

N-아세틸-β-D-글루코사민의 당별 분리 추출

이준호, 이강춘¹, 김 광*
 동아대학교 화학공학과, ¹동의대학교 환경공학과
 (kkim@mail.donga.ac.kr*)

Separation of N-acetyl-β-D-glucosamine produced by Chitinolytic Enzyme

Jun-Ho Lee, Gang-Choon Lee¹, Kwang Kim*
 Dept. of Chemical Engineering, Dong-A University,
¹Dept. of Environmental Engineering, Dong-Eui University
 (kkim@mail.donga.ac.kr*)

서론

키틴은 N-아세틸-β-D-글루코사민(GlcNAc)이 β-1,4결합한 직쇄상의 천연 고분자 중합체로서, 셀룰로오스와 같이 특이한 공간적 배열로 결정화된 다당류이다[1]. 그러나 이들 기능기의 차이에 따라 분자응집구조 혹은 결정구조가 각각 다르고, 그 용해도 같지 않다[2]. 셀룰로오스의 구조는 피라노스환의 2-위치의 탄소에 -OH기, 키틴의 구조는 셀룰로오스의 단위체인 글루코스의 -OH기가 -NHCOCH₃로 치환된 N-아세틸-D-글루코사민으로 구성되어 있고 셀룰로오스와 같은 β-1,4결합으로 이루어진 천연생분해성 고분자이다. 키토산은 키틴의 N-아세틸 그룹을 탈 아세틸화하여 아미노그룹으로 치환된 키틴유도체이다[3]. 그 외의 부분은 같은 구조이다. 일반적으로 키틴과 키토산은 피라노스환의 2-위치 탄소에 N-아세틸기와 10~25% 미만의 아미노기가 혼재되어 있다. 이에 따라, 보통 탈 아세틸화도가 50% 이하를 키틴이라 부르고, 50% 이상을 키토산이라 한다[4]. 따라서 키틴, 키토산은 N-아세틸기(아미노기)의 존재 비율만 다른 동일한 다당이라고 말해도 좋은 천연 고분자이다[5].

키틴과 키토산은 아질산, 염산, 과산화수소, 과옥소산 등의 화학적 방법으로 저분자화될 수 있다. 키틴과 키토산을 화학적인 방법으로 분해하면 부분적으로 탈 아세틸화되어 N-아세틸-D-글루코사민 및 D-글루코사민 단당단위가 혼재되어 있다. 또한 키티나제와 키토사나제 두 효소 모두의 가수분해에 의해서도 저분자화가 가능하고, 99% 이상의 탈 아세틸화된 키토산(순수 키토산)을 효소적 가수분해에 의하여 중합도 1~9의 키토올리고당을 고 수율로 얻는 것이 가능하다[6].

키틴의 키토올리고당, 키토산의 키토올리고당 및 부분 탈 아세틸화에 의해 제조된 키틴과 키토산의 헤테로 키토올리고당, (GlcNAc-GlcN)_n, (n<10), 은 키티나제 또는 키토사나제의 활성형태에 의존된다. 헤테로-키토-올리고당들은 N-아세틸화에 의하여 N-아세틸-D-글루코사민-키토-올리고당으로 간단히 전환시킬 수 있다[7]. 키틴, 키토산을 가수분해하여 얻는 단당류인 D-글루코사민, N-아세틸-D-글루코사민과 소당류인 키틴 올리고당, 키토산 올리고당 등을 들 수 있다. 키틴과 키토산은 체내 흡수에 다소 문제가 있어서 체내 흡수가 빠른 키토올리고당에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다[8].

종래부터 다당류의 올리고당 혼합물을 얻기 위해서 활성탄칼럼에 의한 방법이 시도되었다. 이 방법은 활성탄이 올리고당을 특이적으로 흡착하는 특성을 이용하였다. 흡착된 올리고당의 용출에는 에탄올을 사용하였다[9].

본 연구는 부분적 탈 아세틸화된 키토산(partially deacetylated chitosan: 70~90% PDC)을 기질로 키티나제를 이용하여 원적외선의 조건에서 가수분해 시켜 생성된 N-아세틸-β-D-글루코사민을 활성탄칼럼 방법으로 에탄올을 사용하여 키토올리고당을 분리 추출하였다.

재료 및 방법

1. 미생물 배양

본 연구에서 키티나제로 사용된 *Serratia marcescens* QM B1466 균주를 고체배지에서 계대배양하여 YEPD(1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) 액체배지에서 pH 7.0으로 30°C에서 24시간 배양하여 키티나제 효소생성을 하기 위하여 1.5g chitin, 0.05g yeast extract, 0.136g KH₂PO₄, 0.03g MgSO₄·7H₂O, 0.1g (NH₄)₂SO₄의 효소배지에서 pH 8.5~9.0을 맞추고 250mL Erlenmeyer flask에 50mL의 효소배지에 1%를 접종하여 30°C로 7일간 배양하여 8000rpm으로 15분간 원심분리하여 상층액을 효소용액으로 사용하였다.

2. 키티나제의 활성

키티나제의 활성은 pH 6.0의 McIlvaine 완충용액과 Colloidal 키틴을 포함한 혼합물을 37°C에서 15분간 항온 시킨 후 측정하였다. 발색 시약 용액은 0.5M NaCO₃ 1L에 0.5g potassium ferricyanide를 용해시켜 제조하였다. 제조된 시약 2mL에 시료용액 1.0mL와 증류수 0.5mL를 혼합하고 15분간 끓여 반응을 시킨 후 420nm에서 흡광도를 측정하였다. 활성 단위 1unit는 1분간에 환원당 1mol을 생성시키는 효소의 양으로 정의하였다.

3. 기질 제조

탈 아세틸화 공정을 통하여 제조된 70~90%의 부분적으로 탈 아세틸화된 키토산을 사용하였다. 0.1M 아세테이트 완충용액에 부분적으로 탈 아세틸화된 키토산을 1.0%로 3L의 기질을 제조하였다.

4. 올리고당 제조

N-아세틸-D-글루코사민 올리고당을 제조하기 위하여 제조된 기질 3L와 키티나제 (1.58units) 60mL를 게르마늄에 의한 원적외선(far infrared radiation: 원적외선 상대평균을 0.927 (주)거성 세라믹)의 조건으로 37°C에서 15일간 효소반응 시킨 후 5분간 끓임으로써 반응을 정지하였다.

5. 환원당의 측정

환원당의 측정은 시간에 따라 생성된 반응 혼합물을 Schales의 방법[10]에 의하여 측정하였다. 유리된 환원당의 양은 N-아세틸-D-글루코사민의 표준시약을 사용하고 Schales 법칙을 수식한 방법으로 측정하였다.

6. 활성탄의 선택

생성된 올리고당을 활성탄으로 흡착하기 위하여 올리고당 흡착 분리에 적합한 활성탄을 선정하기 위하여 2가지의 활성탄의 흡착성능을 시험하였다. 실험은 1L의 회분식 반응기에서 600mL의 용액에 10g의 활성탄을 넣고 anchor형 교반기로 섞어주면서 진행하였다. 평형에 도달하는 유무를 측정하기 위해 매시간 용액의 농도를 분석하였다.

7. 당별 분리 추출

선택된 활성탄(CALGON F300&400)을 30% 아세트산을 가하여 3시간을 끓이고 탈기시켜 증류수 15L로 세정하고 건조하여 무게 100g을 측정하여 5×50cm의 칼럼에 충전 하였다. 올리고당 용액 3L를 6mL/min의 유속으로 투입하여 흡착하였다. 흡착농도를 알아보기 위해서 흡광도를 측정하였다. 활성탄에 흡착된 올리고당을 분리 추출하기 위해 99.9% 에탄올을 0~30%의 농도로 단계적으로 변화하였다. 분리 추출된 용액은 흡광도에 의해 환원당을 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 올리고당의 제조

3L의 기질과 60mL의 효소를 원적외선의 조건에서 37°C로 15일 동안 효소반응을 하여 1.03mg/mL의 환원당을 얻었다.

2. 활성탄의 선택

Norit 830과 Calgon F300&400의 활성탄의 흡착성능을 실험한 결과 Norit은 0.52, Calgon

은 0.27로 Calgon이 우수한 흡착성능을 보였다. Fig. 1.는 활성탄의 용액의 흡착성능을 실험하기 위하여 매시간 환원당을 측정하는 것을 농도에 따른 곡선으로 나타낸 것이다.

3. 활성탄 흡착

용액 3L를 활성탄 칼럼에 6mL/min의 유속으로 연속적으로 흘려 흡착을 하였다. 10분당 60mL의 용액을 490분 동안 채취하였다.

칼럼을 통과한 여액은 210nm에서 흡광도를 측정하고 Schales의 방법에 의하여 420nm에서 흡광도를 측정하였다. Fig. 2.는 흡광도 값을 도식화 한 것이다. Fig. 2.에서 위쪽 곡선은 210nm의 흡광도 값이고 아래쪽 곡선은 420nm의 흡광도에서 측정된 환원당의 값을 나타낸 것이다. Fig. 2.에서 430분부터 검출된 환원당의 양은 10.36mg이고 활성탄에 흡착된 환원당은 3074.54mg으로 원액 3L의 환원당 3084.9mg의 99.66%가 흡착이 된 것을 확인할 수 있다.

4. 당별 분리 추출

흡착된 올리고당을 용출하기 위해 에탄올을 0~30%의 농도로 단계적으로 변화시켜 사용하였다. 먼저 증류수 200mL를 칼럼에 충전 하여 용액을 정제시키고 1시간 후 용액을 채취하는 것을 반복하였다. 용출된 용액은 210nm에서 흡광도를 측정하고 Schales법에 의해 420nm에서 흡광도를 측정하였다. 두 번째는 10% 에탄올을 증류수와 같은 방법으로 용액 채취를 반복하고 210nm와 420nm에서 흡광도를 측정하였다. 세 번째는 20% 에탄올을 사용하였고 마지막으로 30% 농도의 에탄올을 사용하여 증류수와 같은 방법을 반복하여 210nm와 420nm의 흡광도를 측정하였다.

측정된 값들을 시간에 따라 도식화 한 것이 Fig. 3.과 Fig. 4.와 같다. Fig. 3.은 210nm에서 흡광도를 측정한 값의 시간에 따른 그래프이고 Fig. 4.는 Schales법에 의해 420nm의 흡광도에서 측정된 환원당 값의 그래프이다. Fig. 3과 4에서 보는 바와 같이 210nm와 420nm의 흡광도에서 두 가지의 그래프는 별로 차이가 나지 않는다는 것을 알 수 있다. 그러므로 에탄올에 의한 탈착에서는 전처리를 하지 않고 시간을 단축시킬 수 있는 210nm에서 흡광도를 측정하는 것도 무방하다 할 수 있겠다.

증류수에 의해서 탈착된 용액의 환원당량은 448.8mg, 10% 에탄올용액에 의해 탈착된 환원당량은 1185.0mg, 20% 에탄올용액으로 탈착된 환원당량은 199.6mg, 30% 에탄올용액으로 탈착된 환원당량은 72.0mg이었다. 활성탄에서 에탄올의 농도에 따라 용출된 용액의 환원당은 1905.4mg으로 활성탄에 흡착된 환원당량 3074.54mg의 61.97%를 분리 추출 하였다. 분리 추출된 용액은 그 농도에 따라 HPLC에 의해서 당 분석이 가능하였다.

분리 추출된 용액 61.97%에서 증류수는 23.55%, 10% 에탄올은 62.19%, 20% 에탄올은 10.48%, 30% 에탄올은 3.78%의 환원당이 각각 검출 되었다. 절반 이상의 올리고당을 추출하였으나 더 많은 양의 올리고당을 분리 추출하기 위해서는 용출용액을 변화시키거나 정제 시간을 달리할 필요성이 있다.

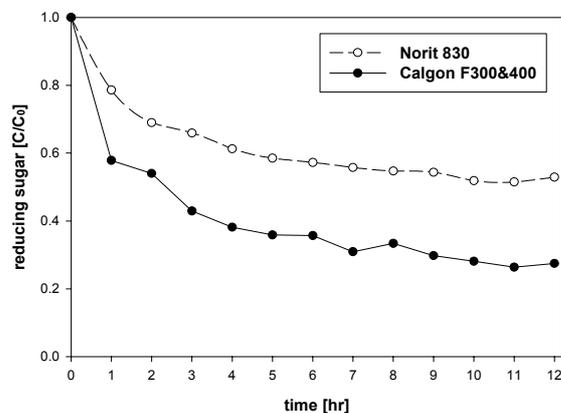


Fig. 1. Comparison between Norit 830 and Calgon F300&400 active carbon. C: reducing sugar concentration of solution(mg/mL), C0: reducing sugar concentration of original solution(mg/mL)

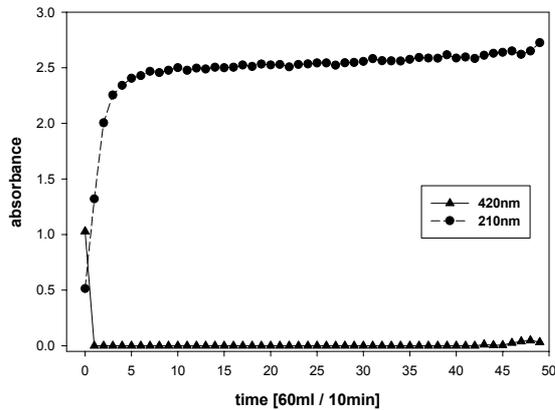


Fig. 2. Curve of adsorption from active carbon column. column size: 5×50cm, flow rate: 6mL/min. Comparison between absorbance of 210nm and 420nm.

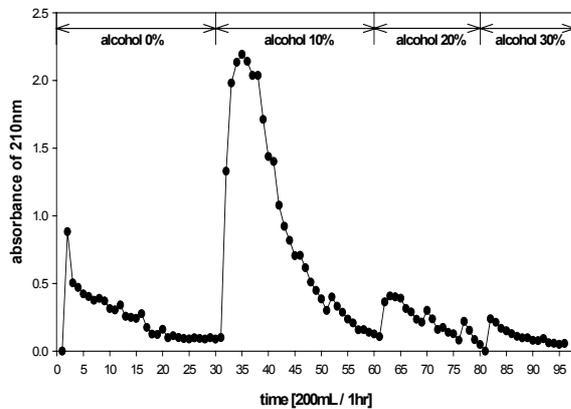


Fig. 3. Desorption curve measured at 210nm. solution fixed time: 200mL/1hr.

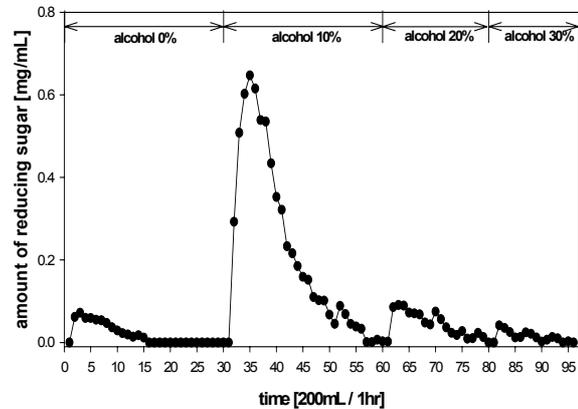


Fig. 4. Curve of desorption from active carbon column. The measure environment is absorbance at 420nm.

참고문헌

1. Chen, J. P., and M. S. Lee, "Enhanced production of *Serratia marcescens* chitinase in PEG/dextran aqueous two-phase systems", *Enzyme Microb. Technol.* 17, 1021-1027(1995).
2. 栗田 恵輔, *化學工業*, 10, 765-773(1991).
3. C. Jeuniaux, *Arch Intern. Phys. Biochem.* 72(2), 329(1964).
4. Kensuke Sakura, "キチン, キトサンの構造", *Sen-I Gakkaishi*, 46, 12, 553(1990).
5. KENSUKE SAKURAI, *SEN-I GAKKAISHI*. Vol. 46, No. 12, 553-557(1990).
6. 김광, "Action patterns of chitinase and Separations of Chitooligosaccharides Produced by Chitinolytic Hydrolysis", *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* Vol. 17, NO. 1, 100-105(2002).
7. Monreal, J. and E. T. Reese, "The chitinase of *serratia marcescens*", *Canadian Journal of Microbiology*, 1115, 689-696(1969).
8. 강길진, 조정일, "Comparison of Colorimetry and HPLC Method for Quantitative Analysis of Chitooligosaccharide", *Korean J. Food SCI. TECHNOL.* Vol. 32, No. 4, 788-791(2000).
9. 김세권, 이용호, "키틴 · 키토산 및 그 올리고당의 제조기술과 개발동향", *한국 키틴 · 키토산 연구회지* 2(1), 66-90(1997).
10. Imoto, T. and K. Yagishita, "A simple activity measurement of lysozyme", *Agric. Biol. cham.*, 35, 1154-1156(1971).