

# 키토산올리고당의 효소적 대량생산 및 생리활성

Large scale enzymatic production of chitooligosaccharides and their biological activities

김세권<sup>1\*</sup> · 신경훈<sup>1</sup>

Se-Kwon Kim<sup>1\*</sup>, Kyung-Hoon Shin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>한양대학교 과학기술융합대학 해양과학융합공학과

<sup>1</sup>Dept. of Marine Science & Convergence Engineering College of Science & Technology, Hanyang University

## Abstract

In recent years, significant importance has been given to chitooligosaccharides (COS) due to its potent notable biological applications. COS can be derived from chitosan which is commonly produced by partially hydrolyzed products from crustacean shells. In order to produce COS, there are several approaches including chemical and enzymatic methods which are the two most common choices. In this regard, several new methods were intended to be promoted which use the enzymatic hydrolysis with a lower cost and desired properties. Hence, the dual reactor system has gained more attention than other newly developed

technologies. Enzymatic hydrolysis derived COS possesses important biological activities such as anti-cancer, antioxidant, anti-hypersensitive, anti-dementia (Alzheimer's disease), anti-diabetics, anti-allergy, anti-inflammatory, etc. Results strongly suggest that properties of COS can be potential materials for nutraceutical, pharmaceutical, and cosmeceutical product development.

Keywords: chitooligosaccharides, ultrafiltration membrane reactor, biological activities

\* Corresponding author: Se-Kwon Kim

Department of Marine Science & Convergence Engineering College of Science & Technology, Hanyang University,  
55 Hanyangdae-ro, Sangnok-gu, Ansan-si, Gyeonggi-do 11558, South Korea

Fax: +82-31-400-5539

Email: sknkim@pknu.ac.kr

Received February 14, 2020; revised March 10, 2020; accepted March 11, 2020



## 서론

전세계적으로 계, 새우, 바닷가재와 같은 갑각류의 가공폐기물은 약 1억 4400만톤이며, 수산식품 제조과정에서 폐기되는 키틴의 양은 매년 12만톤씩 증가하고 있다. 키틴은 양적으로 대단히 풍부하지만 용해성이 매우 낮아 널리 이용되지 못했으나 생체친화성이 우수하여 인공피부나 수술용 봉합사 등 의료용 재료로서 일부 제한적으로 이용되고 있다(Kim, 2018).

키틴산은 키틴을 탈아세틸화(deacetylation)시켜 제조되고 있으며, 초기에는 주로 키틴산의 강력한 흡착력을 이용한 폐수처리제나 중금속 흡착제로 널리 이용되었다. 그러나 키틴산의 항암활성(Nishimura 등, 1986; Suzuki 등 1986; Tokoro 등 1988), 항균 활성(Amako 등, 1987; Kendra와 Hadwiger, 1984; Sánchez, 2017; Shimojoh 등, 1996) 항산화 활성(Ngo 등, 2008; Ngo 등, 2009), 콜레스테롤 저하작용(Maezaki 등, 1993; Sugano 등, 1992) 및 고혈압 억제작용(Okuda 등, 1997)이 밝혀짐으로써 최근에는 기능성 식품(Je and Kim, 2013; Setyahadi S, 2013) 기능성 화장품(Senevirathne 등, 2012) 기능성 바이오 소재(Tak 등, 2017) 및 의약품 소재(Ahmad 등, 2014; Elsabee와 Morsi, 2014; Venkatesan J 등, 2017)로서의 용도 개발이 활발하게 진행되고 있다.

특히 구미에서는 키틴산이 식이섬유로서 콜레스테롤이나 지질의 흡수를 저해하고 고혈압을 조절하는 기능이 있다는 것이 밝혀져 다이어트 식품으로 크게 각광을 받았다. 콜레스테롤은 대부분 간장에서 합성되며 일부는 음식물로부터 섭취된다. 이것은 담즙산의 전구물질로서 십이지장을 거쳐 혈관벽에 붙어서 동맥경화를 일으킨다. 그러나 산성의 위장에서 용해된 키틴산의 양이온은 소장 상부에서 음이온 전하를 가지고 있는 담즙산과 강력한 이온결합을 형성하여 체외로 배출됨으로써 콜레스테

롤의 혈중 농도를 저하시킨다. 또한 채장에서 만들어져 분비되는 지방분해효소인 리파제(lipase)의 활성을 약화시켜 지질의 분해흡수를 막고 체외로 배출시킨다. 더구나 키틴산의 양이온은 십이지장에서도 유적(droplet) 표면의 인산기 부분에 결합함으로써 지방분해효소의 작용을 저해하고 지방의 흡수를 감소시킨다. 그리고 키틴산은 섭취한 소금 중 염소 이온을 체외로 배출시킴으로써 고혈압 관여효소(ACE)의 활성을 억제하며 혈압을 저해하는 것으로 알려졌다(Kim, 2018).

키틴산은 분자량이 매우 큰 고분자 물질이고 섬유소의 구조와 매우 유사하여 사람의 위장관에서 소화흡수되지 못한다. 즉, 위장관에서는 베타-1,4 당체 결합( $\beta$ -1,4 - glycosidic linkage)을 분해 할 수 있는 효소가 존재하지 않는다. Fig 1. 에 나타난 바와 같이 분자량이 22 kDa 이상의 경우는 거의 흡수되지 않는다. 따라서 키틴산을 생체 내 활성물질로서 효율적으로 이용하기 위해서는 그들을 올리고당으로 생산할 필요가 있다.

키틴산올리고당은 그 구성단위인 글루코사민의 중합도가 100개 이하일 때, 다시 말하면 글루코사민이 100개 이하(분자량 18 kDa이하)로 결합된 것을 말하며 그 이상의 분해물은 물에 용해될 수 있어 수용성 키틴산이라 할 수 있다(Kim, 2011).

키틴산올리고당은 키틴산에 비해 분자량이 작고 점도가 낮으며 수용성이므로 다양한 산업적 응용이 가능하며 무엇보다도 생체 내 흡수가 가능하기에 기능성 식품 및 의료분야에서 널리 활용될 가능성이 있다.

키틴산올리고당은 그 분자량 크기에 따라 항종양 작용(Quan 등, 2012; Wu 등, 2012), 항산화 작용(Anarku 등, 2011; Xu 등, 2010), 항치매(Byun 등, 2005; Yoon 등, 2009), 면역강화작용(Mei 등, 2013; Yang 등, 2019), 항알레르기(Vo 등, 2012), 항당뇨(Katiyar 등, 2011; Zhao 등, 2017), 항고혈압(Park 등, 2011), 항고지혈증(Cho 등, 2011) 및 칼슘흡수

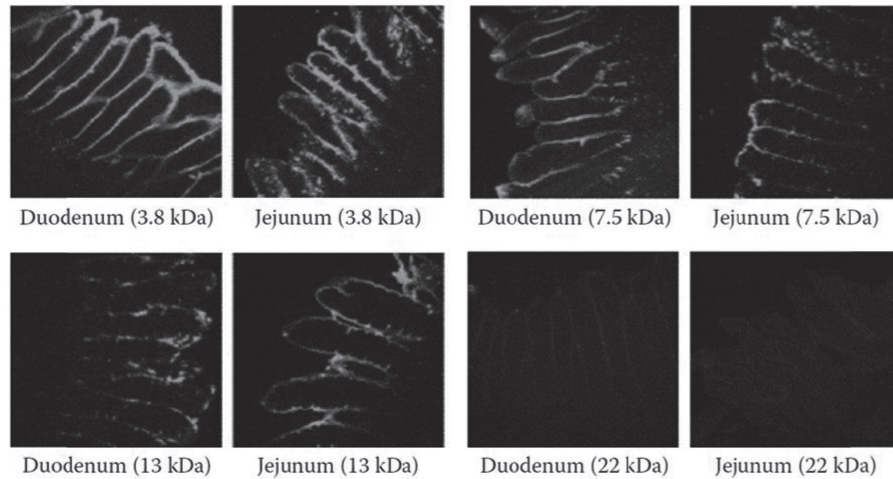


Fig 1. The absorption rates of chitosan oligosaccharides and water-soluble chitosan in the bodies of rats (original magnification X100) (Chae et al, 2005).

촉진 작용(Jung 등, 2006) 등 다양한 생리활성을 나타낸다.

키토산올리고당 생산에는 화학적 방법과 효소적 방법이 널리 이용되고 있다. 산업적 규모의 생산에는 주로 화학적 방법이 이용되었다. 그러나 화학적 가수분해는 독성 화합물, 환경 오염, 생산 수율의 저하에 기인하여 키토산올리고당을 상품화하는데 문제가 되었다. 이에 지난 수년간 적절한 분자량을 가진 키토산올리고당의 대규모 제조를 위한 바람직한 기술 개발이 시도되었지만 사람을 대상으로 한 제품개발에는 한계가 있었다.

이를 해결하기 위해 효소에 의한 키토산의 가수분해가 활발히 진행되었다. 효소분해 공정은 일반적으로 회분식 반응기(batch reactor)에서 수행되었으며 화학적 방법에 비해 키토산올리고당의 화학적 변형(modification)을 최소화하고 생물 활성을 증진시킬 수 있다는 장점이 있다. 그러나 가수분해 효소와 관련된 막대한 비용이 대규모 산업적 생산의 걸림돌이 되었다.

이 같은 생산비용을 줄이기 위해 산분해, 효소가수분해, 산화적 분해 및 초음파 분해, 화학·효소적

분해 및 재조합 방법 등 다양한 방법이 시도되었다. 전자기학, 초음파 및 미량 거르기(microfiltration)에 의해 발생하는 기계적 에너지를 화학제를 사용하지 않고 키토산올리고당 생산을 위해 사용하는 연구도 진행되었다. 하지만 어떤 방법도 성공적으로 키토산올리고당의 대규모 생산을 가능하게 하지는 못했다(Aam 등, 2010).

Jeon과 Kim(2000)은 이러한 기존 연구 중 고정화 효소의 활용에 주목했다. 효소를 회분식 반응기에서 1회만 사용하지 않고 재이용하는 고정화 효소의 활용에 대한 기존 연구는 고정화 방법이 어렵고 고정화 효소의 활성이 낮아 실효성을 거두지 못했다. 그러나 한외여과막을 효소반응기와 결합시킨 막 효소반응기를 활용한 방법을 통해 키토산올리고당은 연속적으로 생산할 수 있는 가능성을 발견하여 세계 최초로 키토산가수분해효소를 이용한 키토산올리고당을 연속적으로 대량 생산할 수 있는 기술개발에 성공했다.

본 총설에서는 효소를 이용한 키토산올리고당의 대규모 생산 방법 및 키토산올리고당의 생리활성에 대하여 살펴본다.



## 본론

### 1. 키토산올리고당의 제조.

지금까지 키토산으로부터 올리고당을 만드는 데는 물리적 방법, 화학적 방법 및 효소적 방법에 의한 연구들이 진행되었다.

물리적 방법에는 열수처리법(Sato 등, 2003), 마이크로웨이브 처리법(Xing 등, 2005), 초음파 처리법(Wu 등, 2008), 감마선 처리법(Yoksan, 등, 2004) 등이 응용되었으나 이들 방법은 잘 정제된 키토산 올리고당을 만드는 데는 한계가 있다.

화학적 방법은 산처리법(Domard 와 Cartier, 1992; Einbu 와 Varum, 2007), 과산화수소 처리법(Lin 등, 2009), 산화질소나트륨 처리법(Morris 등, 2009) 등 여러 연구보고가 있으나 염산의 유해성 문제가 있었다. 염산과 같은 강한 산으로 키토산을 분해시킬 경우 인체에 유해한 부산물 물질이 생성될 뿐만 아니라 염산을 완전히 제거하지 않으면 체내의 당 대사에 큰 영향을 미쳐 인슐린 작용에 이상을 초래하여 심하면 당뇨병을 유발시킬 수도 있다. 따라서 우리나라 보건복지부 식품공전에는 키틴-키토산의 효소분해물인 올리고당을 식품첨가물이나 건강식품소재로 사용할 수 있도록 명시되어 있다(김, 2015).

효소적 방법은 온화한 반응조건에서 키토산을 가수분해시킬 수 있으며 기질 특이성이 있어 반응 정도 및 생성물의 크기를 조절할 수 있다. 더욱이 키토산은 폭 넓은 기질 특이성이 있어 여러 효소에 의해 가수분해 작용을 받을 수 있다. 그러나 효소가 고가이므로 1회 사용으로 발생하는 고비용 문제로 키토산올리고당의 대규모 생산에 활용하기에는 경제성이 떨어진다. 그럼에도 불구하고 인체에 해로운 부작용이 없어 최근에 가장 활발히 연구되고 있다(Assis 등, 2010; Cabrera와 Cutsem, 2005; Dong 등, 2015; Fawzya 등, 2018; Gao 등, 2012; Kang 등,

2018; Lee 등 2008; Moriano 등 2018; Moriano 등, 2016; Wu, 2012).

Cabrera와 Cutsem(2005)은 진한 염산(37%)과 산업용 효소(Pectinase)로 각각 키토산을 가수분해했을 때 효소분해의 경우는 중합도 6-11인 올리고머(oligomer)가 주로 생성되었으나 산분해는 중합도 16이상의 올리고머가 생성되었다고 보고하였으며, Lee 등(2008)은 산업용 지방분해효소(lipase)로 키토산을 가수분해한 경우 중합도 2-6인 올리고당과 글루코사민이 생성되었음을 확인하였다. 또한, *Bacillus cereus* D-11에서 추출한 조효소(crude enzyme)로 키토산을 가수분해한 결과, 수용성 키토산 4g에서 키토이당(GlcN)<sub>2</sub>, 키토삼당(GlcN)<sub>3</sub>, 및 키토사당(GlcN)<sub>4</sub>을 각각 0.95g, 1.43g 및 1.18g을 얻었으며 (Gao 등, 2012). 셀룰로오스가수분해효소 (cellulase), 파파인(papain), 알파-아밀라아제( $\alpha$ -amylase), 리소짐(lysozyme), 크실라나아제(xylanase) 및 글리코시다아제( $\beta$ -glycosidase) 등 비특이성 효소로 키토산을 분해했을 때 중합도 6-8 올리고머가 79.8% 정도 함유된 올리고당을 얻었다 (Gao 등, 2012).

Assis 등 (2010)은 특수한 생리활성을 나타내어 의약적 활용을 할 수 있는 올리고당을 생산하기 위해 곰팡이(*Metarhizium anisopliae*)가 생산하는 키토산 가수분해효소를 이용하여 키토산으로부터 삼합체(trimer) ~ 육합체(hexamer)를 생산하였고, *Bacillus thuringiensis* 에서 추출한 키토산가수분해효소(최적온도 60 °C, 최적 pH 6.0)로 탈아세틸화도(DD)가 서로 다른 키토산을 가수분해한 결과, 충분히 탈아세틸화시킨 키토산에서는 (GlcN)<sub>2-5</sub>가 생성되었고 부분 탈아세틸화시킨 경우는 GlcNAc-(GlcN)<sub>1-3</sub>이 주로 생성되었다.

키토산(MW 600-800 kDa, DD  $\geq$  90%)용액 리터당 10g은 55시간 내 올리고당으로 완전히 전환되었으며, 키토이당(chitobiose), 키토삼당(chitotriose), 키토사당(chitotetraose), 키토오당(chitopentaose)이

각각 1.6 g/L, 1.7 g/L, 5 g/L, 1.4 g/L가 생산되었다 (Moriano 등, 2018).

*Bacillus thuringiensis* BMB 171에서 키토산가수분해효소인 chitosanase의 유전자를 분리하여 효모 (*Pichia pastoris*)에 발현시켜 mg 당 비활성 240 단위(unit)의 재조합 chitosanase 300 mg을 얻었다. 이것으로 키토산을 가수분해 한 결과, 주로 삼합체(trimer)에서 육합체(heptamer)의 올리고당이 생성되었고, 산업용 알파-아밀라아제( $\alpha$ -amylase)의 경우는 중합도(DP) 2-8의 올리고당이 생성되었다(Kang 등, 2018; Wu, 2012). Chitosanase(*Stenotrophomonas maltophilia* KPU 2123)로 키토산을 가수분해하여 한외여과막으로 처리하였을 때 회분(납과 비소 함유) 함량이 50.45%에서 0.79% 이하로 낮아졌다는 보고도 있다(Fawzya 등, 2018).

Lin 등 (2009)은 *Bacillus cereus* NTH-FC-4에서 추출한 완전 정제가 되지 않은 chitosanase CBC I, CBC II, 및 CBC III의 3획분을 분리하여 키토산을 분해한 결과, CBC I의 가수분해물은 이합체(dimer)였으며, CBC II의 경우 제 1차 가수분해물의 중합도가 낮아 반응속도를 올렸을 때, 육합체(heptamer) 이상의 고중합 올리고당을 생산할 수 있었다. 효소 : 기질의 비율이 mg당 0.06 단위(unit)로 한외여과막 반응기로 이동시켰을 때 잔류시간 100분에서 고중합도 올리고당의 농도는 ml당 9.87mg이었다. 이때 조효소를 이용한 경우 29%에 비해 48%로 효소활성이 높았다. 50분에서 33분으로 잔류 시간을 줄였을 때 고중합도 올리고당은 각각 61% 및 69%였으며, 이 시스템에서는 적어도 24시간 이상 운행해야 일정한 제품 생산속도가 유지되었다. 2중 반응기 시스템에서 고정화 효소에 의한 키토산올리고당의 연속적 생산을 시도하기 위해 *Bacillus amylolyquefaciens*(BAN)에서 추출한 산업용 알파-아밀라아제( $\alpha$ -amylase)를 글리옥살 아가로오스 비드(glyoxal agarose bead)에 공유결합법으로 고정화시켜 올리고당의 연속적 생산을 시도한

결과, 중합도 및 탈아세틸화도가 서로 다른 키토산을 이용한 경우 주로 키토이당(chitobiose)과 키토삼당(chitotriose)이 얻어졌다. 2단계 공정은 1단계 부분 분해물이 충전비드반응기를 통해 흘러내릴 수 있을 정도까지 회분식 반응기(1차 반응기)에서 가수분해시킴으로써 막의 막힘현상을 피할 수 있었다 (Moriano 등, 2016).

고정화 효소를 이용한 키토산 가수분해물의 생산에 *Enterobacter* sp. G-1을 물리적 흡착법으로 키토펄(Chitopearl: 키토산으로 만든 산업용 담체)에 고정화시킨 효소를 이용하여 1% 키토산 용액을 17일간 연속적으로 가수분해할 수 있었으며, 이때 최초 효소활성의 50%를 유지하였다(Yamasaki 등, 1992). Jeon 등(1998)은 *Bacillus pumilus* 유래 키토산가수분해효소(chitosanase)를 키토산에 물리적 흡착법으로 제조한 고정화 효소가 유리효소에 비하여 90%이상의 높은 활성을 유지하고 있음을 확인하고 이것을 키토산올리고당의 생산에 이용하였다. 고정화 효소는 60°C에서 2시간 반응으로 고차 올리고당인 키토사당( $\text{GlcN}_4$ ) - 키토육당( $\text{GlcN}_6$ )을 90%이상 함유하고 있었으며, 유리효소에 비해 반응속도는 낮지만 높은 농도의 기질에서 기질저해 반응을 보이지 않았기 때문에 대량생산에 이용이 가능함을 밝혔다.

또한 효소적 가수분해에 의한 키토산올리고당의 생산을 산업적으로 적용시켰을 때 문제가 되었던 대량으로 소모되는 효소의 높은 생산비용을 절감하기 위하여 효소의 재이용을 위한 새로운 생산 시스템의 개발을 시도하여 최초로 최근 식품공정에서 크게 각광을 받고 있는 한외여과막을 생물반응기와 결합시킨 한외여과막 효소반응기를 키토산올리고당의 생산에 적용시켰다. 이 시스템에서 발생한 한 가지 문제점은 키토산 용액의 높은 점성으로 인하여 일어난 막의 막힘(fouling) 현상이었다. 이를 보완하고자 고정화 효소가 충전된 칼럼반응기를 이용하여 일차적으로 키토산을 저분자화하여 키토산 용

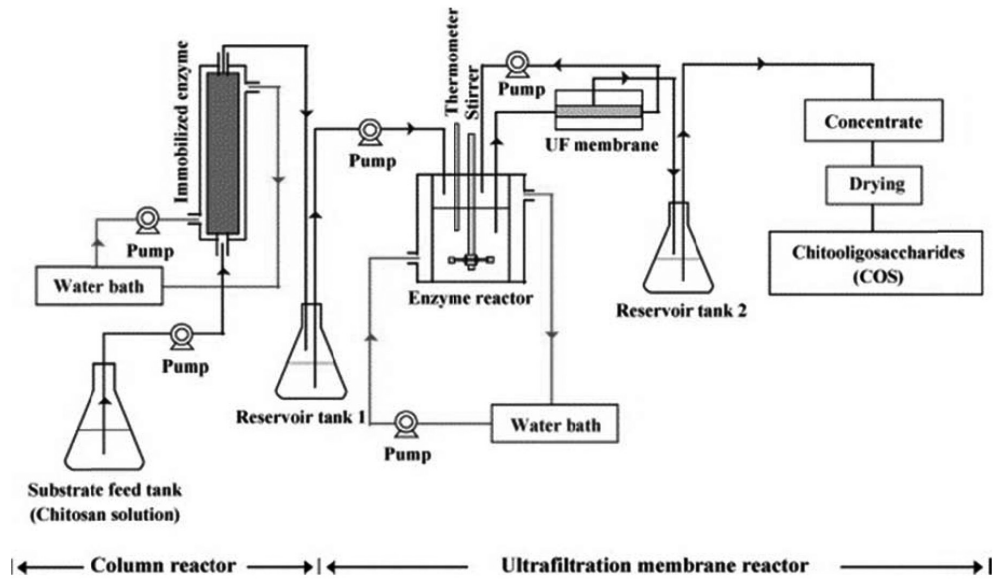


Fig. 2 Schematic diagram of the dual reactor system used for continuous production of chito oligosaccharides (Jeon and Kim, 2000)

액의 점성을 대폭 감소시킨 후 한외여과막 반응기가 도입된 자동화 연속식 생산공정시스템에 적용시킨 결과, 연속적으로 키토산올리고당은 대량 생산할 수 있었다(Jeon과 Kim, 2000).

이 시스템에서 먼저 키토산용액을 반응기에 채운 다음 키토산분해효소를 넣고 순환시키면 키토산은 효소에 의해 분해되어 저분자된 올리고당은 한외여과막을 통해 배출된다. 이때 한외여과막을 통과하지 못한 키토산분해물인 큰 입자와 효소는 분자량이 커서 막을 통과하지 못하고 계속 순환하면서 분해반응이 진행된다. 효소반응기에서 분해되어 한외여과막을 통해 빠져나간 만큼 키토산 용액을 공급시켜 연속적으로 대량 생산할 수 있다(Fig. 2).

이 시스템의 장점은 사용하는 막의 종류에 따라 원하는 분자량의 키토산올리고당을 생산할 수 있다는 것이다. 키토산올리고당은 그 분자량 크기에 따라 생체 내에서 생리기능을 나타내는 것이 달라 목적에 맞는 제품을 생산할 수 있다. 실질적으로 이 시스템을 이용하여 키토산올리고당의 분자량 크기의 범위를 세 종류(MW 10-5 kDa, 5-1 kDa, 1 kDa

이하)로 나누어 항균활성 및 항암활성과 같은 생리활성을 검토한 결과, 키토산올리고당의 분자량 크기에 따라 항균 및 항암 효과가 현저한 차이가 있음을 확인하였다(Jeon과 Kim, 2002).

## 2. 항중양활성

동식물을 막론하고 성체를 구성하고 있는 기본단위는 세포이다. 세포가 모여 조직을 이루고, 조직이 모여 장기가 되며, 장기가 모여 하나의 생명체를 이루고 있는 것이다. 이러한 세포의 중요한 임무 중 하나는 항상 분열 증식하여 자기와 동일한 자손을 만들어 내는 것이다. 정상세포는 이러한 분열 증식이 일사분란하게 이루어지며 세포 스스로 이러한 분열 증식을 조절 할 수 있는 자동 능력이 있다. 그러나 어떤 원인에 의해 이러한 질서가 깨지면 세포는 끝없이 분열을 계속하여 비정상적인 세포 즉 암세포로 변한다.

암세포는 정상세포가 변화하여 생겨난 것이지만 정상세포와 달리 왕성한 발육 때문에 영양분을 섭

Table 1. Anti-tumour/cancer activities of COS:

Kinds of cancer	Cells/Animal	Reference
Cervical cancer and colon cancer	HeLa and SW480 cells	Huang et al., 2006
Skin cancer	Murine melanoma cells	Mendis et al., 2007
Colorectal cancer	CT26 colorectal adenocarcinoma cells	Wang et al., 2008
Liver cancer	Human hepatocellular carcinoma (HepG2)	Shen et al., 2009
Breast cancer	Human breast cancer cells,	Wu et al., 2010
Lung cancer	Human lung carcinoma cells (A549)	Li et al., 2011
Bone cancer	Human chondrosarcoma cells (SW-1353).	Ryu et al., 2012 Van Ta et al., 2006 Rajapakse et al., 2006
Colon cancer	SW480 cells,	Han et al., 2016
Connective tissue cancer	Human fibrosarcoma cells	Hong et al., 2016
Liver cancer	Liver tumor cells	Jing et al., 2019
Lung cancer	A549 lung cancer cells	Li et al., 2019
Liver cancer	Human hepatocellular carcinoma cell	Shen et al., 2009
Prostate cancer	Prostate cancer cells	Park et al., 2011
Lung cancer	Human lung cancer cells HepG2	Han et al., 2015
Gastric cancer	Human gastric cancer cells (BGC823, MKN45, SGC7901)	Luo et al., 2016 Ryu et al., 2017
Liver cancer	Human hepatocellular carcinoma cells	Xu et al., 2008
Human lung cancer	Human lung cancer cells HepG2	Han et al., 2015
Myeloid leukemia	Human myeloid leukemia HL-60 cells	Kim et al., 2012
Lung cancer	Human lung carcinoma cells (A549)	Xian et al., 2011
Fibrosarcoma	Human fibrosarcoma cells	Hong et al., 2016

취, 분해, 이용하는 대사과정이 정상세포보다 훨씬 왕성하다. 또한 우리 몸의 한 곳에 암세포가 생기면 그것의 수는 점점 불어나면서 주위 정상세포 내로 전이하는 침윤현상(intravasation)이 일어난다. 전이에 의해 생긴 암세포의 집단이 조직 내로 침윤해 가는 동안 혈관이나 임파관 속으로 들어가 혈액과 임파액을 타고 몸 안의 각 부위로 퍼져 다른 장기나 조직 속에 뿌리를 내려 새로운 증식이 시작되는 것이다(Kim, 2018).

암을 초기에 발견하면 그 암의 발생지를 제거함으로써 전이를 방지 할 수 있지만 그렇지 못할 경우에는 항암제를 투여하여 단지 생명을 연장시킬 수 밖에 없다. 현재 개발된 항암제는 대부분 화학물질로 부작용이 심하다. 그 이유는 몸 속에서 암세포만

을 선택적으로 손상시키지 않고 정상세포까지 모두 파괴하기 때문이다(Kim, 2018).

키틴·키토산을 저분자화하여 얻어진 중합도 6의 키틴올리고당(N-acetylchitooligosaccharide-6: NACOS-6)과 키토산올리고당(COS-6)을 이용하여 마우스에 이식한 육종(sarcoma180: 생체의 지지 조직인 비상피조직에서 발생하는 악성 종양)의 고형 종양에서 항암작용을 검토한 결과, NACOS-6과 COS-6에서 매우 강력한 종양증식 억제효과가 나타났다. 렌티난(lentinan)이 하루에 kg당 10mg 투여로 약 72%의 저해효과를 보여준 것에 비해 NACOS-6은 하루에 kg당 100 mg을 3회 투여로 약 85%의 효과를, 그리고 COS-6은 같은 양의 투여로 약 93%라는 뛰어난 효과를 보였다(Suzuki 등, 1986).



키토산올리고당(COS)을 대장암세포(SW480)에 ml당 0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 및 5.0 mg을 48시간 처리로 대장암세포의 증식을 억제하였으며, 억제율은 COS의 농도와 밀접한 관계가 있음이 드러났다. 암세포 생존율은 방사선(X-ray)과 COS를 동시에 처리한 것에서 크게 감소하였고, 방사선과 COS를 동시에 처리한 그룹의 세포자살율(apoptosis rate)이 방사선만 처리한 그룹에 비해 높아 COS는 대장암 세포의 증식을 저해할 뿐만 아니라 대장암 세포의 방사선 감수성(susceptibility)을 증가시키는 것을 밝혔다(Han 등, 2016).

Luo 등 (2016)은 키토산올리고당이 세가지 위암 세포(BGC 823, MKN45 및 SGC7901 cells)의 증식 억제 및 방사선 감수성에 미치는 효과를 검토한 결과, COS는 세 형태의 위암세포에서 모두 증식억제 효과를 나타냈으며, 억제율은 COS의 농도와 위암 세포의 감수성과 명확한 상관관계를 보였다. 세포 생존율은 방사선만 처리한 그룹 및 방사선과 COS를 동시에 처리한 그룹에서 방사선량 증가에 따라 점차적으로 감소하였다. 방사선 + COS 그룹의 세포 성장력은 방사선 노출 시 모든 복용량에서 방사선 그룹의 것보다 낮았고, 세 가지 위암세포에서 COS의 감작 강화율(sensitization enhancement ratio)은 각각 1, 0.6, 1.28 및 1.15였다. 방사선 + COS 그룹에 있어서 세 위암세포의 G<sub>2</sub>/M 상(phase)에서 비율 및 세포자살율은 대조군 및 방사선 그룹보다 높았으며, 방사선 + COS 그룹에서 S상 및 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 상에서의 비율은 다른 두 그룹에서 보다 낮았다. 따라서 COS는 세 종류의 인간 위암세포의 증식을 억제하고, 세포자살율을 유도하며 방사선 감수성(radio sensitivity)을 강화한다고 결과를 얻었다(Luo 등, 2016). COS는 간암세포(human hepatocellular carcinoma cells, SMMC-772)에서도 세포자살율을 농도 의존적으로 현저하게 유발시키는 것으로 나타났다(Xu 등, 2018).

암의 전이는 암세포의 발생지로부터 시작하여 주

변의 조직으로 침윤(intravasation 혹은 extravasation)하며 증식해 나가는 복잡한 과정을 거치게 되는데, 그 사이에 세포외기질(extracellular matrix)과 기저막(basement membrane) 등과의 상호작용을 포함하는 일련의 현상들이 일어난다(Liotta, 1983).

키토산올리고당의 인간 간암세포(HEDG2)의 중앙증식 억제 및 암전이 억제 효과를 평가한 결과, 간암세포에서 DNA합성을 감소시켜 암세포의 증식을 저하시켰으며 또한 암 전이에 관련된 단백질효소인 MMP-9의 활성이 폐암세포(Lewis lung carcinoma cells)에서 COS에 의해 저해됨으로써 COS가 폐암의 전이를 억제한다는 사실이 밝혀졌다(Shen 등, 2009).

인간 섬유아세포(HT1080)에서 암 전이에 관하여는 기질 금속단백질가수분해효소-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2) 및 MMP-9에 대한 COS의 저해효과에 대해 여러 연구 등이 수행되었다(Mendis 등, 2006).

분자량이 1-3, 3-5 및 5-10 kDa인 COS 중 3-5 kDa만이 MMP-9 발현에 현저한 저해 효과가 나타나 MMP-9로 인한 암 전이를 억제하는데 이용될 수 있다(Ta 등, 2006). 또한 인간 진피 섬유아세포에서 COS(1, 1-3, 3-5 및 5-10 kDa)의 MMP-2의

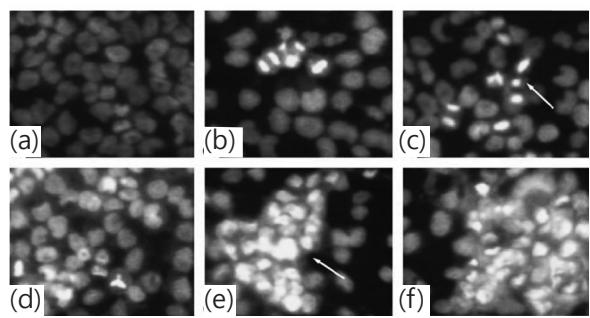


Fig. 3 Morphological changes in SMMC-7721 cells visualized by fluorescent microscopy : (a-f) morphological changes in SSMC-772 cells treated with chitosan oligomers at concentrations of 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 and 1.6 mg/ml for 72h (Il'ina and Varlamov, 2015)



활성 및 발현에 미치는 저해효과도 3-5 kDa의 COS가 가장 높은 저해 활성을 보였는데, 이 같은 저해 효과는 MMP-2의 유전자 발현과 전사의 한 부분인 c-fos 유전자 발현을 억제시키는 것으로 확인되었다(Kim과 kim, 2008). 분자량이 3-5 kDa의 COS는 암 전이나 주름 형성에 관여하는 MMP-2로 인해 발생하는 질환의 예방과 치료에 활용될 것으로 기대된다.

신생혈관형성(angiogenesis)은 이미 존재하고 있는 혈관에서 새로운 모세혈관이 형성되는 과정이다. 이 과정은 종양이 일정한 크기에 도달하게 되면 종양 성장과 전이를 위해 신생혈관이 필요하다. 암세포의 신생혈관형성은 종양 이식부위 및 전이 부위의 암세포로 산소와 영양을 공급하는 혈관으로 작용할 뿐만 아니라 그 형성된 혈관을 통하여 전이로 이어진다. 그러므로 신생혈관의 제어는 암 전이 억제와 밀접한 관계가 있으며, 키토산올리고당이 신생혈관을 제어함으로써 종양세포에서 암 전이를 함께 억제시킨다는 효과가 있음을 확인할 수 있다(Nam 등, 2007; Quan 등, 2009; Shen 등, 2009; Wu 등, 2008; Wang 등, 2007; Xiong 등 2009).

Wu 등 (2012)은 COS의 중합도 및 아세틸화도가 혈관형성 활성에 미치는 영향을 검토한 결과, 사용한 모든 시료가 신생 혈관형성을 저해하였으며, 혈관형성 과정의 가장 중요한 요소인 인간 내피세포(human endothelial cell)의 이주(migration)는 중합도가 3~12인 COS가 항혈관형성 화합물(anti-angiogenic compounds)로서 매우 강력한 것으로 나타났다. 이들은 또한 키토올리고당의 항신생혈관 형성을 알아보기 위해 닭장노막(chicken chorioallantoic membrane, CAM) 신생혈관형성 및 사람 간암세포(human hepatoma carcinoma cells) 배양액에 의해 유도된 인간 뱃줄 정맥내피세포(HUVEC)의 증식, 이주 및 관형성에 대한 키토올리고당의 효과를 측정한 결과, COS는 정상 HUVEC에 어떤 독성도 나타내지 않았지만 유도된 HUVEC

의 닭장노막(CAM) 신생혈관형성 및 증식, 이주, 및 관 형성을 저해한 것으로 드러났다(Wu 등, 2008).

이상 살펴본 바와 같이 키토산올리고당은 암세포 성장에 영향을 미치는 면역항상을 증진시키고 암전이 관련효소인 MMP-2 및 MMP-9의 발현을 저지하여 암 전이를 억제할 뿐만 아니라 암세포의 신생혈관 형성을 억제하므로 암의 예방이나 치료에 활용할 필요가 있다.

### 3. 항산화 작용.

지구상 대부분의 생명체는 공기 중의 산소를 호흡하여 에너지를 산화시켜 얻어지는 에너지를 이용해 생명을 유지하는데 이런 산소가 필요한 대사 과정에서 불가피하게 세포를 손상시키는 독성물질들이 부산물로 만들어진다. 이것을 활성산소라고 한다. 활성산소는 생체조직을 공격하여 세포를 산화 손상시키는 주범이며 유해산소라고도 한다.

활성산소는 세포나 세포 소기관을 손상시키기도 하며 생체 내 여러 단백질의 아미노산을 산화시켜 단백질 기능 저하를 초래하기도 한다. 이것은 핵산에도 손상을 입혀 염기의 변형, 핵산 염기의 유리, 결합의 절단, 당의 산화 분해 등을 초래하여 돌연변이를 일으켜 암의 원인이 되기도 한다(김 과 변, 2018).

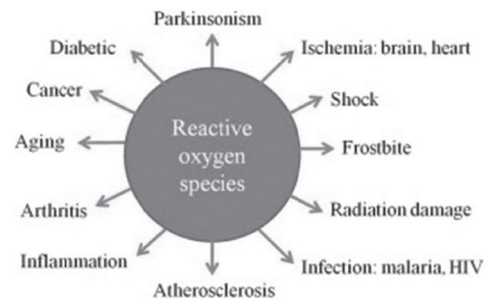


Fig. 4 Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis (Ngo et al., 2015)



활성산소 중에는 초과산화물 라디칼(superoxide radical,  $\cdot O_2^-$ ), 하이드록시 라디칼(hydroxyl radical,  $\cdot HO$ ), 과산화 라디칼(peroxy radical,  $ROO\cdot$ )과 일중항산소( $\cdot O_2$ )와 과산화수소 같은 비라디칼성도 있다. 단백질이나 아미노산은 하이드록시 라디칼이나 일중항산소에 의하여 더욱 산화되기 쉽지만 초과산화물 및 하이드록시 라디칼에는 산화를 받기 어렵다. 항산화 활성은 이들 활성산소의 감소나 반응 생성물의 증감을 측정하여 평가되고 있다(Kim, 2018).

키토산올리고당은 자유라디칼의 축적을 억제하는 작용을 한다. 키토산은 효소로 분해하여 만든 COS의 라디칼 소거능은 COS를 첨가하지 않은 대조군에 비해 하이드록시 라디칼, 초과산화물 라디칼 및 알킬 라디칼 모두에서 라디칼 소거능을 보였으며, 이 중에서 1000 Da이하의 분자량을 가진 COS가 높은 라디칼 소거능을 나타냈다. 분자량 1000 Da 이하의 COS의 라디칼 소거능을 농도에 따라 살펴본 결과, COS의 농도가 0.05%이상에서는 거의 95%이상의 라디칼 소거능을 나타냈다(Mendis 등, 2007).

분자량이 서로 다른 키토산올리고당 및 키토올리고당(NA-COSs, 분자량 1-3 kDa 및 1 kDa이하)의 살아있는 세포에서 산화적 스트레스에 대한 효과는 이들 모두 DNA 및 단백질 산화에 대해 저해효과를 나타냈으며, 세포 내 글루타티온(glutathione, 노화방지 물질) 함량 및 마우스 대식세포(Raw 264.7)에서 세포 내 라디칼 소거 효과가 시간 의존적으로 현저하게 증가하였다. 특히 NA-COS(MW 1-3 kDa)는 세포 내 자유 라디칼의 생성 및 단백질 산화에서 분자량 1 kDa 이하보다 더 효과적이었다. 인간 골수세포(HL-60)에서 골수세포과산화효소(myeloperoxidase, MPO) 활성에 대한 NA-COS(MW: 229,21-593.12 Da)의 저해효과 및 마우스 대식세포(Raw 264.7)에서 DNA 및 단백질의 산화에 대한 저해 효과는 세포 내 글루타티온 양과 라디칼 소거효과가 시간의존적으로 현저하게 증가되

었다(Ngo 등 2008).

키토올리고당(NA-COS, 분자량 1이하 및 1-3 kDa)의 발진 미세신경세포(BV-2 cells)에서 과산화수소로 유도시킨 산화스트레스에 대한 작용을 검토한 결과, NA-COS는 세포 내 활성산소종(ROS) 생산을 줄임으로써 DNA의 산화를 현저하게 감소시켰으며 항산화효소(superoxide dismutase 및 glutathione)의 유전자 발현도 상승시켰다. NA-COS는 카파 B-알파 저해제(I $\kappa$ B- $\alpha$ )의 분해를 방해하고 핵전사 인자인 NF- $\kappa$ B(p65 및 p50)의 핵으로의 이동을 저해하여 NF- $\kappa$ B 활성화를 확실하게 저해시키는 것으로 보아 신경변성에 의해 발생하는 질환의 예방에도 도움이 될 수 있다(Oh 등, 2016).

분자량 1100(중합도 7, Ch1000) 및 분자량 500(중합도 3, Ch500)의 COS의 초과산화물 라디칼, 발암물질(carcinogen) 유도 활성산소종 및 과산화수소에 대한 소거능은 CH1000의 라디칼 저해활성이 리터당 100  $\mu$ mol농도에서 각각 54.8, 35.3 및 38.9%였으나 Ch500의 경우는 각각 40.1, 13.9 및 18.2%로 낮았다. 따라서 COS의 분자량 크기에 따라 라디칼 소거능이 현저한 차이가 있었으며, Ch1000은 높은 라디칼 소거능이 있어 라디칼 소거제로서 활용 가능하다고 시사하였다(Yang 등, 2006).

생체 내에서 키토산올리고당의 항산화력과 시험관에서 산화제인 스트렙토조토신(streptozotocin)에 의해 유도된 당뇨 쥐의 췌장  $\beta$ 세포 DNA의 손상에 대한 보호 효과는 췌장  $\beta$ 세포의 산화적 손상에 대한 탁월한 보호효과가 나타났고, 세포자살(apoptosis)을 저지하였으며 췌장의 형태학적 조사에서도 췌장 세포의 핵 농축(pyknosis), 췌장세포의 감소 및 섬(islets)의 축소에 대해 긍정적인 효과가 나타났다(Liu 등, 2007).

키토산올리고당의 인간배아 간세포 [embryonic hepatocyte(L02 cells)]에서 과산화수소에 의한 산화스트레스에 대한 보호효과 및 1,1-디페닐-2-피크릴-히드라질(1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl)

라디칼에 대한 소거능을 조사한 결과, 과산화수소에 의해 유도된 세포 생존력의 손실은 COS(0.1~0.4mg/ml)로 24시간 전배양 후 현저하게 회복되었으며, COS의 라디칼 소거능은 ml당 2mg 농도에서 80%에 가까웠고, COS는 과산화수소에 의해 유도된 세포에서 세포자살을 억제하였다. 또한 COS가 표적세포에서 효과를 발휘하는데 중요한 세포 내 COS 침투로 인해, COS가 산화적 스트레스에 대해 L02세포를 효과적으로 보호하였으므로 간 손상에 관련된 산화적 스트레스를 치료할 때 COS의 세포 내 침투 정도가 임상지표로서 활용될 수 있다 (Xu 등, 2010).

키토산올리고당의 간 보호 효과를 제3부틸히드로과산화물 (tert-butyl hydroperoxide, t-BHP)로 유도시켜 손상된 간세포(Chang liver cells)에서 활성산소종(ROS)의 생산 저해, 지질과산화 저해, 글루타티온 함량 및 카탈라아제(catalase), 초과산화물불균등화효소(SOD), 글루타티온과산화수소(GPX)를 포함한 항산화 효소의 양을 분석한 결과는 COS 농도 0.1 ~ 1.0 mg/ml에서 세포 성장에 대한 저해 효과가 나타나지 않았으며, t-BHP에 의해 산화적 손상을 받은 세포의 생존율을 증가시켰으나, 활성산소종 발생과 지질과산화는 오히려 감소되었다. 또한 COS는 글루타티온 함량 및 항산화효소의 활성을 증가시켰으므로 간세포를 보호한 것으로 나타났다(Senevirathne 등, 2011).

Luo 등 (2014)은 에탄올 유도 산화적 스트레스에 대한 COS의 간 보호 효과에 기초가 되는 매커니즘을 밝히기 위해 인간 L02 정상 간세포를 COS(0.25, 0.5, 1.0 mg/ml)로 전처리한 후 에탄올(80mM) 첨가로 간 독성을 유발시킨 결과, COS의 전처리는 활성산소종 발생을 저해하여 간세포를 보호하였으며, 에탄올에 의한 지질과산화 및 글루타티온의 고갈도 저해되었다. COS가 활성산소종의 발생을 저해하고 항산화효소의 유전자를 활성화시키는 항산화 잠재력을 가지고 있다는 사실을 밝힘으로써 알

코올 간 손상 질환의 치료제로서 활용될 수 있다고 보고한 바 있다.

키토산올리고당과 그 유도체 사이에 자유라디칼 소거에 대해 서로 다른 매커니즘의 존재를 알아보기 위해 그들의 구조를 변형시켜 구조와 활성과의 상호 관계는 라디칼 소거에서 수소공여는 DPPH(1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 및 탄소중심 라디칼의 소거에 우세하였으나 Fe<sup>2+</sup> 이온의 킬레이트화(chelation)는 수소절취와 다른 하이드록실 라디칼 소거 활성을 위해 간접적으로 기여하는 것으로 나타났다(Huang 등, 2006). 쥐 신경세포(Bv-2 cells)의 과산화 수소로 산화시킨 산화적 스트레스에 대한 COS의 신경세포의 활성산소종 및 DNA 산화증 현저하게 억제하였으므로 신경변성질환의 방지에 활용될 수 있다(Oh 등, 2016). 이처럼 COS는 항산화 효능이 뛰어나므로 노화 방지뿐만 아니라 식품의 산화 방지에 천연물인 산화 저해제로서 활용될 수 있다.

#### 4. 항균활성

키토산 및 그 올리고당의 항균활성은 키토산을 생물학적 응용에 직접 활용할 수 있는 가장 중요한 특성 중 하나로 인식되고 있다.

Allan 등 (1979)이 처음으로 키토산 및 그 유도체가 광범위한 항균효과를 나타낸다고 보고한 후 키토산 및 COS의 항균 효과에 대한 많은 연구들이 진행되었으며, 키토산은 세균, 효모 및 곰팡이에 대해 항균성이 있는 것으로 확인되었다(No 등, 2002).

그러나 키토산은 물에 용해되지 않아 활용도가 떨어지기 때문에 물에 용해가 가능한 수용성 키토산(저분자 키토산)이나 COS의 항균효과에 대한 연구가 활발히 진행되었다. 키토산올리고당의 광범위한 미생물에 대한 항균효과가 입증되면서 천연 식품보존제로 사용도 검토되었다(Devlieghere 등, 2004).



전세계적으로 식품에 기생하여 설사 질환의 가장 일반적인 원인으로 꼽히는 *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *P.seudomonas aeruginosa* 및 *Candida albicans*에 대하여 COS I (MW>100), II (MW100-10), III (10-1) 및 IV (MW<1 kDa)의 항균활성은 그룹(I, II, III)은 *B. cereus*에 대해, 그룹(I, III, IV)은 *B. subtilis*에서 대해, 그룹(II, IV)는 *S. aureus*에 대해, 그룹(II)은 *P. aeruginosa*에 대해, 그룹(I, II, IV)은 *C. albicans*에 대해, 그룹(III)은 *S.chevalieri*에 대해 항균효과가 높게 나타나 항균활성은 미생물 중에 따라 차이가 있음이 확인되었다(El-Sayed 등, 2017).

대표적인 두 가지 구강 병원균인 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*와 *Streptococcus mutans*에 대해 COS 혼합물(MW 2000-30,00 DD, 91%)의 항균활성은 *A. actinomycetemcomitans*의 ml당 2로그 집락형성단위(log colony forming units, CFU)는 30분 후 0.1% 키토산에 의해 불활성화 된 반면 120분간 노출되자 1ml당 4.5로그 CFU에서 불활성 되었다. 그러나 *S. mutans*에 대한 불활성화 정도는 120분까지 노출 후 ml당 0.5 로그 CFU보다 낮았지만 COS는 *A. actinomycetemcomitans*의 세포막 파괴를 초래하므로 치주염 치료에 활용될 수 있다(Choi 등, 2001).

Fernandes 등 (2008)은 키토산 및 그 올리고당의 모든 시료는 *Staphylococcus aureus* 및 *E. coli*에 대해 항균활성을 보였으나, 그 활성은 사용된 농도, 접종 재료의 양 및 분자량에 크게 의존하는 것으로 나타났다. 농도 0.5%, 0.25%, 및 0.1% w/v에서 모든 시료가 ml당  $10^3$ 세포에서 4시간 이내에 살균효과를 보였고, 0.1%(W/V) 처리에서는 ml당  $10^5$  혹은  $10^7$  세포에서 단지 세균발육 정지상태였으며, COS 혼합물 0.25%는 적어도 3 로그 주기(log cycle)에 의해 대장균(*E. coli*) 초기 개체군을 감소시키는데 충분하였다. COS는 ml당  $10^7$  세포에 대해 세균 살균 효과가 0.5%에서 나타났고 중간 크기의 키토산과

달리 *S. aureus*에서는 살균효과가 나타나지 않아 키토산에 비해 항균효과가 낮았다.

키토산올리고당(COS), 저분자량 키토산(LMWC) 및 키토산(CS)의 인간 결장에서 분리한 대표적인 혐기성 박테리아에 대한 항균효과는 비병원성 혐기성 박테리아 균주(*Clostridium paraputrificum*, *Clostridium beijerinckii*, *Roseburia intestinalis*, *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Faecalibacterium prausnitzii* 및 *Blautia coccoides*)의 비성장율을 COS(2, 3, 6 kDa) 0.25와 0.5%, 저분자량 키토산(LMWC, 10 및 16 kDa) 0.025와 0.05% 및 키토산(CS) 0.05와 1.0%로 처리한 후 성장율을 대조군과 비교해보면, 높은 농도의 COS 및 LMWC에서 모든 균주에서 성장율이 감소되었으며, 키토산가수분해물이 *R. intestinalis* 및 *F. prausnitzii*에서 비교적 높은 내성을 보였고, 더 감염되기 쉬운 것은 *Bacteroides* sp. 와 *Clostridium* sp. 에 속하는 박테리아였다. 항균활성은 최소저해농도(MIC) 및 최저 살균농도(MBC)의 측정에서 중합도에 따라 증가되었고 최소저해농도는 CS/LMWC의 중합도 및 박테리아 균주에 의존하여 0.25 - 4.5% 범위였다. 최저 살균농도 또한 중합도에 따라 감소되었다. 16 kDa의 LMWC와 키토산이 가장 항균효과가 높았으며, 저분자량인 COS(2 및 3 kDa)는 항균활성이 낮았다(Šimůnek 등, 2012). 중합도 2 - 6인 COS 혼합물이 *Bacillus cereus* 및 *E. coli*에 대해 키토산보다 항균효과가 높았으며, COS 혼합물에서 육당체(hexamer)가 항균효과가 가장 높았고 이어 5당체, 4당체, 3당체, 및 이당체 순으로 항균효과가 나타났다(Kittur 등, 2005).

프리바이오틱스(Prebiotics) 장관 내에서 *bifido bacteria* 나 *lactobacilli* 같은 특정 유익균의 성장 및 대사를 선택적으로 촉진시켜 유해균의 성장이 저하되어 장내 세균의 균형을 맞추어 장 건강 및 면역 기능을 강화시키는 역할을 하는 식품성분이다. COS는 항균효과에 의해서 유해균의 생육을 억제하

지만 *Bifidobacterium animalis* Bb12, *Bifidobacterium animalis* Bo, 및 *Lactobacillus acidophilus* ki 등 유익균의 성장을 현저하게 촉진시키지 않았지만 오히려 낮은 농도에서 *bifidobacteria*의 성장을 약간 증가시켰다(Fernandes 등, 2012).

키토산, 저분자 키토산(Low-molar mass chitosan, LMWC) 및 COS의 *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. infantis*, 및 *B. longum* ssp. *longum* 에 대한 비성장율(specific growth rate)을 측정 한 결과, COS-LMWC 및 키토산의 MIC 값은 0.025 - 0.75% 범위였으며, 키토산과 LMWC 존재로 모든 *bifidobacteria*의 성장은 0.025% 농도에서 감소되었고 0.5%에서는 성장이 완전히 저해되었다. 그러나 COS는 어떤 저해 효과를 보이지 않았으며 오히려 *B. bifidum*, *B. catenulatum* 및 *B. infantis*의 경우 성장율이 증가되었다(Šimůnek 등, 2012).

생체 내에서 COS의 prebiotic 특성을 확인하고 항대장염의 메커니즘을 밝히기 위하여 kg당 500mg의 COS를 정상 쥐에게 경구 투여하였고, 대장염이 있는 쥐는 3.5% 텍스트란황산염(DSS)으로 처리한 후 쥐의 결장 미생물 조성을 실시간 중합효소연쇄반응(polymerase chain reactor, PCR)을 통하여 16s 리보솜 DNA의 정성분석에 의해 위와 소장 내에서 소화 효소로 분해되지 않는 저분자 probiotics로서 COS 기능은 *Bacteroidetes* 및 *Actinobacteria* phyla의 양을 증가시키는 것으로 보아 probiotics로서의 기능을 나타냈고, 정상 쥐와 대장염 쥐에서 *Enterococcus* 같은 강력한 병원성 균뿐만 아니라 *Firmicutes* 및 *Proteobacterio* phyla의 성장도 저해하였다. 또한 COS의 구강투여는 결장세포의 성장 및 분화, 수송과정, 에너지 대사를 지속시키는 능력을 갖고 있는 큰 창자에 있는 박테리아의 발효 최종산물을 조절하고, 짧은 사슬의 지방산의 농도가 결장에서 증가되었다. 따라서 COS의 투여가 장관의 건강에 유익한 효과를 갖고 있고 더 중요한 것은 항대장염 효과에 대한 메커니즘이 될 수 있는 짧은 사슬

지방산 생산의 억제를 차단하고 태생 창자 대사의 장내 세균의 불균형(dysbiosis)으로부터 쥐를 보호하는 경향을 볼 수 있다(Long 등, 2018).

Jeon과 Kim (2000)은 효소막반응기를 이용하여 고분자량(HMWCOS), 중분자량(MMWCOS) 및 저분자량(LMWCOS) 올리고당을 제조하여 이들의 항균효과를 검토한 결과, 대부분의 박테리아의 성장은 COS처리에 의해 저해되었으며 특히 키토산 처리가 COS처리에 비해 항균효과가 높았지만 COS 중 고분자량 COS는 항균효과가 높게 나타나 COS의 분자량이 미생물 저해에 중요하며 10 kDa이상이어야 활성이 가능하다고 보고하였고, 작은 새끼 돼지 모델(Huanjiang mini-piglet model)을 이용하여 내장 미생물 총(microbiota) 및 그의 대사산물에 대한 COS의 식이보충 효과를 알아보기 위해 기초 식이에 COS를 kg당 0.5g의 첨가 및 무첨가한 것을 14일간 공급하였을 때 COS의 식이 첨가로 인해 회장 및 결장 미생물 무리의 조성을 변화시켰고 유익한 장내 세균의 양 및 내장의 내장 내용물에서 짧은 사슬지방산의 농도를 증가시킨 반면, 대조군에 비해 강력한 병원성 세균의 성장 및 여러 단백질 유도 대사산물의 양은 억제되었다. 이 같은 사실은 COS는 prebiotic 활성이 있으며, 작은 새끼돼지에서 유익한 방법으로 내장의 내장 환경을 변화시키는 것으로 나타났다(Kong 등, 2014).

키토산 및 COS로 만든 필름의 용해성, 수증기 침투성 및 항균활성에 대한 열처리 및 중화처리에 대한 효과는 COS필름이 키토산필름보다 *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Serratia liquefaciens* 및 *Lactobacillus plantarum*에 대해 더 강한 항균활성이 나타났는데 이것은 필름에 COS의 존재에 기인된 것으로 볼 수 있다. 열처리 및 중화처리가 키토산필름의 용해도를 현저히 감소시켜 그들의 항균활성에 큰 손실을 야기시켰으며, 키토산 필름에 COS가 혼입되면 필름의 수증기 투과성에 영향을 주지 않고 미생물에 대한 저해효과를 증가

시켰다. 따라서 열처리 혹은 중성처리로 결합시킨 COS의 혼입에 의해서 높은 항균활성을 갖는 불용성 키토산필름을 만드는 것이 가능하다(Castro 등, 2016).

새로운 항균물질이 전통 항생물질에 비해 병원성 미생물에 대한 내성을 능가할 수 있는 향상된 천연 항균물질의 개발이 필요한 시점에서 키토산 및 키토산올리고당은 항균력이 높은 천연물로서 식품산업에서 활발히 이용될 것으로 기대된다.

## 5. 항고혈압 활성

고혈압은 생활습관병의 대표적인 질환이자 현대인의 주요 사망 원인 중 하나이다. 고혈압이 문제가 되는 것은 환자의 자각증상이 거의 없는 상태로 악화되어 그대로 방치하면 동맥 경화를 촉진하여 심각한 합병증을 유발시키기 때문이다. 이것으로 인해 매년 약 9백 40만명의 사람들이 사망하는 것으로 보고되고 있으며, 전 세계적으로 고혈압 환자는 현재 11억 3천만명에 이른다(Shimizu, 2019).

심장은 전신에 산소와 영양분이 풍부한 혈액을 보급하기 위해서 규칙적인 수축과 이완을 반복하는데 매번 수축 할 때 마다 혈액은 동맥으로 내뿜어지고 결과적으로 동맥혈관내의 압력을 증가시킨

다. 물론 심장이 이완되는 동안에는 혈액을 배출하지 않고 동맥내의 압력도 감소하게 된다.

동맥의 압력은 심장이 수축할 때 마다 내뿜어지는 혈액량과 혈관에 혈액이 흐르는 것을 방해하는 소위 동맥혈관의 저항에 비례하여 우리 몸의 혈압이 결정된다. 흔히 성인 혈압은 심장이 수축할 때의 수축기 혈압이 120mmHg정도이고 심장이 이완되어 있을 때의 이완기 혈압이 80mmHg정도면 정상이라 할 수 있다(Kim, 2018).

본태성 고혈압은 가장 흔히 발생하는 만성질환으로 심장 혈관병, 뇌졸중, 심부전의 위험인자로 꼽힌다. 폐, 혈관벽, 뇌, 신장 등에 존재하는 엔지오텐신 전환효소 (Angiotensin-converting enzyme, ACE)는 혈압이나 체액량 조절에 있어 중요한 역할을 하는 특이성이 큰 단백질 분해효소이다. Fig. 5에 ACE가 혈압을 상승시키는 메커니즘을 나타내었다. ACE는 불활성의 엔지오텐신 I (angiotensin I)에서 두 개의 아미노산을 유리시켜 승압작용이 강력한 엔지오텐신 II (angiotensin II)로 변환시키는 효소다. 따라서 ACE저해제는 이들 반응을 저해하고 혈관을 확장 시킴으로써 혈압을 저하시키므로 고혈압 치료제로 사용되고 있다(김, 2015).

키토산올리고당은 아세틸화 정도에 따라 C-2 위치에 아미노기 또는 아세트아미노기를 갖고 있는데

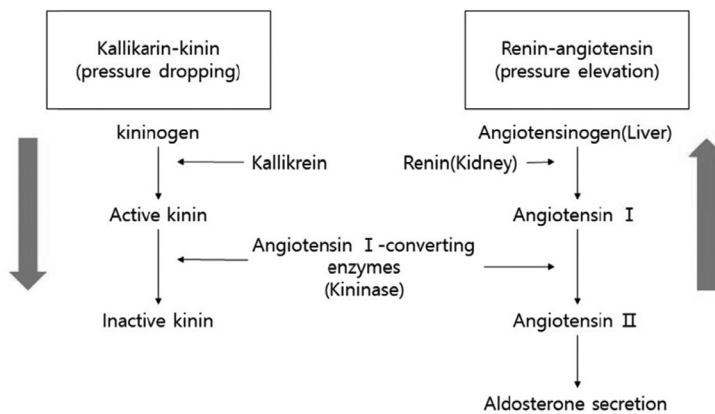


Fig 5. Blood pressure control mechanism (Nagai et al., 2013).

이들이 ACE 저해를 포함한 여러 생물활성을 나타내는데 관여한다. 최근에 COS 및 그 유도체가 순환기 질환(cardiovascular disease, CVD)의 위험을 줄여줄 수 있는 강력한 ACE 저해제로서 보고되었다(Park 등 2008; Huang 등, 2005; Ngo 등 2008; Qian 등 2010).

고식염 식사는 염소이온이 ACE를 활성화시키기 때문에 혈압을 증가시키지만 COS는 염소이온과 결합하여 혈압상승을 억제할 뿐만 아니라 ACE 저해활성도 있어 고혈압 합병증을 줄여줄 수 있다(Byun 등, 2002). COS의 ACE 저해 활성은 탈아세틸화도(DD)에 의존한다. 50%, 75% 및 90% 탈아세틸화 키토산 중 50% 탈아세틸화된 COS(1-5 kDa)는 COS(1 kDa 이하 및 5-10 kDa)에 비해 IC<sub>50</sub> 값이 1.22±0.13 mg/mL 로 ACE 저해활성이 가장 높게 나타났다. 라인웨버-버크(Lineweaver-Bark)의 식에 의하면 경쟁적 저해양상을 보였는데, 이것은 COS의 분자량 및 탈아세틸화도가 ACE저해에 중요하다는 사실을 제시한 것이다(Park 등, 2003).

키토산올리고당의 ACE 저해특성을 근거로 하여 ACE 저해를 갖는 유도체를 합성하기 위해 C-6 위치에 2-클로로에틸아미노히드로클로리드(2-chloroethylaminohydrochloride)를 결합시켜 화학적으로 변형시킨 AE-COS는 ACE 저해 효과가 2.5 mg/ml에서 89.3%였고, IC<sub>50</sub> 값은 0.80 mg/ml였다(Ngo 등, 2008). 그러므로 이 결과는 아미노에틸기에 의해 파라노오스(pyranose)의 C-6 위치에 수소원자의 치환이 ACE 저해효과를 증진시킨 것으로 볼 수 있다. Huang 등 (2005)은 COS를 캡토프릴(Captopril)과 유사한 특이한 구조적 특징을 갖게 하기 위해 -COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COO-기로 카르복실화시킨 C-COS는 캡토프릴과 대등한 활성을 나타내는 강한 ACE저해 효과를 나타내었다고 보고한 바 있다.

ACE 작용에서 레닌(renin, angiotensinogenase)은 레닌-엔지오텐신 시스템에서 속도제한효소로서 중요한 역할을 한다. 혈장 엔지오텐시노겐

(angiotensinogen)이 엔지오텐신-1으로 분해되고 이것은 ACE에 의해 엔지오텐신 II로 전환된다. 그러므로 레닌효소의 저해도 고혈압 치료에 있어서 하나의 목표가 될 수 있다(Fig. 5).

한외여과막 반응기(UF membrane reactor)를 이용하여 분자량(10-5, 5-1 및 1 kDa 이하) 및 탈아세틸화도 90-50%인 6종류의 COS를 제조하여 레닌효소의 저해활성을 검토한 결과, 모든 COS가 농도 의존적으로 레닌 저해활성을 나타냈다. 특히 90% 탈아세틸화 COS는 50% 탈아세틸화 COS에 비해 레닌 저해활성이 높게 나타났으며, COS(1-5 kDa, 탈아세틸화도 90%)가 IC<sub>50</sub> 값이 0.51 mg/ml로 가장 높은 레닌저해활성을 나타내 COS의 분자량과 탈아세틸화도가 레닌 저해활성에 영향을 미치는 가장 중요한 인자인 것으로 밝혀졌다(Park 등, 2008).

## 6. 항 알츠하이머 치매 활성

치매는 정상적인 뇌에서 다양한 원인에 의해 뇌기능에 손상을 입고 이로 인해 서서히 인지능력이 저하되어 결국에는 정상적인 생활을 영위하는 것을 어렵게 만드는 질병이다. 치매는 원인에 따라 뇌 속의 물질이 변형되어 뇌에 손상을 일으키는 알츠하이머 치매, 뇌혈관의 경색이나 출혈로 인한 혈관성 치매, 파킨슨병과 같은 퇴행성 뇌질환 치매 등 여러 가지로 나뉘는데 발병 비율을 보면 알츠하이머병이 50% 정도를 차지하며 그 다음으로 뇌혈관 질환에 의한 혈관성 치매가 30%, 퇴행성 뇌질환과 그 외의 치매가 각각 10% 정도이다(김 과 변, 2018).

알츠하이머 치매는 베타-아밀로이드( $\beta$ - amyloid)라는 단백질의 플라크(Plaques) 축적과 타우(tau) 단백질의 신경섬유매듭(tangles) 형성으로 발병되는 것이 특징이다.

인간의 뇌는 수많은 신경세포(neuron)가 마치 거미줄과 같은 네트워크를 이루면서 신경을 구성하

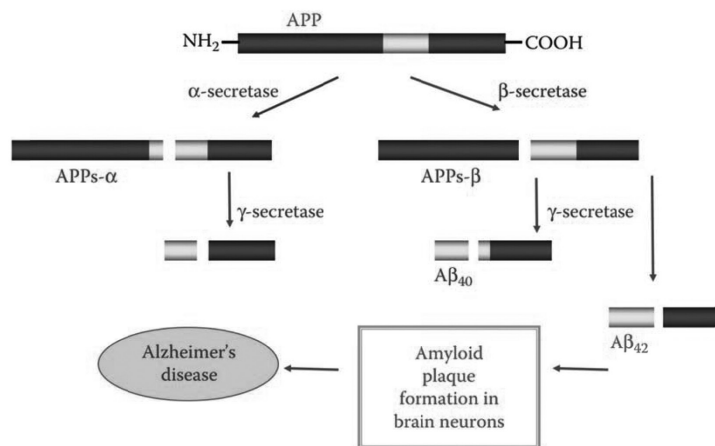


Fig 6. The removal of APP in the normal brain (left) and in the brain of a patient with Alzheimer's disease (right) (Kim, 2018)

고 있다. 신경세포는 핵을 포함하고 있는 소포체, 소포체 인접 뉴런이 보내준 신호를 받아들이는 수상돌기(dendrite) 그리고 이렇게 받아들인 전기적 신호는 다른 뉴런으로 전달하기 위한 부분인 축색돌기(axon)로 이루어진다.

뉴런은 전기를 통해서 서로 신호를 주고 받는데 이때 한 뉴런의 축색돌기의 말단과 다른 뉴런의 수상돌기가 접합부(synapse)에 연결된다. 이 접합부에서 전기적 신호가 신경전달물질로 바뀌어 한 뉴런의 축색돌기 말단에서 다른 뉴런의 수상돌기로 전달된다. 건강한 뇌에서는 이러한 신호전달 과정이 원활하게 이루어지지만 알츠하이머병 환자의 뇌에서는 신경세포의 내외부의 변화로 인해 이 과정이 제대로 이루어지지 못한다(Kim, 2018).

우선 신경세포 외부의 측면에서 살펴보면 정상적인 뇌에서는 지질 이중층으로 구성된 뉴런 세포막을 관통하는 형태로 존재하는 아밀로이드 전구체 단백질(amyloid precursor protein, APP)을 제거하기 위해 알파-세크리테이즈( $\alpha$ -Secretase)와 감마-세크리테이즈( $\gamma$ -secretase)가 작용한다. 알파-세크리테이즈는 베타-아밀로이드( $\beta$ - amyloid)라는 단백질을 형성하지 못하도록 APP의 일부를 자른다. 이때 잘려진 부분은 신경세포 표면으로부터 유리되

며, APP의 나머지 부분은 감마-세크리테이즈가 잘라내어 신경세포 외부로 방출시킨다. 이렇게 방출된 APP 조각들은 신경세포에 영향을 주지 않는다(Kim, 2018).

알츠하이머병에 걸린 뇌의 경우에는 알파-세크리테이즈 대신에 베타-세크리테이즈( $\beta$ -secretase)가 작용한다. 베타-세크리테이즈 역시 APP을 절단하는데 알파-세크리테이즈가 자른 부위와는 다른 부분을 절단한다. 곧이어 감마-세크리테이즈가 남아있는 APP를 자르는데 이때 세포막 외부로 유리되는 단백질이 베타-아밀로이드라는 단백질이다. 베타-아밀로이드는 하나로 모여 신경세포 외부에서 소중합체(oligomer)를 형성하여 뉴런간의 신호를 전달하는 부위인 시냅스를 막아 신호 전달을 차단시킨다. 이들 소중합체들이 다시 모여서 베타-아밀로이드 플라크를 형성한다(Kim, 2018).

키토산올리고당이 치매유발 물질인 베타-아밀로이드의 생성에 관여하는 효소인 베타-세크리테이즈의 활성을 저해한다는 사실을 확인하였다. 흥미로운 점은 COS의 베타-세크리테이즈 저해도가 탈아세틸화도에 의존하였는데, 탈아세틸화도가 50%와 70%인 것에 비해 90%의 경우 저해효과가 월등히 뛰어났다. 또한 90% 탈아세틸화시킨 COS를 분



자량 크기에 따라 저해도를 측정된 결과, 3-5 kDa의 분자량을 가진 COS가 베타-세크리테이즈를 억제시키는데 효과가 뛰어났다(Byun 등, 2005).

말초신경을 손상시킨 후 신경 재생에 COS를 처리하였을 때의 효과를 알아보기 위해 파괴된 비골림프절 신경(peroneal nerve)을 가진 토끼에게 6주 동안 체중 kg 당 1.5 및 3.0 mg의 COS 및 동일량(volume)의 식염수를 매일 정맥주사로 투여했다. COS 처리 후 경측 후방 근육(tibialis posterior muscle)의 퇴화 상태 및 손상된 비골림프신경의 재생 정도를 평가한 결과, 화합물 근육 작용 포텐셜(potential, 전위), 재생된 수초 신경 섬유의 수, 수초(myelin sheaths)의 두께, 그리고 경측 후방 근섬유의 단면부분이 COS의 처리를 받은 신경에서 농도의존적으로 현저하게 개선되었다. 즉 COS는 초기의 정상 비골림프절신경의 손상 후 말초신경 재생을 가속시킨다는 것이 확인되었다. 따라서 COS는 부상으로 손상된 말초신경 재생의 개선을 위한 강력한 신경보호제가 될 수 있다(Gong 등, 2009).

배양된 해마(hippocampal) 신경세포를 글루탐산염(Glutamate)으로 유도시킨 신경독성에 대한 COS(MW 800)의 보호 효과는 배양된 해마 신경세포에서의 글루탐산염(125 mM) 유도 세포의 세포자살(apoptosis)은 COS 처리로 농도의존적으로 감소되었으며, COS는 세포 내 칼슘농도( $Ca^{2+}$ )에서 글루탐산염 유도증가를 억제시켰고, 효소분석에 의해 COS는 캐스페이즈-3(caspase-3)의 글루탐산염 유발활성(glutamate evoked activation)에 길항작용을 나타냈다. 이들 결과는 COS가  $Ca^{2+}$ 농도의 증가로 인한 방해와 캐스페이즈-3 활성을 저해시킴으로써 글루탐산염에 의해 유도된 세포손상으로부터 배양된 해마 신경세포를 보호하는 것을 보여주었다(Zhou 등, 2008).

구리는 시트크롬 산화효소(cytochrome oxidase), Cu/Zn, 초산화물 불균등화효소(Cu/Zn Superoxide dismutase), 도파민 히드록시화효소(dopamine hydro

xylase), 아민 산화 효소(amine oxidase), 구리 일산화 효소(Cu monooxygenases) 및 아질산 환원효소(nitrite reductase) 같은 많은 효소의 보조 인자(cofactor)로서 세포생리학에서 중요한 원소이다. 그러나 구리축적은 신경계에 독성을 나타낼 수 있다. 펜톤(Fenton) 반응(과산화수소와 황산철같은 철염과의 반응으로 하이드록시 라디칼 발생)에 참여함으로써 하이드록시 라디칼 같은 활성산소종(ROS)의 생산을 촉진하기 때문이다. 구리나 다른 금속이온과 같은 산화환원 활성 생체금속(biomaterials)에 의한 항상성 결핍은 알츠하이머 질환과 같은 신경변성 질환에 대한 병리학에서 중요한 역할을 하는 신경세포에 산화적 스트레스를 야기시키는 것으로 알려져 있다(Xu 등, 2010).

일차성 배양시킨 쥐의 피질 신경세포에서 구리로 유도시킨 신경 독성에 대한 COS(MW 1500, DD 90%)의 보호 효과는 COS의 전처리로 피질신경 세포에서 구리의 독성이 농도 의존적으로 억제되었는데 이것은 COS가 세포 내 활성산소종의 증가를 방해함으로써 일차성 피질신경세포에서 구리이온에 의해 유도된 신경독성에 대해 보호효과가 있는 것으로 밝혀졌다(Xu 등, 2010).

COS가 항산화제로서 신경성장인자(nerve growth factor, NGF)로 분화시킨 래트의 크롬친화성 세포종(pheochromocytoma, PC12) 세포에서 과산화수소 처리에 의해 유도된 세포활력의 감소에 어떻게 보호효과를 나타내는지를 조사한 결과, COS처리는 과산화수소에 의해 유발된 세포활력의 감소를 억제시켰는데, 이것은 시토솔  $Ca^{2+}$ 의 감소 및 세포 내 활성산소종의 감소와 연관되었으며, 또한 Bcl-2는 세포자살로부터 세포를 보호하고 세포자살을 막는 조절인자인 반면에 Bax는 세포사멸촉진 조절인자로 세포사멸을 촉진한다. COS는 Bax 단백질의 감소 조절(down-regulation), 캐스페이즈(caspase) 단백질의 감소, Bcl-2의 상승 조절(up-regulation)에 관여하는데 COS처리는 핵 내에서 NF-E2-관련인



Table 2.  $\beta$ -secretase known as  $\beta$ -amyloid cleavage enzyme (BACE-1), prolyl endopeptidase (PEP) known as prolyl oligopeptidase (POP) and acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activities of chito-oligomers and its derivatives

Chito-oligomers derivatives	Neuroprotective activity	IC50	Ref.
Sulfated-COS (1-5 kDa, 50% deacetylation)	Prolyl endopeptidase inhibitory	0.38 mg/ml	Je et al., 2007
COS 3-5 kDa (90% deacetylation)	$\beta$ -secretase inhibitory	25 - 42 mM	Byun et al., 2005
COS 5-10 kDa (90% deacetylation)	$\beta$ -secretase inhibitory	2.59 mg/ml	Lee, et al., 2009
COS 1-5 kDa (90% deacetylation)	$\beta$ -secretase inhibitory	1.67 mg/ml	Lee, et al., 2009
COS < 1 kDa (90% deacetylation)	$\beta$ -secretase inhibitory	3.52 mg/ml	Lee, et al., 2009
COS 5-10 kDa (50% deacetylation)	$\beta$ -secretase inhibitory	1.98 mg/ml	Lee, et al., 2009
COS 1-5 kDa (50% deacetylation)	$\beta$ -secretase inhibitory	2.93 mg/ml	Lee, et al., 2009
COS < 1 kDa (50% deacetylation)	$\beta$ -secretase inhibitory	>4.00 mg/ml	Lee, et al., 2009
Sulfated-COS (1-5 kDa, 50% deacetylation)	$\beta$ -secretase inhibitory	0.38 mg/ml	Je et al., 2007
AE-COS	Acetylcholinesterase	56.5 $\pm$ 0.26 mg/ml	Yoon et al., 2009
DMAE-COS	Acetylcholinesterase	24.1 $\pm$ 0.39 mg/ml	Yoon et al., 2009
DEAE-COS	Acetylcholinesterase	9.2 $\pm$ 0.33 mg/ml	Yoon et al., 2009
Gallate-chitosan (1:1)	Acetylcholinesterase	138.5 $\pm$ 2.5 mg/ml	Cho et al., 2011
Gallate-chitosan (0.5:1)	Acetylcholinesterase	177.9 $\pm$ 3.3 mg/ml	Cho et al., 2011
Gallate-chitosan (0.25:1)	Acetylcholinesterase	196.4 $\pm$ 1.7 mg/ml	Cho et al., 2011
Gallate-chitosan (0.1:1)	Acetylcholinesterase	397.6 $\pm$ 5.2 mg/ml	Cho et al., 2011

Aminoethyl-chitooligomers (AE-COS), dimethylaminoethyl-chitooligomers (DMAE-COS) and diethylaminoethyl-chitooligomers (DEAE-COS) (Ngo et al., 2015)

자 2(NF-E2-related factor 2, Nrf2, 항산화 반응인자)를 안정화시킨 반면 열충격 단백질(HSP) 90의 발현은 감소시켰다. 또한 COS는 서로 다른 분열촉진인자 활성화 단백질 키나아제(mitogen-activated protein kinase, MAPK)의 인산화를 저해할 수 있어 치매유발에 관여하는 비정상적인 인산화를 조절할 수 있다. 이 연구결과는 열충격 반응 및 MAPK 연쇄반응(cascades)이 세포생존에 관련되어있어 두 경로를 상반되게 조절하는 것으로 나타나 COS는 신경변성에 의해 발생된 질환 치료에 뛰어난 효과를 발휘할 수 있다(Joodi 등, 2011).

아세틸콜린(Acetylcholine)은 신경조절자로 기능하는 중앙 신경계 및 말초 신경계에서 신경전달물질로서 관여한다. 아세틸콜린은 신경근접합부에 부착된 아세틸콜린 에스테르가수분해효소(acetylcholine esterase, Ach E)에 의해 콜린과 초산으로 분해되며, 신경근 접합부 및 뇌콜린성 시냅스

에서 신경전달물질인 아세틸콜린의 분해를 통해 신경흥분을 전달하는데 중요한 역할을 한다. 현재 아세틸콜린 에스테르가수분해효소 저해제가 치매환자들의 아세틸콜린 가수분해를 저해하기 위해 널리 이용되고 있다.

Lee 등 (2009)은 분자량 및 탈아세틸화도가 서로 다른 6종류의 COS로 아세틸콜린 에스테르가수분해효소에 대해 미치는 저해효과는 90% 탈아세틸화된 COS가 50% 탈아세틸화된 COS에 비해 저해활성이 월등히 높았으며, 90% COS에서 분자량 1000-5000 Da의 COS가 가장 높은 활성을 보였다. 세포배양실험에서도 90% 탈아세틸화된 중간 크기의 분자량을 가진 COS(90-MMWCOS)가 PC12세포에서 베타 아밀로이드(A $\beta$ 25-35)에 의해 유도된 아세틸콜린 에스테르가수분해효소의 발현 및 활성을 억제시키는 것으로 나타나 치매예방에 활용될 수 있을 것으로 기대된다고 보고한 바 있다.

## 7. 항당뇨 활성

생활습관병인 당뇨병 환자는 식생활의 변화와 더불어 급격히 증가하고 있다. 대한당뇨병학회와 국민건강보험공단의 당뇨병 관련 역학 자료 분석에 따르면, 2006년 165만 5495명(5.6%)에 머물렀던 당뇨병 환자 수는 7년간 꾸준히 증가하여 2013년 272만 777명(8.0%)에 이른 것으로 집계되었다. 대한민국 성인 10명 중 1명이 당뇨병을 앓고 있다는 진단인 것이다.

당뇨병 환자의 증가는 우리나라뿐만 아니라 세계적인 경향이며 최근에는 개발도상국에서도 고칼로리 위주의 식사와 교통수단 이용으로 인한 운동량 저하로 당뇨병이 급증하고 있어 세계당뇨병 환자 수는 2014에 이미 4억 2000만명을 넘어 섰다 (Loke, 2018).

당뇨병은 병의 진행과 더불어 눈, 심장, 동맥, 신경 등에 장애가 발생되는데, 이들 합병증을 줄이는 것이 당뇨병의 치료 목적이라고 해도 과언이 아니다. 당뇨병은 췌장이 필요한 인슐린을 생산하지 못하거나 신체가 생산된 인슐린을 효율적으로 이용하지 못하여 발생하는 대사질환이다. 이것은 오줌 속으로 포도당의 유출(spillage)을 유도할 수 있는 혈중 포도당양(hyperglycemia, 다당증)을 증가시킨다.

체내 지방축적으로 유발되는 비만은 당뇨병, 심혈관 질환(CVD), 압, 수면을 방해하는 무호흡 증상 등 여러 식이관련 만성질환을 유발시킬 가능성이 높다(Jauch-Chara 와 Oltmanns, 2014).

당뇨환자의 출혈은 비정상적으로 멈추기가 어려워 지혈 및 혈액응고가 쉽지 않다. 이와 관련하여 키토산올리고당 및 그 유도체가 지혈을 강화하고 당뇨병 환자의 지속적인 출혈을 방지하는데 활용될 수 있다.

글로코자민 중합체가 지혈시스템을 활성화하는 능력을 검토하기 위해 미세조류에서 유도된 메타폴리-N-아세틸클루코사민이 피브린 중합을 가속

화하는데 가장 효과적인 인자로 작용하여 혈관내피 성장인자의 생성을 감소시켜 혈관 형성 감소로 당뇨병 환자에게 손상된 조직을 수선하는데 기여하였다(Fischer 등, 2007).

Lee 등(2003)은 COS의 항당뇨효과를 스트렙토조토신(STZ)으로 유도시킨 비인슐린 의존성 당뇨 쥐를 이용하여 검토한 결과, 0.3% COS로 처리한 후 당뇨쥐에서 공복 글루코오스 양은 19% 감소되었고, 글루코오스 내당능은 정상쥐에 비해 낮아졌다. 당뇨쥐에게 4주동안 0.3% COS를 투여한 후 내당능은 대조구에 비해 현저하게 증가하였으며 글루코오스로 유도시킨 인슐린 발현은 현저하게 증가하였고, 중성지질(triglycerides)의 양은 대조구에 비해 49%까지 감소되었다.

COS를 투여한 쥐의 콜레스테롤 함량은 통계적으로 큰 차이는 나타나지 않았지만 대조구에 비해 약 10% 정도 감소되었다. 또한 COS는 근원섬유의 분리 및 퇴화, 그리고 미토콘드리아의 액포(vacuolation) 같은 당뇨심근증(diabetic cardiomyopathy) 징후가 감소되었을 뿐만 아니라 글루코오스 내당능과 인슐린 분비를 증가시켰으며 중성지질을 감소시켜 COS는 항당뇨제로서의 이용 가능성을 시사하였다.

정상쥐와 당뇨쥐의 식이에 COS를 첨가한 경우, 당뇨, 비만 및 대사조절에 관련된 간과 골격근에서 가장 중요한 생체에너지 기관인 미토콘드리아의 기능에 미치는 영향은 0.5% COS를 6주동안 정상쥐와 당뇨쥐에게 음료수로 공급하였을 때 COS는 간장에너지학적으로 볼 때 비교적 높은 활성을 나타냈으며 부작용은 전혀 없었으나 골격근 생체에너지학에서는 여러 생체에너지 변수에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 키토산올리고당은 당뇨병 치료에 비교적 안전하였지만 높은 농도의 복용량을 사용하였을 때는 독성학적 부작용이 있는 것으로 나타났다(Teodoro 등, 2016).

COS의 항당뇨효과 및 메커니즘을 규명할 목적으로 2형 당뇨쥐에게 스트렙토조토신(STZ)의 주입



과 함께 고에너지 식이를 8주간 공급한 후 당대사의 변화, 인슐린 감수성, 혈청간 표식효소량, 간글리코겐 함량, 글루코오스 운반체 GLUT-4의 발현, 말론알데히드 함량, 산화물균등화효소(SOD) 활성 및 췌장의 형태를 관찰한 결과, COS는 공복혈당과 공복인슐린을 현저하게 감소시켰고 인슐린 감수성 지표(ISI)를 증가시켰으며 경구 포도당 내당능을 개선시킨 것으로 나타났다. 또한 COS는 간 글루코키나아제의 활성과 글리코겐 함량을 증가시켰으며 지방 및 가자미근(soleus muscle)에서 GLUT-4의 발현을 상승조절하였다. 췌장균등액에서 산화물균등화효소(SOD)의 활성을 증가시켰으나 말론알데히드 함량은 감소시켰다. 당뇨쥐의 췌장 헤마톨실린/에오신 염색은 섬(islet)의 균열이 나타났지만 췌장 섬의 변화는 COS 투여로 최소화되었다. 췌장 β-세포에 대한 COS 효과는 증식 촉진 글루코오스 자극, 인슐린 방출 증가, GLUT-2 mRNA 발현의 상승조절, STZ-유도 세포자살에 대해 보호하는 데 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다.

따라서 COS는 인슐린 저장을 개선, β-세포 증식의 촉진, 인슐린의 분비 증가 및 β-세포의 보호 작용에 의해 제2당뇨병을 치료하는 효과가 있는 것으로 밝혀졌다 (Ju 등 2010).

스트렙토조토신(streptozotocin)으로 유도시킨 COS는 당뇨 쥐에서 췌장 섬세포에서 인슐린 분비를 효과적으로 가속시켰으며 당뇨쥐의 일반적인 임상 증후를 개선시키고 혈장 및 뇨의 포도당 감소, 포도당 내성의 질환을 정상화시키기에 COS는 당뇨병 치료에 사용할 수 있다(Liu 등, 2007).

키토산올리고당의 항당뇨효과를 스트렙토조토신(streptozotocin)으로 유도시킨 비인슐린 의존성 당뇨쥐에서 조사한 결과, 0.3% COS로 처리한 당뇨쥐의 단식 글루코오스량은 기존상태보다 19% 감소하였으며, 포도당 내성은 정상그룹에 비해 당뇨그룹이 낮은 것으로 드러났다. 0.3% COS를 당뇨쥐에게 4주 동안 처리하였을 때 당내성은 당뇨 대조군

에 비해 현저하게 증가하였으며, 포도당 유도 인슐린 발현도 현저하게 증가했다. 또한 0.3% COS를 섭취한 당뇨쥐의 중성지방(triglyceride)량은 당뇨조절 쥐에서의 값에 비해 49%까지 감소하였다. COS로 처리한 동물의 콜레스테롤량의 차이는 크지 않았지만 대조군에 비해 약 10%까지 감소되었으며, 근원섬유의 유리 및 퇴화 그리고 마이토콘드리아의 액포 같은 당뇨심근증(cardiomyopathy)의 징후도 감소되었으며, 또한 중성지방을 감소시키는 효과가 나타났다. 이들 결과는 COS는 포도당 내성 및 인슐린 분비를 증가시키고 중성지방을 감소시키기에 항당뇨제로서 이용될 수 있음을 보여준 것이다 (Lee 등, 2003).

알록산(Alloxan, 당뇨병을 일으킬 수 있는 화학물질)으로 유도시킨 제2형 인슐린의존 당뇨병 쥐에 대한 COS의 치료효과를 조사한 결과에서도 체중 kg당 COS 10mg의 복용량으로 현저하게 혈당 포도당을 감소시켰으며 쥐에서 어떤 독성효과도 나타나지 않아 COS는 항당뇨, 항과지방혈증 및 항산화효과를 나타내므로 COS는 당뇨병을 방지하고 콜레스테롤의 흡수를 낮추어 주기 때문에 활용이 기대된다(Katihar 등, 2011).

키토산올리고당은 2,3,7,8-테트라클로로디벤조-p-디옥신(2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin)에 의해 유도된 당뇨 쥐에서 면역글로블린, 지질축적 간세포 질환, 비정상 혈액세포에 대해 개선효과를 나타냈고, 지방생성 전사인자 및 다른 특수 유전자의 발현을 감소 조절을 통해 지방세포의 분화를 저해시킴으로써 비만치료에 있어 가치있는 천연물이라고 밝혔다(Cho 등 2008).

당뇨쥐에서 인슐린 및 혈당글루코오스의 2시간 방출에 대한 COS의 효과를 알아보기 위해 췌장섬세포의 분화 및 인슐린 분비에 대한 분자량이 서로 다른 COS의 효과를 검토한 결과, COS는 췌장 베타세포의 증식을 현저하게 가속시켰으며 저분자 COS가 래트의 일반임상 징후를 개선시켰다. 즉

혈당 글루코오스의 양이 2시간 내에  $39.38 \pm 3.08$ 에서  $22.13 \pm 3.23$ ,  $21.78 \pm 3.09$ ,  $21.32 \pm 0.32$ ,  $19.73 \pm 4.12$ ,  $17.88 \pm 3.14$ ,  $16.14 \pm 3.55$ 로 낮아졌고 내당능(glucose tolerance)도  $122.40 \pm 12.05$ 에서  $101.19 \pm 12.44$ ,  $99.61 \pm 13.11$ ,  $96.79 \pm 9.22$ ,  $94.79 \pm 13.20$ ,  $89.41 \pm 11.10$ ,  $84.08 \pm 5.93$ 로 향상되었다. 각 그룹은 2-14일간 배양한 섬세포(islet cell)의 생물활성은 당자극에 좋은 반응으로 활성화되었다. 따라서 COS는 여러 가지 생리활성을 갖고 있을 뿐만 아니라 당뇨에도 효과가 있어 치료에 사용될 수 있으며 저분자 COS가 당뇨에 더 좋은 효과를 나타냈다(Liu 등, 2009).

당뇨병과 그 합병증의 예방과 치료에 이용될 가능성이 높은 COS와 미량원소가 생물활성이 있어 그 혼합물을 만들어 췌장섬세포 분화 및 인슐린 분비에 대한 효과는 COS와 그 크롬(Cr), 셀레늄(Se) 유도체가 48시간 동안 리터 당 100mg 농도에서 췌장 베타세포의 분화를 효과적으로 가속시켰으며 120시간에서 정지기(stationary phase)에 이르렀다. COS와 그 크롬유도체 그룹은 다른 그룹(셀레늄 유도체)보다 최종 세포 밀도 및 활성이 높았다. COS와 그 크롬, 셀레늄 유도체 그룹의 인슐린 분비는 10일에서 대조군보다 높았으며, 특히 COS 그룹에서 현저했다. 6일에서 COS 및 크롬, 셀레늄 유도체 그룹의 자극지수(stimulation index)가 대조군에 비해 높았다. 따라서 COS 및 그 미량원소 유도체는 췌장베타세포의 인슐린 분비뿐만 아니라 췌장섬세포의 증식에도 분명한 촉진 효과를 보여 COS와 미량원소를 당뇨병 예방과 치료에 활용될 것으로 기대된다(Liu 등, 2009).

실제로 COS를 이용한 임상검사를 보면 총 200명의 노인 제2형 당뇨병(T2DM)환자를 시타글립틴(sitagliptin, 제2형 당뇨병 치료제) 그룹(SG, 하루 시타글립틴 100 mg 투여), COS 그룹(CG, 하루 COS 100 mg 투여), 시타글립틴 및 COS 혼합 투여 그룹(SCG, 하루 시타글립틴 및 COS 100 mg

투여) 및 위약(placebo)그룹(PG, 위약 100mg 투여)으로 나누어 42시간 치료한 후 변화된 생화학 지표 및 임상변수(parameter)를 분석한 결과 낮은 위험인자가 SG 및 다른 그룹에 비교했을 때 SCG 그룹에서 낮았고, 다른 그룹보다 SCG에서 더 많은 환자가 당화 혈색소(HbA1c, 혈당조절판단지표)가 2.5% 이하로 감소되었다. SG, CG, SCG 및 PG의 환자들의 체중이 각각  $1.25 \pm 0.9$ ,  $2.6 \pm 0.8$ ,  $4.7 \pm 1.3$  및  $0.9 \pm 0.6$  kg 감소되었다. COS와 시타글립틴의 혼합처리가 인슐린 감수성, 지질 프로파일(profile), 아디포넥틴 양(adiponectin level) 및 글루카곤유사펩티드-1(glucagon-like peptide-1), 부작용 감소, 인슐린 저항, 당화 혈색소, 체중지표, 레지스틴(resistin), 종양괴사인자-알파(tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 및 C-반응단백질(CRP)의 향상으로 치료효과가 좋게 나타났다.

COS처리로 인하여 레지스틴, TNF- $\alpha$  및 CRP의 양을 감소시켰으며 아디포넥틴의 양을 증가시켰다. COS 및 시타글립틴의 조합은 제2형 당뇨병 환자에서 체중이 두드러지게 감소되었고 부작용이 적어 더 좋은 혈당 조절이 가능하여 COS가 제2형 당뇨병 치료제로서 활용이 기대된다(Zhao 등, 2017)

## 8. 기타활성

항염증과 알레르기 질환은 전세계적으로 가장 흔히 발생하는 질환 중 하나다. 염증은 물리적 손상, 미생물 침입, 자외선 조사 및 면역반응을 포함한 여러 자극에 의해 숙주의 반응이 예민하게 나타나는 중요한 양상이다.

오래된 염증은 만성 천식, 류마티스성 관절염, 다발성 경화증(multiple sclerosis), 염증성 장질환, 마른 버짐(psoriasis), 암 등 여러가지 질환을 유발시키는 것으로 알려져 있다. 알레르기는 동물의 털, 집 먼지, 식품, 꽃가루, 곤충, 화학물질과 같이 사람에게 크게 해를 주지 않는 환경 물질의 면역 체계가

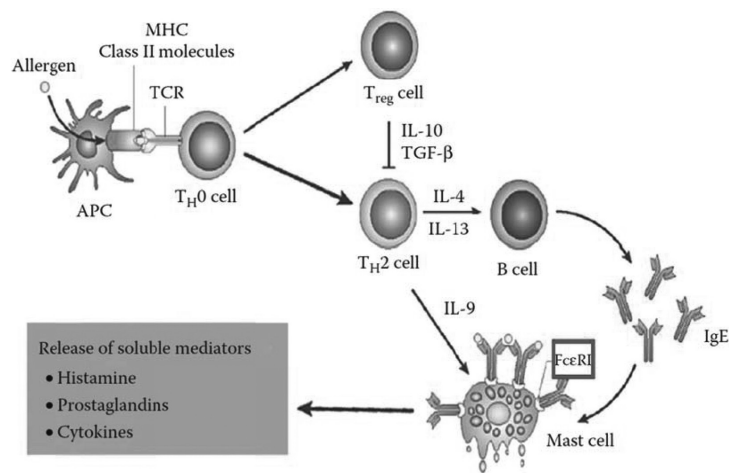


Fig 7. The signaling system in allergic reactions (Kim, 2018)

과민반응을 하여 나타나는 질환이다(Vo 등, 2012).

키토산올리고당 및 그 유도체들의 항염증 및 항알레르기 활성에 관한 여러 연구들이 진행되었다 (Bahar 등, 2012, Chung 등, 2012, Lee 등 2009, Vo 등 2012, Youset 등 2012).

알레르기 발생 매커니즘을 살펴보면, Fig. 7에서 볼 수 있는 바와 같이 알레르기의 원인물질 (allergen)이 몸 안으로 들어오면 항원전달세포에서 제1형과 2형 보조T세포(helper T cell)에 신호를 전달하여 면역글로불린 E(immunoglobulin E, IgE)에 의한 베타세포( $\beta$  cell)를 활성화시킨다. 활성화된  $\beta$  세포는 항체인 IgE를 방출하는데 IgE가 비만세포(mast cell) 표면의 입실론F수용체(Fc $\epsilon$ RI)에 결합하면 비만세포가 활성화되어 히스타민(histamine)과 같은 물질이 분비됨으로써 알레르기성 염증반응이 일어나게 된다. 따라서 항체인 IgE가 입실론F수용체에 결합하는 것을 방지하는 것이 알레르기 발증을 억제할 수 있는 핵심이다.

이와 관련하여 키토산 올리고당(MW, 1-3, 3-5 및 5-10 kDa)이 염기성 백혈병 RBL-2H3에서의 알레르기 반응에 대해 미치는 영향을 실험쥐를 통해 조사한 결과, COS (MW, 1-3 kDa)을 ml 당

1000  $\mu$ g을 투여하자 히스타민과 헥소사미니드가 수분해효소( $\beta$ -hexosaminidase)의 방출 및 칼슘이온 운반체(A23187)에 의해 유도된 세포 내 칼슘이온 증가가 감소되었다. 또한 종양괴사인자(tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ )와 사이토카인(생물활성인자, IL-1 $\beta$ , IL-4 및 IL-6)의 mRNA 발현뿐만 아니라 A23187, 포르볼 12-미리스틴산 13-아세트산 (PMA) 유도생산에 COS의 저해활성 측정에서 COS에 의해 세포의 신호조절 키나아제(MEK/ERK) 및 p38 키나아제의 인산화에 대한 억제효과를 확인했다(Vo 등, 2011).

COS(MW, 1-3 및 3-5 kDa)가 디니트로페닐(DNP) 특이 면역 글로불린 E 항체를 감소시키고 항원 DNP 소혈청 알부민으로 자극시킨 RBL-2H3 비만세포의 활성화에 대한 억제효과를 검토한 결과, COS는 히스타민 및 헥소사미니드가수분해효소의 유리를 감소시켜 RBL-2H3 세포의 탈과립(degranulation, 과립을 잃는 과정)을 현저하게 저해하였으며, 세포 내 칼슘 감소도 수반되었다. RBL-2H3 세포에서 항체-면역글로불린 복합체가 결합할 수 있는 Fc $\epsilon$ RI 수용체의 발현은 농도의존적으로 감소되었다. 이 수용체의 발현이 억제되면 항체-면

역글로불린 복합체가 결합할 수 없어 비만세포에서 히스타민이 분비되지 않아 알레르기 반응은 일어나지 않는다. 따라서 COS가 알레르기 반응에 대해 새로운 저해제로서 활용할 수 있을 것으로 제안하였다(Vo 등, 2012).

COS의 항염증 활성을 카나기난 유도 발 부종 방법(paw edema method)에 따라 의약품 항염증 효과를 평가하는데 이용되는 만성염증에 널리 사용되고 있는 동물 모델을 이용한 연구에서 COS는 분자량 및 농도가 영향을 미쳤는데 농도의존적으로 항염증 활성을 나타냈고, 체중 kg 당 500 mg의 용량이 만성염증 치료에 적합하였다. 결론적으로 COS는 시클로옥시제나아제(cyclooxygenase, prostaglandin ednoperoxide synthase)의 저해 및 프로스타글란딘(prostaglandin)의 감소로 매개되는 항염증 효과를 유도하였으며, 체중 kg 당 COS 500 mg의 효능은 인도메타신(indomethacin, 스테로이드계 항염증제)와 유사한 효능을 나타냈다(Fernandes 등, 2011).

재조합 키토산 가수분해효소와 클루코사민가수분해효소(Exo- $\beta$ -glucosaminase)를 이용하여 키토산으로부터 글루코사민(80.0%) 및 COS (9.8%)로 구성된 혼합물을 얻어 골다공증 마우스 모델을 이용하여 항염증 효과를 검토한 결과, 15일 동안 체중 kg 당 40, 80 및 160 mg를 경구투여 후 항염증 사이토카인 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 의 혈청발현과 항염증 사이토카인 IL-2가 농도의존적으로 현저하게 저하되었으며 염증과정에서 특유하게 증가되는 C-반응 단백질의 양이 대조군에 비해 현저히 낮았다. 흉선지표(thymus index) 및 면역글로불린(Ig G, Ig A, Ig M)의 양은 대조군에 비해 높았고 무릎관절의 부기는 완화되었으며 관절염의 징후는 치료 처리 그룹에서 부분적으로 개선되었다. 이 결과는 글루코사민과 COS가 강한 항염증 효과가 있어 관절염이나 염증 질환에 치료제로 이용될 수 있음을 제시한 것이다(Li 등, 2018).

Kim 등 (2006)이 COS를 하루에 5.1 g 섭취한 노

인(80 $\pm$ 3세)을 대상으로 8주의 시험기간 동안 혈당 사이토카인 함량에 미치는 효과를 검토한 결과, 인터루킨-12(IL-12) 및 인터페론(바이러스 증식 억제 물질) 함량은 대조군에 비해 COS 투여 그룹에서 높았지만 염증 사이토카인 IL-1 $\beta$ 의 양과 종양 괴사 인자-알파(TNF- $\alpha$ )는 오히려 감소되었다. 이 결과는 키토산올리고당의 구강 섭취가 특이세포매개면역에 유익한 효과를 갖고 있는 반면 노인에게 발생된 염증을 약화시키는 작용도 하여 항염증제로서의 활용이 가능하다고 밝혔다

우리나라도 고령화 사회로 접어들면서 당뇨병, 고혈압, 동맥경화 등과 같은 생활습관 병 중에서도 골다공증 환자의 증가가 문제가 되고 있다. 골다공증은 뼈 미네랄과 뼈 기질이 감소하여 골량의 미세구조가 변화하여 골절 또는 그 위험성이 높아진 상태를 의미한다. 골다공증의 원인으로는 칼슘 같은 미네랄이나 비타민 D 섭취 부족, 여성에게는 폐경에 의한 에스트로겐(난포 호르몬)의 분비 저하, 운동부족 등을 들 수 있다.

체내 칼슘의 99% 이상은 뼈와 치아에 저장되고 나머지 1%는 혈액, 근육, 세포 사이의 체액에 존재하면서 근육 수축, 혈관 수축 및 확장, 심장박동, 호르몬과 효소의 분비, 그리고 신경계를 통한 메시지 전달에 관여한다. 칼슘 부족을 개선하기 위해서는 섭취량을 증가시켜야 할 뿐만 아니라 흡수를 잘 되도록 하는 것과 뼈로의 이용을 높이는 것이 중요하다. 칼슘의 흡수와 체내 이용을 촉진하는 것에는 구연산, 말산 같은 유기산, 비타민 D, 카제인 인산펩티드(casein phosphopeptide, CPP)가 있다.

음식물 형태로 체내에 유입된 칼슘은 위에서 위산에 의해 가용화 된 후 소장에서 흡수되는데 소장의 pH가 중성이므로 무엇보다도 중성에서 수용성 상태로 존재해야 흡수가 잘 된다. 예를 들면, 우유의 경우 중성 pH에서 칼슘이 수용액 상태로 존재하여 흡수가 잘 되는 것이다.

최근 키토산 올리고당이 생체내 칼슘 흡수에 효

과가 있는 것을 입증하는 연구가 진행되었다(Jung 등, 2006; Ohara 등, 2004; Ratanavaraporn 등, 2009).

Jung 등 (2006)은 키토산올리고당(COS I: >300 kDa, COS II: 30~10 kDa, COS III: 10~5 kDa, COS IV: <5 kDa)의 칼슘 생체 이용능을 난소 절제 후 저칼슘 식이 섭취에 의해 유도된 골다공증 쥐 모델을 이용하여 검토한 결과, COS가 첨가된 식이(칼슘과 비타민 D가 일정량 함유)를 골다공증 쥐에 섭취시킨 경우 노를 통한 1일 칼슘 배출량에는 유의적 차이가 없었으나 COS를 1% 첨가한 경우는 노의 칼슘 배출량이 매우 감소하였다. 변을 통한 칼슘 배출량은 노에 비하여 유의적 차이가 명확하게 나타났다. 즉, 골결실 유래 칼슘을 키토산올리고당 첨가없이 단독으로 섭취시켰을 경우 대조군보다 약 50% 칼슘 배출량이 감소하였고 여기에 COS를 1% 첨가하였을 때 70.75%의 칼슘 배출량 감소가 나타났으나 그 이상의 올리고당 첨가 3%에서는 오히려 칼슘 배출량이 증가되었다. 결국 노와 변을 통한 칼슘 배출은 COS를 1% 정도 식이에 첨가하는 것이 가장 효율이 높은 것으로 드러났다. 대퇴골의 칼슘량, 뼈 밀도 및 뼈 강도는 카제인인산펩티드 식이

그룹의 것과 유사한 수준으로 증가를 보여 저분자 COS IV 1% 첨가가 골다공증의 칼슘 흡수 강화에 유익한 효과를 나타내는 것을 밝혔다.

이외에도 Table 3에 나타난 바와 같이 COS에 의해 기질 세포 분비 증진, 말초신경 재생 개선, 항대뇌 허혈성질환, 항광노화 효과, 항피로 효과 등 여러 생리활성이 밝혀졌다.

### 요약

키토산은 천연에 존재하는 풍부한 고분자 다당류이며 동시에 항균작용, 항암작용, 면역 활성 증강 작용 등 다양한 생리 기능성을 가진 생체 물질(biomaterial)이다. 그러나 키토산은 수용액에 쉽게 용해되지 않고 체내 흡수율도 매우 낮은 고분자 물질이기 때문에 그 자체로는 생체 내에서 기능을 발휘하지 못한다. 따라서 체내 흡수율이 용이하고 보다 다양한 생리 활성을 나타내는 키토산올리고당으로 섭취할 필요가 있다.

키토산으로부터 키토산올리고당을 만드는 방법은 온화한 조건에서 부반응이 없는 효소분해가 가장 이상적이다. 그러나 키토산을 분해시킬 수 있는 효소의 가격이 매우 비싸고 효소 활성이 낮아 산업적으로 효소를 이용하여 키토산올리고당을 대량 생산하는데는 경제적으로 큰 문제가 있었다. 따라서 효소 분해에 의한 키토산올리고당의 생산을 산업적으로 적용시켰을 때 대량으로 소모되는 효소의 높은 생산 비용을 경감하기 위하여 효소의 재이용을 위한 생산 시스템을 도입하였고 한외여과막 효소반응기를 결합시킨 한외여과막 효소반응기를 키토산올리고당의 생산에 적용시킴으로써 대량 생산이 가능해졌다. 이 시스템은 사용하는 막의 종류에 따라 원하는 분자량의 키토산올리고당을 생산할 수 있어 분자량 크기에 따라 생체 내에서 다른 생리 기능을 나타내는 키토산올리고당을 각기 목적에 맞는 제품으로 대량 생산할 수 있다.

Table 3. Other biological activities of chitosan oligosaccharides

Biological activities	Reference
Promotion of stromal cell secretion	Wei et al., 2013
Improvement of peripheral nerve regeneration	Gong et al., 2009
Antiphotaging effect	Kim et al., 2012a, b
Hypolipidemic activity	Xia et al., 2013
Retinal metabolism	Li et al., 2019
Effect of anti-cerebral ischemic/reperfusion injury	Sun et al., 2010
Anti-fatigue efficacy	Cho et al., 2010
Protective effects of cortical neurons	Xu et al., 2011
Hypolipidemic activity	Xia et al., 2013
Anti photaging effect	Kim et al., 2012
Blood coagulation	Lin and Lin, 2003
Anti-ischemia effect	Sun et al., 2010
Immune protective effects	Qian et al., 2018



키토산올리고당은 암세포 성장에 영향을 미치는 면역을 증진시키고 암 전이 관련 효소인 MMP-2 및 MMP-9의 발현을 저지하여 암 전이를 억제할 뿐만 아니라 암세포의 신생 혈관형성을 억제하므로 암의 예방이나 치료에 활용될 수 있다. 또한 키토산 올리고당은 생체 노화를 촉진시키는 초과산화 라디칼, 히드록시라디칼, 과산화 라디칼과 같은 활성산소종을 소거시킴으로써 활성산소종에 의해 유발되는 질환도 예방한다.

더 나아가서, 키토산올리고당은 양전하를 가진 아미노기를 갖고 있어 미생물 세포막의 음전하와 결합하여 세포막의 기능을 상실시킴으로써 막을 통해 출입하는 대사에 필요한 물질들을 봉쇄한다. 이것은 미생물의 성장과 증식을 감소시키는 효과가 있어 식품분야에서도 천연 보존제로서 활용될 것으로 기대된다.

지금까지 고혈압 및 심장 질환의 치료는 레닌-엔지오텐신 시스템(RAS)경로의 치료조작(manipulator) 및 ACE 저해에 초점이 맞추어져 왔다. Captopril, Enalapril, Alcacepril 및 Lisinopril같은 합성 ACE 저해제는 고혈압 치료 및 예방을 위해서도 널리 사용되고 있으나 기침, 알레르기 반응, 맛 장애 및 피부발진과 같은 부작용을 야기시킬 위험이 있다. 그러므로 고혈압의 치료나 관리를 위한 치료제로서 자연계에 존재하는 천연성분인 키토산올리고당이 바람직한 대안으로 사용될 수 있을 것이다.

고령 사회로 진입하면서 노인의 치매 발병률은 현저하게 증가하는 추세이나 아직까지 효과가 뛰어난 치매치료제는 개발되지 않고 있는 실정이다. 키토산올리고당이 치매유발효소인 베타-세크레타이즈뿐만 아니라 아세틸콜린 에스테르가수분해효소를 저해하고, 산화에 의한 뇌세포의 손상을 저해하는 효능이 있는 것으로 밝혀져 앞으로 치매 예방이나 치료에 적극적으로 활용되어야 한다.

최근에 소비자나 환자들은 다양한 부작용을 낳는 화학적으로 합성된 의약품을 기피하는 경향이

있어 자연식품이나 천연 생리기능성 물질과 자가 치료에 대한 욕구가 높아지고 있다. 그러므로 의약품에 비해 다소 효능이 낮을지라도 특정한 질병의 예방이나 치료를 위해 특수한 생리 기능성 물질의 섭취는 더욱 더 인기를 끌게 될 것이다. 따라서 항암, 항산화, 항염증, 항균, 항고혈압, 항치매, 항당뇨, 항알레르기 등 다양한 생리활성을 나타내는 키토산올리고당을 활용한 건강기능성식품(nutraceuticals), 의약품(pharmaceuticals) 및 기능성 화장품(cosmeceuticals) 등 다양한 제품이 개발될 것으로 기대된다.

### 참고문헌

Aam BB, Heggset EB, Norberg AL, Sørli M, Vårum KM, Eijsink VG. Production of chitooligosaccharides and their potential applications in medicine. *Mar. Drugs* 8: 1482-1517 (2010)

Ahmad FJ, Akhter S, Ahmad MZ, Ramazani F, Samim M, Warsi MH, Anwar M, Rahman Z. Prospective Corollary of Ophthalmic Nanomedicine: A Concept Shift toward Chitosan-Based Mucoadhesive Nanomedicine. pp.317-336. In: *Chitin and Chitosan Derivatives: Advances in Drug Discovery and Developments*. Kim SK (ed). CRC Press. NY, USA (2014)

Allan CR, Hadwiger LE. The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. *Exp. Mycol.* 3: 285-287 (1979)

Amako K, Shimodori S, Imoto T, Miake S, Umeda A. Effects of chitin and its soluble derivatives on survival of *Vibrio cholerae* O1 at low temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 603-605 (1987)

Anraku M, Fujii T, Kondo Y, Kojima E, Hata T, Tabuchi N, Tsuchiya D, Goromaru T, Tsutsumi H, Kadowaki D, Maruyama T, Otagiri M, Tomida H. Antioxidant properties of high molecular weight dietary chitosan *in vitro* and *in vivo*. *Carbohydr. Polym.* 83: 501-505 (2011)

Assis CF, Araújo NK, Pagnoncelli MGB, Pedrini MR, Macedo GR, Santos ES. Chitooligosaccharides enzymatic production by *Metarhizium anisopliae*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 33: 893-899 (2010)

Bahar B, O'Doherty JV, Maher S, McMorrow J, Sweeney T. Chitooligosaccharide elicits acute inflammatory cytokine response through AP-1 pathway in human intestinal epithelial-like (Caco-2) cells. *Mol. Immunol.* 51: 283-291 (2012)

Byun HG, Kim SK. Structure and activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from *Alaskan pollack* skin. *BMB Reports.* 35: 239-243 (2002)

Byun HG, Kim YT, Park PJ, Lin X, Kim SK. Chitooligosaccharides



- as a novel  $\beta$ -secretase inhibitor. *Carbohydr. Polym.* 61: 198–202 (2005)
- Cabrera JC, Cutsem PV. Preparation of chitooligosaccharides with degree of polymerization higher than 6 by acid or enzymatic degradation of chitosan. *Biochem. Eng. J.* 25: 165–172 (2005)
- Castro LF, Mengjbar M, Sánchez Á, Arroyo L, Villarán MC, de Apodaca ED, Heras Á. Films of chitosan and chitosan-oligosaccharide neutralized and thermally treated: Effects on its antibacterial and other activities. *LWT.* 73: 368–374 (2016)
- Chae SY, Jang MK, Nah JW. Influence of molecular weight on oral absorption of water soluble chitosans. *J. Control. Release.* 102: 383–394 (2005)
- Cho EJ, Rahman A, Kim SW, Baek YM, Hwang HJ, Oh JY, Hwang HS, Lee SH, Yun JW. Chitosan oligosaccharides inhibit adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 80–87 (2008)
- Cho SY, Lee JH, Song MJ, Park PJ, Shin ES, Sohn JH, Seo DB, Lim KM, Kim WG, Lee SJ. Effects of chitooligosaccharide lactate salt on sleep deprivation-induced fatigue in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 33: 1128–1132 (2010)
- Cho YS, Kim SK, Ahn CB, Je JY. Inhibition of acetylcholinesterase by gallic acid-grafted-chitosans. *Carbohydr. Polym.* 84: 690–693 (2011)
- Choi BK, Kim KY, Yoo YJ, Oh SJ, Choi JH, Kim CY. *In vitro* antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*. *Int. J. of Antimicrob. Ag.* 18: 553–557 (2001)
- Chung MJ, Park JK, Park YI. Anti-inflammatory effects of low-molecular weight chitosan oligosaccharides in IgE-antigen complex-stimulated RBL-2H3 cells and asthma model mice. *Int. Immunopharmacol.* 12: 453–459 (2012)
- Devlieghere F, Vermeulen A, Debevere J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiol.* 21: 703–714 (2004)
- Domard A, Cartier N. Glucosamine oligomers: 4. Solid state-crystallization and sustained dissolution. *Int. J. Biol. Macromol.* 14: 100–106 (1992)
- Dong H, Wang Y, Zhao L, Zhou J, Xia Q, Qiu Y. Key technologies of enzymatic preparation for DP 6–8 chitooligosaccharides. *J. Food Process Eng.* 38: 336–344 (2015)
- Einbu A, Vårum KM. Depolymerization and de-N-acetylation of chitin oligomers in hydrochloric acid. *Biomacromol.* 8: 309–314 (2007)
- El-Sayed ST, Ali AM, El-Sayed EM, Shousha WG, Omar NI. Characterization and potential antimicrobial effect of novel chitooligosaccharides against pathogenic microorganisms. *J. Appl. Pharm. Sci.* 7: 6–12 (2017)
- Elsabee MZ, Morsi RE. Chitosan: Amazing Controlled Delivery System. Pp261–302 In: *Chitin and Chitosan Derivatives: Advances in Drug Discovery and Developments.* Kim SK(Ed.) CRC Press. USA (2014)
- Fawzya YN, Rahmawati A, Patantis G. Physicochemical properties of chitooligosaccharide prepared by using chitosanase from *Stenotrophomonas maltophilia* KPU 2123. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 139: 1–8 (2018)
- Fernandes JC, Borges M, Nascimento H, Rocha EB, Ramos OS, Pintado ME, Malcata X, Silva AS. Cytotoxicity and genotoxicity of chitooligosaccharides upon lymphocytes. *Int. J. of Biol Macromol.* 49: 433–438 (2011)
- Fernandes JC, Eaton P, Franco I, Ramos ÓS, Sousa S, Nascimento H, Gomes A, Silva AS, Malcata FX, Pintado, ME. Evaluation of chitooligosaccharides effect upon probiotic bacteria. *Int. J. of Biol. Macromol.* 50: 148–152 (2012)
- Fernandes JC, Tavaría FK, Soares JC, Ramos OS, Monteiro MJ, Pintado ME, Malcata FX. Antimicrobial effects of chitosans and chitooligosaccharides upon *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in food model systems. *Food Microbiol.* 25: 922–928 (2008)
- Fischer TH, Bode AP, Demcheva M, Vournakis JN. Hemostatic properties of glucosamine-based materials. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 80: 167–174 (2007)
- Gao XA, Zhang YF, Park RD, Huang X, Zhao XY, Xie J, Jin RD.. Preparation of chitooligosaccharides from chitosan using crude enzyme of *Bacillus cereus* D-11. *J. Appl. Biol. Chem.* 55: 13–17 (2012)
- Gong Y, Gong L, Gu X, Ding F. Chitooligosaccharides promote peripheral nerve regeneration in a rabbit common peroneal nerve crush injury model. *Microsurgery.* 29: 650–656 (2009)
- Han FS, Cui BH, You XF, Xing YF, Sun WX. Anti-proliferation and radiosensitization effects of chitooligosaccharides on human lung cancer line HepG2. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 8: 757–761 (2015)
- Han FS, Yang SJ, Lin MB, Chen YQ, Yang P, Xu JM. Chitooligosaccharides promote radiosensitivity in colon cancer line SW480. *World Gastroenterol.* 22: 5193 (2016)
- Hong S, Ngo DN, Kim MM. Inhibitory effect of aminoethyl-chitooligosaccharides on invasion of human fibrosarcoma cells. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 45: 309–314. (2016)
- Huang R, Mendis E, Kim SK. Improvement of ACE inhibitory activity of chitooligosaccharides (COS) by carboxyl modification. *Bioorgan. Med. Chem.* 13: 3649–3655 (2005)
- Huang R, Mendis E, Rajapakse N, Kim SK. Strong electronic charge as an important factor for anticancer activity of chitooligosaccharides (COS). *Life Sci.* 78: 2399–2408 (2006)
- Huang R, Rajapakse N, Kim SK. Structural factors affecting radical scavenging activity of chitooligosaccharides (COS) and its derivatives. *Carbohydr. Polym.* 63: 122–129 (2006)
- Il'ina AV, Varlamov VP. *In vitro* antitumor activity of heterochitooligosaccharides. *Appl. Biochem. Microbiol.* 51: 1–10 (2015)

- Jauch-Chara K, Oltmanns KM. Obesity—a neuropsychological disease? Systematic review and neuropsychological model. *Prog. in Neurobiol.* 114: 84–101 (2014)
- Je JY, Kim EK, Ahn CB, Moon SH, Jeon BT, Kim B, Park TK, Park PJ. Sulfated chitooligosaccharides as prolyl endopeptidase inhibitor. *Int. J. Biol. Macromol.* 41: 529–533 (2007)
- Je JY, Kim SK. Chitosan and Its Derivatives: Potential Use as Nutraceuticals. pp. 259–266. In: *Marine Nutraceuticals: Prospects and Perspectives*. Kim SK(ed.) CRC Press. USA (2013)
- Jeon YJ, Kim SK. Antitumor activity of chitosan oligosaccharides produced in ultrafiltration membrane reactor system. *J. Microbiol. Biotechnol.* 12: 503–507 (2002)
- Jeon YJ, Kim SK. Continuous production of chitooligosaccharides using a dual reactor system. *Process Biochem.* 35: 623–632 (2000)
- Jeon YJ, Kim SK. Production of chitooligosaccharides using an ultrafiltration membrane reactor and their antibacterial activity. *Carbohydr. Polym.* 41: 133–141 (2000)
- Jeon YJ, Park PJ, Byun HG, Kim SK, Song BK. Production of chitosan oligosaccharides using chitin-immobilized enzyme. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 13: 147–154 (1998)
- Jing B, Cheng G, Li G, Wang ZA Du Y. Inhibition of liver tumor cell metastasis by partially acetylated chitosan oligosaccharide on a tumor–vessel microsystem. *Mar. Drugs* 17: 415 (2019)
- Joodi G, Ansari N, Khodaghali F. Chitooligosaccharide-mediated neuroprotection is associated with modulation of Hsps expression and reduction of MAPK phosphorylation. *Int. J. Biol. Macromol.* 48: 726–735 (2011)
- Ju, C., Wue, W., Yang, Z., Zhang, Q., Yang, X., Liu, Z., Zhang, F. Antidiabetic effect and mechanism of chitooligosaccharides. *Biol. Pharm. Bull.* 33: 1514–1516 (2010)
- Jung WK, Moon SH, Kim SK. Effect of chitooligosaccharides on calcium bioavailability and bone strength in ovariectomized rats. *Life Sci.* 78: 970–976 (2006)
- Kang L, Jiang S, Ma L. Enzymatic production of high molecular weight chitooligosaccharides using recombinant chitosanase from *Bacillus thuringiensis* BMB171. *Microbiol. Biotech. Lett.* 46: 45–50 (2018)
- Karadeniz F, Artan M, Kong CS, Kim SK. Chitooligosaccharides protect pancreatic  $\beta$ -cells from hydrogen peroxide-induced deterioration. *Carbohydr. Polym.* 82: 143–147 (2010)
- Katiyar D, Singh B, Lall AM, Haldar C. Efficacy of chitooligosaccharides for the management of diabetes in alloxan induced mice: A correlative study with antihyperlipidemic and antioxidative activity. *Eur. J. of Pharm. Sci.* 44: 534–543 (2011)
- Katiyar DM, Singh B, Lall AM, Haldar C. Evaluation of antidiabetic and hypolipidemic activity of chitooligosaccharides in alloxan-induced diabetes mellitus in mice. *Int. J. Pharma. Bio. Sci.* 2: 407–416 (2011)
- Kendra DF, Hadwiger LA. Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*. *Exp. Mycol.* 8: 276–281 (1984)
- Kim EK, Je JY, Lee SJ, Kim YS, Hwang JW, Sung SH, Jeon BT, Kim SK, Jeon YJ, Park PJ. Chitooligosaccharides induce apoptosis in human myeloid leukemia HL-60 cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22: 6136–6138 (2012)
- Kim HM, Hong SH, Yoo SJ, Baek KS, Jeon YJ, Chung SY. Differential effects of chitooligosaccharides on serum cytokine levels in aged subjects. *J. Med. Food.* 9: 427–430 (2006)
- Kim JA, Ahn BN, Kong CS, Kim SK. Chitooligomers inhibit UV-A-induced photoaging of skin by regulating TGF- $\beta$ /Smad signaling cascade. *Carbohydr. Polym.* 88: 490–495 (2012)
- Kim JA, Ahn BN, Kong CS, Park SH, Park BJ, Kim SK. Antiphotoprotection effect of chitooligosaccharides on human dermal fibroblasts. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 28: 299–306 (2012)
- Kim MM, Kim SK. Chitooligosaccharides inhibit activation and expression of matrix metalloproteinase-2 in human dermal fibroblasts. *FEBS Lett.* 580: 2661–2666 (2008)
- Kim SK, Rajapakse N. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. *Carbohydr. Polym.* 62: 357–368 (2005)
- Kim SK. Chitosan oligosaccharide : allergy and marine algae. In: *Healthcare Using Marine Organisms*. CRC Press, NY, USA, pp. 133–135 (2018)
- Kim SK. Chitosan oligosaccharide : Alzheimer dementia and chitosan oligosaccharides. In: *Healthcare Using Marine Organisms*. CRC Press, NY, USA, pp. 71–75 (2018)
- Kim SK. Chitosan oligosaccharide : anti-aging. In: *Healthcare Using Marine Organisms*. CRC Press, NY, USA, pp. 28–35 (2018)
- Kim SK. Chitosan oligosaccharide : anticancer activity. In: *Healthcare Using Marine Organisms*. CRC Press, NY, USA, pp. 20–28 (2018)
- Kim SK. Chitosan oligosaccharide : Fisheries products and hypertension. In: *Healthcare Using Marine Organisms*. CRC Press, NY, USA, pp. 175–183 (2018)
- Kim SK. Preface. In: *Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives: Biological Activities and Applications*. CRC Press. NY, USA, p. 6 (2011)
- Kim SK. Utilization of chitin as artificial skin. In: *Healthcare Using Marine Organisms*. CRC press, NY, USA, pp. 47–52 (2018)
- Kim SK. What are chitin, chitosan, water-soluble chitosan, and chitosan oligosaccharides? In: *Healthcare Using Marine Organisms*, CRC Press, NY, USA pp. 7–12 (2018)
- Kittur FS, Kumar ABV, Varadaraj MC, Tharanathan RN. Chitooligosaccharides—preparation with the aid of pectinase isozyme from *Aspergillus niger* and their antibacterial activity. *Carbohydr. Res.* 340: 1239–1245 (2005)
- Kong CS, Kim JA, Ahn B, Byun HG, Kim SK. Carboxymethylations



- of chitosan and chitin inhibit MMP expression and ROS scavenging in human fibrosarcoma cells. *Process Biochem.* 45: 179–186 (2010)
- Kong XF, Zhou XL, Lian GQ, Blachier F, Liu G, Tan BE, Nyachoti CM, Yin YL. Dietary supplementation with chitooligosaccharides alters gut microbiota and modifies intestinal luminal metabolites in weaned Huanjiang mini-piglets. *Livestock Sci.* 160: 97–101 (2014)
- Lee DX, Xia WS, Zhang JL. Enzymatic preparation of chitooligosaccharides by commercial lipase. *Food Chem.* 111: 291–295 (2008)
- Lee HW, Park YS, Choi JW, Yi SY, Shin WS. Antidiabetic effects of chitosan oligosaccharides in neonatal streptozotocin-induced noninsulin-dependent diabetes mellitus in rats. *Biol. Pharm. Bull.* 26: 1100–1103 (2003)
- Lee SH, Park JS, Kim SK, Ahn CB, Je JY. Chitooligosaccharides suppress the level of protein expression and acetylcholinesterase activity induced by A $\beta$ 25–35 in PC12 cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19: 860–862 (2009)
- Li H, Huang L and Chen L. Chitooligosaccharides inhibit a 549 lung cancer cell line proliferation by regulating cell autophagy. *J. Biol. Reg. Homeos. Ag.* 33: 1527–1532. (2019)
- Li X, Wang J, Chen X, Tian J, Li L, Zhao M, Zhou C. Effect of chitooligosaccharides on cyclin D1, bcl-xl and bcl-2 mRNA expression in A549 cells using quantitative PCR. *Chin. Sci. Bull.* 56: 1629–1632 (2011)
- Li Y, Chen L, Liu Y, Zhang Y, Liang Y, Mei Y. Anti-inflammatory effects in a mouse osteoarthritis model of a mixture of glucosamine and chitooligosaccharides produced by bi-enzyme single-step hydrolysis. *Sci. Rep.* 8: 1–9 (2018)
- Lin CW, Lin JC. Characterization and blood coagulation evaluation of the water-soluble chitooligosaccharides prepared by a facile fractionation method. *Biomacromol.* 4: 1691–1697 (2003)
- Lin F, Zhang TY. Spectra analyses of chitosans degraded by hydrogen peroxide under optimal conditions. *Spectrosc. Spect. Anal.* 29: 43–47 (2009)
- Liotta LA, Rao CN, Barsky SH. Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab. Investig.* 49: 636–649 (1983)
- Liu B, Liu W, Han B, Wang C. Effect of chitooligosaccharides on protecting pancreatic B cell and its antioxidant ability *in vivo*. *Gaojishu Tongxim/Chin. High Technol. Lett.* 17: 968–973 (2007)
- Liu B, Liu WS, Han BQ, Sun YY. Antidiabetic effects of chitooligosaccharides on pancreatic islet cells in streptozotocin-induced diabetic rats. *World J. Gastroenterol.* 13: 725 (2007)
- Liu B, Qin ZK, Lin XM, Mei L., Liu WS, Han BQ. Promotion effect of chitooligosaccharides and its derivatives on pancreatic islet cells proliferation and insulin secretion. *J. Clin. Rehabilitative Tissue Eng. Res.* 13: 513–516 (2009)
- Loke A. Diabetes. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>. Feb. 27, 2020.
- Long T, Yu J, Wang J, Liu J, He BS. Orally administered chitooligosaccharides modulate colon microbiota in normal and colitis mice. *Int. J. Pharmacol.* 14: 291–300 (2018)
- Luo Y, Deng L, Deng QJ, Wen L. Comparative study of the chitooligosaccharides effect on the proliferation inhibition and radiosensitization of three types of human gastric cancer cell line. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 9: 601–605 (2016)
- Luo Z, Dong X, Ke Q, Duan Q, Shen L. Chitooligosaccharides inhibit ethanol-induced oxidative stress via activation of Nrf2 and reduction of MAPK phosphorylation. *Oncol. Rep.* 32: 2215–2222 (2014)
- Maezaki Y, Tsuji K, Nakagawa Y, Kawai Y, Akimoto M, Tsugita T, Mitsuoka T. Hypocholesterolemic effect of chitosan in adult males. *Biosci., Biotechnol. Biochem.* 57 1439–1444 (1993)
- Mei YX, Chen HX, Zhang J, Zhang XD, Liang YX. Protective effect of chitooligosaccharides against cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice. *Int. J. Biol. Macromol.* 62: 330–335 (2013)
- Mendis E, Kim MM, Rajapakse N, Kim SK. An *in vitro* cellular analysis of the radical scavenging efficacy of chitooligosaccharides. *Life Sci.* 80: 2118–2127 (2007)
- Mendis E, Kim MM, Rajapakse N, Kim SK. Carboxy derivatized glucosamine is a potent inhibitor of matrix metalloproteinase-9 in HT1080 cells. *Bioorg. Med Chem. Lett.* 16: 3105–3110 (2006)
- Moriano PS, Kidibule PE, Alleyne, E, Ballesteros AO, Heras A, Lobato M, Plou FJ. Efficient conversion of chitosan into chitooligosaccharides by a chitosanolytic activity from *Bacillus thuringiensis*. *Process Biochem.* 73: 102–108 (2018)
- Moriano PS, Woodley JM, Plou FJ. Continuous production of chitooligosaccharides by an immobilized enzyme in a dual-reactor system. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.* 133: 211–217 (2016)
- Morris VB, Neethu S, Abraham TE, Pillai CKS, Sharma CP. Studies on the condensation of depolymerized chitosans with DNA for preparing chitosan-DNA nanoparticles for gene delivery applications. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 89: 282–292 (2009)
- Nam K, Kim M, Shon Y. Inhibition of proinflammatory cytokine-induced invasiveness of HT-29 cells by chitosan oligosaccharide. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17: 2042 (2007)
- Ngo DH, Vo TS, Ngo DN, Kang KH, Je JY, Pham HN, Byun HG, Kim SK. Biological effects of chitosan and its derivatives. *Food Hydrocoll.* 51: 200–216 (2015)
- Ngo DN, Kim MM, Kim SK. Chitin oligosaccharides inhibit oxidative stress in live cells. *Carbohydr. Polym.* 74: 228–234 (2008)
- Ngo DN, Lee SH, Kim MM, Kim SK. Production of chitin oligosaccharides with different molecular weights and their antioxidant effect in RAW 264.7 cells. *J. Func. Foods* 1: 188–198

- (2009)
- Nishimura K, Ishihara C, Ukei S, Tokura S, Azuma I. Stimulation of cytokine production in mice using deacetylated chitin. *Vaccine* 4: 151-156 (1986)
- No HK, Park NY, Lee SH, Meyers SP. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *I. J. Food Microbiol.* 74: 65-72 (2002)
- Oh SH, Vo TS, Ngo DH, Kim SY, Ngo DN, Kim SK. Prevention of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in murine microglial BV-2 cells by chitin-oligomers. *Process Biochem.* 51: 2170-2175 (2016)
- Ohara N, Hayashi Y, Yamada S, Kim SK, Matsunaga T, Yanagiguchi K, Ikeda T. Early gene expression analyzed by cDNA microarray and RT-PCR in osteoblasts cultured with water-soluble and low molecular chitooligosaccharide. *Biomaterials* 25: 1749-1754 (2004)
- Okuda H, Kato H, Tsujita T. Antihypertensive and antihyperlipemic actions of chitosan. *J. Chitin Chitosan* 2: 49-59 (1997)
- Park JK, Chung MJ, Choi HN and Park YI. Effects of the molecular weight and the degree of deacetylation of chitosan oligosaccharides on antitumor activity. *Int. J. of Molecular Sci.* 12: 266-277 (2011)
- Park PJ, Ahn CB, Jeon YJ, Je JY. Renin inhibition activity by chitooligosaccharides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18: 2471-2474 (2008)
- Park PJ, Je JY, Kim SK. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity of hetero-chitooligosaccharides prepared from partially different deacetylated chitosans. *J. Agric. Food Chem.* 51: 4930-4934 (2003)
- Qian L, Chen L. Immune protective effects of chitooligosaccharides on mice genital tract infected by *Chlamydia trachomatis*. *Am. J. Reprod. Immunol.* 79: e12815 (2018)
- Qian ZJ, Eom TK, Ryu BM, Kim SK. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of sulfated chitooligosaccharides with different molecular weights. *J. Chitin Chitosan.* 15: 75-79 (2010)
- Quan H, Xu Z. Hypotheses: A New Way Against Cancer Metastasis, Chitooligosaccharides as Mucosal Adjuvant for Therapeutic Vaccination Targeting Heparanase. *J. Anim. Vet. Adv.* 11: 2788-2791 (2012)
- Quan H, Zhu F, Han X, Xu Z, Zhao Y, Miao Z. Mechanism of anti-angiogenic activities of chitooligosaccharides may be through inhibiting heparanase activity. *Med. Hypotheses.* 73: 205-206 (2009)
- Rajapakse N, Kim MM, Mendis E, Huang R and Kim SK. Carboxylated chitooligosaccharides (CCOS) inhibit MMP-9 expression in human fibrosarcoma cells via down-regulation of AP-1. *Biochim. Biophys. Acta* 1760: 1780-1788 (2006)
- Ratanavaraporn J, Kanokpanont S, Tabata Y, Damrongsakkul S. Growth and osteogenic differentiation of adipose-derived and bone marrow-derived stem cells on chitosan and chitooligosaccharide films. *Carbohydr. Polym.* 78: 873-878 (2009)
- Ryu B, Himaya SWA, Napitupulu RJ, Eom TK, Kim SK. Sulfated chitooligosaccharide II (SCOS II) suppress collagen degradation in TNF-induced chondrosarcoma cells via NF- $\kappa$ B pathway. *Carbohydr. Res.*, 350: 55-61 (2012).
- Ryu B, Kim SY, Vo TS, Kim WS, Kim DG and Kim SK. Characterization of the *in vitro* effects of gallic acid-grafted-chitooligosaccharides in the suppression of AGS human gastric cancer cell proliferation. *RSC Adv.* 7: 24561-24568 (2017)
- Sato K, Saimoto H, Morimoto M, Shigemasa Y. Depolymerization of chitin and chitosan under hydrothermal conditions. *Sen-I Gakkaishi.* 59: 104-109 (2003)
- Senevirathne M, Ahn CB, Kim SK, Je JY. pp. 169-178 *Cosmeceutical Applications of Chitosan and Its Derivatives.* pp. 169-178. In: *Marine Cosmeceuticals: Trends and Prospects.* Kim SK (ed.) CRC Press. NY, USA (2012)
- Senevirathne, M, Ahn CB, Je JY. Hepatoprotective effect of chitooligosaccharides against tert-butylhydroperoxide-induced damage in Chang liver cells. *Carbohydr. Polym.* 83: 995-1000 (2011)
- Setyahadi S. High-Density Chitin-Chitosan Production and Beneficial in Health. pp. 313-328. In: *Marine Nutraceuticals: Prospects and Perspectives.* Kim SK (ed.) CRC Press. NY, USA (2013)
- Shen KT, Chen MH, Chan HY, Jeng JH, Wang YJ. Inhibitory effects of chitooligosaccharides on tumor growth and metastasis. *Food Chem. Toxicol.* 47: 1864-1871 (2009)
- Shimizu Y. Hypertension. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hypertension>. Feb. 27, 2020.
- Shimojoh M, Masaki K, Kurita K, Fukushima K. Bactericidal effects of chitosan from squid pens on oral streptococci. *Nippon Nōgei Kagakukaishi*, 70: 787-792 (1996)
- Šimůnek J, Brandysová V, Koppová I. The antimicrobial action of chitosan, low molar mass chitosan, and chitooligosaccharides on human colonic bacteria. *Folia microbiol.* 57: 341-345 (2012)
- Sugano M, Yoshida K, Hashimoto M, Enomoto K, Hirano S. Hypocholesterolemic activity of partially hydrolyzed chitosans in rats. *Adv. Chitin Chitosan* 11: 472-8 (1992)
- Sun YX, Liu T, Dai XL, Gao ZL, Wei R, Zheng QS, Jiang ZF. A study of the effect of chitooligosaccharides on cerebral ischemia/reperfusion in mice. *Chin. Pharm. Bull.* 26: 1180-1184 (2010)
- Suzuki K, Mikami T, Okawa Y, Tokoro A, Suzuki S, Suzuki M. Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose. *Carbohydr. Res.*, 151: 403 (1986)
- Ta QV, Kim MM, Kim SK. Inhibitory effect of chitooligosaccharides on matrix metalloproteinase-9 in human fibrosarcoma cells (HT1080). *Mar. Biotechnol.* 8: 593-599 (2006)
- Tak HY, Lee, CM, Shim WG, Yoon SD. Preparation and Characterization of Chitosan-based Functional Biomaterials for the Sulindac Recognition. *J. Chitin Chitosan* 22: 162-170 (2017).
- Tapola NS, Lyyra ML, Kolehmainen RM, Sarkkinen ES, Schauss AG. Safety aspects and cholesterol-lowering efficacy of chitosan tablets. *J. Am. Coll. Nutr.* 27: 22-30 (2008)



- Teodoro JS, Gomes AP, Varela AT, Duarte FV, Rolo AP, Palmeira CM. Hepatic and skeletal muscle mitochondrial toxicity of chitosan oligosaccharides of normal and diabetic rats. *Toxicol. Mech. Methods* 26: 650–657 (2016)
- Tokoro A, Tatewaki N, Suzuki K, Mikami T, Suzuki S, Suzuki M. Growth inhibitory effect of hexa-N-acetylchitohexaose against Meth-A solid tumor. *Chem. Pharm. Bull.* 36: 784–790 (1988)
- Van TQ, Kim MM, Kim SK. Inhibitory effect of chitoooligosaccharides on matrix metalloproteinase-9 in human fibrosarcoma cells (HT1080). *Mar. Biotechnol.* 8: 593–599. (2006)
- Venkatesan J, Lowe B, Anil S, Ealla KKR, Kim SK. Marine biopolymers in bone tissue repair and regeneration. pp. 401–414. In: *Industrial Applications of Marine Biopolymers*. Kim SK (ed.) CRC Press. NY, USA. (2017)
- Vo TS, Kim JA, Ngo DH, Kong CS, Kim SK. Protective effect of chitosan oligosaccharides against FcεRI-mediated RBL-2H3 mast cell activation. *Process Biochem.* 47: 327–330 (2012)
- Vo TS, Kong CS, Kim SK. Inhibitory effects of chitoooligosaccharides on degranulation and cytokine generation in rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells. *Carbohydr. Polym.* 84: 649–655 (2011)
- Vo TS, Ngo DH, Ta QV, Wijesekera I, Kong CS, Kim SK. Protective effect of chitin oligosaccharides against lipopolysaccharide-induced inflammatory response in BV-2 microglia. *Cell. Immunol.* 277: 14–21 (2012)
- Wang SL, Lin HT, Liang TW, Chen YJ, Yen YH, Guo SP. Reclamation of chitinous materials by bromelain for the preparation of antitumor and antifungal materials. *Bioresour. Technol.* 99: 4386–4393 (2008)
- Wang Z, Zheng L, Yang S, Niu R, Chu E, Lin X. N-acetylchitoooligosaccharide is a potent angiogenic inhibitor both *in vivo* and *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357: 26–31 (2007)
- Wei X, Chen W, Mao F, Wang Y. Effect of chitoooligosaccharides on mice hematopoietic stem/progenitor cells. *Int. J. Biol. Macromol.* 54: 71–75 (2013)
- Wu H, Aam BB, Wang W, Norberg AL, Sørli E, Eijsink VG, DuY. Inhibition of angiogenesis by chitoooligosaccharides with specific degrees of acetylation and polymerization. *Carbohydr. Polym.* 89: 511–518 (2012)
- Wu H, Yao Z, Bai X, Du Y, Lin B. Anti-angiogenic activities of chitoooligosaccharides. *Carbohydr. Polym.* 73: 105–110 (2008)
- Wu H, Yao Z, Bai X, Du Y, Ma X. Chitoooligosaccharides inhibit nitric oxide mediated migration of endothelial cells *in vitro* and tumor angiogenesis *in vivo*. *Carbohydr. Polym.* 82: 927–932. (2010)
- Wu S. Preparation of chitoooligosaccharides from *Clanis bilineata* larvae skin and their antibacterial activity. *Int. J. Biol. Macromol.* 51: 1147–1150 (2012)
- Wu T, Zivanovic S, Hayes DG, Weiss J. Efficient reduction of chitosan molecular weight by high-intensity ultrasound: Underlying mechanism and effect of process parameters. *J. Agr. Food Chem.* 56: 5112–5119 (2008)
- Xia W, Liu P, Zhang J, Chen J. Biological activities of chitosan and chitoooligosaccharides. *Food Hydrocolloids.* 25: 170–179 (2011)
- Xia Z, Chen J, Wu S. Hydroll. activity of the chitoooligosaccharides from *Clanis bilineata* (Lepidoptera), an edible insect. *Int. J. Biol. Macromol.* 59: 96–98 (2013)
- Xing R, Liu S, Yu H, Guo Z, Wang P, Li C, Li P. Salt-assisted acid hydrolysis of chitosan to oligomers under microwave irradiation. *Carbohydr. Res.* 340: 2150–2153 (2005)
- Xiong C, Wu H, Wei P, Pan M, Tuo Y, Kusakabe I, Du Y. Potent angiogenic inhibition effects of deacetylated chitohexaose separated from chitoooligosaccharides and its mechanism of action *in vitro*. *Carbohydr. Res.* 344: 1975–1983 (2009)
- Xu Q, Ma P, Yu W, Tan C, Liu H, Xiong C, Riao Y, Du Y. Chitoooligosaccharides protect human embryonic hepatocytes against oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *Mar. Biotechnol.* 12: 292–298 (2010)
- Xu Q., Dou J, Wei P, Tan C, Yun X, Wu Y, Bai X, Ma X, Du Y. Chitoooligosaccharides induce apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells via up-regulation of Bax. *Carbohydr. Polym.* 71: 509–514 (2008)
- Xu W, Huang HC, Lin CJ, Jiang ZF. Chitoooligosaccharides protect rat cortical neurons against copper induced damage by attenuating intracellular level of reactive oxygen species. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20: 3084–3088 (2010)
- Xu W, Xiao M, Yuan L, Zhang J, Hou Z. Preparation, physicochemical properties and hemocompatibility of biodegradable chitoooligosaccharide-based polyurethane. *Polymers* 10: 580 (2018)
- Xu Y, Zhang Q, Yu S, Yang Y, Ding F. The protective effects of chitoooligosaccharides against glucose deprivation-induced cell apoptosis in cultured cortical neurons through activation of PI3K/Akt and MEK/ERK1/2 pathways. *Brain Res.* 1375: 49–58 (2011)
- Yang Y, Shu R, Shao J, Xu G, Gu X. Radical scavenging activity of chitoooligosaccharide with different molecular weights. *Eur. Food Res. Technol.* 222: 36–40 (2006)
- Yang Y, Xing R, Liu S, Qin Y, Li K, Yu H, Li P. Immunostimulatory effects of Chitoooligosaccharides on RAW 264.7 mouse macrophages via regulation of the MAPK and PI3K/Akt signaling pathways. *Mar. Drugs.* 17: 36–48 (2019)
- Yoksan R, Akashi M, Miyata M, Chirachanchai S. Optimal  $\gamma$ -ray dose and irradiation conditions for producing low-molecular-weight chitosan that retains its chemical structure. *Radiat. Res.* 161: 471–480 (2004)
- Yoon NY, Ngo DN, Kim SK. Acetylcholinesterase inhibitory activity of novel chitoooligosaccharide derivatives. *Carbohydr. Polym.* 78: 869–872 (2009)
- Yousef M, Pichyangkura R, Soodvilai S, Chatsudthipong V, Muanprasat C. Chitosan oligosaccharide as potential therapy of

inflammatory bowel disease: therapeutic efficacy and possible mechanisms of action. *Pharmacol. Res.* 66: 66-79 (2012)

Zhao L, Sun T, Wang L. Chitosan oligosaccharide improves the therapeutic efficacy of sitagliptin for the therapy of Chinese elderly patients with type 2 diabetes mellitus. *Ther. Clin. Risk Manag.* 13: 739 (2017)

Zhou S, Yang Y, Gu X, Ding F. Chitooligosaccharides protect cultured hippocampal neurons against glutamate-induced

neurotoxicity. *Neurosci. Lett.* 444: 270-274 (2008)

김세권, 변희국. 해양생물로부터 기능성 펩티드의 생산 및 응용. *식품과학과 산업*. 51: 278-301 (2018)

김세권, 수산물과 고혈압. *해양 생물을 이용한 헬스케어*. 자유아카데미, 한국, pp. 237-247, (2015)

김세권, 키틴·키토산 및 키토산 올리고당은 어떻게 만들어지는가? *해양 생물을 이용한 헬스케어*. 자유아카데미, 한국, pp. 22-36 (2015)