

특집 : 수산자원의 건강기능성 연구 및 산업화

키토산: 농산물 생산에서 유용물질 및 저장성 증가를 위한 regulatory molecule로서의 이용

함 경 식

목포대학교 생물산업학부 식품생물공학전공

Utilization of Chitosan as a Regulatory Molecule to Increase Health-beneficial Substance and Shelf-life of Agricultural Products

Kyung-Sik Ham

Department of Food Biotechnology, Mokpo National University, Chonnam 534-729, Korea

한국-칠레간 자유 무역 협정 발효, 세계무역기구(WTO)의 새로운 무역 협상 출범, 중국의 WTO 가입 등으로 한국의 농업은 매우 어려운 상태에 놓여 있다. 이러한 어려움을 타개하기 위한 방편으로 한국에서 농업에 종사하는 사람 대부분은 우리나라 농업은 고품질 농산물 생산을 통한 외국농산물과의 차별화 전략으로 가야 한다고 생각한다. 그러나 막상 고품질 농산물 생산을 하려고 해도 외국을 포함한 다른 지역 농산물과 우리 농산물을 특별히 다르게 하는 개발된 기술이 많지 않은 실정이다. 이러한 상황에서 우리 농산물이 고려하여야 할 것 중의 하나가 기능성 물질이 아닐까 생각한다. 농산물에는 항암물질, 혈압강하 물질, 골다공증 억제물질, 노화억제물질 등 성인병에 효과가 있는 다양한 기능성 물질이 존재하고 있으며 이들 물질들이 인체 내에 들어가 어떤 기작에 의해 효과가 나타나는지 빠르게 발전하는 생명과학에 의해 하나하나 밝혀지고 있다. 그러므로 늘어나는 노인 인구와 성인병증가에 의해 앞으로 이들 기능성 물질의 중요성은 더욱 더 커질 것이다. 그러나 아직 많은 농산물에 있어서 품질을 이야기할 때 기능성 물질에 대한 고려가 많이 되지 않고 있는 실정이다. 앞으로 농산물에서 기능성 물질은 농산물 차별화에 중요한 요소가 될 것이며 이에 대한 관심은 전 세계적으로 점점 더 높아지고 있다.

현재 세계 여러 연구그룹에서 농산물의 기능성물질을 증가시키려는 시도가 되고 있으며 일부는 성공하기도 하였다. 기능성물질의 증가를 위해 육종을 이용하는 방법, 유전자 조작방법 등이 이용되고 있는데 육종방법은 품종 개발 때까지 시간이 오래 걸리는 문제가 있고 유전자조작 방법은 소비자의 선호도가 떨어져 우리나라와 같이 고품

질 농산물 생산을 통해 고가의 제품을 판매하려는 경우에는 어려움이 있다고 생각된다. 많은 기능성물질은 이차대사산물로서 자극 등 환경변화에 민감하게 생합성 과정이 변한다. 그래서 본 연구팀은 식물세포에 자극을 주어 식물 이차대사산물의 생합성과정에 영향을 주어 기능성물질량을 변화시킬 수 있지 않을까 생각하게 되었다. 이런 목적으로 식물세포 자극물질 중 하나인 키토산을 이용하여 일부 농산물에 시도하여 항암물질 등의 기능성물질을 증가시킬 수 있었다. 또한 기능성 물질을 증가시킴과 더불어 병에 대한 저항성을 증가시켜 재배 중 농약사용을 줄이고 수확 후에도 저장성이 증가되는 부수적인 결과를 얻어 앞으로 이런 목적으로 키토산이 많이 이용됐으면 하는 바람으로 그 결과를 보고하는 바이다.

키토산의 생리활성 기능과 다양한 이용

키토산은 glucosamine이 β -1,4-linkage로 연결된 탄수화물로서 키틴을 탈아세틸화하여 쉽게 얻을 수 있다. 키틴은 곰팡이 세포벽, 게, 새우 껍질에 다량 존재하는 탄수화물로서 지구상에 셀룰로스 다음으로 풍부히 존재하는 탄수화물이다. 현재 키토산은 주로 게, 새우껍질을 이용하여 얻는데 버려져서 환경오염의 원인이 되는 이들을 이용하는 것은 자원재활용측면에 있어서도 바람직할 것이다.

이런 측면 이외에 키토산은 여러 가지 고무적인 생리활성 기능을 갖고 있어 이의 이용방법이 다방면으로 연구되고 있다(Table 1).

키토산은 골다공증을 치료하는데 효과가 있고 항종양 효과, 혈중 콜레스테롤 저하효과, 그리고 장내의 유용 세균 증식효과 등이 알려져 의학, 식품분야에서 다양하게

Table 1. Applications of chitosan

Applications	Examples
Water Treatment	Removal of metal ions flocculant Coagulant : Proteins, Dyes, Amino acids filtration
Pulp and Paper	Surface treatment, Photographic paper, Carbonless copy paper.
Medical	Bandages, Sponges, Artificial blood vessels, Blood cholesterol control, Tumor inhibition, Membranes, Dental/plaque inhibition Skin burns/artificial skin.
Cosmetics	Make-up powder, Nail polish, Moisturizers, Fixtures, Bath lotion, Face, Hand and body creams, Toothpaste, Foam enhancing.
Biotechnology	Enzyme immobilization, Protein separation, Chromatography, Cell recovery, Cell immobilization, Glucose electrode
Agriculture	Seed coating, Leaf coating, Hydroponic/ fertilizer, Controlled agrochemical release
Food	Removal of dyes, Solids, Acids Preservatives, Color stabilization Animal feed additive
Membranes	Reverse osmosis, Permeability control, Solvent separation

이용하려는 시도가 되고 있다. 또한 키토산은 항균효과, 상처 회복효과가 있음이 알려져 상처 치료제로서의 이용도 연구되고 있다.

이외에도 키토산의 물리적 성질을 이용하려는 연구도 진행되고 있다. 키토산은 보습효과 등이 있어 화장품 등에서도 이용이 되고 있고 특히 키토산은 중금속, 단백질과 같은 고분자 물질에 대한 흡착 능력이 뛰어나 폐수처리 등에서도 이용되며 그 효과가 입증되고 있다. 또한 식물에 있어서는 식물세포의 생리활성 조절능력이 있어 식물성장을 촉진하기도 하고 식물의 외부 병원균에 대한 저항성을 증가시킨다는 것이 밝혀졌다. 이런 성질을 이용하여 과채류에 키토산을 처리하였을 때 과채류를 오래 저장할 수 있었고 쌀, 감자 등 식물 종자에 키토산을 코팅하였을 때 수확량이 증가했다는 보고가 있다. 그러나 아직 키토산이 어떤 작용을 하여 이런 효과가 있는지 자세한 기작은 전혀 모르는 상태이다.

농업용소재로서의 키토산의 이용: 기능성 물질, 저항성을 증가시키기 위한 조절자(regulatory molecule)로서의 이용

식물의 방어능력을 향상시키는 regulatory molecule (elicitor)로서의 키토산과 세포내 신호전달(signal transduction)

Elicitor는 1970년대 후반부터 알려지기 시작한 것으로

식물의 여러 가지 방어기작을 증가시키는 모든 분자들로 정의가 내려진다. Elicitor는 식물이 병원균의 침입을 어떻게 인식하고 방어태세를 갖추는지를 연구하다가 발견된 것이다. 대부분의 elicitor는 병원균의 구성 성분 또는 병원균에 의해 부서지는 식물의 구성 성분으로 식물은 진화를 거치면서 이런 성분을 병원균으로 인식, 병원균에 대한 방어태세를 갖춘다고 이해되고 있다. Elicitor에는 단백질, 탄수화물, 지방산 등이 있는데 키토산, 키토산도 elicitor의 한 종류로 분류된다. 키토산은 위에서 언급한대로 인체에 면역증가효과 등 여러 생리활성이 보고된 것과 같이 식물에서도 성장을 촉진하기도 하고 외부 병원균에 대한 저항성을 증가시킨다는 것이 보고되어 있다. 식물이 키토산을 인식할 수 있게 된 것은 곰팡이 균의 세포벽에 있는 키토산이 효소에 의해 deacetylation되어 키토산이 만들어지는데 식물은 오랜 세월 곰팡이와 상호작용하면서 키토산을 인식하는 system을 진화시켜왔을 것이라 믿어지고 있다. 다른 종류의 elicitor이면서 본 연구에 사용된 β -glucan은 곰팡이, 효모, 세포벽 등에서 쉽게 얻을 수 있으며 β -1,3, β -1,6-linkage로 이루어진 탄수화물로서 콩 등의 식물에서 식물방어단백질, 일종의 항생물질인 phytoalexin을 만들게 하는 signal로 작용하여 식물이 병원균에 대한 저항성을 증가하게 만든다. 특히 β -glucan elicitor의 콩에 있어서 역할은 몇 연구 group에 의해 β -glucan receptor 등 매우 깊이 있게 밝혀져 있다.

키토산은 여러 종류의 식물에서 방어기작을 증가시키는 것으로 보고되고 있다. 그 예로 키토산 처리는 완두, 파슬리 등에서 일종의 항생물질인 phytoalexin 합성 증가를 일으키고 토마토, 감자 등에서는 방어단백질인 proteinase inhibitor 합성을 증가시킨다고 보고되었다. 그리고 토마토, 파슬리의 세포배양에 있어 키토산 처리는 β -1,3-glucan인 callose 합성을 촉진시키고 slash pine 세포배양에 있어서는 리그닌 합성을 촉진시키는 것이 보고되었다. Callose와 리그닌 합성증가는 병원균 공격에 대하여 세포 저항성을 증가시킨다고 믿어져 오고 있다.

Elicitor 활성을 위한 키토산·키토산의 구조(크기와 N-acetylation 정도)는 식물과 조사하는 방어기작에 따라 달라짐이 보고되고 있다. 예를 들어 토마토와 감자에 있어 proteinase inhibitor 합성을 증가시키기 위해서는 키토산·키토산의 크기가 DP(degree of polymerization) >4 이면 된다. 완두에서 phytoalexin 합성을 증가시키기 위해서는 DP >7 인 키토산이 필요하였다. 이때 키토산은 완두에서 이런 활성을 보이지 않았다. 벼의 세포배양에 있어서 DP >4 인 키토산 올리고당은 phytoalexin 합성을 보이는데 비해 키토산 올리고당은 거의 이런 활성을 보이지 않았다.

식물체가 elicitor를 어떻게 인식하고 그 자극이 염색체

까지 어떻게 전달되는 지는 오랫동안 관심이었다. 키틴의 경우에는 elicitor의 활성을 갖는 키틴 올리고당과 특이적으로 결합하는 단백질 즉 잠정적인 키틴 수용체 단백질의 존재가 벼 세포와 토마토 세포막에서 확인되었고 벼의 경우 75 kD의 분자량을 가진 단백질이 동정되었다. 키틴을 벼 세포에 처리하였을 경우 membrane depolarization이 일어나는데 이것은 키틴의 자극이 핵으로 전달될 때 membrane potential이 변하는 것도 신호전달 과정의 하나란 것을 제시한다. 또한 벼에 있어 wounding의 신호전달물질로서 많이 알려진 Jasmonic acid (JA)의 양이 키틴 처리에 의해 증가하고 Jasmonic acid를 외부에서 처리하였을 때 벼에 키틴을 처리한 것과 같이 phytoalexin 합성이 증가, 그리고 JA 생합성 저해제를 처리하면 phytoalexin 합성이 억제되는 사실로 보아 JA는 키틴 signal transduction pathway의 중간물질이라고 추정된다. 한편 키틴을 토마토에 처리하였을 때 protein phosphorylation이 증가함으로 보아 키틴 signal transduction pathway는 protein phosphorylation을 포함한다고 추정된다.

키토산의 경우는 키틴의 signal transduction pathway와 같이 많은 연구가 안되어 있다. 키틴의 경우와 달리 수용체 단백질을 통해 신호전달이 되지 않고 키토산의 (+)전하와 세포막의 (-)전하가 상호작용하여 신호전달이 이루어진다고 제안되고 있기도 하다. 그리고 protein phosphorylation이 토마토 세포의 callose 합성 신호전달과정에 없다고 제안되기도 하였다. 아직 많은 부분이 연구되어야 할 분야다.

이상과 같은 사실로부터 식물에 키토산을 처리할 때 식물세포 내에 많은 생화학적인 변화가 일어남을 알 수 있다.

키토산을 이용하여 유용성분이 증가된 콩나물의 생산 및 이를 통한 콩나물의 고부가가치화

콩나물, 콩의 건강유용성분: 대두는 여러 가지 유용한 생리활성물질을 갖고 있기 때문에 현대인들에게 건강식으로 인기가 높아지고 있다. 이들 유용생리활성물질 중 genistein, daidzein과 같은 isoflavonoid가 많은 관심을 끌어 연구의 대상이 되어오고 있다.

Genistein은 *in vitro* 실험, 동물실험, 임상실험에서 뛰어난 항암효과를 가지고 있음이 밝혀졌고 유방암과 전립선암의 예방효과가 높다고 알려졌다. Genistein의 항암효과는 tyrosine kinase 저해작용, angiogenesis 억제작용, topoisomerase 저해작용 등을 통해 설명되고 있다. 또한 genistein은 체내에서 여성호르몬인 estrogen과 유사한 작용을 하기 때문에 phytoestrogen으로 불리기도 하며 폐경기 여성의 estrogen 결핍으로 유발되는 골다공증의 예방과 진행억제에도 효과가 있는 것으로 알려지고 있다.

Daidzein은 뼈에서 혈액으로 칼슘의 재흡수를 억제함으로써 노인과 여성의 골다공증 방지에 효과적이라는 연구가 발표되었다. 또한 최근에는 이들 isoflavonoid를 유아시기에 많이 섭취하면 성인이 되어서도 유방암 등 호르몬 의존성 질병 발생률이 훨씬 낮아진다는 보고가 있다. 최근의 다른 발표에 의하면 isoflavonoid를 함유한 대두단백은 치매예방효과를 갖기도 한다는 보고가 있다. 이런 유용성과 더불어 isoflavonoid는 콩이 심혈관 질환을 낮추는데 있어 관여하는 주요성분이라는 보고도 있다. 이와 같이 콩 isoflavonoid 성분의 유용성 등이 밝혀지면서 미국 등에서는 대두가공식품의 판매가 급성장하고 있고, 최근에는 isoflavonoid 성분만을 추출하여 상품화되고 있다. 그러므로 이전에는 isoflavonoid 성분이 콩 가공제품의 쓸쓸한 뒷맛에 관계하여 함량을 낮추는 연구가 진행되었으나 최근에는 오히려 증가시키는 방향으로 관심이 모아지고 있다. 그러나 isoflavonoid를 증가시키려는 대분의 연구는 유전자 조작방법을 이용하기 때문에 소비자의 선호도가 떨어지는 것이 우려되고 있다. 어쨌든 앞으로 사회적으로 노년층이 증가하여 골다공증, 암 등의 노인성 질병 증가가 예상되기 때문에 isoflavonoid를 많이 함유한 콩의 수요는 더욱 더 증가할 것이다. 그러므로 기술적, 경제적으로 가능하면서 유전자조작방법을 이용하지 않는 isoflavonoid 증가 방법이 있다면 이에 대한 연구지원이 이루어져야 할 것이다.

키토산을 이용한 콩나물의 고부가가치화: 콩나물은 우리나라에서 매년 약 8,000억 원 정도의 시장규모를 가진 식품으로 많은 국민의 사랑을 받고 있다. 그러나 습도가 높은 환경에서 재배가 이루어지기 때문에 병 발생이 많아 특히 여름에 여러 재배 공장에서 농약을 사용하여 매년 여름이면 문제가 되고 있다. 또한 콩나물은 미생물 오염이 많아 수확 후 2~3일 정도의 짧은 유통기간으로 수확된 콩나물의 많은 부분이 버려지는 손실이 있다. 그러므로 콩나물 재배 시 농약 사용을 줄일 수 있는 재배 방법 및 수확 후 저장기간을 연장시키는 방법에 대한 연구는 절실하다 하겠다.

본 연구는 콩나물 재배에서 문제가 되고 있는 농약 사용을 줄이기 위함과 더불어 콩나물의 기능성 물질을 증가시키기 위한 시도로 키토산 등의 elicitor를 사용하였으며 이의 이용이 콩나물에 어떤 영향을 주는 지를 조사하였다. 이런 연구를 위해서 콩나물은 많은 장점을 갖고 있다. 즉 콩나물은 4~5일의 짧은 기간에 재배가 가능하고 실험실 안의 좁은 면적에서 많은 시료를 쉽게 획득할 수 있는 장점이 있다. 그리고 무엇보다 대두는 세계의 주요 작물로서, 유전자, 단백질 등의 정보가 풍부하여 연구에 많은 잇점이 있다. 그러므로, 콩나물은 산업적 가치 이외에 키토

산효과의 작용기작을 밝히는 model system으로도 연구할 가치가 있기 때문에 본 연구에서는 콩나물이 선택되었다.

이런 연구를 위해 먼저 elicitor 중 β -glucan과 oligogalacturonide를 제조하였다. Oligogalacturonide는 pectin에서 제조하였는데 isoflavonoid 증가 효과를 보았을 때 별로 효과가 없어 이 다음 실험에는 사용하지 않았다. 키토산은 회사로부터 공급받았으며 β -glucan은 맥주 폐효모를 산 가수분해하여 얻었다. β -glucan은 콩나물에서 chitosan 보다 훨씬 낮은 농도인 ng/mL 단위에서 elicitor 활성을 보이는 것으로 나타났으며 이의 경제적 생산을 위하여 기존에 많이 쓰는 trifluoroacetic acid(TFA) 대신에 단가가 싸고 식품안전성에 문제가 덜한 HCl을 대체 용매로 사용하여 추출조건을 확립하였다.

이렇게 생산한 β -glucan과 chitosan을 콩나물 재배에 사용하였을 때 콩나물의 발아율은 약 5~10% 정도 증가하는 경향이 보였다. Isoflavonoid 증가효과는 β -glucan, chitosan 둘 다 있었으며 둘의 혼합처리에 의해 더욱 증가하여 2~5배 증가시키는 것이 가능하였다. Isoflavonoid의 증가효과는 elicitor의 분자량, 농도에 따라 영향을 받았다.

다른 기능성분 활성을 조사한 결과 elicitor 처리에 의해 항산화 활성이 증가하는 것을 볼 수 있었고, elicitor 처리에 의한 아질산염 소거능은 거의 변화가 없는 것으로 나타났고, 이는 무처리구에도 마찬가지이므로 콩나물 자체에 아질산염 소거능이 거의 없는 것으로 판단된다. 또한 여러 기능성이 알려진 사포닌 함량을 조사한 결과 elicitor 처리한 콩나물이 무처리 콩나물보다 높은 함량을 가졌다.

Elicitor 처리가 콩나물의 병에 대한 저항성을 증가시키는 것을 알아보기 위하여 콩의 병원균으로 알려진 *Phytophthora sojae*와 콩나물에서 분리된 병원균 *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*를 인위적으로 감염시켰을 때 무처리 콩나물에 비하여 elicitor 처리 콩나물이 감염정도가 약하고 elicitor 처리 콩나물 중에서도 특히 chitosan, β -glucan 혼합처리 콩나물이 모든 감염 처리에서 강한 저항성을 보였다. 이것은 즉 elicitor 처리에 의해 콩나물 생체 내에서 방어 기작의 변화가 온 것으로 볼 수 있어서 elicitor 처리 콩나물에서 일부 방어 단백질의 변화를 분석한 결과 trypsin inhibitor, β -1,3-glucanase, phenylalanine-ammonia lyase activity는 처음에는 상당량이 존재하나 성장하는 과정에서 많이 감소하는 경향을 나타내었지만 elicitor 처리 콩나물이 무처리 콩나물에 비하여 성장한지 6시간까지의 초기 activity도 현저하게 많을 뿐만 아니라 72시간 후에도 잔존하는 activity 또한 훨씬 많다는 것을 확인할 수 있었다.

콩나물은 유통기간이 짧은 것이 문제가 되어 elicitor 처리를 통해 유통기간 연장이 가능한지를 조사하였다. 그

결과 elicitor 처리한 콩나물이 총균수에 있어 약 80~90% 정도 감소하는 것을 알 수 있었으며 균의 증가속도도 느린 것을 알 수 있었다. 이 결과는 elicitor 처리를 통해 유통기간 연장이 가능하다는 것을 제시한다. 또한 isoflavonoid도 수확 직후의 높은 함량을 그대로 유지하는 것이 관찰되었다.

위와 같은 실험실에서의 재배결과가 공장에서 대규모로 재배하였을 때에도 적용되는지를 알기 위해 공장에서 실증실험을 한 결과 실험실에서와 비슷한 결과가 나왔다. 즉 발아율 수율에 있어 elicitor를 처리하였을 때 높았으며 isoflavonoid 함량도 증가하였다. 특히 맛에 어떤 영향을 주었는지를 알아보기 위하여 관능평가를 한 결과 기호도가 상승된 것으로 나왔다.

Elicitor가 우리가 모르는 어떤 독성물질들을 증가시킬 수 있다는 가능성을 고려하여 쥐를 이용하여 독성 실험을 하였다. 암·수 rat 각 40마리를 이용하여 콩나물 건조분말을 최고 10%까지 시료에 혼합, 90일간 투여하면서 투여군에서 체중의 변화, 사료섭취량, 음수량, 행동의 변화, 혈액학, 혈청생화학적 변수, 주요 장기의 조직학적 측면에 영향이 나타나는가를 시험하였다. 그 결과 어떤 변수에서도 시험시료의 투여와 관련되었다고 판단할 만한 변화가 관찰되지 않았기 때문에 이 콩나물시료가 인간에 심각한 독성을 미칠 가능성은 거의 없다고 판단되었다. 이 시험에서 사용한 최고 혼합농도인 10%는 콩나물 습증량으로 역산하면 인간(65 kg 기준)이 매일 2.1~7.5 kg(마켓에서 파는 콩나물 25봉지에 해당)을 섭취하는 경우와 비교할 만한 것이다. 일반적으로 인간이 매일 콩나물을 섭취하는 양이 300 g 정도로 가정한다면 rat과 인간의 감도차이를 고려한다고 하더라도 충분히 안전하다고 볼 수 있다.

결 언

본 논문에서는 지면 관계 상 언급을 못 하였지만 키토산 등의 elicitor를 마늘에 처리하였을 때에도 항암물질과 혈압강하물질의 증가와 더불어 저장성의 증가를 관찰할 수 있었다. 이상과 같은 결과로 볼 때 elicitor 처리에 의해 기능성물질의 증가뿐만 아니라 병에 대한 저항성이 증가되고 발아율이 증가되어 이의 이용은 농약사용을 줄여 환경친화적 농업을 할 수 있게 할 뿐 아니라 고품질 농산물 생산에 도움을 줄 수 있을 것이라 기대된다. 그러나 아직 어떻게 해서 이런 효과가 나오는 지 그 기작에 대해서는 우리가 많은 이해를 못하고 있다. 기작을 모름으로써 키토산이 식물세포의 대사활동을 변화시켜 독성물질들을 만들 가능성을 배제 못하고 식물을 먹어야 할 경우 키토산을 처리한 식물의 안전성이 확보 되어있지 않아 실제 이용에

많은 문제가 있게 된다. 이런 안전성 문제는 키토산 효과의 작용기작을 이해한다면 불식될 수 있을 것이다. 또한 키토산 처리를 식물에 할 때 어떤 조건(양, 시기, 횟수 등)에서 처리할 지를 결정할 때 여태까지는 주로 수량증가나 병에 대한 저항성 등을 조사하여 결정하였는데 이런 방법을 사용하는 데는 많은 시간, 경비가 들고 더욱이 실험결

과의 오차가 크다. 키토산효과와 작용기작을 이해한다면, 키토산처리의 최적화가 훨씬 짧은 시간 안에 적은 경비를 들고도 훨씬 정확한 결과를 얻는 것이 가능할 것이라 여겨진다. 그러므로 앞으로 키토산효과와 작용기작 연구에도 많은 지원이 있어야 할 것이다.