

理學碩士 學位論文

부분적으로 탈아세틸화된 키토산
올리고당의 자유라디칼 소거능 특성

指導教授 金 世 權

이 論文을 理學碩士 學位論文으로 提出함



釜慶大學校 大學院

化 學 科

諸 在 榮

諸 在 榮의 理學碩士 學位論文을 認准함

2001年 12月 26日

主 審 醫學博士 文 聖 勳



委 員 理學博士 沈 鉉 琯



委 員 工學博士 金 世 權



목 차

ABSTRACT	1
서 론	3
재료 및 방법	8
1. 재료	8
2. 방법	8
2-1. 탈아세틸 키토산의 제조	8
2-2. 키토산 올리고당의 제조	9
2-3. 환원력 측정	9
2-4. Radical scavenging activity(RSA) 측정	10
2-4-1 DPPH 방법	10
2-4-2 농도별 RSA 측정	10
2-4-3 시간별 RSA 측정	11
2-4-4 EC ₅₀ 값의 측정	11
2-5. Hydroxyl radical scavenging activity 측정	11
2-6. Superoxide radical scavenging activity 측정	12
결과 및 고찰	13
1. 탈아세틸화도 측정	13
2. 탈아세틸 키토산 올리고당의 제조	13
3. 탈아세틸 키토산 올리고당의 환원력	13
4. Radical scavenging activity(RSA)	18

4-1 탈아세틸화된 COS의 분자량 크기별 DPPH 소거능	18
4-2 농도에 따른 DPPH 소거능	18
4-3 시간에 따른 DPPH 소거능	26
5. Hydroxyl radical scavenging acitivity	30
6. Superoxide anion radical scavenging activity	39
요 약	45
참고문헌	47
감사의 글	52

Free Radical Scavenging Properties of Partially Deacetylated Chitosan Oligosaccharides

Jae-Young Je

*Department of Chemistry, Graduate School,
Pukyong National University*

ABSTRACT

In spite of various bioactivities of chitosan, its effects *in vivo* were still ambiguous due to low uptake rate by organism. Therefore, converting chitosan to oligosaccharides, which are having better absorption rate, is necessary for an efficient utilization *in vivo*.

In this study, we have produced partially deacetylated chitosan oligosaccharides (COSs) and have investigated the free radical scavenging activities by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and the electron spin resonance (ESR) spin-trapping technique.

Deacetylation chitosan (degree of deacetylation : 90%, 75%, 50%) were hydrolyzed by enzymatic hydrolysis, and the hydrolysates were separated into three major types, COS I, COS II and COS III, according to their relative molecular weights, 10kDa, 5kDa and 1kDa respectively as determined by

MWCO(molecular weight cut-off) of ultrafiltration membrane. Effect of 90% deacetylated COS II on DPPH radical scavenging was stronger than that of 90% deacetylated COS I or III. The 75% deacetylated COS II and 50% deacetylated COS III were stronger than that of 75% deacetylated COS I or III, that of 50% deacetylated COS I or II.

In hydroxyl radical scavenging activities of deacetylated COSs using the Fenton reaction in the presence of H_2O_2 and Fe^{2+} by ESR. ESR results showed that among the 90% deacetylated COSs, deacetylated COS II was higher signal intensity reduction than that of the others. The 75% deacetylated COS III and 50% deacetylated COS II were higher scavenging effect than that of the other deacetylated COSs.

In superoxide anion radical scavenging activities of deacetylated COSs using hypoxanthine-xanthine oxidase reaction by ESR. ESR resulted showed that 90% deacetylated COS II, 75% deacetylated COS III and 50% deacetylated COS I were higher signal intensity reduction than that of the other deacetylated COSs.

서 론

항산화제(antioxidant)란 산화를 억제하거나 지연시키는 물질을 말하며 (Halliwell 등, 1989), 이에 대한 것은 1940년대 자동산화(autooxidation)에 대한 연구가 이루어진 이래로 자동산화 방지와 인간의 노화억제라는 측면으로 연구가 진행되어 왔다. 이는 그 기능상 자동산화의 연쇄반응을 제어하는 자유라디칼 소거제(free radical scavenger), 과산화물을 비라디칼로 분해하여 불활성시키는 과산화물 분해제(peroxide decomposer), 미량금속의 산화 촉진작용을 억제하기 위한 금속제거제(sequestrants), 자동산화에 있어서 라디칼 저해제와 공존시 항산화 작용을 증가시키는 상승제(synergist) 및 singlet oxygen quencher 등으로 분류된다. 또한, Davies(1986)는 세포계에서의 산화적인 방어기작을 primary defense system과 secondary defense system으로 나누었다. Primary defense는 지질과산화 반응의 과정에서 생성되는 자유라디칼(free radical) 형태의 지질을 보다 안정한 생성물로 변환시킴으로써 지질의 연속적인 산화를 방지하는 기작으로 chain-breaking antioxidant라고도 하며, α -tocopherol(vitamin E), ascorbic acid(vitamin C), β -carotene, uric acid와 항산화 효소인 superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT), glutathione peroxidase(GPx) 등이 여기에 속한다. 이와는 달리 secondary defense는 primary antioxidant defense를 벗어나 산화제나 자유라디칼 반응에 의해 손상을 입은 분자나 세포의 구성성분을 제거하기 위한 repair system으로 손상된 막의 인지질(phospholipid)을 수리하는데 관여하는 효소인 phospholipase A₂와 fatty acid transferase, 손상된 단백질을 분해시

키는 catalytic/multifunctional proteinase complex(Rivett, 1989) 및 산화적인 손상을 입은 DNA를 수리하는 DNA glycosylase와 DNA ligase(Halliwell와 Gutteridge, 1989) 등이 있다.

한편, 자유라디칼(free radical)과 superoxide anion($O_2^{\cdot -}$), hydroxyl radical ($\cdot OH$), nitrogen oxide($NO^{\cdot}$, $NO_2^{\cdot}$), lipid radicals($RO^{\cdot}$, $ROO^{\cdot}$, $R^{\cdot}$)와 같은 활성산소종(reactive oxygen species)은 매우 불안정하여 생체내의 다른 그룹 또는 물질과 즉시 반응하는데, 이것들은 암(Muramatsu 등, 1995), 동맥경화(Steinberg 등, 1989), 위궤양(Das 등, 1997), AIDS(Halliwell 등, 1999)와 다른 많은 질병들에 있어서 중요한 역할을 한다. 또한 자유라디칼(free radical)은 노화와도 밀접한 관련이 있다. Harman(1981)은 vitamin C, α -tocopherol, glutathione, cysteine 등의 항산화제가 발암방지, 면역력 증강 및 동맥경화 진행방지 등의 노화질환 예방효과를 나타낸다고 보고하였으며, Bender 등(1970)은 이들 항산화제들을 마우스에 투여하였을 때, 마우스의 평균수명이 10~20% 연장되는 효과가 있다고 보고하였다. 노화에 관련된 학설 중에서 산소 라디칼설이 많은 지지를 받고 있는데, 이는 끊임없이 생성되는 반응성이 강한 활성산소에 의하여 세포가 점진적으로 손상을 받고 이 같은 손상의 축적으로 세포에 기능저하가 초래된다는 것이다.

활성산소의 생성은 우리가 섭취한 산소가 호흡사슬을 거쳐 전달된 네 개의 전자를 받아 물로 되는 것과 ADP의 산화적 인산화에 따라 필연적으로 수반되며 그 결과 3~5%는 활성산소로 변한다. 다른 활성산소종은 마이크로솜, 광합성 전자전달계, 활동적인 식작용과 xanthine oxidase, tryptophan dioxygenase, diamine oxidase, prostaglandin synthase, guanyl cyclase와 glucose oxidase같은 몇몇 효소의 활성으로 인해 여러 가지 활성산소종이나 그 중간체를 생성한다(Winsten 등, 1997). 이처럼 자유라디칼 및 활성산소종이 생체내 많은 질병에 관

여를 하기 때문에 최근 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

키틴·키토산은 천연에 존재하는 다당류로서 최근에 가장 주목을 받고 있는 신기능성 생물신소재이다. 키틴은 게, 새우 등의 갑각류 껍질, 연체류의 껍질과 근육에, 그리고 곤충류, 버섯류 및 사상균의 세포벽 등에 함유되어 있으며, 지구 상에서 연간 약 1000억톤 정도로 생산되고 있으며, 그 양은 셀룰로오스 다음으로 많다.

키토산은 키틴을 강알카리로 탈아세틸화함으로써 제조되며, 아세트산, 젖산 및 포름산과 같은 유기산 그리고 묽은 염산 및 질산 등과 같은 무기산에 용해된다. 키토산은 폴리양이온(polycation)의 성질을 갖고 있으며, 초기에는 주로 키토산의 강력한 흡착력을 이용한 폐수처리제나 중금속 흡착제(Gordon 등, 1983 ; Landes 와 Bough, 1976) 및 효소 고정화 담체나 크로마토그래피용 수지(Luong 등, 1987 Muzzarelli 등, 1976)와 같은 고분자 소재로서 널리 이용되어져 왔다. 그러나 최근 10년 전부터 키틴·키토산 및 그 유도체가 항균 작용(Sudarshan 등, 1992), 고혈압 조절 작용(Okuda 등, 1997) 및 콜레스테롤 저하 작용(Maezaki 등, 1993) 과 같은 기능성 식품으로서의 이용, 그리고 면역 활성의 부활 내지는 증강 작용에 의한 항암제로서의 이용 등(김 등, 1997 ; Nishimura 등, 1986 ; Suzuki 등, 1986 ; Tokoro 등, 1989) 여러 가지 생리 활성을 가지고 있다는 사실이 밝혀짐으로써 현재 생리기능성 신소재로서 연구개발이 활발히 진행되고 있다.

키토산의 생리활성 중 항암활성은 키토산의 체내 흡수가 매우 중요하기 때문에 고분자 다당류인 키토산보다는 키토산 올리고당의 형태가 매우 유용하게 작용한다. 키토산의 항암활성에 대해서는 일반적으로 키토산의 분자량이 수만 이상 일 때 효과적인 것으로 알려져 있다. 이럴 경우 분자량이 큰 다당류 형태의 키토산의 역할은 단지 식품 보존제에 지나지 않는다. 그러나 키토산 올리고당의 경우

비록 키토산 자체나 다소 고분자의 키토산 가수분해물보다 항균활성이 낮다고 하더라도 생체내 작용을 고려해 볼 때 흡수율이 높기 때문에 항생제로서의 이용할 수 있을 것이다.

최근에는 불용성인 키틴·키토산을 수용성 물질로 유도체를 합성하여 항산화 활성에 대한 연구가 활발하다. Xie 등(2001)은 수용성 키토산인 hydroxypropyl chitosan과 carboxymethyl chitosan 염을 만들어 활성산소종 중에서 가장 반응성이 큰 hydroxyl radical에 대한 소거능을 보고하였고, Xue 등(1998)은 *N,O*-carboxymethyl chitosan과 hydroxypropyl chitosan을 합성해서 항산화 활성을 보고하였고, 또 hexanoyl chitin과 *N*-benzoylhexanoyl chitosan을 합성해 지질과산화에 대한 영향도 보고하였다.

그러나 키틴·키토산의 강력한 생리활성에도 불구하고, 그들 자체의 높은 분자량과 높은 점성으로 인해 사람의 장에 흡수에 영향을 미친다. 대부분 동물의 장에는, 특히 사람의 소화효소에는 키토산의 β -glucosidic 결합을 분해할 수 있는 chitosanase 같은 효소를 가지고 있지 않아 *in vivo*에서 분해되지 않은 고분자 키토산은 흡수가 어려워 생리활성 발현이 여전히 많은 문제로 남아있다(Weiner, 1992).

그렇지만 키토산 올리고당도 키틴·키토산처럼 항암활성(Suzuki 등, 1986; Tsukada 등, 1990), 면역력 증강 효과(Tokoro 등, 1988), 쥐의 경우에 있어서 어떤 병원체의 감염에 대한 방어효과 향상(Yamada 등, 1993; Tokoro 등, 1989), 항곰팡이 활성(Hirano와 Nagao, 1989; Kendra 등, 1989), 항균활성(Hirano와 Nagao, 1989; Uchida 등, 1989; Jeon 등, 2001)등의 다양한 생리활성이 보고되고 있다.

그러나, 아직까지 키토산 올리고당의 탈아세틸화도에 따른 생리활성 연구가 미

흡함과 동시에 자유라디칼(free radical) scavenging 효과에 대한 연구도 이루어져있지 않다. 따라서, 본 연구에서는 탈아세틸화도가 다른 키토산을 가수분해하여 한외여과막을 이용하여 추출한 키토산 올리고당을 여러 가지 자유라디칼(free radical)의 소거 효과를 검토하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에서 사용된 키토산(탈아세틸화도 : 90%, 70%, 50%)은 경기도 평택에 소재한 (주)키토라이프에서 키토신을 구입하여 키토산으로 만들어 사용하였다. 키토산을 가수분해하기 위해 사용한 Chitosanase(694 unit (U)/g protein)는 *Bacillus pumilus* BN-262로부터 유래한 것으로 Wake Chemical Industrial, Ltd(Tyoko, Japan)에서 구입하였다. 키토산 올리고당을 생산하기 위해 사용한 한외여과막장치(Millipore Minitan™)는 Millipore Co.(Bedford, MA)에서 구입하여 사용하였다. 분자량별로 분획하기 위해 사용된 막의 한계범위는(molecular weight cut-off : MWCO)는 각각 10 kDa, 5 kDa, 1 kDa을 사용하였다. Hypoxanthine, xanthine oxidase, DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), spin trap reagent인 DMPO(5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO)에서 구입하여 사용하였다. 그밖에 다른 시약은 분석용 특급을 사용하였다.

2. 방법

2-1. 탈아세틸 키토산의 제조

탈아세틸 키토산의 제조는 키토신에 40% NaOH 용액을 넣고 110℃에서 다양한 시간별로 가열하여 제조하였다. 이렇게 해서 얻어진 탈아세틸 키토산의 확인은

Toei와 Kohara(1976)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 키토산 파우더 5g에 5% acetic acid를 가해 100ml로 만들고 2시간동안 교반한 다음, 이 용액 1ml에 증류수 30ml를 가하여 교반하고 지시약으로 0.1% Toluidine blue를 첨가하였다. 여기에 N/400 polyvinyl sulfate potassium solution(f=1.006)으로 적정하여 아래의 식을 이용하여 탈아세틸화도를 계산하였다.

$$\text{Degree of deacetylation(\%)} = \frac{\frac{X}{161}}{\frac{X}{161} + \frac{Y}{203}} \times 100$$

$$X = 1/400 \times 1/1000 \times f \times 161 \times V$$

$$Y = (0.5 \times 1/100) - X$$

$$V = \text{N/400 polyvinyl sulfate potassium solution의 적정치(ml)}$$

$$f = \text{N/400 polyvinyl sulfate potassium solution의 factor}$$

2-2. 키토산 올리고당의 제조

키토산 올리고당의 제조는 Jeon과 Kim(2000)의 방법에 준하여 제조하였다. 즉, 회분식 반응에서 부분적으로 탈아세틸화된 1% 키토산 용액(pH 5.5)과 chitosanase 5units를 첨가하여 45℃에서 키토산을 효소적 가수분해를 시킨 다음 가수분해된 키토산을 한외여과막장치를 이용하여 분자량 10~5 kDa, 5~1 kDa, 1 kDa이하의 키토산 올리고당으로 분획하였다. 분획된 키토산 올리고당은 동결 건조하여 본 실험에 사용하였다.

2-3. 환원력 측정

키토산 올리고당의 환원력 측정은 Oyaizu(1986)의 방법에 따라 시행하였다.

즉, 키토산 올리고당을 증류수 1ml에 녹이고 여기에 phosphate buffer (2.5ml, 0.2M, pH 6.6), potassium ferricyanide (2.5ml, 1%)를 넣어 섞고, 혼합물을 50℃에서 20분간 incubate 시켰다. 그 다음 trichloroacetic acid (TCA, 10%)를 2.5ml 첨가 후 혼합물을 원심분리(1,500×g, 10분)하였다. 원심분리가 끝나고 상층액 2.5ml를 취하여 여기에 증류수(2.5ml)와 FeCl₃ (0.5ml, 0.1%)를 넣은 후 700nm에서 흡광도를 측정하였다.

2-4. Radical scavenging activity(RSA) 측정

2-4-1 DPPH 방법

DPPH 방법은 Hatano 등(1988)의 방법에 준하여 시행하였다. 즉, 각각의 부분적으로 탈아세틸화된 키토산 올리고당을 분자량 크기별로 일정한 농도가 되게 증류수 1ml에 녹이고 여기에 MeOH 3ml와 1.5×10^{-4} M DPPH/MeOH 용액 1ml를 혼합한 다음 실온에서 30분간 방치한 후, 517nm에서 측정한 흡광도 값으로 다음 식을 이용하여 RSA 값을 구하였다. RSA 값은 3회 실시하여 평균하였다.

$$RSA(\%) = \frac{\text{Absorbance of control} - \text{Absorbance of sample}}{\text{Absorbance of control}} \times 100$$

2-4-2 농도별 RSA 측정

DPPH 방법으로 RSA를 측정한 후 각 탈아세틸화도에서 가장 활성이 좋은 분자량 크기별로 농도를 다르게 하여 RSA를 측정하였다. 즉, sample의 농도를 다르게 하여 증류수 1ml에 녹이고 여기에 MeOH 3ml와 1.5×10^{-4} M DPPH/MeOH 용액 1ml를 혼합한 다음 실온에서 30분간 방치한 후, 517nm에서 측정한 흡광도 값으로 RSA를 구하였다.

2-4-3 시간별 RSA 측정

DPPH 방법으로 RSA를 측정한 후 각 탈아세틸화도에서 가장 활성이 좋은 분자량 크기별로 농도를 다르게 하여 시간에 따라 측정하였다. 즉, sample의 농도를 다르게 하여 증류수 1ml에 녹이고 여기에 MeOH 3ml와 1.5×10^{-4} M DPPH/MeOH 용액 1ml를 혼합한 다음 실온에서 1분, 3분, 5분, 10분, 20분, 40분, 1시간, 2시간, 4시간 동안 방치한 후 517nm에서 측정한 흡광도 값으로 RSA를 구하였다.

2-4-4 EC₅₀ 값의 측정

부분적으로 탈아세틸화된 키토산 올리고당의 분자량 크기별로 활성이 가장 좋은 키토산 올리고당의 농도를 0.5~5mg/ml 농도로 되게 증류수 1ml에 녹이고 여기에 MeOH 3ml와 1.5×10^{-4} M DPPH/MeOH 용액 1ml를 혼합한 다음 실온에서 30분 방치한 후, 517nm에서 측정한 흡광도 값으로 RSA 값을 구하여 대조군에 대한 50% 흡광도 감소를 나타내는 검체의 농도(EC₅₀)로 표시하였다. EC₅₀ 값은 3회 실시하여 평균하였다.

2-5. Hydroxyl radical scavenging activity 측정

활성산소(oxygen radicals)중에서 가장 활성이 강한 하이드록시 라디칼(hydroxyl radical)은 Rosen 등(1984)의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 부분적으로 탈아세틸화된 키토산 올리고당을 분자량 크기별로 일정한 농도가 되게 0.2ml 증류수에 녹이고 여기에 0.3M 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide(DMPO) 0.2ml, 10mM FeSO₄를 0.2ml, 10mM H₂O₂/0.1M phosphate buffer(pH 7.4) 0.2ml 혼합한

다음 실온에서 2.5분 방치한 후에 quartz capillary tube에 옮겨 electron spin resonance(ESR) spectrometer로 측정하였다. 스펙트럼은 scan time : 200s, field : 3461.3 ± 50 G, time constant : 0.5s, power : 1mW, amplitude : 1×200 의 조건으로 기록하였다(Shi 등, 1991). 아래의 식을 이용하여 hydroxyl radical scavenging activity를 계산하였다.

Hydroxyl radical scavenging activity, % = $100 - (\text{ESR signal intensity for medium containing the additives of concern} / \text{ESR signal intensity for the control medium}) \times 100$.

2-6. Superoxide radical scavenging activity 측정

Superoxide radical은 Janzen 등(1986)의 방법에 의하여 hypoxanthine(HPX)-xanthine oxidase(XOD) system으로부터 만들어 시행하였다. 즉, 4mM HPX $50\mu\text{l}$, $30\mu\text{l}$ phosphate buffer saline(PBS), $50\mu\text{l}$ 부분적으로 탈아세틸화된 키토산 올리고당 용액, 4.5M DMPO $20\mu\text{l}$ 와 $50\mu\text{l}$ XOD(0.4u/ml)를 혼합한 후, 혼합한 용액을 quartz capillary tube에 옮긴 후 45s 후에 ESR로 측정하였다. 스펙트럼은 field : 337.1 ± 5 mT, power : 4mW, scan time : 2min, amplitude : 1×500 , time constant : 0.3s의 조건으로 기록하였다. 아래의 식을 이용하여 superoxide anion radical scavenging activity를 계산하였다.

Superoxide anion radical scavenging activity, % = $100 - (\text{ESR signal intensity for medium containing the additives of concern} / \text{ESR signal intensity for the control medium}) \times 100$.

결과 및 고찰

1. 탈아세틸화도 측정

키틴을 강알카리로 처리하여 탈아세틸 키토산을 만든 후 콜로이드 적정에 의하여 탈아세틸화도를 측정하였다. 40% NaOH를 넣고 4시간 50분을 가열하였을 때 탈아세틸화도는 $50 \pm 0.67\%$ 이고, 6시간 10분 가열하였을 때는 $75 \pm 0.82\%$, 7시간 가열하였을 때 탈아세틸화도는 $90 \pm 0.36\%$ 였다.

2. 탈아세틸 키토산 올리고당의 제조

탈아세틸 키토산 올리고당의 제조는 Jeon과 Kim(2000)의 방법에 준하여 실험하였다. 즉, 부분적으로 탈아세틸 키토산 100g을 9450ml 물에 넣은 다음, 여기에 1N lactic acid 550ml를 넣고 교반하여 1% 키토산 용액을 만들었다. 1% 키토산 용액에 chitosanase 5units을 넣고 pH 5.5, 45℃에서 3시간 반응시킨 다음, 한외여과막 장치를 이용하여 분자량 크기별로 분획하였다. 즉, MWCO 10,000~5,000 Da의 막에 의해서 분획된 키토산 올리고당은 COS I으로, MWCO 5,000~1,000 Da의 분획물은 COS II, 그리고 MWCO 1,000 Da에 모두 통과된 것은 COS III로 표시하였다.

3. 탈아세틸 키토산 올리고당의 환원력

탈아세틸화도가 다른 키토산을 효소로 분해하여 얻은 COSs의 환원력을 측정하기 위해서 각 COS를 100~5000 μ g을 1ml 증류수 녹인 다음 측정한 결과를 Fig. 1, 2, 3에 나타내었다. 환원력은 absorbance 700nm에서 측정하였고 흡광도

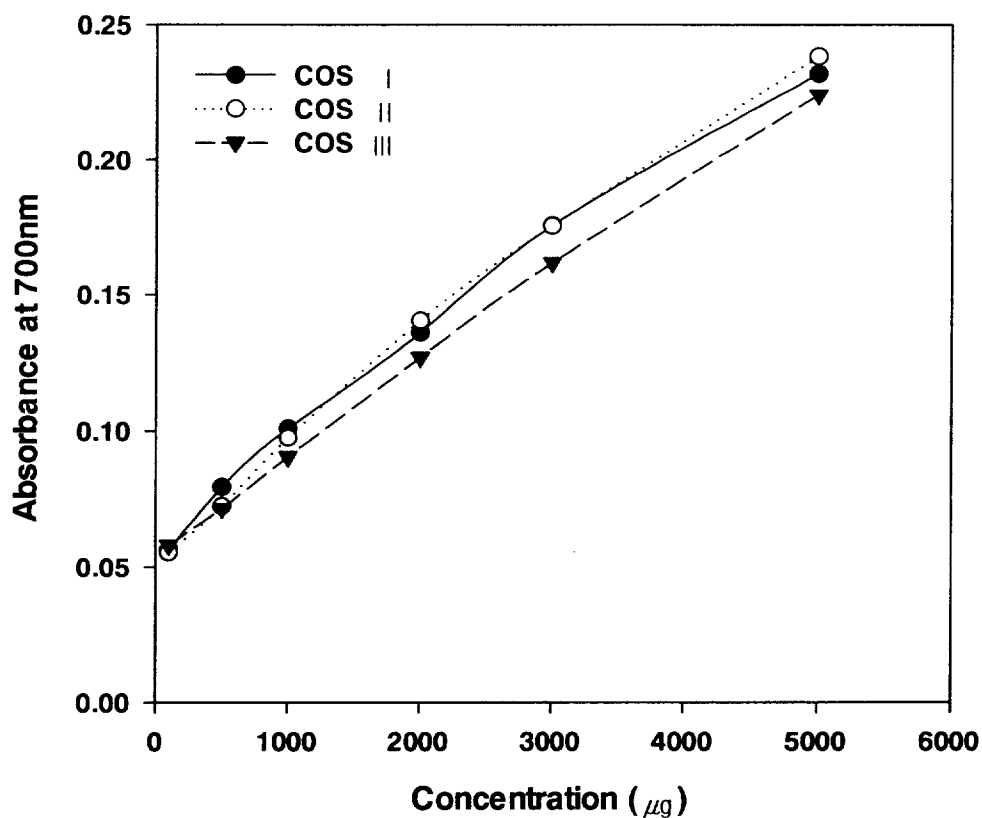


Fig. 1. Reducing power of 90% deacetylated COS on potassium ferricyanide.

COS I : 5kDa~10kDa

COS II : 1kDa~5kDa

COS III: below 1kDa

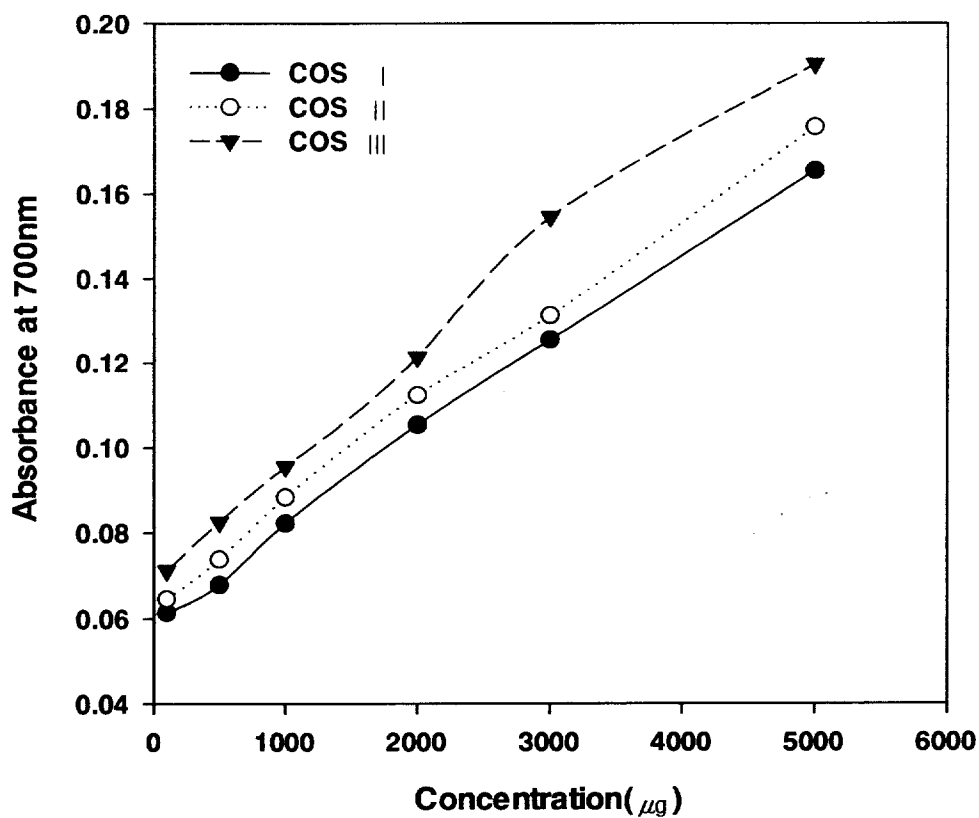


Fig. 2. Reducing power of 75% deacetylated COS on potassium ferricyanide.

COS I : 5kDa~10kDa

COS II : 1kDa~5kDa

COS III : below 1kDa

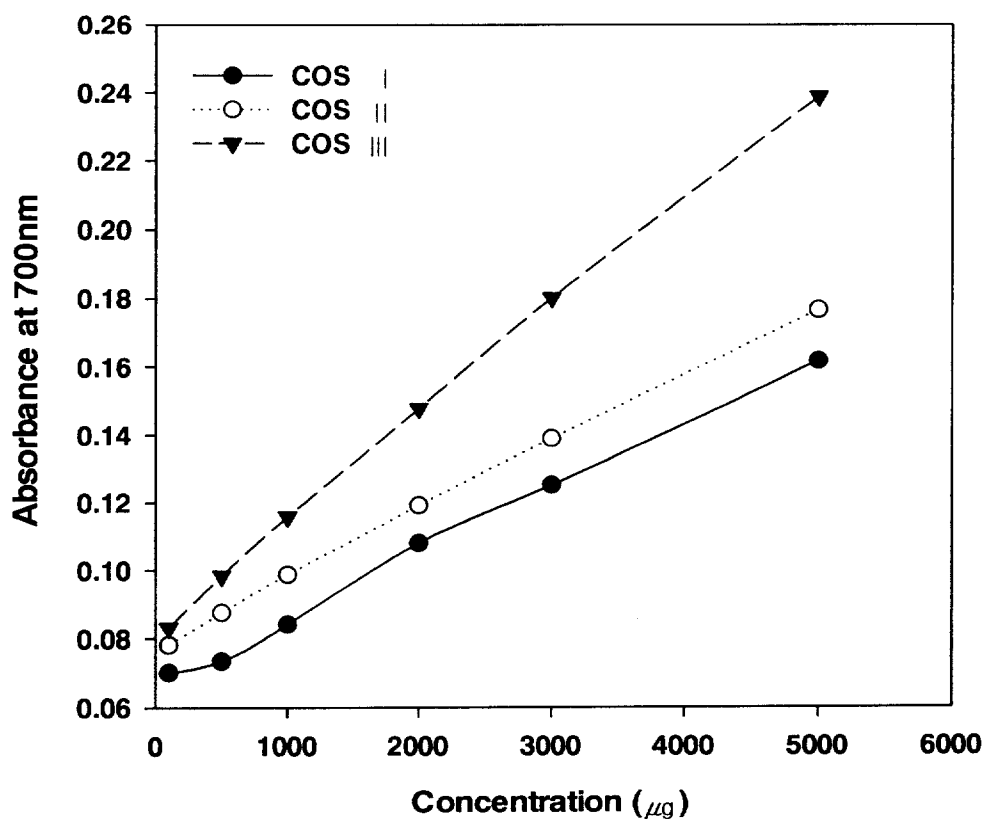


Fig. 3. Reducing power of 50% deacetylated COS on potassium ferricyanide.

COS I : 5kDa~10kDa

COS II : 1kDa~5kDa

COS III : below 1kDa

값이 증가할수록 환원력이 커지는 것을 의미한다. 5000 μ g 에서 환원력은 90% 탈아세틸화된 COS중에서 COS II의 환원력이 가장 높았고, 75% 탈아세틸화된 COS에서는 COS III, 50% 탈아세틸화된 COS에서는 COS III가 환원력이 가장 높았다. 환원력이 높다는 것은 전자주개 능력이 큰 것을 의미하는데, 이것은 자유라디칼(free radicals)과 반응하여 그들을 더욱 안정한 상태로 만들거나 라디칼 연쇄반응을 종결시킬 수 있다는 것을 의미한다.

4. Radical scavenging activity(RSA)

4-1 탈아세틸화된 COS의 분자량 크기별 DPPH 소거능

각각의 탈아세틸화도에 따라 분자량 크기별로 DPPH radical 소거능 측정 결과를 Fig. 4, 5, 6에 나타내었다. 90% 탈아세틸화된 COS에서는 COS II의 소거능이 53.05%로 가장 좋았고, 75% 탈아세틸화된 COS에서는 COS II가 28.38%, 50% 탈아세틸화된 COS에서는 COS III가 20.34%로 소거능이 가장 좋았다.

内田(1988)은 키토산의 탈아세틸화도의 차이에 따라 *F. solani*에 대한 항곰팡이 활성의 검토에서 탈아세틸화도가 높을수록 즉, 유리 아미노기가 많을수록 항곰팡이 활성이 강하다는 것을 보고하였다. 본 연구에서도 DPPH radical 소거능이 탈아세틸화도가 커짐에 따라 활성이 좋은 것으로 나타났다.

4-2 농도에 따른 DPPH 소거능

위의 결과에서 각 탈아세틸화도에 따른 가장 활성이 좋은 분자량 크기별로 농도에 따른 DPPH 소거능을 측정한 결과를 Fig. 7, 8, 9에 나타내었다. 90% 탈아세틸화된 COS II에서는 올리고당의 농도가 0.2%까지는 급격하게 소거능이 증가

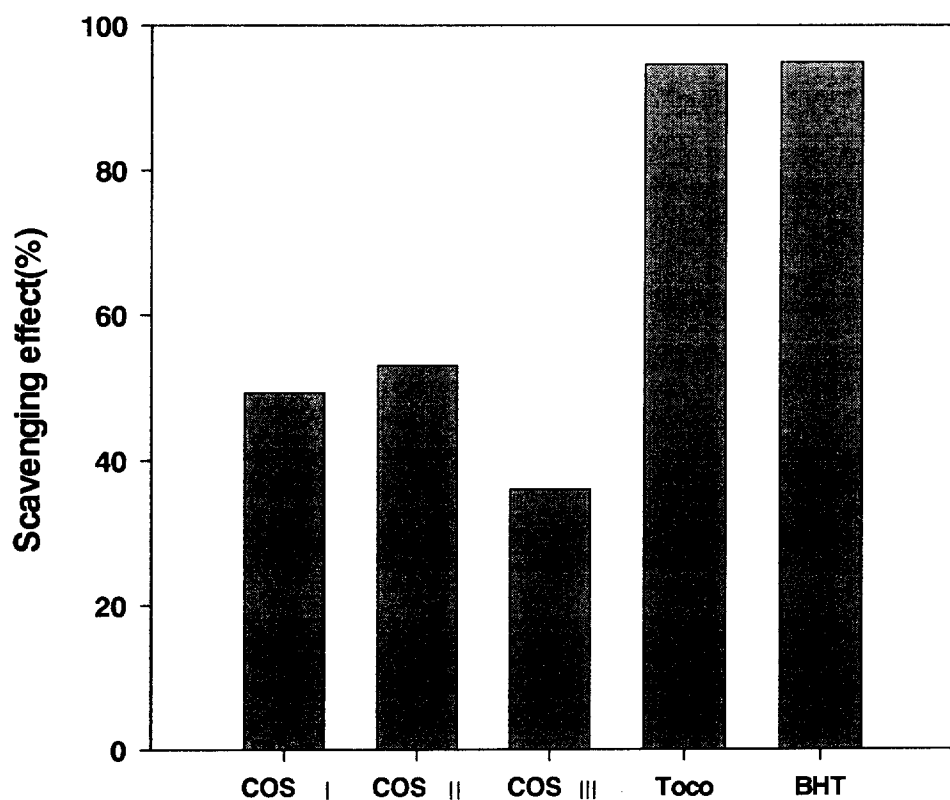


Fig. 4. Free radical scavenging effect of 90% deacetylated COS on DPPH radical.

COS I : 5kDa~10kDa

COS II: 1kDa~5kDa

COS III: below 1kDa

Toco : α -tocopherol.

BHT : 2,6-Di-tert-butyl-p-cresol.

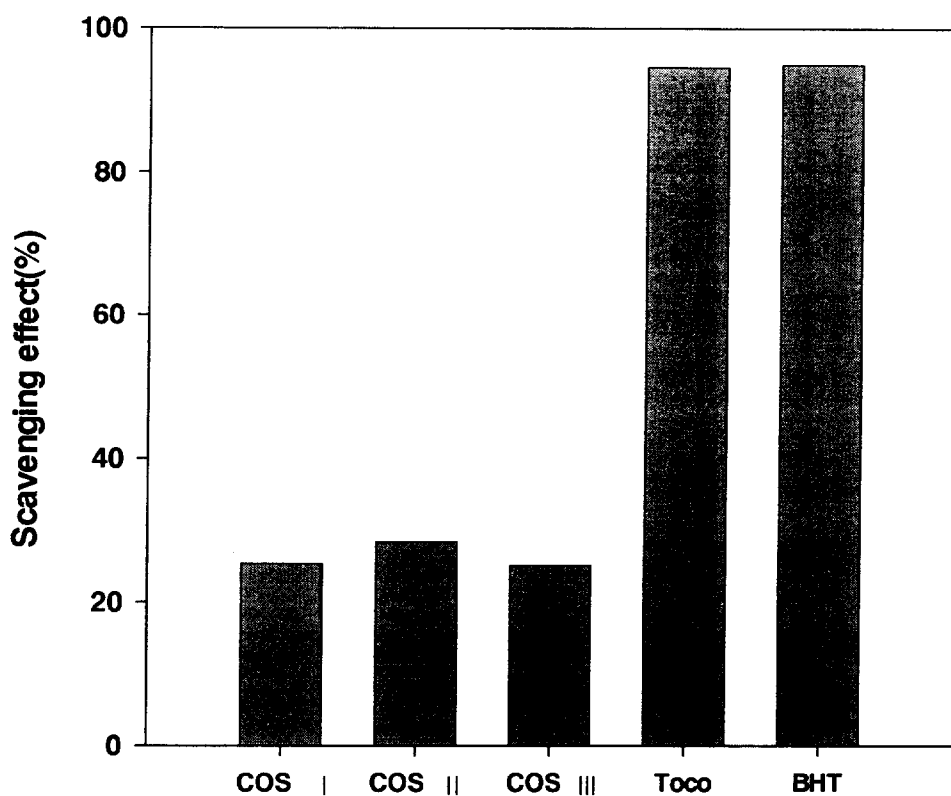


Fig. 5. Free radical scavenging effect of 75% deacetylated COS on DPPH radical.

COS I : 5kDa~10kDa

COS II : 1kDa~5kDa

COS III : below 1kDa

Toco : α -tocopherol.

BHT : 2,6-Di-tert-butyl-p-cresol.

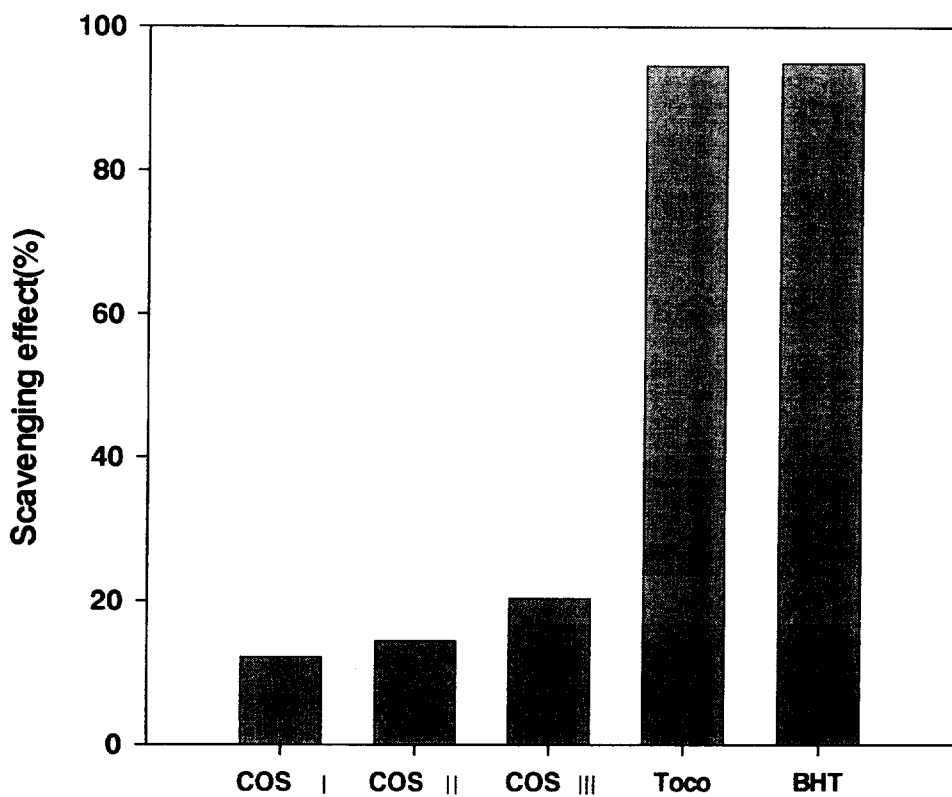


Fig. 6. Free radical scavenging effect of 50% deacetylated COS on DPPH radical.

COS I : 5kDa~10kDa

COS II: 1kDa~5kDa

COS III: below 1kDa

Toco : α -tocopherol.

BHT : 2,6-Di-tert-butyl-p-cresol.

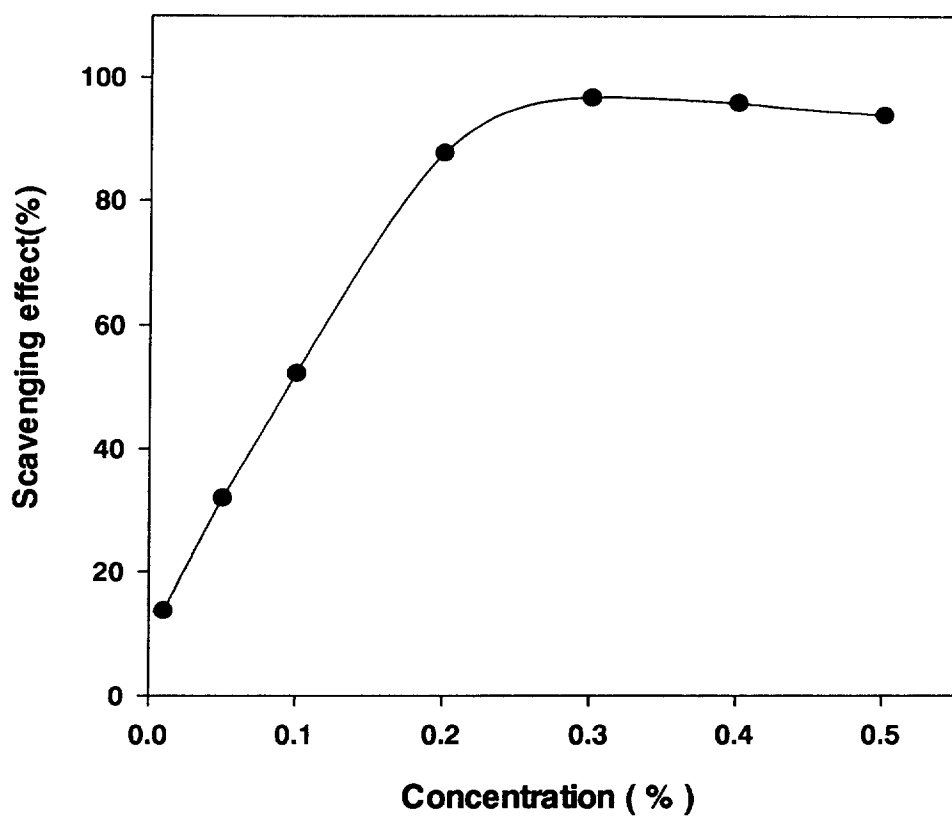


Fig. 7. Free radical scavenging effect of 90% deacetylated COS II on DPPH radical.

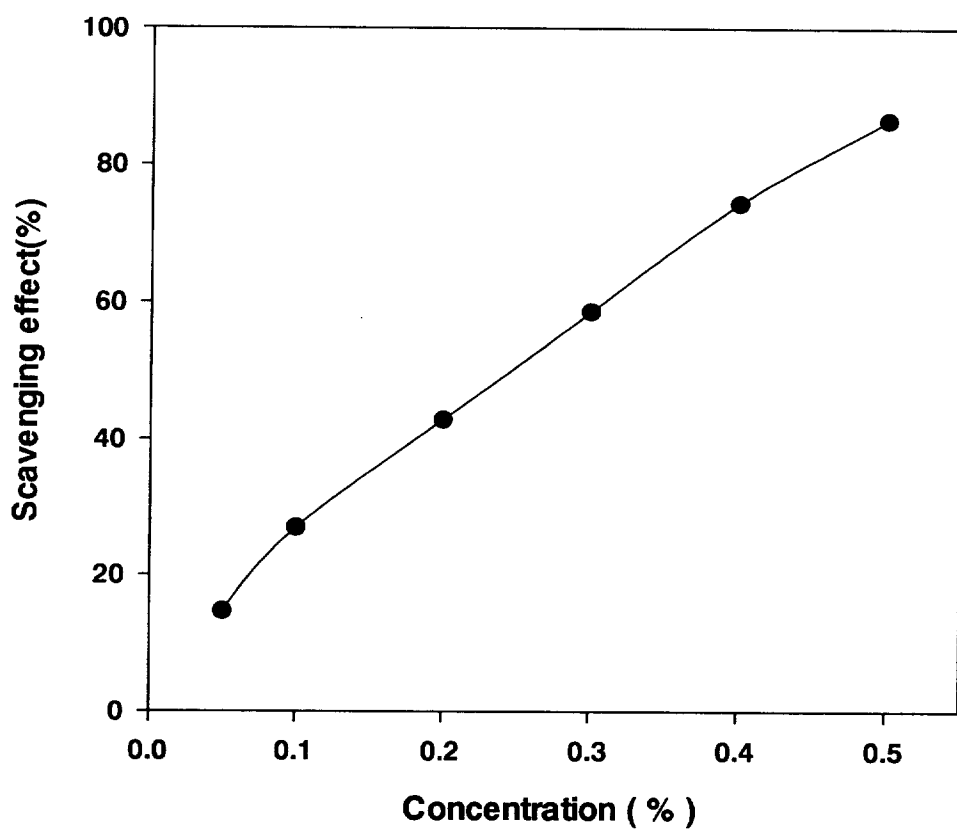


Fig. 8. Free radical scavenging effect of 75% deacetylated COS II on DPPH radical.

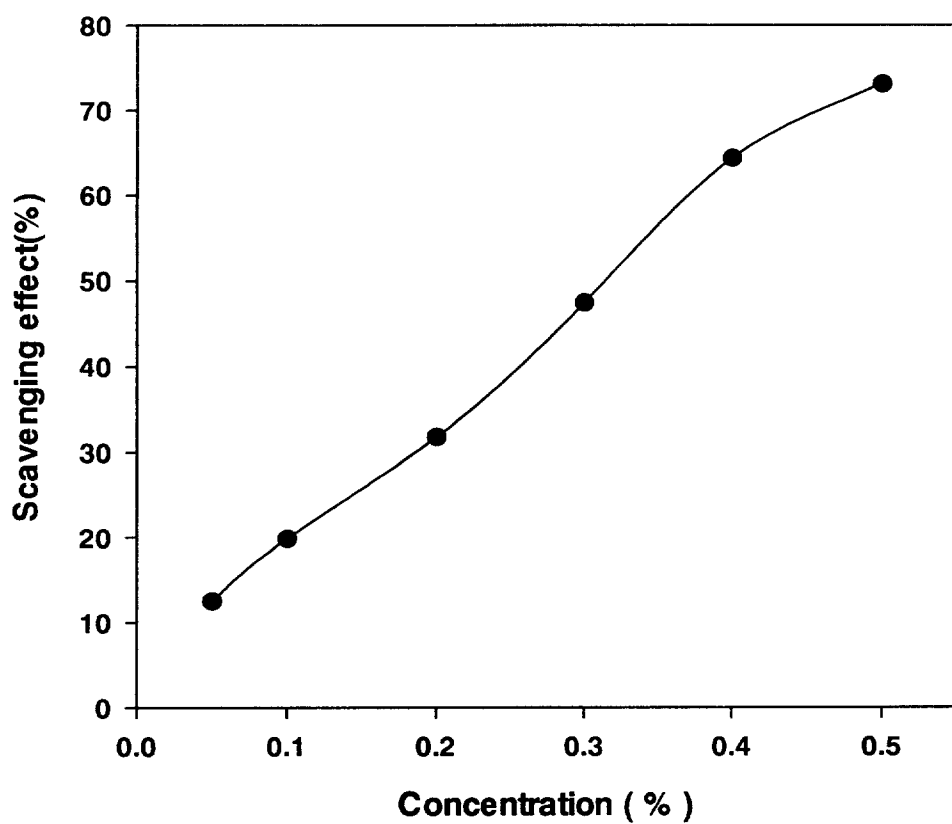


Fig. 9. Free radical scavenging effect of 50% deacetylated COS III on DPPH radical.

Table 1. Free radical scavenging effect of deacetylated COSs

Deacetylated COSs	EC ₅₀ ^a (mg/ml)
90% deacetylated COS II	0.94
75% deacetylated COS II	1.76
50% deacetylated COS III	2.45

^aAmount required for 50% reduction of DPPH radical after 30min.
Values are means of three experiments.

하였고, 0.3%일때는 소거능이 96.75%로 DPPH radical을 거의 다 소거하였다. 반면, 75% 탈아세틸화된 COS II에서는 올리고당의 농도가 0.5%까지 완만하게 소거능이 증가하였으며 이때 소거능은 86.52%였고, 50% 탈아세틸화된 COS III에서는 역시 올리고당의 농도가 0.5%까지 소거능이 완만하게 증가하였으며 이때 소거능은 73.13%였다.

그리고 90% 탈아세틸화된 COS II의 EC_{50} 값은 0.94mg/ml, 75% 탈아세틸화된 COS II의 EC_{50} 값은 1.76mg/ml, 50% 탈아세틸화된 COS III의 EC_{50} 값은 2.54mg/ml로 측정되었다.

4-3 시간에 따른 DPPH 소거능

탈아세틸화된 COSs의 시간에 따른 DPPH 소거능을 알아보기 위해서 각 탈아세틸화도에 따른 DPPH 소거능이 가장 좋은 키토산 올리고당의 분자량 크기별로 농도를 다르게 하여 DPPH 소거능을 측정한 결과를 Fig. 10, 11, 12에 나타내었다. 시간은 각각 1분, 3분, 5분, 10분, 20분, 40분, 60분, 1시간, 2시간, 4시간으로 하여 시간에 따른 소거능을 검토하였다. 90% 탈아세틸화된 COS II의 경우 올리고당의 농도가 0.2, 0.3%일때는 DPPH 용액을 넣자마자 강력한 소거능을 보였고, 1시간 가량 지났을 때는 거의 다 DPPH radical을 소거하였다. 0.1% 농도에서는 1시간 일 때 소거능이 60%였고, 그 이후로는 소거능이 거의 일정하였다. 0.05%와 0.01%에서는 20분을 기점으로 소거능이 거의 일정하였다. 75% 탈아세틸화된 COS II에서는 모든 농도에서 40분까지는 급격하게 DPPH radical이 감소하였고, 농도가 0.3% 이상 일 때는 4시간 후에 80%이상의 우수한 소거능을 보여주었다. 50% 탈아세틸화된 COS III에서도 역시 모든 농도에서 40분까지는 급격하게

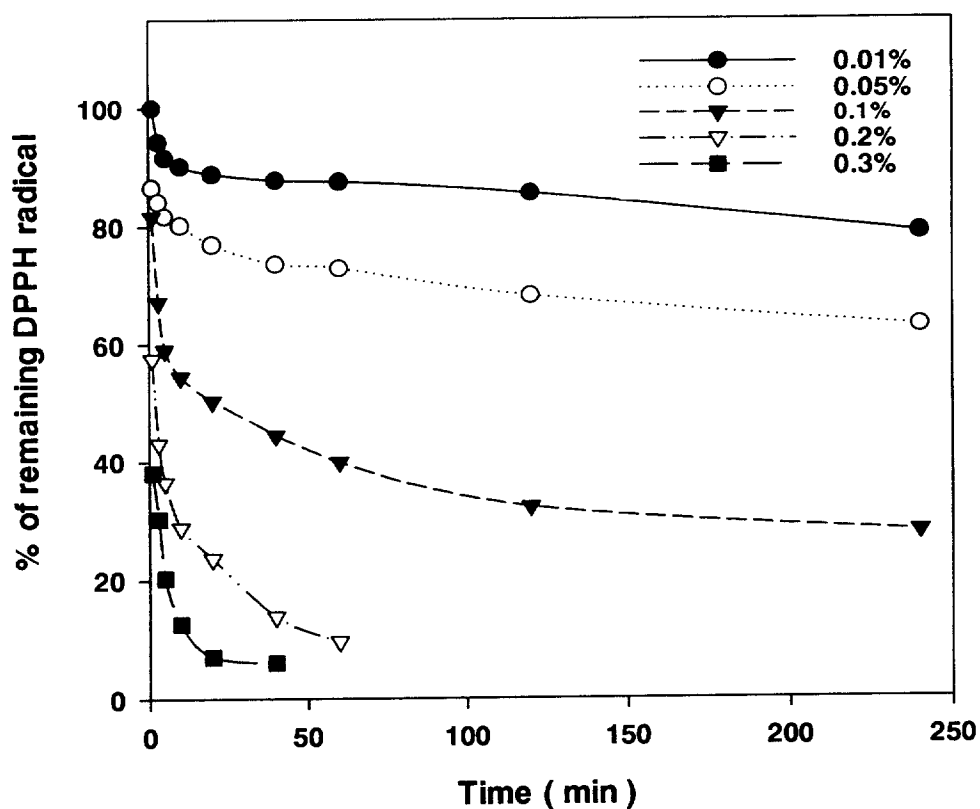


Fig. 10. Free radical scavenging effect of time of 90% deacetylated COS II on DPPH radical.

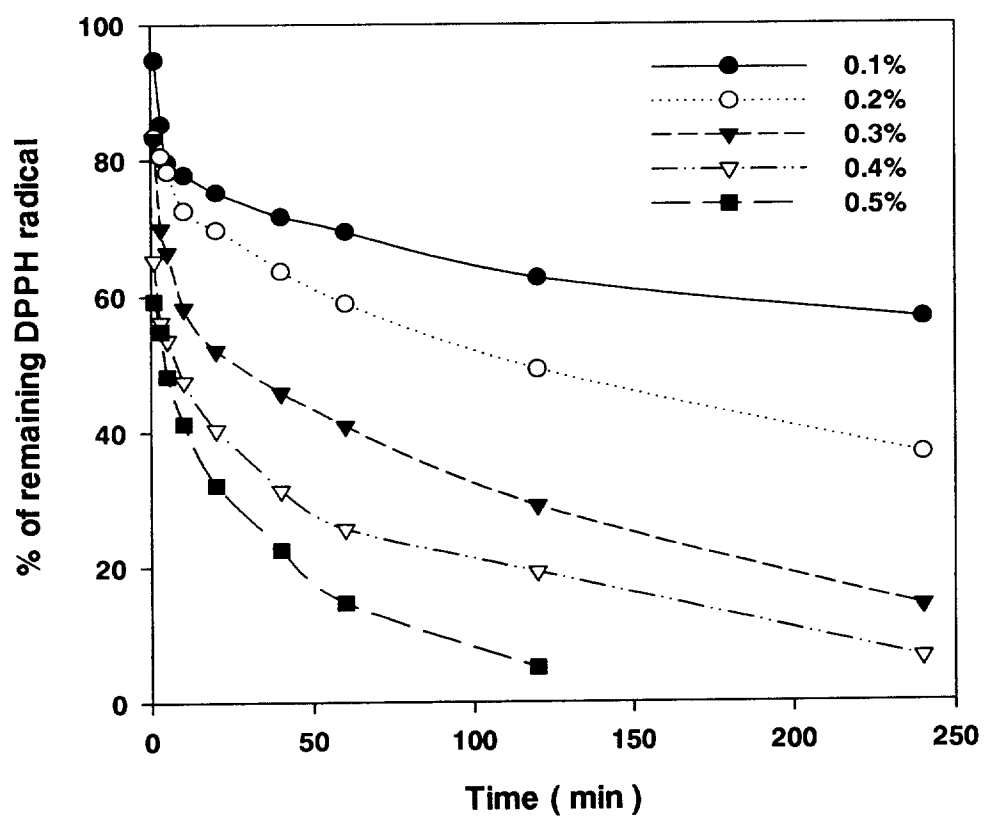


Fig. 11. Free radical scavenging effect of time of 75% deacetylated COS II on DPPH radical.

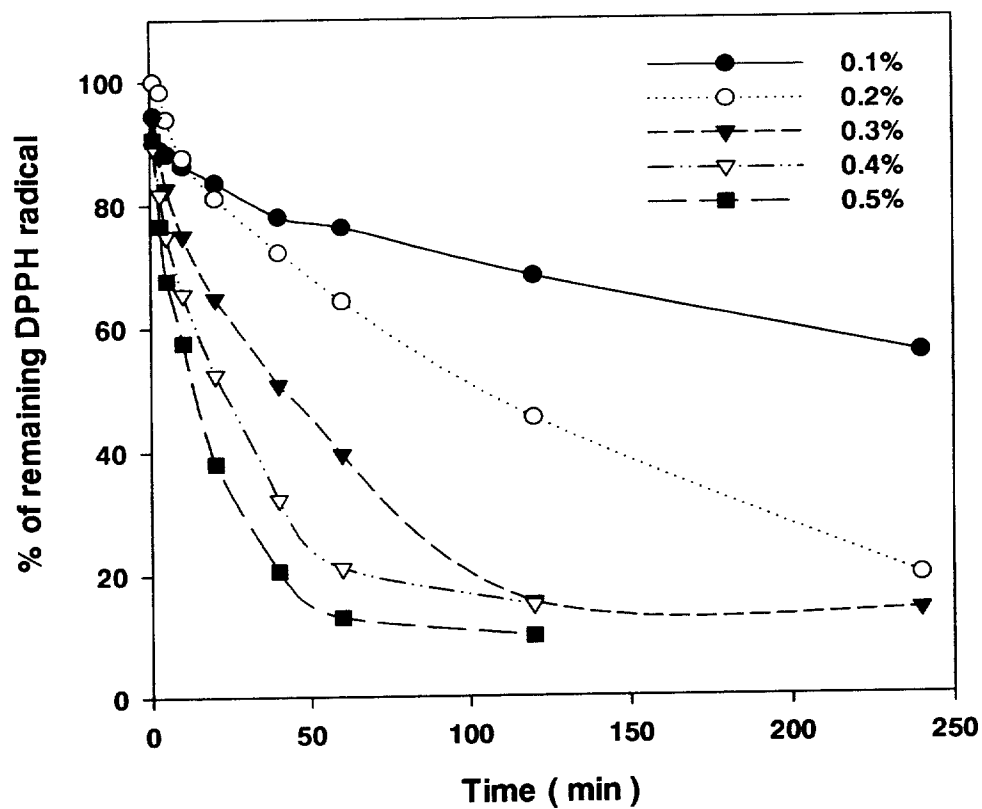


Fig. 12. Free radical scavenging effect of time of 50% deacetylated COS III on DPPH radical.

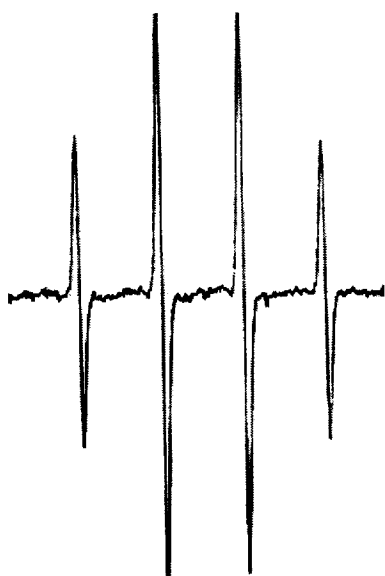
DPPH radical이 감소하였고, 농도가 0.2%에서는 4시간 일 때 소거능이 약 80%, 0.3%이상일 때는 2시간 일 때 소거능이 80%이상의 우수한 소거능을 보여주었다.

일반적으로 천연 항산화제인 α -tocopherol은 지용성으로 가격이 비싸고 수용성이 아니기 때문에 섭취하는데 약간의 어려움이 있다. 그리고 합성 항산화제인 BHT도 항산화 능력이 뛰어나지만 *in vivo*에서 부작용이 있다고 보고되어졌다. 그러나 키토산 올리고당은 수용성으로 지구상에서 셀룰로오스 다음으로 풍부할 뿐만 아니라 *in vivo*에서 부작용도 없어 식품의 첨가제나 의약품으로써의 활용이 기대된다.

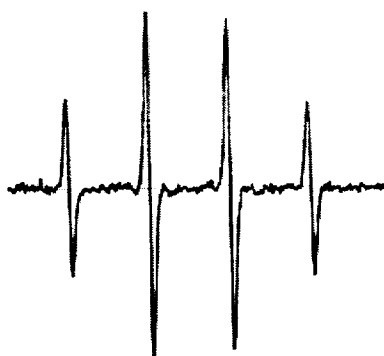
5. Hydroxyl radical scavenging activity

탈아세틸화된 COSs의 hydroxyl radical 소거능을 ESR로 측정한 결과를 Fig. 13, 14, 15와 Table. 2에 나타내었다. 90% 탈아세틸화된 COS에서는 0.05mg/ml의 농도일 때 COS II가 70.21%의 signal intensity 감소를 보였고, 75% 탈아세틸화된 COS에서는 0.05mg/ml의 농도일 때 COS III가 76.60%의 signal intensity 감소를, 50% 탈아세틸화된 COS에서는 0.05mg/ml의 농도일 때 COS II가 80.81%의 가장 많은 signal intensity 감소를 나타내었다.

각각의 탈아세틸 키토산 올리고당의 분자량 크기별로 가장 활성이 좋은 것에 대한 농도별 소거능을 측정한 결과를 Fig. 16, 17, 18과 Table. 3에 나타내었다. 90% 탈아세틸화된 COS II의 0.1mg/ml 첨가시 100% hydroxyl radical 소거능을 보였고, 75% 탈아세틸화된 COS III에서는 80.85%, 50% 탈아세틸화된 COS II에서는 100%의 소거능을 보였다. Xie 등(2001)은 수용성인 키토산 유도체를 만들어 hydroxyl radical 소거능을 보고하였는데 carboxymethyl chitosan sodium의 EC_{50} 값이 $246\mu\text{g/ml}$ 이라고 보고하였다. 키토산의 구조에서 OH 또는 NH기가 라디



(a) Control



(b) 90% deacetylated COS I

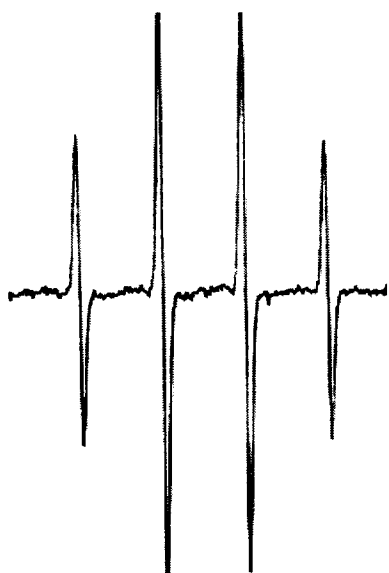


(c) 90% deacetylated COS II

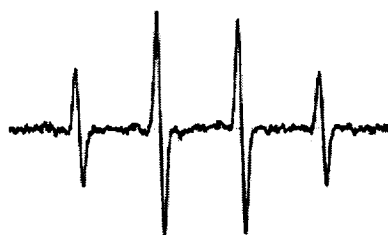


(d) 90% deacetylated COS III

Fig. 13. ESR spectrum of 90% deacetylated COS on hydroxyl radical.



(a) Control



(b) 75% deacetylated COS I

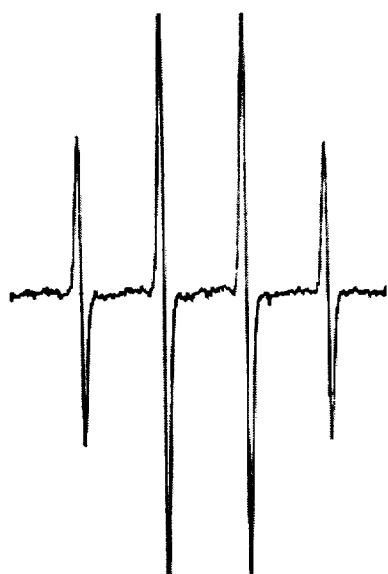


(c) 75% deacetylated COS II

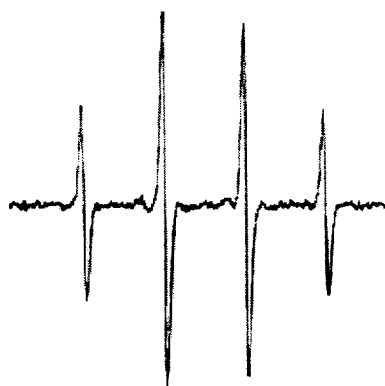


(d) 75% deacetylated COS III

Fig. 14. ESR spectrum of 75% deacetylated COS on hydroxyl radical.



(a) Control



(b) 50% deacetylated COS I

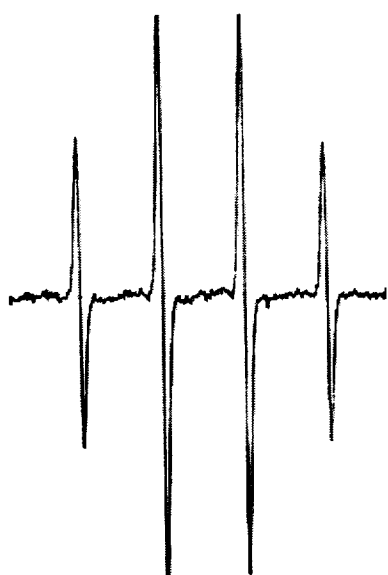


(c) 50% deacetylated COS II

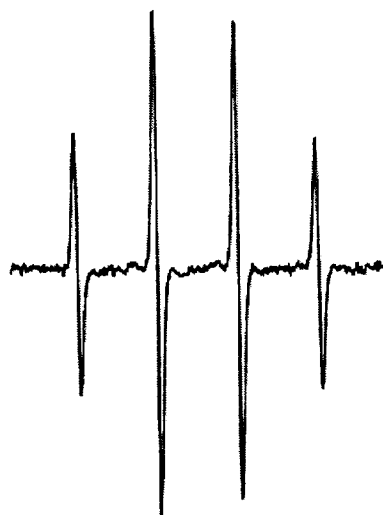


(d) 50% deacetylated COS III

Fig. 15. ESR spectrum of 50% deacetylated COS on hydroxyl radical.



(a) Control



(b) 0.025mg/ml

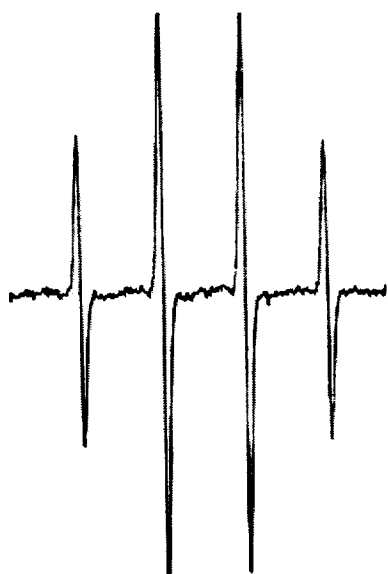


(c) 0.05mg/ml

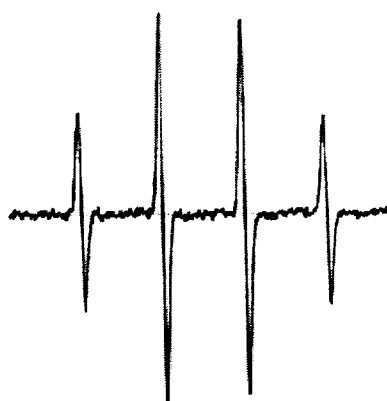


(d) 0.1mg/ml

Fig. 16. ESR spectrum of 90% deacetylated COS II on hydroxyl radical at various concentrations.



(a) Control



(b) 0.025mg/ml

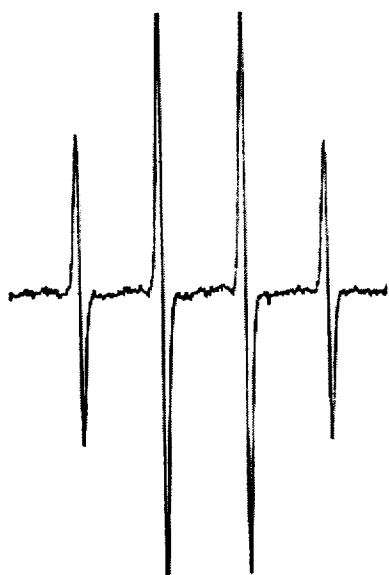


(c) 0.05mg/ml

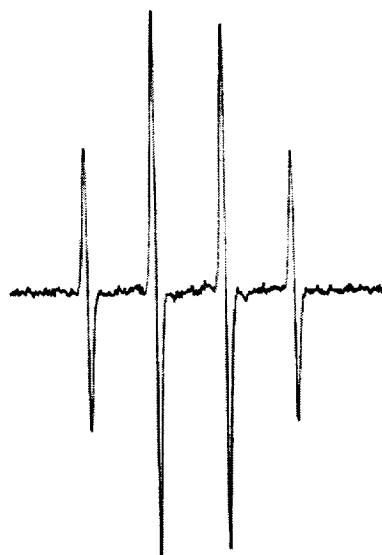


(d) 0.1mg/ml

Fig. 17. ESR spectrum of 75% deacetylated COS III on hydroxyl radical at various concentrations.



(a) Control



(b) 0.025mg/ml



(c) 0.05mg/ml



(d) 0.1mg/ml

Fig. 18. ESR spectrum of 50% deacetylated COS II on hydroxyl radical at various concentration.

Table. 2. Effect of various deacetylated COS on ESR signal intensity of DMPO-OH spin adduct^a

Deacetylated COSs	Relative ESR signal intensity at 0.05mg/ml
90% deacetylated COS I	57.45
90% deacetylated COS II	29.79
90% deacetylated COS III	42.55
75% deacetylated COS I	38.30
75% deacetylated COS II	27.66
75% deacetylated COS III	23.40
50% deacetylated COS I	63.83
50% deacetylated COS II	19.19
50% deacetylated COS III	48.94

^aTreatment and other details are the same
as in the legend of Fig. 13, 14, 15.

Table. 3. Effect of various concentration deacetylated COS on ESR signal intensity of DMPO-OH spin adduct^a

Deacetylated COS (mg/ml)	Relative ESR signal intensity		
	90% deacetylated	75% deacetylated	50% deacetylated
	COS II	COS III	COS II
0.000	100	100	100
0.025	85.11	65.96	91.49
0.050	29.79	23.40	19.19
0.100	0.00	19.15	0.00

^aTreatment and other details are the same as in the legend of Fig. 16, 17, 18.

칼 소거능에 절대적인 영향이 있고, 이것은 두 작용기의 결합 해리에너지에 관련이 있다고 보고하였다. 즉, O-H 또는 N-H의 해리에너지가 크기 때문에 hydroxyl radical과 잘 반응하지 않는다. 그러나 전자를 당기는 carboxymethyl가 치환됨으로써 HOMO의 에너지 레벨에 영향을 미치고, 동시에 O-H 또는 N-H의 해리에너지를 감소시켜 hydroxyl radical과 잘 반응하게 한다고 보고하였다. 본 연구에서도 마찬가지로 탈아세틸화가 적게된 50% 탈아세틸화된 COS에서 전자를 당기는 아세틸기가 상대적으로 풍부하므로 hydroxyl radical 소거능이 우수하였다.

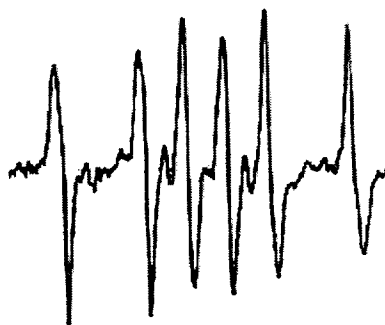
6. Superoxide anion radical scavenging activity

탈아세틸화된 COSs의 superoxide anion radical 소거능을 측정한 결과를 Fig. 19, 20, 21과 Table. 4에 나타내었다. 90% 탈아세틸화된 COS 1mg/ml의 농도일 때 COS II가 77%의 signal intensity 감소를, 75% 탈아세틸화된 COS에서는 COS III가 80%의 signal intensity 감소를, 50% 탈아세틸화된 COS에서는 COS I가 87.1%의 가장 많은 signal intensity 감소를 나타내었다.

각각의 탈아세틸 키토산 올리고당의 분자량 크기별로 가장 활성이 좋은 것에 대한 농도별 소거능을 측정한 결과를 Table. 5에 나타내었다. 탈아세틸 키토산 올리고당 중에서 50% DACOS I이 가장 높은 소거능을 보였고 hydroxyl radical과 마찬가지로 탈아세틸화도가 감소할수록 높은 소거능을 보였다. 이것 또한 아세틸기가 superoxide anion radical이 키토산 올리고당과 반응할 때 active hydrogen과 반응하기 쉽게 하여 안정한 거대분자 라디칼을 형성한다.



(a) Control



(b) 90% deacetylated COS I



(c) 90% deacetylated COS II

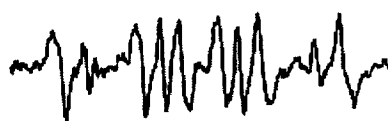


(d) 90% deacetylated COS III

Fig. 19. ESR spectrum of 90% deacetylated COS on superoxide anion radical.



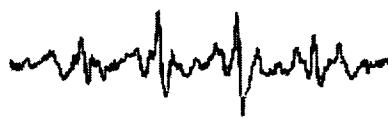
(a) Control



(b) 75% deacetylated COS I



(c) 75% deacetylated COS II



(d) 75% deacetylated COS III

Fig. 20. ESR spectrum of 75% deacetylated COS on superoxide anion radical.



(a) Control



(b) 50% deacetylated COS I



(c) 50% deacetylated COS II



(d) 50% deacetylated COS III

Fig. 21. ESR spectrum of 50% deacetylated COS on superoxide anion radical.

Table. 4. Effect of various deacetylated COS on ESR signal intensity of DMPO-O₂^{-·} spin adduct^a

Deacetylated COSs	Relative ESR signal intensity at 1mg/ml
90% deacetylated COS I	77.42
90% deacetylated COS II	23.00
90% deacetylated COS III	26.20
75% deacetylated COS I	34.15
75% deacetylated COS II	32.26
75% deacetylated COS III	20.00
50% deacetylated COS I	12.90
50% deacetylated COS II	18.50
50% deacetylated COS III	24.25

^aTreatment and other details are the same as in the legend of Fig. 19, 20, 21.

Table. 5. Effect of various concentration deacetylated COS on ESR signal intensity of DMPO-O₂^{-·} spin adduct

Deacetylated COS (mg/ml)	Relative ESR signal intensity		
	90% deacetylated	75% deacetylated	50% deacetylated
	COS II	COS III	COS I
0.00	100	100	100
0.25	38.00	31.60	27.00
1.00	23.00	20.00	12.90

요 약

본 연구는 새우나 게 껍질 등에 풍부하게 존재하는 키틴·키토산을 가공하여 chitosanase로 가수분해 시켜 만든 키토산 올리고당을 한외여과막을 이용 분자량 크기별로 분획한 다음 여러 가지 자유라디칼에 대한 소거능을 검토하였고, 검토한 결과는 다음과 같다.

1. 탈아세틸 키토산 올리고당의 환원력은 90% 탈아세틸화된 COS에서는 COS II가 가장 좋았고, 75% 탈아세틸화된 COS에서는 COS III, 50% 탈아세틸화된 COS에서는 COS III가 가장 좋았다.
2. 탈아세틸 키토산 올리고당의 DPPH radical의 소거능에서는 90% 탈아세틸화된 COS는 COS II가 가장 활성이 우수했고, 75% 탈아세틸화된 COS에서는 COS II, 50% 탈아세틸화된 COS에서는 COS III가장 좋은 활성을 나타내었고, 그들의 EC_{50} 값은 각각 0.94, 1.76, 2.45mg/ml였다.
3. 농도와 시간에 대한 영향에서는 90% 탈아세틸화된 COS II가 0.3% 농도일 때 90% 이상의 소거능을 보였고, DPPH 용액을 첨가 시 급격하게 소거능을 나타내었고, 20분 이후로는 일정하였다. 75% 탈아세틸화된 COS II는 0.5% 농도까지 일정하게 소거능이 증가하였고, DPPH 용액 첨가 시 시간에 따라 급격하게 감소하여 4시간 이후로는 0.3%이상의 농도일 때 80%이상의 소거능을 나타내었다. 50% 탈아세틸화된 COS III도 0.5% 농도까지 일정하게 소거

능이 증가하였고, DPPH 용액 첨가 시 4시간 이후로는 0.2% 이상의 농도일 때 80% 이상의 소거능을 보였다.

4. 탈아세틸 키토산 올리고당의 hydroxyl radical 소거능은 90% 탈아세틸화된 COS II, 75% 탈아세틸화된 COS III, 50% 탈아세틸화된 COS II가 가장 높은 signal intensity 감소를 보였고, 0.1mg/ml의 농도일 때 각각 100, 80.85, 100%의 signal intensity 감소를 보였다.
5. 탈아세틸 키토산 올리고당의 superoxide anion radical의 소거능은 90% 탈아세틸화된 COS II, 75% 탈아세틸화된 COS III, 50% 탈아세틸화된 COS I의 signal intensity 감소가 가장 우수하였고, 1mg/ml의 농도일 때 각각 77, 80, 87.1%의 signal intensity 감소를 보였다.

참고문헌

- Bender, A. D., Kormends, G. G. and Powell, P. (1970) Pharmacological control of aging. *Exp. Gerontol.*, **5**, 97-
- Xue, C., Yu, G., Takashi, H., Junji, T. and Lin, H. (1998) Antioxidative activities of several marine polysaccharides evaluated in a phosphatidylcholine-liposomal suspension and organic solvents. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 206-209.
- Das, D., Bandyopadhyay, D., Bhattacharjee, M. and Banerjee, R. K. (1997) Hydroxyl radical is the major causative factor in stress-induced gastric ulceration. *Free Radical Biol. Med.*, **23**, 8-18.
- Davies, K. J. A. (1986) Intracellular proteolytic systems may function as secondary antioxidant defenses : a hypothesis. *J. Free Rad. Biol. Med.*, **2**, 155-173.
- Gordon, D. T. and Williford, C. B. (1983) Chitin and chitosan: influence on element absorption in rats. ACS Symposium Series 214, Unconventional Source of Dietary Fibers., 156-184.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1989) Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press, Oxford.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. and Cross, E. E. J. (1992) Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine.*, **119**, 598-620.

- Hanman, D. (1981) The aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7124-
- Hatano, T., Kagawa, H. and Okawa, T. (1988) Two new flavonoids and other constituents in licorice wet : their relative astringency and radical scavenging effects, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 2090-2097.
- Hirano, S. and Nagao, N. (1989) Effects of chitosan, pectic acid, lysozyme, and chitinase on the growth of several phytopathogens. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 3065-3066.
- Landes, D. R. and Bough, W. A. (1976) Effect of chitin- a coagulating agent for food processing wastes- in the diets of rats on growth and lever and blood composition. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, **15**, 555-563.
- Janzen, E. G. (1986) Spin trapping. In: Packer, L. (ED.), *Methods Enzymol.*, **105**, 188-198.
- Jeon, Y. J. and Kim, S. K. (2000) Production of chitooligosaccharides using an ultrafiltration membrane reactor and their antibacterial activity. *Carbohydrate Polymers*, **41**, 133-141.
- Jeon, Y. J., Park, P. J. and Kim, S. K. (2001) Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. *Carbohydrate Polymers*, **44**, 71-76.
- Luong, J. H. T., Nguyen, A. L. and Male, K. B. (1987) Recent developments in downstream processing based on affinity interaction. *Trends in Biotechnol.*, **5**, 281-286.
- Muramatsu, H., Kogawa, K., Tanaka, M., Okumura, K., Nishihori, Y., Koike,

- K., Kuga, T. and Niitsu, Y. (1995) Superoxide dismutase in SAS human tongue carcinoma cell line is a factor defining invasiveness and cell motility. *Cancer Res.*, **55**, 6210-6214.
- Maezaki, Y. Tsuji, K., Nakagawa, Y., Kawai, Y., Akimoto, M., Tsugita, T., Takekawa, W., Terada, A., Hara, H. and Mitsuoka, T. (1993) Hypocholesterolemic effect of chitosan in adult males. *Biosci. Biotech Biochem.*, **57**, 1439-1444.
- Muzzarelli, R. A. A., Barontini, G. and Rocchetti, R. (1976) Immobilized enzymes on chitosan columns: α -chymotrypsin and acid phosphatase. *Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 1445-1454.
- Nishimura, K., Ishihara, C., Ukei, S., Tokura, S. and Azuma, I. (1986) Stimulation of cytokine production in mice using deacetylated chitin. *Vaccine*, **4**, 151-156.
- Okuda, H., Kato, K. and Tsujuta, T. (1997) Antihypertensive and antihyperlipemic actions of chitosan. *Korean J. Chitin and Chitosan*. **2**, 49-59.
- Oyaizu, M (1986) Studies on products of browning reaction : Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr.* **44**, 307-315.
- Rivett, A. J. (1989) The multicatalytic proteinase of mammalian cells. *Arch Biochem. Biophys.*, **268**, 1-8.
- Rosen, G. M. and Rauckman, E. J. (1984) Spin trapping of superoxide and hydroxyl radicals. *Methods Enzymol.*, **105**, 198-209.

- Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Khoo, J. C. and Witztum, J. L. (1989) Beyond cholesterol. Modification of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.*, **320**, 915-924.
- Sugano, M., Fujikawa, T., Hiratsuji, Y., Nakashima, K., Fukuda, N. and Hasegawa, Y., (1980) A novel use of chitosan as a hypocholesterolemic agents in rats. *Am. J. Clin. Nutr.*, **33**, 787-793.
- Suzuki, K., Mikami, T., Okawa, Y., Tokoro, A., Suzuki, S. and Suzuki, M. (1986) Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose. *Carbohydrate. Res.*, **151**, 403-408.
- Tokoro, A., Kobayashi, M., Tatewaki, N., Suzuki, S. and Suzuki, M. (1989) Protective effect of N-acetylchitohexaose on *Listeria monocytogens* infection in mice. *Microbial. Immunol.*, **33**, 357-367.
- Tokoro, A., Tatewaki, N., Suzuki, K., Mikami, T., Suzuki, S. and Suzuki, M. (1988) Growth-inhibitory effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose against Meth-A solid tumor. *Chem, Pharm. Bull.*, **36**, 784-790.
- Tusukada, K., Matsumoto, T., Aizawa, K., Tokoro, A., Naruse, R., Suzuki, S. and Suzuki, M. (1990) Antimetastatic and growth-inhibitory effects of N-acetylchitohexaose in mice bearing Lewis lung carcinoma. *Jpn. J. Cancer Res.*, **81**, 259-265.
- Sudarshan, N. R., Hoover, D. G. and Knorr, D. (1992) Antimicrobial action of chitosan. *Food Biotechnology*. **6**, 257-272.
- Toei, K. and Kohara, T. (1976) Conductometric method for colloid titrations.

Anal. Chim. Acta, **83**, 59-65.

Uchida, Y., Izume, M. and Ohtakara, A. (1989) Preparation of chitosan oligomers with purified chitosanase and its application. In G. Skjak-Braek and T. Anthonsen and P. Sandford (Eds.), *Chitin and chitosan*, (pp. 373-382). London: Elsevier.

Weiner, M. L. (1991) An overview of the regulatory status and of the safety of chitin and chitosan as food and pharmaceutical ingredients, in *Proceeding from the 5th International Conference on Chitin and Chitosan*, Vol. 5, pp. 663-672, Princeton, USA.

Xie, W., Xu, P. and Liu, Q. (2001) Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **11**, 1699-1701.

Winston, G. W., Regoli, F., Dugas, JR., A. J., Fong, J. H. and Blanchard, K. A. (1997) A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radical Biol. Med.*, **24**, 480-493.

Yamada, A., Shibuya, N., Kodama, O. and Akatsuka, T. (1993) Induction of phytoalexin formation in suspension-cultured rice cells by N-acetylchitooligosaccharides. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 405-409.

김세권, 전유진 (1997) 키틴·키토산의 생리기능성(II)- 키틴·키토산 및 그 올리고당의 면역작용에 의한 항종양 활성, 한국키틴키토산연구회지, **2**, 3-14.

内田 泰 (1988) キチン・キトサンの抗菌性, フードケミカル, **2**, 22-29.

감사의 글

본 논문이 완성되기까지 언제나 세심한 지도와 배려로 부족한 제자를 지도하여 주신 김세권 지도교수님께 진심으로 머리숙여 감사드립니다. 또한 부족한 논문을 따뜻한 격려와 충고로 심사하여 주신 문성훈 교수님, 심현관 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 그 동안의 학부 및 대학원 생활 동안 격려와 관심을 주신 황금소 교수님, 이동재 교수님, 이 욱 교수님, 문성두 교수님, 손병화 교수님, 김 돈 교수님, 김주창 교수님, 김영일 교수님, 변상용 교수님, 강영수 교수님께도 감사드립니다.

해양 생화학 연구실에서 동고 동락하면서 이 논문이 완성될 때까지 곁에서 많은 도움을 아끼지 않은 변희국 선생님, 송병권 선생님. 박표잠 선생님, 전신영 후배님, 천충길 후배님, 박지영 후배님, 조영숙 후배님, 허성달 후배님과 졸업동기인 이상훈 선배님, 장민정 후배님께도 깊은 감사의 뜻을 전합니다. 또한 먼저 졸업하신 선배님, 후배님 그리고 항상 힘이 되어준 졸업동기들에게도 감사 드립니다. 그리고 9년이라는 긴 시간동안 곁에서 어려움을 같이 나눈 사랑하는 민정에게도 감사의 마음을 전합니다.

끝으로 형, 막내라며 많은 걱정으로 보살펴준 큰누나, 작은누나 그리고 항상 저희 집에 많은 관심과 걱정을 해주신 자형과 귀여운 조카들에게도 감사의 마음을 전합니다. 오늘의 제가 있기까지 부족한 저를 대학원에 진학시키고 걱정과 고생으로 평생을 보내신 부모님께 이 논문을 드립니다.