

Chitooligosaccharides의 마우스에 대한 급성 경구독성

박 헌 국

동남보건대학 식품영양과

Acute Oral Toxicity of Chitooligosaccharides in Mice

Heon-Kuk Park

Dept. of Food and Nutrition, Dongnam Health College

Abstract

Chitooligosaccharides were prepared by enzymatic hydrolyzing of crab shell chitosan. Low molecular weight chitooligosaccharides(LMW-chitooligosaccharides), 64.3% of which was composed of trimer, tetramer, and pentamer, was obtained by hydrolyzing chitosan with the chitosanase originated *Bacillus pumilus* BN-262. High molecular weight chitooligosaccharides(HMW-chitooligosaccharides), 49.3% of which was composed of chitooligosaccharides over heptamer, was obtained by hydrolyzing chitosan with the cellulase originated *Trichoderma viride*. Acute oral toxicity of chitooligosaccharides were tested in mice. Chitooligosaccharides did not have any toxic effect in mice and oral LD₅₀ value of chitooligosaccharides was over 5.0g/kg in mice.

Key words : chitooligosaccharides, acute oral toxicity, mice.

서 론

현대를 살아가는 모든 사람들은 아무런 질병 없이 건강하게 오래 살기를 원한다. 그러나 우리가 살고 있는 시대는 과학의 발달과 고도의 경제성장으로 인하여 편의주의적인 산업사회를 형성함으로써 이의 부산물로 환경오염, 기계문명의 분업화, 자동화, 교통수단의 발달로 인한 운동부족으로 건강과 체력의 저하를 가져오게 되었다. 특히 건강한 생활을 유지하기 위해서는 균형 잡힌 식생활을 영위하는 것이 중요하지만 외식 기회의 증가와 가공식품의 이용량이 매년 증가하면서 균형 잡힌 식생활을 영위하지 못하고 있다¹⁾.

균형 잡치지 않은 식생활과 노령인구의 증가로 인하여 암, 심장병, 뇌졸중 등을 비롯한 성인병과 노인성 치매 등이 증가하게 되었으며, 성인병과 노인성 질환의 증가는 의료비와 사회복지비를 증가시켜 국민의 부담을 증가시키고 있다. 성인병은 발생하면 의학적인 방법으로 치료하기가 어렵기 때문에 식생활 개선을 통한 예방이 가장 효과적인 것으로 알려져 있다. 따라서 기능성 식품은 질병을 예방함으로써 국민건강 증진에 크게 기여할 수 있을 것으로 판단된다²⁾.

현재 많은 종류의 기능성 식품이 제조되어 판매되고 있으며, 그 중에서도 chitosan과 chitooligosaccharides는 기능성이 높은 천연의 식품소재로서 관심이 집중되고 있다.

* 본 연구는 2003년도 동남보건대학 연구비 지원에 의하여 수행되었음.

† Corresponding author : Heon-Kuk Park, Dept. of Food and Nutrition, Dongnam Health College, Suwon 440-714, Korea.

Tel : 031-249-6423, E-mail : foodopia@dongnam.ac.kr

Chitosan은 polycation의 성질을 가지고 있어서 현재 응집제로서 각종 공업 분야에 널리 이용되고 있으며 최근에는 그 외에도 다양한 생리적 기능성을 가지고 있다는 사실이 밝혀지면서 의료, 생화학, 화장품, 식품, 화학 공업 및 농업용 등 다양한 분야에 응용 가능한 신소재로서 기대가 높아지고 있다^{3~10}. Chitosan의 다양한 생리 기능성은 이들의 화학구조의 차이에 따라 달라지는 것으로 알려져 있다. 즉, chitosan의 항암작용이나 면역증강작용은 체내에 흡수된 이후에 발휘될 수 있기 때문에 chitosan 자체보다도 올리고당이 유리한 반면, 혈압 강화작용이나 콜레스테롤 저하작용은 체내에 흡수되지 않은 식이섬유로서의 작용에 의존하기 때문에 고분자 chitosan이 유리하다. 이러한 이유로 chitosan 분야에서의 관심은 점차 올리고당의 생리 기능성 쪽으로 집중되고 있다.

이에 따라서 chitooligosaccharides를 생산하는 것과 관련된 연구는 많이 진행되어 왔으나^{11~19} chitooligosaccharides가 갖는 생리적 기능성에 관한 연구^{20~24}와 chitooligosaccharides의 이용에 관한 연구는 아직도 극히 미미한 실정이다.

본 연구에서는 chitosan을 효소적 분해법으로 분해하여 저분자량 chitooligosaccharides와 고분자량 chitooligosaccharides를 제조하였고 마우스에 대한 급성 경구 독성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. Chitooligosaccharides의 제조

전보²⁵의 방법과 동일한 방법으로 저분자량 chitooligosaccharides(LMW-chitooligosaccharides)와 고분자량 chitooligosaccharides(HMW-chitooligosaccharides)를 제조하였다.

2. Chitooligosaccharides의 마우스에 대한 급성 경구 독성

Chitooligosaccharides의 급성독성 실험은 의약품 등의 독성시험 기준²⁶에 준하여 실험하였다.

실험동물로는 4주령의 ICR계 mouse를 대한실험동물센터에서 구입하여 사용하였다. 동물 입수 후 1주일간 순화시키고 순화기간 중 일반상태를 관찰하여 건강한 동물만을 실험에 사용하였다. 온도 23±3℃, 상대습도 50±10%, 환기 회수 10~12회/hr, 형광등 명암 12시간 주기, 조도 300~500Lux의 사육환경에서 폴리 카보네이트 사육상자 (280W × 420L × 170H mm) 케이지에 각각 10마리씩 넣어 사육하였다. 사료는 실험

동물용 고형사료를 자유로이 공급하였으며 음수는 정제수를 자유로이 섭취시켰다. 투여 가능 최대용량인 5g/kg을 최고 용량군으로 하고 일정 공비를 주어 모두 5개의 투여 용량군을 설정하였다. 실험동물은 각 군당 평균 체중이 비슷하게 되도록 균분리를 하였으며 각 용량군에 암수 각각 5마리가 되도록 하였다. 모든 실험동물에 대하여 투여 당일에는 투여 후 6시간까지 매 시간, 투여 다음날부터 관찰 종료일인 투여 후 14일까지는 1일 1회씩 동물의 일반 상태의 변화, 중독증상 및 폐사동물의 유무를 관찰하였다. 또한 모든 실험동물에 대하여 시험물질 투여 직전과 투여 후 4, 7, 11일 그리고 부검일인 14일에 체중을 측정하여 체중의 변화를 관찰하였다. 관찰기간 종료 후 부검하여 외관 및 내부 장기의 이상 유무를 육안으로 관찰하였다.

3. 통계학적 분석

LD₅₀치의 산출에는 Litchfield-Wilcoxon법²⁷을 이용하였으며 체중에 대한 유의성 검정을 위해서는 one-way ANOVA test를 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 일반증상 및 폐사의 관찰

암·수 각각 5마리씩의 마우스에 투여 가능한 최고 용량인 체중 kg 당 5g까지의 chitooligosaccharides를 투여하여도 모든 실험동물군에서 전혀 사망한 예는 관찰되지 않았다(Table 1, Table 2). 또한 실험 전기간을 통하여 chitooligosaccharides에 의한다고 생각되는 외관적인 이상증상도 발견되지 않았다(Table 5, Table 6).

모든 chitooligosaccharides 투여군과 대조군의 수컷, 암컷에 대하여 체중변화를 측정한 결과 체중의 변화에 유의적인 차이가 발견되지 않았다(Table 3, Table 4).

투여 14일이 경과한 후 부검하여 육안으로 장기의 이상여부를 조사한 결과 5g/kg 투여군에서도 비정상적인 변화가 발견되지 않았다(Table 5, Table 6).

2. LD₅₀

암·수 각각 5마리씩의 마우스에 투여 가능한 최고 용량인 체중 kg 당 5g까지의 chitooligosaccharides를 투여하여도 아무런 이상증상이 관찰되지 않았다. 따라서 chitooligosaccharides의 반수치사량은 5g/kg 이상인 것으로 추정된다.

이와 같은 결과는 전 등²⁸이 Sprague-Dawley 랫드에 대한 chitooligosaccharides의 급성경구독성을 시험한

Table 3. Body weight changes of mice treated orally with LMW-chitooligosaccharide

Sex	Dose (g/kg)	Day after treatment				
		0	4	7	11	14
Male	0.0	18.23 ± 1.21 ^a	19.73 ± 4.21	21.63 ± 4.74	23.75 ± 3.33	26.76 ± 3.89
	1.0	19.12 ± 3.23	20.32 ± 4.80	22.12 ± 6.93	24.54 ± 9.04	27.49 ± 8.78
	1.5	17.36 ± 8.13	18.96 ± 9.81	20.96 ± 10.92	23.12 ± 11.30	26.01 ± 12.86
	2.2	18.36 ± 5.49	19.86 ± 3.43	21.76 ± 4.42	24.01 ± 5.35	26.89 ± 5.50
	3.3	19.46 ± 2.38	21.06 ± 5.95	22.76 ± 6.90	25.21 ± 8.11	28.16 ± 7.86
	5.0	17.47 ± 4.18	19.27 ± 4.19	21.37 ± 5.36	23.61 ± 5.83	26.83 ± 7.43
Female	0.0	16.21 ± 4.21	17.71 ± 5.46	19.91 ± 5.58	22.14 ± 8.21	25.13 ± 10.42
	1.0	18.47 ± 8.09	20.07 ± 7.22	21.87 ± 9.09	23.86 ± 11.16	26.74 ± 12.61
	1.5	19.52 ± 3.07	20.92 ± 5.72	22.72 ± 4.16	25.28 ± 5.43	28.02 ± 5.12
	2.2	17.42 ± 4.91	19.22 ± 3.88	21.13 ± 4.89	23.15 ± 4.48	26.09 ± 7.70
	3.3	18.93 ± 4.54	20.43 ± 4.68	22.27 ± 5.56	24.62 ± 5.01	27.63 ± 6.84
	5.0	19.01 ± 5.49	20.61 ± 8.09	22.46 ± 8.20	24.58 ± 8.18	27.57 ± 9.53

^a Each value represents the mean ± S.D. of 5 mice.

Table 4. Body weight changes of mice treated orally with HMW-chitooligosaccharide

Sex	Dose (g/kg)	Day after treatment				
		0	4	7	11	14
Male	0.0	17.47 ± 2.43 ^a	18.79 ± 4.48	21.02 ± 5.21	24.03 ± 3.39	26.26 ± 5.21
	1.0	18.12 ± 7.58	19.35 ± 4.21	21.59 ± 4.29	24.82 ± 5.41	27.06 ± 4.31
	1.5	17.59 ± 6.28	18.91 ± 5.42	21.47 ± 3.28	24.71 ± 7.18	27.16 ± 6.42
	2.2	16.96 ± 7.21	18.11 ± 6.48	20.36 ± 5.13	23.92 ± 4.92	26.93 ± 3.39
	3.3	18.58 ± 4.48	19.72 ± 5.41	21.95 ± 3.19	24.48 ± 5.23	27.37 ± 4.48
	5.0	17.12 ± 3.59	18.26 ± 4.18	20.82 ± 5.92	24.32 ± 6.52	26.88 ± 5.01
Female	0.0	16.42 ± 4.59	17.65 ± 3.24	20.21 ± 4.48	23.83 ± 4.92	27.06 ± 5.49
	1.0	16.74 ± 5.21	18.09 ± 6.48	20.33 ± 7.14	23.75 ± 6.09	26.87 ± 7.08
	1.5	17.21 ± 6.98	18.56 ± 5.41	21.21 ± 4.19	24.33 ± 3.51	27.45 ± 4.45
	2.2	18.01 ± 4.91	19.23 ± 5.01	21.46 ± 6.48	25.02 ± 5.12	28.25 ± 6.09
	3.3	17.54 ± 2.14	18.99 ± 3.98	21.43 ± 5.13	24.85 ± 7.12	27.86 ± 8.07
	5.0	18.12 ± 4.41	19.37 ± 4.21	21.45 ± 3.21	24.87 ± 4.09	28.01 ± 5.01

^a Each value represents the mean ± S.D. of 5 mice.

Table 5. Clinical signs of mice treated orally with LMW-chitooligosaccharide

Sex	Dose (g/kg)	Clinical sign	Hour after treatment						Day after treatment																
			1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14			
Male	0.0	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.0	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.5	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2.2	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3.3	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5.0	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Female	0.0	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.0	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.5	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2.2	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3.3	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5.0	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

¹NAD : No abnormality detected.**Table 6. Clinical signs of mice treated orally with HMW-chitooligosaccharide**

Sex	Dose (g/kg)	Clinical sign	Hour after treatment						Day after treatment																
			1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14			
Male	0.0	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.0	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.5	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2.2	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3.3	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5.0	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Female	0.0	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.0	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.5	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2.2	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3.3	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5.0	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

¹NAD : No abnormality detected.

결과 투여 가능한 최대 용량인 5,000mg까지 경구투여 하여도 사망이나 체중변화 및 병변현상 등을 전혀 발견할 수 없었으며, 병리조직학적 관찰에서도 간, 신장, 폐, 위, 소장 및 소뇌 등에서 아무런 이상증상을 발견하지 못하였다고 하는 결과와 잘 일치하였다.

이와 같은 사실로 미루어 볼 때 chitooligosaccharides는 극히 안전성이 높은 물질이라고 판단되며 특히 chitooligosaccharides를 식품첨가물로 사용하는 경우는 양적으로도 소량이므로 안전성에 관해서 문제가 없으리라고 추정된다. 그러나 아직까지 장기간에 걸친 섭취에 의한 만성독성, 유전독성, 사람에 대한 다면적인 연구 결과가 절대적으로 부족하며 앞으로 체계적인 검토가 더 진행되어야 할 것이라고 생각된다.

요 약

Chitosan을 *Bacillus pumilus* BN-262 유래의 chitosanase로 처리하여 trimer, tetramer, pentamer가 전체 올리고당 중 64.3%에 달하는 비교적 저분자의 chitooligosaccharides로 구성된 LMW-chitooligosaccharides를 얻었으며, chitosan을 *Trichoderma viride* 유래의 cellulase로 처리하여 중합도 7 이상의 것이 전체 올리고당 중 49.3%에 달하는 상대적으로 분자량이 큰 chitooligosaccharides로 구성된 HMW-chitooligosaccharides를 얻었다. 제조된 Chitooligosaccharides의 마우스에 대한 급성 경구독성을 조사하였다. Chitooligosaccharides는 마우스에 대하여 어떠한 독성 효과도 보이지 않았으며 반수치사량은 5g/kg 이상인 것으로 추정되었다.

참고문헌

1. 송병춘, 맹원재 : 현대인의 식생활과 건강, 건국대학교 출판부, 서울, p. 67~82(1996)
2. 박현서, 이영순, 구성자, 한명주, 조여원 : 식생활과 건강, 효일문화사, 서울, p. 239~253(1997)
3. Maezaki, Y., Tsuji, K., Nakagawa, Y., Kawai, Y., Akimoto, M., Tsugita, T., Takekawa, W., Terada, A., Hara, T. and Mitsuoka, T. : Hypocholesterolemic effect of chitosan in adult males, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**(9), 1439~1444 (1993)
4. 田口智子, 加藤秀夫, 奥田拓道, 多嘉良稔 : 日本農藝化學會誌67(大會講演 要旨集), p.315(1993)
5. 内田泰 : キチン・キトサンの抗菌性, *フードケミカル*, 1988-2, 22~29 (1988)
6. 内田泰 : キチン・キトサンおよび関連化合物の抗菌性とその応用, *化學工業*, 1991-10, 37~43 (1991)
7. 福井春雄, 藤原公, 村岡高志, 次田隆志 : キチン・キトサンによる作物の生長促進効果 第1報 生長促進とその作用性, *日作四國支紀*, **26**, 1~8(1989).
8. 福井春雄, 正田敏幸, 藤原公, 村岡高志, 次田隆志 : キチン・キトサンによる作物の生長促進効果 第2報 各種作物への栽培適用性, *日作四國支紀*, **26**, 9~16(1989)
9. Suzuki, S., Okawa, Y., Okura, Y., Hashimoto, K. and Suzuki, M. : in *Chitin and Chitosan Proceedings of the Second International Conference on Chitin/Chitosan*, ed. by Hirano, S. and Tokura, S. The Japanese Society of Chitin and Chitosan, Tottori Univ., Tottori, p.210(1982)
10. 石倉俊治 : キチンとキトサン, *月刊フードケミカル*, 1993-6, 62~64(1993)
11. Uchida, Y., Izumi, M. and Ohtakara, A. : Preparation of chitosan oligomers with purified chitosanase and its application, *Annual Review of Japanese Society for Chitin and Chitosan*, pp. 93~102(1988)
12. Horowitz, S.T., Roreman, S. and Blumenthal, H.J. : The preparation of glucosamine oligosaccharide - I. Separation, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 5046~5049 (1957)
13. Izumi, M. and Ohtakara, A. : Preparation of D-glucosamine oligosaccharides by the enzymatic hydrolysis of chitosan, *Agri. Biol. Chem.*, **51**(4), 1189~1191(1987)
14. Aiba, S. : Studies on chitosan: 4. Lysozymic hydrolysis of partially N-acetylated chitosan, *Int. J. Biol. Macromol.*, **14**, 225~228(1992)
15. Muraki, E., Yaku, F. and Kojima, H. : Preparation and crystallization of D-glucosamine oligosaccharides with dp. 6~8, *Carbohydrate Research.*, **239**, 227~237(1993)
16. 坂井和男 : キチン・キトサンオリゴ糖の開発と現状, 別冊フードケミカル-I, 食品化學新聞社, pp.106~111(1987)
17. 坂井和男, 南條文雄, 碓氷泰市 : キチン・キトサンオリゴ糖の生産と利用, *澱粉科學*, **37**(2), 79~86(1990)
18. 김순영 : *Aspergillus fumigatus* KH-94로부터 분리한 Chitosanase의 특성과 된장중 Chitooligosaccharide의 면역분석법 개발, 서울대학교 박사학위논문(1997)
19. 홍상필, 김동수 : *Trichoderma viride* 및 *Trichoderma reesei* 유래 Cellulase의 키토산 분해 특성, *한국식품과학회지*, **30**(2), 245~252(1998)
20. 戸倉清一 : キチン,キトサンの生理活性について, 別冊フードケミカル-I, 食品化學新聞社, pp. 5~11(1987).
21. 戸倉清一 : キチンおよびキトサンの免疫賦活性, *月刊フードケミカル*, **1995-2**, 19~24(1995)
22. Tokoro, A., Tatewaki, N., Suzuki, K., Mikami, T. and Suzuki, S. : Growth-Inhibitory effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose against Meth-A solid tumor, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**(2), 784~790(1988)
23. Hadwiger, L.A., Fristensky, B. and Riggleman, R.C. : *In Chitin, chitosan and related enzymes*, Academic Press, Orlando, p.291(1984)

24. 欠吹念 : 最後のバイオマスキチンキトサン, 枝報堂出版, p.1(1988)
25. 박현국 : Chitooligosaccharides의 항균성. *한국식품영양학회지*, **14**(6), 579~584(2001)
26. 식품의약품안전청 : 의약품 등의 독성시험 기준. 식품의약품안전청 고시 제 1998-56호. 1127(1998)
27. Zbinden, G. and Flury-Roversi, M. Significance of the LD₅₀ test for toxicological evaluation of chemical substance, *Arch. Toxicol.*, **47**, 77~99(1981)
28. 전유진, 김세권 : 키토산 및 올리고당의 랫드에 대한 급성경구독성, *한국키티킨키토산학회지*, **4**(2), 115~120(1999)

(2003년 11월 30일 접수)