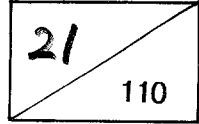


664.018
L273-7

G1249-0856



최종보고서

19804696

국내산 키틴의 고순도화 및 제품다양화에 의한 고부가가치 기술개발

Development of Value-added Technology by High Purification
and Product Diversification of Domestic Chitin

연구기관
한국식품개발연구원

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “국내산 키틴의 고순도화 및 제품다양화에 의한 고부가가치 기술개발”의 최종보고서로 제출합니다.

1997. 11. 30.

주관연구기관명 : 한국식품개발연구원

총괄연구책임자 : 김 중 태 (산업화연구부)

황 재 관 (연세대학교, 구연구책임자)

연 구 원 : 김 철 진 (산업화연구부)

안 병 학 (생물공학연구부)

전 향 숙 (생물공학연구부)

김 왕 준 (생물공학연구부)

홍 상 필 (수산물이용연구부)

홍 석 산 (생물공학연구부)

이 수 정 (산업화연구부)

장 현 주 (생물공학연구부)

위탁연구기관명 : 김제농촌지도소

위탁연구책임자 : 장 현 구 (김제농촌지도소)

연 구 원 : 조 광 우 (김제농촌지도소)

김 찬 (한국키토산(주))

여 백

요 약 문

I. 제목

국내산 키틴의 고순도화 및 제품다양화에 의한 고부가가치 기술개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

현재 국내의 경우 키틴생산이 일반적인 산, 알칼리 세척공정에 의존하므로써 순도가 높지 않은 제품이 생산되고 있으며, 외국의 경우에는 용도 및 순도에 따라 여러종류의 제품이 생산되고 있다. 키틴은 대부분의 용매에 불용성이며, 또한 키토산의 경우에도 묽은 산용액에만 녹고 물에는 녹지 않기 때문에 적용범위가 크지 않다. 키틴 및 키토산을 수용화하는 방법은 키틴의 아세틸기 조절에 의한 방법과 키틴이나 키토산에 각종 기능기를 부착하여 유도체를 형성하는 것이다. 이같은 유도체 형성에 의한 수용화기술은 대부분 실험실적인 연구에 국한되어 있으며, 이를 실제적으로 공정측면에서 scale-up하여 제품의 표준화를 이룰 수 있는 연구가 미흡하다.

키토산은 제조방법에 따라 차이가 생기나 대개 분자량이 $10^5 \sim 10^6$ 에 이르는 거대분자물질이기 때문에 증점제, 필름형성제, 안정제 등의 적용에는 적당하나, 다른 응용 즉, 항균제, 의약품제제, 화장품제제, 저점성의 식품 등에는 사용하기 어렵다. 따라서 키토산의 분자크기를 효율적으로 조절할 수 있는 화학적, 물리적 및 효소적 처리기술의 개발이 필요하다. 키틴의 경우 향후 고부가가치 제품 즉, 의약품 주사제, 인체내 자연분해성 봉합사, 생리활성제, 천연 방부제 등への 적용폭이 확대될 것으로 보아 그 경제적 전망이 매우 밝다. 또한 외국의 경우에도 의약, 화장품 및 식품용에 사용되는 고순도의 키틴에 대한 수요가 급격히 증가하고 있다. 따라서 국내에서 순도를 향상시키는 기술을 개발할 경우 수출가능성이 매우 높을 것으로 예상된다.

최근 식품의 일반 구매 형태를 보면 건강 지향성 식품 및 자연식품에 대한 판매가 급증하고 있으며, 따라서 고순도의 키틴 관련제품의 생산은 국민건강 및 생물산업발

전에 기여할 수 있다. 또한 키틴은 식품 첨가제 및 건강식품 원료로 승인되어 현재까지 키틴, 키토산 및 이들 유도체의 각종 유효 기능성에 대한 연구가 많이 보고되어 왔기 때문에 앞으로 이들 소재에 대한 수요가 급증할 것으로 것으로 생각된다. 따라서 국내에서 이들 소재의 경제적인 제조공정 개발 및 고부가가치의 제품을 개발함으로써, 외국의 제품과 상품경쟁력을 갖추어야 할 것이다.

한편, 근래에 들어와 식품 신소재로 관심이 집중되고 있는 키토산 및 키토산 소중합체의 항암활성을 포함한 여러 생리활성은 주로 분자량과 관련이 깊다고 알려져 있다. 즉, 분자량에 따라서 고유한 생리활성의 발현도 가능해지는데 항암활성에 대한 많은 연구는 용해성, 항원성, 점도, 독성 및 체내 축적정도 등의 측면을 고려하여 주로 소중합체와 같은 저분자 키토산에만 국한되어 이루어졌다. 그러나 키토산은 여러 가지 크기의 분자량을 갖는 고분자 사슬의 집합체이고 현 시점에서 식품에 사용이 허가되어 유통되고 있는 것은 분자량이 수만에서 수십만에 달하는 키틴 및 키토산이므로 intact chitosan과 소중합체를 동시에 비교하거나 전 분자량 영역에 걸쳐 활성을 조사하고 비교하는 연구가 먼저 이루어져야 할 것이다. 그래야만이 키틴 및 키토산의 항암활성과 분자량과의 관계를 상세히 알 수 있으며 특히 활성을 나타내는 키틴 및 키토산 분해물질의 제조가 가능하게 되는 것이다. 그러나 키토산의 전분자량 범위를 대상으로 어떤 분자량 범위의 키토산이 특이적으로 활성을 나타내는지 살펴본 예는 없으므로 이에 대한 연구가 이루어져야 할 것이다.

따라서 본 연구에서는 키틴 제품의 다양화를 위한 분자량 조절 및 수용화 기술과 생산소재의 기능성 구명 및 적용성 확인을 통한 고순도화 기술의 개발을 시도하였으며, 키토산의 분자량에 따른 항돌연변이 활성, 항종양 활성 및 거식세포를 중심으로 한 면역활성 증진 등의 생리활성을 *in vivo*와 *in vitro*방법으로 살펴보았다. 또한, 토양 및 종자 개량제 등의 농가수익성 제고를 위한 적용도 개발을 위하여 키토산 처리를 통한 노지 고추와 다산벼 재배실험을 실시하였다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. 키토산 생산의 최적화 공정개발

- 가. 키토산의 물리적 전처리에 의한 키토산 생산기술
- 나. 키토산의 분자량 조절
- 다. 수용성 키토산의 제조
- 라. 키토산의 항균성

2. 키토산의 생리활성

- 가. 가수분해물의 이화학적 특성
- 나. *In vitro* 항돌연변이 활성
- 다. 면역 증강 활성
- 라. 항암 활성

3. 키토산의 노지고추 재배 적용실험

- 가. 고추 재배를 위한 농업용 키토산의 제조
- 나. 고추종자의 발아 및 본포의 생육 실험
- 다. 키토산 처리된 고추의 병충해 발생정도
- 라. 키토산 처리후 수확한 고추의 생산성

4. 다산벼의 미질향상을 위한 키토산 적용실험

- 가. 다산벼 재배를 위한 농업용 키토산의 제조
- 나. 키토산 처리농도에 따른 육묘시 생육상태
- 다. 키토산 처리농도에 따른 출수후 생육상태 및 예상수량
- 라. 수확된 다산벼의 품질특성

IV. 연구개발 결과 및 활용에 관한 건의

1. 키토산 생산의 최적화 공정개발

키토산의 물리적 전처리 기술에 의한 고순도의 키토산을 생산하기 위하여 압출성형과 autoclaving 공정을 적용하였고, 키토산의 분자량 조절기술의 개발을 위한 물리적 및 화학적 처리방법을 시도하였다. 키토산의 식물생장 촉진효과 실험을 통하여 노지 고추의 재배기술을 개발하기 위하여 발아율, 병충해 정도, 생육정도, 수확량, 토양개선 효과 등을 살펴보았다.

키토산을 고온, 고압 및 전단력(shear force)을 동반하는 압출성형 공정에 의하여 전처리 하였을 경우 처리하지 않은 시료에 비하여 동일한 NaOH 농도에서 용해도는 약 10~25%, 탈아세틸화도는 약 10% 가량 증가하는 현상을 보였다. 따라서 압출성형 공정은 현장적용 기술에 접목시킬 경우 키토산 생산에 사용되고 있는 기존의 과도한 NaOH 처리조건을 완화시킬 수 있는 공정으로 판단된다. 한편, 고온, 고압 및 autoclave 처리에 의한 키토산의 전처리 과정은 처리하지 않은 키토산에 비하여 큰 차이를 보이지 않았다. 이는 압출성형 과정에서 높은 전단력이 키토산의 조직을 이완시키는 데 중요한 역할을 하고 있다는 것을 의미한다.

키토산의 분자량 조절은 키토산 생산공정 및 키토산의 NaOH 세척공정의 조절에 의하여 시행하였다. GPC에 의하여 생산시료의 무게평균분자량(weight average molecular weight)을 측정된 결과 약 40,000~1,500,000의 분자량을 보였다. 특히, 분산도(polydispersity)를 거의 일정하게 유지할 수 있는 기술을 확립하였다. 따라서 이같은 다양한 분자량의 키토산은 각종 식품 및 관련 산업에 있어서 다양하게 적용될 수 있다. 한편, 각 생산소재의 물성으로는 분자량별 고유점도, NaCl 농도변화에 따른 고유점도의 변화, 분자량별 형태학적 특징(conformation), 진한 용액에서의 전단점도 특성, $\eta_{sp,0}$ 대 $C[\eta]$ 관계에 따른 키토산 용액의 엉킴현상 등의 연구를 수행하였다. 이와 같은 유동특성은 앞으로 키토산의 산업적 이용에 중요한 정보로서 활용될 것이다.

2. 키토산의 생리활성

본 연구에서는 계껍질 급원의 키토산을 산가수분해 및 한외여과법으로 제조한 키토산 가수분해물이 분자량에 따라 생리활성이 어떤지 알기 위해 *in vivo* 및 *in vitro* 항암 및 면역증강 활성을 알아보았다.

가. 키토산 가수분해물의 이화학적 특성

한외여과법에 의해 키토산 가수분해물의 6가지 분획(분자량 범위에 따라 chitosan hydrolysate fraction 1(CH-1) : 1,000 이하, chitosan hydrolysate fraction 2(CH-2) : 1,000~3,000, chitosan hydrolysate fraction 3(CH-3) : 3,000~10,000, chitosan hydrolysate fraction 4(CH-4) : 10,000~30,000, chitosan hydrolysate fraction 5(CH-5) : 30,000~100,000 및 chitosan hydrolysate fraction 6(CH-6) : 100,000 이상)을 얻을 수 있었다. 각 분획의 infrared spectrum 분석에 의해 산출된 탈아세틸화도는 69~80%였으며, 점도 측정을 통해 분자량의 차이를 알 수 있었으며, HPLC를 이용하여 측정된 각 분획의 평균분자량은 한외여과법에 의한 결과와 거의 일치됨을 확인할 수 있었다.

나. 항돌연변이 활성

세균을 이용한 *Salmonella typhimurium* reversion assay 및 SOS chromotest에 의해 항돌연변이 활성을 측정한 결과, *Salmonella typhimurium* reversion assay에서는 Trp-P-2, aflatoxin B₁(AFB₁) 및 2-nitrofluorene(2-NF)의 변이 작용에 대해 각각 0~78%, 0~92% 및 0~51%의 억제활성을 나타내었다. 키토산 가수분해물 중 최고 활성을 나타낸 것은 Trp-P-2에 대해 CH-6의 5 mg/plate, AFB₁에 대해 CH-5의 10 mg/plate, 2-NF에 대해 CH-6의 5 mg/plate 농도에서였다. *Escherichia coli* PQ 37을 이용하여 SOS chromotest를 실시한 결과, Trp-P-2의 변이 작용에 대해 CH-6의 10

mg/plate 농도, 4-NQO에 대해 CH-5의 1 mg/plate 농도에서 가장 큰 SOS 유도 저해 활성을 보였다. 또한 키토산 가수분해물의 돌연변이 억제 방식을 CH-5와 CH-6을 이용하여 시험한 결과, Trp-P-2의 변이 작용에 대해 모두 bio-antimutagenic action을 나타냄을 알 수 있었고, CH-5는 시험한 전 농도에서, CH-6은 5 mg/plate의 농도까지 용량-반응 관계를 보여주었다.

다. 면역 증강 활성

Continuous macrophage cell line J774A.1을 이용한 nitrite 생성능을 비교한 결과, 키토산 가수분해물의 농도가 2 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 일 때, 분자량이 증가할수록 nitrite 농도가 비례적으로 증가하였으며, CH-2 및 chitosan이 최고 35 $\mu\text{M}/2 \times 10^5$ cells의 nitrite를 분비하였다. Lipopolysaccharide로 활성화된 J774A.1이 생성하는 nitrite 농도는 CH-2의 200 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 농도일 때 최고치를 보였다. 한편, hydrogen peroxide 분비능을 측정된 결과, CH-5의 200 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 농도에서 894 $\mu\text{M}/\text{mg}$ macrophage protein 및 CH-6의 20 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 농도에서 1044 $\mu\text{M}/\text{mg}$ macrophage protein의 최고 분비능을 나타냈다. 또한 interleukin-1 α (IL-1 α) 분비능은 CH-4, CH-6 및 키토산에서만 나타났고, tumor necrosis factor(TNF)의 경우도 CH-4, CH-5, CH-6 및 키토산에서 분비능이 컸으며, CH-4의 200 $\mu\text{g}/\text{assay}$, CH-5의 20 $\mu\text{g}/\text{assay}$, CH-6의 20 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 및 키토산의 2 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 농도에서 높은 TNF 분비능을 나타냈다.

Thioglycollate-elicited BALB/c mouse spleen cell에 키토산 가수분해물 및 mitogen을 첨가했을 때, concanavalin A(ConA)의 경우, 1.5 및 3.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 모두에서 PBS에 비해 CH-1, CH-6 및 키토산이 더 높은 stimulation index(SI) 수치를 나타냈고, phytohemagglutinin(PHA)은 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도일 때, CH-1을 제외한 모든 시료가 면역세포 증식효과를 나타냈다.

종양이 유발된 BALB/c mouse에서 면역 관련 장기의 무게 변화를 살펴본 결과, spleen의 체중 당 무게는 CH-6군이 $\alpha=0.05$ 수준에서 control군에 비해 유의적으로

큰 수치를 나타냈다. Peritoneal macrophage cell에 의한 IL-1 α 분비능은 control군과 비교했을 때 $\alpha=0.01$ 수준에서 유의적 차이를 나타내는 군은 없었으나, TNF 분비능에 있어서는 CH-6군 및 키토산군이 control군과 비교하여 $\alpha=0.01$ 수준에서 유의적으로 큰 값을 나타냈다.

종양을 유발시킨 BALB/c mouse로부터 얻은 비장세포를 이용하여 interleukin-2(IL-2) 분비능을 측정한 결과, 키토산군이 다른 군에 비해 $\alpha=0.05$ 수준에서 유의적으로 큰 수치를 보였다. 여기에 Con A를 첨가했을 때, 키토산군이 유의적으로 가장 큰 수치를 보였으며 concanavalin A-stimulated lentinan군(C-Lentinan군), C-CH-5군 및 C-CH-6군도 IL-2 분비능이 유의적으로 큼을 알 수 있었다. 한편, 비장세포에 Con A, PHA, LPS를 첨가했을 때 세포증식여부를 측정한 결과, Con A를 1.5 및 3.0 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 첨가시 Lentinan군, COS-6군, CH-5군, CH-6군 및 chitosan군의 SI 값이 유의적으로 높았으며, PHA 첨가시 1.5 및 3.0 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 Lentinan군이 유의적 차이를 보였고, LPS 첨가시 1.5 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 CH-5군, CH-6군 및 키토산군이 유의적으로 큰 SI값을 나타냈다.

라. 항암 활성

[3-4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay를 이용하여 키토산 가수분해물의 *in vitro* 암세포 치사활성을 측정한 결과, sarcoma 180 cell line에 대해서는 각 분획간 치사활성의 차이가 거의 없었고, L 1210 cell line의 경우 60~115%, U-937 cell line은 41~109%, SNU-1 cell line은 8~116%, SNU-182 cell line은 14~111% 그리고 SNU-C4 cell line은 7~115%의 생존율을 나타냈다.

Sarcoma 180으로 종양을 유발한 BALB/c mouse에 대한 키토산 가수분해물의 종양 성장 억제 활성은 CH-6군이 91%로서 가장 컸고, 그 다음 CH-5군이 84%, 키토산군이 77% 및 COS-6군이 75%를 나타냈다.

결론적으로 종합해보면, 평균분자량이 다른 키토산 가수분해물의 항암 및 면역 증강 활성은 거의 모든 시험계에서 공통적으로 CH-5 및 CH-6이 나타났다. 기존의 보고에서 활성이 강하다고 알려진 oligosaccharide의 효과는 본 연구에서는 시험계에 따라 차이를 보여, 동물 실험의 일부에서만 활성을 나타냈다. 본 연구 결과, intact chitosan이나 oligomer보다는 CH-5 및 CH-6의 분자량 범위에서 생리 활성을 보였으므로 특이 활성을 나타내는 키토산 분해물질의 제조에 이용가능할 것으로 보인다. 그러나 이를 위해서는 향후 키토산 분해물질 제조 방법의 표준화, 경구 섭취시의 효과 유무, 독성 시험 등에 대한 후속 연구가 수행되어 항암 및 면역 활성 그리고 그 분명한 기전이 규명되어야 할 것으로 생각된다.

3. 키토산의 노지고추 재배적용 실험

키토산의 식물생장 촉진효과 실험을 통하여 노지고추의 재배기술을 개발하기 위하여 발아율, 병충해 정도, 생육정도, 수확량, 토양개선 효과 등을 살펴보았다. 키토산을 노지고추에 적용하였을 경우 발아율이 증가하고, 높은 염농도에서도 발아율이 높게 나타났으며, 고추묘와 본포에서의 생육상태가 무처리군에 비하여 향상되었다. 또한 탄저병, 풋마름병, 역병, 담배나방 등 병충해의 방제에도 뛰어난 효과를 보였다. 특히, 고추의 최종 생육량에 있어서 키토산을 처리하였을 경우 약 15~30%의 생육량 증가현상을 보였다. 결론적으로 키토산을 노지고추 재배에 적용할 경우 병충해의 예방과 수확량 증가에 크게 기여할 수 있어 앞으로 농가의 소득향상에 크게 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

4. 키토산을 이용한 다산벼의 미질향상 실험

농업용 키토산을 100배, 200배 및 500배의 농도로 희석한 용액처리군에서는 농도가 높을수록 입고병을 발생시키는 후사리움균의 발생이 억제되었다. 출수후 1차 키토

산 회석용액의 농도와 처리시기에 따른 생육상태는 1포기당 줄기수는 모든 처리구에서 큰 차이를 보이지 않았고, 키토산 회석용액 200배로 종자와 출수기에 처리한 경우 21개로 제일 높았다. 다산벼의 재배시 키토산을 처리할 경우 117%의 증수효과가 확인되어 농작물의 생산성 향상을 위한 다양한 농업용 제재로의 활용이 가능할 것으로 예상된다. 키토산을 처리한 경우 식미에 영향을 주는 단백질 함량이 큰 차이는 없었으나, 경도, 부착성, 탄성에 변화를 주는 효과가 발견되었다. 또한, 밥의 관능평가는 전체적인 기호도가 대조구와 비교할 때 약간 좋은 결과를 보여 키토산 처리를 통한 다산벼 재배시 쌀의 식미를 개선할 수 있을 것으로 판단된다. 따라서 본 연구결과에서 밝혀진 바와 같이 생육과 쌀의 품질에 큰 영향을 미칠 수 있는 키토산 용액의 회석농도를 100~500배 수준으로하여 벼 재배 실험에 적용하는 지속적인 연구가 실시된다면 다산벼 쌀의 식미개선 향상에 기여할 수 있는 바람직한 결과를 얻을 수 있을 것으로 판단한다.

여 백

SUMMARY

I. Subject

Development of Value-added Technology by High Purification and Product Diversification of Domestic Chitin

II. Objective and Significance

In Korea, chitin and chitosan are produced industrially from shell-fish waste (crab and shrimp), and that may have low-grade quality because of the purification process with strong acid and alkali treatment. In foreign country, lower case, many kinds of product are produced depend on the application and purity. Chitin is insoluble in most solvent; especially, there is limited use of chitosan not being used in many commercial application. The solubilization of chitin and chitosan can be achieved by controlling the degree of acetylation and preparing their derivatives in addition to the introduction of functional groups. Most of derivatation technology are carried out on a laboratory scale, and there are necessity to standardize the product by the scale-up technique on a process point of view.

Chitosan shows different properties depend on the preparation method, and it is suitable for use in thickening, film forming and stabilizing agent due to it is a macromolecular material having a molecular weight of $10^5 \sim 10^6$. However, it is difficult to use as an antimicrobial agent, medicals, cosmetics and low viscosity food. Therefore, we are necessary to develop the technology of chemical, mechanical and enzymatic treatment to adjust the molecular size suitably. For

chitin, it seems to be a good prospect because of an application will be extended to the valued-added product, such as medical injection, biodegradable wound dressing and natural preservatives, in the future. Also, in the actual state, there is a strong need for high purity chitin being used in medical, cosmetics and food market, it can be said that the possibility of export will be very high when improved technology would be developed in the nearest future.

Recently, there has been considerable improvement in consumption of health and natural foods, and the production of high quality chitin-related product can be contributed to the human health and growth of bioprocess industry. Moreover, there will be a rapid increase in demand for chitin product owing to the report about efficient functionality of chitin, chitosan and its derivatives since they are approved as a food additive or source for health food up to now. Since we will beat the competition with foreign product, if such development of economic process and valued-added product could be established.

It is well known that an anticarcinogenic and immunopotentiating effects of chitosan and its oligomers are mainly related to molecular weight. Many researches on the anticarcinogenic activity are established only on solubility, viscosity, antigen, toxicant and degree of accumulation in the body. However, both chitin and chitosan products are high molecular polymer having various molecular size. So, first of all, in order to study the anticarcinogenic activity of chitin and chitosan, research should be established on comparing intact chitosan with oligomer and examining on activity over the wide range of molecular weights. After then we can recognize the relationship between anticarcinogenic activity of chitin or chitosan and molecular weight, and can prepare chitin, chitosan and some of its derivatives offering specific activity.

This study was performed to develop the value-added technology for the diversification of chitin product and solubilization through characterization of the functionality and applicability of product; investigate the average molecular weight range of chitosan hydrolysates showing anticarcinogenic and immunopotentiating effects; and develop the cultivation technology of red pepper and Indica type rice in order to apply the chitosan in seed conditioning and farming land. It can contribute for the prevention from blight damage and harmful insects and the increment of harvest and the increase of income of farm-household.

III. Contents and Scope of Research

1. Development of optimum process of chitosan production
 - A. Production technology of chitosan by using physical pre-treatment
 - B. Controlling of molecular weight of chitosan
 - C. Preparation of water-soluble chitosan
2. Physiological activity of chitosan
 - A. Physical and chemical properties of chitosan hydrolysates
 - B. Inhibitory effects of chitosan hydrolystes on the chemically induced mutagenesis
 - C. Immunopotentiating activity
 - D. Anticarcinogenic activity
3. Development of cultivation technology of the red pepper
 - A. Preparation of chitosan solution for red pepper cultivation
 - B. Germination and raising seedling of red pepper
 - C. Degree of blight damages and harmful insects of red pepper
 - D. Productivity of red pepper after harvest

4. Development of cultivation technology of the Indica type rice
 - A. Preparation of chitosan solution
 - B. Growth condition of rice during raising seedling
 - C. Growth condition of rice during earing season and the quantity of harvest
 - D. Quality characteristics of rice cropped with chitosan treatment

IV. Results and Recommendation

1. Development of optimum process of chitosan production

Extrusion and autoclaving processes were applied for producing high purified chitosan by physical pre-treatment technology of chitin, and physical and chemical treatment methods were attempted for controlling the molecular weight of chitosan.

From the chitin samples pre-treated by the extrusion process with a high temperature, a high pressure and the shear force, about 10-25% increment of the solubility and about 10% increment of deacetylation were observed at the same concentration of NaOH comparing to non-treated ones. Therefore, if the extrusion process was practically applied, the current excessive treatment of NaOH could be reduced. On the other hand, chitin samples pre-treated by autoclaving with the high temperature and the high pressure showed no big difference to non-treated ones. It means that the high shear force played an important role in relaxing chitin tissues during the extrusion processing.

The molecular weight of chitosan was controlled by controlling the chitin producing process and the NaOH washing process. The average molecular weight of produced samples measured by GPC was approximately 40,000-1,500,000 Da. Especially, the technology of maintaining polydispersity almost at constant level was established. Thus, various molecular weight of chitosans can be diversely

used in many areas of food and food related industries. In addition, each material properties for producing such as peculiar viscosities of different molecular weights, the change of peculiar viscosity due to the change of NaCl concentration, conformation for producing different molecular weight, the characteristics of shear viscosity of high concentrated solution, the coagulation of chitosan solution related to $\eta_{sp,0}$ vs. $[\eta]$, etc., were investigated. These rheological properties can provide important knowledge for industrial application.

2. Physiological activity of chitosan

This study was performed to investigate the average molecular weight range of chitosan hydrolysates showing anticarcinogenic and immunopotentiating effects.

A. Physicochemical properties of chitosan hydrolysates

Six fractions of chitosan hydrolysates(MWCO: <1,000 CH-1, 1,000~3,000 CH-2, 3,000~10,000 CH-3, 10,000~30,000 CH-4, 30,000~100,000 CH-5, >100,000 CH-6)were obtained by acid hydrolysis and ultrafiltration. Degree of deacetylation by IR spectral analysis of each fraction was 69~80%. Intrinsic viscosity tended to increase upon the increasing of molecular weight and measurement of average molecular weight of each fraction by GPC was nearly the same as in the result of ultrafiltration method.

B. Inhibitory effects of chitosan hydrolysates on chemically induced mutagenesis

Chitosan hydrolysates showed antimutagenic effect of 0~78% on Trp-P-2, 0~92% on aflatoxin B₁ and 0~51% on 2-nitrofluorene in *Salmonella typhimurium* reversion assay. Inhibitory effect in *Salmonella typhimurium* reversion assay

showed the highest at 5% concentration of CH-6 on Trp-P-2, 10% concentration of CH-5 on aflatoxin B₁ and 5% concentration of CH-6 on 2-nitrofluorene. In SOS chromotest, inhibitory effect on direct SOS function induced by Trp-P-2 showed the highest at 10% concentration of CH-6 and that on direct SOS function induced by 4-NQO showed the highest at 1% concentration of CH-5. The mode of antimutagenic action of chitosan hydrolysates(CH-5 and CH-6) was observed as bio-antimutagenic rather than desmutagenic action in inhibitory effect on the mutagenicity of Trp-P-2.

C. Immunopotentiating activity

Nitrite production by continuous macrophage cell line J774A.1 treated with samples was measured and the results showed that nitrite concentration was increased proportionally upon increasing of molecular weight at 2 μg /assay concentration of chitosan hydrolysates. Nitrite production was the highest at 2 μg /assay concentration of intact chitosan. Hydrogen peroxide production J774A.1 showed the high value of 894 μM /mg macrophage protein at 200 μg /assay concentration of CH-5 and also the high value 1044 μM /mg macrophage protein at 20 μg /assay concentration of CH-6. CH-4, CH-6 and chitosan enhanced IL-1 production, while the others did not. TNF production showed the high value at 200 μg /assay concentration of CH-4, 20 μg /assay concentration of CH-5, 20 μg /assay concentration of CH-6 and 2 μg /assay concentration of chitosan.

Spleen weight per g body weight of CH-6 group in the sarcoma 180-bearing mouse significantly showed higher value than that of control group($p < 0.05$). IL-1 production by peritoneal macrophage cells from tumor-bearing mouse BALB/c mouse was not significantly different among groups. But, TNF production

showed significantly higher value in CH-6 group than the control group ($p < 0.01$). IL-2 production by splenocytes from tumor-bearing mouse showed significantly higher value in chitosan group than other groups ($p < 0.01$). Spleen cells to which Con A was added brought about significantly the highest IL-2 production in chitosan group and C-Len, C-CH-5 and C-CH-6 groups showed significantly high level of IL-2 production. When splenocytes were stimulated with Con A, PHA and LPS, mitogenesis expressed as stimulation index showed that Len, COS-6, CH-5, CH-6 and chitosan group were significantly higher than another group at 1.5 $\mu\text{g/ml}$ and 3.0 $\mu\text{g/ml}$ concentration of Con A. Stimulation index of Len group was significantly higher than other groups at 1.5 and 3.0 $\mu\text{g/ml}$ concentration of PHA and stimulation index of CH-5, CH-6, chitosan groups were significantly higher than other groups at 1.5 $\mu\text{g/ml}$ concentration of LPS.

D. Anticarcinogenic activity

In vitro cytotoxic effect of chitosan hydrolysate on the growth of sarcoma 180 cell line by MTT assay was not different among tested fractions. But, survival rate of L1210 cell line to which chitosan hydrolysates were treated showed 60~115% and that of U-937, SNU-1, SNU-182 and SNU-C4 showed 41~109%, 8~116%, 14~111% and 7~115%, respectively. The inhibitory effect of tumor growth of CH-6 group in BALB/c mouse was the highest as 91% and that of COS-6, CH-5, CH-6 and chitosan was 84%, 77% and 75%, respectively.

In conclusion, chitosan hydrolysates with different average molecular weight had antimutagenic effect measured by *Salmonella typhimurium* reversion assay and SOS chromotest, and macrophage activation effect *in vivo* and *in vitro*. They also

had antitumor effect in the BALB/c mouse bearing sarcoma 180 and cytotoxic effect on the growth of cancer cell lines. These results suggest that CH-5 and CH-6 are most effective in physiological function tested in this study and their average molecular weight calculated by GPC analysis was in the range of 40,000~70,000. Therefore, further studies are required to find the effect of oral intake, to prove toxicological safety test and to confirm antitumor and immunopotentiating effect against various cancer cells.

3. Development of cultivation technology of the red pepper

In order to develop the cultivation technology of red pepper, rate of germination, rate of damage by blight and harmful insects, the rate of growth, the amount of harvest and the improving effect of soil etc. were investigated through the experiment of accelerating effect on plant growth by chitosan.

When chitosan was applied to the red pepper farming land, the germination rate was increased, even in high salt concentration. The growth condition of seed red pepper(or young red pepper) and grown-leaf were improved compared with non-treated ones. A significant effect on preventing from the damages by blight and harmful insects such as anthracnose, bacterial leaf blight, *heliopsis assulta* etc. were also shown. In case of treatment with chitosan, especially, the final amount of red pepper production was increased by 15-30%. Consequently, the application of chitosan to the red pepper farming land can be contributed for the prevention from blight damages and harmful insects and the increment of harvest; therefore, the income of farm-household could be also increased.

4. Development of cultivation technology of the Indica type rice of Dasan

The less the dilution rate, the higher the inhibition of *Fusarium* that cause wilt. After earing, there was a no difference in amount of stem per root depend on the dilute concentration of chitosan and treated season. However, it showed the highest amount as 21 for chitosan treatment with 200 times diluted solution when treated to seed and earing season. As a result of 117% increased yield, we can expect that chitosan should be used as an agricultural material for the increment of harvest. When chitosan was treated, there was little difference in the change of protein content; but the change of hardness, adhesiveness and springiness were found. As a result of sensory evaluation, overall acceptance of cooked Indica type rice that chitosan treated was showed slightly high score when compared to the control. It has been noted that chitosan treatment during rice cultivation was considered as one of the advisable approaches for the improvement of quality and harvest.

여 백

CONTENTS

Chapter I . Introduction	31
Chapter II. Diversification Technology of Chitosan Product	37
1. Introduction	37
2. Materials and reagents	38
1) Materials	38
2) Methods	38
A. Production of chitin and chitosan, and characterization of its rehological property	38
B. Characterization of antimicrobial activity	43
3. Results and Discussion	45
1) Effect of physical pre-treatment on chitosan	45
2) Rheological properties of water-soluble chitosan	46
3) Antimicrobial effect of chitosan	54
4. Summary and conclusion	55
Chapter III. Physiological Activity of Chitosan	59
1. Introduction	59
2. Materials and reagents	62
1) Materials	62
A. Materials and reagents	62

B. Bacteria	62
C. Cell lines	63
D. Cell culture	63
2) Methods	64
A. Preparations of chitosan hydrolysate	64
B. Physical and chemical properties of chitosan hydrolysates	64
C. <i>In vitro</i> antimutagenic activity	66
D. Immunopotentiating activity	67
E. <i>In vivo</i> Immunopotentiating activity	70
F. <i>In vitro</i> cytotoxic activity against cancer cell line	71
G. <i>In vivo</i> antitumor activity	71
3. Results and discussion	73
1) Physicochemical properties of chitosan hydrolysates	73
2) Inhibitory effects of chitosan hydrolysates on the chemically induced mutagenesis	78
3) Immunopotentiating activity	88
4) Anticarcinogenic activity	114
4. Summary and conclusion	121
References	125
Chapter IV. Development of Cultivation Technology of the Red Pepper ...	131
1. Introduction	131
2. Materials and methods	131
1) Materials	131

2) Methods	132
A. Preparation of chitosan solution	132
B. Germination of red pepper seed	132
C. Raising seedling of red pepper	132
D. Determination of salt concentration	133
3. Results and Discussions	134
1) Effect of chitosan on the germination of red pepper	134
2) Effect of chitosan on the growing of young red pepper	136
3) Effect of chitosan on the physicochemical properties of soil	136
4) Effect of chitosan on the growing of red pepper	136
5) Effect of chitosan on the antivirus	139
6) Effect of chitosan on the productivity of red pepper	141

Chapter V. Development of Cultivation Technology of the

Indica Type Rice	145
1. Introduction	145
2. Materials and methods	146
1) Materials	146
2) Methods	146
A. Treatment of chitsan solution	146
B. Growth observation and methods	146
C. Rice milling	146
D. Preparation of rice flour	149
E. Physicochemical properties of rice flour	149
F. Physical property of cooked rice	150
G. Sensory evaluation of cooked rice	151

3. Results and Discussions	153
1) Growth observation of paddy during soaking	153
2) Growth observation of rice after raising seedling	153
3) Growth observation of rice after earing season	154
4) Estimated production of rice after earing season	155
5) Production of rice	156
6) Physicochemical properties of cooked rice	157
7) Sensory evaluation of cooked rice	158
4. Summary and Conclusion	162
References	163

목 차

제 1 장 서론	31
제 2 장 키토산 제품 다양화 기술	37
제 1 절 서 설	37
제 2 절 실험재료 및 방법	38
1. 실험재료	38
2. 실험방법	38
가. 키토, 키토산의 제조 및 레올로지특성 분석	38
나. 키토산의 항균특성 분석	43
제 3 절 결과 및 고찰	45
1. 키토의 물리적 전처리 효과	45
2. 수용성 키토산의 레올로지 특성	46
3. 키토산의 항균효과	54
제 4 절 요약 및 결론	55
참고문헌	56
제 3 장 키토산의 생리활성	59
제 1 절 서 설	59
제 2 절 실험재료 및 방법	62
1. 실험재료	62
가. 재료 및 시약	62
나. 시험균주	62

다. 세포주	63
라. 세포배양	63
2. 실험방법	64
가. Chitosan 가수분해물의 제조	64
나. Chitosan 가수분해물의 이화학적 특성	64
다. <i>In vitro</i> 항돌연변이 활성	66
라. <i>In vitro</i> 면역증강 활성	67
마. <i>In vivo</i> 면역증강 활성	70
바. <i>In vitro</i> 암세포 치사 활성	71
사. <i>In vivo</i> 항종양 활성	71
제 3 절 결과 및 고찰	73
1. Chitosan 가수분해물의 이화학적 특성	73
2. 항돌연변이 활성	78
3. 면역증강 활성	88
4. 항암활성	114
제 4 절 요약 및 결론	121
참고문헌	125
제 4 장 키토산의 노지고추 재배 적용실험	131
제 1 절 서 설	131
제 2 절 실험재료 및 방법	131
1. 실험재료	131
2. 실험방법	132
가. 농업용 키토산의 제조	132
나. 고추종자의 발아실험	132

다. 고추의 본포 육묘실험	132
라. 본포 토양의 염농도 측정	133
제 3 절 결과 및 고찰	134
1. 키토산이 고추발아에 미치는 영향	134
2. 키토산이 고추묘의 생육에 미치는 영향	136
3. 키토산 처리가 본포 토양의 이화학적 성질에 미치는 영향	136
4. 키토산이 본포 고추생육에 미치는 영향	136
5. 키토산 처리가 병충해 발생에 미치는 영향	139
6. 키토산 처리가 고추의 생산성에 미치는 영향	141
제 5 장 키토산을 이용한 다산벼의 미질향상 실험	145
제 1 절 서 설	145
제 2 절 실험재료 및 방법	146
1. 실험재료	146
2. 실험방법	146
가. 키토산의 처리방법	146
나. 생육조사 및 방법	146
다. 정 미	146
라. 쌀가루의 제조	149
마. 쌀가루의 이화학적 특성	149
바. 밥의 물리적 특성	150
사. 밥의 관능적 특성	151
제 3 절 결과 및 고찰	153
1. 키토산 처리농도에 따른 침종수, 유아 및 유근의 관찰	153
2. 키토산 처리농도에 따른 육묘시 생육상태	153

3. 키토산 처리농도에 따른 출수후 생육상태	154
4. 키토산 처리농도에 따른 출수후 예상수량 조사	155
5. 키토산 처리농도에 따른 조곡 및 정곡 생산량	156
6. 키토산이 처리된 쌀의 이화학적 특성	157
7. 키토산이 처리된 쌀의 조리후 물리적 및 관능적 특성	158
제 4 절 요약 및 결론	162
참고문헌	163

제 1 장 서 론

키틴(Chitin)은 자연중에 셀룰로오스 다음으로 많은 물질로서 주로 게, 새우 등의 갑각류의 껍질에 많이 존재하고 있으며, 이밖에도 감충, 메뚜기 등의 곤충류, 버섯 및 일부 균류의 세포벽에도 분포한다. 키틴은 1811년 Branconot에 의하여 버섯에서 최초로 발견되어 1894년 Hoper-Seyer에 의하여 명명되었다. 키틴은 화학적인 구조가 Poly- β (1,4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose으로, 분자식에서 알 수 있듯이 N-acetylglucosamine이 β -1,4 결합한 분자량 100만 이상의 천연 고분자 다당류로서 세계적으로 연간 약 1000억톤 이상이 생산되는 것으로 추산되고 있다. 키틴은 탈아세틸화합물인 키토산(poly- β -1,4-D-glucosamine)과 함께 최근 다양하면서 뛰어난 생리 특성 및 산업적 유용성이 밝혀지면서 그 수요가 크게 증가하고 있다^(1,2).

키틴은 순도(purity)에 따라 의약품, 식품 및 화장품용, 일반 산업용 등으로 구분되는데, 최근 biomass로서 키틴 및 키토산에 대한 물성과 각종 기능에 대한 연구가 행해진 결과 키틴 키토산은 생체 및 공업분야에 응용가치가 매우 높은 물질로 평가되고 있으며, 키틴 유도체의 종류와 이용분야를 표 1-1에 나타내었다⁽³⁾.

국내의 경우 전북김제, 경북울진 등에 키틴제조공장이 가동중에 있으며, 현재 연간 약 300톤의 생산능력을 갖고 있다. 또한 최근에는 향후 키틴의 수요증가를 고려하여 새로운 키틴 생산공장의 건설이 적극 검토되고 있다. 현재, 국내에서 생산되고 있는 키틴은 대부분 순도가 낮은 산업용에 그치고 있어 부가가치가 매우 낮다. 실제로 국내에서 생산한 저순도의 키틴을 일본에 수출하여 역으로 정제된 키틴을 비싼 값으로 역수입하고 있는 실정이다.

또한 키틴은 구조적 특징상 매우 불용성의 성질을 갖고 있어 자연 그대로의 이용은 매우 어렵다. 따라서 키틴을 고온에서 강알카리로 처리하여 아세틸기를 제거한 키토산(chitosan; Poly- β (1,4)-2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose)의 형태로서 많이 이용한다. 그러나 키토산의 경우에도 묽은 산용액(acid solution)에는 용해되나 물이나

알카리 용액에는 녹지 않으므로 광범위한 적용에는 한계를 갖는다.

따라서 외국의 경우에는 키틴의 아세틸기를 조절하여 수용화하거나, 키틴 및 키토산에 여러가지 기능기(functional groups)을 부착하여 수용성 유도체(soluble derivatives)를 생산하고 있다. 현재 외국에서 연구되어 온 키틴 및 키토산 유도체는 약 10여종에 이르며, 이들 유도체의 기능성 및 생리활성의 구명에 대한 연구가 활발하다. 국내에서도 키토산 유도체 형성에 관한 연구가 일부 진행되고 있다. 그러나 아직 기초적 유도체 형성방법에 대한 연구에 그치고 있으며, 유도체의 다양화 및 실제적인 산업적 이용을 위한 공정개발 연구는 미흡한 실정이다.

키틴 및 키토산의 생산 공정을 요약하면 그림 Fig. 1-1과 같다. 현재 국내의 경우 일반적인 산, 알카리 세척공정에 의존하므로써 순도가 높지 않은 제품이 생산되고 있으며, 저분자화 기술은 산업적으로는 주로 산처리에 의존하고 있다. 그러나 외국의 경우에는 Fig.1-1과 같이 용도 및 순도에 따라 여러 종류의 제품이 생산되고 있다. 따라서 국내 생산제품의 부가가치를 높이기 위해서는 외국의 경우처럼 기존 키틴과 키토산의 순도 및 제품의 다양화를 증가시킬 수 있는 공정의 개발이 필요하다. 키틴은 대부분의 용매에 불용성이며 키토산의 경우에도 묽은 산용액에만 녹고 물에는 녹지 않기 때문에 적용범위가 크지 않다. 키틴 및 키토산을 수용화하는 방법은 크게 두가지로 나눌 수 있는데, 키틴의 아세틸기 조절에 의한 방법과 키틴이나 키토산에 각종 기능기를 부착하여 유도체를 형성하는 것으로 크게 나눌 수 있다. 이같은 유도체 형성에 의한 수용화기술의 경우 국내에서 일부 carboxymethyl chitin을 실험실 규모에서 제조하는 연구가 진행되었으나, 산업화되어 상업적 생산은 하지 못하고 있다. 그리고 이들 유도체의 종류는 다양한 형태로 제조할 수 있으며, 따라서 기능성 및 적용성은 광범위하나 국내에서는 아직 이에 관한 연구가 거의 진행된 바 없다. 더구나 수용화 기술의 범위는 상당히 광범위하며, 오랜 기간의 연구가 요구되기 때문에 모든 유도체 형성기술을 현장에 응용하기는 어렵다. 따라서 생산공정에 대한 연구를 다각적으로 추진하여 적용이 용이할 것으로 예상되는 키틴의 아세틸기 조절 및 카르복실 키

표 1-1. 키틴 유도체의 종류와 이용분야

종 류	이용(가능) 분야
1. 키틴	상처치유, 인공피부, 봉합사, 비료, 스피커용 진동장치
2. 키토산	퇴비발효촉진제, 식물세포활성화제, 식품보존료 등 콜레스테롤 저하, 다공성 bead, 흡습제, 막과 섬유조제 면역부활제, 두발용품, 폐수처리용, 응집제 등
3. 알카리 키틴	화학합성용 중간체 등
4. 금속 킬레이트	우라늄, 중금속 및 할로겐의 제거
5. N-alkylidene 유도체	효소 및 미생물 고정화
6. N-acyl 유도체	gel media, 투석막, 콘택트 렌즈, drug release용
7. Deoxyhalo 유도체	유기합성 중간체
8. N-alkyl 유도체	항균제
9. O-hydroxyalkyl 유도체	수용성 유도체, 유화제, 보습제, 화장품
10. 탈중합 유도체	seed coating, 암면역부활제, endotoxin 및 핵산제거제
11. O-acyl 유도체	유화제
12. O-sulfonyl 유도체	deoxyhalo 및 deoxy 유도체 합성용 중간체
13. 황, 인, 질산 유도체	lipo 단백질의 활성화제(황-유도체) 해수의 우라늄 흡착제(인-유도체), 폭발물(질산-유도체)

틴과 카르복실 키토산의 생산기술을 우선 현장에 적용하는 것이 바람직 할 것으로 판단된다. 한편, 미생물에 의한 chitinase 생산기술은 현재 활발한 연구가 진행되고 있으나 실용화되고 있지 못한 실정이다.

키토산은 제조방법에 따라 차이가 생기나 대개 분자량이 $10^5 \sim 10^6$ 에 이르는 거대 분자이다. 이같은 높은 분자량은 증점제, 필름형성제, 안정제 등의 적용에는 적당하나 다른 응용 즉, 항균제, 의약품제제, 화장품제제, 저점성의 식품 등에는 사용하기 어렵다. 따라서 키토산의 분자크기를 효율적으로 조절할 수 있는 화학적, 물리적 및 효소적 처리기술의 개발이 필요하다.

키토산의 가격은 일반 산업용인 경우 3~5만원/kg에 불과하나 의약품인 경우 200~300만원/kg, 식품 및 화장품용인 경우 30~100만원/kg에 이른다. 따라서 국내에서 생산되는 산업용 키토산의 순도를 향상시켜 부가가치를 높이는 연구가 요구된다고 할 수 있다. 현재 국내 시장규모를 보면 키토산소재 자체로서만 약 100억원대에 이르며, 이를 이용한 관련제품을 고려하면 그 시장규모는 수십배에 이를 것으로 판단된다. 특히 키토산의 경우 향후 고부가가치 제품 즉, 의약품 주사제, 인체 적합성 봉합사, 생리활성제, 천연방부제, 생분해 필름, 기능성 섬유 등에서의 적용폭이 확대될 것으로 보아 그 경제적 전망이 매우 밝다. 또한 외국의 경우에도 의약, 화장품 및 식품용에 사용되는 고순도의 키토산에 대한 수요가 급격히 증가하고 있는 상황을 고려하면 국내에서 순도를 향상시키는 기술을 개발할 경우 수출가능성이 매우 높을 것으로 예상된다.

최근 키토산은 식품첨가제로서 승인을 얻었으며, 또한 건강식품 원료로도 승인을 획득할 것으로 알려져 있다. 현재까지 키토산, 키토산 및 이들 유도체의 각종 유효 효능성에 대한 연구가 많이 보고되어 왔기 때문에 앞으로 이들 소재에 대한 수요가 급증할 것으로 생각된다. 따라서 국내에서 이들 소재의 경쟁적인 제조공정 개발 및 고부가가치의 제품을 개발하므로써, 외국의 제품과 상품경쟁력을 갖추어야 할 것이다.

이에 본 연구에서는 게껍질로부터 키토산을 생산할 수 있는 최적공정과 키토산 제품의 다양화를 위한 수용화 및 분자량 조절기술을 개발하는 것을 목적으로 하였으며,

생산된 키토산 제품의 생리활성 및 항균기능을 구명하였다. 또한, 농가수의 향상과 관련한 토양 및 종자 개량제로서 활용할 수 있는 용도개발을 위하여 노지고추와 다산벼의 재배에 응용하는 현장적용 실험을 실시하였다.

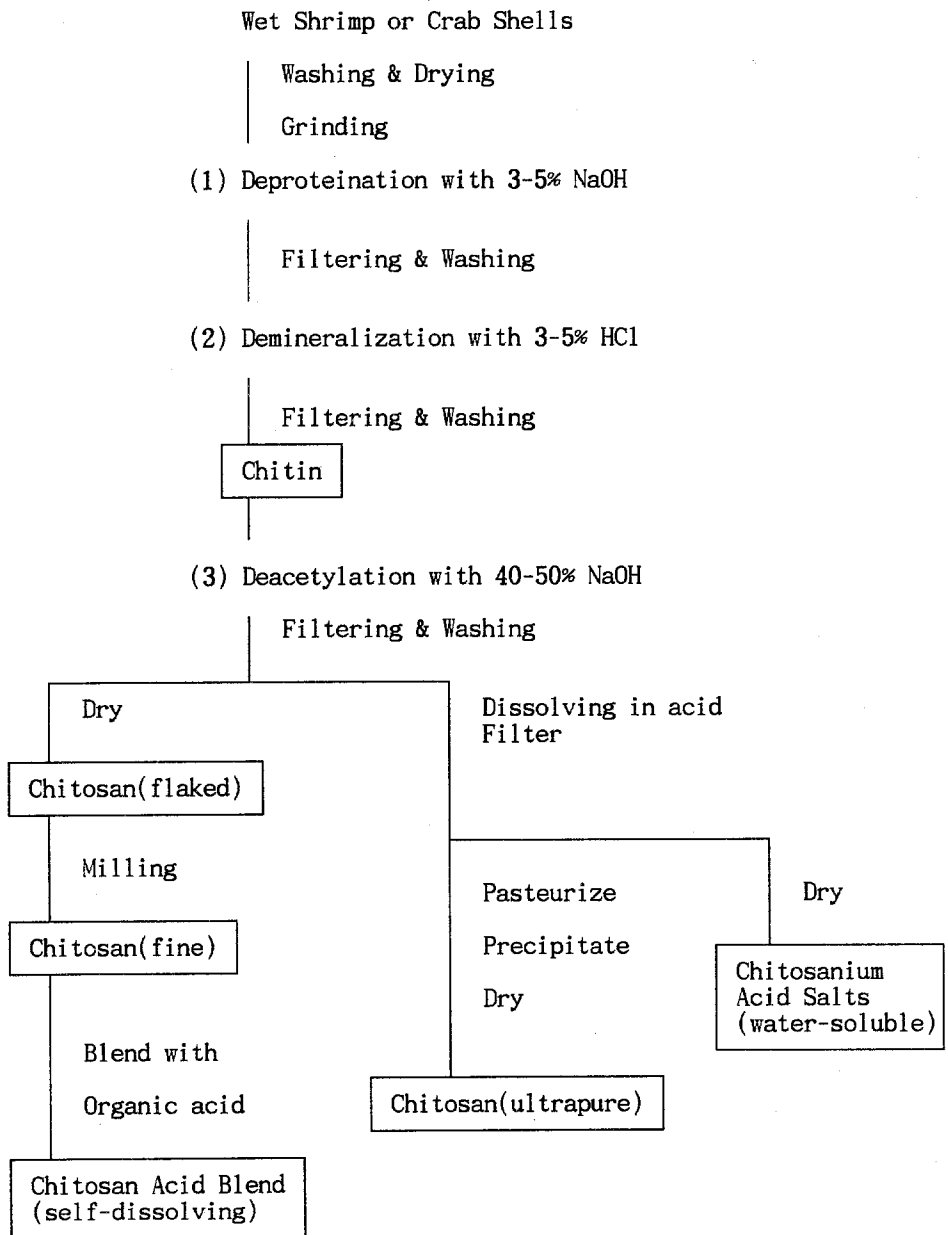


Fig. 1-1. Generalized Scheme for Chitin and Chitosan Manufacturing Process

제 2 장 키토산 제품 다양화 기술

제 1 절 서 설

현재 산업적으로 키토산은 키토신에 40~60%의 고농도 NaOH를 100~150°C의 고온에서 처리하므로써 생산된다. 이러한 격렬한 생산공정을 필요로 하는 키토산 생산공정은 필연적으로 다량의 화학폐수를 발생시키고, 또한 고온 고농도의 NaOH 반응을 견딜 수 있는 특수 반응조를 필요로 하여 생산원가를 높이는 결과를 가져왔다. 따라서 본 연구에서는 키토신의 견고한 결합조직을 완화시키기 위하여 NaOH에 의한 화학적 처리 이전에 물리적 수단에 의한 전처리 과정에 의하여 키토신의 조직을 완화시키는 공정을 시도하였다. 본 연구에서 시도한 물리적 전처리 과정은 압출성형과 autoclave 공정으로서 이들이 키토신의 NaOH 세척과정을 얼마나 완화시킬 수 있는가에 연구의 주안점을 두었다.

키토산의 각종 생리학적 및 식품학적 기능성은 분자량에 의하여 큰 영향을 받는다. 키토산의 분자량은 산, 알칼리 세척에 의한 키토신생산 공정 및 키토신의 NaOH 처리 조건에 의하여 많은 영향을 받는다. 따라서 본 연구에서는 키토산의 분자량을 조절하기 위한 산 및 알칼리 농도, 반응온도, 반응시간 등의 공정조건을 확립하였다. 키토산의 저분자화는 고유점도의 측정과 분자량의 계측에 의하여 확인되었으며, 본 연구에서 구체적으로 설정될 분자량 대 고유점도와의 관계식은 추후 현장에서 손쉽고 정확하게 분자량을 결정하는 주요 지표로서 활용될 것이다.

키토산은 주로 희석 산용액에 용해되고 물에는 잘 녹지 않기 때문에 광범위한 적용에는 한계가 있다. 이와 같은 문제점은 키토산에 수용화를 유도할 수 있는 기능기의 첨가에 의하여 해결될 수 있다. 따라서, 본 연구에서는 지금까지 비교적 반응 기작이 잘 알려져 국내 키토산 생산현장에서 쉽게 적용할 수 있는 carboxymethyl chitosan(CM-chitosan) 유도체의 생산기술을 연구하였다. 기존에 주로 적용된 방법은

저온(-20°C)에서 유기용매(isopropanol)를 이용한 기술이 주로 이용되어 왔으나, 이는 실험실적으로는 가능하나 현장적용에는 어려운 문제점이 있었다. 따라서 본 연구에서는 현장적용이 용이할 수 있도록 키토산을 원료물질로 이용하여 상온에서 isopropanol을 이용하지 않는 방법을 설정하였다.

제 2 절 실험재료 및 방법

1. 실험재료

본 연구에서 사용된 게껍질은 속살을 제거한 홍게(*Chitinonecetes opilio*)를 건조하여 제조하였다.

2. 방 법

가. 키틴, 키토산의 제조 및 레올로지특성 분석

1) 키틴의 제조

먼저 원료 게껍질에 5% HCl을 가하여 실온에서 6시간 동안 방치하여 회분을 제거하였다. 다음, 5% NaOH을 가하여 90°C에서 12시간 동안 방치하여 단백질을 제거한 후 물로 충분히 수세하고 나서 50°C에서 건조하여 키틴을 제조하였다.

2) 압출성형

먼저 키틴을 1.0 N NaOH 용액에 침지시킨 후 상온에서 12시간 동안 방치하였다. 이를 여과한 후 압착 탈수기를 이용하여 대부분의 NaOH를 제거하였다. 본 연구에서 사용한 압출성형기는 Bühler corotating twin screw extruder(Bühler Brothers Co.,

Switzerland)으로서 L/D 비(length/ratio ratio)가 40인 스크류를 이용하였다. 키틴의 압출성형은 스크류 속도 135rpm, 시료주입속도 2kg/hr, 수분함량 20%이고, 바렐의 가열온도는 순차적으로 150°C, 165°C, 250°C였다. 이때 SME(specific mechanical energy)는 453 Kwh/ton으로 측정되었다. 압출성형된 키틴 시료는 냉각후 물로 충분히 세척한 후 아세톤으로 씻고나서 건조하였다.

3) Autoclave

키틴 원료 100g을 1.0 N NaOH용액에 넣고 6시간 동안 상온에서 방치한 후 120°C, 1.2기압에서 1시간 동안 가압가열하였다. 냉각후 물로 충분히 세척한 후 아세톤으로 씻고나서 건조하였다.

4) 키토산 제조

압출성형과 autoclave로 전처리한 키틴시료 1g을 시험관(25 x 150 mm)에 넣고 30%, 40%, 50%, 60% NaOH 용액 20 mL을 가한 후 30분마다 vortex mixer로 교반하면서 120°C에서 10시간 동안 가열하였다. 냉각한 후 물로 NaOH가 제거될 때까지 세척한 후 아세톤으로 씻고나서 상온에서 건조하였다.

5) 용해도 측정

제조한 키토산 시료 0.5g을 100mL의 0.5% 초산 용액에 넣고 상온에서 1시간 동안 교반하였다. 이를 상온에서 4시간 동안 방치한 후 상등액을 수거하였다. 다음, 상등액 10mL를 취하여 수분칭량병에 넣고 105°C에서 4시간 동안 건조하여 고형분 함량을 구한 후 용해도를 다음 식으로 계산하였다:

$$\text{용해도} = \frac{(\text{soluble solids g/10 mL}) \times 100 \text{ mL}}{0.5 \text{ g}} \times 100\%$$

6) 탈아세틸화도 측정

키토산 0.5g을 100mL의 5%(v/v)초산 용액에 넣고 용해시켰다. 이 키토산 용액 1 mL를 200mL 삼각플라스크에 넣고 물 30mL를 넣고 섞은 후 지시약으로 0.1% toluidine blue 용액을 2~3 방울 가해 주었다. 다음, 0.0025-N potassium polyvinyl sulfate 용액으로 적정한 후 다음 식에 의하여 탈아세틸화도를 측정하였다:

$$\text{Degree of acetylation} = \frac{X/161}{X/161 + Y/203} \quad (1)$$

$$X = \frac{1}{400} \times \frac{1}{1000} \times f \times 161 \times v \quad (2)$$

$$Y = 0.5 \times \frac{1}{100} - X \quad (3)$$

여기서 v : 0.0025-N potassium polyvinyl sulfate 용액 소비량(mL)

f : 0.0025-N potassium polyvinyl sulfate 규정도 계수

7) 다양한 분자량의 키토산 제조

키토산 원료로부터 키토산을 제조할 경우에는 탈미량원소화(demineralization), 탈단백화(deproteinization), 탈아세틸화(deacetylation)와 같은 주요 공정을 거친다⁽⁴⁾. 본 연구에서는 5종류 분자량의 키토산을 Table 2-1에 나타낸 바와 같이 게겍질 세척액의 HCl, NaOH 농도, 반응온도, 반응시간 등의 분자량 조절을 위한 중요한 공정변수 조건에 따라서 제조하였다.

Table 2-1. Preparation of chitosans with various molecular weights

Samples	HCl (demineralization)			NaOH (deproteinization)			NaOH (deacetylation)		
	Conc. (%)	Temp. (°C)	Time (hr)	Conc. (%)	Temp. (°C)	Time (hr)	Conc. (%)	Temp. (°C)	Time (hr)
CTS-1	3	30	3	5	90	12	40	70	6
CTS-2	5	30	6	5	90	12	50	100	12
CTS-3	10	30	12	5	90	12	60	110	24
CTS-4	10	40	12	5	90	12	60	130	36
CTS-5	15	50	24	5	90	12	60	140	48

8) 키토산의 고유점도 측정

키토산의 고유점도는 Cannon-Fenske capillary viscometer를 이용하여 측정하였다. 일정량의 키토산을 0.05, 0.1, 0.2, 0.3M-NaCl/ 0.1M-acetic acid 용액에 넣고 상온에서 1시간 동안 용해시켰다. 이를 0.45 μ m Millipore filter에서 여과한 후 10mL의 용액을 Cannon-Fenske 모세점도관(size 50)에 넣고 25 \pm 0.1°C에서 점도를 측정하였다.

비점도(Specific viscosity: η_{sp})와 고유점도(intrinsic viscosity: $[\eta]$)는 각각 다음 식을 이용하여 결정하였다:

$$\eta_{sp} = (\eta - \eta_s) / \eta_s \quad (4)$$

$$[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \eta_{sp} / C \quad (5)$$

여기서 η 는 용액의 점도, η_s 는 용매의 점도, C 는 용액의 농도이다. 결과적으로 고유점도는 식 (5)의 η_{sp}/C 대 C 의 절편으로부터 구할 수 있으며, 이 때 고유점도의 단위는 농도의 역수로 나타낸다.

9) 키토산의 분자량 측정

키토산의 분자량 측정은 2 가지 방법 즉, 고유점도를 이용한 계산식과 GPC에 의하여 측정하였다. 우선, 키토산의 분자량은 용매가 0.2M NaCl/0.1M acetic acid일 때 고유점도와 다음의 Mark-Houwink 식이 적용된다⁽⁶⁾.

$$[\eta] = 1.81 \times 10^{-3} M^{0.93} \quad (6)$$

즉

$$M = (55.25 \times [\eta])^{1.0752} \quad (7)$$

결과적으로 위의 식 (5)에서 구한 고유점도를 식 (7)에 대입하므로써 키토산의 분자량을 계산할 수 있다.

한편, GPC(gel permeation chromatography)에 의한 분자량 측정 조건은 다음과 같다:

장치 : HPLC (Jasco International Co., LTD, Tokyo, Japan)

- Pump : PU-980
- Detector : RI-930
- Oven : CO-965
- System Control & Data Process : LCSS-905

측정조건 :

- 이동상 : 0.1M NaCl/0.1M CH₃COOH
- 유량 : 1.0mL/min
- Column : Shodex OHpak SB-805
- Column Temperature : 40°C
- 시료주입량 : 100μl

키토산 시료 5mg을 5mL의 0.1M NaCl/0.1M CH₃COOH 용액에 넣고 용해시킨 후 냉장고에 일정시간 방치하였다. 이를 0.45μm membrane filter에 넣어 여과한 후 시료로 사용하였다. 이 때 표준물질로는 pullulan(P-800 = 8.53×10^5 , P-200 = 1.86×10^5 , P-50 = 4.80×10^4 , P-5 = 5.80×10^3)을 시료와 같은 농도로 녹여 사용하였다.

10) 수용성 키토산의 조제

앞에서 조제한 키토산 1g을 40% NaOH에 분산시킨 후 monochloroacetic acid를 가하여 최종 NaOH의 농도를 18%로 한 후 30°C에서 5시간 동안 반응시켰다. 다음, HCl을 이용하여 pH를 7.0으로 조절한 후 증류수에 대하여 3일 동안 투석하였다.

나. 키토산의 항균특성 분석

1) 키토산

UF로 제조된 분자량별 키토산을 acetate buffer (0.1 M, pH 5.0)에 0.1%로 녹여 이것을 시료로 하였다. 사용된 키토산의 분자량은 1,000이하, 1,000~3,000, 3,000~10,000, 10,000~30,000, 30,000~100,000, 100,000 이상 이었다. 최소저해농도(MIC)측정을 위해 시료를 2배 희석법으로 2⁸까지 희석 하여 사용하였다.

2) 미생물

본 연구원에서 glycerol stock (-70°C)상태로 보관중인 미생물을 각각의 최적 배지

에 접종하여 3회 계대배양하여 실험에 사용하였다. 이때 사용된 미생물은 Gram positive, negative 및 효모이며 다음과 같다. *Aeromonas hydrophila* 461, *Bacillus cereus* 430, *B. polymyxa* 440, *Clostridium perfringens* 803, *Enterococcus faecalis* 192, *E. faecium* 823, *Escherichia coli* 272, *Lactobacillus acidophilus* 507, *L. bulgaricus* 425, *L. casei* 196, *L. delbrueckii* 149, *L. helveticus* 659, *L. plantarum* 464, *L. plantarum* 812, *L. sake* 816, *Leuconostoc mesenteroides* 465, *Listeria monocytogenes* 799, *Pediococcus acidilactici* 830, *P. pentosaceus* 833, *Staphylococcus aureus* 219, *Pseudomonas aeruginosa* 252, *Salmonella typhimurium* 251, *Candida albicans* 432.

3) 키토산의 항균력 및 MIC 측정

O/N 배양된 미생물을 5ml의 soft agar (0.75% agar) 에 약 5×10^6 이하 되도록 접종하여 잘 섞은 후 미리 준비된 각각 미생물의 최적 agar 배지 (1.5% agar)위에 pour plate 하여 굳힌 후 살균된 cork borer 로 well을 판 후 시료 키토산 용액 $50\mu\text{l}$ 를 well에 접종하여 배양 하였다. 생육억제환의 형성유무를 관찰하여 항균력을 측정 하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 키틴의 물리적 전처리 효과

키틴의 물리적 전처리 효과로서 압출성형과 autoclave가 키틴산 제품의 용해도와 탈아세틸화도에 미치는 영향을 Table 2-2에 나타내었다. 우선 압출성형한 시료의 경우 무처리한 시료에 비하여 같은 NaOH 농도에서 용해도가 증가한 것을 알 수 있으며, 특히 이같은 용해도의 증가는 낮은 NaOH의 농도에서 더욱 뚜렷하게 나타났다. 한편, 탈아세틸화도의 경우에는 통상적으로 키틴산을 생산하는데 많이 사용되고 있는 50%의 NaOH 조건하에서 무처리의 81.2%에서 압출성형 후 91.4%로 탈아세틸화도가 촉진된 것을 알 수 있다.

이상과 같은 결과는 압출성형과정에서 고온, 고압, 고전단력에 의해 키틴의 조직체가 일부 붕괴되면서 NaOH에 의한 접근이 보다 용이해지기 때문으로 해석된다. 반면에, autoclave인 경우에는 용해도와 탈아세틸화도에 있어 무처리한 시료와 큰 차이를 보이지 않았다. 이같은 결과는 압출성형과정에서 수반되는 고전단력(high shear force)이 키틴의 조직을 완화시키는데 주도적인 역할을 하고 있다는 것을 의미한다.

Table 2-2. Solubility and degree of acetylation of chitosans prepared with different physical treatments

NaOH (%)	Control		Extrusion		Autoclave	
	S (%) ^a	DA (%) ^b	S (%)	DA (%)	S (%)	DA (%)
30	10.5	-	21.5	-	10.9	-
40	32.7	-	58.7	-	31.5	-
50	93.2	81.2	95.4	91.4	92.7	80.7
60	100.0	91.9	100.0	94.0	100.0	89.6

^a Solubility; ^b Degree of acetylation

압출성형이 곡류, 과채류, 해조류 등의 식물 세포벽의 조직 수용화에 뛰어난 효과를 발휘한다는 결과는 본 연구진에 의하여 입증된 바 있으나, 키틴의 경우에는 조직 간의 결합력이 강하여 본 연구에서 L/D 비를 40으로 증가시켰음에도 불구하고 압출성형의 효과가 예상보다 크게 나타나지는 않았다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 키틴의 압출성형과정에서 고농도의 NaOH 처리를 필요로 하나 이 경우에는 기계에 손상을 줄 우려가 있으며, 또한 NaOH의 처리에 견딜 수 있는 기계사양의 제작에 상당한 투자를 필요로 하기 때문에 현실적으로 적용하는데 문제점이 있다. 따라서 Table 2-2에 나타낸 바와 같이 압출성형에 의한 키틴의 조직이완 현상이 확인되었으나, 이를 현장에서 적용하기 위해서는 기술적 및 경제적 타당성의 고려가 선행되어야 할 것으로 판단된다.

2. 수용성 키틴산의 레올로지 특성

가. 키틴산의 고유점도 및 분자량

키틴산 시료 CTS-3에 대하여 Fig. 2-1에 비점도(η_{sp}) 대 키틴산 농도의 관계를 나타내었다. 그림에서 절편이 고유점도로서 이는 일정한 용매 조건하에서 키틴산 분자의 단위질량당 차지하게 되는 수동학적 부피(hydrodynamic volume)을 나타낸다. 고유점도는 분자량, 전하, 측쇄, 용매의 종류 등과 같은 구조적 요인에 의하여 영향을 받는 물성 인자로서 생고분자 물질의 유동거동을 이해하는 매우 중요한 척도이다.

Table 2-3에 0.2 M NaCl/0.1 M CH₃COOH의 용매 조건에서 측정된 키틴산 시료의 고유점도와 식 (7) 즉, $M = (55.25 \times [\eta])^{1.0752}$ 의 관계식으로부터 계산한 키틴산의 분자량을 나타내었다. 표에 나타난 바와 같이 제조공정에 따라 키틴산의 분자량이 상이하게 나타나는 것을 알 수 있다. 생고분자의 물리적 및 생리적 특징에 가장 큰 영향을 미치는 인자는 분자량으로서 효율적인 키틴산의 분자량 조절공정의 확립은 키틴산의 생산성 및 현장 적용성에 매우 중요하다. 따라서 Table 2-1에서 제시된 분자량 조절조건은 Table 2-3에 나타난 바와 같이 매우 실용적으로 키틴산의 분자량 조

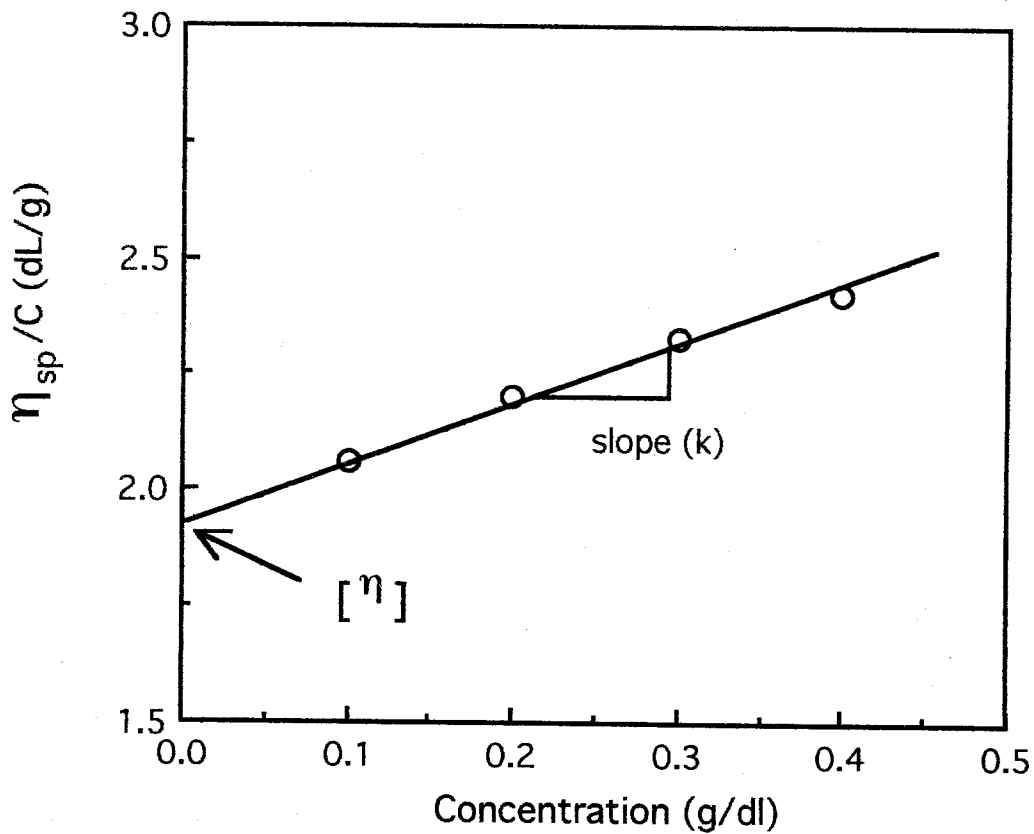


Fig. 2-1. Determination of Intrinsic Viscosity for CTS-3 Sample

질에 잘 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

Table 2-3. Intrinsic viscosity and molecular weight of chitosans as a function of NaCl concentration

NaCl (mM)	Intrinsic Viscosity (dL/g)				
	CTS-1	CTS-2	CTS-3	CTS-4	CTS-5
0	59.760	39.075	6.729	3.998	3.045
50	16.736	8.966	1.949	0.938	0.908
100	14.536	7.074	1.736	0.890	0.848
200	11.342	6.009	1.634	0.812	0.780
300	10.644	4.785	1.389	0.762	0.699
$M_v(x10^{-4})^a$	170.98	86.36	21.29	10.04	9.61

^a $M_v = (552.49 \times [\eta])^{1.0752}$ at 0.2 M NaCl/0.1 M CH₃COOH ([η] : ml/g)

한편, 본 연구에서는 보다 정량적인 결과를 얻기 위하여 GPC에 의한 분자량 측정을 시도하고 있다. 표준물질인 pullulan의 GPC에 의한 분자량별 크로마토그램과 교정곡선을 Fig. 2-2에 나타내었다. 따라서 고유점도([η]) 대 분자량(M_w)의 관계를 확립하면 앞으로 현지 생산공장에서 간단하게 고유점도만을 측정하여 분자량을 쉽게 구할 수 있는 품질관리 자료로서 활용할 수 있다.

나. 키토산의 고유점도에 대한 NaCl 농도효과

키토산은 분자구조적으로 양이온을 갖는 다가전해질(polyelectrolytes)의 고분자 물질이다. 이같이 전하를 갖는 고분자 물질의 경우에는 고유점도가 염의 존재와 그 농

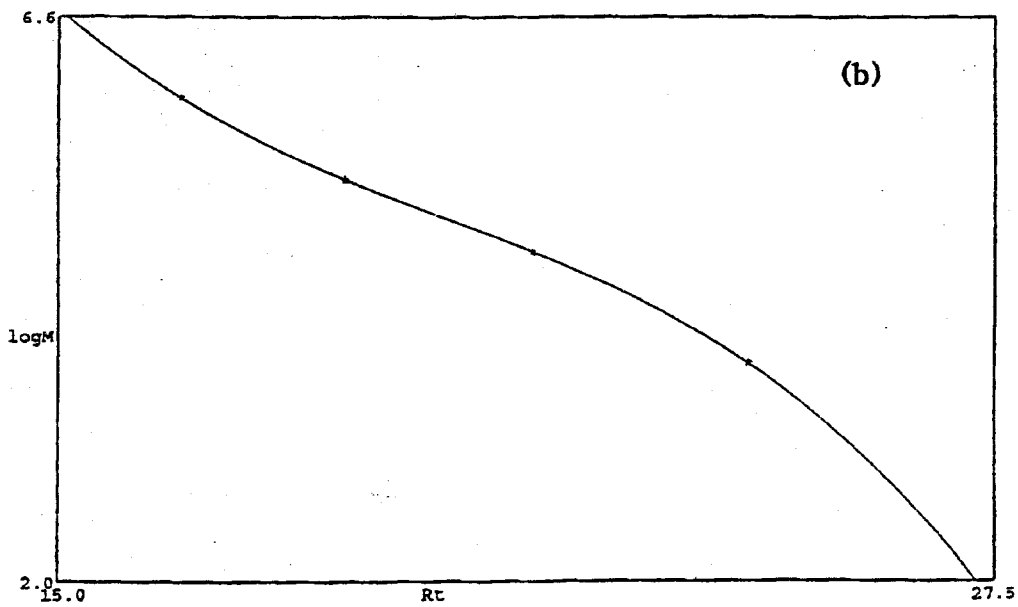
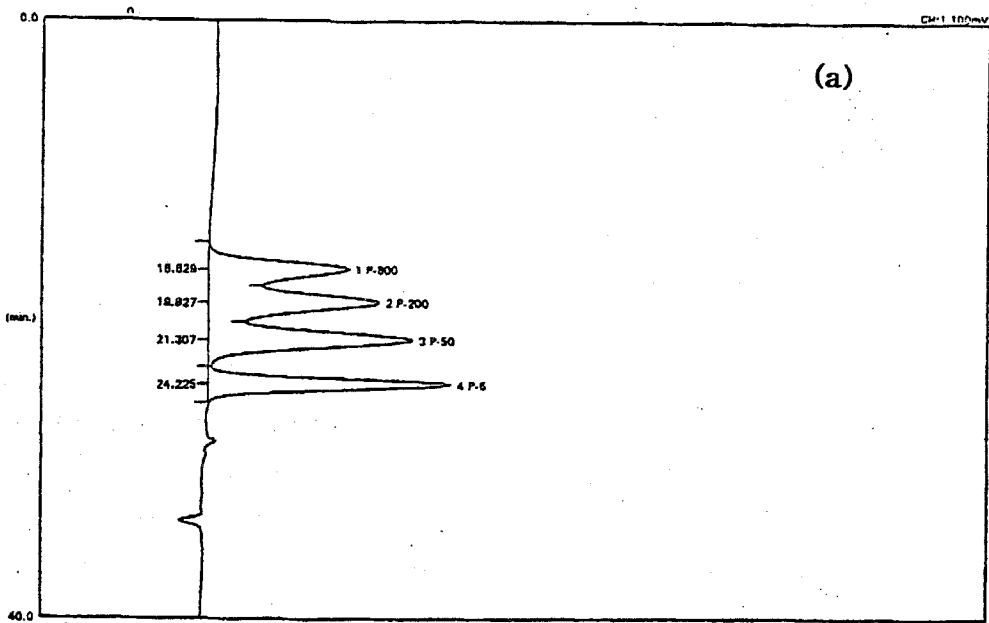


Fig. 2-2. (a) GPC Chromatogram and (b) Standard Curve for Pullulan

도에 따라 큰 영향을 받게 된다. Table 2-3에는 0~300 mM 농도의 NaCl 용액하에 키토산의 고유점도를 0.2-M NaCl/0.1M CH₃COOH 용액의 조건에서 평균분자량과 상관시켜 나타내었다. 키토산의 고유점도는 분자량의 크기에 상관없이 NaCl의 농도가 증가할수록 낮아지는 것을 알 수 있다. 이는 염의 첨가에 따라 키토산의 양이온 밀도가 감소하면서 분자내의 정전기적 반발력(electrostatic repulsive force)이 감소하기 때문인 것으로 해석된다. 이같은 고유점도의 감소는 궁극적으로 진한 키토산 용액에서의 전단점도(shear viscosity) 및 물성에 많은 영향을 미치기 때문에 키토산이 각종 산업적 용도로 사용될때 중요한 가공인자로 작용하게 된다. 이러한 고유점도의 감소는 단위부피당의 수력학적 용적을 나타낸다. 이와 유사한 결과는 알긴산과 펙틴 등의 음이온성 다당류의 고유점도를 측정 한 보고를 통하여 알 수 있다^(7,8).

Table 2-4. Correlation of NaCl concentration and intrinsic viscosity

Samples	α^a	R^2
CTS-1	-8.17	0.987
CTS-2	-5.14	0.986
CTS-3	-0.66	0.954
CTS-4	-0.26	0.985
CTS-5	-0.23	0.967

$$^a [\eta] \propto \log (C_{NaCl})^a$$

NaCl의 농도와 키토산의 고유점도와의 관계를 Fig. 2-3에 나타내었는데, 키토산의 고유점도는 다음 식과 같이 대수를 취한 NaCl의 농도에 비례관계를 보이고 있다.

$$[\eta] \propto \log (C_{NaCl})^a \quad (8)$$

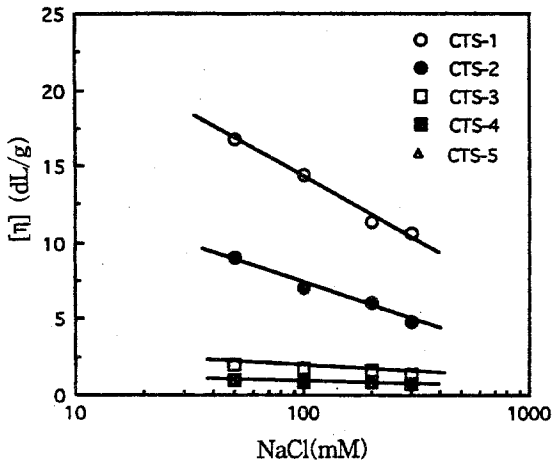


Fig. 2-3. Intrinsic viscosity of chitosan samples at different NaCl concentrations.

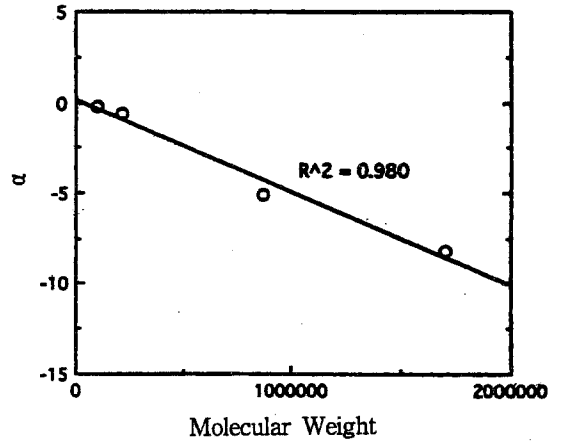


Fig. 2-4. Correlation of molecular weight and α values of $[\eta] \log(C_{NaCl})^\alpha$.

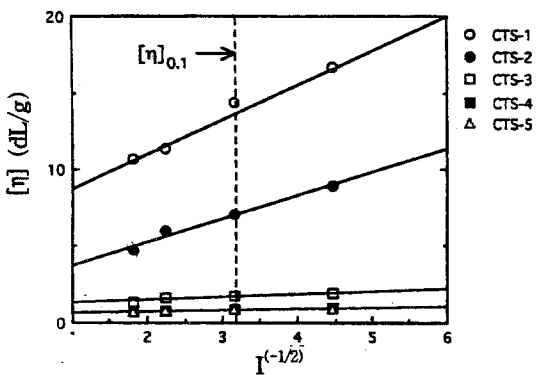


Fig. 2-5. Ionic strength dependence of intrinsic viscosity for chitosans of different molecular weight.

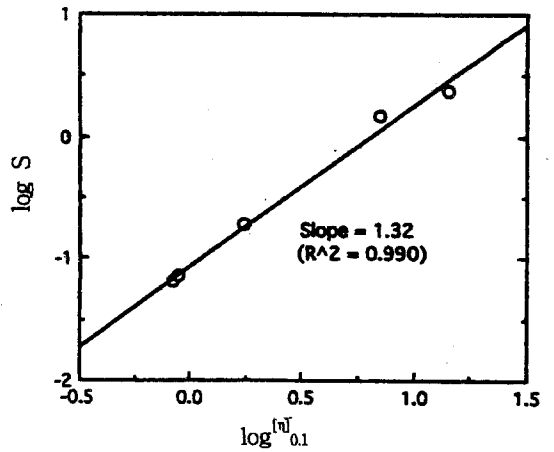


Fig. 2-6. Dependence of S values on intrinsic viscosity of chitosans at $I=0.1M$.

여기서, CNaCl은 NaCl의 농도(mM), α 는 상수이다. Table 2-4에는 키토산의 α 값과 상관계수를 나타내고 있는데, 여기서 α 값은 $[\eta]$ 과 $\log(CNaCl)$ 의 기울기를 나타내며 키토산의 분자량에 따라 증가한다. 이것은 높은 분자량의 키토산의 경우 NaCl의 농도가 증가함에 따라서 고유점도의 값이 크게 감소됨을 의미한다. Fig. 2-4에 식 (8)으로부터 구한 α 값과 대수를 취한 키토산 분자량과의 관계가 비례관계(R^2)가 성립됨을 나타내고 있다.

본 연구의 키토산과 같이 전형적인 예를 보인 다가전해질에 있어서 coil expansion은 segment-segment electrostatic repulsive expansion에 의한 것으로 보고 되어 있다⁽⁹⁾. 구조가 확장되면 될 수록 고유점도는 높아지게 되는데, 고유점도는 거의 이온강도의 평방근에 비례적으로 감소함을 보여 주는 식 (9)가 이를 증명하고 있다⁽¹⁰⁾.

$$[\eta] = A + S I^{-1/2} \quad (9)$$

여기서, A는 상수, I는 이온강도, S는 고유점도와 $I^{-1/2}$ 과의 관계식에서 기울기를 나타낸다. Fig. 2-5에 나타낸 것과 같이 $I^{-1/2}$ 의 함수로 나타낸 고유점도는 직선을 나타내며, 여기서 기울기는 분자량이 증감함에 따라서 증가한다. 이같은 사실은 고유점도는 염의 존재하에서 분자크기가 큰 것에 더욱 큰 영향을 미침을 암시한다.

이온강도에 대응한 고유점도의 변화정도는 다가 전해질 사슬의 유연성을 증가시킬수록 증가한다. Smithrød and Haug⁽¹¹⁾는 각기 다른 분자량의 시료를 제조할 필요 없이 사슬 유연성(chain flexibility)의 특성을 분석할 수 있는 단순한 방법을 개발하기 위하여 $I = 0.1M$ 을 기준값으로 적용하기도 하였다. 이러한 경우에 식 (9)는 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$[\eta] = A + B([\eta]_{0.1})^\beta I^{-1/2} \quad (10)$$

식 (9)와 (10)으로부터

$$S = B([\eta]_{0.1})^\beta \quad (11)$$

또는

$$\log S = \log B + \beta \log ([\eta]_{0.1}) \quad (12)$$

여기서 B는 chain stiffness의 정도이며⁽¹²⁾, B값이 작아지면 작을수록 chain stiffness는 높아지게 된다.

Fig. 2-5로부터 구한 기울기 (S)를 Fig. 2-6에 I = 0.1M인 조건에서 고유점도의 함수로 이중 대수좌표로 나타내었는데, 여기서 기울기는 1.32임을 알 수 있는데, 이러한 결과는 alginate, carboxymethyl cellulose (CMC), carboxymethyl amylose와 같은 다가 전해질의 다당류에 있어서 1.3 ± 0.1 의 값을 보인 것과 거의 일치하고 있다.

Table 2-5. Chain stiffness parameters (B) of Chitosans

Samples	B
CTS-1	0.071
CTS-2	0.113
CTS-3	0.091
CTS-4	0.085
CTS-5	0.081
Average	0.088

chain stiffness parameter (B)는 Table 2-5에 나타낸 $B = S/([\eta]_{0.1})^{1.32}$ 로부터 구한다. B값은 0.07~0.12의 범위를 보이며, 평균값은 0.09이다. 기본적으로 셀룰로오스와 xanthan 및 키토산은 carboxymethyl cellulose가 주골격으로 구성되어 있다⁽¹³⁾. B값은 CMC와 xanthan이 각각 0.05 및 0.005인데⁽¹⁴⁾ 이는 키토산의 chain stiffness 0.09보다 높음을 의미한다. 이것은 또한 cellulose 골격에 있어서 CMC의 carboxymethyl

기와 xanthan의 trisaccharide 측쇄가 더욱 강한 구조를 제공한다는 것을 알 수 있다. CMC와 xanthan에 비교하였을 경우, 키토산이 보다 유연한 구조를 갖는 것은 키토산 분자에 비교적 큰 저해를 주지 않는 약간 bulky한 아미노기가 존재하기 때문이다. 그러나 본 연구에서는 분자량과 B값과의 상관성은 명확하게 밝히지 않았다. 따라서 분자량 분포뿐만 아니라 절대 분자량을 통한 chain stiffness에 대한 분자량의 영향을 밝히는 후속연구가 요구된다.

3. 키토산의 항균효과

분자량별 실험에 사용한 gram positive, negative 및 효모의 23개 균주에 있어서 키토산의 항균력은 나타나지 않은 결과를 보였다. 이러한 결과는 키토산이 항균성을 갖고 있어 천연보존제로 사용되고 있는 사실에 비취볼 때 상반된 것으로서 실험범위와 조건에 좌우되는 것으로 판단된다. 즉 지금까지의 연구방법은 키토산 용액을 배양액에 직접 첨가하여 미생물의 성장을 OD나 CFU/ml 로 측정하였으나 본 연구에 사용한 키토산은 생리활성 실험을 위하여 분자량별로 분획하여 제조한 0.1% 키토산 시료를 피검미생물의 soft agar lawn에 파인 구멍 (well)에 떨어뜨려 생육억제환의 유무를 관찰한 것으로 기존의 방법과는 다르다. 일반적으로 미생물에 대한 항균력을 검정하고자 할 때는 후자(본 실험)의 방법이 보다 효과적이다. 따라서 기존의 방법으로 실험을 하였다면 OD의 감소나 생균수의 감소도 예상된다. 다른 한가지 추측은 사용된 키토산의 농도가 0.1%정도로 타 실험의 경우보다 비교적 낮아 발생한 경우로 생각된다.

제 4 절 요약 및 결론

키틴의 물리적 전처리 기술에 의한 고순도의 키토산을 생산하기 위하여 압출성형 공정을 이용하여 전처리할 경우 처리하지 않은 시료에 비하여 동일한 NaOH 농도에서 용해도는 약 10~25%, 탈아세틸화도는 약 10% 가량 증가하는 현상을 보였다. 따라서 압출성형 공정은 현장적용 기술에 접목시킬 경우 키토산 생산에 사용되고 있는 기존의 과도한 NaOH 처리조건을 완화시킬 수 있는 공정으로 판단된다.

키토산의 분자량 조절은 키틴 생산공정 및 키틴의 NaOH 세척공정의 조절에 의하여 시행하였는데 생산시료의 무게평균분자량(weight average molecular weight)을 측정한 결과 약 40,000~1,500,000의 분자량을 보였다. 특히, 분산도(polydispersity)를 거의 일정하게 유지할 수 있는 기술을 확립하였다. 따라서 이같은 다양한 분자량의 키토산은 각종 식품 및 관련 산업에 있어서 다양하게 적용될 수 있다.

분자량별 실험에 사용한 gram positive, negative 및 효모의 23개 균주에 있어서 키토산의 항균력은 나타나지 않은 결과를 보였는데, 이러한 결과는 키토산이 항균성을 갖고 있어 천연보존제로 사용되고 있는 사실에 비취볼 때 상반된 것으로서 실험범위와 조건에 좌우되는 것으로 판단된다. 즉 지금까지의 연구방법은 키토산 용액을 배양액에 직접 첨가하여 미생물의 성장을 OD나 CFU/ml 로 측정하였으나 본 연구에 사용한 키토산은 생리활성 실험을 위하여 분자량별로 분획하여 제조한 0.1% 키토산 시료를 피검미생물의 soft agar lawn에 파인 구멍 (well)에 떨어뜨려 생육억제환의 유무를 관찰한 것으로 기존의 방법과는 다르다. 일반적으로 미생물에 대한 항균력을 검정하고자 할 때는 후자(본 실험)의 방법이 보다 효과적이다. 따라서 기존의 방법으로 실험을 하였다면 OD의 감소나 생균수의 감소도 예상된다. 다른 한가지 추측은 사용된 키토산의 농도가 0.1% 정도로 타 실험의 경우보다 비교적 낮아 발생한 경우로 생각된다.

참고문헌

1. Muzarelli, R.A.A.: *In Chitin*, Pergamon press, Oxford, p.1(1977)
2. 홍상필, 김동수: 생물 신소재 키틴, 키토산의 이용에 관하여, *식품기술*, **8**, 49(1955)
3. 念: 最後の バイオマスキトサン, 枝報堂出版, p.1(1988)
4. No, H. K., Meyers, S. P. and Lee, K. S.: Isolation and characterization of chitin from craw fish shell waste, *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 575(1989)
5. Hwang, J. K. and Kokini, J. L.: Contribution of the size branches to rheological properties of pectins, *Carbohydr. Polym.*, **19**, 41(1992)
6. Robert, G. A. F. and Domszy, J. G.: Determination of the viscometric constants for chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.*, **4**, 374(1982)
7. Doublier, J. L. and Cuvelier, G.: Gums and hydrocolloids: functional aspects. *In "Carbohydrates in Food"* Eliasson, A. C.(ed.), Marcell Dekker, Inc., New York, pp. 291-292(1996)
8. Moe, S. T., Draget, K. I., Skjåk-Brak, G. and Smithrød, O.: Alginates. *In "Food Polysaccharides and their Application"* Stephan, A. M.(ed.), Marcel Dekker, Inc., New York, p. 259(1995)
9. Fixman, M.: Polyelectrolytes: a fuzzy sphere model, *J. Chem. Phys.*, **41**, 3772(1964)
10. Peter, M. G.: Applicationa and environmental aspects of chitin and chitosan, *J. M. S.-Pure Appl. Chem.*, **A32**, 629(1995)
11. Muzzarelli, R. A. A.: Chitosan-based dietary foods, *Carbohydr. Polym.*, **29**, 309(1996)
12. Clark, A. H. and Ross-Murphy, S. B.: Structural and mechanical properties of biopolymer gels, *Adv. Polym. Sci.*, **87**, 57(1987)

13. Singh, S. K. and Jacobsson, S. P.: Kinetics of acid hydrolysis of κ -carrageenan as determined by molecular weight (SEC-MALLS-RI), gel breaking strength, and viscosity measurements. *Carbohydr. Polym.*, **23**, 89(1994)
14. Sinsky, A., James, S., Eason, D. and Rha, C. K.: Biopolymers and modified polysaccharides. In "Biotechnology in Food Processing" Harlander, S. K. and Labuza, T. P.(eds.), Noyes, Pub., New Jersey, pp. 82-89(1996)

여 백

제 3 장 키토산의 생리활성

제 1 절 서 설

근래에 들어와 식품 신소재로 관심이 집중되고 있는 키토산은 키틴을 탈아세틸화하여 얻게 되는 동물성 식이섬유의 일종이다⁽¹⁾. 키토산은 키틴과 함께 미이용 천연자원으로 주목받아 의약품, 화장품, 공업용 및 식품용 소재로 이용하고자 하는 연구가 시도되어 왔다⁽²⁻¹⁸⁾. 식품 분야에서는 키토산이 항균성, 보수성, 유화안정성, 콜레스테롤 저하 효과 및 식이섬유로서의 생리적 기능 등 다양한 생리활성을 가진다는 연구결과들이 보고되면서 그 이용가능성에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다^(14,15,18).

특히 최근에는 키토산 및 그 유도체들이 고형암의 성장 저지 효과, 항체 생산 증강, adjuvant로서의 기능성 등 항암 및 면역 증강 활성을 나타낸다고 보고되고 있으며, 소중합체(oligomer) 중에서는 6당체가 활성을 나타낸다고 알려져 있다⁽³⁾. Suzuki 등⁽¹⁹⁾에 의하면, 키틴 및 키토산 소중합체중에서 hexa-N-acetylchitohexaose 및 chitohexaose가 항종양 효과를 나타냈는데, ddY male mice의 sarcoma 180 solid tumor에 대한 성장 저해 효과는 chitohexaose가, C3H/he male mice의 MM 46 solid tumor에 대해서는 hexa-N-acetylchitohexaose가 더 컸다고 하였다. Tokoro 등⁽²⁰⁾도 hexa-N-acetylchitohexaose 및 chitohexaose가 BALB/c mice에 이식된 Meth-A solid tumor의 성장 저해 효과를 나타낸다고 보고하였다. 류 등⁽²¹⁾도 새우껍질로부터 추출한 intact chitosan이 ICR mice에 이식한 sarcoma-180에 대해 최고 63%의 저해 활성을 나타낸다고 보고하였다. Sirica 등⁽²²⁾은 키토산이 polycationic charge를 지니므로, negative charge를 띠는 malignant cell, 예를 들어 L1210 leukemia와 선택적으로 응집하는 특성을 지니며, BDF mice의 L1210 ascites tumor에 키토산을 만성 투여시 말초 혈액으로 leukemic cell이 퍼지는 것을 지연시킨다고 보고하고 있다.

면역활성과 관련하여, 키토산은 hemicellulose, locust bean gum, pectin 등과 함께 Ig M 생산을 증진하는데 특히 키토산은 다른 다당류와 비교할 때 매우 저농도에 서도 강한 효과를 나타낸다고 하였으며⁽²³⁻²⁵⁾, 키토산 및 키토산의 pentaose, hexaose, heptaose 등은 Ig 생산 자극 효과를 나타내지 않았다고 보고하였다⁽²³⁾. 또한 nitrite 생성능 측정을 통한 intact chitosan의 macrophage stimulating function이 보고되었는데, 이는 주로 glucosamine에 의해서가 아니라 소량으로 존재하는 N-acetylglucosamine에 기인한 활성이라고 하였다. 또 macrophage 활성화로 인하여 반응성 산소종(reactive oxygen intermediates)의 분비능 증가는 N-acetylchitohexaose가 *Listeria monocytogenes*에 감염된 mice에서 발견되었으며⁽²⁶⁾, 다른 보고에서는 N-acetyl-chito-oligosaccharide가 mice의 peritoneal exudate cell(PEC)의 반응성 산소종 증진효과를 나타냈다⁽²⁷⁾. 또한, N-acetyl-oligosaccharide가 PEC의 attracting 효과를 보였고⁽²⁸⁾, D-glucosamine이 natural-killer cell activity 또한 증진시켰다⁽²⁹⁾. 그리고 병원균 중 *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* 및 *Listeria monocytogenes*에 대해 N-acetylchitohexaose에 의해 유도된 BALB/c mice의 PEC가 *in vitro* 및 *in vivo*에서 모두 살상효과를 지녔다고 보고하였다^(26,30). 또한, hexa-N-acetyl-chito-hexaose 및 chitohexaose가 interleukin-1과 2를 포함한 lymphokine의 생산을 증가시킴으로써 cytolytic T-lymphocytes의 분화 증진을 통해 항암 효과를 나타낸다고 보고하였다⁽²⁰⁾. 이와 같이 키토산, 키토산 및 그들의 소중합체가 항암 활성을 나타내는 기전은 주로 숙주매개 면역반응에 관여하여 종양에 의해 손상된 면역기능을 회복 또는 증강시켜 줌으로써 효과를 발휘하는 것으로 알려져 있다. 즉, cytotoxic T-lymphocytes⁽²⁰⁾, macrophage⁽²⁹⁾, natural killer cells⁽³¹⁾ 등과 같은 tumoricidal immunocytes를 활성화시킨다는 기전을 제시하고 있다.

항암활성을 포함한 키토산 및 키토산 소중합체의 생리활성은 주로 분자량과 관련이 깊다고 알려져 있다. 즉, 분자량에 따라서 고유한 생리활성의 발현도 가능해지는데 항암활성에 대한 많은 연구는 용해성, 항원성, 점도, 독성 및 체내 축적정도 등의 측면

을 고려하여 주로 소중합체와 같은 저분자 키토산에만 국한되어 이루어 졌다. 그러나 키토산은 여러 가지 크기의 분자량을 갖는 고분자 사슬의 집합체이고 현 시점에서 식품에 사용이 허가되어 유통되고 있는 것은 분자량이 수만에서 수십만에 달하는 키토탄 및 키토산이므로 intact chitosan과 소중합체를 동시에 비교하거나 전 분자량 영역에 걸쳐 활성을 조사하고 비교하는 연구가 먼저 이루어져야 할 것이다. 그래야만이 키토탄 및 키토산의 항암활성과 분자량과의 관계를 상세히 알 수 있으며 특이 활성을 나타내는 키토탄 및 키토산 분해물질의 제조가 가능하게 되는 것이다. 그러나 키토산의 전분자량 범위를 대상으로 어떤 분자량 범위의 키토산이 특이적으로 활성을 나타내는지를 살펴본 예는 없다.

따라서 본 연구에서는 키토산의 중요한 물리화학적 특성 중에서 활성에 영향을 크게 미칠 것으로 생각되는 분자량에 초점을 맞추어, 어떤 분자량 범위의 키토산이 생리 활성을 가장 잘 나타내는지 알아보기 위해, 게껍질 키토산을 부분 가수분해하여 분자량이 다른 분획을 제조한 다음 생리활성을 실험하였다. 그리하여, 암의 초기 단계에 관여하는 항돌연변이 활성, 항종양 활성 및 거식세포를 중심으로 한 면역 활성 증진 효과를 *in vivo*와 *in vitro* 실험으로 수행하였다.

제 2 절 실험재료 및 방법

1. 실험 재료

가. 재료 및 시약

Chitosan(practical grade from crab shells)은 Sigma Chemical Co.(USA)제품을, 한외여과(ultrafiltration) 장치는 Amicon사 제품으로, YM 1(molecular weight cut-off=1,000), YM 3(MWCO=3,000), YM 10(MWCO=10,000), YM 30(MWCO=30,000) 및 YM 100(MWCO=100,000)의 한외여과막(ultrafiltration membrane)을 사용하였다. 시험에 사용된 돌연변이원 중에서 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole(Trp-P-2)는 Wako Chemical Inc.(Japan)으로부터, aflatoxin B₁(AFB₁), 2-nitrofluorene(2-NF) 및 4-nitroquinoline oxide(4-NQO)는 Sigma Chemical Co.로부터 구입하였다. Aroclor 1254-induced rat liver S-9은 Organon Teknika Corp. 제품을 사용하였다.

[3-4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), scopoletin, *o*-nitrophenyl- β -galactoside(ONPG)는 Sigma Chemical Co.로부터, interleukin-1 α , 2 및 tumor necrosis factor 분석을 위한 antibody는 genzyme(USA)으로부터, *p*-nitrophenyl phosphate(PNPP)는 Wako Chemical Inc.(Japan), horseradish peroxidase 및 phorbol myristic acetate는 Sigma Chemical Co.로부터 구입하였다.

나. 시험균주

Salmonella typhimurium TA 98은 생명공학 연구소의 유전자 은행으로부터 분양받아, histidine 요구성, rfa 돌연변이, uvrB deletion 돌연변이, ampiciline 저항성 등의 유전형질을 확인한 후 시험에 이용하였다. *Escehrichia coli* PQ 37은 도평 콘트롤 센터로부터 분양받아 rfa 돌연변이, uvr deletion 돌연변이, alkaline phosphatase의

constitutivity 및 sfi A::lax Z fusion 등의 유전형질을 확인한 다음 시험에 사용하였다.

다. 세포주

세포 배양 실험에 이용된 cell lines는 다음과 같다: J774A.1(monocyte; macrophage, mouse), U-937(lymphoma;monocyte-like, human), sarcoma-180(sarcoma-180(sarcoma, mouse), L1210(lymphocytic leukemia, mouse)은 ATCC로부터 분양 받아 사용하였고, SNU-1(gastric cancer, human), SNU-182(hepatocellular carcinoma, human), SNU-C4(colon cancer, human)은 한국 세포주 은행(KCLB, 서울))에서 분양 받아 사용하였다.

라. 세포 배양

세포 배양시 사용된 배지는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, with or without phenol red, Gibco)과 RPMI medium 1640(Gibco)을 사용하였다. 배지는 3차 증류수로 용해한 후 sterilized filter(0.22 μ m pore size)로 여과하여 멸균한 다음 10% fetal bovine serum과 1% streptomycin-penicilline을 첨가하여 이용하였으며, 세포 세척 및 계대 배양시 37°C를 유지하면서 사용하였다.

세포의 종류에 따라 anchorage-dependent한 세포는 배지를 제거하고 trypsin-EDTA(0.05% trypsin, 0.53 mM EDTA · 4Na)를 37°C에서 5분간 처리한 다음 cell을 떼내어 세포를 분리한 후, 원심분리에 의해 3번 반복세척 후 사용하였다. Anchorage-independent한 세포의 경우는 배지에 confluent하게 부유되었을 때 원심분리하여 assay에 이용하였다. 세포는 freezing용 배지(7.5% DMSO 포함)를 첨가하여 -70°C liquid nitrogen tank에 보관 후 사용직전에 해동하여 배양하였다.

2. 실험 방법

가. Chitosan 가수분해물의 제조

Horowitz 등⁽³²⁾의 산가수분해법을 일부 수정하여 고분자인 키토산을 분해하였다. 즉 키토산 분말 30 g을 둥근 플라스크에 넣고, 6 N HCl 용액 600 ml를 첨가하여, 60 °C에서 1시간 30분동안 교반하면서 반응시킨 후, 냉각 및 회석하여 감압 농축기로 용매를 증발시켰다. 이 가수분해물을 0.5% 초산 용액 600 ml로 용해시킨 다음, 여과지로 여과하여 불순물을 제거하고, 한외여과막(ultrafiltration membrane, Amicon)을 이용하여 분자량에 따라 분리하였다. 한외여과막은 산에 저항성이 있는 YM을 이용하였고, YM 1, YM 3, YM 10, YM 30 및 YM 100을 순차적으로 통과시켜 얻어진 6가지 분획을 각각 농축, 건조시켰다. 각 분획에 잔존하는 염산을 제거하기 위하여 키토산 가수분해물 분획 2(CH-2), 3(CH-3), 4(CH-4), 5(CH-5), 6(CH-6)은 90% acetone 용액을 처리하여 원심분리하고 상정액을 제거하는 과정을 시료의 pH가 중성이 될 때까지 반복한 다음 감압 건조하였다. 키토산 가수분해물 분획 1(CH-1)은 위와 같은 절차로 중성이 될 때까지 반복한 후 동결 건조하였다.

나. Chitosan 가수분해물의 이화학적 특성

수분 함량은 상압 가열 건조법으로 105°C에서 측정하였다. 점도는 키토산 가수분해물을 0.1 M acetic acid-0.2 M NaCl 용액에 녹인 후, Cannon-Fenske 모세관 점도계를 사용하여 25 °C에서 0.25, 0.5, 0.75, 1 g/dl 농도에서의 상대점도를 측정한 후 아래 식에 따라 고유점도를 계산하였다⁽³³⁻³⁵⁾.

$$\text{Relative viscosity}(\eta_{\text{rel}}) = \eta/\eta_s$$

$$\text{Specific viscosity}(\eta_{\text{sp}}) = (\eta - \eta_s)/\eta_s = \eta_{\text{rel}} - 1$$

$$\text{Reduced viscosity}(\eta_{\text{red}}) = (\eta - \eta_s)/C \cdot \eta_s = \eta_{\text{sp}}/C$$

$$\text{Intrinsic viscosity}([\eta]) = \lim(\eta_{sp}/C) = (\eta_{red})_{c \rightarrow 0}$$

η_s : 용매의 점도

η : 용액의 점도

C : 용액의 농도

탈아세틸화도는 Sannan 등⁽³⁶⁾의 방법을 이용하였다. 즉, KBr cell을 만들어 FT-IR spectroscop(FTIR-300, JASCO)로 스펙트럼을 얻어, 흡광도의 비(A_{1550}/A_{2878})를 구한 후 검량선을 이용하여 각 분획의 탈아세틸화도를 계산하였다.

한외여과법으로 분리한 키토산 가수분해물 각 분획의 평균분자량과 분자량분산도를 알기위해 HPLC를 이용하여 분석하였고, 분석조건은 Table 3-1과 같다. 여러 가지 방법에 의한 평균분자량과 분자량 분산도는 Millennium 2101에 의한 data processing program으로부터 얻었다.

Table 3-1. Operating conditions of Waters HPLC gradient system

Item	Conditions
Column	Ultrahydrogel 1000, Ultrahydrogel 500, Ultrahydrogel 250(Waters co., USA)
Column temp.	36°C
Detector	RI
Flow rate	1.0 ml/min
Mobile phase	0.1 M acetic acid/0.1 M NaCl
Analytical device	Waters HPLC Gradient System M 410-RI with heating chamber
Data processing software	Millennium 2010

다. *In vitro* 항돌연변이 활성

1) *Salmonella typhimurium* reversion assay

Maron과 Ames의 방법^(37,38)을 이용하였다. 즉 미리 멸균시킨 capped tube에 시험 용액 100 μl , 돌연변이원 100 μl , 4% S₉ mix 500 μl (직접변이원의 경우, 0.2 M phosphate buffer, pH 7.4), *Salmonella typhimurium* TA 98 100 μl ($1-2 \times 10^9$ cells/ml)를 넣고, 37 °C에서 20분간 preincubation시켰다. 이것을 0.5 mM biotin/histidine이 첨가된 top agar 2 ml와 혼합한 후, minimal glucose agar plate에 골고루 도말하였다. 37 °C에서 48시간 배양한 후 배지 위의 복귀 변이주(revertant)의 콜로니수를 계수하였다. 시료의 돌연변이 억제효과는 다음과 같이 계산하였다. 시험에 사용된 돌연변이원은 Trp-P-2가 0.05 $\mu\text{g}/\text{plate}$, AFB₁이 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$, 2-NF가 8 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 의 농도였다. 시험은 매 시험시 세개의 평판을 사용하여 2회 반복하여 실시하였다.

$$\text{Inhibition rate(\%)} = [(a-b)/(a-c)] \times 100$$

a : 돌연변이원만 있을 때 복귀 변이주의 수

b : 시료와 돌연변이원을 동시에 첨가하였을 때 복귀 변이주의 수

c : 시료와 돌연변이원이 모두 없는 경우의 복귀 변이주의 수

Bio-antimutagenicity test는 다음과 같은 방법으로 실시하였다. 즉, Overnight culture한 *Salmonella typhimurium* TA 98 균주를 3,500 rpm에서 10 분간 원심분리한 다음 1.15 M phosphate buffer에 현탁시킨 후 Trp-P-2 및 S₉을 첨가하여 37°C에서 2시간 반응시켜 균주에 돌연변이가 먼저 일어나도록 유도하였다. 그 다음 1.15 M phosphate buffer로 3회 세척하여 Trp-P-2를 제거한 후동일 buffer에 재현탁시켰다. 이와같이 처리된 균 현탁액의 균수를 약 1×10^9 으로 조정하여 desmutagenicity를 측정 한 것과 동일한 과정으로 bio-antimutagenicity를 측정하였다.

2) SOS chromotest

Quillardet 등^(39,40)의 방법을 이용하였다. 즉 *Escherichia coli* PQ 37을 하룻밤 동안 37°C에서 배양한 후 La 배지로 1:50(v/v)으로 희석해서 이를 다시 2시간 30분 동안 배양하였다($1 \sim 2 \times 10^9$ cells/ml). 이 배양액을 La 배지로 1:10으로 희석한 것을 사용하였다. 멸균한 capped tube에 시료 20 μ l, 돌연변이원 20 μ l, 균주와 S₉ mix(직접변이원의 경우, 신선한 La 배지첨가) 혼합액을 넣고 37°C에서 반응시킨 후 β -galactosidase와 alkaline phosphatase 활성을 측정하였다. 먼저 β -galactosidase 측정은 시험관에 B buffer 2.7 ml를 넣고 37°C에서 5분간 평형시킨 후 ONPG 용액 0.6 ml를 첨가하여 30분간 반응시켰다. 그런 다음 1 M Na₂CO₃용액으로 반응을 정지시킨 후 spectrophotometer로 420 nm에서의 흡광도를 측정하였다. Alkaline phosphatase의 측정은 위와 동일한 방법으로 하되 B buffer대신에 P buffer를, ONPG 대신에 PNPP를, 반응 정지액은 0.25 M HCl 1 ml를 첨가한 5분 후 2-M tris 1 ml를 첨가하였다. 효소 활성은 $[1000 \times A_{420}/t]$ 으로 나타냈고[t는 반응시간(분)], alkaline phosphatase unit에 대한 β -galactosidase unit의 비율을 R값으로 나타냈다. SOS 유전자의 유도 계수(induction factor, IF)는 R(C)/R(O)로 나타냈는데, 여기에서 R(C)는 돌연변이원이나 시료가 있을 때, R(O)는 돌연변이원이나 시료가 없을 때의 R값이다. 사용된 돌연변이원의 농도는 Trp-P-2가 4 μ g/assay, 4-NQO가 1 μ g/assay였다. 매 시험은 세개의 평판을 사용하여 2회 반복하여 실시하였다.

라. In vitro 면역 증강 활성

1) 거식세포 활성 증진능

(가) 반응성 질소종 분비능

96-well plate에 시료 및 J774A.1(2×10^5)을 넣고 48시간 동안 CO₂ incubator에서 37°C를 유지하면서 배양하였다. 배양액 중의 nitrite 농도는 microplate assay⁽⁴¹⁾를 이용하여 측정하였다.

(나) 반응성 산소종 분비능

H₂O₂ 분비정도는 microplate fluorometer(Fluoroskan Ascent, Life Sciences International Co.)를 이용하여 측정하였다⁽⁴²⁾. J774A.1(2x10⁵ cells/ml) 및 시료를 96-well plate에 넣어 37°C에서 48시간 배양하였다. 이것을 1,000 rpm에서 10분간 원심분리하고, 37°C의 0.9% NaCl 용액으로 세포를 세차례 세척하였다. 30 μM scopoletin, 1mM NaN₃, 1 purpurgallin-unit/ml의 horseradish peroxidase, 100 ng/ml의 phorbol myristic acetate를 함유한 반응액을 각 well당 100 μl씩 첨가하였다. 그런 다음 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 후 형광의 감소도를 측정하여 반응성 산소종 생성능을 측정하였다. 표준용액으로서 0 ~ 1.0 mM-H₂O₂ 20 μl와 반응액 100 μl를 넣어 위와 같은 절차로 실험하여 standard curve를 통해 확인하였다.

(다) Interleukin-1 α 분비능

반응성 질소종 분비능 측정시와 동일한 절차로 J774A.1과 시료를 96-well plate에 넣어 48시간 동안 CO₂ incubator에서 37°C를 유지하면서 배양한 후 상정액을 취해 대식세포가 분비하는 interleukin-1 α (IL-1 α)을 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)⁽⁴³⁾를 이용하여 측정하였다. 즉, anti-mIL-1 α 단일 클론 항체가 코팅된 microtiter plate에 항체의 비특이적인 반응을 방지하기 위하여 blocking 시약을 가한 다음 세척용 완충액으로 4회 세척하였다. 세척한 plate에 표준 IL-1 α 또는 배양한 시료액을 100 μl씩 well에 주입하고 37°C에서 40분간 배양하였다. 배양한 plate를 세척용 완충액으로 다시 4회 세척하고 biotinylated anti-mIL-1 α을 100 μl씩 넣어 37°C에서 40분간 배양한 다음 세척용 완충액으로 4회 세척하였다. 그런 다음 avidin-conjugated peroxidase 100 μl씩 가한 다음 37°C에서 25분간 반응시킨 후 세척용 완충액으로 4회 세척하였다. 여기에 기질(3,3',5,5'-tetramethyl benzidine)을 100 μl 첨가하여 실온에서 5분간 발색반응을 시킨 후 1 N sulfuric acid를 100 μl씩 가해 반응을 정지시켰다. 이것을 ELISA reader(Molecular device, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 작성한 표준곡선에서 IL-1 α 함량을 계산하였다.

(라) Tumor necrosis factor 분비능

거식세포의 tumor necrosis factor(TNF) 생성능을 chitosan 가수분해물이 증진시키는지를 알아보기 위해 IL-1 α 과 같은 절차로 처리한 후 ELISA⁽⁴³⁾를 이용하여 TNF를 분석하였다. 즉, anti-mTNF 단일 클론 항체가 코팅된 microtiter plate에 표준 TNF 또는 배양한 시료액을 100 μ l씩 well에 주입하고 37°C에서 2시간 배양하였다. 배양한 plate를 세척용 완충액으로 다시 4회 세척하고 HRP-conjugated anti-mTNF을 100 μ l씩 넣어 37°C에서 1시간 배양한 다음 세척용 완충액으로 4회 세척하였다. 여기에 기질(3,3',5,5'-tetramethyl benzidine)을 100 μ l 첨가하여 실온에서 10분간 발색반응을 시킨 후 1-N sulfuric acid를 100 μ l씩 가해 반응을 정지시켰다. 이것을 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 작성한 표준곡선에서 TNF 함량을 계산하였다.

2) 비장세포의 Interleukin-2 분비능 및 면역세포 증식능

4일 전에 복강에 thioglycollate를 주입한 BALB/c mouse의 비장을 떼내어 가위와 핀셋을 이용하여 비장세포를 분리하였다. 이를 RPMI 1640 medium으로 3회 세척하고 2.5x10⁶ cells/ml의 세포수로 조정된 다음, 37°C의 CO₂ incubator에서 48시간 동안 배양하여 상정액 중의 interleukin-2(IL-2)를 ELISA⁽⁴³⁾로 측정하였다. 즉, anti-mIL-2 단일 클론 항체가 코팅된 microtiter plate에 표준 IL-2 또는 배양한 시료액을 100 μ l씩 well에 주입하고 37°C에서 40분간 배양하였다. 배양한 plate를 세척용 완충액으로 다시 4회 세척하고 biotinylated anti-mIL-2을 100 μ l씩 넣어 37°C에서 40분간 배양한 다음 세척용 완충액으로 4회 세척하였다. 그런 다음 avidin-conjugated peroxidase 100 μ l씩 가한 다음 37°C에서 25분간 반응시킨 후 세척용 완충액으로 4회 세척하였다. 여기에 기질(3,3',5,5'-tetramethyl benzidine)을 100 μ l 첨가하여 실온에서 10분간 발색반응을 시킨 후 1 N sulfuric acid를 100 μ l씩 가해 반응을 정지시켰다. 이것을 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 작성한 표준곡선에서 IL-2 함량을 계산하였다.

한편 비장세포 현탁액에 mitogen인 concanavalin A(ConA), phytohemagglutinin (PHA), lipopolysaccharide(LPS)를 각각 첨가하여 72시간 동안 37°C의 CO₂ incubator에서 배양한 다음 mitogen을 첨가하지 않은 살아있는 세포에 대한 mitogen을 첨가한 살아있는 세포의 optical density값의 비, 즉 stimulation index(SI)로 면역세포의 증식여부를 비교하였다.

마. *In vivo* 면역 증강 활성

1) 면역 관련 장기의 무게 측정

Sarcoma 180으로 종양을 유발시킨 BALB/c mouse를 희생시켜 간, 비장, 흉선을 분리하여 무게를 측정한 후 각 군간의 차이를 알아보았다.

2) 복강 거식세포의 분리 및 활성화능 측정

Sarcoma 180으로 종양을 유발시킨 BALB/c mouse의 복강세포로부터 거식세포를 분리하여 활성 시험에 이용하였다⁽⁴⁴⁾. BALB/c mouse의 복강에 Hank's balanced salt solution(HBSS)을 주입한 다음 맛사지하여 peritoneal exudate cells(PEC)를 얻었다. 그 다음 세포 부착법(cell adhesion method)을 이용하여 거식세포를 분리, 세척하였다. 각 군 별로 4×10^5 cells/ml로 세포수를 조정한 다음, 37°C의 CO₂ incubator에서 48시간 동안 배양한후 상정액을 취하여 nitrite, IL-1 α 및 TNF 생성능을 측정하여 비교하였다.

3) 비장세포의 분리, 활성화능 및 면역세포 증식능

Sarcoma 180으로 종양을 유발시킨 BALB/c mouse의 비장으로부터 단일 세포로 분리하고 RPMI 1640 medium으로 3회 세척한 다음 2.5×10^6 cells/ml의 세포수로 조정한 후 37°C의 CO₂ incubator에서 48시간 동안 배양한 후 앞과 동일한 방법으로 IL-2 생성능을 측정하였고, 72시간 동안 배양하여 ConA, PHA 및 LPS를 각각 첨가하였을 때 면역세포 증식능에 미치는 영향을 stimulation index로 비교하였다.

4) 혈중 백혈구 수의 측정

키토산 가수분해물이 혈중 백혈구 수에 미치는 영향을 알아보기 위해 Coulter STKS(USA)를 사용하여 백혈구수를 측정하였다.

바. *In vitro* 암세포 치사활성

키토산 가수분해물이 암세포 치사 효과가 있는지 *in vitro*에서 알아보기 위해 MTT assay를 실시하였다. 즉, 시료와 trypsin 처리 또는 하지 않은 single cell suspension(1×10^6 cells/ml)을 96-well에 함께 넣어 4일동안 37°C를 유지하면서 CO₂ incubator에서 배양하였다. 4일 후 MTT 시약 50 μ l를 넣고 다시 4시간 동안 반응시켰다. 이것을 1,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상정액을 제거하고, DMSO 150 μ l를 첨가하여 용해시킨 후, 540 nm에서의 흡광도를 ELISA reader로 측정하였다.

사. *In vivo* 항종양 활성

1) 실험 동물 및 사육

본 연구에 사용된 동물은 14~25g(평균 18g, 4~5주령)의 BALB/c mouse로서 약 2주일 동안 적응시킨 후 사용하였다. 고형사료(삼양사료)를 이용한 식이와 물은 무제한으로 공급하였으며, 1주에 3번씩 체중을 측정하여 변화를 관찰하였다.

2) 항종양 활성

실험군은 Table 3-2에서와 같이 완전임의배치법(Completely randomized design)에 의해 대조군을 포함하여 7군으로 나누었고, 1군당 7~8마리씩 사육하였다. 먼저, 종양세포인 sarcoma 180(5×10^5 cells/ml)을 BALB/c mouse의 왼쪽 서혜부에 접종한 후, 그 다음날부터 연속적으로 5일 동안 100 mg/kg(Lentinan군은 10mg/kg) 농도의 시료를 tail vein으로 주입하였다. 종양을 유발시킨 날로부터 25일째되는 날에 mouse를 희생하여 종양 발생 빈도, 종양의 크기 및 무게를 측정하고, tumor growth inhibition rate(%)를 계산하였다.

$$\text{Inhibition rate(\%)} = \frac{C_w - T_w}{C_w} \times 100$$

C_w : Average tumor weight of the control group

T_w : Average tumor weight of the treated group

3. 통계 분석

키토산 가수분해물의 pH가 시험계에 미치는 영향은 SAS를 이용하여 분산분석으로 유의성을 검증하였다. 또 동물 실험 결과들은 분산분석, Duncan's multiple range test 또는 Student *t*-test를 이용하여 유의성을 검증하였다.

Table 3-2. Experimental groups for animal study

Groups	Number of animals	Dose of injection
Control	8	Saline 0.1ml
Lentinan	7	10mg/kg body wt.
COS-6 ¹⁾	8	100mg/kg body wt
CH-4 ²⁾	8	100mg/kg body wt
CH-5 ³⁾	8	100mg/kg body wt
CH-6 ⁴⁾	7	100mg/kg body wt
Chitosan	7	100mg/kg body wt

¹⁾ COS-6 : chitohexaose

²⁾ CH-4 : chitosan hydrolysate fraction 4

³⁾ CH-5 : chitosan hydrolysate fraction 5

⁴⁾ CH-6 : chitosan hydrolysate fraction 6

제 3 절 결과 및 고찰

1. 키토산 가수분해물의 이화학적 특성

키토산을 산가수분해한 다음 한외여과막을 통과시켜 얻은 가수분해물들의 수율과 이화학적 특성은 Table 3-3과 같다. 각 분획의 수율은 12.9~22.3% 수준이었으며 CH-1과 CH-6을 제외하고는 거의 비슷한 정도로 시료를 얻을 수 있었다. 또한, 이들의 수분함량은 CH-1이 가장 높은 15.3%를 나타냈고, CH-2에서 CH-6까지는 키토산보다 약간 낮은 6.3~8.7%였다. 키토산 가수분해물의 농도에 따른 환원점도(reduced viscosity)는 Fig. 3-1과 같다. 0.25~1%의 농도 범위에서 CH-1에서 CH-4까지는 환원점도의 차이가 뚜렷하지 않았으나, CH-5와 CH-6은 농도 증가에 따라 증가하였다. 환원점도로부터 유추한 고유점도(intrinsic viscosity)는 CH-6으로 갈수록, 즉 분자량이 증가함에 따라 점차 증가하는 경향을 나타내었다.

한편, 키토산 가수분해물 및 키토산의 탈아세틸화도를 Sannan 등⁽³⁶⁾의 방법으로 산출한 결과, 가수분해 전의 키토산은 71%의 탈아세틸화도를 나타내었다. 키토산 가수분해물은 CH-3에서 6까지는 69~72%로 키토산과 비슷한 수준이었으나, CH-1은 80%, CH-2는 78%로서 약간 높은 수준이었다. CH-1과 CH-2의 탈아세틸화도가 다른 가수분해물에 비해 약간 높은 것은 산에 의해 glycoside 결합이 먼저 분해된 다음 아미드 결합의 분해는 저분자가 될수록 더 영향을 받기 때문으로 생각된다.

키토산의 분자량에 따라서 고유한 생리활성의 발현도 다르게 나타날 가능성이 높은 것으로 추측되고 있다. 그러나 키토산은 여러 가지 크기의 분자량을 갖는 고분자 사슬의 집합체이기 때문에 평균분자량 뿐만 아니라 분자량분산도[수평균 분자량에 대한 중량평균 분자량의 비율로서 불균질성(heterogeneity)의 척도임]도 중요할 것이다. 특정 분자량의 키토산이 특정 생리활성을 나타낸다고 가정할 때 분자량분산도가 클

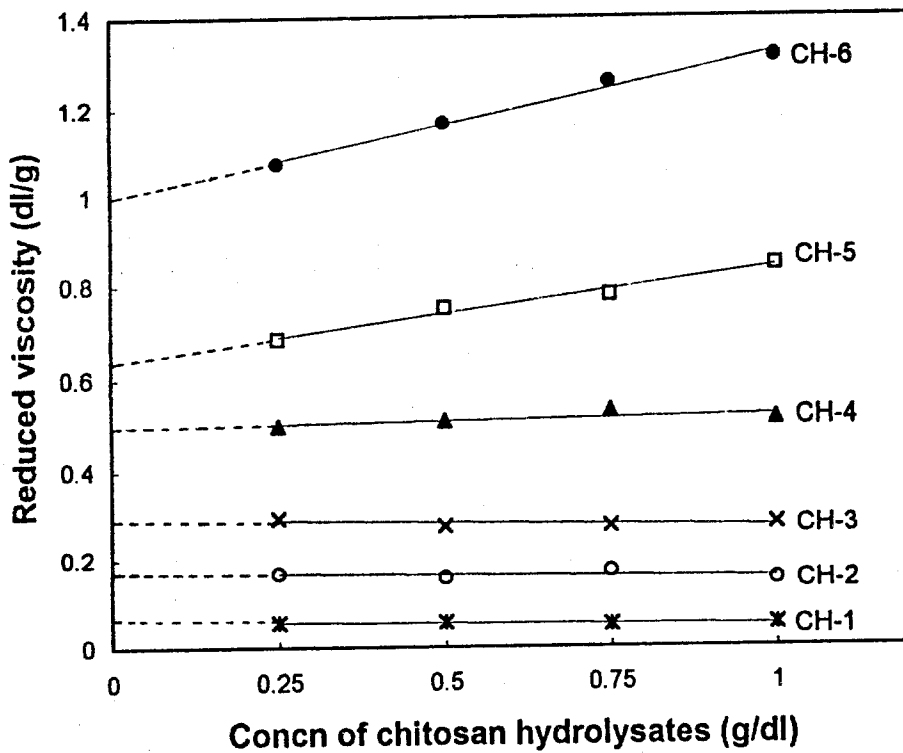


Fig. 3-1. Reduced viscosity of chitosan hydrolysates at different concentrations

경우에는 특정 분자량에 해당하는 분자 사슬의 분율이 낮기 때문에 생리활성도 저하될 수 밖에 없을 것이다.

Table 3-3. Physical and chemical properties of chitosan hydrolysates

Chitosan hydrolysates ¹⁾	Molecular weight range	Yield (%)	Moisture (%)	Intrinsic viscosity(dl/g)	Degree of deacetylation(%)
CH-1	< 1,000	12.9	15.3	0.058	80
CH-2	1,000~ 3,000	17.3	8.3	0.169	78
CH-3	3,000~ 10,000	15.3	8.7	0.294	72
CH-4	10,000~ 30,000	17.7	6.3	0.498	70
CH-5	30,000~100,000	14.7	7.7	0.639	69
CH-6	> 100,000	22.3	8.7	1.000	70
Chitosan	-	(100)	10.7	12.864	71

¹⁾ Partial acid hydrolysates of chitosan were fractionated through Amicon ultrafiltration membranes.

따라서 산가수분해법 및 한외여과법에 의해 얻어진 키토산 가수분해물 6가지 분획의 평균분자량 및 분자량분산도를 알기 위해, gel-permeation chromatography를 이용하여 분석한 결과, 산출된 각 분획의 평균 분자량 및 분자량분산도는 Table 3-4와 같다. 고분자는 분자량을 측정하는 방법에 따라 osmometry를 이용한 수평균 분자량(number-average molecular weight: Mn), light scattering을 이용한 중량 평균 분자량(weight-average molecular weight: Mw), ultracentrifugation을 이용한 Z 평균 분자량(Z-average molecular weight: Mz), viscometry를 이용한 점도 평균 분자량(viscosity-average molecular weight: Mv) 등이 있으며, 일반적으로 크기가 Mn<Mp<Mv<Mw<Mz의 관계에 있다. 본 연구에서 사용한 GPC chromatogram의 각

위치에 따라 이러한 여러 가지 평균분자량을 계산한 결과, 계산된 4가지 평균 분자량 간에 약간의 수치의 차이를 나타냈으나, 크기의 순서는 이론과 일치하였다. 4종류의 평균 분자량 중에서 중량 평균 분자량이 널리 통용되는 분자량으로서, 각 분획의 M_w 를 비교하면 CH-1, CH-4, CH-5는 한외여과법의 분자량 범위와 일치하였고, CH-2, CH-3, CH-6은 약간 벗어났다. 한편, 키토산은 약 99만으로서 일반적으로 알려진 분자량 수준과 같았으며, 키토산 가수분해물의 가장 고분자 분획인 CH-6보다 10배이상 분자량이 더 컸음을 알 수 있었다. 결과적으로 분자량 범위가 수백에서 수십만까지 넓은 영역의 키토산 및 그 가수분해물의 분자량 추정은 기존에 손쉽게 측정할 수 있는 점도에 의한 계산 방법으로는 잘 적용이 되지 않았으므로 GPC 분석을 통해 시도하여 보았다. 한외여과막의 molecular weight cut-off와 GPC chromatogram의 M_w 은 대체적으로 비슷한 수치를 나타냄을 알 수 있었고, 그 결과, CH-1의 M_w 는 866, CH-2는 6,620, CH-3은 12,816, CH-4는 24,368, CH-5는 41,971, CH-6은 63,756, 키토산은 989,904였다. 또, 분자량분산도는 CH-2만 chromatogram이 갈라짐으로 인해 값이 높았고, 가수분해물 분획 및 키토산의 분자량분산도는 1.39~1.75로서 비슷한 수준을 나타냈다.

Table 3-4. Molecular weight distribution of chitosan and its hydrolysates

Treatment (concn : 0.2%)	Molecular weight range	Mn ¹⁾	Mp ²⁾	Mw ³⁾	Mz ⁴⁾	Polydispersity ⁵⁾
CH-1	< 1,000	628	475	866	1723	1.39
CH-2	1,000~ 3,000	2,197	6,724	6,620	11,828	3.01
CH-3	3,000~ 10,000	7,322	8,996	12,816	18,983	1.75
CH-4	10,000~ 30,000	14,428	19,042	24,368	34,743	1.69
CH-5	30,000~100,000	29,367	37,290	41,971	55,798	1.43
CH-6	> 100,000	44,734	53,524	63,756	86,697	1.43
Chitosan	-	563,011	795,233	989,904	1,628,950	1.65

1) Number-average molecular weight

2) Peak-average molecular weight

3) Weight-average molecular weight

4) Z-average molecular weight

5) Mw/Mn : rough measure of the degree of heterogeneity

2. 항돌연변이 활성

가. 항돌연변이 활성에 대한 pH의 영향

본 연구에서 제조된 키토산 가수분해물은 키토산을 염산으로 가수분해하여 얻은 염산염의 상태이므로, 이러한 시료 자체의 산도가 시험 결과에 영향을 미치는지 알아보기 위해 각 시료대신 pH 1, 2, 4, 7로 조정된 용액을 사용하여 *Salmonella typhimurium* reversion assay와 SOS chromotest를 실시하였다. Trp-P-2에 대해서 *Salmonella typhimurium* reversion assay 결과, Fig. 3-2에서와 같이 여러 pH에서 측정된 복귀 돌연변이 수간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다($p < 0.1$). 또한, SOS 유도 반응에 대해서도 pH에 따른 induction factor(IF) 값간의 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p < 0.1$).

이와 같은 결과는 키토산 가수분해물 자체의 pH는 산성이었으나, 활성시험시 시험계에 투여되는 시료의 양이 소량인 동시에 시료가 완충용액을 사용했기 때문으로 생각된다. 따라서 키토산 가수분해물의 항돌연변이 시험시 시료 자체의 높은 산도로 인한 영향은 거의 없을 것으로 판단되었다.

나. *Salmonella typhimurium* reversion assay

키토산을 산가수분해하여 얻은 6가지 분획들의 돌연변이 억제효과를 *Salmonella typhimurium* reversion assay를 통해 살펴보았다(Table 3-5). 먼저 식품의 조리 가공 중 발생할 수 있는 대표적인 간접변이원인 tryptophan 열분해산물(3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole(Trp-P-2))에 대하여, 각 분획별로 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 mg/plate의 농도로 시험한 결과, CH-1~CH-4에서는 0~37%의 낮은 억제 효과를 나타내었으나, 용량-반응 관계를 나타내지 않은 것으로 보아 항돌연변이 활성이 거의 없는 것으로 판단되었다. 그러나 CH-5와 CH-6에서는 5 mg/plate 이상에서 급격히 돌연변이 억제효과가 증가하는 경향을 보였다. 즉 CH-5의 경우 5

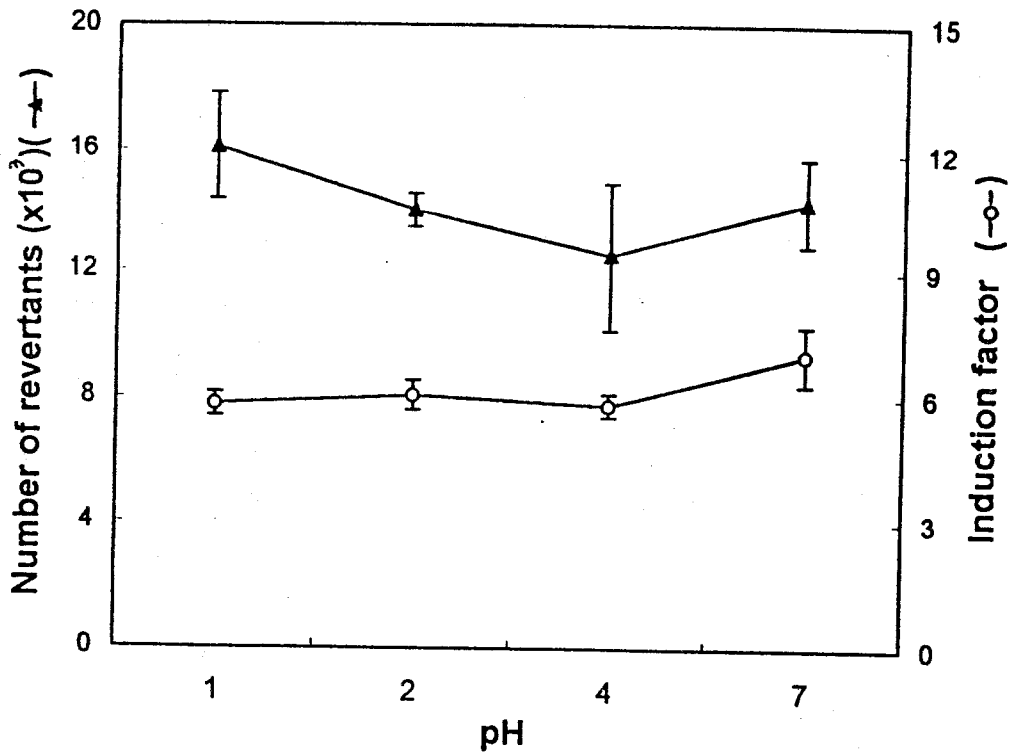


Fig. 3-2. Effect of pH on the number of revertants in *Salmonella typhimurium* reversion assay and induction factor in SOS chromotest in the presence of Trp-P-2

Number of revertants and induction factor at different pH were not significantly different at $\alpha=0.01$ level

mg/plate 및 10 mg/plate에서 억제율이 각각 45.1 및 67.7%로 비교적 높은 효과를 나타냈고, CH-6의 경우 5 mg/plate에서 가장 높은 78.3%의 억제 효과를 보였다. CH-6의 10 mg/plate의 농도에서는 plate상에서 counting할 때, colony와 시료를 분간하기 힘들어 결과를 제시할 수 없었다.

곰팡이가 생성하는 간접변이원인 aflatoxin B₁(AFB₁)은 Trp-P-2와는 달리, CH-2에서 CH-6까지의 5 mg/plate 및 10 mg/plate에서 돌연변이 억제효과를 나타냈으며 (Table 3-5), CH-5의 5 mg/plate 및 10 mg/plate에서 각각 91.5% 및 92.0%의 두드러진 억제 효과를 보였다. 2-nitrofluorene(2-NF)은 간의 microsome 효소에 의해 대사 활성화가 필요없는 직접변이원으로서, 이에 대한 키토산 가수분해물의 돌연변이 억제 효과는 다른 두 종류의 변이원보다 그 효과가 훨씬 낮았다. 즉 CH-5의 5 mg/plate 및 10 mg/plate에서 33.8% 및 21.6%였고, CH-6의 5 mg/plate가 최고 수치인 50.6%를 보였다.

한편 키토산 가수분해물의 돌연변이원성을 시험한 결과, 0.1~10 mg/plate범위에서 돌연변이원성이 없는 것으로 나타났다(결과 미제시).

Intact chitosan의 경우, Trp-P-2로 유도된 돌연변이에 대한 억제 효과를 0.1~1 mg/plate 범위에서 살펴보았을 때 0.1~0.5 mg/plate 사이에서 용량-반응 관계를 나타내면서 억제 효과를 나타냈으며, 0.5 mg/plate일 때 65.4%의 최고 활성을 나타내었다⁽⁴⁵⁾. 이는 CH-6이 5 mg/plate의 농도에서 78.3%의 억제 활성을 나타낸 것과 비교하면, 약간 낮은 수치였다. 기타 2-NF 및 sodium azide에 대한 키토산의 돌연변이 억제 활성은 미미하거나(0~10.6%) 활성을 나타내지 않았다. 키토산 가수분해물 및 키토산의 2-NF에 대한 돌연변이 억제활성은 모두 낮은 수준으로 일치된 결과를 나타냈다.

이상의 *Salmonella typhimurium* reversion assay 결과, 키토산 가수분해물은 직접변이원인 2-NF보다는 간접변이원인 Trp-P-2와 AFB₁에 대한 억제효과가 컸다. 즉 Trp-P-2에 대한 활성이 0~78.3%, AFB₁이 0~92.0%로서 후자에 대한 억제 활성이 더 크게 나타났다. 각 분획내에서는 저농도에서보다 5 mg/plate 및 10 mg/plate의 농

도에서 항돌연변이 효과를 보였고, 세 종류의 변이원에 대해, CH-5와 CH-6이 공통적으로 돌연변이 억제활성을 크게 나타냈다. 또한 키토산 가수분해물의 이러한 항돌연변이 활성은 모든 시험 plate상에서 background lawn이 관찰되었으므로, 시료 자체의 독성 효과에 기인한 것이 아니었음을 확인할 수 있었다.

Table 3-5. Inhibitory effects of chitosan hydrolysates on the mutagenicity of Trp-P-2, AFB₁ and 2-NF in *Salmonella typhimurium* TA 98

Treatment (mg/plate)		Number of revertants (% Inhibition rate)		
		Trp-P-2 ¹⁾	AFB ₁ ²⁾	2-NF ³⁾
Negative control ⁴⁾		23 ± 5	28 ± 4	26 ± 7
Positive control ⁵⁾		1707 ± 192 ⁶⁾	374 ± 64	573 ± 89
CH-1	0.1	1270 ± 166(26.0)	350 ± 35(6.9)	581 ± 92(0.0)
	0.5	1252 ± 319(27.0)	390 ± 119(0.0)	512 ± 94(11.1)
	1.0	1766 ± 324(0.0)	344 ± 41(8.6)	516 ± 71(10.4)
	5.0	2836 ± 422(0.0)	841 ± 147(0.0)	524 ± 112(8.8)
	10.0	1512 ± 348(11.6)	786 ± 191(0.0)	625 ± 110(0.0)
CH-2	0.1	1538 ± 284(10.0)	414 ± 62(0.0)	540 ± 72(6.0)
	0.5	1122 ± 365(34.8)	472 ± 50(0.0)	553 ± 102(3.5)
	1.0	1152 ± 280(33.0)	414 ± 55(0.0)	583 ± 70(0.0)
	5.0	1433 ± 618(16.3)	134 ± 29(69.3)	584 ± 45(0.0)
	10.0	2158 ± 908(0.0)	188 ± 52(53.7)	518 ± 234(10.1)
CH-3	0.1	1591 ± 236(6.9)	360 ± 34(4.1)	626 ± 96(0.0)
	0.5	1497 ± 166(12.5)	397 ± 34(0.0)	595 ± 82(0.0)
	1.0	1446 ± 242(15.5)	348 ± 30(7.5)	556 ± 66(3.0)
	5.0	1921 ± 551(0.0)	104 ± 32(78.0)	537 ± 82(6.5)
	10.0	1604 ± 456(6.1)	113 ± 48(75.2)	694 ± 72(0.0)
CH-4	0.1	1516 ± 293(11.3)	387 ± 91(0.0)	661 ± 162(0.0)
	0.5	1188 ± 151(30.8)	417 ± 49(0.0)	556 ± 106(3.1)
	1.0	1128 ± 238(34.4)	414 ± 114(0.0)	629 ± 33(0.0)
	5.0	1445 ± 849(15.6)	86 ± 34(83.2)	671 ± 41(0.0)
	10.0	1080 ± 528(37.2)	83 ± 46(84.1)	596 ± 112(0.0)
CH-5	0.1	1470 ± 107(14.1)	447 ± 55(0.0)	572 ± 117(0.0)
	0.5	1374 ± 330(19.7)	520 ± 248(0.0)	536 ± 91(6.6)
	1.0	1536 ± 153(10.2)	533 ± 238(0.0)	569 ± 94(0.6)
	5.0	947 ± 423(45.1)	57 ± 22(91.5)	388 ± 79(33.8)
	10.0	567 ± 192(67.7)	55 ± 24(92.0)	454 ± 138(21.6)
CH-6	0.1	1511 ± 151(11.6)	446 ± 45(0.0)	549 ± 64(4.4)
	0.5	1710 ± 180(0.0)	428 ± 49(0.0)	583 ± 132(0.0)
	1.0	1697 ± 674(0.6)	345 ± 39(8.4)	565 ± 173(1.4)
	5.0	389 ± 174(78.3)	75 ± 16(86.3)	296 ± 68(50.6)
	10.0	-	-	402 ± 47(31.2)

1), 2) Activated with S₉ mix. 3) Without S₉ mix. 4) DMSO was used as a negative control.

5) Trp-P-2 was used as a positive control. 6) Mean ± standard deviation

다. SOS chromotest

항돌연변이 효과를 살펴보기 위해 Quillardet에 의해 1982년 개발되어 Ames test와 90%의 상관성을 보이는 시험 방법인 SOS chromotest를 실시한 결과, 간접변이원인 Trp-P-2와 직접변이원인 4-NQO에 대하여 키토산 가수분해물이 SOS 반응의 유도를 억제하는 효과를 나타냈다. Table 3-6과 같이 Trp-P-2에 대해, 모든 분획에서 SOS 유도를 억제하는 현저한 효과는 나타나지 않았고, 양성대조군인 induction factor(IF)값 5.28에 대하여 CH-2의 10 mg/plate의 농도에서 3.64, CH-3과 CH-4의 5 mg/plate 및 10 mg/plate의 농도에서 3.24~4.06로서 유도 억제정도가 비교적 낮았다. *Salmonella typhimurium* reversion assay의 경우처럼, CH-5와 CH-6의 5 mg/plate 이상의 농도에서 항돌연변이 활성이 약간 나타났는데, CH-5의 5 mg/plate 및 10 mg/plate 농도에서 3.27 및 3.07, CH-6의 1 mg/plate 이상의 농도에서 2.89, 2.74 및 2.44의 IF 값을 보였다. 가장 높은 SOS 유도반응 억제효과는 CH-6의 10 mg/plate의 농도일 때 53.8%를 나타냈다.

Trp-P-2와는 다르게 4-NQO에 대한 항돌연변이 활성은 6가지 분획 모두에서 나타났다(Table 3-7). 또 4-NQO에 대해서 CH-1의 5 mg/plate 및 10 mg/plate 농도에서 IF 값을 19.91에서 5.32 및 6.52로 낮추어 68.4 및 67.3%의 유도 억제활성을 나타냈다. CH-3과 CH-4에서는 1 mg/plate 이상의 농도일 때 5.25~9.34의 IF값을 보여 53.1~73.6%의 돌연변이 억제효과를 나타냈다. CH-5와 CH-6에서는 낮은 농도인 0.5 mg/plate 이상의 농도부터 효과를 보였고, 그 이상의 농도에서는 비슷한 수준의 효과를 나타냈으며, IF값이 4.57~8.45, 즉 57.6~77.0%의 항돌연변이 활성을 나타냈다. SOS chromotest로 측정된 키토산 가수분해물의 항돌연변이 활성은 직접변이원인 4-NQO에 대한 활성이 간접변이원인 Trp-P-2에 대해서보다 더 크게 나타났다. 또한 고분자 분획으로 갈수록, 낮은 농도에서부터 항돌연변이 활성을 나타냈다.

한편, intact chitosan의 경우, Trp-P-2 및 4-NQO에 의한 SOS 유도억제활성을 0.02~0.2 mg/plate 범위에서 살펴본 연구에서, Trp-P-2에 대해서는 0~39.2%,

4-NQO에 대해서 0~49.0%의 유도억제활성을 나타냄을 알 수 있었다. 이는 키토산 가수분해물과 마찬가지로 간접변이원인 Trp-P-2보다는 직접변이원인 4-NQO에 대한 SOS 유도억제활성이 큼을 알 수 있었고, intact chitosan이 가수분해물보다는 활성이 적음을 알 수 있었다. 이와같이 SOS chromotest에 의해서 키토산 가수분해물이 돌연변이 억제활성을 조사하였을 때, 활성을 나타낸 것은 키토산이 positive charge를 가진 polysaccharide로서 변이원이 세균에 물리적 및 화학적으로 접근하는 것을 방해하여 나타낸 것으로 보여지나, 뒤에서 돌연변이 억제방식 시험에서 다시 살펴보고자 한다.

Table 3-6. Inhibitory effect of chitosan hydrolysates on direct SOS function induced by Trp-P-2 in *Escherichia coli* PQ 37

Treatment (mg/plate)	β -Galactosidase		Alkaline phosphatase		R	Induction factor	Inhibition rate(%)	
	Abs.	Unit	Abs.	Unit				
Negative control ¹⁾	0.32	10.7	1.41	46.9	0.23	1.00		
Positive control ²⁾	0.90	30.0	0.75	24.9	1.20	5.28		
CH-1	0.1	0.87	28.9	0.69	23.0	1.26	5.50	0.0
	0.5	0.85	28.2	0.69	23.0	1.23	5.38	0.0
	1.0	0.77	25.5	0.65	21.7	1.18	5.15	2.4
	5.0	0.77	25.6	0.59	19.8	1.29	5.66	0.0
	10.0	1.00	33.4	0.65	21.6	1.55	5.97	0.0
CH-2	0.1	0.81	26.9	0.70	23.3	1.15	5.05	4.3
	0.5	0.68	22.8	0.64	21.5	1.06	4.65	11.9
	1.0	0.71	23.6	0.68	22.6	1.04	4.57	13.4
	5.0	0.77	25.6	0.70	23.3	1.10	4.82	8.7
	10.0	0.43	14.4	0.52	17.4	0.83	3.64	31.0
CH-3	0.1	0.69	22.8	0.67	22.2	1.03	4.51	14.6
	0.5	0.76	25.4	0.66	22.0	1.15	5.05	4.2
	1.0	0.73	24.2	0.68	22.7	1.06	4.66	11.7
	5.0	0.47	15.5	0.58	19.3	0.81	3.53	33.2
	10.0	0.54	18.1	0.59	19.5	0.93	4.06	23.0
CH-4	0.1	0.63	21.1	0.67	22.5	0.94	4.12	21.9
	0.5	0.62	20.7	0.68	22.8	0.91	3.98	24.5
	1.0	0.72	23.9	0.71	23.8	1.00	4.39	16.8
	5.0	0.41	13.8	0.56	18.7	0.74	3.24	38.7
	10.0	0.53	17.6	0.69	23.0	0.77	3.36	36.3
CH-5	0.1	0.66	21.8	0.69	23.0	0.95	4.14	21.5
	0.5	0.65	21.6	0.67	22.2	0.97	4.26	19.2
	1.0	0.66	22.1	0.69	23.1	0.96	4.20	20.4
	5.0	0.42	13.9	0.56	18.6	0.75	3.27	38.0
	10.	0.45	15.1	0.64	21.5	0.70	3.07	41.8
CH-6	0.1	0.55	18.2	0.64	21.2	0.86	3.76	28.8
	0.5	0.61	20.4	0.67	22.2	0.92	4.03	23.7
	1.0	0.38	12.6	0.57	19.1	0.66	2.89	45.3
	5.0	0.34	11.4	0.55	18.3	0.63	2.75	48.0
	10.0	0.34	11.5	0.62	20.7	0.56	2.44	53.8

¹⁾ DMSO was used as a negative control.

²⁾ Trp-P-2 was used as a positive control.

Table 3-7. Inhibitory effect of chitosan hydrolysates on direct SOS function induced by 4-NQO in *Escherichia coli* PQ 37

Treatment (mg/plate)	β -Galactosidase		Alkaline phosphatase		R	Induction factor	Inhibition rate(%)	
	Abs.	Unit	Abs.	Unit				
Negative control ¹⁾	0.23	7.9	1.80	59.9	0.13	1.00		
Positive control ²⁾	2.30	76.7	0.88	29.2	2.63	19.91		
CH-1	0.1	2.33	77.5	0.68	22.6	3.43	26.03	0.0
	0.5	2.27	75.8	0.50	16.6	4.57	34.63	0.0
	1.0	1.36	45.2	0.31	10.2	4.43	33.61	0.0
	5.0	0.11	3.6	0.13	4.3	0.83	6.30	68.4
	10.0	0.09	3.0	0.10	3.5	0.86	6.52	67.3
CH-2	0.1	1.83	60.9	0.35	11.8	5.17	39.22	0.0
	0.5	0.76	25.4	0.22	7.4	3.44	26.08	0.0
	1.0	0.46	15.3	0.19	6.4	2.41	18.27	8.2
	5.0	0.13	4.5	0.11	3.6	1.26	9.53	52.2
	10.0	0.31	10.4	0.24	7.9	1.31	9.96	50.0
CH-3	0.1	1.73	57.5	0.32	10.7	5.40	40.96	0.0
	0.5	0.81	27.1	0.23	7.6	3.58	27.17	0.0
	1.0	0.13	4.3	0.17	5.6	0.77	5.84	70.7
	5.0	0.18	6.0	0.15	4.9	1.23	9.34	53.1
	10.0	0.26	8.6	0.23	7.8	1.10	8.38	57.9
CH-4	0.1	1.75	58.4	0.33	10.9	5.37	40.74	0.0
	0.5	0.29	9.5	0.16	5.4	1.76	13.35	33.0
	1.0	0.08	2.8	0.12	4.0	0.69	5.25	73.6
	5.0	0.20	6.8	0.18	6.0	1.13	8.59	56.9
	10.0	0.25	8.3	0.30	10.0	0.83	6.32	68.3
CH-5	0.1	1.85	61.6	0.39	13.1	4.71	35.73	0.0
	0.5	0.12	3.9	0.15	5.0	0.78	5.89	70.4
	1.0	0.08	2.7	0.12	4.2	0.64	4.84	75.7
	5.0	0.19	6.3	0.18	5.9	1.07	8.10	59.3
	10.0	0.19	6.2	0.30	10.0	0.62	4.73	76.2
CH-6	0.1	1.35	44.9	0.31	10.4	4.31	32.70	0.0
	0.5	0.09	3.0	0.15	5.0	0.60	4.57	77.0
	1.0	0.09	2.9	0.12	4.0	0.73	5.50	72.4
	5.0	0.15	4.9	0.13	4.4	1.11	8.45	57.6
	10.0	0.22	7.2	0.24	8.2	0.88	6.70	66.3

¹⁾ DMSO was used as a negative control.

²⁾ Trp-P-2 was used as a positive control.

이상의 키토산 가수분해물의 항돌연변이 활성을 살펴보면, 다른 문헌에서 항암활성이 있다고 보고된 키토산 소중합체에 대해서, 그 분자량 범위에 해당하는 본 연구의 CH-1과 CH-2는 *Salmonella typhimurium* reversion assay와 SOS chromotest 결과 모두 활성을 나타내지 않았거나, 낮은 효과를 보였다. 이와 같이 기존의 보고와 차이를 나타내는 것은, 다른 문헌에서 조사된 항암활성은 암세포의 직접적인 치사활성이나 종양이식 후 암세포의 성장저지 효과를 살펴본 것이므로, 본 연구에서 사용한 항돌연변이 시험 방법과의 차이때문이 아닌가 생각된다. 본 연구 결과에서는 분자량이 4만 이상인 중분자 또는 고분자 분획의 키토산 가수분해물에서 돌연변이 억제활성이 나타났고, CH-6보다 분자량이 약 10배 가량 큰 intact chitosan은 오히려 활성이 감소된 것으로 보아, 항돌연변이 활성을 나타내는 최적의 분자량 범위가 있을 것으로 생각되고, 점성이 높은 고분자 키토산은 아닌 것으로 사료된다.

라. Chitosan 가수분해물의 돌연변이 억제 방식

키토산 가수분해물이 Trp-P-2, 4-NQO 등의 변이원성에 대해 억제 활성을 지녔다는 것을 알 수 있었다. 이러한 돌연변이 억제물질은 다양한 억제 작용 방식을 지니는데, 크게 세포의 돌연변이 억제물질(desmutagen)과 세포내 돌연변이 억제물질(bio-antimutagen)으로 구분할 수 있으며, 키토산 가수분해물이 어떠한 양식으로 작용하는지 알아보았다. 전자인 desmutagen은 변이원으로 활성되는 것을 억제하거나 변이원 자체를 직접적으로 불활성화시키는 등 주로 세포외에서 DNA에 변이원이 도달하기 전단계에서 작용하는 반면, 후자인 bio-antimutagen은 세포내에서 DNA repair 및 promotion 단계에 작용하는 것으로 보고되고 있다^(46,47). 예를들어, phenolic antioxidants인 ferulic acid, caffeic acid, chlorogenic acid, ellagic acid, sesamol, myricetin, robinetin, luteoline 등과 bay, berfamont, peppermint 등 다양한 herbs의 물추출물, 식이섬유 등이 desmutagen의 대표적인 예이고, epigallocatechin gallate, polyphenol계 antioxidant 등이 bio-antimutagen에 속한다.

Trp-P-2에 대한 돌연변이 억제활성이 컸던 CH-5 및 CH-6에 대한 억제방식을 살펴본 결과는 Fig. 3-3과 같다. DNA 손상을 먼저 유도하여 bio-antimutagenicity활성을 지니는지 알아본 결과, CH-5는 0.1~10.0 mg/plate의 농도 범위에서 용량-반응 관계를 뚜렷히 나타내었으며 세포내 돌연변이 억제활성이 더 큰 경향이였다. CH-6도 10 mg/plate의 농도를 제외한 0.1~5.0 mg/plate까지 용량-반응 관계를 나타내었으며 세포내 돌연변이 억제활성이 더 큰 경향으로 나타나, CH-5 및 CH-6이 모두 bio-antimutagen으로서 작용 가능성이 더 큼을 알 수 있었다. 한편, intact chitosan의 경우는 0.5mg/plate의 농도까지는 desmutagen, 그 이상의 농도에서는 bio-antimutagen으로 작용하였다⁽⁴⁵⁾. Assay에 사용한 CH-5 및 CH-6의 농도가 chitosan보다 높았음을 고려할 때, 키토산 가수분해물과 키토산 모두 고농도로 갈수록 bio-antimutagen으로 작용하였다는 일치된 결과를 볼 수 있었다. 그러나 분자량이 약 4만인 CH-5, 약 7만인 CH-6 및 약 100만인 키토산이 어떻게 세포내에 투과되어 세포내 항돌연변이원으로서 작용했는지 아직 정확한 원인을 알 수 없었으며, 앞으로 규명되어야 할 부분인 것으로 보인다.

3. 면역 증강 활성

가. 거식세포 활성화능

기존의 보고에 의하면 다당성분에 의한 항종양 활성은 숙주 매개 면역 반응에 관여하여 종양에 의해 손상된 면역기능을 회복 또는 증강시켜 활성을 나타내는 것으로 보고하고 있다⁽⁶⁹⁾. 따라서 키토산 및 그 가수분해물이 in vitro에서 거식세포 활성화능을 나타내는지 살펴보기 위해 반응성 질소종 분비능, 반응성 산소종 분비능, cytokine(IL-1) 및 TNF 분비능을 측정하였다.

1) 반응성 질소종 분비능

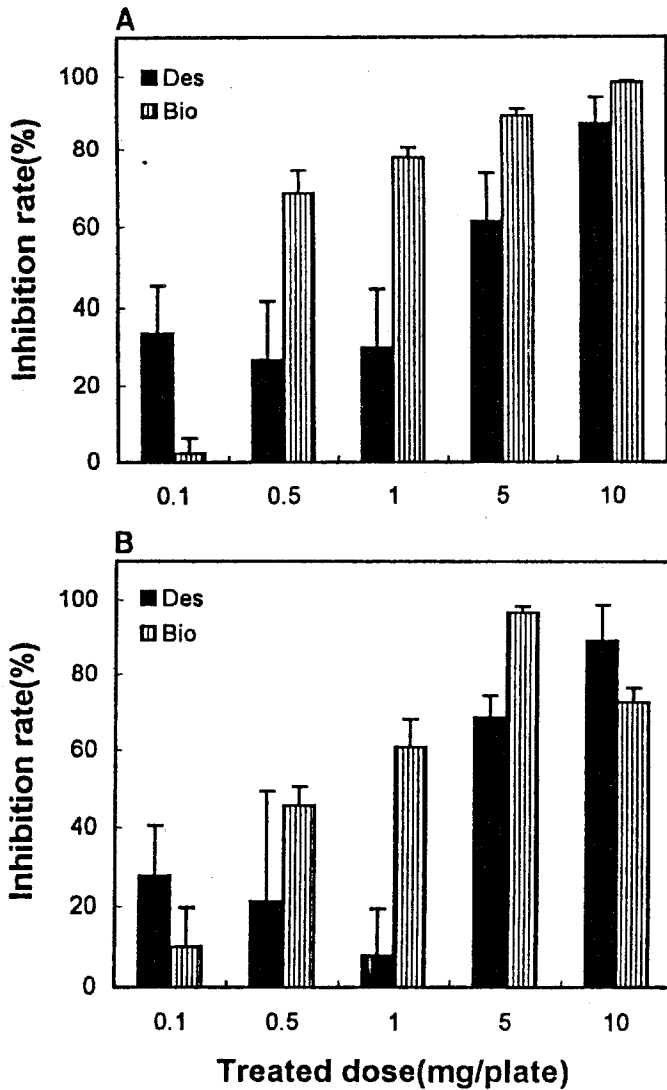


Fig. 3-3. Bio-antimutagenicity and desmutagenicity of chitosan hydrolysate fraction 5 and fraction 6 against the mutagenicity of Trp-P-2 by *S. typhimurium* reversion assay

A : Fraction 5, B : Fraction 6,

Des : Desmutagenicity, Bio : Bio-antimutagenicity

활성화된 거식세포의 여러가지 분비물 중에서 반응성 질소종(reactive nitrogen intermediate: RNI)은 비교적 최근에 알려진 물질로서 면역작용에 의한 항미생물, 항암작용의 기전중에서 높은 화학적 반응성을 나타내는 물질로 알려져 있다. 즉 거식세포가 세균을 탐식하게 되면 TNF와 γ -interferon 등의 자극으로 nitric oxide synthetase가 산소와 결합하여 L-arginine을 산화시켜 NO가 생성된다. 이렇게 생긴 NO는 미생물과 암세포에 대하여 독작용을 나타내며 독작용은 미토콘드리아 기능 억제, FeS 함유 효소기능 저하 및 DNA 손상에 의한 현상으로 알려져 있다⁽⁴⁸⁾. 그러나 NO는 반응성이 강하여 짧은 시간에 nitrite(NO_2^-)나 nitrate(NO_3^-)로 전환되거나 친화력이 있는 SH, heme 등에 부착되므로 NO 생성량을 측정하기 위해서 안정된 대사산물인 nitrite나 nitrate를 Griess 반응을 이용하여 측정한다. 따라서 키토산 가수분해물, 키토산, GA, NAGA 및 COS-6의 반응성 질소종 분비능을 살펴보았다.

먼저 키토산 가수분해물, 키토산, GA, NAGA 및 COS-6 자체가 세포독성을 지니는지 알아보기 위해 MTT assay를 수행한 결과, Fig. 3-4에서와 같이 사용된 시료가 모두 세포독성을 나타냈다. 즉 0.2~200 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 로 시료의 농도가 증가할수록 세포독성이 점차 뚜렷히 증가하였다. CH-1, CH-2, CH-3는 51~90%의 생존율을 보였으나, CH-4는 18~91%, CH-5는 30~84%, CH-6는 26~87%였다. CH-4의 200 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 에서 18%의 생존율을 나타내어 모든 시료 중 가장 큰 세포독성이 있었다. 키토산의 경우, 2 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 의 농도에서 nitrite 분비정도가 가장 컸을 뿐만 아니라, 세포 독성도 55%의 생존율을 보여 가장 컸다. 0.2~2 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 사이의 농도를 다시 측정한 결과, nitrite 분비 및 세포독성이 용량-반응의 비례관계를 나타냈다.

거식세포가 생성하는 nitrite(NO_2^-)의 농도는 Table 3-8에서와 같이 control인 PBS가 1.85 μM , acetate가 0.64 μM 이었으며, 시료를 첨가하였을 때는 0~35 $\mu\text{M}/\text{assay}$ 의 농도로서, 모든 시료가 반응성 질소종 분비능을 나타냈다. CH-1에서 CH-5는 0.2, 2, 20, 200 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 의 시험농도들 중에서 20 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 일 때 한 시료내에서 최고의 값을 보였고 CH-6과 chitosan은 2 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 일 때 최고의 값을 나타내어

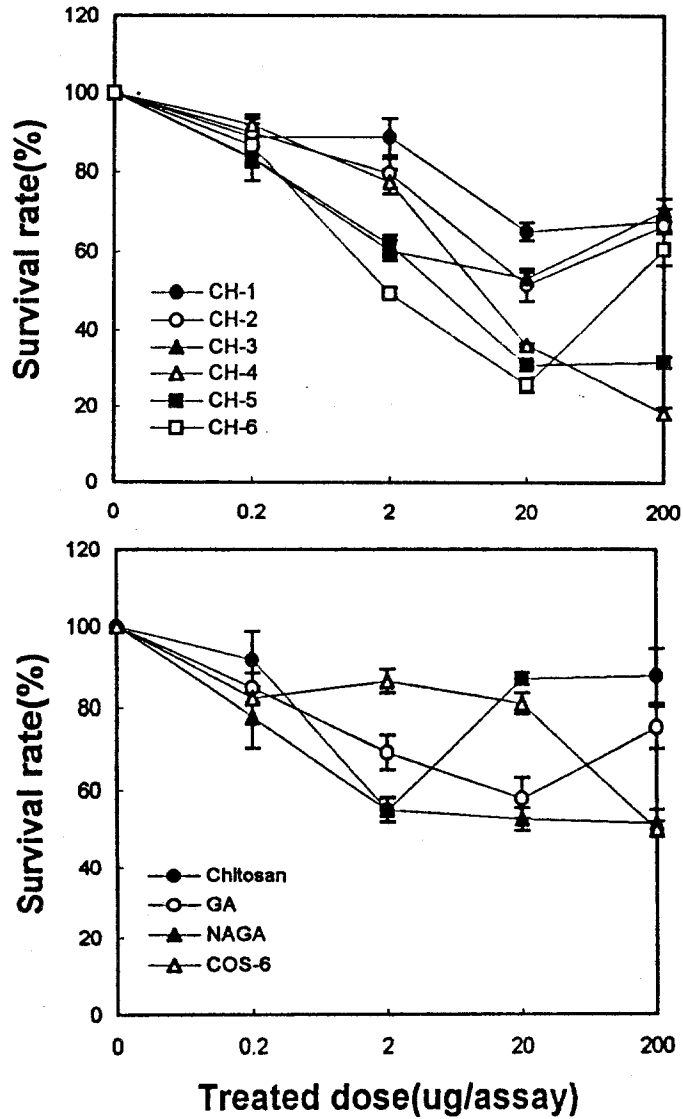


Fig. 3-4. Cytotoxic effect of chitosan hydrolysates, chitosan, GA, NAGA and COS-6 on the growth of continuous macrophage J774A.1 cell line

고분자 분획으로 갈수록 낮은 시험농도에서 최고의 값을 나타내는 경향이였다. 20 μg /assay일 때 각 시료들을 비교해보면, CH-1에서 CH-6까지 26.4, 34.8, 28.6, 15.6, 22.7, 18.8 μM 이었으며, 가수분해물중에서 CH-2의 nitrite 분비능이 가장 컸다. 0.2 μg /assay의 농도에서는 가수분해물간에 차이를 나타내지 않았으며, 2 μg /assay에서는 7.7~25.8 μM 로서 고분자 분획으로 갈수록 증가하는 경향을 나타냈다. 각 시료에서 최고의 활성을 나타낸 20 μg /assay에서의 수치가 고분자 분획보다 저분자 분획쪽에서 더 높게 나타난 이유는 MTT assay에서 고분자(CH-4, 5, 6)가 세포 독성이 더 컸기 때문에 나타난 영향인 것으로 생각된다.

또한, 키토산의 경우, 2 μg /assay일 때, 35.0 μM 의 최고 농도를 나타냈다. Glucosamine(GA)은 키토산을 주로 구성하는 단당이고, N-acetylglucosamine은 키토산을 주로 구성하며 키토산에도 소량 존재하는 단당으로서, 활성을 나타내는 분자량 범위를 알고자 하는 것이 본 연구의 목적이므로 가장 분자량이 작은 단당과 올리고당을 시험에 포함시켰고, 또한 이들을 통해 아세틸기의 유무가 활성에 영향을 미치는지 알아보하고자 하였다. GA은 0.2~20 μg /assay, NAGA는 0.2~200 μg /assay 사이에서 뚜렷한 용량-반응 관계를 보였고, NAGA는 200 μg /assay일 때 34 μM 의 nitrite가 분비되었다. COS-6도 최고 27.7 μM (200 μg /assay)의 농도로 nitrite가 분비됨을 볼 수 있었고, 용량-반응 관계를 선명히 볼 수 있었다.

한편, 키토산 가수분해물과 함께 lipopolysaccharide(LPS)를 첨가하여 secondary activation 정도를 알아본 결과, PBS는 49.42 μM , acetate는 44.8 μM 이었다. 이들과 비교했을 때, 키토산 가수분해물, 키토산, GA, NAGA, COS-6 모두 LPS를 첨가한 정도 만큼만 nitrite 분비 정도가 증가하였고, CH-2의 200 μg /assay일 때, 다른 시료에 비해 약간 증가한 경향을 보였다. 그리고 세포 독성이 컸던 시료와 농도 범위에서는 오히려 PBS나 acetate값보다도 더 낮은 값을 나타내었다.

Rat peritoneal exudate macrophage에 대한 nitric oxide 생산에 관해 chitosan, NAGA, N-acetylmannosamine(NAManA), N-acetylgalactosamine(NA-GalA)을 처리

Table 3-8. Nitrite production by continuous macrophage cell line(J774A.1) treated with chitosan hydrolysates, chitosan, GA, NAGA and COS-6

Treatment	Treated dose ($\mu\text{g}/\text{assay}$)	Nitrite concn ($\mu\text{M}/2 \times 10^5$ cells)	Lipopolysaccharide-induced nitrite concn($\mu\text{M}/2 \times 10^5$ cells)
PBS ¹⁾		$1.85 \pm 0.71^{3)}$	49.42 ± 1.70
Acetate		0.64 ± 0.35	44.79 ± 0.85
CH-1	0.2	6.14 ± 0.64	45.20 ± 0.35
	2	7.66 ± 0.83	43.98 ± 1.46
	20	26.39 ± 0.93	45.94 ± 1.15
	200	20.11 ± 1.16	41.48 ± 1.88
CH-2	0.2	7.22 ± 0.73	41.01 ± 1.12
	2	9.92 ± 1.42	44.19 ± 1.80
	20	34.77 ± 1.35	50.73 ± 1.88
	200	3.44 ± 0.80	62.08 ± 0.58
CH-3	0.2	7.62 ± 0.92	43.44 ± 2.58
	2	20.93 ± 1.55	39.46 ± 2.00
	20	28.56 ± 0.58	42.36 ± 1.93
	200	9.18 ± 1.24	54.45 ± 1.38
CH-4	0.2	6.24 ± 0.69	47.90 ± 0.62
	2	12.62 ± 1.06	46.41 ± 2.39
	20	15.59 ± 0.70	20.49 ± 0.35
	200	17.11 ± 3.15	27.24 ± 1.97
CH-5	0.2	6.38 ± 0.82	42.90 ± 0.96
	2	22.31 ± 0.80	37.77 ± 0.62
	20	22.68 ± 0.69	20.62 ± 0.12
	200	21.50 ± 0.92	27.78 ± 0.93
CH-6	0.2	2.97 ± 0.56	43.44 ± 2.23
	2	25.82 ± 1.02	28.05 ± 1.17
	20	18.83 ± 0.43	13.67 ± 0.62
	200	4.65 ± 0.46	26.83 ± 1.32
Chitosan	0.2	1.21 ± 0.57	42.97 ± 2.73
	2	35.04 ± 3.04	42.97 ± 0.93
	20	2.93 ± 2.40	27.24 ± 1.52
	200	6.88 ± 0.70	31.83 ± 1.62
GA	0.2	5.43 ± 0.39	40.74 ± 2.06
	2	14.65 ± 0.94	41.69 ± 1.30
	20	26.39 ± 4.23	43.92 ± 0.51
	200	0	8.27 ± 0.51
NAGA	0.2	8.47 ± 0.43	46.68 ± 0.51
	2	25.11 ± 1.76	48.71 ± 0.82
	20	27.00 ± 1.13	48.03 ± 1.82
	200	34.02 ± 1.76	48.17 ± 2.55
COS-6	0.2	1.72 ± 0.26	39.19 ± 2.13
	2	2.97 ± 0.22	40.00 ± 1.84
	20	9.11 ± 0.74	42.84 ± 1.72
	200	27.68 ± 1.06	52.42 ± 0.42
LPS ²⁾	0.02	-	21.84 ± 1.10
	0.2	-	48.24 ± 1.10
	2	-	46.08 ± 1.12

¹⁾ PBS : phosphate buffered saline (pH 7.2), ²⁾ LPS : lipopolysaccharide

³⁾ Mean \pm STD

한 실험 결과를 보면, 키토산과 NAGA가 nitrite 분비능이 컸고, 그 다음이 GA였으며, NAGaA, NAManA 등은 분비능이 적었다⁽²⁹⁾. 그 연구에서 대부분이 glucosamine으로 구성된 키토산의 macrophage activation은 glucosamine에 의한 효과라기보다, 주로 소량 존재하는 NAGA에 기인하는 것으로 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 키토산, GA, NAGA 중에서 키토산과 NAGA가 약간 높은 수치였으나, GA의 nitrite 분비능도 컸으며 세포독성을 감안하여, 비슷한 정도로 반응성 질소종 분비능이 있는 것으로 보이므로, 키토산의 활성이 NAGA에만 기인한다고 할 수는 없고 nitrite 분비능은 아세틸기의 유무에 영향을 받지 않는 것으로 보여졌다.

2) 반응성 산소종 분비능

세균과 같은 이물질이 거식세포가 탐식하게 되면 탐식포 막에 있는 효소에 의하여 산소가 superoxide anion으로 환원되고 계속하여 수산기(-OH), 일중항 산소(singlet oxygen) 및 hydrogen peroxide를 형성하게 된다. 이들은 반응성 산소종(reactive oxygen species)라 하여 세균이나 암세포에 대하여 독작용을 나타낸다.

따라서 반응성 질소종과 더불어 거식세포가 활성화되어 분비되는 대표적 화학물 질인 반응성 산소종 중에서 H₂O₂ 분비능을 알아본 결과는 Table 3-9와 같다. Assay system에 phorbol myristic acetate(PMA)가 첨가되어 유도된 반응성 산소종 분비능은 chitosan 가수분해물들, GA, COS-6에서 모두 나타났다. H₂O₂ 생성량(μ M/mg macrophage protein)을 계산한 결과, CH-1은 423.8~699.6, CH-2는 89.1~478.8, CH-3는 84.0~387.8, CH-4는 211.3~596.7을 분비하였고, 이들 중에서는 CH-1의 분비능이 큼을 알 수 있었다. 반면, CH-5는 0.2~200 μ g/assay에서 용량-반응 관계를 뚜렷히 나타내며 296.0~894.3 μ M의 산소종을 분비하였다. CH-6은 0.2~20 μ g/assay의 농도까지 288.7, 510.3, 1044.4 μ M로 증가하였으나 200 μ g/assay에서는 오히려 훨씬 감소되었다. 모든 분획중에서 CH-6은 20 μ g/assay 농도에서 1044.4 μ M의 산소종을 분비하여 최고 활성을 나타냈다.

Table 3-9. Hydrogen peroxide production by continuous macrophage cell line(J774A.1) treated with chitosan hydrolysates, chitosan, GA, NAGA and COS-6

Treatment	Treated dose ($\mu\text{g}/\text{assay}$)	H ₂ O ₂ produced ($\mu\text{M}/\text{mg}$ macrophage protein)
PBS		239.9 \pm 59.9 ¹⁾
Acetate		248.3 \pm 19.3
CH-1	0.2	423.8 \pm 68.6
	2	500.4 \pm 4.9
	20	425.8 \pm 37.6
	200	699.6 \pm 56.7
CH-2	0.2	434.8 \pm 67.1
	2	478.8 \pm 36.8
	20	299.6 \pm 30.8
	200	89.1 \pm 7.1
CH-3	0.2	387.8 \pm 19.9
	2	321.9 \pm 30.5
	20	293.1 \pm 15.0
	200	84.0 \pm 8.2
CH-4	0.2	397.0 \pm 21.5
	2	406.4 \pm 8.1
	20	596.7 \pm 9.3
	200	211.3 \pm 11.8
CH-5	0.2	296.0 \pm 18.8
	2	580.9 \pm 23.1
	20	862.1 \pm 14.9
	200	894.3 \pm 28.2
CH-6	0.2	288.7 \pm 25.8
	2	510.3 \pm 28.4
	20	1044.4 \pm 29.7
	200	232.0 \pm 4.2
Chitosan	0.2	201.8 \pm 48.0
	2	194.9 \pm 36.2
	20	82.2 \pm 10.1
	200	100.0 \pm 5.7
GA	0.2	302.8 \pm 47.0
	2	264.0 \pm 24.1
	20	198.8 \pm 26.5
	200	477.2 \pm 49.3
NAGA	0.2	209.6 \pm 29.8
	2	170.9 \pm 4.1
	20	216.9 \pm 27.6
	200	179.7 \pm 16.1
COS-6	0.2	207.0 \pm 11.3
	2	255.2 \pm 31.8
	20	349.9 \pm 46.1
	200	260.8 \pm 16.9

¹⁾ Mean \pm STD

키토산은 82.2~201.8 μM , GA는 198.8~477.2 μM , NAGA는 170.9~216.9 μM , COS-6는 207.0~349.9 μM 의 수치를 나타냈는데, GA를 제외하고, 키토산과 NAGA는 nitrite 분비능이 컸던 것과 비교할 때, hydrogen peroxide 분비능은 다른 시료에 비해 상대적으로 적음을 알 수 있었다. Murine candidiasis를 유발하여 키틴 및 키토산의 보호효과를 조사한 연구에서, mouse peritoneal exudate cells로부터의 반응성 산소종 분비능에 대해 키틴과 키토산을 비교하였을 때 키틴을 처리한 것과 키토산을 처리한 세포에서 더 컸음을 알 수 있었다⁽³⁰⁾. 또 *Listeria monocytogenes* 감염을 mouse에 유발하여 NACOS-6의 방어효과를 본 연구에서 NACOS-6를 처리하지 않은 군에 비해 NACOS-6 처리군이 반응성 산소종 분비능이 큼을 볼 수 있었다⁽⁴⁵⁾. 또 다른 연구에서도 NACOS-4, 5, 6이 mouse peritoneal cell의 반응성 산소종 분비 증진 효과를 보고하였다^(27,28). 그러나, 본 연구에서는 NACOS-6로 시험하지는 않았으나, 단당과 올리고당인 GA, NAGA, COS-6 모두 키토산 가수분해물에 비해 훨씬 낮은 수준의 반응성 산소종 분비능을 나타냈다.

3) Interleukin-1 α 분비능

Interleukin-1은 17 KDa의 단백질로서 T cell의 생산을 증가시키고 B cell의 활성화 및 항체 생산을 증가시키는 등 생체내 여러 면역 기능 조절에 관여하고 있는 면역 조절 물질 중의 하나이다. IL-1은 등전점에 기준하여 IL-1 α (pI 5.0)와 IL-1 β (pI 7.0)의 2종류로 분류하고 있으며 여러 종류의 세포에서 분비되나 특히 활성화된 거식세포에서 많이 분비되는 cytokine으로 알려져 있다⁽⁴⁹⁾. 따라서 키토산 및 그 가수분해물이 *in vitro*에서 거식세포 활성화능을 나타내는지 살펴보기 위해 IL-1 α 분비정도를 ELISA로 측정하였다. 그 결과는 Table 3-10과 같이 IL-1 α 가 분비된 시료는 CH-4, CH-6 및 키토산이었고, 다른 시료들은 IL-1 α 분비능을 나타내지 않았다.

Table 3-10. Interleukin-1 α production by continuous macrophage cell line(J774A.1) treated with chitosan hydrolysates, chitosan, GA, NAGA and COS-6

Treatment	Treated dose (μ g/assay)	IL-1 α concn (pM/2x10 ⁵ cells)	Treatment	Treated dose (μ g/assay)	IL-1 α concn (pM/2x10 ⁵ cells)
PBS		ND ¹⁾			
Acetate		ND			
CH-1	0.2	ND	CH-6	0.2	ND
	2	ND		2	ND
	20	ND		20	ND
	200	ND		200	26.1
CH-2	0.2	ND	Chitosan	0.2	ND
	2	ND		2	ND
	20	ND		20	2.49
	200	ND		200	28.25
CH-3	0.2	ND	GA	0.2	ND
	2	ND		2	ND
	20	ND		20	ND
	200	ND		200	ND
CH-4	0.2	ND	NAGA	0.2	ND
	2	ND		2	ND
	20	ND		20	ND
	200	7.6		200	ND
CH-5	0.2	ND	COS-6	0.2	ND
	2	ND		2	ND
	20	ND		20	ND
	200	ND		200	ND

¹⁾ ND: Not detectable

CH-4의 200 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 에서 7.60 pM, CH-6도 200 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 에서 26.05 pM, 키토산은 20 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 에서 2.49 pM, 200 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 에서 28.25 pM을 나타냈다. IL-1 α 의 경우에 고분자 분획이 거식세포 활성화능이 컸음을 알 수 있었다.

4) Tumor necrosis factor 분비능

Tumor necrosis factor는 염증 및 암 등의 질환에서 면역능이나 대사의 조절에 중요한 역할을 담당하는 내인성 매개인자이다. 거식세포는 외부에서 침입한 세균 등에 의해 거식세포가 활성화되면 다량의 TNF를 분비하는 것으로 알려져 있다. TNF의 항암작용도 대부분 TNF 자체의 독성에 의해서라기 보다 TNF에 의해 모이고 (chemotaxis), 활성화된 거식세포, cytotoxic-T cell 및 natural killer cell 등이 생산하는 NO나 H₂O₂들이 암세포를 죽임으로써 나타내는 것으로 추측되고 있다⁽⁵⁰⁾.

따라서 거식세포가 분비하는 TNF를 측정된 결과는 Table 3-11과 같으며, 모든 시료에서 분비됨을 측정할 수 있었다. 측정된 농도범위는 59.5 nM에서부터 최고 1341.6 nM이었다. CH-1, CH-2, CH-3에서보다는 CH-4, CH-5, CH-6에서 전반적으로 TNF 농도가 컸으며, CH-4는 549~1341.6 nM, CH-5는 637.9~952.1 nM, CH-6는 213.3~1243.8 nM의 범위였다. CH-4는 200 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 에서 1341.6 nM의 TNF가 분비되어 가장 높은 수치를 나타냈으며 CH-5는 20 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 에서 952.1nM, CH-6은 20 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 에서 1243.8 nM을 보였다. 키토산의 경우, nitrite, IL-1 α 분비능 assay에서와 같이 2 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 에서 두드러지게 수치가 증가하여 1172.5 nM을 나타냈다.

Table 3-11. Tumor necrosis factor production by continuous macrophage cell line(J774A.1) treated with chitosan hydrolysates, chitosan, glucosamine, N-acetylglucosamine and chitohexaose

Treatment	Treated dose ($\mu\text{g}/\text{assay}$)	TNF concn (nM/ 2×10^5 cells)	Treatment	Treated dose ($\mu\text{g}/\text{assay}$)	TNF concn (nM/ 2×10^5 cells)
CH-1	0.2	512.2	CH-6	0.2	267.2
	2	604.3		2	703.6
	20	644.0		20	1243.8
	200	564.6		200	213.3
CH-2	0.2	622.1	Chitosan	0.2	59.5
	2	561.5		2	1172.5
	20	656.2		20	311.0
	200	ND ¹⁾		200	549.8
CH-3	0.2	145.0	GA	0.2	575.8
	2	673.1		2	503.0
	20	761.1		20	542.7
	200	ND		200	153.2
CH-4	0.2	707.7	NAGA	0.2	644.0
	2	549.3		2	576.3
	20	820.7		20	517.8
	200	1341.6		200	581.4
CH-5	0.2	637.9	COS-6	0.2	480.1
	2	675.6		2	577.8
	20	952.1		20	741.8
	200	897.6		200	624.7

1) ND : Not detectable

나. 비장세포의 interleukin-2 분비능 및 면역세포 증식능

비장 면역세포 중 helper-T cell이 활성화되면 IL-2와 같은 lymphokine을 생성 및 분비하며, 이것이 활성화된 cytotoxic T-cell을 증폭시키고, natural killer cell을 활성화시켜 종양세포를 살해하는데 관여하는 것으로 알려져 있다⁽⁵¹⁾.

정상 BALB/c mouse에게 thioglycollate를 복강에 주입하여 elicitation 시킨 후 비장을 떼내어 분리한 비장 면역세포의 IL-2 분비능을 키토산 가수분해물이 증진시키는 지 알아본 결과(Table 3-12), CH-4, CH-5, CH-6 및 키토산을 20 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 의 농도로 첨가했을 때 분비된 IL-2 농도는 PBS에 비해 낮은 수준으로서 각각 71.05, 44.89, 54.28, 39.86 pM/ 4×10^5 cells였다. Con A만 첨가했을 때는 242.41 pM/ 4×10^5 cells로서 최고 수준을 나타냈다. 한편, 키토산 가수분해물과 T cell mitogen인 Con A를 함께 첨가하여 배양했을 때, IL-2 분비능이 증가하였다. 즉, CH-4는 97.54 pM/ 4×10^5 cells로 수치가 커졌고, CH-5는 108.94 pM/ 4×10^5 cells로서 증가폭이 가장 컸으며, CH-6도 74.74 pM/ 4×10^5 cells로 증가하였다. 그러나 키토산은 Con A를 첨가시 IL-2 분비능이 증가되지 않았다.

Mitogen은 면역 세포의 세포막의 특정 부위에 특이성(specificity)을 가지며, 면역 세포를 자극하여 DNA 합성을 유도하며 증식반응을 일으키는 것으로 보고되고 있다⁽⁵¹⁾. 식물성 mitogen가운데 Con A 및 PHA는 T cell을, LPS는 B cell을 자극한다고 알려져 있으므로 이들을 이용하여 비장세포의 증식효과를 측정하였다. Table 3-13과 같이 Con A를 첨가했을 때 키토산 가수분해물이 면역세포 증식에 미치는 영향을 stimulation index(SI)로 나타냈다. 그 결과, Con A를 1.5 및 3.0 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 의 농도로 첨가했을 때 SI가 1보다 큰 시료는 200 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 의 CH-6과 20 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 의 chitosan이었다. PHA를 1.5 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 농도로 첨가한 경우에 대부분의 시료에서 SI수치가 1보다 컸으나, PBS 또는 acetate의 SI 수치보다 큰 시료는 20 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 의 CH-6. 0.2 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 의 chitosan. 0.2 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 의 NAGA였다. 3.0 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 의 농도로 PHA를 첨가했을 때, 각 시료의 SI수치는 1.5 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 농도일 때와 거의 차이가 없었으며, 200 μg

/assay의 CH-4가 가장 큰 SI 수치를 나타냈다.

Table 3-12. Interleukin-2 production by thioglycollate-elicited BALB/c mouse spleen cells injected with chitosan hydrolysates and chitosan

Treatment (concn : 20 μ g/assay)	IL-2 concn (pM/4x10 ⁵ cells)
PBS	99.89
CH-4	71.05
CH-5	44.89
CH-6	54.28
Chitosan	39.86
Con A	242.41
C ¹⁾ -CH-4	97.54
C-CH-5	108.94
C-CH-6	74.74
C-Chitosan	0.00

1) C : Concanavalin A-stimulated

Table 3-13. Proliferative effect of chitosan hydrolysates, chitosan, GA, NAGA and COS-6 on splenocyte of thioglycollate-elicited BALB/c mouse stimulated by mitogens

Treatment	Treated dose ($\mu\text{g}/\text{assay}$)	Stimulation index(SI)					
		Con A		PHA		LPS	
		1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	3.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	3.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	3.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$
PBS		0.76 \pm 0.14	0.84 \pm 0.15	1.22 \pm 0.15	0.93 \pm 0.18	1.74 \pm 0.06	1.71 \pm 0.05
Acetate		0.86 \pm 0.09	1.38 \pm 0.69	1.18 \pm 0.20	1.02 \pm 0.07	2.12 \pm 0.05	2.82 \pm 0.38
CH-1	0.2	0.97 \pm 0.01	0.85 \pm 0.03	0.94 \pm 0.06	0.91 \pm 0.07	1.09 \pm 0.20	1.52 \pm 0.06
	2	0.90 \pm 0.01	0.79 \pm 0.02	1.18 \pm 0.12	0.85 \pm 0.23	1.06 \pm 0.36	1.32 \pm 0.04
	20	0.84 \pm 0.03	0.77 \pm 0.03	1.11 \pm 0.09	0.94 \pm 0.22	1.03 \pm 0.09	1.20 \pm 0.03
	200	0.77 \pm 0.04	0.65 \pm 0.06	1.04 \pm 0.08	0.84 \pm 0.19	0.97 \pm 0.17	1.06 \pm 0.02
CH-2	0.2	0.77 \pm 0.02	0.66 \pm 0.03	1.10 \pm 0.06	1.05 \pm 0.01	1.06 \pm 0.31	1.24 \pm 0.05
	2	0.72 \pm 0.01	0.69 \pm 0.05	1.10 \pm 0.12	0.94 \pm 0.19	1.21 \pm 0.02	1.24 \pm 0.06
	20	0.83 \pm 0.01	0.77 \pm 0.09	1.06 \pm 0.07	1.07 \pm 0.02	1.08 \pm 0.19	1.30 \pm 0.05
	200	0.78 \pm 0.08	0.85 \pm 0.12	0.89 \pm 0.07	0.92 \pm 0.14	2.01 \pm 0.05	2.19 \pm 0.16
CH-3	0.2	0.68 \pm 0.01	0.63 \pm 0.03	0.99 \pm 0.11	1.05 \pm 0.03	1.21 \pm 0.02	1.18 \pm 0.04
	2	0.74 \pm 0.01	0.69 \pm 0.03	0.91 \pm 0.02	1.08 \pm 0.08	1.23 \pm 0.04	1.23 \pm 0.05
	20	0.82 \pm 0.04	0.77 \pm 0.04	0.85 \pm 0.06	1.01 \pm 0.02	1.21 \pm 0.05	1.20 \pm 0.05
	200	0.55 \pm 0.05	0.32 \pm 0.05	0.75 \pm 0.02	1.05 \pm 0.08	1.05 \pm 0.03	0.95 \pm 0.04
CH-4	0.2	0.77 \pm 0.02	0.67 \pm 0.02	0.89 \pm 0.08	1.02 \pm 0.08	1.19 \pm 0.05	1.25 \pm 0.06
	2	0.70 \pm 0.03	0.65 \pm 0.04	1.07 \pm 0.08	0.97 \pm 0.07	1.20 \pm 0.02	1.16 \pm 0.06
	20	0.62 \pm 0.04	0.69 \pm 0.12	0.99 \pm 0.15	1.11 \pm 0.10	1.05 \pm 0.18	1.09 \pm 0.09
	200	0.82 \pm 0.07	0.94 \pm 0.22	1.09 \pm 0.04	1.21 \pm 0.13	1.01 \pm 0.15	1.04 \pm 0.11
CH-5	0.2	0.67 \pm 0.01	0.62 \pm 0.03	1.12 \pm 0.04	1.03 \pm 0.08	1.15 \pm 0.06	1.16 \pm 0.04
	2	0.75 \pm 0.03	0.70 \pm 0.02	1.14 \pm 0.04	0.97 \pm 0.05	1.18 \pm 0.08	1.23 \pm 0.02
	20	0.67 \pm 0.03	0.70 \pm 0.06	1.14 \pm 0.09	1.02 \pm 0.11	1.00 \pm 0.07	1.06 \pm 0.03
	200	0.69 \pm 0.01	0.80 \pm 0.06	0.90 \pm 0.08	0.90 \pm 0.10	0.77 \pm 0.07	0.78 \pm 0.08
CH-6	0.2	0.69 \pm 0.01	0.65 \pm 0.02	1.06 \pm 0.04	1.11 \pm 0.03	1.25 \pm 0.05	1.21 \pm 0.04
	2	0.72 \pm 0.04	0.68 \pm 0.02	1.12 \pm 0.06	1.07 \pm 0.07	1.25 \pm 0.08	1.26 \pm 0.04
	20	0.70 \pm 0.13	0.62 \pm 0.11	1.23 \pm 0.14	1.05 \pm 0.19	1.26 \pm 0.06	1.27 \pm 0.14
	200	0.87 \pm 0.07	1.05 \pm 0.20	0.89 \pm 0.06	0.93 \pm 0.04	0.99 \pm 0.06	0.98 \pm 0.07
Chitosan	0.2	0.52 \pm 0.04	0.44 \pm 0.05	1.25 \pm 0.04	0.80 \pm 0.08	1.52 \pm 0.20	1.22 \pm 0.08
	2	0.49 \pm 0.01	0.46 \pm 0.03	1.22 \pm 0.10	0.85 \pm 0.08	1.13 \pm 0.06	1.14 \pm 0.11
	20	1.03 \pm 0.04	1.02 \pm 0.06	1.13 \pm 0.03	1.06 \pm 0.02	1.69 \pm 0.29	1.54 \pm 0.19
	200	0.74 \pm 0.05	0.70 \pm 0.01	1.13 \pm 0.32	0.76 \pm 0.06	1.12 \pm 0.04	1.32 \pm 0.25
GA	0.2	0.71 \pm 0.01	0.70 \pm 0.01	1.19 \pm 0.06	1.15 \pm 0.00	1.22 \pm 0.06	1.20 \pm 0.05
	2	0.75 \pm 0.03	0.68 \pm 0.00	1.14 \pm 0.04	1.14 \pm 0.07	1.23 \pm 0.04	1.10 \pm 0.06
	20	0.74 \pm 0.02	0.66 \pm 0.01	1.14 \pm 0.02	1.12 \pm 0.02	1.16 \pm 0.05	1.09 \pm 0.05
	200	0.26 \pm 0.01	0.28 \pm 0.01	1.16 \pm 0.04	1.10 \pm 0.03	1.31 \pm 0.08	1.18 \pm 0.09
NAGA	0.2	0.77 \pm 0.01	0.66 \pm 0.02	1.24 \pm 0.08	1.15 \pm 0.03	1.25 \pm 0.07	1.25 \pm 0.02
	2	0.72 \pm 0.03	0.62 \pm 0.03	1.13 \pm 0.01	1.04 \pm 0.09	1.21 \pm 0.04	1.17 \pm 0.02
	20	0.61 \pm 0.02	0.56 \pm 0.02	1.05 \pm 0.02	0.99 \pm 0.05	1.05 \pm 0.08	1.02 \pm 0.01
	200	0.57 \pm 0.06	0.54 \pm 0.02	1.07 \pm 0.08	1.02 \pm 0.06	1.04 \pm 0.05	1.02 \pm 0.05
COS-6	0.2	0.67 \pm 0.04	0.63 \pm 0.04	1.07 \pm 0.03	1.09 \pm 0.10	1.64 \pm 0.07	1.12 \pm 0.06
	2	0.78 \pm 0.03	0.72 \pm 0.03	1.16 \pm 0.08	1.12 \pm 0.05	1.27 \pm 0.04	1.21 \pm 0.04
	20	0.71 \pm 0.04	0.67 \pm 0.02	1.05 \pm 0.06	1.05 \pm 0.04	1.12 \pm 0.07	1.08 \pm 0.03
	200	0.67 \pm 0.02	0.63 \pm 0.04	1.02 \pm 0.04	1.00 \pm 0.04	0.85 \pm 0.26	1.05 \pm 0.02

¹⁾ SI : stimulation index

한편, LPS 를 첨가한 경우에 Con A와 PHA에 비해 전반적으로 높은 SI 수치를 나타내는 경향이었으나 200 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 의 CH-2만이 PBS의 SI보다 높은 수치를 나타냈다.

다. *In vivo* 면역 증강 활성화

1) 면역 관련 장기 무게 변화

BALB/c mice에 sarcoma 180으로 종양을 유발한 후, 키토산 가수분해물들을 *in vivo*로 주입했을 때, 종양 유발후 감소된 면역계를 증강시키는지 알아보았다. 먼저, 면역 관련 장기의 무게는 Table 3-14와 같이 체중 1 g당 무게를 비교하면, 간의 경우 control 군에 비해 Lntinan군($p<0.01$), CH-5군($p<0.1$) 및 키토산군($p<0.05$)이 유의적으로 무게가 적었다. 비장은 CH-6군만 control군보다 유의적으로 큰 수치를 나타냈으며($p<0.05$), 흉선은 유의적인 차이가 없었다.

2) 복강 거식세포의 활성화능

종양을 유발시킨 mouse의 복강 거식 세포로부터 nitrite 분비능을 측정한 결과, 실험한 7군 모두, LPS를 첨가하거나, 안한 경우에 모두 nitrite 분비능을 나타내지 않았다(결과 미제시). 또한 IL-1 α 및 TNF 생성능을 ELISA로 측정한 결과는 Table 3-15와 같다. IL-1 α 의 분비능에 있어서, control군과 유의적인 차이를 나타낸 군은 없었으며 LPS로 활성화시킨 경우에도 유의적 차이를 보이지 않았다. 한편, TNF의 경우, LPS로 활성화시킨 L-CH-6군과 L-키토산군만 control군보다 유의적으로 높은 TNF 분비능을 나타냈다($p<0.01$).

Table 3-14. Organ weight of mice implanted with sarcoma 180¹⁾

Groups	Average body weight (g)	Organ weight(g)		
		Liver	Spleen	Thymus
Control	17.3	1.128±0.139	0.180±0.041	0.068±0.019
Lentinan	17.3	0.900±0.132 ^{***2)}	0.177±0.056 ^{NS}	0.060±0.022 ^{NS}
COS-6	16.9	1.060±0.153 ^{NS}	0.182±0.028 ^{NS}	0.062±0.017 ^{NS}
CH-4	17.0	0.923±0.341 ^{NS}	0.210±0.040 ^{NS}	0.057±0.020 ^{NS}
CH-5	21.4	1.150±0.254 ^{NS}	0.208±0.059 ^{NS}	0.093±0.030 ^{NS}
CH-6	17.1	0.996±0.212 ^{NS}	0.244±0.068*	0.070±0.038 ^{NS}
Chitosan	18.0	0.980±0.071 ^{NS}	0.210±0.085 ^{NS}	0.070±0.000 ^{NS}

Groups	Relative organ weight (mg/g BW)		
	Liver	Spleen	Thymus
Control	65.20± 8.04	10.41±2.37	3.93±1.10
Lentinan	52.02± 7.63 ^{***}	10.23±3.24 ^{NS}	3.47±1.27 ^{NS}
COS-6	62.72± 9.05 ^{NS}	10.77±1.66 ^{NS}	3.67±1.01 ^{NS}
CH-4	54.29±20.05 ^{NS}	12.35±2.35 ^{NS}	3.35±1.18 ^{NS}
CH-5	53.74±11.87*	9.72±2.76 ^{NS}	4.34±1.40 ^{NS}
CH-6	58.25±12.40 ^{NS}	14.27±3.98 ^{**}	4.09±2.22 ^{NS}
Chitosan	54.44± 3.94*	11.67±4.72 ^{NS}	3.89±0.00 ^{NS}

¹⁾ Mean ± STD

²⁾ Significantly different between control group and each treated group by Student *t*-test

* p < 0.1, ** p < 0.05, *** p < 0.01

³⁾ Not significantly different between control group and each treated group by Student *t*-test

Table 3-15. Interleukin-1 α and tumor necrosis factor production by peritoneal macrophage cells of tumor-bearing BALB/c mice injected(i.v.) with COS-6, chitosan hydrolysates and chitosan

Groups	IL-1 concn (pM/4x10 ⁵ cells)	TNF concn (nM/4x10 ⁵ cells)
Control	16.39 ± 22.44 ²⁾	5.35 ± 5.87
Lentinan	5.64 ± 6.73 ^{NS3)}	6.89 ± 11.93 ^{NS}
COS-6	25.90 ± 23.86 ^{NS}	12.15 ± 5.18 ^{NS}
CH-4	9.59 ± 14.71 ^{NS}	1.36 ± 1.93 ^{NS}
CH-5	0.34 ± 0.59 ^{NS}	4.11 ± 6.57 ^{NS}
CH-6	16.23 ± 18.08 ^{NS}	0.00 ± 0.00 ^{NS}
Chitosan	0.00 ± 0.00 ^{NS}	0.00 ± 0.00 ^{NS}
L ¹⁾ -Control	19.01 ± 24.46	4.26 ± 7.77
L-Lentinan	16.82 ± 17.89 ^{NS}	5.26 ± 4.87 ^{NS}
L-COS-6	45.13 ± 39.54 ^{NS}	21.59 ± 27.39 ^{NS}
L-CH-4	16.29 ± 15.20 ^{NS}	10.31 ± 9.46 ^{NS}
L-CH-5	6.57 ± 11.38 ^{NS}	13.50 ± 17.85 ^{NS}
L-CH-6	38.00 ± 19.69 ^{NS}	26.18 ± 4.53 ^{****4)}
L-Chitosan	3.67 ± 0.00 ^{NS}	29.64 ± 0.00 ^{***}

¹⁾ L : Lipopolysaccharide-stimulated

²⁾ Mean ± STD

³⁾ Not significantly different between control group and each treated group by Student t-test

⁴⁾ Significantly different between control group and each treated group by Student t-test

* p < 0.1, ** p < 0.05, *** p < 0.01

3) 비장 세포의 IL-2 분비능 및 세포 증식능

종양이 유발되면 종양항원을 인지한 helper-T cell이 다양한 lymphokine, 특히 IL-2를 분비함으로써 활성화된 cytotoxic T-cell을 증폭시키고 natural killer cell을 활성화시켜 종양 세포를 살해한다고 알려져 있다⁽⁵¹⁾. 그러므로 키토산 가수분해물 분획이 tumor-bearing BALB/c mouse의 비장면역세포의 IL-2 분비능에 영향을 주는 지를 알아보았다.

Control군은 IL-2 분비능이 전혀 없었고 모든 군에서 IL-2의 분비능을 나타냈는데, Lentinan군이 1.27 pM이었고, COS-6군이 0.43 pM, CH-4군이 0.23 pM, CH-5군이 0.58 pM, CH-6군이 0.65 pM로서 가수분해물 분획의 분자량이 커질수록 IL-2 분비능이 증가하였으며, 키토산이 4.82 pM의 IL-2 분비를 보여 유의적으로 최고 활성을 나타냈다(Table 3-16). 비장세포의 T cell 증식에 영향을 주는 mitogen인 Con A를 각 세포에 첨가했을 때에도 같은 경향으로서 control군(1.37 pM)에 비해 큰 폭으로 증가하였다. 분비능이 컸던 군을 보면, Lentinan군이 43.22 pM, CH-5군이 47.49 pM, CH-6군이 45.3 pM, Chitosan군이 95.03 pM의 농도로 IL-2를 분비하였으며, Chitosan군이 최고의 분비능을 나타냈다.

또 mitogens를 첨가했을 때 tumor-bearing BALB/c mouse spleen cells의 증식 여부를 stimulation index(SI)를 통해 살펴보았다(Table 3-17). T cell의 mitogen인 Con A를 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 첨가시 control군에 비해 CH-5군, CH-6군, 키토산군이 SI값이 유의적으로($\alpha=0.05$) 커서, 각각 1.51, 1.65, 1.54였으며, 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도일 때도 COS-6군, CH-5군, CH-6군, 키토산군이 유의적으로 큰 SI값을 보였다. PHA를 1.5 및 3.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 첨가했을 때 Lentinan군이 1.83, 1.98로서 가장 큰 SI를 보였으며, B cell mitogen인 LPS의 경우에 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 CH-5군이 1.99, 키토산군이 2.21의 유의적으로 큰 SI를 나타냈고, 3.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 일 때 CH-5군, CH-6군, 키토산군의 SI수치가 유의적으로($\alpha=0.05$) 커서 각각 2.37, 2.26, 2.18이었다.

Table 3-16. Interleukin-2 production by spleen cells of tumor-bearing BALB/c mice injected(i.v.) with COS-6, chitosan hydrolysates and chitosan

Groups	IL-2 concn (pM/4x10 ⁵ cells)
Control	0 ^p
Lentinan	1.27 ± 2.29 ^{b2)3)}
COS-6	0.43 ± 0.92 ^b
CH-4	0.23 ± 0.48 ^b
CH-5	0.58 ± 1.15 ^b
CH-6	0.65 ± 1.30 ^b
Chitosan	4.82 ± 6.40 ^a
C ¹⁾ -Control	1.37 ± 3.16 ^c
C-Lentinan	43.22 ± 34.46 ^b
C-COS-6	6.57 ± 9.01 ^c
C-CH-4	3.76 ± 5.69 ^c
C-CH-5	47.49 ± 47.90 ^b
C-CH-6	45.30 ± 32.30 ^b
C-Chitosan	95.03 ± 46.24 ^a

¹⁾ C : Concanavalin A-stimulated

²⁾ Mean ± STD

³⁾ Values with different superscripts within the column were significantly different at $\alpha = 0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 3-17. Proliferative effect of chitosan hydrolysates, chitosan, GA, NAGA and COS-6 on splenocyte of tumor-bearing BALB/c mice stimulated by mitogens

Groups	Stimulation index(SI)					
	Con A		PHA		LPS	
	1.5 $\mu\text{g/ml}$	3.0 $\mu\text{g/ml}$	1.5 $\mu\text{g/ml}$	3.0 $\mu\text{g/ml}$	1.5 $\mu\text{g/ml}$	3.0 $\mu\text{g/ml}$
Control	1.19 \pm 0.10 ^{d1)2)}	1.24 \pm 0.12 ^b	1.21 \pm 0.11 ^b	1.14 \pm 0.05 ^b	1.57 \pm 0.21 ^b	1.62 \pm 0.27 ^c
Lentinan	1.26 \pm 0.14 ^{bcd}	1.50 \pm 0.16 ^{ab}	1.83 \pm 0.20 ^a	1.98 \pm 0.38 ^a	1.23 \pm 0.25 ^b	1.48 \pm 0.26 ^c
COS-6	1.40 \pm 0.24 ^{abcd}	1.86 \pm 0.22 ^a	1.36 \pm 0.12 ^b	1.37 \pm 0.18 ^b	1.62 \pm 0.31 ^b	1.67 \pm 0.28 ^{bc}
CH-4	1.21 \pm 0.18 ^{cd}	1.32 \pm 0.24 ^b	1.27 \pm 0.14 ^b	1.23 \pm 0.19 ^b	1.58 \pm 0.20 ^b	1.67 \pm 0.38 ^{bc}
CH-5	1.51 \pm 0.23 ^{abc}	1.91 \pm 0.79 ^a	1.36 \pm 0.17 ^b	1.41 \pm 0.22 ^b	1.99 \pm 0.43 ^a	2.37 \pm 0.55 ^a
CH-6	1.65 \pm 0.12 ^a	1.95 \pm 0.53 ^a	1.27 \pm 0.29 ^b	1.35 \pm 0.26 ^b	1.43 \pm 0.23 ^b	2.26 \pm 0.50 ^a
Chitosan	1.54 \pm 0.25 ^{ab}	2.00 \pm 0.22 ^a	1.40 \pm 0.38 ^b	1.32 \pm 0.29 ^b	2.21 \pm 0.44 ^a	2.18 \pm 0.56 ^{ab}

¹⁾ Mean \pm STD

²⁾ Values with different superscripts within the column were significantly different at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test.

4) 혈중 백혈구 수

중양을 유발시킨 mouse의 혈액 내 백혈구수가 증가하였는지 알아보았다. 그 결과, Table 3-18과 같이 각 군 간의 백혈구 수에서 유의적인 차이가 나타나지 않은 것으로 보아 본 연구에서는 키토산 가수분해물 분획의 처리가 혈중 백혈구 수의 증가에 영향을 주지 않았음을 알 수 있었다.

이상으로 키토산 가수분해물의 면역 증강 효과를 종합하면, *in vitro* 실험을 통해서 CH-4, CH-5, CH-6, chitosan이 거식세포 활성화능이 컸으며, *in vitro* 및 *in vivo* 실험에서 macrophage activation효과를 공통적으로 나타낸 시료는 TNF 분비능에서 CH-6 및 키토산이었다. 또한 비장세포의 IL-2 분비능은 *in vitro* 및 *in vivo*에서 CH-5가 컸으며, mitogen에 의한 비장면역세포의 증식에는 CH-6 및 키토산이 활성이 컸음을 알 수 있었다. 그러므로 면역증강활성을 나타내는 키토산 가수분해물의 분자량은 적어도 약 24,000은 되어야 그들이 지니는 분자량에 따른 점성 및 숙주내 면역계를 자극하는 특성의 차이로 인한 면역 증강 활성을 나타내는 것으로 사료된다.

Table 3-18. Effect of COS-6, chitosan hydrolysates and chitosan on the number of white blood cells in tumor-bearing BALB/c mice

Groups	Cell number (x 10 ³ per mm ³)
Control	6.0±2.1 ^{NS1)2)}
Lentinan	5.8±1.0
COS-6	6.5±1.8
CH-4	6.4±1.6
CH-5	6.0±2.0
CH-6	6.0±1.6
Chitosan	6.0±2.8

¹⁾ Mean±STD

²⁾ Not significantly different among groups by ANOVA(p<0.05).

4. 항암 활성

가. *In vitro* 암세포 치사 활성

기존의 보고들은 키토산, NACOS-6, COS-6 등이 항종양 활성이 있다는 *in vivo* 실험 결과들을 보여주었고, 그 기전은 면역계를 경유한 간접적 효과라고 제시하였다. 그러나 본 연구에서는 직접적으로 암세포에 대한 치사효과가 있는지 먼저 *in vitro*에서 살펴보고자 하였다. 사용된 cell line은 사람, mouse로부터 유래한 다양한 종류의 것들이며, 대표적인 육종암으로서 sarcoma-180, lymphoma의 일종인 L1210, 사람의 monocyte/macrophage U-937, 한국인 암환자로부터 수집된 위암세포 SNU-1, 간암세포 SNU-182, 대장암세포 SNU-C4를 선택하였다. 시험할 sample은 모두 phosphate buffered saline(pH 7.2)에 녹여 사용하였고, 키토산만 0.5% acetic acid에 용해시켜 사용하였다.

키토산 가수분해물, 키토산, GA, NAGA, COS-6 및 NACOS-6의 암세포 치사효과는 cell line에 따라 다양한 활성 정도를 보였다. 먼저 mouse에서 얻은 sarcoma 180에 대하여 CH-1에서 CH-6의 키토산 가수분해물은 Fig. 3-5a와 같이 생존율이 모든 농도에서 두드러진 차이가 없이 89~109%를 나타냈다. 키토산은 80~109%, NAGA, COS-6 및 NACOS-6는 82~106%의 생존율을 나타냈는데, GA가 sarcoma 180 cell line에 대하여 200 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 의 농도에서 54%의 제일 낮은 생존율을 나타냈다.

L1210 cell line의 경우, 모든 시료가 0.2~20 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 농도 범위에서는 생존율이 100~115%로서 거의 차이가 없었으나, CH-5가 200 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 의 농도에서 최저 61%를, CH-6이 66%, 키토산이 70%의 생존율을 나타냈다(Fig. 3-5b).

U-937 cell line은 키토산 가수분해물, 키토산, GA, NAGA, COS-6, NACOS-6를 첨가한 assay system에서 41~109%의 생존율을 나타냈다(Fig. 3-5c). 모든 시료가 0.2~2 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 의 농도에서 생존율의 차이를 나타내지 않다가, 20 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 에서 68~

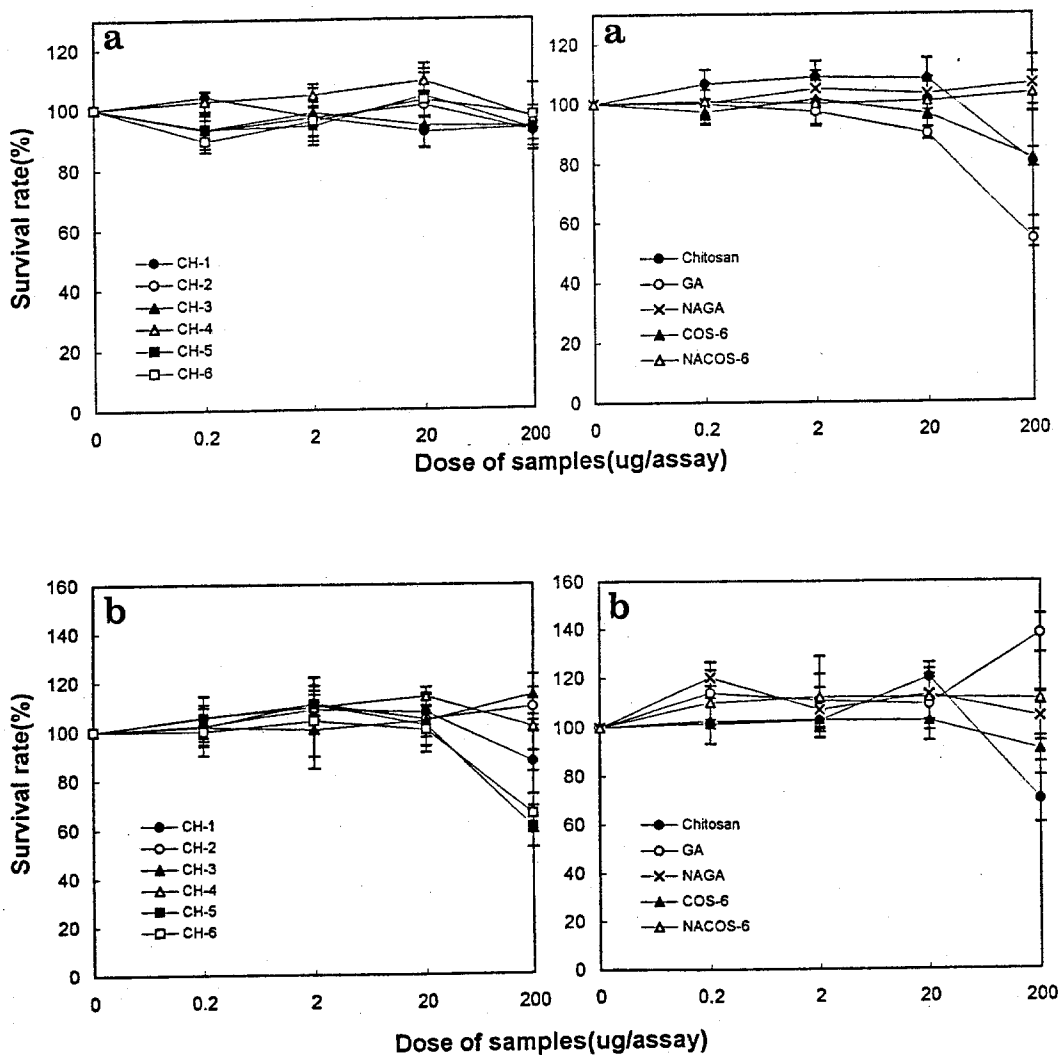


Fig. 3-5. In vitro cytotoxic effect of chitosan and its hydrolyzates on sarcoma 180(a), L1210(b), U-937(c), SNU-1(d), SNU-182(e) and SNU-C4(f)

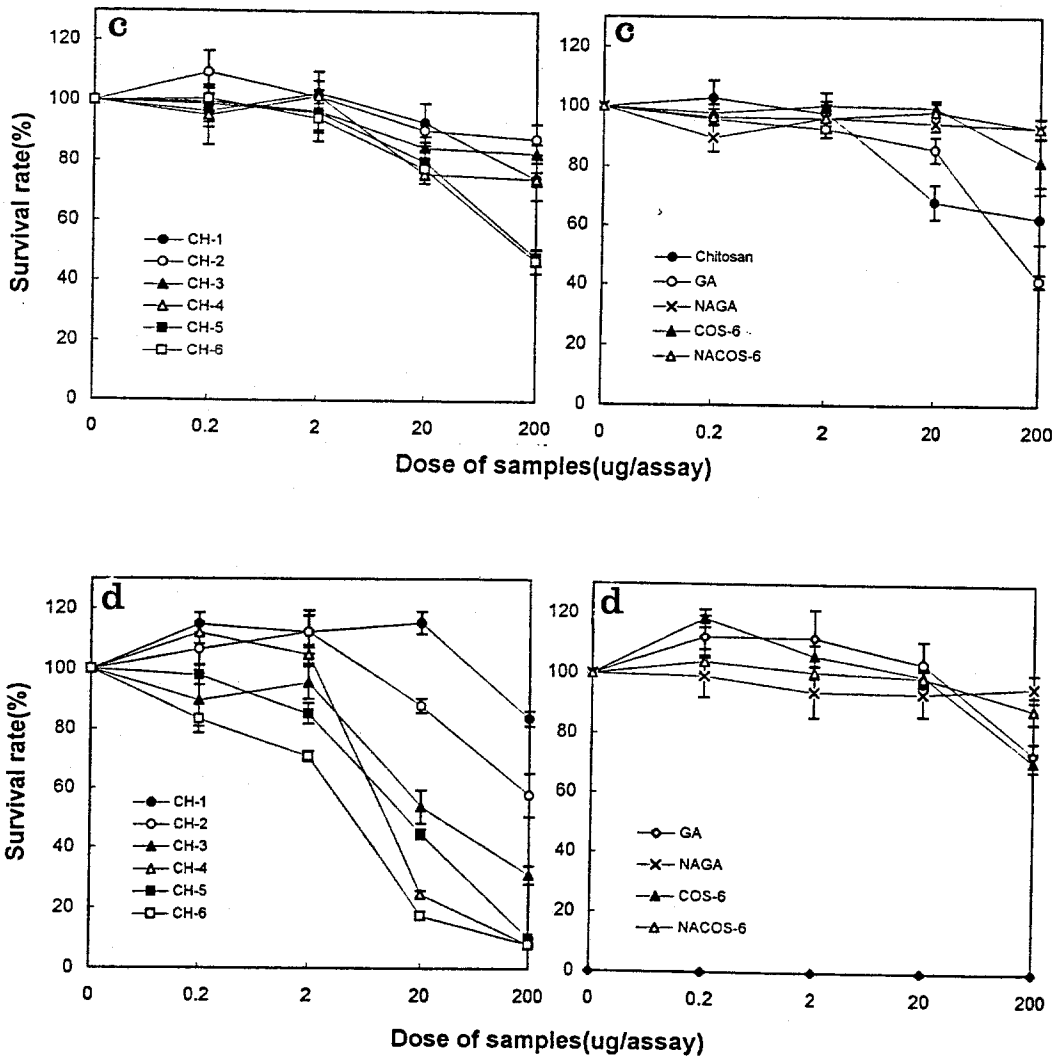


Fig. 3-5. (continued)

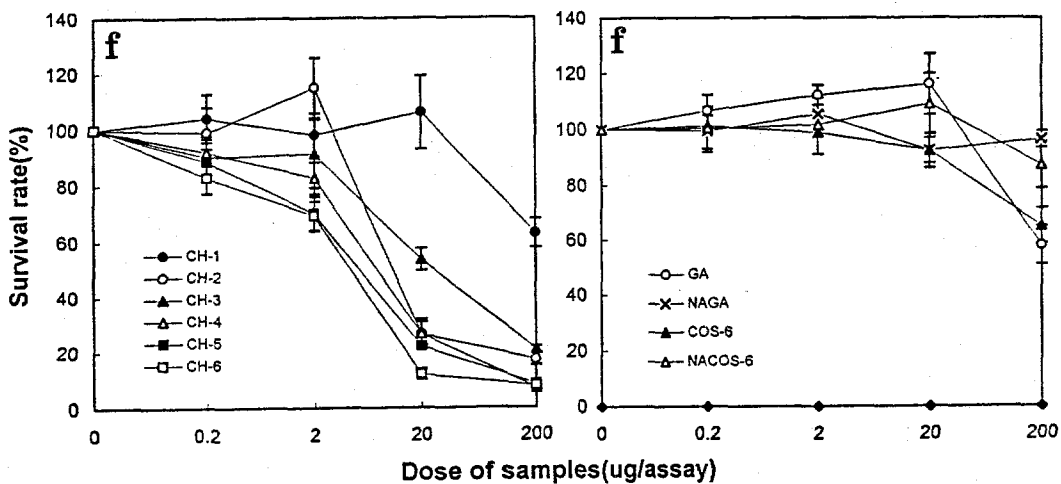
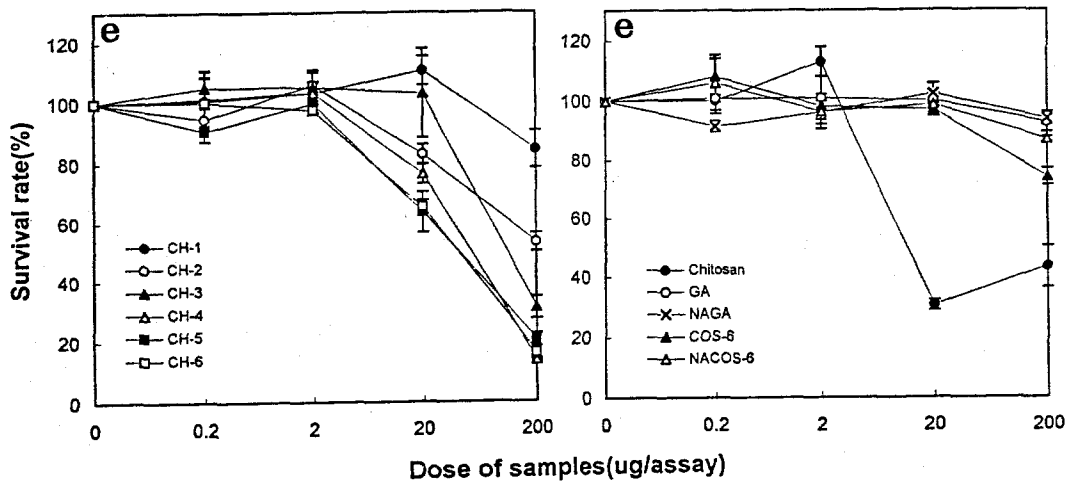


Fig. 3-5. (continued)

101%로서 전반적으로 약간 감소하였다. U-937도 다른 cell line과 마찬가지로 200 μg /assay의 농도에서 세포 독성이 컸는데, CH-5가 48%, CH-6이 47%, chitosan이 62% 및 GA가 41%의 생존율을 보였다.

한국인에게 많이 발생하는 위암세포인 SNU-1은 키토산 가수분해물의 경우 생존율의 용량-반응 관계가 뚜렷히 나타났고, 분획에 따른 차이가 컸으며, CH-4 및 CH-6은 최하 8%의 생존율을 나타냈다(Fig. 3-5d). CH-2는 200 μg /assay일 때 58%, CH-3은 20 μg /assay일 때 54%, 200 μg /assay일 때 31%, CH-4는 20, 200 μg /assay에서 각각 25, 8%, CH-5는 45, 103%, CH-6은 18, 8%를 나타냈다. 반면에 GA, NAGA, COS-6, NACOS-6는 농도에 따라 생존율에 차이를 나타내지 않았다.

또, SNU-1은 acetic acid에 의한 세포독성의 영향을 많이 받으므로, 다른 cell line과는 다르게, 0.2 μg /assay일 때 14%, 2 μg /assay일 때 89%, 20 μg /assay일 때 102%, 200 μg /assay일 때 138%로서 시료의 농도가 증가할수록 오히려 생존율이 증가하는 경향을 보였다(Fig. 3-5d).

간암세포인 SNU-182도 역시 키토산 가수분해물들의 치사활성이 시료 농도의 증가에 따라 두드러졌고, 또한 키토산이 SNU-182에 대한 치사활성이 다른 cell line에 대해서보다 컸다(Fig. 3-5e). 키토산 가수분해물의 치사 활성은 20 μg /assay부터 급격히 증가하였는데 이 때 CH-4는 77%, CH-5는 64%, CH-6은 65%의 생존율을 나타냈다. 200 μg /assay의 농도에서는 CH-1에서 CH-6까지 85, 53, 31, 14, 20, 16%의 생존율을 나타내어, SNU-182에 대한 세포독성도 CH-4, CH-5, CH-6 즉, 분자량이 증가할수록 더 큰 활성을 나타내는 것으로 보였다. 한편 키토산도 30%(20 μg /assay), 43%(200 μg /assay)의 낮은 생존율을 나타냈고, GA, NAGA, COS-6, NACOS-6는 SNU-182 치사활성이 거의 없는 것으로 보여진다.

대장암 세포인 SNU-C4는 6가지 cell line중 키토산 가수분해물에 의한 치사활성에 영향을 크게 받으며, 가장 낮은 생존율을 나타냈다(Fig. 3-5f). 또한 SNU-1과 함께 acetic acid에 의한 치사도가 컸다. 20, 200 μg /assay농도에서 CH-1은 106%, 63%,

CH-2는 27%, 17%, CH-3은 54%, 21%, CH-4는 27%, 7%, CH-5는 22%, 8%, CH-6은 12%, 8%의 생존율을 나타냈다. 반면에 GA, NAGA, COS-6, NACOS-6는 농도 및 시료에 따라 생존율의 차이가 거의 없다가 200 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 농도에서 COS-6가 65%, GA가 58%의 생존율을 나타냈다. 키토산은 acetic acid에 용해시켰으므로, 용매에 의한 영향으로 시료의 농도가 증가할수록 오히려 생존율이 증가하였다(결과 미제시).

키토산이 암세포에 대해 직접적으로 치사 활성을 나타낸다는 보고는 거의 없었는데, Sirica 등⁽²²⁾은 murine erythrocyte와 bone marrow cell 등 정상세포와 비교하여 L1210 leukemia cells를 선택적으로 응집시키는 효과가 있음을 보고하였다. 이것은 정상 세포보다 암세포가 더 negative surface charge를 띠기 때문에 polycationic charge를 띠는 키토산과 반응하여 응집되는 특성을 지닌다고 하였다. 본 실험에서 사용한 L1210 cell에 대한 키토산 가수분해물의 생존율은 CH-5의 61%가 가장 낮은 수준이었다. 또, 류 등⁽²¹⁾에 의하면, sarcoma 180 cell line에 대해 *in vivo*에서 직접적인 세포 독성 작용을 dye exclusion 방법에 따라 viability test를 실시한 결과, 10~50 mg/kg의 키토산을 투여시 72~80%의 생존율을 나타내 직접적 세포 독성 작용을 보이지 않았음을 알 수 있었고, 이는 sarcoma 180 cell line을 이용한 본 연구의 결과와 일치하였다.

결과적으로 암세포 치사 활성이 컸던 키토산 가수분해물들이 정상세포에 악영향을 주지 않아야, 즉 암세포에 대해 선택적으로 치사작용을 나타내야 항암성분으로서의 바람직한 기능을 나타낼 것이다. 정상세포에 대한 직접적 치사 효과는 추후에 알아보아야 할 것이다.

나. *In vivo* 항종양 활성

BALB/c mouse에 sarcoma 180 cell을 피하로 주입하여 종양을 유발한 다음 어떤 분자량 범위의 키토산 가수분해물이 종양 성장에 대한 억제 활성이 높은지를 알아보기 위해 키토산 가수분해물 중에서 항돌연변이 활성, *in vitro* 암세포 치사 활성, *in*

in vitro 거식세포 활성능이 컸던 CH-4, CH-5, CH-6을 선택하여 종양을 유발시킨 후 종양 성장 억제 효과를 살펴보았다.

동물 실험을 시작한 직후 BALB/c mouse의 평균 체중은 18 g이었다. 희생하기 직전까지 살아 남은 mouse의 평균체중은 control군이 17.3 g, Lentinan군이 17.3 g, COS-6군이 16.9 g, CH-4군은 17 g, CH-6군은 17.1 g, 키토산군은 18 g으로서 실험 기간 중 거의 체중 변화가 없었으며, 각 군 간의 차이를 볼 수 없었으나, CH-5군만 평균 체중 수치가 21.4 g으로서 다른 군보다 컸고, 증가폭도 약간 큼을 알 수 있었다 (Fig. 3-6)

BALB/c mouse를 이용하여 키토산 가수분해물의 sarcoma 180 고형암에 대한 성장 억제 활성을 살펴보았다(Table 3-19). 먼저 각 군당 7~8마리의 mouse를 사육하였는데, 실험기간인 25일 동안에 죽은 쥐들의 대부분은 시료의 intravenous injection기간인 5일 이내에 죽었다. Control군은 sample대신 saline 용액을 투여하였는데, 한 마리도 죽지 않은 반면, Lentinan군은 1마리, COS-6군은 2마리, CH-4군은 1마리, CH-5군은 4마리, CH-6군은 2마리, 키토산군은 5마리의 쥐가 죽었다. 키토산군의 경우, sample injection시 많은 쥐들이 희생된 것으로 보아, 키토산의 분자량이 너무 커서 독성을 나타냈기 때문인 것으로 생각된다.

각 군당 종양이 유발된 비율을 살펴보면, control군과 COS-6군이 63% 및 67%로서 가장 높았으며, Lentinan군이 50%, CH-4군이 42.9%, CH-5군이 25%, CH-6군이 60%, 키토산군이 50%로서, 이중 CH-5군이 25%의 최저 종양 유발율을 보였다. 종양의 크기는 Table 3-19와 같이 CH-4군이 평균적으로 가장 컸고, 그 다음이 control군의 순서였으며, CH-6군이 가장 낮은 값을 나타냈다. 종양의 무게는 종양의 크기와 마찬가지로 같은 군내에서도 차이가 컸는데, 평균을 보면 CH-4군이 0.79 g으로서 최고 수치였으며, Lentinan군이 0.22 g, control군이 0.17 g이었으며, CH-5군과 CH-6군이 0.028 g, 0.015 g으로 종양의 크기가 작았으며, 각각 84, 94%의 종양성장 저해활성을 나타냈다(Table 3-19).

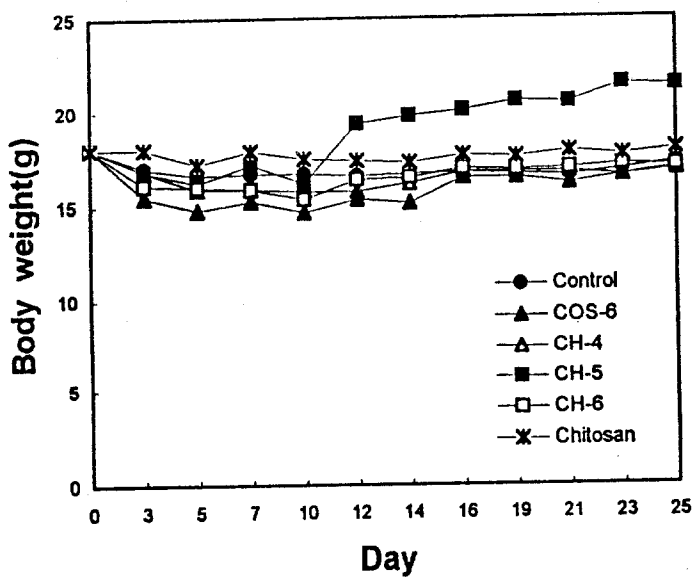


Fig. 3-6. Changes in body weight of tumor-bearing BALB/c mice

Table 3-19. Inhibitory effect of COS-6, chitosan hydrolysates and chitosan on the tumor growth in BALB/c mice transplanted(s.c.) with sarcoma 180

	Control	Lentinan	COS-6 ¹⁾	CH-4 ²⁾	CH-5 ³⁾	CH-6 ⁴⁾	Chitosan
No. of mice tested	8	7	8	8	8	7	7
No. of mice died	0	1	2	1	4	2	5
Tumor incidence	5	3	4	3	1	3	1
Incidence rate(%)	63	50	67	43	25	60	50
Tumor size (average, mm)							
Width	7.29	6.80	4.78	11.26	4.37	3.41	4.27
Length	7.41	7.46	4.85	10.43	4.35	3.52	4.83
Height	4.23	4.31	2.61	5.39	2.05	1.72	2.55
Tumor weight(g)							
Average minimum	0.172	0.224	0.043	0.79	0.028	0.015	0.04
Average maximum	0.036	0.018	0.029	0.079		0.014	
Average maximum	0.588	0.594	0.064	2.147		0.016	
Inhibition rate(%)	-	-30	75	-359	84	91	77

¹⁾ COS-6 : chitohexaose

²⁾ CH-4 : chitosan hydrolysate fraction 4

³⁾ CH-5 : chitosan hydrolysate fraction 5

⁴⁾ CH-6 : chitosan hydrolysate fraction 6

한편, lentinan은 표고버섯의 자실체로부터 분리된 것으로 $\beta(1\rightarrow4)$ 결합을 근간으로 하여 $\beta(1\rightarrow6)$ 을 측쇄로 갖는 항종양 활성을 나타내는 중성 다당류⁽⁷⁴⁾로서 현재 임상용으로 사용되는 시료를 이용하였고 사용 농도도 기존의 보고에 준하여 설정했음에도 불구하고 본 연구에서는 거의 종양 성장 억제 활성을 나타내지 않았다.

이상의 결과를 살펴볼 때 기존의 보고에서 항암활성이 강하다고 알려진 oligosaccharide의 효과나 intact chitosan의 효과는 CH-5 및 CH-6보다 비교적 낮게 나타났다. 그러나 분자량이 5만에서 7만에 이르는 CH-5 및 CH-6이 어떠한 기전에 의해 항종양 활성을 나타내는지는 앞으로 더 연구가 진행되어야 할 것이다. 현재까지 고분자 다당류의 항종양 활성 발현에 대한 기전으로는 1~5% 범위는 pinocytosis에 의해 흡수가 가능하여 이 범위의 농도만으로도 생리활성을 나타내기에 충분한 것으로 보고되고 있으며, 다른 한편으로는 흡수가 충분하지 않다 하더라도 소장내 많이 분포되어 있는 임파절을 고분자 다당류들이 자극함으로써 분비된 여러 면역 effector물질들에 의해 면역계가 활성화되어 항종양활성을 나타낸다고 한다⁽⁵³⁾.

제 4 절 요약 및 결론

본 연구에서는 게껍질 급원의 키토산을 산가수분해 및 한외여과법으로 제조한 키토산 가수분해물이 분자량에 따라 생리활성이 어떤지 알기위해 항암 및 면역증강 활성을 알아보았다. 항돌연변이 활성은 세균을 이용한 *Salmonella typhimurium* reversion assay 및 SOS chromotest를 이용하여 측정하였다. 면역증강 활성은 먼저 *in vitro*법으로 거식세포를 이용한 반응성 질소종, 반응성 산소종 및 cytokines 분비능을 측정하였으며 다음에는 종양 유발 후 복강 거식 세포 및 비장세포를 분리하여 활성화 및 세포 증식능을 측정하였다. 항암활성으로는 암세포 치사활성을 *in vitro*에서 살펴본 후, BALB/c mouse를 이용한 종양 억제 활성을 살펴보았다.

1. 키토산 가수분해물의 이화학적 특성

한외여과법에 의해 키토산 가수분해물의 6가지 분획(분자량 범위에 따라 chitosan hydrolysate fraction 1(CH-1) : 1,000 이하, chitosan hydrolysate fraction 2(CH-2) : 1,000~3,000, chitosan hydrolysate fraction 3(CH-3) : 3,000~10,000, chitosan hydrolysate fraction 4(CH-4) : 10,000~30,000, chitosan hydrolysate fraction 5(CH-5) : 30,000~100,000 및 chitosan hydrolysate fraction 6(CH-6) : 100,000 이상)을 얻을 수 있었다. 각 분획의 infrared spectrum 분석에 의해 산출된 탈아세틸화도는 69~80%였으며, 점도 측정을 통해 분자량의 차이를 알 수 있었으며, HPLC를 이용하여 측정한 각 분획의 평균분자량은 한외여과법에 의한 결과와 거의 일치됨을 확인할 수 있었다.

2. 항돌연변이 활성

세균을 이용한 *Salmonella typhimurium* reversion assay 및 SOS chromotest에 의해 항돌연변이 활성을 측정한 결과, *Salmonella typhimurium* reversion assay에서

는 Trp-P-2, aflatoxin B₁(AFB₁) 및 2-nitrofluorene(2-NF)의 변이 작용에 대해 각각 0~78%, 0~92% 및 0~51%의 억제활성을 나타내었다. 키토산 가수분해물 중 최고 활성을 나타낸 것은 Trp-P-2에 대해 CH-6의 5 mg/plate, AFB₁에 대해 CH-5의 10 mg/plate, 2-NF에 대해 CH-6의 5 mg/plate 농도에서였다. *Escherichia coli* PQ 37을 이용하여 SOS chromotest를 실시한 결과, Trp-P-2의 변이 작용에 대해 CH-6의 10 mg/plate 농도, 4-NQO에 대해 CH-5의 1 mg/plate 농도에서 가장 큰 SOS 유도 저해 활성을 보였다.

또한 키토산 가수분해물의 돌연변이 억제 방식을 CH-5와 CH-6을 이용하여 시험한 결과, Trp-P-2의 변이 작용에 대해 모두 bio-antimutagenic action을 나타냄을 알 수 있었고, CH-5는 시험한 전 농도에서, CH-6은 5 mg/plate의 농도까지 용량-반응 관계를 보여주었다.

3. 면역 증강 활성

Continuous macrophage cell line J774A.1을 이용한 nitrite 생성능을 비교한 결과, 키토산 가수분해물의 농도가 2 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 일 때, 분자량이 증가할수록 nitrite 농도가 비례적으로 증가하였으며, CH-2 및 키토산이 최고 35 $\mu\text{M}/2 \times 10^5$ cells의 nitrite를 분비하였다. Lipopolysaccharide로 활성화된 J774A.1이 생성하는 nitrite 농도는 CH-2의 200 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 농도일 때 최고치를 보였다. 한편, hydrogen peroxide 분비능을 측정 한 결과, CH-5의 200 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 농도에서 894 $\mu\text{M}/\text{mg}$ macrophage protein 및 CH-6의 20 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 농도에서 1044 $\mu\text{M}/\text{mg}$ macrophage protein의 최고 분비능을 나타냈다. 또한 interleukin-1 α (IL-1 α) 분비능은 CH-4, CH-6 및 키토산에서만 나타났고, tumor necrosis factor(TNF)의 경우도 CH-4, CH-5, CH-6 및 키토산에서 분비능이 컸으며, CH-4의 200 $\mu\text{g}/\text{assay}$, CH-5의 20 $\mu\text{g}/\text{assay}$, CH-6의 20 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 및 키토산의 2 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 농도에서 높은 TNF 분비능을 나타냈다.

Thioglycollate-elicited BALB/c mouse spleen cell에 키토산 가수분해물 및

mitogen을 첨가했을 때, concanavalin A(ConA)의 경우, 1.5 및 3.0 $\mu\text{g/ml}$ 농도 모두에서 PBS에 비해 CH-1, CH-6 및 키토산이 더 높은 stimulation index(SI) 수치를 나타냈고, phytohemagglutinin(PHA)는 3 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도일 때, CH-1을 제외한 모든 시료가 면역세포 증식효과를 나타냈다.

종양이 유발된 BALB/c mouse에서 면역 관련 장기의 무게 변화를 살펴본 결과, spleen의 체중 당 무게는 CH-6군이 $\alpha=0.05$ 수준에서 control군에 비해 유의적으로 큰 수치를 나타냈다. Peritoneal macrophage cell에 의한 IL-1 α 분비능은 control군과 비교했을 때 $\alpha=0.01$ 수준에서 유의적 차이를 나타내는 군은 없었으나, TNF 분비능에 있어서는 CH-6군 및 키토산군이 control군과 비교하여 $\alpha=0.01$ 수준에서 유의적으로 큰 값을 나타냈다.

종양을 유발시킨 BALB/c mouse로부터 얻은 비장세포를 이용하여 interleukin-2(IL-2) 분비능을 측정한 결과, 키토산군이 다른 군에 비해 $\alpha=0.05$ 수준에서 유의적으로 큰 수치를 보였다. 여기에 ConA를 첨가했을 때, 키토산군이 유의적으로 가장 큰 수치를 보였으며 concanavalin A-stimulated lentinan군(C-Lentinan군), C-CH-5군 및 C-CH-6군도 IL-2 분비능이 유의적으로 큼을 알 수 있었다. 한편, 비장세포에 ConA, PHA, LPS를 첨가했을 때 세포증식여부를 측정한 결과, ConA를 1.5 및 3.0 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 첨가시, Lentinan군, COS-6군, CH-5군, CH-6군 및 키토산군의 SI 값이 유의적으로 높았으며, PHA 첨가시 1.5 및 3.0 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 Lentinan군이 유의적 차이를 보였고, LPS 첨가시 1.5 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 CH-5군, CH-6군 및 키토산군이 유의적으로 큰 SI값을 나타냈다.

4. 항암 활성

[3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay를 이용하여 키토산 가수분해물의 *in vitro* 암세포 치사활성을 측정한 결과, sarcoma 180 cell line에 대해서는 각 분획간 치사활성의 차이가 거의 없었고, L 1210 cell line의 경

우 60~115%, U-937 cell line은 41~109%, SNU-1 cell line은 8~116%, SNU-182 cell line은 14~111% 그리고 SNU-C4 cell line은 7~115%의 생존율을 나타냈다.

Sarcoma 180으로 종양을 유발한 BALB/c mouse에 대한 키토산 가수분해물의 종양 성장 억제 활성은 CH-6군이 91%로서 가장 컸고, 그 다음 CH-5군이 84%, 키토산군이 77% 및 COS-6군이 75%를 나타냈다.

결론적으로 종합해보면, 평균분자량이 다른 키토산 가수분해물의 항암 및 면역증강 활성은 거의 모든 시험계에서 공통적으로 CH-5 및 CH-6이 나타났다. 기존의 보고에서 활성이 강하다고 알려진 oligosaccharide의 효과는 본 연구에서는 시험계에 따라 차이를 보여, 동물 실험의 일부에서만 활성을 나타냈다. 본 연구 결과, intact chitosan이나 소중합체보다는 CH-5 및 CH-6의 분자량 범위에서 생리 활성을 보였으므로 특이 활성을 나타내는 키토산 분해물질의 제조에 이용가능할 것으로 보인다. 그러나 이를 위해서는 향후 키토산 분해물질 제조 방법의 표준화, 경구 섭취시의 효과 유무, 독성 시험 등에 대한 후속 연구가 수행되어 항암 및 면역 활성 그리고 그 분명한 기전이 규명되어야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Muzzarelli, R. A. A. : *Chitin*. Pergamon press (1977)
2. Mathur, N. K. and Narang, C. K. : Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. *J. Chem. Educ.*, **67**, 938 (1990)
3. Knorr, D.: Use of chitinous polymers in food - a challenge for food research and development. *Food Technol.*, **38**(1), 85 (1984)
4. 김세권: 키틴, 키토산 및 그 유도체의 제조기술과 개발동향(제1회). 식품 공업, 106호, 63 (1990)
5. Muzzarelli, R. A. A. : Natural chelating polymer. Pergamon press, 108 p (1973)
6. Austin, P. R., Brine, C. J., Castle, J. E. and Zikakis, J. P. : Chitin : New facets of research. *Science*, **212**, 749 (1981)
7. Skjak-Braek, G., Anthonsen, T. and Sandford, P.: *Chitin and Chitosan*, Elsevier, New York, p.703 (1989)
8. Allan, C. R. and hadwiger, L. A. : The fungicidal effect of chitosan on fungi of varing cell wall composition. *Exp. Mycol.*, **3**, 285 (1979)
9. Hirano, S. and Nagao, N. : Effects of chitosan, pectic acid, lysozyme, and chitinase on the growth of several phytopathogens. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 3065 (1989)
10. Hirano, S., Itakura, C., Seino, H., Akiyama, Y., Nonaka, I., Kanbara, N. and Kawakami, T. : Chitosan as an ingredient for domestic animal feeds. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 1214 (1990)
11. Eiden, C. A., Jewell, C. A. and Wightman, J. P. : Interaction of lead and chtrmium with chitin and chitosan. *J. Appl. Polym. Sci.* **25**, 157 (1980)
12. Dobetti, L. and Delben, F. : Binding of metal cations by N-carboxymethyl chitosans in water. *Carbohydr. Polym.*, **18**, 273 (1992)
13. Bough, W. A., WU, A. C. M., Campbell, T. E., Holmes, M. R. and perkins, B.

- E. : Influence of manufacturing variables on the characteristics and effectiveness of chitosan products. II. coagulation of activated sludge suspensions. *Biotech. Bieng.*, **20**, 1945 (1978)
14. Knorr, D. : Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste mangement. *Food Tech. Jan.*, 114 (1991)
 15. No, H. K. and meyers, S. P. : Crawfish chitosan as a coagulant in recovery of organic compounds from seafood processing streams. *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 580 (1989)
 16. Brin, C. J., Sandford, P. A. and Zikakis, J. P. : *Advances in chitin and chitosan*. Elsevier, New york (1992)
 17. Muzzarelli, R., Jeuniaus, C. and Gooday, G. W. : *Chitin in nature and technology*, plenum press (1986)
 18. Knorr, D.: Functional properties of chitin and chitosan. *J. Food Sci.*, **47**, 593 (1982)
 19. Suzuki, K., Mikami, T., Okawa, Y., Tokoro, A., Suzuki, S. and Suzuki, M.: Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose. *Carbohydr. Res.*, **151**, 403 (1986)
 20. Tokoro, A., Tatewaki, N., Suzuki, K., Mikami, T., Suzuki, S., and Suzuki, M.: Growth-inhibitory effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose against Meth-A solid tumor. *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 784 (1988)
 21. 류병호: 새우껍질에서 추출한 키토산의 항암 및 면역활성. *한국영양식량학회지*, **21**, 154 (1992)
 22. Sirica, A. E. and Woodman, R. L. : Selective aggregation of L1210 leukemia cells by the polycaton chitosan. *J. Natl. Cancer Inst.*, **47**, 377 (1971)
 23. Yamamoto, M. M., Mori, Y., Osada, K. and Murakami, H. : Enhancement of production of IgM and interferon- β in human cell lines by poly-lysine. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 1842 (1995)
 24. Maeda, M., Murakami, H., Ohta, H. and Tajima, M.: Stimulation of IgM production in human-human hybridoma HB4C5 cells by chitosan. *Biosci.*

Biotech. Biochem., **56**, 427 (1992)

25. Yamada, K., Ikeda, I., Sugahara, T., Shirahata, S. and Murakami, H. : Screening of immunoglobulin production stimulating factor(IPSF) in foodstuffs using human-human hybridoma HB4C5 cells. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2987 (1989)
26. Tokoro, A., Kobayashi, M., Tatewaki, N., Suzuki, K., Okawa, Y., Mikami, T., Suzuki, S. and Suzuki, M. : Protective effect of N-acetylchitohexaose on *Listeria monocytogenes* infection in mice. *Microbiol. Immunol.*, **33**, 357 (1989)
27. Suzuki, K., Tokoro, A., Okawa, Y., Suzuki, S. and Suzuki, M. : Enhancing effects of N-acetyl-chitooligosaccharides on the active oxygen-generating and microbicidal activities of peritoneal exudate cells in mice. *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 886 (1985)
28. Suzuki, K., Tokoro, A., Okawa, Y., Suzuki, S. and Suzuki, M. : Effect of N-acetylchito-oligosaccharides on activation of phagocytes. *Microbiol. Immunol.*, **30**, 777 (1986)
29. Peluso, G., Petillom, O., Ranieri, M., Santin, M., Ambrosio, L., Calabro, D., Avallone, B. and Balsamo, G. : Chitosan-mediated stimulation of macrophage function. *Biomaterials*, **15**, 1215 (1994)
30. Suzuki, K., Okawa, Y., Hashimoto, K., Suzuki, S. and Suzuki, M. : Protecting effect of chitin and chitosan on experimentally induced murine Candidiasis. *Microbiol. Immunol.*, **28**, 903 (1984)
31. Nishimura, K., Nishimura, S., Nishi, N., Numata, F., Tone, Y., Tokura, S. and Azuda, I. : Adjuvant activity of chitin derivatives in mice and quinea-pigs. *Vaccine*, **3**, 379 (1985)
32. Horowitz, S. T., Roseman, S. and Bliemthal, H. J.: The preparation of glucosamine oligosaccharides. I. separation. *J. Amer. Chem. Soc.*, **79**, 5046(1957)
33. 박성민, 이근태 : Carboxymethyl chitin의 고유점도에 미치는 pH 및 분자량의 영향. 한국수산과학회지. **28**, 487 (1995)
34. Roberts, G. A. F. and Domszy, J. G. : Determination of the viscometric

constants for chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.* **4**, 374 (1982)

35. Rabek, F. J.: *Experimental Methods in Polymer Chemistry*. Pitman Press, p.126 (1980)
36. Sannan, T., Kurita, K., Ogura, K. and Iwakura, Y.: Studies on chitin: 7. I. r. spectroscopic determination of degree of deacetylation. *Polymer*, **19**, 458 (1978)
37. Maron, D. M. and Ames, B. N.: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **113**, 173 (1983)
38. Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. : Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Res.*, **31**, 347 (1975)
39. Quillardet, P., Huisman, O., D' Ari, R. and Hofnung, M.: The SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci(USA)*, **79**, 5971 (1982)
40. Quillardet, P., Hofnung, M. : The SOS chrimotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins : procedures. *Mutation Res.*, **147**, 65 (1985)
41. Ding, A. H., Nathan, C. F. and Stuehr, D. J. : Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol.*, **141**, 2407 (1988)
42. Harpe, J. D. L. and Nathan, C. F. : A semi-automated micro-assay for H₂ O₂ release by human blood monocytes and mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol. Methods*, **78**, 323 (1985)
43. Yoshizawa, Y., Enomoto, A., Todah, H., Ametani, A. and Kaminogawa, S. : Activation of murine macrophage by polysaccharide fraction from marine algae(*Porphyra yezoensis*). *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1862 (1993)
44. Steinmuller, C., Roester, J., Grottrup, E., Fracke, G., Wagner, H. and marie-Louise Lohman-Matthes. : Polysaccharides isolated from plant cell cultures of *Echinacea purpurea* enhance the resistance of immunosuppressed mice against systemic infections with *Candida albicans* and *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Immunopharmac.*, **15**, 605 (1993)

45. 전향숙, 장현주, 이종미 : Chitosan의 in vitro 들연변이 억제효과 및 세포내 작용 특성. 한국식품과학회지, 28, 1059 (1996)
46. Namik, M. : Antioxidants/antimutagens in food. *CRC critical reviews in food science and nutrition.*, 29, 273 (1990)
47. 카와키시 순로 : 식품 중의 생체 기능 조절 연구법. 송현문화사 (1996)
48. Stuehr, D. J., kwon, N. S. and Gross, S. S. : Synthesis of nitrogen oxides from L-arginine by macrophage cytosol : requirement for inducible and constitutive components. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 161, 420 (1988)
49. Ben-Efraim, S. and Bonta, I. L. : Modulation of antitumor acitivity of macropahges by regulation of eicosanoids and cytokine production. *Int. J. Immuonolpharmac.*, 16, 397 (1994)
50. Urban, J. L., Shepard, H. M., Rothstein, J. L. and Sugarman, B. J. : Tumor necrosis factor : A potent effector molecule for tumor cell killing by activated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 5233 (1986)
51. Roitt, I., Brostoff, J. and Male, D. : Immunology, 4th ed. (1996)
52. Sasaki, T. and Takaska, : Further study of the structure of lentinan, an anti-tumor polysaccharide from *lentinus edodes*. *Carbohydr. Res.*, 47, 99 (1976)
53. 大塚博之, 前田浩, 山下昭 : 経口投与による抗腫瘍ペプチドマソナソ KS-2 腸管系吸收, 癌と化学療法, 8, 1570(1981)

여 백

제 4 장 노지고추재배 적용실험

제 1 절 서 설

키토산의 농업용 토양 및 종자 개량제로 이용하기 위한 적용연구로서 키토산 처리에 의한 노지고추의 재배시 발아율, 생육상황, 수확량 등에 미치는 영향을 연구하였다. 농작물에 키토산을 이용하는 방법은 키토산 초산염과 키토산 푸마르산염 등의 유도체 형태를 1000~5000배 정도로 희석한 용액을 식물체에 직접 살포하여 병원균의 증식을 예방할 수 있다. 또한 묘상의 토상에 살포하여 토양중의 키틴나제 및 키토사나제를 강력히 분비하는 방선균의 증식을 촉진시켜 병원균의 활동을 억제시키며, 종자를 키토산으로 피복하여 발아 후의 생장 혹은 수량의 증수효과를 기대하는 측면에서 활용하는 것으로 알려져 있다. 그러나 농작물 재배에 있어서 생육과 수확후 병충해 예방과 증수효과를 얻을 수 있는 예가 실증되고 있지만 효과의 작용메카니즘을 분자수준에서 해석할 수 있는 것에 대하여는 지속적인 연구대상이 되고 있다.

따라서 본 연구에서는 노지고추를 농업용 키토산을 처리하여 재배하면서 고추의 생육상태와 토지개량 효과의 검증을 위한 현장적용 실험을 통하여 농가에서 경제적으로 큰 부담 없이 사용이 가능하고, 또한 간편하게 적용할 수 있는 기술을 개발하는 것을 목적으로 하였다.

제 2 절 실험재료 및 방법

1. 실험재료

실험에 사용한 고추는 95년산 홍광 공시품종을 사용하였다.

2. 방법

가. 농업용 키토산의 제조

실험에 사용한 키토산 용액은 제 2장 Table 2-2에 나타낸 키토산 시료(CTS-3) 5% 용액에 젖산 5%, Vit. C 1%를 혼합하여 노지고추 생산에 적용할 수 있는 키토산 용제를 생산하였다((주) 한국키토산). 이 용제는 물에 500배(2 mL 키토산 용제/1L 물) 혹은 1000배(1 mL 키토산 용제/1L 물) 희석하여 고추재배에 필요한 키토산 용액을 조제하였다.

나. 고추종자의 발아실험

고추의 발아율에 대한 키토산 효과 실험은 다음의 조건하에서 시행하였다:

- 처리농도 : 500배, 1000배, 무처리
- 키토산 침종 처리시간 : 30℃ 온수 - 12시간
- 항온기 처리온도 : 22℃ ~ 24℃
- 시험기간 : '96. 2. 8 ~ 2. 18 (11일간)

다. 고추의 본포 육묘실험

고추의 고추묘 생육에 대한 키토산 효과 실험은 다음의 조건에서 행하였다:

- 파종 : '96. 2. 10(500배, 1000배, 무처리)
- 포트가식 : '96. 3. 16(파종후 36일)
- 육묘기 1회 키토산 처리 : '96. 3. 26(파종후 46일)
- 육묘기 2회 키토산 처리 : '96. 4. 15(파종후 66일, 가식후 30일, 1차 처리 13일후)
- 육묘 소요일수 : 파종 ~ 정식 - 83일간

라. 본포 토양의 염농도 측정

본포 토양의 염농도에 대한 키토산 처리효과는 다음의 실험조건하에서 행하였다:

a. 시비량 - 기비(밑거름) - 요소 1포(20kg)

(5월 10일) 용성인비 6포($20\text{kg} \times 6 = 120\text{kg}$)

유기질비료($20\text{kg} \times 24\text{포} = 480\text{kg}$)

그린소일,(부산물 비료 $10\text{kg} \times 35\text{포} = 350\text{kg}$)

1차 추비 - 요소 30kg

(6월 5일)

2차 추비 - 21복비 3포($25\text{kg} \times 3 = 75\text{kg}$)

(8월 16일)

b. 본 포 - 정식시 토양관주처리
키토산처리 (5월 13일)

500배(정식 1회 처리구, 6회 처리구)

1000배(정식 1회 처리구, 6회 처리구)

- 생육기 2회 처리

1차 엽면살포처리(생육 2회구, 6회 처리구)
(6월 19일) → 물 1말당 키토산 40g 처리

2차 엽면 살포처리(생육 2회구, 6회 처리구)
(8월 16일) → 물 1말당 키토산 20g 처리

제 3 절 결과 및 고찰

1. 키토산이 고추밭아에 미치는 영향

표 4-1에 키토산의 처리농도가 밭아현상에 미치는 영향을 나타내었다. 실험의 당초 목적은 키토산 처리농도(500배, 1000배)별 밭아율 관계의 동정을 관찰코자 하였으나 밭아시 - 밭아율은 연관된 계속 작업으로 밭아시부터 관찰하였다. 표에 나타난 바와 같이 실험실 내에서의 밭아율은 처리구나 무처리구에서 공히 90% 이상으로 별 유의성이 없었으나 전체 밭아율은 500배에서 99%, 1000배에서 97%, 무처리에서 94%로 500배에서 높았고, 기타 종합적인 내용은 1000배에서 높게 나타났다.

표 4-1. 키토산 처리농도가 밭아에 미치는 영향

구 분 ^a	500배	1000배	무처리	비 고
밭아시	처리후 36시간 발현	처리후 24시간 발현	-	1000배에서 유의성 높았음.
밭아세	처리후 5일 - 75.7%	처리후 5일 - 91.2%	처리후 5일 -11.3%	"
밭아기	처리후 4일 - 35.3%	처리후 4일 - 57%	처리후 4일-1.2%	"
밭아전	처리후 6일 - 94.7%	처리후 5일-91.2%	처리후 7일-86.7%	"
밭아일수	처리후 5일	처리후 4일	처리후 6일	"
밭아기간	108시간	101시간	149시간	"
밭아율 (%)	99	97	94	500배에서 높았음.

^a 용어해설

- 밭아시 : 최초 1개체가 밭아한 날

- 발아세 : 일정한 시일내의 발아율
- 발아기 : 전체 종자수의 50%가 발아한 날
- 발아전 : 종자의 대부분 (80% 이상) 발아한 날
- 발아일수 : 파종기 - 발아기까지 일수
- 발아기간 : 발아시 - 발아전까지의 일수
- 발아율 : 파종된 종자 개체수에 대한 발아 종자 개체수의 비율(%)

표 4-2는 염농도의 변화에 따른 고추의 발아율을 나타낸 것이다. 500배 희석 키토산 용액을 홍광종자에 처리한 경우 염농도 1.9에서 발아율 100%로 가장 좋았다. 한편, 염농도 4.8에서 홍광종자에 무처리한 경우에는 발아율 0%로 전혀 발아되지 않았으나, 홍광종자에 키토산 500배 희석용액을 처리한 경우 염농도 8.0에서도 55%의 발아율을 나타내었다. 또한, 홍광종자에 키토산 1000배 희석용액을 처리한 경우에는 염농도 4.2에서도 45%의 발아율을 보였다.

이같은 결과는 키토산을 종자에 처리하였을 때 염농도에 대한 저항성이 증가되어 발아율이 향상됨을 의미한다. 한편, 500배와 1000배의 유의성은 500배에서 탁월한 효과를 보여, 고추 육묘시 발아율 증진을 위한 키토산 종자 처리농도는 500배로 처리하여 파종하면 발아율 증진효과를 기대할 것으로 생각된다.

표 4-2. 키토산 처리에 의한 염농도별 발아율 비교^a

처리농도별	500배	무처리	무처리	1000배	1000배	무처리	무처리	무처리	500배
품종별	홍광	홍광	거성	홍광	홍광	건강	홍광	효자건	홍광
염농도별 (ds/m)	1.9	2.3	2.6	3.0	4.2	4.8	4.8	5.4	8.0
발아상태	양호	양호	양호	양호	불량	불량	불량	불량	불량
발아율(%)	100	88	85	90	45	20	0	10	55

^a 공시상토 : 시관용 짱짱이 2호, 종자처리 조건 : 30℃ 온수에 12시간 침지(담금)

2. 키토산이 고추묘의 생육에 미치는 영향

표 4-3에 키토산의 처리농도가 고추의 생육에 미치는 영향을 나타내었다. 1, 2차 조사결과 A~G처리 유형중 500배 종자 침지에서의 생육상태가 가장 좋게 나타났다. 3차 조사결과에서는 500배 육묘기 2회 처리에서의 생육상태가 월등히 높았고, 4차 조사결과 역시 육묘 2회처리 500배에서 무처리대비 초장-127%, 엽수-123%의 결과를 보여 가장 좋은 생육상태를 보였다. 고추묘 전체적인 소질은 무처리, 종자처리, 육묘기 2회 처리 유형에서 육묘기 2회 처리가 초장, 엽수, 줄기두께, 엽색, 병해 발생 등을 종합적으로 관찰할 때 가장 좋았다. 키토산 처리에 의한 고추묘 생육상황의 한 예를 그림 4-1에 나타내었다.

3. 키토산 처리가 본포 토양의 이화학적 성질에 미치는 영향

표 4-4는 키토산의 처리농도 및 처리방법에 따른 본포토양의 pH, 염농도 등을 나타낸 것이다. 토양에서의 키토산 처리구와 무처리구의 EC 변화는 1차 조사시 무처리에 비해 처리구의 EC는 낮았으며, 2차 조사시는 오히려 처리구에서는 증가하고 무처리구에서는 낮아지는 경향이였다. 한편, 3차 조사시는 증가 추세였다가 4차 조사시는 처리구와 무처리구 공히 낮아지는 경향이였으나, 정식직후 EC보다는 처리구는 낮아지는 경향이였고, 무처리구는 증가추세를 보여 토양에서의 EC 변화 추이는 약간의 유의성이 있다고 사료된다.

4. 키토산이 본포 고추생육에 미치는 영향

표 4-5에 키토산의 농도와 처리방법이 본포에서의 고추생육에 미치는 영향을 나타내었다. 1차조사(정식후 19일)시 초장은 1000배 정식 1회구에서, 경경은 무처리구에서 좋았으며, 2차조사(정식후 37일)와 3차조사(정식후 51일)시에서 초장과 경경은 무



그림4-1. 키토산 처리에 의한 고추묘 생육

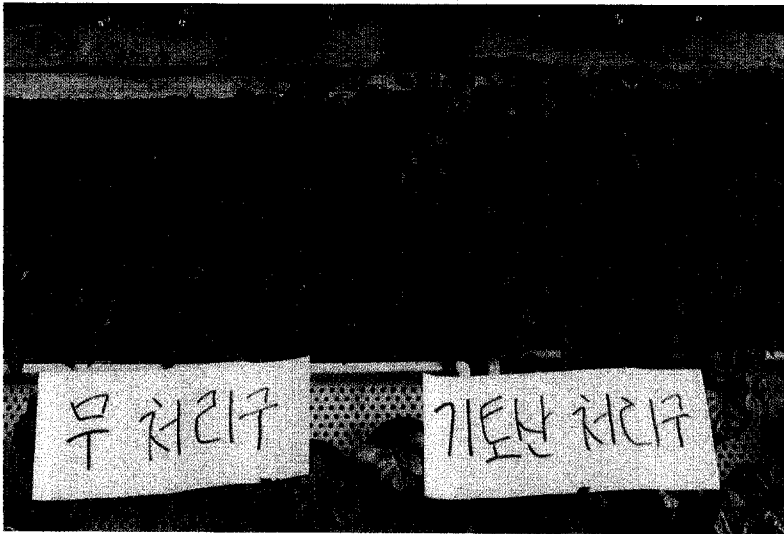


그림4-1. 키토산 처리에 의한 고추묘 생육

여 백

처리구에서 높게 나타났다. 반면에 4차조사(정식후 91일)시 초장은 500배 종자침지구, 경경은 1000배 육묘 2회구에서 높게 나타났다. 본포 포장의 토양의 이화학적 성분상 태는 무처리구에서 보는 바와 같이 인산, 카리마그네슘, EC 등의 높은 관계로 초장 및 경경은 좋았으나, 결국 전체적인 수량은 키토산 처리구보다 떨어짐과 병충해 발생율은 높아 키토산 처리구의 유의성을 보여주고 있다.

표 4-3. 키토산 처리농도별 고추묘 생육 및 소질에 미치는 영향

구분		4월3일		4월 15일		4월 26일		5월 2일		TOTAL	
		초장	엽수	초장	엽수	초장	엽수	초장	엽수	초장	엽수
A	종자침지 500배	(cm)	(매)							(114%)	(105)
		7.5	2.9	10.3	6.9	16.9	9.8	23.0	11.4	57.7	31.0
B	종자침지 1000배	6.5	2.5	8.9	6.3	16.5	9.5	23.6	12.3	(110)	(103)
										55.5	30.6
C	종자침지 500배+육 묘 2회	6.5	2.7	9.2	6.2	17.2	10.1	26.2	13.1	(104)	(108)
										59.11	32.05
D	종자침지 1000배+육 묘 2회	6.5	2.7	9.4	6.9	17.1	9.8	26.9	12.5	(118)	(108)
										59.8	31.9
E	육묘 2회처리 500배	6.6	3.1	10.2	7.0	19.5	11.3	27.8	13.7	(126)	(118)
										64.01	35.05
F	육묘 2회처리 1000배	6.4	3.0	9.3	6.8	17.0	10.4	24.3	11.6	(113)	(107)
										57.0	31.75
G	무처리	5.9	2.2	7.65	6.3	15.3	10.0	21.9	11.1	(100)	(100)
										50.7	29.6

5. 키토산 처리가 병충해 발생에 미치는 영향

표 4-6에 키토산의 처리농도와 처리방법이 고추 생육과정에서의 병충해 발생에

미치는 영향을 나타내었다. 고추재배시 고추수량에 치명적인 타격을 주는 탄저병, 역병, 풋마름병, 담배나방의 발생율을 조사한 결과 처리구는 무처리구에 비해 병충해 발생율이 낮았으며, 특히 역병의 경우 처리구에서는 거의 발생하지 않았으나, 무처리구에서는 13.3%의 높은 발병율을 보였으며, 담배나방 역시 무처리구에서 높게 나타났다. 키토산 처리구중에서도 탄저병과 담배나방은 공히 500배와 1000배 6회 처리구에서 유의성이 높았고, 담배나방의 경우에는 생육 2회에서 발생율이 다소 높았다.

표 4-5. 키토산 처리농도 및 방법별 본포 고추 생육에 미치는 영향

일 구 분	1차조사		2차조사		3차조사		4차조사	
	6월 1일		6월 19일		7월 3일		8월 22일	
	초장 (cm)	경경 (mm)	초장 (cm)	경경 (mm)	초장 (cm)	경경 (mm)	초장 (cm)	경경 (mm)
500배 종자침지	50.4	6.5	76.7	9.4	91.5	10.9	115.7	14.8
500배 육묘 2회	48.5	6.1	78.3	8.9	89.6	10.5	110.3	13.9
500배 정식	44.4	6.4	81.4	9.3	92.9	10.8	111.7	14.4
500배 생육 2회	48.9	6.0	74.6	8.9	86.3	10.6	103.6	14.6
500배 종자+육묘 2회 + 정식 1회+생육기 2 회 처리구	49.8	6.1	78.0	9.1	87.5	10.8	103.5	14.9
1000배 종자침지	48.0	6.3	80.7	9.5	88.2	11.3	89.3	13.7
1000배 육묘 2회	51.4	6.5	82.6	9.9	89.5	11.8	93.7	15.3
1000배 정식 1회	52.7	6.3	84.0	9.6	91.9	11.5	94.7	14.1
1000배 생육 2회	48.6	6.4	82.8	9.6	92.8	11.6	104.4	14.6
1000배 종자처리+육 묘2회+정식1회+생육 기 2회 처리구	52.5	6.5	83.6	9.5	92.6	11.7	95.1	14.3
무처리구	50.1	6.7	85.8	10.4	97.9	12.9	98.9	14.7

^a 경경 : 지상부 5cm 부위의 줄기의 두께(mm)

표 4-6. 키토산 처리농도 및 방법별 병충해 발생상황^a

구 분	탄저병 (%)	꽃마름 병	역 병	담배나 방	비 고
500배 종자침지	2.5	0	2.2	2.3	
500배 육묘 2회	3.0	0	0	2.2	
500배 정식	3.1	0	0	2.9	
500배 생육 2회	1.1	0	0	3.6	
500배 5회 처리	0.5	0	0	1.5	
1000배 종자	2.8	0	0	2.1	
1000배 육묘 2회	1.5	0	0	2.0	
1000배 정식	3.6	0	0	1.7	
1000배 생육 2회	1.4	0	0	3.4	
1000배 6회 처리	0.5	0	0	1.3	
무처리	5.8	5.6	13.3	5.4	

^a 병충해 발생율은 1, 2, 3, 4차 조사 결과의 평균치임.

6. 키토산 처리가 고추의 생산성에 미치는 영향

표 4-7에 키토산 처리에 따른 고추의 수량성을 나타내었다. 평당 총 착과수는 500배 정식 1회 처리구에서 가장 많았고, 1과당 무게는 1000배 6회 처리구가 16.4g으로 가장 무거웠으며, 평당 수량은 100배 6회 처리구가 높게 나타났다. 6회 처리시 수량이 무처리에 비해 131%의 증수를 보였으나, 처리시 작업등 인건비로 생산비가 증가되어 경제성이 상대적으로 감소하였다. 따라서 1000배 육묘 2회 처리의 방법은 무처리 대비 116%의 증수효과와 처리방법이 간편하여 금후 농가보급에 타당성이 있다고

생각된다. 그림 4-2에 1000배 희석한 키토산을 육묘 2회 처리 및 생육 6회 처리한 고추의 생산성을 무처리한 시료와 비교하였다.

표 4-7. 처리구별 고추 수량성 관계(1평당: 10주)

구 분	500배 종자	500배 육묘 2회	500배 정식	500배 생육 2회	500배 6회	1000배 종자	1000배 육묘 2회	1000배 정식	1000배 생육 2회	1000배 6회	무처리
1차 수확	38개	49	45	45	15	55	50	45	33	41	46
2차 수확	74	47	77	57	86	100	88	68	71	78	75
3차 수확	156	125	201	151	177	110	17175	103	159	194	147
4차 수확	80	51	53	76	59	62	6161	63	51	46	67
총과수 (개)	348	272	376	329	337	327	374	279	314	359	335
생체총 수량 (g)	4109.03	3836.93	4834.25	4304.67	4508.67	4691.06	5207.50	4551.67	4712.76	5887.61	4473.73
건과총 수량 (g)	739.6	690.7	870.2	774.8	811.6	844.3	937.3	819.3	848.3	1059.8	805.3
1과당 생체중 량(g)	11.8	14.1	12.9	13.1	13.4	14.4	13.9	16.3	15.0	16.4	13.4



그림 4 2. 키토산 처리에 의한 고추 수확량

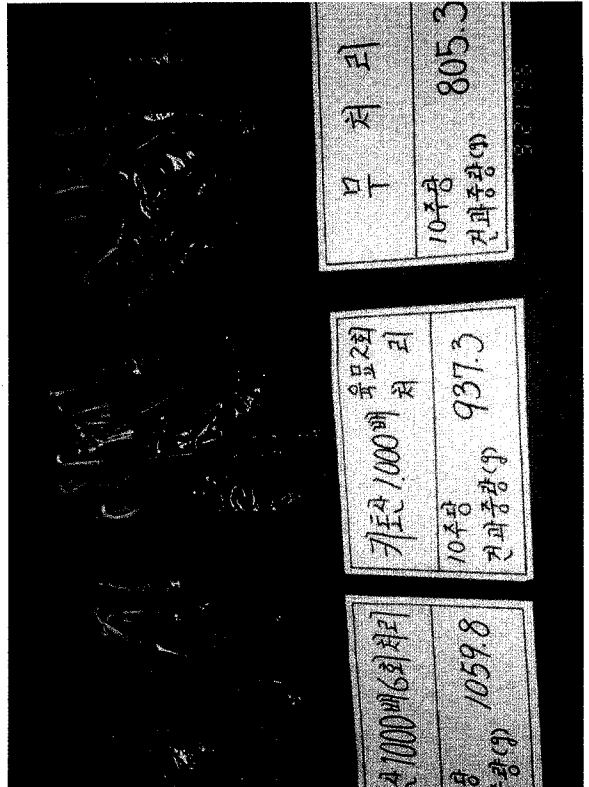
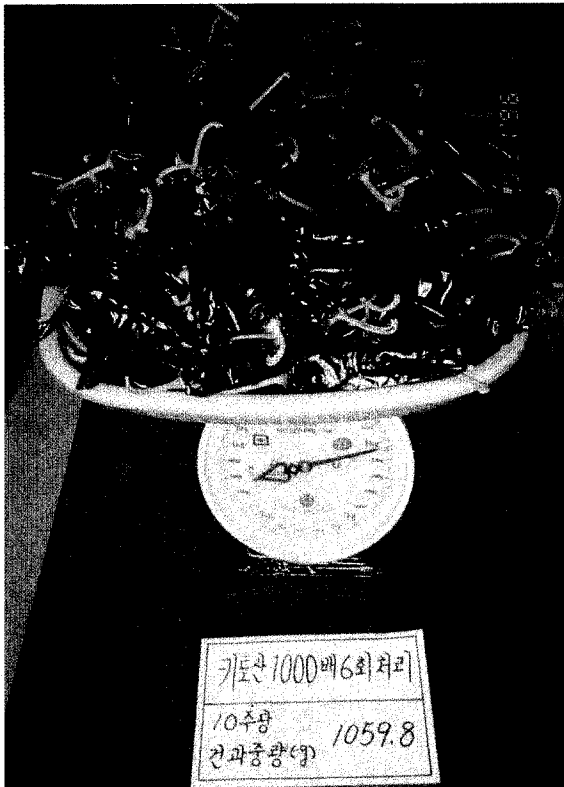
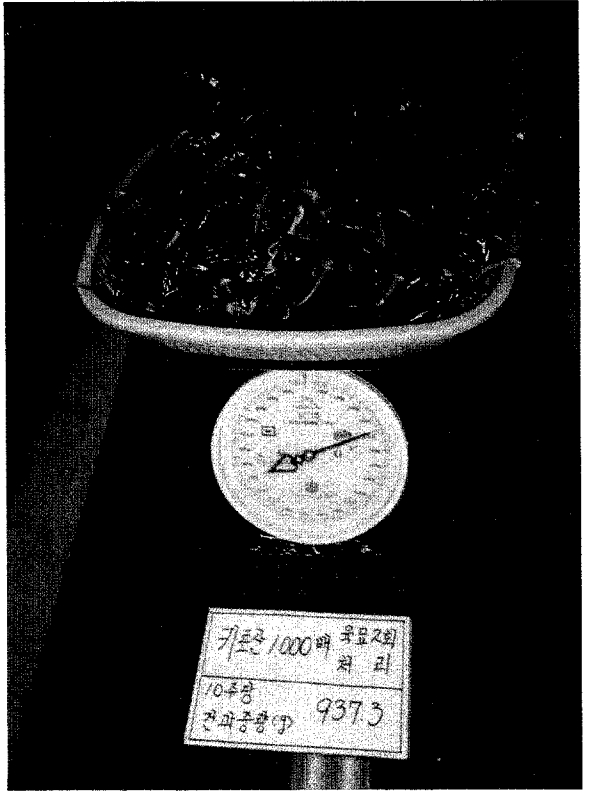
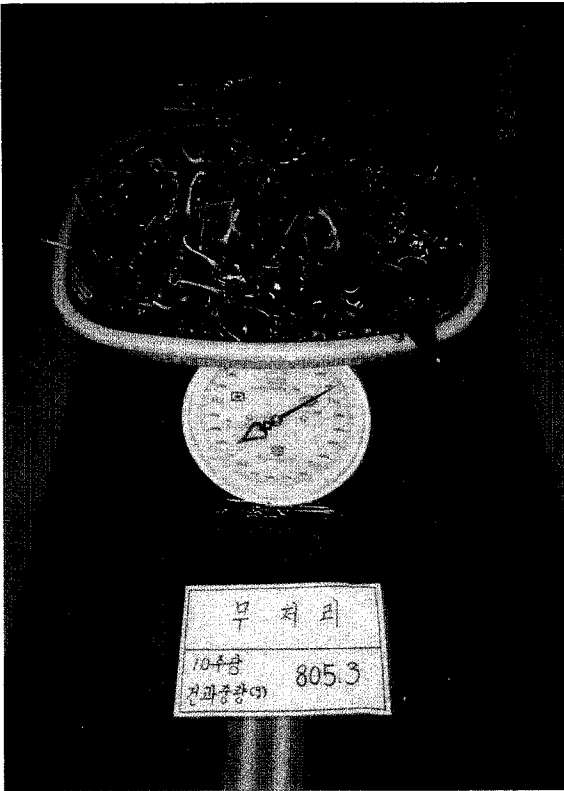


그림4-2. 키토산 처리에 의한 고추 수확량

여 백

제 5 장 다산벼의 미질향상을 위한 적용실험

제 1 절 서 설

식물은 병원균에 감염되면 chitinase 및 β -1,3-glucanase 등 병원균의 세포벽을 분해할 수 있는 효소와 병원균의 증식을 저해하는 작용이 있는 phytoalexin 등의 생성을 유도, 분비하며 식물세포벽의 주성분인 cellulose와 결합하여 조직의 강도를 높이는 lignin 등의 생합성을 촉진하기도 하는 등 소위 자기방어능력이 있는 것으로 알려져 있다⁽¹⁾. 한편, 키틴, 키토산 및 6~7량체의 올리고당은 병원균 세포벽의 특이한 부위에 결합하여 병원균의 생육을 저해하는 동시에 식물세포의 특위부위를 인식해 식물세포 DNA를 활성화하고 가수분해효소 및 phytoalexin의 생합성 효소, protease 저해물질, 항균 단백질 등 일반 단백질의 생합성을 높이는 등 식물의 자기방어기구의 발현에 있어서 tiger역할을 하는 것으로 보여지고 있다⁽²⁾.

따라서 키틴 및 키토산은 식물 세포의 활성화를 통하여 인위적으로 식물생산성의 향상에 응용될 수 있을 것으로 기대되고 있다. 실제로 키토산을 각종 식물체에 투여하여 식물생산성의 향상효과를 거둔 결과가 다수 있는데 양배추 20~50%, 소맥 8~21%, 무 14%, 하지감자 55~61%, 고구마 13~36%, 당근 11~14%, 마늘 10~15%, 상치 7% 등 식물체의 증수효과를 보인 사례가 많다⁽³⁾.

한편, 쌀의 조리후 밥상태로 섭취할 때 식미는 쌀알의 이화학적 특성, 품종, 재배환경, 비배관리 방법 등에 영향을 받는다. 특히, 쌀알의 화학적 성분중 아밀로오스와 단백질 함량이 식미에 크게 영향을 주며 이들 함량이 높으면 밥의 찰기(stickness)가 떨어져 우리나라 사람의 입맛에 맞지 않는다. 이에 본 연구에서는 수량성이 타품종에 비하여 130% 정도 증수되고 있으나, 통일벼 계통의 쌀로 밥맛이 떨어지는 단점으로 인하여 소비가 감소하고 있는 다산벼(슈퍼쌀)의 재배시 키토산 처리를 하여 벼의 생

육상태와 수확후 쌀의 품질분석을 통하여 미질향상의 효과를 살펴보았다.

제 2 절 실험재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용한 쌀품종은 본 연구의 협동연구기관인 전북 김제농촌지도소가 1급지의 논 600평에서 생산한 1997년산 다산벼(슈퍼쌀)를 수확하여 사용하였다.

2. 방법

가. 키토산의 처리방법

키토산의 처리농도는 키토산 용액을 100배, 200배, 500배, 1000배 희석한 용액을 침종, 육묘, 출수시에 처리하였다.

나. 생육조사 및 방법

벼의 생육과정중 생육상태 조사를 다음과 같이 실시하였다(그림 5-1 참조).

묘상 : 엽수, 초장

본답 : 엽수, 초장, 분얼수

출수후 : 엽실울, 벼알수, 예상수량

수량 : 정현울, 정백울

다. 정미



키토산처리시험포

이 논은 게 껍질에서 추출한 천연고분자 화합물인 키토산을 이용하여 슈퍼쌀(다산벼)의 미질과 밥맛을 향상시키고, 수량을 더욱 높이고자 하는 시험포입니다.

- 면 적 : 600평 ● 품 종 : 다산벼 ● 재 배 법 : 일반재배
- 이 양 일 : 5월 26일 ● 예 상 수 량 : 10a당 700kg

소재지 : 김제시 부량면 응성리 담당 지도사 : 조 광 우

한국식품개발연구원

그림5-1. 다산벼 재배를 위한 시험포 전경(전북, 김제)



키토산처리시험포

이 논문 게 껍질에서 추출한 천연고분자 화합물인 키토산을 이용하여 슈퍼쌀 (다산벼) 의 미질과 밥맛을 향상시키고, 수량을 더욱 높이고자 하는 시험포 입니다.

● 면 적 : 600평 ● 품 종 : 다산벼 ● 재 배 법 : 일반재배

● 이 양 일 : 5월 26일 ● 예 상 수 량 : 10a당 700kg

소 재 지 : 김제시 부량면 용성리 담 당 지 도 사 : 조 광 우

한국식품개발연구원

그림5-1. 다산벼 재배를 위한 시험포 전경(전북, 김제)

여 백

수확한 다산벼를 수분 12% 정도로 천일건조한 후 농촌진흥청 기준에 따라 쌀(백미)로 도정한 다음, 나이론/폴리에틸렌 복합비닐백에 밀봉하여 저온저장(4℃)하면서 사용하였다.

라. 쌀가루의 제조

일반성분을 위한 쌀가루는 쌀 100g을 Cyclone mill(Cyclotec. 1093, Sweden)을 사용하여 분쇄하고 80메쉬를 통과한 것을 시료로 하였다.

마. 쌀가루의 이화학적 특성

1) 일반성분

쌀가루의 일반성분은 AOAC 방법⁽⁴⁾에 따라 수분은 105℃ 건조법, 조회분은 직접 회화법, 조지방은 Soxhlet법, 조단백질은 단백질 자동분석기(Kjeltec System 1026 Analyzer, Tecator, Sweden)를 사용하여 Semi-micro Kjeldahl법으로 분석하였다.

2) 무기질 분석

각 시료를 회화시킨 회분을 AOAC 방법⁽⁴⁾에 따라 분석하였다. 회화시킨 회분에 탈이온수를 10방울 떨어뜨린 다음 질산용액(1:1) 4ml를 가한 후 110℃ 되는 캐비넷 건조기를 사용하여 증발시켰다. 이를 다시 500℃ 회화로에 넣어 1시간 동안 다시 회화시킨후 실온으로 냉각시켜 염산용액(1:1) 10ml를 넣어 무기질을 잘 녹인 후 50ml 정용 플라스크에 정용하고 여과하여 Inductively Coupled Plasma-Atomic Emmission Spectrometer(Jobin Yvon JY 138, France, 이하 ICP-AES로 함)로 분석하여 무기질 조성을 분석하였다. 각 원소의 표준용액(Ca, Mg, Na, K, Fe, Al, Cu, Mn, Zn, P 등 high purity standards, U.S.A.)의 농도는 3점을 이용한 검량곡선을 작성하여 분석하였으며, 시료용액의 농도와 동일하게 희석하여 측정하였고, 이 때 ICP-AES의 작동조건은 Table 5-1과 같다.

Table 5-1. Operation conditions for ICP

Power	1 Kw for aqueous
Nebulizer pressure	3.5 bar for Meinhard type C
Aerosol flow rate	0.3 l/min
Auxiliary gas	0.3 l/min for multielement analysis of aqueous solution
Cooling gas	12 l/min

3) 색도

쌀가루의 색도를 색차계(Tri-stimulus colorimeter, JC-801S, Color Tecno System Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 L(lightness), a(redness), b(yellowness), $\Delta E(=\sqrt{(\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2)})$ 값을 측정하였다. 측정은 최소한 5회 이상 반복하였다. Standard plate L값이 97.45, a값이 -0.09, b값이 -0.16이었다.

바. 밥의 물리적 특성

1) 침지 및 취반

쌀 20g(± 0.004)을 100ml 나사마개(screw cap)병에 담고 가수율을 1.50(v/w)로 한 후 뚜껑을 닫고 실온(21℃)에서 30분간 침지 시켰다. 텍스처 측정을 위한 취반공정은 미리 가열된 직경 30cm, 높이 25cm의 찜통 속에서 수증기를 이용하여 30분간 취반 한 후 가열을 중단하고 10분간 뜸을 들였다.

2) 텍스처 측정

취반된 쌀밥의 텍스처 측정은 Okabe의 방법⁽⁵⁾을 변형하여 TPA(Texture profile analysis) 실험으로 하였다. 측정중 시료의 온도 변화를 최소화 하기 위하여 Mossman 등의 방법⁽⁶⁾대로 실온(21℃)에서 나사마개병을 거꾸로 세워 60분간 방치시킨 후 병의 중앙부분의 밥을 발채하여 2알씩 놓고 Texture analyer (model TA-XT2, Stable Micro system Ltd., Haslemere, England)를 이용하여 측정하였다.

측정조건은 cross head speed는 0.5mm/sec, holding time은 3sec, strain은 95%, probe의 직경은 50mm 이었다. 나타낸 데이터는 10회 측정된 평균값이다. 시료의 측정항목들인 springiness, gumminess, hardness, cohesiveness, adhesiveness, chewiness의 정의 및 단위는 표 5-2와 같다.

표 5-2. 시료 측정항목의 정의와 단위

특 성	정 의	단 위
경도(hardness)	주어진 시료의 변형에 필요한 힘	gram
겉성(gumminess)	반고체 시료를 삼키기전 상태로 분리하는데 드는 힘(hardness×cohesiveness)	
부착성(adhesiveness)	시료와 texturometer fixture 사이의 부착력	gram
탄력성(springiness)	변형에 가해진 힘이 제거된 뒤, 시료의 상태가 원래로 돌아가려는 정도	
씹힘성(chewinwss)	반고체 시료를 삼키기전 상태로 분리하는데 드는 힘(hardness×cohesiveness×adhesiveness)	

사. 밥의 관능적 특성

1) 취반

관능검사용 밥시료를 제조하기 위한 절차는 다음과 같다. 수압수세미(PR-7J, Aiho)를 이용하여 쌀 800g을 세미한 다음 쌀의 수분함량에 따라 가수량을 조절한 후 취반하였다.

2) 관능평가용 밥의 준비

취반후 밥시료는 예비실험을 통해 확립해 놓은 표준방법을 이용하여 밥을 다른 용기에 옮겨 담아 밥알이 부서지지 않게 두 번 정도 저어 10분간 식힌 후 사기용기

(8.5cm×5.0cm, 지름×높이)에 일정량(약 50g)을 담아 뚜껑을 덮어 세자리 무작위 수를 달아 제세하였다. 제세된 시료의 온도는 $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ 이었다.

3) 밥의 관능적 평가

밥의 관능적 평가는 9점 척도법을 사용하여 특성강도와 기호도를 측정하였으며, 이대 사용한 검사표는 부록 1과 2에 제시하였다. 실험은 2회 반복하였다.

4) 통계

각 측정항목에 있어서 시료간의 차이는 SAS(Statistical Analysis System)을 이용하여 분산분석(Analysis of Variance)을 하고, 그 결과 시료간 차이가 있는 경우 SNK(Studentized Newman Keul's) 다중비교에 의해 시료군 평균간의 차이여부를 결정하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 키토산 처리농도에 따른 침종수, 유아, 유근의 관찰

키토산 회석용액 100, 200, 500, 1000배와 키토산을 용해한 젖산 자체의 효과가 작용하는지 확인하기 위하여 키토산을 용해한 동일한 농도의 젖산용액 및 대조구에 종자를 112시간 침지하는 동안 물의 탁도와 유아 및 유근의 출현상태를 살펴 보았다.

물의 탁도는 키토산 1000배 회석액과 젖산용액이 가장 낮은 상태로 오랜 시간 지속되었고, 키토산 회석용액 100, 200, 500배 순으로 탁도가 낮았으나 대조구는 탁도가 높은 것을 관찰할 수 있었다. 유아와 유근의 출현상태는 젖산 1000배 회석액으로 처리한 종자가 가장 빠르게 나타났고, 키토산의 회석농도가 높은 100, 200, 500, 1000배 순으로 출현상태가 바른 경향을 보였다.

2. 키토산 처리농도에 따른 육묘시 생육상태

키토산 회석용액을 달리 처리한 벼의 생장과정 중 육묘시 입고병 발생현황, 엽색, 건물중 초장 등을 살펴 보았다. 농업용 키토산을 100배, 200배 및 500배의 농도로 회석한 용액처리군에서는 농도가 높을수록 입고병을 발생시키는 후사리움균의 발생이 억제되었고, 키토산을 처리하지 않은 대조구에서는 곰팡이가 발생하였다. 따라서 대조구에서 곰팡이의 생장이 발견된 결과와는 상반되게 키토산 회석액의 처리농도가 높을수록 입고병을 일으키는 후사리움균의 발생이 억제되는 사실로 미루어 볼 때 벼의 재배시 키토산의 처리는 입고병을 억제할 수 있는 효과가 있는 것으로 사료된다.

엽색정도는 키토산 회석용액 100배, 200배, 500배에서 처리구가 대조구에 비하여 매우 진한 색깔을 보여 대조구에 비하여 질소원의 흡수가 용이하였던 것으로 판단된다. 육묘시 10구당 건물무게는 키토산 회석용액 100배, 200배, 500배 처리구가 대조구에 비하여 각각 18.3%, 8.3%, 7.0% 정도로 키토산 용액의 농도가 낮을수록 무게가 더

나가는 결과를 보였다. 한편, 초장은 대조구와 키토산 처리구 모두 유의성을 보이지 않았다.

3. 키토산 처리농도에 따른 출수후 생육상태

출수후 1차 생육상태를 키토산 희석용액의 농도와 처리시기에 따라 관찰하여 표 5-3에 나타내었다. 표에서 알 수 있듯이 1포기당 줄기수는 모든 처리구에서 큰 차이를 보이지 않았고, 키토산 희석용액 200배로 종자와 출수기에 처리한 경우 21개로 제일 높았다. 1주당 영화수는 키토산 희석용액 100배, 200배, 1000배로 처리한 대부분의 처리구에서 대조구보다 높은 수를 보였다.

표 5-3. 출수후 1차 생육조사

구 분	대 조 구 (개)	1000 배, 종자 처리	1000 배, 육묘 1회	1000 배, 종자+ 육묘	1000 배, 출수 기	1000 배, 종자+ 출수	1000 배, 육묘+ 출수	종자+ 출수+ 육묘	500배, 종자+ 출수	200배, 종자+ 출수	100배, 종자+ 출수	젓산, 종자+ 출수
1포기당 줄기수	19.3	16.5	16.5	17.5	19.5	18.5	19.5	19.0	18.0	21.0	17.5	11.5
1주당 영화수	85.5	96.2	92.4	92.8	104.7	83.7	86.2	86.7	88.5	81.7	98.9	134.4
1포기당 총영화수	1646.2	1551.0	1525.0	1624.0	2041.0	1548.5	1680.9	1647.3	1593.0	1715.0	1729.0	1545.6

표 5-4. 출수후 2차 예상수량 조사

구 분	m ² 당 이삭수 (개)	m ² 당 영화수 (개)	등숙비율 (%)	정조 천립중 (g)	10a당 예상 수량(kg/10a)	간 장 (cm)
대조구	424.8	34238.9	90.1	29.8	618.3	60.7
종자1회 처리	479.0	44355.4	88.5	29.4	766.7	62.3
육묘1회 처리	436.6	33923.8	93.1	29.5	633.6	61.6
종자+육묘	413.0	33246.5	91.7	30.2	626.1	62.3
출수기 처리	448.4	33271.3	87.1	30.4	599.0	60.4
종자+출수기	377.6	34625.9	92.7	29.3	639.5	66.3
육묘+출수기	424.8	27866.9	88.5	29.9	502.5	61.3
종자+육묘+출수기	495.6	41977.3	91.4	29.7	774.9	63.5
500배종자+출수기	460.0	35742.0	89.5	29.5	641.7	62.3
200배종자+출수기	342.2	42261.0	94.0	29.2	788.7	63.0
100배종자+출수기	413.0	40061.0	91.4	30.3	754.5	64.1
젖산종자+출수기	389.4	41587.9	91.0	29.6	761.7	65.4

※ 단위면적당 수량 = 단위면적당 이삭수 X 이삭 1개의 평균영화수 X 등숙율 (%) X 정조 천립중 ÷ 1,000

4. 키토산 처리농도에 따른 출수후 2차 예상수량 조사

출수후 2차 예상수량을 m²당 이삭수, m²당 영화수, 등숙비율, 10a당 예상수량, 간 장 등을 조사하여 표 5-4에 나타내었다. m²당 이삭수는 종자, 육묘, 출수기 키토산 처리구가 495개로 대조구의 424개 보다 117% 가량 많았고, m²당 영화수는 종자 처리구가 44,355개로 대조구의 34,238개 보다 130% 가량 많았다. 등숙비율은 키토산을 200배 희석한 용액으로 종자 처리시와 출수기에 키토산 처리한 시험구가 94%로 대조구 90.1% 보다 104% 많은 결과를 보였다. 정조천립중은 모든 처리구가 29.4~30.4g 수준을 보였다. 10a당 예상수량은 키토산을 200배 희석한 용액으로 종자 처리시와 출수기에 키토산 처리한 시험구가 788.7kg이고 대조구가 618.3kg을 보여 128% 정도의 증수

효과를 보였다.

5. 키토산 처리 농도에 따른 조곡 및 정곡 생산량

표 5-5에 다산벼의 수확후 조곡 및 정곡 생산량을 나타내었다. 육묘 및 출수후의 생육단계에서 비교적 좋은 생육상태를 보였던 종자처리, 출수기 1회, 종자와 육묘 및 출수기에 키토산 처리를 한 처리구들은 예상외로 조곡과 정곡의 생산량이 저조하였다. 한편, 키토산 용액을 500, 200, 100배 희석한 용액으로 처리한 경우에 있어서 정곡 생산량은 794, 782, 738kg/10a로 대조구에 비하여 각각 17.6, 15.9, 9.3%가 증수된 결과를 보였다.

표 5-5. 수확후 다산벼의 조곡 및 정곡생산량

키토산처리구	수분함량 (%)	조곡생산량 (kg/5m ²)	정곡생산량 (kg/10a)
대조구	12.8	4.9	675
종자 1회*	10.8	4.3	607
육묘 1회*	10.1	5.1	724
종자+육묘*	10.8	4.5	633
출수기 1회*	11.4	4.9	686
종자+출수기*	11.0	5.3	738
육묘+출수기*	11.0	4.8	678
종자+육묘+출수기*	10.8	5.0	704
500배	11.1	5.7	794
200배	11.7	5.6	782
100배	10.3	5.2	738
젓산 1000배	10.4	5.4	764

6. 키토산이 처리된 쌀의 이화학적 특성

키토산이 처리된 쌀가루의 일반성분 분석 결과를 Table 5-6에 나타내었다. 키토산을 종자침종과 출수 및 종자, 육묘, 출수 단계시 모두 처리한 경우 시료에 있어서 조단백질, 조지방, 조회분의 함량은 큰 변화가 없었다. 일반적으로 쌀의 화학적 성분 중 조단백질의 함량은 아밀로오스와 함께 식미에 큰 영향을 주는 인자로서, 이들 함량이 높으면 밥의 찰기가 떨어져서 우리나라 사람들의 식미에 맞지 않는 것으로 알려져 있다⁽⁷⁾.

무기질 함량을 Table 5-7에 나타내었는데, 종자에 키토산을 처리한 시료에 있어서 Fe, Cu, Mn, Al, Zn의 함량이 대조구에 비하여 높았다. 특히 인의 함량은 출수와 종자, 육묘, 출수단계시 모두 처리한 시료에 있어서 월등히 높은 결과를 보였다. 그리고 벼의 생장중 Mg, P, K 등의 무기질 성분은 일반적으로 출수기가 빠르고 등숙기가 높을수록 함량이 증가하고, 이들 무기질의 함량은 유수형성기 이후에 토양수분이 감소하면 함량이 낮아진다고 한다⁽⁸⁾. 또한 재배시 질소와 거름의 사용량이 무기질의 함량변화에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 한편, Mg/K의 비는 대조구와 키토산 처리구간에 큰 차이를 보이지 않았다.

Table 5-6. Proximate composition of Indica type rices of different chitosan treatment during growing

Samples	Moisture (%)	Crude protein (%N×5.95)	Crude fat (%)	Crude ash (%)
C ¹⁾	11.43	8.18	0.57	0.48
S ²⁾	11.24	8.34	0.57	0.46
E ³⁾	10.85	7.93	0.55	0.44
R ⁴⁾	10.38	8.05	0.49	0.43
L ⁵⁾	10.39	7.44	0.57	0.57

Table 5-7. Mineral composition of Indica type rices of different chitosan treatment during growing

Samples	(mg%)										
	Na	Ca	P	K	Fe	Mg	Cu	Mn	Al	Zn	Mg/K
C ¹⁾	17.4	6.5	113.3	69.7	0.8	29.1	0.28	0.92	2.29	1.29	0.42
S ²⁾	15.5	6.0	112.1	69.6	1.3	28.6	0.31	0.96	3.50	1.36	0.41
E ³⁾	21.5	6.6	108.5	67.0	0.7	27.6	0.30	0.90	3.19	1.19	0.41
R ⁴⁾	20.7	6.6	105.3	72.3	0.8	26.0	0.34	0.88	3.14	1.30	0.36
L ⁵⁾	11.5	6.0	109.8	84.5	0.5	28.9	0.37	0.85	1.69	1.06	0.34

¹⁾C: control, ²⁾S: Indica type rice which cropped with chitosan treated in the seed only, ³⁾E: Indica type rice which cropped with chitosan treated in the earing season only, ⁴⁾R: Indica type rice which cropped with chitosan treated in the seed, and both raising seedling and earing season, ⁵⁾L: Indica type rice which cropped with lactic acid treated in the seed only

Table 5-8. Hunter's color values of Indica type rice flour

Samples	L	a	b	ΔE
C ¹⁾	92.67	-2.28	9.36	10.83
S ²⁾	92.23	-2.28	8.97	10.75
E ³⁾	92.18	-2.34	8.41	10.31
R ⁴⁾	92.02	-2.35	8.14	10.18
L ⁵⁾	92.22	-2.33	8.12	10.05

¹⁾C: control, ²⁾S: Indica type rice which cropped with chitosan treated in the seed only, ³⁾E: Indica type rice which cropped with chitosan treated in the earing season only, ⁴⁾R: Indica type rice which cropped with chitosan treated in the seed, and both raising seedling and earing season, ⁵⁾L: Indica type rice which cropped with lactic acid treated in the seed only

쌀가루의 색도는 Table 5-8에 나타내었는데, 대조구에 비하여 키토산 처리 시료가 백색도와 전체적인 색차에 있어 약간 낮은 경향이였다.

7. 키토산이 처리된 쌀의 조리시 물리적 및 관능 특성

키토산 처리에 의하여 재배한 쌀을 조리한 밥의 색도 및 텍스처 특성은 표 5-9와 같다. 밥 자체의 색도는 쌀일 때보다 백색도와 황색도가 현저히 저하되고 있으며, 적색도는 증가하였다. 또한 텍스처에 있어 종자와 출수시 키토산을 처리한 시료가 5092.9g에 비해 4891.1~4999.0g으로 경도가 약간 낮아지고 부착성은 대조구가 -527.6인데 비해 처리 시료에 있어서 -679.6으로 상당히 낮았다. 그러나 탄성과 응집성은 시료간 차이없이 0.32~0.35로 비슷하였다.

Table 5-9. Hunter's color values and texture properties of cooked Indica type rices of different chitosan treatment during growing

Samples	Hunter's color values			Texture properties			
	L	a	b	Hardness (g)	Adhesiveness (g)	Springiness	Cohesiveness
C ¹⁾	74.90	-1.76	0.98	5092.9	-527.6	0.32	0.32
S ²⁾	75.19	-1.76	1.17	4891.1	-568.0	0.32	0.33
E ³⁾	75.02	-1.78	1.31	4999.0	-679.6	0.33	0.34
R ⁴⁾	76.44	-1.68	0.76	5194.7	-616.1	0.34	0.32
L ⁵⁾	75.73	-1.78	1.05	5454.9	-578.6	0.35	0.34

¹⁾C: control, ²⁾S: Indica type rice which cropped with chitosan treated in the seed only, ³⁾E: Indica type rice which cropped with chitosan treated in the earing season only, ⁴⁾R: Indica type rice which cropped with chitosan treated in the seed, and both raising seedling and earing season, ⁵⁾L: Indica type rice which cropped with lactic acid treated in the seed only

밥을 관능적으로 평가하여 통계처리한 결과를 Table 5-10에 나타내었다. 밥의 윤기, 색의 강도, 밥 이외의 냄새, 외관, 냄새, 맛 등의 관능적 특성은 대조구와 키토산을 처리하여 재배한 쌀에 있어서 큰 차이를 보이지 않은 것으로 나타났다. 그러나 밥의 경도, 탄력성, 밥알의 응집성, 부착성 등의 조직감에 관계한 관능적 특성은 대조구보다 키토산 처리를 한 쌀시료가 통계적 유의성은 떨어지지만 좋은 기호도를 보임으로써 약간의 차이점이 있음을 알 수 있었다. 또한 전체적인 기호특성도 대조구에 비하여 키토산이 처리된 쌀밥이 약간의 차이를 보이며 좋은 기호도를 보여 주었다.

Table 5-10. Mean values for sensory attributes of cooked Indica type rices of different chitosan treatment during growing

Sensory attributes samples	Cooked Indica type rice				
	C ¹⁾	S ²⁾	E ³⁾	R ⁴⁾	L ⁵⁾
Glossiness	6.80	6.40	6.76	6.44	6.28
Color	3.75	3.04	2.92	3.04	3.00
Off-flavor	3.04	3.17	2.64	3.04	3.50
Sweet taste	6.14 ^{ab}	6.14 ^{ab}	6.33 ^{ab}	6.55 ^a	5.17 ^b
Hardness***	5.44 ^a	5.56 ^a	5.96 ^a	4.72 ^a	3.08 ^b
Springiness***	5.36 ^a	5.68 ^a	6.08 ^a	5.08 ^a	3.08 ^b
Cohesiveness***	5.04 ^a	5.56 ^a	5.88 ^a	4.68 ^a	3.28 ^b
Adhesiveness***	5.48 ^a	4.96 ^b	4.56 ^b	5.76 ^a	6.68 ^a
Appearance	6.36	6.28	6.24	6.16	5.76
Falvor	6.40	6.36	6.64	6.56	6.71
Taste	5.70	5.96	6.04	6.29	5.00
Texture**	5.60 ^a	6.04 ^a	5.87 ^a	5.72 ^a	4.25 ^b
Overall acceptance*	5.72 ^a	6.00 ^a	5.80 ^a	5.76 ^a	4.36 ^{bb}

¹⁾C: control, ²⁾S: cooked rice which cropped with chitosan treated in the seed only
³⁾E: cooked rice which cropped with chitosan treated in the earing season only,
⁴⁾R: cooked rice which cropped with chitosan treated in the seed, and both raising seedling and earing season, ⁵⁾L: cooked rice which cropped with lactic acid treated in the seed only

* P < 0.05

** P < 0.01

*** P < 0.001

제 4 절 요약 및 결론

1. 정곡 생산량은 종자 및 출수후 키토산 처리구가 대조구보다 117% 정도의 증수를 보였다.
2. 키토산을 종자에 처리한 시료와 육묘, 출수 및 전체 생육단계에 걸쳐 처리한 시료 모두 단백질 함량의 큰 변화는 없었다.
3. 무기질은 종자에 키토산을 처리한 시료에 있어서 Fe, Cu, Mn, Al, Zn의 함량이 대조구에 비하여 높았다. 한편, Mg/K의 비는 대조구와 키토산 처리구간에 큰 차이를 보이지 않았다.
4. 밥의 조직감 분석 결과 키토산 처리구가 대조구에 비하여 경도가 낮고, 부착성은 컷으나 탄성과 응집성은 차이가 없었다.
5. 밥의 관능평가는 종자에 키토산 처리구가 경도, 탄성, 응집성이 대조구에 비하여 좋았고, 전체적인 기호도도 좋게 나타났다.

다산벼의 재배시 키토산을 처리할 경우 117%의 증수효과가 확인되어 식물의 생산성 향상을 위한 다양한 농업용 제재로의 활용이 가능할 것이다. 키토산을 처리한 경우 식미에 영향을 주는 단백질 함량이 큰 차이는 없었으나 경도, 부착성, 탄성에 변화를 주는 효과가 발견되었다. 또한 밥의 관능평가는 전체적인 기호도가 대조구와 비교시 약간 좋은 결과를 보여 키토산 처리를 통한 다산벼 재배시 쌀의 식미를 개선할 수 있을 것으로 판단된다. 따라서 본 연구 결과에서 밝혀진 바와 같이 생육과 쌀의 품질에 큰 영향을 미칠 수 있는 키토산 용액의 희석농도를 100~500배 수준으로 하여 벼재배 실험에 적용하는 지속적인 연구를 실시한다면 다산벼 쌀의 식미개선 향상에 효과적인 결과를 얻을 수 있을 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

1. Hadwiger, L. A., Fristensky, B. and Riggleman, R. C. : *In Chin*, chitosan and related enzymes, Academic press, Orlando, p.291(1984)
2. 穴吹 念 : キチソ, キトサンの 應用, 枝報堂出版, p.1(1988)
3. 福井春雄 : 日本肥料研究會會報, **44**, 43(1984)
4. A.O.A.C. : Official methods of analysis. 15th ed., The Association of Official Analysis Chemists, Washington, D.C.(1990)
5. Okabe, M. : Texture measurement of cooked rice and its relationship to the eating quality, *J. Texture Studies*, **10**, 131(1979)
6. Mossman, A. P., Feller, D. A. and Suzuki, H. : Rice stickiness. I. Determination of rice stickiness with an Instron tester, *Cereal Chem.*, **60**, 286(1983)
7. 박석홍 : 벼 재배환경에 따른 식미관련 화학적 특성 변이,

여 백

Appendix

여 백

Appendix 1. 텍스처 특성 정의 및 평가방법

경도

밥알을 입천정과 혀 사이에 넣고 압착하는데 드는 힘을 많이 필요로 할수록 경도가 강하다.

탄력성

밥알을 입천장과 혀사이에 넣고 부분적으로 누룬후, 떼었을 때 원래상태로 회복되는 정도. 원래의 상태로 돌아오는 정도가 강할수록 탄력성이 강하다.

찰알의 응집성

시료가 파괴되기 전까지 변형되는 정도

변형되는 정도가 적을수록 응집성이 강하다.

예) 같은 힘을 들였을 때 탄력성이 강한 밥에 비해 진밥이 밥알 형태의 변형이 더 많이 되므로 응집성이 강하다.

푸슬푸슬한 밥 < 진밥 < 탄력성이 있는 밥

부착성

혀로 밥덩어리를 낱알낱알로 흩어지게 하는데 드는 힘

낱알낱알로 흩어지게 하는데 힘이 드는 밥은 부착성이 강하다

예) 진밥인 경우 밥알 표면의 부착성이 강하다.

Appendix 2. 밥의 관능평가에 사용된 검사표

이름 :

날짜 : 199 . . .

먼저, 물로 입가심을 하신후, 왼쪽의 시료로부터 평가해 주십시오. 각 항목에 대한 귀하의 의견을 가장 잘 표현한 난에 시료번호를 적어 주십시오.

외관 윤기의 정도 () () () () () () () () () 없음 대단히 강함	외관의 기호도 () () () () () () () () () 대단히 싫다 대단히 좋다
색의 강도 () () () () () () () () () 없음 대단히 강함	
향 밥이외의 냄새강도 () () () () () () () () () 없음 대단히 강함	냄새의 기호도 () () () () () () () () () 대단히 싫다 대단히 좋다
맛 밥 특유의 맛강도 () () () () () () () () () 없음 대단히 강함	맛의 기호도 () () () () () () () () () 대단히 싫다 대단히 좋다
조직감 경도 () () () () () () () () () 없음 대단히 강함	조직감의 기호도 () () () () () () () () () 대단히 싫다 대단히 좋다
탄력성 () () () () () () () () () 없음 대단히 강함	
응집성 () () () () () () () () () 없음 대단히 강함	
전반적인 기호도 () () () () () () () () () 대단히 싫다 대단히 좋다	

J. Food Sci. Nutr.
2(1), 1(1997)

Effect of Molecular Weight and NaCl Concentration on Dilute Solution Properties of Chitosan

Jae-Kwan Hwang[†], Sang-Pill Hong* and Chong-Tai Kim*

Bioproducts Research Center, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea
**Korea Food Research Institute, Kyonggi-do 463-420, Korea*

Reprinted from
Journal of Food Science and Nutrition
Vol. 2, No. 1, p. 1~5(1997)
Copyright©, The Korean Society of Food Science and Nutrition

여 백

Effect of Molecular Weight and NaCl Concentration on Dilute Solution Properties of Chitosan

Jae-Kwan Hwang[†], Sang-Pill Hong* and Chong-Tai Kim*

Bioproducts Research Center, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea
*Korea Food Research Institute, Kyonggi-do 463-420, Korea

Abstract

Solution properties of polyelectrolytic biopolymers such as chitosan, pectin, alginate and etc. are significantly influenced by molecular weight and salt concentrations. The effect of NaCl concentration on the hydrodynamic properties of chitosan in dilute region was investigated for chitosans of varying molecular weights. Intrinsic viscosity ($[\eta]$) of chitosans with 5 different molecular weight was determined by glass capillary viscometer, and the viscosity average molecular weight was calculated using Mark-Houwink equation. Intrinsic viscosity decreased with increasing NaCl concentration for all chitosan samples, and it was proportional to the logarithmic NaCl concentration, i.e., $[\eta] \propto \log(C_{\text{NaCl}})^\alpha$. Decreasing trend of $[\eta]$ with NaCl concentration became more pronounced with increasing molecular weight. It was also found that the α values, indicating C_{NaCl} dependence of $[\eta]$, were linearly correlated with the logarithmic molecular weight ($R^2=0.980$). The chain stiffness parameters (B) were calculated by $B=S/([\eta]_{0.1})^{1.32}$, in which S was obtained from slope of $[\eta]$ vs $I^{-1/2}$. The B values of chitosan samples were determined to be 0.113~0.071 with an average of 0.09.

Key words: chitosan, intrinsic viscosity, rheology, chain stiffness

INTRODUCTION

Chitin is a linear polymer of β -(1 \rightarrow 4)-linked 2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose (GlcNAc). In nature, chitins are widely distributed in the shells of crustacea (crab, shrimp, etc.), in the cuticles of insects (cockroach, silkworm, etc.), in the shells & skeletons of mollusks (krill, squid, etc.) and in the cell walls of fungi (mushroom, baker's yeast, etc.) (1,2). The shells of crab, shrimp and krill, which are now waste materials of the food processing industry, are the main sources of industrial chitin production due to their apparent abundance (3).

Chitosan, which is partially *N*-deacetylated chitin, consists of 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranose (GlcNAc: A-unit) and 2-amino-2-deoxy- β -D-glucopyranose (GlcN: D-unit) residues linked through β -(1 \rightarrow 4) glycosidic linkages and thus may be considered a binary heteropolysaccharide (4,5). The A- and D-units have been shown to be randomly distributed in water-soluble partially *N*-acetylated chitosans (6). Chitosan is positively charged due to amino groups at acidic pH, whose magnitude is dependent on the degree of deacetylation, and it is thus classified as one of polyelectrolytes.

Commercial chitosan is obtained from chitin by heterogeneous alkaline deacetylation, and commercial chitosans usually contain a fraction of acetylated units (F_A) between 0 and 0.2 (5,7). Chitosan is distinguished from chitin by its solubility in dilute aqueous acid solutions (8). Chitosan and their derivatives have found numerous applications in food, biotechnology, pharmacology, medicine and environmental technology during the last two decades (9-11).

Molecular size of polysaccharides is a crucial factor affecting various functional properties (12,13). At low molecular size, depolymerized polysaccharides confer the bifidogenic effect in most cases as oligosaccharides and also provide a wide range of physiological and medical functions (14-16). In contrast, polysaccharides of high molecular weight act as thickening and gelling agents, and in the case of non-starch polymers the physiological roles can be anticipated as dietary fiber sources (17-19). This indicates that various food and physiological functions of polysaccharides greatly depend on the molecular weight of polysaccharides. Thus, the accurate characterization of molecular weight dependence on functional properties is of primary impor-

[†]Corresponding author

tance to find a wide range of application of polysaccharides.

Natural polyelectrolytes include multi-charged functional groups such as carboxyl(pectin, alginate), sulfate (carrageenan) or amino(chitosan) groups. In charged state, the anionic or cationic functional groups in biopolymers impart the intramolecular electric repulsive force, which results in increasing the hydrodynamic volume by the extended chain conformation(20,21). However, in the presence of salt the charged groups are screened, and thus the chain rather possesses compact structure, leading to the decreased hydrodynamic volume. In addition, the charge density of polyelectrolytes is greatly dependent on pH. Thus, understanding the effects of salt concentration and pH is crucial to optimize the functional properties of polyelectrolytic biopolymers.

To date only a few studies have been conducted on solutions properties of chitosan in dilute and concentrated domains(3,22,23). To our knowledge, however, no attempts have been made to systematically investigate solution properties considering the molecular size of chitosans in the presence of various salt concentrations. Accordingly, this research aims to investigate the effects of NaCl concentration on the hydrodynamic properties of chitosan in dilute region representing the polymer concentration below physical intermolecular contact. In addition, we also studied how much the molecular size of chitosan affects the molecular response of chitosan in the presence of NaCl.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of chitosans

Three major steps, i.e., demineralization, deproteinization and deacetylation are required to prepare chitosans from chitinous raw materials(7). In this research,

chitosan samples of 5 different molecular weights were prepared according to the procedures shown in Table 1. First, chitin was prepared by treating *Chitinonecetes opilio* with 5~15% HCl at 30~50°C for 3~24hr(demineralization) and subsequently with 5% NaOH at 90°C for 12hr(deproteinization). Then, chitin was treated with 40~60% NaOH at 70~140°C for 6~48hr to remove the acetyl residues(deacetylation).

Determination of intrinsic viscosity

The intrinsic viscosity of chitosan was measured by Cannon-Fenske glass capillary viscometer(Cannon Instrument Co., USA; size 50) at 25°C. A certain amount of chitosan was dissolved in 0.05, 0.1, 0.2, 0.3M NaCl/0.1M CH₃COOH solution. The chitosan solutions were filtered through a 0.45µm Millipore filter to get rid of dusts and insoluble impurities. Then, 10ml solution was pipetted into the capillary viscometer, which was equilibrated at 25°C water bath for 30min prior to measurements.

Specific viscosity(η_{sp}) and intrinsic viscosity($[\eta]$) were determined as follows(24):

$$\eta_{sp} = (\eta - \eta_s) / \eta_s \quad (1)$$

and

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \eta_{sp} / C \quad (2)$$

where η is the solution viscosity, η_s is the solvent viscosity, and C is the solution concentration.

Determination of molecular weight

Molecular weight of chitosan was calculated by the following Mark-Houwink equation in 0.2M NaCl/0.1M acetic acid(25):

$$[\eta] = 1.81 \times 10^{-3} M_v^{0.93} \quad (3)$$

Table 1. Preparation of chitosans with various molecular weights

Samples	HCl (demineralization)			NaOH (deproteinization)			NaOH (deacetylation)		
	Conc.(%)	Temp.(°C)	Time(hr)	Conc.(%)	Temp.(°C)	Time(hr)	Conc.(%)	Temp.(°C)	Time(hr)
CTS-1	3	30	3	5	90	12	40	70	6
CTS-2	5	30	6	5	90	12	50	100	12
CTS-3	10	30	12	5	90	12	60	110	24
CTS-4	10	40	12	5	90	12	60	130	36
CTS-5	15	50	24	5	90	12	60	140	48

where $[\eta]$ is the intrinsic viscosity(ml/g), and M_v is the viscosity average molecular weight.

RESULTS AND DISCUSSION

Table 2 shows the intrinsic viscosity of chitosans at 0~300mM NaCl concentrations in conjunction with the viscosity average molecular weight calculated from Eq. 2 at 0.2M NaCl/0.1M CH_3COOH . The intrinsic viscosity of chitosans significantly decreased with increasing NaCl concentration regardless of molecular weight of chitosans. This can be attributable to the screening effects of sodium ions for the cationic charges of chitosans(23). Due to the reduced electrostatic repulsive force, chitosan molecules are changed from the extended structure to the more compact one. This results in decreasing the intrinsic viscosity($[\eta]$), representing the hydrodynamic volume of a polymer per unit mass. The similar observations were also reported for anionic polysaccharides such as alginate, pectin and etc.(21,26).

Relations between NaCl concentration and intrinsic viscosity of chitosans are demonstrated in Fig. 1. The intrinsic viscosity of chitosans exhibited the linear relation with logarithmic NaCl concentration as follows:

$$[\eta] \propto \log(C_{\text{NaCl}})^\alpha \quad (4)$$

where C_{NaCl} is the NaCl concentration(mM), and α is the constant. Table 3 exhibits α values and correlation coefficients for chitosan samples. The α values, representing the slopes of $[\eta]$ vs $\log(C_{\text{NaCl}})$, increase with molecular weight of chitosans. This indicates that chitosans with higher molecular weight shows the greater reduction in intrinsic viscosity as the NaCl concentration increases. As shown in Fig. 2, the linear correlation

Table 2. Intrinsic viscosity and molecular weight of chitosans as a function of NaCl concentration

NaCl (mM)	Intrinsic viscosity(dl/g)				
	CTS-1	CTS-2	CTS-3	CTS-4	CTS-5
0	59.760	39.075	6.729	3.998	3.045
50	16.736	8.966	1.949	0.938	0.908
100	14.536	7.074	1.736	0.890	0.848
200	11.342	6.009	1.634	0.812	0.780
300	10.644	4.785	1.389	0.762	0.699
$M_v(\times 10^{-4})^a$	170.98	86.36	21.29	10.04	9.61

^a $M_v = (552.49 \times [\eta])^{1.0752}$ at 0.2M NaCl/0.1M CH_3COOH ($[\eta]$: ml/g)

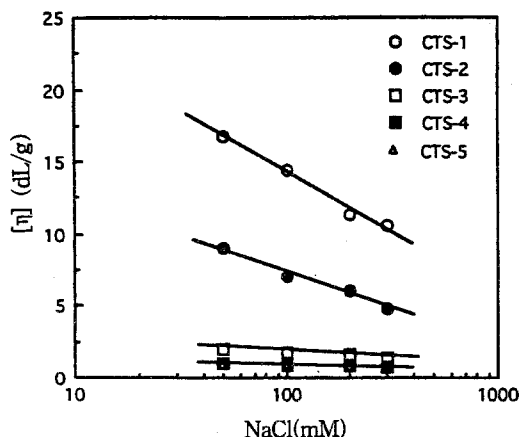


Fig. 1. Intrinsic viscosity of chitosan samples at different NaCl concentrations.

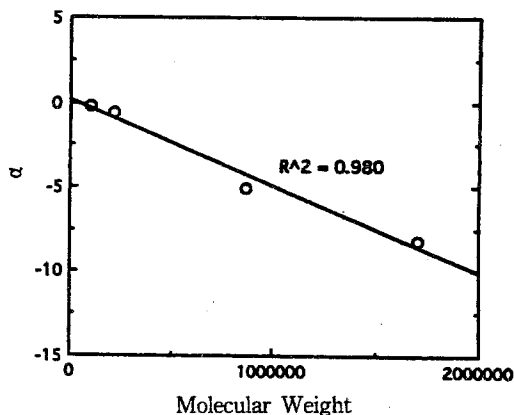


Fig. 2. Correlation of molecular weight and α values of $[\eta] \log(C_{\text{NaCl}})^\alpha$.

($R^2=0.980$) was observed between the logarithmic molecular weights of chitosans and α values obtained from Eq. 4.

For polyelectrolytes as typically exemplified by chitosan

Table 3. Correlation of NaCl concentration and intrinsic viscosity

Samples	α^a	R^2
CTS-1	-8.17	0.987
CTS-2	-5.14	0.986
CTS-3	-0.66	0.954
CTS-4	-0.26	0.985
CTS-5	-0.23	0.967

^a $[\eta] \propto \log(C_{\text{NaCl}})^\alpha$

in this research, the important source of coil expansion is segment-segment electrostatic repulsive expansion (27). The more expanded structure can impart the higher intrinsic viscosity. It has been well documented that the intrinsic viscosity decreases almost linearly with the square root of ionic strength as follows(28):

$$[\eta] = A + S I^{-1/2} \quad (5)$$

where A is the constants, I is the ionic strength, and S is the slope of intrinsic viscosity vs $I^{-1/2}$. As shown in Fig. 3, the plot of intrinsic viscosity as a function of $I^{-1/2}$ exhibited straight lines, in which the slopes increased with increasing molecular weights. This indicates that the intrinsic viscosity is more significantly influenced at higher molecular size in the presence of salts.

The magnitude of change in intrinsic viscosity in response to ionic strength increases with increasing flexibility of the polyelectrolyte chain. Smithrød and Haug (29) employed $I=0.1M$ as a reference value to develop a simple method for characterizing chain flexibility without the necessity to prepare samples with different molecular weights. In this case, Eq. 5 can be expressed as follows:

$$[\eta] = A + B([\eta]_{0.1})^\beta I^{-1/2} \quad (6)$$

From Eqs. 5 and 6,

$$S = B([\eta]_{0.1})^\beta \quad (7)$$

where the constant B is a measure of chain stiffness(29): the smaller the B value, the higher the chain stiffness.

$$\log S = \log B + \beta \log([\eta]_{0.1}) \quad (8)$$

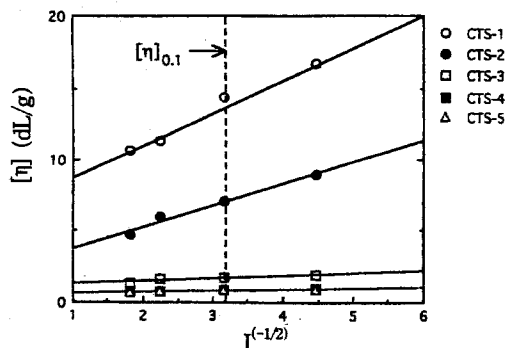


Fig. 3. Ionic strength dependence of intrinsic viscosity for chitosans of different molecular weight.

Table 4. Chain stiffness parameters(B) of chitosans

Samples	B
CTS-1	0.071
CTS-2	0.113
CTS-3	0.091
CTS-4	0.085
CTS-5	0.081
Average	0.088

The slope (S) obtained from Fig. 3 is demonstrated in Fig. 4 as a function of the intrinsic viscosity at $I=0.1M$ on the double logarithmic coordinates, in which the slope was determined to be 1.32. This result is nearly consistent with the report of 1.3 ± 0.1 for polyelectrolytic polysaccharides such as alginate, carboxymethyl cellulose(CMC) and carboxymethyl amylose(29). The chain stiffness parameter(B), calculated from $B = S/([\eta]_{0.1})^{1.32}$, are presented in Table 4. The B values ranged 0.07~0.12, and averaged 0.09. Essentially, cellulose constitutes the backbone of carboxymethyl cellulose and xanthan as well as chitosan(30). The B values of CMC and xanthan were reported to be 0.05 and 0.005, respectively(31), which thus indicate that the chain stiffness is higher than 0.09 of chitosan. This indicates that the carboxymethyl groups of CMC and trisaccharide sidechains of xanthan provide the more rigid conformation for the cellulose backbone. When compared to CMC and xanthan, the more flexible conformation of chitosan can be ascribed to the less bulky amino groups which relatively impart insignificant hindrance to the chitosan molecule. However, the distinct correlation be-

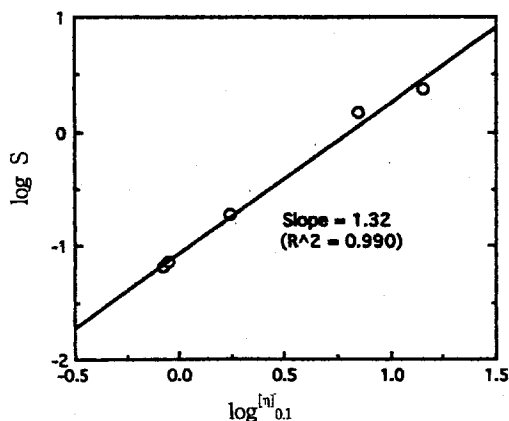


Fig. 4. Dependence of S values on intrinsic viscosity of chitosans at $I=0.1M$.

tween molecular weights and B values was not clearly observed in this research. Further studies may be necessary to elucidate the effect of molecular weight on the chain stiffness in terms of molecular weight distribution as well as absolute molecular weight.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Agriculture, Forestry and Fishery Special Grant from the Ministry of Agriculture in Korea(Project No. 195165-2).

REFERENCES

- Knorr, D. : Use of chitinous polymers in food. *Food Technol.*, **38**, 85(1984)
- Hirano, S., Sato, N., Yoshida, S. and Kitagawa, S. : Chemical modification of chitin and chitosan, and their novel modification. In "*Industrial polysaccharides*" Yalpani, M. (ed.), Elsevier, New York, p.163(1987)
- Rinaudo, M. and Domard, A. : *Chitin and chitosan*. Proceedings of the 4th International Conference on Chitin and Chitosan, p.71(1988)
- Nordtveit, R. J., Vårum, K. M. and Smidsrød, O. : Degradation of fully water-soluble, partially N-acetylated chitosans with lysozyme. *Carbohydr. Polym.*, **23**, 253(1994)
- Vårum, K. M., Ottøy, M. H. and Smidsrød, O. : Water-solubility of partially N-acetylated chitosans as a function of pH: effect of chemical composition and depolymerization. *Carbohydr. Polym.*, **25**, 65(1994)
- Vårum, K. M., Anthonsen, M. W., Grasdalen, H. and Smidsrød, O. : Determination of the degree of N-acetyl groups in partially N-acetylated chitin(chitosans) by high fields n.m.r. spectroscopy. *Carbohydr. Res.*, **217**, 19(1994)
- No, H. K., Meyers, S. P. and Lee, K. S. : Isolation and characterization of chitin from craw fish shell waste. *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 575(1989)
- Roberts, G. A. : *Chitin chemistry*. Macmillan, Hong Kong, p.116(1992)
- Tikhonov, V. E., Radigina, L. A. and Yamskov, Y. A. : Metal-chelating chitin derivatives via reaction of chitosan with nitrilotriacetic acid. *Carbohydr. Res.*, **290**, 33(1996)
- Peter, M. G. : Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. *J.M.S.-Pure Appl. Chem.*, **A32**, 629(1995)
- Muzzarelli, R. A. A. : Chitosan-based dietary foods. *Carbohydr. Polym.*, **29**, 309(1996)
- Clark, A. H. and Ross-Murphy, S. B. : Structural and mechanical properties of biopolymer gels. *Adv. Polym Sci.*, **87**, 57(1987)
- Singh, S. K. and Jacobsson, S. P. : Kinetics of acid hydrolysis of κ -carrageenan as determined by molecular weight(SEC-MALLS-RD), gel breaking strength, and viscosity measurements. *Carbohydr. Polym.*, **23**, 89(1994)
- Yaeshima, T. : Benefits of bifidobacteria to human health. *Bulletin of IDF*, **313**, 36(1996)
- Crittenden, R. G. and Playne, M. J. : Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Tren. Food Sci. Technol.*, **7**, 353(1996)
- Delzenne, N. M. and Roberfroid, M. R. : Physiological effects of non-digestible oligosaccharides. *Lebensm. Wiss. Technol.*, **27**, 1(1994)
- Stephan, A. M. : *Food polysaccharides and their applications*. Marcel Dekker, Inc., New York(1995)
- Asai, I., Omoto, T. and Koda, H. : Forming physical property in food with polysaccharides. *J. Appl. Glycosci.*, **43**, 385(1996)
- Dziedzic, J. D. : A focus on gums. *Food Technol.*, **45**, 116(1991)
- Launay, B., Doublier, J. L. and Cuvelier, G. : Flow properties of aqueous solutions and dispersions of polysaccharides. In "*Functional properties of food macromolecules*" Mitchell, J. R. and Ledward, D. A.(eds.), Elsevier Applied Science Publishers, New York, p.12(1986)
- Doublier, J. L. and Cuvelier, G. : Gums and hydrocolloids : functional aspects. In "*Carbohydrates in food*" Eliasson, A. C.(ed.), Marcel Dekker, Inc., New York, p.291(1996)
- Wang, W. and Xu, D. : Viscosity and flow properties of concentrated solutions of chitosan with different degrees of deacetylation. *Int. J. Biol. Macromol.*, **16**, 149(1994)
- Chen, R. H., Lin, W. C. and Lin, J. H. : Effects of pH, ionic strength, and type of anion on the rheological properties of chitosan solutions. *Acta Polymer*, **45**, 41(1994)
- Hwang, J. K. and Kokini, J. L. : Contribution of the side branches to rheological properties of pectins. *Carbohydr. Polym.*, **19**, 41(1992)
- Roberts, G. A. F. and Domszy, J. G. : Determination of the viscometric constants for chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.*, **4**, 374(1982)
- Moe, S. T., Draget, K. I., Skjåk-Brak, G. and Smithrød, O. : Alginates. In "*Food polysaccharides and their applications*" Stephan, A. M.(ed.), Marcel Dekker, Inc., New York, p.259(1995)
- Fixman, M. : Polyelectrolytes: a fuzzy sphere model. *J. Chem. Phys.*, **41**, 3772(1964)
- Morris, E. R. and Ross-Murphy, S. B. : Chain flexibility of polysaccharides and glycoproteins from viscosity measurements. *Tech. Carbohydr. Metabol.*, **B310**, 1(1981)
- Smithrød, D. and Haug, A. : Estimation of the relative stiffness of the molecular chain in polyelectrolytes from measurements of viscosity at different ionic strengths. *Biopolymers*, **12**, 1213(1971)
- Hwang, J. K. and Kokini, J. L. : Structure and rheological properties of side branches of carbohydrate polymers. *J. Tex. Stud.*, **22**, 123(1991)
- Sinsky, A., Jamas, S., Easson, D. and Rha, C. K. : Biopolymers and modified polysaccharides. In "*Biotechnology in food processing*" Harlander, S. K. and Labuza, T. P. (eds.), Noyes, Pub., New Jersey, p.82(1986)

(Received December 20, 1996)