

Trichoderma viride 및 *Trichoderma reesei* 유래 Cellulase의 키토산 분해 특성

홍상필 · 김동수
한국식품개발연구원

Chitosanolytic Characteristics of Cellulases from *Trichoderma viride* and *Trichoderma reesei*

Sang-Pill Hong and Dong-Soo Kim
Korea Food Research Institute

Abstracts

The chitosanolytic capabilities of cellulases, glucosidases, proteases and commercial enzymes were evaluated, and effective chitosanolytic cellulases from *T. viride*, *T. reesei* and Celluclast, a commercial enzyme from *T. reesei* were characterized. The reaction of cellulase from *T. viride*, *T. reesei* and Celluclast was optimal at pH 5.0 and 45~55°C. Max. chitosanolytic activities of cellulases from both *T. viride* and *T. reesei* were observed at the enzyme/chitosan ratio=0.1 and chitosan concentration=3.0%. For the possible application of commercial Celluclast to chitosan oligosaccharides production, 3%(w/v) chitosan was reacted with 1%(v/v) Celluclast at pH 5.0 and 55°C. The apparent viscosity decreased by 98% within 30 minutes reaction and Max. contents of 50% EtOH solubles were 70% at 15 hrs reaction. Total reducing sugars were also increased with reaction time and maintained approx. 13.5% after 2hrs reaction. In 15 hrs treated chitosan hydrolyzates, various kinds of chitosan oligosaccharides were produced and contents of chitosan hexamer, known for its antitumor activities, were about 8.0%, about 4 times higher values compared with acid hydrolysis method. The results suggested that chitosan oligosaccharides could be produced with low-cost cellulases from *T. reesei*.

Key words: chitosan, cellulase, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*, Celluclast, oligosaccharides

서 론

키토산은 N-acetylglucosamine이 β -1,4 결합한 분자량 100만 이상의 천연 고분자 다당으로 갑각류, 곤충류, 균류 등에 의해서 연간 약 1,000억톤 이상 생산되는 것으로 추산되고 있는 귀중한 생물자원으로 이의 탈아세틸화물인 키토산(poly- β -1,4-D-glucosamine)과 함께 새로운 신소재로서 주목받고 있다⁽¹⁻³⁾.

키토산 및 키토산은 독성이 없고 흡착성, 보습성, 유화성, 생분해성을 나타내며 항균작용, 제산작용과 케양억제작용, 콜레스테롤 및 triglyceride를 낮추는 약리작용, 장내 유용세균의 생장촉진, 항종양활성, 식물세포의 활성화작용, 면역부활작용 등 다양한 기능을 나타

내는 것으로 알려지고 있다^(2,9). 따라서 키토산 및 키토산은 건강지향성 식품, 의약품, 식품보존제, 사료 및 토양개량제 등 향후 다양한 분야에 응용이 가능한 새로운 고부가가치 생물자원으로서 기대되고 있다^(2,3).

한편, 키토산은 불용성이고 키토산의 경우는 산에만 녹고 물이나 alcohol에 녹지 않으며 키토산 용액은 점도가 높은 특징이 있다. 또한 키토산은 단백질이 존재하거나 pH가 상승시 응집되는 성질을 보이며 산성에서는 쓰거나 묽은 맛을 나타내는 등 키토산 및 키토산은 물성이나 기호성 등에 제약이 있어서 키토산 및 키토산의 물성개선은 식품 및 의약품 등 관련분야의 응용 측면에서 매우 중요하다^(2,3,10-11).

이와 같은 관점에서 최근 우수한 생리기능성을 가지면서 수용성 혹은 유기용매 등에 용해가 가능하고 안전성이 높은 키토산 및 키토산 올리고당에 대한 관심이 집중되고 있다^(2,3).

Corresponding author: Sang-Pill Hong, Korea Food Research Institute, San 46-1 Baekhyun-dong, Bundang-gu, Songnam-si, Kyonggi-do 463-420, Korea

키틴 및 키토산 올리고당의 생성은 Rupley⁽¹³⁾ 및 Horowitz⁽¹⁴⁾가 보고한 염산분해법이 일반적 방법으로 이용되고 있으며, 최근 Sakai 등⁽¹⁵⁾은 염산분해방법을 개량하여 키틴/키토산 올리고당의 생성수율을 기존의 방법보다 개량한 바 있으나 염산분해방법에서는 단당의 생성량이 많고, 또한 올리고당의 생성수율이 적으며 생성물의 안전성 측면에서도 적합지 않은 것으로 지적되고 있다⁽³⁾.

한편, 키틴 및 키토산 올리고당은 효소적 방법에 의하여 생산이 가능하며 이 방법은 산분해방법보다는 생성물의 안전성이 높고 또한 반응의 조절이 용이한 장점이 있다. 키토산 분해효소는 *Bacillus* 및 *Penicillium* 등에서 생산되는 chitosanase를 들 수 있으나^(10,18) chitosanase는 아직까지 상업적 생산이 이루어지지 못하고 있어 이들 효소를 이용한 키토산 올리고당의 생산은 경제성 면에서 또한 한계가 있는 실정이다. 그러나 최근 Yalpani 등⁽¹⁶⁾과 David 등⁽¹⁷⁾은 상업적으로 이용가능한 glycanase, protease 및 lipase 등이 키토산의 점도를 저하시키며 夜久 등⁽¹⁹⁾은 활성이 강한 cellulase가 키토산도 잘 분해한다고 보고한 바 있어 상업용 효소를 이용한 키토산 올리고당의 경제적 생산가능성이 기대되고 있다.

본 연구에서는 상업적으로 널리 활용되고 있는 각종 효소의 키토산 분해능력을 탐색하였으며 *T. viride*, *T. reesei* 유래의 cellulase 및 상업용 cellulase인 Cel-luclast가 우수한 키토산 분해능력을 보여 이들 효소의 키토산 가수분해 특성을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 시험재료로 사용한 키토산은 상법에 준하여 조제하였다. 즉, 홍게다리부의 껍질을 분쇄한 후 이를 3% 염산으로 3시간 교반하여 탄산칼슘을 제거하였다. 계속해서 증류수로 수차례 수세한 후 5% NaOH로 90°C에서 12시간 처리하여 키틴을 얻었다. 키토산은 키틴을 50% NaOH에서 100°C, 12시간 처리하고 물로 수세하고 건조하였으며 탈아세틸화도가 99% 이상 될 때까지 이상의 공정을 반복하여 조제되었다.

탈아세틸화도 및 키토산의 FT-IR spectrum의 측정

키토산의 탈아세틸화도는 콜로이드 적정법(PVSK법)⁽¹²⁾을 이용하였으며 Robert 등의 방법⁽¹²⁾에 기초한 KBr pellet법을 이용하여 키토산의 FT-IR spectrum

(Jasco사, 일본)을 조사하였다.

키토산의 분자량 측정

Jasco사(일본)의 GPC로 측정하였다.

키토산 올리고당의 TLC 분석

TLC용 Plate는 Merck사의 silica gel을 사용하였으며 용매의 조성은 Isopropyl alcohol : pyridine : acetic acid : water=10 : 6 : 6 : 9로 하였으며⁽¹⁸⁾ 전개가 완료된 plate에 5% ninhydrin액을 분부하여 건조한 후 100°C drying oven에서 1분간 발색시켰다. 표준물질은 glucosamine, chitosan dimer, chitosan trimer, chitosan tetramer, chitosan pentamer, chitosan hexamer (日本生化學工業(社))를 사용하였다.

키토산 올리고당의 HPLC 분석

TSK gel NH₂-60 (250 mm × 4.6 mm) column을 사용하였고 mobile phase는 CH₃CN:H₂O=65:35로 하였으며 유속은 0.8 mL/min으로 하였고 RI로 detection하였다.

키토산 분해효소의 탐색

효소는 일본 생화학공업의 chitinase 3종(*Bac. sp.*, *Str. griseus* 및 *Ser. marcenens*), Sigma사의 hen egg white lysozyme 및 turkey egg white lysozyme, chitosanase (*Bac. sp.*), cellulase 4종(*Pen. funiculosum*, *T. viride*, *T. reesei* 및 *Asp. niger*), β-glucosidase 2종(almond 및 *Caldocellum*), papain, trypsin, Novo사의 상업용 효소 5종(Alcalase, Novozyme, Viscozyme, Ultrazyme, Cel-luclast) 및 국산 Protease를 사용하였다. 효소반응은 0.25% 키토산에 대하여 효소량을 1~10 unit되게 첨가하고 pH를 3.0과 5.0으로 나누어 40°C에서 5시간동안 실시하였으며 반응물에 대하여 TLC를 행한 후, Ninhydrin 법⁽²⁰⁾으로 생성 올리고당을 발색시켜 키토산 분해능력이 있는 효소를 탐색하였다.

키토산 분해물의 점도, 수율 및 환원당의 분석

키토산 및 분해물의 상대점도는 Ostwald 점도계를 이용하여 25°C에서 측정하였으며⁽²⁰⁾ 분해물을 50% ethyl alcohol되게 하여 5,000×g에서 10분간 원심분리한 후 침전물을 상압건조법⁽²⁰⁾으로 정량하여 50% ethyl alcohol 가용성 저분자 키토산의 생성수율을 역산하였다. 키토산의 가수분해에 의하여 생성된 환원당은 3,5-dinitrosalicylic 산(DNS)⁽²¹⁾방법으로 540 nm에서 비색정량하였으며 검량선은 glucosamine (Sigma사)을 이용

하여 작성하였다.

결과 및 고찰

키토산의 IR spectrum, 탈아세틸화도 및 분자량

키토산의 특징은 조제원료 및 조제방법에 따라 다양할 수 있으며, 특히 키토산의 탈아세틸화도와 분자량은 키토산을 이용한 실험결과의 재현성 측면에서 매우 중요하다. 따라서 본 연구에서 조제한 키토산의 특성을 알아보기 위하여 IR spectrum을 조사하였으며 PVSK적정법⁽¹²⁾에 의한 탈아세틸화율 및 GPC법으로 분자량을 측정하였다. Fig. 1에 나타난 바와 같이 본 연구에서 조제한 키토산 및 키토산의 IR spectrum은 Sigma사의 키토산 및 키토산과 각각 유사하게 나타나고 있었

다. 키토산의 경우에는 3447 cm^{-1} (OH stretching), 3264 cm^{-1} (NH stretching), $2878\sim 2890\text{ cm}^{-1}$ (CH stretching), 1652 cm^{-1} (amide-I), 1550 cm^{-1} (amide-II), 1310 cm^{-1} (amide-III) 및 $1020\sim 1070\text{ cm}^{-1}$ (CO stretching)에서 강한 흡수대가 나타나고 있었다. 한편 조제키토산은 조제키토산의 경우와 달리 1652 cm^{-1} (amide-I), 1550 cm^{-1} (amide-II) 및 $1020\sim 1070\text{ cm}^{-1}$ (CO stretching)에서의 흡수 peak가 명확히 관찰되지 않고 있어 키토산에 존재하고 있던 아세틸기가 키토산의 중요한 조제단계인 키토산의 탈아세틸화 과정에서 거의 이탈된 것으로 추정되고 있으며 조제키토산의 탈아세틸화도를 PVSK법⁽¹²⁾으로 측정하였을 경우에는 99%이상으로 나타나고 있었다. 일반적으로 키토산의 탈아세틸화도는 IR법, PVSK적정법 등⁽¹²⁾ 여러 방법이 알려지고 있으나

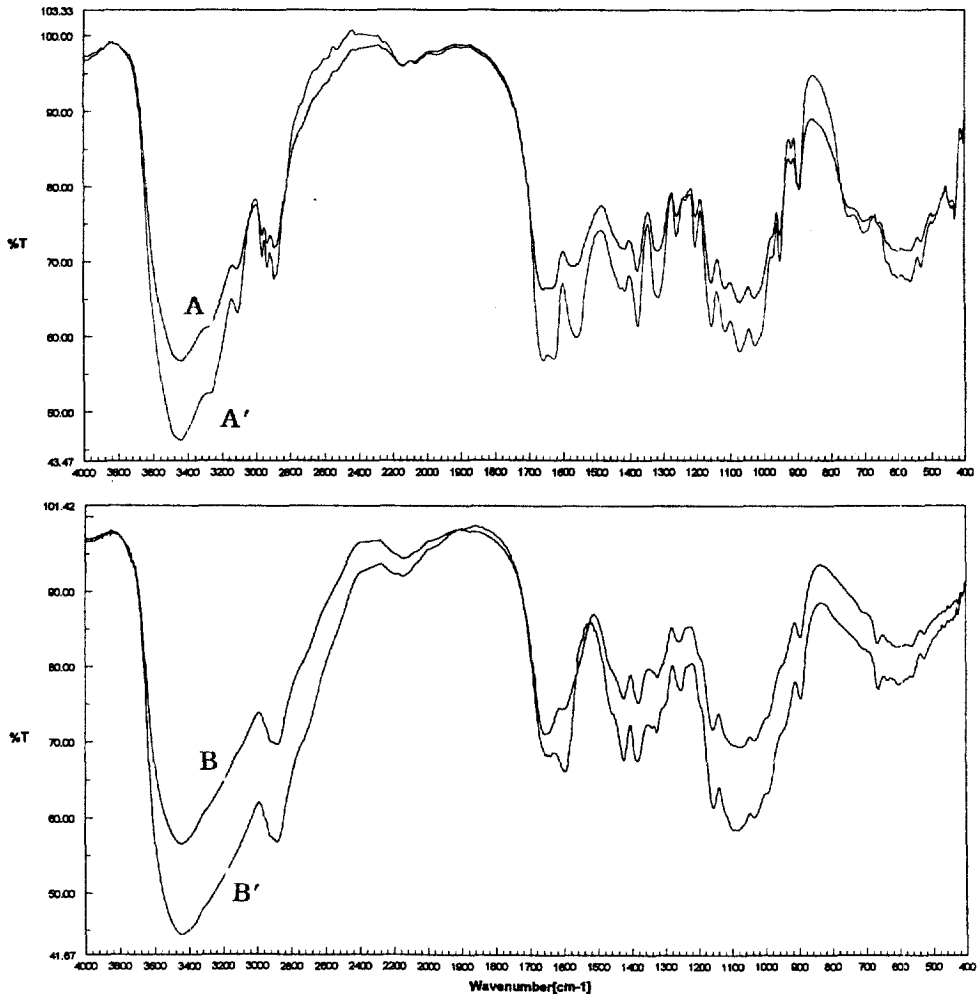


Fig. 1. FT-IR spectra of chitin and chitosan. A: Sigma chitin A': prepared chitin, B: Sigma chitosan B': prepared chitosan

IR법은 정성적인 분석에 유용하며 PVSK 적정법은 정량적인 분석에 유용한 것으로 생각되고 있다. 따라서 본 연구에서 조제한 키토산은 매우 고순도의 키토산인 것으로 생각된다.

한편, GPC에 의한 조제키토산의 분자량을 측정하였을 경우 평균분자량은 293,600으로 비교적 저분자의 키토산임이 확인되었다.

키토산 분해효소의 탐색

효소적 분해법을 통한 키토산 올리고당의 생산을 위해 각종 미생물 유래의 chitosanase에 의한 효소적 생산법이 다양하게 시도된 바 있으며^(10,18) 2~5량체의 키토산 올리고당까지는 비교적 높은 수율로 얻을 수 있고 항종양활성이 높은 것으로 알려진 6량체 키토산 올리고당의 생성수율도 산분해법보다는 약간 높은 편으로 알려지고 있으나 chitosanase류는 아직까지 상업적인 수준으로 생산되지 못하고 있는 실정이다.

한편, 키토산의 구조는 Fig. 2에 나타낸 바와 같이 키틴의 탈아세틸화물로서 C₂ 위치에 아미노기가 있는 것을 제외하고는 cellulose의 구조와 동일한 특징을 보이고 있다. 따라서 키토산은 cellulase류에 의해서도 분해가 가능한 것으로 보고되고 있으며^(16,17) Yalpani 등⁽¹⁶⁾ 및 David 등⁽¹⁷⁾은 상업적으로 이용가능한 glycanase, protease 및 lipase 등이 키토산을 분해할 수 있는 능력이 있다고 발표한 바 있다. 따라서 본 연구에서는

lysozyme, cellulase, β-glucosidase, protease 및 상업용 효소류와 참고로 chitinase와 chitosanase를 대상으로 키토산 분해능력을 검토하였다.

Fig. 3에는 각 효소의 키토산 반응물을 TLC로 분석한 결과를 나타낸 것으로 spot 부분과 전개된 올리고당의 발색정도를 관찰하였을 때 *Bacillus sp.* 유래 chitinase 및 chitosanase는 pH 3.0 및 pH 5.0에서 키토산을 대부분 분해하고 있었다. 또한 이들 이외의 효소 중 키토산의 분해는 *T. viride* 및 *T. reesei* 유래의 cellulase 및 *T. reesei* 유래의 Celluclast에서 관찰되었으며, 생성물의 종류는 2량체 이상의 올리고당외에 비교적 저분자의 키토산도 포함되어 있는 것으로 추측되었다. Yalpani 등⁽¹⁶⁾ 및 David 등⁽¹⁷⁾은 cellulase, papain, 및 Alcalase 등은 키토산의 잔존 아세틸화도가 높을수록 높은 기질특이성을 나타내며 완전히 탈아세틸화된 키토산은 어느 효소에 대해서도 기질이 되지 못하였다고 하였으며, Ohtakara 등⁽²²⁾은 *Ser. marcescens*나 *Aer. hydrophila* 유래의 chitinase는 아세틸화율이 낮을수록 효소활성이 높다고 보고한 바 있다.

따라서 *T. viride* 및 *T. reesei* 유래의 cellulase에서

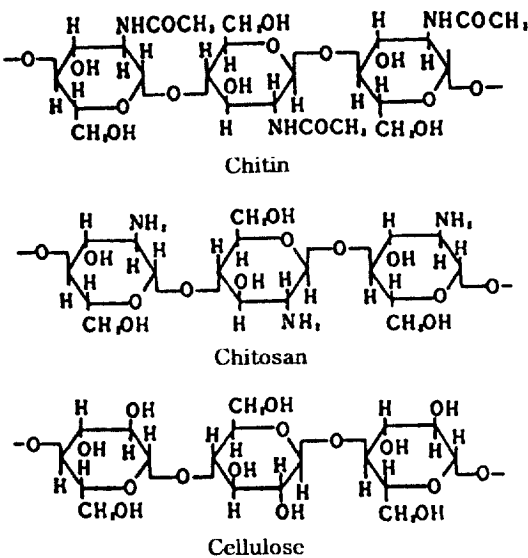


Fig. 2. Chemical structure of chitin, chitosan and cellulose.

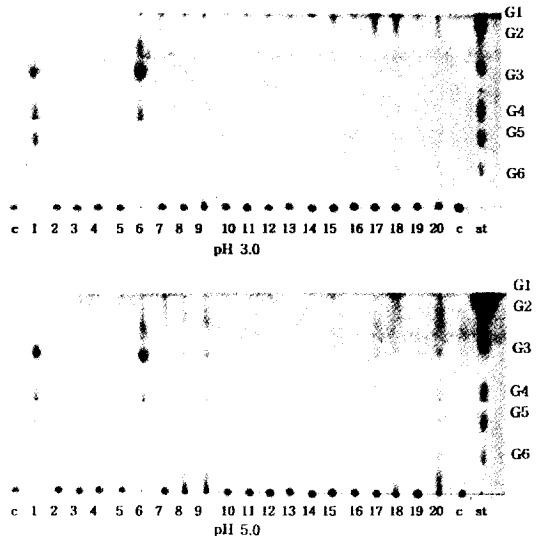


Fig. 3. Thinlayerchromatogram of chitosan hydrolyzates by various enzymes. Reaction condition : 1~10 unit enzyme, 0.25% chitosan, 5 hr, 40°C. 1. Chitinase from *Aer. hydrophila*, 2. Chitinase from *Ser.marcescens*, 3. Lysozyme from hen egg white, 4. Lysozyme from turkey egg white, 5. Chitinase from *Str. griseus*, 6. Chitosanase from *Bac. sp.* 7. Cellulase from *Tri.viride*, 8. Cellulase from *Tri.reesei*, 10. Cellulase from *Asp.niger*, 11. β-glucosidase from Almond, 12. β-glucosidase from *Caldocellum*, 13. Papain, 14. Trypsin, 15. Alcalase, 17. Novozyme, 18. Viscozyme, 19. Ultrazyme, 20. Celluclast

Table 1. Enzymatic hydrolysis of chitosan and its main oligosaccharides

Kinds of enzymes	specific activity (μ mole glucosamine/ hr/mg enz.)	kinds of oligosaccharides
Chitinase from <i>Aer. hydrophila</i>	14.6	Glc ₃ -Glc ₆
Chitosanase from <i>Bac. sp.</i>	1.7	Glc ₂ -Glc ₄
Cellulase from <i>Tri. viride</i>	0.6	Glc ₂ ·
<i>Tri. reesei</i>	0.7	Glc ₂ ·
Commercial enzymes Celluclast (<i>Tri. reesei</i>)	0.08	Glc ₂ ·

¹⁾Reaction conditions: 0.25% chitosan, 40°C, 0.1 M acetic acid buffer (pH 5.0).

키토산 분해활성이 나타난 이상의 결과는 본 연구에 사용된 키토산의 탈아세틸화율이 99%이상인 점과 *Asp. niger* 혹은 *Pen. funiculosum* 유래의 cellulase에서는 키토산 분해활성이 전혀 나타나지 않는 점 등을 고려할 때 기질특이성이 강하게 반영되고 있기 때문으로 생각된다.

Table 1에는 이들 효소의 활성과 생성된 올리고당의 종류를 나타낸 것으로 키토산 가수분해에 대한 효소의 비활성(specific activity)은 *Aeromonas* 유래의 chitinase 활성이 14.6으로 가장 높았고 *Bacillus* 유래의 chitosanase는 1.7을 나타내었으며 2량체 이상의 균일한 올리고당을 생성하는 *T. viride* 및 *T. reesei* 유래의 cellulase의 비활성은 각각 0.6 및 0.7로 나타났다. 또한 상업용 cellulase인 Celluclast의 경우에는 비활성이 0.08로 매우 낮은 수준이었다. 한편 생성된 키토산 올리고당의 분포는 *T. viride* 및 *T. reesei* 유래 cellulase간에 차이를 보이고 있었으나 Celluclast의 경우에는 *T. reesei* 유래의 cellulase와 유사한 경향을 보이고 있었다(Fig. 3). 이와 같은 결과는 Celluclast의 source가 *T. reesei* 인 점 및 Celluclast의 키토산 분해활성이 *T. reesei* 고유의 cellulase에서 비롯되고 있음을 시사하는 것으로 생각되었다.

Cellulase의 키토산 분해특성

T. viride 및 *T. reesei* 유래 cellulase 및 Celluclast의 키토산 분해에 대한 적정 pH는 5.0으로 이들 효소들의 고유의 최적 pH범위와 유사하였다(Fig. 3). 온도의 경우, *T. viride* 유래 cellulase는 45°C에서, *T. reesei* 유래 cellulase 및 Celluclast는 55°C (Table 2)에서 최대의 활성을 나타내고 있어 cellulase로서의 최적 온도로 알려진 37°C (*T. viride* 및 *T. reesei*) 및 40°C (Celluclast)

Table 2. Effect of temperature on the chitosan hydrolysis by cellulase from *Trichoderma viride* and *T. reesei*

Temp. (°C)	Reducing sugar produced (μ mole glucosamine equi.)		
	Cellulase <i>Tri. viride</i>	Cellulase <i>Tri. reesei</i>	Commercial cellulase <i>Tri. reesei</i>
45	0.60	0.80	1.04
55	0.42	1.76	3.13
65	0.33	0.63	1.56

¹⁾Reaction conditions: 0.5% chitosan, 1% enzyme, 0.1 M acetic acid buffer (pH 5.0), 5 hrs.

보다는 각각 8°C 및 15°C 높은 편이었다. 또한 적정온도에서의 키토산에 대한 절대활성은 *T. viride* 0.6, *T. reesei* 유래의 cellulase 1.76, Celluclast 3.13으로 Celluclast가 가장 우수한 키토산 분해활성을 나타내고 있었다. Cellulase가 키토산 분해활성을 나타내는 데 있어서 특히 cellulase고유의 적정 온도보다 높게 나타난 이상의 결과는 키토산이 중성당인 cellulose와 달리 용해성이 낮고 점도가 높으며 또한 양이온성을 나타내는 특성 및 키토산에 대한 cellulase의 비특이적인 효소활성과 관계가 있는 것으로 생각된다. Table 3에는 이들 효소의 dose response를 비교한 결과로 대상 cellulase 모두 효소/키토산의 비(w/w)가 0.08~0.10이 적절한 것으로 나타났다.

이와 같은 결과는 85% 탈아세틸화 수준의 키토산의 분해활성을 점도변화로 측정하여 얻은 papain (0.09)의 경우와 유사하고 또한 cellulase, hemicellulase, lipase 등의 경우보다는 매우 높은 편이다¹⁷⁾. 한편, 키토산은 100 mM 초산 buffer (pH 5.0)에서 최대 3% (w/v)정도 가용화 되는 것으로(data not shown) 키토산의 농도에 따른 효소활성 관계 역시 반응의 효율적 측면에서 매우 중요하다. 따라서 본 연구에서는 양적으로 높은 수준인 1%의 효소 농도(w/w 혹은 v/v (Celluclast))조건에서 키토산 농도에 따른 효소활성을 측정하였다. Table

Table 3. Dose response comparison for chitosan hydrolysis by *Trichoderma viride* and *T. reesei*

Enz./chitosan (w/w)	Reducing sugar (μ mole glucosamine equi.)		
	Cellulase <i>Tri. viride</i>	Cellulase <i>Tri. reesei</i>	Commercial cellulase <i>Tri. reesei</i>
0.01	-	-	1.91
0.02	0.02	0.05	2.77
0.04	0.06	0.09	3.33
0.06	0.06	0.09	4.86
0.08	0.10	0.13	6.94
0.10	0.11	0.16	7.08

¹⁾Reaction conditions: 0.5% chitosan, 0.1 M acetic acid buffer (pH 5.0), 45°C (*T. viride*), 55°C (*T. reesei*), 5 hrs.

Table 4. Effect of chitosan concentration on the chitosan hydrolysis by cellulase from *Trichoderma viride* and *T. reesei*

Chitosan (%)	Reducing sugar (μmole glucosamine equi.)		
	Cellulase <i>Tri. viride</i>	Cellulase <i>Tri. reesei</i>	Commercial cellulase <i>Tri. reesei</i>
0.5	-	0.59	3.71
1.0	0.34	1.38	8.93
2.0	0.40	2.26	13.20
3.0	0.39	3.61	14.10

¹⁾Reaction conditions: 1% enzyme, 0.2 M acetic acid buffer (pH 5.0), 45°C (*T. viride*), 55°C (*T. reesei*), 5 hrs.

4에 나타낸 바와 같이 *T. viride* 유래 cellulase는 키토산의 농도에 관계없이 비교적 낮은 수준의 활성을 나타내는 특성을 보였으나 *T. reesei* 유래 cellulase 및 Celluclast의 경우에는 키토산의 농도가 증가할수록 활성이 증가하였으며 키토산의 농도가 3%일 때 *T. reesei* 유래의 cellulase는 3.61, Celluclast는 14.10으로 최대의 활성을 보이고 있었다. 이와 같은 결과는 키토산의 농도가 낮을수록 cellulase, hemicellulase, lipase 및 pappain 등의 키토산에 대한 비활성(specific activity)이 높게 나타났다고 한 Yalpani 등⁽⁶⁾의 결과와는 상반되는 결과이나 본 시험에서 1%수준에 해당하는 높은 량의 효소가 반응계에 첨가되었기 때문으로 생각된다.

***Trichoderma reesei* 유래 상업용 효소를 이용한 키토산 올리고당의 생산**

T. reesei 유래 상업용 효소인 Celluclast를 이용하여 키토산의 올리고당 생산특성을 조사하였다. 즉, 1% (v/v) 효소를 이용하여 pH 5.0 및 55°C에서 3% 키토산을 시간별로 분해시키고 수율, 점도, 환원당, TLC경향, 키토산 올리고당 조성 등을 분석하여 키토산 올리고당의 상업적 생산 가능성을 검토하였다. Fig. 4에는 시간별 가수분해물의 수율과 점도를 나타낸 것으로 키토산의 점도는 분해전 310 cp에서 분해가 시작된

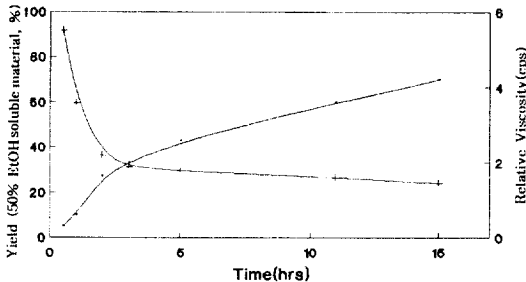


Fig. 4. Total yield and viscosity of chitosan hydrolyzates by commercial cellulase from *Tri. reesei*.

후 30분 이내에 점도가 5 cp수준으로 98% 수준 이상의 급격한 점도 감소를 보였으며 15시간 분해시 50% 에탄올 가용물의 생성 수율이 약 70%에 달하였다.

또한 분해경과에 따라 환원당의 생성량도 증가하는 경향이었으며 환원당의 생성량은 최대 13.5%로 나타나고 있었다(Fig. 5). Fig. 6에는 키토산의 시간별 가수분해물의 TLC상을 나타낸 것으로 키토산의 Celluclast 가수분해물은 분해시간에 관계없이 균일한 올리고당 생성분포를 보이고 있었으며 분해시간이 경과함에 따라 각각의 올리고당의 절대함량은 증가하는 경향을 보이고 있음을 알수 있었다. 한편 고른 올리고당 분포를 나타내는 동시에 50% 에탄올 가용물의 생성 수율이 가장 높게 나타난 15시간 분해물의 6량체 이하의 올리고당 조성을 HPLC로 정량 분석한 결과

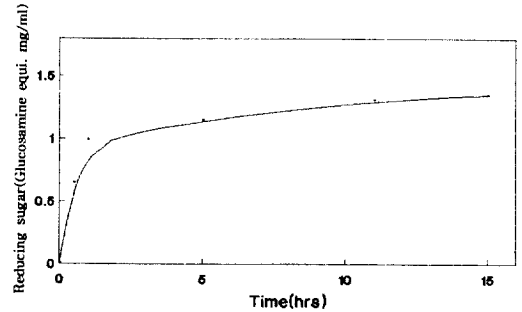


Fig. 5. Total reducing sugar of chitosan hydrolyzates by commercial cellulase from *Tri. reesei*.

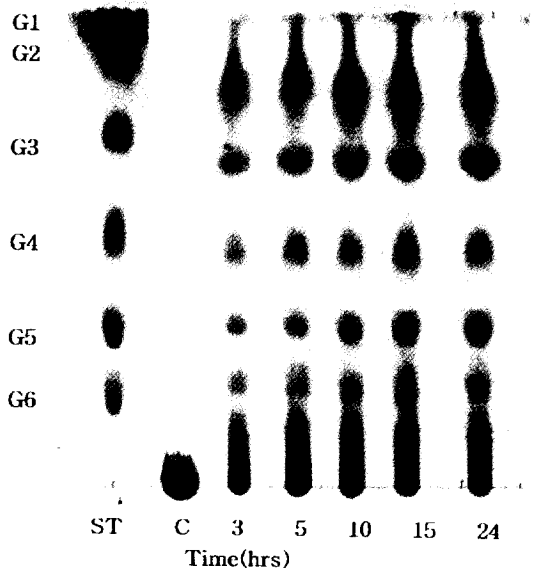


Fig. 6. Time course of TLC pattern of chitosan hydrolyzates by commercial cellulase.

Table 5. Total yield and oligosaccharide content of chitosan hydrolyzates by Celluclast from *T. reesei* (Unit: %)

	Yield						Total
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	
Cellulase	-	15.3	11.3	10.2	9.6	8.0	54.4
HCl ¹⁾	27.5	16.5	12.2	8.7	4.8	-	78.6
HCl ²⁾	12.8	13.9	12.4	2.6	2.5	2.3	46.5

¹⁾Method by Horowitz *et al.*⁽¹⁴⁾

²⁾Method by Sakai *et al.*⁽¹⁵⁾

(Table 5), 2량체 15.3%, 3량체 11.3%, 4량체 10.2%, 5량체 9.6%로 나타났으며 Sarcoma 180고형종양의 억제효과가 있는 것으로 알려진 6량체의 키토산 올리고당⁽⁹⁾의 생성 수율은 Sakai 등⁽¹⁵⁾이 산분해 방법에서 얻고 있는 2.3%보다 약 4배 높은 수준인 8%로 나타나 매우 주목되었으며 효소반응조건의 조절에 따라 6량체 키토산 올리고당의 생성수율도 충분히 향상시킬 수 있을 것으로 생각되었다.

이상의 결과에서와 같이 *T. viride* 및 *T. reesei* 유래의 cellulase는 99%이상의 탈아세틸화도를 가지는 키토산에 대하여 분해활성을 나타내는 특성을 보이며 특히 *T. reesei* 유래의 cellulase인 Celluclast는 상업용 효소로서 지금까지 효소가격이 높아 활용되지 못한 chitosanase를 대신하여 키토산 올리고당을 경제성 높게 생산하는 데 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

키토산 올리고당 생산에 이용 가능한 경제성 있는 키토산 분해 효소를 탐색하였다. Cellulase, β -1,4-glucosidase, protease 및 상업용 효소류를 대상으로 조제 키토산에 대한 분해력을 시험한 결과 *Trichoderma viride*, *T. reesei* 유래의 cellulase 및 상업용 효소인 Celluclast (*T. reesei* 유래 cellulase)가 우수한 키토산 분해능력을 나타내었다. 키토산에 대한 반응성은 *T. reesei* 유래 cellulase가 *T. viride* 유래 cellulase 보다 강하였으며 이들의 적정 키토산 분해조건은 pH 5.0이었고 적정 온도는 *T. viride* 유래 cellulase는 45°C, *T. reesei* 유래 cellulase 및 Celluclast는 55°C로 나타났다. 또한 dose reponse 시험에서 이들 효소 모두 enz./Chitosan비=0.1이 적절하였으며 *T. reesei* 유래 효소 및 Celluclast는 키토산 농도가 3%일 때 최대의 활성을 나타내었다. 한편, 상업용 효소인 Celluclast를 이용한 키토산 올리고당의 생산 가능성을 시험하기 위하여 3% 키토산 용액(310cp)에 Celluclast를 1% 첨가하고 pH 5.0, 55°C에서 시간별로 반응시켰을 때, 점도는 초기 30분경에 5.51cp로 98% 이상 감소하였으며 50%

ethanol 가용물의 수율은 분해 15시간에 70%로 최대를 보였다. 총환원당의 함량은 분해시간이 경과함에 따라 증가하였고 반응 2시간부터 13.5% 내외의 수율을 유지하였다. 올리고당의 조성은 15시간 분해물에서 균일한 분포와 높은 함량을 보였으며 항종양활성을 나타내는 것으로 알려진 6량체 키토산 올리고당의 생성량은 기존의 산 분해방법의 약 4배에 해당되는 8.0%로 나타났다. 따라서 *T. viride* 및 *T. reesei* 유래의 cellulase는 99%이상의 탈아세틸화도를 가지는 키토산에 대하여 분해활성을 나타내고 특히 *T. reesei* 유래의 상업용효소는 지금까지 효소가격이 너무 높아 활용되지 못한 chitosanase를 대신하여 키토산 올리고당을 경제성 높게 생산하는 데 이용될 수 있을 것으로 기대되었다.

문 헌

1. Muzarelli, R.A.A.: *Chitin*, Pergamon Press, Oxford, p.1 (1977)
2. Hong, S.P. and Kim D.S.: About application of chitosan. *Bull. Food Tech.*, **8**, 49-60 (1995)
3. Hong, S.P., Hwang, J.K. and Kim, D.S.: Functional properties of chitin/chitosan and its oligosaccharide production. *Food Sci. Ind.*, **30**(1), 44-52 (1997)
4. Gallaher, D.D. and Hassel, C.A.: *Dietary Fiber in Health & Disease*, Eagan Press, New York, p.112 (1995)
5. 内田泰: 키토산, 키토산의抗菌性. *月刊フ-ドケミカル*, **2**, 22-29 (1988)
6. Kendra, D.F. and Hadwiger, C.A.: Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*. *Exp. Mycol.*, **8**, 276-281 (1984)
7. 戸倉清一: 別冊フ-ドケミカル, (株)食品化学新聞社, 東京, p.5 (1987)
8. Suzuki, K., Mikami, T., Okawa, Y.A., Suzuki, S. and Suzuki, M.: Antitumor effect of hexa-N-acetyl-chitoheaxose and chitoheaxose. *Carbohydr. Res.*, **151**, 403-408 (1986)
9. Tokoro, A., Tatewaki, K., Suzuki, T., Mikami, S., and Suzuki, M.: Growth inhibitory effect of hexa-N-acetyl chitoheaxose and chitoheaxose against Meth-A solid tumor. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, **36**, 784-789 (1988)
10. 欠吹 念: 最後のバイオマスキチンキトサン, 枝報堂出

- 版, p.210 (1988)
11. 欠吹 念 : キチン,キトサンの應用, 枝報堂出版, p.1 (1990)
 12. 欠吹 念 : キチンキトサン實驗マヌアル, 枝報堂出版, p. 79 (1991)
 13. Rupley, J.A.: The hydrolysis of chitin by concentrated hydrochloric acid and the preparation of low molecular weight substrates for lysozyme. *Biochem. Biophys. Acta.*, **83**, 245-255 (1964)
 14. Horowitz, S.T., Roseman, S. and Blumenthal, H.J.: The preparation of glucosamine oligosaccharide-I. Separation. *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 5046-5049 (1957)
 15. Sakai, K., Nanjo, F. and Usui, T.: Production and utilization of oligosaccharides from chitin and chitosan. *Denpukakaku*, **37**, 79-86 (1990)
 16. Yalpani, M. and Pantaleone, D.: An examination of the unusual susceptibilities of aminoglycans to enzymatic hydrolysis. *Carbohydr. Res.*, **256**, 159-175 (1994)
 17. David, P., Yalpani, M. and Scollar, M.: Unusual susceptibility of chitosan to enzymic hydrolysis. *Carbohydr. Res.*, **237**, 325-332 (1992)
 18. Uchida, Y., Ohtakara, A.: Chitosanase from *Bacillus sp.* *Method in Enzymology*, Academic press, Newyork, 161, p 501 (1988)
 19. 夜久富美子 : キチン キトサンの分離技術と分析技術. *フードケミカル*, **2**, 91-97 (1993)
 20. Yu, J.H.: *Experiments in Food Science and Enzymology*, Tamku press, Seoul, vol 1, p.121 (1989)
 21. Miller, G.L.: Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, **31**, 426-432 (1959)
 22. Ohtakara, A., Izume, M. and Mitsutomi, M.: Action of microbial chitinase on chitosan with different degree of deacetylation. *Agri. Biol. Chem.*, **52**, 3181-3182 (1988)

(1997년 5월 9일 접수)