工學碩士 學位論文

In Vitro 실험에 의한 Chitosan의 지방질 흡착 특성에 관한 연구

2002 年 2 月

釜 慶 大 學 校 大 學 院

食 品 工 學 科

黃 善 永

工學碩士 學位論文

In Vitro 실험에 의한 Chitosan의 지방질 흡착 특성에 관한 연구

指導敎授 李 根 泰

이 論文을 工學碩士 學位論文으로 提出함

2002 年 2月

釜慶大學校 大學院

食品工學科

黃 善 永

黃善永의 工學碩士 學位論文을

認准함

2001年　12月　26日

主　審	農學博士	李　養　鳳	㊞
委　員	工學博士	全　炳　秀	㊞
委　員	工學博士	李　根　泰	㊞

목 차

In Vitro Studies on the Lipids Absorption Characteristics of Chitosan

Sun-Young HWANG

Department of Food Science and Technology,
Graduate School, Pukyong National University

Abstract

In order to study on the lipids absorption characteristics of chitosan as different molecular weight and degree of deacetylation, *in vitro* tests under condition of gastrointestinal track were investigated and the results were summarized as follows.

The degree of deacetylation in chitosans were 70%, 85%, 92% as different deacetylation time(1hr, 2hrs, 3hrs), respectively. The molecular weight of each chitosan was controlled by enzymatic hydrolysis and then the molecular weight of chitosan were 24kDa 28kDa, 4kDa, respectively.

The bulk density, water holding capacity and fat binding capacity of each chitosan powder were 96.2 504.0%, 374.4 1217.9%, 307.0 659.3%, respectively. The higher molecular weight of chitosan was exhibited the lower bulk density and further the higher water and fat binding capacities. Binding capacities of chitosan powders to bile salts, cholesterol and linoleic

acid were 41.2 63.3%, 40.8 67.4%, 42.6 72.6%, respectively.

Cholesterol and linoleic acid were mixed with bile salts and then the pH of each micelle was increased upto pH 7.4 with 0.1N NaOH solution. Binding capacity of each chitosan to bile salts was showed 69.6 92.0% in bile salts-cholesterol mixed micelle and 66.1 88.0% in bile salts-linoleic acid mixed micelle. Binding capacities of chitosans to cholesterol and linoleic acid were 47.8 74.4%, 52.4 87.0%, respectively. After pH of chitosan solution was increased, the lipid binding capacity of chitosan was more increased than chitosan powder.

In near infrared spectrum of chitosan absorbed lipid, the occurrence static electronical binding between chitosan and lipid through the combination of C-H in lipid and amide(NH_3^+) in chitosan was identified. This result proved the theological mechanism of lipid absorption of chitosan.

In conclusion, the higher degree of deacetylation and molecular weight of chitosan was exhibited the higher lipid binding capacity. After the pH of chitosan solution was increased upto pH 7.4, the lipids binding capacity of chitosan was more increased than chitosan powder. The change of pH in gastrointestinal track influenced the lipid binding capacity of chitosan. The lipids absorption of chitosan was occurrenced by combination of C-H in lipids and amide(NH_3^+) in chitosan.

서 론

수산가공폐기물인 게, 새우 등 갑각류의 껍질 및 오징어연골에 많이 함유되어 있는 chitin 및 chitosan(Fig. 1)은 천연에서 연간 약 100 1,000억톤 정도가 생산되는 것으로 추정되고 있어(Hirano등, 1987) cellulose 다음으로 많은 양이 생산되는 생물자원으로서 그 가치를 인정받고 있으며, 이를 효과적으로 이용하기 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 하지만 chitin은 물이나 알콜 등 일반용매에는 녹지 않는 특성을 가지고 있어 그 자체로는 이용 가능성이 매우 낮은 문제점을 지니고 있다. 이것을 해결하기 위하여 개발된 것 중에서 chitosan은 chitin의 2번 탄소에 연결되어 있는 acetyl group을 진한 알카리용액으로 처리하여 제거한 chitin 유도체(탈아세틸화물)로서 자연상태에서도 chitin과 함께 일부 존재하는 것으로 알려져 있다. 이러한 chitosan은 묽은 산용액에 매우 잘 녹는 특성을 지니고 있고, 반응성도 높아 최근 여러 연구자들에 의해 산업적으로 매우 이용가능성이 높은 물질임이 밝혀지고 있으며 여러 분야에서 chitosan을 활용하기 위해 많은 관심을 보이고 있다(Table 1).

Chitosan의 응용가능분야는 매우 넓으며 산업화가 이루어질 경우 경제성도 상당히 높을 것으로 예상되어지지만 관련 연구들의 형태가 대부분 가능성의 타진 수준에 머물고 있어 아직은 미흡한 실정이다.

Chitosan은 용액상태에서 거대한 양이온성 분자로 작용하기 때문에 여러 가지 음이온 형태의 분자 또는 물질을 흡착할 수 있는 능력이 있다(Knorr, 1984). 이러한 chitosan의 특성을 잘 이용할 경우 효과적인 응집 또는 흡착제로 이용가능 할 것이며, 이와 관련된 연구를 통하여 현재 알려져 있는 응용가능분야는 폐수처리, 단백질 회수, 지방흡착, 건강보조식품소재, 미생물 또는 효소의 고정화 담체, 과일 음료 또는 발효주의 청징제 등이다(Austin 등, 1981,

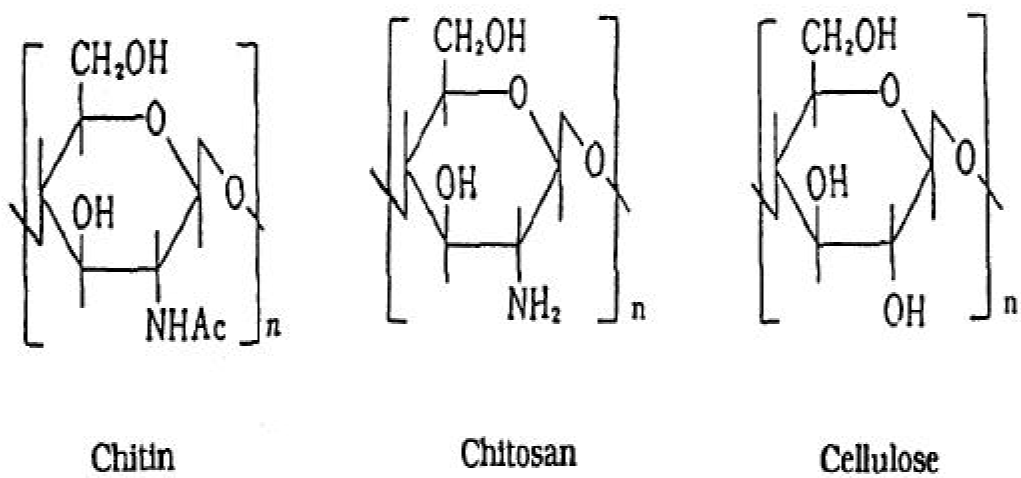

Fig. 1. Chemical structure of chitin, chitosan and cellulose.

Table 1. Industrial applications of chitosan

Application fields	Available functions
Wastewater Treatment	Removal of metal Flocculant and coagulant - protein - dye - amino acids
Food Industry	Removal of dye and suspended solids etc Preservative Color stabilization Animal feed additive
Medical	Bandages Blood cholesterol control Controlled release of drugs Skin bum Contact lens
Biotechnology	Enzyme and cell immobilization Protein separation Cell recovery Chromatography
Agriculture	Seed coating Fertilizer Controlled agrochemical release
Cosmetic	Moisturizer Face, hand and body creams Bath lotion Hair care
Pulp and Paper	Surface treatment Photographic paper
Membrane	Permeability control Reverse osmosis

Casio 등, 1982, Latlief 등, 1983, Hirano, 1988, Knorr 등, 1988, 1991).

특히 chitosan은 fat-binding 능력이 뛰어난 것으로 알려져 있는데 동물실험을 통하여 장내 지방흡수를 줄이고, 혈중콜레스테롤 수준을 감소시키는 효과가 있는 것으로 나타났다(Kobayashi 등, 1979, Nagyvary 등, 1979, Sugano 등, 1978, 1980, Vahouny 등, 1983, Razdan 등, 1994). 이러한 특성은 요즘 현대인들에게 많은 문제가 되고 있는 고지혈증, 고콜레스테롤혈증 및 동맥경화증의 예방과 치료에 효과가 있을 것으로 예상된다. 또한 anti-lactose intolerance (Austin 등, 1982, Knorr, 1984), 항균작용(Sanford, 1988), 보습성, 유화안정성 및 식이섬유기능 등도 있어 이를 고부가 가치성 제품개발에 응용할 수 있을 것으로 예상된다(Hirano 등, 1987, Kanazawa 등, 1993, Fang 등, 1994).

Chitosan을 각종 식품에 응용하기 위해서는 식품에 사용 가능한 형태의 chitosan이 만들어야 한다. 즉 생리활성을 가지며 독성이 없고 수용성이며, 이미·이취가 없고 저점성의 조건을 갖추어야 한다. 그러므로 chitosan의 분자량을 낮추어 저분자 chitosan 또는 chitosan olygomer를 제조하는 것이 우선적으로 이루어져야 할 것이다.

현재 chitin과 chitosan 분해물질의 제조법으로는 화학적 방법과 효소적 방법 등이 보고되고 있다. 화학적 방법으로는 진한염산, 불화수소, 과산화수소 및 과산화붕소에 의한 가수분해법이 행해지고 있지만, 반응조건이 과격하기 때문에 반응의 제어가 어렵고, 반응 중에 shiff 염기를 기점으로 하는 Maillard 반응으로 인한 부생성물이 식품안전성을 해칠 우려가 있다(Hirano 등, 1985).

따라서 chitosan을 이용한 기능성식품을 개발하기 위해서는 효소적 방법으로 저분자 chitosan을 생산하는 것이 바람직할 것이다. Chitosan olygomer를 제조하는 방법으로는 유기산을 첨가하여 가열하는 화학적 가수분해 방법과 미생물이나 효소를 이용하여 chitosan의 β-1,4-lingkage를 절단하는 방법 등이 있

다(Hirano, 1985). 미생물을 이용하는 방법은 β-1,4-glycoside 결합을 가수분해하는 chitosanase를 분비할 수 있는 미생물(Aspergillus sp., Bacillus sp. 등)을 chitosan이 함유된 배지에서 배양하여 분해산물을 얻는 방법과 미생물로부터 chitosanase를 추출, 정제하여 chitosan을 분해시키는 방법 등이 있다(Muzzarelli, 1977, Akiyama, 1995). Panataleone 등(1991)은 chitosan에 대한 여러 가지 효소의 가수분해도를 조사한 결과, cellulase, pectinase, papain 등과 같은 산업용 food-grade 효소들도 chitosan을 가수분해할 수 있는 능력이 있음을 보고하였다.

최근 우리나라의 식생활이 점차 서구화되면서 각종 가공식품이나 육류의 섭취가 꾸준히 증가하고 있다. 이로 인하여 고지혈증이나 고콜레스테롤혈증을 가진 사람이 늘어나고 있고, 동맥경화, 고혈압, 심장병, 뇌졸증, 대장암, 당뇨병, 비만 등 성인병의 발병률도 간과하지 못할 수준으로 증가하고 있다.

우리나라 국민의 지방섭취는 1980년 21.8g으로 총열량의 9.81%였던 것이 1993년에는 36.9g으로 총열량의 18.2%를 차지해 섭취량이 2배 가까이 증가되었다. 이 중 동물성 지방은 16.6g으로 지방섭취량의 44.9%를 차지하고 있다(보건복지부통계, 1995). 따라서 높은 지방섭취로 인한 각종 성인병을 예방하기 위해서는 우선 동물성지방을 대상으로 하여 체내흡수를 낮추어 줄 수 있는 기능성 식품을 연구하는 것이 필요할 것이다.

체내의 지방질 대사에 대한 식이섬유의 영향에 대해서는 많은 보고가 있으나 성분에 따른 생리적 효과는 반드시 일치하고 있지는 않다. Chitosan의 *in vivo* 실험 결과, 혈청 cholesterol과 지방질 수준을 감소시키는데 효과가 큰 pectin보다도 그 효과가 뛰어났고, 또한 지방질의 lymphatic absorption을 저해하는 효과가 있다고 보고되어 있다(Sugano 등, 1978, 1980, Nagyvary 등, 1979). 일반적으로 chitosan이 chitin보다 생리적 효과가 더 뛰어난 것으로 알려져 있으

며, chitin질의 생리적 기능에 대한 *in vivo* 실험은 비교적 많이 행해졌으나 국내에서는 보고된 바가 거의 없고, 그 작용 메카니즘을 설명하는 데에는 미흡한 점이 많이 남아 있다. 이를 보완하기 위해서는 체내 소화기관과 같은 환경조건을 모델링하여 각 요인별로 조사하는 것이 효과적인 방법이라 사료된다.

본 연구에서는 식품에 응용가능한 저분자 chitosan을 효소적 방법으로 제조하여 동물성 및 식물성 유지에 대한 흡착특성을 조사하고, 기능성 식품소재로서의 가치를 확인하고자 하였으며, 인체의 소화기관과 같은 환경조건을 갖춘 model system에서 chitosan의 지방흡착특성을 조사하고 이에 대한 흡착기구를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

Ⅰ. 실험재료

구입한 chitin(C-9213, Sigma Chemical Co.)을 정제하여 chitosan의 원료로 사용하였으며, chitosan 분해용 효소는 lipase(L-3126, Sigma Chemical Co.)를 사용하였다. 지방질은 bile salts(B-8756, Sigma Chemical Co.)와 cholesterol (Junsei Chemicals Co., Japan), linoleic acid(L-1626, Sigma Chemical Co.)를 사용하였으며, 그 외 다른 시약들은 특급시약을 사용하였다.

Ⅱ. 실험방법

1. Chitin 및 chitosan 제조

Sigma사 chitin을 구입하여 탈회와 탈단백의 정제 공정을 거친 후 chitosan의 원료로 사용하였다. 탈회는 2N HCl 용액(원료의 10배)을 서서히 가한 후 실온에서 1시간 동안 교반하고, 교반이 끝난 다음 수세액이 중성에 이를 때까지 충분히 수세한 후 1N NaOH 용액(원료의 10배)을 가하여 heating mantle (E107, Misung Scientific Co.)에서 100℃로 3시간 동안 교반하면서 단백질을 제거하였다. 탈단백 공정이 끝난 후 충분히 수세한 다음 50℃에서 열풍건조하여 chitin을 얻었다. 그리고 chitosan은 위의 방법으로 제조한 정제 chitin에 47% NaOH 용액(chitin의 15배)을 가하여 130℃에서 일정 시간 동안 가열한 후 중성이 될 때까지 수세하고, 50℃에서 건조하여 잘게 분쇄한 후 상온에 보관하면서 실험에 사용하였다(Fig. 2).

2. Chitosan 분자량 조절

탈아세틸화도별로 제조된 chitosan을 0.1M acetate-0.1M sodium acetate buffer

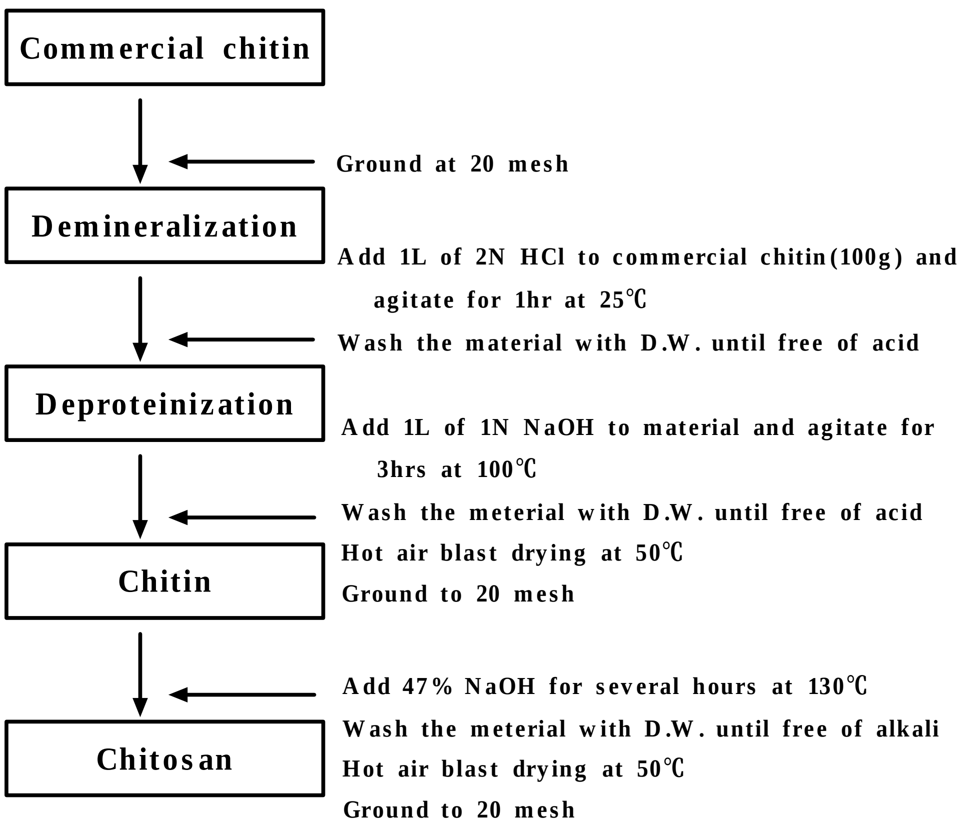

Fig. 2. Purification and preparation procedure of commercial chitin and chitosan.

(pH 4.0) 용액에 1% 농도로 용해시킨 뒤 lipase와 chitosan의 비율을 1 : 0.3으로 조절하여 40℃에서 24시간 동안 incuvation한 후, 반응을 정지하기 위해 100℃에서 15분간 autoclaving하였다. Inactivation 된 효소가수분해물을 glass filter로 효소와 chitosan 효소분해물로 분리하고, chitosan 효소분해물에 0.1M NaOH를 첨가하여 생성된 백색 침전물을 원심분리(5000rpm, 10min)를 통하여 증류수 수세한 뒤 동결건조(SFDSM 12, Samwon freezing engineering Co.) 시키고 분쇄하여 실험에 사용하였다(Fig. 3).

3. 일반성분 분석

제조한 chitin의 수분은 상압가열건조법, 회분은 건식회화법, 질소량은 micro-kjeldahl법, 지방은 Soxhlet법에 따라 측정하였다(AOAC, 1990).

4. Chitosan의 탈아세틸화도 측정

Sannan 등(1978)의 방법에 따라 시료 2㎎(200mesh)과 KBr 100㎎을 완전히 혼합한 후 마쇄하고, 시료 pellet을 만들어 FT-IR(Spectrum GX, Perkin Elmer, USA)로 4,000㎝$^{-1}$ 500㎝$^{-1}$영역에서 측정하였다. IR spectrum의 2,878㎝$^{-1}$과 1,550㎝$^{-1}$에서의 흡광도의 비(A_{1550}/A_{2878})를 구한 다음 Sannan 등(1978)이 구한 검량선(Fig. 4)을 이용하여 탈아세틸화도를 계산하였다.

5. 고유점도와 분자량 측정

Chitosan의 고유점도와 분자량 측정을 위하여 Ubbelohde형 모세관 점도계를 사용하였다. 0.1M acetic acid-0.02M NaCl 용액을 용매로 하여 0.01%, 0.03%, 0.05%, 0.08%, 0.1% chitosan 용액을 조제한 후, 각 chitosan 용액의 상대점도를 측정하고 아래의 식을 이용하여 비점도와 환원점도를 구한 다음 고유점도를

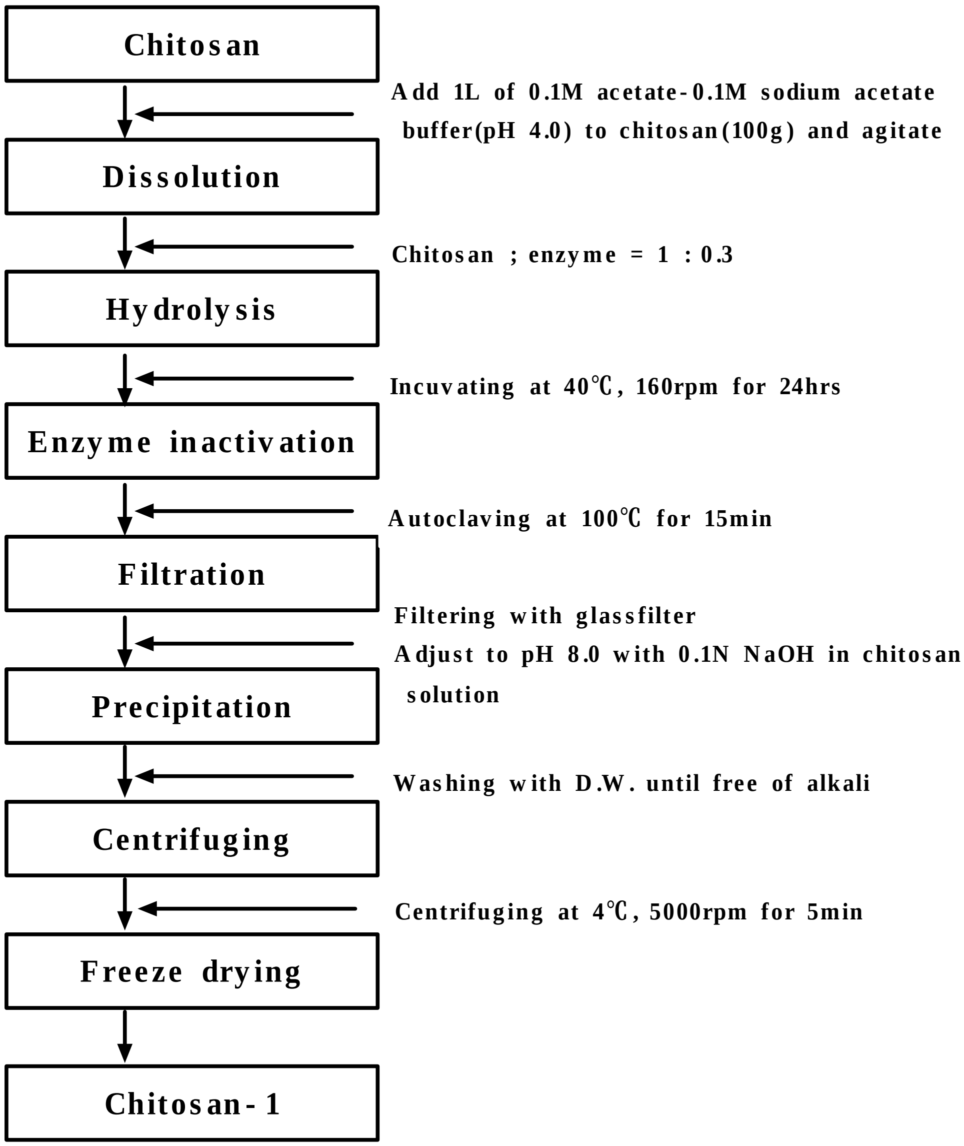

Fig. 3. Preparation procedure of low molecular weight chitosan.

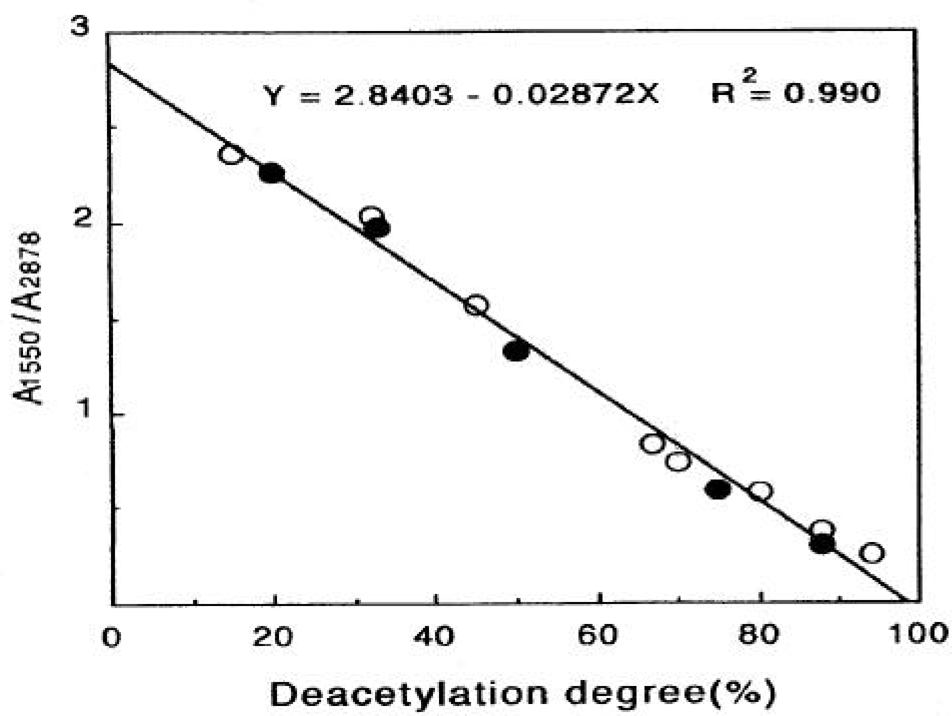

Fig. 4. Calibration line obtained by plotting the ratio of the absorbance of the bend at 1550cm^{-1} to that at 2878cm^{-1} against the degree of deacetylation(from Sannan et al., 1978).

구하였다.

$$\text{Relative viscosity} \; ; \quad \eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_s}$$

$$\text{Specific viscosity} \; ; \quad \eta_{sp} = \frac{(\eta - \eta_s)}{\eta_s} = \eta_{rel} - 1$$

$$\text{Reduced viscosity} \; ; \quad \eta_{red} = \frac{\eta - \eta_s}{C \cdot \eta_s} = \frac{\eta_{sp}}{C}$$

$$\text{Intrinsic viscosity} \; ; \quad [\eta] = \lim_{c \to 0}\left(\frac{\eta_{sp}}{C}\right) = (\eta_{red})_{c \to 0}$$

η_s : 용매의 점도, η : 용액의 점도, C : 용액의 농도

분자량은 고유점도와 분자량의 관계를 나타낸 Mark-Houwink 식을 이용하여 구하였다. 이 때 상수인 K와 a는 Roberts 등(1988)이 0.1M Acetic acid-0.02M NaCl 용액에 chitosan을 녹여서 구한 값을 이용하였다.

$$[\eta] = K \times Mw^a$$

여기서, $[\eta]$는 고유점도, K는 3.04×10^{-5}, Mw는 분자량, a는 1.26이다.

6. Bulk density 측정

Parrot 등(1978)의 방법으로 bulk density를 측정하였다. 즉 눈금이 매겨진 실린더에 일정량의 시료를 채운 후 내용물의 부피를 측정하였으며, mg/mL로 표시하였다.

7. 보수력(Water holding capacity)

McConnell 등(1974)의 방법에 따라 각각의 건조시료 0.1g을 원심관(15mm×

100mm)에 넣고 정평한 후 증류수 10mL를 넣고 vortex mixer에서 1분간 교반한 다음 실온에서 1시간 방치하면서 15분마다 5초 동안 교반한 후 원심분리(1600×g, 25min)하여 상층액을 제거한 다음 여지상에서 45°로 기울여 30분간 방치한 후 무게를 정평하였다.

$$보수력(\%) = \frac{수분흡착\ 후\ 무게(g)}{건조시료의\ 무게(g)} \times 100$$

8. 지방 흡착력(Fat binding capacity)

Lin 등(1974)의 방법에 따라 각각의 시료 0.2g을 원심관(15mm×100mm)에 넣고 정평한 후 대두유(동방유량) 10mL를 넣고 vortex mixer에서 1분간 교반한 다음 실온에서 1시간 방치하면서 15분마다 5초 동안 교반한 후 원심분리(1600×g, 25min)하여 상층액을 제거한 다음 여지 상에서 45°로 기울여 30분간 방치한 후 무게를 정평하였다.

$$지방흡착력(\%) = \frac{지방흡착\ 후\ 무게(g)}{건조시료의\ 무게(g)} \times 100$$

9. Bile salts 함량

Gregory and Pascoe의 방법(1954)에 따라 측정하였다. 즉 bile salts 용액 2mL에 45% H_2SO_4 용액 12mL와 0.3% furfural 용액 2mL를 각각 첨가하여 65℃에서 30분동안 반응시킨 후 청색으로 발색되는 것을 확인하였다. 이때 optical density가 가장 높은 파장인 680nm를 택하여 spectrophotometer (Biopec-1601, Shimazu)로 분석하였다. Bile salts의 농도에 따른 표준곡선은 Fig. 5에 제시하였다.

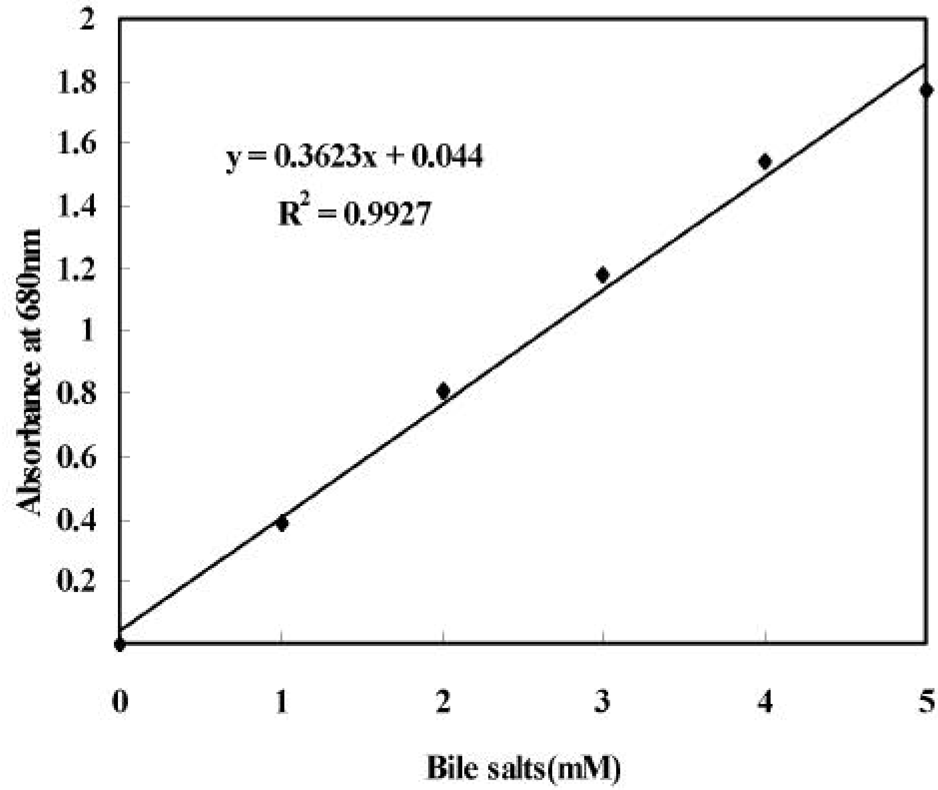

Fig. 5. Standard curve of bile salts in Gregory and Pascoe's test.

10. Cholesterol 함량

Zak의 방법(1968)에 따라 분석하였다. 즉 ferric chloride precipitation reagent 2mL에 1mL의 cholesterol 용액을 넣은 다음 진한 황산 2mL를 조심스럽게 첨가하였다. 이 용액을 잘 혼합한 후 실온에서 20분 정도 냉각한 다음 spectrophotometer(Biopec-1601, Shimazu)를 사용하여 560nm에서 흡광도를 측정하였다. Cholesterol 표준곡선은 Fig. 6에 제시하였다.

11. Linoleic acid 함량

Frings 등(1970)의 total lipid 분석방법에 따라 linoleic acid 함량을 분석하였다. 시료 용액 1mL에 진한 황산 2mL를 넣고 잘 혼합한 후 boiling water bath에서 10분간 가열하였다. 이것을 5분 동안 찬물에서 식힌 후 0.5mL의 aliquot를 취하여 phospho-vanillin reagent 5mL와 잘 혼합하였다. 이것을 15분 동안 37℃를 유지하면서 반응시킨 다음 실온에서 5분간 냉각시킨 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다. Linoleic acid 표준곡선은 Fig. 7에 제시하였다.

12. Mixed micellar component 결합 능력

Cholesterol과 linoleic acid에 bile salts를 첨가하여 micelle을 형성하였을 때 각각의 micelle 구성성분들이 chitosan과 결합되는 정도를 Eastwood 등(1976)과 Vahouny 등(1980, 1981)의 방법을 변형하여 측정하였다. 각 구성성분의 농도는 생리적 조건을 고려하여 bile salts는 0.1M phosphate buffer(pH 7.0)에 용해하여 5mM 농도로 하였고, cholesterol과 linoleic acid는 ethyl ether에 녹여 각각 0.25mM, 0.5mM 농도로 하였다.

Chitosan 1g을 1N HCl 20mL에 용해시킨 후 0.25mM cholesterol과 0.5mM

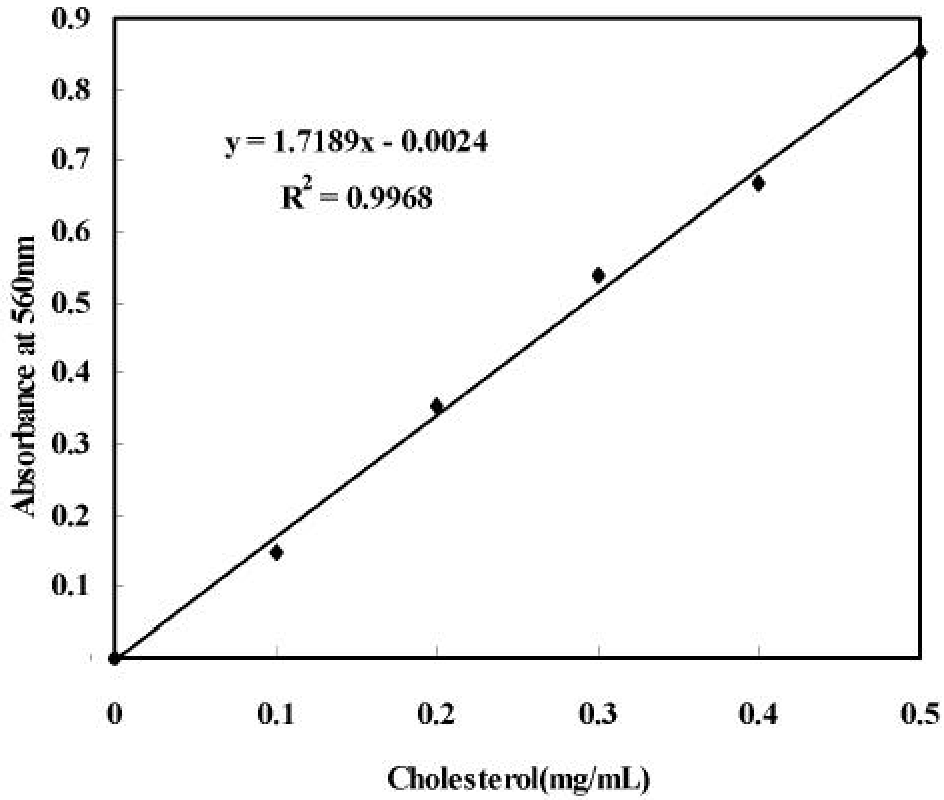

Fig. 6. Standard curve of cholesterol in Zak's method.

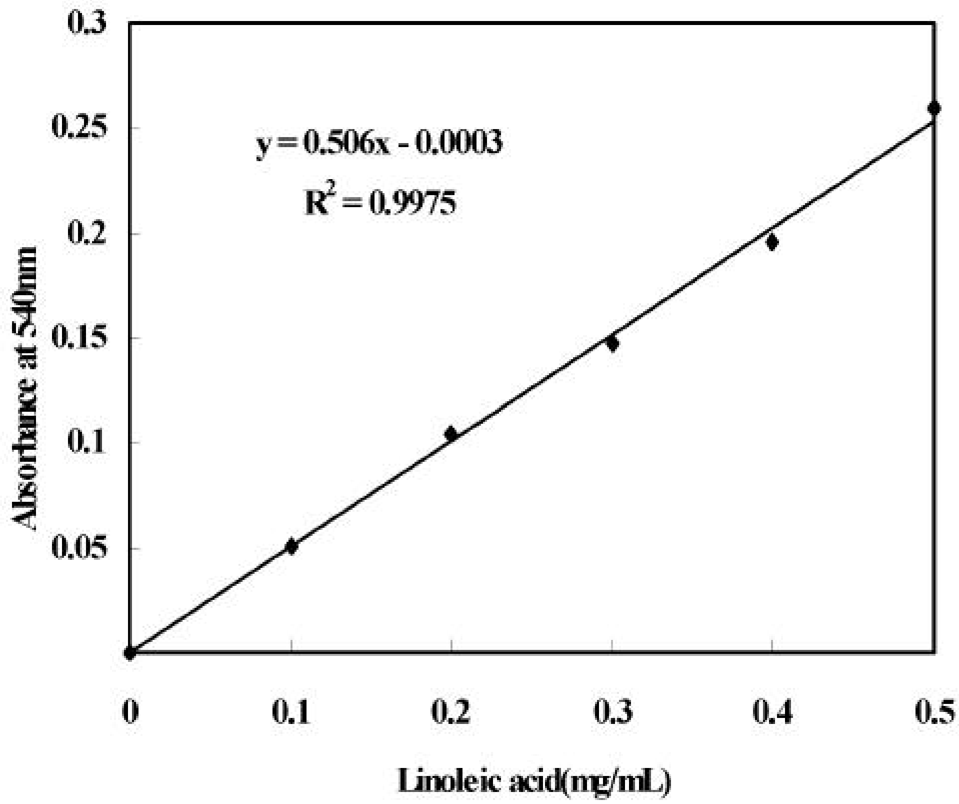

Fig. 7. Standard curve of linoleic acid in Frings et al.'s method.

linoleic acid 50mL를 각각 혼합하여 shaking incuvator에서 100rpm으로 3시간 동안 37℃를 유지하면서 반응시켰다. 이 혼합액에 5mM bile salts 10mL를 첨가하고, 1N NaOH로 pH 7.4가 되도록 조절하여 37℃에서 3시간동안 100rpm으로 반응시켰다. 이 혼합물을 원심분리(1600×g, 25min)한 후 분리된 상징액을 취해 bile salts, cholesterol, linoleic acid를 각각 정량하였다. Micellar component와의 결합정도(%)는 유화액에 첨가한 각 구성성분의 농도와 chitosan의 흡착실험 후 분리된 상징액의 농도 차이로부터 계산하여 구하였다.

13. Chitin 및 chitosan의 근적외선 분광분석

(1) 지방흡착 chitosan 제조

Lin 등(1974)의 방법을 변형하여 chitosan 5g을 0.1 M acetate-0.1 M sodium acetate buffer(pH 4.0) 용액 500mL에 용해시킨 1% chitosan(w/v)용액에 50g의 대두유(동방유량)를 첨가하여 교반한 후 0.1N NaOH 용액으로 pH를 7.4로 조절하였다. 3000rpm에서 25분간 원심분리한 후 분리된 대두유를 제거하고 원심분리관을 45° 기울여 30분 동안 방치한 후 제조된 지방흡착 chitosan pellet을 동결건조하여 근적외선분광분석용 시료로 사용하였다.

(2) 근적외선 분광분석 및 통계처리

Chitosan의 구조 분석을 위해 제조한 각각의 시료를 근적외선 분광분석기(Spectrum GX, Perkin Elmer, USA)로 분석하였으며, 각 시료의 spectrum은 1100nm 2400nm 영역에서 absorbance mode로 측정하였다. 근적외선 분광분석으로 얻어진 스펙트럼 결과의 통계적 분석은 near infrared spectral analysis software(QUANT C+, Perkin Elmer, USA)를 사용하여 principal component regression(PCR)법으로 행해졌다.

결과 및 고찰

1. Chitin 및 chitosan의 일반성분

Chitosan 제조를 위해 Sigma사에서 구입한 chitin의 경우 조단백질과 조회분 함량이 각각 39.23%, 5.53%로 비교적 높았다. 구입한 chitin을 재탈회 및 재탈단백한 후 일반성분을 측정한 결과 조단백질 함량은 3.57%이었고, 조회분 함량은 1.18%이었다. 또 수분 함량은 5.65 6.20%이었으며, 지방의 함랑은 미량 검출되었다(Table 2).

2. Chitosan의 탈아세틸화도와 분자량

Chitosan의 특성에 따른 지방질 흡착 특성을 조사하기 위하여 chitosan의 탈아세틸화도와 분자량을 조절하였고, 그 결과를 Table 3에 나타내었다.

재탈회 및 재탈단백 한 chitin에 47% NaOH 용액을 가하여 130℃에서 반응시간을 달리하여 제조한 chitosan의 infrared spectrum(Fig. 8)으로부터 2,878 ㎝$^{-1}$과 1,550㎝$^{-1}$에서의 흡광도의 비(A_{1550}/A_{2878})를 구한 다음 Sannan 등(1978)이 구한 검량선(Fig. 4)을 이용하여 탈아세틸화도를 계산한 결과 탈아세틸화도는 각각 70%, 85%, 92%이었다.

탈아세틸화도가 70%, 85%, 92%인 chitosan의 고유점도를 측정하여 분자량을 계산한 결과 분자량은 24kDa 28kDa이었고, 각각의 chitosan을 효소가수분해한 결과 분자량은 4kDa 이하였다.

3. Chitosan 분말의 bulk density 및 수분과 지방에 대한 흡착력

Chitosan 입자의 compectness를 표현하는 bulk density(mg/mL)를 측정하여 Table 4에 나타내었고, M.W. 24kDa chitosan과 M.W. 4kDa chitosan이 각각

Table 2. Ingredients of commercial chitin and chitin(dry basis)

Composition	Content(%)	
	Commercial chitin	Chitin[a]
Moisture	6.20	5.65
Crude protein	39.23	5.53
Crude ash	3.57	1.18
Crude fat	ND[b]	ND[b]

[a] Demineralization ; add 1L 2N HCl to commercial chitin(100g) and agitate for 1hr at 25℃

Deproteinization ; add 1L 1N NaOH to material and agitate for 3hrs at 25℃.

[b] ND : Not detected.

Table 3. Degree of deacetylation and molecular weight of chitosan

		Degree of deacetylation(%)	Molecular weight (M.W.)
Chitosan[a]	70H	70	28kDa
	70L		4kDa
Chitosan[b]	85H	85	26kDa
	85L		4kDa
Chitosan[c]	92H	92	24kDa
	92L		4kDa

[a] Deacetylation ; added 47% NaOH to chitin for 1hr at 130℃.

[b] Deacetylation ; added 47% NaOH to chitin for 2hrs at 130℃.

[c] Deacetylation ; added 47% NaOH to chitin for 3hrs at 130℃.

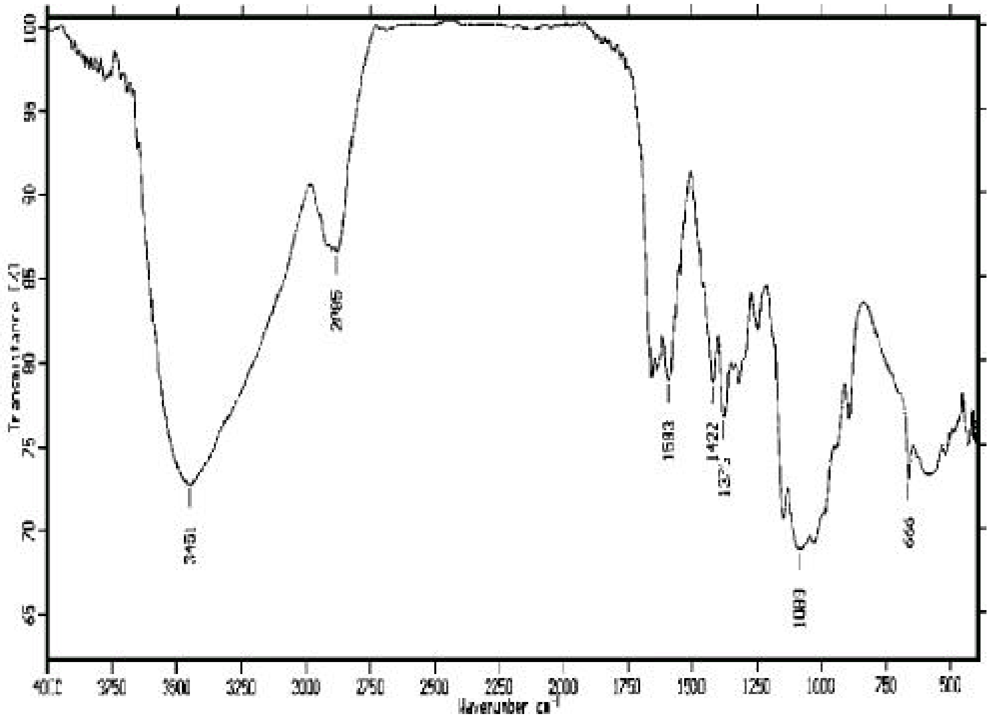

Fig. 8. Fourier transform infrared spectrum of chitosan.

Table 4. Bulk density of chitosan

Chitosan[a]	Bulk density (mg/mL)
70H	96.2±6.5
70L	477.1±6.9
85H	106.8±7.5
85L	489.3±7.3
92H	111.1±6.8
92L	504.0±8.3

[a] 70H;D.D.70%, M.W.28kDa chitosan, 70L;D.D.70%, M.W.4kDa chitosan
85H;D.D.85%, M.W.26kDa chitosan, 85L;D.D.85%, M.W.4kDa chitosan
92H;D.D.92%, M.W.24kDa chitosan, 92L;D.D.92%, M.W.4kDa chitosan
D.D.; Degree of deacetylation(%), M.W.; Molecular weight.

96.2 111.1mg/mL, 477.1 504.0mg/mL이었으며, 탈아세틸화도 70%, 85%, 92% chitosan이 각각 96.2 477.1mg/mL, 106.8 489.3mg/mL, 111.1 504.0mg/mL으로 상대적으로 chitosan의 탈아세틸화도가 높고, 분자량이 작을수록 bulk density가 크게 나타났다.

Chitosan 분말의 보수력, 지방흡착력을 측정하여 Fig. 9, Fig. 10에 나타내었다. 수분과 지방에 대한 흡착력은 M.W. 24kDa chitosan이 각각 1094.5 1217.9%, 649.9 659.3%이었으며, M.W. 4kDa chitosan이 각각 374.4 424.5%, 307.0 338.8%이었다. 탈아세틸화도(D.D.) 70% chitosan이 각각 374.4 1094.5%, 307.0 649.9%이었고, D.D. 85% chitosan이 376.9 1153.9%, 333.8 652.9%이었으며, D.D. 92% chitosan이 각각 424.5 1217.9%, 338.8 659.3%로 나타났다. Chitosan의 분자량이 상대적으로 크고, 탈아세틸화도가 높을수록 수분과 지방에 대한 흡착력이 높게 나타났다.

Knorr(1982)와 Austin 등(1981)등은 chitin 및 chitosan의 보수력은 chitin질의 결정화도와 단백질 함량에 따라 차이가 나며, 또 McConnell 등(1974)은 식이섬유의 보수력은 측정 온도, 침지시간, 원심분리 속도 등에 따라 달라진다고 보고하였다. Kim(1994)과 Knorr(1982)에 의하면 분자량과 결정성이 큰 chitosan의 지방 흡착력이 높게 나타났다고 하였다.

4. 지방질 종류에 따른 chitosan 분말의 흡착특성

Chitosan 분말의 bile salts, cholesterol, linoleic acid 흡착력을 측정하여 Fig. 11, Fig. 12, Fig. 13에 나타내었다.

Chitosan 분말의 bile salts, cholesterol, linoleic acid에 대한 흡착력은 M.W. 24kDa chitosan이 각각 56.6 63.3%, 57.2 67.4%, 62.4 72.6%이었고, M.W. 4kDa chitosan이 각각 41.2 49.8%, 40.8 49.6%, 42.6 52.8%이었다.

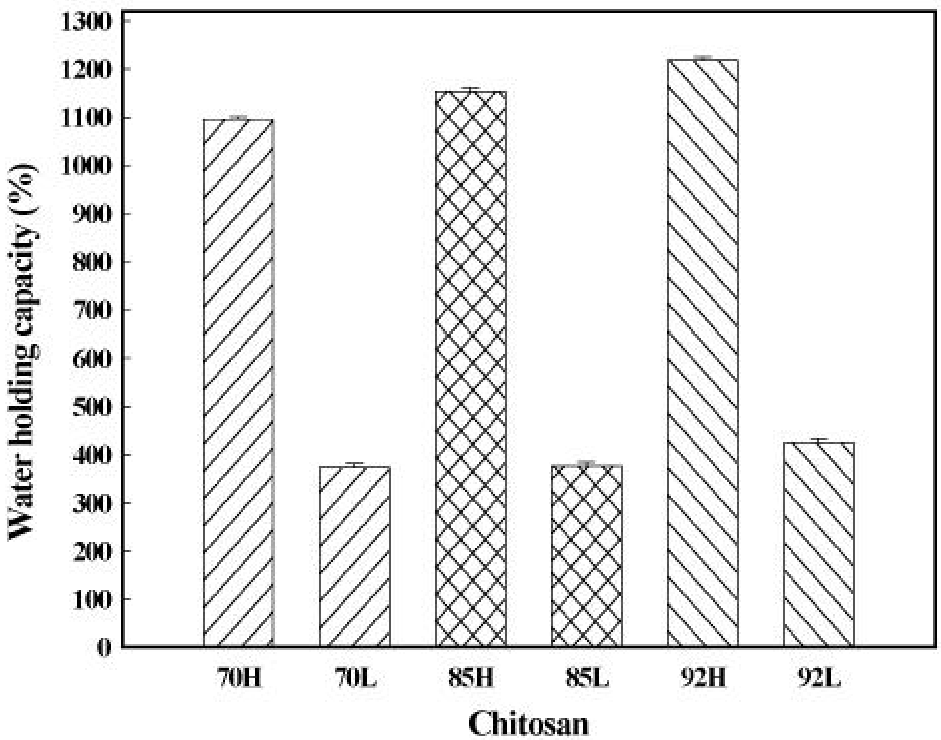

Fig. 9. Water holding capacity of chitosan.

70H;D.D.70%, M.W.28kDa chitosan, 70L;D.D.70%, M.W.4kDa chitosan
85H;D.D.85%, M.W.26kDa chitosan, 85L;D.D.85%, M.W.4kDa chitosan
92H;D.D.92%, M.W.24kDa chitosan, 92L;D.D.92%, M.W.4kDa chitosan
D.D.; Degree of deacetylation(%), M.W.; Molecular weight.

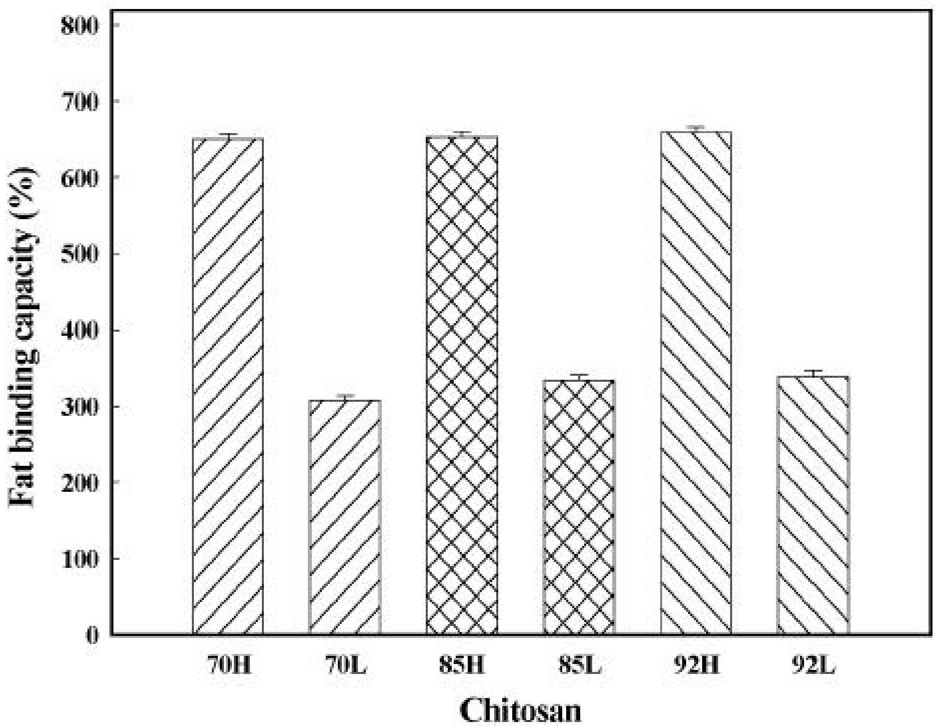

Fig. 10. Fat binding capacity of chitosan.

70H;D.D.70%, M.W.28kDa chitosan, 70L;D.D.70%, M.W.4kDa chitosan
85H;D.D.85%, M.W.26kDa chitosan, 85L;D.D.85%, M.W.4kDa chitosan
92H;D.D.92%, M.W.24kDa chitosan, 92L;D.D.92%, M.W.4kDa chitosan
D.D.; Degree of deacetylation(%), M.W.; Molecular weight.

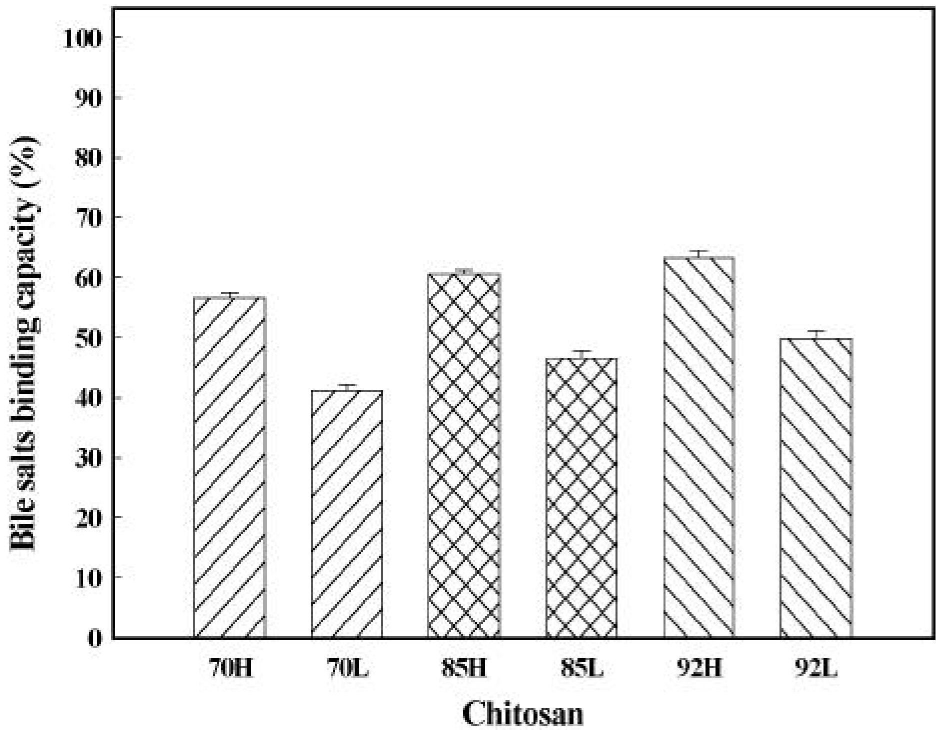

Fig. 11. Binding capacity of chitosan to bile salts.

70H;D.D.70%, M.W.28kDa chitosan, 70L;D.D.70%, M.W.4kDa chitosan
85H;D.D.85%, M.W.26kDa chitosan, 85L;D.D.85%, M.W.4kDa chitosan
92H;D.D.92%, M.W.24kDa chitosan, 92L;D.D.92%, M.W.4kDa chitosan
D.D.; Degree of deacetylation(%), M.W.; Molecular weight.

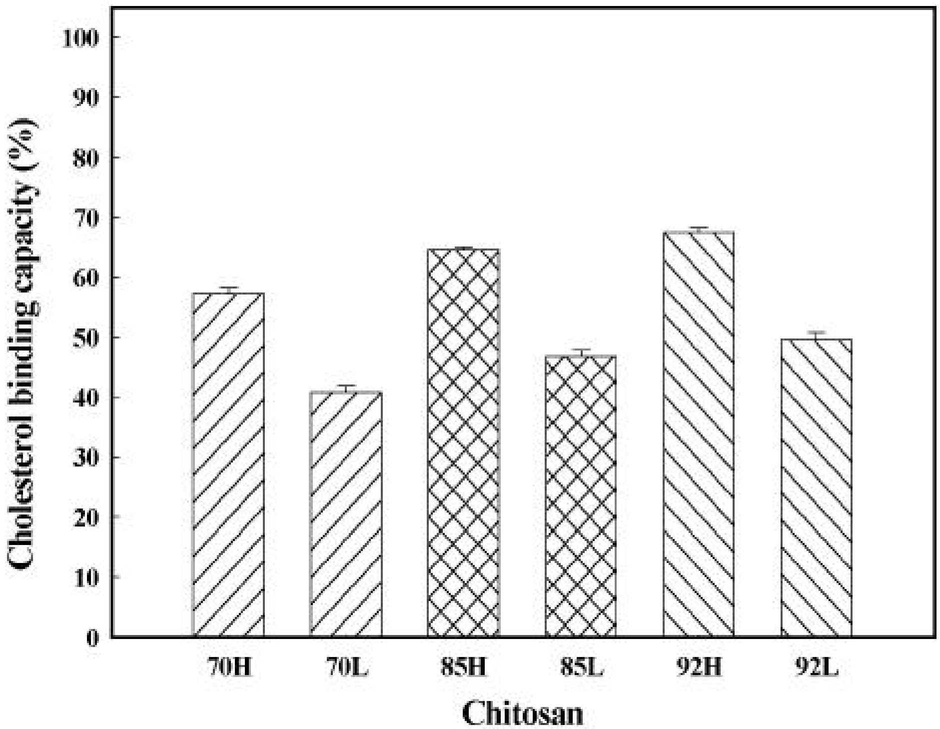

Fig. 12. Binding capacity of chitosan to cholesterol.

70H;D.D.70%, M.W.28kDa chitosan, 70L;D.D.70%, M.W.4kDa chitosan
85H;D.D.85%, M.W.26kDa chitosan, 85L;D.D.85%, M.W.4kDa chitosan
92H;D.D.92%, M.W.24kDa chitosan, 92L;D.D.92%, M.W.4kDa chitosan
D.D.; Degree of deacetylation(%), M.W.; Molecular weight.

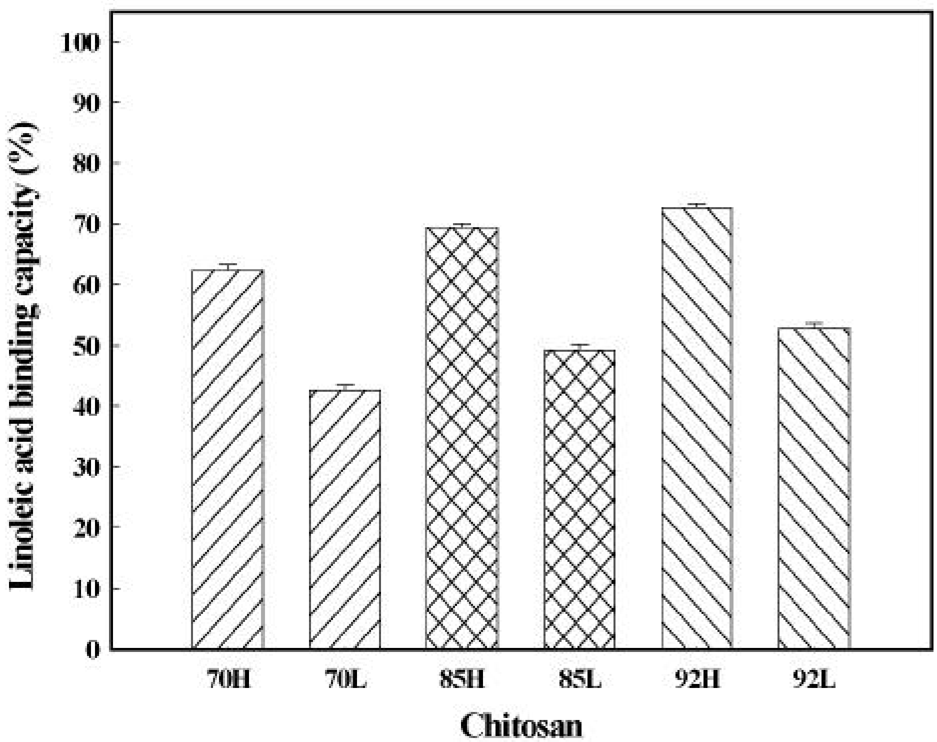

Fig. 13. Binding capacity of chitosan to linoleic acid.

70H;D.D.70%, M.W.28kDa chitosan, 70L;D.D.70%, M.W.4kDa chitosan
85H;D.D.85%, M.W.26kDa chitosan, 85L;D.D.85%, M.W.4kDa chitosan
92H;D.D.92%, M.W.24kDa chitosan, 92L;D.D.92%, M.W.4kDa chitosan
D.D.; Degree of deacetylation(%), M.W.; Molecular weight.

탈아세틸화도에 따른 bile salts, cholesterol, linoleic acid 흡착력은 D.D. 70% chitosan이 각각 41.2 56.6%, 40.8 57.2%, 42.6 62.4%이었고, D.D. 85% chitosan은 46.2 60.6%, 46.8 64.6%, 49.2 69.4%이었으며, D.D. 92% chitosan은 49.8 63.3%, 49.6 67.4%, 52.8 72.6%이었다. 상대적으로 분자량이 크고, 탈아세틸화도가 높은 chitosan 분말의 지방질 흡착력이 높게 나타났으며, 세 종류의 지방질 중 linoleic acid에 대한 chitosan의 흡착력이 42.6 72.6%로 가장 높게 나타났다.

식이섬유의 bile acids와 지방산에 대한 흡착은 혈청 cholesterol 저하효과 등 생리적으로 중요한 의미를 지니며 이에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다. 특히 Ebihara 등(1981)과 Eastwood 등(1968)은 bile acid와 식이섬유와의 결합은 hydrophobic bond에 의한 이온결합이 관여한다고 보고하였고, Herman 등(1974)은 소장 내에서 식이섬유는 선택적 이온교환반응을 통하여 bile acid를 흡착하고, 이를 체외로 배설시킴으로서 bile acid의 체내 이용성(bioavailability)을 떨어뜨린다고 하였다. Vahouny 등(1981)에 의하면 cholestyramine을 비롯한 guar gum, alfafa, lignin등의 식이섬유와 palmitic acid, oleic acid, linoleic acid 및 monolein과의 결합정도를 비교해 본 결과 지방산의 길이 또는 불포화도에 따른 어떤 경향은 찾을 수 없었고, 지방산 중에서 linoleic acid와의 결합력이 가장 크게 나타났고, monolein과의 결합력이 가장 낮았다고 보고하였다.

5. pH 변화에 따른 chitosan의 지방질 흡착특성

소화관의 pH 변화에 따른 chitosan의 물리화학적 특성변화를 Fig. 14에 나타내었다. 위에서는 pH 2 부근의 위산에 의해 chitosan은 용해되고, 이 chitosan 산용액은 주위의 기름방울 표면을 둘러싼 후 장으로 이동하게 된다. 분비되는 소화효소에 의해 소장 내의 pH는 7.4 이상으로 증가하게 되고, 이로 인하여

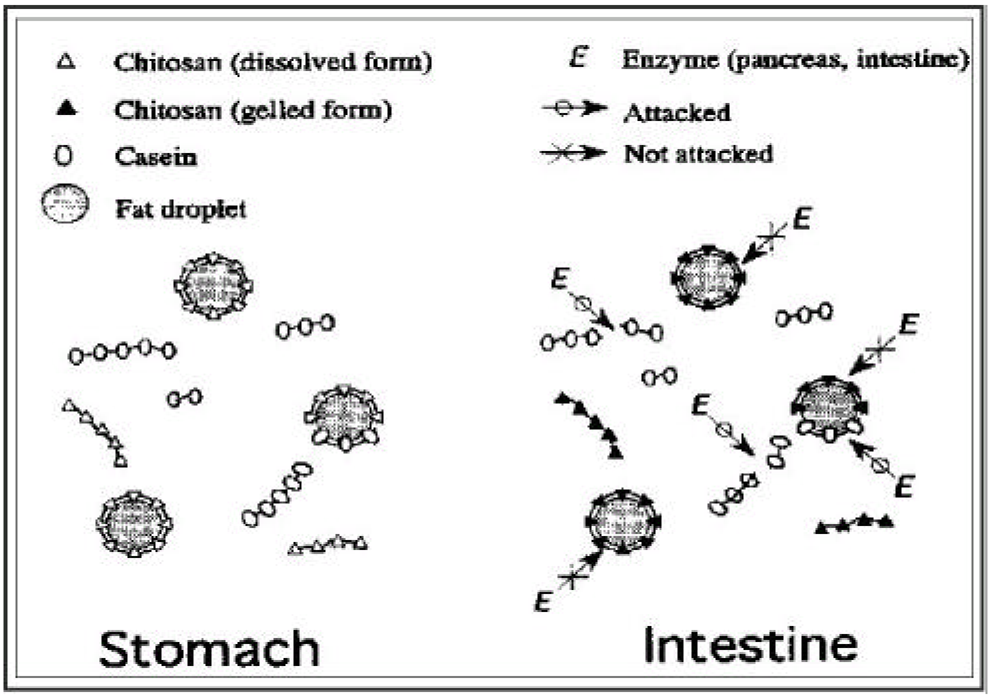

Fig. 14. Schematic illustration for the inhibition of fat digestion by chitosan.

chitosan과 기름 혼합물은 pH 변화에 의해 응집을 일으키며, 침전하게 된다.

소화기관의 pH 변화에 따른 chitosan의 물성 변화가 체내 지방질 흡착의 주된 요인으로 생각되어지고 있고, 이런 이론적인 chitosan의 지방질 흡착 원리를 규명하기 위해 온도와 pH를 소장의 조건으로 조절하고, bile satls와 각각의 micelle을 만들어 cholesterol과 linoleic acid에 대한 흡착력을 *in vitro* test로 조사하였다.

Bile salts와 cholesterol을 혼합한 micelle의 흡착능을 Table 5에 나타내었다. pH 조절 chitosan의 bile salts와 cholesterol에 대한 흡착력은 M.W. 24kDa chitosan이 각각 84.8 92.0%, 63.6 74.4%이었고, M.W. 4kDa chitosan이 각각 69.6 77.9%, 47.8 56.8%이었다. pH 조절 chitosan의 탈아세틸화도에 따른 bile salts와 choelsterol 흡착력은 D.D. 70% chitosan이 각각 69.6 84.8%, 47.8 63.6%이었고, D.D. 85% chitosan이 각각 73.6 89.8%, 54.0 71.4%이었으며, D.D. 92% chitosan이 각각 77.9 92.0%, 56.8 74.4%이었다. Eastwood 등(1968)은 cholesterol 대사에서 지방질의 소화 및 흡수를 위해서 지방질은 bile acid와 micelle을 형성해야만 하며, 소장 내에서 micelle 내의 bile acid가 식이섬유소와 흡착하면 micelle의 안정성 저하로 인하여 micelle의 분리가 일어나고, 지방질의 용해도에 영향을 주어 체외 배설 효과를 가진다고 하였다.

Bile salts와 linoleic acid를 혼합한 micelle의 흡착능을 Table 6에 나타내었다. pH 조절 chitosan의 bile salts와 linoleic acid에 대한 흡착력은 M.W. 24kDa chitosan이 각각 82.3 88.0%, 74.1 87.0%이었고, Mw 4kDa chitosan이 각각 66.1 74.5%, 52.4 63.8%이었다. pH 조절 chitosan의 bile salts와 linoleic acid에 대한 흡착력은 D.D. 70% chitosan이 각각 66.1 82.3%, 52.4 74.1%이었고, D.D. 85% chitosan이 각각 71.4 85.5%, 59.8 84.8%이었으며, D.D. 92% chitosan이 각각 74.5 88.0%, 63.8 87.0%이었다. Bile salts 뿐만

Table 5. Binding capacity of chitosan to bile salts and cholesterol in bile salts-cholesterol mixed micelle

Chitosan[a]	Bile salts binding capacity (%)	Cholesterol binding capacity (%)
70H	84.8 ± 0.9	63.6 ± 1.4
70L	69.6 ± 1.1	47.8 ± 1.1
85H	89.8 ± 0.6	71.4 ± 0.5
85L	73.6 ± 1.0	54.0 ± 0.9
92H	92.0 ± 0.8	74.4 ± 0.8
92L	77.9 ± 0.9	56.8 ± 0.7

[a] 70H;D.D.70%, M.W.28kDa chitosan, 70L;D.D.70%, M.W.4kDa chitosan
85H;D.D.85%, M.W.26kDa chitosan, 85L;D.D.85%, M.W.4kDa chitosan
92H;D.D.92%, M.W.24kDa chitosan, 92L;D.D.92%, M.W.4kDa chitosan
D.D.; Degree of deacetylation(%), M.W.; Molecular weight.

Table 6. Binding capacity of chitosan to bile salts and linoleic acid in bile salts-linoleic acid mixed micelle

Chitosan[a]	Bile salts binding capacity (%)	Linoleic acid binding capacity (%)
70H	82.3 ± 1.0	74.1 ± 1.3
70L	66.1 ± 1.1	52.4 ± 0.9
85H	85.5 ± 0.7	84.8 ± 1.1
85L	71.4 ± 0.9	59.8 ± 0.7
92H	88.0 ± 0.6	87.0 ± 1.0
92L	74.5 ± 1.0	63.8 ± 0.6

[a] 70H;D.D.70%, M.W.28kDa chitosan, 70L;D.D.70%, M.W.4kDa chitosan
85H;D.D.85%, M.W.26kDa chitosan, 85L;D.D.85%, M.W.4kDa chitosan
92H;D.D.92%, M.W.24kDa chitosan, 92L;D.D.92%, M.W.4kDa chitosan
D.D.; Degree of deacetylation(%), M.W.; Molecular weight.

아니라 cholesterol과 linoleic acid 모두 chitosan의 분자량이 상대적으로 크고, 탈아틸화도가 높을수록 지방질에 대한 흡착력이 높게 나타났다. Sugano 등 (1978, 1980)과 Nagyvary 등(1979)의 동물실험 결과 chitosan은 혈청 cholesterol과 지방질 수치를 저하시키는 효과가 있다고 하였고, 특히 식물성 섬유인 pectin보다도 그 효과가 뛰어났으며, 림프에서 지방질의 체내 흡수를 저해하는 효과를 가진다고 보고하였다. 또한 chitosan은 장내에서 cholesterol이 coprostanol로 전환되는 것을 감소시키고, 중성 sterol의 배설을 증가시킨다고 하였다.

Bile salts와 cholesterol에 대한 chitosan 분말의 흡착력은 각각 41.2 63.3%, 40.8 67.4%이었고, pH 조절 후에는 69.6 92.0%, 47.8 74.4%이었다. 또 bile salts와 linoleic acid에 대한 chitosan 분말의 흡착력은 각각 41.2 63.3%, 42.3 72.6%이었으며, pH 조절 후에는 66.1 88.0%, 52.4 87.0%로 지방질 micelle 중에서 bile salts에 대한 pH 조절 chitosan의 흡착력이 가장 높게 나타났다. 또 chitosan 용액의 pH를 소장의 조건으로 하고 bile salts와 혼합하여 micelle을 형성하였을 때 chitosan의 지방질 흡착력이 증가하는 경향을 보였다.

Razdan 등(1994)과 Fukada 등(1991)은 chitosan은 산성인 위에서 수화되고 부분적으로 이온화되어 polyglucosamine chaine으로 molecular solution을 형성한다고 하였다. 이 polyglucosamine chain의 polyelectrolyte cation은 지방질의 음이온을 둘러싸서 흡수를 방해함으로서 hypocholesterolemic effect를 나타낸다고 보고하였으며, 이러한 작용에 의해 혈청 콜레스테롤이 낮아진다고 하였다. 이런 이론적인 chitosan의 지방흡착 메카니즘을 규명하기 위하여 본 실험에서는 chitosan의 지방 흡착조건을 달리한 *in vitro* tests로 비교실험 하였고, 그 결과 소화관에서의 pH 변화가 chitosan의 지방질 흡착 특성에 큰 영향을 끼친다는 것을 알 수 있었다.

6. 흡착조건에 따른 chitosan의 지방질 흡착특성

Chitosan의 특성 및 지방질 종류에 따른 흡착특성을 조사하기 위하여 흡착실험 후 흡착력이 가장 높았던 M.W. 24kDa, D.D. 92% chitosan의 지방질 흡착 결과를 Fig. 15에 나타내었다.

Chitosan 분말과 pH 조절 chitosan의 cholesterol 흡착력은 각각 67.4%, 74.4%이었고, linoleic acid의 흡착력은 각각 72.6%, 87.0%로 chitosan 분말의 경우 linoleic acid에 대한 흡착력이 가장 높게 나타났다. Bile salts의 경우 chitosan 분말의 흡착력은 63.3%이었고, cholesterol과 혼합한 micelle의 흡착력은 92.0%이었으며, linoleic acid와 혼합한 micelle의 흡착력은 88.0%로 pH를 소장의 조건으로 조절한 후 cholesterol과 micelle을 형성한 bile salts의 흡착력이 다른 micelle에 비해 높게 나타났다. Chitosan 용액의 pH를 소장의 조건으로 조절하고, bile salts와 지방질을 혼합하여 micelle을 만든 경우 chitosan 분말에 비해 높은 지방질 흡착력을 나타내었고, 흡착조건을 달리한 비교실험을 통하여 chitosan의 지방질 흡착력에 영향을 끼치는 주된 요인이 소화관 내의 pH 변화라는 것을 알 수 있었다.

7. Chitosan의 지방흡착 기구

Chitosan의 지방결합 특성을 근적외선 스펙트럼으로 분석한 결과(Fig. 16), 지방질 흡착에 따른 chitosan의 amide기(NH_3^+) 감소가 나타났고, 이 스펙트럼을 2차 미분한 결과(Fig. 17)를 통해 chitosan의 지방흡착에 따른 amide기(NH_3^+)의 변화를 좀 더 명확히 확인할 수 있었다. 지방흡착 chitosan의 근적외선 스펙트럼 분석결과를 토대로 chitosan의 지방질 흡착은 chitosan의 amide기(NH_3^+)와 지방의 carboxyl기(-COOH)사이의 정전기적 결합에 의해 이루어짐을 예측할 수 있었다.

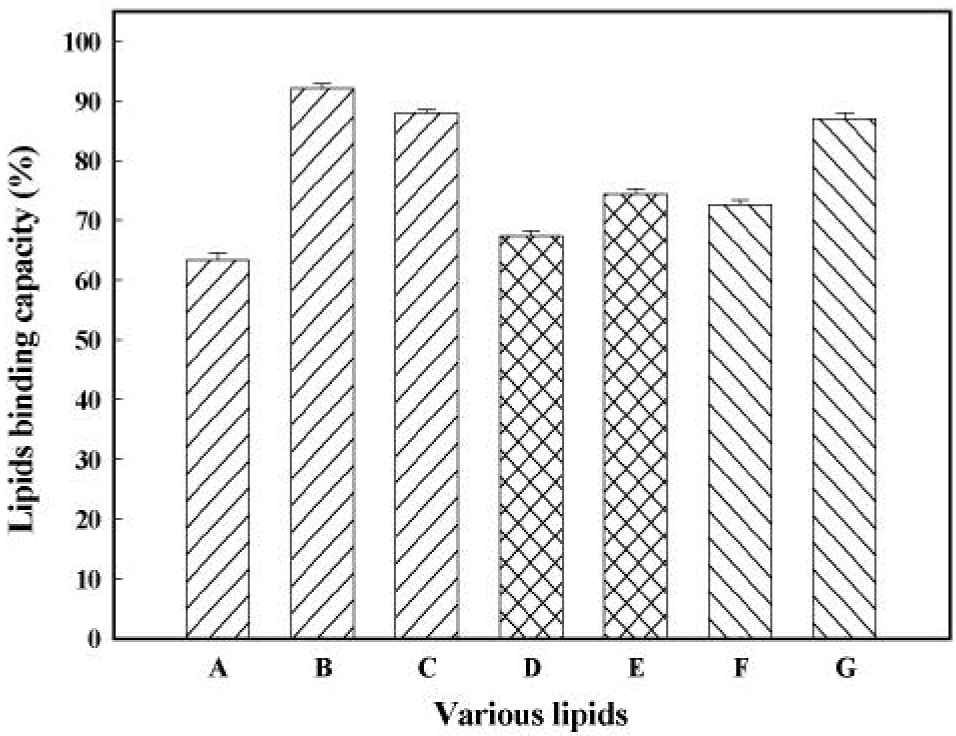

Fig. 15. Lipids binding capacity of chitosan[a].

A ; bile salts binding capacity (%)

B ; bile salts binding capacity (%) in bile satls-cholesterol mixed micelle

C; bile satls binding capacity (%) in bile salts-linoleic acid mixed micelle

D ; cholesterol binding capacity (%)

E ; cholesterol binding capacity (%) in bile satls-cholesterol mixed micelle

F ; linoleic acid binding capacity (%)

G; linoleic acid binding capacity (%) in bile satls-linoleic acid mixed micelle

[a] Chitosan : D.D.92%, M.W.24kDa.

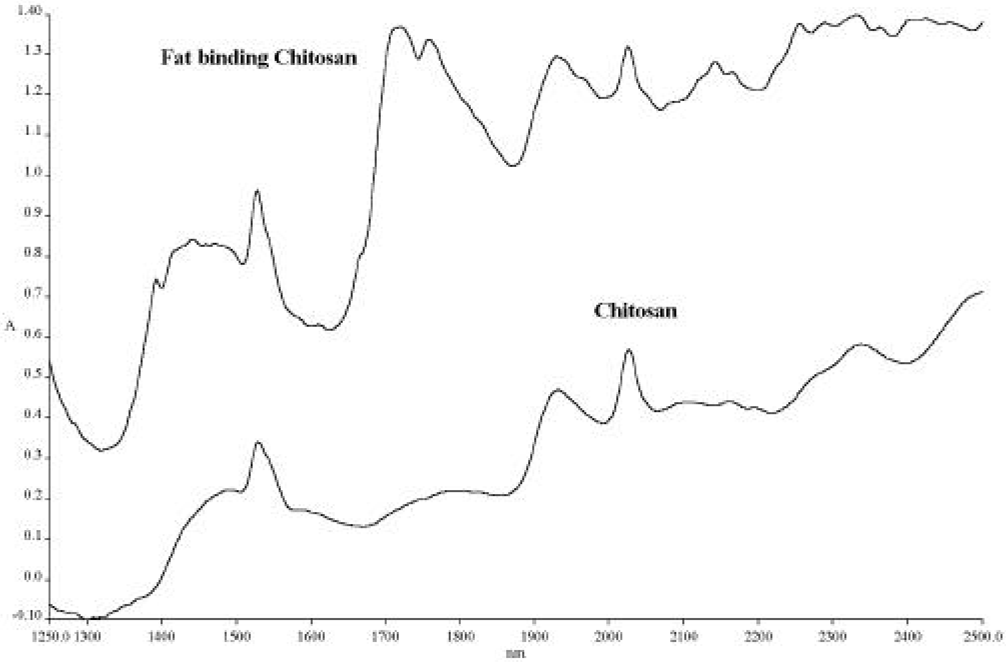

Fig. 16. Near infrared spectrum of chitosan and fat binding chitosan.

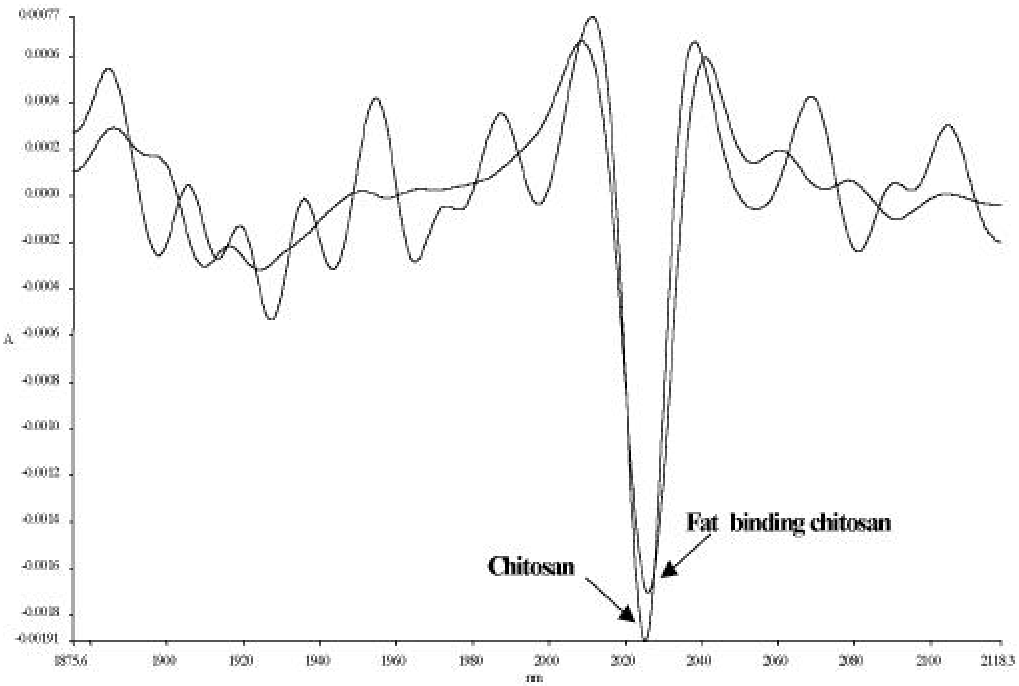

Fig. 17. Second derivative near infrared spectrum of chitosan and fat binding chitosan.

Chitosan의 분자량에 따른 지방흡착 특성을 조사하기 위해서 탈아세틸화도는 같고, 분자량을 달리한 지방흡착 chitosan의 근적외선 스펙트럼(Fig. 18) peak를 비교해본 결과, M.W. 24kDa 이상인 고분자 chitosan이 M.W. 4kDa 이하인 저분자 chitosan에 비해 상대적으로 높은 지방의 peak가 나타남을 확인할 수 있었다. Chitosan의 지방질 흡착능에 대해 *in vitro* 실험한 결과와 근적외선 분광분석 한 결과를 비교하여 Table 7에 나타내었다. *In vitro* 실험으로 chitosan의 지방 흡착력을 측정한 결과, M.W. 24kDa chitosan과 M.W. 4kDa chitosan의 지방 흡착력은 각각 659.3%, 338.8%로 분자량이 상대적으로 높은 M.W. 24kDa chitosan의 지방 흡착력이 두 배정도 높게 나타났다. 근적외선 스펙트럼의 지질 흡수 peak 면적을 계산해 본 결과, M.W. 24kDa chitosan과 M.W. 4kDa chitosan이 각각 17.7, 12.8로 나타났고, 이 결과는 *in vitro* 실험한 결과와 같은 경향을 나타내었다.

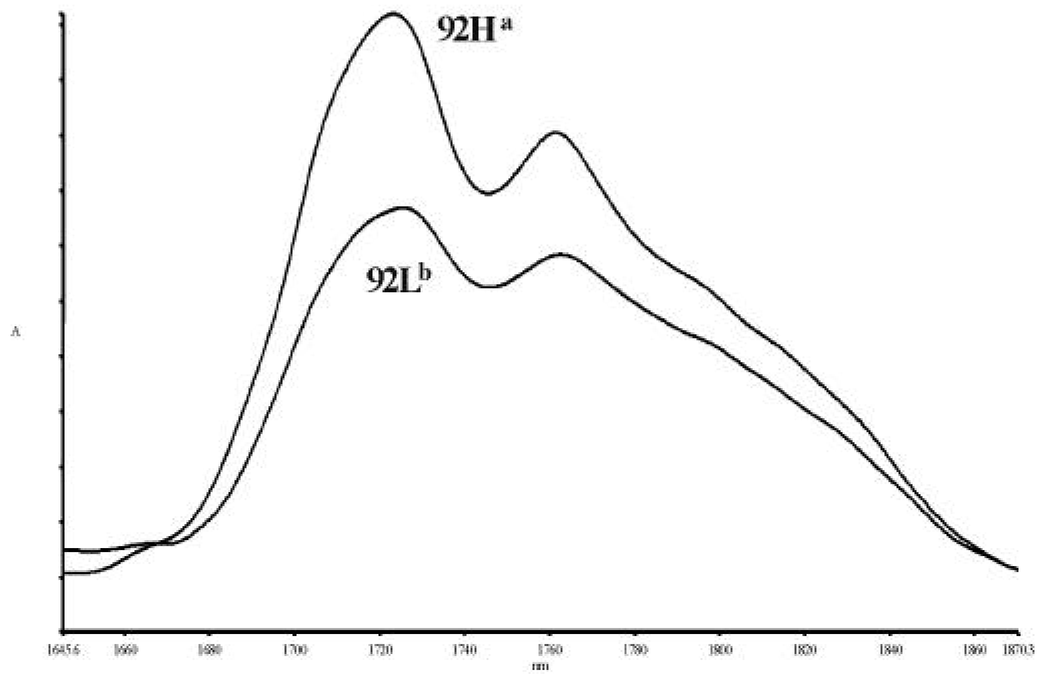

Fig. 18. Near infrared spectrum of fat binding chitosan.

[a] **92H; D.D. 92(%), M.W. 24kDa**

[b] **92L; D.D. 92(%), M.W. 4kDa.**

Table 7. Differences between fat binding capacity and corrected area by near infrared analysis

Chitosan	Fat binding capacity (%)	Corrected area by NIR analysis
92H[a]	659.3±6.8	17.7
92L[b]	338.8±8.5	12.8

[a]92H; D.D. 92(%), M.W. 24kDa

[b]92L; D.D. 92(%), M.W. 4kDa.

결론 및 요약

Chitosan의 지방질 흡착특성에 관한 연구를 하기 위하여 인체의 소화기관과 같은 환경조건을 갖춘 model system에서 chitosan의 종류와 지방질 종류를 달리하여 chitosan의 지방질 흡착기구를 규명하고자 하였고, 그 결과를 요약하면 아래와 같다.

1. Chitosan의 제조공정 중 가열시간을 조절하여 탈아세틸화도가 70%, 85%, 92%인 chitosan을 제조하였고, 이 chitosan의 분자량은 24kDa이상이었다. 각각의 chitosan을 lipase로 가수분해하여 분자량이 4kDa이하인 chitosan을 제조하였다.

2. Chitosan 분말의 소화관내 기능적 특성인 bulk density 및 수분과 지방에 대한 흡착력을 측정한 결과, 각각 96.2 504.0mg/mL, 374.4 1217.9%, 307.0 659.3%이었다. Chitosan의 탈아세틸화도가 높을수록 bulk density 및 수분과 지방에 대한 흡착력은 높게 나타났고, chitosan의 분자량이 증가할수록 bulk density는 감소하였으며, 보수력과 지방 흡착력은 증가하였다.

3. Chitosan 분말의 bile salts, cholesterol, linoleic acid에 대한 흡착력은 각각 41.2 63.3%, 40.8 67.4%, 42.6 72.6%로 세 종류의 지방질 중 linoleic acid에 대한 흡착력이 가장 높게 나타났다. Chitosan의 분자량이 상대적으로 크고, 탈아세틸화도가 높을수록 지방질에 대한 흡착력이 높게 나타났고, 탈아세틸화도보다는 분자량이 chitosan의 지방질 흡착력에 더 큰 영향을 끼쳤다.

4. Chitosan 용액의 pH를 소장의 조건으로 조절하고 bile salts와 지방질을 혼합하여 micelle을 형성하였을 때 cholesterol과 linoleic acid에 대한 chitosan의 흡착력은 각각 47.8 74.4%, 52.4 87.0%로 나타났다. 또 bile salts에 대한 chitosan의 흡착력은 cholesterol과 혼합한 micelle에서는 69.6 92.0%이었고, linoleic acid와 혼합한 micelle에서는 66.1 88.0%로 다른 지방질에 비해 bile salts에 대한 흡착력이 높게 나타났다.

5. 흡착조건을 달리하여 chitosan(M.W. 24kDa, D.D. 92%)의 지방질 흡착력을 조사해 본 결과, chitosan 분말의 경우 linoleic acid에 대한 흡착력이 72.6%로 가장 높게 나타났고, pH 조절 chitosan의 경우 cholesterol과 micelle을 형성한 bile salts에 대한 흡착력이 92.0%로 다른 지방질 micelle에 비해 높은 흡착력을 나타내었다. 또 chitosan 용액의 pH를 소장의 조건으로 조절하였을 때 chitosan의 지방질 흡착력이 증가하였고, 흡착조건을 달리한 비교실험을 통해 소화관 내의 pH 변화가 chitosan의 지방질 흡착력에 있어서 중요한 요인이라는 것을 알 수 있었다.

6. Chitosan의 지방결합능력을 near infrared spectrum으로 구조적 분석한 결과, chitosan의 지방질 흡착은 chitosan의 amide기(NH_3^+)와 지방의 carboxyl기(-COOH)사이의 정전기적 결합에 의해 이루어짐을 예측할 수 있었다.

감사의 말씀

본 연구가 이루어지기까지 학문의 길로 인도하여 주시고 시종 인내와 사랑으로 지도하여 주신 이근태 교수님께 먼저 깊은 존경과 감사를 표합니다.

부족한 논문을 정성껏 다듬어 주신 이양봉 교수님, 전병수 교수님께 진심으로 감사드리고, 평소 학문의 길을 걸을 수 있도록 격려를 아끼지 않으신 본 학과 장동석 교수님, 조영제 교수님, 김선봉 교수님, 양지영 교수님, 안동현 교수님께도 감사드립니다.

그리고 무엇보다도 본 연구가 있기까지 많은 조언과 따뜻한 격려로 용기를 주신 공동실험실습관 박성민 선생님께 진심으로 감사드립니다.

또한 항상 힘들고 지칠 때 위로와 격려를 해주신 최현미 선생님께도 감사드리고, 화학공학 실험실에서 기쁠 때나 슬플 때나 같이 동고동락하면서 지내온 석사과정 송호수 선배님, 김경태 선배님과 학부생 장재희, 류하나, 김선미, 임근식, 백성윤 후배님께도 고마운 마음을 전하며, 그 동안 많은 도움을 주신 실험실 선후배님들께도 감사드립니다.

어렵고 힘든 고비마다 함께 걱정하며 용기를 준 친구들에게 고마움을 전하며, 어릴 때부터 사랑과 격려로 정신적 버팀목이 되어주신 하늘에 계신 외할머니께 진심으로 감사의 마음을 전합니다. 끝으로 부족한 딸을 위해 항상 기도하시며, 끊임없는 사랑과 인내로 뒷바라지 해 주신 아버님과 어머님께 이 작은 결실을 바칩니다.

참 고 문 헌

Akira, O. and M. Mitsutom. 1995. Emzymatic preparation of oligosaccharides from chitin and chitosan. Food and Food Ingredient of Japan, 164.

Akiyama, K., K. Kawazu and A. Kobayash. 1995. A novel method for chemo-enzymatic synthesis of elicitor-action chitosan oligomers and partially N-deacetylated chitin oligomers using N-acetylated chitotrioses as substrates in a lysozyme-catalyzed transglycosylation reactionsystem. Carbohydr. Res., 179, 151-160.

AOAC. 1990. Official Methods of Analysis, 15the ed. Association of Official Analytical Chemists. Arlington, 17, 868, 931, 932.

Austin, P.R., C.J. Brine and J.P. Zkakis. 1981. New facts of research. Science, 212, 749.

Austin, P.R. 1982. Lactose-rich animal feed formulations and method of feeding animals. U.S. Patent, 4, 320, 150.

Bae, Y.M. and I.C. Seong. 1996. Measurement of fat content in potatochips by near infrared spectroscopy. Korean J. Food Sci. Tech., 28, 916-921.

Bruce, A. and A. Schumann. 1991. Comparion of near infrared spectroscopy calibration methods for the prediction of protein, oil, and starch in maize grain. J. Agric. Food Chem., 39, 883-886.

Byun, H.G. 1992. Syntheses of the derivatives of chitin and chitosan and their physicochemical properties(in Korean). M.S. Thesis, Nat'l

Fisheries Univ. of Pusan, Korea.

Casio, I.G., R.A. Fisher and P.A. Carroad. 1982. Bioconversion of shellfish chitin waste:waste pretreatment, enzyme production, process design and economic analysis. J. Food Sci., 47, 901.

Chobert, J.M., M. Sitohy and J.R. Shitaker. 1987. Specific limited hydrolysis and phosphorylation of food proteins for improvement of fuctional and nutritional properties, JAOCS, 64, 1704-1711.

Dreher, M.L. 1987. Handbook of dietary fiber, Marcel Dekker, Inc., New York.

Eastwood, M.A. and D. Hamilton. 1968. Studies on the adsorption of bile salts to non-absorbed components of diet. Biochem. Biophys. Acta., 152, 165-173.

Eastwood, M. and L. Mowbray. 1976. The binding of the components of mixed micelle to dietary fibers. Am. J. Clin. Nutr., 29, 1461-1467.

Ebihara, K., R. Masuharea and S. Kiriyama. 1981. Soluble dietary fiber on plasma glucose and insulin responses in young man undergone glucose tolerance test. Mutr. Rep. Inter., 23, 577-583.

Fang, S.W., C.F. Li and Y.C. Shin. 1994. Antifungal activity of chitosan and its preservative effect on low-sugar candied *Kumguat*, J. Food Prot., 57, 136-140.

Filar, L.J. and M.G. Wirick. 1978. Bulk solution properties of chitosan. Proc. the 1st Inter. Conf. on Chitin and Chitosan, Ed. R.A.A. Muzzarelli and E. R. Pariser. MIT Sea Grant Program, Cambridge, Mass.

Frings, C.S. and R.T. Dumn. 1970. Am. J. Clin. Pathol., 53, 88.

Fukada, Y., K. Kimura and Y. Ayki. 1991. Effect of chitosan feeding on intestinal bile acid metabolism in rats. Lipids, 26, 395-399.

Hawk, P., B.L. Oser and W.H. Summerson. 1954. Practical Physiolosical Chemistry, McGRAW-HILL Book Co. 416.

Herman, J.B. and K.J. Fred. 1974. *In vitro* absorption of bile salts to food residues, salicyazosulfapyridine and hemicellulose. Gastroenternol, 67, 237-244.

Hirano, S., Y. Kondo and K. Fujii. 1985. Preparation of acetylated derivatives of modified chito-oligosaccharides by the developmerization of partially N-acetylated chitosan with nitrous acid, Carbohydr. Res., 163, 338-341.

Hirano, S. and T. Matsumura. 1987. N-Acyl derivatives of chitosan and their hydrolysis by chitinase. Carbohydr. Res., 165, 120.

Hirano, S. 1988. Production and application of chitin and chitosan. Proc. the 4th Inter. Confer. on Chitin and Chitosan held in Trondheim, Norway, 37.

Johns, W.H. and T. Bates. 1969. Quantification of the binding tendencies of cholestyramine I; Effect of structure and added electrolytes on the binding of unconjugated and conjugated bile salts anion, J. Pharm. Sci., 5, 179.

Kanazawa, A., T. Ikdeda and T. Endo. 1993. Polymeric phosphonium salts as a novel class of cationic biocides. IV. Synthesis and antibacterial activity of polymers with phosphonium salt in the main chain. J. Polym. Sci. Part A. Polym. Chem., 31, 3031.

Kim, S.K. 1992. Manufactureing techniques and development trends of chitin, chitosan and their derivates(in Korean), Food Industry, 106, 63-73.

Kim, J.H. 1994. Functional properties of microcrystalline chitin produced from crab shell under different preparation condition(in Korean). M.S. Thesis, Ewha Woman Univ., Korea.

Knorr, D. 1982. Fuctional properties of chitin and chitosan. J. Food Sci., 47, 593-595.

Knorr, D. 1984. Use of chitinous polymers in food:a challenge for food research and development. Food Technol., 38, 85-97.

Knorr, D. and A.G. Imeri. 1988. Effects of chitosan on yield and compositional data of carrot and apple juice. J. Food Sci., 53, 1707.

Knorr, D. 1991. Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management. Food Technol., 44, 114.

Kobayashi, T., S. Otsuka and Y. Yugari. 1979. Hypocholesterolemic effect of chitosan. Nutr. Rept. Int., 19, 327.

Lanza, E. 1983. Determination of moisture, protein, fat and calories in raw pork and beef by near infrared spectroscopy. J. Food Sci., 48, 471-474.

Latlief, S.J. and D. Knorr. 1983. Effect of chitin as coagulating aid on protein yield, composition and fuctionality of tomato seed protein concentrates. J. Food Sci., 48, 1587.

Lee, Y.C. 1997. Production of bioactive chitosan hydrolasate and its use for the development of fuctional foods(in Korean). Final report of good health R&D project, The ministry of health and welfare.

Lin, M.J.Y. and E.S. Humber. 1974. Certain fuctional properties of sunflower meal products, J. Food Sci., 39, 368-370.

McConnell, A.A., M.A. Eastwood and W.D. Mitchell. 1974. Physical characteristics of vegetable food stuffs that could influence bowel function, J. Sci. Food Agric., 25, 1457.

Muzzarelli, R.A.A. 1977. Chitin, Pergamon Press, Oxford, 164.

Nagyvary, J.J., J.D. Falk and M.L. Hill. 1979. Hypolipidemic activity of chitosan and other polysaccharides in rats. Nutr. Rept. Int., 20, 677.

Pantaleone, D., M. Yalpani and M. Scollar. 1991. Proc. the 5th Inter. Conf. on Chitin and Chitosan, 292.

Parrot, M.E. and B.E. Thrall. 1978. Funtional properties of various fibers: physical properties. J. Food Sci., 43, 759.

Razdan, A. and D. Pette. 1994. Effect of chitosan on nutrient digestibility and plasma lipid concentrations in broiler chickens. Br. J. Nutr., 72, 277-288.

Report of investigation into national nutrition. 1995. The ministry of health and welfare.

Roberts, G.A.F. and K.E. Taylor. 1988. The preparation and characterisation of chitin beads for use in chromatography. Proc. of the 1st Inter. Confer. on Chitin and Chitosan, 577-588.

Sannan, T., K. Kurita and K. Ogura. 1978. Studies on chitin : 7. IR spectroscopic determination of degree of deacetylation. Polymer, 19, 458-459.

Sanford, P.A. 1988. Chitosan, commercial uses and potential applications, Proc. the 4th Inter. Conf. on Chitin and Chitosan held in Trondheim, Norwey, 51-69.

Seligson, B. 1968. Standard Method of Clinical Chemistry, Academic Press, New York.

Shin, S.S. 1997. The production of water soluble chitosan hydrolysate by enzymes. M.S. Thesis, Chung Ang Univ., Korea.

Sugano, M., T. Fujikawa and Y. Hasegawa. 1978. Hypercholesterolemic effects of chitosan in cholesterol-fed rats. Nutr. Rep. Int., 18. 531.

Sugano, M., T. Fujikawa and Y. Hiratsuji. 1980. A novel use of chitosan as a hypocholesterolemic agent in rats. Am. J. Clin. Nutr., 33, 787-793.

Sugano, M., T. Fujikawa and Y. Hiratsuji. 1985. Preparation of acetylated derivatives of modified chito-ologosaccahrides by the depolymerization of partially N-acetylated chitosan with nitrous acid, Carbohydr. Res., 163, 338-341.

Tombes, R., M.M. Cassidy and I.J. Gallo. 1980. Binding of bile salts, phospholipids and cholesterol from mixed micelles by bile acid sequestrans and dietary fibers, Lipids, 15, 1012-1018.

Vahouny, G.V., R. Tombes and M. Cassidy. 1980. Diatary fibers V; Binding of fatty acid and phospholipid and cholesterol from mixed micelles containing bile salts and lecithin, Lipid, 15, 1012.

Vahouny, G.V., R. Tombes and M.M. Cassidy. 1981. Diatary fibers VI; Binding of fatty acid and monolein from mixed micelles containing bile salts and lecithin, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 166, 12.

Vahouny, G.V., S. Satchihanandam and M.M. Cassidy. 1983. Comparative effects of chitosan and cholestyramine on lymphatic absorption of lipids in the rat. Am. J. Clin. Nutr., 38, 278.

Weiner, M.I. 1992. An overview of the regulation status and of the safety of chitin and chitosan as food and pharmaceutial ingridients. Advances in chitin and chitosan, Elsevier Applied Science, London, 663-670.