

Mucor rouxii가 생산한 Chitin deacetylase의 특성

손흥식* · 박성민 · 손병일 · 최현미 · 이근태
 대전주조 (주) 중앙연구소*, 부경대학교 식품공학과

Characterization of Chitin Deacetylase Produced from *Mucor rouxii*

Heung-Sik SOHN*, Seong-Min PARK, Byung-Yil SON, Hyeon-Mee CHOI, and Keun-Tai LEE

DaeSun Distilling Co., Ltd., Lab.*, Department of Food Science and Technology,
 Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

In order to degrade chitin by enzymatic hydrolysis, it is required from screening highly active deacetylase. To this end, we examined three fungal strains and it turned out that *Mucor rouxii* produced highly active deacetylase, this enzyme exhibited the highest enzymatic activity against colloidal chitin. The conditions for growing *Mucor rouxii* are as follows ; the effective carbon source, nitrogen source, adequate initial pH, temperature and incubation time were 2% glucose, 1.33% yeast extract, 0.66% pepton, 4.5, 25 ± 2°C and 48 hr, respectively. The optimum pH and temperature for purified enzyme activity were 5.5 and 40°C, respectively. The purified enzyme was stable at pH ranging from 4.5 to 5.5. However, the enzyme activity was decreased to less than 50% at pH below 4.5 and above 7.5. At tempratures above 50°C, the enzyme activity was decreased remarkably. The enzyme was inhibited by LiCl, HgCl₂, and BaCl₂ but stimulated by CaCl₂ and ZnCl₂. The activity of purified enzyme was increased by L-cysteine and 2-mercaptoethanol, while decreased by o-phenanthroline, ρ-CMB, EDTA, and iodoacetate. The K_m and the V_{max} value of purified enzyme were 1.2% and 59.5 U/mg, respectively. The deacetylation activity of purified enzyme was not detected at optimal reaction condition when chitin particle suspension was used.

Key words: *Mucor rouxii*, chitin deacetylase, enzyme activity,

서 론

Chitin은 N-acetylglucosamine (GlcNac)이 β-1,4결합된 중합체이며 분자사슬의 양상에 따라 α, β, 그리고 γ-chitin형 결정구조로 존재하는데, 대부분 일반용매에는 용해되지 않는 특성을 지니고 있어 그 자체만으로 이용하기에는 많은 어려움이 따르고 있다. 따라서 chitin의 이용가능성을 향상시키기 위한 방법으로서 chitin을 화학약품을 처리하여 추출한 다음, chitin의 아세틸기를 제거하여 chitosan을 얻는 방법과 탈아세틸 효소를 사용하여 chitin으로부터 chitosan을 생성시키는 효소적 방법이 있다. 화학적 방법은 오폐수의 발생에 의한 환경오염과 분자량이나 탈아세틸화도가 일정한 생성물을 얻기 어렵다는 결점을 내포하고 있어 물리, 화학적으로 균질품의 chitosan을 생산하기가 불가능하다. Araki등 (1975)은 β(1→4)N-acetylglucosamine의 단일 중합체인 chitin이 효소적 탈아세틸 반응에 의하여 acetamido group이 가수분해되어 chitosan으로 전환되어 진다고 하였고, 그 후 M. rouxii 등을 위시한 다수의 Zygomycetes종에 속하는 곰팡이류들의 균사체 내의 탈아세틸화효소들에 대한 연구가 계속되어졌다. 역시 Araki (1975)는 M. rouxii로부터 추출한 탈아세틸 효소를 부분정제하여 amino-sugar 잔기의 N-acetyl group에 동위원소로 label되어진 polysaccharide를 기질로 반응시켰을 때, glycol chitin만이 탈아세틸 되었다고 보고하였으며, Dunkel등 (1994)은 M. rouxii 및 Absidia coerulea의 배양액중에 chitin을 첨가시킬 경우, 이들로부터 추출한 조효소액의 활성이 배이상 증가하는 것으로 보고하였다.

따라서 본 연구에서는 산업적으로 유용하게 활용될 수 있는 chitosan의 생산을 환경친화적 방법중의 하나인 효소에 의한 chitosan 생산가능성을 검토해 보기위한 시도의 일환으로 다량의

chitosan을 함유하고 있는 Zygomycetes종의 곰팡이 균류들 중 일부 균류를 선택하여 배양된 균주의 균사체중에 존재하는 탈아세틸효소의 활성을 효소적 방법에 의하여 측정된 다음, 가장 우수한 탈아세틸활성을 지닌 곰팡이균을 선택, 적정조건에서 배양 후, 균사체내에 존재하고 있는 탈아세틸효소를 정제하여 그 특성을 알아보고 이를 미세한 분말상의 chitin에 반응시켜 탈아세틸생성물인 acetic acid의 생성여부를 관찰하여 보았다.

재료 및 방법

1. 실험재료

Chitin deacetylase 추출을 위한 균주는 *Mucor rouxii* (ATCC 24905), *Absidia coerulea* (ATCC 14067), *Phycomyces blakesleeanus* (IFO 5870)이며 효소정제 및 특성실험에 사용된 기질은 colloidal chitin을 사용하였으며 붉은대게 (*Chinonecetes japonicus*)의 몸통부분 갑각을 수세하여 제조된 chitin (Park, 1995; Baik, 1995)을 각각 20, 40, 60, 80 mesh의 크기로 분쇄하여 정제효소와의 반응용으로 사용하였다.

2. *Mucor rouxii*의 최적배양조건

탄소원으로는 glucose, fructose, maltose, sucrose, 질소원으로는 peptone 및 yeast extract이외에 malt extract, (NH₄)₂SO₄, urea 등을 질소원으로 하여 균체성장 및 추출된 조효소액의 활성을 측정, 비교하였고 결정된 탄소원과 질소원을 다양한 농도로 첨가하여 최적농도를 결정하였으며 배지의 pH를 3.5~8.5, 배양온도는 15~40°C, 배양시간은 8~62 hr으로 배양조건을 달리하여 최적 온도 및 시간을 결정하였다.

3. Chitin deacetylase의 정제

추출된 조효소액을 DEAE-cellulose column에 흡착시킨 다음 Tris-HCl 및 Tris HCl 염용액을 이용하여 흡착되지 않은 단백질을 용출시킨 후, Sepharose CL-6B에서 용출 분획을 하여 얻어진 활성분획을 DEAE-Sephadex A-50에 흡착시켜 Tris-HCl로 만든 염용액을 이용하여 용출 분획하였다. 기질에 대하여 활성이 강한 분획을 농축하여 전기영동적으로 선도 검정을 한 후, 효소특성 실험용 효소용액으로 하였다 (Fig. 1). 정제된 효소의 고유활성은 31.92 U/mg, 수율은 6.5%, 정제도는 22배이었다.

4. Chitin deacetylase의 활성측정

기질로서 1.1% colloidal chitin (0.1M citric phosphate buffer, pH 5.5)과 효소액을 40°C에서 40분간 반응시켰을 때 유리되어져 나오는 acetic acid의 양을 Dunkel 등 (1994)의 효소적 방법을 이용하여 측정하였다. 효소 1 unit (단위)는 1분간에 1 μ mole의 acetic acid를 생산하는 효소량으로 정하였다.

5. Chitin deacetylase의 특성측정

(1) 효소활성의 최적조건과 안정성측정

① pH: 정제효소 250 μ l에 대해 colloidal chitin 250 μ l와 각 pH별 완충액 (pH 4.0~6.0; 0.1M Citric phosphate buffer, pH 7.0~9.0; 0.1M Tris-HCl buffer, pH 9.0~11.0; 0.1M sodium hydroxide carbonate buffer) 750 μ l를 혼합하여 반응 (40°C, 40 min) 시킨 후, 생성된 acetic acid의 양을 측정함으로써 최적 pH조건을 구하였다.

② 온도: 정제효소 250 μ l에 기질 250 μ l 및 0.1M citric phosphate buffer (pH 5.5) 750 μ l을 혼합하여 반응온도 10~70°C까지 5에서 10°C의 간격으로 조절하면서 각각 40분간 반응시켜 유리되어져 나오는 acetic acid의 양을 측정함으로써 최적 온도를 구하였다.

③ 반응시간: 정제효소 250 μ l에 기질 250 μ l 및 0.1M citric phosphate buffer (pH 5.5) 750 μ l을 혼합하여 시간별로 반응시킨 후 (40°C), 유리되어져 나오는 acetic acid의 양을 측정함으로써 최적 온도를 구하였다.

(2) 효소활성에 미치는 첨가물의 영향 측정

여러 가지 금속이온 용액 10 μ l에 정제효소용액 250 μ l, 0.1M citric phosphate완충액 (pH 5.5) 740 μ l를 넣어 30°C에서 30분간 혼합한 후 여기에 기질용액 250 μ l를 가하여 40°C에서 40분간 반응시켜 활성을 측정하고 또 화학약제 즉, SH 화합물 (L-cysteine, dithiothreitol), SH 차단제 (ρ -CMB [ρ -chloromecuricbenzoate], σ -phenanthroline), S-S결합 절단제 (2-mercaptoethanol) 및 금속 chelate (EDTA, iodoacetate)를 40°C에서 40분간 반응시켜 활성을 측정하였으며 control로서 탈이온수를 사용하였다.

(3) 효소농도 및 기질농도에 따른 효소활성 측정

1.1% 기질용액에 대하여 효소를 농도별로 첨가하여 생성된 acetic acid를 측정하여 효소농도간의 상관식으로부터 적정반응조건을 구하고 또 효소농도를 고정하고, 기질농도 0.275~1.5%로 달리하여 반응시킨 후, 반응시간당 생성되는 acetic acid의 양을 측정하여 Lineweaver-Burk식으로 부터 반응속도정수 (K_m)와 최대반응속도 (V_{max})를 구하였다.

6. Chitin분말에 대한 chitin deacetylase의 반응

기질로서 5.0% chitin 분말 (0.1M citric phosphate buffer, pH 5.5)와 효소액을 40°C에서 40분간 반응시켰을 때 유리되어져 나오는 acetic acid의 양을 효소적 방법을 이용하여 측정하였다 (Dunkel 등, 1994).

결과 및 고찰

1. Deacetylase 활성균주의 탈아세틸화능

Deacetylase 활성균주를 48시간 배양 후 이들 균사체 및 조효소액에 대한 특성을 비교한 결과 (Table 1) 균사체내의 chitosan의 함량이 비교적 높은 것으로 알려진 *A. coerulea*보다 *M. rouxii*의 경우 상대적으로 높은 생육상태 및 효소활성을 나타냈다. 따라서 본 연구에서는 *M. rouxii* 균주의 균사체내에 존재하는 효소특성을 조사하였다.

2. Deacetylase 활성균주의 최적배양조건

Deacetylase 활성균주인 *Mucor rouxii*의 최적배양조건은 탄소원으로 glucose 2.0%, 질소원은 peptone 0.67%, yeast extract 1.33%, 그 이외 무기염으로 NaCl, K_2HPO_4 , $MgSO_4$ 및 $CaCl_2$ 는 각각 0.1%, 0.1%, 0.5%, 0.01% 이고, 배지의 pH는 4.5, 배양온도는 25°C 부근, 배양시간은 48시간이었다.

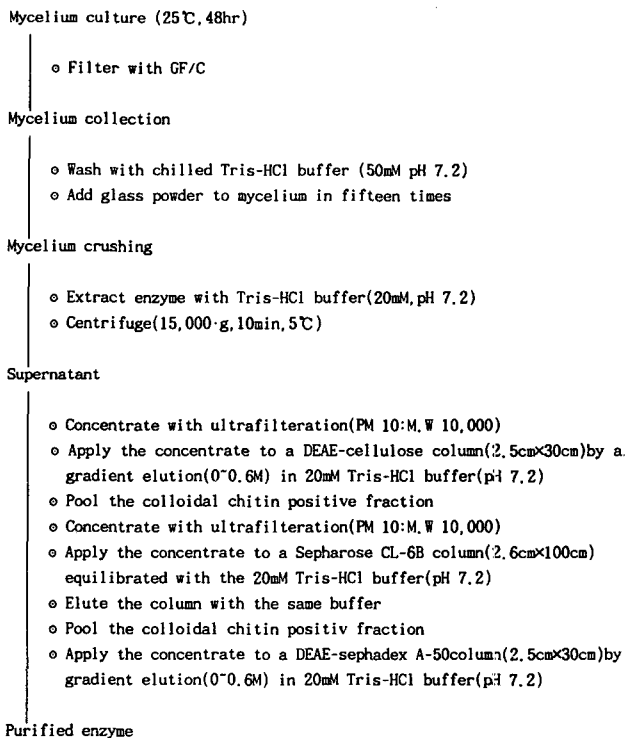


Fig. 1. Process for purifying the mycelium enzyme.

3. Chitin deacetylase 특성

(1) 효소활성의 최적조건

정제된 효소의 활성최적 pH조건은 Fig. 2에 나타난 것 처럼 pH 5.5 부근에서 최적활성을 보였으며 pH 4 이하와 pH 8이상의 반응조건에서는 급격한 활성저하를 초래하였다. Kauss 등 (1984)이 땅콩에 잘 서식하는 *Colletotrichum lindemuthianum*의 균사체에서 추출한 deacetylase의 경우, pH 8.5에서 최적의 활성을 나타낸다고 하였으며 또한 *Mucor*속의 곰팡이 균사체에서 추출한 deacetylase인 경우라도 기질로 glycol chitin을 사용한 결과 사용한 완충용액에 따라 약간씩 차이가 있었다. (Arcidiacono 등 :1988) 이것은 같은 기능을 가진 효소라도 효소가 생산되어진 미생물의 종에 따라 최적반응 조건이 다를 수 있기 때문이다. 활성온도에 있어서는 Fig. 3에 나타난 바와같이 35~40°C에서 최대활성이 나타났으며 이들 최적 pH와 온도 조건에서 반응시간을 달리 하였을 경우의 acetic acid 생성정도를 측정된 결과를 Fig. 4에 나타냈다. 본 실험의 반응조건하에서 반응시간 40분까지는 효소 작용에 의한 acetic acid의 생성이 시간이 경과함에 따라 급속하게 증가하다가 이후 거의 일정한 수준을 유지하는 것으로 나타난 바, 본 실험의 반응 조건에서 생성되는 acetic acid의 값으로 활성을 측정하려면 약 40분 정도 경과하는 것이 가장 적당한 효소반응 시간이었다.

(2) 효소활성의 안정성

정제효소를 각 pH의 완충액에서 30분간 투석시킨 후, 잔류활

Table 1. The deacetylation ability of the chitosan-producing strains

Strain	Growth*	Activity**
<i>Absidia coerulea</i>	1.04	36.8
<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	0.75	25.4
<i>Mucor rouxii</i>	1.31	49.4

Growth condition : 25 ± 2°C, 48hr.

* Fungal growth : dry mycelium weight (g)

**Acetic acid formation of crude enzyme (MM/mg):reaction condition ; substrate 1.1% colloidal chitin 1.0 ml (0.1M citric-phosphate buffer, pH 5.5), crude enzyme 0.5 ml, 40°C, 40 min.

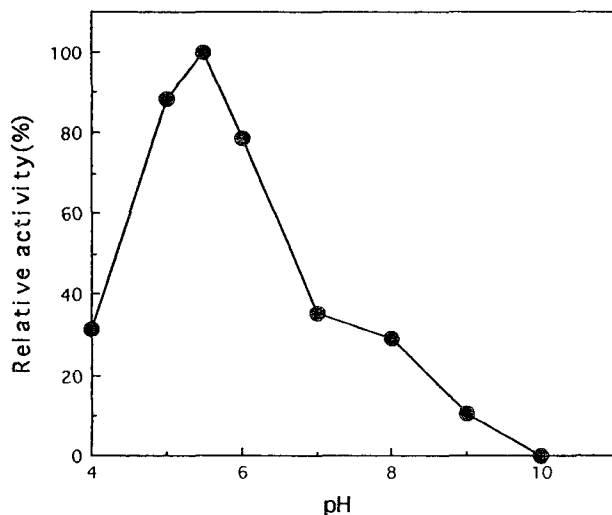


Fig. 2. pH dependency of the purified enzyme.

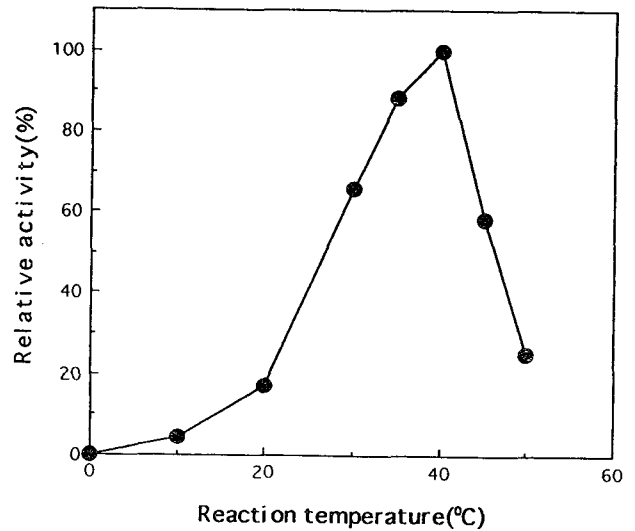


Fig. 3. Temperature dependency of the purified enzyme.

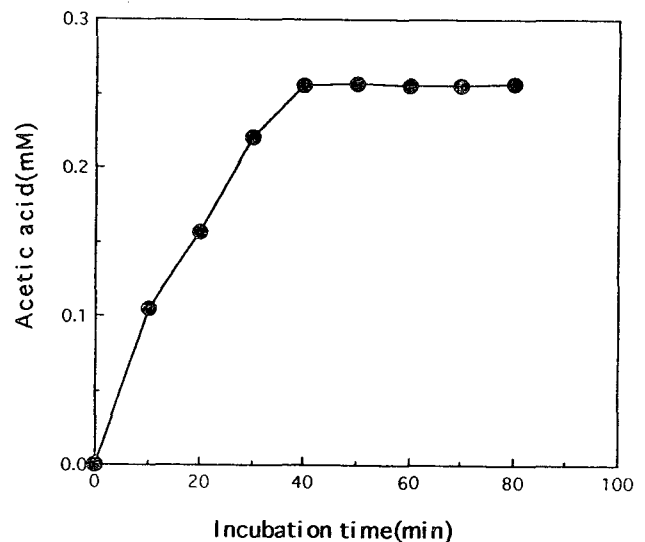


Fig. 4. Effect of incubation time on acetic acid formation of the purified enzyme.

성을 측정하여 상대활성값으로 안정성을 실험한 결과 (Fig. 5) pH 4.5 이하 pH 7.5 이상의 영역에서는 불안정한 것으로 나타났으며 특히, 미알카리성 및 알카리성영역에서는 불안정한 것으로 나타났다. 0~80°C의 각 온도에서 30분간 서서히 교반하면서 잔류하는 효소의 활성을 측정할 경우 (Fig. 6) 가열온도 30°C까지는 매우 안정하였으나 40°C에서는 약 20% 활성이 소실되었으며 이후 급격한 효소활성을 잃어버려 50°C 이상에서는 거의 대부분의 활성이 소실되어 온도에 비교적 민감한 효소인 것으로 나타났다. 이것은 *Colletotrichum* 속의 균사체로부터 추출한 효소의 경우 (Siegrist 등:1990), 100°C에서 30분간의 가열로 약 56% 이상의 실활을 보인 것과 비교하여 상대적으로 좀 더 강한 내열성을 나타냈다. 또 정제효소를 20, 40, 60°C 및 80°C의 각 온도에서 시간경과에 따른 효소활성의 영향을 실험한 결과 (Fig. 7) 반응온도 20°C에서는 효소활성의 소실은 거의 감지할 수 없었으나 40°C에서는 50분간의 전

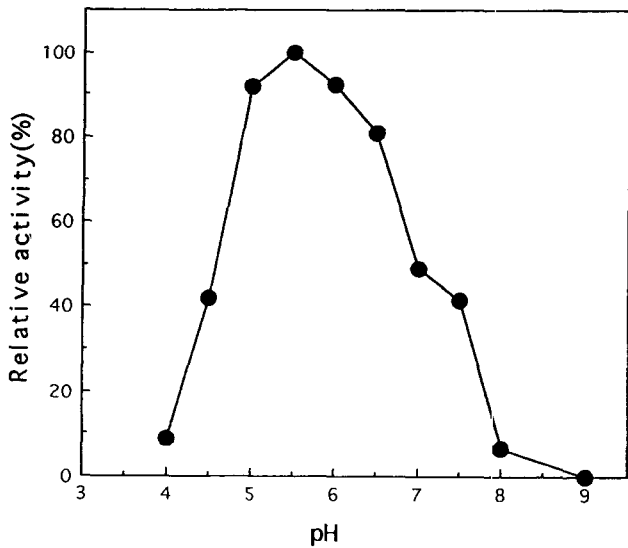


Fig. 5. Stability of the purified enzyme at the different pH.

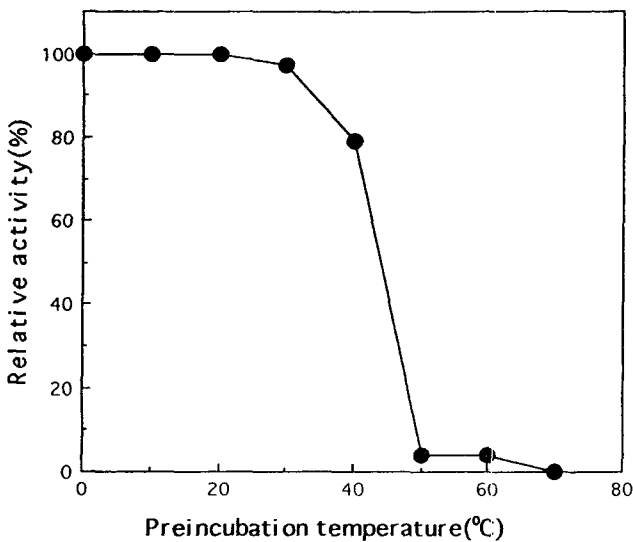


Fig. 6. Stability of the purified enzyme at the different temperature.

(前)가열로 약 55% 정도의 활성이 소실되었으며 효소의 최적반응 온도보다 낮은 온도에서도 효소활성의 소실현상을 나타내었다.

(3) 효소활성에 미치는 첨가물의 영향

1, 2가 금속이온의 효소활성에 미치는 영향을 실험한 결과 (Table 2), 2 mM 농도의 Ca²⁺, Zn²⁺이온에 의해서는 약 10~20% 정도의 활성이 증대되었으나 Li⁺, Ba²⁺ 및 Hg²⁺, 그리고 Ni²⁺ 등의 이온에 의해서는 50~80% 정도의 활성이 감소되었다. 또 효소활성에 미치는 화학약제 및 저해제의 영향을 실험한 결과 (Table 3), SH 화합물인 L-cysteine과 S-S결합 절단제인 2-mercaptoethanol에 있어서 활성이 증대되는 것으로 나타났다. 반면 SH기 차단제인 α -phenanthroline, ρ -CMB와 금속 chelate제인 EDTA 및 iodoacetate에 의해서는 효소활성이 현저하게 억제되고 있음을 볼 때, 효소는 활성부위에 SH기를 갖는 SH-enzyme이며 metalloenzyme인 것으로 추정된다.

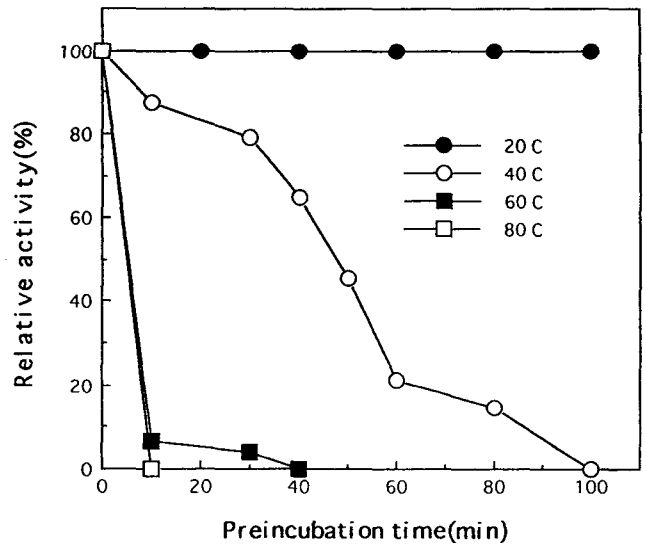


Fig. 7. Effect of preincubation temperature on the purified enzyme.

Table 2. Effect of metal ions on the purified enzyme

Metal ion	Metal ion concentration (mM)	Relative activity (%)
Control	2	100.0
K ⁺	2	85.5
Li ⁺	2	10.0
Ba ²⁺	2	25.5
Ca ²⁺	2	126.0
Co ²⁺	2	81.4
Hg ²⁺	2	17.4
Mg ²⁺	2	94.8
Mn ²⁺	2	75.0
Zn ²⁺	2	113.9
Ni ²⁺	2	44.8

(4) 효소농도 및 기질농도에 따른 효소활성

Colloidal chitin (1.1%)을 기질로 하여 반응효소의 농도 변화에 따른 활성증가 (Fig. 8)는 반응혼액 1 ml에 대해 효소 농도 15 μ g에 해당하는 농도까지는 직선적인 관계를 보였으며 이때의 흡광도와 효소 농도간의 상관관계식은 $Y=0.0031X-0.0012$ ($r=0.995$)이었다. 보다 높은 농도에서는 활성증가 정도가 감소하였는데 이것은 1.1% colloidal chitin 기질에 대한 효소의 적정농도는 반응혼액 1 ml에 대해 약 15 μ g임을 알 수 있었다. 또 기질농도에 따른 반응속도를 Lineweaver-Burk 식으로 측정된 경우 (Fig. 9), 그 때의 반응속도식은 $Y=0.0168+0.0202X$ ($r=0.9905$)이었다. 또한, 효소의 K_m 은 1.2%로 나타났고, 최대반응속도 V_{max} 는 59.5 U/mg 이었다.

4. Chitin분말에 대한 효소의 반응

각각의 크기별로 미세 입자화된 chitin의 혼탁용액에 대한 효소 반응을 실시한 결과 적용된 모든 범위의 시료에 대해, 반응생성물인 acetic acid가 전혀 검출되지 않았으며 또 효소반응특성 결과에서 나타난 반응최적조건하에서도 미세분말화된 chitin에 대해서는 전혀 반응하지 않은 것으로 나타났다. 이것은 chitin의 특수한

Table 3. Effect of chemical reagents on the purified enzyme

Reagents	Concentration (mM)	Relative activity (%)
Control	0	100.0
L-Cysteine	0.015	101.0
	0.1	120.8
	0.5	146.0
	1.0	168.4
EDTA	0.05	100.0
	0.1	69.4
	0.5	50.3
	1.0	30.0
Dithiothreitol	0.05	79.4
	0.1	98.3
	0.5	100.2
	1.0	120.0
Iodoacetate	0.05	109.5
	0.1	99.3
	0.5	99.6
	1.0	89.1
p-CMB	0.05	132.0
	0.1	120.8
	0.5	109.5
	1.0	100.0
o-Phenanthroline	0.05	106.6
	0.1	100.0
	0.5	40.0
	1.0	16.0
2-Mercaptoethanol	0.05	89.4
	0.1	108.8
	0.5	118.8
	1.0	138.3

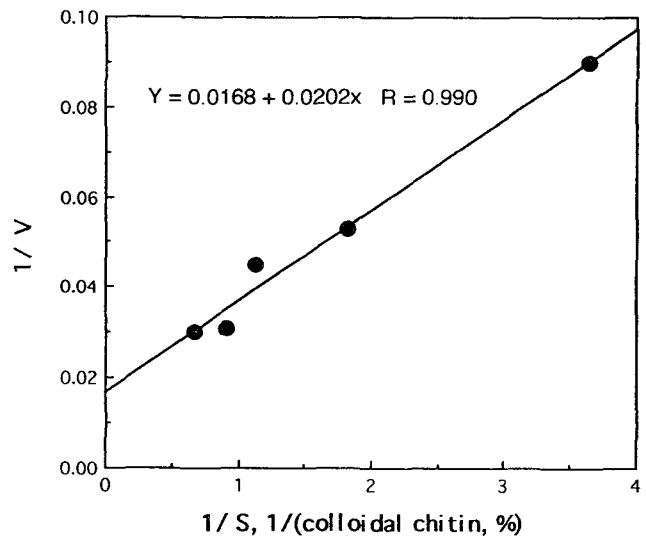


Fig. 9. Kinetic parameters of colloidal chitin deacetylation by the purified enzyme.

하는 효소의 반응조건에 적합하지 않아 보다 효율적인 기질의 처리에 대한 연구가 필요하다 하겠다. 현단계에서는 deacetylase를 이용한 효소의 고정화보다는 산업화적인 측면에서 기존의 알카리 처리법이 유용할 것으로 사료된다. 따라서, 기존의 방법에 의한 산업화 가능성을 타진하여 보는것도 향후 deacetylase의 실질적 유용성을 실현하는 기초자료로 유익할 것으로 판단된다.

요 약

Chitin deacetylase 추출을 위한 *M. rouxii* 균의 성장 및 분해활성 효소의 생산을 위한 공급원 중, 탄소원으로는 glucose 및 fructose 등이 가장 우수한 것으로 나타났고, 질소원으로는 yeast extract 및 pepton이 3:2의 비율로 총 2% 정도의 농도가 가장 효과적이었다. 성장 최적 pH는 4.5, 배양온도는 25°C 부근이었고 약산성 및 7.5이상의 영역에서는 균체의 성장 및 분해활성 효소의 활성이 급격히 저하되었으며 35°C 이상의 온도영역에서는 거의 생육하지 못하였다. 정제효소의 최적활성 pH 영역은 pH 5.5부근이었으며 pH 4.0이하와 pH 8.0 이상의 반응조건에서는 급격한 활성 저하를 초래하였고 반응 온도 35°C~40°C 영역에서 최고의 활성을 나타내었다. pH안정성에 있어서 pH 4.5 이하 및 pH 7.5 이상의 영역에서는 상당히 불안정한 것으로 나타났으며 CaCl₂ 및 ZnCl₂ 첨가에 의하여 약 10~20%의 활성이 증가되었으나 Li²⁺ 및 Hg²⁺ 등에 의해서는 현저한 활성저하현상을 나타내었다. 정제효소는 SH-화합물인 L-cysteine 과 S-S결합 절단제인 2-mercaptoethanol에 의해서는 활성이 증대되었고, SH 차단제인 σ-phenanthroline, CMB 및 금속 chelate제인 EDTA와 iodoacetate에 의해서는 활성이 현저히 저하되었다. 그리고, 정제효소의 K_m은 1.2%였으며, V_{max}는 59.5 U/mg 이었고, 20, 40, 60, 80 mesh의 크기로 제조되어진 분말 chitin에 대한 정제효소와의 반응에서 반응생성물인 acetic acid는 검출되지 않았다.

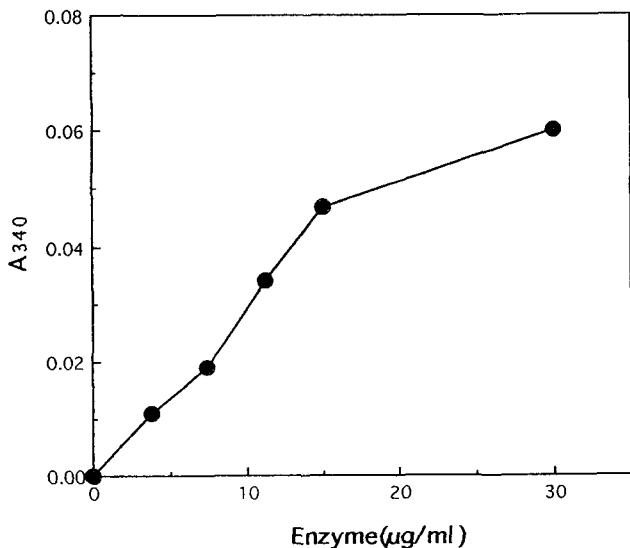


Fig. 8. Effect of enzyme concentration on the purified enzyme.

결정구조 (Jeuniaux, 1975)에 의하여, 습윤에 의한 구조의 팽창이 극히 어려워 적용한 정제효소에 의한 반응진행이 거의 일어나지 않은 것으로 생각되며 일반적으로 chitin의 경우 HCl, H₂SO₄, 및 formic acid등의 용액에 일부 용해되어지나 이는 결국 적용하고자

참 고 문 헌

- 박 성민. 1995. Carboxymethyl Chitin의 레올로지 특성과 식품에의 응용. 부산수산대학 식품공학과 공학박사 학위 논문.
- 백 운두. 1995. Chitosan용액의 물성학적 특성에 관한 연구. 부산수산대학 식품공학과 공학석사 학위 논문.
- Araki, Y. and E. Ito. 1975. A pathway of chitosan formation in *Mucor rouxii*, Enzymatic deacetylation of chitin. *Eur. J. Biochem.*, 55, 71~78.
- Arcidiacono S., S.J. Lombardi, D.A. Kaplan. 1988. Fermentation, Processing and Enzyme Characterization for Chitosan Biosynthesis by *Mucor rouxii*. Proceedings from the 4th International Conference on Chitin and Chitosan held in Trondheim.
- Bartnicki-Garcia, S. and W.J. Nickerson. 1962. Nutrition, growth and morphogenesis of *Mucor rouxii*. *J. Bacteriol.*, 84, 841~858.
- Dunkel, C. and D. Knorr. 1994. Enhancement of chitin deacetylase activity in *Mucor rouxii* and *Absidia coreluea*. *Food Biotech.*, 8, 67~74.
- Gajjar, L., R.S. Dukey and R.C. Srivastava. 1994. Activation and Stabilization of Enzymes Entrapped into Reversed Micelles. *Appl. Biotech. & Biochem.*, 49, 101~112.
- Jeuniaux Ch. 1975. Chitin et complexes chitino-proteiques de la cuticule. *Traite de Zoologie*, Vol. 8 (3).
- Hadwiger, L.A. 1984. Chitin, Chitosan and Related Enzymes, Academic Press, J.P. Zikakised., San Diago, 291~302.
- Kauss, H., W. Jeblick and D.H. Young. 1983. Chitin deacetylase from the plantpathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Plant Science Letters*, 28, 231~236.
- Kienzle-Sterzer, C.A., D.R. Rodriguez-Sanchez and C.K. Rha. 1982. Flow behaviour of a cationic biopolymer, Chitosan, *Polymer Bulletin*, 13, 1~6.
- Knorr, D. 1982. Functional properties of chitin and chitosan. *Journal of Food Science*, 47, 593~595.
- Rane, K.D. and D.G. Hoover. 1993. Production of chitosan by fungi. *Food Biotechnology*, 7, 11~33.
- Seo, H., K. Mitsukashi and H. Tanibe. 1992. Antibacterial and antifungal fiber blanched by chitosan. *Proceedings of the 5th International Conference on Chitin and Chitosan*, 34~40.
- Siegrist, J. and H. Kauss. 1990. Chitin deacetylase in cucumber leaves infected by *Colletotrichum lagenarium*. *Physiol. Molec. Plant Pathol.*, 36, 267~273.
- Weir, S., D.K. Ramsden, J. Huges and F. Le Thomas. 1994. The strength of yeast flocs produced by the cationic flocculant chitosan : Effect of suspension medium and of pretreatment with anionic polyelectrolytes. *Bio-tech., Tech.*, 8, 129~132.
- White, S.A., P.R. Farina and I. Fulton. 1979. Production and Isolation of Chitosan from *Mucor rouxii*. *Applied and Environmental Microbio.*, Aug., 323~328.

1998년 8월 25일 접수

1999년 2월 6일 수리