

키토산 올리고당의 연속적 생산 및 생리 활성

김 세 권

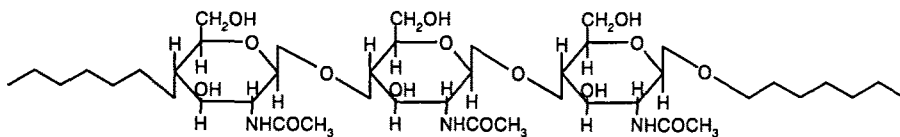
(부경대학교)

키토산 올리고당의 연속적 생산 및 생리 활성

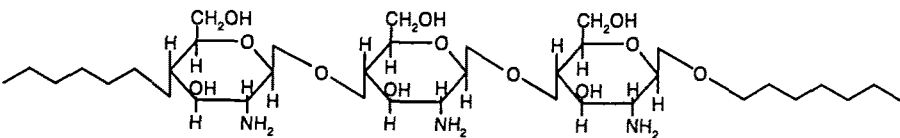
김세권
부경대학교 화학과

I. 서론

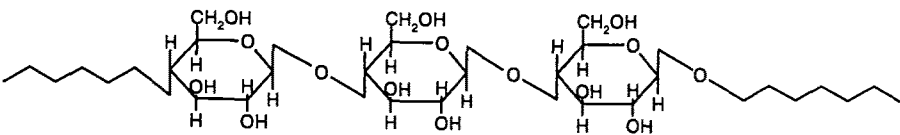
키토인은 N-아세틸글루코사민 (acetylglucosamine, GlcNAc)이 β -1,4 결합한 다당류로서 게나 새우 등의 갑각류 껍질, 곤충의 외골격, 버섯이나 균류의 세포벽에 단백질과 복합체로서 함유되어 있으며, 식물계에서는 셀룰로오스와 같이 생물체의 지지나 보호의 역할을 담당하고 있다. 키토인은 지구상에서 연간 약 1,000억톤 정도로 생산되고 있으며, 현존하는 최후의 생물자원이라고 할 수 있다. 키토산은 키토인을 강알칼리로 탈아세틸화 (deacetylation)시켜 얻을 수 있으며, D-글루코사민 (GlcN)이 β -1,4 결합한 구조를 가지고 있다 (Fig. 1).



Chitin



Chitosan



Cellulose

Fig. 1. Chemical structures of chitin, chitosan and cellulose.

Table 1. Chemical properties and their applications of chitin and chitosan

Item	Chitin	Chitosan
Chemical properties	Polymer of N-acetyl glucosamine Many H-bond Insolubility Lower reactivity	Polymer of glucosamine Linear polycation Reactive amino group Reactive hydroxy group Soluble in acidic solutions
Medical materials	Artificial skin Absorbable surgical suture	
Polymer materials		Heavy metal adsorption agent
Biotechnology	Enzyme immobilization	Immobilization of enzyme and cell
Food		Antimicrobial agent Antifungal agent Dietary fiber Film
Pharmaceutical	Wound healing accelerator Immune system stimulant Antitumor agent	Wound healing accelerator Drug delivery vehicle Cholesterol reducing agent Immune system stimulant Antitumor agent
Agriculture		Seed coating Animal feed
The others	Preparing to chitosan	Excellent flocculent Substantive to hair, skin Moisture retention

키티ن·키티산의 이용은 해양 생물자원의 유효이용이 주목을 받은 이후 급속히 발전하였으며, 그 응용분야로는 공업용 재료로서 폐수처리제 혹은 중금속흡착제 (1), 생물공학적 재료로서 효소고정화용 담체, 크로마토그래피용 수지 및 기능성막(2), 농업용 재료로서 병충해 예방제 (3), 의료용 재료로서 인공피부 (4) 등 대부분 고분자물질로서 이용되어 왔다. 그러나 최근 10여년 전부터 키티ن·키티산 및 그 유도체가 면역증강 및 부활작용에 의한 항암활성 (5,6), 항균활성 (7-9), 체내 콜레스테롤 개선작용 (10), 고혈압 억제작용 (11,12), 칼슘흡수촉진 작용 (13) 및 항산화작용 (14) 등 여러 가지 생리활성을 가지고 있다는 사실이 밝혀짐으로써 현재 생리기능성 신소재로서 연구개발이 활발히 진행되고 있다 (Table 1).

그런데 키티ن·키티산은 자체로서 대단히 고분자물질이고, 또한 셀룰로오스나 카라기난과 같이 사람의 위장관 (gastrointestinal tract)에서 소화흡수되지 못한다. 즉 사람의 위장관에서는 β -1,4 글리코시드 결합 (glycosidic linkage)을 분해할 수 있는 효소가 존재하지 않는다 (15). 따라서 키티ن·키티산을 생

체내에서 생리활성 물질로 이용하기 위해서는 생체내에서 흡수가 가능한 올리고당으로 만들 필요가 있다.

본고에서는 게나 새우와 같은 갑각류의 껍질로부터 키틴·키토산을 효율적으로 생산하는 방법 및 그들로부터 최근 더욱더 관심이 증폭되고 있는 키토산 올리고당의 연속적 생산 및 그의 생리 기능성에 대하여 소개하고자 한다.

II. 키토산의 생산

산업적으로 이용되고 있는 키틴과 그 탈아세틸화 형태의 키토산은 거의 대부분 게, 새우, 가재 및 크릴 등 갑각류의 껍질 (건조물 기준으로 약 20~30%의 키틴질 함유)로부터 추출하고 있다. 이들 갑각류로부터 매년 지구상에서 폐기되고 있는 껍질의 양은 1,440천 톤 (건조물 기준) 정도로 추산되고 있으며, 이 정도의 양은 현재 전세계적으로 필요로 하는 250~500천 톤의 물량을 충분히 공급할 수 있다 (16).

갑각류 껍질은 주로 단백질 (30~40%), 탄산칼슘 (30~50%), 키틴질 (20~30%) 및 소량의 색소 등으로 구성되어 있다. 이들로부터 키틴을 분리하기 위해서는 반드시 탈단백 (deproteination) 및 탈회 (demineralization)공정을 거쳐야 하며, 생산된 키틴으로부터 탈아세틸화 후 키토산이 제조된다 (Fig. 2).

탈단백공정은 껍질에 존재하는 단백질을 제거하기 위하여 껍질을 잘 마쇄한 후, 묽은 NaOH 용액 (1~10%)에 담구어 온도를 서서히 가온 (65~100°C)하는 것이다. Hackman (17)은 1N NaOH로 100°C, Anderson 등 (18)은 3.5% NaOH로 90~95°C, 그리고 Brzeski (19)는 10% NaOH로 상온에서 수행하는 방법을 제시하였으며, 반응시간은 대개 30분에서 12시간 정도이다. 그러나, 일반적으로는 원하는 키틴의 품질 (탈아세틸화도의 정도)에 따라 알칼리 농도, 사용시간 및 온도를 선택하여야 한다. 탈단백 공정은 강알칼리 (화학제품)처리 외에도 효소분해에 의한 방법 (20, 21)이 있는데, 효소처리에 의한 방법은 환경오염을 유발하지 않는 장점이 있는 반면 원하는 키틴 제품을 만들기 어렵다.

탈회공정은 상온에서 10% 이상의 염산 수용액을 이용하여 탄산칼슘을 염화칼슘으로 분해하여 제거하는 것을 말한다. 이외에도 Horowitz 등 (22)과 Synowiecki 등 (23)은 탄산칼슘을 제거하기 위하여 상온에서 각각 90% formic acid와 22% HCl을 사용하였으나, Whistler과 Bemiller (24)은 다소 특이하게 -20°C에서 39% HCl을 사용하였다. 그러나 사용되는 용액의 산도가 높을수록 키틴의 분자량 저하 및 탈아세틸화가 발생할 가능성이 높기 때문에 이를 피하기 위해서는 ethylenediaminetetra-acetic acid와 같은 산도가 약한 용액을 사용하는 방법 (25)과 온화한 조건에서 여러 차례 반복하여 실시하는 방법이 있다. 탈회시간은 일반적으로 2~3시간 교반하면 충분하지만, 30분이나 몇 일에 걸쳐서 하는 경우도 있다.

갑각류 껍질에 함유되어 있는 색소는 산-알칼리 처리만으로는 키틴의 제품에 남아 있을 가능성이 높다. 따라서 에탄올, 에테르, 과염소산나트륨용액 (0.5% chlorine 함유), 아세톤, 클로로포름, 과산화수소, 에틸아세테이트 등을 사용하여 제거할 수 있다. 이러한 처리를 한 후의 키틴제품은 진한 핑크색에서 흰색으로 바뀌게 된다.

키틴으로부터 키토산을 제조하기 위해서는 키틴의 N-아세틸기를 제거해야 하는데, 이는 강알칼리 (40~50%의 NaOH 혹은 KOH) 및 약 100°C 이상 온도조건 하에서 수행한다. 탈아세틸화에 영향을 미치는 중요한 요소로서는 알칼리의 농도, 반응온도, 반응시간, 키틴의 입자크기나 밀도 등이며, 생산된 키토산이 묽은 산성용액에 잘 녹기 위해서는 탈아세틸화가 충분히 일어나야 한다. 만약, 50%의 NaOH로

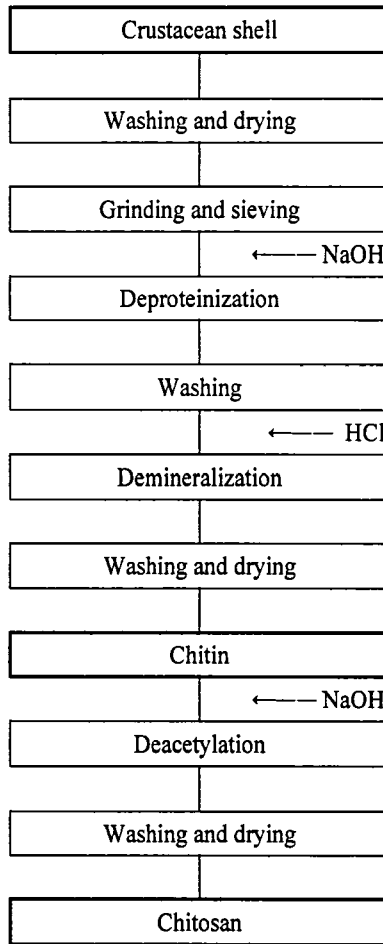


Fig. 2. Flow diagram of the processing for production of chitin and chitosan.

산가용성 키토산을 제조한다면, 10 g의 키틴에 대하여 NaOH 용액 560 ml를 사용하여 하루동안 반응시킴으로써 가능하며, 420 ml를 사용하였을 때는 2일동안, 280 ml를 사용시 3일, 그리고 140 ml일 때는 6일간 반응이 필요하다 (26). Wu와 Bough (27)는 100°C에서 50% NaOH 용액으로 최초 1시간 반응시킴으로써 약 68%가 탈아세틸화되었으며, 그 이후 5시간의 반응에서 단지 78%만이 탈아세틸화되었으므로 반응시간이 2시간 경과한 후에는 탈아세틸화가 크게 진전되지 않고 오히려 분자량의 감소를 일으킬 가능성이 높다. 그리고 알칼리 농도가 낮을수록 키토산의 점도나 분자량의 감소폭은 작지만 너무 조건이 온화하게 되면 약산용액에도 녹지 않을 경우가 있다. 따라서 알칼리 용액의 농도를 감소시키면 반응시간의 증가가 필요하며, 점도에 대한 영향은 덜 받게 된다. 알칼리 용액의 농도를 높게 되면 탈아세틸화도와 점도에 영향을 좀 더 많이 받게 되고, 반응시간을 증가시킬수록 탈아세틸화도의 증가와 분자량의 감소를 일으킨다. Alimuniar와 Zainuddin (26)는 상온에서 30~65% NaOH로 키토산을 제조할 때, 50% NaOH의 경우 6일, 55% NaOH의 경우 5일, 60%와 65% NaOH의 경우 4일동안 반응을 시킴으로써 가능하다고 보고한 바 있다. 최근에, Pelletier 등 (28)은 키틴의 탈아세틸화반응에 thermo-mechano-

chemical 기술을 도입하여 10% NaOH로 4°C에서 24시간 반응으로 거의 완벽한 탈아세틸화를 실현하였다.

Ⅲ. 키토산 올리고당의 생산

1. 산가수분해에 의한 키토산 올리고당의 제조

산가수분해법에 의한 키토산 올리고당의 제조는 1957년 Horowitz 등 (29)에 의해 처음으로 수행되었다. 키토산의 산가수분해에서도 키토신의 경우와 마찬가지로 낮은 생리활성 물질인 저분자 올리고당 및 단당의 생성은 피할 수 없다. 따라서 높은 수율과 고중합도 올리고당의 효율적인 생산을 위한 최적 조건의 검토가 필요하다.

키토신의 가수분해액으로부터 각각의 올리고당을 회수하는 데에는 활성탄 칼럼이 광범위하게 이용되고 있다. 이 방법은 활성탄이 올리고당을 특이적으로 흡착하고 또 단당이나 중화에 의해서 생성된 염을 흡착하지 않은 특성을 갖고 있기 때문이며, 용출시킬 때에는 50% 에탄올을 이용한다. 올리고당의 분리 정제에는 0→50% 에탄올 농도구배에 의해 GlcNAc₂~GlcNAc₇을 순차적으로 용출된다. 그리고 올리고당의 검출은 아세틸기에 의한 210 nm 흡광도법으로 측정할 수 있다. GlcNAc₂와 GlcNAc₃는 약 10%, GlcNAc₄와 GlcNAc₅는 5~10%, GlcNAc₆와 GlcNAc₇은 3~5%의 수율로 키토신에서 얻을 수가 있다. 얻어진 올리고당을 HPLC에 의해 순도를 분석해 보면 중합도가 높을수록 순도가 떨어지며, GlcNAc₇의 경우에는 순도가 50% 이하로 매우 낮기 때문에 고순도의 올리고당을 조제하기 위해서는 겔여과법이나 분취용 HPLC를 사용하면 가능하다. 또한 키토신의 가수분해 후 중화에 의해 생성된 염을 제거하기 위해서는 이온교환막 전기투석장치를 이용할 경우 가능하며, 공업적인 생산에도 적용할 수 있다.

2. 효소분해에 의한 키토산 올리고당의 제조

키토산을 가수분해하는 대표적인 효소인 chitosanase는 토양 미생물과 몇몇 식물에 널리 분포하고 있으며, 특히 식물에서는 병원성 곰팡이에 대한 방어수단에 관여하고 있다.

Chitosanase는 추출된 개체나 종에 따라서 가수분해 작용 패턴이 서로 다르며, 그것은 사용된 기질의 아세틸화도에 따라 결정된다. 지금까지 문헌에서 보고된 chitosanase들은 endo형이 대부분이며, 이것은 가수분해물로서 dimer, trimer, tetramer 등의 키토산 올리고당을 생산한다. Nanjo 등 (30)은 *Nocardia orientalis*의 배양액으로부터 새로운 형태의 exo형 chitosanase (키토산 혹은 그 올리고당의 비환원형 말단으로부터 glucosamine 단당류만을 유리시킴)를 분리하여, exo-β-D-glucosaminidase로서의 특성을 밝혔다.

또한 여러 가지 종에서 유래된 chitosanase의 서로 다른 가수분해 작용 패턴을 나타내었다. 이것은 앞에서 서술하였듯이 기질의 키토산의 중합도와 아세틸화도에 따라 크게 의존하고 있다는 것을 나타낸다. 지금까지 보고된 대부분의 chitosanase들은 endo형의 작용패턴을 가지는 것들을 중심으로 개발되어져 왔다. 이들 효소에 의한 키토산의 가수분해는 단당류의 생성이 없이 dimer, trimer, tetramer를 비롯한 각종 분자량의 올리고당을 생산하기 때문에 키토산 올리고당의 생리활성 측면에서 볼 때,

chitosanase의 작용패턴은 상당히 중요하게 다루어져야 한다.

Chitosanase의 가수분해율과 키토산의 아세틸화도의 관계에 관한 보고로서, *Bacillus circulans* MH K-1 (31)과 *Streptomyces* N-174 (32) 유래 chitosanase들은 비교적 넓은 범위의 아세틸화도를 가진 키토산 기질에도 효율적으로 가수분해반응을 촉매하는 것으로 알려져 있다. 반대로, *F. solani* (33)와 *N. orientalis* (34) 유래 chitosanase들은 30% 아세틸화도를 가지고 있는 키토산에서단 그리고 *Enterobacter* G-1 효소는 20% 아세틸화도의 키토산에서만 각각 최적활성을 보인다 (35). *Bacillus licheniformis* UTK의 chitosanase는 65~80% 탈아세틸화된 키토산에서 최적활성을 나타낸다 (36). *P. islandicum* 유래 chitosanase의 가수분해작용에 의해 생성된 올리고당은 그 환원말단 부분에 N-아세틸글루코사민 (GlcNAc)을 가지고 있는 dimer 혹은 trimer가 주성분인 특징을 가지고 있다. 이 효소는 키토산의 N-아세틸글루코사민과 글루코사민 사이를 특징적으로 분해한다는 것을 의미하고 있다. 그렇게 때문에 50%의 아세틸화도를 가진 키토산에서 이 효소는 최적활성을 나타내고 있다 (37).

Sakai 등 (38)은 *Bacillus* R-4에서 분리한 chitosanase를 이용하여 키토산 올리고당을 생산하기 위하여 80%와 100% 탈아세틸화된 키토산을 가수분해시킨 결과, 80% 탈아세틸화 키토산은 100% 탈아세틸화 키토산에 비해 명확하게 분해율이 낮았다고 하였다. Uchida 등 (39)은 *Bacillus* sp. No-7M 유래 정제 chitosanase (52.5 U)를 이용하여 효소분해에 의해 중합도 2~5의 키토산 올리고당을 높은 수율로 얻기 위하여, 5% 키토산 유산용액 (pH 5.4) 50 ml에 chitosanase 52.5 U를 첨가하여 37°C에서 6시간 반응을 시켰을 때, 반응시간의 경과에 따른 생성된 올리고당의 조성은 1시간 반응에서는 GlcN₃~GlcN₆였으나, 그 이상 시간이 경과할 수록은 GlcN₅ 이상의 올리고당은 감소하는 반면에 GlcN₂~GlcN₄의 올리고당은 점차 증가하였고 보고하였다.

한편, 셀룰로오스와 키토산은 글루코오스의 C-2 위치에 수산기와 아미노기의 차이를 제외하고는 상당히 유사한 화학구조를 가지고 있기 때문에 셀룰로오스를 가수분해하는 효소인 cellulase를 이용하여 키토산을 가수분해하여 키토산 저분자화 물질 내지 올리고당을 생산하고 있다 (40).

현재, 키토산 올리고당을 생산하는데 있어서 가장 초점이 되는 부분은 효소적 가수분해로 생리활성이 우수한 고중합도 올리고당 (pentamer 이상)만을 특이적으로 생산하는 효소의 개발이다. 키토산 올리고당은 몇몇 chitinase (41)와 lysozyme (42)을 이용하여 당전이반응으로 고중합도 키토산 올리고당을 생산할 수 있으나, 키토산 올리고당의 생산에서는 아직 이러한 효소가 개발되지 못하였다. 그러나 키토산에 비하여 키토산은 산성영역의 수용액에서 녹기 때문에 대량 생산이 가능하다. 이에 대한 연구로서 Yamasaki 등 (35)과 Jeon 등 (43)은 고정화 효소를 이용하여 키토산 가수분해물을 생산하였으며, 특히 Jeon 등은 *Bacillus pumilus* 유래 chitosanase를 키토산에 물리적 흡착법으로 제조한 고정화 효소가 유리 효소에 비하여 90% 이상의 높은 활성을 유지하고 있음을 확인하고, 이것을 이용하여 키토산 올리고당을 대량으로 생산하는데 이용하였다.

또한, Jeon과 Kim (43,44)은 효소적 가수분해에 의한 키토산 올리고당의 생산을 산업적으로 적용시켰을 때, 대량으로 소모되는 효소의 높은 생산비용을 절감하기 위하여 효소의 재이용을 위한 새로운 생산 시스템의 개발을 시도하였다. 이를 위하여 최근 식품공정에서 크게 각광을 받고 있는 한외여과막을 생물반응기와 결합시킨 한외여과막 효소반응기를 키토산 올리고당의 생산에 적용시켰다. 그런데 이러한 시스템에서 발생한 한가지 문제점은 키토산의 높은 점성으로 인하여 일어난 막의 fouling현상인

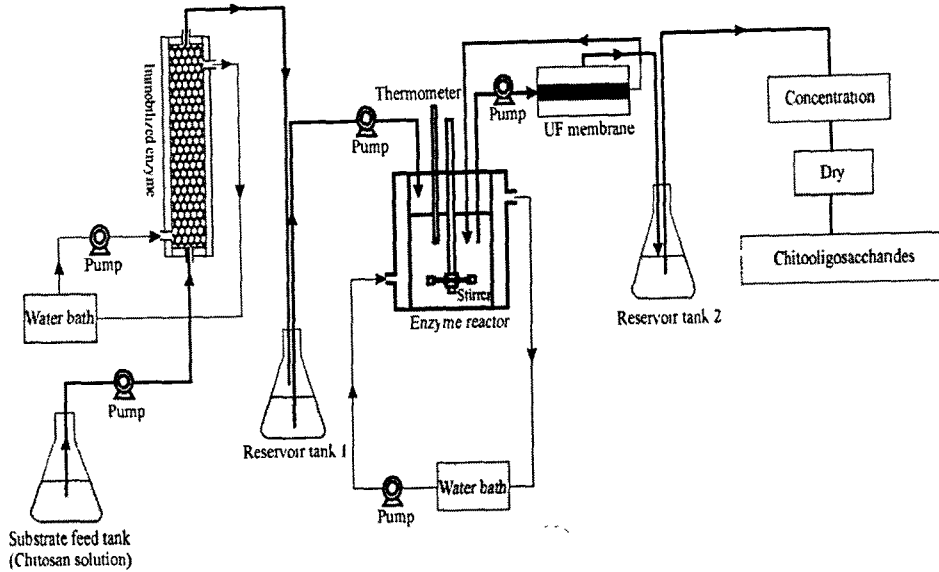


Fig. 3. Preparation of oligosaccharides from chitosan.

데, 이를 보완하고자 고정화효소가 충전된 칼럼반응기를 이용하여 일차적으로 키토산을 저분자화하여 키토산의 점성을 대폭적으로 감소시킨 후 한외여과막 반응기가 도입된 자동화 연속식 생산공정 시스템 (Fig. 3)에 적용시킨 결과, 연속적이면서도 대량으로 키토산 올리고당의 생산이 가능하게 되었다. 이 시스템의 장점은 사용하는 막의 종류에 따라 원하는 분자량의 키토산 올리고당을 생산할 수 있으며, 생리활성을 거의 기대할 수 없는 GlcN_3 이하의 올리고당 및 단당류는 막을 통하여 순환되는 동안 막의 외부로 빠져나가게 되어 자연적으로 제거할 수 있다. 이들은 실질적으로 이 시스템을 이용하여 키토산 올리고당의 분자량 크기별로 분획한 3종류 (MW 10~5, 5~1, 1 kDa 이하)에 대하여 항균활성, 자유라디칼 소거능 및 항암활성과 같은 생리활성을 검토한 바 있다 (6,8,9,14).

IV. 키토산 및 그 올리고당의 생리 활성

1. 항균활성

키토산 및 그 염산 가수분해물이 식물병원성 곰팡이에 대하여 생육저지효과를 나타내는 것이 1979년 Allan and Hadwiger (3)에 의해서 처음으로 보고된 이래로 1984년 Kendra and Hadwiger (7)에 의해 더욱 명확하게 밝혀졌다. 内田 (45)은 키토산의 농도변화에 따른 대장균 (*Escherichia coli*)의 증식에 미치는 영향을 bouillon배지 (육즙 1%, 펩톤 1% 및 염화나트륨 0.5%; pH 6.0)에서 검토한 결과, 키토산을 0.02% 이상 첨가하였을 때 *E. coli*의 생육을 완전히 저지하였다.

한편, Stössel과 Leuba (46)는 키토산, 키틴 및 다른 종류의 아미노당의 식물병원성 진균의 증식에 대한 영향을 검토한 결과, 키틴은 곰팡이의 생육저해작용을 가지고 있지 않음을 보고하였다. 内田 (45)은

키토산의 농도에 따른 항곰팡이 활성에 관하여 검토하였는데, 키토산이 0.1% 첨가되었을 때 식물병원성 곰팡이인 *Fusarium solani*의 생육은 완전히 저지되었으며, 6일 동안 증식이 완전히 억제되었다고 보고하였다.

이와 같이 키토산의 항균작용 메커니즘은 양전하를 가진 키토산의 아미노기-세균 세포벽의 음전하와 이온결합을 형성하여 세포분열을 저해함으로써 세균의 성장을 억제하는 것으로 추정된다. 이에 대한 간접적인 증거로서 키토산의 탈아세틸화도에 따른 항균활성의 검토이다. 일반적으로 키토산은 키토산을 100% 탈아세틸화시킨 것이 가장 이상적이지만 실질적으로 100% N-아세틸기를 제거하기는 어렵다. 따라서 키토산에는 어느 정도의 N-아세틸 아미노기가 존재하며 이는 키토산에서 키토산을 제조할 때의 조건에 따라 그 함량에서 차이가 발생한다. 그러므로 키토산의 탈아세틸화도의 차이에 따라서 chitosanase의 활성, 효소의 고정화, 금속이온의 흡착력 등이 달라지게 된다. 内田 (45)은 키토산의 탈아세틸화도의 차이에 따라서 *Fusarium solani*에 대한 항곰팡이 활성을 검토한 결과, 탈아세틸화도가 높을수록 즉, 유리 아미노기가 많을수록 항곰팡이 활성이 강하다는 것을 보여주었다. 이것은 양전하를 가진 키토산의 아미노기가 특이적인 화학구조를 가진 곰팡이의 세포벽과 결합하여 생육을 저해시키는 사실을 판단케 한다.

한편, Jeon 등 (8)은 키토산을 효소막 반응기를 이용하여 가수분해하여 얻어진 키토산 올리고당을 분자량 한계범위가 각각 10, 5 및 1 kDa인 막을 통과시켜 항균활성을 검토한 결과, 키토산 올리고당의 항균활성은 올리고당의 분자량 크기에 크게 의존하는 것으로 나타났다. 즉, 키토산 올리고당은 키토산보다는 우수하지 못하였으나, 그람 음성균 중 *E. coli*, *E. coli* O-157, *Salmonella typhi*, 그람 양성균 중 *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* 등과 같은 주로 병원성 세균들과 하양 유래 세균인 비브리오균 (*Vibrio cholera*, *Vibrio parahaemolyticus*)에 대해서 높은 항균활성을 보였다. 특히 키토산 올리고당 중 분자량이 가장 큰 10 kDa의 막은 통과하고 5 kDa의 막은 통과하지 못한 키토산 올리고당에 대해 높은 항균활성이 나타났으나, 분자량이 가장 작은 1 kDa의 막을 통과한 키토산 올리고당에서도 항균활성을 나타내었다. 또한, 키토산 및 그 올리고당의 생리활성 발현에는 그 화학구조에서 C-2 위치의 유리 아미노기가 매우 중요하게 작용한다는 사실을 인식하여, Jeon과 Kim (9)은 이들 위치의 유리 아미노기에 아미노산을 콘쥬게이트 결합시킨 키토산 올리고당 유도체를 합성하여 생리활성에 미치는 영향을 검토하였다. 키토산 1 mM에 5 mM의 아미노산 유도체를 첨가하였을 때 가장 효율적으로 합성되었으며, 키토산 올리고당 유도체들 중 Asn이 결합된 키토산 올리고당이 *E. coli*에 대하여 매우 높은 항균력을 보였다. 이러한 사실은 아미노산의 측쇄와 주사슬에 각각 노출되어 있는 2개의 유리 아미노기가 세균의 세포벽에 함유되어 있는 카르복실 음이온과 매우 효과적으로 이온결합을 형성하여 세균의 성장을 강력하게 억제하는 것으로 판단된다. 따라서 키토산의 항균력은 단지 키토산에 함유되어 있는 유리 아미노기의 함량에만 의존하는 것이 아니라 이웃하는 유리 아미노기와의 분자간 거리에 의해서도 크게 의존할 수 있음이 시사되었다.

2. 고혈압 조절작용

식염을 지나치게 많이 섭취하게 되면 체내의 혈압이 상승한다는 사실은 잘 알려져 있다. 혈압만 상승하고 신장(腎臟)이나 부신(副腎) 등에 장애가 없는 본태성 고혈압환자에 대해서 식염을 제한하게 되

면 약 60% 정도의 혈압을 저하시킬 수 있다고 한다. 식사 중에 식염이 장에 흡입되면 Na^+ 와 Cl^- 로 해리되고 각각 독자적으로 경로에 따라 조절된다. 따라서 식염이 혈압상승에 관여하고 있어도 Na^+ 나 Cl^- 중 어느 것이 혈압을 상승시키는지는 지금까지 많은 논쟁이 되어 왔다. 1954년 Dahl과 Love (47)는 현재 널리 알려져 있는 Na^+ 에 의한 혈압상승설을 제창하였다. 즉, 식염을 제한하여 혈압을 저하시킨 후 염화암모늄 (NH_4Cl)을 투여하여도 혈압은 상승하지 않는다는 실험을 근간으로 하여 이와 같은 주장을 할 수 있었다. 그러나 염화나트륨 대신에 염화암모늄을 섭취하게 되면 체내에서 NH_4^+ 로 해리되고, 따라서 프로톤 (proton, H^+)을 방출하여 ($\text{NH}_3 + \text{H}^+$) 세포내를 산성으로 만든다. 그러면 세포내 pH의 저하에 의하여 당대사를 중심으로 하는 세포내 대사 전체가 저해를 받아서 체중이나 혈압이 저하될 가능성이 있게 된다. 결국, 염소가 혈압상승물질이라도 NH_4^+ 의 독성 때문에 그 효과가 발휘되지 않을 가능성이 있다. 실제로 탄산나트륨이나 구연산나트륨을 투여하여도 혈압의 상승이 없었다든가 (48), 염화칼슘, 염화콜린, 리신염산염, 염화칼륨 등의 투여에도 혈압이 상승한다고 하는 보고 (49)가 이를 뒷받침하고 있다. 그러면 과연 어느 성분이 혈압의 상승에 가장 뚜렷하게 작용하는가 하는 의문은 여전히 남아 있게 된다. 따라서 Na^+ 나 Cl^- 를 특이적으로 결합하여 변(便) 중에 배출시킬 수 있는 식이섬유가 있으면 좀 더 명확한 결론에 도달할 수 있을 것이라는 추정과 함께, Na^+ 는 알긴산 (alginic acid)의 카르복실 음이온에 이온결합을 형성할 수 있고, Cl^- 는 키토산의 유리 아미노 양이온에 특이적으로 이온결합을 할 수 있다는 사실을 토대로 奥田 (11)은 다음과 같은 실험들을 수행하였다.

키토산과 알긴산의 두 식이섬유를 높은 함량의 식염과 함께 랫트 (rat)에 투여한 결과, 예상대로 알긴산이나 키토산에 각각 Na^+ 와 Cl^- 가 특이적으로 결합하여 체외로 배출되는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 이와 같은 식이섬유를 함유한 고농도의 식염을 정상혈압을 가진 랫트와 고혈압의 랫트에 40일 동안 투여하여 혈압의 변화를 관찰하였다. 두 종류의 혈압을 가진 랫트 모두 알긴산보다 키토산을 섭취한 랫트에서 혈압이 더 낮았다. 따라서 알긴산에 의해 체외로 배출된 Na^+ 보다는 체내에 흡수된 Cl^- 에 의해 혈압이 상승한다는 결과를 얻을 수가 있었다. 그러면 왜 키토산을 섭취하였을 때 혈압이 떨어지는 것일까? Cl^- 가 혈압에 어떻게 관여하는 것일까 하는 의문은 본태성 고혈압에 직접적으로 관여하는 효소인 안지오펜신 전환효소 (angiotensin converting enzyme; ACE)를 통하여 알 수 있다. 즉, ACE는 안지오펜신 I에 작용하여 혈압상승물질인 안지오펜신 II를 생성하는 효소로서, 생성되어진 안지오펜신 II는 혈관을 수축하기도 하고, 동시에 혈관수축작용을 가진 아드레날린 (adrenaline)을 부신수질 (副腎髓質)로부터의 분비를 촉진시키며, 신장에서 Na^+ 의 배출을 억제하는 알도스테론 (aldosterone)의 합성을 촉진함으로써 혈압을 상승시키는 것으로 알려져 있다. 결국, ACE의 활성을 저하시킴으로써 혈압을 낮출 수가 있다. 만약, Cl^- 에 의해서 ACE활성이 증가하게 되면 혈압이 상승하는 것인데, 이에 관련된 연구결과를 加藤 (50)이 보고한 결과에 의해서 보면, Na^+ 를 함유한 초산나트륨이나 탄산수소나트륨은 농도의 증가에 따라 ACE의 활성에 변화가 없는 반면에 Cl^- 가 함유되어 있는 염화나트륨이나 염화칼륨은 농도의 증가에 따라 계속적으로 ACE의 활성이 증가하는 것으로 알 수 있다. 이상의 결과를 종합해 보면, 키토산의 혈압저하작용에 의해서 Cl^- 가 혈압상승에 관여한다는 사실이 밝혀졌으며, 키토산을 섭취함으로써 고혈압이 어느 정도 개선될 수 있다는 것을 알 수 있다.

한편, Hong 등 (12)은 키토산 올리고당의 ACE 저해활성과 spontaneously hypertensive rat (SHR)의 혈압에 미치는 영향을 검토한 결과, ACE 저해활성 (IC_{50})은 trimer가 $0.9 \mu \text{ mole}$ 로 가장 우수하였고, dimer의 경우에는 $2.4 \mu \text{ mole}$, 그 외의 올리고당은 모두 $100 \mu \text{ mole}$ 이상이었다고 하였다. 또한, 강력한

ACE 저해제인 captopril의 인체 투여량을 기준으로 trimer 키토산 올리고당 2.14 mg/kg을 SHR에 강제 경구투여 하였을 때 4시간 경에 8주령 및 21주령 SHR 모두 최저혈압을 보였고, 이때의 혈압강하는 8주령 SHR이 27 ± 4.8 mmHg, 21주령 SHR이 36 ± 4.3 mmHg로 나타났다. 따라서 이들 결과로부터 trimer 및 dimer 키토산 올리고당은 향후 고혈압 치료제로서 응용이 가능할 것으로 판단된다.

3. 콜레스테롤 개선작용

일반적으로 지방을 섭취하게 되면 지방은 그대로 흡수되는 것이 아니라 체장에서 분비되는 lipase에 의해서 분해된 후, 그 분해산물이 장에서 흡수하게 된다. 그러나 지방은 수용액에서 용해되지 않기 때문에 대부분의 지방분자들이 물과 회합하여 미셀을 형성한다. 한편 lipase는 수용성이기 때문에 기름방울의 계면에서 효소작용을 수행하며, 따라서 지방의 기름방울이 작을수록 효소가 작용할 수 있는 계면이 넓어져 그 만큼 지방이 분해되기 쉽다. 이러한 생체내 계면활성제로서 작용하는 것이 십이지장(十二指腸)에서 분비되는 담즙에 함유되어 있는 담즙산(bile acid)이다. 담즙산은 분자내에 음이온의 전하를 가지고 있는 카르복실기를 함유하고 있기 때문에 여기에 키토산의 유리 아미노기가 이온결합을 형성하여 체외로 배출하게 되면 체내의 담즙산이 부족하여 lipase의 활성을 저하시키는 원인으로 작용한다.

Sugano 등 (51)은 랫트를 이용하여 키토산에 의한 혈액 및 간장 중의 콜레스테롤 개선작용에 대하여 검토한 결과, 고농도의 콜레스테롤을 함유한 키토산을 2~5% 첨가하여 랫트를 20일간 사육하면 사료 섭취량이나 발육에는 전혀 영향을 미치지 않고 혈중 및 간장중의 콜레스테롤 값이 현저하게 저하하였다고 보고하였다. Maezaki 등 (52)은 사람을 대상으로 키토산에 의한 혈중 콜레스테롤 개선작용을 알아보기 위하여 시험전 대조기 1일동안은 키토산 무첨가 비스킷을 3개/일, 시험기 전반부의 1주일엔 키토산 0.5 g 첨가한 비스킷을 3개/일 (1.5 g/일), 후반부 1주일엔 6개/일 (3 g/일) 그리고 시험종료 후 대조기 1주일엔 다시 키토산 무첨가 비스킷을 3개/일 섭취하도록 하였으며, 키토산 섭취 전후의 혈중지질과 변중의 담즙산 배출량을 조사한 결과, 키토산 섭취에 의해서 혈중의 총콜레스테롤값은 유의적으로 감소하였으며, HDL-콜레스테롤은 유의적으로 상승하였고, 키토산 섭취를 중지하면 다시 원래대로 되돌아가는 경향을 보였으며, 또한 키토산 섭취에 의해서 1차 담즙산의 cholic acid과 chenodeoxycholic acid의 변중 배출량이 유의적으로 증가하였으며 섭취를 중지하면 감소하였다고 보고한 바 있다.

키토산은 고분자로서 이용될 때 체내에 흡수되지 않고 체외로 배출되는 하나의 식이섬유로서 작용을 하며, 이때 키토산 자체에 함유되어 있는 양이온의 유리 아미노기 때문에 지방의 체내 흡수를 방지할 수 있어 건강식품으로서 이용을 기대할 수 있다.

4. 면역작용에 의한 항종양 활성

키토산의 생리활성 중 면역능을 증강시켜 항종양활성을 검토하려는 연구가 초기에는 다당류를 그대로 마우스 복강내 투여하여 그 효과를 관찰하였지만, 키토산은 모두 물에 불용성이기 때문에 재현성이 있는 결과를 얻기 힘들어서 그 효과를 평가하는데 많은 어려움이 있었다. 따라서 수용성 키토산 올리고당을 제조하여 그 활성을 검토하게 되었다. 그렇지만 일반적으로 항암성 다당류는 산분해 등에 의해서 분자량이 감소될 경우 예외 없이 활성을 잃어버리기 때문에 이들 키토산 올리고당도 다른 대부분

의 다당류와 같이 면역활성이 발현할 것으로 기대하지 못했던 것이다. 그러나 Suzuki 등 (53)은 키토산을 저분자화하여 얻어진 중합도 6의 키토올리고당 (COS-6)을 이용하여 이형적 (allogeneic) 마우스에 이식한 sarcoma 180 고형 종양계에서 항암작용을 검토한 결과, COS-6에서 상당히 강력한 종양증식 억제효과를 볼 수 있었다고 하였다. Tokoro 등 (54)은 또 다른 동계간 마우스 종양계로서 BALB/c 마우스에 이식한 Meth-A 고형종양에서 COS-6가 41%의 항종양활성을 나타내었으나 이들보다 분자량이 조금 더 낮은 COS-5에서는 종양억제활성은 거의 없는 것으로 보고하였다. Suzuki (55)와 Tokoro 등 (56)은 대식세포, 림프구 및 cytokine이 상호 관련하고 있는 면역계에서의 종양억제 반응에 관하여 검토하여 키토산 올리고당에 의해 활성화된 IL-1 및 IL-2의 관여를 시사하였고, 그의 대식세포활성화, 지현형 과민증 반응을 증가시킨다는 사실을 밝혔다.

Jeon과 Kim (6)은 효소막 반응기를 이용하여 분자량별로 분획하여 얻은 키토산 올리고당의 항암활성을 검토한 결과, 키토산 올리고당의 분자량에 따라 그 활성이 크게 차이가 난다는 것을 알았다. 즉, 분자량이 1,000에서 5,000 Da 사이의 키토산 올리고당의 경우 5,000에서 10,000 Da사이의 키토산 올리고당과 1,000 Da 이하의 키토산 올리고당보다 종양성장 억제율 및 연명효과에서 가장 높은 활성을 보였다. 따라서 키토산 올리고당의 항암활성은 분자량 크기가 1,000에서 5,000 Da 사이일 때 가장 효과적이었다. 특히, 1,000에서 5,000 Da 사이의 키토산 올리고당의 경우 마우스 1 kg 당 50 mg 이하로 복용투여하였을 때 항암활성에 대한 농도 의존성이 없으며, 단지 10 mg의 투여로 60% 이상의 sarcoma 180 복수암을 억제할 수 있었다.

5. 칼슘흡수촉진작용

키토산과 셀룰로오스의 공통점은 장내 노폐물의 배출, 지질 및 콜레스테롤의 흡수저해 등이 있으며, 차이점은 키토산은 마크로파아지 유래 성장인자를 매개로 하여 골아세포와 연골세포의 증식을 촉진하고 동시에 이터루킨 1을 활성화시킴으로써 뼈의 흡수를 촉진하고 결과적으로 골다공증을 예방할 수 있다고 하였다 (57). 그러나, Deuchi 등 (58)은 키토산을 다량으로 랫트에게 연속적으로 섭취시켰을 때 체내 칼슘이 약 60~70%로 감소하였다고 보고하였다. 따라서 Jeon 등 (13)은 식이섬유로서 작용하는 키토산보다는 체내 흡수율이 높은 키토산 올리고당을 이용하여 칼슘흡수촉진작용을 검토한 결과, 키토산 올리고당 1%를 염화칼슘과 함께 랫트에 섭취시켰을 때 변으로 배출되는 칼슘의 양은 약 75%로 감소하였으며, 대퇴골의 뼈골절강도는 키토산 올리고당을 첨가하지 않은 대조구보다 약 15~20%정도 증가하였다. 이러한 결과는 칼슘 보충제로 널리 알려져 있는 casein phosphopeptide (CPP)를 3.5% 첨가시켰을 때 대퇴골의 강도가 6.2% 증가하였다는 결과와 비교해 볼 때 키토산 올리고당의 칼슘흡수촉진제로서 이용 가능성을 시사해준다.

6. 노화방지작용

생체가 노화하는 메카니즘은 아직까지 확실하게 밝혀지지 않고 있으나 모든 장기가 노화함에 따라 그 구조가 변하고 기능이 퇴화하게 된다. 이러한 결과로 나이가 증가함에 따라 해부학적, 생화학적, 생리학 및 행동학적인 면을 포함한 모든 측면에서 신체의 변화가 나타나게 된다. 이러한 노화에 따라

나타나는 면역체계의 감소는 여러 가지 질병 및 외부의 스트레스에 대한 저항성을 감소시켜 여러 가지 질병을 유발하게 된다. 노화가 일어나는 원인에 대한 학설은 지금까지도 여러 가지 설이 주장되고 있으나, 가장 많은 지지를 받고 있는 설이 자유라디칼설이다. 이 자유라디칼설에 의하면 끊임없이 생성되는 반응성 강한 자유라디칼이 세포나 효소를 점차적으로 파괴하고 생체가 정상적인 세포나 효소를 모두 써 버림으로써 노화와 사망을 초래한다는 것이다. 그러나, 생체내에 있는 세포는 이러한 자유라디칼로부터 세포를 보호하는 항산화효소 (glutathion peroxidase, SOD, catalase 등)와 비타민 A, C, E 및 카로틴 등과 같이 외부에서 공급되는 영양소와 대사산물이 있다.

키토산 올리고당 역시 자유라디칼의 축적을 억제하는 기능이 있는 것으로 나타났다(14). 즉, 키토산 효소로 분해하여 만든 키토산 올리고당 (분자량 1.0, 1.0~3.0, 3.0~5.0, 5.0~10.0 kDa)을 라디칼 소거능에 대하여 실험한 결과 키토산 올리고당을 첨가하지 않은 대조군에 비하여 약 20% 이상의 라디칼 소거능을 보였으며, 이 중에서 3.0~5.0 kDa 사이의 분자량을 가진 키토산 올리고당이 가장 높은 라디칼 소거능을 나타내었으면, 그 농도가 0.05% 이상에서 거의 95% 이상의 라디칼 소거능을 나타내었다. 따라서 키토산 올리고당을 섭취할 경우 생체내 자유라디칼 생성을 감소시켜 노화 및 자유라디칼에 의하여 유발될 수 있는 암, 면역력 감소, 동맥경화 등의 성인병 예방과 치료를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

우리나라의 키토산의 이용 현황에 관한 정확한 조사는 부족하지만 그 중 많은 부분을 차지하고 있는 건강식품분야에서 보면 1997년도 상반기 매출액 460억원으로 시장점유율에서 칼슘과 스쿠알렌에 이어 3위였으나, 2000년도에는 약 1,800억원 시장으로 1위를 차지하였다. 키토산·키토산의 소비량이 가장 많은 일본의 경우에는 1996년도 키토산·키토산 소비량이 약 800톤으로서, 이 중 폐수처리용 응집제로서 약 350톤 (44%), 그리고 건강식품, 동물사료 및 식품가공 원료 등 식품과 사료의 첨가제로서 185톤 (23%), 농업용 소재로서 120톤 (15%) 등이며, 이들을 합치면 전체 이용 중에서 약 80% 이상을 차지하고 있다.

앞에서도 언급하였듯이, 키토산의 이용 가능분야는 열거할 수 없을 정도로 다양하다. 그러나 현재 키토산의 이용은 과거의 공업분야보다 부가가치가 높은 식품이나 의약품 소재로서의 비중이 높아지고 있다. 또한 키토산으로부터 제조한 올리고당의 높은 중앙증식억제 효과 및 암 전이억제 효과, 면역증강작용에 의한 항암작용, 칼슘흡수촉진작용, 노화방지 작용, 고혈압조절작용, 콜레스테롤 개선작용, 및 대장균을 비롯한 많은 병원성 세균에 대하여 높은 항균작용이 있음이 밝혀졌으며 또한 *Sendai* 바이러스 및 *Staphylococcus aureus*에 감염된 마우스의 생명연장효과가 시사되어 항생제로서의 개발 가능성이 매우 높아졌다.

우리나라는 지금까지 키토산의 의료용 소재로서 이용은 전무한 실정이지만, 고품질의 키토산과 키토산 올리고당을 개발하여 건강식품으로서의 이용에 박차를 가하고 있다. 특히 키토산 올리고당은 그 제조방법에서 강산을 이용한 화학적 처리 공정이 인체의 유해성 논란으로 보사부 식품규격에서 사용 금지되어 있기 때문에 효소적 분해에 의한 생산이 필수적이다. 다행히 최근에 이러한 관심이 관련 업체들의 연구개발에 의해 고품질 키토산 올리고당의 생산이 이루어지고 있으며, 이는 일본과의 경쟁적 위치에 서게 된 것이 무척 다행스럽다.

키토산 올리고당은 다양한 생리기능성을 가지고 있어 여러 분야에 응용이 가능하지만, 축산분야에 서의 키토산의 이용은 현재 동물성장촉진사료로 약간 이용되고 있을 뿐 거의 이용되지 않고 있다. 그러나, 앞에서 살펴본 바와 같이 키토산 및 그의 올리고당의 항암, 항고혈압, 항균, 항산화 등의 여러 가지 생리기능성을 가지고 있어 이를 축산분야에 충분히 응용할 수 있을 것으로 판단된다.

Ⅵ. 참고문헌

1. Gordon, D. T. and Williford, C. B. (1983) ACS Symposium Series 214, Unconventional Source of Dietary Fibers, 156-184.
2. Aiba, S., Izume, M., Minoura, N., Fujiwara, Y. (1985) Carbohydr. Polym., 5, 285.
3. Allan, C. R. and Hadwiger, L. A. (1979) Exp. Mycol., 3, 285.
4. Nakajima, M., Atsumi, K., Kifune, K., Miura, K., Kanamaru, H. (1986) The Jpn. J. of Surgery, 16, 216.
5. Nishimura, K., Ishihara, C., Ukei, S., Tokura, S. and Azuma, I. (1986) Vaccine, 4, 151.
6. Jeon, Y. J. and Kim, S. K. (2001) J. Microbiol. Biotechnol, (submitted)
7. Kendra, D. F. and Hadwiger, L. A. (1984) Exp. Mycol., 8, 276.
8. Jeon, Y. J., Park, P. J. and Kim, S. K. (2001) Carbohydrate Polymers, 44, 71.
9. Jeon, Y. J. and Kim, S. K. (2001) J. Microbiol. Biotechnol., 11, 281.
10. 次田隆志, 坂本廣司, (1995) 月刊フドケミカル, 2, 45.
11. 奥田拓道 (1995) 月刊フドケミカル, 2, 33.
12. Hong, S. P., Kim, M. H., Oh, S. W., Han, C. K. and Kim, Y. H. (1998) Korean J. Food Sci. Technol. 30, 1476.
13. Jeon, Y. J., Kim, G. H., Park, P. J. and Kim, S. K. (1999) J. Korean Fish. Soc., 32, 247.
14. Park, P. J., Byun, H. G. and Kim, S. K. (2001) In Proceeding form the 3rd International Symposium on Chitin Enzymology and 4th Conference of the European Chitin Society, Ancona, Italy.
15. Weiner, M. L. (199) In Proceeding from the 5th International Conference on Chitin and Chitosan, Vol. 5, pp. 663-672, New Jersey, USA.
16. Johnson, E. L. and Peniston, Q. P. (1982) In Chemistry & Biochemistry of Marine Food Products, p. 415, AVI Publishing Co., Westport, CT.
17. Hackman, R. H. (1954) Aust. J. Biol. Sci., 7, 168.
18. Anderson, C. G., DePablo, N. and Romo, C. R. (1978), In Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosa, p. 54, MIT Sea Grant Program, Cambridge, MA.
19. Barzeski, M. M. (1982), In Proceedings of the Second International Conference on Chitin and Chitosan, p. 15. The Japan Society of Chitin and Chitosan, Sapporo, Japan.
20. Shimahara, K., Ohkouchi, K. and Ikeda, M. (1982) In Proceedings of the Second International Conference on Chitin and Chitosan, p. 10. The Japan Society of Chitin and Chitosan, Sapporo, Japan.
21. Bough. W.A., Salton, W.L., Wu, A.C.M. and Perkins, B.E. (1978) Biotech. Bioeng. 20, 1931.

22. Horowitz, S.T., Roseman, S. and Blumental, H.J. (1957) *J. Am. Chem. Soc.* 79, 5048.
23. Synowiecki, J., Sikorski, I.E. and Naczka, M. (1981) *Biotech. Bioeng.* 23, 231.
24. Whistler, R.S. and BeMiller, J.N. (1962) *J. Org. Chem.* 27, 1161.
25. Austin, P.R., Brine, C.J., Castle, J.E. and Zikakis, J.P. (1981) *Science*, 212, 749.
26. Alimuniar and Zainnuddin (1992) In *Advances in Chitin and Chitosan*. p. 627, Elsevier Applied Science, Essex, UK.
27. Wu, A.C.M. and Bough, W.A. (1978) In *Proceedings of the Fifth International Conference on Chitin/Chitosan*. p. 88, MIT Sea Grant Program. Cambridge, MA.
28. Pelletier, A., Lemire, I., Sygusch, J., Chornet, E. and Overend, R.R. (1990) *Biotech. Bioeng.* 36, 310.
29. Horowitz, S. T., Roseman, S. and Blumenthal, H. J. (1957) *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 5046.
30. Nanjo, F., Katsumi, R., Sakai, K. (1990) *J. Biol. Chem.*, 265, 10088.
31. Boucher, I., Dupuy, A., Vidal, P., Neugebauer, W. A. and Brzezinski, R. (1992) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38, 188.
32. Shimosaka, M., Nagawa, M., Ohno, Y. and Okazaki, M. (1993) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 57, 231.
33. Sakai, K., Katsumi, R., Isobe, A. and Nanjo, F. (1991) *Biochem. Biophys. Acta*, 1097, 65.
34. Yamasaki, Y., Hayashi, I., Ohta, Y., Matsuda, H. (1993) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 57, 444.
35. Yamasaki, Y., Fukumoto, I., Kumagai, N., Ohta, Y., Nakagawa, T., Kawamukai, M. and Matsuda, H. (1992) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 56, 1546.
36. Fenton, D. and Eveleigh, D. E. (1981) *J. Gen. Microbiol.*, 126, 151.
37. Yabuki, M., Uchiyama, A., Suzuki, A., Ando, A. and Fuji, T. (1988) *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 34, 255.
38. Sakai, K., Nanjo, F. and Usui, T. (1990) *Denpun Kagaku*, 37, 79.
39. Uchida, Y., Izume, M. and Ohtakara, A. (1988) In *Chitin and Chitosan*, pp. 373-382, Proceedings from the 4th International Conference on Chitin and Chitosan held in Trondheim, Norway.
40. 夜久富美子 (1991) *四國工研究會報*, 42, 15.
41. Usui, T., Hayashi, Y., Nanjo, F., Sakai, K. and Ishido, Y. (1987) *Biochim. Biophys. Acta*, 923, 302.
42. 碓永泰市, 磯部清志, 松井秀憲 (1988) 第3回キチン・キトサン・ポジウム講演要旨集 pp. 30-38.
43. Jeon, Y. J. and Kim, S. K. (2000), *Process Biochem.*, 35, 623.
44. Jeon, Y. J. and Kim, S. K. (2000), *Carbohydrate Polymers.*, 41, 133.
45. 内田 泰 (1988) *フドケミカル*, 2, 22.
46. Stössel, P. and Leuba, J. L. (1984) *Phytopath. Z.*, 111, 82.
47. Dahl, L. K. and Love, R. A. (1954) *Arch. Int. Med.*, 94, 525.
48. Kurtz, T. W., Al-Bander, H. A. and Morris, R. C. Jr., N. E. (1987) *J. Med.*, 317, 1043.
49. Kaup, M. S., Greger, L. J., Marcus, S. K. M. and Lewis, M. N. (1991) *J. Nutr.*, 121, 330.
50. 加藤秀夫 (1995) *キチン・キトサン健康読本*1, No. 2, pp.46-49, 東洋醫學会.
51. Sugano, M., Fujikawa, T., Hiratsuji, Y., Nakashima, K., Fukuda, N. and Hasegawa, Y. (1980) *Am. J.*

Clin. Nutr., 33, 787.

52. Maezaki, Y., Tsuji, K., Nakagawa, W., Terada, Y., Akimoto, M., Tsugita, T., Takekawa, W., Terada, A., Hara, H. and Mitsuoka, T. (1993) Biosci. Biotech. Biochem., 57, 1439.
53. Suzuki, K., Mikami, T., Okawa, Y., Tokoro, A., Suzuki, S. and Suzuki, M. (1986) Carbohydr. Res., 151, 403.
54. Tokoro, A. Tatewaki, N., Suzuki, K. Mikami, T., Suzuki, S. and Suzuki, M. (1988) Chem. Pharm. Bull., 36, 784.
55. Suzuki, S. (1996) Fragrance J., 15, 61.
56. Tokoro, A., Kobayashi, M., Tatewaki, N., Suzuki, S. and Suzuki, M. (1989) Microbiol. Immunol., 33, 357.
57. 伊藤不二不 (1995) 骨粗鬆症に對す補助食品キトサンの役割, 月刊フドケミル, 2, 39.
58. Deuchi, k., Kanaubci, O., Shizukuish, M. and Kobayashi, E. (1995) Biosci. Biotech. Biochem., 59, 1211.