

# 키토올리고당과 수용성 키토산의 열처리가 올리고당 함량의 변화와 항 로타바이러스성에 미치는 영향

박범석 · 김종현 · 유대환 · 유제현

건국대학교 낙농학과

## Effects of Heat Treatment of Chitooligosaccharide and Water-Soluble Chitosan on the Changes in Oligosaccharide Content and Anti-Rotaviral Activity

B. S. Park, J. H. Kim, D. H. Yu and J. H. Yu

Department of Dairy Science, Konkuk University

### ABSTRACT

Chitosan is the deacetylated product of chitin. Chitosan and its derivatives have many properties that make them attractive for a wide variety of health applications. This study was conducted to investigate change of oligosaccharide content and antiviral effect on rotavirus of chitooligosaccharide and water soluble chitosan after heat treatment. The quantitative analysis of oligosaccharide using colorimetry showed that oligosaccharide contents in water soluble chitosan and chitooligosaccharide were decreased from 62.67% to 60.45% and from 59.48% to 54.31%, respectively, after heating. The inhibitory effect of chitosan derivatives on MA-104 cell infected with human rotavirus(HRV) measured using AEC staining method. The inhibition level of 0.125% water-soluble chitosan against cell infection by human rotavirus was  $91.98 \pm 3.09\%$  in HRV S2 and was  $89.92 \pm 1.68\%$  in HRV Wa. But, chitooligosaccharide had not shown inhibitory effect against cell infection by HRV. It considered that most oligosaccharide of chitooligosaccharides consist of oligomer of lower polymerization degree. Heat treatment of water soluble chitosan and chitooligosaccharide did not influence their antiviral effects on rotavirus.

(Key words : Water-soluble chitosan, Chitooligosaccharide, Human rotavirus)

### I. 서 론

로타바이러스는 세계적으로 가장 심각한 증세를 나타내는 위장염 설사의 원인체로서 개발도상국에서는 매년 유아 100만명 이상이 로타바

이러스에 의한 위장염으로 사망하고 전세계에 걸쳐 1억 5천 어린이가 설사병과 구토를 일으키고 있다. 세계보건기구(WHO)는 로타바이러스 감염에 대한 효율적인 억제와 예방을 최우선 과제로 삼고 있다(Cook 등, 1990; Kapikian

Corresponding author : Bum-Suk Park, Department of Dairy Science, Konkuk University #1 Hwayang-dong, Gwangjin-gu, Seoul, Korea 143-701. Tel: +82-2-450-3688, Fax: +82-2-455-5362 E-mail: bumsuck@hanmail.net

과 Chanock, 1990).

로타바이러스는 다양한 혈청형에 의해 발병이 되고 있기 때문에 한 혈청형에 감염되었다가 치료되더라도 다른 혈청형의 로타바이러스의 감염에 대한 방어능력이 형성되지 않기 때문에 효과적인 백신개발이 되지 않고 있다 (Conner 등, 1994). 이로 인해 Bass 등(1992)은 식품성분에 의해 로타바이러스를 저해하는 것이 백신개발의 문제를 해결하는 좋은 선택이 될 수 있다고 했으며, 지금까지 초유, 난황, 녹차추출물, 락토페린 및 감초산 등 식품성분으로 로타바이러스의 감염을 방어하는 많은 연구가 보고되고 있다(Ebina 등, 1985; Ebina 등, 1990; Ebina 등, 1991; Superti 등, 1997; 차 등, 1999; 송 등, 2000).

키토산은 게, 새우 등 갑각류의 껍질이나 곤충류의 cuticle층, 오징어나 크릴과 같은 연체류의 골격과 껍질, 그리고 곤충류, 버섯류 및 사상균 등의 세포벽 등에 존재하는 키틴을 고온에서 강알칼리로 처리하여 탈아세틸화로 생성된 천연고분자 물질이다(Muzzarelli, 1977). 이것은 D-glucosamine(2-amino-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranose)이  $\beta$ -1, 4 결합한 직쇄상의 난소화성 다당체로서 분자 내에 유리아미노기가 존재하며 chitinase, chitosanase 등 효소로 좀 더 분해하면 키토올리고당이 된다(Horowitz 등, 1957).

이러한 키틴·키토산 및 올리고당은 독성이 없고 흡착성, 보습성, 유화성, 생분해성을 나타내며 항균작용, 제산작용과 케양억제작용, 장내 유용세균의 성장촉진, 항종양활성, 식물세포의 활성화작용, 면역부활작용, 항균작용 등 다양한 생리적 기능을 나타내는 것으로 알려지고 있으며 항암, 항균 및 면역활성에 대한 다양한 연구보고가 나옴에 따라 생물 의학적인 응용에 많은 관심이 집중되고 있다(전 등, 1996).

키토산은 체내흡수에 다소 문제가 있어 최근 들어 체내 흡수가 빠른 키토올리고당에 관한 연구들(Kobayashi 등, 1984; 김과 전, 1997)이 활발해지면서 키토올리고당을 이용한 제품개발

에도 많은 연구들이 이루어지고 있다(김과 전, 1997; 최 등, 1997). 현재 국내에서 건강보조식품으로 키토산 가공식품을 규정하고 있는데, 이는 키토올리고당이 20%(w/w) 이상 함유되어야 한다(식품공전, 2000). 따라서 키토산 가공식품의 품질관리는 키토올리고당의 함량이 중요하다.

따라서 본 연구는 로타바이러스를 억제하는 생리 활성물질을 개발하고 식품첨가물로서의 적용 가능성을 확인하기 위한 기초자료로 이용하기 위하여 수행하였으며, 이에 많은 생리적 가능성을 갖고 있다고 알려진 키토산 유래물질 중 수용성 키토산과 키토산 올리고당의 당 함량을 식품가공 공정중 반드시 필요한 열처리 전·후 변화가 생기는지, 또한 어린이 바이러스성 설사증의 주요 원인인 human rotavirus (HRV)의 세포감염에 억제효과를 나타내는지를 확인하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 키토올리고당과 수용성 키토산

본 실험에서 사용된 키토올리고당 및 수용성 키토산(Kunpoong Bio, Korea)은 한국보건산업진흥원으로부터 제공받아 사용하였으며, 올리고당의 정량에 사용된 D-glucosamine 표준품은 N-acetyl-D-glucosamine(Sigma Chem. Co., USA)을 이용하였다.

### 2. 비색법에 의한 올리고당의 정량

열처리에 의한 키토올리고당과 수용성 키토산의 올리고당 함량 변화를 확인하기 위하여 90°C dry oven에서 1시간동안 열처리한 후, 열처리 전후의 당 함량 변화를 UV spectrophotometer(UVIKON 933, Italy)를 이용한 비색법으로 측정하였다(식품공전, 2000).

(1) 시료의 D-glucosamine 추출

시료의 D-glucosamine 추출은 0.04g의 시료를 물에 녹여 중화시키고 glass filter(3G3)로 여과한 후 검액을 100ml로 하였다. 이 때 지방성분이 있는 시료는 탈지한 후 사용하였으며, 검액 10ml에 HCl 7ml과 H<sub>2</sub>O 3ml을 가하고 혼합시킨 후 5ml을 취하여 탈기밀봉 후 105℃에서 24시간 반응으로 시료를 glucosamine으로 분해하였다. 분해된 시료는 60℃ 감압 하에 농축하여 HCl과 H<sub>2</sub>O를 제거한 후 증류수에 녹여 사용하였다.

(2) 비색법에 의한 올리고당의 정량

Glucosamine으로 분해한 여액 1ml을 취하여 acetyl acetone 1.5ml에 1.2N 탄산나트륨을 가하여 50ml로 만든 액 2ml과 혼합한 후 96℃에서 1시간 가열하고 흐르는 물에 냉각시켰다. 다시 96%(v/v) ethyl alcohol 20ml을 가하고 p-dimethylaminobenzaldehyde 1.6g에 HCl 3ml 그리고 96%(v/v) ethyl alcohol 30ml을 가하여 만든액 2ml을 가해서 혼합한 후 실온에서 2시간 방치한 다음에 530nm에서 흡광도를 5회 반복하여 측정하였다.

$$\frac{\text{표준용액의 농도}(\mu\text{g/ml}) \times \frac{S_a}{S_t} \times \frac{10}{\text{시료의 채취량}(g)} \times \frac{100}{10^6}}$$

S<sub>a</sub> : 검액의 흡광도  
S<sub>t</sub> : 표준용액의 흡광도

3. 세포배양과 바이러스

로타바이러스의 감염 또는 증식을 위한 배양 세포로는 Macacrus Rhesus monkey kidney cell(MA-104 세포)로 미국 Stanford University 의과대학의 Dr. Greenberg Lab으로부터 분양받

아 Medium 199 Earl's salts(No. 9466 : Irvine scientific. Santa Anna. CA.)에서 증식시킨 후 사용하였다. 세포의 증식과 유지는 M199에 불활성화시킨 7%의 Fetal bovine serum(FBS : GIBCO, USA)과 1% L-glutamin penicillin streptomycin(L-GPS: Irvine scientific. Santa Anna. CA.)을 혼합하여 75cm<sup>2</sup> 크기의 T-flask에서 매일 배지를 교환하면서 3~4일 후에 완전한 monolayer가 형성된 세포를 계대배양하여 사용하였다.

실험에서 사용한 바이러스로는 표준 HRV Wa(G1, P1A)와 S2(G2, P1B)를 Chiarini 등 (1983)의 방법에 의하여 3차례 계대배양 시킨 후 -20℃에서 냉동보관하며 사용하였다.

4. 키토올리고당과 수용성 키토산의 항 로타 바이러스성 탐색

(1) 로타바이러스의 역가측정

HRV의 역가분석은 Ruggeri와 Greenberg (1991)의 방법에 의하여 6 well culture plate를 이용한 plaque assay로 수행하였다. 불활성화시킨 HRV S2와 Wa를 10<sup>2</sup>~10<sup>7</sup>까지 희석하여 MA-104 세포의 monolayer가 형성된 6 well plate의 각 well에 0.5ml 넣어 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 37℃에서 1시간 동안 흡착시켰다. 바이러스액을 제거하고 agarose와 무혈청 M199(x2)를 1:1로 혼합하여 각 well마다 4ml씩 첨가하였고, agarose가 굳은 후에 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 37℃에서 6일 동안 배양하였다. 배양 후 neutral red (GIBCO, USA)로 7시간 동안 염색하여 fluorescent light box 위에서 plaque수를 계수하였다.

(2) 로타바이러스의 MA-104 세포감염에 대한 키토올리고당과 수용성 키토산의 영향분석

Kaljut 등(1988)의 방법을 응용한 AEC stain-

ing method에 따라 실시하였으며, MA-104 세포를 96 well plate에 monolayer가 형성되도록 배양하였고, 바이러스는 2회에 걸쳐 활성화시켜 이용하였다. 각각의 시료는 1g을 멸균증류수 49ml로 용해하여 0.45 $\mu$ m syringe filter로 여과하였다.

먼저 모든 well에 무혈청 M199 50 $\mu$ l씩을 넣고, 각 line의 첫 번째 well에 준비된 sample 50 $\mu$ l를 넣어 2배로 희석되어지게 하고 계속적으로 계단희석하여 2~1,024배까지 희석한 후 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 37 $^{\circ}$ C, 15시간 동안 배양하였다. Inhibitor로 첨가된 sample과 바이러스를 제거한 뒤 10% formalin을 이용하여 세포를 고정하였으며 다시 1% triton X-100을 각 well에 60 $\mu$ l씩 넣었고 상온에서 4분간 정치 후, 로타바이러스에 특이적 단백질 항체인 IB2와 2차 항체로 affinity purified antibody peroxidase HRP goat anti-mouse(IgG)(Kirkegaard & Perry, Gaithersburg, MD.)를 각각 1시간 동안 반응시켰다. AEC staining solution은 N, N-dimethylformamide (Sigma, No.D-4254) ml당 4mg의 3-amino-9-ethylcarbazole (Sigma, No.A-5754)이 첨가된 것과 0.05M sodium acetate buffer(pH 5.2), hydrogen peroxide(3:7:0.01)를 혼합하여 각 well에 60 $\mu$ l씩 첨가하였고 상온에서 10여분간 반응시켜 염색한 후 현미경(Olympus TE-3000, Japan)상에서 사진 촬영하였으며, inhibitor를 첨가하지 않은 대조구와 비교하여 바이러스 감염률을 계산하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 열처리 전후 키토올리고당과 수용성 키토산의 올리고당 함량 변화

흡광도를 이용한 열처리 전후 키토올리고당과 수용성 키토산의 올리고당 함량 변화를 Fig. 1에 나타내었으며, 각각의 흡광도 최고치와 최

Fig. 1. Changes of oligosaccharide concentration of chitooligosaccharide and water-soluble chitosan after heat treatment.

저치를 제외한 3회에 해당하는 수치의 percentage로 평균 $\pm$ 표준편차를 표시하였다. 그 결과 열처리하기 전 키토올리고당은 59.48%이며 이를 90 $^{\circ}$ C에서 1시간 열처리한 것은 54.31%로 약 5%정도 감소하였다. 또 수용성 키토산은 62.67%이며 열처리한 것은 60.45%로 약 2%정도 감소하였다. 키토올리고당과 수용성 키토산 모두 올리고당의 손실이 있었으나 수용성 키토산에서는 그 감소가 경미한 반면 키토올리고당에서는 상대적으로 감소량이 높았다. 이는 키토올리고당의 중합도가 수용성 키토산과 비교하여 상대적으로 낮기 때문인 것으로 사료된다.

#### 2. 로타바이러스 역가

본 실험에 사용한 로타바이러스의 감염가를 측정하기 위하여 HRV Wa와 S2를 10<sup>2</sup>~10<sup>7</sup>까지 희석하여 0.7% agarose가 함유된 배지에 6일간 배양한 후 neutral red staining에 의해 원형으로 탈색된 부분의 plaque forming unit(PFU) 수를 관찰하였으며, 그 결과 Wa는 1.2 $\times$ 10<sup>6</sup> PFU/ml이었고, S2는 3.0 $\times$ 10<sup>6</sup> PFU/ml이었다.

3. 키토올리고당 및 수용성 키토산에 의한 HRV의 MA-104 세포감염억제

키토올리고당 및 수용성 키토산의 항 로타바이러스성을 확인하기 위하여 HRV Wa와 S2에 키토올리고당과 수용성 키토산을 각각 농도 1.0~0.001%로 계단희석하여 첨가하고 MA-104 세포에 감염시킨 후 키토올리고당과 수용성 키토산이 첨가되지 않은 대조구와 비교하여 HRV의 감염 억제율을 계산하였으며, 그 결과는 Fig. 2과 3에 나타내었다.

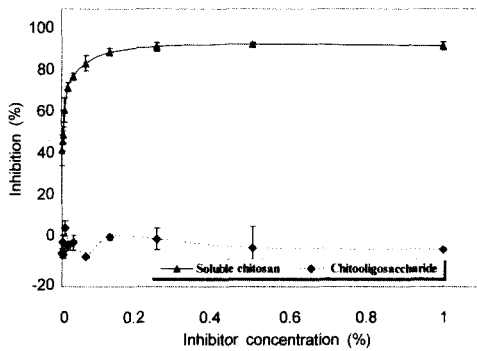


Fig. 2. Patterns of inhibitory effect of chitooligosaccharide and water-soluble chitosan on HRV S2 infected cells by AEC staining.

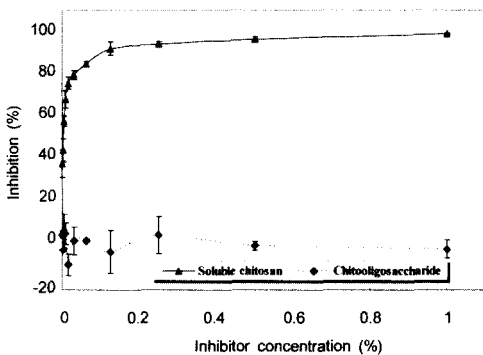


Fig. 3. Patterns of inhibitory effect of chitooligosaccharide and water-soluble chitosan on HRV Wa infected cells by AEC staining.

(1) 키토올리고당과 수용성 키토산이 HRV의 MA-104 세포감염에 미치는 영향

HRV Wa의 경우 수용성 키토산의 농도 0.004%에서  $51.05 \pm 3.66\%$ , 0.016%에서  $73.66 \pm 2.15\%$ , 그리고 0.125% 이상에서는  $89.92 \pm 1.68\%$ 의 감염 억제효과를 나타내었고, HRV S2는 0.004%에서  $58.02 \pm 2.48\%$ , 0.016%에서  $75.74 \pm 2.84\%$ , 그리고 0.125% 이상에서는 90% 이상의 감염억제효과를 나타내었다. 반면 키토올리고당의 농도에 따라 감염된 세포수에 다소간의 차이는 있으나 키토올리고당이 HRV Wa와 S2의 MA-104 세포감염에 있어서 억제효과를 나타냈다고 인정되지는 않았다.

Uchida 등(1988)은 키토산 및 키토올리고당의 항균작용에 대한 실험에서 40~50 mg 환원당/g 키토산 가수분해물이 키토산보다 높은 항균성을 보였으며, 중합도 3~4를 주체로 하는 가수분해물 보다는 중합도 5~6 이상의 것이 주성분인 가수분해물이 항균성이 강하였다고 보고하였고, 국내에서 조(1989)는 키토산 및 그 부분 가수분해물(수용성 키토산)을 이용한 항균실험에서 분자량 280만의 고분자 키토산(수용성 키토산)이 높은 항균성을 갖는다고 보고하였다. 결국 이는 Uchida 등(1988) 및 박(1999)이 보고한 키토산은 고분자 화합물보다는 가수분해가 다소 일어난 것(수용성 키토산)이 더 높은 항균성을 나타내지만 가수분해가 진행되어 갈수록 항균력이 떨어진다고 발표한 결과와 일맥상통하였다. 본 로타바이러스 억제 실험에서도 HRV의 종류에 따라 다소간의 차이는 있으나 수용성 키토산이 키토올리고당보다 HRV의 MA-104 세포감염을 억제하는 것으로 나타났다.

(2) 키토산 유래물질의 열처리에 의한 HRV의 MA-104 세포감염억제의 변화

키토산 유래물질의 열처리 후 HRV의 MA-

104 세포감염 억제실험에서는 처리1의 경우 63℃에서 5~30분까지 5분 간격으로, 처리2의 경우 90℃에서 2~10분까지 2분 간격으로 시료를 취하여 이것을 HRV의 inhibitor로 이용하였으며 대조구로는 열처리하지 않은 표준물질을 이용하였고 그 결과는 Fig. 4과 5에 나타내었다.

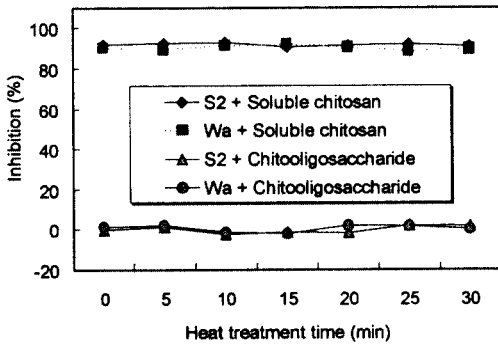


Fig. 4. Patterns of inhibitory effect of heat treated chitooligosaccharide and water-soluble chitosan on HRV infected cells by AEC staining. Inhibitor concentration : 0.25%. Heat treatment : 63°C/5~30min.

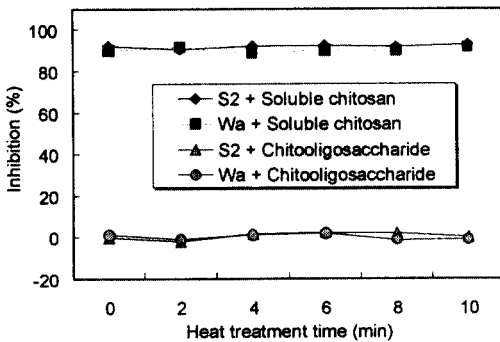


Fig. 5. Patterns of inhibitory effect of heat treated chitooligosaccharide and water-soluble chitosan on HRV infected cells by AEC staining. Inhibitor concentration : 0.25%. Heat treatment : 90°C/2~10min.

열처리에 의한 수용성 키토산은 HRV의 감염억제능력에 차이를 보이지 않았다. 열처리하지 않은 0.25%의 수용성 키토산은 HRV S2에 대해서 91.89%의 억제효과를 나타냈으며, 처리1의 경우 90.69~92.71%, 처리2의 경우 90.77~92.91%의 감염 억제율을 나타내었고 HRV Wa는 처리1의 경우 88.71~92.01%, 처리2의 경우 88.69~91.75%의 감염 억제율을 보여 열처리하지 않은 대조구와 비교하여 유의차가 있다고 볼 수 없다. 따라서 수용성 키토산은 열처리가 HRV의 감염억제에 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

키토올리고당은 HRV의 세포감염에 억제효과를 나타내지 않았으며, 이는 열처리 후에도 변화되지 않았다.

#### IV. 요 약

키토산의 탈아세틸화로 얻어지는 화합물인 키토산과 키토올리고당은 다양한 생리활성 기능을 나타내므로 생물의학적인 응용에 많은 관심이 집중되고 있다. 본 연구는 키토올리고당과 수용성 키토산의 열처리 후 올리고당 함량의 변화와 어린이 바이러스성 설사를 유발하는 HRV(human rotavirus)의 MA-104 세포감염에 억제작용을 나타내는지 확인하기 위하여 수행하였다. 그 결과 열처리 후 비색법으로 측정된 올리고당의 함량은 수용성키토산의 경우 62.67%에서 60.45%로 약 2%정도, 키토올리고당은 59.48%에서 54.31%로 약 5%정도 감소하였다. 키토산 유래물질의 항로타바이러스성 탐색은 AEC staining으로 측정하였으며, 수용성키토산은 농도 0.125% 이상에서 HRV S2의 세포감염에 있어 90% 이상의 감염 억제효과가 있었으며, HRV Wa의 경우 89% 이상의 억제효과가 있었다. 키토올리고당은 HRV의 세포감염에 억제효과가 없었다. 열처리한 시료의 경우, 수용

성 키토산과 키토올리고당 모두 열처리가 HRV의 감염 억제에 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다. 따라서 중합도가 높은 수용성키토산은 열처리를 거치는 식품에 첨가하여도 그 기능이 크게 감소하지 않으므로 향후 식품첨가물로서 이용가능성이 클 것으로 사료된다.

## V. 인 용 문 헌

- Bass, D. M., Baylar, M. R., Chen, C., Meng, L. and Greenberg, H. B. 1992. Libosome mediated transfection of intact viral particles reveals that plasma membrane determines permissivity of tissue culture cells to rotavirus. *J. Clin. Invest.* 90:2313-2320.
- Chiarini, A., Arista, S., Giammanco, A. and Sinatra, A. 1983. Rotavirus persistence in cell culture: Select of resistant cells in the presence of fetal calf serum. *J. Gen. Virol.* 64:1101-1110.
- Conner, M. E., Madson, D. O. and Estes, M. E. 1994. Rotavirus vaccines and vaccination potential. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 105:253.
- Cook, S. M., Glass, R. I., Le Baron, C. W. and Ho, M. S. 1990. Global seasonality of rotavirus infections. *Bulletin WHO* 68:171-177.
- Ebina, T., Sato, A., Umezu, K., Ishida, N., Ohyama, S., Oizumi, A., Ailawa, K., Katagiri, S., Katsushima, M., Imai, A., Kitaoka, S., Suzuki, H. and Konno, T. 1985. Prevention of rotavirus infection by oral administration of cow colostrum containing antihuman rotavirus antibody. *Medical Microbiology and Immunology*, 174:177-185.
- Ebina, T., Tusukada, K., Umezu, K., Nose, M., Tsuda, K., Hatta, H., Kim, M. and Yamamoto, T. 1990. Gastroenteritis in suckling mice caused by human rotavirus can be prevented with egg yolk immunoglobulin (IgY) and treated with a protein-bound polysaccharide preparation. *Microbiology and Immunology*, 34:617-629.
- Ebina, T. and Tusukada, K. 1991. Protease inhibitors prevent the development of human rotavirus induced diarrhea in suckling mice. *Microbiology and Immunology*, 35:583-588.
- Horowitz, S. T., Romeman, S. and Blumenthal, H. J. 1957. The preparation of glucosamine oligosaccharides. I. Separation. *J. Am. Chem. Soc.* 79:5046-5049.
- Kalgot, K. T., Shaw, R. D., Rubin, D. H. and Greenberg, H. B. 1988. Infectious rotavirus enters cells direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *J. Virol.* 62(4):1136-1144.
- Kapikian, A. Z. and Chanock. R. M. 1990. Rotaviruses. *Virology* 2, 2nd: In B. N. Fields and D. M. Knipe(ed), Raven press, New York. p. 1353-1404.
- Kobayashi, M., Watanabe, T., Suzuki, S. and Suzuki, M. 1984. Effect of N-acetylchitohexaose against *Candida albicans* infection of tumor-bearing mice. *Microbiology and Immunology*, 34:413-419.
- Muzzarelli, R. A. A. 1977. Enzymatic synthesis of chitin and chitosan. Occurrence of chitin. In *Chitin*, Muzzarelli, R. A. A.(Ed.), Pergamon Press, New York, p. 5.
- Ruggeri, F. M. and Greenberg, H. B. 1991. Antibodies to the trypsin cleavage peptide VP8 neutralize rotavirus by inhibition binding of virions to target cells in culture. *J. Virol.* 65 (5):2211-2219.
- Superti, F., Ammendolia, M. G., Valenti, P. and Seganti, L. 1997. Antirrotavial activity of milk proteins: lactoferrin prevents rotavirus infection in the enterocyte-like cell line HT-29. *Medical Microbiology and Immunology*, 186:83-91.
- Uchida, Y., Izumi, M. and Ohtakara, A. 1988. Preparation of chitosan oligomers with purified chitosanase and its application. *Annual Review of Japanese Society for Chitin and Chitosan.* 93~102.
- 김세권, 전유진. 1997. 키틴, 키토산의 생리활성 (2) 키틴·키토산 및 그 올리고당의 면역작용에 의한 항종양활성. *한국키틴·키토산연구회지.* 2(1):3-14.
- 박현국. 1999. Chitosan의 생산, 특성 및 이용. *한림원.* 서울. p. 61-77.
- 송진욱, 조홍찬, 이영진, 이종익, 박범석, 김용휘, 차광중, 유제현. 2000. 감초산이 송아지 로타바이러스의 MA-104 세포감염에 미치는 영향. *한국 BRM학회지.* 10(1):115-126.
- 식품공전. 2000. 식품의약품안전청. p. 361-363.
- 전유진, 이용호, 김세권. 1996. 키틴, 키토산의 생

- 리기능성 (1) 항균작용, 고혈압조절작용 및 콜레스테롤 개선작용. 한국키티틴·키토산연구회지. 1 (1):4-13.
21. 조학래. 1989. 저분자 chitosan의 항균성 및 식품 보존효과에 관한 연구. 부산수산대학교 박사학위 논문.
22. 차광중, 유대열, 이종기, 유제현. 1999. 락토페린 이 국내분리 유아 로타바이러스의 MA-104 세포 감염에 미치는 영향. 대한바이러스학회지. 29(2): 87-97.
23. 최연진, 김은정, 김영수, 신용철. 1997. 키토산 올리고당 생산을 위한 키토산 분해효소의 개발. 한국키티틴·키토산연구회지. 2(3):40-48.
- (접수일자 : 2002. 9. 2 / 채택일자 : 2002. 12. 11)