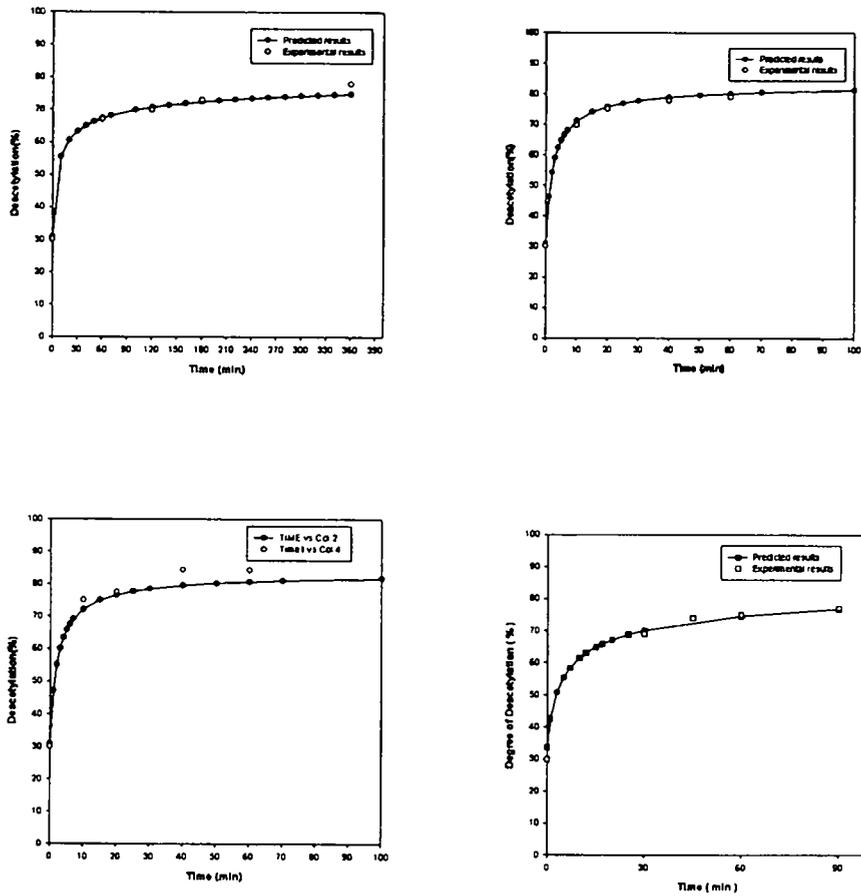


Fig.18. Comparison of estimated results and experimental results

A: 100°C, particle size: 1×4~5cm, AAD = 1.13%

B: 120°C, particle size: 1×4~5cm, AAD = 1.02%

C: 140°C, particle size: 1×4~5cm, AAD = 2.61%

D: 100°C, particle size: 0.5×0.5cm, AAD = 1.40%.

터 식 (1)은 반응온도와 반응시간으로부터 탈아세틸화도를 추정할 수 있는 적절한 식인 것으로 판단된다.

2) 식 (1)에서 탈아세틸화도에 대한 particle size의 영향은 상수 A로 표현되고 있으며 본 연구에서 검토된 size의 경우 particle size가 작아짐에 따라 대략 9% 가량의 탈아세틸화도의 증가가 이룩됨을 알 수 있다.

라. 반응온도의 영향

실험결과 및 식 (1)에 의하면 반응온도가 상승할수록 탈아세틸화도는 증가하는 것으로 나타나고 있다. 식 (1)을 이용하여 탈아세틸화도에 미치는 반응온도의 영향을 조사하여 보았다(Fig.19).

1) 반응온도가 상승할수록 탈아세틸화도는 증가하나 탈아세틸화도의 증가도는 점점 작아짐을 알 수 있다. 반응온도가 140℃ 이상인 경우는 최대 탈아세틸화도는 반응온도에 관계없이 거의 동일한 것으로 나타나고 있으나 최대 탈아세틸화도에 당도하는 반응시간은 반응온도가 높을수록 단축됨을 알 수 있다.

2) 이러한 고찰로부터 적정반응온도는 140 - 160℃ 부근인 것으로 판단되며 반응온도와 소요시간 사이의 경제성검토가 수반될 경우 최적반응온도가 결정될 수 있으리라 생각된다.

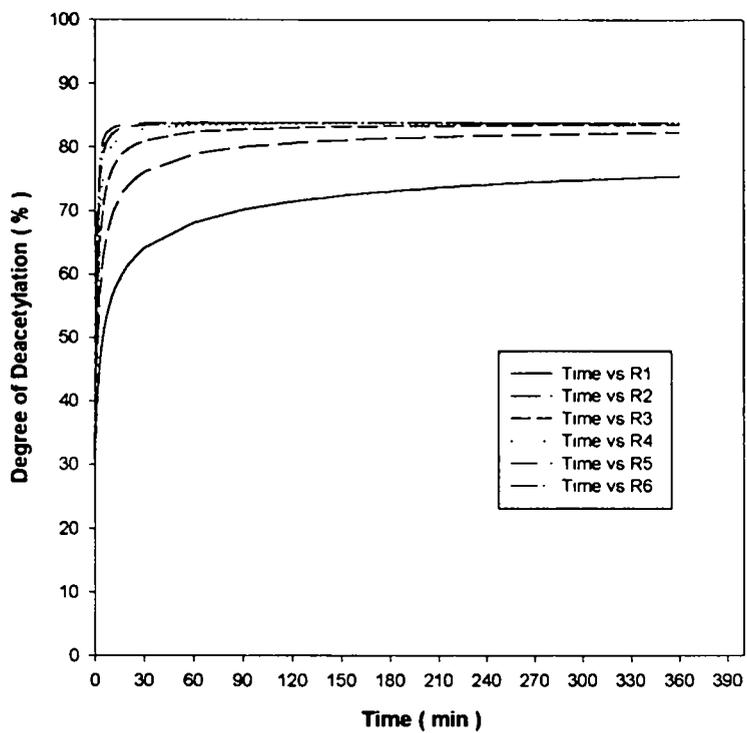


Fig.19. Effect of reaction temperature on degree of deacetylation

(Case of uncut chitin, 1×4~5 cm size)

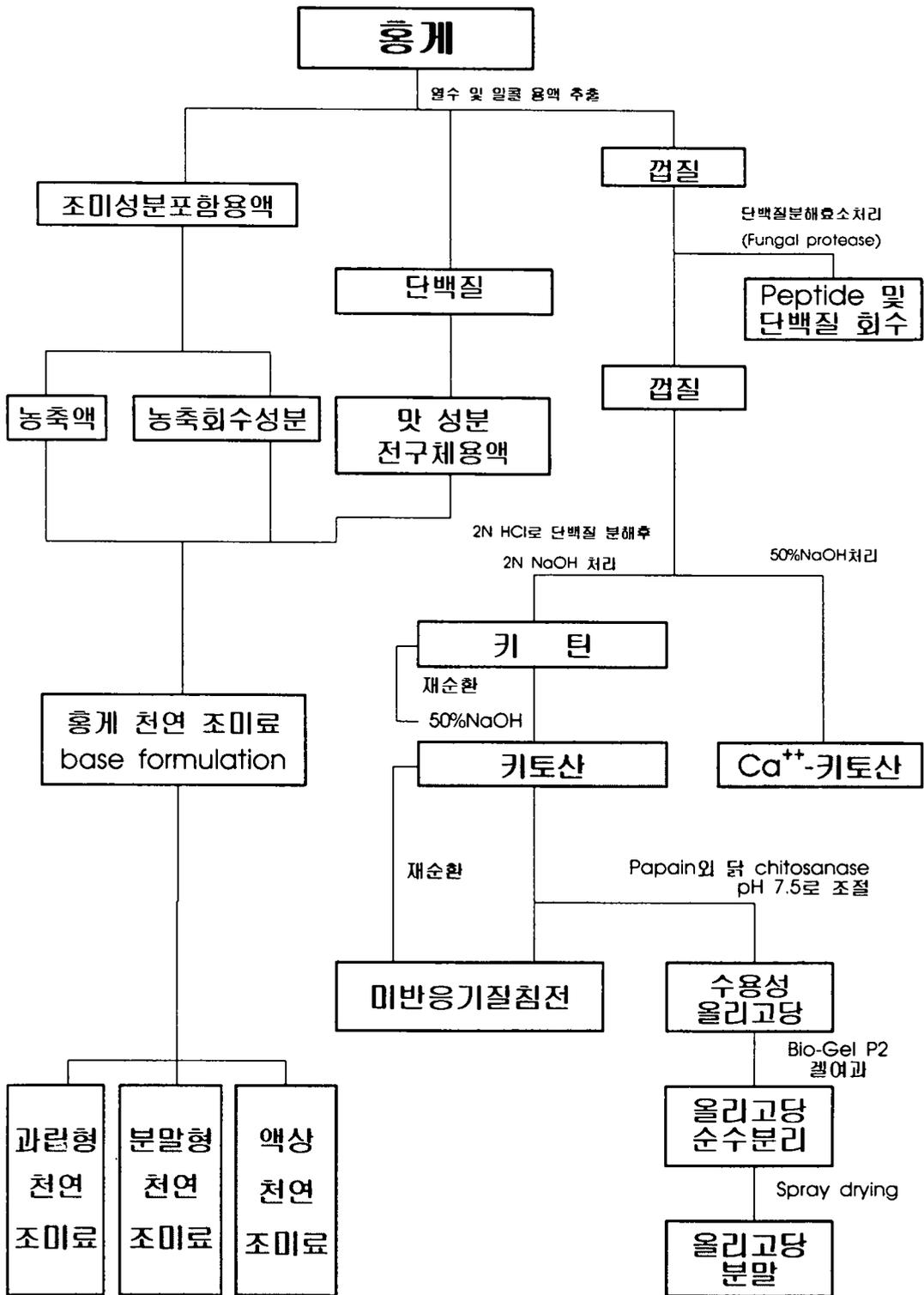
제4절 결론

키틴으로부터 NaOH를 사용하여 단백질을 제거하는 대신에 단백질 분해효소를 이용한 결과 곰팡이 단백질 분해효소 50mg/ml에서 50%까지 단백질에 제거되어서 NaOH 사용 방법을 대처 할 수 없으나 특수 peptide를 얻는 데는 유용하였다. 고점도의 키토산(200 cps)을 얻기 위하여서는 100℃에서 2시간, 120℃에서 20분 이내로 반응을 하여야 하였으며 30cps 이하의 저 점도의 키토산은 140℃에서 10분 정도도 충분하였다. 게껍질의 30% 정도 존재하는 Ca를 회수하기 위하여 Ca⁺⁺-키토산의 제조 방법을 개발한 결과 80%의 탈아세틸화도를 갖기 위해서는 120℃에서 60분 이상 140℃에서 40분 이상 반응을 시켜야 했다. 또한 1% 초산 용액에 완전히 용해하기 위하여서는 120℃에서 80분 정도 반응을 140℃에서는 40분 이상 반응을 시켜야 되었다. 이때의 회분은 약 5% 정도 였다.

키토산 제조에 사용되는 50% NaOH와 단백질 분해효소는 3회 사용이 가능하였다. 이후의 NaOH는 산성 폐수가 많이 나오는 공장에 제공함으로써 폐기물 처분에서 비용을 절약하였다.

게껍질 100g으로부터 17-20g의 단백질을 회수 할 수가 있었으며 전체적으로 소수성 아미노산의 함량이 높았다. 기질의 사용에서는 키토산 효소 분해 반응액을 pH 8.0으로 조절하여 침전물을 얻음으로서 재사용이 가능하였다. 키토산 분해효소는 기질 pH를 사전에 조절함으로써 3회의 사용이 가능하였다. 가수 분해 효소 경우 50-60℃에서는 3일 정도에서도 안정성을 보였으며 키틴은 40-50%가 키토산은 30-40%가 수용성 올리고당으로 변화 되었으며 조성은 사용 효소에 따라 dimer, trimer가 생성되었다. 끝으로 수학적 model은 실험 data와 아주 잘 맞았으며

simulation에 의하여 반응 조건 생성 키토산의 특성을 예측할 수 있었다.



III. 참고문헌

1. Andini, S., L. Ferrara, G. Maglio, and R. Palumbo (1988) *Makromol. Chem. Rap. Commun.*, **9**, 119
2. Arai K, Kinumaki T and Fugita T : Toxicity of chitosan. *Bull Tokai Reg Fish Res Lab.* (1968) **56** 86-94,
3. Baker, S.A., A.B. Foster, M. Stacey, and J.M. Webber : Amino-sugars and related compounds. Part IV. Isolation and properties of oligosaccharides obtained by controlled fragmentation of chitin. (1958) *J. Chem. Soc.* 2218-2227
4. Cho, J.S., H. Ha, S. H. Kim, S. Y. Han, J. K. Kwan and Y. K. Sung (1996) *J. Appl. Polym. Sci.*, **60**, 161
5. Feng, X. M., C. D. Xiong, L. M. Cheng, and R.P. Xu (1990) *J. Polym. Sci., Polym. Lett. Ed.*, **28**, 411
6. Hackman, R.H. (1954) *Aust. J. Biol. Sci.*, **7**, 168
7. Hirano, S. : Production and application of chitin and chitosan in Japan, in "Chitin and Chitosan", eds., G. Skjak-Break, T. Anthonsen, P. Sandford, Elsevier (1989) pp37-43.
8. Hirano, S., H. Inui, T. Mikami, Y. Ishigami, H. Hisamori : An alkaline chitin solution and some O-alkylchitin derivatives, (1991) *Agric. Biol. Chem.*, **55**. 2627-2628
9. Hirano, S., H. Kaneko, M. Kitagawa: N-Lower-fatty-acyl derivatives of chitosan as adsorbents for lysozyme and chitinase. (1991). *Agric. Biol.*

Chem., **55**, 1683-1684

10. Hirano, S., K. Hayashi, K. Hirochi : Some N-acyl derivatives of O-carboxymethylchitosan. (1992) *Carbohydr. Res.*, **225**, 175-178
11. Kyotani S, Nishioka Y, Okamura M, Tanaka T, Miyazaki M, Ohnishi S, Yamamoto Y, Ito K, Ogiso T, Tanada S. : A study of embolizing materials for chemo-embolization therapy of hepatocellular carcinoma: antitumor effect of cis-diamminedichloroplatinum(II) albumin microspheres, containing chitin and treated with chitosan on rabbits with VX2 hepatic tumors. (1992) *Chem. Pharm. Bull.* **40**(10), 2814-2816
12. Marcinkiewicz J, Polewska A, Knapczyk J : Immunoadjuvant properties of chitosan. (1991) *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, **39**, 127-132
13. Muxzarelli, R.: in Chitin, Pergamon Press, Oxford (1977), p.85
14. Nishimura K, Nishimura S, Nishi I, Saiki S, Tokura S and Azuma I : Immunological activity of chitin and its derivatives. (1984) *Vaccine*, **2**, 93-99
15. Otakara, A. and M. Yafuki : Chitin and Chitosan : An Experimental Manual. Chapter 2, 3, and 4., 技報堂出版, Tokyo (1991)
16. Pavia, D. L., G. M. Lanpman, and G. S. Kriz, Jr. : in "Introduction to spectroscopy", W. B. Saunders Co., Philadelphia, (1979)
17. Rupley, J.A.: The hydrolysis of chitin by concentrated hydrochloric acid, and the preparation of low-molecular-weight substrates for lysozyme. (1964) *Biochimica. et Biophysica. Acta.*, **83**, 245-255
18. Suzuki K, Mikami T, Okawa Y, Tokoro A, Suzuki S and Suzuki M : Antitumor

- effect of hexa-N-acetyl chitohexaose and chitoheaoase. (1986) *Carbohydrate Res*, **151**, 403-408.
19. Tanigawa T, Tanaka Y, Tomita K, Sasaki T, Sashiwa H, Saimoto H, Shigemasa Y, Okamoto Y, Minami S and Matsushashi A : Effect of chitin on the production of interleukin-1b in human blood monocytes. (1992) *Yonago Acta Med*, **35**(2), 147-150
20. Tanigawa T, Tanaka Y, Tomita K, Sashiwa H, Saimoto H and Shigemasa Y, : Effect of partially deacetylated chitin oligomers on two macrophage cell lines: comparison with lipopolysaccharide and phorbol myristate acetate. (1991) *Yonago Acta Med*, **34**, 155-162,
21. Terbojevich, M., A. Cosani, and C. Canaro, in "Chitin and Chitosan" Proceedings of the 4th International conference on Chitin and Chitosan, Trondheim, Norway, August (1988) p407
22. Natural chelating polymers : alginic acid, chitin and chitosan (1973) R.A.A. Muzzarelli, Pergamon Press, Oxford
23. Proceedings of the first international conference on chitin/chitosan. (1978) R.A.A. Muzzarelli and E.R. Parizer (ed) MIT Sea Grant report MITSG78-7, MIT Press
24. Chitin, chitosan and related enzymes (1984) J.P. Zikasis (ed), Academic Press, New York
25. 別冊 フトケ三カル, キチン/キトサンの科学 (1987) 食品化学新聞社
26. Biomass part B : Lignin, Pectin and Chitin (1988) W.A. Wood and S.T. Kellog, Methods in Enzymology Vol.161, Academic Press, New York

27. Chitin Source Book : A guide to the research literature (1989) E.R. Pariser and Donald P. Rombardi, John Wiley & Sons
28. 김세권, 키틴, 키토산 및 그유도체의 제조기술과 개발동향 (1990) 식품공업 10월호, p63-73
29. 김세권, 키틴, 키토산 및 그유도체의 제조기술과 개발동향 (1991) 식품공업 3월호, p37-44
30. Advances in Chitin and Chitosan (1992) C.J. Brice, P.A. Sanford and J.P. Zikakis (ed), Elsevier Applied Science, London
31. 第六回 キチン・キトサン・シンポジウム (1992) キチン・キトサン研究會, 仙台市民會館, 仙台市 日本
32. 이용현, Chitin/chitosan유도체의 구조, 분해효소, 이용 및 주류산업에서의 활용 (1994) 주류공업 12월호, p73-85
33. 김세권, 수산가공폐기물의 활용방안 (1995) 식품공업 9월호, p7-14
34. 김현정, 이현철, 양승갑, 박노동, 조종수 (1997) 한국생체재료학회 97년 춘계 학술대회 p9
35. 한범구, 유탁, 이우진, 조성준, 박인호, 조도현 (1997) 한국 키틴·키토산 연구회지 2(3), 86-92
36. Beom-Ku Han, Hee-Young Park, Su-Il Kim, Woo-Jin Lee, In-Ho Park and Do-Hyun Jo (1997) 7th International Conference in Chitin and Chitosan, September 3-5, Lyon France, Abstract Book(Plenary Lecture and Papers)
37. Beom-Ku Han, Woo-Jin Lee and Do-Hyun Jo : Chitinolytic enzymes from the gizzard and the chyme of the broiler (*Gallus gallus* L). Biotechnology Letters (1997) 19, 981-984

38. 최연진, 김은정, 김영수, 신용철 (1997) 키토산 올리고당 생산을 위한 키토산 분해효소의 개발, 한국 키틴·키토산 연구회지 2(3), 40-48

제 2 세부과제. 미생물, 효소 생산 및 응용

I. 미생물에 의한 키틴 올리고머 생산

제 1 장 서 론

1. Chitinase 연구

Chitin은 N-acetylglucosamine(GlcNAc)를 기본단위로 하여 β -1,4 결합으로 연결된 homopolymer로서 분자량은 약 1×10^6 정도이다. Chitin은 게, 크릴새우, 보리새우 등과 같은 바다 갑각류들과 거미, 개미, 메뚜기 등과 같은 곤충의 외피를 구성하는 주성분이고, 미생물에서는 녹조류, 효모, 사상균 등의 세포벽 성분으로 발견된다.

Chitinase는 chitin을 가수분해하는 효소(chitinolytic enzyme)를 통칭하는 용어로서 세균, 곰팡이, 식물 및 동물에서 발견되고 있다. 세균의 경우 chitinase를 세포외로 분비하여 chitin을 분해하므로써 질소원과 탄소원을 획득하는데 이용하고, 곰팡이의 경우 cytosolic chitinase는 세포벽합성에 관여할 것으로 추측되며 세포외 chitinase는 다른 곰팡이의 기생에 관여하는 것으로 알려지고 있으며, 식물의 경우 병원성 곰팡이의 침입을 막기 위한 자기방어기작의 하나로 알려지고 있다. 갑각류와 곤충의 chitinase도 곰팡이의 cytosolic chitinase와 마찬가지로 외피의 chitin합성및

변형에 관계하는 것으로 알려졌다. Chitinase는 자연계에서 이와 같은 중요한 생화학적 작용을 담당하고 있을뿐만 아니라, 비교적 최근에 새로운 응용성이 알려지기 시작하면서 이에 대한 많은 연구가 집중되고 있다. Chitinase는 키틴분해산물인 키틴올리고머 제조에 이용할 수 있다. 키틴올리고머는 항암, 면역활성증진 등의 생리활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 키틴올리고머의 생리활성은 단량체(monomer)의 중합도가 높을수록 증가되는 것으로 알려졌으며 특히 6당의 키틴올리고머가 가장 높은 생리활성을 보이는 것으로 나타났다. 비교적 중합도가 높은 키틴올리고머를 생산하기 위해서는 산분해법보다 효소적 분해법이 더 유용한 것으로 생각되고 있다. 효소적 분해법의 경우 단당류나 이당류를 생성하는 exo-chitinase보다 endo-chitinase가 키틴올리고머 제조에 효과적일 것으로 생각된다. Chitinase의 또 다른 응용성은 식물병원성 곰팡이의 퇴치에 이용하는 것이다. Chitinase 생성 세균 혹은 곰팡이를 토양에 뿌려 토양 중의 식물병원 곰팡이의 성장 및 발아를 억제함으로써 병발생 빈도를 줄이거나, chitinase 유전자를 식물에 도입함으로써 내진균성 식물을 만들 수 있을 것으로 생각된다. 이 경우 곰팡이의 세포벽을 효과적으로 분해하기 위해서는 exo-형보다 endo-형의 chitinase가 효과적인 것으로 보고되고 있다. 따라서 chitinase의 이러한 응용성을 생각할 때 endo-chitinase의 개발이 중요한 것으로 생각된다.

2. Chitin 분해특성에 따른 chitinase의 분류

Harman 등은 Enzyme Nomenclature에 기초하여 촉매반응에 따라 chitinase를 명명하였다. Enzyme Nomenclature에서는 chitin분해와 관련하여 i) chitinase(EC 3.2.1.14)는 chitin을 무작위로 절단하는 효소로 정의하고 있으며, ii) N-acetyl- β -glucosaminidase(EC 3.2.1.20)는 chitobiose 혹은 그 이상의 길이를 가진 chitin기질을 이용하여 비환원 말단으로부터 N-acetyl- β -glucosamine을 생산하는 효소로 각각 정의하고 있다. 실제 생물체가 생산하는 chitin 분해효소는 절단 특성상 위의 2가지로 정의하기 어렵고 또 구별이 모호한 것들이 많아 Harman 등은 다음과 같은 용어의 정의를 제시하였다. 즉, i) chitinolytic enzyme은 chitin분해에 관계하는 모든 효소를 통칭하는 이름으로, ii) endo-chitinase는 chitin을 무작위로 절단하는 효소로서, iii) N-acetyl- β -glucosaminidase는 chitin의 비환원 말단으로부터 N-acetyl- β -glucosamine을 생성하는 효소로서, iv) chitobiosidase는 chitin의 비환원 말단으로부터 N, N'-diacetyl chitobiose(dimeric unit)를 생성하는 효소로서 각각 정의하였다. 종래에 사용되던 chitobiase는 dimer인 N, N'-diacetyl chitobiose를 기질로 이용하여 monomer인 N-acetyl- β -glucosamine을 생성하는 효소로 정의되어 왔으나 Harman 등의 정의에 따르면 N-acetyl- β -glucosaminidase에 포함된다고 볼 수 있다. 그러나 chitobiase가 dimeric unit에 높은 특이성을 보이는 효소로 통용되고 있으며, N-acetyl- β -glucosaminidase는 dimeric unit이상의 chitin으로부터 비환원 말단에서 N-acetyl- β -glucosamine을 생성

하는 효소로 사용되기 때문에 이 두 효소를 구별하여 사용하는 것이 옳다고 생각된다. 따라서 우리는 chitin분해와 관련된 효소를 chitinolytic enzyme, endo-chitinase, N-acetyl- β -glucosaminidase, chitobiosidase, chitobiase 등과 같이 5개로 구별하여 부르려고 한다. 여기서 N-acetyl- β -glucosaminidase, chitobiosidase, chitobiase는 exo-형 chitinase로 분류된다. 여기서 한가지 중요한 문제는 이들 효소의 활성을 어떻게 구별하여 측정하는가 하는 것이다. 이 문제에 대하여 Tronsmo와 Harman은 artificial substrate인 p-nitrophenyl-oligosaccharide의 사용을 제안하였다. N-acetyl- β -glucosaminidase의 경우 p-nitrophenyl- β -D-N-acetyl glucosaminide (dimer기질로 인식됨)를 기질로 사용하여 p-nitrophenol group의 방출을 측정하였고, chitobiosidase의 경우 p-nitrophenyl- β -D-N, N'-diacetylglucosaminide (trimer기질로 작용)를 기질로 사용하여 p-nitrophenol group의 방출을 측정하였으며, endo-chitinase는 colloidal chitin을 기질로 사용하며 510nm에서 흡수도를 측정하여 탁도의 감소로서 효소 활성으로 나타내었다. 이 경우 i) N-acetyl- β -glucosaminidase는 chitobiase와의 구별이 안되고, ii) trimer unit을 기질로 사용하는 경우 endo-chitinase와 chitobiosidase가 모두 작용할 수 있어 이들의 구별이 어려운 문제점이 있다. 일반적으로 탄수화물 분해 효소들이 기질의 길이에 대한 특이성이 낮기 때문에 효소의 종류를 명확히 구분하여 명명하고 assay하는 것은 매우 어려운 것으로 보인다.

3. 미생물의 endo-chitinase

지금까지 대부분의 endo-chitinase는 식물과 동물에서 주로 발견되고 연구되어 왔다. 반면에 미생물에서는 exo-chitinase가 많이 보고되었다. 특히 세균유래의 chitinase 경우 대부분이 exo-chitinase인 것으로 나타났다. 지금까지 세균에서 분리된 endo-chitinase는 *Streptomyces* sp.의 것과 *Enterobacter agglomerans*의 것이 보고되었을 뿐이다. 곰팡이 유래의 endo-chitinase는 *Trichoderma harzianum*에 대한 연구가 가장 많이 진전되었다. 지금까지 보고된 endo-chitinase를 소개하면 다음과 같다.

가. *Streptomyces* spp.

Chitin은 *Streptomyces* 종에게 있어 좋은 질소, 탄소원이며 항진균성 세균으로 분리되어 활발히 연구되어 왔다. Phillips 등은 *Streptomyces plicatus*의 63kDa chitinase유전자를 클로닝하였으며, 순수분리된 63kDa chitinase는 인공기질인 4-methylumbelliferyl(4-MU)-(GlcNAc)₂와 4-MU-(GlcNAc)₃를 기질로 사용하였을 때 4-MU-(GlcNAc)₂보다 4-MU-(GlcNAc)₃로부터 4-MU를 생성하는 속도가 상대적으로 높아 endo-chitinase일 것으로 추정하였다. 그러나 (4-MU)-(GlcNAc)₂도 상당한 속도로 분해하여 4-MU와 (GlcNAc)₂를 생성하므로 chitin을 비환원 말단에서 (GlcNAc)₂단위로 자르는 exo-chitinase일 가능성을 배제할 수 없었다. *S. plicatus*에서는 분자량 47kDa, 49kDa, 61kDa, 63kDa의 4종의

chitinase가 존재하는 것으로 보고되었으나 더 이상의 효소적 연구나 분자생물학적 연구가 진행되지 않았다.

나. *Enterobacter agglomerans*

Leonid 등은 pythium속에 의해 발병되는 오이와 완두콩의 모잘록병에 길항미생물인 *Enterobacter agglomerans*로부터 endo-chitinase의 존재를 확인하였다. 이들은 키틴올리고머에 4-MU group이 β -1,4 결합으로 연결된 substrate analogue를 이용하여 chitinase의 종류를 구분하였다. *E. agglomerans*로부터 분리된 89kDa, 67kDa chitinase들의 경우 4-MU-(GlcNAc), 4-MU(GlcNAc)₂ 등의 기질로부터 4-MU를 절단하였으며, 59kDa chitinase는 4-MU-(GlcNAc)₂, 4-MU-(GlcNAc)₃ 기질로부터 4-MU를 방출하였으며, 50kDa chitinase는 4-MU-(GlcNAc)₃에서만 4-MU를 방출하였다. 이 결과로부터 89kDa 과 67kDa chitinases는 N-acetyl- β -D-glucosaminidase, 50kDa chitinase는 chitobiosidase, 그리고 59kDa chitinase는 endo-chitinase로 각각 분류하였다.

다. *Trichoderma* spp

미생물 chitinase에 의한 antifungal activity는 주로 *Trichoderma* spp.를 대상으로 연구되었다(23, 24). *Trichoderma* spp.는 세포벽 분해에 관련된 polysaccharide lyases, protease, lipase 등의 효소를 생성하는 곰팡이로 알려져 있으며, 이중에서 세포벽 구성물질인 chitin을 분해하는 chitinase

가 진균병원성 조절에 가장 중요한 것으로 보고되었다. Cruz 등은 *T. harzianum* CECT 2413을 chitin을 유일한 탄소원으로 하는 최소배지에서 배양하여 세종류의 chitinase를 순수분리하였다. 각각의 분자량은 42kDa, 37kDa, 33kDa이었으며, 이 세종류의 chitinase들은 endo-chitinase활성을 나타내면서 각각 다른 kinetic 특성을 나타내었다. Harman 등은 *T. harzianum*으로부터 endo-chitinase를 순수분리하고 이 endo-chitinase가 antifungal activity에 중요한 작용을 하는 것으로 보고하였다. 또 이들 연구그룹은 *T. harzianum*과 비슷한 mycoparasite인 *Gliocladium virens*의 endo-chitinase를 분리하여 antifungal activity가 있음을 밝혔다. 특히 이 endo-chitinase는 *G. virens*가 생산하는 gliotoxin의 antifungal activity에 상승효과를 주는 것으로 밝혀졌다. Hayes 등은 *T. harzianum* strain P1으로부터 42kDa의 endo-chitinase유전자를 클로닝하고 그 염기서열을 분석하였다. 그 결과 *Serratia marcescens*, *Bacillus circulans*, *S. plicatus*, *Vibrio parahemolyticus*, *Kluyveromyces lactis*등 세균과 곰팡이의 chitinase들과 유사하였지만 식물과 효모의 chitinase들과의 유사성이 낮았다. Carsolio 등은 *T. harzianum* IMI 206040로부터 42kDa endo-chitinase를 클로닝하고 대장균에서의 발현을 연구하였다. 재조합 대장균에서 발현된 endo-chitinase는 *in vitro*에서 *Botrytis cinerea*의 세포벽을 분해하였으며 chitin이 함유된 cell wall을 첨가하면 활성이 유도됨을 알 수 있었다. 또한

Draborg 등은 *T. harzianum*의 endo-chitinase를 효모에서 발현시켜 active한 형태의 효소를 배지중으로 분비시켰다. 효모에서 발현되는 44kDa endo-chitinase는 곰팡이와 세균성 chitinase와 아미노산서열이 유사하였으며 *B. circulans*의 polyclonal antibody와 cross-reaction을 일으켰다. *T. harzianum*의 endo-chitinase 유전자를 *T. reesei*의 cellulase 유전자 promoter하에 연결하여 endo-chitinase를 생산하지 못하는 *T. reesei*에서 발현시켰다. 이 경우 *T. harzianum*의 endo-chitinase와 특성이 동일하였으며 20배 정도 대량발현시킬 수 있었다.

제 2 장 재료 및 방법

제 1 절 재료 및 시약

N-Acetylchitooligosaccharides(GlcNAc 2-6)는 Seikagaku, chitooligosaccharides (GlcN 2-7)는 Wako에서 구입하여 사용하였다. N-acetylglucosamine·HCl 과 Glucosamine·HCl은 Sigma사의 제품을 사용하였다. Carbohydrate column은 waters, TSK-GEL NH2-60 column과 CM-Toyopearl column은 Tosoh, Superose 12HR column은 Pharmacia에서 구입하여 사용하였다. Yeast extract, typtone등 미생물 배지 성분은 Difco에서 구입하였다. Silica gel plate(Kieselgel 60 F254)는 Merck의 것을 사용하였으며 그 외 시약은 특급시약을 사용하였다.

제 2 절 실험 방법

1. Endo-chitinase 생산 세균의 스크리닝

남해안 지역에서 수집한 300여종의 시료로부터 endo-chitinase 활성을 가지는 세균을 분리하기 위해 0.5%(w/v) 키틴을 유일한 탄소원으로 포함하고 있는 기본배지와 여기에 1%(w/v)의 glucose를 첨가한 MCG 배지를 사용하였다. MC배지의 조성은 Na₂HPO₄·7H₂O 1.28%, KH₂PO₄ 0.3%, NaCl 0.05%, (NH₄)₂SO₄ 0.1%, yeast nitrogen base(Difco) 0.67%, swollen chitin 0.5% (pH 6.8)이었

다.

수집한 시료 약 1g을 30ml 멸균증류수에 현탁시킨 후 40C에서 밤새 정치시킨 후 상등액을 적절히 희석하여 MC 혹은 MCG배지에 평판도말하였다. 30℃에서 배양하면서 키틴분해환을 비교적 빨리 형성시키는 것과 분해환의 크기가 상대적으로 큰 균주를 1차적으로 선발하였다. 1차로 선발된 균주를 LB 액체배지에 접종하여 종배양한 후 MCG와 MC 액체배지에서 진탕배양하여 endo-chitinase 활성을 측정하여 endo-chitinase활성이 높은 균주들을 최종적으로 선발하였다.

2. 내열성 chitinase 생산 세균의 스크리닝

내열성 chitinase 생산 미생물의 선발을 위해서는 전국에서 채취한 다양한 시료 1g을 MCT 액체배지 50ml(pH 6.8)에 접종하고 60℃에서 1 주일간 진탕배양하였다. 이때 MCT배지의 조성은 Na₂HPO₄·7H₂O 1.28%, KH₂PO₄ 0.3%, NaCl 0.05%, (NH₄)₂SO₄ 0.1%, yeast nitrogen base(Difco) 0.67%, peptone 1%, swollen chitin 0.5% 이었다. 1 주일 배양 후 적당량을 MCT agar plate에 평판도말하고 55℃에서 2일간 배양하였다. MCT agar plate 상에 자라 나온 콜로니를 1차로 분리하여 보관하였다. 1차 분리균주를 MCT 배지에 접종하여 60℃에서 4-7일간 진탕배양한 후 상등액의 키틴 분해활성을 측정하여 키틴 분해활성이 높은 균주를 선발하였다.

3. 키틴 분해 곰팡이 스크리닝

채집한 시료의 정치 상등액을 항생배지에 적절히 희석 평판도 말하여 투명환을 형성하는 30여종의 곰팡이균주를 1차로 분리하였고 분리된 균주들을 배양조건 (colloidal chitin 농도, 온도, 다른 탄소원 첨가)을 달리하여 배양하면서 chitinase activity를 비교하였다.

4. 분리균주의 보관

키틴, 키토산 분해 미생물은 agar plate에서 콜로니를 형성시켜 2차로 agar plate에 도말하여 완전히 분리된 single 콜로니를 얻었다. 이 콜로니를 LB test tube(5ml)에 접종하여 30℃에서 밤새 배양한 후 15%로 glycerol에 현탁시킨 후 -70℃에 보관하였다. 이렇게 보관된 균주는 키틴, 키토산 조효소를 얻기 위한 균주로 사용되었다.

5. 분리균주 GM13의 동정

Endo-chitinase 활성이 높은 분리균주 GM13을 동정하기 위해 형태적, 생화학적 특성과 탄소이용성을 조사하였다. 생화학적 특성과 탄소이용성은 API kit (Analytab Products, Plainview, USA)를 사용하여 조사하였다. 시험결과를 Bergey's manual of systematic bacteriology에 따라 분리균주를 동정하였다.

6. Chitinase 효소활성 측정

Chitinase의 활성은 DNS 환원당 정량법을 이용한 total

chitinolytic activity 측정과 탁도감소법을 이용한 endo-chitinase 활성을 측정하였다.

가. DNS법에 의한 chitinase 활성측정

Chitinase 활성측정은 배양상등액 300 μ l와 키틴 기질 300 μ l (2% swollen chitin in 50mM sodium phosphate buffer (pH 6.8))를 섞고 50 $^{\circ}$ C에서 (내열성 효소의 활성을 측정할 경우에는 75 $^{\circ}$ C)에서 30분간 반응한 후 원심분리하여 상등액의 환원당을 측정하였다. DNS 1ml에 상등액 300 μ l를 첨가하여 5분간 끓여서 발색시킨 후 550nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 N-acetylglucosamine을 사용하여 제작한 표준곡선으로부터 환원당량을 정하였다. Chitinase 1 단위(U)는 위와 동일한 조건에서 1시간동안 1 μ mole의 N-acetylglucosamine을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

나. 탁도감소법에 의한 endo-chitinase 활성측정

탁도감소에 의한 endo-chitinase 활성측정은 0.02% swollen chitin(in 50mM sodium phosphate buffer (pH 6.8))125 μ l, 증류수 250 μ l와 chitinase 125 μ l를 섞고 50 $^{\circ}$ C에서 반응시키면서 시간에 따른 탁도감소를 흡광도 510nm에서 측정하였다. 이때 endo-chitinase 1단위(U)는 위와 동일한 실험 조건에서 분당 탁도 0.1을 감소시키는 효소의 양으로 정의하였다.

7. 키틴에 의한 chitinase 유도성 조사

GM13으로부터 생산되는 endo-chitinase의 chitin 유도성과 glucose에 의한 catabolite repression을 조사하였다. GM13균주를 다른 MC, MCG, MG broth에 각각 접종하고 30℃에서 진탕배양하면서 12시간 간격으로 시료를 분취하였다. 시료를 원심분리하여 균체를 제거한 후 상등액의 단백질량, chitinolytic 활성, endo-chitinase 활성을 측정하였다. 이때 MG 배지는 MCG배지에서 swollen chitin 대신에 1% glucose가 유일한 탄소원으로 첨가된 배지이며, MC배지는 MCG배지에서 glucose를 제외하고 0.5% swollen chitin을 유일한 탄소원으로 첨가한 배지이다.

8. 키틴 분해산물의 분석

배양상등액과 2% swollen chitin을 50℃에서 밤새 반응시켰다. 반응 후 원심분리하여 잔여기질(키틴)을 버리고 상등액은 speed vaccum centrifuge로 농축시킨 후 박층크로마토그래피와 HPLC방법으로 분석하였다.

가. 박층크로마토그래피(TLC)에 의한 반응산물 분석

Chitinase에 의한 키틴반응산물을 TLC방법으로 분석하였다. 반응산물을 TLC에 spotting하고 Isoamyl alcohol: ethanol: ammonia: water(50:60:1:30)의 용매로 반응산물을 전개시킨 뒤 완전히 말렸다. 말린 TLC 표면에 50% 황산(H₂SO₄/Ethanol, 1/1)을 분무하여 120℃에서 10분간 발색시켰다. TLC plate는 silica

gel plate(Kieselgel 60 F254, Merck, Germany)를 사용하였다.

나. HPLC에 의한 반응산물 분석

Chitinase에 의해서 생성된 반응산물을 정량적으로 분석하기 위해 HPLC를 사용하였다. 80% acetonitrile을 mobile phase로 사용하였고, 시료를 Carbohydrate column(Waters)에 injection 하여 분리하고 eluant 속의 당은 210nm에서 detection하였다.

9. Swollen chitin 제조

Monreal의 방법에 따라 swollen chitin을 제조하였다. Crab shell chitin(practical grade, Sigma) 10g에 85% phosphoric acid 50ml를 첨가하고 잘 섞은 후 상온에서 하룻밤 방치하여 팽화시켰다. 팽화된 chitin에 증류수 500ml를 첨가한 뒤 Waring blender로 균질화시켰다. 균질화된 swollen chitin을 sintered-glass funnel에서 증류수로 여러 번 세척하여 pH를 5.0 부근으로 올린 다음 1N NaOH를 사용하여 pH를 7.0으로 조정하였다. Swollen chitin에 0.02% sodium azide를 첨가하여 40C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

10. Chitinase의 클로닝

GM44의 chromosomal DNA를 Sau3AI으로 부분분해시킨 다음 pUC19/BamHI/CIP 벡터와 ligation시켜 *Echerichia coli* JM83으로 transformation시켰다. *E. coli* transformants를 LB/Ap/swollen

chitin plate로 tooth-picking 방법으로 옮긴 다음 37℃에 incubation하면서 swollen chitin의 분해력을 조사하였다.

제 3 장 결과 및 고찰

제1절 키틴 분해 효소 생산 미생물의 분리 및 선발

1. Endo-chitinase 생산 세균 스크리닝

각 지역에서 수집한 300여 점의 시료들을 MCG 한천배지에 평판 도말하고 30°C에서 배양했을 때 보통 1주일 정도 경과된 후 즉, 포도당이 탄소원으로 이용되어 완전히 고갈된 뒤에 투명환을 형성시키나 20여종은 3-4일 정도로 비교적 빨리 투명환(clear halo)을 형성시켜서 1차적으로 10여종을 분리하였다. 1차 분리된 균주들을 MCG액체배지에 접종하여 30°C에서 2일간 진탕배양한 후 7,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 균체와 잔여 chitin을 제거하고 상등액을 모았다. 상등액은 DNS 환원당 활성과 endo-chitinase 활성을 각각 측정하였고 2% swollen chitin과 50°C에서 하룻밤 반응시켜 반응산물을 TLC로 분석하였다(Table 1). 그 결과 endo-chitinase 활성을 가지는 균주를 1종 발견하였다. 이 균주는 MCG 한천배지에서 3일만에 투명환을 형성시키는 균주로써 GM13으로 명명하였다. 환원당 생성 활성을 동일하게 하여 탁도감소법으로 배양상등액의 활성을 측정한 결과 초기 탁도 2.5에서 GM13 균주의 배양상등액을 반응할 시에는 30분 경과 후 0.3정도로 감소하며 1시간 후에는 탁도를 거의 관찰할 수 없었으나 대부분의 분리균주들과 기존에 chitinase 활성이 높은 것으로 알려진 *Serratia marcescens*, *S. liquefaciens*의 배양상등액을 반응시에는 탁도를 거의 감소시키지

못하였다(Table 2, Fig. 1). 동일한 환원당을 생산하는 효소의 양을 처리시에도 다른 효소들과는 달리 기질의 탁도가 현저히 줄어들었으며, 이것은 GM13의 chitinase가 endo-type으로 기질을 분해하기 때문인 것으로 생각되었다. 따라서 endo-chitinase 활성이 가장 높은 GM13 균주를 최종적으로 선택하여 올리고머 생산을 조사하였다.

Table 1. Chitinase activity and degradation products the isolates.

Isolates	Time	Activity(Δ Abs. 550nm)		Degradation products
		MCG	MC	
GM13	2 d	0.19054	0.37875	NAG2-NAG7
GM2	2 d	0.02388	0.0172	NAG1, NAG2
GM4	2 d	N. D.	N. D.	NAG1
GM6	2 d	0.24515	0.44986	NAG1-NAG3
GM7	2 d	0.51195	0.71643	NAG1-NAG3
GM9	1 d	0.01772	0.19235	NAG1-NAG2
GM10	1 d	0.01913	0.14581	NAG1-NAG3
GM14	1 d	N. D.	0.01419	NAG1-NAG3
GM20	2 d	0.43182	N. D.	NAG1, NAG2
GM21	2 d	0.38635	N. D.	NAG1, NAG2
GM27	2 d	0.43422	N. D.	NAG1, NAG2

N. D. : Not detectable

Table 2. Decrease of turbidity of chitin suspension by endo-chitinase of the isolates.

Sample	Turbidity (Abs. 510nm) after 30min reaction
Control	2.4631
GM13	0.2789
No.1	2.1190
No.2	2.0965
No.50	2.2018
No.50B	2.1190
<i>S. marcescens</i>	2.1243
<i>S. liquefaciens</i>	1.9845

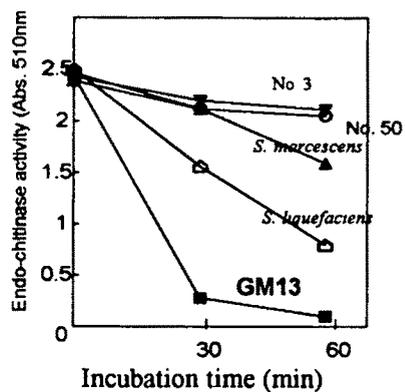


Fig. 1. Endo-chitinase activities of the culture supernatants of various bacterial isolates.

2. 내열성 chitinase 생산 세균 스크리닝

채집한 시료 약 1g을 MCT 배지에 첨가하고 60℃에서 1주일간 배양하면서 내열성 미생물을 enrichment하고 MCT agar plate에 적당량을 평판도말 하였다. 도말한 plate를 60℃에서 배양하여 50여종의 내열성 미생물을 분리하였다. 분리된 내열성 미생물들의 키틴분해환 생성여부를 조사한 결과 2일 배양 동안 균체성장은 매우 빠르나 키틴 분해환을 형성하는 미생물은 찾을 수가 없었다. 따라서 키틴분해환을 형성하지는 못하나 성장이 잘되는 내열성 미생물을 MCT배지에서 4-7일간 진탕배양하였다. 그 결과 진탕배양 동안 키틴을 잘 분해하지 못하였으나 chitinase 활성을 조사해본 결과 10여 종의 세균은 환원당을 생성함을 알 수 있었다. 이런 내열성 미생물들의 chitinase 활성과 키틴분해 산물은 Table 3에 나타내었다.

Table 3. Chitinase activity and degradation products of thermostable endo-chitinase

Isolates	Time	Activity (Abs. 550nm)	Degradation products
3B	3 d	1.1542	NAG2
8A	3 d	1.2797	NAG2
4A	3 d	1.0597	NAG2
2B	3 d	1.7189	NAG2
8B라	3 d	0.3842	NAG2
2B마	3 d	0.2393	NAG2 NAG3
2B다	3 d	0.2469	NAG2
2가	3 d	0	NAG1
8A가	3 d	0.0797	NAG1
2나	3 d	0.3223	NAG2 NAG3
3B	3 d	0.1589	NAG2

3. Chitinase 생산 곰팡이의 스크리닝

키틴 분해 곰팡이 탐색 결과 30 여 주의 곰팡이를 1차로 분리하고, chitinase 활성이 가장 우수한 2 주를 선발하였다. 그러나, 분해 산물 분석 결과 주로 2당체를 생산하여 키틴 올리고머 생산에 이용될 만한 균주를 찾지 못하였다.

제2절 선발균주 GM13가 생산하는 chitinase의 특성

1. 분리균주 GM13의 동정

Endo-chitinase 활성이 높은 분리균주 GM13을 동정하기 위해 형태적, 생화학적 특성 및 탄소원 이용성을 조사하였다. Fig. 2 과 Table 4에서 보는 바와 같이 분리균주 GM13은 그람 양성 세균으로서 flagella를 가지고 있어 이동성을 보였다. GM13의 형태는 구형, 단간상형, 장간상형 등 다양한 모양을 갖는 변형균(variable)으로 나타났다. 이러한 형태적 특성과 생화학적 특성 및 탄소원 자화성을 고려해 볼 때 분리균주 GM13은 *Arthrobacter* 속에 속하는 것으로 생각되었다. GM13 균주의 정확한 분류에는 더 많은 분류학적 연구가 필요할 것으로 생각되나 본 연구에서는 잠정적으로 분리균주 GM13을 *Arthrobacter* sp. GM13으로 명명하고 실험에 사용하였다.



TEM (x40,000)



Negative stain (x17,000)

Fig.2. Electronmicrograph (TEM) of selected strain *Arthrobacter* sp. GM13

Table 4. Morphological and physiological characteristics of GM13.

Test	Result
Cell shape	Rod, cocci and variables
Gram stain	+
Motility	+
Biochemical test	
β -Galactosidase	+
Urease	-
Arginine dihydrolase	-
Ornithine decarboxylase	-
Esculine hydrolase	+
Arginine arylamidase	+
Pyrrolidonyl arylamidase	-
Catalase	+
Oxidase	+
β -Glucuronidase	-
Carbon source assimilation	
Glucose, fructose, mannose,	+
Maltose, mannitol, saccharose,	+
N-Acetyl-glucosamine	+
Lactose, trehalose, raffinose	-
Cellobiose, arabinose, ribose	-

+ : Positive response, - : negative response.

2. GM 13의 chitinase 생산 특성

가. Swollen chitin에 의한 chitinase의 유도

Arthrobacter sp. GM13 균주를 MC, MCG, MG배지에 접종하고 12시간 간격으로 시료를 채집하여 배양상등액의 효소활성을 측정하였다. 그 결과 MC배지에서 chitinolytic 활성과 endo-chitinase 활성은 접종 후 점차적으로 증가되어 36시간째 각각 13U/ml, 2.24U/ml을 보였다. 반면에 MG배지의 경우 36시간 배양 후 4.4U/ml, 0.0U/ml로 나타났고 MCG배지의 경우 각각 12U/ml, 1.28U/ml으로 나타났다. 이 결과로부터 *Arthrobacter* sp. GM13 균주의 chitinase는 chitin에 의해 chitinase 생산이 유도되며 glucose에 의해서 catabolite repression을 받는다는 것을 알 수 있었다. 또한 MG배지에서 glucose가 완전히 고갈된 36시간 이후의 배양에서 4.4U/ml의 chitinolytic 활성을 나타내었다. 이러한 결과는 chitin 유도성과는 독립적으로 glucose가 존재하지 않으면 일부의 chitinase가 생산된다는 것을 시사하였다.

나. *Arthrobacter* sp. GM13의 chitinase 생산 특성

Arthrobacter sp. GM13을 MC 액체배지에서 배양하면서 배양 시간에 따른 세포외 단백질의 생성, chitinolytic 활성 및 endo-chitinase 활성의 변화를 조사하였다(Fig. 3). Chitinolytic 활성의 경우 54시간째 최대를 보였으며 endo-chitinase 활성은 48시간째 최대를 보였다. 세포외 단백질의 경우 36시간까지 점차적으로 증가되어 42시간째에 최대의 양으로 생산되어 이후에는 더 이상 단백질량이 증가하지 않았다.

Chitinolytic 활성에 대한 endo-chitinase 활성의 비를 조사하면 42시간째에 최고가 됨을 알 수 있었다. 이 결과로 볼때 endo-chitinase는 다른 exo-chitinase에 비해서 chitin 분해초기에 다량 생산된다는 것을 알 수 있었다.

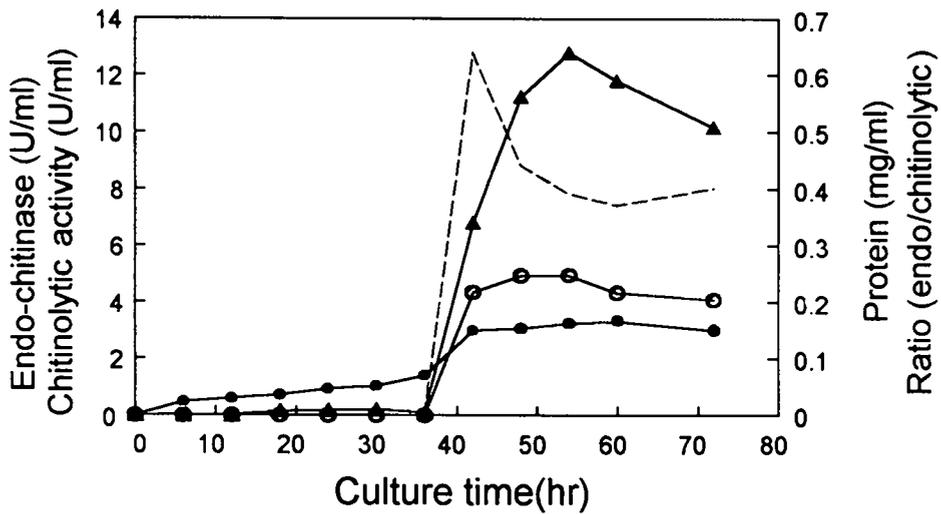


Fig. 3. The changes of chitinolytic and endo-chitinase activity during the culture of *Arthrobacter* sp. GM13 in MC broth at 30°C, 150rpm.

Chitinolytic activity (▲), Endo-chitinase activity (○), Protein (●), Ratio(endo/ chitinolytic, ---)

제 3 절 *Arthrobacter* sp. GM13이 생산하는 chitinase의 순수분리

1. *Arthrobacter* sp. GM13 chitinase의 정제

분리균주 *Arthrobacter* sp. GM13을 MC 액체배지(pH 6.8)에 접종하고 30℃, 150rpm 조건하에서 42시간 진탕배양하였다. 배양 후 배양액을 6,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 균체와 잔여 chitin을 제거하고 배양상등액을 얻어 동결건조기로 농축시켜 조효소로 사용하였다. 이때 약 90% 정도의 효소활성이 회수되었다. 동결건조에 의해 완전히 농축된 배양상등액을 10mM sodium phosphate (pH 6.8) 완충용액 100ml에 녹인 후 ammonium sulfate를 1M 되게 녹인 다음 10,000rpm에서 15분간 원심분리하여 녹지 않은 잔여물을 제거한 후 이미 1M ammonium sulfate가 첨가된 10mM sodium phosphate buffer (pH 6.8)로 평형화된 phenyl-Toyopearl column에 loading하여 분리하였다(Fig. 4). Ammonium sulfate gradient로 용출하는 경우 0.2M과 0M ammonium sulfate 농도에서 세 peaks를 보였다. 첫 번째 peak(Set I)의 경우 chitinolytic 활성만을 가지고 있었으며 두 번째 peak(Set II)의 경우 chitinolytic 활성과 낮은 endo-chitinase 활성을 보였다. 그러나 세 번째 peak(Set III)의 경우 앞의 두 peak보다 높은 endo-chitinase 활성을 보였다. 이상의 분리과정을 정리하면 Table 5과 같았다. 10mM sodium phosphate 완충용액으로 용출된 Set III chitinase는 SDS-PAGE 결과, 65kDa 단백질이 순수분리되었음을 알 수 있었으며 탁도감소, swollen chitin 분해산물분석, 4-MU-chitooligosaccharides 분해

력 시험결과 endo-chitinase라는 것을 알 수 있었다.

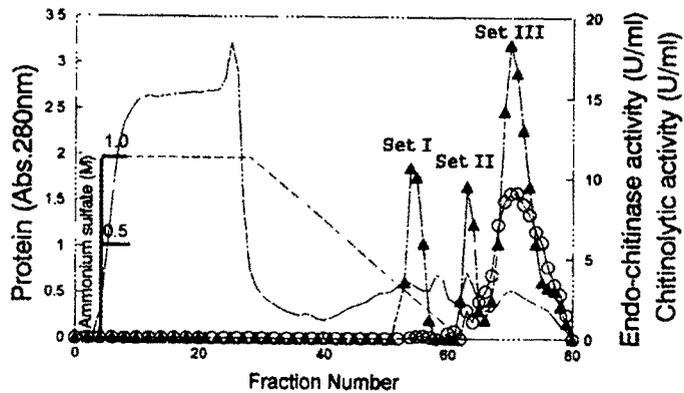


Fig. 4. Purification of *Arthrobacter* sp. GM13 chitinase by phenyl-Toyopearl column chromatography. Fractions showing chitinase activity were pooled into set I, set II and Set III. Chitinolytic activity, ▲-▲; endo-chitinase activity, ○-○; protein(Abs. 280nm), ■-■; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gradient,

Table5. Summary of the purification steps

Purification step	Tot. Protein (mg)	Chitinolytic activity			Endo-chitinase activity		
		Tot. act. (U/ml)	Sp. act. (U/mg)	Yield (%)	Tot. act. (U/ml)	Sp. act. (U/mg)	Yield (%)
Culture supernatant	42.49	2918.7	68.7	100	1739	40.9	100
Lyophilization	41.67	2367	56.8	81	1572	37.7	90
Phenyl-Toyopearl							
Set I	3.4	123.7	36.4	4.2	0	0	0
Set II	1.6	107.7	67.1	3.7	19.6	12.2	1.1
Set III	4.46	416.6	93.5	14.3	755.2	169.4	43.4

2. *Arthrobacter* sp. GM13으로 분리된 Set I, Set II, Set III chitinase의 비교

가. SDS-PAGE

Phenyl-column으로 분리된 세 종류의 chitinase peaks를 전기영동한 후 coomassie blue 염색과 활성염색방법으로 분석하였다 (Fig. 5 (A), (B)).

배양 상등액의 경우 활성염색 결과 65kDa, 50kDa, 37kDa, 33kDa, 20kDa의 5가지 chitinases 활성 band를 보여 *Arthrobacter* sp. GM13은 적어도 5종의 chitinase가 생산된다는 것을 알 수 있었다. Set III의 경우 coomassie 염색과 활성염색 결과 65kDa chitinase가 순수분리되었음을 알 수 있었다. Endo-chitinase활성이 없는 Set I의 경우 50kDa, 37kDa, 33kDa, 20kDa의 chitinase band는 발견되었으나 Set III의 65kDa

chitinase는 발견되지 않았다. 이러한 결과로 볼 때 65kDa를 제외한 4종류의 chitinase 만으로는 endo-chitinase 활성을 나타낼 수 없는 exo-chitinase로 생각되었다. Chitinolytic 활성과 함께 낮은 endo-chitinase 활성이 검출되었던 Set III의 경우 5종의 chitinase가 모두 발견되었다.

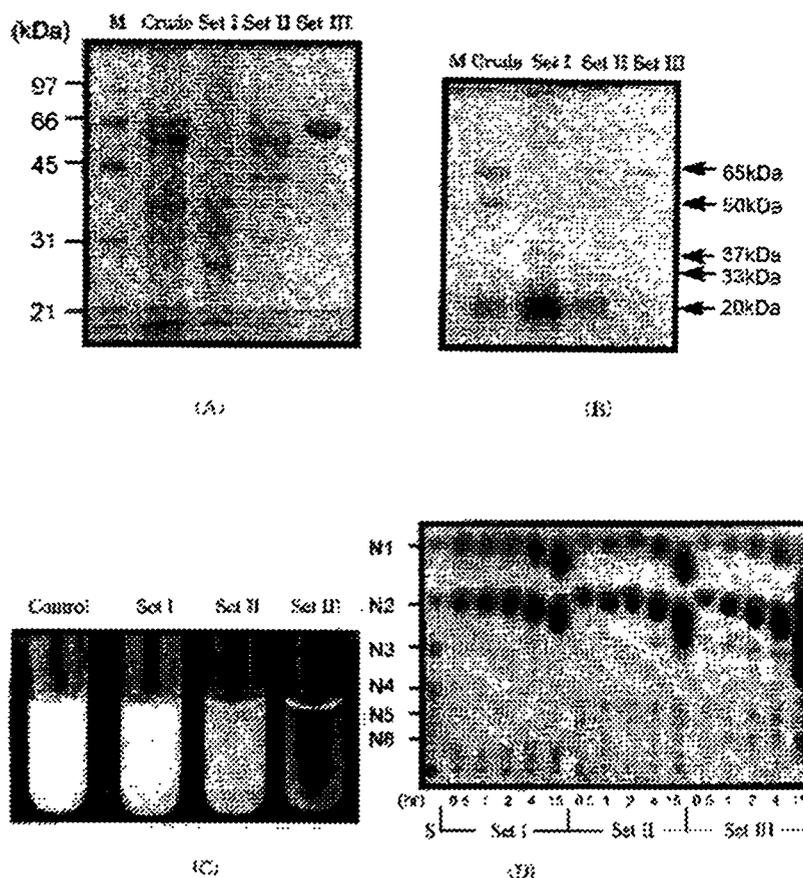


Fig. 5. Comparison of chitinases Set I, Set II, Set III eluted from phenyl-Toyopearl column chromatography.

(A) SDS-PAGE gel stained with Coomassie brilliant blue R-250. Lanes: 1, standard marker proteins; 2, crude enzyme of culture supernatant(40 μ g); 3, chitinase Set I (30 μ g); 4, chitinase Set II (20 μ g); 5, chitinase Set III (5 μ g). (B) SDS-PAGE gel visualized with chitinase activity staining.

Lanes represent the same samples as in (A) but the amount of proteins loaded on gel was reduced as followings: crude enzyme (15 μ g), Set I (14 μ g), Set II (7 μ g), and Set III (4 μ g). (C) Turbidity decrease of reaction mixture by the chitinases. Turbidity decrease was examined by the same method of endo-chitinase assay as described in Materials and Methods. The same amount of chitinase Set I, Set II, and Set III was added to reaction mixture when calculated in chitinolytic activity (10U/ml). (D) Products analysis of the chitinases Set I, Set II, and Set III from swollen chitin. One 5ml of 2% swollen chitin was hydrolyzed by the same amount of chitinolytic activity (10U) of the chitinases Set I, Set II, and Set III at 50°C. After simplify at appropriate time intervals, the reaction products were analyzed by TLC. S represents the standard sugar mixtures of monomer(NAG1), dimer(NAG2), trimer(NAG3), tetramer(NAG4), pentamer(NAG5), and hexamer(NAG6) of N-acetylglucosamine(NAG). Numbers represent reaction time(hr). O.N, overnight reaction.

나. Chitin 분해산물 분석

1mM sodium phosphate (pH 6.8) 완충용액에 현탁된 2% swollen chitin을 phenyl-Toyopearl column을 통과한 Set I,

Set II, Set III chitinase를 동일한 chitinolytic 활성(10U)으로 첨가하여 overnight 반응한 결과 endo-chitinase활성이 없는 Set I은 탁도를 감소시키지 못하였으나 Set III는 기질을 완전히 분해하여 탁도를 감소시켰다(Fig. 5 (C)).

1mM sodium phosphate (pH 6.8) 완충용액에 현탁된 2% swollen chitin을 기질에 동일한 3U total chitinase 활성으로 Set I, Set II, Set III의 효소를 처리하고 시간별로 시료를 채취하였다. 시료를 15,000rpm에서 5분간 원심분리하여 불용해성 물질을 제거하고 상등액을 100°C에서 5분간 열처리하여 효소활성을 없앤 뒤 감압농축시킨 다음 TLC로 분석하였다(Fig. 5(D)). 그 결과 Set III의 경우 dimer의 양이 가장 많고 다음으로 monomer의 양이 많았으며, 소량의 trimer, tetramer, pentamer, hexamer도 관찰되었다. 또한 endo-chitinase 활성을 나타내지 않는 Set I의 경우 Set III에 비해서 trimer 이상의 올리고머가 관찰되지 않았다. 이상의 결과로부터 Set III chitinase는 chitin oligomer를 생산하는 endo-type chitinase임을 알 수 있었다.

제 4 절. 65kDa endo-chitinase의 특성

1. *Serratia liquefaciens* chitinases와의 비교

비교적 endo-chitinase활성이 높은 균주로서 본 연구실에서 분리되어 연구된 *S. liquefaciens* GM1403 균주의 chitinases와 *Arthrobacter* sp. GM13 균주의 65kDa endo-chitinase를 비교하여 보았다 (Fig. 6). *S. liquefaciens* GM1403의 59kDa chitinase와

Arthrobacter sp. GM13의 65kDa endo-chitinase 활성을 비교하기 위해서 동일한 chitinolytic 활성에 대해서 endo-chitinase 활성을 비교하여 보았다. 그 결과 *Arthrobacter* sp. GM13의 65kDa endo-chitinase는 *S. liquefaciens* GM1403의 C59에 비해 6배 이상 높은 endo-chitinase 활성을 가지고 있음을 알 수 있었다.

Serratia liquefaciens GM1403의 C59, C38 들의 antisera를 이용하여 *Arthrobacter* sp. GM13 균주의 65kDa endo-chitinase와의 immuno-blot 실험을 수행하였다. 그 결과 *Arthrobacter* sp. GM13 균주의 65kDa endo-chitinase는 C59-antiserum과 C38-antiserum에 전혀 반응하지 않았다. 이 결과로부터 순수분리한 endo-chitinase C65는 기존에 밝혀진 *S. liquefaciens* chitinases인 C59, C38 과 면역학적 유사성이 없는 효소라는 것을 알 수 있었다.

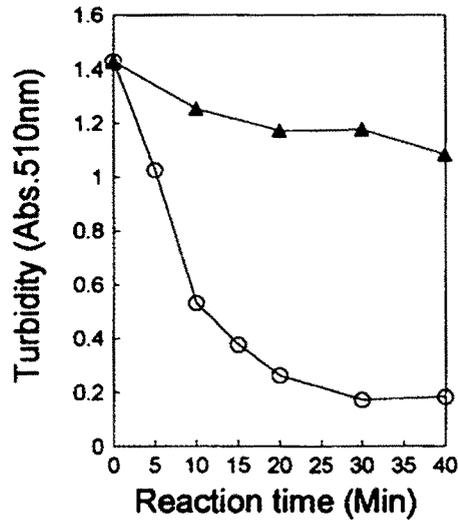


Fig. 6. Comparison of endo-chitinase activity of the purified C₅₉ of *S. liquefaciens* and C₆₅ of *Arthrobacter* sp. GM13. The same amount (1U) of the enzymes was added to reaction mixture when calculated in chitinolytic activity. Symbols: C₆₅, ○-○: C₅₉, ▲-▲. Same of the chitinolytic activity(1U) was added.

2. 온도, pH 및 금속이온의 영향성 조사

가. 온도의 영향

순수분리된 C₆₅의 최적 반응온도를 알아보기 위해서 다양한 온도에서 효소활성을 측정하였다. 효소활성을 측정한 온도 범위는 20°C에서 80°C사이이며 10°C의 간격으로 chitinolytic 활성과 endo-chitinase 활성을 측정하였다(Fig. 7 (A)). 이때 60°C에서 최적활성을 보였다. 열 안정성을 조사하기 위해 기질이 없는 상

태에서 10°C 간격으로 40°C 에서 70°C까지의 온도에서 효소를 정
치시킨 후 효소를 채취하여 잔존하는 endo-chitinase와
chitinolytic 활성을 측정하였다. 그 결과 Fig. 7 (B)에서 보듯
이 50°C 이하의 온도에서 4시간 방치해도 거의 모든 활성이 남
아 있었으나 60°C 이상의 온도에서는 안정성이 급격히 감소하
였다.

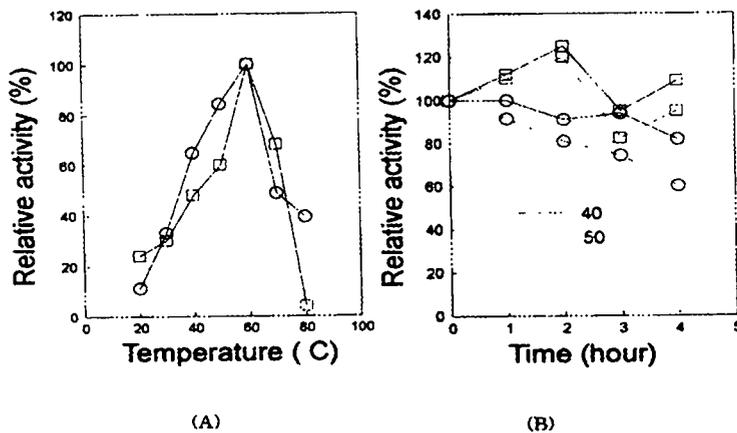


Fig. 7. Effects of temperature on the activity (A) and stability (B) of endo-chitinase of C₆₅ of *Arthrobacter* sp. GM13. To determine the pH stability of the enzyme, the enzyme was incubated in each buffer for 1hr at 37°C and then, the residual activity was measured. C₆₅. Endo-chitinase activity, ○-○: chitinolytic activity, □-□. Buffers used are: 50mM glycine-HCl(pH 2.0-3.0), citric acid-sodium phosphate(pH 3.0-6.0), sodium phosphate(pH 6.0-8.0), tris(pH 8.0-9.0), glycine-NaOH(pH 9.0-11.0), phosphate(pH 11.0-12.0).

나. pH의 영향

분리된 65kDa endo-chitinase의 최적 pH를 알아보기 위하여 50mM glycine-HCl(pH 2.0-3.0), citric acid-sodium phosphate(pH 3.0-6.0), sodium phosphate(pH 6.0-8.0), tris(pH 8.0-9.0), glycine-NaOH(pH 9.0-11.0), phosphate(pH 11.0-12.0) 완충용액을 사용하여 다양한 pH를 가지는 기질을 만들어 효소와 반응시켜 활성을 측정하였다. 또한 효소의 pH안정성을 조사하기 위하여 각 pH별로 제조한 50mM 완충용액에 효소액을 섞은 후 37°C에서 1시간동안 방치한 다음 잔존활성을 측정하였다. 그 결과 Chitinase C₆₅는 endo-chitinase와 chitinolytic 활성 모두 pH 5.0에서 최고활성을 보였으며 endo-chitinase 활성은 pH 4.0에서 8.0 사이에서 80%정도의 활성이 나타났다. 또한 Chitinolytic 활성은 7.0이후에서 20%정도 활성이 낮았다. pH 안정성은 pH 4.0에서 10.0까지의 잔존활성이 50% 정도로 비교적 안정하게 유지 되었다(Fig. 8).

다. 금속 이온의 영향

C₆₅에 대한 금속이온 영향성을 조사하기 위해 다양한 금속이온들과 함께 반응시켜 Somogyi법으로 활성을 측정하였다. 각 금속이온들을 10mM 농도로 만든 뒤 기질과 혼합하여 최종적으로 1mM 농도로 60°C에서 효소와 1시간 반응시킨 후 발색시키고 520nm에서 그 흡광도를 측정한 뒤 Unit으로 환산하여 상대적인

활성을 백분율로 나타내었다. 이때 금속이온이 들어가지 않고 바로 swollen chitin과 반응한 후의 활성을 100%로 하였다. 실험결과 somogyi법에 의한 환원당 활성은 AgNO_3 와 HgCl_2 가 활성을 억제시켜 각각 29, 44%정도의 활성을 나타내었고 AgNO_3 , HgCl_2 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 는 endo-chitinase활성을 완전히 저해하였다(Table. 6).

특히 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 는 환원당 활성은 100% 이상 유지시키나 endo-chitinase활성만을 특이적으로 저해시켰다. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도를 0.01mM에서 0.1mM, 1mM로 각각 증가시키면 endo-chitinase활성은 농도에 비례하여 77%, 57%, 0%의 잔존활성을 나타내었다. 또한 1mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 실온에서 1시간동안 반응시켜 endo-chitinase활성이 완전히 소실된 후 10mM EDTA를 첨가하여 철이온을 chelating시키면 다시 활성이 100% 회복되었다(Fig. 9).

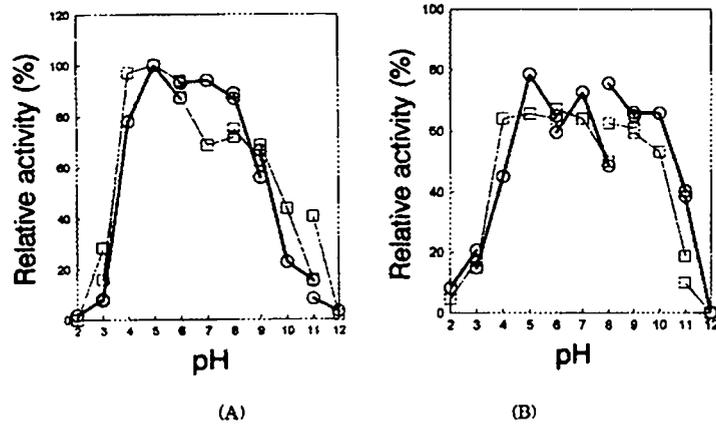


Fig. 8. Effect of pH on the activity (A) and stability (B) of the endo-chitinase C₆₅ of *Arthrobacter* sp. GM13. Endo-chitinase activity, ○-○; chitinolytic activity, □-□.

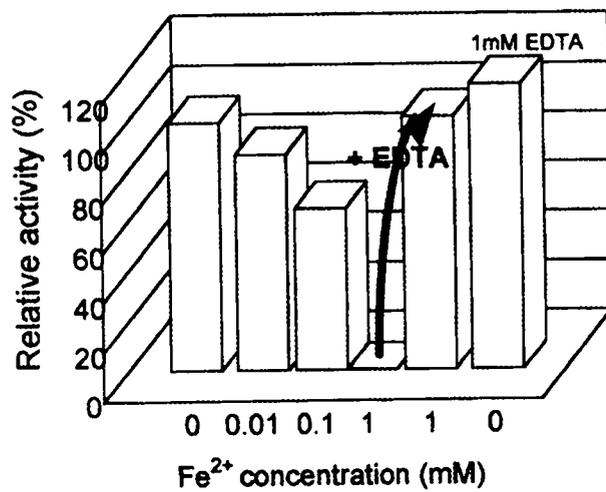


Fig. 9. Effect of Fe²⁺ on the activity of endo-chitinase C₆₅ of *Arthrobacter* sp. GM13

Table 6. Effect of metal ions on the activity of endo-chitinase C₆₅ of *Arthrobacter* sp. GM13.

Metal ions ¹⁾	Chitinolytic Activity	Endo-chitinase Activity
	Relative Activity(%)	Relative Activity(%)
Control	100.0	100.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	80.3	107.3
AgNO ₃	28.7	25
CaCl ₂ ·2H ₂ O	107.6	110
CuSO ₄ ·5H ₂ O	97.4	51.5
ZnSO ₄	96.6	71.6
MnCl ₂ ·4H ₂ O	86.7	117.7
HgCl ₂	43.6	30
NiCl ₂	100.0	100.0
CoCl ₂	86.0	46.2
FeSO ₄ ·7H ₂ O	114.4	0

3. 기질의 특이성

순수분리된 65kDa endo-chitinase의 기질특이성을 조사하기 위해서 다양한 기질에 대한 chitinase활성을 조사하였다. 대상 기질은 purified chitin powder, crab shell chitin, swollen chitin, regenerated chitin, glycol chitin, chitin oligomer, chitosan

이며 각 기질에 효소를 60°C에서 30분간 반응시켜 방출되는 NAG 환원당의 양을 DNS방법에 따라 흡광도 550nm에서 측정하였다. 이때, swollen chitin과 반응 시켰을때의 활성을 100%로 하여 상대적인 활성의 차이를 백분율로 나타내었다. 그러나 각 기질에 대한 탁도감소법에 의한 endo-chitinase활성은 측정할 수 없었다. 실험 결과 soluble한 chitin oligomer들에 대한 반응성이 6배 정도로 높았다. 따라서 이 효소가 endo-chitinase활성이 높음에도 불구하고 대부분 dimer를 생산하는 이유는 생산된 올리고머를 빠른 속도로 dimer로 전환시키며 dimer를 전혀 분해할 수 없기 때문일 것이라 추정되었다(Table 7).

Table 7. Substrate specificity of the endo-chitinase C₆₅ of *Arthrobacter* sp. GM13.

Substrate	Specific activi	Relative activi
	(U/mg)	(%)
Swollen chitin	572.9	100
Crab shell chitin	N. D	N. D
Purified chitin	N. D	N. D
Chitosan	N. D	N. D
Glycol chitin	21.25	3.7
Regenerated chitin	361.1	63.0
N-Acetylchitobiose	N. D	N. D
N-Acetylchitotriose	2985	521.1
N-Acetylchitotetraose	3646	636.4
N-Acetylchitopentaose	3930	686.0
N-Aetylchitohexaose	3733	651.6

4. Chitin oligomer 분해 pattern

C65의 chitin 분해형태를 자세히 조사하고자 구입한 (Seikagaku, Japan) 순수 올리고머를 기질로 사용해서 어떤 product를 생산하는지에 대해 실험하였다. 사용한 기질은 dimer(NAG₂), trimer, tetramer, pentamer, hexamer며 각 기질에 C65를 60°C에서 10분, 30분, 1시간씩 처리한 뒤 100°C에서 5분간 가열하여 효소를 죽인 뒤 TLC에 2차 전개시켰다. 그 결과 dimer는 분해되지 않았고(data not shown) trimer는 dimer와 monomer로, tetramer는 trimer, dimer, monomer로, 그리고 pentamer와 hexamer는 trimer, dimer, monomer로 각각 분해 되었다. 이 실험 결과 올리고머를 이 효소는 trimer단위로 잘라서 대부분 dimer와 monomer로 전환 시킴을 알 수 있었다. 예상과는 달리 tetramer의 형성이 나타나지 않는 것으로 보아서 C65는 dimer 단위로 자르는 것이 아니라 trimer 단위로 자르는 것으로도 추정된다. 즉, pentamer나 hexamer를 trimer나 dimer로 자르는 것이다.

5. 65kDa endo-chitinase의 enzyme kinetics

정제된 chitin oligomer에 대해 순수분리된 C65의 kinetics를 알아보았다. trimer부터 hexamer, 그리고 swollen chitin을 기질로 사용하여 효소와 10분 반응시킨 뒤 DNS법으로 환원당을 측정하였다. 그 결과 정제된 chitin oligomer에 대한 K_m 은 10mM에서 18mM사이였으며 V_{max} 는 2에서 7nmoleNAG/min정도였다. 또한 swollen chitin에 대한 K_m 은 1.364mg/ml, V_{max} 는 7.35

nmoleNAG/ml이었다(Fig. 10).

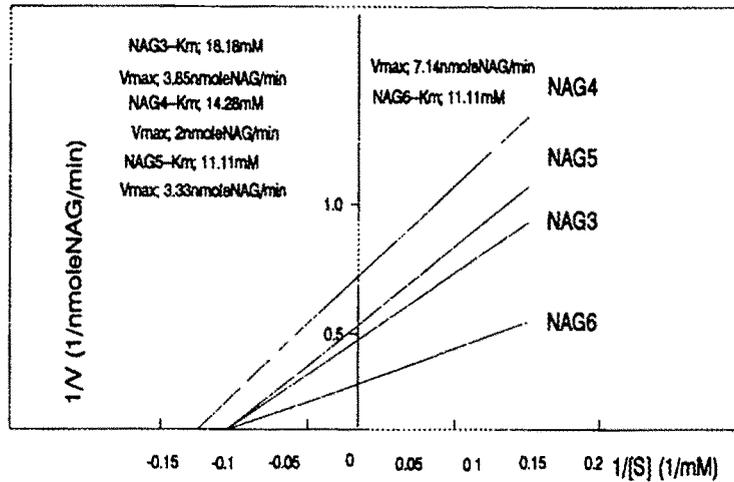


Fig. 10. Kinetics of the endo-chitinase C_{65} of *Arthrobacter* sp. GM13.

6. Antifungal activity

항진균성을 보이는 식물, 동물의 endo-chitinase처럼 세균인 *Arthrobacter* sp. GM13의 65kDa endo-chitinase는 기존의 세균성 exo-chitinase보다 높은 항진균성을 나타내었다. PDA(Potato Dextrose Agar, Difco.) 한천배지에 대상균인 *Botrytis cinerea*와 *Rhizoctonia solani*를 접종하여 각각 20℃와 28℃에서 배양하였

다. 하루정도 배양해서 어느 정도 자란 후 접종한 균에서 방사형으로 2cm 떨어진 곳에 stainless ring을 얹힌 후 0.2 μ m filter로 제균한 endo-chitinase를 각 각 10U, 50U, 100U되게 떨어뜨렸다. 균을 다시 2일간 배양한 후 억제효과를 한천배지 상에서 관찰하고 억제부분의 균사를 광학 현미경으로 관찰하였다. 그 결과 한천배지 상에서 억제효과를 관찰할 수 있었으며 광학현미경 상에서 endo-chitinase가 처리된 *Botrytis cinerea*의 세포벽이 파괴되었으며 *Rhizoctonia solani*는 균사체 내에 많은 액포가 관찰되었다 (Fig. 11).

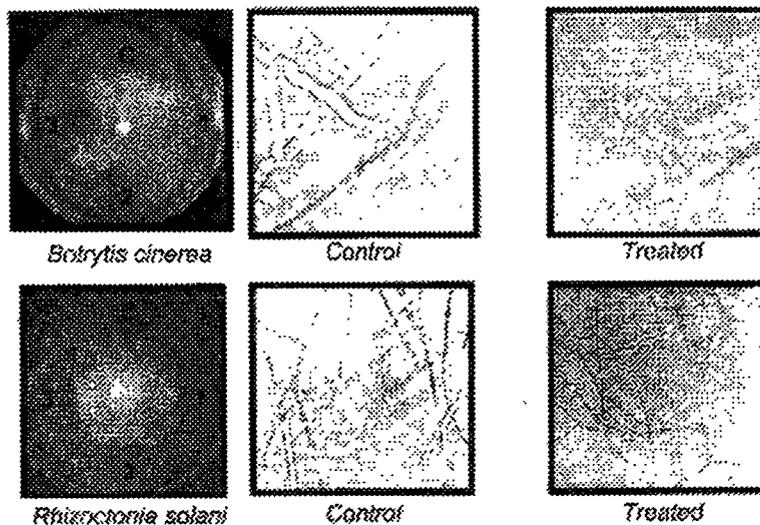


Fig. 11. Antifungal activity of the endo-chitinase C₆₅ of *Arthrobacter* sp. GM13.

제5절 *Arthrobacter* sp. GM13의 endo-chitinase 를 이용한 키틴올리고머 생산

1. 키틴올리고머 생산

GM13 균주의 chitinase와 swollen chitin을 4시간 동안 반응시켜 반응산물을 TLC로 분석하였다(Fig.12). 그 결과 endo-chitinase 활성이 기존에 보고된 chitinase들보다 월등히 높은 분리균주 *Arthrobacter* sp. GM13의 chitinase는 키틴을 분해하여 최종산물로써 dimer를 주로 생산하였으며 3-7당 범위의 올리고머도 소량 생산하였다. 이것은 endo-chitinase가 키틴을 분해하여 올리고머를 생산하기는 하나 빠른 속도로 키틴 올리고머를 분해하기 때문에 올리고머의 비율이 적은 것으로 생각된다.

2. Chitinase 유전자 클로닝

pUC19 벡터를 이용한 genomic library를 제조하여 chitinase 유전자를 screening 중에 있다. 또한 pLAFR3 cosmid를 이용한 genomic library를 제조 중에 있으며 이것이 만들어지면 훨씬 유전자의 screening이 용이할 것으로 보인다.

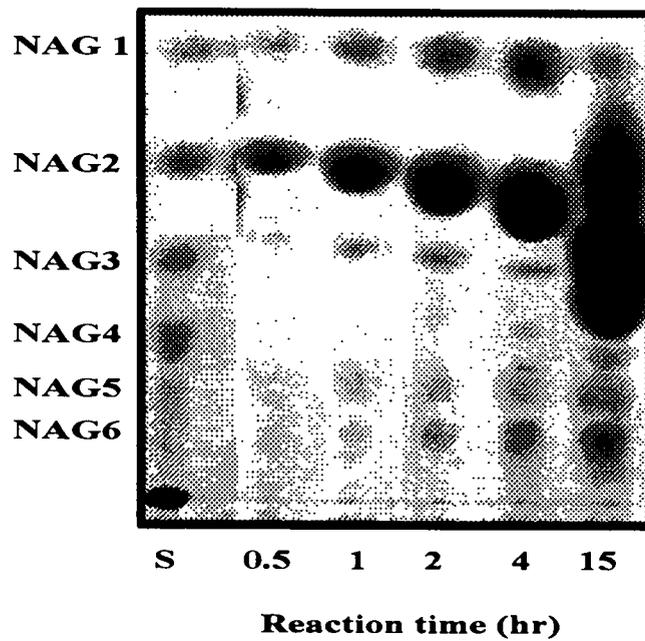


Fig 12. TLC analysis of degradation products of swollen chitin by endo-chitinase of GM13.

제 6 절 결 론

키틴으로부터 키틴올리고머를 생산하는 endo-chitinase를 여러 가지 방법으로 탐색한 결과 우수한 효소를 발견하지 못하였다. 대부분의 세균, 곰팡이들이 키틴을 분해하여 2당을 생성하였다. 우리는 그 중에서 endo-chitinase 활성이 월등히 높은 *Arthrobacter* sp. GM13 균주를 자연계에서 분리하였다. 기존에 보고된 다른 chitinase들보다 endo-chitinase 활성(swollen chitin의 탁도 감소능력)이 매우 높았으며 키틴올리고머 생산에 있어서도 2당 이상의 올리고머를 생산하였다. 그러나 분리균주 GM13의 endo-chitinase는 주로 2당을 생산하였고 그 이상의 올리고머에 대해 높은 분해 활성을 가지고 있어 고중합도의 올리고머 생산비율이 낮았다. 내열성 chitinase를 자연계에서 탐색한 결과 고온에서 chitinase 활성을 보이는 10여종의 균주를 선 발할 수 있었다. 그러나 이런 균주들 또한 2당을 주로 생산하였고 올리고머 생산에는 적합하지 못하였다. 다양한 탐색방법에도 불구하고 키틴으로부터 키틴올리고머를 직접 생산할 수 있는 chitinase를 발견할 수 없었다. 이러한 결과는 대부분의 미생물들이 키틴을 먹이로 이용하기 위하여 2당 혹은 1당으로 분해하는 특성 때문인 것으로 생각된다. 본 연구는 장기적인 새로운 탐색방법을 개발하여 계속 진행되어야 할 것으로 생각된다. 한편, 키토산의 효소적 분해에 의한 키토산 올리고머 생산은 키틴올리고머 생산보다는 비교적 쉬운 것으로 알려져 있다. 또한 키토산올리고머를 acetic anhydride와 methanol을 이용하여 아세틸화시켜 쉽게 키틴올리고머으로 전환시킬 수 있다. 따라

서 고중합도의 키토산 올리고머를 생산하는 endo-type chitosanase를 자연계에서 분리하여 먼저 키토산 올리고머를 생산한 후 사용목적에 따라 이 키토산 올리고머를 키틴올리고머으로 전환시키는 방법이 적절한 것으로 생각된다. 따라서 향후의 연구는 키토산을 분해하는 endo-chitosanase 연구에 집중하였다.

II. 미생물에 의한 키토산 올리고머 생산

제 1 장 서 론

키토산은 glucosamine(GlcN)의 β -1,4 다당체로서 자연계에서는 *Mucorales* 목 곰팡이의 세포벽에서 발견된다. 그러나 셀룰로오즈 다음으로 풍부한 biomass로 알려진 키틴을 탈아세틸화시키므로써 손쉽게 얻을 수 있다. 지금까지 주로 키토산 및 키틴 고분자의 이용성을 개발하고자 하는 연구가 이루어져왔다. 최근 이들 다당류의 분해산물인 올리고머에서 항균작용, 항암작용, 면역강화작용, 유산균 증식촉진작용 등이 발견되면서 관심의 대상이 되고 있다.

올리고머는 일반적으로 2-8 정도의 중합도를 갖는 다당으로서 단당이나 고분자 다당체와 비교해서 독특한 물성과 생리활성을 갖는다. 기존에 알려진 대부분의 올리고머는 전분유래의 올리고머이며 이들은 보수성, 저감미성, 결정방지성 등의 식품학적 특성이 있으며, 특히 장내 유익균을 증식시켜 정장작용을 하므로써 건강식품소재로서 널리 사용되고 있다. 그러나 키토산 및 키틴 올리고머의 경우 면역성 증진작용, 항균작용과 같은 독특한 생리활성을 갖는 점이 기존의 전분 올리고머와 차별화되는 특징이다. 또한 면역성을 증가시키는 다당체로서 알려진 효모의 β -글루칸, 곰팡이 및 버섯 균사체 등의 경우 다당체에서만 생리활성이 발견된 것에 비해서, 키토산 및 키틴의 경우 다당체에서만 생리활성이 발견된 것에 비해서, 키토산 및 키틴의 경우

단당류를 포함한 올리고머에서 생리활성이 발견된 것이 특징이다. 키토산 및 키틴 올리고머 중에서 특히 6당 이상의 올리고머에서 더 높은 생리활성을 가진 것으로 보고되었다. 또한, 항암작용에 있어서 키토산의 올리고머보다 키틴의 올리고머가 더 높은 활성을 가진 것으로 알려졌다.

키토산 및 키틴 올리고머는 산분해법으로 손쉽게 만들 수 있다. 산분해법의 경우 올리고머의 수율이 낮고, 특히 단당을 포함한 저중합도의 올리고머가 많이 생기는 문제가 있다. 또한 반응 후 잔류염을 제거하기 위해서 용매를 사용하거나 비교적 고중합도의 올리고머를 얻기 위해서 키토산 분해물을 분획해야 하는 어려움이 있다. 최근 기존의 산분해방법을 대체하기 위해서 효소적 방법이 모색되었다. 효소적 방법은 온화한 반응조건을 사용하고 2당 이상의 올리고머 수율이 높으며 사용효소에 따라서 비교적 고중합도의 올리고머를 만들 수 있는 장점이 있다. 지난 10여년간 올리고머 제조용 효소가 많이 연구되었으나 아직 키틴으로부터 직접 비교적 고중합도의 키틴 올리고머를 만들 수 있는 효소는 아직 개발되지 않았다. 키토산 올리고머 제조용 효소의 경우 일본에서 몇가지 효소제가 개발되었으나, 우리나라에서는 최근의 많은 연구에도 불구하고 아직 적당한 효소를 개발하지 못하였다.

제 2 장 재료 및 방법

제 1 절 재료 및 시약

N-Acetylchitooligosaccharides(GlcNAc 2-6)는 Seikagaku, chito-oligosaccharides (GlcN 2-7)는 Wako에서 구입하여 사용하였다. N-acetylglucosamine·HCl 과 glucosamine·HCl은 Sigma사의 제품을 사용하였다. Carbohydrate column은 waters, TSK-GEL NH2-60 column과 CM-Toyopearl column은 Tosoh, Superose 12HR column은 Pharmacia에서 구입하여 사용하였다. Yeast extract, typtone등 미생물 배지 성분은 Difco에서 구입하였다. Silica gel plate(Kieselgel 60 F254)는 Merck의 것을 사용하였으며 그 외 시약은 특급시약을 사용하였다.

제 2 절 실험방법

1. 키토산 분해 미생물의 분리

각 지역에서 수집한 300여종의 시료로부터 키토산 분해활성을 가지는 미생물을 분리하기 위해 0.5%의 키토산을 탄소원으로 하는 배지(MCA)를 사용하였다. 이때 MCA 배지의 조성은 K₂HPO₄ 0.2%, KH₂PO₄ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.07%, NaCl 0.05%, KCl 0.05%, CaCl₂ 0.1g, yeast extract(Difco) 0.5%, swollen chitosan 0.5%이다. 수집한 시료 1g정도를 30ml 멸균증류수에 현탁시킨 후 40℃에서 밤새 정치시킨 뒤 상등액을 적절히 희석하여 MCA배지에 평판도말하였다. 30℃에서 배양하면서 키토산 분해환을 비교적 빨리 형성시키는 것과 분해환의 크기가 상대적으로

큰 균주를 1차적으로 선발하여 15% glycerol 용액에 현탁하여 -70°C에 보관하였다. 보관된 균주는 MCA 액체배지에서 진탕배양하여 각 시료의 DNS 환원당 활성을 측정하여 활성이 높은 균주들을 최종적으로 선택, 분리하여 실험에 사용하였다.

2. 키토산 단량체(글루코사민)를 생산하는 미생물의 탐색

토양과 바다시료 등을 50ml M9 Minimal chitosan(M9 salt + 0.5% colloidal chitosan, pH 5.0) 배지와 Czapeck minimal chitosan(NaNO₃ 0.3%, K₂HPO₄ 0.1%, KCl 0.05%, MgSO₄ · 7H₂O 0.05%, FeSO₄ · 7H₂O 0.001%, 0.5% soluble chitosan, pH 5.0, chloramphenicol 50µg/ml) 액체배지에 접종하고 각각 30°C와 20°C에서 1주일간 진탕배양하였다. 배양액을 동일한 액체배지에 접종하는 방법으로 3회 계대배양한 다음 LB와 50µg/ml의 chloramphenicol이 함유된 PDA 평판배지에 각각 평판도말하여 세균과 곰팡이를 각각 분리하였다. 자라 나온 균체들은 평판도말하여 순수분리하여 보관하고 각각을 M9 minimal chitosan Czapeck minimal chitosan액체 배지에 접종하여 30°C와 20°C에서 1주일간 진탕배양하였다. 배양액을 원심분리하여 얻은 배양상등액은 2% soluble chitosan과 40°C에서 6시간동안 반응시킨 다음 반응산물을 TLC로 분석하였다.

3. 분리균주 GM44의 동정

Chitosanase 활성이 높고 비교적 고중합도의 올리고머를 생산하는 분리균주 GM44를 동정하기 위해 균체의 지방산 분석 및 생화학적, 형

태적, 배양학적 특성을 조사하였다. 시험결과를 Bergey's manual of systematic bacteriology에 따라 분리군주를 동정하였다.

4. 전자현미경 관찰

분리군주 GM13과 GM44의 형태를 주사전자현미경(TEM)으로 조사하였다. 세포를 LB배지에서 하룻밤 동안 배양한 후 균체를 수집하고 증류수로 1회 세척하였다. 이 세포를 2.5% glutaraldehyde와 1% osmium tetroxide (OsO₄)를 사용하여 고정시킨 후 인산 완충용액(pH 7.0)으로 세척하였다. 여러 가지 농도의 ethanol과 acetone의 혼합을 사용하여 세포를 탈수시키고 Epon resin에 끼워 넣었다. LKB-ultratome으로 절단하여 초박편을 만든 후 여기에 탄소를 입히고 lead와 uranyl acetate를 다시 입힌 다음 주사전자현미경(Hitachi H-600)을 사용하여 관찰하였다.

5. 배양 온도에 따른 분리군주 *Bacillus* sp. GM44의 chitosanase 생산

배양 온도에 따른 분리군주 *Bacillus* sp. GM44의 균체 성장과 chitosanase 생산성을 알아보기 위해 25℃, 30℃, 37℃, 45℃, 50℃에서 각각 군주를 배양하였다. 1일단위로 균체 성장과 chitosanase 활성을 측정된 뒤 가장 높은 활성을 비교하였다.

6. Chitosanase 활성측정

Chitosanase의 활성은 키토산용액으로부터 생성되는 환원당의 양을 측정하여 결정하였다. 100mM sodium acetate 완충용액(pH 5.0)에 녹인

1% 키토산 용액 300 μ l에 효소액 300 μ l을 첨가하고 50 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응하였다. 반응 후 10N NaOH 20 μ l을 첨가하여 석은 후 12,000rpm에서 5분간 원심분리하였다. 이때 생성된 반응상등액 300 μ l에 1ml DNS 용액을 첨가한 후 끓는 물에서 5분간 가열하였다. 가열 후 충분히 식힌 다음 550nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선으로부터 환원당량을 정량하였다. 표준곡선은 D-glucosamine·HCl을 사용하여 정하였다. chitosanase의 활성단위(U)는 주어진 조건에서 분당 1 μ mole의 glucosamine을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

7. Chitosanase의 생산

LB한천배지에서 자란 *Bacillus* sp. GM44 균주를 5ml LB액체배지에 한 백금이 접종하고 30 $^{\circ}$ C에서 15시간 진탕배양한 후 이것을 다시 150ml LB액체배지에 1.5ml접종하여 4-5시간 더 배양하였다. 이렇게 만든 전배양액을 3L배지(yeast extract 30g, peptone 60g, KH₂PO₄ 18g, K₂HPO₄ 9g, MgSO₄ 6.3g, NaCl 1.5g, KCl 1.5g, CaCl₂ 0.9g, soluble starch 60g, pH 6.8)가 든 5L 발효조(한국발효기)에 접종하고 30 $^{\circ}$ C, 400rpm, 1vvm으로 60~70시간 이상 배양하였다.

8. Endo-chitosanase의 순수분리

Bacillus sp. GM44 균주의 배양액을 원심분리하여 균체를 제거하고 배양 상등액을 회수하였다. 상등액 1리터를 polyethyleneglycol(PEG)을 이용하여 약 100ml로 농축한 후 10mM Na-acetate buffer(pH 5.0)로 투석하였다. 투석한 조효소액을 CM-Toyopearl column(2.4x5cm)에 주입하

고 같은 buffer로 세척한 후 0 - 1M NaCl gradient를 걸어 chitosanase를 용출하였다. Chitosanase 분획을 Centricon으로 농축한 후 Superose 12HR FPLC column을 이용한 gel permeation chromatography 방법으로 순수 분리하였다.

9. 단백질 정량

단백질량은 Bradford 방법에 따라 Bio-Rad사의 microassay 방법으로 정량하였다. 이 때 표준곡선은 bovine serum albumin을 사용하여 구하였다.

10. Chitosanase의 전기영동

SDS-PAGE는 Laemmli의 방법에 따라 수행하였다. Mini-Protein kit(Bio-Rad)를 사용하여 12% polyacrylamide gel을 50mA에서 40-50분간 전기영동한 후 0.05% Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하여 단백질 band를 확인하였다.

SDS-PAGE gel 상에서의 chitosanase 활성염색은 다음과 같은 방법으로 실시하였다. 먼저 SDS-PAGE를 실시한 후 gel을 1% Triton X-100이 포함된 완충용액(100mM sodium acetate buffer, pH 5.0)에 담귀 교반하면서 SDS를 제거하였다. 그 후 100mM sodium acetate buffer (pH 5.0)에 0.02% chitosan과 2.5% agarose를 첨가하여 만든 agarose gel 위에 SDS-PAGE gel을 overlay하여 50℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후 agarose gel을 0.1% Congo red로 염색시켜 chitosanase band를 확인하였다.

11. N-말단 아미노산 서열 결정

SDS-PAGE gel의 단백질을 nylon membrane으로 transfer한 후 Automated Edman degradation 방법으로 단백질의 N-말단 아미노산 서열을 결정하였다. 이때 아미노산 서열분석은 pulse liquid phase protein/peptide sequencer를 사용하여 결정하였다(한국기초과학지원센터).

12. 키토산 올리고머 생산

4% 키토산 용액에 1-40U 범위의 chitosanase를 처리한 후 생성되는 환원당의 양을 반응시간에 따라 측정하고 그 반응산물을 분석하였다. 또한 4%의 키토산을 20U의 chitosanase로 8, 12, 20시간 가수분해시켜 분해산물을 HPLC로 분석, 정량하여 반응시간에 따른 키토산올리고머 구성을 조사하였다.

13. 키토산 분해산물의 분석

배양상등액과 1% 키토산 용액을 40℃에서 밤새 반응시켰다. 수용액 상태의 반응산물을 박층크로마토그래피와 HPLC방법으로 분석하였다.

가. 박층크로마토그래피(TLC)에 의한 반응산물 분석

Chitosanase에 의한 키토산 반응산물을 TLC 방법으로 분석하였다. 반응산물을 TLC(silica gel plate, Kieselgel 60 F254, Merck)에 spotting한 후 n-propanol: 30% ammonia water(2:1)을 용매로 사용하여 전개시켰

다. 전개 후 TLC plate를 상온에서 말린 다음 동일한 용매로 2차 전개시켰다. 완전히 건조시킨 TLC plate 표면에 0.1% ninhydrin이 포함된 water-saturated n-butanol을 분무한 뒤 110℃에서 10분간 가열시켜 spot을 확인하였다.

나. High Performance Liquid Chromatography(HPLC)에 의한 반응산물 분석
반응시간에 따른 키토산 올리고머의 조성을 분석하기 위해 HPLC를 수행하였다. 반응시료를 0.2 μ m filter로 여과한 후 TSK-GEL(Tosoh) NH2-60 column에 주입하고 60% acetonitrile을 mobile phase로 사용하여 0.5ml/min의 유속으로 분리하였다. 이렇게 분리된 당들을 differential refractometer로 검출하였다.

14. Acetic anhydride를 이용한 키토산의 acetylation

키토산 올리고머를 아세틸화시켜 키틴 올리고머으로 전환시키기 위해 Scheme 1과 같은 방법을 사용하였다.

15. 재조합 대장균을 이용한 chitosanase 생산

GM44의 chromosomal DNA를 Sau3AI으로 부분분해시킨 다음 pUC19/BamHI/CIP 벡터와 ligation시켜 *E. coli* JM83으로 transformation시켰다. *E. coli* transformants를 LB/Ap plate로 tooth-picking 방법으로 옮긴 다음 37C에서 24시간 incubation하였다. 그 후 1% chitosan이 포함된 top agar (pH 5.0)를 over lay하고 24시간 더 incubation하였다. Chitosanase 활성을 갖는 *E. coli* transformant

는 최종적으로 Congo red로 top agar를 염색한 후 콜로니 주위에 투명한 환을 형성하는 콜로니를 선발하였다.

제 3 장 결과 및 고찰

제 1 절 Chitosanase 생산 균주의 분리 및 동정

1. Chitosanase 생산 균주 스크리닝

채집한 시료의 정치 상등액을 MCA plate에 적절히 평판도말하여 30℃에서 배양하면서 분해환을 형성시키는 미생물들을 15여종 분리하여 MCA배지에 진탕배양시켰다. 4-5일 배양하는 동안 배지 속의 swollen chitosan의 분해가 일어났다. 2일 배양 후 배양액을 7,000 rpm에서 20분 동안 원심분리하여 배양상등액을 얻어 chitosanase 활성을 측정하고 이 배양상등액과 키토산 기질을 50℃에서 밤새 반응시킨 후 TLC에 의해서 반응산물을 분석하였다. 그 결과 chitosanase에 의한 환원당 형성은 비교적 적지만 trimer 이상의 올리고머를 형성하는 미생물들을 3여종 얻을 수 있었다. chitosanase 활성과 반응산물 분석은 Table 1에 나타내었다.

2. 키토산 단량체를 생산하는 미생물의 탐색

토양과 바다시료등을 50ml M9 minimal chitosan 배지와 Czapeck minimal chitosan 액체배지에서 3회간 배양한 후 LB와 50µg/ml의 chloramphenicol이 함유된 PDA 평판배지에 각각 평판도말한 결과 약 100여종의 세균과 곰팡이를 각각 분리하였다. 분리균주들의 배양상등액을 2% 키토산용액과 40℃에서 6시간동안 반응시킨 다음 반응산물을 TLC로 분석한 결과 세균으로 추정되는 분리균주들은 키토산을 전혀 분해하

지 못하였으나 20여종의 곰팡이들은 키토산을 분해하였고 그 중 10여종은 최종 반응산물로써 키토산 단량체(글루코사민)만을 생산하였다 (Table 2).

3. 분리균주 GM44의 동정

약 300여종의 분리균주 중에서 chitosanase 활성이 높고 비교적 고중합도의 올리고머를 생산하는 분리균주 GM44 균주는 그람 양성 포자형성 간균으로(Fig. 1) *Bacillus* 속에 속하는 것으로 판명되었다. 분리균주 GM44를 좀 더 정확히 동정하기 위해서 균체의 지방산 분석 및 생화학적, 형태적, 배양학적 특성을 조사하였다(Table 3). 그러나 GM44 균주의 분류특성은 기존의 *Bacillus* 종들과 정확히 일치하지 않았다. 본 연구에서는 잠정적으로 분리균주 GM44를 *Bacillus* sp. GM44로 명명하였다.

Table 1. Chitosanase activity and degradation products of chitosan by the isolates.

Isolates	Degradation products
EG 1	G1
EG 3	G1
EG 5	G1, G2, G3
EG 6	G2, G1, G3, G4
EG 28	G2, G3, G4, G5, G1
EG 30	G1
EG 13	G1
EG 27	G1, G2
EG 32	G1
EG 33	G1

Table 2. Analysis of degradation products of chitosan by the chitosanase producing strains.

Isolates	Time	Activity (Δ Abs. 550nm)	Degradation products
GM44	2 d	0.45621	G2-G6
Sa	2 d	0.23959	G3, G4
No. 33	2 d	0.16818	G1-G4
SP1401	2 d	0.34219	G2-G5
SP1603	2 d	0.17462	G1-G5
N13-C2	2 d	0.42494	G2
SP102	2 d	0.10713	G1, G3
Ka	2 d	0.05089	G2-G4
SP3101	2 d	0.1664	G1, G2
SP7902	2 d	0.11613	G1-G3
TC802	2 d	0.28241	G2
No. 3	2 d	0.14630	G1, G2
SP2601	2 d	0.21368	G3, G4
N2-S1	2 d	0.26608	G3
N13-S4	2 d	0.02232	G3-G5

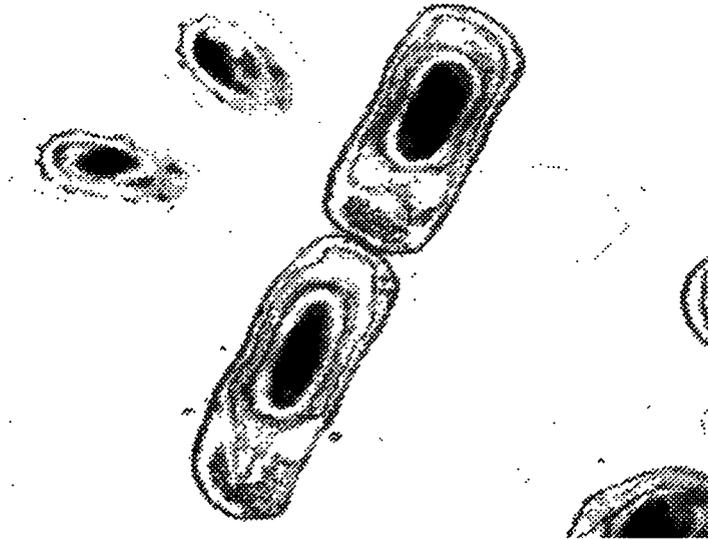


Fig. 1. Electronmicrograph (TEM) of *Bacillus* sp. GM44.

Table 3. Characteristics of GM44.

+ : Positive response - : Negative response

Cell shape	Rod
Gram stain	Gram positive
Spore	+
Catalase	+
Nitrate reduction	+
Citrate utilization	-
Biochemical test with a Vitek system and lipid analysis	→ <i>Bacillus</i> sp.

제 2 절 Endo-chitosanase 생산

1. 배양온도에 따른 분리균주 *Bacillus* sp. GM44의 균체 성장 및 chitosanase 생산

각각 다른 온도에서 배양한 *Bacillus* sp. GM44의 균체 성장 및 chitosanase 생산은 Table 4에 나타내었다. 분리균주 *Bacillus* sp. GM44는 25℃ 이하, 37℃이상에서는 거의 자라지 못하였으며 30℃에서 성장이 가장 잘되며 chitosanase 활성도 가장 높았다. 균체성장에 비례하여 chitosanase가 생산됨을 보여주었다.

Table 4. The effect of temperature on the growth and chitosanase production.

Culture temperature (℃)	Cell growth (Abs. 600nm)	Activity (U/ml)
25	28.0	9.8
30	29.1	12.8
37	5.6	10.6
45	N. D.	N. D.
50	N. D.	N. D.

N. D.; Not detectable

2. 탄소원과 질소원에 따른 chitosanase의 생산

탄소원의 종류에 따른 효소 생산성을 조사한 결과 가용성전분 배지

에서 최대의 효소 생산성을 보였으며 그 다음으로 포도당이였다(Table 5). 다른 탄소원에 비해서 키토산이 첨가된 배지에서는 오히려 효소 생산성이 낮았다. 이러한 결과는 chitosanase가 constitutive 효소라는 것을 의미하였다. 가용성 전분의 농도에 따른 효소 생산성을 조사한 결과 2%(w/v)에서 최대 효소활성을 보였다(Table 6). 여러 가지 질소원에 따른 효소 생산성을 조사한 결과 yeast extract가 가장 좋았으며(Table 7), yeast extract 1%와 peptone 3% 배지에서 최대 약 50U/ml의 효소 활성을 보였다. 이러한 효소활성은 *Bacillus* sp. K-881과 *Bacillus* sp. 7-M의 4.2U/ml, 1.0U/ml 보다 높은 값이었다.

Table 5. Effect of carbon source in the medium on the chitosanase production of GM44.

Carbon source	Cell growth (Abs. 600nm)	Activity (U/ml)
Glycerol	7.5	0.95
Glucose	6.0	3.23
Glucosamine	5.1	2.06
Sucrose	4.1	1.40
Soluble starch	12.7	3.49
Chitosan	N. D.	1.17

* The concentration of carbon sources were 0.5%.

* N. D: Not determined.

Table 6. Effect of the concentration of soluble starch in the medium on the production of chitosanase of GM44.

Concentration of soluble starch (%)	Activity (U/ml)
1	13.37
2	17.27
3	11.03
5	2.23

Table 7. Effect of concentration of nitrogen source in the medium on the production of chitosanase.

Nitrogen source	Cell growth (Abs. 600nm)	Activity(U/ml)
NH ₄ Cl	0.95	0.72
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.54	0.66
CSL	13.6	1.78
Polypeptone	39.6	2.47
Peptone	37.2	0.95
Tryptone	29.2	2.23
Yeast extract	9.5	3.78

* The concentration of nitrogen source were 0.5%.

제 3 절 Endo-chitosanase의 순수분리

1. GM 44 균주의 endo-chitinase의 분리

GM44 균주를 MCA 액체배지에서 swollen chitosan 대신 0.5% soluble starch로 대체시킨 액체배지 1L에 접종하여 30℃, 180rpm에서 70시간정도 배양하였다. 배양 후 배양 상등액을 6,000×g에서 20분간 원심분리하여 균체를 제거하여 배양상등액을 얻었다. 이때 배양 상등액의 chitosanase 활성은 12/ml이었다. 배양상등액을 투석막에 넣고 PEG를 뿌려 농축시킨 후 20mM sodium acetate 완충용액(pH 5.0)으로 밤새 투석시켜서 조효소액으로 사용하였다. 이 조효소액을 CM-Toyopearl column에 주입하고 동일한 완충용액으로 세척한 후 0-1M NaCl gradient로 용출시켰다. 이때 0.3M NaCl 농도에서 chitosanase 활성을 보이는 peak를 얻었으며(Fig. 2) 이 분획을 모아 완충용액으로 투석시킨 후 Centricon으로 농축하였다. 이 농축액을 Superose 12HR FPLC column에 주입시키고 100mM sodium phosphate 완충용액(pH 5.0)에 100mM KCl이 함유된 용액을 사용하여 분자량 별로 단백질을 분리시켜 chitosanase 활성을 보이는 하나의 분획을 얻었다(Fig. 3). 각 단계의 분리표를 Table 8에 나타내었다. 최종적으로 순수분리된 chitosanase의 비활성은 1,744.3U/mg이었으며 수율은 46.5% 이었다.

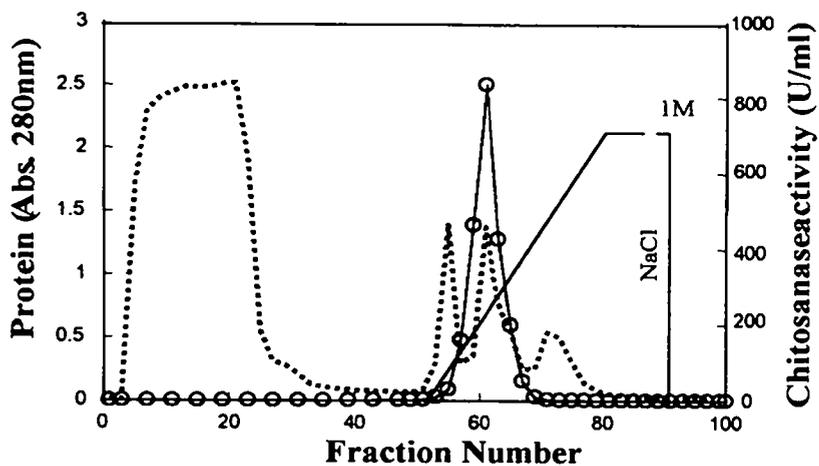


Fig. 2. CM-Toyopearl column chromatography. Chitosanase activity (○), Protein (----).

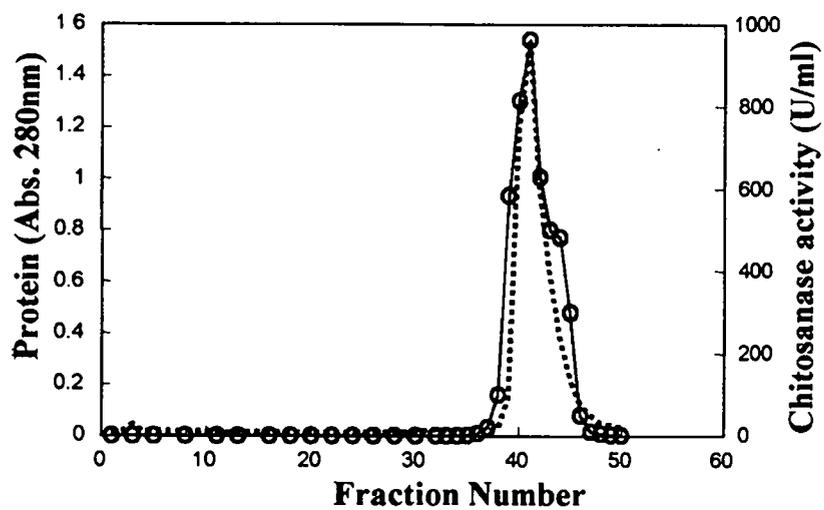


Fig. 3. Superose 12HR FPLC column chromatography. Chitosanase activity (○), Protein (----)

Table 8. Purification steps of endo-chitosanase from *Bacillus* sp. GM44.

Step Yield (-fold)	Total protein Purification (mg)	Total activity (U)	Specific acitivity (U/mg)	(%)
Culture supernatant 100.0	161.8	11,660	72.1	
PEG concentration 90.5	81.8	10,548	128.9	
CM-Toyopearl 72.9	7.5	8,498	1,139.2	
Superose 12HR 46.5	3.1	5,429	1,744.3	

2. Chitosanase의 SDS-PAGE 전기영동

CM-Toyopearl column과 Superose 12HR FPLC column을 통해 분리된 chitosanase peak를 전기영동한 후 Coomassie blue 염색과 활성염색 방법으로 분석하였다(Fig. 4(A), (B)). 배양상등액의 경우 Coomassie blue 염색 결과 많은 단백질 band를 보였지만 Superose 12HR FPLC column으로 얻은 분획의 경우 하나의 band 만을 보였으며 이 단백질의 분자량은 45kDa이었다. 활성염색결과 배양상등액과 순수분리된 분획 모두 하나의 chitosanase band만을 보였다. 이 결과들로부터 분리균주 *Bacillus* sp. GM44는 분자량 45kDa의 한 종류의 chitosanase만을 생산하며 CM-Toyopearl column과 Superose 12HR FPLC column을 통해 순수분리되었음을 알 수 있었다.

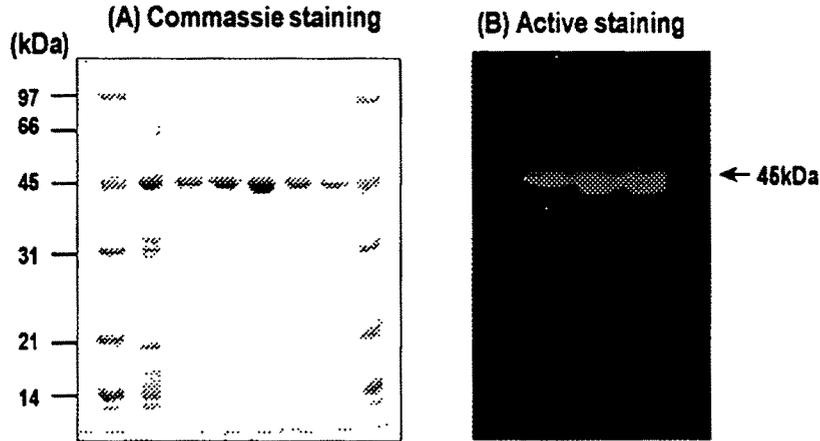


Fig. 4. Electrophoresis of chitosanase of GM44.

(A) Coomassie blue staining (B) Congo red staining for chitosanase activity

3. N-말단 아미노산 서열결정

순수분리된 N-말단 아미노산 서열을 분석한 결과 A-X-X-K-E-M-K-P-F-P-Q-Q-V-N-Y-A-G-V-I-K로 나타났다. 이 결과를 BLAST로 유사성을 조사해본 결과 *Bacillus* sp. KSM-330으로부터 분리된 endo-cellulose의 N-말단과 90%의 유사성을 보였다. 그러나 기존에 보고된 다른 chitosanase들과는 유사성이 없었다.

제 4 절 순수분리된 chitosanase의 특성

1. 온도, pH의 영향 및 기질특이성

가. 온도의 영향

순수분리된 45kDa endo-chitosanase chitosanase의 최적 온도를 알아보기 위해서 30℃에서 70℃까지 5℃ 혹은 10℃ 간격으로 조절된 온도에서 효소활성을 측정하였다. 그 결과 45kDa endo-chitosanase는 70℃에서 최대활성을 보였다(Fig. 5 (A)). 온도안정성을 측정하기 위하여 30℃, 40℃, 50℃, 60℃, 70℃, 80℃에서 chitosanase를 일정시간 방치한 후 잔존효소활성을 측정하였다. 그 결과 40℃에서 16시간까지 90% 이상의 활성을 유지하였으나 50℃에서는 16시간 후 약 80%의 효소활성이 실패되었다(Fig. 5 (B)).

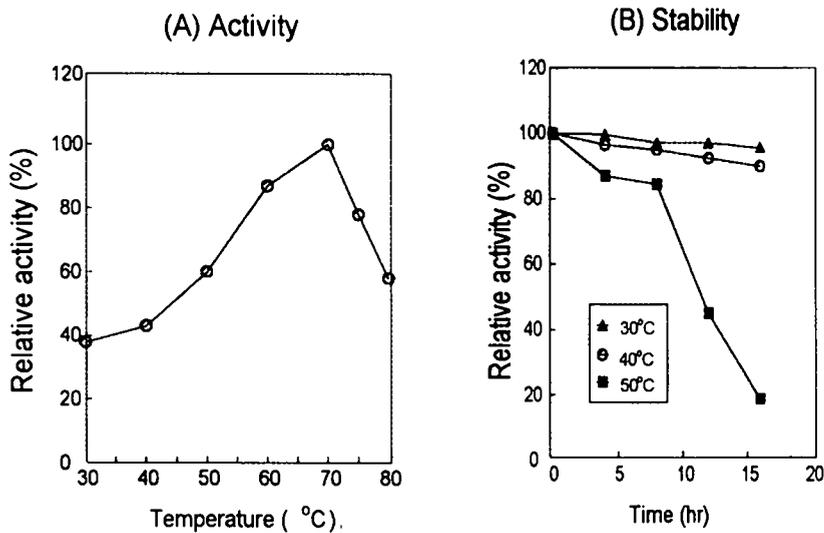


Fig. 5. Effect of temperature on the activity (A) and stability (B) of the endo-chitosanase of *Arthrobacter* sp. GM44.

나. pH의 영향

순수분리된 45kDa endo-chitosanase의 최적 pH를 알아보기 위해서 0.4% 키토산에 초산용액을 첨가하여 완전히 녹인 후 1N-HCl 혹은

1N-NaOH를 사용하여 pH 2-7범위의 기질을 만들었다. 여기에 적절히 희석된 효소를 첨가한 후 효소활성을 측정하여 최적 pH를 구하였다. 그 결과 pH 5.0에서 최대활성을 보였다(Fig. 6 (A)). 순수분리된 chitosanase의 pH 안정성을 측정하기 위하여 pH 2-3은 glycine-HCl 완충용액, pH 3-6은 citrate 완충용액, pH 6-8은 sodium phosphate 완충용액, pH 9-10은 glycine-NaOH 완충용액을 각각 사용하였다. 이 때 100mM의 완충용액 각각에 적절히 희석된 효소를 첨가한 후, 30℃에서 1시간 방치한 다음 각각의 잔존효소활성을 측정하였다. 그 결과 pH3.0-10.0 범위에서 비교적 안정하였다(Fig. 6 (B)).

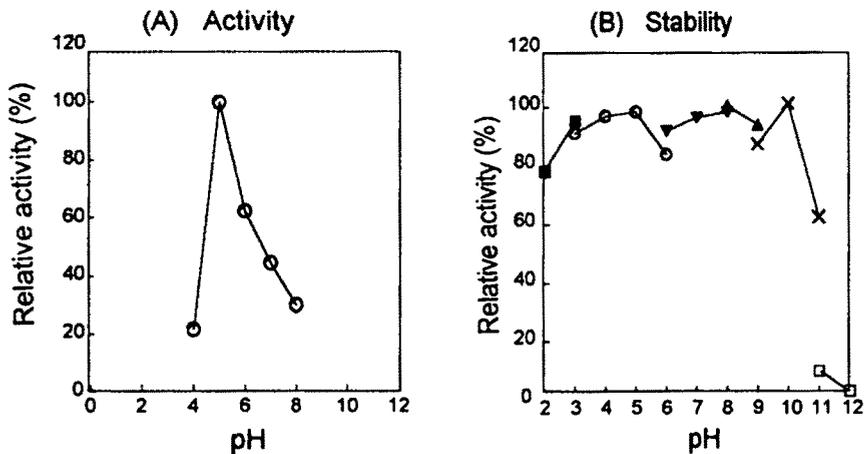


Fig. 6. Effect of pH on the activity (A) and stability (B) of the endo-chitosanase of *Arthrobacter* sp. GM44.

다. 기질특이성

순수분리된 45kDa endo-chitosanase의 기질 특이성을 조사하기 위하여 chitooligosaccharides들과 swollen chitin, CM-cellulose, starch, peptidoglycan을 기질로 사용하여 분해시킨 후 그 반응산물의 환원당을 측정하였다. 측정된 환원당량은 키토산 분해시 생성되는 환원당량을 100%로 하여 백분율로 나타내었다(Table 9). Chitobiose(2당)와 chitotriose(3당)는 분해하지 못하였으며 chitotetraose(4당)-chitoheptaose(7당)에 대한 분해는 15-24% 정도로 비교적 낮았다. 이 chitosanase는 swollen chitin과 CM-cellulose에 대해 2-3% 정도로 매우 낮은 활성을 보였으며 peptidoglycan과 전분은 전혀 분해하지 못하였다. 이 결과로부터 *Bacillus* sp. GM44가 생산하는 endo-chitosanase는 올리고머분해력이 비교적 낮기 때문에 키토산을 이용한 키토산 올리고머 생산에 유리할 것으로 생각된다. 또한 구조가 유사한 다른 기질을 사용하지 못하고 키토산에 대해서만 특이적 활성을 보였다.

2. Chitosanase의 탈아세틸화도에 따른 키토산 분해성 비교

탈아세틸화도(Degree of deacetylation, DD)가 39.22%, 58.9%, 68.1%, 77.0%, 81.9%, 87.1%, 94.1%인 키토산을 세화(주)에서 구입하여 0.2%의 기질(pH 5.0)을 만들었다. 각 기질에 대한 효소활성을 비교해 본 결과 81.9%의 탈아세틸화 기질에서 최고의 활성을 보였으며 39.2%-87.1% 범위의 탈아세틸화 기질에 대해서는 최고 활성의 83.3% 이상의 활성을 보였다(Table 10). 94.1%의 키토산 기질에 대해서는 최고

활성의 71%를 보여 상대적으로 낮은 활성을 나타내었다. 이미 보고된 다른 chitosanase들이 탈아세틸화도가 낮은 기질에 대해서 낮은 효소활성을 보이는 것과는 달리 *Bacillus* sp. GM44의 endo-chitosanase는 83% 정도의 높은 활성을 보여 생산이 쉽고 가격이 낮은 키토산 기질을 이용함으로써 키토산 올리고머의 산업적 생산에 효율적으로 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

Table 9. Substrate specificity of endo-chitosanase of GM44.

Substrate	Relative activity (%)
Chitooligosaccharides	
Chitobiose	N. D.
Chitotriose	N. D.
Chitotetraose	15.0
Chitopentaose	16.8
Chitohexaose	20.0
Chitoheptaose	23.8
Swollen chitin	2.8
Chitosan	100.0
CM-cellulose	2.5
Peptidoglycan	N. D.
Starch	N. D.

N. D. : Not detectable

Table 10. Chotisanase activity of GM44 on chitosan substrates with various degree of deacetylation.

Degree of deacetylation of chitosan (%)	Relative activity (%)
39.2	83.3
58.9	84.1
68.1	86.2
77.0	97.7
81.9	100.0
87.1	93.4
94.1	71.0

3. Chitosanase의 키토산올리고머 분해 pattern 연구

chitosanase의 분해 pattern을 조사하기 위해 표준 키토산 올리고머 (3당-7당)을 40℃에서 15시간 분해시켜 그 분해산물을 TLC로 분석하였다. 그 결과 2당과 3당은 전혀 분해하지 못하였고, 4당에서 7당까지의 올리고머는 키토산기질에 비해 낮은 속도로 분해되었다. 4당과 5당은 3당과 2당으로, 6당과 7당은 4당, 3당, 2당으로 각각 분해하였다(Fig. 7).

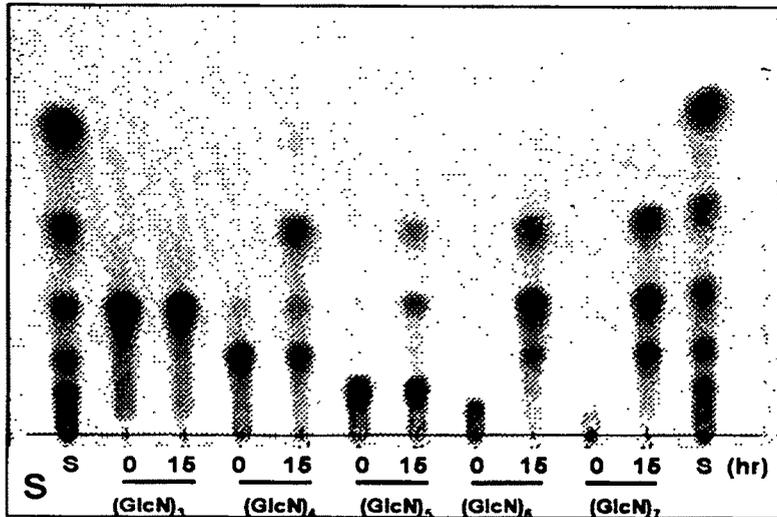


Fig. 7. Degradation pattern of chitosan oligomers by chitosanase of GM 44.

제 5 절 키토산 올리고머의 생산

1. *Bacillus* sp. GM13의 chitosanase를 이용한 키토산 올리고머 생산

Chitosanase로 분해된 여러 가지 기질의 반응산물을 TLC와 HPLC로 분석하였을 때 Fig. 8과 Fig. 9과 같은 결과를 얻었다. 본 효소는 키토산으로부터 1당을 전혀 생산하지 않았고 2당을 소량 생산하며 대부분 3당 이상의 올리고머가 생성되는 것으로 나타났다.

4% 키토산 용액에 10U의 단위로 10 - 40U 범위의 chitosanase를 처리한 후 반응시간에 따른 분해도를 측정하였다(Fig. 10 (A)). 20U 이상의 효소를 처리하는 경우 24시간 이내에 거의 분해가 완료되었고 그 이

후로는 크게 분해가 진행되지 않았다. 1 - 10U의 효소를 처리하는 경우 60시간까지는 점진적으로 분해도가 증가되었으나 그 이후로는 크게 분해가 진행되지 않았다(Fig. 10 (B)). 20U의 chitosanase를 처리하는 경우 8, 12, 20시간동안 각각 분해한 시료를 HPLC로 분석하여 올리고머 조성을 조사하였다. 그 결과 Fig. 11에서 보는 바와 같이 초기(8hr)에는 6당 이상의 당이 전체 올리고머의 약 40%를 차지하였으나 반응시간이 증가될수록 점차 감소되어 20시간째는 약 25% 정도를 보였다. 최종적으로 3당, 4당, 5당, 6당이 98%를 차지하였다. 또한 4U의 효소로 분해하는 경우 Fig. 12와 같은 TLC 결과를 얻었다. TLC에서 보는 바와 같이 키토산 분해물은 1당과 2당을 거의 포함하고 있지 않았으며 대부분 3당 이상의 올리고머를 함유하고 있었다. 일본의 제품과 비교했을 때 2당 함량이 적고 6당 이상의 올리고머 함량이 많은 것이 특징이었다.

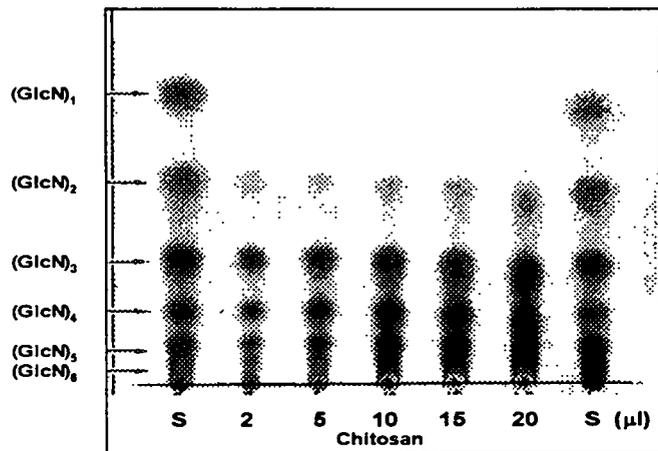


Fig. 8. Thin layer chromatogram of degradation products of chitosan by chitosanase from *Bacillus* sp. GM44.

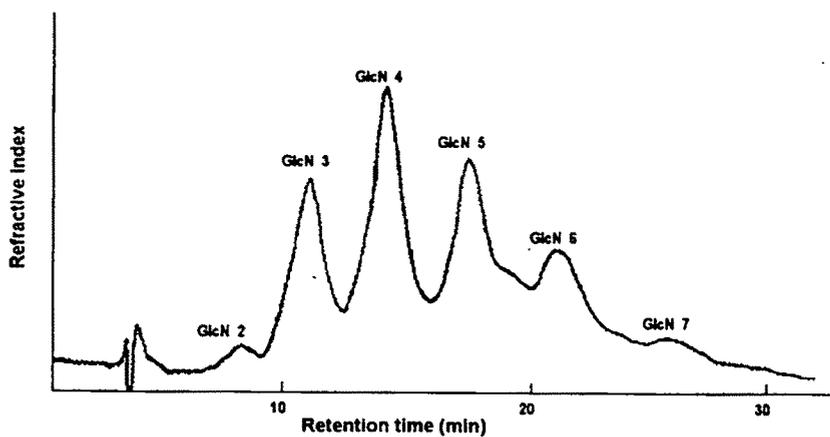


Fig. 9. HPLC analysis of degradation products of chitosan by chitosanase from *Bacillus* sp. GM44.

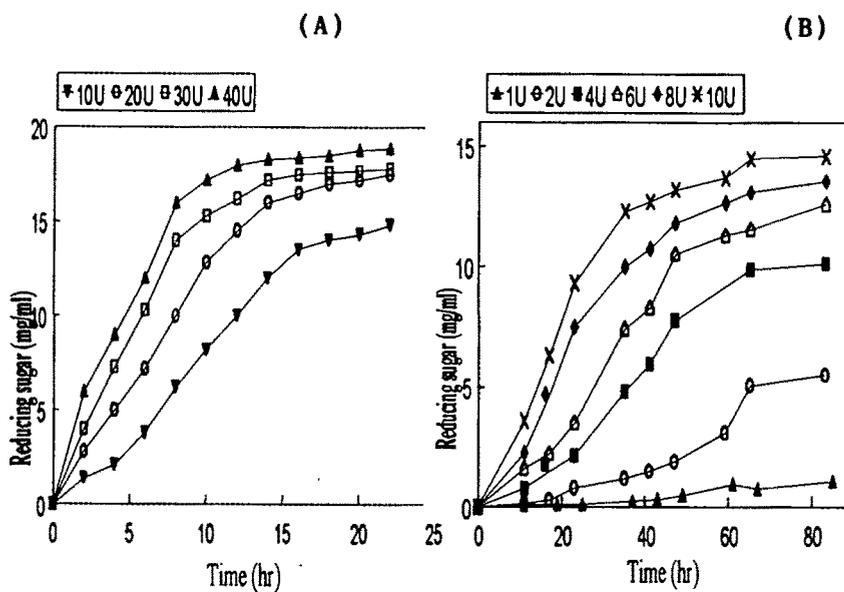


Fig. 10. Degradation of chitosan by endo-chitosanase from *Bacillus* sp. GM 44.

(A) 10-40 U, (B) 1-10 U

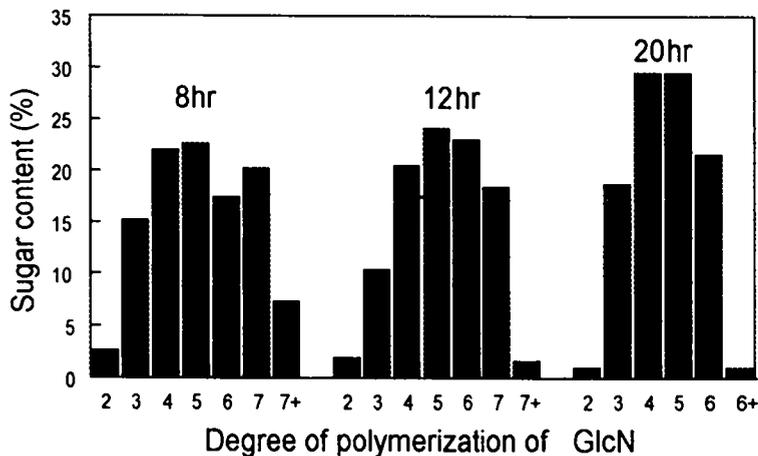


Fig. 11. Composition of chitosan oligomers produced by chitosanase from *Bacillus* sp. GM 44. after 8, 12, and 20 hrs.

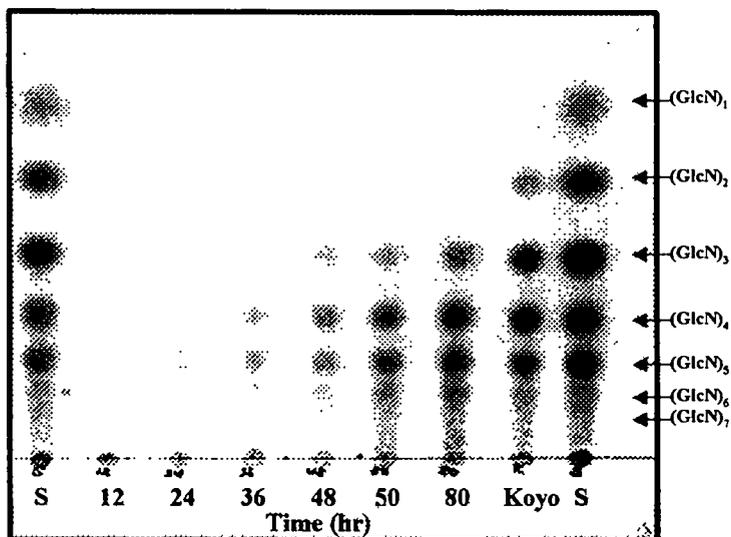


Fig. 12. Analysis of chitosan oligomers produced during 80 hours of hydrolysis by *Bacillus* sp. GM 44. chitosanase.

2. Acetic anhydride를 이용한 키토산의 acetylation

키토산 올리고머를 실험방법에 기술한 방법에 따라 아세틸화시켜 동결건조하여 시료를 만들었다. 80% acetonitrile을 mobile phase로 사용하여 시료를 Carbohydrate column(Waters)에 injection하여 분리하고 eluant 속의 당은 210nm에서 detection하였다. 표준 키토산 올리고머를 동일한 조건에서 분리하였을 경우 아세틸화시킨 올리고머 시료와 동일한 시간에서 검출되었다(Fig. 13). 이 결과로 키토산 올리고머가 완전히 아세틸화 되었을 것으로 생각되나 NMR과 IR에 의한 정밀한 구조분석이 요구된다.

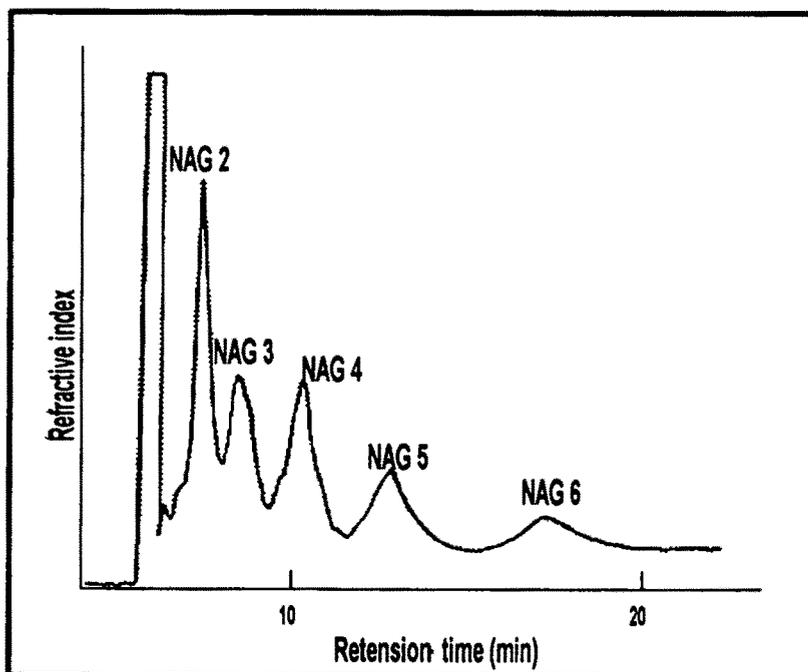


Fig. 13. HPLC analysis of chitin oligomers produced by acetylation of chitosan oligomers.

3. 재조합 대장균을 이용한 chitosanase 생산

*Bacillus*로 부터 클로닝한 chitosanase 유전자를 pUC 19 벡터를 사용하여 대장균에서 발현시켰다. 또한 *Bacillus*-대장균 shuttle 벡터를 이용하여 고초균 DB431에서도 발현시켰다. 과잉발현을 목적으로 pJ27의 rRNA promoter(strong promoter) 다음에 chitosanase 유전자를 삽입하여 발현시켰다. 즉, GM44균주로부터 chromosomal DNA를 분리한 후 Sau3AI 제한 효소로 부분분해하여 3-10kb의 DNA fragments를 분리하고 pUC19/BamHI/CIP 벡터와 ligation하여 *E. coli* JM83으로 transformation하였다. 클로닝된 유전자를 대장균에서 pUC19벡터를 사용하여 발현시킬 때 약 1.5U/ml의 효소 생산성을 보였다. *Bacillus*-대장균 shuttle 벡터를 사용하여 고초균 DB431에서 발현시킬 때 약 30U/ml의 효소 활성을 보였다. 그러나 이러한 역가는 모균주에 비해서 낮은 값이었다. 효소생산성을 높이기 위해서 강력한 promoter인 rRNA promoter를 사용하여 chitosanase 유전자를 발현시키는 실험을 수행 중에 있다. 앞으로 rRNA promoter를 이용한 재조합 균주가 만들어지면 이 균주를 이용하여 효소의 생산최적화 연구를 진행시킬 계획이다.

4. Chitosanase의 대량 분리정제 방법 개발

Chitosanase의 공업적 정제방법을 개발하기 위해서 여러 가지 방법을 사용하였다. 그 결과 다음과 같은 방법이 적합함을 알았다. 발효액을 원심분리하여 균체를 제거하고 배양액 중의 이물질을 제거하기 위해서 밀리포아 CP-15 depth filter cartridge를 통과시켰다. 통과된 액을 밀리포아 10K ultrafiltration membrane으로 20배 농축한 후 10mM

Na-citrate 완충용액(pH 5.0)(buffer A)으로 diafiltration하였다. 미리 buffer A로 평형화시킨 CM-Sepharose column에 효소액을 loading한 후 buffer A로 세척한 후 0.1M, 0.15M, 0.2M, 0.25M, 0.3M, 0.4M NaCl 용액으로 효소를 용출시켰다. 효소 분획을 buffer A로 투석시킨 후 실험에 사용하였다.

상기와 같이 CM-Sepharose column으로부터 흡착된 효소를 0.2M NaCl로 용출시킬 수 있었다. 이때 효소 수율은 약 50% 였으며 최종 효소의 비활성도는 약 960U/mg이었으며 SDS-PAGE 분석결과 95% 이상의 순도를 가진 것으로 나타났다. 또한 CM-Sepharose matrix에 흡착시킬 수 있는 효소의 양은 약 10,000U/ml of bed volume이었다.

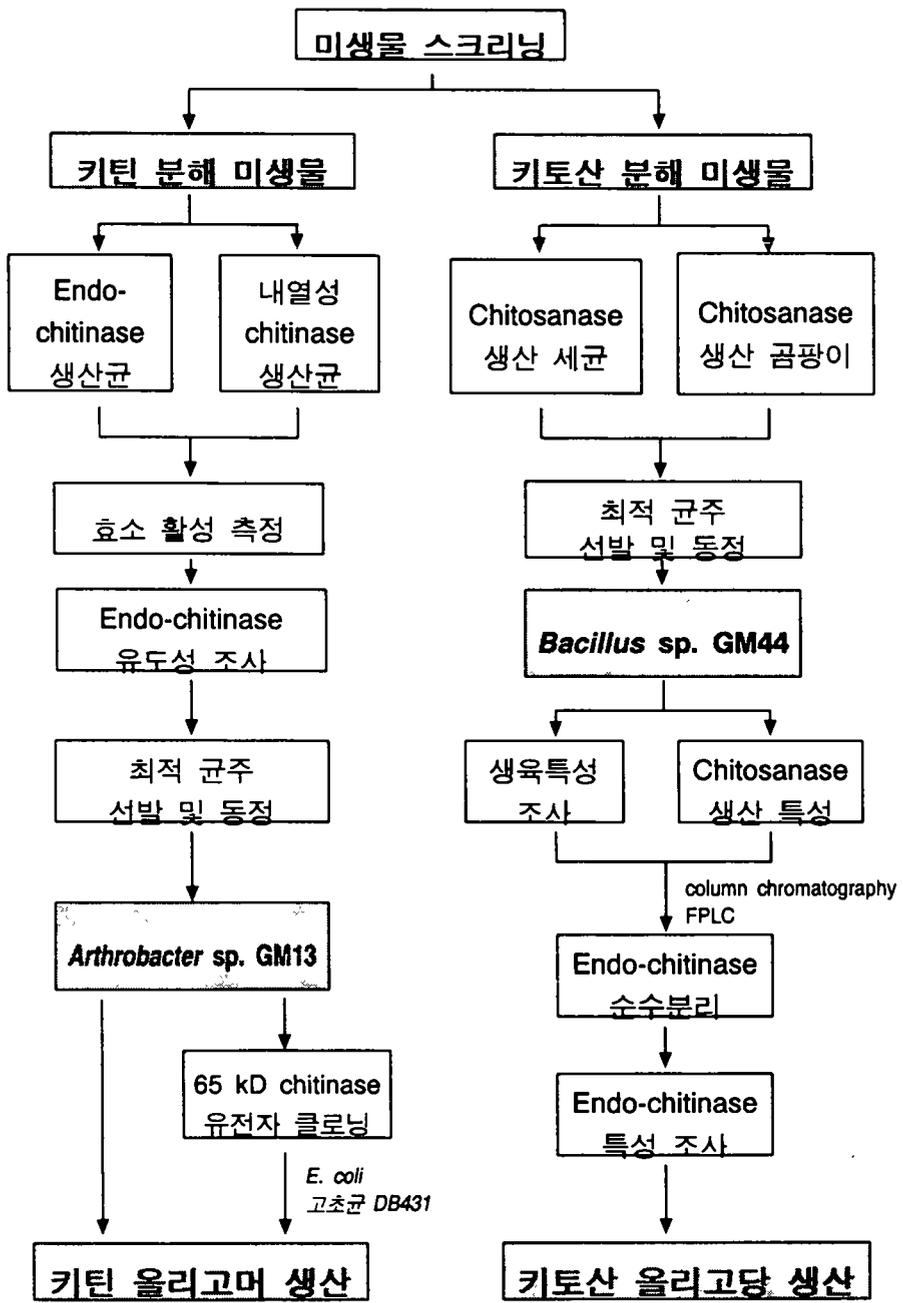
제 6 절 결 론

키토산의 효소적 가수분해를 통해 고중합도의 키토산 올리고머를 생산하기 위해 endo-chitosanase를 생산하는 미생물을 자연계에서 선발하였다. 분리균주 GM44가 생산하는 endo-chitosanase는 기존에 보고된 키토산아제 효소들보다 활성이 10배 이상 높았으며 3-8당의 키토산 올리고머를 주로 생산하였다. 분리균주 GM44는 *Bacillus* 속에 속하는 균주로 동정이 되었으며 *Bacillus* sp. GM44로 명명하였다. 분리균주 *Bacillus* sp. GM44는 chitosanase를 constitutive하게 분비하며 배양액에 키토산을 첨가 시 균체 성장과 효소생산성이 떨어지는 특징을 보였다. 이 균주는 30℃에서 가장 높은 균체 성장과 효소생산성을 보였으며 탄소원으로 가용성 전분과 포도당을 질소원으로는 yeast extract를 사

용했을 시 가장 높은 chitosanase 생산성을 보였다. 2%의 가용성 전분과 yeast extract를 사용해서 jar fermenter에서 배양 시 최고 60U/ml 이상의 효소활성을 보였다.

CM-Toyopearl column과 Superose 12HR FPLC를 통해 chitosanase를 분리하여 SDS-PAGE 와 활성염색을 통해 분리균주 *Bacillus* sp. GM44는 한 종류의 chitosanase만을 생산하며 그 분자량은 45kDa임을 알 수 있었다. 순수분리된 45kDa endo-chitosanase는 70℃, pH 5.0에서 최적활성을 보였으며 pH 3.0 - pH 10.0에서 안정하였으며 40℃ 이하의 온도에서 16시간까지 90% 이상의 활성을 유지하였다. 그러나 50℃이상의 온도에서는 활성이 급격히 감소하였다. 순수분리된 chitosanase는 2당과 3당은 전혀 분해하지 못하였고 키토산올리고머 분해력이 키토산 분해력에 비해 20% 이하의 활성을 보여 올리고머 축적에 용이하였다. 본 효소는 swollen chitin, CM-셀룰로스에 대해서 2-3%의 낮은 활성을 보였다. GM44 chitosanase는 81.9% 탈아세틸화 기질에 대해서 최고의 활성을 보였으며, 39.2% 탈아세틸화 키토산에 대해서 최고 활성의 70% 이상의 높은 활성을 가지는 특성이 있었다. 따라서 부분 탈아세틸화된 키틴의 분해 및 키틴 올리고머 제조에 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 생각된다. N-말단 아미노산 서열은 *Bacillus* sp. KSM-330 endo-cellulase와 90%의 유사성을 보였으며 본 효소가 CM-cellulose에 대해 약 2.5% 정도의 활성을 보이는 것을 볼 때 효소의 구조와 작용기작이 endo-cellulose와 유사할 것으로 생각된다. 본 효소로 키토산을 가수분해 시킬 시 반응시간에 따라 키토산 올리고머의 조성을 적절히 조절할 수 있었다. Acetic anhydride와 methanol을 사용하여 키토산올리고머를

키틴올리고머으로 전환할 수 있었다



Ⅲ. 참고문헌

1. Zikakis, J. P. 1984. Chitin, Chitosan, and related enzymes. Academic Press, New York.
2. Muzearellis R. A. A. 1985. Chitin in The Polysaccharides(G. O. Aspinall ed.). pp. 417-450. Academic Press, New York.
3. Mmato, M., R. Lola, A. Harvey, L. Peter, and R. Barry. 1980. Bloom mode of regulation of natural killer cell activity by interferon. *J. Exp. Med.* 152 : 124-137.
4. Kobayashi, M., T. Watanabe, S. Suzuki, and M. Suzuki. 1990. Effect of N-Acetylchitohexaose against *Candida albicans*: Infection of Tumor-Bearing Mice. *Microbiol. Immunol.* 34(5) : 413-426.
5. Suzuki, S., Y. Okawa, Y. Okura, K. Hashimoto, and M. Suzuki. 1982. Immunoadjuvant effect of chitin and chitosan, p. 210-212. In Hirano, S., and Tokura, S.(eds), chitin and chitosan, The Japanese Society of chitin and chitosan, Tottori University, Tottori.
6. Suzuki, K., Y. Okawa, K. Hashimoto, S. Suzuki, and M. Suzuki, M. 1984. Protecting effect of chitin and chitosan on experimentally induced murine candidiasis. *Microbiol. Immunol.* 28 : 903-912.
7. Rupley, J. A. 1964. The hydrolysis of chitin by concentrated hydrochloric acid, and the preparation of low-molecular-weight

- substrates for lysozyme. *Biochimica et Biophysica Acta*. 83 : 445-455.
8. Lorito, M., G. E. Harman, C. K. Hayes, R. M. Broadway, A. Tronsmo, S. L. Woo, and A. Di. Pietro. 1993. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology*. 83 : 302-307.
9. Alex, S., and I. Chet. 1989. Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. *J. Gen. Microbiol.* 135 : 675-682.
10. Lorito, M., C. K. Hayes, A. Di. Pietro, S. L. Woo, and G. E. Harman. 1994. Purification, characterization and synergistic activity of a glucan 1, 3- β -glucosidase and an N-acetyl- β -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*. 84 : 398-405.
11. Alfonso, C., O. M. Nuero, F. Santamaria, and F. Reyes. 1995. Purification of a heat-stable chitin deacetylase from *Aspergillus nidulans* and its role in cell wall degradation. *Curr. Microbiol.* 30 : 49-54.
12. Taylor, J., J. Jones, S. Sandler, G. Meullar, J. Bedbrook, and P. Dundmuir. 1987. Optimizing the expression of a chimeric gene in plant cells. *Mol. Gen. Genet.* 210 : 572-577.
13. Harman, G. E., C. K. Hayes, M. Lorito, R. M. Broadway, A. D.

- Pietro, C. Peterbauer, and A. Tronsmo. 1993. Chitinolytic enzyme of *Trichoderma harzianum*: Purification of chitobiosidase and endochitinase. *Phytopathology*. 83 : 313-318.
14. Bielka, H., H. B. F. Dixon, P. Karlson, C. Liebecq, N. Sharon, E. J. Van Lenten, S. F. Velick, J. F. G. Vliegenthart, and E. C. Webb. 1984. Enzyme Nomenclature. Academic Press, New York.
15. Tronsmo, A. and G. E. Harman. 1993. Detection and quantification of N-acetyl-B-D-glucosaminidase, chitobiosidase, and endochitinase in solutions and on gels. *Anal. Biochem.* 208:74-79.
16. Leah, R., J. D. Mikkelsen, J. mundy, and I. Svendsen. 1987. Identification of a 28,000 dalton endochitinase in barely endosperm. *Carlsberg. Res. Commun.* 52 : 31-37.
17. Gaynor, J. J., and M. K. Unkenholz. 1989. Sequence analysis of a genomic clone encoding an endochitinase from *Solanum tuberosum*. *Nucleic Acid Res.* 17(14) : 5855
18. Krishnan, A., P. N. Nair, and D. Jones. 1994. Isolation, cloning, and chracterization of new chitinase stored in active form in chitin-lined venom reservoir. *J. Biol. Chem.* 269(33) : 20971-20976.
19. Skujins, J. J., H. J. Potgieter, and M. Alexander. 1965. Dissolution of fungal cell walls by *Streptomyces* chitinase and

- β -(1 \rightarrow 3) glucanase. *Arch. Biochem. Biophys.* 111: 358-364.
20. Phillips W. R., C. Albright, and B. Benfield. 1988. Cloning and expression of a *Streptomyces plicatus* chitinase(chitinase-63) in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 263 : 443-447.
21. Trimble, R. B., A. L. Tarentino, G. Evans, and F. Maley. 1979. Purification and properties of endo- β -N-acetylglucosaminidase L from *Streptomyces plicatus*. *J. Biol. Chem.* 254 : 9708-9713.
22. Leonid, C., Z. Ismailov, S. Haran, and I. Chet. 1995. Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 : 1720-1726.
23. Elad, Y., I. Chet, and J. Katan. 1980. *Trichoderma harzianum*: a biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology.* 70 : 119-121.
24. Elad, Y., I. Chet, and Y. Henis. 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Can. J. Microbiol.* 28 : 719-725.
25. Chérif, M., and N. Benhamou. 1990. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Phytopathology* 80 : 1406-1414.
26. Neuhaus, J. M., P. Ahl-Goy, S. Flores, and F. Meins 1991.

- High-level expression of a tobacco chitinase gene in *Nicotiana sylvestris*. Susceptibility of transgenic plants to *Cerospora nicotianae* infection. *Plant. Mol. Biol.* 16 : 141-151.
27. De la Cruz, J., A. Hidalgo-Gallego, J. M. Lora, T. Benitez, J. A. Pintor-Toro, and A. Llobell. 1992. Purification and characterization of extracellular, acidic chitinase isoenzymes from elicitor-stimulated parsley cells. *Eur. J. Biochem.* 206 : 859-867.
28. Pietro, A. D., M. Lorito, C. K. Hayes, R. M. Broadway, and G. E. Harman. 1993. Endochitinase from *Gliocladium virens*: Isolation, characterization, and synergistic antifungal activity in combination with gliotoxin. *Phytopathology.* 83 : 308-313.
29. Hayes, C. K., S. Klemsdal, M. Lorito, A. Di Pietro, C. Peterbauer, J. P. Nakas, A. Tronsmo, and G. E. Harman. 1994. Isolation and sequence of an endochitinase-encoding gene from a cDNA library of *Trichoderma harzianum*. *Gene.* 138 : 143-148.
30. Carsolio, C., A. Gutierrez, B. Jimenez, M. Van Montagu, and A. Herrera-Estrella. 1994. Characterization of ech-42, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91 : 10903-10907.
31. Draborg, H., S. Christgau, T. Halkier, G. Rasmussen, H. Dalboge and S. Kauppinen. 1996. Secretion of an enzymatically active *Trichoderma harzianum* endochitinase by *Saccharomyces*

cerevisiae. *Curr. Genet.* 29 : 404-409.

32. Jones, D. and M. D. Collins. 1986. Irregular, Nonsporing Gram-positive Rods in Bergey's manual of Systematic Bacteriology, Jones, G. H. (ed.), Williams and Wilkins, Baltimore. Vol. 2, p. 1261.

33. Monreal, J. and E. T. Reese. 1969. The chitinase of *Serratia marcescens*. *Can. J. Microbiol.* 15 : 689-696.

34. Molano, J., I. Polacheck, A. Duran, and E. Cabib. 1979. *J. Biol. Chem.* 254 : 4901-4907.

35. Hirano, S., and Y. Ohe. 1976. *Carbohydr. Res.* 47 : 315-320.

36. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31 : 426-428.

37. Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195 : 19-23.

38. Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248-254.

39. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227 : 680-685.

40. Trudel, J. and A. Asselin. 1989. Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 178 : 362-366.

41. Johnes, J. D. G., K. L. Grady, T. V. Suslow, and J. R. Bedbrook. 1986. Isolation and characterization of genes encoding two chitinase enzyme from *Serratia marcescens*. *EMBO J.* 5 : 467-473.
42. Joshi, S., M. Kozlowki, S. Richens, and D. M. Comberbach. 1989. Chitinase and chitobiase production during fermentation of genetically improved *Serratia liquefaciens*. *Enzyme. Technol.* 11 : 289-295.
43. 강송옥. 1994. Purification and characterization of chitinases from *Serratia liquefaciens* GM 1403 isolate. 경상대학교 석사학위논문.
44. 하기정. 1996. Molecular cloning and nucleotide sequence of chitinase C59 gene from *Serratia liquefaciens* GM1403. 경상대학교 석사학위논문.
45. Austin, P. R., C. J. Brine, J. E. Castle, J. P. Zikakis (1981). Chitin: New facets of research. *Science* 212: 749-753.
46. Tokoro, A., M. Kobayashi, N. Tatewaki, K. Suzuki, Y. Okawa, T. Mikami, S. Suzuki, and M. Suzuki (1989). Protective effect of N-acetyl chitohexaose on *Listeria monocytogenes* infection in mice. *Microbiol. Immunol.* 33:357-367.
47. Suzuki, K., T. Mikami, Y. Okawa, A. Tokoro, S. Suzuki, and M. Suzuki (1986). Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose. *Carbohydr. Res.* 151:403-408.

48. Tokoro, A., N. Tatewaki, K. Suzuki, T. Mikami, S. Suzuki, and M. Suzuki (1988). Growth-inhibitory effect of hexa-N-acetylchitohexaose against Meth-A solid tumor. *Chem. Pharm. Bull.* 36:784-790.
49. Suzuki, K., A. Tokoro, Y. Okawa, S. Suzuki, and M. Suzuki (1985). Enhancing effect of N-acetyl-chitooligosaccharides on the active oxygen-generating and microbicidal activities of peritoneal exudate cells in mice. *Chem. Pharm. Bull.* 36:886-888.
50. Hadwiger, L. A. and J. M. Backman (1980). Chitosan as a component of pea-fusarium solani interactions. *Plant Physiol.* 66: 205-211.
51. 大宝明 等(1985). 유산균증식촉진제. 일본특허공보 소63-98379.
52. Rupley, J. A. (1964). The hydrolysis of chitin by concentrated hydrochloric acid, and the preparation of low-molecular-weight substrates for lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta* 83: 445-455.
53. 田中一經 等(1988). chitosanase 또는 그 제조법. 일본특허공보 평2-79972.
54. 大宝明 等(1985). 키토산 올리고머의 제조법. 일본특허공보 소 62-30103.
55. Izume, M., S. Nagae, H. Kawagishi, M. Mrrsutomi, and A. Ohtakara (1992). Action pattern of *Bacillus* sp. No. 7-M

- chitosanase on partially N-acetylated chitosan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56: 448-453.
55. Monreal, J. and E. T. Reese (1969). The chitinase of *Serratia marcescens*. *Can. J. Microbiol.* 15: 689-696.
56. Ozaki, K., N. Sumitomo, and O. Ito (1991). Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding an endo-1,4- β -glucanase from *Bacillus* sp. KSM-330. *J. Gen. Microbiol.* 137: 2299-2305.
57. Kobayashi, M., T. Watanabe, S. Suzuki, and M. Suzuki (1990). Effect of N-acetylchitohexaose against *Candida albicans* infection of tumor-bearing mice. *Microbiol. Immunol.* 34: 413-426.
58. Tokoro, A., N. Tatewaki, K. Suzuki, T. Mikami, S. Suzuki, and M. Suzuki (1988). Growth-inhibitory effect of hexa-N-acetylchitohexaose against Meth-A solid tumor. *Chem. Pharm. Bull.* 36:784-790.

제 3 세부과제. 키틴, 키토산의 식품에의 응용

I. 식품에의 응용을 위한 키틴, 키토산의 물성연구

제1장 서론

최근 식품 신소재의 개발 및 기능성 식품에 대한 관심이 고조되어 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며 이의 일환으로 다당류에 대한 관심이 증가되고 있다. 다당류는 여러 종류의 단당류가 수백~수만개 결합하여 이루어진 고분자 물질로 동·식물과 미생물에 존재하고 구성상의 종류, 결합 방식 등에 따라 물리화학적 성질이 다르며 점도 증가제, 안정제, 유화제, 보습제, 젤화물질과 피복제 등으로 용도가 다양하다. 특히 식품 분야에서는 소량만을 첨가하여도 식품의 점탄성, 유동성이 변화하고 texture의 특성 개선 등 다방면에 응용되고 있어 이의 중요성이 인식되고 있으며 이의 일환으로 최근 탄수화물에서 유래된 키틴과 키토산에 대한 관심이 고조되고 있다.

게, 새우 등의 갑각류 외피는 키틴(25-30%), 탄산칼슘(40-50%), 단백질(20-30%) 및 소량의 색소로 구성되어 있으며 이들 물질을 순차적으로 제거하는 공정을 거쳐 키틴을 얻을 수 있다. 단백질 제거의 경우, 3-5%의 저농도 NaOH로 열처리하는 방법, papain, protease, pepsin 등의 단백질 분해효소 혹은 세균에 의한 단백질 제거법 등이 있으나 NaOH 처리법이 가장 일반적으로 사용되고 있다.

키토산은 위와같이 처리한 키틴을 50% 내외의 NaOH용액으로 가열처리하

거나 *Mucor* 등의 사상균에 존재하는 deacetylase 등을 이용하는 방법이 있으나 고농도 NaOH 처리법이 일반적으로 사용되고 있다.

키토산의 산업적 이용 형태는 분말자체를 그대로 이용하는 경우도 있지만 대부분 묽은 산 수용액에 녹여 이용하고 있다는 점을 감안 할 때 키토산 용액의 물성학적 특성에 대한 연구는 중요한 과제라 할 수 있으며 이에 대한 많은 연구가 국내외적으로 행해지고 있다.

이중 키토산의 분자량과 탈아세틸화도는 키토산의 기능특성에 영향을 주는 가장 중요한 인자로서 필름 형성능 및 물리적 강도는 분자량이 높을수록 크며, 응집성은 탈아세틸화도가 높을수록 우수하다고 알려져 있다. 키토산의 분자량과 탈아세틸화도는 제조조건에 따라 많은 차이가 있으므로 산업적 이용목적에 적합한 키토산을 제조하기 위해서는 NaOH 농도, 가열온도, 가열시간 연속처리 등의 제조조건이 키토산의 분자량과 탈아세틸화도에 미치는 영향에 대한 조사가 선행되어야 한다.

따라서 본 연구에서는 홍게껍질에서 키토산을 추출하고 분자량이 다른 4 종류의 키토산을 제조하여 이의 물리화학적 특성조사와 식품변질에 관여하는 대표적인 미생물에 대한 생육억제효과를 조사하였다.

제 2 장 재료 및 방법

제 1 절 재 료

키틴, 키토산 제조 원료는 강원도 속초시 소재 H사로부터 조가공 키틴을 제공 받아 사용하였다.

제 2 절 실험방법

1. 키틴 키토산의 제조

키틴과 키토산은 Hackman의 방법을 변형하여 제조하였다(Fig. 1) 키토산 제조시 NaOH의 농도를 45, 50, 55, 60%(w/w)로 조절하고 이의 끓는 점으로 5시간동안 가열하여 아세틸기를 제거하였다. (이하 키토산-45, 키토산-50, 키토산-55, 키토산-60)

2. 일반성분 및 Ca정량

수분함량은 105℃ 상압가열건조법으로 측정하였고, 회분함량은 550℃ 회화법으로 측정하였으며 질소함량은 micro-Kjeldhal 방법으로 정량 하였다. Ca정량은 건식회화법에 따라 회화하여 시료를 예비 탄화시키고 진한 황산 2.0ml를 가하여 Hood에서 황산을 날려보낸 후 1.0% HCl용액으로 만들어 Shimadzu 700 원자흡광광도계를 이용하여 422.7nm에서 측정하였다.

표준곡선은 Ca표준용액을 1.0ppm과 10.0ppm이 되도록 calibration curve를 작성하였다.

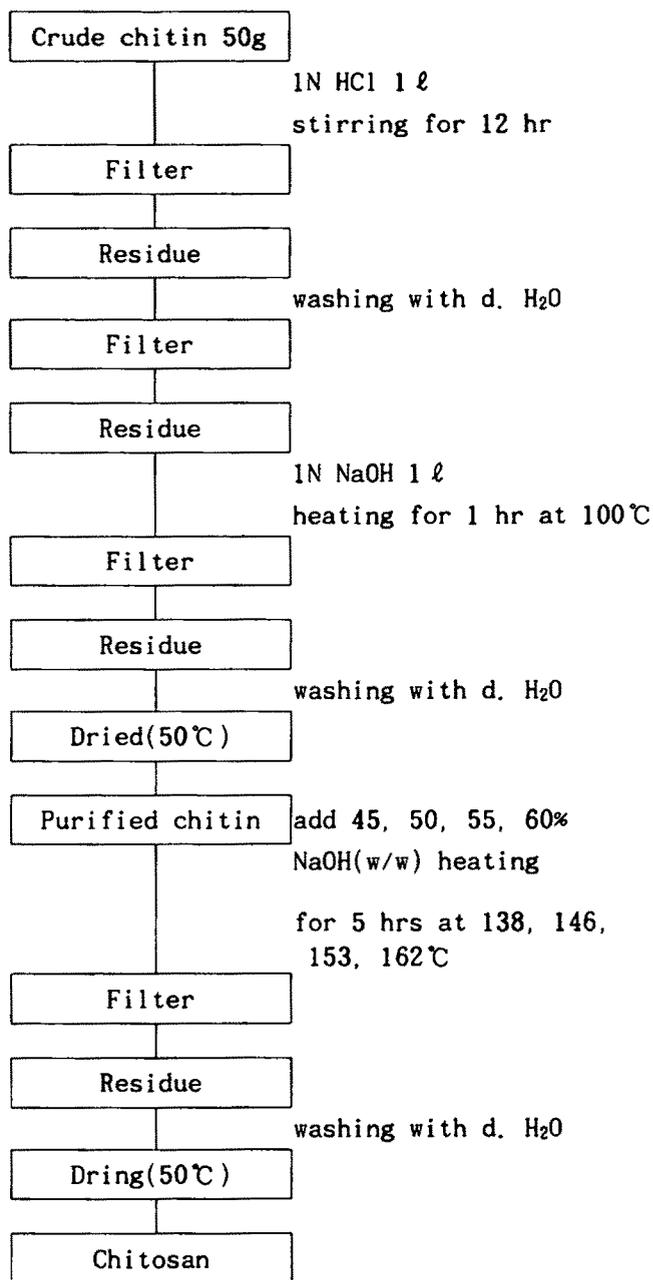


Fig.1. Schematic diagram for the preparation of chitin and chitosan.

3. 점도 및 분자량 측정

점도는 Ostwald형 점도계를 이용하여 25℃ 수조에서 측정하였으며 용액의 낙하시간을 용매의 낙하시간으로 나눈 상대 점도로 표기하였다. 분자량 측정은 극한 점도로부터 분자량을 추정할 수 있는, Staudinger식에 의하여 계산하였으며 상수인 K와 a수치는 Lee가 chitosan에 적용시킨 수치를 사용하였다.

극한점도의 추정을 위한 키토산의 용매계는 0.2M acetic acid + 0.1M NaCl + 4.0M urea를 사용하였으며, 본 용매계에 각 농도별로 용해시킨 chitosan의 상대 점도로부터 비점도 및 환원점도를 구한 다음 환원점도와 농도간의 곡선에서 포외법으로 극한점도를 구하였다.

4. 키틴, 키토산의 탈아세틸화도 측정

각각의 시료를 KBr pellet (1.0%)을 만들고 Bio Rad사의 FT-IR을 이용하여 1000~4000cm⁻¹에서 측정하였다. 이와같은 spectrum을 이용하여 1000~500cm⁻¹ 사이와 4000~3500cm⁻¹사이에 기준점을 잡고 base line을 그린 후 흡광도에 대한 1550cm⁻¹/2878cm⁻¹의 비율을 Sannan이 제시한 검량선에 대입하여 탈 acetyl화도를 계산하였다.

$$N\text{-acetyl기 함량(\%)} = (A_{1550}/A_{2878}) \times 100/1.33$$

5. 키틴, 키토산의 기능적 특성

가. 수분 및 지방흡수성 측정

30mesh를 통과한 시료 0.5g을 원심분리관에 넣고 전체무게를 잰 후 수분흡수량의 경우 증류수 30ml를, 지방흡수의 경우에는 대두유 20ml를

가하고 실온에서 1시간동안 15분 간격으로 교반한 뒤에 1,600×g에서 25분 원심분리한 후 상등액을 제거하고 무게를 측정하여 건조시료 100g에 대한 수분흡수량(g)으로 나타내었다.

나. 색소흡착력

색소흡착력의 경우 시료 0.1g에 식용색소인 적색 40호(FD & Red No. 40)를 일정농도(5~20mg dye/ℓ H₂O)가 되도록 증류수에 녹인 용액 10ml를 가하여 10초간 교반하였다. 1시간동안 20분 간격으로 5초씩 교반하고 원심분리(1,600×g, 5min)하여 상등액을 505nm에서 측정하여 검량선과 비교 후 농도를 계산하였다. 시료 0.1g에 식용색소인 적색 40호(FD & Red No. 40)를 일정농도(5~20mg dye/ℓ H₂O)가 되도록 증류수에 녹인 용액 10ml를 가하여 이를 120m⁻¹로 교반하고 약 5분간 정치한 후 상등액을 505nm에서 측정하여 검량선과 비교 후 농도를 계산하였다.

6. 미생물 생육억제 조사

식품변질에 관여하는 대표적인 미생물에 대한 생육억제 실험은 키토산 1.0g을 100ml 증류수에 가해 멸균시킨 다음 acetic acid를 0.5ml 가해 용해시킨 무균상태의 것을 항균력 측정 실험에 사용하였다. 멸균 증류수로 희석한 키토산 용액을 한국 미생물 보존 센터에서 구입한 공시균이 접종된 배지에 첨가하여 세균은 30℃에서 24시간, 효모는 30℃, 5~6일 배양하면서 박테리아는 colony를 측정하였고, 효모는 560nm에서 O.D.를 측정하였으며 각 균주에 사용한 배지는 Table 1과 같다.

Table 1. The list of microorganisms used for the test of antimicrobial activity of chitosan.

	Microbiology	Medium
Bacteria	<i>Serratia liquefaciens</i> KCCM NO. 12094	Nutrient broth
	<i>Streptococcus mutans</i> KCCM NO. 40105	Brain heart infusion broth
	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC No. 8288	Lactobacillus broth
	<i>Lactobacillus</i> <i>fructivorans</i> ATCC No. 8014	Lactobacillus broth
	<i>Zygosaccharomyces bailii</i> KCCM NO. 50165	YMPG broth
	Yeast	

제 3 장 결과 및 고찰

제 1 절 키틴, 키토산의 이화학적 특성

1. 일반성분 및 Ca함량

키틴과 키토산의 일반성분 및 Ca함량은 Table 2과 같다.

Table 2. Proximate composition of chitin and chitosan

(Unit : %)

	Moisture	Ash	Nitrogen	Ca
Chitin	4.96	2.15	6.48	0.31
Chitosan-45	6.14	0.46	6.90	0.12
Chitosan-50	5.86	0.58	6.53	0.26
Chitosan-55	6.72	0.54	7.15	0.13
Chitosan-60	6.65	1.16	7.03	0.16

키틴은 수분이 4.96%, 키토산-45~60은 5.86~6.72%를 나타내어 키틴의 수분함량이 키토산보다 낮았으며 키토산 시료간에는 수분함량에 큰 차이가 나타나지 않았다. 회분함량은 키틴이 2.15%, 키토산45~60은 0.46~1.16%를 나타내어 키토산 시료간의 차이를 나타냈고 Ca 함량은 키틴이 0.31%, 키토산-45~60이 0.12~0.26%로 나타나 조가공키틴을 재가공하는 공정에서 이미 다량의 칼슘이 제거되어진 것을 알 수 있었다. 정의 가시발 새우와 붉은 대게로 부터 제조한 키토산의 경우 수분이 각각 8.03%와 8.35% 그리고 시판 키토산의 경우 7.76%로 본실험에서 제조

한 키토산보다 수분함량이 높게 나타났다. 한편 회분 함량은 0.30과 0.49%로 본실험과 유사한 경향을 나타냈으나 시판 키토산의 경우 2.2%의 회분을 함유하고 있어 본실험에서 제조한 키토산보다 높게 나타났다. 질소함량은 가시발새우와 붉은 대게로 제조한 키토산이 각각 6.92와 7.45% 그리고 시판 키토산이 6.72%로 본실험과 유사한 경향을 보였다.

키토산의 이론적인 질소함량이 6.8%로 알려져 있으므로 본실험에서 키토산-50이 이보다 낮게 나타난 것은 강한 알카리조건에 의해 아세틸기와 함께 NH_2 기도 떨어져 나가 질소함량이 이론치 보다 적게 나타난 것으로 사료된다.

2. 분자량

점도를 이용하여 키토산의 분자량을 측정한 결과, 키토산-45는 분자량이 약 59,000으로 가장 크게 나타났고 키토산-50이 32,600, 키토산-55가 25,500을 나타냈으며 키토산-60은 12,000을 나타내어 가장 작은 분자량을 보였다. 즉 키토산 제조시 사용한 NaOH 농도가 높을수록 분자량이 감소하는 경향을 보였다.

이와같은 결과는 조동의 실험에서 NaOH농도 45%를 끓는 온도로 8시간 가열 했을 때 분자량이 97,000을 나타낸 것을 제외하고는, NaOH 농도가 50%일 때 35,000 55%일 때 29,000 그리고 60%일 때 11,000을 나타내어 분자량이 거의 일치하는 것으로 나타났다. 조동의 실험에서 가열 시간이 8시간이고 본실험에서는 5시간 임에도 불구하고 거의 같은 분자량을 보여 일정시간이상 가열시 더 이상의 분해가 일어 나지 않는 것으

로 사료된다.

3. 키틴, 키토산의 탈아세틸화도

키틴과 키토산의 i.r. spectrum은 Fig. 2와 같다.

키틴의 i.r. spectrum(Fig. 2A)에서 1450cm^{-1} 근처의 peak는 C-N group의 peak로 보여지며 $1650, 1550\text{cm}^{-1}$ 근처의 peak들은 각각 amide I 과 amide II의 peak로 보여지는데, amide I의 peak가 2개로 나타나는 것은 polymer상에서의 C=O group들 중 일부가 수소결합을 하고 있기 때문인 것으로 보인다.

한편, 키토산의 i.r. spectrum(Fig. 2B)에서의 특징을 보면 $3200 \sim 3500\text{cm}^{-1}$ 에서는 키틴과 유사한 -OH 및 -NH의 신축진동을 보이나 $1650 \sim 1660\text{cm}^{-1}$ 의 C=O 신축진동의 세기는 키틴에 비해 현저히 감소 하였다. 이는 탈아세틸화 반응에 의해 C=O 결합의 대부분이 제거되어 나타나는 현상으로 보이며 이와같은 결과는 Sannan 등의 보고와 유사한 경향을 나타내었다.

이 등은 키틴분석시 2879cm^{-1} (C-H group), 1550cm^{-1} (amide group)의 근처에서 peak가 관찰되었으며 $1000 \sim 1200\text{cm}^{-1}$ 사이 가 여러개의 peak로 나뉘어져 있으나 키토산의 경우 제조 조건에 상관없이 이 부분이 아주 둔화 되어 있다고 하여 본실험의 결과와 일치하였다.

이와같은 spectrum을 이용하여 $1000 \sim 500\text{cm}^{-1}$ 사이와 $4000 \sim 3500\text{cm}^{-1}$ 사이에 기준점을 잡고 base line을 그린 후 흡광도에 대한 $1550\text{cm}^{-1}/2878\text{cm}^{-1}$ 의 비율을 Sannan이 제시한 검량선에 대입한 결과 키틴은 약 45%, 키토산-45~60의 경우 88~94%의 탈아세틸화도를 얻을 수

있었다.

키토산의 경우 식품첨가물공전에서 제시한 탈아세틸화도가 70%이상이므로 본실험에서 제조한 키토산은 이에 적합함을 알 수 있다.

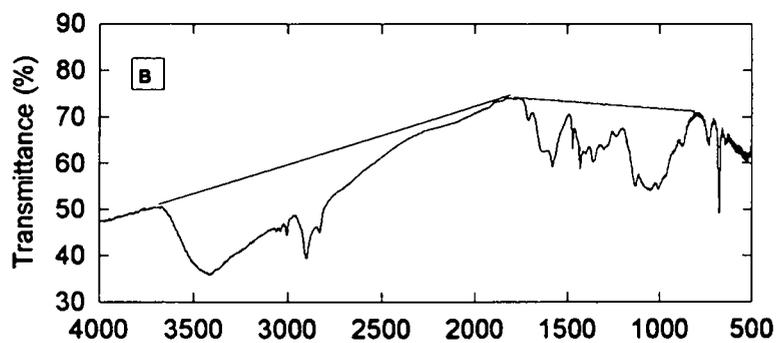
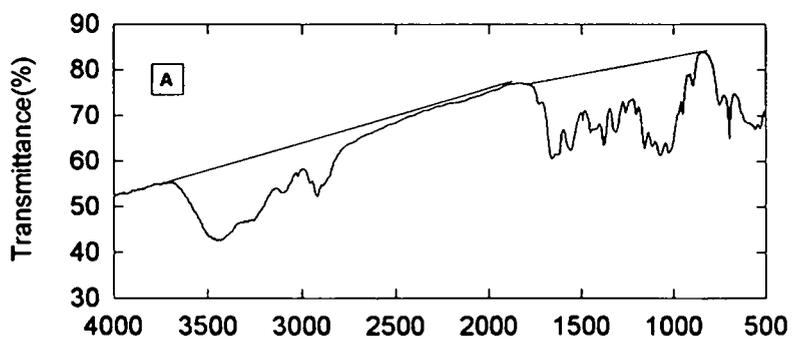


Fig. 2. IR spectrum of chitin(A), chitosan(B) and baselines for the determination peak absorbance

4. 키틴, 키토산의 기능적 특성

가. 수분 및 지방흡수력

키틴과 키토산의 수분흡착력 실험결과(Fig. 3), 키틴이 548g/100g sample로 키토산 45~60보다 많은량을 흡착하였고 키토산-45는 494, 키토산 50과 55는 470, 키토산-60은 440g/100g sample로 제조된 키토산간에는 큰차이를 나타내지 않았다.

한편, 이 등은 키토산이 키틴보다 100g sample당 약 50~100g 더 많은 량의 수분을 흡수하였다고 보고하였으며 Knorr는 키토산이 키틴보다 150% 더 많은 수분을 흡착하였다고 보고하여 본 실험과는 다른 결과를 나타내었다. Knorr는 이러한 수분흡착능의 차이를 시료간의 염형성 그룹의 차이에 의해 나타난다고 하여, 본 실험에서 색소흡착능에 대한 키틴과 키토산의 차이를 볼 때 이와 유사한 경향을 보여 주고 있다.

장 등은 반드시 일치하지는 않지만 bulk density가 낮은 키틴 및 키토산은 입자의 상태가 bulky하므로 수분이 침투되기 쉽기 때문에 그렇지 않은 것에 비해 수분을 보유하는 능력이 더 컸으며 보수력은 탈아세틸화도, 분자량의 영향보다 bulk density, 즉 crystallinity의 영향을 가장 크게 받는 것으로 사료된다고 하였다.

유지흡수력의 경우(Fig. 4) 키틴이 100g당 498g의 지방을 흡수한 반면 키토산 45~60은 368~452g의 지방을 흡수하였다. 이는 이 등이 보고한 지방흡수력에 비해 키토산의 경우 약 2배 이상의 지방흡수력을 보였다.

한편, 보수력은 생리적으로 중요한 의미를 가지며 식이 섬유가 위장관(gastrointestinal tract)을 통과할 때 수화된 스폰지와 같은 작용을

하고, 보수력이 커질수록 stool weight는 증가하며, 그외에 intraluminal transit, 영양소의 흡수, fecal electrolytes와도 관련이 있다고 알려져있다.

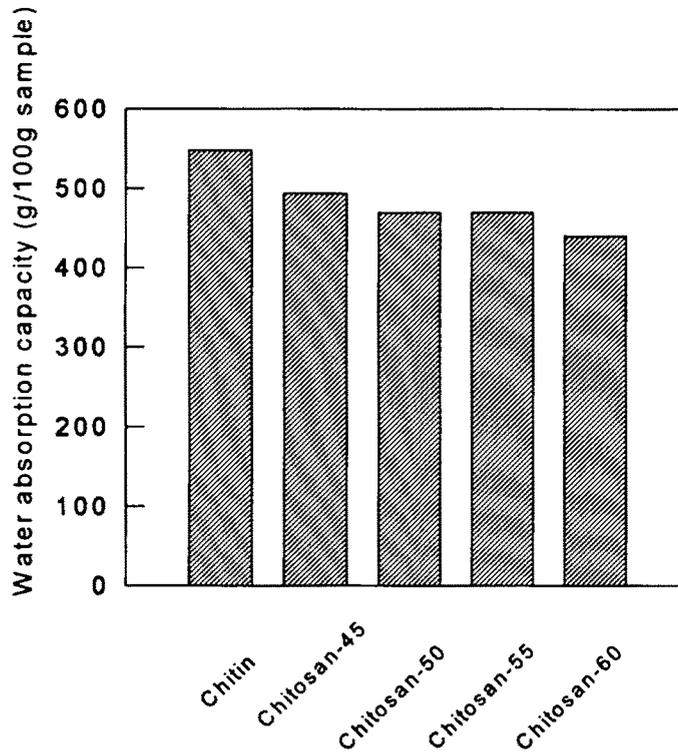


Fig. 3. Water holding capacity of chitin and chitosan prepared with different NaOH concentration.
Chitosan-45: 45% NaOH
Chitosan-50: 50% NaOH
Chitosan-55: 55% NaOH
Chitosan-60: 60% NaOH

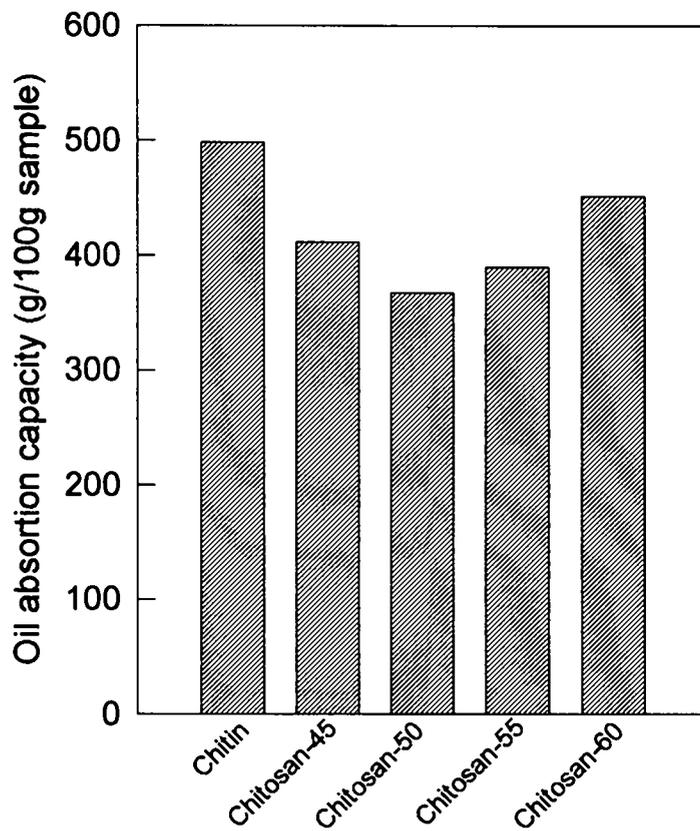


Fig. 4. Oil adsorption capacity of chitin and chitosan prepared with different NaOH concentration.

나. 색소흡착력

색소흡착능을 측정하기 위해 적색색소(Red No. 40)농도를 5~20mg dye/l로 하여 흡광도를 측정하고 이의 검량선을 작성하였다. 검량선의 회귀선식은 $Y = 0.04423X + 0.00899$ ($r^2=0.9996$) 이었으며 이를 이용하여 색소흡착력을 비교한 결과(Fig. 5) chitin은 g sample 당 약 11.16mg으로 많은 량의 색소를 흡착하였다. 그러나 chitosan의 경우 45% NaOH (w/w)로 제조한 chitosan이 10.56mg/g을 흡착한 것을 제외하고는 거의 색소를 흡착하지 않아 이 등의 실험에서 50% (w/w) NaOH로 온도와 시간을 달리하여 제조한 chitosan의 색소흡착력이 시료 1g당 $14 \pm 3.2\text{mg} \sim 16 \pm 2.2\text{mg}$ 를 나타낸 것과 비교할 때 키토산-45를 제외하고는 상당한 량의 차이를 나타내고 있다. 이는 적색색소가 SO3-기를 가지고 있어 chitosan의 NH₂기와 결합한다고 볼 때 본실험에서 제조한 chitosan은 강한 탈아세틸화 조건(NaOH 농도 45~60%, Temp. 138~162℃)으로 인해 acetyl기와 함께 다량의 NH₂기가 제거되어 위와 같은 결과를 나타내는 것으로 보여진다.

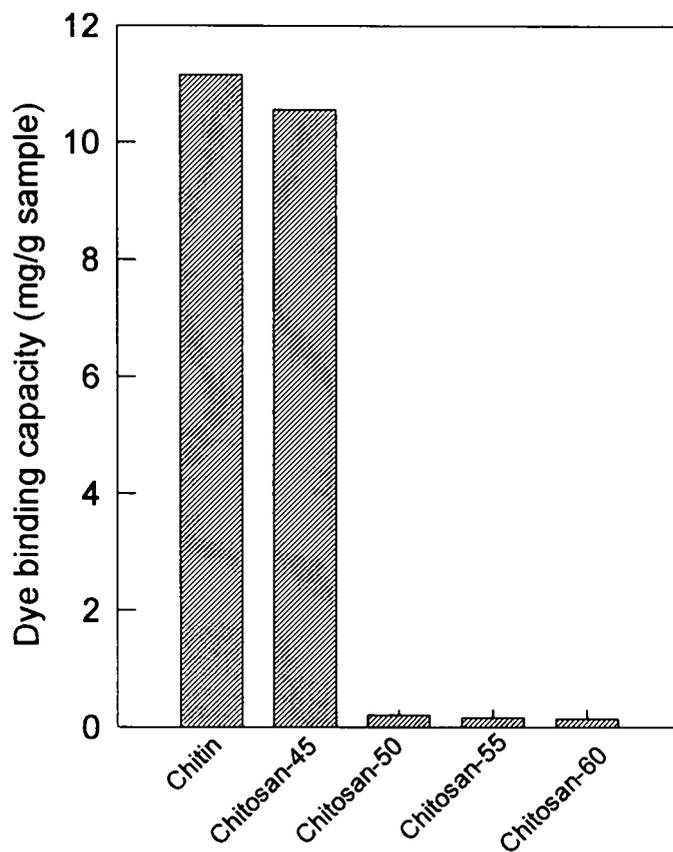


Fig. 5. Dye binding capacity of chitin and chitosan prepared with different NaOH concentration.

제2절 미생물 생육억제 효과

마요네즈 부패미생물로 알려진 *Lactobacillus plantarum*과 *Lactobacillus fructivorans* 및 *Zygosaccharomyces bailii* 그리고 치석 세균으로 알려진 *Streptococcus mutans*와 두부 부패 미생물인 *Serratia liquefaciens*에 대한 분자량 별로 제조한 키토산의 항미생물 작용은 Fig. 6~10과 같다.

*Lactobacillus plantarum*의 경우(Fig. 6) 키토산-45를 25~75ppm 첨가했을 경우 대조구와 큰 차이를 나타내지 않았으나 100ppm 첨가시 대조구에 비해 미생물이 자라는 시간을 다소 연장시킬 수 있었으나 24시간 경과 후에는 대조구가 약 4.2×10^9 CFU/ml, 키토산-45 첨가군이 약 8.5×10^8 CFU/ml의 미생물이 성장하여 큰 차이를 나타내지 않았다. 위와 같은 결과는 키토산-50, 55, 60의 경우 모두 양상은 비슷하였으나 키토산-60 첨가군이 24시간 경과 후 1.9×10^8 CFU/ml, 키토산-50 첨가군이 7.2×10^7 CFU/ml, 키토산-55 첨가군이 3.3×10^6 CFU/ml의 순으로 *Lactobacillus plantarum*의 성장에 대해 저해능이 우수한 것으로 나타났다.

*Lactobacillus fructivorans*의 경우 1/5 희석배지에서 균의 성장이 원활하지 않아 대조구가 24시간 경과후 1.1×10^7 CFU/ml가 성장하였다. 그러므로 앞서 *Lactobacillus plantarum*에 대한 키토산 첨가량보다 적은량을 첨가하여 실험한 결과는 Fig. 7와 같다.

키토산-45를 10ppm 첨가한 균을 제외한 모든균에서 균의 성장이 억제되는 경향을 보이고 있으며 또한 키토산-55를 첨가했을 때를 제외하고는 키토산 농도가 40ppm일 경우 균이 사멸하여 마요네즈 부패 미생물

인 *Lactobacillus fructivorans*에 대해 우수한 항미생물 작용을 나타내므로 보인다. 한편 미생물이 사멸하는데에는 키토산-45의 경우 24시간이 소요된 반면, 키토산-50의 경우 16시간, 60은 20시간으로 키토산-50이 가장 우수한 효과를 나타내는 것으로 보인다.

마요네즈 부패 효모인 *Zygosaccharomyces bailii* 생육에 미치는 키토산의 첨가효과는 Fig. 8와 같다. 키토산-45를 첨가한 경우 대조구는 약 2일 후 정지기에 도달한 반면 키토산을 10, 30, 50ppm을 첨가하면 유도기가 80시간까지 지속되었고 70ppm을 첨가한 배지는 100시간까지 연장되었다. 키토산-50을 50ppm 첨가한 경우는 키토산-45를 70ppm 첨가한 경우와 동일한 효과를 나타냈으며 70ppm을 첨가할 경우 130시간까지도 균의 성장이 보이지 않아 마요네즈 부패 미생물 억제실험을 위해서는 키토산-50이 가장 적합한 것으로 보여진다. 키토산-60의 경우 키토산-55보다 항미생물 효과가 높은 것으로 나와 미생물에 따라 제조한 키토산의 저해효과가 다소 차이가 있음을 알 수 있었다.

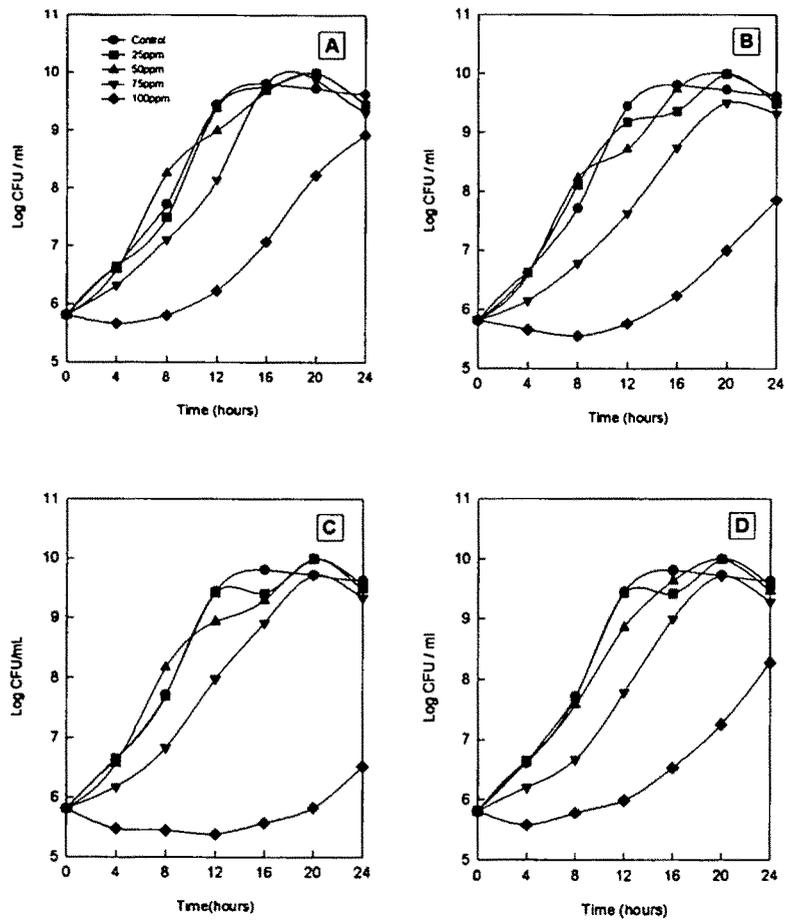


Fig. 6. Effect of various concentrations of chitosan-45(A), chitosan-50(B), chitosan-55(C) and chitosan-60(D) on the growth of *Lactobacillus plantarium*.

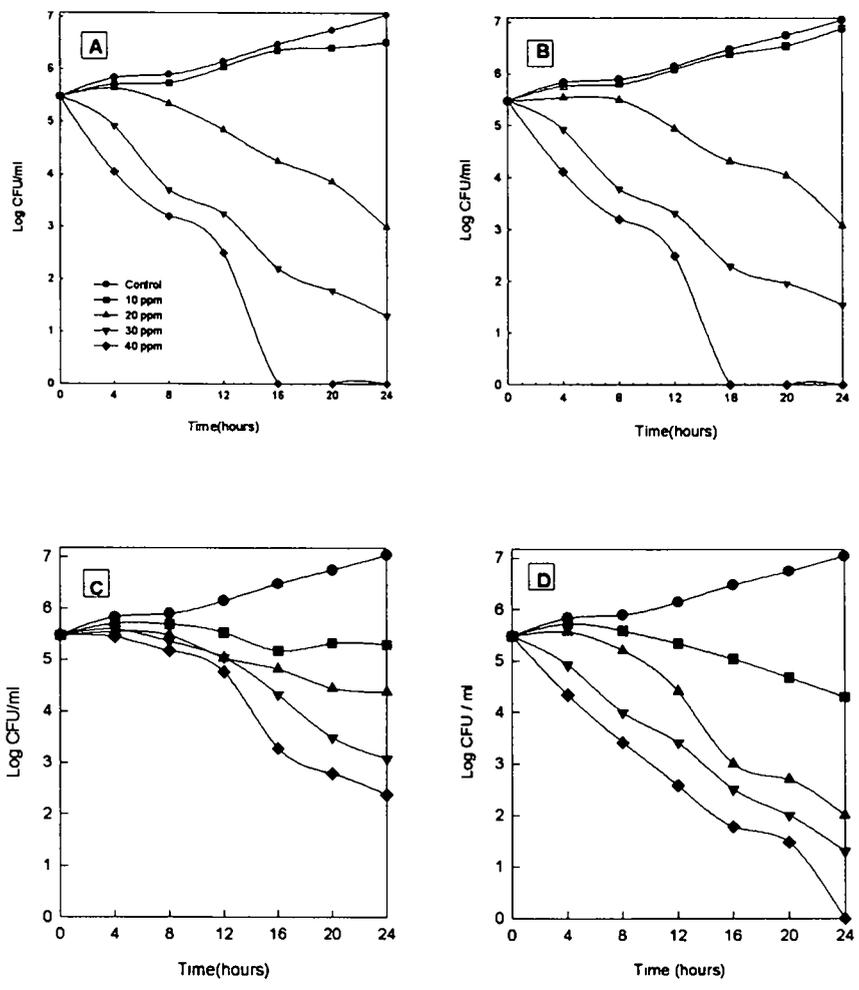


Fig. 7. Effect of various concentrations of chitosan-45(A), chitosan-50(B), chitosan-55(C) and chitosan-60(D) on the growth of *Lactobacillus fructivorans*.

한편, 두부의 부패미생물인 *Serratia liquefaciens*의 경우(Fig. 9) 제조한 키토산 모두 20ppm 만으로도 저해 효과가 뚜렷하게 나타났다. 특히 키토산-60의 경우 10ppm 만을 첨가해도 유도기간이 약 18시간 가량 연장되어 두부 보존제로서의 역할이 기대되어진다.

일반적으로 치석세균으로 알려진 *Streptococcus mutans*에 대한 항균 효과는 Fig. 10과 같다. 키토산-45를 10ppm 첨가시 대조구와 차이를 나타내지 않았으나 30과 40ppm을 첨가시는 앞서의 다른 미생물에 대한 실험결과와 마찬가지로 8시간까지는 대부분의 미생물이 사멸하다가 8시간을 기점으로 급속하게 성장하는 경향을 나타내었다. 그러나 키토산-50의 경우 40ppm 첨가시 12시간 이후에 colony가 나타나지 않아 사멸된 것으로 보인다. 이로 미루어 키토산-50을 충치예방 식품이나 구강청정제 등에 첨가한다면 좋은 효과를 나타낼 것으로 사료되어진다.

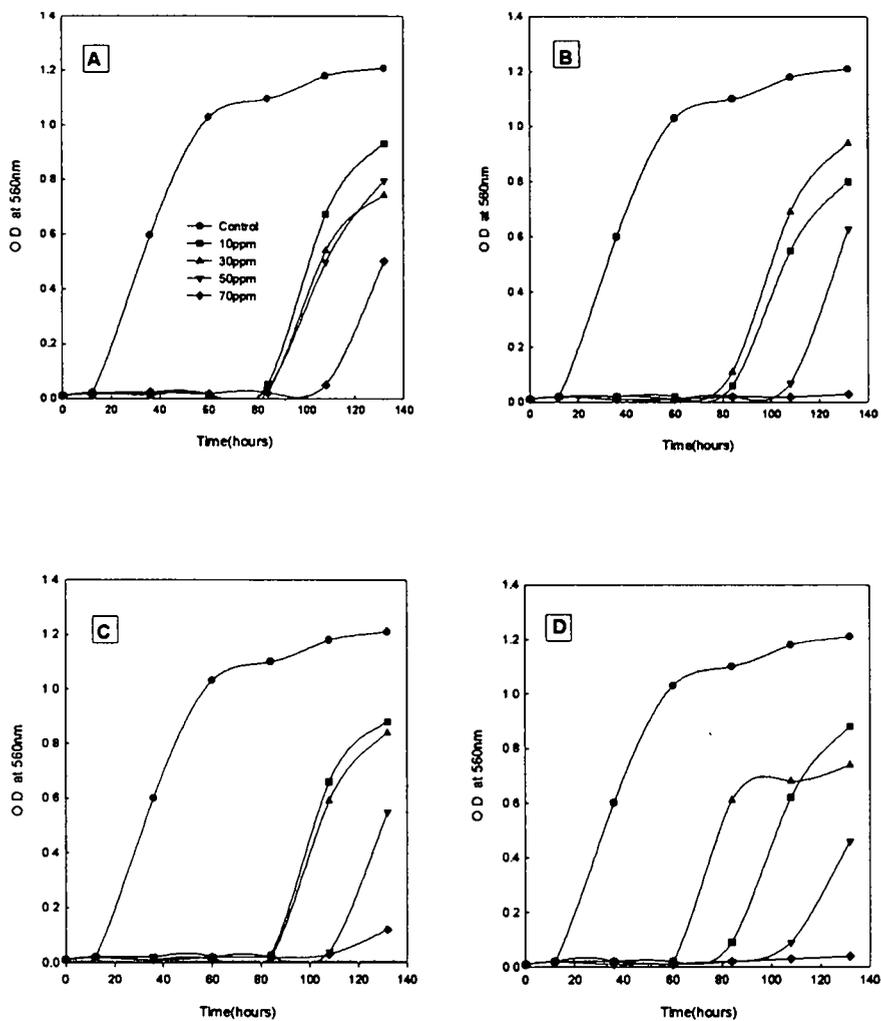


Fig. 8. Effect of various concentrations of chitosan-45(A), chitosan-50(B), chitosan-55(C) and chitosan-60(D) on the growth of *Zygosaccharomyces bailii*.

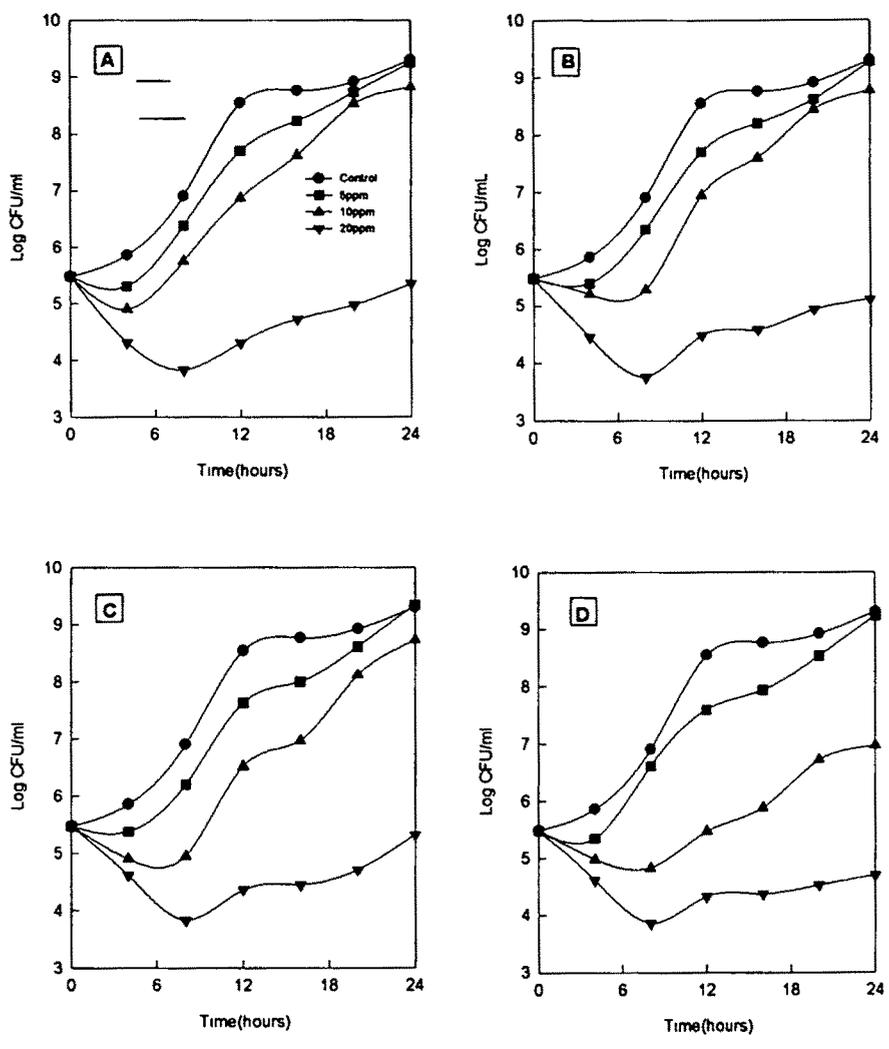


Fig. 9. Effect of various concentrations of chitosan-45(A), chitosan-50(B), chitosan-55(C) and chitosan-60(D) on the growth of *Serratia liquefaciens*.

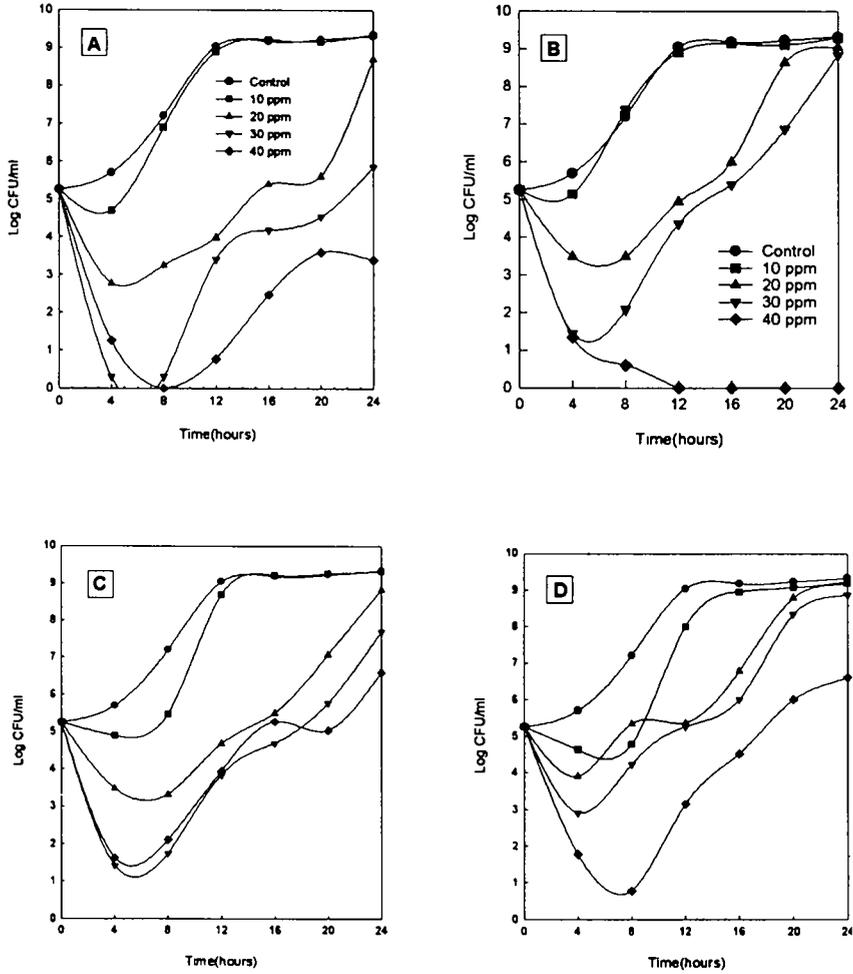


Fig. 10. Effect of various concentrations of chitosan-45(A), chitosan-50(B), chitosan-55(C) and chitosan-60(D) on the growth of *Streptococcus mutans*.

제3절 결 론

본 연구에서는 키토산을 분자량 별로 제조하여 이의 물리화학적 특성변화와 항균력을 측정하였다.

일반성분 분석을 보면 키토인은 수분이 4.96%, 키토산-45~60은 5.86~6.72%를 나타내 키토인의 수분함량이 키토산보다 낮았으며 키토산 시료간에는 수분함량에 큰 차이가 나타나지 않았다. 회분함량은 키토인이 2.15%, 키토산-45~60은 0.46~1.16%를 나타내어 키토산 시료간의 차이를 나타냈고 Ca 함량은 키토인이 0.31%, 키토산-45~60이 0.12~0.26%로 조가공키토인을 재가공하는 공정에서 이미 다량의 칼슘이 제거되어진 것을 알 수 있었다.

점도를 이용하여 키토산의 분자량을 측정한 결과 키토산-45는 분자량이 약 59,000으로 가장 크게 나타났고 키토산-50이 32,600, 키토산-55가 25,500을 나타냈으며 키토산-60은 12,000을 나타내어 가장 작은 분자량을 보였다. 즉 키토산 제조시 사용한 NaOH 농도가 높을수록 분자량이 감소하는 경향을 보였으며 ir spectrum을 이용하여 탈아세틸화도를 구한 결과 키토인은 약 45%, 키토산-45~60의 경우 88~94%의 탈아세틸화도를 얻을 수 있었다.

키토인과 키토산의 수분흡수력 실험결과 키토인이 키토산 45~60보다 많은 량을 흡수하였고 키토산간에는 큰차이를 나타내지 않았으며, 유지흡착력의 경우 키토인이 100g당 498g의 지방을 흡수한 반면 키토산 45~60은 368~452g의 지방을 흡수하였다. 적색색소 red No. 40에 대한 흡착력의 경우 chitin은 g sample 당 약 11.16mg으로 많은 량의 색소를 흡착하였다. 그러

나 chitosan의 경우 키토산-45를 제외하고는 거의 색소를 흡착하지 않아 본실험에서 제조한 chitosan은 강한 탈아세틸화 조건(NaOH 농도 45~60%, Temp. 138~162℃)으로 인해 acetyl기와 함께 다량의 NH₂기가 제거되어 위와 같은 결과를 나타내는 것으로 보인다.

*Lactobacillus plantarum*과 *Lactobacillus fructivorans* 및 *Zygosaccharomyces bailii* 그리고 치석세균으로 알려진 *Streptococcus mutans*와 두부 부패 미생물인 *Serratia liquefaciens*에 대한 분자량 별로 제조한 키토산의 항미생물작용을 조사한 결과 5종류의 미생물에 대한 실험 모두에서 키토산-45, 60은 키토산-50, 55에 비해 항균효과가 다소 떨어지는 경향을 보여 항균력이 강하게 나타나는 일정범위의 분자량이 존재하는 것으로 보인다.

II. 키토산 첨가에 의한 마요네즈의 저장성 연구

제1장 서론

마요네즈는 난황, 셀러드유, 식초, 소금, 설탕, 레몬즙, 기타조미료 등을 혼합하여 만든 반고형상태의 에멀전으로 이들 성분중 식초와 소금은 마요네즈의 신맛과 짠맛 및 방부성을 부여하며 에멀전의 안전성을 향상시킨다고 알려져있다.

일반적으로 마요네즈의 품질은 사용되는 식용유의 산화안정성에 의해 주로 영향을 받으며, 마요네즈를 포함한 드레싱류가 다른 조미식품과 구별되는 특징은 유화식품이란 점으로 유화상태의 파괴는 제품의 가치상실을 의미한다. 그러므로 마요네즈의 유화 안정성과 점도 등을 향상시키기 위한 문헌이 국내외적으로 발표되고 있다.

Harrison 등은 염의 첨가가 점도, 유화능력 등에 미치는 영향에 대해 보고하였고 Dutilh 등은 효소처리한 난황으로 마요네즈를 제조하였을 경우 유화 안정성에 관하여 실험한 결과 유화안정성이 대조구에 비해 향상된다고 보고하였다.

한편, 마요네즈의 일반적으로 알려진 부패미생물은 *Lactobacillus fructivorans*와 *Lactobacillus plantarum* 그리고 효모의 *Zygosaccharomyces bailii* 등이 대표적인 미생물로 알려져 있다.

Kurtzman 등은 17종의 부패한 마요네즈에서 효모와 박테리아를 검출하였으나 모든시료에서 곰팡이는 발견되지 않았고 가장 많은 시료에서 *Lactobacillus fructivorans*가 검출되었다고 보고하여 마요네즈의 대표

적인 부패미생물임을 확인하였다.

마요네즈의 저장기간 동안에 일어나는 변질은 온도, 압력, 진동 등에 의하여 기름의 분리, 점도의 저하, 지방구의 대형화, 변색 등 물리적 변화와 성분유의 산패, maillard 반응 등에 의한 맛과 향기 및 색의 변화 그리고 미생물에 의한 변질 등을 들 수 있다. 현재까지 마요네즈의 저장성 향상을 위한 연구는 김 등의 마요네즈 제조시 대두유와 저에루신산 유채유를 혼합하여 냉동분리 안정성 및 풍미, 산화안정성 등의 품질 특성에 대한 시험과 김의 마요네즈 제조시 토크페롤를 첨가하여 유화안정성과 산화안정성에 대한 보고 등이 있다. 그러나 키토산을 마요네즈에 첨가하여 저장안정성을 향상시키고자하는 연구는 보고된 바가 많지않다.

따라서 본 연구에서는 홍게껍질에서 키토산을 추출하고 분자량이 다른 4종류의 키토산을 제조하여 마요네즈 변질에 관여하는 미생물에 대한 생육억제효과가 가장 큰 키토산을 선정, 마요네즈 제조시 첨가하여 저장중 지방산패도, 유화안정성 및 점도 등의 변화를 조사하였다.

제 2 장 재료 및 방법

제 1 절 재료

마요네즈용 원료로 사용된 대두유는 동방유량의 제품, 식초는 (주) 오뚜기 제품, 식염은 한주소금, 설탕은 제일제당의 백설탕을 시중에서 구입하여 사용하였으며 달걀은 신선한 것을 구입하여 할란하여 난백을 제거 한 후 난황을 사용하였다.

제 2 절 실험방법

1. 마요네즈의 제조

난황과 설탕, 수분을 혼합 후 약 2분간 균질한 후 대두유와 농도별로 키토산을 첨가한 초산을 가해 Hobart mixer(model No. N-50, Hobart corporation, Troy, Ohio, USA)로 5분, waring blender로 2분간 최종균질하였다.

Table 3. Formula of experimental mayonnaise

Ingredients	%
Soybean oil	76.0
Vineger ^{a)}	4.0
Egg yolk	7.5
Salt	1.5
Sugar	1.5
Water	9.5
Total	100.0

a)Acidity(7.0%).

2. 산패도측정

가. 과산화물가 측정

Peroxide value는 시료 5.0g에 chloroform 50ml와 methanol 25ml, 2.5%-CaCl₂ 25ml를 가해 유지를 추출한 후 원심분리(3000rpm, 10min)하여 chloroform층을 추출하였다. 추출물 10ml를 250ml 삼각 플라스크에 취하여 chloroform-acetic acid(2:3) 용액 35ml를 가한 후 potassium iodide 포화 용액 1ml를 정확히 가하고 1분간 진탕시켜 상온 암소에서 10분간 반응시켰다. 이 반응액에 75ml의 증류수를 가하여 1.0% 전분용액을 지시약으로 0.02N sodium thiosulfate로 적정하여 peroxide value를 측정하였다.

나. TBA 측정

시료 5.0g에 chloroform 50ml와 methanol 25ml, 2.5%-CaCl₂ 25ml를 가해 유지를 추출한 후 원심분리(3000rpm, 10min)하여 chloroform층을 5ml 취하였다. 여기에 0.2M-TBA 5ml를 첨가하여 65℃에서 90분동안 가열한 후 상온으로 냉각하고 530nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 유화 안정성 측정

유화 안정성 평가는 천 등의 stability rating(SR)로 계산하고 김 등의 방법을 변형하여 측정하였다. 마요네즈 10g을 50ml plastic centrifuge tube에 넣어 초기의 무게를 잰 후 80℃ waterbath에서 30분간 shaking한 후 1000×g에서 5분간 원심분리하여 얻어진 분리된 기름을 주사기로 제거한 다음 무게를 측정(F1)하여 전체 무게(F0)에 대한 비로 나타내었다. 유화 안정성은 다음과 같이 계산하였다.

Emulsion stability = $F1 / F0 \times 100\%$

4. 점도 측정

마요네즈의 점도는 Brookfield viscometer (model RVTDV- II, Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Stoughton, MA)를 사용하여 20℃, spindle No. 6, speed 10으로 측정하여 centipoise(cP)로 나타내었다.

5. 미생물 challenge test

키토산이 100, 500, 1000ppm 첨가된 마요네즈에 *Lactobacillus fructivorans*와 *Zygosaccharomyces bailii*를 각각 10^7 CFU/g을 첨가한 후 저장기간에 따라 마요네즈 10g과 멸균된 생리식염수 10ml를 stomach bag에 넣고 Pro-media SH-001에서 2분간 균질한 후 효모는 YMPG agar 배지에, 젖산균은 *Lactobacillus* MRS agar 배지에 평판부가법으로 접종하여 젖산균은 30℃에서 24시간, 효모는 25℃, 5~6일 배양한 후 colony를 측정하였다.

제3장 결과 및 고찰

제1절 마요네즈의 이화학적 특성 변화

1. 과산화물가(POV)의 변화

마요네즈는 구성분 중 기름이 약 60%이상을 차지하는 고지방 식품이므로 이의 저장기간 동안에 일어나는 변질은 온도, 압력, 진동 등에 의하여 기름의 분리, 점도의 저하, 지방구의 대형화, 변색 등 물리적 변화와 성분유의 산패반응 등에 의한 맛과 향기 및 색의 변화가 일어날 수 있다. 그러므로 마요네즈의 산패방지는 제품의 저장기간을 연장할 수 있는 한 방법이며 이에 대한 키토산의 첨가 효과를 나타낸 것은 Fig. 11, 12와 같다.

앞서 각각의 식품변질에 관여하는 미생물에 대한 키토산 첨가 실험에서 수십ppm 만으로도 미생물 생육억제 효과가 나타났으나 마요네즈에 키토산을 첨가시 egg yolk 단백질에 의한 침전 등의 문제로 인해 효과가 감소할 것을 예상하여 키토산의 첨가농도를 100, 500 그리고 1000ppm으로 결정하였다. 25℃에서 저장한 대조구의 경우 8주까지는 완만하게 증가하다가 10주째에 큰 폭으로 상승하였으며, 키토산 500ppm을 첨가한 경우는 대조구와 차이를 보이지 않았으나 100ppm과 1000ppm을 첨가한 마요네즈는 유도기 이후 증가폭을 다소 완화시킬 수 있었다. 37℃에 저장한 경우 대조구의 과산화물가는 8주째에 가장 큰 폭으로 상승하였다가 그 이후에 떨어지는 경향을 나타냈고 100ppm의 경우 10주째 까지도 계속적으로 상승하여 500ppm과 1000ppm 보다 오히려 항산화 효

과가 뛰어난 것으로 나타났다.

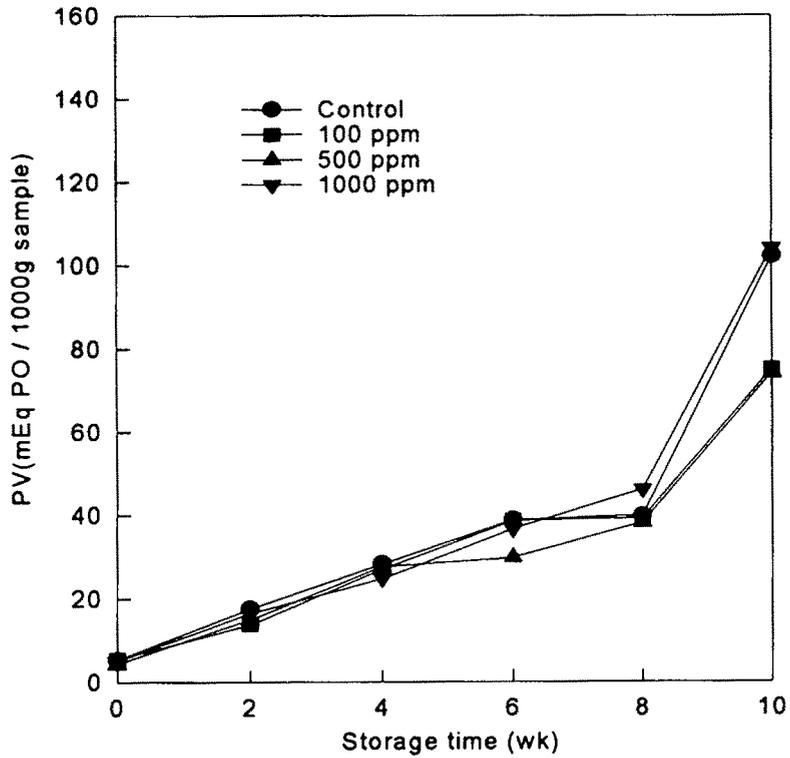


Fig. 11. Changes in POV of mayonnaise by addition of chitosan-50 during storage at 25°C.

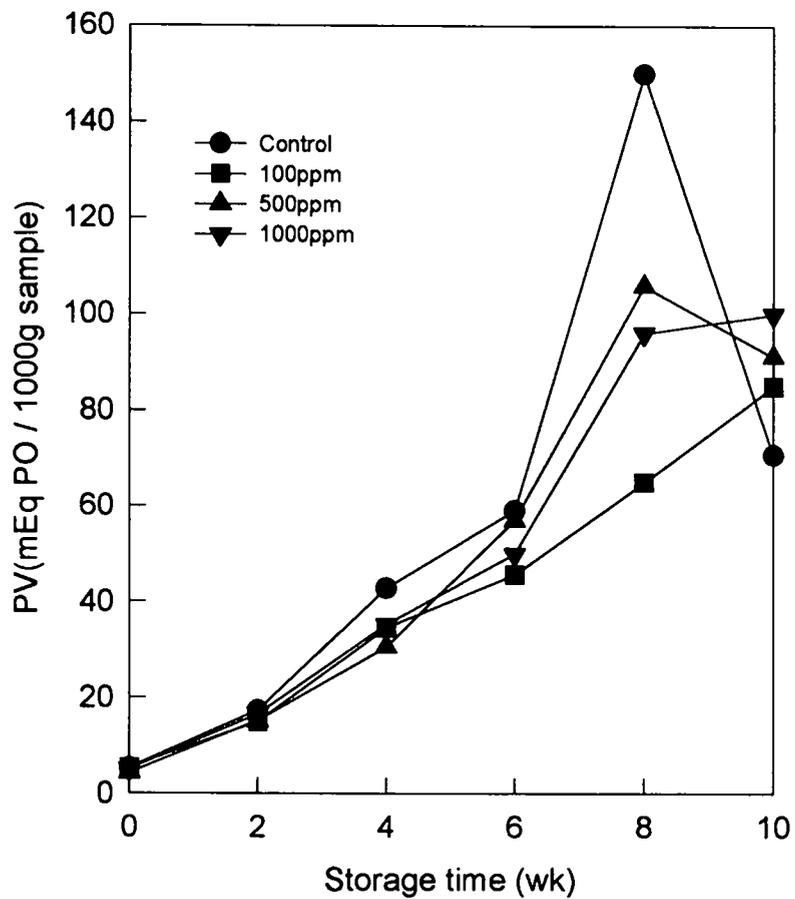


Fig. 12. Changes in POV of mayonnaise by addition of chitosan-50 during storage at 37°C.

본 실험에서 100ppm 첨가시에 비해 500ppm과 1000ppm 첨가시 산화안정성이 오히려 감소한 것과 이의 실험에서도 1.0%의 미세결정화키틴을 첨가한 것이 2.0%의 미세결정화 키틴을 첨가한 것에 비해 항산화능이 좋게 나타난 것을 볼 때 키토산을 첨가하여 산화안정성을 높이기 위해서는 적정농도범위가 있음을 알 수 있다.

2. TBA가의 변화

키토산-50을 첨가한 마요네즈의 TBA 값의 변화는 Fig. 13, 14와 같다. 25℃로 저장한 마요네즈 대조구의 경우 6주까지 계속 상승하다가 그 이후 부터 일정한 값을 유지하였고 키토산 첨가구는 8주까지는 대조구와 차이를 나타냈으나 10주가 경과 하였을시에는 거의 유사한 값을 나타냈다. 한편 37℃로 저장한 키토산을 첨가한 마요네즈의 경우는 초기에 대조구의 TBA가가 저장 8주까지 급속히 증가하였으며 그 이후에는 다소 감소하는 경향을 보였다. 또한 500ppm과 1000ppm의 키토산을 첨가한 마요네즈는 대조구에 비해 6주까지 서서히 증가하다가 8주째에 급속히 증가하였으며 그 이후에 감소하였다. 그러나 키토산-50을 100ppm 첨가한 마요네즈의 TBA가는 전 저장기간을 통해 약간 증가하여 앞서 과산화물가의 변화와 유사한 경향을 보여주고 있다.

일반적으로 TBA가는 유지의 산화가 진행됨에 따라 감소하지 않는다고 알려져 있으나 최 등의 라면 저장성 실험과 최 등의 지방질 산화에 대한 된장추출물의 항산화 특성 등의 실험에서는 TBA가가 유지의 저장기간중 증가하다가 감소하였다. 최 등은 이와같은 결과에 대해 산화에 의해 발생한 malonaldehyde가 중합, 휘발 및 타화합물과의 결합에 의하

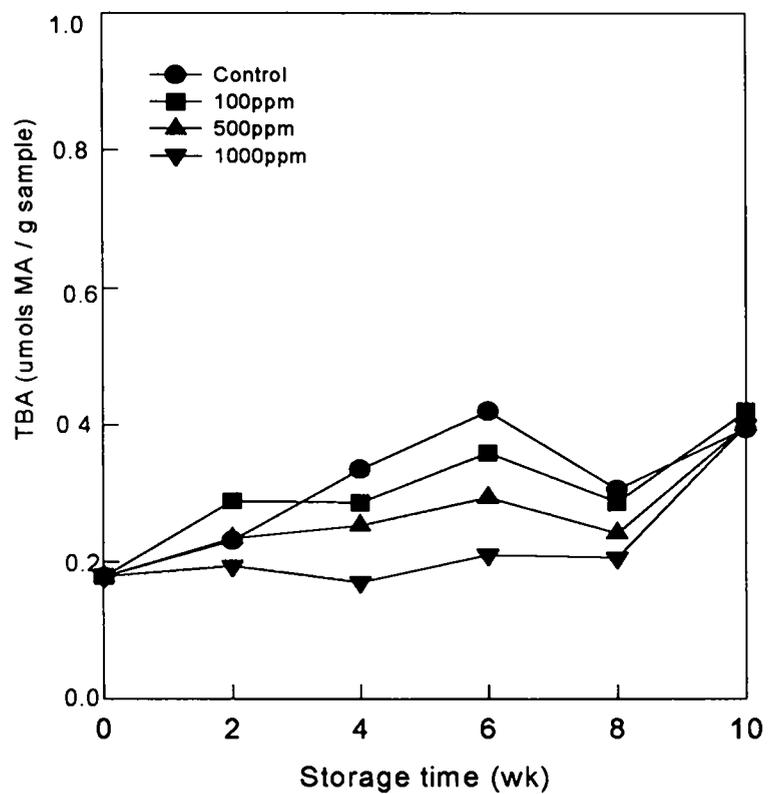


Fig. 13. Changes in TBA value of mayonnaise by addition of chitosan-50 during storage at 25°C

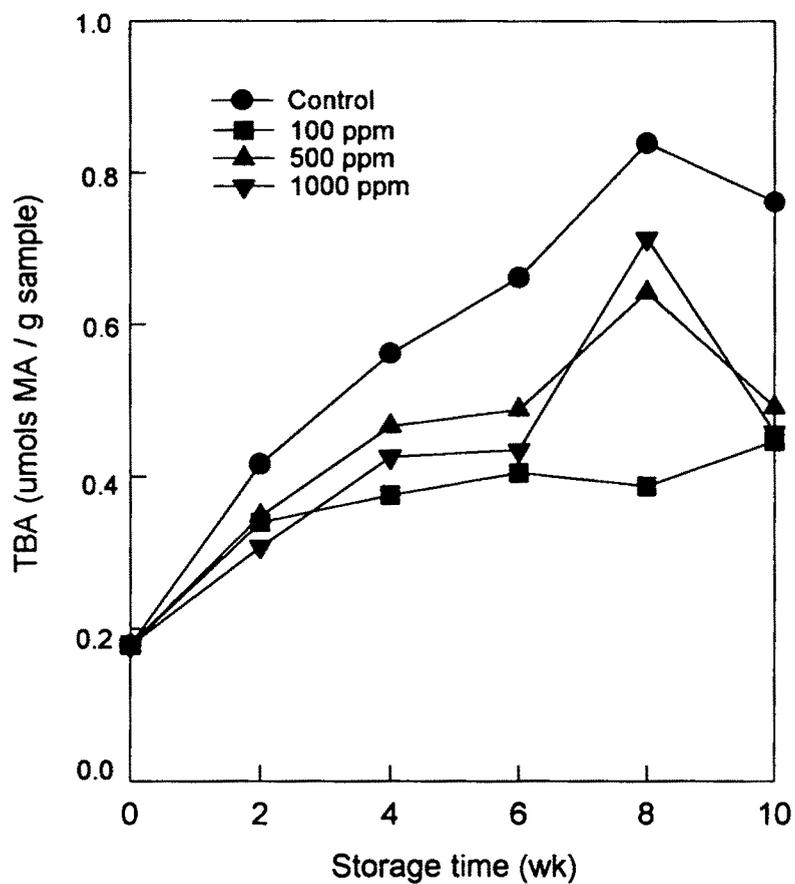


Fig. 14. Changes in TBA value of mayonnaise by addition of chitosan-50 during storage at 37°C.

그 자체가 소모되는 것으로 이들에변화에 의한 손실이 생성보다도 더 크
기 때문이라고 추측하였다.

3. 유화안정성

키토산을 농도별로 첨가하여 마요네즈를 제조한 후 두가지 저장온
도(25℃, 37℃)에서 저장하면서 키토산이 마요네즈의 유화안정성에 미
치는 영향을 조사한 결과는 Table 4와 같다.

25℃로 저장한 마요네즈의 경우 대조구와 키토산 첨가구 모두 10주
까지 유화능에 큰 변화를 나타내지 않아 유화력이 안정한 것으로 보여
지며, 이는 차 등의 마요네즈 제조시 난황 사용량에 따른 유화 안정성
의 비교실험에서 동결에 의한 유화 안정성 실험시 난황의 함량이 6.5%
이상일 경우 유화력이 안정하였으며, 진동에 의한 실험에서도 난황
5.0% 이상일 경우 안정하다고 하여 상온 유통시 본실험에서 제조한 바
와같이 7.5%의 난황함량을 보유한 마요네즈는 유화가 파괴되는데에 상
당한 시일이 소요될 것으로 보인다.

수평에 의하면 마요네즈의 유화가 파괴되는 원인으로서는 동결, 고온,
건조, 진동, 압력 등이 있다고 보고되고 있으나 마요네즈 제품의 유통
과정중에 일어날 수 있는 경우는 진동과 여름철 온도 상승에 따른 유화
안정성의 저하 등으로 보여지므로 이와 유사한 온도인 37℃에서 저장한
마요네즈의 경우 대조구와 키토산 첨가구 모두 6주까지는 유화능에 차
이가 나타나지 않았으나 8주 저장시 대조구는 약 40%의 기름이 분리되
어 유화가 파괴되었고 100ppm 첨가구는 10주가 경과한 후에도 유화된
마요네즈에서 큰 변화를 보이지 않았다. 그러나 키토산을 500ppm첨가한

마요네즈는 대조구와 같이 8주가 경과한 후 약 40%의 유화능이 감소하였다. 1000ppm의 경우는 8주까지는 큰 변화를 보이지 않았으나 8주 이후 부터는 감소하는 경향을 나타내었다. 이로 미루어 보아 마요네즈에 첨가한 키토산이 유화안정성에 기여할 수 있는 적정농도가 있는것으로 보여지며 이보다 많은량을 첨가 할 경우 오히려 유화안정성이 감소하는 경향을 보이고 있다. 이는 앞서 항산화능 실험에서와 같은 결과이며 유화물이 파괴되면서 물과 지방이 분리되고 이로인해 지방이 가수분해 되기 쉬운상태에 놓여 산패가 가속화 되어지는 것으로 사료되어진다.

Table 4. Effect of chitosan on the emulsion stability of mayonnaise

(Unit : %)

Storage temp. ($^{\circ}$ C)	Storage time (weeks)	Concentration of chitosan (ppm)			
		0	100	500	1000
25	0	100.00	100.00	100.00	100.00
	2	100.00	100.00	100.00	100.00
	4	98.66	98.39	97.96	97.95
	6	97.99	97.88	97.69	97.57
	8	97.61	97.94	97.50	98.28
	10	97.41	97.91	97.10	97.54
37	2	100.00	100.00	100.00	100.00
	4	97.76	98.14	97.84	98.65
	6	96.54	97.46	97.04	97.70
	8	61.77	96.04	66.99	93.38
	10	39.57	93.77	40.26	84.52

4. 점도측정

마요네즈의 점도는 유화도와 더불어 마요네즈의 물리적 품질특성을 결정하는 주요한 요인중의 하나이다. 키토산-50을 농도별로 마요네즈에 첨가했을 경우, 저장기간에 따른 마요네즈의 점도 변화는 Fig. 15 및 16과 같다.

마요네즈 제조 초기에 키토산을 첨가한 마요네즈가 대조구에 비해 점도가 더 높게 나타나 키토산을 첨가할 시 점도가 증가하는 것을 알 수 있었으며 키토산을 500ppm 첨가한 마요네즈의 점도가 약 $70 \times 10^3 \text{cp}$ 로 가장 높게 나타났다(Fig. 15). 마요네즈를 25℃로 저장한 경우 키토산 첨가농도에 따른 점도의 뚜렷한 차이를 보이지 않았으나 첨가구와 대조구 모두에서 초기 2주동안에 큰폭으로 감소하였으며 그 이후에는 서서히 감소하는 경향을 보였다.

마요네즈를 37℃로 저장한 경우는 앞서 25℃ 경우와 마찬가지로 처음 2주동안에 큰 폭으로 감소하였다가 6주까지는 서서히 감소하고 그후 다시 큰 폭으로 감소하는 경향을 보였다(Fig.16). 그러나 키토산을 100ppm 첨가한 마요네즈의 점도는 8주째에도 감소하지 않고 일정한 값을 유지하다가 10주째에 큰 폭으로 감소하였다. 이결과는 앞서의 과산화물가, TBA가 그리고 유화안정성에서와 마찬가지로 37℃로 저장한 마요네즈에서 키토산을 100ppm 첨가시 점도가 가장 높게 나타났다.

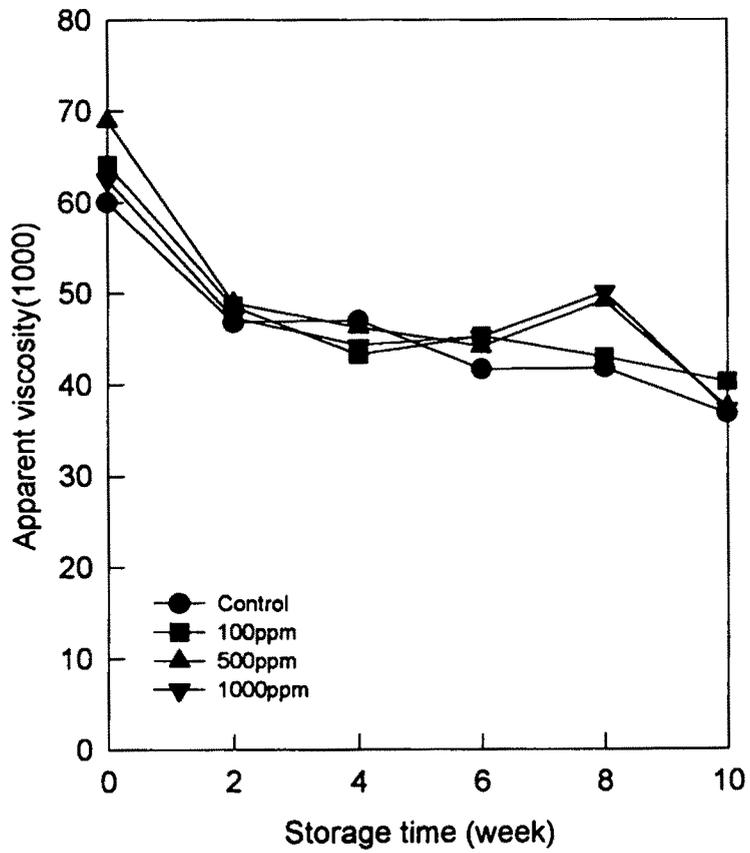


Fig. 15. Changes in viscosity of mayonnaise by addition of chitosan-50 during storage at 25°C.

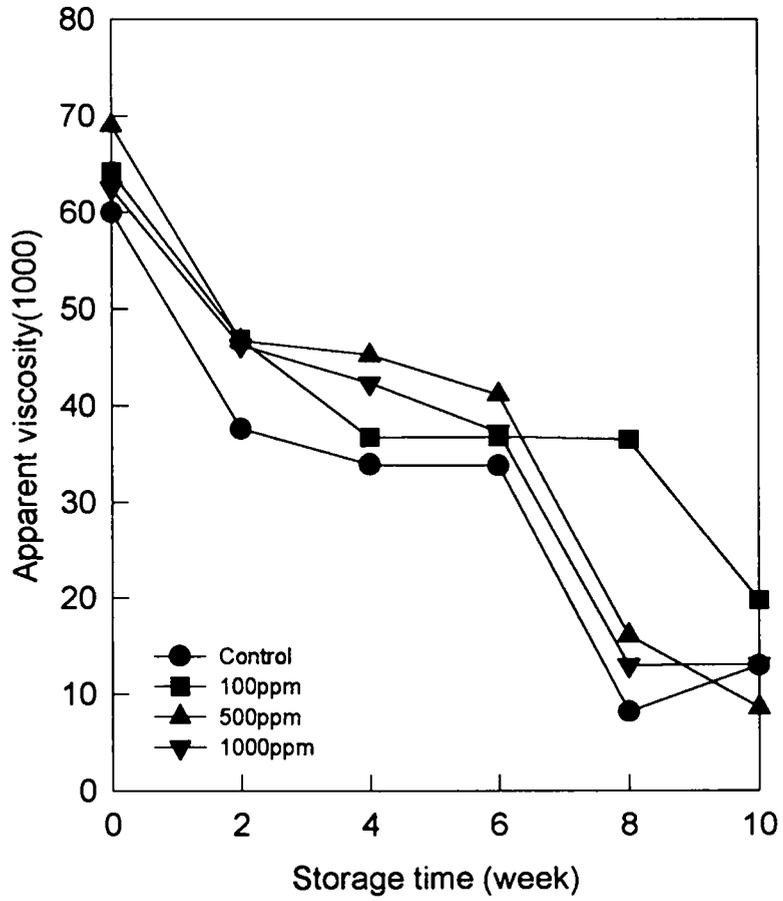


Fig. 16. Changes in viscosity of mayonnaise by addition of chitosan-50 during storage at 37°C.

제 2 절 미생물 challenge test 결과

*Lactobacillus fructivorans*와 *Zygosaccharomyces bailii* 모두에서 키토산 첨가 마요네즈 제조시 마요네즈 변질에 관여하는 *Lactobacillus fructivorans*와 *Zygosaccharomyces bailii*를 마요네즈 1g당 107 CFU를 인위적으로 첨가하고 키토산-50을 농도별로 첨가하여 25℃와 37℃에서 경시적으로 미생물의 변화를 측정 한 결과는 Fig. 17, 18과 같다.

*Lactobacillus fructivorans*와 *Zygosaccharomyces bailii* 모두에서 키토산 첨가구 뿐만아니라 대조구도 생균수가 감소하여 마요네즈 제조시 첨가한 초산과 NaCl에 의해서도 많은수의 미생물이 감소하는 것을 알 수 있었다.

*Lactobacillus fructivorans*의 경우 25℃에서 4주 저장시 대조구가 1.1×10^4 CFU/ml 성장한 반면 키토산-50을 100ppm 첨가시 7.0×10^2 CFU/g까지 감소하여 적은양의 키토산만을 첨가하여도 효과를 나타내는 것으로 보인다(Fig. 17). 또한 키토산 1000ppm을 첨가시 32CFU/g를 나타내어 대부분의 미생물이 키토산에 의해 성장에 저해를 받은 것으로 사료되어진다.

한편, 25℃의 경우 전반적으로 미생물의 감소속도가 3주까지 완만하게 진행되어 계속적으로 감소하는 경향을 보여주고 있으나 37℃의 경우 대조구와 키토산 첨가구의 경우 미생물이 3주까지 계속 감소하다가 3주가 지나면서부터 다시 성장하거나 일정하게 유지하는 경향을 나타내고 있어 키토산만을 첨가하여 미생물을 사멸시킬 수 없는 것으로 사료되어진다.

키토산 농도별 첨가 효과를 보면 25℃의 경우 처음 1주째에 큰 차이를 나타내 대조구와 키토산 1000ppm 첨가구와의 차이가 약 10^3 CFU/g를 나타내 계속 이와같은 경향을 유지하는 것으로 보인다. 37℃의 경우 키토산 농도별 효과는 3주까지는 큰 차이를 나타내지 않고 대조구에 비해 전반적으로 미생물 감소효과를 나타냈다.

이와같은 경향은 *Zygosaccharomyces bailii*에서도 유사하게 나타나 25℃의 경우 전반적으로 미생물의 감소속도가 3주까지 완만하게 진행되어 계속적으로 감소하는 경향을 보여주고 있으나 37℃ 대조구의 경우 3주까지 완만하게 감소하다가 3주이후에 다시증가하는 경향을 나타냈으나 키토산 첨가구의 경우 미생물이 2주까지 급속히 감소하다가 더 이상 감소하지 않고 일정한 수준을 유지 하는 것으로 나타났다(Fig. 18).

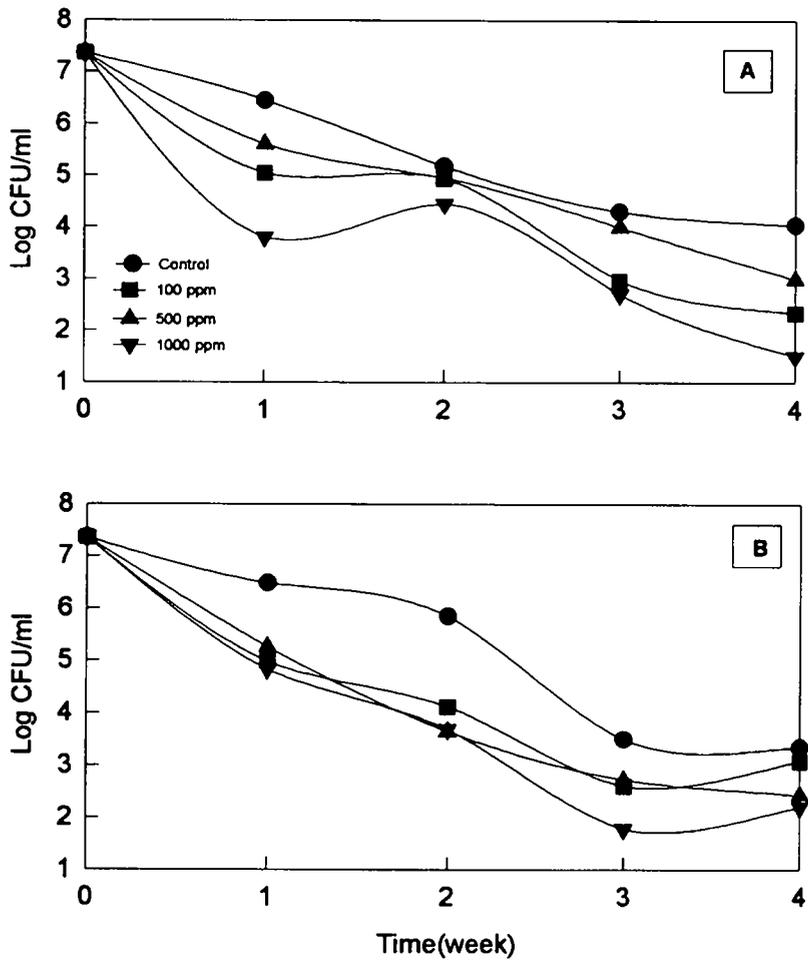


Fig. 17. Changes in *Lactobacillus fructivorans* of mayonnaise by addition of chitosan-50 during storage at 25°C(A) and 37°C(B).

키토산 농도별 첨가 효과를 보면 25℃의 경우 처음 1주째에 큰 차이를 나타내 대조구와 키토산 1000ppm 첨가구와의 차이가 앞서 *Lactobacillus fructivorans* 유사하게 약 10^3 CFU/g를 나타내 계속 이와 같은 경향을 유지하는 것으로 보인다. 37℃의 경우 키토산 농도별 효과는 3주까지는 큰 차이를 나타내지 않고 대조구에 비해 전반적으로 미생물 감소효과를 나타냈다.

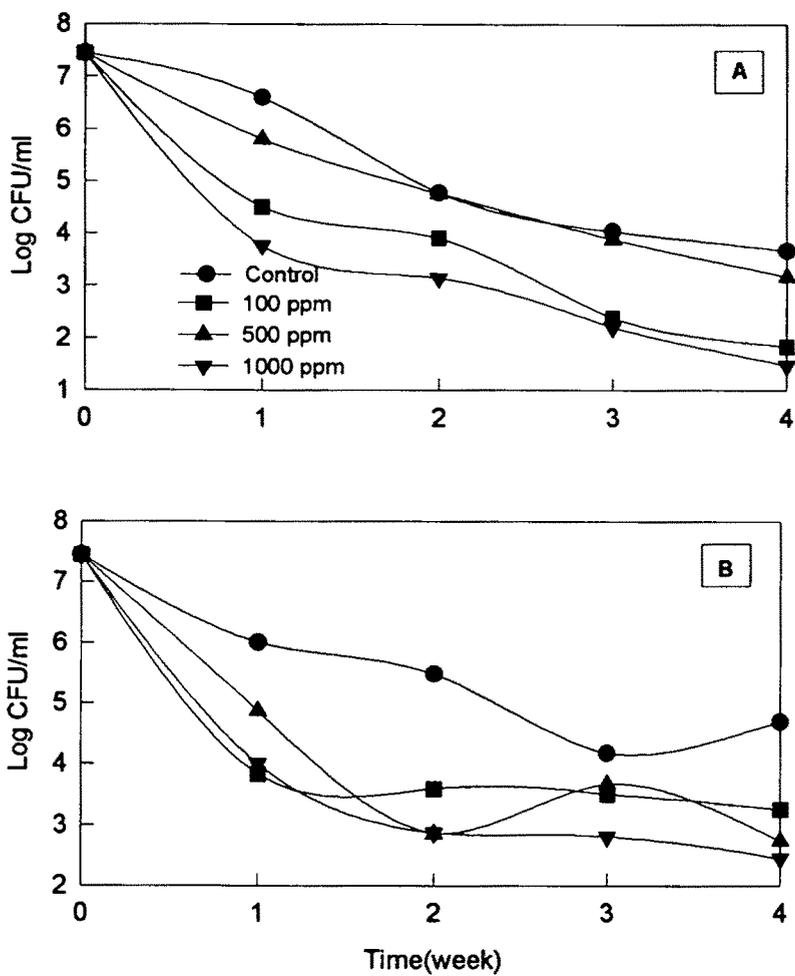


Fig. 18. Changes in *Zygosaccharomyces bailii* of mayonnaise by addition of chitosan-50 during storage at 25°C(A) and 37°C(B).

제3절 결 론

본 연구에서는 키토산을 분자량 별로 제조하여 향미생물 작용이 가장 좋게 나타난 분자량의 키토산을 마요네즈에 첨가하여 25℃ 및 37℃에서 저장중 안정성 변화를 조사하여 키토산 첨가가 마요네즈 제품의 품질향상을 증진시킬 수 있는지의 여부를 연구하였다.

키토산 첨가에 따른 항산화능 실험에서 과산화물가는 25℃에서는 대조구와 첨가구 모두에서 큰 차이가 없었으나 37℃로 저장한 경우 키토산을 100ppm 첨가한 경우가 500ppm과 1000ppm 보다 오히려 항산화 효과가 뛰어난 것으로 나타났다. 키토산-50을 첨가한 마요네즈의 TBA 값의 변화의 경우도 37℃로 저장한 대조구의 경우 초기에 급속히 증가한 후, 6주 후부터 일정한 값을 유지한 반면 키토산-50 첨가구중 100ppm을 첨가한 마요네즈는 거의 변화를 보이지 않아 앞서 과산화물가와 같은 경향을 보여주고 있다.

키토산 첨가에 따른 유화안정성의 경우 25℃에서는 큰변화가 없었으나 37℃에 저장한 마요네즈의 경우 키토산을 500ppm과 1000ppm 첨가시 약 6주에서 8주 사이에 큰 폭으로 감소하였으나 100ppm 첨가구는 10주가 경과한 후에도 유화된 마요네즈에서 변화를 보이지 않아 마요네즈에 첨가한 키토산의 유화안정성에 기여할 수 있는 적정농도가 있는 것으로 보여지며 이보다 많은량을 첨가 할 경우 오히려 유화안정성이 감소하는 경향을 보였다.

키토산을 첨가한 마요네즈의 점도 변화는 제조초기 대조구에 비해 점도가 더 높게 나타나 키토산을 첨가할 시 점도가 증가하는 것을 알 수 있었으며 키토산을 500ppm 첨가한 마요네즈의 점도가 약 $70 \times 10^3 \text{cps}$ 로 가장 높게 나타났다.

마요네즈의 미생물 challenge test에서 *Lactobacillus fructivorans*는 키토산을 1000ppm 첨가시 32 CFU/g를 나타내어 대부분의 미생물이 키토산에 의해 사멸되거나 성장에 저해를 받은 것으로 사료되어진다.

*Zygosaccharomyces bailii*에서도 앞서와 유사한 경향이 나타나 25℃의 경우 전반적으로 미생물의 감소속도가 3주까지 완만하게 진행되어 계속적으로 감소하는 경향을 보여주고 있으나 37℃ 대조구의 경우 3주까지 완만하게 감소하다가 3주이후에 다시증가하는 경향을 나타냈으나 키토산 첨가구의 경우 미생물이 2주까지 급속히 감소하다가 더 이상 감소하지 않고 일정한 수준을 유지하는 것으로 나타났다.

Ⅲ. 키토산 동치미 쥬스의 개발 및 특성조사

제 1 장 서 론

동치미는 발효과정에 의해 생성한 유기산의 새콤한 맛과 탄산가스의 청량감과 적절한 짠맛이 어우러지고 차갑고 시원한 느낌 등이 잘 조화된 식물성 액상 발효 식품이라고 할 수 있다. 또한 동치미는 일반 김치와는 달리 고추 등 자극성 향신료나 특이한 짠 젓갈류 등을 사용하지 않고 물을 다량으로 넣고 발효시켜 만들기 때문에, 채소 고유의 담백한 맛이 우리 나온 맵지도 않고 그다지 짜지도 않은 일종의 물김치이므로 발효성 음료에 가까워, 우리 나라 사람들 뿐만 아니라 외국인들에게도 기호성이 높을 수 있어 앞으로 건강음료나 발효음료로서의 개발이 기대되고 있다.

동치미에 관련된 연구는 배추김치에 비하여 많이 이루어져 있지 않으며 발표된 동치미의 연구 내용으로는 동치미의 발효 과정 중 산화환원전위의 변화, 동치미의 맛성분, 비휘발성 유기산의 분석과 숙성 온도에 따른 변화, 열처리와 염첨가의 저장성 효과, 열수담금 및 염혼합물 첨가의 병용 효과, 동치미의 발효중 물리적, 화학적, 관능적 성질의 변화, 동치미의 발효 숙성에 미치는 소금 농도의 영향, 양파 및 감초 첨가가 동치미의 발효 숙성에 미치는 영향, 동치미 발효와 이에 관여하는 젖산균의 분리 동정 및 인삼을 첨가한 동치미쥬스의 품질특성에 관한 연구 등이 있다.

정은 동치미 발효 중 산도, pH 및 산화 환원 전위를 조사하여 산도는 16℃에서 7일째에 lactic acid로 0.31%에 달하고 pH는 3.4까지 저하되며 발효 초기가 말기보다 호기적 상태임을 밝힌 바 있다. 김은 혐기적 조건하에서 숙성이 가능하도록 김칫독을 개량한 후 실험하여 산도, pH, 유리당의 변화를 관찰하였고, 이와 이는 맛있는 동치미 담금법을 찾기 위한 관능검사 및 유기산을 분석하였으며, 강 등은 열처리와 소금 첨가가 동치미의 발효에 미치는 영향에 관해 연구하였고, 동치미는 숙성 온도 및 염도등의 조건에 따라 적숙기 및 관능적 기호성이 달라진다고 여러 연구들에서 제시하고 있다.

동치미의 미생물을 분리 동정한 황에 의하면 동치미 숙성과정중에 초기 호기성세균인 *Pseudomonas*속, 통성혐기성세균인 *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*가 나타나고 중기에는 *Leuconostoc mesenteroides*와 *Pseudomonas denitrificans*가 우세하며 이중 후자가 비타민 B12 생산성이 있는 것으로 보고한 바 있다. 그 후 오와 안도 동치미에서 젖산균을 분리동정하여, *Leu. mesenteroides*, *Lac. plantarum*, *Lac. brevis*, *Pediococcus pentosaceus* 및 *Streptococcus faecalis*의 5종을 보고하였다. 또한 박은 동치미의 발효와 이에 관여하는 젖산균을 분리 동정하였는데 *Leu. mesenteroides*, *Leu. dextranicum*, *Lac. plantarum*, *Lac. bavaricus*, *Lac. sake*, *Pediococcus pentosaceus*, *Streptococcus faecalis*의 7개 균종이며 특히 *Leu. mesenteroides*와 *Lac. plantarum*의 2균종이 발효온도 및 기간 별로 차이는 있으나 80%~100%를 차지하고 있다고 보고하였다.

최근 키토산은 미생물의 성장을 억제하여 식품 보존제로써 이용이 가능하다는 연구가 보고되었고, Kendra 와 Hadwiger은 키토산 가수분해물이 식품 병원성 곰팡이인 *Fusarium solani*의 생육을 저지시키는 효과가 있으며, 内田는 키토산이 *E. coli*와 *Staphylococcus aureus* 및 유산균에 항균력이 있음을 보고하였다. 이러한 키토산의 항균작용 메카니즘은 양전하를 가진 키토산의 아미노기가 세균 세포벽의 음전하와 이온결합을 형성하여 세포분열을 저해함으로써 세균의 성장을 억제하는 것으로 추정된다.

김치와 관련된 키토산의 연구로서는 김과 강의 깍두기 보존성에 미치는 효과와 이와 이의 무우의 염장과정 중의 조직감 변화에 대한 효과, 김 등의 저분자 키토산이 배추김치 모델시스템의 보존성에 미치는 영향, 노 등의 소금절임시 키토산 첨가가 김치의 보존성에 미치는 효과 등 몇 편의 연구가 있다.

본 연구에서는 동해에서 어획되는 홍게(*Chitinonecetes opilio*)껍질을 약산, 약알칼리로 처리하여 공업적으로 생산된 조키토산을 구입하여 우리나라 식품첨가물 규격에 맞는 70% 탈아세틸화도를 갖는 키토산을 제조하여 키토산의 물리화학적 특성 및 동치미 발효 미생물에 대한 생육억제 효과를 조사하여 천연 기능성 보존제로서의 가능성을 검토하고자 하였다. 또한 미생물 생육억제 효과가 가장 큰 키토산을 선정하여 동치미 제조시에 첨가한 후 동치미의 발효 속성중 발효온도별로 경시적으로 동치미쥬스와 무우에 대하여 물리화학적 특성 변화와 미생물의 생균수조사 및 관능검사를 실시하였다.

제 2 장 재료 및 방법

제 1 절 재료 및 시약

홍게(*Chitinonectes opilio*) 껍질로부터 계살을 제거하고 난 껍질을 약알칼리와 약산으로 처리하여 얻어진 키틴(회분함량 3.5%)을 동우실업(강원도 속초시 소재)으로부터 구입하였으며, 분쇄하지 않은 상태(1cm×4~5cm, W×L)로 Fig. 19와 같이 정제하여 사용하였으나 필요한 경우에는 cutting mill(동양과학)을 이용하여 0.5cm×0.5cm (W×L)이하로 분쇄하여 사용하였다. 동치미 제조에 사용한 소금은 한주로부터 구입하여 사용하였고 NaOH는 식품공업용을 사용하였으며 다른 분석용 시약은 Merck사나 Fluka사의 GR급을 사용하였다.

제 2 절 실험방법

1. 동일한 탈아세틸화도를 갖는 키토산의 제조

키틴 160g을 미리 정하여진 온도로 예열한 50%(w/v) NaOH용액 4ℓ에 가한 후에 교반하면서 탈아세틸화 조건으로 가열온도와 시간은 100℃에서는 6시간까지, 120℃와 140℃에서는 1시간까지 처리하면서 일정시간 간격으로 시료를 취해서 NaOH용액을 제거하고 증류수로 중화될 때까지 6~8회 정도 세척한 후 50℃에서 하룻밤동안 열풍 건조하여 키토산을 제조하였다(Fig. 19).

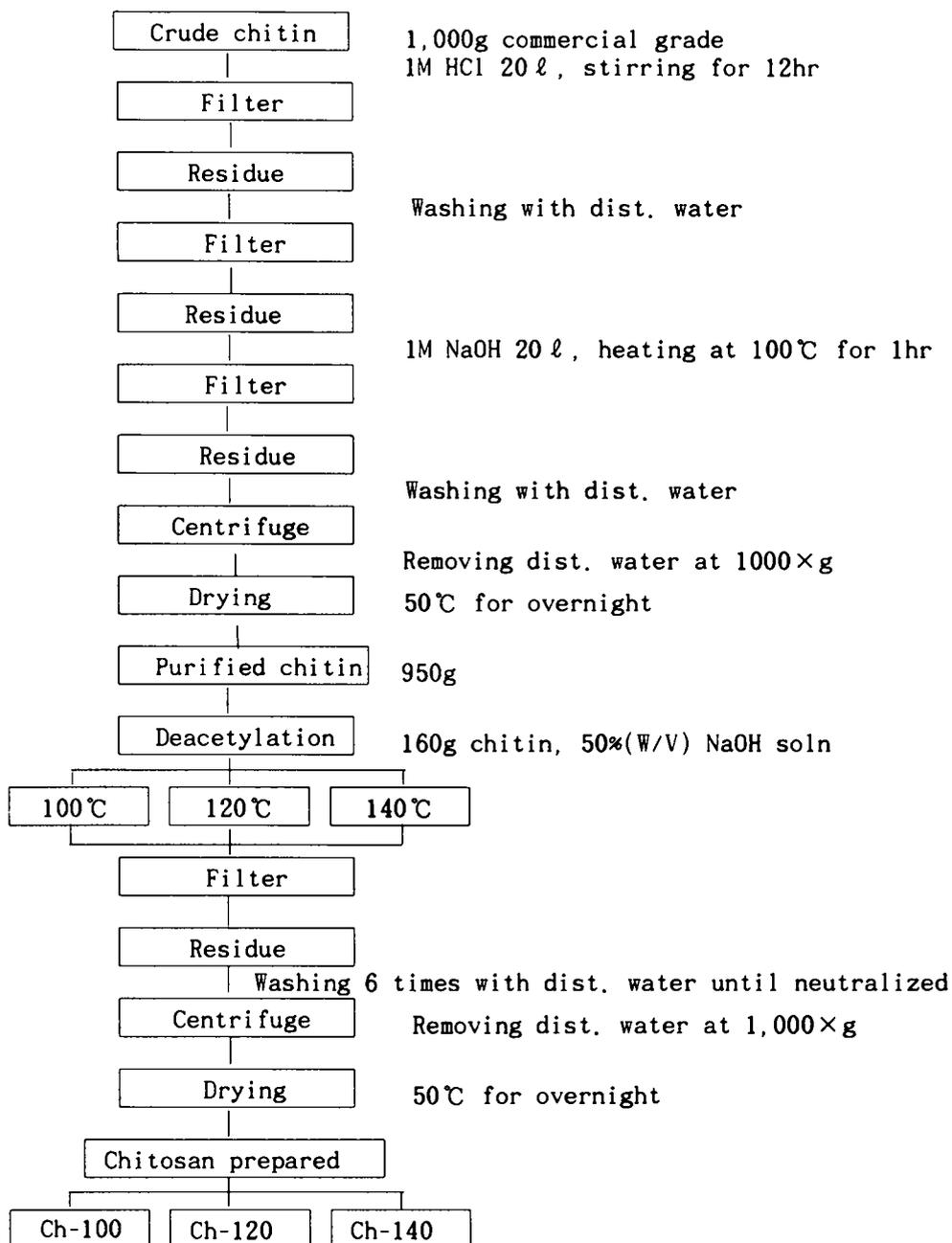


Fig. 19. Schematic diagram for preparation of chitosan from chitin.

2. 키토산의 물리화학적 및 미생물학적 특성 측정

가. 화학적 성질

1) 일반성분의 측정

식품첨가물공전에 준하여 수분함량은 105℃ 상압가열건조법으로, 회분함량은 550℃ 회화법으로 측정하였으며 질소함량은 micro-Kjeldahl법으로 정량하였다.

나. 물리적 성질

1) 점도의 측정

Brookfield viscometer (model RVTDV-II, Brookfield Engineering Lab., Inc., Stoughton, MA)를 사용하여 키토산시료를 1%(v/v) 초산용액에 0.5%(w/v)가 되도록 녹여서 LV3 type spindle을 사용하여 30, 60rpm에서 각각 3회씩 측정하고 평균값을 사용하였다.

2) 분자량 측정

분자량 측정은 고분자화합물의 분자량측정법으로 일반적인 점도법에 의거하였다. 점도는 키토산을 초산 수용액에 녹여 Ubbelohde형 점도계에서 모세관 속을 시료액이 통과하는 시간을 측정하여 용액의 낙하시간을 용매의 낙하시간으로 나눈 상대 점도로 표기하였다. 키토산 0.4g을 0.2M acetic acid + 0.1M NaCl + 4M urea 수용액에 용해하여 100ml로 하여 0.4% 키토산 용액을 제조하고 이 용액을 acetic acid, NaCl, urea의 혼합용액으로 키토산 농도

가 1/64로 될 때까지 반복 희석하여 7종류의 용액을 만들어 냉암소에 10일간 방치하여 평형화시켰다. 이 때, 항온조의 온도는 25℃로 설정하였다

분자량 측정은 극한 점도로부터 분자량을 추정할 수 있는 Staudinger식에 적용시켜 계산하였다.

다. 젖산균 생육 억제 효과의 조사

키토산 용액은 키토산 1.0g을 증류수 100ml를 가하여 멸균시킨 다음 acetic acid 0.5ml을 가해 용해시킨 무균상태의 용액을 사용하였다. 동치미 발효에 관여하는 대표적인 주요 젖산균인 *Leuconostoc mesenteroides*와 *Lactobacillus plantarum*은 세종대학교 식품공학과 미생물 연구실에서 분양받아 사용하였다. 키토산을 5배 희석한 MRSB배지에 첨가하여 각각 10, 20, 30, 40ppm이 되도록 30℃에서 24시간 배양하면서 경시적으로 생균수를 측정하였다. 생균수의 측정은 *L. plantarum*은 sodium azide-glucose agar배지에 *L. mesenteroides*는 sodium azide-sucrose agar배지에 평판주개법으로 접종하여 30℃에서 24시간 배양 후 colony수를 측정하였다.

3. 키토산이 첨가된 동치미의 제조

가. 동치미의 제조

동치미 무우(품종 : 태백)는 가락동 농산물 시장에서 구입하여 무우청 부분을 제거한 뒤 깨끗이 세척하고 물기를 제거한 후 세로로 1/4씩 쪼개어 사용하였다. 동치미 담금액은 증류수를 이용하여 초기 소금

농도가 3.0%가 되도록 소금용액을 만들고 무우와 소금용액의 비율이 1:1(w/v)이 되도록 담그었고 양념은 파, 마늘, 생강을 무우 무게 당 각 1.0%, 0.5%, 0.2%의 비율로 해서 cheese cloth에 싼 후 담금액에 첨가하였다. 동치미는 4, 10 및 20℃에 저장하면서 7일에서 49일까지 발효시켰고 일정시간 마다 담금액을 취하여 동치미 주스의 pH, 적정산도, 총균수 및 젖산균수 등을 측정하였다.

나. 키토산 동치미 담금액 제조

본 실험에서는 소금농도가 3.0%인 소금물 100ml에 키토산 5g과 0.3% acetic acid를 첨가한 후 30분간 초음파처리하여 키토산을 용해시킨 후 이 용액을 동치미에 첨가하여 최종 키토산 농도가 500, 1000ppm이 되도록 조정하였다. 또한 acetic acid 첨가 대조구는 3.0% 소금물에 acetic acid를 첨가하여 acetic acid의 최종농도가 300ppm이 되도록 제조하였다.

다. 동치미 시료의 조제

동치미 담금액(liquid)을 3겹의 cheese cloth로 여과하여 동치미 주스(dongchimi juice) 시료로 하였고, 동치미 무우는 Blender(34BL97, U.S.A)로 마쇄하고 5,000×g에서 20분간 원심 분리시킨 다음 상등액을 3겹의 cheese cloth로 여과하여 부유 물질을 제거한 후 동치미 무우 즙액(dongchimi radish juice) 시료로 하였다.

4. 키토산이 첨가된 동치미의 발효 특성 측정

가. 물리화학적 특성

1) 동치미의 pH 및 적정산도

각 여과액의 pH는 pH meter(Dong Woo Medical System, Model DP-215M) 로 실온에서 측정하였다. 적정산도는 동치미 주스 10.0 ml를 취하여 A.O.A.C방법에 의해 중화시키는 데 소비된 0.1N NaOH 용액(ml)을 젖산의 양(%)으로 환산하였다

2) 염도의 측정

동치미 담금액과 무우 즙액(radish juice)의 소금농도는 염분 농도계(NS-3p, Merbabu Trading Co., Japan)로 측정한 뒤, 염분 농도계와 Mohr법으로 측정한 소금 농도간의 표준 곡선을 이용하여 소금 농도를 결정하였다.

3) 탁도의 측정

동치미 담금액의 탁도는 Beckman DU 650 Spectrophotometer를 사용하여 파장 558nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) 무우의 경도 측정

동치미 무우의 경도 측정은 세로(길이)로 반(1/2)자른 무우를 위 중간 아래 등으로 3등분하여 표피에서 1cm 되는 부위를 2cm 두께로 절단하여 Rheometer (CR-200D, Sun Scientific Co, Japan)를 사용하여 측정하였다. Press type(mode II)에 의해 Rheometer의 조작 조건은 pull scale의 힘의 무게는 10kg, chart speed는 10mm/min, table speed는 120mm/min이었다. 무우의 hardness의 측정치는 무청 부분으로부터 3등분하여 각각 upper, middle, lower로 구분하여 각각 4회 반복 측정한 평균치로 표시하였다.

나. 미생물학적 특성

1) 총생균수 및 젖산균수 측정

동치미 시료 1.0ml을 무균적으로 취하여 멸균된 증류수에 적절히 희석한 후 총생균수는 PCA배지에, *Lactobacillus*속 젖산균은 sodium azide-glucose agar에, 그리고 *Leuconostoc*속 젖산균은 sodium azide-sucrose agar에 평판주거법에 의해 측정하였는데 총균과 *Leuconostoc*속 젖산균은 30℃에서 48시간 배양한 후 나타난 집락수를 1ml당 colony-forming unit(CFU/ml)로 표시하였고, *Lactobacillus*속 젖산균의 경우는 30℃에서 72시간 배양한 후 나타난 집락수를 CFU/ml로 표시하였다.

다. 관능검사

키토산의 농도를 달리하여 500ppm 및 1000ppm을 첨가한 동치미, acetic acid만 첨가한 동치미 및 아무것도 첨가하지 않은 동치미를 4, 10 및 20℃에서 각각 발효시키면서 발효 과정 중 일어나는 관능적 성질 변화를 알아보기 위하여 경시적으로 동치미 액과 무우의 냄새, 맛 그리고 전체적인 기호도를 평가하였다. 각 시료의 관능적 특성은 관능 요원들에게 느끼는 대로 특성을 묘사하게 한 뒤 냄새(신내, 군덕내, 덜익은 내, 새콤한 내)와 맛(신맛, 군덕맛, 덜익은 맛, 새콤한 맛, 짠 맛), 그리고 기호도의 10가지 묘사를 선정하였고 동치미 무우는 texture(crispness, chewness)의 2가지 묘사를 추가하였다. 시료의 온도는 상온으로 하였으며 각 특성의 강도 평가는 다시료 비교법에 의한

9점 채점법으로 하였다. 관능검사 결과의 유의성 검정은 분산 분석 (ANOVA)법에 의하였고 각 시료간의 묘사별 유의성은 Duncan의 방법에 따라 평균간의 다중비교를 실시하였다.

제 3 장 결과 및 고찰

제 1 절 키토산의 물리화학적 및 미생물학적 특성

1. 물리화학적 성질

가. 일반 성분 분석

홍게(*Chitinonecetes opilio*)에서 유래한 조키틴과 정제키틴 및 동일한 탈아세틸화도를 갖는 키토산의 수분함량, 회분함량 및 질소함량의 측정결과는 Table 5와 같다. 78%의 동일한 탈아세틸화도를 갖는 키토산은 50% NaOH에서 100℃에서는 6시간, 120℃에서는 20분, 140℃에서는 10분간 반응시켜 제조하였으며, 본 실험에서는 각각 Ch-100, Ch-120, Ch-140이라 칭하였다. 수분함량은 조키틴 8.93%에서 정제키틴 7.96%로 1%정도 감소하였고 키토산은 8.45~8.69%로 약간 증가하였으나, 시료간 큰 차이는 나타나지 않았다.

회분함량은 조키틴 4.05%에서 정제키틴 2.45%로 상당히 감소되었고 키토산은 0.55~0.86%로 저하되었다. 정은 키틴의 회분 함량이 2.2%, 시판키토산 0.49%라 보고하였고 김은 키틴 2.15%, 키토산 0.46~1.16%라고 보고하였는 바 본 실험과 유사하였다. 질소함량은 정제 키틴 6.49%에서 키토산은 6.96~6.72%로 약간 증가하는 경향이였다. 정은 질소함량이 붉은 대게로 제조한 키토산의 질소함량이 7.45%이었고, 시판 키토산이 6.72%로 보고하였고, 김도 키틴 6.48%, 키토산 6.53~7.15%로 보고하여

본 실험과 유사한 경향을 나타내었다.

Table. 5. Proximate composition of chitin and chitosan obtained from *Chitinonecetes opilio*

(Unit : %)

Chitin, Chitosan	Moisture	Ash	Nitrogen
Crude chitin	8.93	4.05	6.01
Purified chitin	7.96	2.45	6.49
Chitosan-100	8.45	0.55	6.96
Chitosan-120	8.74	0.67	6.91
Chitosan-140	8.69	0.86	6.72

Chitosan-100 : obtained at 100℃ for 6hrs

Chitosan-120 : obtained at 120℃ for 20min

Chitosan-140 : obtained at 140℃ for 10min

나. 분자량

Ubbelohde 점도계로 점도를 측정하여 극한 점도를 산출하고 분자량을 계산한 결과 Ch-120는 분자량이 약 852,000으로 가장 크게 나타났고 Ch-100이 746,000, 키토산-140이 336,500을 나타내어 가장 작은 분자량을 보였다.

즉, 반응온도가 높을수록 분자량이 감소하는 경향을 보였다. 이는 아세틸 결합은 안정해서 낮은 온도에서 장시간 반응시키는 것보다는 높

은 온도에서 격렬하게 탈아세틸화반응이 일어나는 것으로 추정할 수 있다.

2. 젖산균 생육억제 효과

동치미 발효의 대표적인 젖산균으로 알려진 *Leuconostoc mesenteroides* 및 *Lactobacillus plantarum*에 대하여 제조한 키토산의 종류와 농도에 따른 항미생물 작용을 조사하였다.

가. *Leuconostoc mesenteroides*의 생육 억제

*L. mesenteroides*에 대한 항균작용 실험결과 Ch-100은 10, 20, 30ppm에서는 무첨가 대조구와 거의 유사하였으나, 40ppm에서는 초기 4시간까지는 생육을 억제시켰으며 그 후 생육이 증식되어 24시간 후에는 무첨가구와 동일해졌다. Ch-120도 10ppm과 20ppm에서는 Ch-100과 유사하였으며, 30ppm에서 초기에 약간의 생육을 지연시켰을 뿐 거의 억제효과가 없으며, 40ppm에서는 Ch-100과 같이 초기 8시간까지는 증식을 억제시켰다. Ch-140은 10ppm, 20ppm에서는 무첨가구와 차이가 없었으나 30ppm에서는 억제작용이 현저하여 24시간후에 무첨가구가 6.3×10^8 CFU/ml에 비해 5.0×10^6 CFU/ml로 억제 작용이 인정되었다. 40ppm에서는 초기 1×10^5 CFU/ml의 생균수가 4시간째에는 2.5×10^4 CFU/ml로 격감하여 살균작용이 확인되었으며 그 후 서서히 증가하였지만 24시간째에도 6.3×10^6 CFU/ml에 불과하였다.

이상과 같이 *L. mesenteroides*의 생육억제작용은 Ch-140이 가장 우수하였으며 40ppm이상에서는 항미생물작용이 확인되었다.

나. *Leuconostoc*속 젖산균수의 변화

*L. plantarum*의 경우, 생육저해 경향은 *L. mesenteroides*와 유사하였으나 저해효과는 전반적으로 약간 미흡한 것으로 나타났다.

Ch-100, Ch-120 및 Ch-140 공히 10ppm과 20ppm의 농도에서는 무첨가구와 차이가 전혀 인지되지 않았으나 30ppm에서는 Ch-140만이 저해작용을 보였다. 즉 Ch-140의 30ppm 첨가구에서는 8시간 동안은 증식되지 않았으며 그 후는 완만히 증가하여 24시간 때에는 다른 시험구와 비슷하게 10^9 CFU/ml로 증가하였다. 그러나 40ppm 첨가구에서는 현저한 차이를 보였는데 Ch-140은 12시간째까지는 10^5 CFU/ml에서 10^3 CFU/ml로 감소시켰고, 그 후에도 24시간까지도 *L. plantarum*에 대하여 생육을 억제시킨다고 볼 수 있다. 본 실험에서 제조된 세가지 키토산 중 Ch-140이 *L. mesenteroides*와 *L. plantarum*의 생육저해작용이 우수한 것으로 판단되어 앞으로의 동치미 발효에 첨가할 키토산의 시료로서 선정하였다.

제 2 절 키토산이 첨가된 동치미의 발효 특성

1. 물리화학적 특성

가. pH 변화

각각 발효온도 4, 10 및 20℃에서 키토산 농도를 달리하여 첨가한 동치미 액의 pH 변화를 Fig. 20~22에 나타내었다. 실험군들 간의 pH를 비교하면 발효 초기에는 예상했던 바와 마찬가지로 acetic acid만을 첨가한 군이 다른 군들에 비해 pH가 유의적으로 낮았고, 전 발효기간을

통해 키토산 첨가균들이 대조군에 비해 비교적 높은 값을 나타내는 경향을 보이다가 발효말기가 되면서 대조구와 거의 비슷한 pH로 떨어졌다. 4℃에서 발효시킨 경우 대조구는 11일째에 적숙기 pH 4.2에 도달한 데 비해 chitosan 500ppm 첨가 동치미액은 25일째에 적숙기에 도달하였고 chitosan 1000ppm 첨가 동치미액은 발효 49일까지도 적숙기의 pH 4.2에 도달하지 못하였다. 10℃ 발효에서는 대조구는 발효 9일째에, 500ppm 키토산 첨가구는 17일째에, 그리고 1000ppm 키토산 첨가구는 18일째에 적숙기 pH에 도달하였다. 20℃ 발효에서는 대조구는 발효 2일째에, 500ppm 키토산 첨가구는 3일째에, 그리고 1000ppm 키토산 첨가구는 5일째에 적숙기의 pH에 도달하였다. 일반적으로 모든 온도에서 키토산 첨가구는 대조구에 비해 pH가 전반적으로 느리게 떨어지는 경향을 보였다.

동치미 무우즙액의 pH를 측정한 결과(Figs. 23~25) 4℃ 발효의 경우 대조구는 35일째에 적숙기에 도달하였으나 chitosan 첨가구는 49일째에서도 적숙기보다 높은 pH를 유지하였다. 10℃에서 발효시켰을 때는, 대조구가 적숙기 pH에 도달하는데 15일이 소요되었음에 비하여 chitosan 첨가구는 21일째에 적숙기 pH에 도달하였다. 20℃에서 발효시킨 경우 대조구는 4일째에 적숙기 pH에 도달하였으나 chitosan첨가구는 6~7일째에 도달하였다. 이상과 같은 결과로부터 전반적으로 chitosan첨가구가 대조구에 비해 pH가 높은 경향을 보여 chitosan의 첨가가 동치미액과 마찬가지로 동치미 무우즙에서도 pH저하를 억제함을 알 수 있었고 그 효과는 chitosan의 농도가 높을수록 유효함을 추정할 수 있었다.

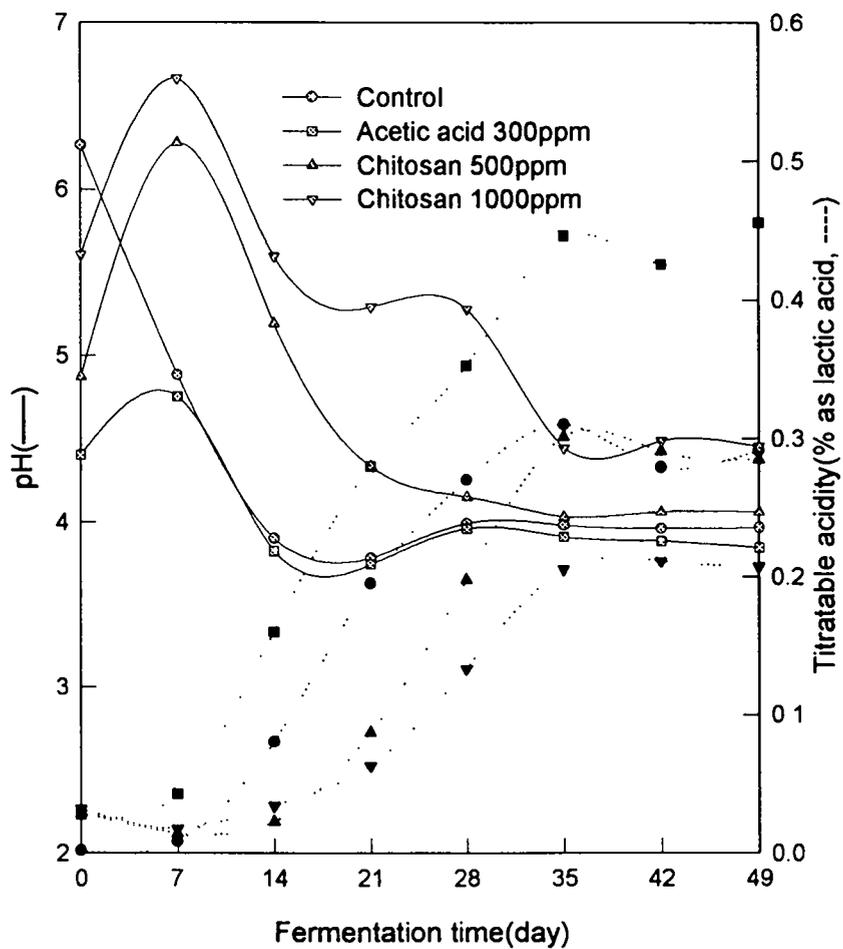


Fig. 20. Changes in pH and titratable acidity of dongchimi juice during fermentation at 4°C for 49 days.

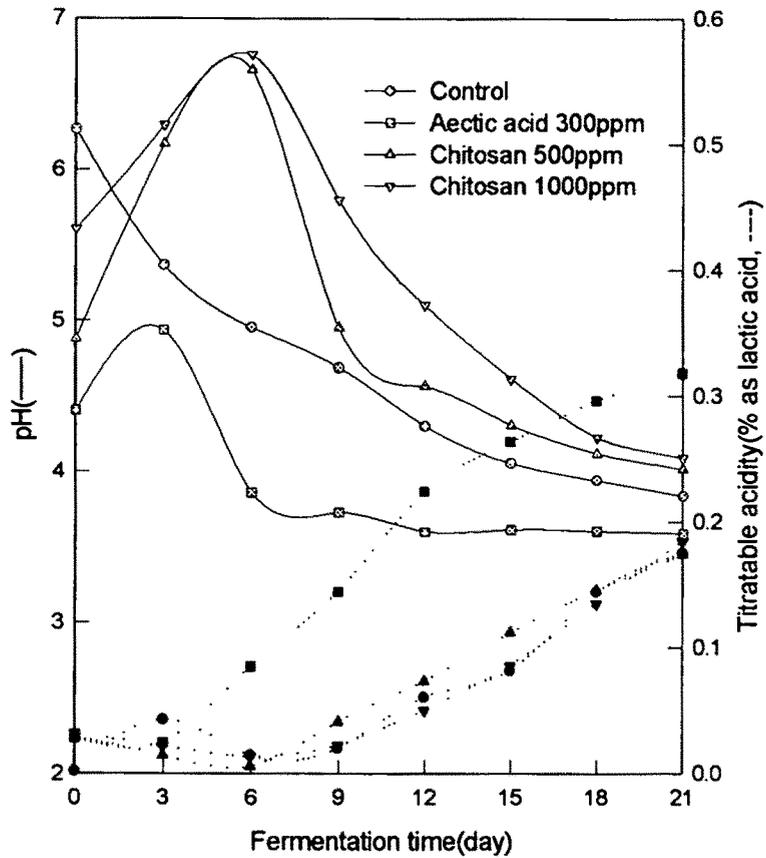


Fig. 21. Changes in pH and titratable acidity of dongchimi juice during fermentation at 10⁰C for 21 days.

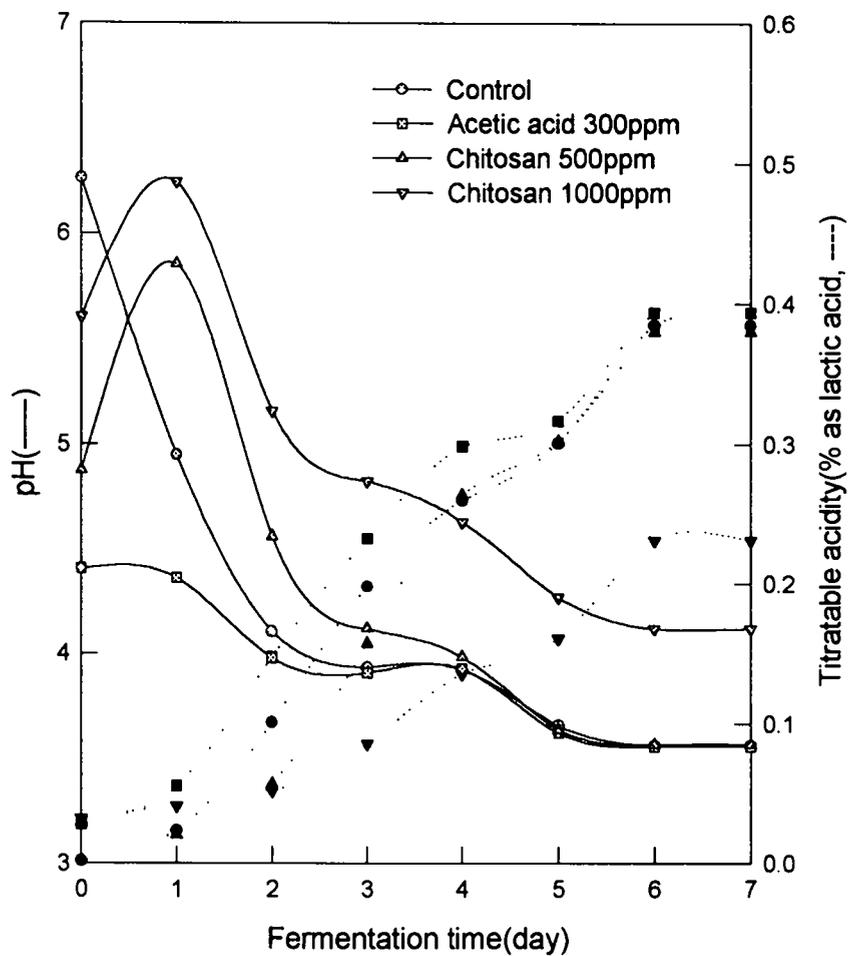


Fig. 22. Changes in pH and titratable acidity of dongchimi juice during fermentation at 20°C for 7 days.

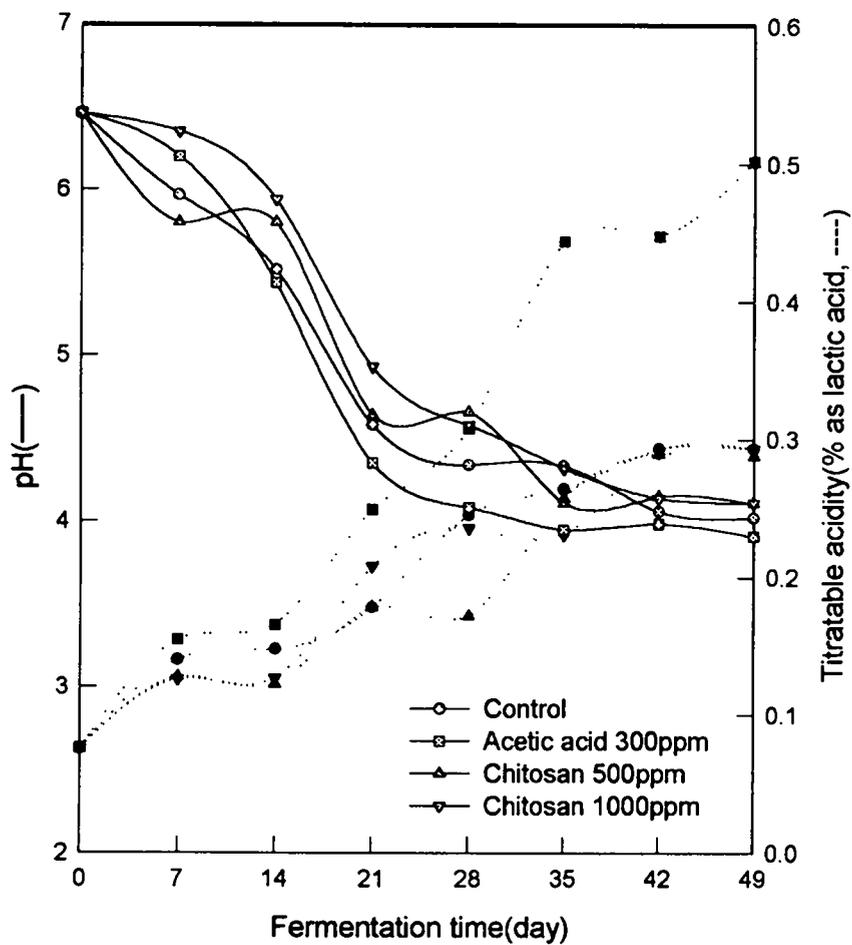


Fig. 23. Changes in pH and titratable acidity of dongchimi radish juice during fermentation at 4°C for 49 days.

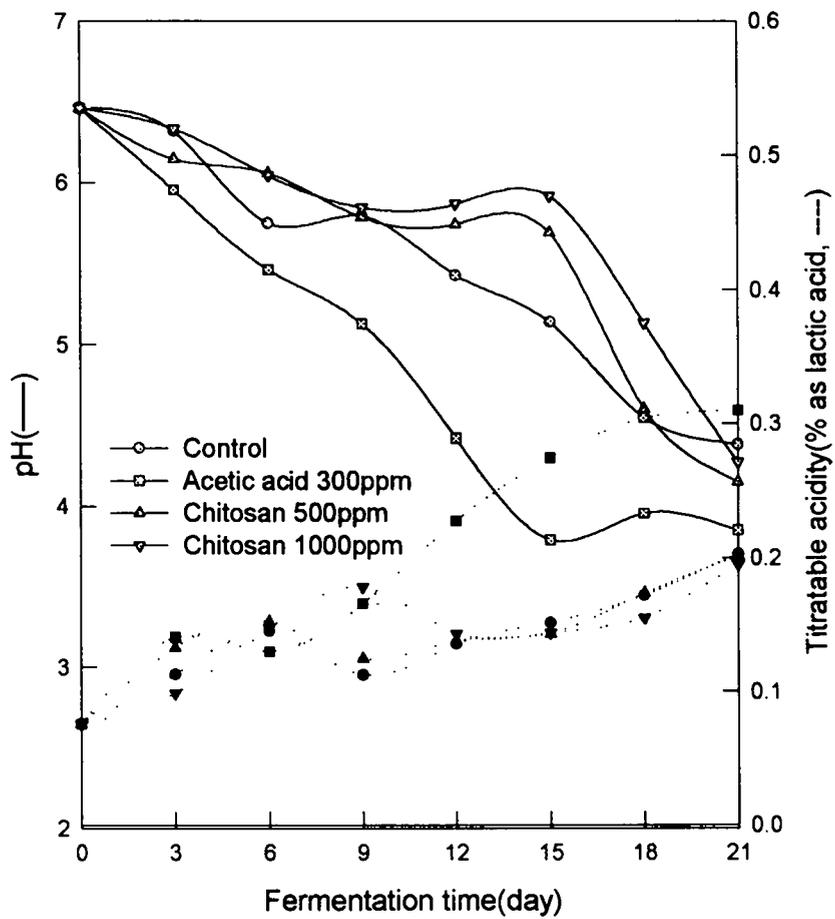


Fig. 24. Changes in pH and titratable acidity of dongchimi radish juice during fermentation at 10°C for 21 days.

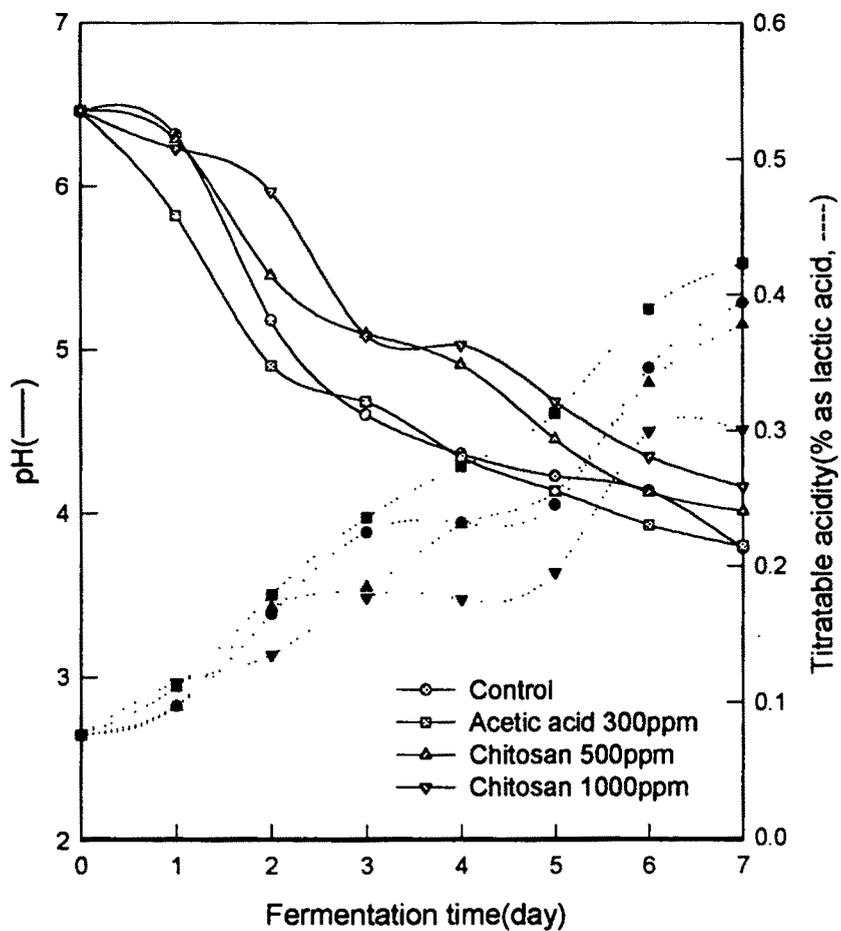


Fig. 25. Changes in pH and titratable acidity of dongchimi radish juice during fermentation at 20°C for 7 days.

나. 적정 산도의 변화

동치미를 제조하여 각각 4, 10 및 20℃에서 발효시키면서 동치미액의 산 생성량(젖산%)을 측정한 결과는 Figs. 20, 21 및 22과 같으며 pH와 적정산도는 반비례적인 관계를 보이고 있다.

박에 의하면 우리가 식용할 수 있는 동치미의 적숙기의 적정산도 범위는 0.13%에서 0.21%까지라고 보고하였는 바 이를 기준으로하여 검토하였다. 4℃에서 발효시 키토산 무첨가구는 18일째에 0.13%에 도달하여 22일째에 0.21%를 넘어선 반면 키토산 500ppm 첨가구는 28일째에 도달하여 30일째에 과숙산도 0.21%를 초과하였고, 키토산 1000ppm 첨가구는 28일째에 0.13%를 나타내어 49일째까지도 과숙산도를 초과하지 않아 키토산 첨가가 산 생성을 억제시켰음을 보여주었다. 10℃발효에서는 키토산 무첨가구의 경우 16일에 0.13%에 도달하였으나, 키토산 500ppm 첨가구와 키토산 1000ppm 첨가구는 17일째에 도달하여 거의 차이가 없었다. 그리고 20℃에서는 키토산 무첨가구가 2일째에 0.13%의 산을 생성한 반면, 키토산 500ppm 첨가구는 3일째에 도달하였고, 키토산 1000ppm 첨가구는 4일째에 도달하였다. 이상에서와 같이 발효온도가 낮을수록, 키토산 농도별로는 첨가농도가 높을수록 산 생성량이 적었는데 이것은 키토산이 젖산균의 생육을 억제시켰기 때문이라고 생각된다.

동치미 무우즙액은 동치미액보다 전반적으로 산도가 빠르게 증가하는 경향을 나타내었으나(Figs. 23~25) 키토산 첨가군이 대조군보다 산 생성량이 적다는 결과는 동치미액의 산도변화와 흡사하였다. 4℃에서 발효하였을 때, 대조군은 28일째에 산도가 0.25%에 도달하였으나 키토산 첨가군은 35일째에 0.25%에 이르렀다. 10℃에서 발효시킨 경우에는

대조군이 3일째에 적숙산도 0.13%에 이르렀고 이 때 키토산 첨가군도 적숙산도에 이르렀으며 키토산 첨가 농도에 따른 차이는 별로 보이지 않았다. 20℃에 발효시켜 산도 변화를 측정한 경우 대조구는 1.2일째에 이미 적숙산도 0.13%에 도달하였고 키토산 500ppm 첨가구와, 1000ppm 첨가구도 비슷하였다. 그러나 과숙산도 0.21%에는 무첨가 대조구가 3일째에 이미 초과한 반면 키토산 500ppm 첨가구는 4일째에, 키토산 1000ppm 첨가구는 5일째에 도달하여 키토산을 첨가함에 따라, 첨가농도가 높을수록 산도증가가 억제되는 경향을 나타내었다.

본 실험에서 키토산 첨가구는 첨가 농도가 높을수록 산도증가가 억제되는 경향을 나타냈는데, 이는 키토산이 젖산균의 생육을 저해시켜 유기산 생성이 억제되었기 때문으로 사료된다.

다. 염도의 변화

동치미 발효 중 담금액과 무우의 염도변화를 살펴보면 발효가 진행됨에 따라 동치미 담금액과 무우즙액의 소금함량은 삼투압 차이에 의해 무우 조직내로 소금이 침투하므로 담금액에서는 감소하고 무우즙액에서는 증가하여 발효 말기에 이르면 담금액과 무우즙액의 염도는 1.7% 내외로 거의 비슷하게 되었다(Figs. 26~28). 동치미 액과 무우즙액에서 염도의 증감속도는 온도에 따라 발효온도가 높을수록 빠르게 최종농도에 도달하였는데, 이는 높은 온도에서 발효시킬수록 무우조직으로의 소금침투속도가 빨리 진행되었다는 장과 문 등의 보고와 유사하였다.

담금액중 염도의 변화 경향은 발효초기에는 빠르게 감소하다가 그 후 완만했으며 대체적으로 발효초기의 염농도 3.0%가 발효후기에 약

1.5~1.8%로 평형상태에 도달하는 것으로 판단되었다. 담금액의 소금함량은 삼투압차이에 의한 무우조직내의 소금침투로 감소하게 되는 데 감소속도는 온도가 높을수록 빠르며, 발효 초기에 빠르게 감소하다가 완만해져 후기에는 평형상태에 도달한다는 강의 보고와 거의 유사한 경향을 나타냈다.

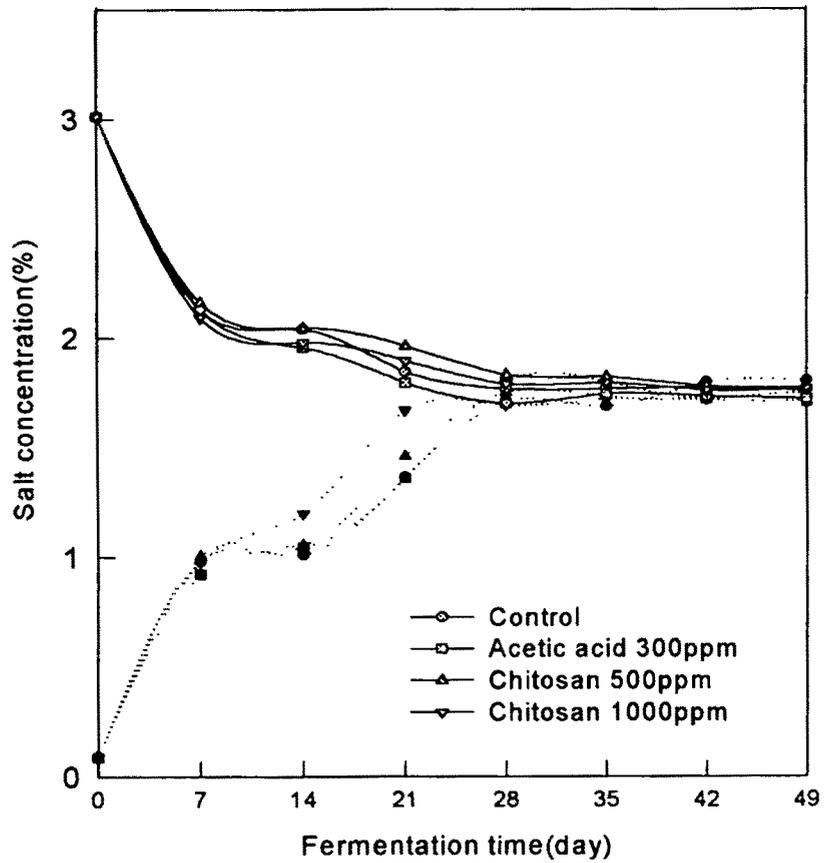


Fig. 26. Changes in salt concentration of dongchimi juice and radish juice during fermentation at 4^oC for 49 days. — dongchimi juice, ---- radish juice

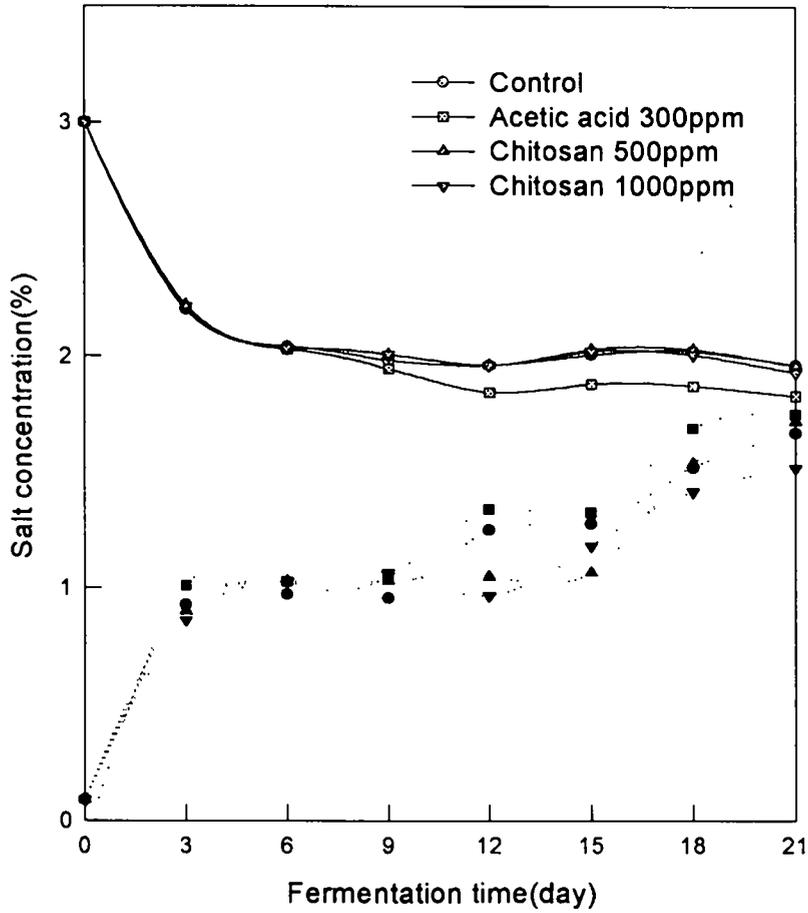


Fig. 27. Changes in salt concentration of dongchimi juice and radish juice during fermentation at 10°C for 21 days. ---- dongchimi juice, ---- radish juice.

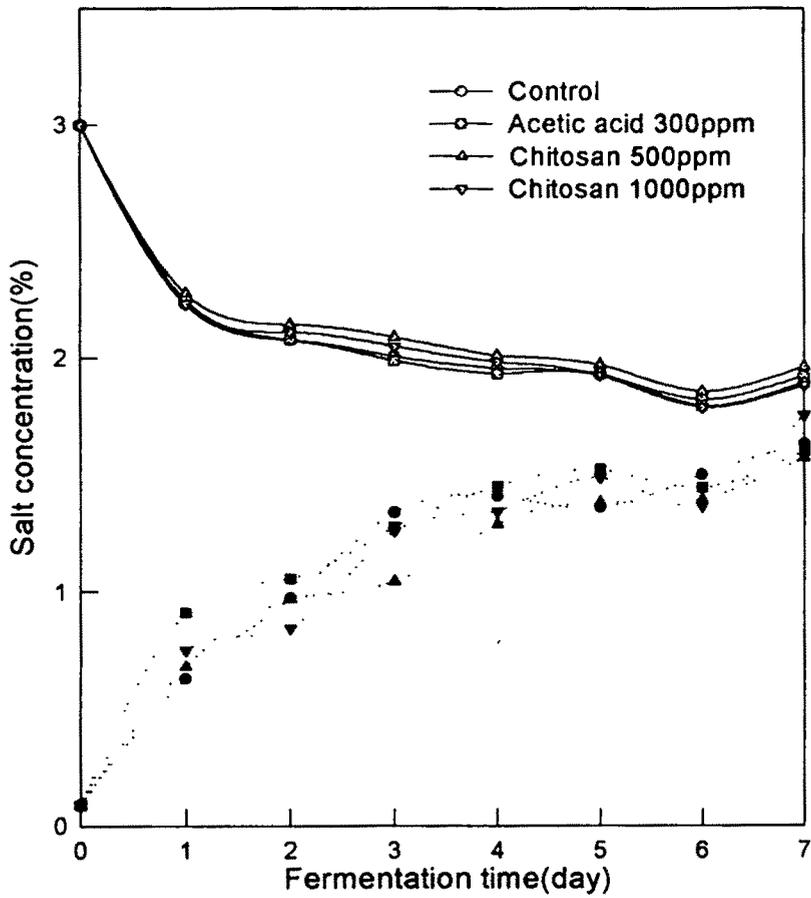


Fig. 28. Changes in salt concentration of dongchimi juice and radish juice during fermentation at 20°C for 7 days. — dongchimi juice, ---- radish juice.

라. 탁도의 변화

동치미 담금액의 탁도는 비교적 투명했던 소금용액이 발효가 시작되면서 점점 불투명한 유백색으로 뿌옇게 됨을 볼 수 있었다. 강81)의 실험방법과 같이 빛의 분산에 의해 흡광도의 차이를 준다고 여겨지는 558nm에서 탁도의 변화를 측정한 결과는 Figs. 29~31와 같다.

발효초기에는 완만한 증가를 보였으며 발효적기 이후에는 모든 시료에 있어서 탁도가 급격히 증가하였다. 또한 탁도의 변화는 발효온도가 높을수록, 그리고 키토산 첨가농도가 낮을수록 더 컸는데 이러한 탁도의 증가는 탄수화물이 분해되어 용출되는 가용성 유기물의 함량과 관계가 깊은 것으로 강의 연구보고에 나타나 있다.

본 실험 결과, 키토산 첨가구에서는 탁도를 현저하게 감소되었는 바 이는 발효가 억제, 지연되었기 때문이며 아울러 균체 및 기타 음이온성 고분자 물질을 흡착하므로써 부유물질을 감소시키기 때문으로 사료되며, 탁도의 감소효과는 동치미 음료를 개발에 크게 도움을 줄 것으로 기대된다.

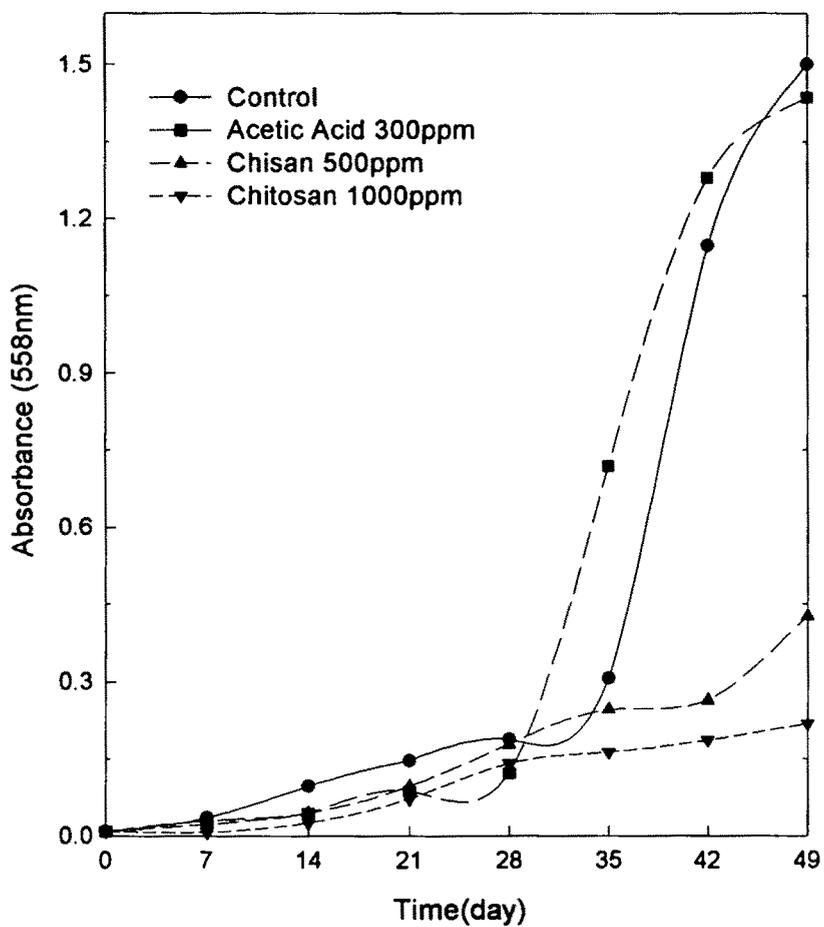


Fig. 29. Changes in the turbidity of dongchimi juice during fermentation at 4°C for 49 days.

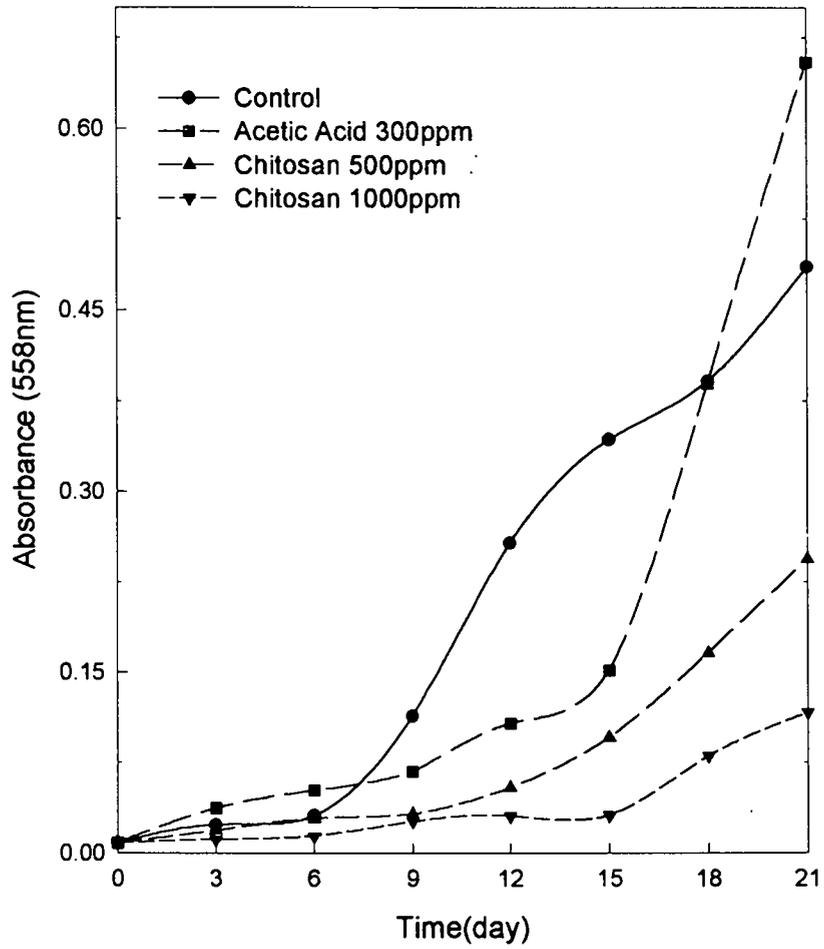


Fig. 30. Changes in turbidity of dongchimi juice during fermentation at 10°C for 21 days.

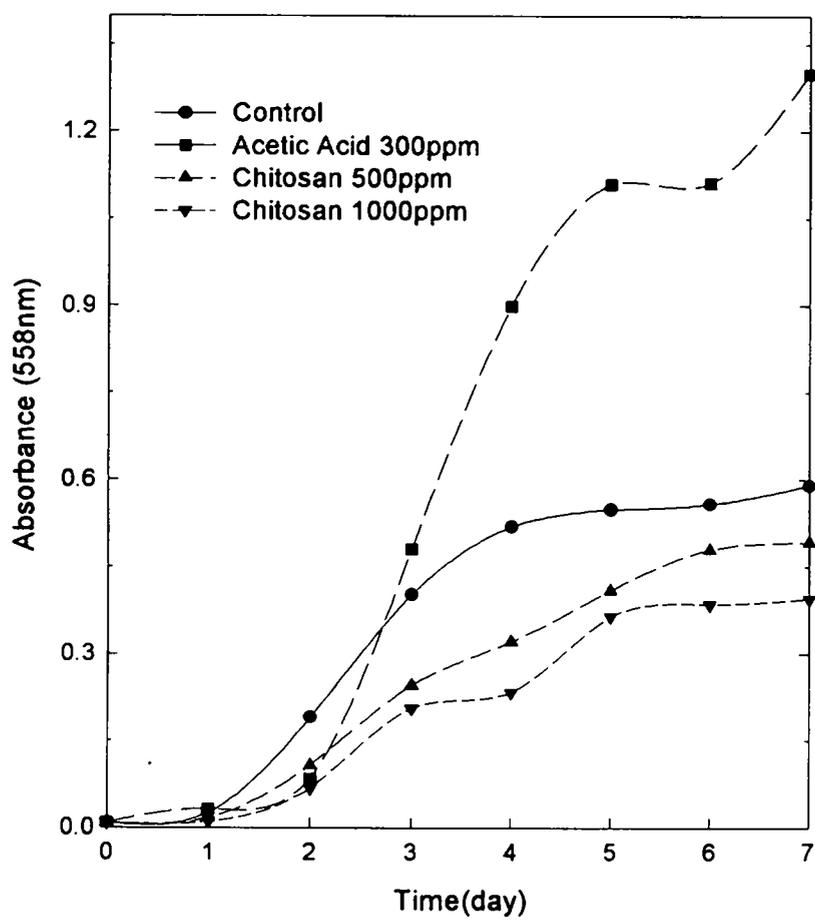


Fig. 31. Changes in the turbidity of dongchimi juice during fermentation at 20^oC for 7 days.

마. 무우의 경도 변화

동치미 발효 중 발효 온도에 따른 무우의 upper part, middle part, lower part의 세부분의 기계적 조직감을 측정된 결과는 Tables 6~8과 같다. 경도는 온도와 무우의 위치에 상관 없이 숙성 초기에 급격히 감소한 후 비슷한 수준으로 유지되거나 서서히 감소되는 경향을 나타내었다. 전반적인 경도의 변화 경향은 대조군, 키토산 500ppm 첨가군, 키토산 1000ppm 첨가군의 순서로 경도가 높게 유지되었으나, 특히 20℃ 발효구에서는 발효 중기에 대조군에 비해 키토산 첨가에 의한 hardness의 향상은 뚜렷하였으나 그 효과는 발효기간이 증가함에 따라 점차 감소하였다. 김치는 저장기간이 경과함에 따라 조직이 연화되어 hardness는 점차 감소하는데 이러한 연화 현상은 protopectinase, polygalacturonase, pectin methyl esterase 등의 효소의 작용에 의해 펙틴질의 성상변화가 주요인으로 알려져 있다. 이는 염장과정 중 키토산의 첨가가 무우의 조직감에 미치는 영향을 알아보기 위하여 압착력, 침투관통력 및 절단력을 측정된 결과, 키토산 첨가는 모두 무우의 조직감을 향상시킴을 발견하였다.

Table 6. Change in hardness of radish during dongchimi fermentation at 4°C for 49 days

(Unit : g)

Treatment	Part	Fermentation time(days)							
		0	7	14	21	28	35	42	49
Control	upper part	221.46	56.20	59.50	46.10	46.70	48.20	48.80	47.50
	middle part	205.38	61.60	64.30	48.90	46.10	55.70	52.20	51.20
	lower part	242.82	64.80	75.50	56.70	48.50	56.20	60.20	56.30
Acetic acid 300ppm	upper part	221.46	62.70	47.70	43.00	46.20	49.10	47.70	48.50
	middle part	205.38	72.00	54.80	59.90	46.70	59.70	51.70	55.30
	lower part	242.82	75.60	65.30	57.70	49.60	58.50	57.00	56.90
Chitosan 500ppm	upper part	221.46	60.70	53.20	47.10	44.60	52.30	48.60	53.30
	middle part	205.38	66.60	53.20	51.10	45.40	55.10	52.10	54.20
	lower part	242.82	73.20	60.40	55.90	57.40	58.50	59.10	58.20
Chitosan 1000ppm	upper part	221.46	50.00	49.90	48.80	43.90	46.40	52.20	49.80
	middle part	205.38	53.50	52.20	55.40	55.90	55.10	56.30	54.30
	lower part	242.82	57.70	60.10	69.20	64.40	59.80	62.20	59.90

Table 7. Change in hardness of radish during dongchimi fermentation at 10°C for 21 days

(Unit : g)

Treatment	Part	Fermentation time(days)							
		0	3	6	9	12	15	18	21
Control	upper part	221.46	64.60	55.00	58.40	53.50	45.00	45.90	29.10
	middle part	205.38	75.70	65.00	51.70	62.80	48.30	43.80	47.10
	lower part	242.82	67.50	73.30	66.40	84.00	62.70	56.70	52.00
Acetic acid 300ppm	upper part	221.46	37.10	51.60	50.2	57.10	43.20	47.30	52.20
	middle part	205.38	41.80	66.50	49.30	61.90	55.30	47.30	60.00
	lower part	242.82	52.00	78.80	48.70	62.90	73.30	54.50	59.00
Chitosan 500ppm	upper part	221.46	71.10	54.50	52.90	62.70	46.70	56.00	52.90
	middle part	205.38	30.80	66.50	56.20	67.50	53.10	52.20	57.00
	lower part	242.82	57.50	72.00	78.70	61.70	62.90	56.90	56.40
Chitosan 1000ppm	upper part	221.46	57.80	64.10	56.80	57.60	48.60	48.60	52.50
	middle part	205.38	28.80	61.70	62.70	71.30	51.70	68.20	58.70
	lower part	242.82	56.00	71.30	62.70	71.80	57.60	70.80	65.40

Table 8. Change in hardness of radish during dongchimi fermentation at 20°C for 7 days

(Unit : g)

Treatment	Part	Fermentation time(days)							
		0	1	2	3	4	5	6	7
Control	upper part	221.46	73.85	53.30	51.40	66.45	57.90	64.50	62.70
	middle part	205.38	126.35	71.60	71.00	71.20	74.00	72.20	60.10
	lower part	242.82	97.15	71.60	56.80	75.15	76.40	71.60	62.40
Acetic acid 300ppm	upper part	221.46	64.85	56.20	50.50	68.30	64.80	61.40	63.40
	middle part	205.38	119.40	60.30	56.30	69.20	66.40	74.00	65.80
	lower part	242.82	66.05	67.50	53.70	77.40	63.80	81.70	85.80
Chitosan 500ppm	upper part	221.46	61.00	63.50	67.00	66.80	83.10	72.60	64.90
	middle part	205.38	109.40	60.40	78.00	69.65	74.30	71.40	79.00
	lower part	242.82	101.50	73.40	71.30	70.00	93.80	78.20	85.80
Chitosan 1000ppm	upper part	221.46	76.30	64.00	61.00	65.85	79.60	79.20	79.90
	middle part	205.38	133.15	103.70	63.00	65.75	68.40	78.40	86.40
	lower part	242.82	66.70	65.70	71.70	82.25	85.60	81.60	96.40

2. 미생물수의 변화

동치미가 익는다는 것은 적당한 발효가 일어난 상태로 이는 주로 *L. mesenteroides*에 의해 대체로 0.1~0.3%의 산이 생성되었을 때이며, 그 이후로 산 생성량이 많아져 식용하기 어려운 산패현상이 일어나는 것은 *L. mesenteroides*의 최대 증식이후에 주로 내산성이 강한 *L. plantarum*에 의해 과다한 산이 생성되는 때문으로 알려져 있다. 따라서 동치미 주스에 생육하는 젖산균 중 특히 *L. mesenteroides*와 *L. plantarum*을 포함한 젖산균 및 총균의 생육에 미치는 키토산의 영향을 살펴보고자 이들이 포함된 젖산균 및 총균수의 변화를 조사하였다.

가. 총생균수의 변화

Fig. 32에서 보는 것처럼 총균수의 변화는 온도와 키토산농도에 따라 각기 다른 양상을 보였다. 총균수는 전발효기간을 통해서 대조군의 경우에 가장 많았으며 chitosan 1000ppm 첨가구에서 가장 적었다. 깎두기에 고분자 키토산을 첨가한 김과 강의 보고에서도 키토산 첨가균들이 대조군에 비해 총균수가 약간 적었다고 했으며, 배추김치에 저분자 키토산을 첨가한 김 등의 결과와도 일치했다.

4℃에서 키토산 무첨가구는 처음에 5.5×10^5 CFU/ml이던 것이 발효가 진행되면서 총균수가 빠르게 증가했다가 발효적기(산도 0.1~0.3%)를 기점으로 최고를 보인 후 발효말기까지 그 숫자에 큰 변동이 없었다. 그러나 키토산 첨가구는 발효 초기 총균수가 급격히 감소하였다가 다시 증가하기 시작하여 발효 적기에는 최고를 보였고 발효 말기에는 점점 감소하는 경향을 보였다. 발효 적기의 총균수는 키토산 무첨가구와 키토산 첨가구 모두 1.3×10^7 CFU/ml 정도로 차이를 보이지 않았으나 키토산 첨가구의 경우 총균수가 최대에 이른 후 점점 수가 감소하는 경향을 보여 발효말기까지 균수의 변동이 없이 거의 일정하게 유지된 대조구와 차이를 보였다. 총균수가 최고치를 나타내기까지 대조구는 7일, 키토산 500ppm 첨가구는 14일, 그리고 1000ppm 첨가구는 21일이 소요되어 키토산이 미생물의 성장을 억제한다는 것을 알 수 있었다. 10℃에서도 발효 초기부터 그 수가 급격히 증가되어 3일째부터는 10^7 CFU/ml로 증가하였다. 발효적기에 총균수는 키토산 무첨가구가 1.5×10^8 CFU/ml, 키토산 500ppm 첨가구가 1.7×10^7 CFU/ml, 키토산 1000ppm 첨가구가 1.2×10^7 CFU/ml이었으며 발효말기에는 다소 감소하는 경향을 보였다. 20℃에서

는 1일째 7×10^7 CFU/ml에 도달하였고 그 숫자는 점차 증가하여 1.3×10^8 CFU/ml까지 증가하였다. 발효 적기의 총균수는 키토산 무첨가구가 10^8 CFU/ml, 키토산 500ppm 첨가구가 6.9×10^7 CFU/ml 그리고 키토산 1000ppm 첨가구가 7.2×10^7 CFU/ml였다. 위의 결과로부터 키토산의 첨가는 여러 균체의 생육을 억제하는 것으로 생각된다. 그러나 키토산에 의한 유기성분의 응집, 침전효과에 대한 보고가 있어 실제로 생균수는 이보다 더 많을 수 있을 것으로 예상된다.

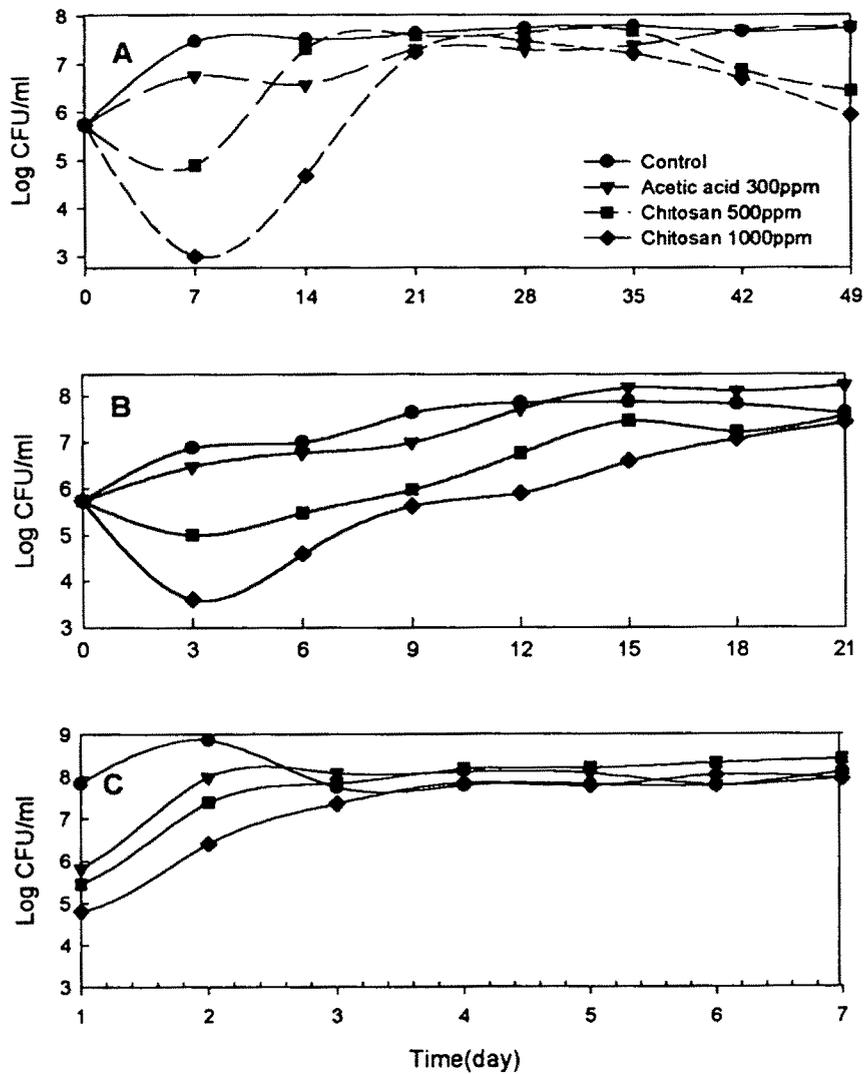


Fig. 32. Changes in total viable cell counts of dongchimi juice during fermentation at 4°C for 49 days(A), 10°C for 21 days(B), 20°C for 7 days(C).

나. *Leuconostoc*속 젖산균수의 변화

동치미 주스 중에서 *Leuconostoc*속 젖산균수의 변화는 Fig. 33과 같다. 전 발효기간을 통해 대조군이 키토산 첨가군들에 비해 그 수가 많았다. 또한 키토산 첨가량이 많을수록 동치미의 주 발효균인 젖산균의 생육을 크게 억제시켜 발효를 지연시키는 것으로 나타났다. 4℃ 발효에서는 키토산 무첨가구가 14일째에 2.3×10^7 CFU/ml로 최대균수를 보였으며 키토산 500ppm 첨가구는 21일째에 2.1×10^7 CFU/ml로, 키토산 1000ppm 첨가구는 21일째에 1.1×10^7 CFU/ml로 최대치를 나타낸 후 발효기간이 증가함에 따라 모든 시험구에서 감소하였다. 10℃에서는 15일째에 키토산 무첨가구 및 키토산 500ppm 첨가구가 각각 7.9×10^7 CFU/ml, 10^7 CFU/ml, 18일째에 1000ppm 키토산첨가구가 2.5×10^6 CFU/ml로 최대치를 보인 후 급격히 감소하였으나 20℃에서는 4일째에 각각 7.5×10^7 CFU/ml, 7.7×10^7 CFU/ml, 2.5×10^7 CFU/ml로 최대균수를 나타낸 후 일정한 수준을 유지하였다. 전반적으로 *Leuconostoc*속 젖산균도 총균수와 마찬가지로 키토산 첨가농도가 높을수록 생장이 억제되는 경향을 보였다. 젖산균수의 변화는 발효초기까지만 총균수와 다소의 차이를 보였을 뿐이고 일단 젖산균의 번식이 시작되었을 때는 총균수의 변화와 큰 차이 없이 대동소이하였다. 젖산균수의 경우 발효온도에 상관없이 4℃에서는 14일, 10℃에서는 9~12일, 20℃에서는 3~5일째인 발효적기에 10^7 CFU/ml를 나타내었으며 키토산 첨가농도가 증가할수록 젖산균의 수가 감소하였다. 발효초기에 젖산균수가 급격히 감소한 후에 발효적기까지 지속적으로 증가하다가 그 이후부터 젖산균수에 큰 변동이 없었던 것은 발효적기까지 잘 자라던 내산성이 약한 젖산균이 발

효적기 이후부터 감소되면서 발효말기에 내산성이 강한 젖산균이 그 감소된 숫자만큼 증가되었을 것으로 보인다.

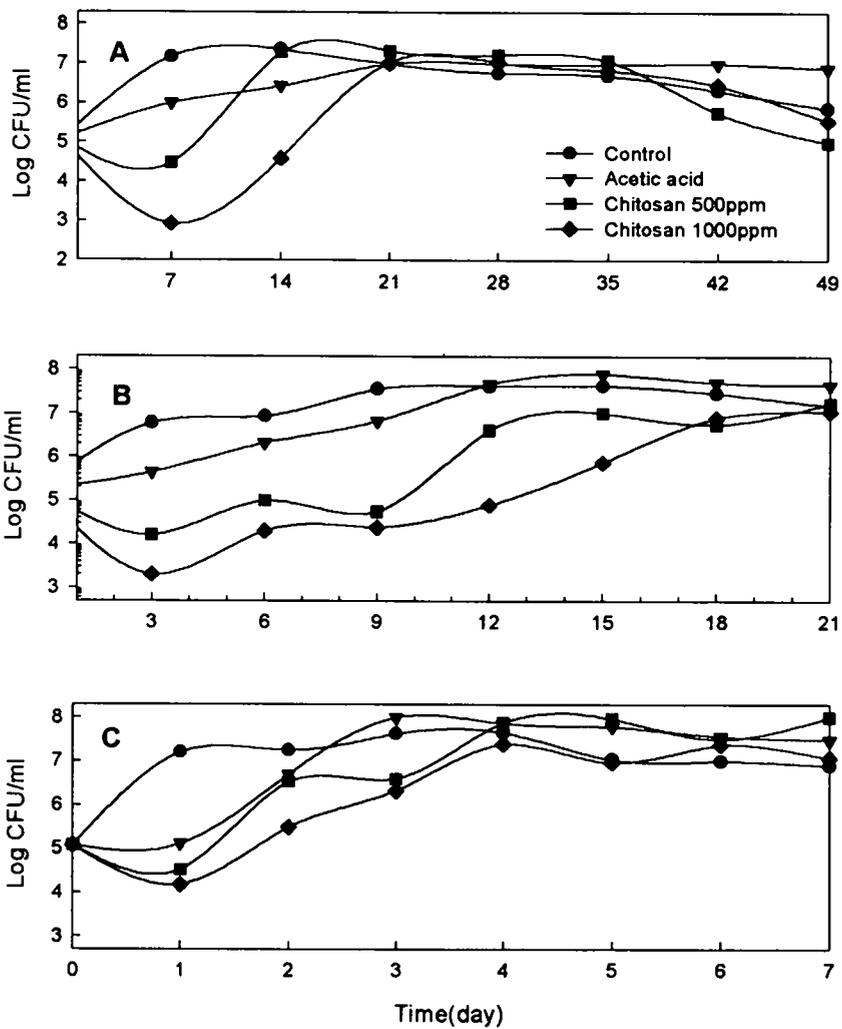


Fig. 33. Changes in total viable cell counts of *Leuconostoc* spp. of dongchimi juice during fermentation at 4°C for 49 days (A), 10°C for 21 days (B), 20°C for 7 days (C).

다. *Lactobacillus*속 젖산균수의 변화

*Lactobacillus*속 젖산균수의 측정결과(Fig. 34)는 *Leuconostoc* 속과 무척 유사한 양상을 보였다. 즉 대조군과 키토산 무첨가구는 발효가 진행됨에 따라 발효 적기까지 급격히 증가하여 일정수준을 유지하였으며, 키토산 첨가구는 발효 초기 급격하게 균수가 감소한 후 발효 적기까지 지속적으로 증가하다가 다시 발효 후기에 점차 감소하여 대조구와 차이를 보였다. 4℃에서 발효 시킨 경우 키토산 무첨가구는 계속적으로 증가하여 49일째에 6.0×10^7 CFU/ml에 이르렀으나 키토산 첨가구는 500ppm 첨가구가 35일째에 3.5×10^7 CFU/ml, 1000ppm 첨가구가 28일째에 2.0×10^7 CFU/ml로 최고에 이른 수 점차 감소하였다. 10℃에서 발효시켰을 때도 발효 말기인 21일째에 키토산 무첨가구 500ppm 및 1000ppm 키토산 첨가구의 *Lactobacillus* 속 젖산균의 수가 각각 6.5×10^7 CFU/ml, 2.3×10^7 CFU/ml, 1.8×10^7 CFU/ml로 키토산의 농도가 높을수록 균수가 적은 특성을 나타내었다. 이와 같이 키토산이 첨가됨에 따라, 그리고 키토산의 농도가 높을수록 대조구에 비해 젖산균의 수가 더 적은 결과는 총균수의 결과와 일치해 키토산 첨가에 의해 미생물의 생육이 억제되었음을 알 수 있다. 이들 결과는 키토산을 첨가한 배추김치에서의 균총변화와 비슷한 경향이였다.

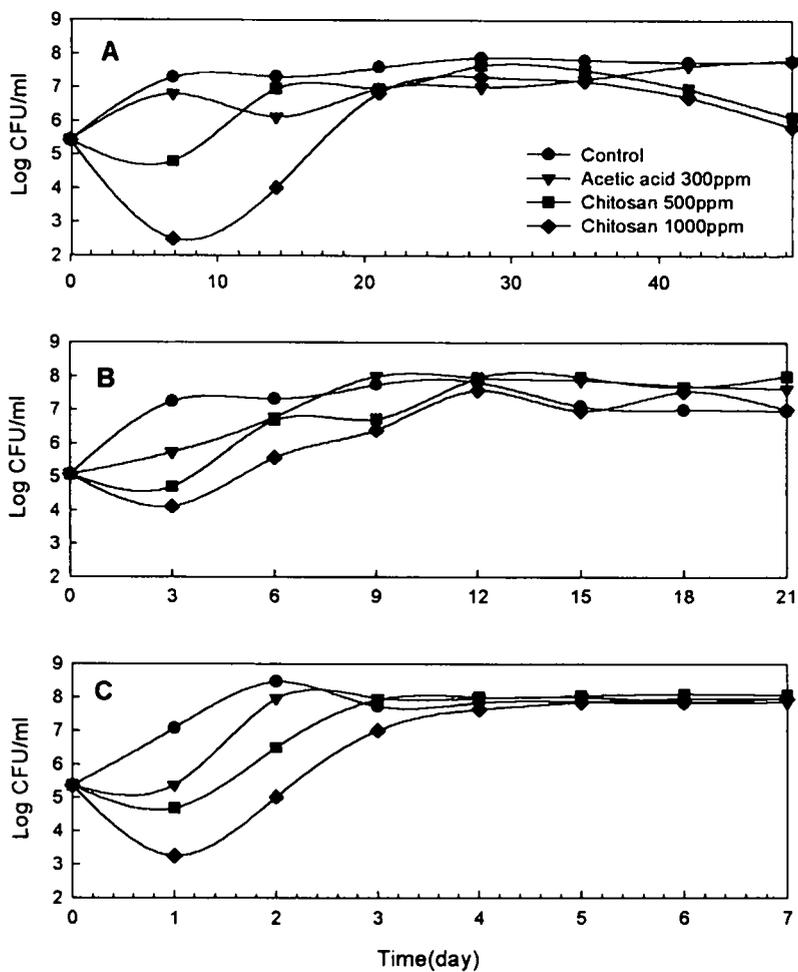


Fig.34. Changes in viable cell counts of *Lactobacillus* spp. of dongchimi juice during fermentation at 4°C for 49 days(A), 10°C for 21 days(B), 20°C for 7 days(C).

3. 관능적 성질의 변화

관능적 성질의 평가는 시각, 후각, 미각, 촉각, 청각등 5가지 감각이 받아들이는 느낌을 기초로 하여 식품의 품질을 측정하는 것으로 500ppm과 1000ppm의 키토산을 첨가한 동치미, 아무 것도 첨가하지 않은 동치미와 acetic acid를 300ppm 첨가한 동치미를 각각 4, 10 및 20℃에서 각각 49일, 21일, 7일간 발효시키면서 경시적으로 동치미 담금액과 무우의 냄새와 맛 등의 관능적 성질을 평가하였다.

동치미 담금액의 관능적 품질의 평가방법은 향미묘사법에 의하여 신맛, 군덕맛, 생무우맛, 상콤한 맛, 키토산의 짙은 맛과 이에 상응하는 냄새들을 선정하여 다시료 비교법에 의하여 평가한 후 통계 처리하였으며, 각각에 대한 발효 최종일의 QDA profile은 Figs. 35~37에 나타내었다. 동치미 무우의 관능적 품질의 평가방법도 담금액과 같으나, texture를 평가하기 위하여 crispness와 chewiness를 추가하여 평가한 결과에 대한 각각의 발효최종일 QDA profile은 Figs. 38~40에 나타내었다.

가. 동치미 쥬스의 품질 평가

4℃에서 발효한 동치미 쥬스의 전반적인 관능적 특성은 신내, 군덕내, 새콤한 내, 신맛, 군덕맛, 새콤한 맛은 증가현상을 나타내고 있으며 풋내, 생무우맛, 텁텁한 맛은 발효기간이 경과하면서 감소를 나타내었다. 10℃발효와 20℃발효에서의 전반적인 특성도 10℃의 변화 양상과 유사함을 보여 주었다.

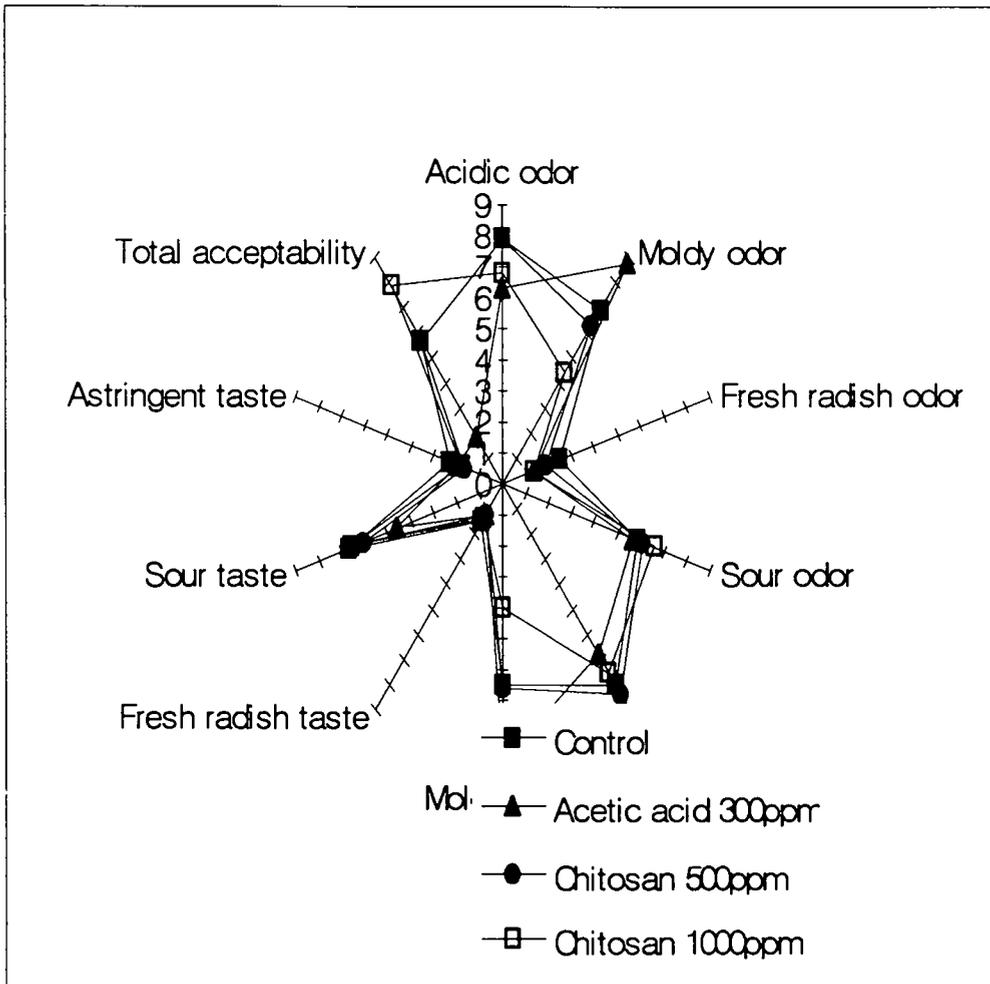


Fig. 35. QDA profiles in odor and taste of dongchimi juice on the 49th days of fermentation at 4°C.

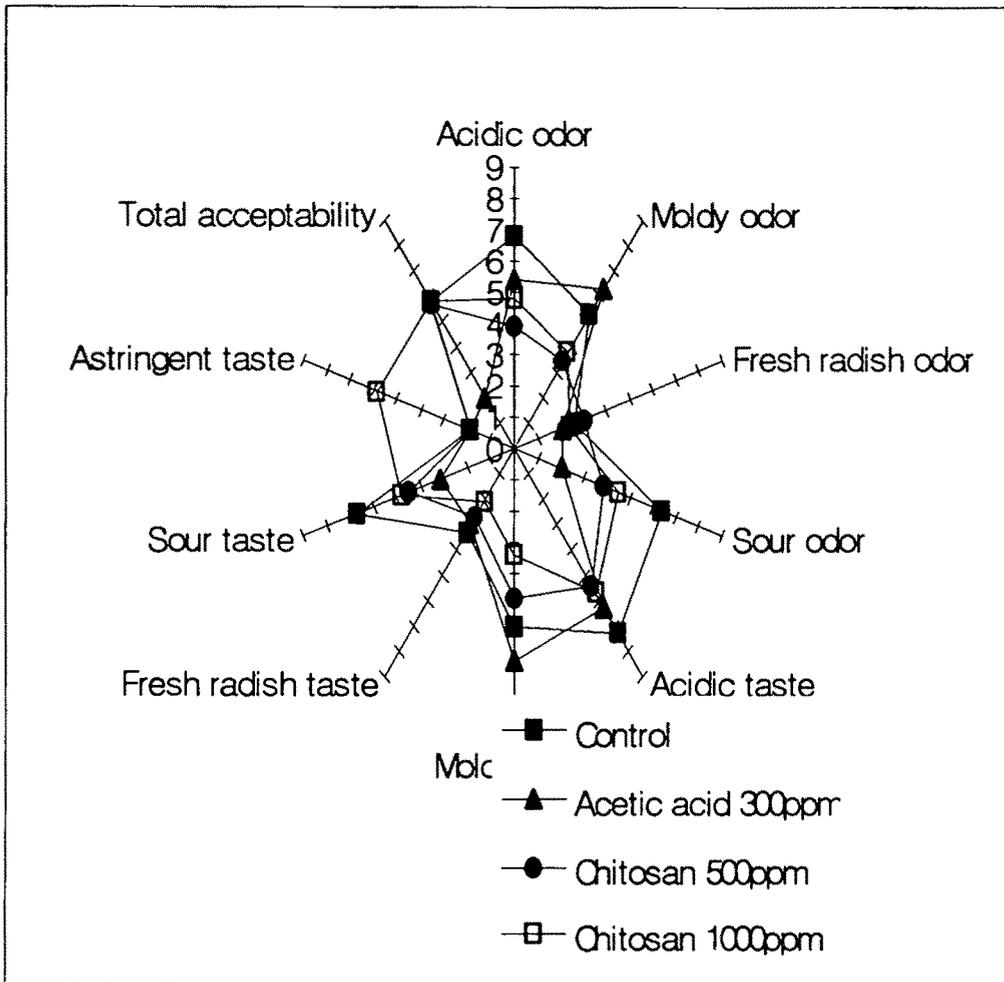


Fig. 36. QDA profiles in odor and taste of dongchimi juice on the 21th days of fermentation at 10°C.

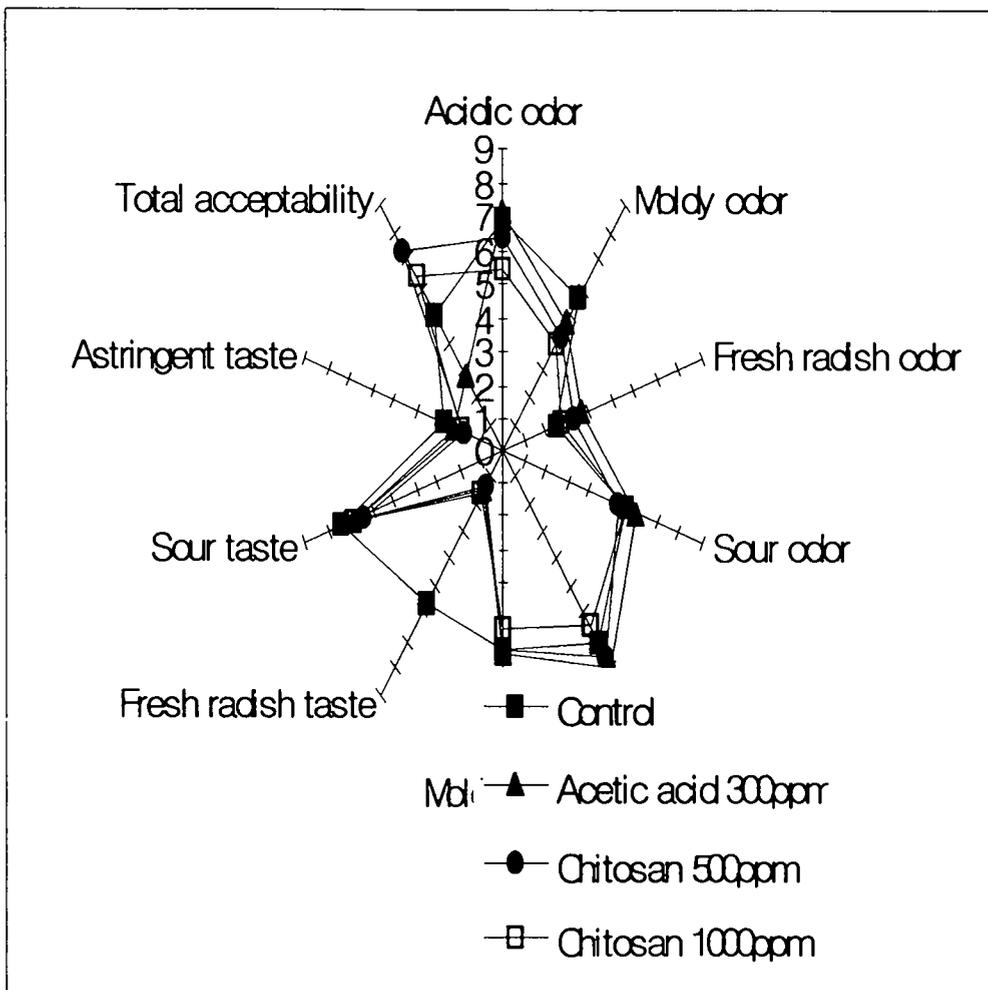


Fig. 37. QDA profiles in odor and taste of dongchimi juice on the 7th days of fermentation at 20°C.

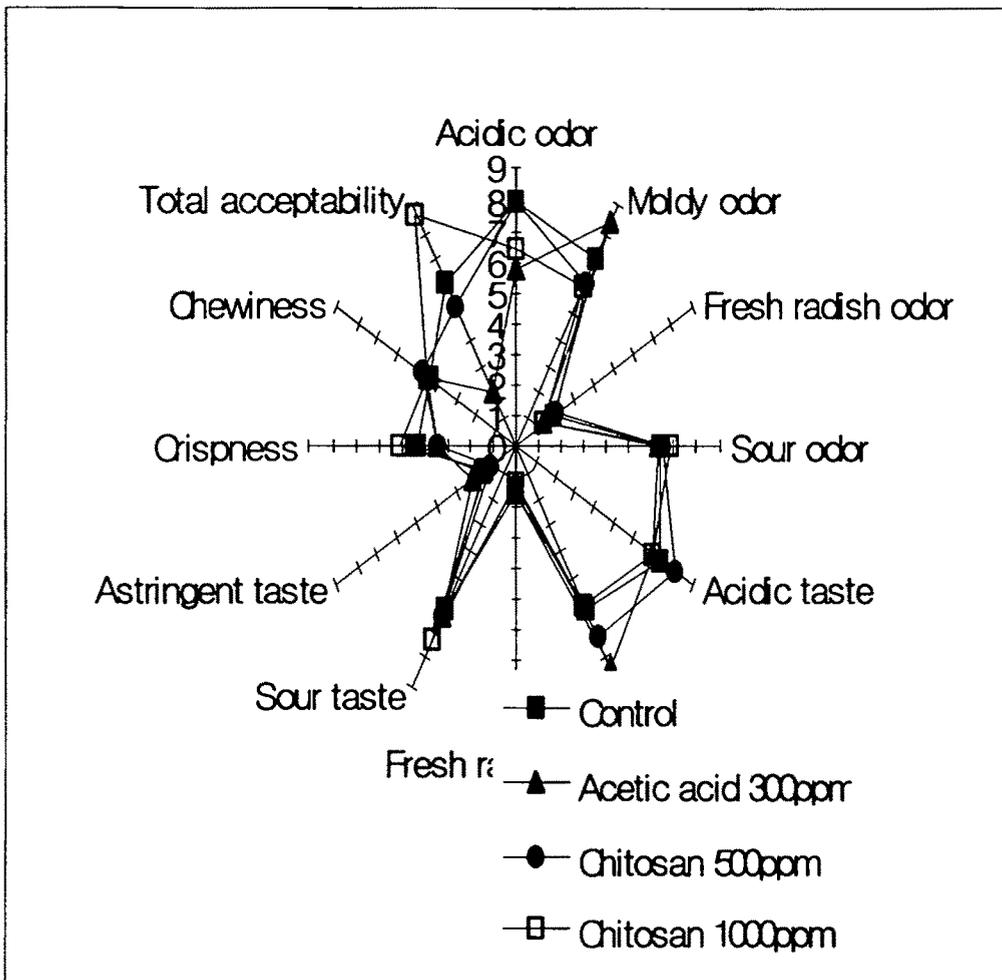


Fig. 38. QDA profiles in odor and taste of dongchimi radish on the 49th days of fermentation at 4°C.

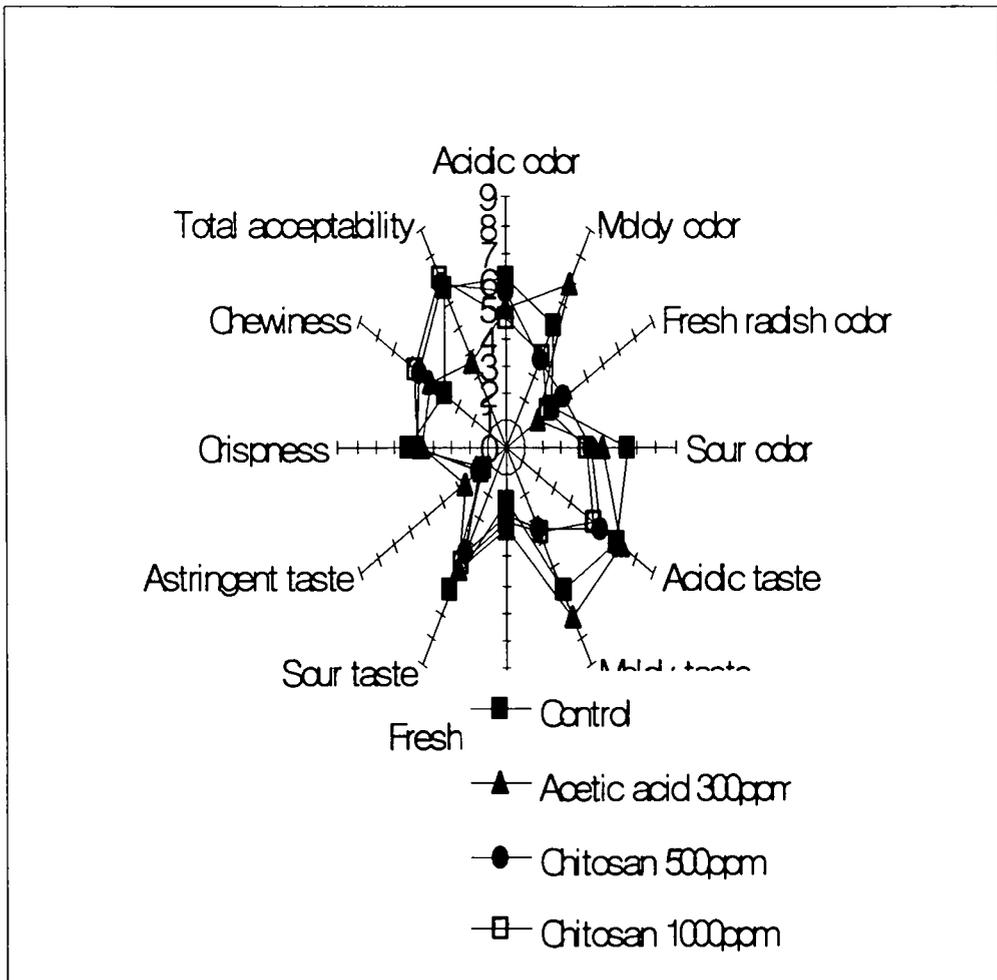


Fig. 39. QDA profiles in odor and taste of dongchimi radish on the 21th days of fermentation at 10°C.

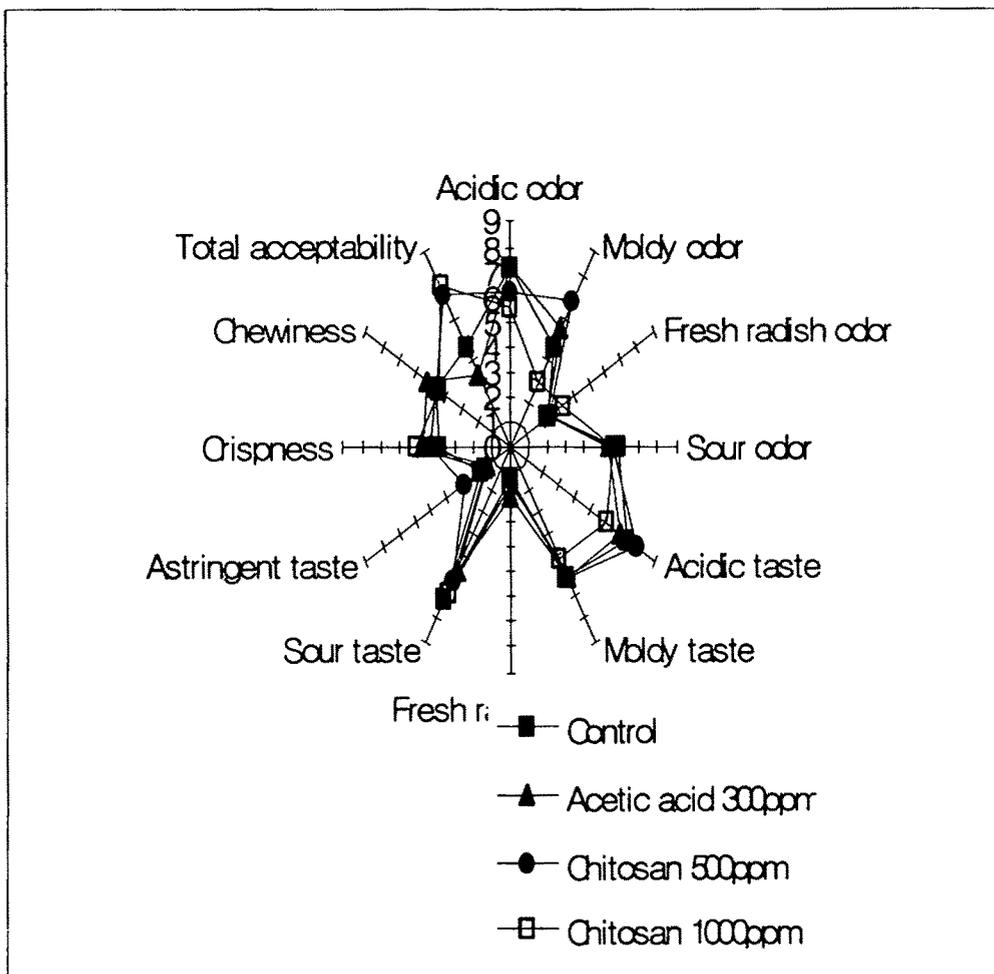


Fig. 40. QDA profiles in odor and taste of dongchimi radish on the 7th days of fermentation at 20°C.

키토산 농도별로는 각 발효온도별로 키토산 첨가구가 키토산 무첨가구보다 발효말기에 군덕맛을 덜 느끼는 것으로 나타났고 이것은 배추김치에 키토산을 첨가했을 때 전 발효기간 동안 대조군이 키토산 첨가군에 비해 군덕내가 유의적으로 강했다고 보고한 구 등의 연구보고와 유사하였다. 또한 동치미의 신맛은 발효기간이 길어질수록 증가하였으나 대조군에 비해 키토산 첨가군이 약하게 평가되어 10℃ 발효의 경우, 대조구는 3일째부터 신맛을 나타낸다고 평가한 데 반하여 키토산 500ppm 첨가구는 9일째에, 1000ppm 첨가구는 18일째에 신맛을 나타내어 대조군에 비해 보존기간이 10일 이상 연장될 수 있음을 시사하였고, 발효 중 키토산의 첨가가 pH와 총산함량의 변화를 완만하게 했던 결과와 일치하는 결과이다. 이러한 현상은 배추김치에 키토산을 첨가하여 보존성을 조사한 김 등이나 소금절임시 키토산 첨가가 김치의 보존성에 미치는 효과를 조사한 노 등의 대조군에 비해 키토산 첨가군의 신맛이 훨씬 약하게 평가되었다는 보고와 일치하였다. 전체적인 기호도는 키토산 1000ppm 첨가구가 다른 시료에 비해 좋게 평가되었으며 키토산 무첨가구보다 키토산첨가구가 좋게 평가되었다. 이는 키토산의 NH_3^+ 가 생성된 acetic acid 및 lactic acid와 결합하거나 흡착하여 냄새와 맛이 완화되고 키토산의 떼은 맛이 감소되어 기호성이 증대되는 것으로 생각되었다.

나. 동치미 무우의 품질 평가

4℃에서 발효한 동치미 무우의 전반적인 관능적 특성은 신내, 군덕내, 새콤한 내, 신맛, 군덕맛, 새콤한 맛은 증가하는 데 반해 풋내, 생무우맛, 텁텁한 맛은 감소하는 경향이었으며, texture는 crispness와

chewness가 낮아지는 경향을 나타내었다. 이러한 경향은 키토산 첨가구와 비슷하였다. 전체적인 기호도에서는 acetic acid 첨가구는 현저하게 낮아졌고, 무첨가구는 낮아지다가 다시 초기와 비슷한 기호성을 보여주었다. 키토산 500ppm 첨가구는 발효 중반까지는 초기보다 높았다가 말기에 약간 낮아졌으나 1000ppm 첨가구는 초기에는 기호도가 매우 낮았으나 중기부터 지속적으로 높아져서 말기까지도 매우 높은 기호도를 보여주었다. 이는 키토산의 떫은 맛이 젖산 생성으로 감소되고 조직감이 월등히 좋아졌기 때문으로 사료된다. 10℃ 발효에서의 동치미 무의 전반적 관능적 특성도 4℃ 발효와 거의 일치하는 경향이나 acetic acid 첨가구와 키토산 500ppm 첨가구의 관능적 성질이 4℃보다는 약간 개선되는 것으로 나타났다. 이는 10℃ 발효가 전반적인 동치미 발효를 촉진시켜 전체적인 기호도가 상승되기때문으로 추정된다. 20℃ 발효에서는 무첨가구와 acetic acid의 첨가구에서는 신내와 신맛이 급격히 증가하고 군덕내와 군덕맛이 강해져서 기호도가 지속적으로 낮아지는 경향이였다. 그러나 키토산 500ppm 첨가구는 다른 온도에서와는 달리 모든 평가항목에서 좋은 경향을 보여 기호도가 현저히 상승하였고, 1000ppm 첨가구는 모든 항목에서 기호도가 월등하게 높았다.

제3절 결 론

동해안의 홍게 *Chitinoecetes opilio* 껍질로부터 생산된 키틴을 이용하여 우리나라 식품첨가물 규격인 70%이상의 탈아세틸화 키틴산을 제조한 후 이들의 물리화학적, 항미생물성을 조사한 후 동치미발효에 첨가하여 동치미의 품질특성향상, 산업화 및 음료화에 대한 기초자료를 확립하고자 하였다.

70% 이상의 탈아세틸화도를 갖는 키틴산을 제조하기 위해서는 50% NaOH 용액 중에 100℃에서는 6시간, 120℃에서는 20분, 140℃에서는 10분간 처리하였으며 이 때 생성된 키틴산의 점도는 130, 180 및 30cps였고 분자량은 746,000, 852,000 및 336,500이었다.

생성된 3종의 키틴산을 동치미 발효 주요 유산균으로 알려진 *Leu. mesenteroides*와 *Lac. plantarum*에 대하여 농도별로 온도에 따른 생육 억제작용을 조사한 결과 키틴을 140℃에서 10분간 반응시킨 키틴산 Ch-140이 첨가농도가 40ppm이상에서는 그 효과가 현저하였다.

동치미 담금액에 선정된 키틴산 Ch-140의 500, 1000ppm 첨가, acetic acid 300ppm 첨가 및 무첨가 대조구를 4, 10 및 20℃에서 발효시키면서 동치미 담금액과 무우의 품질 특성을 조사한 결과는 다음과 같다.

동치미 담금액의 pH 변화는 온도가 높을수록 pH가 빠르게 낮아지는 경향이었으며 무첨가구와 타시험구에 비해 키틴산 1000ppm 첨가구가 모든 발효 시험구에서 pH 저하를 지연시켰다. 동치미 담금액의 적정산도 변화는 온도가 높을수록 빠르게 증가하는 경향이었으며 타시험구에 비해 키틴산 1000ppm 첨가구가 모든 시험구에서 적정산도가 가장 낮았으며 서서히

증가하였다. 동치미 무우즙액의 pH와 산도의 변화는 동치미 담금액과 같은 경향을 뒤따르고 있는 것으로 나타났다.

동치미 담금액과 무우의 염도가 평형에 도달하는데는 4℃에서 28일째였고, 온도변화보다는 기간에 영향을 받는 것으로 나타났다.

동치미 주스의 탁도의 변화는 발효중기부터 급격히 증가하는 경향이었으며, 키토산 첨가로 탁도가 현저하게 낮아졌다.

동치미 무우의 경도 변화는 발효 온도와 무우의 위치에 상관없이 숙성 초기에 급격히 감소한 후 서서히 감소하는 경향을 나타내었고 키토산 1000ppm첨가군이 20℃ 발효에서 대조구에 비해 높은 경도를 나타내었다.

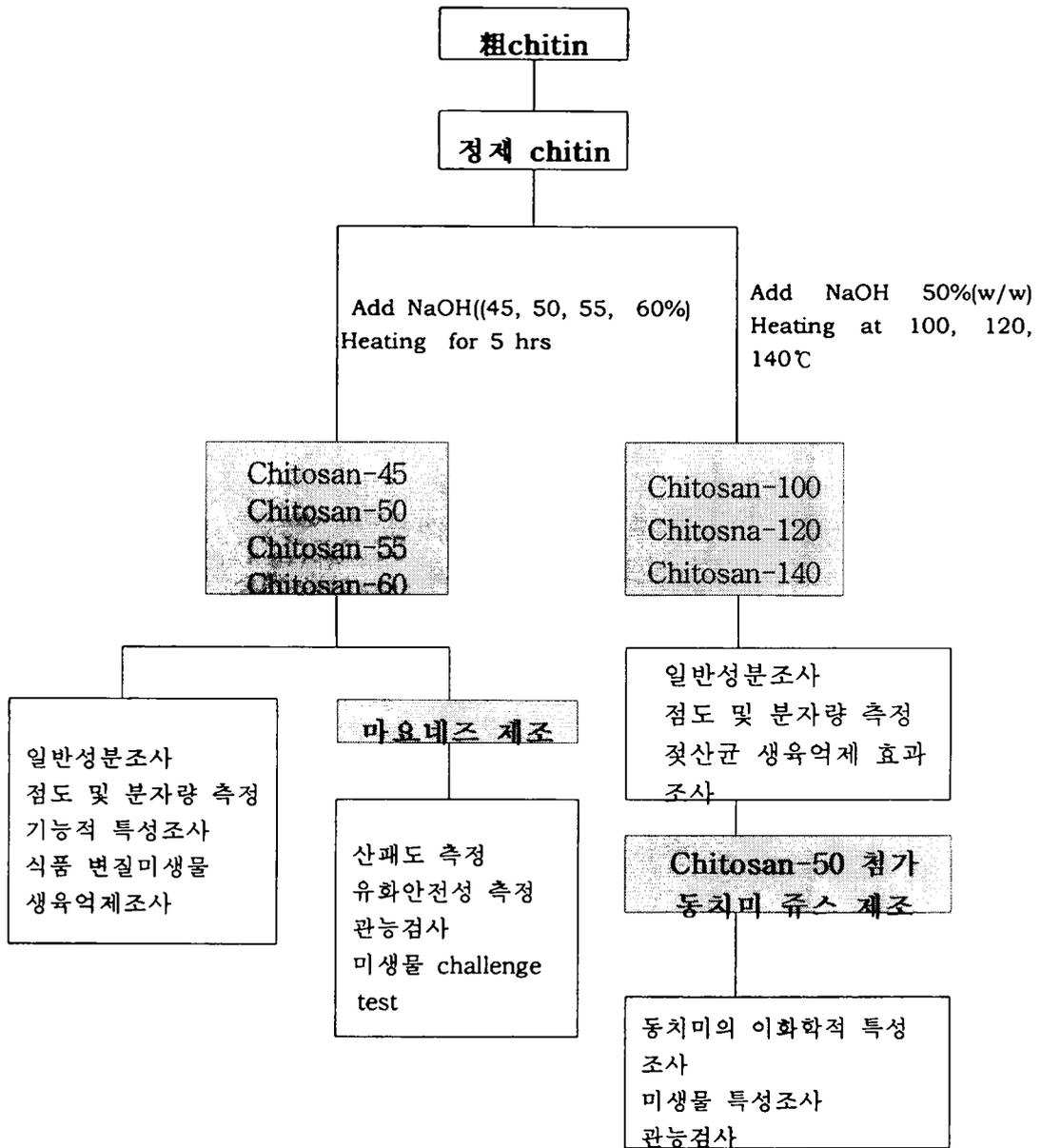
총세균수는 키토산 1000ppm 첨가 발효구에서 4, 10, 20℃의 발효온도에서 담금 1일째에 현격하게 저하되어 서서히 증가하다가 발효 말기에는 무첨가구와 유사한 수준에 이르렀다. *Leuconostoc*속 젖산균수는 키토산 1000ppm 첨가구에서 발효 초기에 급격히 감소했다가 곧바로 증식해서 타 시험구와 비슷한 생균수를 나타내었다가 발효말기에는 감소하는 경향을 보였다. *Lactobacillus*속 젖산균수는 발효 초기에 급격히 감소한 후 발효 중반에 타 시험구와 같이 최고생균수에 도달한 후 말기까지 유지되었다.

관능 검사 결과, 키토산 1000ppm 첨가군이 acidic odor와 acidic taste가 낮게 느껴질 뿐 아니라 느껴지는 기간이 지연되고, 적숙기에 도달하는 시기가 늦어지며, 적숙기간을 연장시킬 뿐만 아니라, total acceptability가 상승되는 것으로 나타나 저장성과 기호성을 동시에 개선한다고 사료되었다.

키토산 1000ppm 첨가구는 무첨가대조구에 비해서, 특히 4℃ 발효 중에서 적숙기 도달기간이 11일째에서 28일째로 2.5배 지연 효과를 나타냈고,

palatable period도 7일간에서 21일간으로 3배나 연장시켰으며, 또한 관능적으로 신맛을 느끼는 시기도 14일째에서 35일째로 2.5배 지연되었을 뿐만 아니라 기호성이 좋아지는 시기도 49일째에서 28일째로 40%이상 단축되었다.

키토산의 첨가는 동치미 발효중 젖산균생육을 억제시켜서 산생성을 지연시키므로써 보존성을 물론 최적발효기간을 연장시키 줄 뿐만 아니라 생성된 젖산과 acetic acid의 산냄새와 맛을 완화시켜 기호성도 향상되는 것으로 나타났다. 따라서 보존성의 연장, 적숙 발효기간 연장 뿐만 아니라 물리적 성질과 기호성을 증진시켜 주는 효과가 확인되었다.



IV. 참고문헌

1. 홍상필, 김동수 : 생물 신소재, 키틴/키토산의 이용. 식품기술 제 8 권 제2호 49(1995)
2. 홍상필, 황재관, 김동수 : 키틴/키토산의 기능성과 올리고당의 생산 기술. 식품과학과 산업, **30**(1), 44(1997)
3. Austin, P.R., Brine, C, J., Castle, J. E., and Zikakis, J.P. Chitin : New facets of research. *Science* **212**, 749(1981)
4. 이근태, 박성민, 백운두 : 갑각류 외피의 유효이용을 위한 키틴/키토산의 제조와 물성학적 특성에 관한 연구(1. 키토산의 분자량과 탈아세틸화도에 미치는 영향). *J. Korean Fish. Soc.* **28**(4), 392(1995)
5. Davies, D. H. and Munree, V. G. : Organic solvent systems for chitosan. Proceedings of the international Conference on chitin/chitosan, 1, 103(1978)
6. Wu, A. C. M. and Bough, W. A. : A study of variables in the chitosan manufacturing process in relation to molecular-weight distribution, Chemical characteristics and waste-treatment effectiveness. Proceedings of the International Conference on Chitin/Chitosan, **1**, 88(1978)
7. Roberts, G. A. F. and Tylor, K. E. : The preparation and characterization of chitin bead for use in chromatography. Proceedings of the international Conference of Chitin/Chitosan, **4**, 577(1988)

8. 이우진, 한범구, 박인호, 박승현, 오훈일, 조도현 : 키토산 제조시 반응온도와 시간 및 입자 크기가 키토산의 물리화학적 특성에 미치는 영향. 한국식품과학회지, 27(6), 997(1995)
9. Sannan, T., Kurita, K. and Ikakura, Y. : Studies on chitin : I.r. spectroscopic determination of degree of deacetylation. *J. Polymer*, 19, 458(1978)
10. Muzzarelli, R. A. A. : Chitin. Pergamon Press, Oxford, p. 79(1977)
11. A.O.A.C. : *Official Methods of Analysis*. 15th ed., Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, p. 868(1990)
12. A.O.A.C. : *Official Methods of Analysis*. 15th ed., Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, p. 868(1990)
13. A.O.A.C. : *Official Methods of Analysis*. 15th ed., Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, p. 868(1990)
14. 식품공전: 한국식품공업협회. p. 775(1994)
15. 천정아, 송은승 : 저지방 마요네즈의 물성과 관능적 특성. 한국식품과학회지, 27(6), 839(1995)
16. Lin, M., J., Y. and Humbert, E., S. : Certain functional properties of sun flower meal products. *J. Food Sci.*, 39, 368(1974)

17. Knorr, D. : Dye-binding properties of chitin and chitosan. *J. Food Sci.* **48**, 36(1983)
18. 정계환 : 가시발 새우 껍질에서 제조한 키토산의 특성과 폐수처리효과 및 고지 혈중 흰쥐의 지질대사에 미치는 영향. 경상대학교 박사학위논문(1995)
19. No. H., K. and Meyer, S. P. : Preparation and characterization of chitin and chitosan. A review. *J. Aquatic Food product Technol.*, **4**, 27(1995)
20. 조학래 : 저분자 chitosan의 항균성 및 식품보존 효과에 관한 연구. 부산수산대학 박사학위논문 (1989)
21. 식품첨가물공전 : 한국식품공업협회(1996)
22. Knorr, D. : Functional properties of chitin and chitosan. *J. Food Sci.* **47**, 593.(1982)
23. 장현주, 전동원, 이서래 : 게껍질 Chitin 및 Chitosan의 소화관내 기능성에 관한 연구. 한국식품 과학회지, **26(4)**, 348(1994)
24. 김재욱, 손양도, 홍기주, 유무영, 정계환, 허종화 : 마요네즈 제조시 품질 특성에 미치는 저에루신산 유채유 혼합의 영향, 한국식품과학회지, **27**, 298(1995)
25. 김세권 : 키틴, 키토산 및 그 유도체의 제조기술과 개발동향(제 2 회). 기술정보
26. Claude P. Champagne, Bernard Aurouze and Gilles Goulet : Inhibition of undesirable gas production in tofu. *J. Food Sci.* **56(6)** 1600-1603(1991)

27. 김인애 : Mayonnaise 제조시 tocopherol 첨가 효과에 관한 연구. 성
심여자대학원 석사논문
28. Harrision, L.J. and Cunningham, F.E. : Influence of salt on
properties of Liquid Yolk and Funtionality in Mayonnaise.
Poultry Science, 65, 915(1986)
29. Dutilh, G.E. and Groger, W. : Improvement of product Attributes
of Mayonnise of Enzymic Hydrolysis of Egg Yolk with
Phospholipase A₂. *J. Sci. Food Agric.*, 32, 451(1981)
30. Kurtzman, C. P., Ruth Rogers, and Hesseltine, C. W. :
Microbiological spoilage of mayonnaise and salad dressings.
American Society for Microbiology, 21(5), 870(1971)
31. Hocking, A. D. : Fungal spoilage of high-fat foods. AIFST
Convention paper. *Food Australia* 46(1), 30(1994)
32. 김재욱, 손양도, 홍기주, 유무영, 정계환, 허종화 : 마요네즈 제조시
품질 특성에 미치는 저에루신산 유채유 혼합의 영향. 한국식품과학회
지, 27, 298(1995)
33. Yu-tsyr Li Hsieh and Joe M. Regenstein : Factors affecting
quallity of oil mayonnaise. *J. Food Sci.* 56(5), 1298(1991)
34. 천정아, 송은승 : 저지방 마요네즈의 물성과 관능적 특성. 한국식품
과학회지, 27(6), 839(1995)
35. 김동훈 : 식품화학. 탐구당(1988)
36. 이종미 : Chitin계 물질을 이용한 Salad dressing의 개발. 한국음식
문화연구원논문집, p. 427(1997)

37. 최홍식, 권태완 : 라면 유지의 안정성에 관한 연구. (I)시험저장중 라면 유지의 산패에 대하여. 한국식품과학회지, 4(4), 259(1972)
38. 최홍식, 박경숙, 문갑순, 박건영 : 지방질의 산화에 대한 된장 및 그 추출물의 항산화 특성. 한국식품과학회지, 19(2), 163(1990)
39. 차기성, 김재욱, 최춘언 : 마요네즈 제조시에 난황 사용량에 따른 유화 안전성의 비교. 한국식품과학회지, 20(2), 225(1988)
40. 今井忠平 : マヨネズ・ドレシソグの鮮度保持と測定. 食品工業, 17, 89(1974)
41. 조재선, 황성연 : 김치류 및 절임류의 표준화에 관한 조사 연구(2). 한국식문화학회지. 3, 301(1988).
42. 정동효 : 김치성분에 관한 연구(제8호), 동치미 산화 - 환원 전위에 대하여. 한국식품과학회지, 2, 34 (1970)
43. 이매리, 이해수 : 동치미의 맛 성분에 관한 연구. 한국조리과학회지, 6,1 (1990)
44. 강근옥, 손현주, 김우정 : 동치미의 발효 중 화학적 및 관능적 성질의 변화. 한국식품과학회지, 23, 267 (1991)
45. 강근옥, 김종근, 김우정 : 열처리 및 염의 첨가가 동치미 발효에 미치는 영향. 한국영양식량학회지, 20, 565 (1991)
46. 강근옥, 구경형, 김우정 : 동치미의 저장성 향상을 위한 열수 담금 및 염혼합물의 병용효과. 한국영양식량학회지, 20, 559 (1991)
47. 강근옥, 구경형, 이정근, 김우정 : 동치미의 발효 중 물리적 성질의 변화. 한국식품과학회지, 23, 262 (1991)
48. 문성원, 조동욱, 박완수, 장명숙 : 동치미의 발효 속성에 미치는 소

- 금농도의 영향. 한국식품과학회지, 27, 11 (1995)
49. 김미정, 문성원, 장명숙 : 양파첨가가 동치미의 발효속성에 미치는 영향. 한국영양식량학회지, 24, 330 (1995)
 50. 장명숙, 문성원 : 감초첨가가 동치미의 발효속성에 미치는 영향. 한국식품과학회지, 24, 744 (1995)
 51. 박세원 : 동치미 발효와 이에 관여하는 젖산균의 분리 및 동정. 세종대 박사학위논문 (1995)
 52. 권수미 : 인삼을 첨가한 동치미 주스의 품질특성에 관한 연구. 세종대 석사학위논문 (1997)
 53. 김순동 : 개량 김치독에 의한 동치미의 숙성에 관한 연구. 영남전문대학교 논문집, 6, 247 (1978)
 54. 지옥화 : 염도를 달리한 무우 김치의 숙성기간에 따른 비휘발성 유기산의 변화. 충남대 석사학위논문 (1981)
 55. 고은정, 허상선, 박만, 최용희 : 이온음료 제조를 위한 동치미의 최적 담금 조건에 관한 연구. 한국영양식량학회지, 24, 141 (1995)
 56. 황규찬 : 침채류의 숙성세균과 Vitamin B₁₂ 생산성. 경희대 박사학위논문(1983)
 57. 오충규 : 김치에서 분리한 유산균에 미치는 식염과 유기산의 영향. 경희대 석사학위논문 (1996)
 58. 안숙자 : 김치에서 분리한 유산균의 생육에 미치는 식염과 식품보존료의 영향. 한국조리학회지, 4, 39 (1988)
 59. Papineus, A.M., Hoover, K.G. and Knorr, D. : Antimicrobial activity of chitosan. *Food Biotechnol.*, (1990)

60. Kendra, D.F. and Hadwiger, L.A. : Characterization of the smallest chitosan oligomer that maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits piastin formation in *Pisum sativum*. *Exp. Mycol.*, **8**: 276 (1984)
61. 内田 泰. : 天然保存料シリーズ, キトサン 日添加會報 **7**, 9 (1988)
62. 内田 泰 : キチン, キトサンの 抗菌性. 月刊フ-ドケミカル, No.2, 22(1988)
63. 김광옥, 강현전 : 제조조건이 다른 새우껍질 chitosan의 물리 화학적 성질 및 깎두기의 보존성에 미치는 영향. 한국식생활문화학회지, **9**, 71(1994)
64. 이희섭, 이귀주 : 무우의 염장과정중 조직감의 변화에 대한 예열처리 및 chitosan 첨가효과. 한국식생활문화학회지, **27**, 420 (1995)
65. 김광옥, 문형아, 전동원 : 저분자 chitosan이 배추김치 모델시스템의 보존성에 미치는 영향. 한국식품과학회지, **27**, 420(1995)
66. 노홍균, 박인경, 김순동 : 소금절임시 키토산 첨가가 김치의 보존성에 미치는 효과. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **244**, 932~936 (1995)
67. 한국식품공업협회 : 식품첨가물공전 (1996)
68. Brookfield engineering laboratories, Inc.: Brookfield viscometer manual, Measurement and control of viscosity (1995)
69. 키친, 키토산 硏究會編 : 키토산實驗マニュアル, 枝報堂出版, p.57 (1991).
70. 심선택 : 침채류 발효 중 산도증가 둔화현상과 미생물의 교대. 세종대석사학위논문 (1989)

71. Mayeux, J.V. and Colmer, A.R. : Selective medium for *Leuconostoc* detection. *J. Bacteriol.*, **81**, 1009 (1961)
72. A.O.A.C. : *Official Methods of Analysis*, 15th ed., Association of Official Analytical Chemists, 942. 15 (1990)
73. 주현규, 박충균, 조규성, 마상조 : 식품분석법. 유희문화사, p. 303 (1990)
74. 김종근, 최희숙, 김상순, 김우정 : 발효 중 오이지의 물리화학적 및 관능적 품질의 변화. *한국식품과학회지*, **21**, 838 (1989)
75. Larmond, E. : *Methods for Sensory Evaluation of Foods*. Canada Department of Agriculture (1970)
76. 김광옥, 이영춘 : 식품의 관능검사. 학연사, p. 9 (1989)
77. 정계환 : 가시발새우껍질에서 제조한 키토산의 특성과 폐수처리효과 및 고지혈증 흰쥐의 지질 대사에 미치는 영향. 경상대학교 박사학위 논문 (1995)
78. 김용진 : 제조조건에 따른 키토산의 이화학적, 미생물학적 특성 및 마요네즈 저장성에 미치는 효과. 세종대 석사학위논문(1998)
79. 장상근 : 동치미 및 배추김치의 제조조건이 물리화학적 특성에 미치는 영향. 세종대 박사학위논문 (1995)
80. 문성원, 조동욱, 박완수, 장명숙 : 동치미의 발효 속성에 미치는 소금농도의 영향. *한국식품과학회지*, **27**, 11 (1995)
81. 강근옥 : 동치미의 발효 중 물리화학적 및 관능적 특성 변화에 관한 연구. 세종대박사학위 논문 (1989)
82. 이용호, 이혜수 : 김치의 숙성과정에 따른 펙틴질의 변화. *한국조리*

과학회지, 2, 54 (1986)

83. 이희섭 : 무의 염장과정중 조직감의 변화에 대한 예열처리 및 키토산 첨가효과. *Kor. J. Dietary Culture*, 9, 1 (1994)
84. 전문정 : Nisin을 이용한 김치의 저장성 향상에 관한 연구. 세종대 석사학위논문 (1993)
85. 구경형, 강근옥, 김우정 : 김치발효 과정 중 품질 변화. *한국식품과학회지*, 20(4), 476 (1988)

제 4 세부과제. 농업용 및 의료용 소재의 개발 연구

I. 농업용 소재 개발 연구

제1장 서 론

키틴, 이를 탈아세틸화한 키토산(Chitosan), 이들의 화학적 수식을 통하여 얻어진 키틴 유도체들, 이와 관련한 효소들, 키틴 및 키토산의 분해 산물들은 가까운 미래에 신기능성 생물신소재(New Biomaterial)로서 화공, 환경, 의약, 의료, 농업, 식품 등 다양한 분야에서 그 응용이 기대되고 있다.

키틴이 갖는 산업소재로서의 중요한 특징으로는 1) 갑각류 껍질에 분포하는 생물자원의 구성분, 2) 생물적으로 재생 가능한 천연자원, 3) 자연환경을 오염시키지않는 생분해성, 4) 동물 및 식물 조직과 공존 가능한 생물 적합성(biocompatibility), 5)아미노 다당류인 생물고분자(aminopolysaccharide), 6) 거의 무독성(LD50 16g/kg body weight in mice), 7) 다양한 생물학적 기능성 (functionality), 8) 분자 입체형태의 가변성, 9) 산업적으로 젤, 구슬, 섬유, 필름, 콜로이드, 용액, 분말 등으로 조제 가능, 10) 화학적으로 수식 가능한 아미노기와 히드록시기(2-NH₂, 3-OH, 6-CH₂OH)를 가진 점, 11) 다양한 생물활성 등이다.

갑각류의 껍질은 건조 분쇄하여 비료로서 사용되어온 것이며, 일본에서는 이의 효과가 인정되어 비료로 등록되어 있는 농업용 소재이다. 이후 연구에서 갑각류의 비료로서의 효과가 키틴과 키토산에서 비롯된 것임이 해

명되면서, 이들은 환경친화형의 식물생장/반응 촉진/조절제, 천연농약 (내충성 및 내병성의 증강제), 농산물 품질 및 수량 향상제, 기타 신기능성 소재 물질 등의 농림용의 신소재로서 개발되어 활용되고 있거나 미래 개발 가능성이 큰 소재로 인식되고 있다.

이에, 키틴과 그 유도체를 이용하여, 농업용 소재의 개발을 위하여 다양한 키틴 유도체를 조제하여 이들의 생물활성을 조사하고자 하였다.

제2장 실험방법

1. 키토산 올리고머(oligomers)의 조제

가. 효소를 이용한 키토산 올리고머의 조제

1) 균주의 배양

본 실험실에서 분리한 *Bacillus* sp. P16을 LB배지(+1% NaCl, 0.5% powdered chitosan, 1% tryptone, pH 7.0)에서 72시간, 37℃에서 진탕배양한 다음 원심분리(10,000 g x 60 min)하여 조효소액을 얻었다. 이를 Ultrafiltration kit (Amicon)으로 농축한 다음 투석하여 동결건조하였다.

2) 올리고당의 조제

키토산(금호화성 제품, 탈아세틸화도 85.4%, 분자량 400,000 이상) 5 g에 1 M 초산 23.3 ml을 가하고 증류수를 가하여 녹인 다음 최종 100 ml로 조정하여 5% 키토산 용액을 만들었다. 여기에 상기 효소 (3 mg/ml in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.5) 1 ml를 가하여 40℃에서 진탕반응시켜, 종료 후 가열하여 반응을 중지시킨 다음 동결건조하였다. 이렇게 조제된 시료를 Horowitz 등의 방법을 이용하여 올리고당을 분별 분리하였다. 즉, 유리대롱 (4.6 x 50 cm)에 Dowex 50W 800 ml을 채우고 여기에 효소분해로 조제한 키토산 분해물 12 g을 0.5 M HCl 용액에 녹여 가한 다음 증류수 300 ml로 씻어 준 다음 1.15 M HCl 2.5 L와 5.5 M HCl 2.5 L를 준비하여 농도구배 크로마토그래피하였다. 각 분획은 Ninhidrin 반응으로 발색하여 570nm의 흡광도를 측정하였으며, 각 해당 분획은 농축 건조하였다.

나. 염산 부분가수분해

키토산 10 g에 농염산 100 ml을 가하고 80도에서 20-100분간 가수분해시켰다. 불용물을 원심분리하여 제거하고, 상등액에 활성탄을 가하여 탈색시킨 후에 감압농축 건조시켰다. 여기에 메탄올 80 ml을 가하여 실온 2시간 교반하고 흡입여과하여 불용물을 제거하고 다시 감압농축 건조시켰다.

다. 올리고당의 분리 및 정제

이온교환수지법: 상기한 부분분해물 3 g을 물에 녹여 200 ml의 이온교환수지 (Dowex50W H⁺ form, 1.8x50 cm)에 흡착시키고, 1.15 N 염산 150 ml, 1.8 N HCl 300 ml, 2.54 N HCl 400 ml 순으로 순차적으로 용출시켰다. 올리고당의 검출은 닌히드린 시약을 사용하여 570nm에서 흡광도를 측정하여 행하였으며, 키토산 올리고당은 TLC와 HPLC로 분리 검출하였다.

Ultrafiltration 법: Amicon Disflo ultrafiltration membrane을 이용하여 키토산의 산 가수분해물을 올리고머 크기별로 분리할 수 있는지 검토하였다. 이때 사용한 filter는 YM1, YM3, YM10이었으며, 이들의 단백질 cut-off molecular weight는 각 1,000, 3,000, 10,000 dalton이다. 키토산 올리고머를 증류수에 녹이고 이를 순차적으로 YM10부터 통과시키는 방식으로 YM1까지 통과시켜 4획분으로 나누었다.

2. 키토산 유도체의 합성

가. 키토산의 조제

탈아세틸화도가 높은 키토산을 조제하기 위하여 Hirano 등의 방법을 이용하였다.

나. N-acetylchitosan gel 조제

키토산 3.2 g을 2% 초산 300 ml에 완전히 녹인 다음, 이를 메탄올 300ml을 가하여 희석하였다. 헥소사민 잔기당 5몰당량, 10ml의 무수초산을 교반하면서 방울방울 천천히 30분 이상 걸러 가하고, 이를 실온에 방치하였다. 이때 1시간 이내에 젤화가 일어났으며, 이 젤을 증류수에 하루 침적하여 치환도 1.0의 N-acetylchitosan gel을 얻었으며, 이를 건조시켜 xerogel chitin을 얻었다.

다. 알칼리 키틴 용액 조제

3.2 g의 키토산에서 조제한 N-acetylchitosan gel (ds 1.0 for NAc)을 2일간 투석시킨 다음, 여기에 증류수를 가하고 믹서로 잘게 갈아 균질화시켰다. 이를 여과하고 0.5% 수산화나트륨으로 씻은 다음, 압력을 가하여 눌러 그 무게가 대략 72 g쯤 되도록 하였다. 이를 진한 수산화나트륨 용액 (28 g/60 ml)에 분산시켜 2시간 동안 실온에서 저어준 다음 그 부피를 200 ml이 되도록 조절하였다. 이렇게 하면, 14% 수산화나트륨 용액에 2% 알칼리 키틴 용액이 조제되었다.

라. Carboxymethylchitin의 조제

이 알칼리 키틴용액을 얼음수조에 담가서 냉각시킨 다음, sodium chloroacetate (28 g, 12 eq. mol/ mol GlcNAc)을 얼음수조에서

14%(W/W) NaOH 용액 (70 ml)에 녹여서, 이를 잘 저어주면서 키틴용액에 30분 이상에 걸쳐 방울방울 가하였다. 이 용액을 얼음수조에 재냉각시키고 무수초산 8 ml을 방울방울 잘저어주면서 30분 이상에 걸쳐 가하여 ~3.5 g의 CM-chitin sodium salt를 얻었으며, 이로부터 salt-free CM-chitin이 얻어졌다.

마. O-acetylsalicylchitosan의 조제

본 실험실에서 합성한 aspirin 7.2 g과 dicyclohexylcarbodiimide 4.33 g을 anhydrous dioxane 40 ml에 녹여서 실온에서 3시간 반응시킨 다음 침전물을 여과하고 여액을 감압농축하였다. 이를 초산용액에서 재결정하여 aspirin anhydride를 얻었다.

0.32 g의 키토산을 2% acetic acid 25 ml에 녹이고 여기에 50 ml의 메탄올을 가하였다. 여기에 글루코피라노오스의 10당량의 aspirin anhydride를 가하여 하룻밤 방치하였으며, 이를 증류수에 투석한 후 0.1% NaOH를 가하여 중화하여 이를 다시 투석한 다음 여과하고 에탄올로 씻고 건조하였다.

바. N-Trimethylacetylchitosan의 조제

0.32 g의 키토산을 2% acetic acid 25 ml에 녹이고 여기에 50 ml의 메탄올을 가하였다. 여기에 글루코피라노오스의 10당량의 trimethylacetic anhydride를 가하여 하룻밤 방치하였으며, 이를 증류수에 투석한 후 0.1% NaOH를 가하여 알칼리화하여 이를 다시 투석한 다음 감압농축하고 에탄올을 가하여 침전시켰다. 원심분리 후에 에탄올로

씻고 건조하였다.

사. Trifluoroacetyl chitosan의 조제

0.32 g의 키토산을 2% acetic acid 25 ml에 녹이고 여기에 50 ml의 메탄올을 가하였다. 여기에 글루코피라노오스의 0.3당량의 trifluoroacetic anhydride를 가하여 하룻밤 방치하였으며, 이를 증류수에 투석한 후 0.1% NaOH를 가하여 알칼리화하여 이를 다시 투석한 다음 냉동건조시켰다.

아. Chitosan sulfate 조제

10 g의 키토산 (탈아세틸화도 0.85)을 1 L 2% 초산에 용해하고, 불용물을 제거한 다음, 2.5 M NaOH 수용액으로 중화하였다. 석출하는 침전물을 여과 수집하고, 증류수, 에탄올, 무수 에탄올, 에테르 순으로 세척한 다음, 80 ml의 정제 피리딘(pyridine)에 현탁하였다. 60 ml의 정제 피리딘을 플라스크에 담고 이를 얼음수조에서 냉각하고 10 ml 염화술폰산 (chlorosulfonic acid)을 30-40분 동안에 방울방울 가하였다. 여기에 상기한 키토산 현탁액 40 ml (키토산 함량 3.5 그램)을 가하고, 비등수조에서 1시간 가열하였다. 실온까지 냉각하고, 200ml의 증류수에 부으면 투명한 갈색용액이 얻어졌다. 75 ml의 2.5 M NaOH 수용액을 가하고, 500 ml의 에탄올을 사용하여 황산화 키토산의 나트륨염을 침전시켰다. 이 침전을 다시 200 ml의 증류수에 용해하여 증류수 중에서 3일간 투석한 다음 용액을 100 ml까지 감압농축하고, 10 ml의 포화 NaCl 수용액을 가하고, 150 ml ethanol을 사용하여 다시 침전시켰다.

자. N-[¹⁴C]-labeled N-acetylchitosan의 조제

상기한 (2)항의 방법으로 [¹⁴C]-1-acetic anhydride를 사용하여 표지된 N-[¹⁴C]-labeled N-acetylchitosan을 조제하였다.

3. 분석

가. TLC

실리카겔 박판에 점적한 시료를 n-propanol:water:ethylacetate: ammonia (6:3:3:1, v/v) 용매계에서 전개한 다음 닐히드린으로 발색 검출하였다.

나. HPLC

Shimadzu liquid chromatograph LC-10AS (column: Shim-Pack CLC-NH2; eluant: 60% acetonitrile; flow rate: 1.0 ml/min; detector: differential refractometer)를 사용하여 올리고당을 분석하였다.

다. FT-IR

Nicolet Instrument FT-IR (Model 520P)을 사용하여 IR spectrum을 분석하였다.

4. 키틴 유도체의 생물활성

가. 콩나물의 생장에 미치는 키토산 처리 효과 검정

콩나물콩 (카나다산, 100립중 8.47 g)을 24시간 침지 발아시킨 다음 1% 키토산 용액에 실온에서 2시간 침지시켰다. 이를 6일간 생육상에서 20℃, 습도 80%의 암조건에서 재배하고 그 생육을 조사하였다. 대조구로는 콩나물 생장 조절제인 indole B를 사용 설명서에 따라 처리하였다.

나. 키틴/키토산 및 그 유도체의 농업용 소재로서의 응용성 평가

키틴 유도체의 농업용 소재로서의 개발을 위한 기초연구로서 우선 키틴 (DA 2.33%), 키토산 (DA 76.9%), 키토산 올리고당을 조제하였으며, 토마토 (품종, 영광)와 콩 등을 대상작물로 선정하여 토양혼화, 관주, 침지 등 3가지 방법으로 키토산 유도체들을 종실 또는 토양에 처리하여 발아와 초기 생장을 관찰하였다.

1) 토마토 종자의 침지처리

토마토 종자 약 40립중을 증류수와 키토산 용액(DA 76.91%, 100 mg/100 ml 0.2%젖산 수용액)에 24시간 침지하여 풍건한 후 증류수에 적신 거름종이를 깔 Petri dish에 27℃ 2일간 치상 발아상태가 양호한 종자를 정식 pot(5×5)에 상토 12 g을 넣은 후 종자를 파종하였다. 파종 후 30일, 45일 경과후에 초장, 엽수, 최대엽장, 뿌리길이, 생체중 등을 조사하였다.

2) 토양의 관주처리

키토산 용액과 키토산올리고당 용액을 토마토종자를 이식하기전에 각 pot 상토 표면에 골고루 25 ml씩 관주처리하였다.

3) 토양의 혼화처리

키틴, 키토산, 키토산올리고당 분말시료를 각 pot당 366 mg (33 kg/10a)상토와 골고루 잘 혼합처리하여 다시 pot에 옮겨담았다.

4) 키토산 농도별 발아율 조사

토마토종자의 키토산 농도별 발아율을 조사해 보고자 토마토종자 20립을 0.1% 초산용액에 녹인 키토산 용액을 농도별로 조제 control, 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5%에서 각각 발아시켜 (25℃) 발아율을 조사하였다.

다. 항균활성 검정

먼저, 본 실험실에 보유중인 각종 대장균에 대한 키토산의 생육억제 효과를 먼저 검정하였다. 대장균은 다양한 농도의 키토산을 함유한 LB 배지에서 37 C, 150 rpm으로 진탕배양하였으며 그 생육은 660nm에서의 흡광도를 측정하였다. 한편, 0.2%의 키토산을 함유하는 LB 배지에서 성장하는 대장균을 선발하였다.

한편, 다양한 농도의 (0, 10, 100, 250, 500, 1000, 2000 ppm) 키토산, 키틴, 키토산 올리고당 등을 함유한 PDA 배지에 균을 중앙에 접종하여 20℃ 암실에서 배양하면서 매일 균사의 크기를 측정하였다. 저해율은 대조구의 성장에 대한 비율로서 나타냈다.

제3장 결과 및 고찰

제1절 키토산 올리고당의 조제

1. 산 가수분해에 의한 올리고당의 조제 및 분리

가. 염산가수분해법에 의한 올리고당의 제조 조건 확립

키토산 30 g에 진한 염산 300 ml을 가하여 80℃에서 반응시간을 달리 하여 산 가수분해를 행한 다음 생성된 반응 혼합액을 HPLC로 분석하여 반응수율과 여러 중합도(dp: degree of polymerization)의 올리고당의 조성을 조사한 결과를 Table 1에 나타냈다. Table 1에 나타낸대로 반응 시간을 증가시킬수록 수율이 증가하여 81-85%를 유지하지만 대신 monomer의 함량이 증가하였다. 반응시간 60분에서 dp 4 이상의 고중합도의 올리고당이 가장 많이 생성되었다.

염산을 사용한 키틴/키토산의 가수분해에는 염산의 농도, 반응시간, 온도 등이 중요한 인자인 것은 알려져 있다. 그러나 고중합도의 올리고당의 생산을 위한 반응조건은 아직 덜 확립된 셈이며, 본 연구의 결과에서 보건대 염산 가수분해법에 의하여 고중합도의 키토산 올리고당을 생산하기 위하여는 반응시간의 적절한 조절이 중요한 것으로 나타났다.

Table 1. Effect of reaction time on the composition of chitosan hydrolyzate by HCl hydrolysis

Products	Reaction Time (min)					
	20	40	60	70	80	100
Monomer	25.1%	36.2%	31.4%	34.0%	48.3%	37.6%
Dimer	18.8	17.5	19.6	19.6	17.9	19.7
Trimer	23.9	17.9	16.6	16.5	13.6	15.5
Tetramer	8.6	7.9	9.6	9.1	7.9	9.0
Pentamer	7.1	6.3	8.2	7.5	5.6	7.0
Hexamer	8.2	6.3	6.7	6.1	3.4	4.9
Heptamer	5.0	5.6	5.6	5.3	3.2	4.6
Octmer	3.2	2.2	2.3	1.9	-	1.7
Yield (%)	33.0	48.0	85.2	82.4	81.4	81.9

나. 반응 생성물의 확인

이때 반응 생성물의 동정과 정량은 TLC 및 HPLC를 이용하였다. HPLC 분석조건에서 표준화합물과 반응 산물의 크로마토그램을 Fig.1에 나타냈다. 이 분석조건에서 여러 올리고머들의 분리는 양호하였다

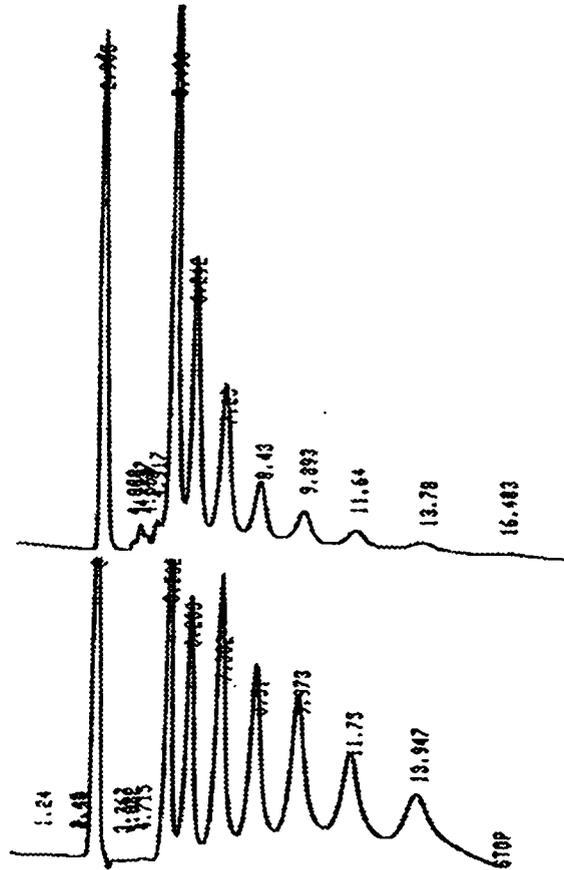


Fig.1. HPLC chromatograms of standard chitooligomers (monomer to heptamer) (lower) and HCl hydrolyzates of chitosan (upper).

Fig. 2는 80℃, 60분 염산 가수분해한 시료를 활성탄을 가하여 탈색시킨 다음 Dowex 50 column chromatography한 결과로 산 가수분해물은 크게 5 분획으로

나누어지는 것을 보여준다. 각 분획들이 함유한 올리고머를 HPLC로 분석하여 확인한 결과를 Table 2에 정리하였다. 이렇게 분획한 F1은 glucosamine monomer를, F2는 dimer를, F3는 trimer를, F4는 주로 tetramer와 일부 pentamer를, F5는 tetramer와 pentamer를 함유하고 있었다. 이 결과는 산 가수분해의 방법으로 제한적으로 (dp 5 이하의) 키토산 올리고당을 실질적으로 컬럼 크로마토그래피를 사용하여 정제 생산할 수 있음을 제시하는 것이다. 그러나 Table 1에 나타났던 반응물 가운데 소량 분포하는 dp 6 이상의 것들은 정제 회수하기 어려웠다.

이렇게 하여 조제된 키토산 올리고머 (F1-F5)를 공동 연구에 사용하도록 제공하였다.

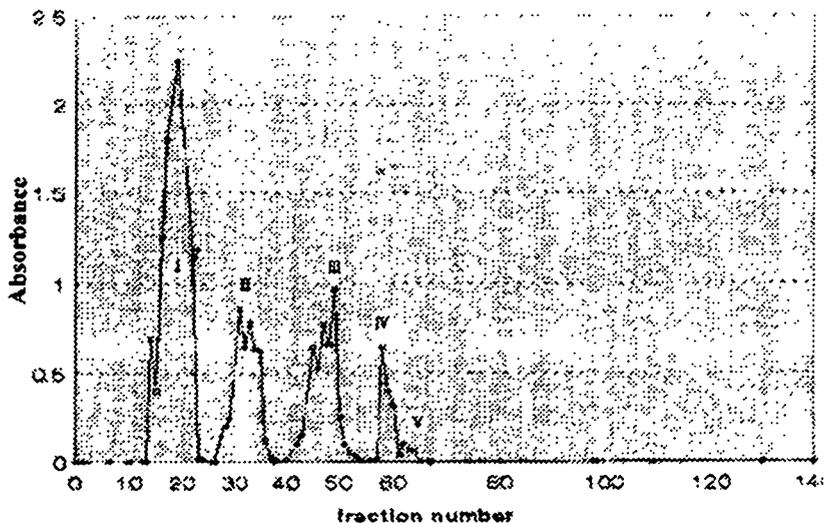


Fig. 2. Dowex 50 column chromatography of chitosan hydrolysates.

Table 2. Composition of the chitosan oligomer fractions separated on Dowex 50 column

	Fraction				
	F1	F2	F3	F4	F5
Monomer	98.0	3.0	0	1.0	6.6
Dimer	2.0	85.0	1.0	1.0	4.7
Trimer	-	8.9	97.0	2.0	8.7
Tetramer	-	2.0	2.1	76.0	39.6
Pentamer	-	1.1	-	20.6	30.4
Hexamer	-	-	-	-	6.0
Heptamer	-	-	-	-	3.9
Octamer	-	-	-	-	-
Yeild(%)	46.9	24.8	17.1	10.0	1.45

다. Ultrafiltration membrane을 이용한 올리고당의 분획

다음으로 Amicon Disflo ultrafiltration membrane을 이용하여 키토산의 산 가수분해물을 올리고머 크기별로 분리할 수 있는지 검토하였다. 이때 사용한 filter는 YM1, YM3, YM10이었으며, 이들의 단백질 cut-off molecular weight는 각 1,000, 3,000, 10,000 dalton이다. 키토산 올리고머를 증류수에 녹이고 이를 YM3을 통과시키는 방식으로 YM1까지 통과시켜 4획분으로 나누었다. 그러나 이 방법은 Table 3에 나타난 결과에서 보는 바와 같이 키토산 올리고머를 분리하는 방법으로는 효과가 적은 것으로 드러났다.

Table 3. Composition of the chitosan oligomer fractions separated with Diaflo ultrafiltration membrane

	Fraction			
	YM10-cut	YM1-cut	YM3-cut	YM1-filtrate
Monomer	27.9	21.8	23.4	31.8
Dimer	20.1	16.1	18.8	22.5
Trimer	16.8	13.6	17.4	16.8
Tetramer	10.2	7.3	12.2	9.2
Pentamer	8.9	10.7	11.9	7.7
Hexamer	6.7	9.6	10.7	5.0
Heptamer	6.5	9.2	5.7	7.0
Octamer	2.9	5.8	-	-
Nanomer	-	3.3	-	-
Yeild(%)	6.6	9.8	26.9	56.4

2. 미생물 효소를 이용한 고중합도 키토산 올리고머의 조제

본 실험실에서 분리한 몇몇 미생물이 생산하는 키토산분해효소를 사용하여 키토산을 효소적으로 가수분해하여 키토산올리고당을 얻었으며, 이들의 가수분해정도는 총환원능력으로 평가할 때 10-500 mg/g 범위였다. 이를 Dowex 50W 컬럼 크로마토그래피하여 분석한 결과를 Fig. 3에 나타냈다. 키토산올리고당은 8개 분획으로 나누어졌으며, 각 분획의 올리고당 조성을 HPLC로 분석한 결과는 Table 4와 같았다. 분획1은 이당류를, 분획2는 3당류를, 분획3은 4당류를, 분획4는 4-5당류를, 분획5는 5-6당류를, 분획6은 5-8당류를, 분획7과 8은 6-8당류를 중심 올리고당으로 함유하는 것을 알 수 있다.

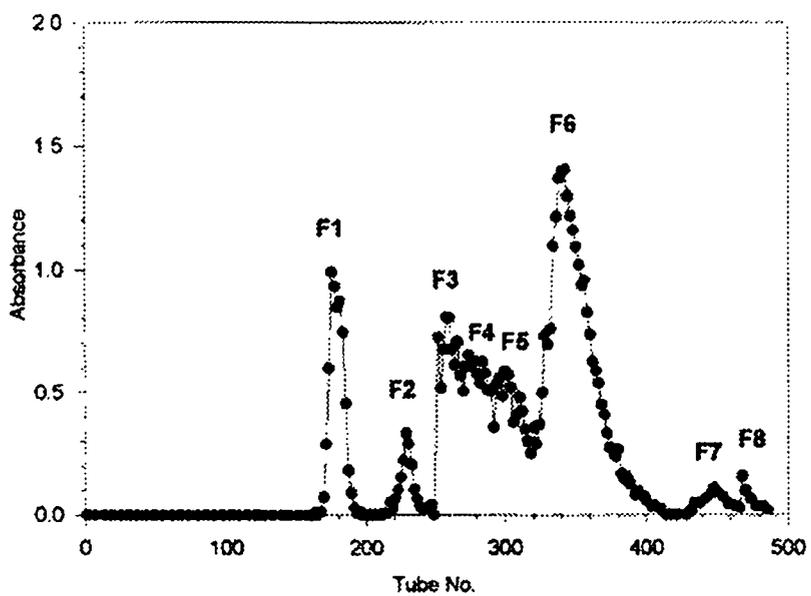


Fig.3. Dowex 50W chromatography of chitooligosaccharides produced by enzymatic hydrolysis.

Table 4. Chitooligosaccharide compositions of 8 fractions separated on Dowex 50W column. Each fraction was analyzed by HPLC.

Fraction	Degree of Polymerization								
	DP1	DP2	DP3	DP4	DP5	DP6	DP7	DP8	DP9
F1	18.1	58.0	8.63	6.81	4.7	3.8	-		
F2	3.53	6.7	73.8	6.03	5.15	4.73	-		
F3	-	6.3	8.14	53.7	7.57	11.5	6.29	4.09	2.0
F4	-	3.6	3.7	27.3	31.6	13.1	8.9	6.6	4.9
F5	2.17	3.4	3.9	7.7	33.8	18.5	11.3	9.1	7.7
F6	-	3.5	4.4	5.4	27.6	29.4	17.3	12.4	-
F7	-	4.8	6.5	6.7	12.2	21.2	20.5	16.6	11.4
F8	-	2.6	9.0	9.0	12.6	16.7	18.9	18.0	7.7

Fig. 4은 본 연구실에서 분리한 몇몇 미생물이 생산한 효소를 이용한 키토산의 분해산물을 TLC로 분석한 chromatogram이다. Fig. 4에서 본 바와 같이 이들 미생물 효소는 키토산을 분해하여 중합도 2이상의 키토산 올리고머를 생산하였다. 이 중 몇가지 미생물들은 고중합도 올리고머의 대량생산을 위한 효소 소재로 가능성이 커 보였다.

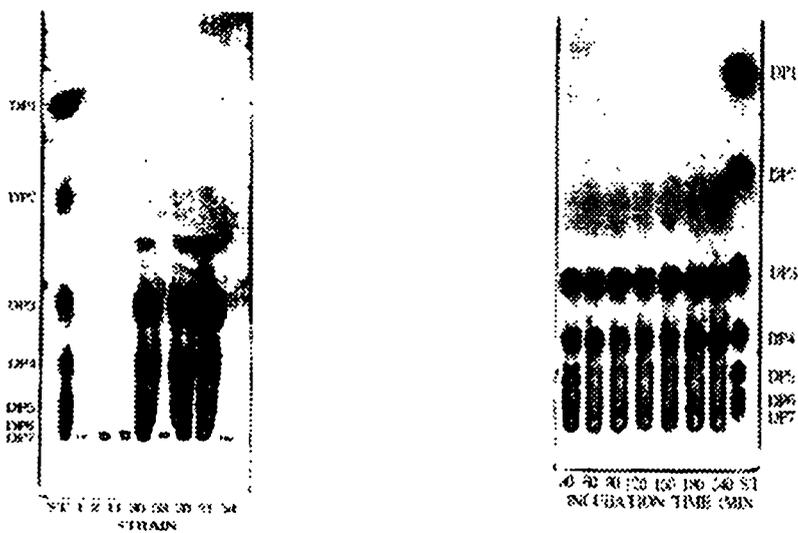


Fig.4. TLC chromatograms of chitosan chitooligosaccharides.

Soluble chitosan was incubated with the each supernatant of the screened *Bacillus* sp. P1, P2, P11, P20, P21, P30, P53 and P54, and the products were analyzed by TLC

Fig.5. Effect of enzyme reaction time on the composition of chitooligosaccharides. Soluble chitosn was incubated with the culture supernatant of *Bacillus* sp. P21, for various time intervals and the products were analyzed by TLC.

그중 한가지 미생물의 배양 상등액과 키토산을 배양하였을 때, 배양 시간의 영향을 조사한 결과를 Fig. 5에 나타냈다.

반응시간을 30분에서 4시간까지 조사한 결과, 중심 생성물은 중합도 3-7 또는 그 이상의 고중합도 키토산 올리고당이었으며, 시간이 경과하여도 올리고당의 조성은 큰 변화를 보이지 않았으며, 특히 단당은 전혀 생성되지 않았다. 이는 이 효소가 당전이활성(transglycosylation activity)을 갖는데서 기인할 수도 있을 것이다. Fig. 6은 이 키토산분해효소와 키토산 반응혼합액의 점성 변화를 시간에 따라 측정한 것이다.

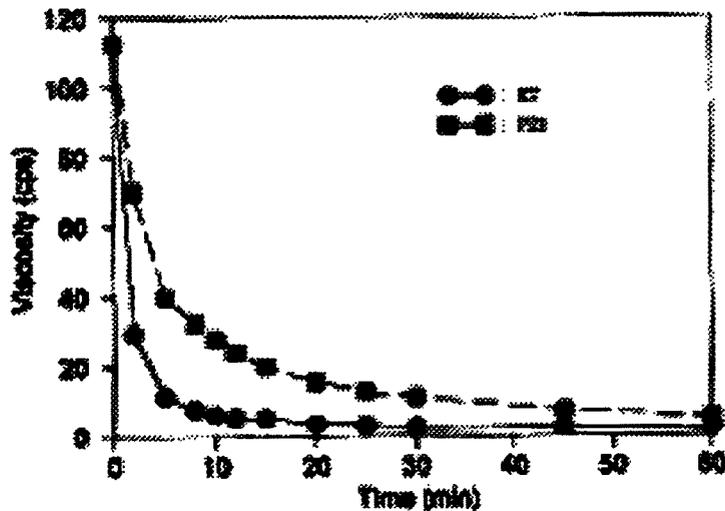


Fig.6. Viscosity changes of 1% chitosan solution during incubation with the culture supernatant of *Bacillus* sp. P21 or commercial enzyme E7.

이 균주가 생산하는 조효소의 키토산분해효소 활성은 대조로 사용한 비교적 정제된 시판 효소 E7의 그것에는 미치지 못하였으나 이 효소가 조효소액을 그대로 사용한 것임을 고려한다면 이 효소는 키토산을 내부가수분해하는 효소활성이 큰 것으로 평가되었다. Fig. 7은 이 효소와 시판효소 E7의 키토산 분해산물을 HPLC로 분석 비교한 결과를 보여준다. 어느 것에서나 이당류 이상의 올리고당을 주 생성물로 확인할 수 있었으며, 두 효소의 키토산 분해산물의 조성에서는 별 차이를 발견할 수 없었다. 이러한 결과에 근거하여 앞으로 이 효소 분해 산물 분석을 포함하여 이 효소의 여러가지 성질을 연구할 가치가 크다는 것이다.

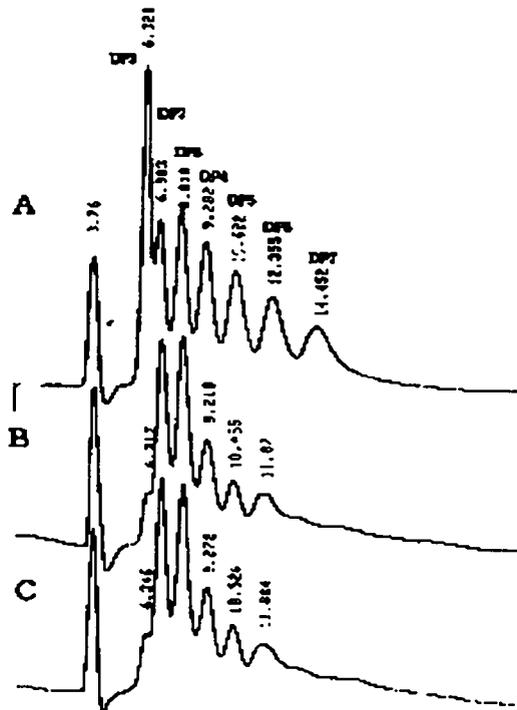


Fig.7. HPLC chromatograms of chitosan hydrolyzates. Soluble chitosan was incubated with the culture supernatant of *Bacillus* sp.21 or commercial enzyme E7, and the products were analyzed by HPLC.

제2절 키토산 유도체의 합성

1. N-[¹⁴C]-labeled N-acetylchitosan의 조제

N-[¹⁴C]-labeled N-acetylchitosan을 상기한 방법으로 chitosan과 (1-¹⁴C)-acetic anhydride를 사용하여 조제하였으며(표지효율 9.4%), 이를 다른 연구자들에게 제공하였다.

2. 키토산, 재생키토산, carboxymethylchitin의 조제

게 껍질 키토산에서 Hirano등의 방법으로 키토산을 조제하였으며, 이 키토산을 아세틸화하여 재생키토산을 조제하였다. 한편, 알칼리 키토산용액을 조제한 다음 carboxymethylchitin을 조제하였다. 이렇게 조제된 키토산, 키토산, 재생키토산의 FT-IR spectrum이 조사되었다(Fig. 8).

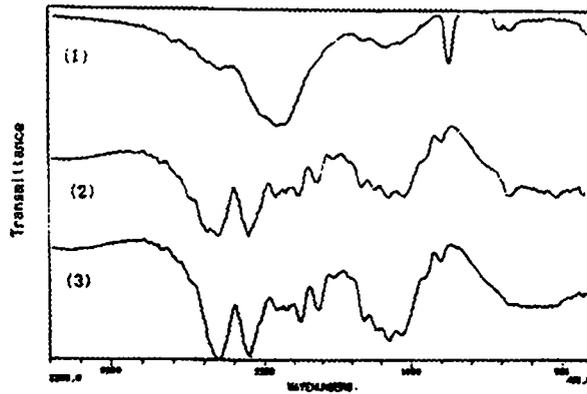


Fig.8. IR spectrums of chitin (3), chitosan (1) and regenerated chitin (2) prepared from squid pen.

키토산은 1651, 1550, 1379 cm^{-1} 에서 각각 CONH의 stretching, CN 결합에 대한 CO stretching, CH₂ wagging을 나타내는 amide band를 보였다. 탈아세틸화된 키토산은 amide의 특징적인 띠를 상실하고 대신 1454 cm^{-1} 에서 강한 띠를 보였으며 872 cm^{-1} 에서 새로운 띠를 보였다. 이 키토산을 아세틸화시킨 재생키토산은 다시 amide 띠를 회복하여 키토산의

그것과 비슷한 띠들을 보였다. 이결과들은 Muzzarelli이 보고한 IR spectrum과 일치하는 것이며, 이러한 사실들은 본 실험에서 조제한 키틴과 키토산이 적절하게 조제되었음을 시사하는 것이다.

3. 0-acetylsalicylchitosan, trimethylchitosan, trifluoracetyl-chitosan, chitosan sulfate의 조제

상기한 방법으로 0-acetylsalicylchitosan, trimethylchitosan, trifluoracetylchitosan, chitosan sulfate 등을 조제하였다. 이들의 FT-IR spectrum을 조사하였다.(Fig.9)

0-acetylsalicylchitosan과 trifluoracetylchitosan의 조제는 아직까지 보고된 바 없다.

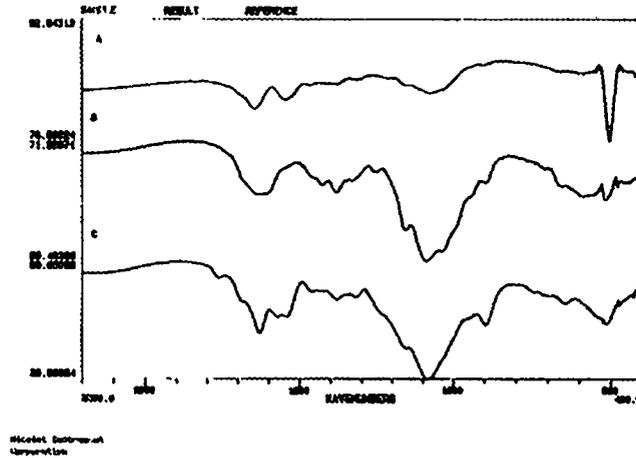


Fig.9. FT-IR spectra of N-trimethylacetylchitosan(A),
N-trifluoroacetylchitosan(B) and N-(O-acetylsalicyl)-chitosan(C).

4. 키토산 황산염의 합성

상기한 방법으로 chitosan sulfate를 합성하였으며 10 g의 키토산으로부터 2.9 g의 최종산물을 얻었다. 이 방법으로 얻은 황산화 키토산은 당 잔기 1 몰당 1몰의 황산기를 갖는 것으로 보고되고 있으나 본 연구에서는 아직 원소분석을 수행하지 못했다.

제3절 키틴 및 키토산 유도체의 생물활성

1. 콩나물의 생장에 미치는 키토산의 영향

소위 무공해 콩나물의 재배를 위한 소재로 키토산을 활용하고자 키토산이 콩나물의 생장에 미치는 영향을 조사하였다. Table 5에 보인 바

와 같이 키토산의 처리는 시중에서 판매 사용되고 있는 콩나물 재배 약제인 Indol B의 처리 경우 보다 콩나물의 신장을 촉진시키는 결과를 보여주었다. 이를 부위별로 분석하면 줄기의 길이는 두 처리 사이에 차이가 없었으나 뿌리의 신장에서 차이가 인정되었다. 즉, 인돌비의 처리는 콩나물의 뿌리의 신장을 억제하였으나 키토산의 처리는 그 신장을 억제하지 않는 것으로 보였다. 키토산의 처리는 줄기의 무게/신장의 비를 저하시키는 경향이였다. 이것은 콩나물리 인돌비의 처리에 비하여 키토산을 처리한 경우 덜 통통하게 성장한다는 것을 의미한다. 한편 키토산을 처리한 콩나물의 뿌리는 실뿌리의 발생이 활발하였다. 이는 작물에 이를 처리한다면 근의 발근과 생육을 촉진시키는 효과가 있을 것임을 시사하는 것으로 앞으로 주의할 가치가 있는 결과로 여겨진다. 시중에서 구입한 키토산 제제인 Biosprout의 처리 결과는 키토산 처리의 결과와 유사하였다.

Table 5. Effect of chitosan on the growth of soybean sprouts

Treatment	Length			Weight/Shoot	Shoot Length/ Shoot Weigth
	Shoot	Root	Total		
1% chitosan	12.3±1.2	8.9±1.5	21.3±2.2	0.608	20.2
Indole B	11.2±2.0	4.2±1.7	15.3±3.1	0.759	14.8
Biosprout	12.9±1.5	8.7±1.1	21.6±1.3	0.653	19.8

2. 식물 병원미생물 생육억제 효과 검정

가. 대장균 strain에 대한 효과

우선 본 실험실에 보유중인 각종 대장균에 대한 키토산의 생육억제 효과를 검정하였다.

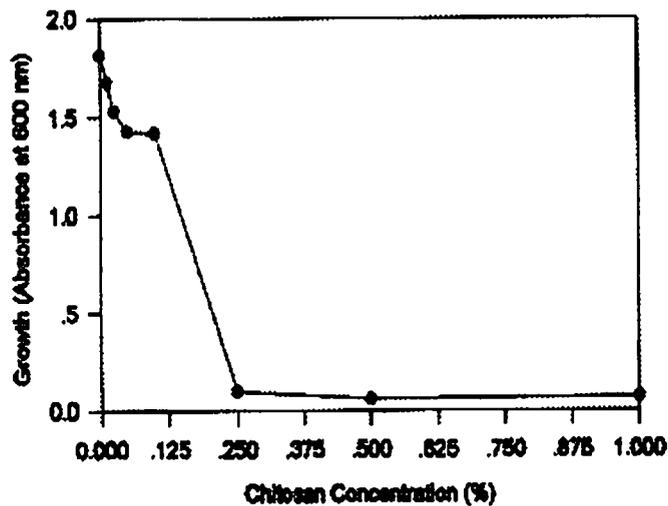


Fig.10. Effect of chitosan on the growth of *E. coli* ATCC 25922.

Fig. 10은 키토산이 *E. coli* ATCC25922의 생장에 미치는 영향을 실험한 것으로, 0.2-0.25% 키토산 (1% 키토산 용액 점도 83.9) 농도에서 대장균의 생장을 완전히 억제하는 것을 보여주고 있다. 이는 대장균이 0.02%의 키토산을 함유한 배지에서 생육이 완전히 억제되었다는 결과와는 그 농도에서 차이가 있는 것이다. 이는 실험에 사용한 균주의 차이 때문일 수도 있을 것이다. 본 실험실에 보유중인

대장균 41균주의 생육을 0.2% 키토산 함유 LB배지에서 조사하였던 바, 0.2% 키토산 배지에서 성장하는 7균주를 1차 선발하였으며, 더 높은 농도의 키토산 함유 배지에서 성장 여부를 검토하고 있다. 이 균주들은 앞으로 키토산의 미생물 생육억제 작용 메커니즘을 연구하는데 유용한 소재가 될 수 있을 것이다.

나. 식물병원성 미생물에 대한 효과

1) 공시균주 확보

한편, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysprum*, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger* 등의 곰팡이류와 *Erwinia*속 1종, *Pseudomonas*속 1종, *E. coli*, *Bacillus subtilis* 등의 세균을 확보하였다.

2) 키토산 처리의 효과

이들 미생물을 0, 0.001, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2% 농도의 키토산을 함유하는 PDA배지에 처리하여 7일간 배양하며 생육환을 비교하였다. 그 결과 모든 곰팡이의 성장이 키토산 0.1%의 농도에서 유의하게 저해되는 것을 확인하였다. Table 6에서 보는 바와같이 0.1% 키토산 농도에서 역병균은 73%, 덩굴쪼김병균은 68% 그 생육이 억제되었다. 그러나 키틴에서는 그 효과가 미미하였다.

3. 식물 성장에 미치는 키틴 유도체의 영향

토마토를 대상으로 키틴 혼화(33 kg/a), 키토산 혼화 및 관주, 키토산 올리고당 환화 및 관주, 키토산 피복 (0.2%용액에 3회 침지) 등의 처리를 행하여 생육을 30일과 45일에 관찰하였다 (Table 7,8). 대조에 비하여 키틴 등을 처리한 경우 모든 생육지표가 향상된 것으로 나타났다. 특히 이들을 토양에 혼화처리한 경우에 그 효과가 컸다. 이러한 경

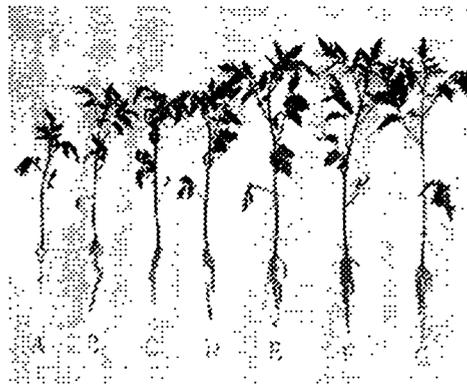
향은 이식 45일후의 생육조사에서도 같이 나타났다.(Fig.11, 12)

Table 6. Effect of chitosan on the growth of fungi

Conc. of chitosan (ppm)	Control value (%)	
	<i>Phytophthora sojae</i>	<i>Fusarium graminearum</i>
Control	100	100
10	84.9	97.2
100	83.3	95.8
500	44.2	63.1
1000	27.0	32.5
2000	25.8	28.9



(A)



(B)

Fig.11. Photographs showing the growth of tomato plants after plantation in pots(A) and in total plants (B). A: control B: chitosan coating C: chitosan solution watering D: chitosan oligomer's solution watering E: chitin treatment to soil F: chitosan treatment to soil G: chitosan oligomer's treatment to soil

대두의 경우, 키토산의 혼화 처리와 키토산올리고당 처리시에 가장 좋은 생육을 보였으며 종자 피복시에 가장 생육이 나빴다. 이와 같이 식물의 생장에 미치는 영향이 서로 다르게 나타난 것은 작물의 종류, 처리 농도와 방법이 다른 데서 비롯되었을 것으로 여겨진다.

Table 7. Growth of tomato plants 30-days after transplantation

Treatments	Plant ht (cm)	No. of leaves	Maximum leaf length (cm)	Root length (cm)	Stem ht (cm)	Plant Weight (g)	Stem Weight (g)	Leaf Dried Weight (g)	Root Dried Weight (g)
A	35.8	21	5.1	9.8	26.5	2.9	1.2	0.116	0.066
B	40.5	21	5.9	12.1	28.5	3.7	1.10	0.123	0.056
C	41.0	21	5.3	13.4	27.7	3.2	1.37	0.136	0.053
D	47.7	24	6.0	14.9	32.9	4.6	1.64	0.153	0.064
E	55.0	31	6.4	16.0	39.0	7.8	3.16	0.274	0.106
F	49.7	29	6.4	12.8	36.8	6.3	2.93	0.244	0.081
G	42.5	25	5.5	14.9	28.1	4.0	2.81	0.254	0.088

A: control B: chitosan coating C: chitosan solution watering D: chitosan oligomer's solution watering E: chitin treatment to soil F: chitosan treatment to soil G: chitosan oligomer's treatment to soil

Table 8. Growth of tomato plants 45-days after transplantation

Treatments	Plant ht (cm)	No. of leaves	Maximum leaf length (cm)	Root length (cm)	Stem ht (cm)	Plant Weight (g)	Stem Weight (g)	Leaf Dried Weight (g)	Root Dried Weight (g)
A	46.1	27	5.4	17	29.1	4.61	4.91	0.232	0.120
B	57.2	39	6.0	17.7	39.5	8.54	9.72	0.454	0.205
C	54.5	42	6.1	16	38.5	8.65	8.68	0.375	0.173
D	59.5	44	6.3	18.7	40.8	10.17	9.57	0.387	0.161
E	66.1	57	6.9	17.3	48.8	15.46	16.92	0.630	0.386
F	69.5	56	7.0	18.1	51.4	16.25	18.74	0.725	0.338
G	69.0	53	6.9	18.0	51.0	15.44	19.35	0.723	0.311

A: control B: chitosan coating C: chitosan solution watering D: chitosan oligomer's solution watering E: chitin treatment to soil F: chitosan treatment to soil G: chitosan oligomer's treatment to soil

Table 9. Effect of chitosan treatment on the germination of tomato seeds. Unit: Number of gerninated seed(%)

	A	B	C	D	E	F	G
1일	0	0	0	0	0	0	0
2일	9(45)	0	2(10)	0	0	0	0
3일	18(90)	18(90)	17(85)	0	1(5)	0	0
4일	20(100)	19(95)	19(95)	6(30)	3(15)	0	0
5일	.	20(100)	20(100)	9(45)	5(25)	0	0
6일	.	.	.	14(70)	12(60)	1(5)	0

A: Control B: 0% Chitosan C: 0.05% Chitosan D: 0.1% Chitosan
E: 0.5% Chitosan F: 1.0% Chitosan G: 2.5% Chitosan

한편 키토산 소재의 토마토 종자의 발아에 미치는 영향은 흥미있는 결과를 보여주었다. 즉, 키토산의 종자 피복 처리는 일반적으로 종실의 발아를 지연시켰으며, 0.1% 이상의 농도에서는 발아율의 감소까지 초래하였다. 그러나 0.05% 키토산 농도에서는 무처리와 대등한 성적을 보였다.

제4절 결론

키토산을 염산으로 가수분해시 60분 80℃가 올리고당의 생산이 가장 좋았으며, 효소에 의한 가수분해에서는 dp가 2~4까지가 60%, dp가 5~7까지가 30%, 7이상이 10%가 생성되었으며, [¹⁴C]-키틴을 포함한 키토산의 다양한 유도체를 합성하여 FT-IR로 확인하였다. 식물성 병원균인 *Fusarium* sp. 와 *Phytophthora* sp. 에서는 키토산 용액 0.1%이상에서 생장이 현격히 감소함을 보였다. 콩나물 성장에 대한 키토산의 효과는 시중제품 “Indol B” 보다 우수한 촉진효과를 보였으며 토마토씨 발아에서는 키토산용액(0.2%)에 침지하는 것이 관주나 토양에 포함하는 경우보다 높은 효과를 나타냈다. 대두의 경우에는 반대로 침지가 가장 발아율이 낮았으며 토양에 혼합한 경우와 키토산 올리고당 처리에서 가장 효과가 좋았다.

II. 키토산 유도체들의 면역기능 조절 연구

제1장 서 론

Tanigawa 등은 키토산을 플라스틱 배양 용기에 부착시켜서 사람의 혈액 단핵구를 반응시키면 interleukin- 1β 의 생산을 증가시킨다고 보고하였고, Marcinkiewicz 등은 마우스에서 수용성 키토산은 면양적혈구에 대한 T-의존성 체액성면역반응 (T-dependent humoral immune response)이 항진됨을 보고하였다. 또 Kyotani 등은 가토의 간암모델에서의 연구를 통해 microsphere에 키토산이나 키토산을 부착시켜 이식된 VX2 종양에 투여하면 상당한 항암 효과가 있음을 보고하였다. 그 외에도 키토산/키토산은 그 유도체에 따라 다양한 생물학적 특성을 나타낸다고 알려지고 있다.

다양한 의학적 이용이 기대되는 키토산/키토산 유도체들이 대식세포의 면역기능에 미치는 영향을 관찰코자 하였다. 그 첫 시도로서 면역기능 중 인식기능(recognition function)의 초기 단계와 효과 기능(effector function)의 최종 역할을 담당하는 대식세포의 활성화에 미치는 영향을 선천성 면역과 밀접한 관계가 있는 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 및 nitric oxide (NO)의 생성능에 미치는 영향을 관찰하고 이와 함께 마우스에서의 *Listeria monocytogenes*와 *Candida albicans* 감염에 대한 숙주반응에 미치는 키토산의 영향을 관찰하였다.

제2장 실험방법

11

1. 실험동물

대한실험동물(주)에서 구입한 생후 8주-12주된 정상 BALB/c 마우스를 암수 구별없이 사용하였다. 실험중 모든 마우스들은 크기가 18 cm x 28 cm인 cage당 6마리 이하를 넣어 항온 항습 무균 사육장치 내에서 사육하였다.

2. 시약 및 배지

Ovalbumin (OVA), complete Freund's adjuvant, incomplete Freund's adjuvant, lipopolysaccharide (LPS: *E. coli* 0111:H4), 2-mercaptoethanol, sodium pyrophosphate, 3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT), actinomycin D 등은 Sigma사 (St. Louis, MO) 제품을 사용하였고, 본 연구에 사용한 chitosan은 금호화성 (서울) 제품을 사용하였고, 이를 키토산 분해효소를 사용하여 부분 가수분해시킨 Chitoenzyme, 그리고 염산 가수분해시킨 chitochem을 공시하였다. 이들 부분 분해물을 다시 이온교환수지에 흡착시키고 염산에 용출시킨 후 다양한 규격의 BioGel을 사용하여 분자량에 따라 얻은 올리고머들 (D1, D2, D3, D4, D5, F1, F8, F9, F10)을 본 실험에 사용하였다. 이들 각종 키토산은 사용직전에 멸균 phosphate buffered saline (PBS)에 용해시킨후 60℃에서 30분간 열처리하여 멸균하였다. 세포배양을 위하여는 fetal calf serum (FCS), L-glutamine 및 RPMI 1640 배지는 GIBCO사 (Grand Island, NY) 제품을 사용하였다. 그리고 brain heart infusion (BHI) 배지, Brewer's thioglycollate 배지

는 Difco사 (Detroit, MI) 제품을 사용하였다. RNA 추출 kit는 QIAGEN (Valencia, CA)에서 구입하였다. 역전사-중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)을 위해서는 Taq DNA polymerase, Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase을 GIBCO사 (Grand Island, NY) 제품을 사용하였고 random primer와 RNasin은 Promega사(Madison, WI) 제품을 사용하였다.

3. 공시균

본 연구에서 마우스의 감염실험과 키토산의 항균효과를 조사하기 위하여 *S. typhimurium* (LT2 strain: ATCC 19585, 이하 ST)를, *E. coli*, *L. monocytogens* (serotype 1인 strain 10403, 이하 LM) 및 *C. albicans*를 사용하였다. ST, *E. coli*, LM의 배양을 위하여는 BHI배지를 이용하였고 CA를 배양하기 위하여는 Sabouraud Dextrose agar를 사용하였다. 분양 즉시 균을 BALB/c 마우스에 반복 통과시켜 병독성을 유지하고, 배양중 대수증식기에 있는 균을 냉동용 소형 시험관에 분주하여 -70℃의 초저온 냉동기에 보관하면서 그때그때 사용하였다.

4. 세포 배양

TNF- α 를 측정하기 위한 지시 세포주인 L929세포와 마우스로부터 분리한 대식세포의 배양을 위하여 10% FCS, L-glutamine, 2-mercaptoethanol 그리고 항생제가 첨가된 RPMI 1640을 사용하고 마우스의 대식세포주인 J774 (ATCC)세포와 RAW264.7 세포의 배양을 위하여는 RPMI 1640이나 Dubecco's Modified Eagle's medium (DMEM) (GIBCO

사, Grand Island, NY)를 사용하였다.

5. 마우스에서의 면역복합체 생산.

Ovalbumin (OVA)를 PBS에 용해하고 2500 x g로 30분간 원심한 다음 여과 멸균하여 다음 사용시까지 -20℃에 보관하였다. 이를 다시 complete Freund's adjuvant와 1:1로 혼합하여 제조한 유탁액 0.2 ml를 마우스의 복강에 주사하고 1주일후 다시 incomplete Freund's adjuvant와 1:9로 혼합하여 제조한 유탁액(0.2ml)을 1주일 간격으로 마우스의 복강에 반복 주사하였다.

6. 면역혈청과 면역복합체 전처리

OVA 유탁액으로 최종 주사하고 1주일이 지난 후 생산된 복수를 채취하였다. 채취한 복수를 응고시까지 기다린 후 2500 x g로 10분간 원심하여 -20℃에 보관하였다. 이들 복수를 모두 함께 모아 다시 50,000 x g로 30분간 원심한 다음 여과 멸균하여 다음 사용시까지 -20℃에 보관하였다. 면역복합체 전처리를 위하여는 일정 농도의 항체와 항원을 시험관내에서 반응시킨 다음 (최종농도: 100 μg OVA와 항-OVA 면역 혈청의 1:5 희석액) 마우스의 복강 내에 0.5 ml씩 주입하였다.

7. 마우스의 *Candida* 및 *Listeria* 감염

면역복합체 전처리군과 정상 대조군 마우스의 복강에 일정수의 균액 (5x10⁶ CA/마우스, 10⁵ LM/마우스)을 1 ml PBS로 만들어 주사하였다. 각 세균을 감염시킨 일정 시간후에 각 실험군당 3마리의 마우

스를 경부전위로 희생시키고 각각의 비장 또는 신장을 적출하여 이들을 0.05% Triton이 첨가된 PBS내에서 조직 호모게나이저 (Tekmar Co., Cincinnati, OH)로 마쇄하였다. 이 조직 마쇄액을 같은 완충용액으로 10배 계단 희석하고 이어 일정량의 각 희석액을 BHI 배지 또는 Sabouraud Dextrose 배지상에 증첩 접종하고 5% 탄산가스 배양기내에서 배양한 후 집락수를 산정하였다.

8. 키틴산의 항균작용 측정

각 시료를 시험관 희석법에 의하여 해당 배지로 2배 계단 희석한 다음 일주야 배양한 각 균액을 일정량씩 접종하고 37°C, 24시간 배양하여 균 번식 여부를 판독하였다.

9. TNF- α 의 측정

키틴의 처치가 마우스 생체내에서의 TNF- α 의 생산과 복강 대식세포로부터의 시험관내 TNF- α 의 생산에 미치는 효과를 구별하여 관찰하였다. 즉 시험관내 복강대식세포로부터의 TNF- α 의 생산을 조사키 위해서는 먼저 복강대식세포를 부착법에 의해서 분리하고 24-well 배양판에 well당 10^6 세포를 1일 배양한 다음 여러 가지 용량의 키틴을 처치하였다. 이를 다시 배양 배지 내에 1 μ g/ml LPS를 투여하고 다시 24시간 배양한 다음 상층배양액을 수집하고 원심, 여과 후 4°C에 보관하였다. 한편 마우스 생체 내에서의 TNF- α 의 생산을 조사키 위해서는 각 균의 마우스를 일정량의 키틴으로 처치하고 1일후 10^5 LM을 복강 내에 감염시키고 감염 5일 후 25 μ g LPS를 0.2 ml의 용량으로 정맥내 주사하였다.

주사한 2시간 후에 혈액을 채취하여 혈청을 분리하였다. 이 혈청과 배양 상청액내의 TNF- α 량을 정량적으로 측정하기 위하여는 actinomycin D 존재하에 L929 세포를 용해시키는 능력을 관찰하는 Kratz등이 사용한 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 즉 각 well당 104의 L929세포를 96-well 세포 배양판에서 37°C, 18시간 동안 배양하고 난 후 TNF- α 검사 시료를 2배 계단 희석하여 각 희석액을 actinomycin(최종농도: 2 μ g/ml)과 함께 증충하였다. 배양 24시간 후 L929 세포의 생존도를 최종적으로 MTT를 가하여 생산되는 formazan 색소를 570nm 파장하의 ELISA 판독기를 사용하여 판독하였다.

10. NO의 측정

대식세포에서 생산되는 NO는 순간적으로 산화되어 nitrite로 전환되므로 이에 Griess reagent (1% sulfanilamide/0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride/2.5% H₃PO₄)를 혼합하여 실온에 10분간 방치한 다음 ELISA판독기를 사용하여 540nm파장에서 흡광도를 측정하였다.

11. 역전사-증합효소 연쇄 반응 (RT-PCR)

마우스 복강 대식세포에서 total RNA를 RNeasyTM total RNA kit (Qiagen)로 추출하였다. 배양판에서 배지를 제거하고 lysis buffer를 넣음으로 RNA 추출 과정을 시작하였다. 추출한 RNA의 농도는 분광광도계 (Hitachi, Tokyo, 일본)로 260 nm에서 OD를 측정하여 계산하였다. 0.5-1 μ g의 RNA에 reverse transcriptase를 가하고 37°C에서 1시간 반

응시켜 first strand cDNA를 만들었다. 역전사 반응 산물 5 μ l를 취하여 template로 하고 총 25 μ l의 volume으로 PCR을 하였는데 반응액 조성은-50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl, 1.5 mM MgCl₂, 0.25 μ M each primer, 100 μ M each dNTP, 2.5 U Taq DNA polymerase이었다. PCR 기계로 PCR ROBOT (화인상사, 한국)를 사용하여 94 $^{\circ}$ C-30초, 55 $^{\circ}$ C-30초, 72 $^{\circ}$ C-1분을 1 주기로 30회 반응시켰다. PCR 반응 산물 10 μ l를 취하여 ethidium bromide가 포함된 2% agarose gel로 전기영동하였다. UV transilluminator (UVP, San Gabriel, 미국)에 gel을 올려 놓고 band를 확인한 후 Polaroid camera (Polaroid, Cambridge, 미국)로 사진을 촬영하였다.

Primers는 바이오니아(주)에 합성을 의뢰하여 iNOS와 TNF- α , 그리고 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) specific primer를 제조하였다. 이들 primer의 염기 서열은 다음과 같다.

iNOS 5' Primer: CACGAATTCGCTTGCCCTGGA

3' Primer: ATAGGATCCTTTGATCCTCACA

TNF- α 5' Primer: CCTGTAGCCACGTCGTAGC

3' Primer: TTGACCTCAGCGCTGAGTTG

GAPDH 5' Primer: CATGACCACAGTCCATGCCATCAC

3' Primer: CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC

제3장 결과 및 고찰

제1절 합성 키토산의 병원성 미생물 항균효과

Table 10는 3가지 키토산 올리고당이 몇가지 미생물의 생육억제 효과를 보여주고 있다. 키토산 올리고당의 분자량에 따라 그리고 미생물의 종류에 따라 그 억제작용이 상이한 것으로 나타났다. 분자량이 약 1,500인 올리고당이 *E. coli*와 *L. monocytogens*에 대하여 보다 강한 항균효과를 나타냈으며, 항균작용을 나타내는 농도는 약 0.25 - 0.5 %이었다. 한편 *C. albicans*에 대하여는 각 키토산의 항균작용에는 차이를 나타내지 아니 하였다.

Table 10. Effective dosage of chitosan oligomers on the growth inhibition of some microorganisms

Microorganisms	Chitosan Size(aver.)	Effective Dosage
<i>S. trypanosoma</i>	MW 10,000	>2%
	MW 3,000	>2%
	MW 1,500	1.0%
<i>E. coli</i>	MW 10,000	2%
	MW 3,000	2%
	MW 1,500	0.25-0.5%
<i>L. monocytogens</i>	MW 10,000	2%
	MW 3,000	0.25-0.5%
	MW 1,500	0.25%
<i>C. albicans</i>	MW 10,000	1-2%
	MW 3,000	2%
	MW 1,500	2%

제2절 면역증진효과

1. 키토산 투여가 마우스의 *L. monocytogenes* 감염에 미치는 영향

정상 대조군과 각종 유도체의 카이틴 (Taiyo chem, chitosan A, DP4 그리고 DP5)과 FK-23을 전처치 (2 mg/ml 용액을 0.2 ml 복강내 주입)한 처치군의 복강에 일정수의 균(105LM/마우스)을 1 ml PBS에 부유하여 주사하였다. 감염시킨 1일후에 각 실험군당 3마리의 마우스를 경부전위로 희생시키고 각각의 비장을 적출하여 이들을 0.05% Triton이 첨가된 PBS내에서 조직 호모게나이저 (Tekmar Co., Cincinnati, OH)로 마쇄하였다. 이 조직마쇄액을 PBS로 10배 계단 희석하고 이어 일정량의 각 희석액을 BHI 배지상에 증첩 접종하고 5% 탄산가스 배양기내에서 배양한 후 집락수를 산정결과 Fig.12에서와 같이 Taiyo chem 또는 chitosan A를 전처치하면 이들 마우스의 비장내의 *L. monocytogenes* 수는 대조군에서 오히려 현저히 증가하였고 DP4, DP5 그리고 FK-23를 전처치하면 비장내의 *L. monocytogenes* 수는 대조군에 비하여 현저히 감소하였다.

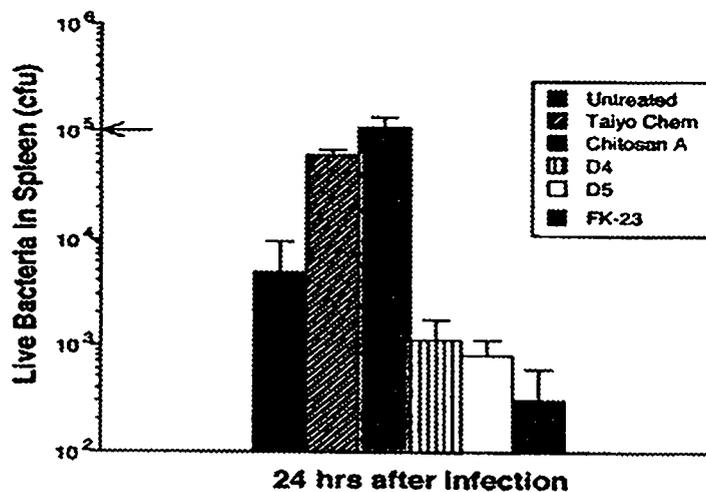


Fig.12. Effect of chitosan treatment on the course of a primary sublethal *L. monocytogenes* infection. BALB/c mice were treated i.p. with 1 mg or various derivatives of chitins daily for two days before challenge. Each group of animals received a i.p. injection of 10⁵ *L. monocytogenes* contained in a total of 0.5 ml of normal saline. Mice were killed one day after infection. The number of viable *L. monocytogenes* per spleen was determined by plating on trypticase soy agar. Results expressed are the mean±SD from three mice per each time point.

Symbol : ← Number of *L. monocytogenes* challenged.

2. 면역복합체와 키토산이 *Candida*감염에 미치는 영향

OVA-면역항체와 항원(OVA)를 혼합하여 감염직전에 복강내에 투여한 BALB/c 마우스에 5×10^6 의 *C. albicans*을 복강내로 감염시켰다. 감염 3일후 신장을 적출하여 전 신장내의 생균수를 산정하여 전처치하여 비교하였다. Figure 13에서와 같이 처리하지 않은 대조군에 비하여 신장내 *C. albicans*의 수는 면역복합체를 투여한 군에서는 약 100배정도 증가하였고 면역복합체처리 마우스에 키토산을 투여하면 *Candida*감염에 대한 저항성은 증가하였다.

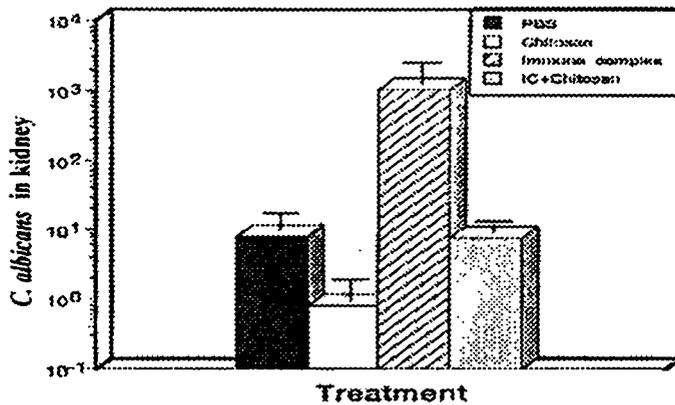


Fig.13. Effect of chitosan and immune complex on the resistance of mice infected with *Candida albicans*(*C. albicans*). BALB/c mice were untreated or treated with immune complex [100 µg OVA plus anti-OVA (0.5 ml of 1/5 dilution of OVA-immune serum,) i.p.] just before challenge. Three and eight days after infection with 5×10^6 *C. albicans*, i.p., kidneys from three animals were homogenized respectively and the number of viable *C. albicans* organism was determined by plating on Sabouraud dextrose agar. Results are the mean \pm SD from three mice per each time point.

제3절 항암효과

1. 대식세포의 TNF- α 생산에 미치는 영향

대식세포주 RAW264.7 세포를 시험관내에서 배양하면서 F1, F8, F9을 각각 0.2%의 용량으로 반응시키고 이들을 well당 105세포씩 24시간동안 배양하여 생산된 TNF- α 의 역가를 서로 비교하였다 (Fig. 14A). RAW264.7 세포는 배양액만의 배양만으로 약간의 TNF- α 를 생산하였으며 배양액내에 F8나 F9의 첨가는 별로 영향을 나타내지 아니 하였으나 F1을 첨치하면 RAW264.7 대식세포로부터 상당량의 TNF- α 를 생산하였다. 한편 F8나 F9는 100 ng/ml의 LPS존재하에서 별로 영향을 나타내지 아니 하였으나 F1은 LPS단독첨치군에 비하여 TNF- α 생산이 상당히 증가되었다 (Fig. 14B).

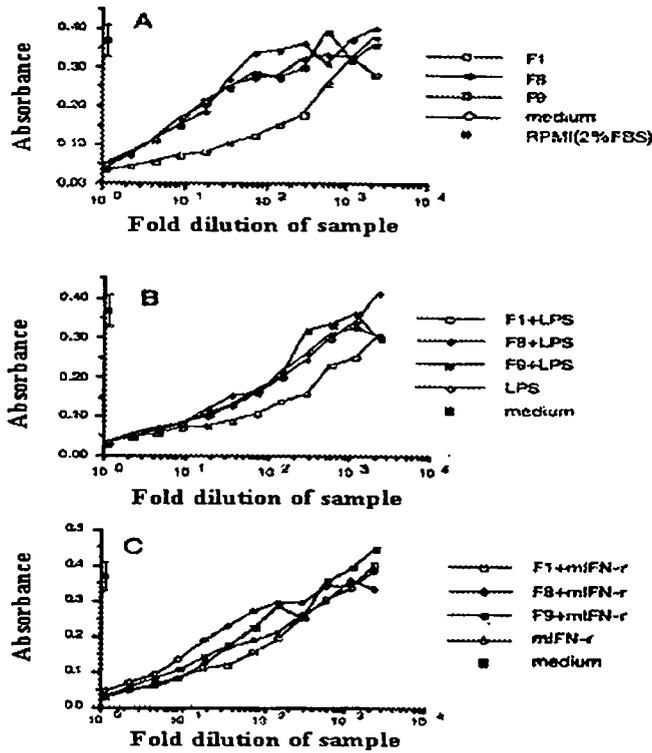


Fig.14. Production of TNF- α by RAW264.7 cells treated with chitosans. RAW264.7 cell were cultured at 1×10^5 /ml in RPMI1640 media. Then, they were treated with 0.2% chitosan alone(A), or 0.2% chitosan in the presence of 100 ng/ml LPS(B) or 50U/ml mIFN-r(C) for 1 day. TNF- α activity in culture supernate was assayed by the L929/ActD cytotoxicity method

50 U/ml의 IFN-r 존재 하에서는 F1, F8, F9 모두 IFN-r 단독 부여시보다 TNF- α 생산능이 증가하였고 그중에서도 F1에서 현저하였다 (Fig. 14C).

2.. 두가지 cell lines에서의 NO생산에 미치는 영향

가. RAW 264.7 세포

이미 세포주로 확립된 마우스 대식세포주 RAW264.7 세포를 시험관내에서 배양하면서 각종 키토산을 사용직전에 멸균 PBS에 용해시킨후 60℃에서 30분간 열처리하여 멸균하고 이를 배양중인 RAW264.7세포에 반응시켜 이들 세포로부터 생산된 NO의 양을 측정하였다(Fig. 15).

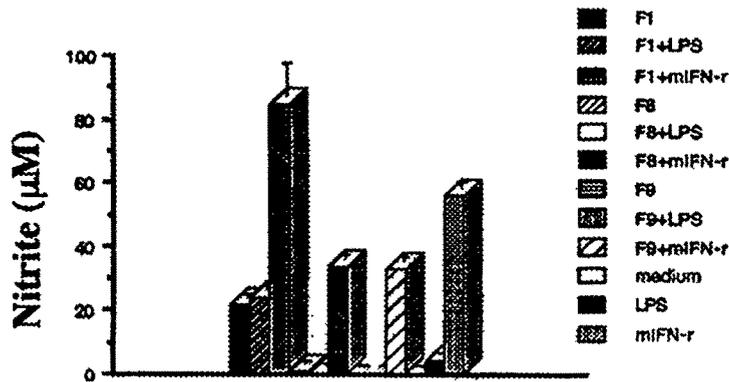


Fig.15. Production of nitric oxide by RAW264.7 cells treated with chitosan. AW264.7 cells were cultured at 1×10^5 /ml in RPMI640 media. Then, they were treated with 0.2% chitosan alone, or 0.2% chitosan in the presence of 100 ng/ml LPS or 50U/ml mIFN-r for 1 day. Nitric oxide was determined by the method using Griess reagent.

IFN- γ 을 첨가하지 않고 키토산만을 처리하면 F1를 제외하고는 NO생산을 거의 야기시킬 수 없었으며, 키토산과 함께 IFN- γ (50 unit/ml)를 함께 첨가하면 F1이 IFN- γ 만을 투여한 대조군에 비하여 NO의 생산이 현저히 증가하였다. 또 키토산과 함께 LPS (0.1 mg/ml)를 함께 첨가하면 F1부여군에서만 증가를 나타내었다(Fig. 16).

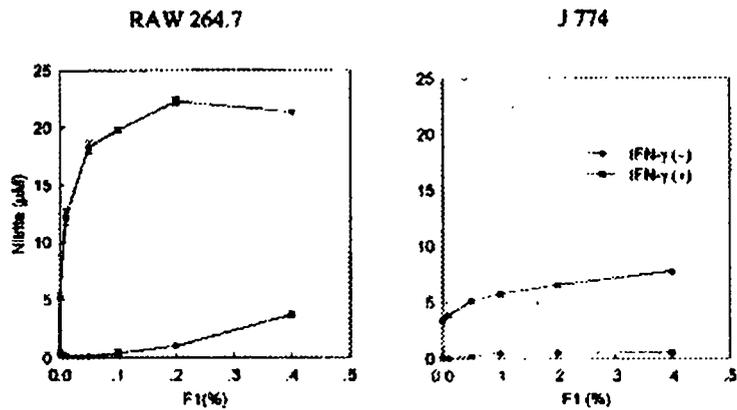


Fig.16. Dose-dependent increase of macrophage NO production by chitosan F1. Macrophages were incubated for 24 h with various concentrations of F1 plus or minus IFN- γ (50 U/ml). The cells were cultured at 3×10^4 /well (200 μ l volume) in 96-well plate. The amount of nitrite in culture supernatant was measured with Griess reagent. Means of triplicate \pm SD are shown.

나. J774 세포에서의 NO생산에 미치는 영향

마우스 대식세포주 RAW264.7와는 활성도가 다른 세포주 J774세포를 시험관내에서 배양하면서 각종 키토산을 반응시켜 이들 세포로부터 생산된 NO의 양을 측정하였다(Fig. 17).

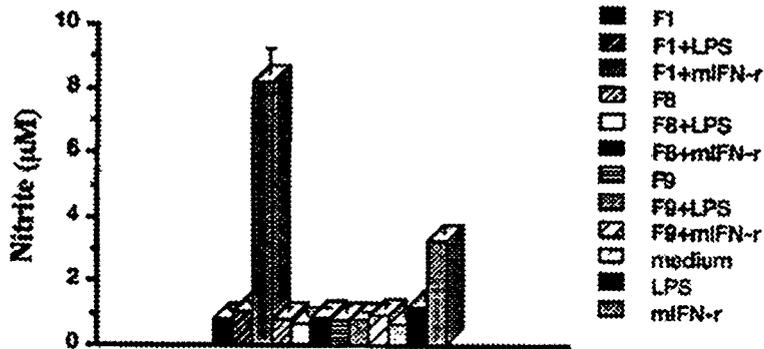


Fig.17. Production of NO by J774A cells treated with chitosan.

J774A cells were cultured at 1×10^5 /ml in RPMI1640 media and treated with 0.2% chitosan alone, or 0.2% chitosan in the presence of 100 ng/ml LPS or 50U/ml mIFN-r for 1 day. Nitric oxide was measured by the method using Griess reagent.

F1은 RAW264.7와는 달리 F1은 단독처치시나 LPS (0.1 mg/ml)존재하에 NO생산을 거의 야기시킬 수 없었으나, F1과 함께 IFN- γ (50 U/ml)를 함께 첨가하면 INF- γ 만을 투여한 대조군에 비하여 NO의 생산이 현저히 증가하였다.

3. iNOS 및 TNF- α mRNA발현에 미치는 키토산 F1의 영향

RAW264.7 세포를 시험관내에서 배양하면서 F1을 4시간동안 반응시켜 이들 세포로부터 발현되는 iNOS 및 TNF- α mRNA를 측정하였다 (Fig. 18). IFN- γ 존재하에서 iNOS mRNA발현은 F1에 의하여 현저히 증가하였으며 TNF- α mRNA발현은 F1 투여에 의하여 증가를 보였으나 iNOS mRNA 발현증가에는 미치지 못하였다. 한편 INF- γ 과 LPS가 함께 존재하는 조건에서는 F1은 iNOS 및 TNF- α mRNA 발현에 변화를 나타내지 못하였다.

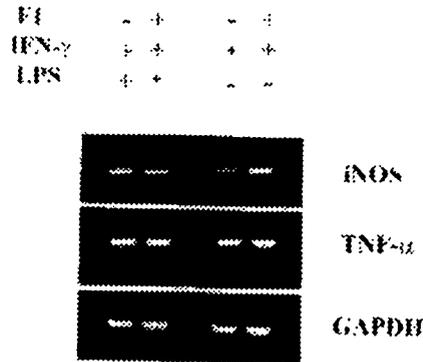


Fig.18. Effect of F1 chitosan (0.2%) oligomer on iNOS and TNF- α expression by RAW264.7 murine macrophage cells. RAW264.7 cells were stimulated with F1 oligomer in the presence of IFN- γ (50 U/ml) or LPS (100 ng/ml). After 4 hours of incubation, RNA was extracted and RT-PCR was done.

제4절 결론

키토산 유도체의 면역 기능 조절에서는 분자량이 1,500인 올리고당의 *E. coli*와 *L. monocytogenes*에 대하여 0.25-0.5%에 항균력이 우수하였다. 마우스에 키토산을 투여하였을 경우, 상용품인 Taiyo Chem이나 키토산 처리에서는 비장내의 *L. monocytogenes*의 숫자가 증가하였으나 DP가 4-5인 올리고당에서는 현격히 감소하여 병원균 challenge에 대한 효과가 우수하였다. 또한 면역 복합체와 키토산을 동시에 전 처리하면 신장의 *C. albicans*의 감염이 줄어들었다.

이들 유도체의 항암 효과로서 TNF- α 와 NO의 생성을 대식세포 cell line RAW 264.7에서 F1은 LPS 단독 처리 군에 비하여 TNF- α 생성이 증가되었다. 또한 NO 생성에서는 RAW 264.7 세포와 J774 세포에 대하여 실험한 결과 F1에서만 NO의 생성이 있었으며 키토산은 IFN- γ 와 같이 투여 할 경우 키토산의 효과에 의하여 NO의 생성이 증가하였다. 반면에 J774에서는 RAW 264.7과는 달리 F1 당들의 효과는 없었으나 F1과 IFN- γ (50 U/ml)에서 IFN- γ 단독 보다 훨씬 NO의 생성이 높았다. 또한 iNOS mRNA의 발현은 F1 존재 하에서 IFN- γ 단독시 보다 훨씬 높았다.

Ⅲ. 키토산 소재를 이용한 인공피부 개발 연구

제1장 서 론

고분자 신소재 분야의 연구로서 의료용 고분자에 대한 관심과 연구가 활성화 되어 인공심장, 인공피부, 인공혈액, 혈액투석기, 인공심폐기 등에 대한 연구에서 상당한 성과를 거두고 있으며, 일부는 상품화되기에 이르렀다. 또한 첨단과학과 기술의 발달로 생명과학의 중요성에 대한 관심이 고조되면서 이 분야의 연구개발이 활발히 진행되고 있다. 최근에는 질병으로 인해 사용할 수 없는 신체의 각 기관을 인공적으로 만든 물질로 교체하여 그 기능을 회복시키는 연구가 성공되면서 의료용 재료의 개발 연구가 생명연장이라는 측면에서 큰 성과를 가져오고 있다. 이와 같은 의료용 재료로 만든 기관 중에는 인공심장, 인공신장, 인공뼈, 인공폐, 인공혈관 등이 있으며 그 중에서 인공피부는 피부의 복잡한 구조와 기능 때문에 완벽한 피부와의 대체물질이 아닌 열화상환자의 생명보호와 조직회복을 촉진시킬 수 있는 상처 피복재료로서의 연구가 활발히 진행되고 있는 바, 인공피부의 기본 소재로서 키틴, 키토산이 크게 주목받고 있다.

또한, 생체 적합성이 좋은 키틴과 키토산을 인공피부용 재료로 개발하기 위하여 재료의 단점인 습윤시 기계적 강도의 저하를 보강하고 항균성 지능형 인공피부 재료의 개발을 목적으로 생분해성이 있는 키틴과 키토산을 원료로 삼고 여기에 생체적합성이 좋은 polyethylene glycol (PEG), polypropylene glycol (PPG), PEG-PPG 등을 이용하여 키틴 또는 키토산과의 intrapenetrating polymer networks (IPNs) 구조를 합성하여 그 물성 및 인공피부로서의 가능성을 탐색하고자 하였다.

아울러, 생체적합성이 좋은 키토산을 인공피부용 재료로 개발하기 위하여 다당이면서 생체고분자의 일종인 알긴산과의 고분자간 복합체를 형성하여 이의 물리화학적 성질 및 인공피부로서의 가능성을 조사하고자 하였다. 더욱이 키토산 단독의 친공피부는 친수성이 매우 강하기 때문에 약물방출속도가 커서 세포독성을 나타낼 염려가 있어 소수성이면서 인공피부로 상품화되고 있는 poly(L-leucine) (PLL)을 키토산에 graft화 하여서 그 약점을 보완하고자 하였다.

제2장 실험방법

1. PEG macromer의 합성

벤젠 용액에서 공비점을 이용하여 PEG(분자량:7500)를 정제한 시료 12g을 500ml 원형 플라스크 크안에 150ml의 벤젠용액에 넣고 기름탕조안에서 80℃로 가열시켜 PEG를 녹였다. PEG를 녹인 용액에 0.46ml의 트리에칠아민과 0.61ml의 아크로일클로라이드를 섞고서 80℃에서 3시간 반응시켰다. 반응후 트리에탄올아민 클로라이드를 거르고 이 거른 용액을 헥산에 침전시켜 PEG macromer를 얻었다. 얻은 PEG macromer를 40℃의 진공 건조기에서 12시간 건조시켰다. 합성 scheme을 Fig.19에 나타냈다.

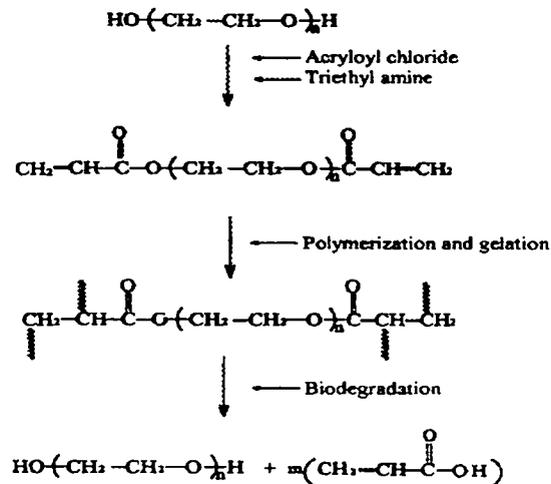


Fig.19. Reaction scheme of the preparation of PEG macromer, PEG network and their degradation.

2. PEG-chitin IPN 의 제조

PEG macromer: β -chitin의 무게비를 1:2, 1:3, 1:4로 하여 개미산(2.4 wt-% W/V)에 녹였다. 이 용액을 질소를 이용하여 30분간 버블링 시켰다. 여기에 광개시제인 2,2-dimethoxy-2-phenylacetophenone을 N-vinylpyrrolidone에 녹인후 위의 용액에 첨가하였다. 위의 용액을 450w UV 램프를 이용하여 20분간 조사하였다. UV 조사후에 개미산을 감압하에서 날려보냈다. 이렇게 얻어진 필름을 증류수에 침지후에 미반응의 PEG를 제거하였다. 미반응의 PEG를 제거후에 동결건조에 의하여 PEG-chitin IPN 필름을 제조하였다.

가. FT - IR 측정

각 시료의 FT-IR은 유기용매에 녹는 경우에는 필름 형태로, 녹지 않는 경우에는 KBr 분말과 혼합 후에, Nicolet Instrument FT-IR (Model 520P)를 사용하여 측정하였다.

나. 함수율 측정

함수율은 다음 식을 이용하여 측정하였다.

$$WC \text{ (wt.-%)} = [(W_s - W_d) / W_s] \times 100$$

W_s : 평형에 도달된 무게

W_d : 건물중

다. DSC 측정

합성된 IPNs의 유리전이온도, 결정온도, 용점은 DSC (Du Pont

Instrument 910)를 사용하여 측정하였다. -100℃부터 300℃까지 승온속도는 10℃/min로 조절하였다.

라. IPN의 기계적 성질 측정

제조된 IPNS의 인장강도는 인장을 10 mm/min 속도로 Toyo Baldwin UTM-400을 이용하여 측정하였다.

3. 키토산-알긴산 복합체 형성 및 물성 조사

키토산을 2% 초산에 녹이고(1 wt-%), 알긴산은 증류수에 녹인 후(1 wt-%), 두 용액을 혼합하여 만든 후 아크릴판에 casting 한 후 공기 건조하여 film을 만들었다. 이렇게 만든 film의 IR 측정은 1000~2500cm⁻¹의 범위에서 IR spectrometer(Bruker IFS-66 FT-IR)를 이용하여 측정하였다. 탁도 측정을 위해 각각의 농도를 6×10⁻³ wt-% 가 되도록 키토산은 초산에, 알긴산은 증류수에 녹여 pH를 4로 맞추는 후 UV spectrometer에서 파장 450 nm에서 탁도를 측정하였다. 키토산은 초산에, 알긴산은 증류수에 녹여 pH를 4로 맞추어 두 용액을 혼합하여 우벨로드 점도계로 점도를 측정하였다.

4. Wound dressing의 제조 및 물성 조사

가. 제조

먼저 1 wt-%의 키토산을 동결건조시켰다. 이과정에서 약물(AgSD, DHEA)을 원하는 양만큼 loading시켰다. 동결건조된 키토산 matrix를 알긴산 용액(1 wt-%)에 침지시켜 복합체를 형성시킨후에 동결건조 시켰

다. 이와 같은 과정을 여러번 반복하여 sample을 각각 제조하였다. 이렇게 제조한 dressing의 수분 함량은 이를 37℃의 증류수 용액에 침지시킨 후에 시간에 따라 수분량을 무게 변화로 측정하였다. 제조한 dressing의 표면, 밀면 및 단면의 형태를 주사전자 현미경(JSM-35CK)으로 관찰하였다.

나. 복합체의 항균력 검사

일정수의 박테리아를 agar plate 위에 seeding 시킨후에 drug(AgSD, DHEA)-impregnated wound dressing을 plate위에 covering 시킨후에 37℃에서 2일동안 incubation 시킨다음에 dressing 밑부분을 porer를 이용하여 cutting한 후에 균질화 시켰다. 얻은 균액을 희석시킨 후에 영양분이 들어있는 agar에 plating 시켜 2~3일 동안 incubation 시킨 후 colony 수를 counting 하였다.

다. 화상치유 실험

Mouse(BALB/c)의 등부위를 shaving 시킨후에 90℃에서 20초 동안 heat block을 이용하여 화상을 입힌다. 화상 부위를 drug-impregnated wound dressing으로 3일동안 covering 한후 화상부위의 손상된 조직을 제거하기위해서 외과적으로 절개한 후에 새로운 dressing으로 covering 해준다. 매주 한차례씩 사진촬영을하면서 새로운 dressing으로 교체시켜 준다.

라. 주사전자현미경 관찰

제조한 wound dressing의 표면, 밑면 및 단면의 형태를 Pol-Au로 코팅한 후 주사전자현미경 (JSM-35CK)으로 관찰하였다.

마. 약물방출 시험 및 세포독성검사

제조한 wound dressing에 약물을 담지시킨 후에 이 시료를 PBS(pH=7.4, 0.1M)용액에서 37℃의 incubater에서 시간에 따른 약물방출 검사를 행하였다.

세포에 대한 독성은 L929(mouse fibroblast)를 이용하여 MTT방법에 의하여 행하였다.

바. 조직검사

화상부위에 wound dressing을 도포후 4주가 지나 쥐를 희생시키고 시료를 채취하여 10% formaldehyde로 고정시킨후 hematoxylin-eosin으로 염색한 후 조직을 광학현미경으로 관찰하였다.

5. 키토산에 PLL의 graft화 반응

키토산 sponge를 동결건조법으로 제조한 후 이것을 LL-NCA를 CH₂Cl₂ 용매에 녹인 곳에 침지시켜 실온에서 48시간동안 반응시켰다.

제3장 결과 및 고찰

제1절 PEG macromer-chitin IPN 합성 및 특성

1. PEG macromer-chitin IPN의 합성 확인

PEG 1.5 k 와 PEG macromer의 FT-IR spectra를 Fig. 20에 나타냈다.

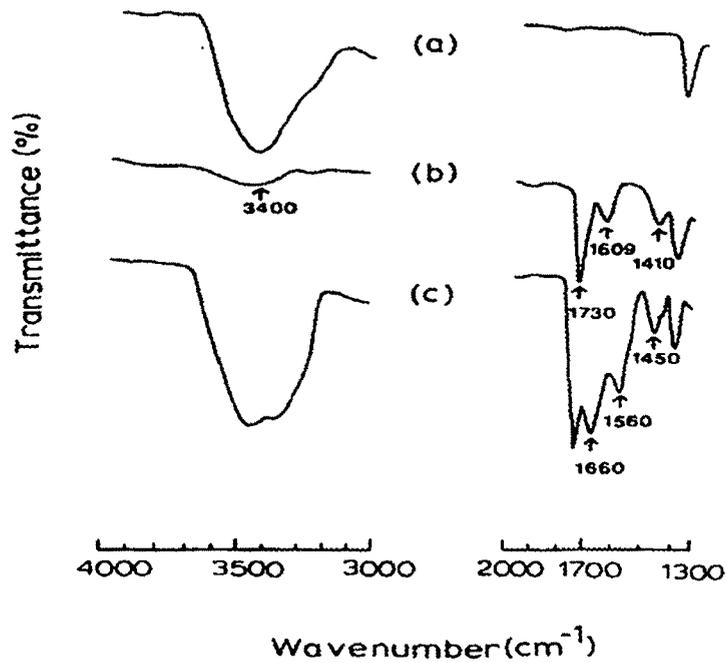


Fig. 20. FT-IR spectra of (a) PEG, (b) PEG macromer and (c) semi IPN.

그림에서 나타낸바와 같이 PEG에서는 3447 cm^{-1} 에 OH기로 인한 흡수대가 나타난 반면 PEG macromer에서는 acrylation으로 인하여 그 흡수대의 강도가 약하게 되었다. PEG macromer에서는 1726 cm^{-1} 에 새로운

흡수대가 나타났는데 이것은 acrylate기로 인한 카르보닐기로 인한 흡수대로 간주된다. 2872 cm^{-1} 의 흡수대는 PEG 나 PEG macromer의 C-H 신축으로 인한 흡수대가 나타났다.

2. PEG macromer-chitin IPN의 물성 측정

가. IPN의 함유율

합성된 PEG-chitin IPN의 시간에 따른 함유율을 Fig.21에 나타냈다. 그림에서 나타낸 바와 같이 모든 IPN은 20분만에 함유율이 평형에 도달되었고 β -chitin 단독인 경우에는 함유율이 48% 였는데 PEG macromer가 도입됨에 따라서 함유율은 60%에서 81%로 증가되었고 β -chitin량이 증가함에 따라서 함유율은 증가되었다. 이것은 β -chitin량이 증가함에 따라서 가교도가 감소되기 때문이라고 생각된다.

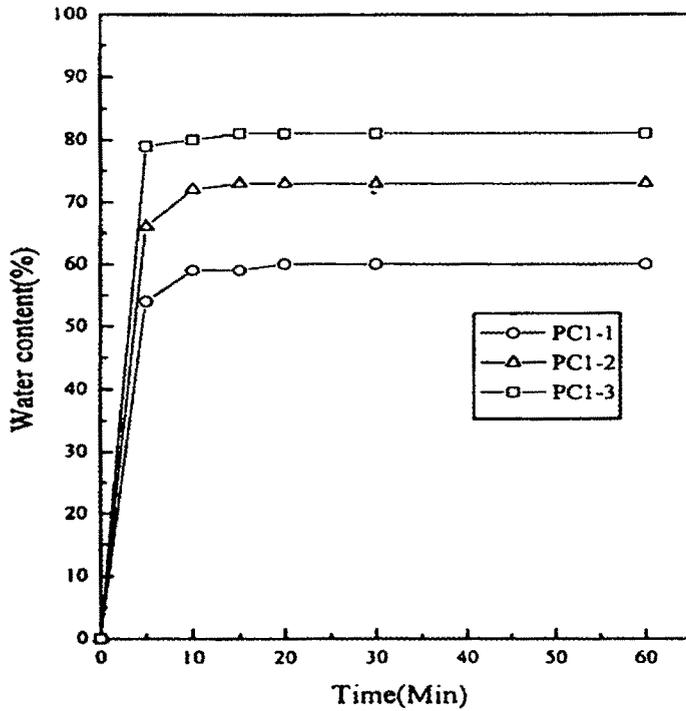


Fig. 21. Swelling kinetics of semi-IPN.

나. IPN의 열적성질

합성된 IPN의 DSC 열적성질은 Fig. 22에 나타냈다. 그림에서 나타낸 바와 같이 PEG macromer 단독은 63°C에서 강한 흡열 녹는점을 나타내나 chitin/PEG IPN계에서는 약하고 넓은 흡열점을 52°C와 54°C 사이에서 나타냈다. chitin 단독은 강직한 주쇄로 인하여 녹는점이 잡히지 않았다. Table 11에 합성된 IPNs의 열적성질, 결정화도를 나타냈다. 표에 나타낸 바와 같이 시료가 가교됨에 따라서 결정화도는 급격히 감소되었

고 아울러 용융시의 엔탈피값도 작아졌다. 이러한 것들은 IPN이 되면서 PEG macromer 단독보다는 결정화도 및 배향도가 감소되기 때문이라고 생각된다. 이러한 이유로 인하여 IPN에서의 PEG의 녹는점은 저온으로 이동되고 흡열피크는 작아졌다.

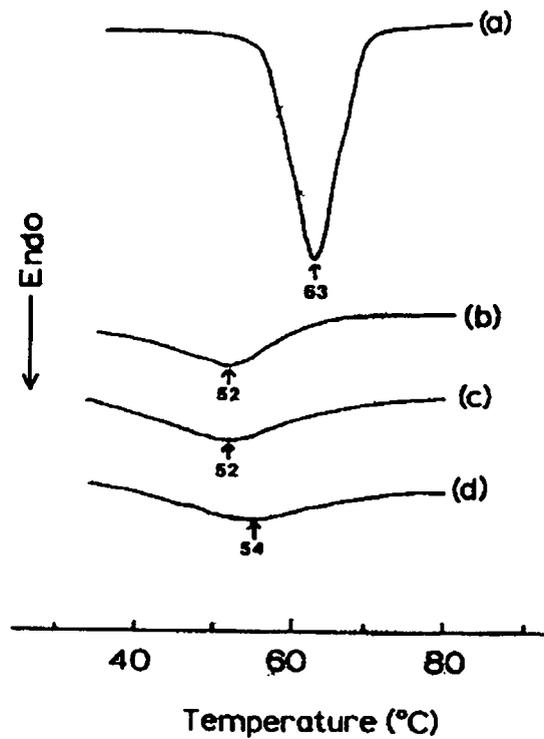


Fig.22. D.S.C. melting thermograms of PEG macromer (a) and semi IPN hydrogels: (b) PC1-1; (c) PC1-2 and (d) PC1-3.

Table 11. Thermal properties and crystallinities of PEG maromer and semi-IPN hydrogels

Sample	T_g (°C)	T_k (°C)	ΔH_f (Jg ⁻¹)	Crystallinity(%)
PEGM	-53	63	195	88
PC1-1	18	52	24	11
PC1-2	21	52	10	5
PC1-3	20	54	< 10	< 5
α -chitin	236 ^a	-	-	-
β -chitin	170 ^b	-	-	-

다. IPN의 기계적 성질

IPN의 기계적 성질인 인장강도 결과를 Table 12에 나타냈다. 건조시나 습윤시 모두 키틴의 함량이 증가할수록 인장강도는 증가되었다. 특히 건조시의 IPN의 인장강도 값은 상당히 높은 수치를 나타내고 있었고 습윤시에도 어느정도의 기계적 강도를 유지하고 있었다. 높은 함수율을 가지고 있음에도 불구하고서 습윤시에 좋은 기계적 강도를 가지고 있기 때문에 인공피부로서의 가능성을 가지고 있다고 생각된다.

Table 12. Mechanical properties of PEG maromer and semi-IPN hydrogels

Sample	EWC(%)	Tensile strength(MPa)	
		Dry	Wet
PEGM	10	-	-
PC1-1	60	21.8	1.35
PC1-2	73	33.1	2.12
PC1-3	81	35.0	2.41
α -chitin	20	-	-
β -chitin	48	-	-

제2절 키토산-알긴산 복합체의 합성 및 인공 피부로서의 특성

1. 복합체의 합성 및 특성

가. 복합체의 합성 확인

키토산과 알긴산이 고분자간 복합체를 형성하는가를 확인하기 위하여 키토산 수용액과 알긴산 수용액을 혼합하여 만든 film의 IR spectra를 측정한 결과 Fig.23에 나타난 바와 같이 알긴산의 카르복실기의 카르보닐 피크가 1068 cm^{-1} 였던 것이 1618 cm^{-1} 로 shift되었는데 이것은 키토산의 아미노기와 알긴산의 카르복실기가 이온결합을 했기 때문이라고 생각된다.

고분자간 복합체형성을 탁도측정에 의하여 확인하였는데 Fig.24에 나타난 바와 같이 혼합비가 50/50(wt/wt)에서 가장 탁도가 큰 것으로 보아 알긴산과 키토산은 화학당량론적으로 결합되고 있는 것을 알 수

있었다. 또한 환원 점도 측정결과를 Fig. 25에 나타낸 바와 같이 알긴산과 키토산의 복합체 수용액의 환원점도는 알긴산과 키토산 두 수용액의 산술평균값보다 낮은 것으로 보아 알긴산과 키토산은 서로 상호작용을 하고 있다는 것을 알 수 있었다.

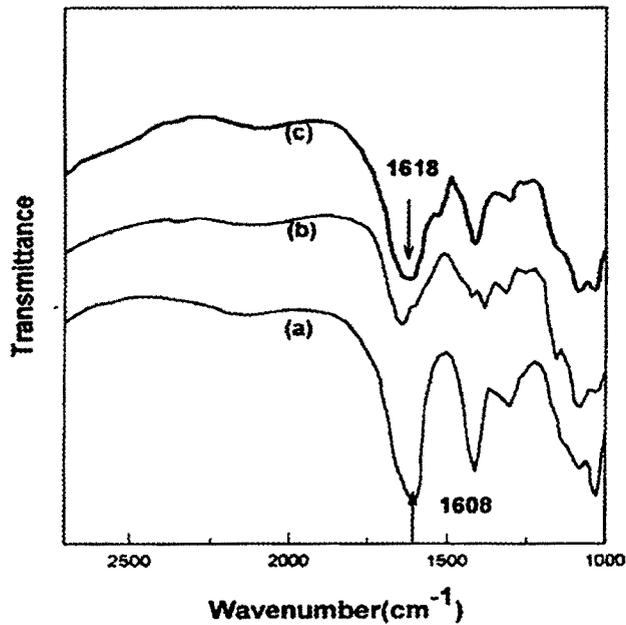


Fig. 23. IR spectra of alginate (a), chitosan (b), and chitosan/alginate polyelectrolyte complex (c).

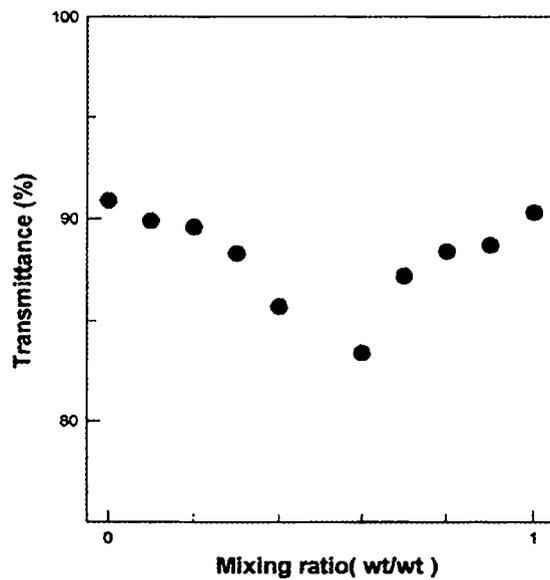


Fig.24. Turbidity of mixture of alginate and chitosan aqueous solution with various mixing ratio. (0.006%(w/v), pH=4, λ =440nm)

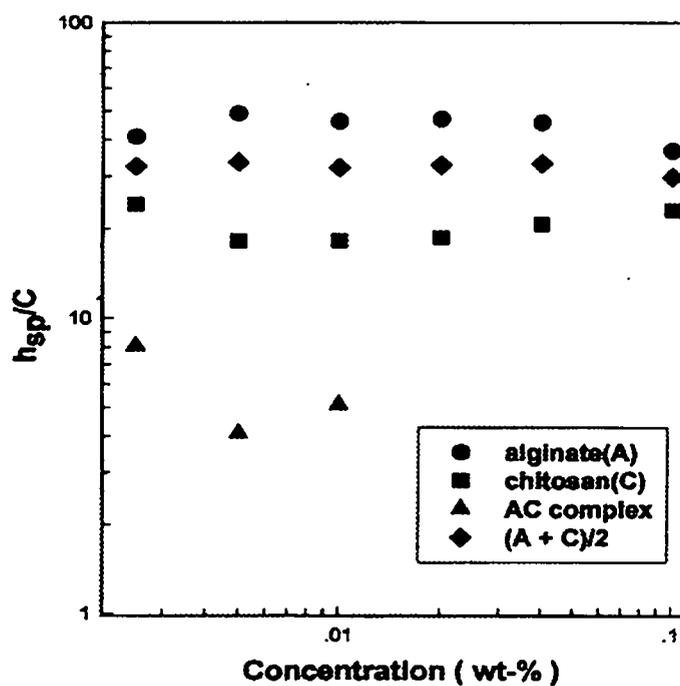


Fig.25. Effect of concentration on the viscosity of chitosan-alginate mixture.

나. 키토산-알긴산 복합체의 수분량 측정

키토산-알긴산 복합체의 시간에 따른 수분량을 측정한 결과가 Fig. 26에 나타냈다.

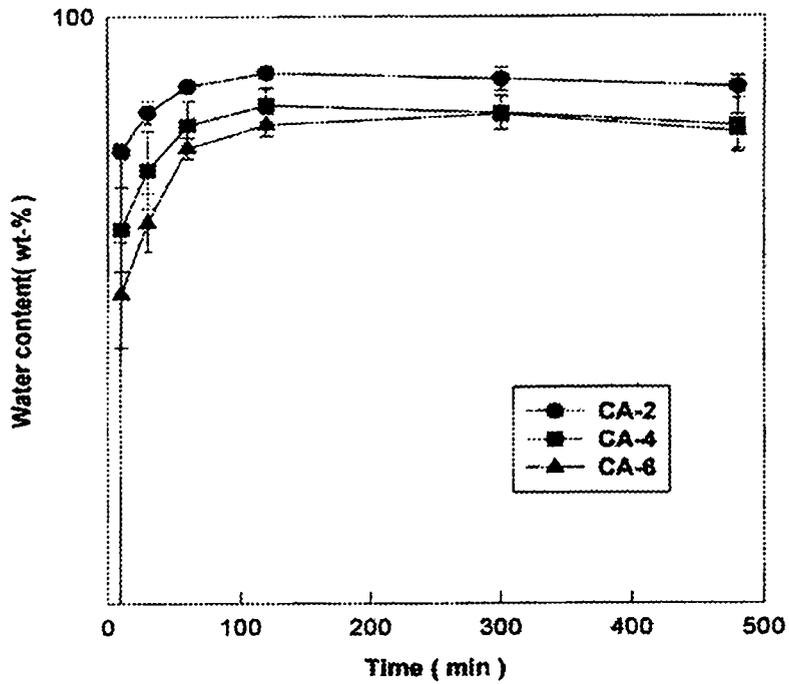


Fig. 26. Water regaining of wound dressing made of various chitosan -alginate complex.

그림에서 나타낸 바와 같이 복합체의 친수성의 성질로 인하여 빠른 시간안에 수분량은 급격히 증가하였고 1시간안에 평형에 도달되었다. 또한 복합체 형성회수가 증가함에 따라 수분량은 약간 감소하는 경향을 나타냈다.

다. 키토산-알긴산 복합체의 형태관찰

키토산 단독의 표면 및 단면(Fig. 27)의 형태보다 알긴산과 복합체를 형성한 후의 표면 및 단면(Fig. 27) 형태는 아직 부드러운 형태로 되었는데 이것도 키토산과 알긴산이 복합체 형성으로 형태변화를 일으킨 것으로 사료된다.

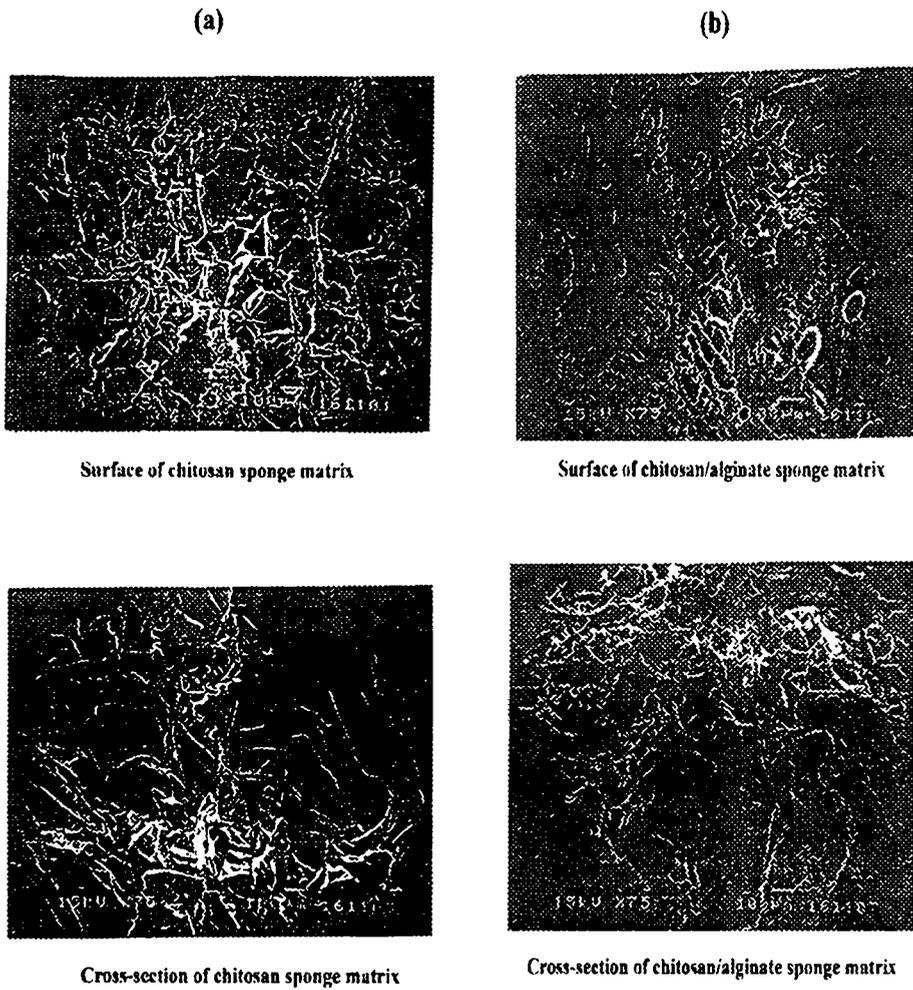


Fig. 27. Scanning electron micrograph of chitosan (a) and chitosan/alginate (b) sponge matrix.

2. 복합체의 인공피부로서의 특성

가. 키토산-알긴산 복합체로부터 항균제의 방출

키토산-알긴산 복합체에 항균제인 실버설퍼다이진을 담지시킨 후 in

in vitro (pH 7.4, 37°C)에서의 방출 실험한 결과를 Fig. 28에 나타냈는데 시간에 따라 선형적으로 방출되는 거동을 보였으며 복합체 형성회수가 증가됨에 따라 친수성의 감소로 인하여 약물방출속도가 감소됨을 나타냈다.

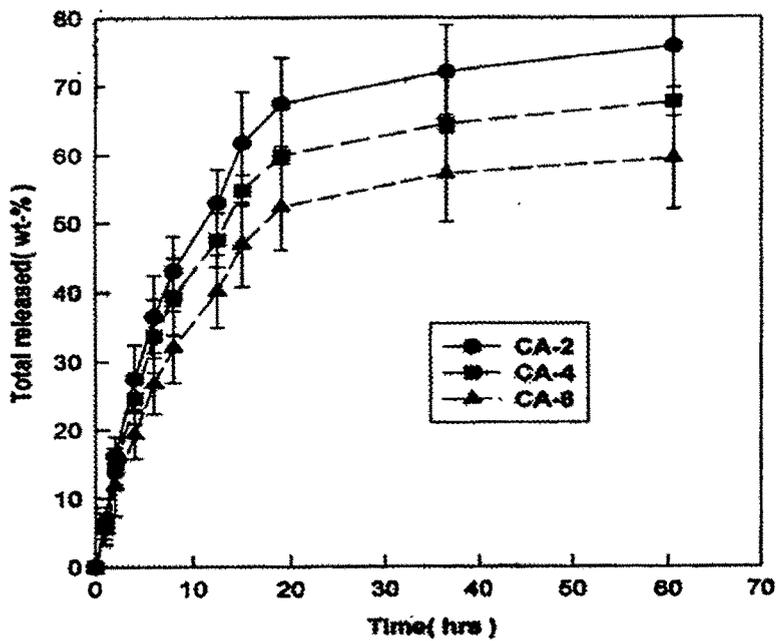


Fig. 28. Release of AgSD from AgSD-soaked wound dressing made of chitosan - sodium alginate sponge matrix. Drug loading was 20% of initial freeze-dried chitosan

나. 키토산-알긴산 복합체의 항균력 검사

복합체에 항균제인 실버설퍼다이진을 담지시킨후 박테리아 일종인 *Pseudomonas aeruginosa*에 대한 항균력 검사결과를 Fig.29에 나타냈는데 월등한 항균능력을 나타냄을 알 수 있었고 복합체 형성회수가 증가함에 따라 항균력은 약간 감소함을 나타냈는데 이것은 약물방출속도가 느려졌기 때문이라고 생각된다.

다. 세포독성 검사

항균제를 담지시킨 키토산-알긴산 복합체 wound dressing의 세포독성은 L929세포를 이용하여 측정하였다. 항균제를 담지한 것과 담지하지 않은 것과는 세포독성에서 큰 차이가 없었다.

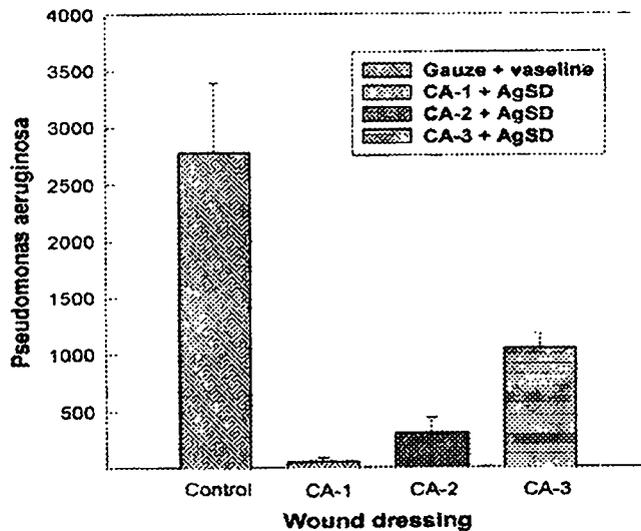


Fig.29. Survival of residual *Pseudomonas aeruginosa* in the agar plate covered with AgSD-impregnated wound dressing. Initial seeding of *Pseudomonas aeruginosa* was $5 \times 10^3 / \text{cm}^2$. Drug loading was $50 \mu\text{g} / \text{cm}^2$.

제3절 키토산에 Poly-L-leucine(PLL)의 graft화 반응

1. 키토산-PLL 복합체 확인

인공피부 소재로서 유망한 키토산에 폴리루이신을 graft화하여 그 특성을 검토하였다. 먼저 루이신을 활성형인 L-leucine N-carboxyanhydride (LL-NCA)를 합성하고 또 키토산 스폰지를 동결건조 방법으로 조제하였다. 이들을 그래프트화시키기 위하여 키토산 스폰지를 LL-NCA를 CH₂Cl₂에 녹인 용액에 침지시켜 실온에서 48시간동안 반응시켰다. 이때 키토산 스폰지에 폴리루이신의 graft 반응에서 LL-NCA/chitosan = 5 (w/w)인 경우 graft율은 20.8%이었다. Graft화의 메카니즘은 키토산의 2번째의 탄소에 있는 일급 아미노기가 LL-NCA의 5번째의 탄소핵을 공격한 친핵성 첨가 메카니즘에 의하여 graft 반응이 진행되었다고 생각되었다.

2. FT-IR

이렇게 합성한 키토산 단독과 키토산-g-폴리루이신의 FT-IR을 조사하였다. 키토산 단독에서는 관찰되지 않은 amide I band가 폴리루이신이 graft됨으로 인하여 1650cm⁻¹부근에 나타나는 것으로 보아 graft된 폴리루이신이 α -helix를 형성하기 때문이라고 생각되었다. 키토산에서 약하게 나왔던 1550cm⁻¹ 부근의 amide II 흡수대도 폴리루이신이 graft됨으로 흡수대가 크게 나타난 것으로 관찰되었다. (Fig. 30)

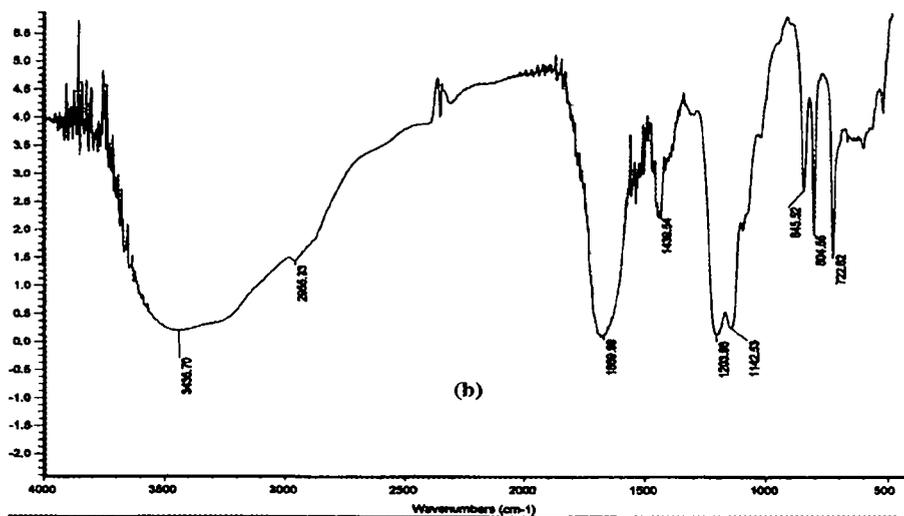
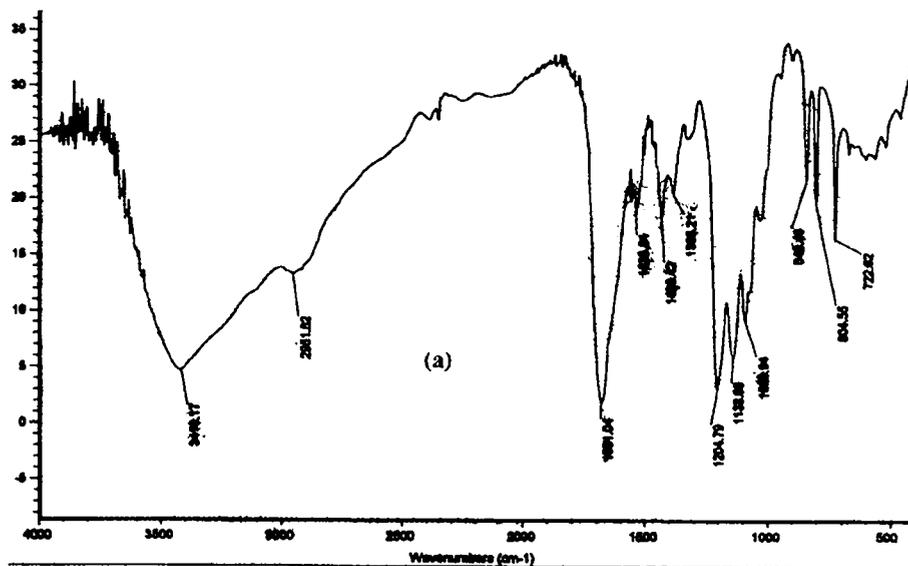


Fig. 30. FT-IR spectra of chitosan(a) and chitosan-g-poly (L-leucine) (b).

3. 전자현미경 관찰

키토산 단독과 키토산-폴리루이신의 표면과 단면을 주사 전자현미경을 사용하여 관찰하였다. (Fig. 31, 32) 키토산 스폰지는 표면에 큰 구멍이 보이는데 폴리루이신이 graft화되면 그 구멍의 크기가 상당히 작아지는 것을 관찰할 수가 있었다. 또한 키토산 단독 및 키토산-폴리루이신의 단면은 표면과 같은 경향을 보여 graft화 됨으로 인하여 구멍의 크기가 작아지고 있었는데 이것은 표면 뿐만 아니라 내부에까지 graft 반응이 일어났기 때문이라고 생각되었다.

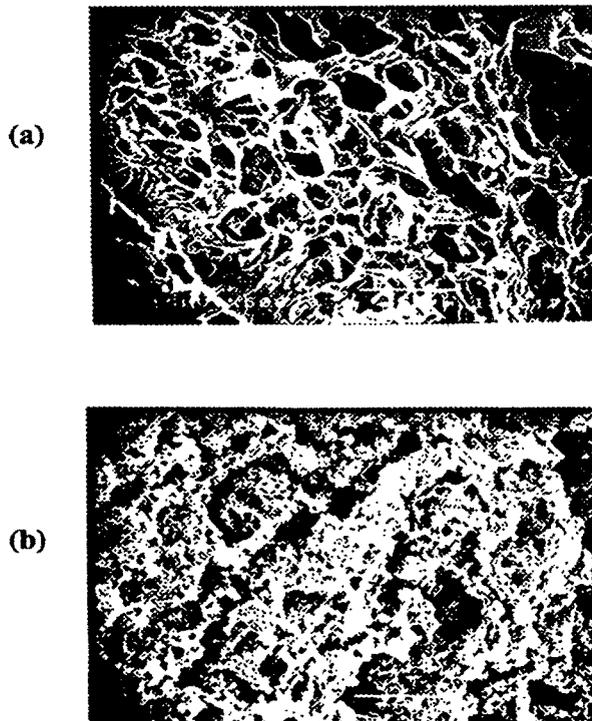


Fig.31. Scanning electron microscopic observation of surface of chitosan (a) and chitosan-PLL (b).

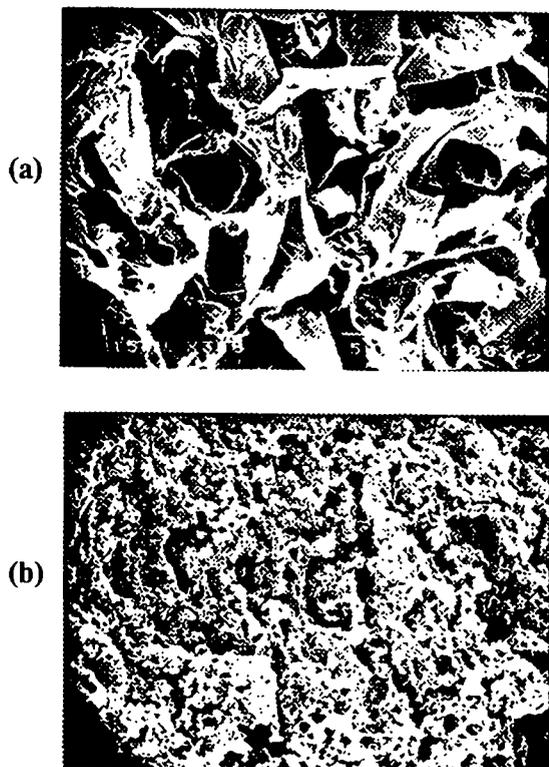


Fig.32. Scanning electron micrograph of cross-section of chitosan (a) and chitosan-PLL (b).

제4절 쥐를 이용한 화상치유 실험 및 조직 검사

90℃에서 20초간 화상을 입힌 쥐에 대조구조로서 가제에 바셀린을 바른 것(Fig. 33-A), 키토산 단독(Fig. 33-B), 키토산-알긴산복합체에 실버셀퍼다이진을 담지시킨 것(Fig. 33-C)과 키토산-알긴산 복합체에 실버셀퍼다이진 및 면역증강제인 DHEA를 담지시킨 것(Fig. 33-D)을 화상부위에 각각의 시료를 15일간 덮어 씌운후의 상처치유효과를 본것으로서 그림에 나타낸바와 같이 상처치유효과순서는 키토산 단독과 키토산-알긴산 복합체에 항균제와 DHEA를 넣은 것이 가장 치유효과가 컸고 다음이 키토산-알긴산 복합체에 항균제를 넣은 것이고 가장 효과가 없는 것은 대조구조로서 바셀린을 바른 가제였다. 키토산-알긴산복합체에 항균제를 넣은 것이 키토산 단독보다 덜 효과적인 이유는 아직 알 수가 없고 현재 그 이유를 밝히기 위하여 실험을 진행중에 있다.

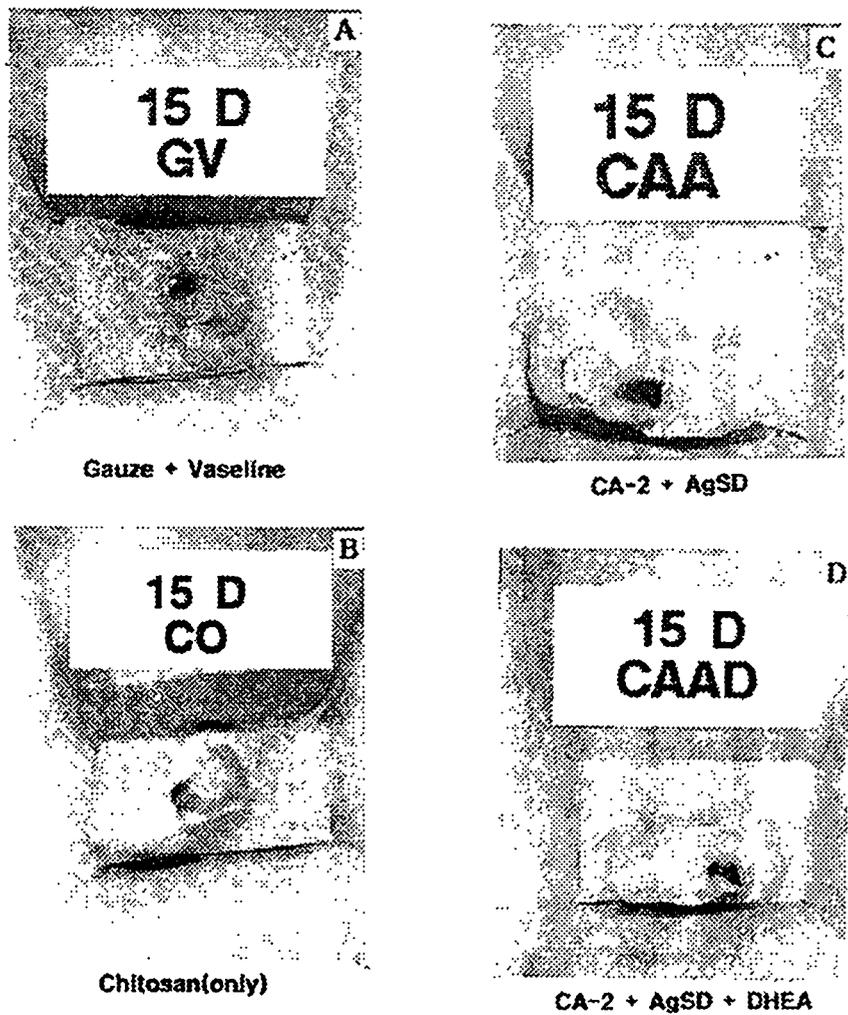
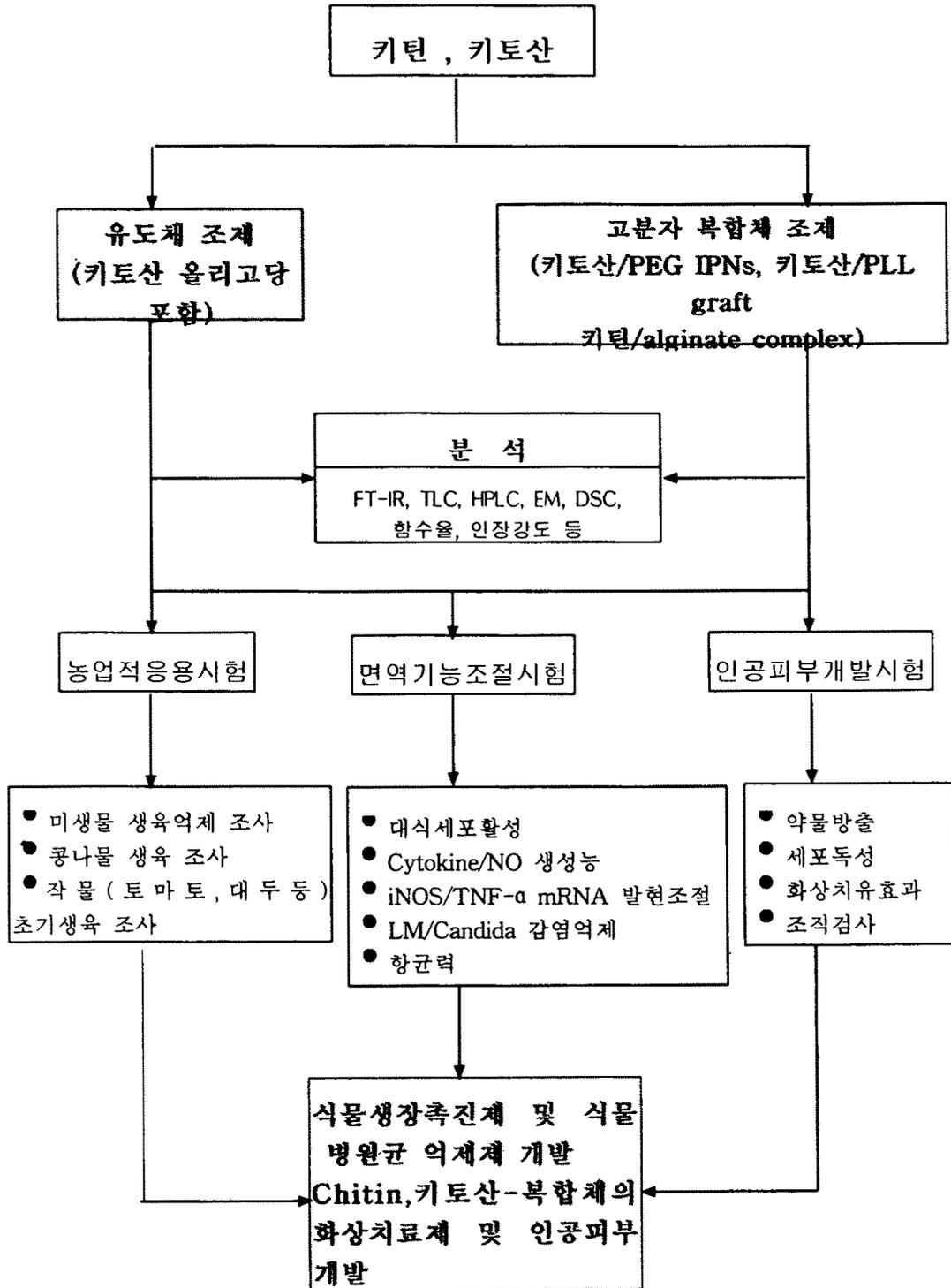


Fig.33. Wound surface covered with drug impregnated wound dressing 15 days after application of chitosan and chitosan-alginate complex

제5절 결론

키틴, 키토산 소재 인공피부개발에서는 PEG macromer-chitin IPN을 합성하여 흡수율이 81%로 증가하였으며, 흡열녹는점은 52℃~54℃로 나타났고 습윤시에 좋은 기계적 특성을 나타내어 인공피부의 가능성이 높게 나타났다. 또한 키토산-alginate complex는 1시간 정도에 수분흡수량이 평형에 도달하였으며, 단면은 키토산의 부드러운면을 간직하고 있었다. Ag-sulfadiazine방출은 20분까지는 거의 선형적으로 증가한 후 30분에는 plateau에 도달하였다. 이 키토산-alginate의 세포독성은 L929세포에서 없는 것으로 판명되었으며, *Pseudomonas aeruginosa*에 대한 sponge의 간극이 축소되었음을 관찰하였다. 화상치유 효과에서는 키토산-alginate complex에 Ag-sulfadiazine과 DHEA를 같이 투여한 것이 우수하였으며 조직학적 검사에서도 가장 좋았다.



IV. 참고문헌

1. Andini, S., L. Ferrara, G. Maglio, and R. Palumbo, Makromol. Chem. Rap. Commun., 9, 119(1988)
2. Arai K, Kinumaki T and Fugita T: Toxicity of chitosan. Bull Tokai Reg Fish Res Lab, 56:86-94, 1968.
3. Baker, S.A., A.B. Foster, M. Stacey, and J.M. Webber.: Amino-sugars and related compounds. Part IV. Isolation and properties of oligosaccharides obtained by controlled fragmentation of chitin, J. Chem. Soc. 2218-2227(1958)
4. Cho, J.S., H. Ha, S. H. Kim, S. Y. Han, J. K. Kwan and Y. K. Sung. J. Appl. Polym. Sci., 60, 161(1996)
5. Feng, X. M., C. D. Xiong, L. M. Cheng, and R.P. Xu, J. Polym. Sci., Polym. Lett. Ed., 28, 411(1990)
6. Hackman, R.H., Aust. J. Biol. Sci., 7. 168(1954)
7. Hirano, S.: Production and application of chitin and chitosan in Japan, in "Chitin and Chitosan", eds., G. Skjak-Break, T. Anthonsen, P. Sandford, Elsevier, 1989, pp 37-43.
8. Hirano, S., H. Inui, T. Mikami, Y. Ishigami, H. Hisamori: An alkaline chitin solution and some O-alkylchitin derivatives, Agric. Biol. Chem., 55. 2627-2628(1991).
9. Hirano, S., H. Kaneko, M. Kitagawa: N-Lower-fatty-acyl derivatives of chitosan as adsorbents for lysozyme and

- chitinase, *Agric. Biol. Chem.*, 55, 1683-1684(1991).
- 10: Hirano, S., K. Hayashi, K. Hirochi: Some N-acyl derivatives of O-carboxymethylchitosan, *Carbohydr. Res.*, 225, 175-178 (1992).
 11. Kyotani S, Nishioka Y, Okamura M, Tanaka T, Miyazaki M, Ohnishi S, Yamamoto Y, Ito K, Ogiso T, Tanada S, et al. A study of embolizing materials for chemo-embolization therapy of hepatocellular carcinoma: antitumor effect of cis-diamminedichloroplatinum(II) albumin microspheres, containing chitin and treated with chitosan on rabbits with VX2 hepatic tumors. *Chem-Pharm-Bull-(Tokyo)* 40(10): 2814-6, 1992.
 12. Marcinkiewicz J, Polewska A, Knapczyk J: Immunoadjuvant properties of chitosan. *Arch Immunol Ther Exp* 39:127-132.1991.
 13. Muzzarelli, R.: in *Chitin*, Pergamon Press, Oxford (1977), p.85
 14. Muzzarelli RAA:Chitin. pp. 5-17, Pergamon Press, Oxford, 1977.
 15. Nishimura K, Nishimura S, Nishi I, Saiki S, Tokura S and Azuma I: Immunological activity of chitin and its derivatives. *Vaccine*, 2_93-99, 1984.
 16. Otakara, A. and M. Yafuki: *Chitin and Chitosan: An Experimental Manual*. Chapter 2, 3, and 4., 技報堂出版, Tokyo (1991)
 17. Pavia, D. L., G. M. Lanpman, and G. S. Kriz, Jr., in *Introduction to spectroscopy*, W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1979.
 18. Rupley, J.A.: The hydrolysis of chitin by concentrated

- hydrochloric acid, and the preparation of low-molecular-weight substrates for lysozyme, *Biochimica et Biophysica Acta* 83: 245-255(1964)
19. Suzuki K, Mikami T, Okawa Y, Tokoro A, Suzuki S and Suzuki M: Antitumor effect of hexa-N-acetyl chitohexaose and chitoheaoase. *Carbohydrate Res*, 151:403-408, 1986.
 20. Tanigawa T, Tanaka Y, Tomita K, Sasaki T, Sashiwa H, Saimoto H, Shigemasa Y, Okamoto Y, Minami S and Matsuhashi A: Effect of chitin on the production of interleukin-1b in human blood monocytes. *Yonago Acta Med*, 35(2):147-150, 1992.
 21. Tanigawa T, Tanaka Y, Tomita K, Sashiwa H, Saimoto H and Shigemasa Y, : Effect of partially deacetylated chitin oligomers on two macrophage cell lines: comparison with lipopolysaccharide and phorbol myristate acetate. *Yonago Acta Med*, 34:155-162, 1991
 22. Terbojevich, M., A. Cosani, and C. Canaro, Chitin and Chitosan', *Proceedings of the 4th International conference on Chitin and Chitosan, Trondheim, Norway, August 1988, p407*
 23. Nelson-JL: Alexander-JW: Gianotti-L: Chalk-CL: Pyles-T
Influence of dietary fiber on microbial growth in vitro and bacterial translocation after burn injury in mice. *Nutrition*. 1994 Jan-Feb; 10(1): 32-6
 24. Petronio-MG: Mansi-A: Gallinelli-C: Pisani-S: Seganti-L:

- Chiarini-F: In vitro effect of natural and semi-synthetic carbohydrate polymers on Chlamydia trachomatis infection. Chemotherapy. 1997 May-Jun: 43(3): 211-7
25. Peluso-G; Petillo-O; Ranieri-M; Santin-M; Ambrosio-L; Calabro-D; Avallone-B; Balsamo-G: Chitosan-mediated stimulation of macrophage function. Biomaterials. 1994 Dec: 15(15): 1215-20
26. Schmidt-RJ; Chung-LY; Andrews-AM; Spyratou-O; Turner-TD: Biocompatibility of wound management products: a study of the effects of various polysaccharides on murine L929 fibroblast proliferation and macrophage respiratory burst. J-Pharm-Pharmacol. 1993 Jun: 45(6): 508-13
27. Kosaka-T; Kaneko-Y; Nakada-Y; Matsuura-M; Tanaka-S: Effect of chitosan implantation on activation of canine macrophages and polymorphonuclear cells after surgical stress. J-Vet-Med-Sci. 1996 Oct: 58(10): 963-7