

키토사나아제

Chitosanase

정 의 이 품목은 *Aeromonas*속, *Bacillus*속 및 *Trichoderma viride*의 배양물에서 얻어진 효소제이다. 다만, 역가조정, 품질보존 등을 위하여 희석제, 안정제 등을 첨가할 수 있다.

이 품목은 키토산 중 D-글루코사민 사이의 β -1,4 결합을 endo형으로 가수분해한다.

성 상 이 품목은 백~진한 갈색의 분말, 입상, 페이스트상 또는 무~진한 갈색의 액상이다.

확인시험 이 품목의 활성시험법에 따라 시험할 때 활성을 나타내어야 한다.

순도시험 (1) 비소 : 이 품목을 비소시험법에 따라 시험할 때, 그 양은 4.0ppm 이하이어야 한다.

(2) 납 : 이 품목 5.0g을 취하여 원자흡광광도법 또는 유도결합플라즈마발광광도법에 따라 시험할 때, 그 양은 5.0ppm 이하이어야 한다.

(3) 대장균군 : 이 품목은 「식품의 기준 및 규격」 일반시험법의 미생물 시험법 중 대장균군에 따라 시험할 때, 제품 1g당 30 이하이어야 한다.

(4) 살모넬라 : 이 품목은 「식품의 기준 및 규격」 일반시험법의 미생물 시험법 중 살모넬라균 시험법에 따라 시험할 때, 음성(-)이어야 한다.

(5) 대장균 : 이 품목은 「식품의 기준 및 규격」 일반시험법의 미생물 시험법 중 대장균에 따라 시험할 때, 음성(-)이어야 한다.

활성시험법(역가)

분석원리 : 본 역가시험은 pH 5.0, 온도 48℃에서 chitosan 기질의 가수분해에 근거를 두고 있다. 가수분해에 의하여 생성된 환원당인 글루코사민을 알칼리성페리시아나이드 시액과 반응시켜 흡광도측정법으로 측정하는데 근거를 두고 있다.

시험용액의 조제 : 시험조건하에서 최종희석액 1mL가 효소공시험용액과의 흡광도차이가 0.1~0.5의 범위가 되도록 일정량을 취한 다음 0.05M 초산염완충액에 녹여 시험용액을 조제한다.

시험조작 : 기질용액 2mL를 시험관에 넣고 이에 미리 48℃의 수욕조에서 5분간 항온시킨 시험용액 1mL를 정확히 가해주고 흔들어 혼합한 후 수욕조에 방치한다. 정확히 5분 후 시험관을 끓는 수욕조에서 3분간 가열하여 효소반응을 중지시킨 다음 상온으로 식혀준다. 따로 효소공시험용으로 시험용액 대신 미리 수욕조에서 3분간 가열실활시킨 시험용액 1mL를 사용한다. 별도로 2개의 시험관에 물 1.4mL를 각각 넣고 이에 위의 효소반응액 0.1mL와 효소공시험반응액 0.1mL를 각각 가해준 다음 알칼리성페리시아나이드시액 2mL씩을 가해 주고 끓는 수욕조에서 15분간 가열하고 상온으로 식힌 다음 액층 1cm, 파장 420nm에서 효소시험용액과 효소공시험용액의 흡광도를 각각 측정하여 검량선에서 D-글루코사민의 농도($\mu\text{mol/mL}$)를 구한다.

검량선의 작성 : 미리 건조 항량시킨 D-글루코사민염산염 215.6mg을 정밀히 달아 물을 가하여 100mL로 한다. 이 액을 사용하여 1mL당 D-글루코사민을 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 μ mol/mL을 함유하도록 글루코사민 표준용액을 각각 조제한다. 각 표준용액 1mL와 물 2mL를 각 시험관에 넣고 시험관 모두를 끓는 수욕조에서 3분간 끓여주고 상온으로 식힌 다음 시험조작의 「별도로 2개의 시험관에」 이하와 동일조작을 행한다. 따로, 표준용액 1mL 대신 물 1mL를 사용하여 시험한 것을 대조액으로 하여 액층 1cm, 파장 420nm에서 각각의 흡광도를 측정하고 글루코사민표준용액의 농도(μ mol/mL)에 대한 검량선을 작성한다.

다음의 계산식에 따라 효소제의 역가를 구한다.

$$\text{역가(CU/mL 또는 g)} = \frac{A}{5 \times W}$$

A : 검량선에서 얻은 시험용액의 D-글루코사민 표준용액의 농도(μ mol/mL 또는 g)

5 : 반응시간(분)

W : 시험용액 1mL에 함유된 검체의 양(mL)

역가의 정의 : 1 Chitosanase unit(CU)는 상기시험조건 하에서 분당 1 μ mol의 D-글루코사민에 상당하는 환원당을 유리시키는 효소의 양이다.

시 액

0.05M 초산염완충액(pH 5.0) : 0.1M 초산 14.8mL와 0.1M 초산나트륨용액 35.2mL를 혼합하고 물을 가하여 100mL로 한다. 이 용액의 pH는 5.0이어야 한다.

기질용액 : 키토산(Sigma-Aldrich Co. 또는 이와 동등한 것) 0.2g
을 물 40mL에 현탁시키고 1.0M 초산 10mL를 가하여 교반 용해시
킨 후 1.0M 초산나트륨용액을 가하여 pH를 5.0으로 조절한 다음
0.05M 초산염완충액(pH 5.0)을 가하여 100mL로 한다. 이 용액은 냉
장고에 보관한다.

알칼리성페리시아나이드시액 : 페리시아노화칼륨($K_3Fe(CN)_6$) 0.5g을
0.5M 탄산나트륨용액 1,000mL에 녹인다. 이 액은 갈색병에 넣어 밀
봉하여 보존한다.

보존기준

냉암소에서 밀봉 보존하여야 한다.