

## Chitosan 가수분해물의 *in vitro* 항돌연변이 활성

장현주 · 전향숙 · 이서래\*

한국식품개발연구원 쌀이용연구센터, \*이화여자대학교 식품영양학과

### Antimutagenic Activity *in vitro* of Chitosan Hydrolysates

Hyun-Joo Chang, Hyang-Sook Chun and Su-Rae Lee\*

Rice Utilization Research Center, Korea Food Research Institute

\*Department of Food and Nutrition, Ewha Woman's University

#### Abstract

Antimutagenic effect of chitosan hydrolysates was investigated using *Salmonella typhimurium* reversion assay and SOS chromotest against 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole(Trp-P-2), aflatoxin B<sub>1</sub>, 2-nitrofluorene and 4-nitroquinoline oxide. After partial acid hydrolysis of chitosan, six fractions of different molecular size were obtained by ultrafiltration. Chitosan hydrolysates showed antimutagenic effect of 0~78% on Trp-P-2, 0~92% on aflatoxin B<sub>1</sub>, 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 fraction 6 on Trp-P-2, 10% concentration of fraction 5 on aflatoxin B<sub>1</sub>, and 5% concentration of fraction 6 on 2-nitrofluorene. In SOS chromotest, chitosan hydrolysates showed antimutagenic effect of 0~54% on Trp-P-2 and 0~77% on 4-nitroquinoline oxide. These results suggest that high molecular weight fraction of chitosan hydrolysates (MW >30,000) is most effective to inhibit mutagenicity of tested mutagens.

Key words: chitosan hydrolysates, molecular size, *Salmonella typhimurium* reversion assay, SOS chromotest

## 서 론

근래에 들어와 식품 신소재로 관심이 집중되고 있는 chitosan은 2-amino-2-deoxy-D-glucose가  $\beta$ -1,4 결합을 한 다당류로서 chitin을 탈아세틸화하여 얻게 되는 동물성 식이섬유의 일종이다<sup>(1)</sup>. Chitosan은 chitin과 함께 미이용 천연자원으로 주목받아 의약품, 화장품, 공업용 및 식품용 소재로 이용하고자 하는 연구가 시도되어 왔다<sup>(2)</sup>. 식품 분야에서는 chitosan이 항균성<sup>(3)</sup>, 보수성<sup>(4)</sup>, 유화안정성<sup>(5)</sup>, 콜레스테롤 저하 효과 및 식이섬유로서의 생리적 기능<sup>(6)</sup> 등 다양한 생리활성을 가진다는 연구결과들이 보고되면서 그 이용가능성에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

특히 최근에는 chitosan 및 그 유도체들이 고형암의 성장 저지 효과<sup>(7)</sup>, 항체 생산 증강<sup>(8)</sup>, adjuvant로서의 기능성<sup>(9)</sup> 등 항암 및 면역 증강 활성을 나타낸다고 보고되고 있으며, oligomer 중에서는 6당체가 활성을 나타

낸다고 알려져 있다<sup>(10,11)</sup>. Suzuki 등<sup>(10)</sup>에 의하면, chitin 및 chitosan oligomer 중에서 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<sup>(11)</sup>도 hexa-N-acetylchitohexaose 및 chitohexaose가 BALB/c mice에 이식된 Meth-A solid tumor의 성장 저해 효과를 나타낸다고 보고하였다. 이와같이 intact chitosan 및 chitosan oligomer의 항종양 효과가 보고되어 있으나, 어떤 분자량 범위의 chitosan이 특이적으로 활성을 나타내는지를 살펴본 예는 없으며, 항돌연변이 활성에 대해서는 보고된 바 없다.

따라서 본 연구에서는 어떠한 평균분자량 범위의 chitosan이 가장 커다란 생리 활성을 나타내는지 알아보기 위해, 계껍질 chitosan을 부분 가수분해하여 분자량이 다른 fraction을 제조한 후, 발암성과의 상관관계가 높다고 알려진 *in vitro* 측정법인 *Salmonella typhimurium* reversion assay 및 SOS chromotest에 의해 항돌연변이 활성을 살펴보았다.

Corresponding author: Su-Rae Lee, Department of Food and Nutrition, Ewha Woman's University, 11-1 Daehyon-dong, Seodaemun-ku, Seoul 120-750, Korea

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

Chitosan (C-3646, practical grade from crab shells)은 Sigma Chemical Co. (USA) 제품을, 한외여과 (ultrafiltration) 장치는 Amicon사 제품을 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 B<sub>1</sub>, 2-nitrofluorene 및 4-nitroquinoline oxide는 Sigma Chemical Co.로부터 구입하였다. Aroclor 1254-induced rat liver S-9은 Organon Teknika Corp. 제품을 사용하였다. 시험균주 중 *Salmonella typhimurium* TA 98은 유전공학센터의 유전자 은행으로부터, *E. coli* PQ 37은 도핑 콘트롤 센터로부터 분양받아 사용하였다.

### Chitosan 가수분해물의 제조

Horowitz 등<sup>(12)</sup>의 산가수분해법을 일부 수정하여 고분자인 chitosan을 분해하였다. 즉 chitosan 분말 30 g을 둥근 플라스크에 넣고, 6 N HCl 용액 600 ml를 첨가하여, 60°C에서 1시간 30분동안 교반하면서 반응시킨 후, 냉각 및 희석하여 감압 농축기로 용매를 증발시켰다. 이 가수분해물을 0.5% 초산 용액 600 ml로 용해시킨 다음, 여과지로 여과하여 불순물을 제거하고, 한외여과막 (ultrafiltration membrane)을 이용하여 분자량에 따라 분리하였다. YM 1 (molecular weight cutoff=1,000), YM 3 (MWCO=3,000), YM 10 (MWCO=10,000), YM 30 (MWCO=30,000) 및 YM 100 (MWCO=100,000)을 순차적으로 통과시켜 얻어진 6가지 fraction을 각각 농축, 건조시킨 다음 분말로 하여 시험에 이용하였다.

### Chitosan 가수분해물의 이화학적 특성

수분 함량은 상압 가열 건조법으로 105°C에서 측정하였다. 점도는 chitosan 가수분해물을 0.1 M acetic acid-0.2 M NaCl 용액에 녹인 후, Ubbelohde형 점도계를 사용하여 25°C에서 여러 농도에서의 상대점도를 측정 한 후 식에 따라 고유점도를 계산하였다<sup>(13)</sup>.

탈아세틸화도는 Sannan 등<sup>(14)</sup>의 방법을 이용하였다. 즉, KBr cell을 만들어 FT-IR spectroscopy (FTIR-300, JASCO)로 스펙트럼을 얻어, 흡광도의 비( $A_{1550}/A_{2975}$ )를 구한 후 검량선을 이용하여 탈아세틸화도를 계산하였다.

### *Salmonella typhimurium* reversion assay

Maron과 Ames의 방법<sup>(15)</sup>을 이용하였다. 즉 미리 멸균시킨 capped tube에 시험용액 100  $\mu$ l, 돌연변이원 100  $\mu$ l, 4% S9 mix 500  $\mu$ l (직접변이원의 경우, 0.2 M phosphate buffer, pH 7.4), 균주 100  $\mu$ l ( $1-2 \times 10^8$  cells/ $\mu$ l)를 넣고, 37°C에서 20분간 preincubation시켰다. 이것을 top agar 2  $\mu$ l와 혼합한 후, minimal glucose agar plate에 골고루 도말하였다. 37°C에서 48시간 배양한 후 배지위의 복귀 변이주(revertant)의 콜로니 수를 계수하였다. 시료의 돌연변이 억제효과는 다음과 같이 계산하였다. 시험에 사용된 돌연변이원은 Trp-P-2가 0.05  $\mu$ g/plate, aflatoxin B<sub>1</sub>이 1  $\mu$ g/plate, 2-nitrofluorene이 8  $\mu$ g/plate의 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

### SOS chromotest

Quillardet 등<sup>(16,17)</sup>의 방법을 이용하였다. 즉 *E. coli* PQ 37을 하룻밤 동안 37°C에서 배양한 후 La 배지로 1:50 (v/v)으로 희석해서 이를 다시 2시간 30분 동안 배양하였다( $1-2 \times 10^8$  cells/ $\mu$ l). 이 배양액을 La 배지로 1:10으로 희석한 것을 사용하였다. 멸균한 capped tube에 시료 20  $\mu$ l, 돌연변이원 20  $\mu$ l, 균주와 S<sub>9</sub> mix (직접변이원의 경우, 신선한 La 배지첨가) 4혼합액을 넣고 37°C에서 반응시킨 후  $\beta$ -galactosidase와 alkaline phosphatase 활성을 측정하였다. 먼저  $\beta$ -galactosidase 측정은 시험관에 B buffer 2.7  $\mu$ l를 넣고 37°C에서 5분간 평형시킨 후 *o*-nitrophenyl- $\beta$ -galactoside (ONPG) 용액 0.6  $\mu$ l를 첨가하여 30분간 반응시켰다. 그런 다음 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액으로 반응을 정지시킨 후 spectrophotometer로 420 nm에서의 흡광도를 측정하였다. Alkaline phosphatase의 측정은 위와 동일한 방법으로 하되 B buffer 대신에 P buffer를, ONPG 대신에 *p*-nitrophenyl phosphate (PNPP)를, 반응 정지액은 0.25 M HCl 1  $\mu$ l를 첨가한 5분 후 2 M tris 1  $\mu$ l를 첨가하였다. 효소활성은  $[1000 \times A_{420}/t]$ 으로 나타냈고(t는 반응시간(분)), alkaline phosphatase unit에 대한  $\beta$ -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

Table 1. Physical and chemical properties of chitosan hydrolysates

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

<sup>1)</sup>Partial acid hydrolysates of chitosan were fractionated through Amicon ultrafiltration membranes

(O)는 돌연변이원이나 시료가 없을 때의 R값이다. 사용된 돌연변이원의 농도는 Trp-P-2가 4 µg/assay, 4-nitroquinoline oxide가 1 µg/assay였다. 매 시험은 세개의 평판을 사용하여 2회 반복하여 실시하였다.

#### 통계 분석

Chitosan 가수분해물의 pH가 시험계에 미치는 영향은 SAS를 이용하여 분산분석을 수행한 다음  $\alpha=0.01$  수준에서 유의성을 검증하였다.

### 결과 및 고찰

#### Chitosan 가수분해물의 이화학적 특성

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

환원 탈아세틸화도를 Sannan 등<sup>14)</sup>의 방법으로 산출한 결과, 가수분해 전의 chitosan은 71%의 탈아세틸화도를 나타내었다. Chitosan 가수분해물은 fraction 3에서 6까지는 69~72%로 chitosan과 비슷한 수준이었으나, fraction 1은 80%, fraction 2는 78%로서 약간 높은 수준이었다. Fraction 1과 2의 탈아세틸화도가 다른 가수분해물에 비해 약간 높은 것은 산에 의해 glycoside

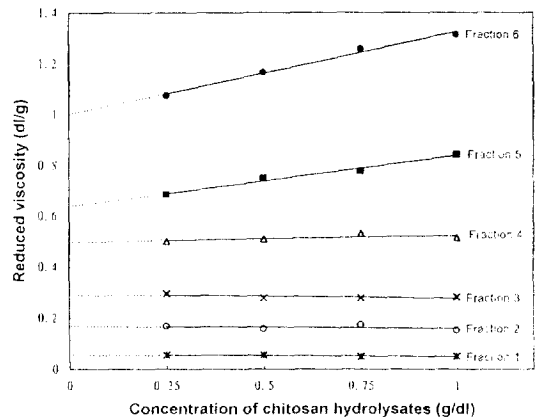


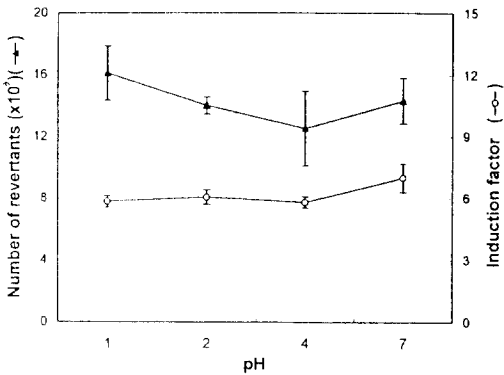
Fig. 1. Reduced viscosity of chitosan hydrolysates at different concentrations

결합이 먼저 분해된 다음 아마이드 결합의 분해는 저분자가 될수록 더 영향을 받기 때문이 아닌가 생각된다.

#### 항돌연변이 활성에 대한 pH의 영향

본 연구에서 제조된 chitosan 가수분해물은 chitosan을 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. 2에서와 같이 여러 pH에서 측정된 복귀 돌연변이 수간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다( $p < 0.01$ ). 또한 SOS 유도 반응에 대해서도 pH에 따른 IF 값간의 유의적인 차이가 나타나지 않았다( $p < 0.01$ ).

이와 같은 결과는 chitosan 가수분해물 자체의 pH는 산성이었으나, 활성 시험시 시험계에 투여되는 시료의 양이 소량인 동시에 시료가 완충용액을 사용했기 때문으로 생각된다. 따라서 chitosan 가수분해물의 항돌연변이 시험시 시료 자체의 높은 산도로 인한 영향



**Fig. 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  $\alpha=0.01$

은 거의 없을 것으로 판단되었다.

#### *Salmonella typhimurium* reversion assay

Chitosan을 산가수분해하여 얻은 6가지 fraction들의 돌연변이 억제효과를 *Salmonella typhimurium* reversion assay를 통해 살펴보았다(Table 2). 먼저 식품의 조리 가공 중 발생될 수 있는 대표적인 간접변이원인 tryptophan 열분해산물(Trp-P-2)에 대하여, 각 분획별로 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0%의 농도로 시험한 결과, fraction 1~4에서는 0~37%의 낮은 억제 효과를 나타내었으나, 용량-반응 관계를 나타내지 않은 것으로 보아 항돌연변이 활성이 거의 없는 것으로 판단되었다. 그러나 fraction 5와 6에서는 5% 이상의 농도에서 급격히 돌연변이 억제효과가 증가하는 경향을 보였다. 즉 fraction 5의 경우 5% 및 10% 농도에서 억제율이 각각 45.1 및 67.7%로 비교적 높은 효과를 나타냈고, fraction 6의 경우 5% 농도에서 가장 높은 78.3%의 억제 효과를 보였다. Fraction 6의 10% 농도에서는 plate 상에서 counting할 때, colony를 분간하기 힘들어 결과를 제시하지 못하였다.

한편, 곰팡이가 생성하는 간접 변이원인 aflatoxin B<sub>1</sub>은 Trp-P-2와는 달리, fraction 2에서 fraction 6까지의 5% 및 10% 농도에서 돌연변이 억제효과를 나타냈으며, fraction 5의 5% 및 10% 농도에서 각각 91.5% 및 92.0%의 두드러진 억제 효과를 보였다. 2-Nitrofluorene은 대사활성화가 필요없는 직접변이원으로서, 이에 대한 chitosan 가수분해물의 돌연변이 억제효과는 다른 두 종류의 변이원보다 그 효과가 훨씬 낮았다. 즉 fraction 5의 5% 및 10% 농도에서 33.8% 및 21.6%였고,

fraction 6의 5% 농도가 최고 수치인 50.6%를 보였다.

이상의 *Salmonella typhimurium* reversion assay 결과, chitosan 가수분해물은 직접변이원인 2-nitrofluorene 보다는 간접 변이원인 Trp-P-2와 aflatoxin B<sub>1</sub>에 대한 억제효과가 컸다. 즉 Trp-P-2에 대한 활성이 0~78.3%, aflatoxin B<sub>1</sub>이 0~92.0%로서 후자에 대한 억제 활성이 더 크게 나타났다. 각 fraction 내에서는 저농도에서보다 5% 및 10% 농도에서 항돌연변이 효과를 보였고, 세 종류의 변이원에 대해, fraction 5와 6이 공통적으로 돌연변이 억제효과를 크게 나타냈다. 또한 chitosan 가수분해물의 이러한 항돌연변이 활성은 모든 시험 plate 상에서 background lawn이 관찰되었으므로, 시료 자체의 독성 효과에 기인한 것이 아니었음을 확인할 수 있었다.

#### SOS chromotest

항돌연변이 효과를 살펴보기 위해 또 다른 시험 방법인 SOS chromotest를 실시한 결과는 Fig. 3과 같다. 간접변이원인 Trp-P-2와 직접변이원인 4-nitroquinoline oxide에 대하여 SOS 반응의 유도를 억제하는 효과를 살펴보았다. Trp-P-2에 대해, 모든 fraction에서 SOS 유도를 억제하는 현저한 효과는 나타나지 않았고, 양성대조군인 IF (induction factor)값 5.28에 대하여 fraction 2의 10% 농도에서 3.64, fraction 3과 4의 5% 및 10% 농도에서 3.24~4.06로서 유도 억제 정도가 비교적 낮았다. *Salmonella typhimurium* reversion assay의 경우처럼, fraction 5와 6의 5% 이상의 농도에서 항돌연변이 활성이 약간 나타났는데, fraction 5의 5% 및 10% 농도에서 3.27 및 3.07, fraction 6의 1% 이상의 농도에서 2.89, 2.74 및 2.44의 IF 값을 보였다. 가장 높은 SOS 유도반응 억제효과는 fraction 6의 10% 농도일 때였다.

Trp-P-2와는 다르게 4-nitroquinoline oxide에 대한 항돌연변이 활성은 6가지 fractions 모두에서 나타났다. 또 4-nitroquinoline oxide에 대해서 fraction 1의 5% 및 10% 농도에서 IF 값을 19.91에서 5.32 및 6.52로 낮추어 68.4 및 67.3%의 유도 억제효과를 나타냈다. Fraction 3과 4에서는 1% 이상의 농도일 때 5.25~9.34의 IF값을 보여 53.1~73.6%의 돌연변이 억제효과를 나타냈다. Fraction 5와 6에서는 낮은 농도인 0.5% 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 chitosan 가수분해물의 항돌연변이 활성은 직접변이원인 4-nitroquinoline oxide에 대한 활성이 간접변이원인 Trp-P-2에 대해서보다 더 크게 나타

**Table 2. Inhibitory effects of chitosan hydrolysates on the mutagenicity of Trp-P-2, aflatoxin B<sub>1</sub> and 2-nitrofluorene in *Salmonella typhimurium* TA 98**

| Chitosan Hydrolysates<br>(test concn) | Number of revertants (% inhibition rate) |  |                               |
|---------------------------------------|--|--|-------------------------------|
|                                       | Trp-P-2 <sup>1)</sup>                    | Aflatoxin B <sub>1</sub> <sup>1)</sup> | 2-Nitrofluorene <sup>2)</sup> |
| Positive control                      | 1707±192 <sup>3)</sup>                   | 374± 64                                | 573± 89                       |
| Negative control <sup>4)</sup>        | 23± 5                                    | 28± 4                                  | 26± 7                         |
| Fraction 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)                |
| Fraction 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)                |
| Fraction 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)                |
| Fraction 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)                |
| Fraction 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)                |
| Fraction 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)                |

<sup>1)</sup>Activated with S9 mix<sup>2)</sup>Without S9 mix<sup>3)</sup>Mean±standard deviation of duplicate runs<sup>4)</sup>DMSO was used as a negative control

났다. 또한 고분자 fraction으로 갈수록, 낮은 농도에서부터 항돌연변이 활성을 나타냈다.

이상의 chitosan 가수분해물의 항돌연변이 활성을 살펴보면, 다른 문헌에서 항암활성이 있다고 보고된 chitosan oligomer에 대해서, 그 분자량 범위에 해당하는 본 연구의 fraction 1과 2는 *Salmonella typhimurium* reversion assay와 SOS chromotest 결과, 모두 활성을 나타내지 않았거나, 낮은 효과를 보였다. 이와 같

이 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 3만 이상인 중분자 또는 고분자 fraction의 chitosan 가수분해물에서 돌연변이 억제활성이 나타났으므로, 앞으로는 이들 fraction의 돌연변이 억제 방식

문헌

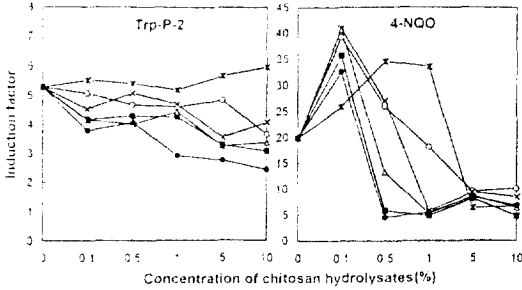


Fig. 3. Inhibitory effects of chitosan hydrolysates on the mutagenicity of Trp-P-2 and 4-nitroquinoline oxide in *E. coli* PQ 37 (Fraction 1: \*—\*, Fraction 2: ○—○, Fraction 3, ×—×, Fraction 4: △—△, Fraction 5: ■—■, Fraction 6: ●—●)

과 아울러 중합도별로 다시 분별한 후 활성 검토에 대한 연구가 계속적으로 수행되어야 할 것이다.

요 약

Chitosan이 항돌연변이 활성을 나타내는 분자량 범위를 알아보기 위해, chitosan 가수분해물의 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole(Trp-P-2), aflatoxin B<sub>1</sub>, 2-nitrofluorene 및 4-nitroquinoline oxide에 대한 억제 활성을 *Salmonella typhimurium* reversion assay와 SOS chromotest로 조사하였다. Chitosan을 삼가수분해한 후 환의여과하여 6가지 fraction을(분자량 1,000 이하, 1,000~3,000, 3,000~10,000, 10,000~30,000, 30,000~100,000, 100,000 이상)의 chitosan 가수분해물을 제조하였다. 제조된 각 fraction의 탈아세틸화도는 큰 차이가 없었으며, 시료 자체의 pH가 복귀 돌연변이 수와 SOS 유도 반응에 미치는 영향은 없는 것으로 나타났다. 얻어진 fraction별로 *Salmonella typhimurium* reversion assay를 실시한 결과, Trp-P-2에 대한 항돌연변이 활성은 fraction 6의 5% 농도에서 78%, aflatoxin B<sub>1</sub>에 대해서는 fraction 5의 10% 농도에서 92%, 그리고 2-nitrofluorene에 대해서는 fraction 6의 5% 농도에서 51%의 최고 활성을 나타냈다. 한편 SOS chromotest에서는 Trp-P-2에 대하여 0~54%, 4-nitroquinoline oxide에 대하여 0~77%의 억제 활성을 나타냈다.

1. Knorr, D.: Use of chitinous polymers in food—a challenge for food research and development. *Food Technol.*, **38**(1), 85 (1984)
2. 김세권 : 키틴, 키토산 및 그 유도체의 제조기술과 개발 동향(제1회). 식품공업, 106호, 63 (1990)
3. 조학래 : 저분자 chitosan의 항균성 및 식품보존효과에 관한 연구. 부산수산대학교 대학원 박사학위 청구논문 (1989)
4. Knorr, D.: Functional properties of chitin and chitosan. *J. Food Sci.*, **47**, 593 (1982)
5. 변회국, 강옥주, 김세권 : 키틴 및 키토산 유도체의 합성과 그 물리화학적 특성. 한국농화학회지, **35**, 265 (1992)
6. Dreher, M. L.: *Handbook of Dietary Fiber*, Marcel Dekker, New York, p.209 (1987)
7. 류병호 : 새우껍질에서 추출한 키토산의 항암 및 면역활성. 한국영양식량학회지, **21**, 154 (1992)
8. 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)
9. Skjak-Braek, G., Anthonsen, T. and Sandford, P.: *Chitin and Chitosan*, Elsevier, New York, p.703 (1989)
10. Suzuki, K., Mikami, T., Okawa, Y., Tokoro, A., Suzuki, S. and Suzuki, M.: Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose against Meth-A solid tumor. *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 784 (1988)
11. Horowitz, S. T., Roseman, S. and Bliemthal, H. J.: The preparation of glucosamine oligosaccharides. I. separation. *J. Amer. Chem. Soc.*, **79**, 5046 (1957)
12. Rabek, F. J.: *Experimental Methods in Polymer Chemistry*. Pitman Press, p.126 (1980)
13. 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)
14. Maron, D. M. and Ames, B. N.: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **113**, 173 (1983)
15. 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)
16. Quillardet, P., Bellecombe, C. D. and Hofnung, M.: The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: Validation study with 83 compounds. *Mutat. Res.*, **147**, 79 (1985)

(1996년 6월 25일 접수)