

## 키티ن·키토산 및 그 올리고당의 제조기술과 개발동향

김 세 권 / 부경대학교 교수(한국키티ن·키토산연구회 간사장)

### 머 리 말

키티인과 키토산은 지구상에서 연간 천억톤 이상 생물생산이 되고 있는 미이용 천연자원으로 주목되어 식품, 의약품 및 화장품 등 여러 공업분야에서 이에 관한 이용연구가 활발히 진행되고 있다.

키티인·키토산의 공업적 생산은 1970년 일본에서 시작되어 현재 연간 약 1,100톤이 생산되고 있으며, 우리나라에서는 연간 400톤이 생산되는 것으로 추정되고 있다. 이외에 중국, 미국, 폴란드, 인도, 러시아 등에서도 키티인·키토산이 생산되고 있다. 키티인은 그 자체로서의 용도는 적고 대부분 키토산 제조원료로 사용되고 있다.

최근 키티인·키토산을 가수분해하여 얻어진 저분자 단당류인 D-글루코사민, N-아세틸 글루코사민과 소당류인 키티인 올리고당, 키토산 올리고당의 기능과 이용도 미이용자원인 키티인·키토산의 이용을 극대화하는데 중요한 몫을 하고 있다. 이러한 점에서 키티인을 분해하는 키티인 가수분해효소(chitinase), 키토산을 분해하는 키토산 가수분해효소(chitosanase) 등 효소를 이용한 저분자화의 연구도 활발히 이루어지고 있다.

국내에서 키티인·키토산이 시장에 출현한 지가 10여년이 경과하였지만 아직 제품의 품질에 많은 문제점이 있으며, 다양한 용도 개발이 이루어지지 못하고 있는 실정이다.

다행히 필자 등이 개발한 키토산 가수분해 효소를 이용한 막효소반응기에서의 키토산 올리고당의 연속적 생산기술이 산업체에서 활용되어 대량 생산 체계에 들어감으로써 양질의 키토산 올리고당을 응용한 제품들이 시판에 들어가 다행이라 생각된다.

본고에서는 키티인·키토산 및 그 올리고당의 제조 방법을 문헌을 통하여 살펴보고 이를 활용하여 개발되고 있는 개발동향에 대하여 간추려 본다.

### 1. 키티인·키토산의 제조

#### 1) 갑각류 껍데기로부터 키티인의 제조

키티인은 새우와 게 등의 갑각류 껍데기에 많이 함유되어 있기 때문에 일반적으로 이들을 원료로하여 분리한다. 갑각류 껍데기는 키티외에 탄산칼슘을 주성분으로 하는 무기염, 단백질, 지질, 색소 등을 함유하고 있기 때문에 이들을 차례로 제거해야 한다. 무기염의 제거에는 묽은 염산과 에틸렌디아민사초산(EDTA)법을, 단백질 제거에는 알칼리법, 효소법 및 발효법을 사용하고 있다. 또 지질 및 색소는 유기용매로 추출할 수 있다. 공업적으로는 묽은 염산에 의한 무기염 제거와 알칼리에 의한 단백질 제거로 분리시킨다.

#### ① 화학 처리에 의한 분리

화학처리에 의한 분리는 a. 묽은 염산에

의한 무기물의 제거, b. 묽은 알칼리에 의한 단백질 제거, c. 유기용매에 의한 지질 및 색소의 제거 순서로 되지만, 단백질 제거나 무기염 제거보다 앞서 행하는 경우도 있다. 또 알칼리 처리에 의해 지질 및 색소의 대부분이 제거되기 때문에 c는 생략하는 경우도 많다.

대표적인 키틴의 분리법으로 Hackman<sup>1)</sup> 방법이 있다. 즉 껍데기를 흐르는 물로 세정하여 부착물을 조심스럽게 제거하고 100°C에서 건조시킨다. 이 건조한 껍데기를 2N 염산으로 실온에서 5시간 침전시킨다. 수세 후 100°C에서 건조한 다음 분쇄한다. 이 분말에 냉각한 2N 염산을 가하여 때때로 격렬하게 교반하면서 48시간 처리한다. 무기염을 제거시킨 껍데기를 원심분리로 회수한 후 수세한다. 다시 1N 수산화나트륨 수용액중에서 100°C, 12시간 가열하여 단백질을 제거한다. 불용성의 키틴회분을 회수하여 새로운 1N 수산화나트륨 수용액을 가하여 같은 조건하에서 단백질을 제거시킨다. 단백질제거 조작을 다시 3회 반복하면서 세정액이 중성이 될 때까지 수세를 반복한다. 다음에 에탄올, 에테르 순으로 세정하

고 오산화인 속에서 진공 건조시킨다. 이 조작으로 껍데기로부터 얻어진 담황색 키틴 분말의 수율은 17%이다.

Shimahara 등<sup>2)</sup>은 Hackman 방법을 간략화한 방법으로 키틴을 분리하였다. 즉 흐르는 물로 껍데기의 부착물을 제거한 후 새우류의 꼬리부분 껍데기는 체질마다 분리하고, 각이 두꺼운 계류는 5mm정도로 분쇄하여 풍건(風乾)하였다. 이 껍데기를 2N 염산으로 상온에서 24시간 침전시키고 다시 2N 염산으로 교환하였다. 다시 24시간 무기질 제거처리를 계속하였다. 수세 후 무기질이 제거된 껍데기에 1N 수산화나트륨 수용액을 가하여 100°C에서 36시간 단백질을 제거시켰다. 단, 알칼리용액은 처리 6시간 후에 1회 교환하였다. 키틴을 회수하여 세정액이 중성이 될 때까지 수세하였다. 물이 제거된 키틴을 등근바닥 플라스크에 넣고 에탄올을 가하여 6시간 가열 환류시켜 풍건하였다. 이 처리로 왕새우 *Penaeus japonicus*의 풍건한 껍데기로부터 백색 키틴의 수율은 30%였다. 간략법은 미분쇄(微粉碎)하지 않은 껍데기를 사용하기 때문에 회수와 세정조작이 Hackman법보다 용이하다.

표 1. 새우의 껍데기 및 여러 가지 방법으로 조제한 키틴 중간생성물의 성상

물질(정제 과정)	회분 (%)	단백질 (%)	탈아세틸화도 (%)	결정화도 <sup>1)</sup>	분자량( $\times 10^6$ ) <sup>2)</sup>	색
천연껍데기	21.0	16.9				
EDTA로 무기염을 제거시킨 껍데기	0.5	25.4				
HCl로 무기염을 제거시킨 껍데기	0.3	26.0				
키틴A(EDTA/LC(102* <sup>3)</sup> )	0.5	0.3	9.9	19	3.5	회백색
키틴B(HCl/LC(102* <sup>3)</sup> )	0.9	0.9	10.6	26	3.1	회백색 ~담갈색
키틴C(EDTA/NaOH)	0.3	0.0	12.4	25	2.6	백색
키틴D(HCl/NaOH)	0.1	0.0	17.1	41	1.8	백색

(주) ※ 1. X선 회절도의  $2\theta = 19^\circ$  부근의 피크값의 높이의 상대값.

※ 2. DMAc/5% LiCl용액의 극한점도에서 키토산 식을 대용하여 구한 분자량

※ 3. *Pseudomonas maltophilia* LC 102의 배양에 의한 단백질 제거.

이들 방법은 산 및 알칼리를 사용하기 때문에 분리된 키틴에 해중합(解重合)이나 탈아세틸화 등의 변성을 어느 정도 일으킨다. 이들 영향을 억제하기 위해 무기염 제거시에 사용되는 묽은 염산 대신에 킬레이트제인 EDTA를 사용하는 방법이 Foster와 Hackmam<sup>3)</sup>에 의해 제창되었다. 이 방법은 중성 부근에서 무기염을 제거하기 때문에 키틴의 변성을 억제할 수 있지만, 산처리법에 비해 처리하는데 오랜 시간이 필요하며 껍데기중의 무기염 잔존량도 증가한다. 실제로, 새우의 껍데기를 0.1M-EDTA용액에 실온에서 6시간 침전한 경우 회분은 21%에서 0.5%로 감소하였고, 알칼리 처리의 경우에 비해 회분 잔존량이 약간 높은 결과가 얻어졌다(표 1)<sup>4)</sup>.

무기염 제거법은 이외에 초산 또는 아초산<sup>5)</sup>이나 90% 포름산<sup>6)</sup>을 사용하는 방법이, 단백질 제거에는 탄산나트륨 용액으로 가열하는 방법<sup>7)</sup>과 10% 수산화나트륨 용액으로 실온에서 3일간 처리하는 방법<sup>8)</sup>이 있다. 또 색소제거에 과산화수소를 사용하는 방법도 보고되어 있다.

## ② 생물학적 처리에 의한 단백질 제거

갑각류 껍데기의 단백질제거에 가열된 묽은 알칼리를 사용하면 산처리와 마찬가지로 키틴 변성을 일으킨다. 이 변성을 막기 위해서 단백질 분해효소를 사용하는 효소처리법과 세균을 사용하는 발효법에 의한 방법이 검토되고 있다.

武田와 阿部<sup>9)</sup>는 가다랑어 내장에서 추출한 protease를 계 *paralithodes camithecus*의 EDTA로 무기질 처리시킨 껍데기에 작용시켜 껍데기의 단백질 함량을 20%에서 2%로 낮추었다. 또 武田와 勝浦<sup>10)</sup>는 같은 껍데기에 시판 protease를 작용시켜 단백질 함량을 1%까지 낮추었다. 한편 Herzog 등<sup>11)</sup>은 계 *Astacus fluviatilis*의 무기질이 제거된 껍데기를 protease로 40°C, 15시간 분해하여 단백질 함량을 15%에서 2.2%로 papain을 65°C, 40시간 작용시켜 0.67%로 감소시켰다. 그러나 시판 protease로는 키틴분해효소가 혼입되어 있다고 생각되는 사례도 보고되어 있다<sup>12)</sup>.

池田과 島原<sup>13)</sup>은 protease를 생산하지만, 키틴 가수분해효소는 생산하지 않는 세균을 참새우의 무기질을 제거한 껍데기를 사용하여 탐색한 결과, 토양에서 *Pseudomonas maltophilia* LC102를 분리하였다. 여러 종의 갑각류 껍데기를 영양원으로 하여 *Ps. maltophilia*를 흔들면서 배양한 결과, 참새우의 무기질이 제거된 껍데기는 24시간의 배양으로 단백질함량을 1% 정도까지 저하시켰지만, 그 이후 28시간 배양에서도 완전한 제거는 이루어지지 않았다. 또 왕게와 대하 *Panulirus japonicus*에서는 껍데기 단백질함량이 5%이하로 낮아지지 않았다.(그림 1)

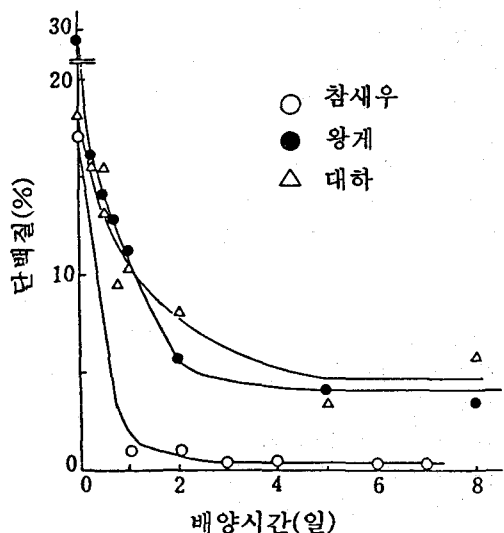


그림 1. *Pseudomonas maltophilia* LC 102에 의한 여러 가지 갑각류 껍데기에 의한 단백질 제거율

이와 같이 protease 및 발효법에 의한 단백질 제거는 껍데기 단백질이 90~97% 정도까지는 제거가 가능했지만 완전히 제거할 수는 없었다. 그 이유로서 껍데기에는 protease로 분해되기 어려운 단백질을 10% 정도 함유되어 있고,<sup>10)</sup> 또한 단백질이 키틴과 공유결합을 형성하고 있는 것으로 알려져 있다<sup>5)</sup>.

③ 여러 가지 방법으로 분리한 키틴의 성상  
①과 ②에 나타낸 바와같이 무기질 제거

에는 일반적인 묽은 염산법과 온화한 EDTA법, 단백질 제거에는 일반적인 가열 묽은 알칼리법과 온화한 발효법이 있다. 그리고 이들 무기질 제거와 단백질 제거를 조합시킨 4종류의 방법으로 새우의 꼬리부 껍데기를 처리하여 키틴을 분리시켜 그 성상을 측정 한 결과는 표 1과 같다. 또 분자량 값은 키틴산의 점도식을 사용하였기 때문에 절대값은 부정확하다. 이 중에서 가혹한 화학처리만으로 분리한 키틴A는 다른 것에 비해 분자량이 낮았고 탈아세틸화도는 높았다. 한편 온화한 처리의 조합으로 분리한 키틴D는 키틴A와 반대의 결과를 나타내었다. 더구나 가혹한 처리와 온화한 처리를 조합시켜 사용한 키틴B와 C는 이들의 중간값이었다. 따라서 묽은 염산처리 및 가열한 묽은 알칼리처리는 어느 것이나 키틴에 어느 정도의 변성을 일으킨다. 또 EDTA 처리 및 발효법이 키틴의 탈아세틸화를 일으킨다고 생각하기는 어렵기 때문에 새우 껍데기의 키틴은 생합성된 시점에서 10% 정도의 탈아세틸화가 진행되었다고 생각된다.

## 2) 기타 생물로부터의 키틴의 분리

갑각류 이외에 키틴을 비교적 다량으로 함유한 생물로서는 곤충, 연체동물, 진균류 등이 있지만 이들로부터 키틴을 분리한 보고는 상당히 적다. 연체동물에 속하는 오징어 체내에는 연갑(軟甲)이라는 골격기관이 있다. 여기에 함유되어 있는 키틴의 결정구조는  $\beta$ 형이며, 갑각류의  $\alpha$ -키틴과 다르기 때문에 최근 그 연구가 시작되었다<sup>14)</sup>. 연체연갑키틴의 분리는 Hackman법으로 행해지고 있다. 또 초산균에 의해 생산되는 셀룰로오스에 N-아세틸 글루코사민 잔기를 4몰% 도입한 키틴과 셀룰로오스의 중간적인 성질을 갖는 새로운 다당류도 보고되어 있다<sup>15)</sup>.

## 3) 갑각류 키틴으로부터 키틴산의 제조

키틴산은 일반적으로는 갑각류 유래 키틴을 가열된 진한 알칼리로 탈아세틸화함으로써 제조할 수 있다. 갑각류 키틴을 효소적으로 탈아세틸화하는 방법도 시도되고 있지

만 실용화하는데 이르지 못했다. 또 집합균류의 균사체에서 직접 키틴산을 얻을 수 있는 방법도 검토되고 있다<sup>16)</sup>.

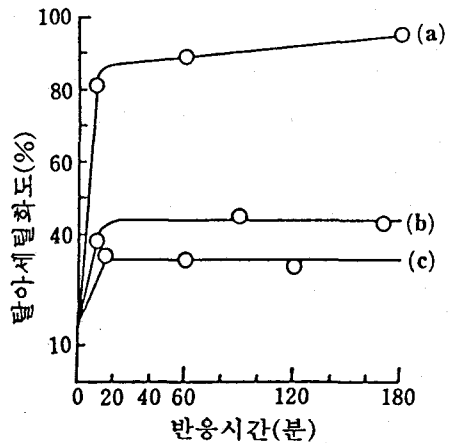


그림 2. 키틴분말의 알칼리 용액중에서의 탈아세틸화반응

- (a) 40% 수산화나트륨 용액(130°C)
- (b) 30% 수산화나트륨 용액(112°C)
- (c) 20% 수산화나트륨 용액(105°C)

### ① 화학적인 탈아세틸화

키틴은 고농도의 알칼리 용액중에서 가열하면 아미노기의 아세틸기가 이탈되어 키틴산으로 된다. 탈아세틸화시의 알칼리 농도, 처리온도, 처리시간에 대해서는 확립된 조건은 아니지만 높은 탈아세틸화도의 키틴산을 얻기 위해서는 저분자화를 일으키는 가혹한 처리조건이 필요하다.

키틴분말을 각 농도의 알칼리 용액의 비점 가까이에서 처리한 경우의 반응시간과 탈아세틸화도의 관계를 그림 2에 나타내었다<sup>17)</sup>. 탈아세틸화는 반응초기에 급속히 진행하지만, 그후의 진행은 상당히 완만하게 된다. 그림 2에서 90%이상의 탈아세틸화도의 키틴산을 얻기 위해서는 40% 수산화나트륨 용액중에 130°C, 3시간의 처리가 필요하게 된다. 또 키틴을 50% 수산화나트륨 용액중에서 가열한 경우 5시간 처리 후의 분자량은 30분 처리한 것보다 1/2 감소한다.

키틴산의 제조에는 알칼리 용액중에서의 가열 외에 180°C의 용융 수산화칼륨중에서

30분간 처리하는 방법<sup>18)</sup>, 수산화칼륨, 에탄올, 에틸렌글리콜로 된 유기 알칼리용액으로 처리하는 방법<sup>19)</sup> 등도 있다.

## ② 생물학적인 탈아세틸화

키틴의 탈아세틸화효소는 접합균류에 존재하는 것으로 알려져 있다. Araki와 Ito<sup>20)</sup>는 *Mucor rouxii*의 균사체로부터 탈아세틸화효소를 정제하였다. 이 효소는 수용성의 글리콜키틴(glycolchitin) 및 키틴올리고당(5량체)을 쉽게 탈아세틸화시키지만 분말 키틴에 대한 활성은 올리고당의 10% 정도였다. 또 島原와 岩埼<sup>21)</sup>는 아세트아미드 분해균 *Aeromonas* sp. H 33을 사용하여 갑각류 키틴의 탈아세틸화를 시도하였다. H 32 균주를 키틴분말이 함유된 배지에서 8일간 배양하면 키틴의 탈아세틸화도는 50%까지 상승했지만 그 이후는 일정하게 되었다. 이들 결과는 키틴의 단단한 결정구조가 탈아세틸화 효소의 키틴 입자내부로 침입을 저지하고 있다고 생각된다. *Mucor rouxii*의 경우, 생합성 직후의 결정구조를 형성하지 않는 키틴에 탈아세틸화 효소가 작용하는 것으로 추정되고 있다.

## 4) 접합균류를 사용한 키토산 생산

키토산은 접합균류의 세포벽에 키틴과 함께 존재하고 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 키토산을 많이 함유한 균주를 대량으로 배양한 기술이 확립되면 현재 행해지고 있는 「갑각류 키틴의 화학적 탈아세틸화법」을 대신한 키토산 제조방법이 될 가능성이 있다.

White 등<sup>22)</sup>은 글루코오스, 효모추출액, 맥아추출액으로 만든 배지(pH 4.5)에 *Mucor rouxii*를 접종하여 28°C에서 통기배양한 결과, 50시간 배양 후에 균사체를 모아 묽은 알칼리로 단백질을 제거한 후 10% 초산으로 키토산을 추출하였다. 배양액 1ℓ당 건조균사체 9~14g, 키토산 0.5~1.2g을 얻었다. 또, MacGaharen 등<sup>23)</sup>은 *Absidia coerulea*를 36시간 배양하여 배양액 1ℓ당 건조균사체 18g, 키토산 4.9g을 얻었다. 또 小林 등<sup>24)</sup> 접합균류 *Mucoraceae*과에 속하는 사상균 7속 125균주를 동일조건으로 배양하여

생성된 키토산 양을 비교한 결과, 키토산 고생산주는 *Absidia*속과 *Rhizopus*속에 많이 분포하였다.

접합 균류에서 키토산을 얻는 방법은 폐기물인 갑각류 껍데기를 이용한 키토산 제조법에 비해 제조비용이 많이 들지만 균질한 키토산을 안정적으로 공급할 수 있다는 점에서 우수하다. 또, 접합균류의 키토산은 종래의 갑각류 키토산보다 금속이온 흡착능과 항균성이 높은 특징도 발견되고 있다.

## 2. 키틴 및 키토산 올리고당의 화학적 제조법

키틴 올리고당은 N-아세틸 글루코사민(GlcNAc)이 β-1,4-결합으로 수 개가 결합한 물질이며, 일반적으로 키틴을 부분 가수분해하여 제조한다. 키틴 올리고당 제조의 시도는 과거에 몇가지의 방법에 의해 이루어졌지만<sup>25)</sup> 일련의 중합도의 올리고당(GlcNAc)<sub>2</sub>~(GlcNAc)<sub>7</sub>은 얻어지지 않았다. 그러나 1958년에 Barker 등<sup>26)</sup>은 키토산을 염산에 의해 가수분해하여 이것을 N-아세틸화한 다음 활성탄 칼럼에 의한 분리를 하여 (GlcNAc)<sub>7</sub>까지의 올리고당을 얻었다. 그리고 1964년 Rupley<sup>27)</sup>는 라이소자임의 기질로서 올리고당을 얻기 위해 키틴을 여러 가지 조건으로 염산가수 분해하여 활성탄 칼럼에 의한 분리정제를 하여(GlcNAc)<sub>5</sub>까지의 올리고당을 얻었다. 이 방법은 키틴올리고당의 일반적 조제법으로서 널리 사용되고 있다. 또 최근에는 불화수소에 의해 키틴을 가수분해하는 개량법도 나오고 있다.<sup>28)</sup>

한편, 키토산 올리고당은 글루코사민(GlcN)이 β-1,4-결합한 물질이며, 키틴을 가열한 진한 알칼리로 처리하여 얻어진 키토산을 부분 가수분해하여 제조할 수 있다. 산가수분해에 의한 키토산올리고당의 제조는 1957년 Horowitz 등<sup>29)</sup>에 의해 시도되었다. 이 방법은 키토산을 염산으로 가수분해한 후 이온교환크로마토그래피로 분리정제를 행한 것이다.

여기서는 종래 방법에 개량을 가한 효율적인 키틴·키토산올리고당의 제조법에 대하여 소개한다.

## 1) 키틴올리고당의 제조

### ① 키틴의 가수분해

산가수분해시에는 키틴을 구성하는 글리코시드결합이 무작위로 가수분해되어 아세틸기가 떨어져 나간다. 목적하는 중합도의 키틴올리고당을 효율적으로 얻는 데는 가수분해조건을 정확히 설정할 필요가 있다. 그래서 키틴가수분해시 올리고당의 생성변화에 대하여 조사하였다.

#### [실험]

키틴 200g에 1kg의 진한 염산을 가하여 교반하면서 40°C에서 분리를 하였다. 1시간마다 분해액 30g을 채취하여 이것을 분석시료로 하였다. 분석시료는 같은 양의 증류수로 희석한 다음 5% 수산화나트륨 용액 30g을 가하여 중화하고 다시 중화용액과 같은 양의 증류수로 희석한 다음 셀라이트(celite) 10g을 가하여 여과하였다. 여액은 환원력, GlcN 양을 측정 한 다음, 200ml의 양이온 교환수지(Dowex 50W×4(H<sup>+</sup>))칼럼 및 100ml의 이온교환수지혼합(Amberite 1R 120B(H<sup>+</sup>): Amberite 1RA 400(OH<sup>-</sup>))=1:1)칼럼에 넣어 유출시킨다. 유출액은 농축후 동결건조하여 키틴 분해물을 얻었다. 분해액의 환원력의 측정은 여액 50ml를 100ml로 희석하여 그 1ml에 3ml의 샤퐄시약을 가하여 15분간 끓인 후 흡광도(420nm)를 측정한다. 분해물 중의 GlcN 양은 GlcN의 염산염을 표준으로 하여 닌하이드린법으로 측정하였다. 키틴올리고당의 분리정량은 HPLC를 사용하였다. 분석은 아래 조건에서 행하였다.

사용기종 : Waters제, 201 D 콤팩트형  
검출기 : Waters제, R401형 시차굴절계  
칼럼 : Waters제,  $\mu$ -bondapak CH(3.9 × 300mm)  
유속 : 0.8ml/min  
이동상 : CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O = 70 : 30(v/v)  
온도 : 실온

#### (결과)

반응온도는 아세틸기의 가수분해를 될 수 있는 데로 억제시키기 위해 40°C에서 하였다. 그림 3에 가수분해시에 있어서 키틴분

해물, GlcN의 생성량 및 분해여과액의 환원력의 시간경과에 따른 변화를 나타내었다.

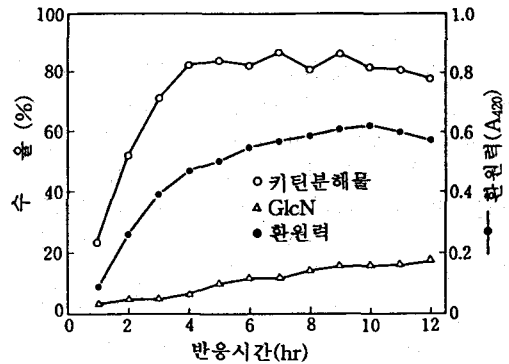


그림 3. 40°C에 있어서 키틴가수분해의 경시적 변화

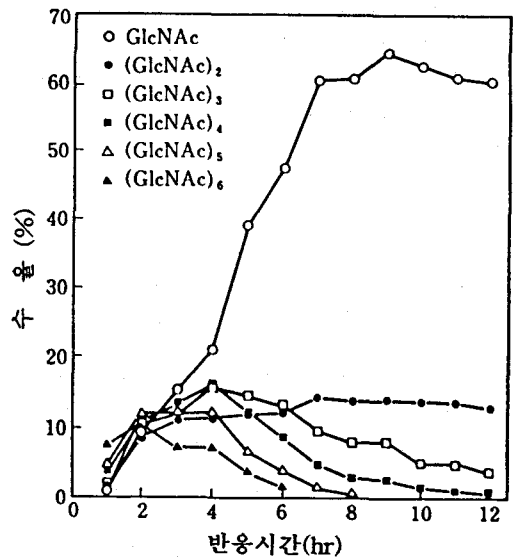


그림 4. 키틴가수분해시 키틴올리고당의 생성량 변화

키틴분해물의 생성량은 가수분해의 경과시간에 따라 4시간까지는 급격히 증가하였으며, 그 이후는 거의 최고값을 나타내었다. 그러나 10시간 후에는 감소하는 경향을 나타내었다. 또 환원력 값도 4시간까지는 급격히 증가하였으며, 그 이후는 완만하게 증가를 보이다가 10시간 경과 후에 감소하였다. 탈아세틸화물의 GlcN 생성은 가수분해

시간에 따라 완만하게 증가하는 경향을 보였다. 한편 이때의 키틴분해물중 올리고당의 키틴에 대한 생성량변화를 그림 4에 나타내었다. 키틴분해물의 생성량은 4시간에서 최대였으며, 이때 키틴올리고당의 생성량도 최대였다. 그러나 그 이후 키틴분해물의 생성량은 변화하지 않았지만 키틴올리고당의 3~6당(GlcNAc)<sub>3</sub>~(GlcNAc)<sub>6</sub>이 서서히 감소하여 GlcNAc와 2당(GlcNAc)<sub>2</sub>이 증가하였다. 이것은 생성된 올리고당이 가수분해를 받아 단당과 이당으로 분해되었다고 생각되며, 이로 인하여 환원력의 완만한 증가가 일어난 것으로 판단되었다.

이상의 결과로부터 40°C에서의 키틴의 최적가수분해시간은 다음과 같이 생각된다. (GlcNAc)<sub>5</sub>, (GlcNAc)<sub>6</sub>의 효율적 생산을 목적으로 한다면 약 2시간, (GlcNAc)<sub>3</sub>, (GlcNAc)<sub>4</sub>라면 약 4시간, 그리고 GlcNAc, (GlcNAc)<sub>2</sub>라면 약 7시간이다.

② 활성탄 칼럼에 의한 키틴올리고당 혼합물의 제조

키틴의 염산가수분해물로부터 (GlcNAc)<sub>2</sub>~(GlcNAc)<sub>6</sub>의 올리고당 혼합물을 얻기 위해서 종래부터 사용되고 있는 활성탄 칼럼에 의한 방법을 시도되었다. 이 방법은 활성탄이 올리고당을 특이적으로 흡착하여 단당과 산의 중화에 의해 생성된 염류를 흡착하지 않는 특성을 이용한 것이다. 흡착된 올리고당의 용출에는 에탄올을 사용한다.

[실 험]

키틴 50g에 250g의 진한 염산을 가하여 앞서 기술한 바와 같이 각각 40°C에서 1.5, 2.0, 2.5, 3.0시간, 30°C에서 2.0, 4.0, 6.0시간 분해한 후 중화 및 여과를 행하였다. 각각 여액을 활성탄 칼럼(4.4×100 cm, 활성탄 : 셀라이트=1 : 1)에 통과하여 올리고당을 흡착시켰다. 칼럼을 5l의 증류수를 사용하여 세정한 후 올리고당을 6l의 50%에탄올로 용출시켰다. 용출액은 감압농축으로 에탄올을 제거한 후 이온교환 수지 칼럼(4.5×30cm, Amberite 1R 120B(H<sup>+</sup>) : 5×30cm, Amberite 1RA 400B(OH<sup>-</sup>)=1 : 1)에 걸여 유출액을 감압농축 및 동결건조하여 올리고당 분말을 얻었다.

<결 과>

표 2(a)에 40°C에서 가수분해하여 얻어진 올리고당의 수율(대 키틴중량)을 나타내었다. 활성탄 칼럼에 의한 올리고당의 회수는 그림 4와 같은 경향을 나타내었다. 가수분해시간이 길어짐에 따라 올리고당의 수율은 높게 되어 (GlcNAc)<sub>5</sub>, (GlcNAc)<sub>3</sub> 등 중합도가 낮은 올리고당이 증가하였다. 그러나 (GlcNAc)<sub>5</sub>, (GlcNAc)<sub>6</sub> 등 중합도가 높은 올리고당은 증가후 감소하는 경향을 보였다. 중합도가 높은 올리고당을 생산하는데는 40°C에서 2시간 가수분해가 최적조건이었다. 또 30°C에서 가수분해한 경우에는 6시간에서 같은 정도의 결과를 얻었다(표 2(6)).

표 2. 가수분해에 의한 키틴올리고당의 수율

(a) 40°C

반응시간(hr)	수 율 (%)					계
	(GlcNAc) <sub>2</sub>	(GlcNAc) <sub>3</sub>	(GlcNAc) <sub>4</sub>	(GlcNAc) <sub>5</sub>	(GlcNAc) <sub>6</sub>	
1.5	5.3	6.4	6.3	5.5	3.9	27.4
2.0	7.1	8.2	8.0	6.9	4.9	35.1
2.5	9.9	10.0	8.2	5.2	3.4	36.7
3.0	12.0	10.7	7.9	5.2	2.2	38.0

(b) 30°C

반응시간(h)	수 율 (%)					
	(GlcNAc) <sub>2</sub>	(GlcNAc) <sub>3</sub>	(GlcNAc) <sub>4</sub>	(GlcNAc) <sub>5</sub>	(GlcNAc) <sub>6</sub>	계
2.0	1.0	1.5	1.6	1.6	0.7	6.4
4.0	2.4	2.6	2.6	3.1	2.8	13.5
6.0	6.4	8.4	8.7	8.6	4.0	36.1

③ 활성탄 칼럼에 의한 키틴 올리고당의 분리

올리고당 혼합물로부터 각각 (GlcNAc)<sub>2</sub> ~ (GlcNAc)<sub>6</sub>의 올리고당의 분리에 대하여 검토하였다.

활성탄 칼럼에 흡착시킨 올리고당은 에탄올의 농도 기울기에 의해 차례로 용출할 수 있다.

[실 험]

40°C에서 3시간 가수분해에 의해 얻어진 올리고당 혼합물 10g을 200ml의 증류수로 용해하여 활성탄 칼럼 (4.4×100cm, 활성탄:셀라이트=1:1)에 흘려 올리고당을 흡착시켰다. 칼럼을 5ℓ의 증류수를 사용하여 세정한 후 올리고당을 6ℓ의 0→30% 에탄올 직선농도 기울기에 의해 (GlcNAc)<sub>2</sub>~(GlcNAc)<sub>6</sub>의 중합도에 따른 상당획분을 차례로 용출시켰다. 올리고당 검출은 아세틸기에 유래하는 210nm의 흡광도를 측정하였다. 각각의 획분을 감압농축 및 동결건조하여 올리고당의 분말을 얻었다.

<결 과>

그림 5에 분리결과를 나타내었다. 또 올리고당 혼합물 10g으로부터의 수량(收量)을 (GlcNAc)<sub>2</sub> 1.2g, (GlcNAc)<sub>3</sub> 1.9g, (GlcNAc)<sub>4</sub> 1.6g, (GlcNAc)<sub>5</sub> 0.8g, (GlcNAc)<sub>6</sub> 0.3g이었다.

올리고당의 순도는 HPLC로 분리한 결과, 80~95%이었으며 중합도가 높을수록 수율은 감소되는 경향이였다. 이것들은 겔여과 또는 분취용 HPLC로 고순도의 올리고당으로서 조제될 수 있다. 활성탄 칼럼에 의한 방법은 올리고당의 간편한 분리 방법으로서 적합하였다.

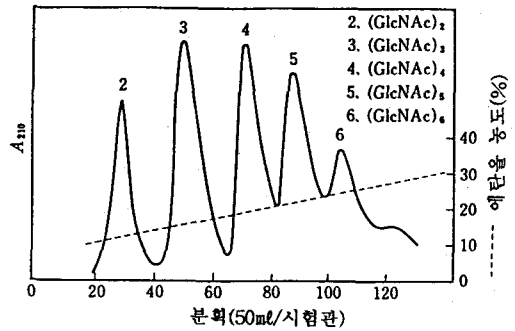


그림 5. 활성탄 칼럼에 의한 키틴올리고당의 분리

④ 이온교환막 전기투석 탈염법에 의한 키틴올리고당의 생산

키틴 가수분해액에서 올리고당을 회수하는 데는 중화에 의해 생성된 다량의 염과 생성된 탈아세틸화물의 제거가 필요하게 된다. 활성탄 칼럼에 의한 방법은 활성탄에 올리고당의 흡착량이 적고, 올리고당의 용출에 다량의 에탄올을 필요로 하는 점 등, 경제적인 문제가 있다고 생각된다. 또 이온교환 수지칼럼을 사용하여 생성된 염과 탈아세틸화물의 제거는 가능하지만 다량의 염 제거가 필요하다는 점에서 설비가 대형화되어야 한다. 이같은 점에서 효율적 생산을 목적으로 키틴 가수분해액에서 올리고당의 회수를 이온교환막 전기투석장치에 의한 탈염으로 검토하였다.

[실 험]

키틴 500g에 2.5kg의 진한 염산을 가하여 교반하면서 40°C에서 3시간 15분 동안 분해시켰다. 분해액은 3ℓ의 증류수로 희석한



다음, 25% 수산화나트륨 용액을 가하여 중화하였다. 다음에 셀라이트 300g 및 활성탄 10g을 가한 후 여과하여 키틴분해 여과액 7ℓ를 얻었다. 분해여과액의 탈염은 양이온 교환막, 음이온 교환막의 10쌍의 막으로 구성된 이온교환막 전기투석장치(YS-2-10행)를 사용하였다. 탈염조(4ℓ 용량)에는 키틴분해여액을 넣고 농축조와 전해액조에 5% 식염수 4ℓ를 사용하여 유속 3ℓ/min로 순환시키면서 전기투석하였다. 전기투석 후 용액은 이온교환수지 칼럼 (4.5×50cm, Amberlite IR 120B (H<sup>+</sup>):Amberlite IRA 400B (OH<sup>-</sup>)=1:1)에 통과시켜 얻어진 유출액을 농축한 다음 동결건조하였다. 염분

측정은 염화물이온을 Mohr법으로 측정하여 염화나트륨으로서 산출하였다.

### 〈결 과〉

키틴분해 여과액에는 키틴올리고당, GlcNAc 외에 염화나트륨, 초산나트륨, GlcN 등이 함유되어 있다. 이들 이온물질의 제거에 이온교환막 전기투석장치를 사용하였다. 표 3에 이온교환막 전기투석 장치의 작동조건과 키틴분해여액 중 염분의 시간에 따른 변화를 나타내었다. 염분은 경과시간과 더불어 저하하여 4시간 후에는 0.6%가 되었다.

표 3. 이온교환막 전기투석 장치에 의한 탈염 조건

시간(hr)	작동조건			가수분해 생성물		
	전압(V)	전류(A)	NaCl(%)	pH	용량(ml)	온도(°C)
0	8.3	8.0	15.5	3.9	3393	19.0
0.5	8.3	8.5	14.3	4.2	3276	21.0
1.0	8.0	8.5	12.7	4.3	3089	24.0
1.5	8.0	8.6	11.1	4.4	2902	26.0
2.0	8.0	8.6	9.0	4.4	2621	28.0
2.5	8.0	8.6	7.3	4.4	2410	29.0
3.0	8.2	8.0	5.2	4.5	2153	27.5
3.5	8.5	7.4	2.9	4.6	1919	29.0
4.0	9.4	5.5	0.6	4.8	1681	30.0

표 4. 이온교환막 전기투석 탈염법에 의해 생산된 키틴올리고당의 조성

올리고당	조성(%)	수율*(%)
GlcNAc	38.6	21.3
(GlcNAc) <sub>2</sub>	21.0	11.6
(GlcNAc) <sub>3</sub>	16.6	9.1
(GlcNAc) <sub>4</sub>	12.2	6.7
(GlcNAc) <sub>5</sub>	7.9	4.4
(GlcNAc) <sub>6</sub>	3.7	2.0

(주) ※ 키틴중량에 대한 수율로서 산출

이때 키틴 분해 여과액량도 서서히 감소하여 초기의 약 1/2량까지 농축시켰다. 또 경과시간과 더불어 pH의 완만한 상승 및 2시간까지는 약간의 온도상승이 일어났다. 한편 작동조건에 있어서는 탈염이 진행됨에 따라 3시간 이후는 급격하게 전류값이 저하되었다.

다음에 건조된 키틴분해물 중 소량의 염분을 완전히 제거하기 위해서 이온교환수지 칼럼을 사용하여 정제하였다. 최종적으로 얻어진 키틴분해물의 조성을 HPLC로 조사한 결과, 표 4에 나타낸 바와 같이 (GlcNAc)<sub>2</sub>~(GlcNAc)<sub>6</sub>의 올리고당 외에 가수분해에 의해 다량으로 생성된 GlcNAc가 회수되었다. 또 건조물 수량은 255g이었으며, 키틴으로 부터의 수율은 51%였다. 이온교환막 전기투석장치를 사용한 키틴올리고당 생산은 종래의 활성탄 칼럼에 의한 방법에서는 회수되지 않았던 GlcNAc를 함유하고 있었으며 키틴올리고당을 간편하게 대량생산이 가능하여 공업적 생산법으로 적합하다고 생각된다.

## 2) 키틴산 올리고당의 제조

키틴산 올리고당의 효율적 생산을 목적으로 종래보다 고온에서의 단시간 분해에 의한 키틴산 올리고당의 생산성에 대하여 조사하였다. 또 얻어진 키틴산 올리고당의 용해도를 밝혀 그 성질을 이용한 키틴산 올리고당의 분리정제법에 대하여 검토하였다.

### ① 키틴산의 가수분해

키틴 올리고당과 마찬가지로 목적하는 중합도를 가진 키틴산 올리고당을 효율적으로

얻기 위해서는 가수분해조건을 정확하게 설정할 필요가 있다. 여기서 가수분해는 10mesh 정도로 분쇄한 박편상의 키틴산을 80°C의 진한 염산을 사용하여 분해하였다.

### [실험]

키틴산 200g에 2ℓ의 진한 염산을 가하여 교반하면서 80°C에서 분해하였다. 가수분해액을 1, 2, 4, 6, 8 시간 후에 200ml씩 취하여 같은 양의 증류수를 가한 다음, 불용물을 원심분리로 제거하였다. 얻어진 상등액에 활성탄을 가하여 탈색한 후 감압농축 건조하여 키틴산 분해물을 얻었다. 가수분해를 1~8시간 한 다음 분해액을 농축하여 염산을 제거한 후 200ml의 양이온 교환수지 칼럼(Dowe×50w×4(H+))에 흡착시켜 0→4.0M의 염산농도 기울기에 의해 각각의 키틴산 올리고당을 분리하여 키틴산으로 부터의 수율을 조사하였다.

### <결과>

80°C의 가수분해에서는 표 5에 나타낸 바와 같이 키틴산은 서서히 분해되어 단시간에 올리고당의 생성되었다. 중합도가 높은 올리고당은 가수분해 시간과 더불어 감소하였다. 즉 6시간 이상의 가수분해에서는 올리고당 수율이 현저히 저하하여 단당(GlcN)의 비율이 50%이상을 차지하였다. 또 (GlcNAc)<sub>2</sub>, (GlcNAc)<sub>3</sub>의 올리고당은 비교적 높은 수율로 얻을 수 있었지만 (GlcNAc)<sub>4</sub> 이상의 올리고당은 6시간 이상의 가수분해에서는 상당히 수율이 낮아지는 경향을 보였다.

표 5. 80°C 가수분해에 있어서 키틴산 올리고당의 수율

반응시간(hr)	수						계
	GlcNAc	(GlcNAc) <sub>2</sub>	(GlcNAc) <sub>3</sub>	(GlcNAc) <sub>4</sub>	(GlcNAc) <sub>5</sub>	(GlcNAc) <sub>6</sub>	
1.0	12.8	13.9	12.4	2.6	2.5	2.3	46.5
2.0	20.8	16.6	13.0	3.2	2.5	1.4	57.5
4.0	24.3	15.3	11.3	3.0	2.3	—	56.2
6.0	50.8	10.9	6.2	0.9	—	—	68.8
8.0	66.7	4.3	—	—	—	—	71.0

이들 결과로부터 (GlcN)<sub>2</sub>~(GlcN)<sub>6</sub>의 일련의 올리고당을 얻기 위한 최적 가수분해 시간은 1시간으로 충분하며, 또 키토산 올리고당의 최대수율이 얻어진 것은 1~2시간인 것을 알 수 있다. 본법은 사용하는 염산량이 적고 더구나 종래의 방법에 비교하여 상당히 단시간에 할 수 있는 이점이 있기 때문에 올리고당의 생산에 충분히 이용할 수 있다고 생각된다.

② 키토산 올리고당의 용해성

키토산의 가수분해물 중에는 키토산 올리고당 외에 많은 단당(GlcN)이 함유되어 있다. 다음의 이온교환수지칼럼을 사용한 올리고당의 분리공정에서는 단당이 많을 수록 올리고당의 부하량(負荷量)이 적게 되며, 또 올리고당의 분리에도 악영향을 미치는 등의 문제가 있다. 여기서는 키토산의 가수분해물로부터 단당을 간편하게 제거할 수 있는 방법에 대하여 검토하였다. 표 6에 GlcN~(GlcN)<sub>6</sub>의 메탄올과 물에 대한 용해도를 조사한 결과를 나타내었다.

표 6. 키토산 올리고당의 용해도

올리고당	용 해 도 (%)	
	메 탄 올	물
GlcN	0.4	37
(GlcN) <sub>2</sub>	5.4	190
(GlcN) <sub>3</sub>	37.0	177
(GlcN) <sub>4</sub>	45.0	158
(GlcN) <sub>5</sub>	4.6	86
(GlcN) <sub>6</sub>	1.7	68

단당 및 키토산 올리고당은 물에 대해 각각 37% 및 68% 이상의 높은 용해도를 나타내었다. 특히, (GlcN)<sub>2</sub>~(GlcN)<sub>4</sub>는 현저히 높은 용해성을 나타내어 점성이 높은 용액으로 되었다. 한편, 유기용매에 대해서는 에탄올, 프로판올, 부탄올, 피리딘, 초산에틸, 아세톤 등에는 거의 녹지 않았지만, 메탄올에서 용해성을 나타내었다. 메탄올에 대해서는 GlcN에 비해 (GlcN)<sub>2</sub>~(GlcN)<sub>6</sub>쪽이 높은 용해도를 나타내었다.

이와 같이 단당(monomer)이 메탄올에 대해 비교적 용해하기 어렵기 때문에 이 성질을 이용하여 GlcN을 선택적으로 제거한 다음 이온교환수지 칼럼으로 올리고당의 분리정제를 시도하였다.

③ 이온 교환 수지 칼럼에 의한 키토산 올리고당의 분리

[실 험]

키토산 750g을 7.5ℓ의 진한 염산을 사용하여 80℃에서 1시간 가수분해하였다. 반응 후 7.5ℓ의 증류수를 가하여 이 분해액의 불용물을 원심분리로 제거하여 상층액에 활성탄을 가하여 탈색시킨 후 감압농축 건조하였다. 이 분해물에 메탄올 6.5ℓ를 가하여 실온에서 2시간 교반한 다음 흡입여과로 불용물을 제거하고 그 여과액을 감압농축 건조하였다. 여기서 메탄올의 용해분리에 의해 300g의 키토산 분해물을 얻었다. 다음에 이 분해물(300g)을 이온교환수지(Dower 50W 4(H<sup>+</sup>)) 칼럼(8 100cm)에 흡착시켰다. 키토산 올리고당은 1.1, 1.9, 2.6, 3.1, 3.7, 4.1M의 염산으로 단계적으로 용출시켰으며, 검출은 닌히드린으로 발색시켜 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 각각의획분을 농축한 후 건조하였다.

(결 과)

분리결과를 그림 6에 나타내었다. 메탄올로 단당을 선택적으로 제거함으로써 올리고당의 분리는 현저하게 개선되어 7당 이상이라 생각되는 올리고당도 생성되었다. 또 이때의 올리고당 수량 및 키토산으로부터의 수율을 표 7에 나타내었다. 본 법에서는 이온교환수지 칼럼보다 더 많은 양의 키토산 올리고당을 분리할 수 있어 한 번 조작으로 대량의 올리고당의 분리 회수가 가능하다.

표 7. 키토산 올리고당의 수량 및 수율

올리고당	수율(g)	(%)
GlcN	21.0	2.8
(GlcN) <sub>2</sub>	59.3	7.9
(GlcN) <sub>3</sub>	89.3	11.9
(GlcN) <sub>4</sub>	25.8	3.4
(GlcN) <sub>5</sub>	15.2	2.0
(GlcN) <sub>6</sub>	9.4	1.3

(주) 키토산 중량을 기본으로 산출

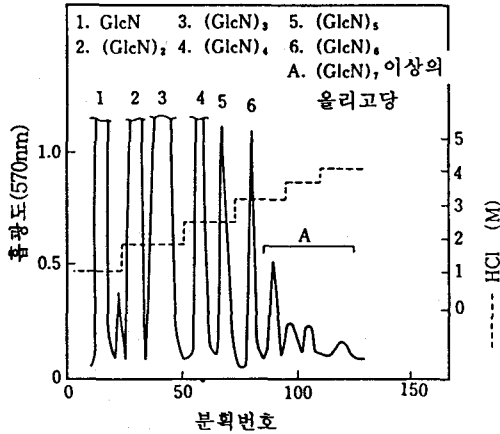


그림 6. 이온교환수지 칼럼에 의한 키토산 올리고당의 분리

### 3. 키틴 및 키토산 올리고당의 효소적 제조법

#### 1) 효소에 의한 키틴 올리고당의 제조

키틴, 키토산 분해효소는 세균, 방선균, 곰팡이 등 미생물에 널리 분포하여 주로 원형질체(protoplast) 조제에 이용되고 있다. 그림 7에 그 관련효소를 나타내었다. 키틴 분해효소로는 키틴나제(chitinase)와  $\beta$ -N-아세틸 글루코사미나제(N-acetyl- $\beta$ -glucosaminase)가 관여한다. 미생물이 생산하는 키틴나제는 거의 세포내효소(endoenzyme)로 키틴의  $\beta$ -1,4결합을 임의로 가수분해하며, 또 올리고당에 대해서는 2당 단위로 가수분해하는 것이 많고, 최종산물로서 2당의 N-아세틸 키토비오스가 기대된다. 지금까지 3당, 4당, 5당 등 올리고당을 특이적으로 생산하는 키틴나제는 발견되지 않고 있다. 또  $\beta$ -N-아세틸 글루코사미나제는 키틴 올리고당 및 N-아세틸 글루코사민을 유리시키므로 키틴 올리고당의 생산에는 부적당하다. 그렇지만 대부분의 미생물은 키틴나제와  $\beta$ -N-아세틸 글루코사미나제를 생산하여 이들 효소에 의한 키틴 가수분해생산물은 단당류의 N-아세틸 글루코사민으로 되는 경우가 많다.

현재 키틴 올리고당 제조법으로서는 호열성 미생물에 의한 N-아세틸 키토비오스의 생산과 키틴나제, 라이소자임을 사용한 당

전이반응에 의한 고중합도의 올리고당 생산이 보고되어 있다<sup>30)</sup>.

여기서는 호열세균 중에 함유되어 있는 키틴분해효소를 이용하여 키틴으로부터 디-N-아세틸 키토비오즈(GlcNAc)<sub>2</sub>의 미생물 생산법, 키틴분해효소인 키틴나제와 라이소자임의 당사슬 연장반응을 이용한 중합도가 낮은 기질로부터 중합도가 높은 키토 올리고당의 합성법 또는 라이소자임의 당전이 반응을 이용한 비당부분(aglycon)에 p-니트로페닐기를 가진 키토올리고당 유도체의 합성법을 소개한다.

#### ① 디-N-아세틸 키토비오즈

滝口와 島原은 당초 증온성 세균 *Vibrio anguillarum* E-388을 사용한 키틴분해에 의한(GlcNAc)<sub>2</sub>의 제조법을 보고하여 종래의 산분해법에 비해 수율 및 선택성에서 우수하였다고 하였다<sup>31)</sup>. 그렇지만 이 방법은 배양일수가 16일간이라는 긴 시간이 소요되는 결점이 있다. 따라서 호열세균 *Bacillus licheniformis* X-7u를 사용함으로써 배양시간을 대폭으로 단축할 수 있다. 이 경우의 배양액으로부터의 (GlcNAc)<sub>2</sub>의 회수 방법은 아래에 기술한 활성탄 칼럼에서의 분리법<sup>32)</sup>과 배양액의 농축액에 무수초산과 피리딘을 가해 (GlcNAc)<sub>2</sub>를 옥타초산유도체로 변환하여 클로르포름으로 추출, 농축하여 실리카겔 칼럼크로마토그래피로 분리하는 방법이 있다<sup>33)</sup>.

#### [실 험]

이온교환수지 1l 당 콜로이드 키틴 15g, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 2g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12H<sub>2</sub>O 3.4g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g, NaCl 0.5g, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.5g, CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 0.1g, 효모엑기스 0.5g의 배지(pH 7.0)에 호열성 키틴분해세균 *B. licheniformis* X-7u의 초발균 농도가 4×10<sup>6</sup> cells/ml 되도록 접종하여 50°C에서 회전 진동하면서 배양(5cm, 150rpm) 하였다. 배양 3.5일 째에 (GlcNAc)<sub>2</sub>이 배양액에 9.8kg/l 로 축적되었고, (GlcNAc)<sub>3</sub>도 0.2g/l 로 소량 함유되어 있었다. 위에 기술한 조건하에서 4일간 배양한 (GlcNAc)<sub>2</sub>농도 9.5g/l 의 배양액 100 ml를 사용하여 2당을 분리하였다. 배양액을 원심분리에 의해 균체 및 잔존 키틴을 제거

한 후 그 상등액을 한외여과(Amicon PM 10, 분획분자량 10,000)를 하였다. 이 액을 활성탄 칼럼(2.2 30cm)에 걸어(GlcNAc)<sub>2</sub>를 흡착시켜 이온교환수로 충분히 칼럼을 세정

한 다음 10% 에탄올로(GlcNAc)<sub>2</sub>를 회수하였다. 이 용출획분을 농축건조하면 백색결정 0.75g이 얻어졌다. 배양액으로부터의 (GlcNAc)<sub>2</sub>의 회수율은 79%였다.

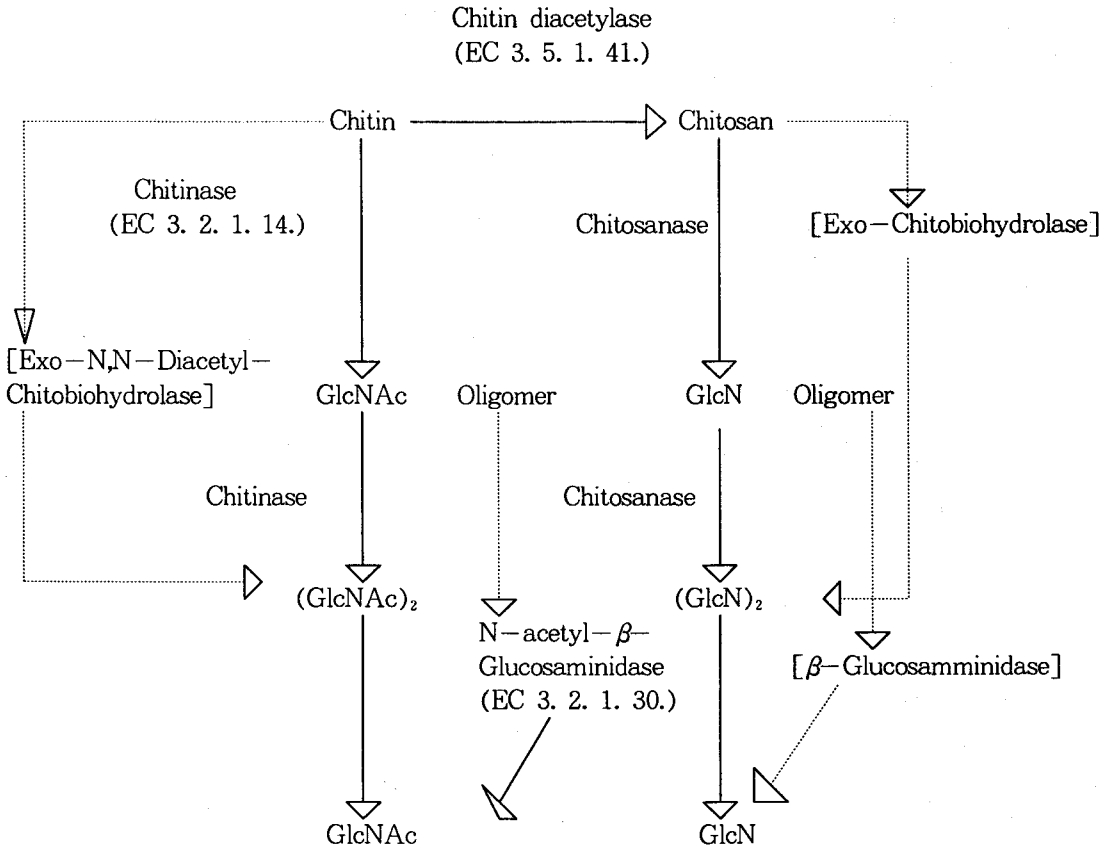


그림 7. 키틴·키토산의 분해효소(점선은 예상되는 분해경로, [ ]는 분해효소)

② 키틴가수분해효소(chitinase)에 의한 핵사-N-아세틸 키토핵사오스의 합성  
*Nocardia orientalis* 또는 *Trichoderma reesei* 유래의 키틴가수분해효소를 인위적인 제어 하에 기질 (GlcNAc)<sub>4</sub>와 반응시키면 이 당 사슬 연장반응에 의해 핵사-N-아세틸 키 토핵사오스(GlcNAc)<sub>6</sub>를 형성한다. 여기서는 *N. orientalis* 유래의 미생물 효소를 이용한 방법을 소개한다<sup>34)</sup>

[실험]

테트라-N-아세틸 키토테트라오스 (GlcNAc)<sub>4</sub> 200mg을 20% 황산암모늄을 함유한

50mM 초산완충액(pH 5.5) 4ml에 용해하였다. 이 용액에 *N. orientalis* 유래의 키틴분해효소 0.8U를 가하여 40℃에서 24시간 방치하였다(효소합성 : 콜로이달 키틴 1ml에 적당량의 효소액과 0.2M 초산완충액 (pH5.5)를 가하여 전량을 2ml로 하여 660nm의 흡광도가 1.5로 되도록 조제하여 40℃에서 10분간 진탕반응을 하였다). 반응액은 시간경과에 따라 백색으로 변하면서 곧 침전을 생성하였다. 생긴 침전을 원심분리에 의해 모아 20% 황산암모늄 5ml로 세정하였다. 이 침전을 5ml의 물에 용해한 후 Bio Gel P-

4(2.6 95cm, 200~400mesh) 칼럼에 걸쳐 3 ml 분취하면서 겔여과를 하였다.

용출위치의 최초에 출연하는 주 피크(획분: 83~92)를 분획하여 농축, 동결건조하여 49mg의 (GlcNAc)<sub>6</sub>을 얻었다. 이것은 기질당 전환율이 34%였다.

끓여 반응을 정지시키고 원심분리하여 불용물을 제거하였다. 상등액 1ml에 샤프스 시약 3ml를 가하여 15분간 끓인 후 급냉하여 흡광도 420nm에서 측정하였다. 효소합성 1U는 1mmol의 N-아세틸글루코사민 당량의 환원력을 갖는 효소량으로 정의하였다.

③ 라이소자임에 의한 헥사-N-아세틸 키토헥사오스와 헵타-N-아세틸 키토헥타오스의 합성

키틴분해효소에 의한 (GlcNAc)<sub>4</sub>로부터 (GlcNAc)<sub>6</sub>으로의 합성반응은 이당 사슬연장에 지나지 않는다. 여기서 난백 라이소자임을 사용하여 보다 저중합도 기질로부터 당사슬 연장반응을 이용한 고중합도 올리고당 (GlcNAc)<sub>6</sub> 및 헵타-N-아세틸키토헥타오스(GlcNAc)<sub>7</sub>의 조제법을 소개한다<sup>36)</sup>.

[실 험]

(GlcNAc)<sub>2</sub> 200mg을 30% 황산암모늄을 함유한 0.1% 초산완충액(pH 4.0) 2ml에 용해하고, 이 용액에 효소원으로서 6회 결정을 반복한 시판 난백 라이소자임 20mg을 가하여 70°C에서 8시간 반응시켰다. 투명한 반응액은 반응진행에 따라 서서히 백색으로 변하면서 침전을 생성하였으며, 용기를 거꾸로 해도 반응액은 움직이지 않았다. 침전을 원심분리한 후 상층부를 분별하여 침전을 50% 메탄올 5ml로 세정하였다. 같은 조작을 다시 2회 반복한 다음 이 침전을 어름 용액속에서 자주 냉각하면서 물 20ml를 가하여 용해하였다. 불용물을 원심분리하여 제거하고, 그 상층액을 탈염장치로 탈염, 그리고 농축동결건조하여 F-1(42mg)을 얻었다. 이 획분을 고속액체 크로마토그래피로 분석하면 주성분이 (GlcNAc)<sub>6</sub>와 (GlcNAc)<sub>7</sub>의 물비가 3:2로 되는 고중합도 올리고당이었다. F-1을 9ml에 녹여 이 용액의 1/3을 Bio-gel·P-4칼럼에 걸쳐 겔

여과를 하였다. 이 조작을 3회 반복하였다. 그림 7에 나타난 바와 같이 응축순서에 따라 (GlcNAc)<sub>7</sub>과 (GlcNAc)<sub>6</sub>에 해당하는 두 개의 주 피크를 획분하여 각각 13mg과 19mg을 얻었다. 이 반응은 우선적으로 불용화침전시킬수 있기 때문에 이 같은 고중합 올리고당을 함유한 획분을 얻는데는 상당히 효율 좋은 방법이다. 이 경우 30% 황산암모늄 첨가는, 6, 7당의 생성효율에 현저하게 영향을 주어 그 생성량은 무첨가의 그것에 비교하여 약 6배에 달했다(그림 9).

④ p-니트로페닐·펜타-N-아세틸-β-키토펜타오시드

현재 라이소자임의 활성측정은 *Micrococcus luteus*의 건조균체를 기질로 하여 그 용균작용을 이용하여 탁도법에 의해 행해지고 있다. 그러나 이방법은 기질의 균체품질이 일정하지 않은 점과 반응시 이온강도, pH에 크게 영향을 미치므로 그 활성 측정값의 재현성이 좋지 않은 결점이 있다. 이 같은 점에서 최근 구조가 명확한 라이소자임의 활성측정 기질의 개발목적으로서 용융법에 의해 발색단으로서 p-니트로페닐기를 도입한 p-니트로페닐·펜타-N-아세틸-β-키토펜타오시드(PNP-(GlcNAc)<sub>5</sub>)가 화학적으로 합성되어 그 기질로서의 유용성이 나타나고 있다. 여기서는 효소에 의한 PNP-(GlcNAc)<sub>5</sub>의 간편하면서도 효율적인 합성법을 소개한다<sup>36) 37)</sup>.

[실 험]

펜타-N-아세틸키토펜타오스(GlcNAc)<sub>5</sub> 1g을 0.125M로 초산완충액(pH 6.0) 80ml에 p-니트로페닐-β-N-아세틸글루코사미니드(PNP-GlcNAc) 3.97g를 디메틸설폭시드(DMSO) 120ml에 각각 용해시켰다. 두액을 혼합한 후 난백 라이소자임 33mg을 가하여 30°C에서 150시간 방치시켰다. 이 경우의 (GlcNAc)<sub>5</sub>와 PNP-GlcNAc의 물비는 1:12였으며, 기질농도는 2.5%였다. 반응액은 시간이 지남에 따라 백색으로 변하면서 곧 침전이 생겼다. 반응 종료후 생긴 침전을 원심분리에 의해 모았다. 이 침전을 고속액체 크로마토그래피로 분석하면 PNP-(GlcNAc)<sub>5</sub>와 PNP-(GlcNAc)<sub>4</sub>의 물비는

약 10:1이었다. 이 소량의 부생성물 PNP-(GlcNAc)<sub>4</sub>을 제거할 목적으로 침전을 원심분리에 의해 순차적으로 메탄올 200ml, 50%메탄올 200ml로 4회, 끝으로 메탄올 200ml로 충분히 세정하였다. 이와같이 세정한 침전물을 데시케이터에서 건조한 후 0.52g을 얻었다. 이것을 고속액체 크로마토그래피로 분석하면 순도가 약 98%인 PNP-(GlcNAc)<sub>5</sub>을 얻을 수 있다. 수율은 공여체 기질 (GlcNAc)<sub>5</sub>당 46%였다. 이와 같이 하여 얻어진 PNP-(GlcNAc)<sub>5</sub>는 라이소자임의 활성측정 기질로서 표준품의 그것과 감도에 있어서 조금도 손색이 없었다. 이와

같이 이 반응은 목적 화합물을 직접 생성물로서 석출시켜 크로마토그래피 조작을 거치지 않고 세정조작만으로 고순도의 표품을 얻을 수 있다. 여기서 PNP-(GlcNAc)<sub>5</sub>를 특이적으로 또한 효율적으로 합성하는 데는 온도를 가능한 낮게, DMSO농도는 가능한 높게, 공여체에 대한 수용체 기질의 몰비도 가능한 높게 하는 것이 바람직하다. 이 경우의 DMSO첨가는 수용체기질 PNP-GlcNAc의 고농도에서의 반응을 보증할 뿐만 아니라 목적 화합물인 PNP-(GlcNAc)<sub>5</sub>의 효율적 생산에 상당히 유용한 용매이다.

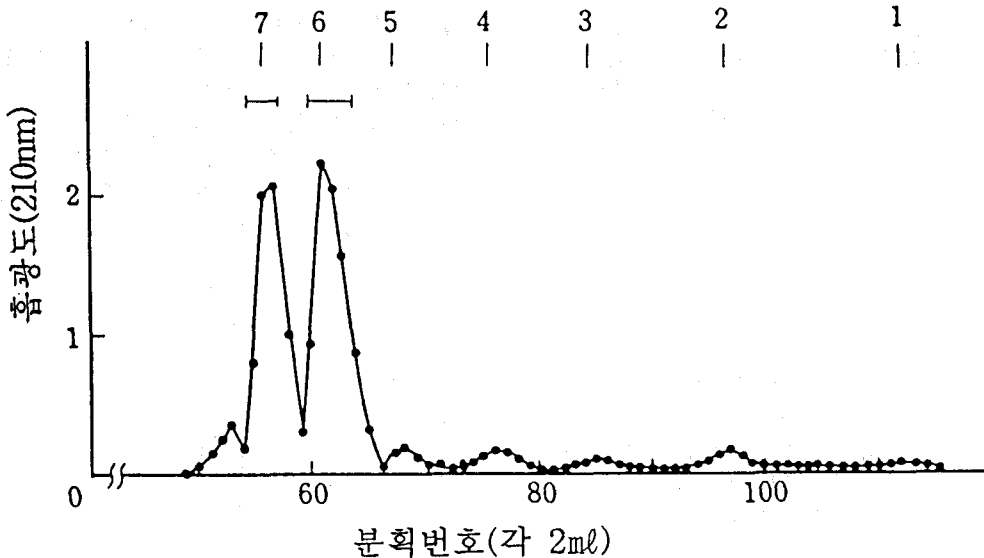


그림 8. 라이소자임 작용에 의한 당전이 생성물의 분석과 겔여과에 의한 분리  
Bio-Gel P-4 칼럼, 2×100cm(50°C로 보온)  
용출: 증류수, 유속: 12ml/hr  
1~7: 표준 키토올리고당의 각 중합도에 따른 용출위치

## 2) 키토산 올리고당의 제조

키토산의 효소분해는 주로 키토산분해효소(chitosanase)가 관여하고 있다. 키토산분해효소는 여러가지 미생물에서 발견되어 이것을 사용하여 키토산올리고당의 효소분해가 시도되고 있다. 일반적으로 엔도형 키토산 올리고당의 효소에 의한 분해는 단당의 생성이 거의 없고 키토산 올리고당의 제조

에 유효하다. 이 키토산분해효소를 사용한 키토산으로부터 D-글루코사민(GlcN)의 β-(1-4)결합한 중합도 2~5의 일련의 올리고당 (GlcN)<sub>2</sub>-(GlcN)<sub>5</sub>의 제조법이 井爪와 大室에 의해 보고되었다<sup>36)</sup>. 여기서는 坂井 등의 방법에 근거한 효소분해에 의한 키토산 올리고당 제조법을 소개한다<sup>39)</sup>.

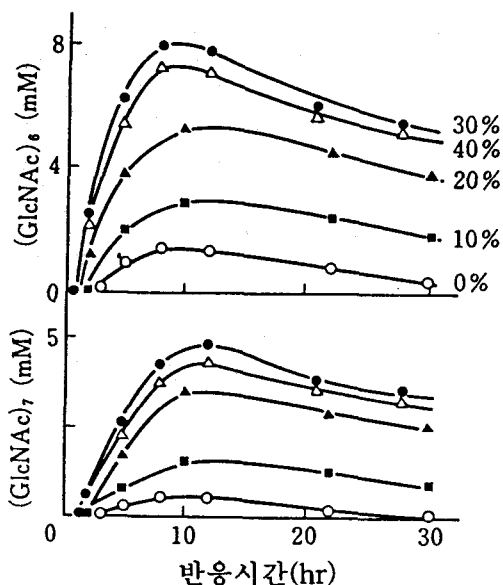


그림 9. 라이소자임 당전이반응에 있어서 (GlcNAc)<sub>6</sub>과 (GlcNAc)<sub>7</sub>의 생성효율에 미치는 황산암모늄 농도의 영향

고속액체크로마토그래피에 의한 분석조건

YMC 칼럼 A-014(SIL) 칼럼,  $\phi$  6mm $\times$ 30cm

이동상: 아세트니트릴-증류수(70:30), 유속: 0.8ml/min

검출기: UV(SPD-6A)

#### [실험]

100% 탈아세틸화 키토산 14g을 물 1.3l에 현탁시켜 여기에 초산을 가하여 용해시킨 후 이 용액을 pH 5.4로 조절하였다. 이와 같이 조절한 키토산 초산염 용액 400ml에 Bacillus R-4가 생산하는 키토산 분해효소를 12U 가하여(활성측정: 0.5% 키토산을 함유한 0.067M 초산완충액 0.5ml에 적당량 효소액을 가하여 전량을 1ml로 하여 40 $^{\circ}$ C, 10분간 반응시켰다. 반응액을 5분간 끓인 후 Rondle Morgan법<sup>40</sup>으로 유리 아미노당을 정량하였다. 1U는 1분간에 1 $\mu$ mol의 글루코사민에 해당하는 아미노당을 생성한 효소량으로 하였다) 40 $^{\circ}$ C에서 48시간 천천

히 교반하면서 반응을 시킨 다음, 반응액을 0.1N HCl로 pH 2.7로 조제, 농축을 하였다. 이 농축액에 메탄올 200ml을 가하여 생성된 침전물을 원심분리에 의해 제거시켰다. 이 상층액에 아세톤을 가하여 침전을 생성시켜 이것을 원심분리에 의해 모아 이 침전물을 아세톤으로 세정한 후 감압건조하여 키토산 올리고당 혼합물로서 5.3g을 얻었다. 키토산 올리고당 혼합물 3g을 50ml 물에 용해하여 이 용액을 Dowex 50W $\times$ 4칼럼(H<sup>+</sup>form, 2.2 $\times$ 30cm)에 흘렸다. 칼럼을 100ml의 물로 세정한 후 흡착부를 0(600ml) $\sim$ 4.5N HCl(600ml)의 직선 농도기울기에 의해 용출시켰다. 그림 10에 이때의 용출패턴을 나타내었다. 주 피크 3회분을 각각 농축하여 아세톤 침전시킨 후 건조시켰다. 용출순서로 F-1에서 (GlcN)<sub>4</sub> HCl; 0.411g (13.7% : 키토산 올리고당 혼합물로부터의 수율), F-2로부터 (GlcN)<sub>3</sub> HCl; 0.981g (32.7%), F-3부터 (GlcN)<sub>2</sub> HCl; 0.920g(30.7%)을 얻었다.

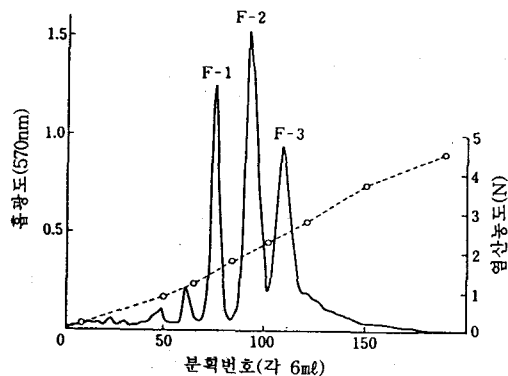


그림 10. 이온교환크로마토그래피에 의한 키토산올리고당의 분리

Dowex 50W $\times$ 4 칼럼, 2.2 $\times$ 30cm

용출액: 0 $\sim$ 4.5N 염산에 의한 직선농도구배

검출: 닌히드린법

#### 3) 키토산 가수분해효소를 이용한 한외여과막 반응기에서 키토산 올리고당의 연속적 생산

키틴 키토산을 가수분해하여 얻은 올리고당은 항종양활성, 면역 부활활성 및 항균활



성이 매우 높은 것으로 밝혀졌다. 그러나 현재 대부분의 이들 올리고당은 산이나 알칼리에 의한 화학적 가수분해로 생산되고 있어, 의약품이나 식품으로 이용시 안전성에 문제가 되고 있다. 따라서 이들의 효소적 가수분해를 위하여 많은 연구자들에 의해 미생물 유래의 키틴 가수분해효소나 키토산 가수분해효소가 생산되고 있으나 효소가 너무 고가(高價)이기 때문에 올리고당의 대량 생산에 이용되지 못하고 있는 실정이다. 그러나 한외여과막 효소반응기를 키토산올리고당의 효소적 생산에 이용하게 되면 고가의 효소를 계속하여 재사용할 수 있으므로 연속적 대량 생산이 가능할 것으로 기대된다. 따라서 여기서는 金<sup>4)</sup>에 의해서 시도된 키토산을 기질로 하여 한외여과막 반응기에서 *Bacillus pumilus* BN-262 유래의 키토산 가수분해효소를 이용하여 키토산 올리고당을 연속적으로 생산하기 위한 조건을

검토한 결과를 간단히 소개한다.

[실 험]

키토산 1%(w/v) 용액 500ml를 막반응기에 넣고 *Bacillus pumilus* BN-262 유래 키토산 가수분해효소를 25Unit(기질용액 1ml 당 효소 0.05 Unit) 되도록 첨가하여 3시간 동안 반응시킨 후, 분자량 한계 3 KDa인 한외여과막을 통하여 재순환시킨다. 이때 최적 반응온도별 유출속도, 효소의 안정성을 검토하였다.

(결 과)

한외여과막 반응기(그림 11)는 키토산 올리고당의 연속적 생산에서 1% 키토산 용액 500ml에 키토산 가수분해효소 25Unit를 첨가하여 반응시켰을 경우, 반응온도 45℃에서 분당 4ml의 유출속도로 한외여과막 반응기를 재순환시켰을 때, 비교적 고차올리고당인 (GlcN)<sub>3</sub>에서 (GlcN)<sub>6</sub>이 약 95% 함유되어 있었다.

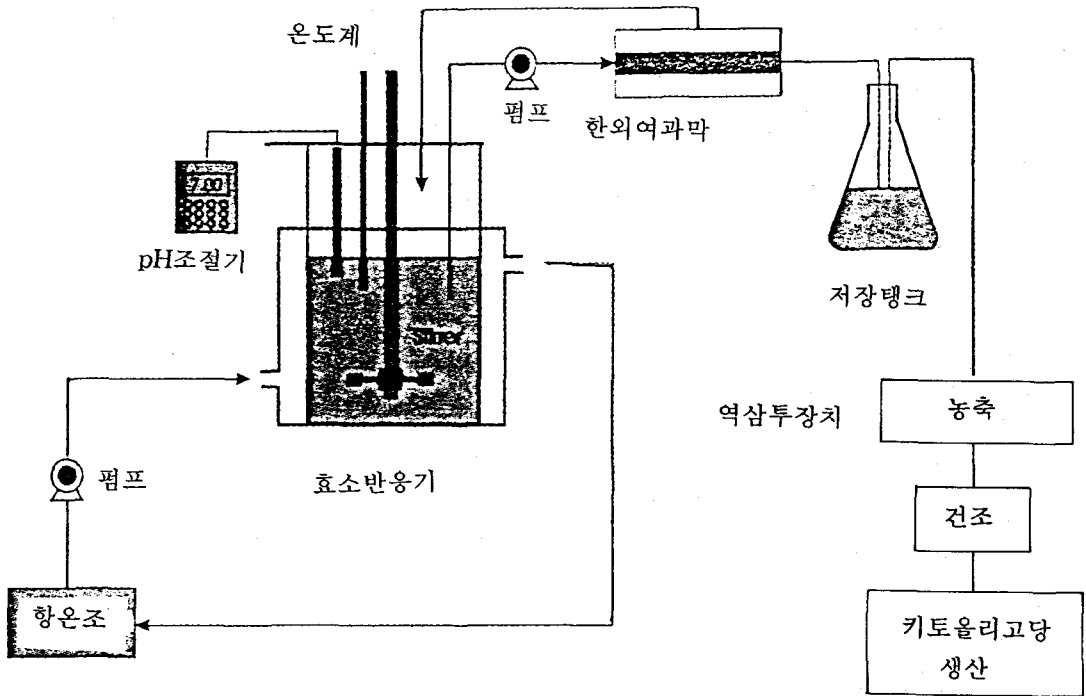


그림 11. 한외여과막 반응기에서 키토올리고당의 연속적 생산 과정

또한 효소의 안정성에 대한 검토에서 기질공급은 5회내로 하였을 때 효소의 활성은 좀더 높게 유지되었으나 그 이후로 활성은 감소하였다. 그러나 11회내에서 기질을 공급하여도 급격한 효소활성의 저하는 나타나지 않았으며, 이때 초기 효소활성의 약 80%를 유지하였다(그림 12).

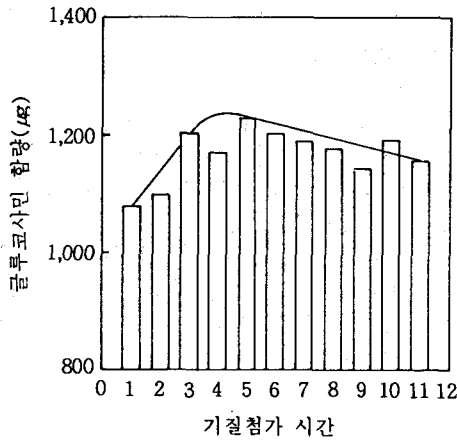


그림 12. 연속식 한외여과막 반응기에서 1% 키토산용액의 첨가에 따른 키토산분해효소의 분해활성

#### 4. 상품개발 동향<sup>42~45)</sup>

##### 1) 응집제

키토산은 아미노기를 가지고 있으므로 수용액 중에서는 양이온성의 전하를 가지는 고분자 전해질이 된다. 음전하의 현탁입자에 흡착시켜 하전을 중화하면 입자간에 가교된 블록이 형성되어 고체·액체가 분리된다.

대부분은 배수처리용으로, 특히 활성오니법의 잉여 오니의 탈수에 많이 이용되고 있다. 1980년에 음이온성 합성고분자 응집제(폴리아크릴산 나트륨 등)를 이용한 이단(二段) 응집법이 개발되어 탈수율이 향상됨에 따라 수요가 급격하게 늘었다. 폐수처리 이외에는 과즙, 와인을 비롯한 각종 식품제조공정에서 청징제, 여과 보조제, 침강제로서도 이용되고 있다. 또한 미생물 균체 단백질 등의 유용물 분리회수에도 이용되고 있다.

##### 2) 의료용 재료

의료재료로서의 응용은 키틴 또는 키토산 분말에 의한 창상 치료의 연구로부터 시작되었다. 현재 셀룰로오스나 키틴, 그 외의 바이오 소재 등과 같은 의료재료에 있어서는 생체 적합성이 필수 조건으로 되어 있다. 키틴을 사용한 성형체는 생체내의 효소 라이소자임으로 분해되는 생체 친화성을 가지고 있다. 상처의 치유 촉진효과를 가지는 혈청 단백질 등과 같은 혈액성분의 흡착능이 높아 지혈 효과도 보이는 등 종래의 재료에 비하여 의료업계의 관심이 높아지고 있다. 현재는 소화기 외과나 정형외과 수술에 사용되는 흡수성 봉합사나 열상, 피부결손증(인공피부)을 중심으로 제품이 개발되고 있다.

피복재료는 나일론 포(布)와 실리콘 시트의 복합체나 롤리우레탄막 등의 합성재료 또는 키틴·키토산을 비롯한 돼지나 소의 껍질 등의 생체재료가 있다. 현재 일본의 피복재 시장은 30억엔으로 추측되고 있으며, 현재는 가격이 낮은 합성재료가 대부분의 시장을 차지하고 있다. 그러나 치료중에 용해하거나 치유 완료 후 처치가 좋지 않은 결점이 있다. 한편 키틴으로 만들어진 피복재는 생체 적합성이 아니라 합성재료의 결점을 극복하였고, 앞으로 가격이 같은 수준으로 되면 현재의 시장이 그대로 키틴·키토산 피복재로 바뀔 가능성이 있다. 더욱이 면역의 이상(異常)증가가 한 원인이 되어 있는 아토피성 피부염이나 일반 피부병에 대해서도 면역이나 세균 억제 효과가 있는 키토산 제품이 사용될 가능성이 있다.

##### 3) 건강식품

키틴·키토산을 식품 소재로 한 것은 소형의 새우나 게가 전병 등의 스낵과자에 첨가된 것이다. 또한 식품 첨가물 리스트의 점도 증가 안정제로 사용하고 있고, 호이프크림이나 아이스크림 등의 보형성 개선에 도움이 되고 있다. 그러나 실제로 제품화된 것은 키토산을 식물섬유의 하나로서 첨가한 건강식품으로 시장이 형성되고 있다.

키토산의 식물섬유로서의 기능은 콜레스테롤 저하작용이나 혈압강하, 장내 유효균

증식능, 면역력의 향상, 중금속의 배설 등이 있는데 건강식품으로서의 품질을 뒷받침하는 기준이 없는 조잡한 제품들이 많이 출하되고 있다. 이에 일본 건강·영양식품협회는 1995년 6월 1일부터, 우리나라는 1996년 7월부터 키토산 가공식품 및 키토산 함유식품의 규격기준을 채택하였다. 이 기준에 의해 키토산의 점도나 탈아세틸화도, 중금속 함유량 등이 상세하게 규정되어 업체측은 이런 점을 체크하는 것이 필요하게 되었다. 이에 따라 절반에 가까운 기준치 이하의 키토산 건강식품이 시장으로부터 소멸되어 감과 동시에 품질이 보증된 남은 제품은 수요량이 신장되고 있다.

건강식품으로서의 키토산·키토산은 소비자 가격이 상당히 높기 때문에 식품용 수요 전체가 대폭적으로 감소하든가 또는 품질보증된 제품에 따라 수용 전체가 지금 이상의 성장률을 달성하는가는 당분간 시장동향을 관찰할 필요가 있다.

특정보건용 식품은 건강에 대해서 어떻게 유효한가를 표시할 수 있는 식품으로서 키토라이프의 「키토캡」과 「키토자임」, 보령제약의 「키토올리고」, 종근당의 「칼스키」, 웅진월드의 「웅진야토엑기스」엘지(LG)의 「키토산」등이 상품화 되었고, 일본은 明治제과의 「프럭토올리고당」을 비롯하여 「칼슘과라」나 「올리고CC」등이 유명하다.

현재 일본의 특정보건용 식품 시장은 400억엔으로 4,000억엔 시장인 건강식품의 1/10로서 그 규모는 적지만 구체적인 효능을 표시할 수 있는 점 때문에 업계나 판매업자에 있어서 어떤 건강식품보다 매력적이다. 이러한 가능성을 기대하고 투자의욕이 왕성한 대기업의 특수보건용 식품으로의 신청이 두드러지게 증가하고 있다.

#### 4) 기타 용도

키토산을 이용한 식품은 인간뿐만 아니라 가축이나 애완동물에 응용되기도 하고 대장균 등의 유해균에 대한 항균력이 강하기 때문에 젖소의 유방염 대책에도 이용되

고 있다. 더욱이 키토산은 식물의 성장촉진이나 항균성이 있어 농작물이나 골프장의 잔디 등에 이용되고 있다. 또한 서방성 담체로서 종자의 코팅에도 사용된다.

키토산·키토산의 보습성, 피막 형성능을 사용하여 화장품으로의 응용 개발도 활발하다. 키토산염을 모발화장품에 첨가함에 따라 모발의 감촉성, 윤기, 빗질성이 향상되기 때문에 샴푸에 첨가된다. 또한 키토산의 수용성 유도체인 카르복시메틸키토산(CM-키토산)은 보습성이 높아 피부에 대한 안전성도 높다.

키토산을 원료로 한 마이크로비드는 다공질 구조를 가지고 500~3000Å의 벌집모양의 구멍을 다수 가지고 있다. 용도로서 고정화효소 담체, 친화성 크로마토그래피의 담체 등이 있다.

종래 배양세포의 세포내 구조를 관찰할 때 세포를 난백, 젤라틴, 한천 등으로 고정화하였는데 키토산을 이용함에 따라 용해하지 않고 조작성을 향상시킬 수가 있다.

저분자화한 키토산을 이용한 핵산제거제는 단백질과 핵산의 분리에 유용하기 때문에 생리활성물질 등과 같은 유용물질의 정제에 이용되고 있다. 키토산의 흡수성을 이용한 흡수성 섬유도 개발되고 있다. 또한 항균성을 가지고 있기 때문에 스포츠용 의류, 속옷, 이불카바 등 서서히 응용 범위를 넓히고 있으며, 액정, 도료, 염료, 의약·농약 중간체 등의 분야에서 활발하게 연구 개발되고 있다.

#### 5. 키토산·키토산 유도체의 이용

키토산·키토산은 반응성이 높은 관능기를 가지고 있기 때문에 화학적 변형에 의해 그 특성을 유도해내려는 시도가 활발하다. 특히 글리콜키토산, CM-키토산, 황산화 키토산 등 난용성의 키토산을 수용성으로 하는 유도체 개발이 많다. 또한 키토산을 가수분해하여 얻는 단당, 키토올리고당, 키토산 올리고당이 연구 개발되고 있다. 일본에서의 키토산·키토산 유도체의 생산량은 표 8과 같다.

표 8. 일본에서의 키틴·키토산 유도체의 생산량(1995년)

(단위 : 톤, %)

품 명	수량	구성비	용 도
D-글루코사민	20	36.4	의약, 항균제용
N-아세틸글루코사민	20	63.4	식품소재용
키틴올리고당	6	10.9	시약용
CM-키틴	5	9.1	화장품용
키토산 올리고당	4	7.3	식품소재
합 계	55	100.0	

CM-키틴은 키틴과 모노클로로초산을 알칼리 조건하에서 반응시켜 제조한다. 정제한 키틴 분말을 55% 수산화나트륨 수용액 (0.2% 도데실 황산나트륨을 포함함) 중 에서 처리하여 알칼리 키틴으로 한다.

알칼리 키틴에 이소프로필알코올 또는 2-프로판올을 가하고 실온에서 모노클로로 초산과 반응시키면 카르복시메틸키틴나트륨염을 얻을 수 있다. 이것을 염산으로 처리하면 카르복시메틸키틴이 얻어진다. CM-키틴(Na염)은 일본의 一丸파르코스(株)가 상품명 「키틴리퀴드」로서 판매하고 있고 가격은 kg당 6,000엔이다. 이 제품은 보습성이 높아 히알루론산에 필적하기 때문에 보습제로서 화장품에 이용되고 있다.

이 외에도 정전기 방지제, 모발 보호작용 등으로 이용되고 있고 내열성, pH 안정성이 우수하며 더욱이 히알루론산의 수분의 1의 가격이라는 점 때문에 앞으로 이용량은 더욱 증대할 것으로 생각된다. 또한 면역증강 작용도 있기 때문에 그 용도가 더욱 확대될 것으로 기대되고 있다.

키틴을 염산으로 완전 가수분해하면 단당의 D-글루코사민 염산염이 얻어진다. D-글루코사민은 현재 일본에서의 수요는 없지만 수출용으로 생산하고 있는데, 유럽에서는 소염제로서, 미국에서는 건강식품으로서 판매되고 있으며, 북미에서는 N-아세틸글루코사민의 형태로 건강식품으로서 판매되고 있다. 일본의 太平洋化學工業과 燒津水

産化學工業이 수출을 하고 있다. D-글루코사민 염산염은 뼈(骨) 및 관절성 질환용으로 이용되었는데 현재는 사용되고 있지 않다.

키틴올리고당은 2~7개의 N-아세틸글루코사민이  $\beta$ -1,4의 형태로 결합한 올리고당이고, 키틴을 진한 염산 등으로 부분가수분해하여 얻는다. 미생물이나 키틴가수분해효소 등의 효소를 이용하여 가수분해하는 방법도 있지만 염산으로 가수분해하는 방법이 제조단가가 낮기 때문에 주류를 이루고 있다. 특히 6량체가 강한 면역증강작용을 가지기 때문에 의약품으로서의 이용이 기대되고 있다. 또한 생체 친화성이 높기 때문에 합성 약품에의 이용도 검토되고 있다. 현재 키틴올리고당의 생리활성은 동물 실험 단계에 있고, 燒津水産化學工業이 생산하고 있으며, 가격은 일반급으로 kg당 약 6만엔이다.

키토산 올리고당은 2~10개의 D-글루코사민이  $\beta$ -1,4로 결합한 올리고당이고, 키토산을 진한 염산으로 부분가수분해하여 얻어지지만, 현재 일부는 미생물의 키토산가수분해효소로 가수분해하고 있다. 키토산올리고당은 燒津水産化學工業이 생산하고 생화학공업에서 HPLC로 분리하여 올리고당 시약으로 판매하고 있다. 그림 13에 키틴·키토산 관련물질을 나타내었다.

## 6. 수요동향

### 1) 1995년의 시장규모

국내에서의 키토산 생산량은 응집제용 250톤, 식품소재용 50톤, 기타 농업용 등으로 전체 약 350톤으로 추정된다.

일본의 키틴·키토산의 생산량은 820톤으로 추정되는데, 중국과 한국으로부터의 수입이 약 400톤이고 미국, 유럽에의 수출은 약 200톤으로서 일본의 키틴·키토산 수요량은 약 1,020톤으로 추정된다. 일본 수요 1,020톤의 내역은 응집제 49.5%, 식품소재 19.8%, 항균제 14.9%, 의료재료 5.9%, 효소담체 5.0%로 되어 있다.

1995년의 수출은 200톤이지만 식품소재로서의 수출이 100톤이었다. 이 가운데 유도체화된 것으로 N-아세틸글루코사민이 20톤, D-글루코사민이 10톤이다. 그밖에

화장품용으로 50톤, 의료재료로 40톤, D-글루코사민이 의료용으로 10톤 수출되고 있다. 한편 수입은 응집제용 250톤, 식품소

재용 100톤, 항균제용 50톤, 의약용 10톤으로 구성되어 있다(표 9).

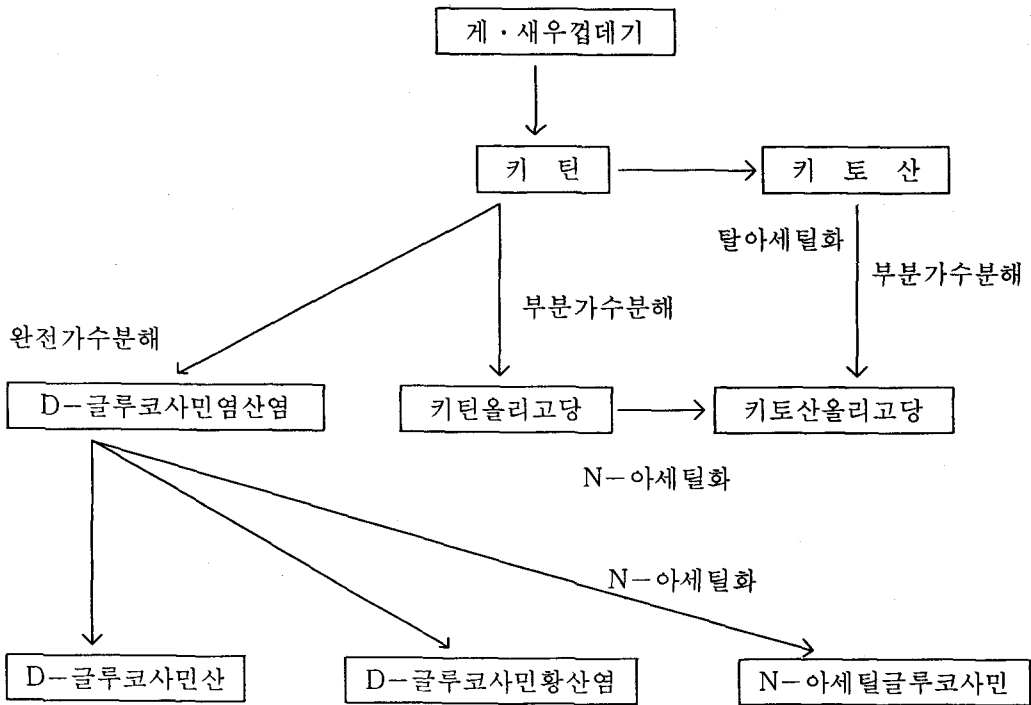


그림 13. 키틴·키토산 관련물질

표 9. 일본의 키틴·키토산의 용도별 시장규모(1995년)

(단위 : 톤, %)

용도	생산량	수출	수입	국내수요	비고
응집제	250	0	250	500	
식품소재	200	100	100	200	주로 건강식품용; 키틴 올리고당 6톤 생산, N-아세틸글루코사민 20톤, D-글루코사민 10톤 수출
의료재료	100	40	0	60	
항균제	100	0	50	150	
화장품	70	50	0	20	CM-키틴 5톤 생산
효소담체	50	0	0	50	
의약	10	10	10	10	D-글루코사민으로서 전량수출
농업, 섬유, 시약 등	30	0	0	30	키토산 올리고당 시약 4톤생산
합계	810	200	400	1,020	

키틴·키토산 시장을 금액으로 추정하는 것은 곤란하지만 출하단가로 추정하면 1995년의 일본 출하금액은 44억엔이고 수요금액은 41억엔 정도로 보인다. 수량으로 응집제용은 출하단가로 전체의 30%, 일본 수요금액으로는 50% 정도를 차지하는데 경합 제품인 계면활성제형 고분자응집제의 가격이 급격하게 저하하고 있어 키틴·키토산형 응집제는 최근 경쟁력을 잃고 수요가 감소하고 있다. 한편 의료재료용이나 식품소재용, 화장품용 등은 고부가가치 제품이기 때문에 판매가격은 고가이다. 그 결과 일본 수요는 식품소재용이 17.2억엔, 의료재료용 6.8억엔으로 수요의 대부분을 차지하고 있고, 응집제용 5.1억엔, 항균제용 2.7억엔, 화장품용 1.5억엔, 효소담체용 1억엔으로 되어 있다. 또한 농업용, 섬유용, 시약 등 기타가 6.5억엔이다.

1996년 이후에 의료재료, 식품소재용이 수출 확대에 힘입어 시장을 리드할 것으로 예상된다.

## 2) 용도별 시장 동향

### i) 응집제용

폐수처리의 응집제용 시장은 1995년 250톤이 생산되었다. 수출은 없고 수입이 250톤이었으며, 일본 수요는 500톤으로 추정된다. 최근에 저가격의 합성계 고분자 응집제로의 수요는 감소하고 있다. 현재 키틴·키토산의 응집제는 1kg당 1,000~1,200엔이지만 고분자계의 응집제의 소비자 가격은 1kg당 1,000엔 이하인 것도 있어 판매 가격은 약간 높은 편이다. 단 설당의 제조공정에서 사용되는 응집제로서의 수요는 늘고 있다.

### ii) 건강식품·특정보건용 식품

식품 소재용의 시장은 생산이 200톤, 수출입이 합쳐서 100톤으로 일본 수요는 200톤으로 추정된다. 식품 소재로서의 수요는 건강식품용을 중심으로 탄탄한 신장율을 나타내고 있다. 최근에는 차와 연제품 등에도 이용되기 시작하였다. 현재 키틴·키토산을 이용한 건강식품의 소비자 가격 기준의 매상고는 300억엔을 넘는 것으로 추정되었다. 또한 건강식품으로서의 용도는 특히 관심의

대상이 되고 있는데, 日本化藥, 카토키치는 1993년 5월에 일본 건강·영양식품협회로부터 특정보건용 식품 신청을 위한 「관여하는 성분」으로서 종합평가서를 발행받았다. 키토산에 대해서는 식품으로서의 규격 기준도 있어 각 업체의 움직임도 활발하다.

산을 사용하지 않고도 물에 녹는 수용성 키토산이 개발됨에 따라 음료에의 응용이 기대되고 있는데 국내에서는 기능성 음료로서 상아제약의 「유」가 상품화되었다.

키토산의 면역증강작용, 콜레스테롤 저하, 혈압저하작용, 아토피성 피부개선 등의 생리활성은 건강식품으로 응용할 수 있는 가능성을 제시하고 있어 키틴·키토산의 건강식품 시장은 앞으로 클로렐라의 600억엔, 로알젤리의 500억엔을 충분히 넘을 것으로 기대된다.

### iii) 의료재료용

의료재료용의 시장은 100톤 정도이며, 수출이 40톤으로 실제 일본 수요는 60톤으로 추정된다.

이 시장에 참가하여 판매실적을 가지고 있는 것은 유니티카 뿐이다. 유니티카는 창상피복재「베스키틴」을 창상피복 시트로서 또는 이비인후과용 스폰지형 인공피부로서 판매하고 있다. 동사는 일본만이 아니라 유럽, 한국에도 시장을 확대하고 있다.

### iv) 키틴·키토산 유도체 이용

대표적인 키틴·키토산 유도체는 D-글루코사민, N-아세틸글루코사민, 카르복시메틸키토산(CM-키토산), 키토산올리고당, 키토산올리고당 등이 있다. 전체 시장은 55톤으로 추정되고 그 중에서 D-글루코사민, N-아세틸글루코사민이 각각 20톤으로 구성비 36.4%로 되어 있다. D-글루코사민, N-아세틸글루코사민 모두 구미에서의 수요가 증대되고 있는 반면, 일본에서는 거의 수요가 없다. 따라서 거의 전량이 구미로 수출되고 있다고 한다.

그 외에 키틴 올리고당, 키토산 올리고당이 각각 6톤, 4톤, CM-키토산이 5톤으로 추정된다. CM-키토산은 특히 화장품 용도를 중심으로 이용되고 있고 부가가치가 높은

점에서도 앞으로 유도체 가운데 신장율이 가장 기대되고 있다. 국내에서는 (주)키토라이프에서 효소를 이용하여 키토산 올리고당을 건강식품용으로 연간 50톤을 생산할 수 있는 시설을 갖추어 생산중에 있으며, 현대화성도 건강식품용, 동물 사료용, 농업용으로 키토산올리고당을 생산하고 있어 앞으로 수출이나 새로운 응용 개발이 기대되고 있다.

## 7. 업계 및 연구 동향

키토산·키토산의 공업생산은 일본수산이 1968년에 계껍데기를 이용하는 키토산·키토산 제조의 파일릿 플랜트를 건설하고 1971년에 자회사인 協和油脂工業이 양산 플랜트를 건설하여 키토산을 공업적으로 생산 개시한 것이 최초이고, 현재에는 약 10개 회사가 생산하고 있다. 주요 업체는 共和테크닉스, 甲陽케미칼, 三樂工業, 片倉치카린, 北海道曹達, 大伸水産, 燒津水産化學工業 등이다.

국내에서 키토산을 생산하는 업체는 (주)신영키토산, (주)금호화성, (주)현대화성, (주)세화산업, (주)영덕키토산, (주)한국키토산, (주)영창Biochemical, (주)이세하이텍 등이다.

키토산·키토산 업체에는 두 제품을 전부 생산하는 곳, 키토산만을 생산하고 키토산업체에 공급하는 곳, 키토산만을 생산하는 곳 등 여러 가지이다. 일반적으로 응집제 생산업체는 키토산, 키토산을 전부 생산하고 식품소재, 의료재료의 키토산 업체는 키토산을 공급받는 경우가 많다.

키토산의 원료는 주로 계껍데기이고 북해도나 鳥取縣 등에서 어획 가공된 계의 폐껍데기가 이용되고 있다. 홍계의 3/4이 어획되는 鳥取縣, 境港市는 입지조건을 갖추고 있어 주변 지역에 제조업체가 집중되어 있다. 그러나 최근에는 중국, 한국으로부터 수입 키토산이 많아 일본산 키토산은 주로 식품소재용, 의료재료용으로 이용되고 있다.

응집제용의 키토산 원료(계 등딱지를 분쇄한 정도의 처리 상태)는 1kg당 약 30엔인 것에 비해 식품소재용, 의료재료용의 키토산

원료는 1kg당 600~800엔이다.

### 1) 片倉치카린

片倉치카린은 키토산의 원료업체로서 共和테크닉스 등의 키토산 업계에 키토산을 공급하고 있다. 동사는 CM-키토산도 생산하고 있고, 생산능력은 키토산, CM-키토산을 합쳐서 연간 1,000톤이다. 片倉치카린의 CM-키토산을 一丸파르코스가 상품화하여 판매하고 있다. CM-키토산은 수용성 키토산으로 주로 화장품에 이용되고 있다.

동사는 창상 피복제의 의료용 분야로 진출하였다. 「우레자크C」라고 하는 이 제품은 키토산을 화학 변형한 N-숙시닐키토산과 저항원성 아테로콜라겐으로 이루어진 복합스폰지 시트로서 항생제인 황산겐타마이신을 함유한 폴리우레탄 필름이 부착된 2중구조로 되어 있는데, 1995년 4월부터 공동개발 기업인 高研을 통해 판매하고 있다.

### 2) 유니티카

유니티카는 키토산을 의료용 재료로서의 응용으로 선두를 달리고 있는 업계로서 키토산 창상 피복 보호제의 보급에 참여하고 있다. 상처의 정도나 치료 부위에 적합한 형태의 제품을 개발하였고 일반적인 외상성 피부결손증용의 「베스키토W」(부직포형)을 비롯하여 비강내나 구강내의 점막 결손증용 「베스키토F」(스폰지형), 외상성 고막공용 「베스키토T」(얇은 막형), 육창 케양용 「베스키토C」(면형) 등이 있다. 현재는 병원에서 사용되는 의료용구로서 판매하고 있으나 앞으로는 약국에서도 취급할 수 있는 밴드 에이드 등 간이형의 반창고 타입의 상품화를 검토하고 있다. 또한 지혈제로 개발하려는 연구도 진행되고 있는데, 지혈제는 소등의 건섬유에서 얻은 콜라겐이 주류였으나 분말 형태이기 때문에 취급하는 데 어려움이 있다. 키토산은 섬유 등의 성형이 가능하여 사용하기 쉽게 되고 지혈작용인 혈소판의 자극이 콜라겐에 비해 높아 지혈 효과가 우수하다.

동사가 개발중인 미섭유상 키토산 지혈제는 일본 후생성으로부터 1992년 10월에 제조승인을 획득하였다. 이것은 키토산의 생체 친

화성을 이용한 제품으로 창상 피복제 「베스 키틴」에 연이어 히트상품으로 주목되고 있다. 또한 鳥根醫科大學과의 공동 연구에 의해 키틴과 항암제 시스플라틴을 조합시켜 항암제의 효과를 높이고, 부작용이 낮은 약물투여시스템「플라키틴」을 개발하였다.

### 3) 共和테크노스

共和테크노스는 키틴·키토산을 이용한 응집제의 최대 생산업체이다. 片倉치카린, 甲陽케미칼 등으로부터 키틴을 공급받아 키토산을 생산하고 있다. 일본의 키틴·키토산 응집제의 생산량은 연간 약 250톤이지만 동사는 약 150톤/년의 생산능력을 가지고 있다. 응집제 외에 항균제로서 연간 수십톤 생산하고 있다.

### 4) 燒津水産化學工業

燒津水産化學工業은 건강식품용 키토산에 주력하고 있고 그 원료는 중국, 한국으로부터 거의 전량을 수입하고 있다. 키틴유도체로서 키틴올리고당, 키토산올리고당을 생산하고 있는 유일한 업체이다. 생산량은 키틴올리고당 6톤/년, 키토산올리고당 4톤/년이지만, 건강식품분야에서의 수요가 급증하기 때문에 앞으로 생산량은 늘어날 것으로 기대하고 있다. 가격은 키틴올리고당 6만엔/kg, 키토산올리고당 15만엔/kg이다. 동사는 이밖에 글루코사민 황산염을 유럽, 미국으로 수출하고 있고 수출량은 연간 약 30톤이며, N-아세틸글루코사민을 북미로 연간 약 20톤 수출하고 있다. 또한 건강식품용 키토산을 적극적으로 확대 판매하고 키틴·키토산의 용도 개발에도 힘을 기울이고 있다.

### 5) 日本化樂

日本化樂은 키토산의 용도 개척의 하나로 서 식품 분야에의 개발에 힘을 기울이고 있다. 동사는 지금까지 식품용으로 정제한 키토산 「키토사민」을 공급하고 있는데, 1995년 건강식품으로서 키토산 가공식품의 규격 기준이 결정된 것을 계기로 건강식품 시장에 본격적으로 참가하고 있다.

또한 이미 키토산의 새로운 식품소재 시

장으로 목표로 하고 있는 특정 보건용식품 분야에의 참여도 시도하고 있다.

### 6) 기타 업체

甲陽케미칼은 소재를 공급하는 한편 식품용 키토산의 판매에 힘을 기울이고 있다. 또한 최근에는 키토산의 낙농분야에 대한 응용으로서 축산용 키토산 「반나미르」를 개발하였다. 一丸파르코스는 CM-키틴외에 수용성 키토산(히드록시프로필키토산)도 취급하고 있다. 四國工業技術研究所는 키틴을 주성분으로 하는 세포벽을 가진 접합균류 R. acetoinus HUT 1219균의 배양에 의한 키토산 생산기술을 개발하고 대량 생산기술에 응용이 기대되고 있다. 식품 용도로는 영양보조식품이나 어묵 등의 연제품이나 다류 등 폭넓게 응용되기 시작하였다.

그러나 한편으로 기린 맥주가 키토산의 대량 섭취에 의해 지질, 비타민 E 뿐만 아니라 미네랄이 배출된다는 것을 발표하여 안일한 대량 섭취를 경고하였다. 또한 鳥取大學과 安佐動物公園은 개, 고양이, 소, 마우스, 너구리에 대량의 면상(綿狀) 키토산을 피하에 투여했을 때 키토산이 개, 너구리에 대해서만 특이적으로 폐렴을 일으킨다고 발표하였다. 따라서 앞으로 식품 용도로서의 키틴·키토산의 안전성 확인이 중요한 과제가 되어 있다.

신규 용도로서 섬유 용도가 개발되어 兼松, 小松精練이 키토산과 콜라겐의 폴리에스테르 신소재 「바이오톤」을 판매하고, 鐘紡이 키토산 배합 섬유소재 「키토콜라a」, 當士紡績이 키토산을 짜넣어 항균 방취효과를 가지는 천연섬유 「키토폴리이」를 판매하고 있다. 더욱이 식물활성제, 배합 사료용 키토산, 키토산 배합 유두 소독제 등 여러 가지 용도로 개발하고 있다.

## 맺 음 말

최근 우리나라에서도 키틴·키토산 및 그 올리고당의 여러 가지 가능성이 밝혀짐에 따라 이에 관한 관심이 높아져 많은 업체에서 관련제품을 개발하려고 많은 노력을 기울이고 있는 실정이다. 이미 키틴·키토산 관련제품들이 시판중에 있으나 아직까지는



이들 상품의 제조기술적인 측면과 품질면에서 여러 가지 문제점이 있는 것으로 판단되어 관련업계에 조금이나마 도움이 되고자 키틴·키토산 및 올리고당의 제조기술과 개발동향에 대하여 관련문헌을 통하여 살펴보았다.

국내에서 제조된 키틴·키토산이 일본으로 수출된 경우, 거의 전량이 공업용 폐수 처리 용도로만 사용되고 있어 아직까지 국내에서 생산된 키틴·키토산 제품의 품질을 인정받지 못하는 실정이다. 그런데도 불구하고 국내에서는 이를 이용한 건강소재의 제품들이 시판되고 있다. 더욱이 우리나라 식품공전에는 키틴·키토산을 효소로 분해시킨 올리고당을 식품첨가물이나 건강식품 소재로서 이용하도록 되어 있으나 거의 대부분이 염산으로 분해시킨 산분해 올리고당이 이용되고 있어 국민건강에 위협을 주고 있다. 앞으로 행정당국의 철두철미한 행정 지도와 관련 업계의 품질향상을 위한 투자와 노력을 기울일 때라 생각된다.

## 8. 참고문헌

- 1) Hackman, R. H. : Austr. J. Biol. Sci., 7, 168(1954)
- 2) Shimahara, K., Y. Takiguchi : Methods in Enzymology, eds. W. A. Wood, S. T. Kellogg, pp.417, AP. New York(1988)
- 3) Foster, A. B., R. H. Hackman : Nature, 180, 40(1957)
- 4) Shimahara, K., Y. Takiguchi, K. Ohkouchi, K. Kitamura, O. Okada : Chitin, Chitosan and Related Engymes, ed. P. J. Zikakis, pp.239, AP. Orlando(1984)
- 5) Brine, C. J., P. R. Austin : Comp. Biochem. Physiol., 70B, 173(1981)
- 6) Horowitz, S. T., S. Roseman, H. J. Blumenthal : J. Am. Chem. Soc., 79, 5046(1957)
- 7) Rigby, G. W. : U. S. Patent 2040879(1986); Chemical Abstract, 30, 4598(1936)
- 8) Moorjani, M. N., V. Achutha, D. I. Khashim : J. Food Sci, Technol., 12, 187(1975)
- 9) 武田道夫, 阿部榮善 : 農水講研報, 11, 339(1962)
- 10) 武田道夫, 膳浦洋 : 農水講研報, 13, 109(1964)
- 11) Herzog, K. H., H. Grossman, M. Reflander : Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem., 356, 1067(1975)
- 12) 滝口泰之, 島原健三 : 醸工, 67, 23(1989)
- 13) 地用正彦, 島原健三 : 日本農藝化學會誌, 67, 23(1989)
- 14) 要田惠輔, 多田知義, 石井茂, 西村紘一郎 : 第5回 キチン キトサン シンポジウム講演予稿集, PP. 72(1991)
- 15) Ogawa, R., S. Tokura : Carbohydr. Polym., 19, 171(1992)
- 16) 大室明, 失吹稔 : キチン キトサン實驗マニュアル, キチン キトサン 研究會編, 技報當出版(1991)
- 17) Kurita, K., T. Sannan, Y. Iwakura : Makromol., Chem., 178, 3197(1977)
- 18) Horton, D., Lineback., D.R. : Methods in Carbohydrate Chemistry, ed. R. L. Whistler, pp. 7403, AP. Orlando(1965)
- 19) Broussignac, P. : Chem. Ind. Genie. Chim., 99, 1241(1968)
- 20) Araki, Y., E. Ito : Eur. J. Biochem., 55, 71(1975)
- 21) 島原健三, 岩崎浩吉 : 旭硝子工業技術獎勵會研究報告, 41, 299(1982)
- 22) White, S. A., P. R. Fanina, I. Fluton : Appl. Environ. Microbiol., 38, 323(1979)
- 23) MaGaharen, W. J., G. A. Perkinson, J. A. Growich, R. A. Leese, G. A. Ellwstad : process Biochem., 19, 88(1984)
- 24) 小林丘, 鍛治佳子, 道原健三. 山南陸徳 : 日本農藝化學會誌, 62, 1471(1988)
- 25) Zilliken, F., G. A. Braun, C. S. Rose, P. Gyorgy : J. Am. Chem. Soc., 77, 1296(1955)
- 26) Barker, S. A., A. B. Foster, M. Stacey, J. M. Webber : J. Chem. Soc., 80, 2218(1958)
- 27) Rupley, J. A. : Biochim. Biophys. Acta. 83, 245(1964)

- 28) Bosso, C., J. Defaye, A. Domard, A. Gabelle, C. Pederson : Carbohydr. Res., 156, 57 (1986)
- 29) Horowitz, S. T., S. Roseman, H. J. Blumenthal : J. Am. Chem. Soc., 79, 5046(1957)
- 30) 港口. 島原 : 日本農藝化學大會講演要旨集, p.500(1986)
- 31) Takiguch, Y., K. Shimahara : Lett. Appl. Microbiol., 6, 129(1988)
- 32) Takiguchi, Y., K. Shimahara : Agric. Biol. Chem., 53, 1537(1989)
- 33) Nishimura, S., H. Kuzuhara, Y. Takiguch, K. Shimahara : Carbohydr. Res., 194, 223 (1989)
- 34) Usui, T., Y. Hayashi : Biochim. Biophys. Acta. 923, 302(1987)
- 35) Usui, T., H. Matsui, K. Isobe : Carbohydr. Res., 203, 65(1990)
- 36) Usui, T., Y. Hayashi, F. Nanjo, Y. Ishido : Biochim. Biophys. Acta, 953, 179 (1988)
- 37) Usui, T., H. Matsui : Agric. Biol. Chem., 53, 383(1989)
- 38) Izume, M., A. Ohtakara : Agric. Biol. Chem., 51, 1189(1987)
- 39) 坂井和男 南條文雄, 確水泰市 : 澱粉科學, 37, 79(1990)
- 40) Morgan, T. J, C. J. M. Randle : Biochem. J., 61, 586(1955)
- 41) 金世權 : 한국 키틴키토산 연구회지, 1, 57(1996)
- 42) Maket of Chitin and Chitosan : Bio Industry, 13, 52(1996)
- 43) 戸倉清 : 高分子, 44, 112(1995)
- 44) Maeda M, Inoue Y, Iwase H and Kifune K. : Encyclopedic handbook of biomaterial and bioengineering, Part A : Materials, Vols. 1 and 2, 1585(1995)
- 45) 이근임 : 산업동향 16, 1(1996)