

## 키틴산의 가수분해에 있어 온도변화에 따른 원적외선의 영향

이준호, 김 광\*  
 동아대학교 화학공학과  
 (kkim@mail.donga.ac.kr\*)

### Hydrolysis of Chitosan through Far Infrared Radiation at Different Temperature

Jun-Ho Lee, Kwang Kim\*  
 Dept. of Chemical Engineering, Dong-A University, Korea  
 (kkim@mail.donga.ac.kr\*)

#### 서론

키틴은 *N*-아세틸-*D*-글루코사민이  $\beta$ -1,4 결합한 다당으로 그 구조가 셀룰로오스와 흡사하고 비교적 안정된 상태로 존재한다. 식물계 경우의 셀룰로오스처럼 생물체의 지지와 방호의 역할을 맡고 있는 천연의 고분자 물질이다. 또, 그 탈 아세틸화물을 키틴산이라고 칭하고 키틴산은 키틴의 알칼리처리에 의한 탈아세틸화(deacetylation)와 분해를 거쳐 얻어진다.

키틴과 키틴산은 분자구조가 거의 유사한 다당류이다. 키틴은 *N*-아세틸-*D*-글루코사민 잔당, (GlcNAc)<sub>n</sub>, 이  $\beta$ -1,4 결합한 선상다량 고분자로서 *D*-글루코사민 잔당, (GlcN)<sub>n</sub>, 이 일부 포함되어 있다.<sup>1)</sup> 키틴산은 키틴 탈아세틸화물에서  $\beta$ -1,4 폴리 *D*-글루코사민으로 정의되며 그 분자량은 키틴보다 조금 작다. 키틴은 효소 키틴나제에 의해 임의로 가수 분해되어 저분자량을 갖는 가용성 중간체로 생성되며 이 중간체에 포함된 *N*-아세틸-*D*-글루코사민 2당인 키틴바이오스는  $\beta$ -*N,N'*-디아세탈 글루코사미니다제(키틴바이아제)에 의하여 *N*-아세틸-*D*-글루코사민단당 단위로 최종 가수분해 된다.

키틴과 키틴산은 아질산, 염산, 과산화수소, 과옥소산 등의 화학적 방법으로 저분자화될 수 있지만 키틴나제와 키틴사나제등 효소의 가수분해에 의해서도 저분자화가 가능하고, 99 % 이상의 탈아세틸화된 키틴산(순수 키틴산)을 효소적 가수분해에 의하여 중합도 2~5의 키틴올리고당을 고 수율로 얻는 것이 가능하다.<sup>2)</sup> *N*-아세틸-*D*-글루코사민의 키틴올리고당은 키틴 다당류의 천연폴리머를 효소 키틴나제의 가수분해에 의하여 생산하고, *D*-글루코사민 올리고머의 생성은 키틴산 다당류를 키틴사나제에 의한 효소 가수분해로 제조될 수 있다. 또한 키틴을 키틴산으로 변환하는 효소로서 키틴디아세틸라제(chitin deacetylase)가 있다. 헤테로-키틴-올리고당은 키틴나제 또는 키틴사나제의 활성형태에 의존되어 부분적 탈아세틸화 키틴산(partially deacetylated chitosan : PDC)과 같은 여러 가지 탈아세틸화 정도에 따라서 생산될 수 있다. 헤테로-키틴-올리고당들은 *N*-아세틸화에 의하여 *N*-아세틸-*D*-글루코사민-키틴-올리고당으로 간단히 전환시킬 수 있다.<sup>3)</sup> 키틴, 키틴산을 가수분해하여 얻는 단당류인 *D*-글루코사민, *N*-아세틸-*D*-글루코사민과 소당류인 키틴올리고당, 키틴산 올리고당 등을 들 수 있다. 이와 같이 저분자 물질의 기능과 이용도 마지막 이용 자원으로서의 키틴, 키틴산의 고도 이용을 달성한다는 점에서 상당히 중요한 일이다. 이와 같은 점에서 키틴을 분해하는 키틴나아제, 키틴산을 분해하는 키틴사나아제 등, 효소를 이용한 저분자화의 연구가 차츰 늘어나고 있다.

본 연구에서는 게르마늄에 의한 원적외선의 조건에서 다른 두 온도(37°C와 41°C)에서 같은 활성의 키틴나제를 사용하여 혼합한 양이 달라졌을 때의 키틴나제가 키틴 및 키틴산의 가수분해를 통해 *N*-아세틸-*D*-글루코사민을 생산하는 양을 알아 보고자하는 것이고 다

른 한 가지는 두 가지의 온도에서 키티나제가 키틴 및 키토산을 가수분해하여 *N*-아세틸-*D*-글루코사민을 생산하였을 때 더 많은 양의 글루코사민을 생산하기 위한 원적외선이 있는 조건에서의 적합한 온도를 알아보고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 1. 미생물 배양

본 연구에서 키티나제로 사용된 *Serratia marcescens*<sup>3-5)</sup> QM B1466 균주를 고체배지에서 계대배양하여 YEPD ( 1 % yeast extract, 2 % peptone, 2 % glucose ) 액체배지에서 pH 7.0으로 30℃에서 24시간 배양하였다. 키티나제<sup>6)</sup> 효소 생성은 효소배지에서 배양하였다. 효소배지 1.5g chitin, 0.05g yeast extract, 0.136g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.03g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>의 배지에서 pH 8.5~9.0을 맞추어 250ml Erlenmeyer flask에서 30℃로 7일간 배양하여 사용하였다.

#### 2. 기질 제조

탈아세틸화 공정을 통하여 제조된 75~90 %의 부분적으로 탈아세틸화된 키토산을 사용하였다. 탈아세틸화된 키토산을 0.1 M 아세테이트 완충용액에 탈아세틸화 키토산( 75~90 % )를 0.6 %로 1000ml를 제조하였다.

#### 3. 키티나제 활성

키티나제 활성은 pH 6.0의 McIlvaine 완충용액과 Colloidal chitin을 포함한 혼합물을 37℃에서 15분간 항온 시킨 후 측정하였다. 발색 시약 용액은 0.5 M NaCO<sub>3</sub> 1 L에 0.5g potassium ferricyanide를 용해시켜 제조하였다. 이 제조된 시약 2ml에 시료 용액 1.5ml를 혼합하고 15분간 끓여 반응 정지시킨 후 420nm 흡광도를 측정하였다.

#### 4. 글루코사민의 생산

제조된 기질 1000ml를 250ml로 나누어 배양된 키티나제( 0.55unit/min )를 2ml와 4ml를 두 가지씩 각각 넣어주고 게르마늄에 의한 원적외선이 있는 조건에서 37℃와 41℃에서 2~9일간 반응 후 5분간 끓임으로서 반응을 정지하였다.

#### 5. 환원당 측정

환원당의 측정은 시간에 따라 생성된 반응 혼합물을 Schales의 방법<sup>7)</sup>에 의하여 측정하였다. 유리된 환원당의 양은 *N*-아세틸-*D*-글루코사민의 표준시약을 사용하고 Schales 법칙을 수식한 방법으로 측정하였다.

### 결과 및 고찰

본 실험에서는 두 가지의 온도에서 실험을 하였다. 효소는 단백질로 구성되어 있고 최적 온도는 30~40℃로 나타나 있다. 그리고 원적외선을 발생시키는 게르마늄의 효과는 효소가수분해 과정중의 산소 공급 촉진을 하고 식물 및 동물의 생육을 촉진 시키는 대사기능 촉진 효과가 있다. 대사기능 촉진은 효소 반응 혼합물에서 효소의 활성을 높일 것이라 사료되어진다.

동일한 온도에서 키티나제의 양에 의한 글루코사민의 차이

Fig 1.에서 보느냐와 같이 37℃에서 게르마늄이 있는 원적외선의 조건에서 효소 (0.55unit/min)를 2ml를 혼합한 것과 4ml를 혼합한 것을 비교하였다. 효소 2ml가 혼합된 것은 1.54 mg/ml로 8일에 최고값을 보였다. 4ml를 혼합한 것은 1.80mg/ml로 8일에 최고값을 보였다.

Fig 2.는 41℃에서 37℃와 동일한 조건으로 효소 2ml를 혼합한 것의 글루코사민의 양은 1.12mg/ml이고 4ml를 혼합한 것은 1.49mg/ml로 9일에 최고값을 보였다. Fig 1.과 2.에서 볼 수 있듯이 0.55unit/min의 키티나제를 사용하였을 경우 0.6%의 기질에서 키티나제 2ml의 양 보다는 4ml의 두 배의 양이 더 많은 양의 글루코사민을 생산하는 것을 알 수 있었다.

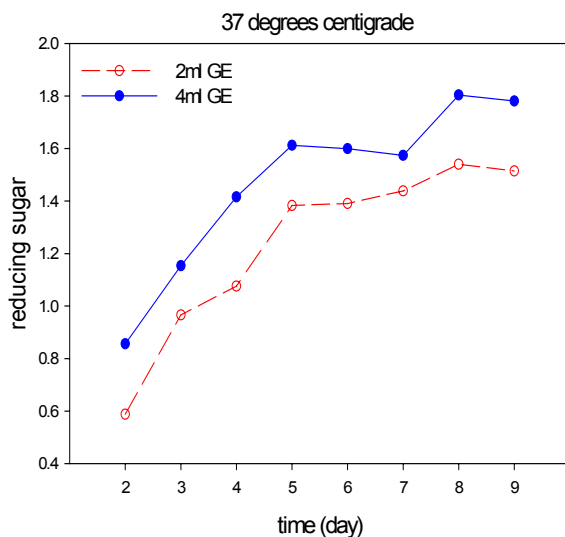
다른 온도에서 글루코사민의 차이

Fig 3.에서 보는바와 같이 37°C의 효소 2ml의 글루코사민의 양이(1.54mg/ml) 41°C의 효소 4ml의 글루코사민의 양(1.49mg/ml) 보다 많은 것을 알 수 있다. 여기서 보는바와 같이 게르마늄에 의한 원적외선의 조건에서 효소의 활성은 37°C가 41°C 보다 높음을 알 수 있다. 그러므로 37°C가 효소가 활성화하기에 적당한 온도임을 알 수 있었다. 41°C에서는 단백질로 구성된 효소가 열에 의하여 단백질이 변성되어 반응 속도가 떨어지는 것을 알 수 있었다.

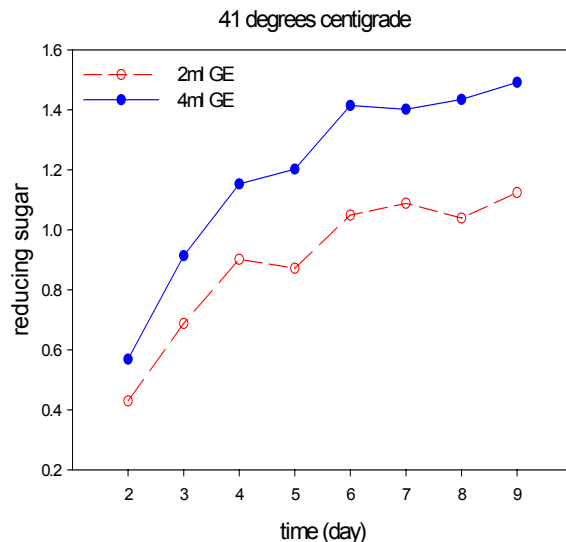
본 실험에 있어서 글루코사민의 생산 양에 영향을 미치는 다른 요인을 생각해 본다면 효소로 사용한 키티나제의 활성을 생각해 볼 수 있다. 활성이 다른 두 가지 이상의 키티나제를 사용하여 글루코사민의 생산량을 알아보고 활성의 비율로 인하여 이론상의 양을 추측해보는 실험이 필요함을 알 수 있다.

### 요약

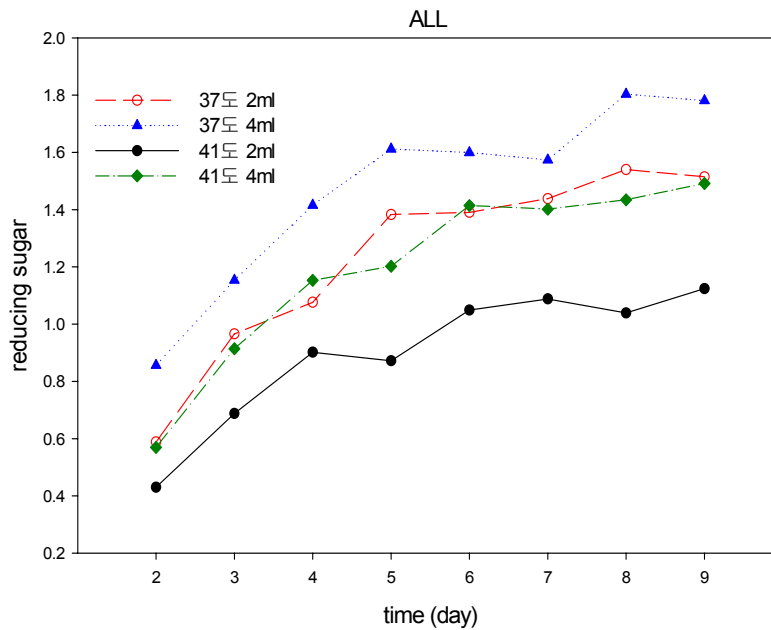
게르마늄에 의한 일정한 원적외선의 조건에서 키티나제(활성 0.55unit)를 사용하여 기질에 각각 2ml와 4ml를 혼합하여 37°C와 41°C에서 반응하여 글루코사민을 생산하였다. 글루코사민의 양은 Schales' 법에 의해 측정하였다. 글루코사민의 양은 37°C에서 키티나제 4ml를 혼합하였을 때가 가장 많은 양이 생산되었다.



**Fig 1.** Amount of glucosamine by hydrolysis of chitosan through far infrared radiation at 37 degrees centigrade



**Fig 2.** Amount of glucosamine by hydrolysis of chitosan through far infrared radiation at 41 degrees centigrade



**Fig 3.** Amount of glucosamine by hydrolysis of chitosan through far infrared radiation at 37 & 41 degrees centigrade

#### 참고문헌

1. Nishimura, K., S. Nishimura, N. Nishi, I. Saiki, S. Tokura, and I. Azuma(1984), Immunological activity of chitin and its derivatives, Japan Journal Vaccine, 2, 93-99
2. 相羽誠一, 키틴, 키토산의 화학반응성, (1990), 섬유와 공업, vol. 46, No12
3. Monreal, J. and E. T. Reese(1969), The chitinase of serratia marcescens. Canadian Journal of Microbiology, 1115, 689-696
4. Reid, J. K., and D. M. Ogyrdziak(1981), Chitinase overproducing mutant of serratia marcescens. Applied and Environmental Microbiology, 41, 664-668
5. Roberts, R. L., and E. Cabib(1982), Serratia marcescens chitinase : one-step purification and use for the determination of chitin. Analytical Biochem., 127, 402-412
6. Kim, K., A. L. Creagh, and C. A. Haynes(1998), Effective production of N-acetyl-b-D-glucosamine by serratia marcescens using chitinaceous waste. The Korea Society for Biotechnology and Bioengineering, 3, 71-77
7. Imoto, . and k. Yagishita(1971), A simple activity measurement of lysozyme. Agric. Biol. cham., 35, 1154-1156