

키틴 및 키토산이 생체내 카드뮴 축적에 미치는 영향

유일수 · 유문희* · 소진탁**

국립 이리농공전문대학 화학공학과 및 *식품공업과, **원광대학교 의과대학

= Abstract =

A Study on the Effect of Chitin, Chitosan and Dithiocarbamate Chitosan against Cadmium Accumulation in *Scapharca subcrenata*

IL Soo You, Hoon Hee Ryu* and Chin Thack Soh**

Department of Chemical Engineering, and *Department of Food Engineering, Iri National College of Agriculture and Technology

**Medical College, Wngkwang University

This study was performed to investigate the effect of chitin, chitosan and dithiocarbamate chitosan against cadmium accumulation. The *Scapharca subcrenata* were divided into four independent groups which were one control and three experimental groups by cadmium alone treatment or chitin, chitosan and dithiocarbamate chitosan which cadmium. Samples were analyzed by Varian 30/40 atomic absorption spectrophotometer.

The results obtained were as follows:

1. The cadmium concentration in water were significantly decreased in three experimental groups compared with that of control group($P < 0.05$).
2. The cadmium concentration in muscle of *S. subcrenata* in cadmium alone treatment group were similar to that of the chitin treatment group, but chitosan and dithiocarbamate chitosan treatment groups were significantly decreased($P < 0.05$).

In conclusion, this study revealed the effect of chitin, chitosan and dithiocarbamate chitosan against cadmium accumulation. It exhibited the highest effect at dithiocarbamate chitosan treatment group.

Key words : Chitin, Chitosan, Dithiocarbamate Chitosan, Cadmium, *Scapharca subcrenata*

서 론

금속 제련과정에서 발생하는 카드뮴은 항부식 작용, 전기도금, 페인트색소, 플라스틱 제조 등 다양한 산업

에 이용되고 있다(이병철, 1988; 원종훈, 1979). 이와 같이 카드뮴은 산업활동 과정 중에 노출되어서 수질, 토양, 농작물, 어패류 및 인체에 농축되어 다양한 질병을 일으킨다(Kage *et al.*, 1961; Pulido *et al.*, 1966). 그 중독 현상은 급성중독으로는 기도, 폐를 손상케하며 인후부 통증, 기침, 두통, 어지럼증과 구토증 및 호흡 곤란을 수반하고, 만성중독으로는 후각이상, 식욕부진, 반복성 설사, 위장 장애 및 체중감소 등을 일으킨다(최규식과 류영환, 1990; Eaton and Toal, 1982).

이 논문은 1996년 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

중금속 해독제로는 $\text{Ca}_2\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 가 사용되는데 이것은 중금속과 강한 친화성 킬레이트제이지만 신장 독성을 유발한다. 또한 해독제 penicillamine은 위장관에서 잘 흡수되는 장점을 가지고 있으나, 백혈구 감소증, 재생불량성 빈혈 등을 유발시킬 수 있는 것으로 알려졌다(Sillem and Martell, 1964; Pulido *et al.*, 1966). 그러나 키틴 및 키토산은 인체에 무해한 것으로 보고되고 있으며, 항체가 형성되지 않고 부작용이 없어 의료용 신소재로 많은 연구가 진행 중이다(김용부 등, 1988; Bough, 1975a,b).

키틴은 게, 새우등의 갑각류 외골격이나 균류, 조류와 같은 고등식물 등에 다량 함유되어 있는 천연 고분자로 폐수처리, 식품공업, 섬유공업, 화장품, 의약품 등에 이용되고 있다. 키틴을 탈아세틸화하여 키토산을 얻을 수 있으며, 이것은 유리 1차 아미노기가 증가되어 중금속에 우수한 흡착능을 갖는 것으로 보고된 바 있다(Hall and Yalpani, 1980; Maruca *et al.*, 1982).

Muzzarelli와 Tanfani(1982)는 dithiocarbamate chitosan을 제조하여 금속착화제로 이용하고자 하였으며, 김윤택(1993)은 dithiocarbamate chitosan을 지시제로 이용한 고분자성 tetracycline의 개발에 관한 연구를 하였다.

Sakaguchi 등(1979)은 인산기로 치환된 인산화 키토산을 이용하여 수중의 중금속 제거제로 이용해 분별과 탁월한 효과가 있다고 보고하였고, 최규식과 류영환(1990)은 황산화된 키토산계 분리용 소재의 제조와 금속이온 분리능에 관한 연구에서 키틴 및 키토산의 다공성 과립 및 구형의 성형제를 제조하여 금속이온의 분리능을 실험한 결과 Cu^{2+} 및 Ni^{2+} 의 제조효과가 있는 것으로 보고한 바 있다.

본 실험에서는 게를 산, 알칼리 처리하여 얻은 키틴과 키틴을 탈아세틸화하여 얻은 키토산 및 키토산을 알칼리성에서 CS_2 로 처리하여 얻어진 dithiocarbamate chitosan을 이용하여 수질내 카드뮴의 제거효과, 새꼬막내 카드뮴의 제거효과 및 새꼬막내 metallothionein의 농도변화를 측정하였다.

실험재료 및 방법

1. 실험재료

1) 새꼬막

새꼬막은 김제군 진봉면 심포항에서 구입하여 20일

동안 실험실에서 적응시킨 후 실험 재료로 이용하였다. 실험수로 사용한 수질상태는 수온을 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 로 pH는 6.5 - 7.0로 유지하였다. 또한 실험수조에 충분한 산소공급을 위하여 폭기시키면서 용존산소량(DO)을 6.0 - 8.0 mg/l로 유지하였다. 카드뮴을 부여하지 않은 조건에서 새꼬막내 카드뮴의 농도는 0.205 mg/kg이고, 납의 농도는 0.627 mg/kg 이었다.

2) Chitin 제조

시중에서 구입한 게의 껍질을 물로 세척하여 불순물을 제거한 후 2N-HCl 용액에 12시간 침적시켜 탄산칼슘을 용출해내고 분쇄하였다. 24시간 실온에서 방치한 후 충분히 세척한 다음 15°C 이하 온도에서 4% NaOH 수용액으로 24시간 동안 처리하여 단백질을 분해 제거하고 증류수로 세척하였다. 이와 같은 선과 알칼리 처리 작업을 5회 반복한 다음, 3% H_2O_2 1 N HCl 수용액으로 6시간 동안 실온에서 방치하여 색소를 산화시키고, 알칼리 처리한 다음 증류수, 에탄올, 에테르 순으로 세척한 후 건조하여 순백색 키틴을 얻었다. 이것을 분쇄하여 80 - 100 mesh/inch²의 키틴을 제조하였다.

3) Chitosan 제조

80-100 mesh/inch²의 키틴을 110°C 에서 47% NaOH 수용액으로 1시간 동안 처리하여 탈아세틸화시켰으며, 탈아세틸화도를 증가시키기 위하여 5회 반복 반응을 하여 키토산을 제조하여, 이것을 증류수로 충분히 세척한 다음 에탄올, 에테르 순으로 세척하여 70°C 에서 진공 건조시켰다.

4) Dithiocarbamate Chitosan 합성

키틴 분말 60g을 40% NaOH 수용액 1 liter를 넣고 110°C 로 8시간 가열한 후 이과하여 증류수로 충분히 세척한 다음 메탄올 500 ml와 임포니아 100 ml를 분산시키고 CS_2 60 ml를 넣어 2일간 실온에 방치한 후 여과하여 메탄올, 증류수로 7회 반복 세척하여 실온에서 건조시켜 건조기(desiccator)에 보관하였다.

2. 실험방법

1) 실험식이 및 처리

실험기간동안 수조내 수온은 $20 \pm 2^\circ\text{C}$, pH는 6.5 - 7.0 및 용존산소량(DO)은 6.0 - 8.0 mg/l로 유지하였

다. 실험군은 4개군으로 구분하여 각군에 20마리의 새꼬막을 투입하였다. 실험수의 카드뮴 농도는 CdCl₂를 이용하여 100 µg/l가 되도록 하였으며, 키티, 키토산 및 dithiocarbamate chitosan은 100 mg/l 농도로 하여 실험을 실행하였다.

2) 새꼬막 조직내 중금속 함량 분석

새꼬막의 껍질을 제거한 후 내장부분을 버리고 근육부분만을 증류수로 3회 세척한 후 냉동 건조기를 이용하여 건조시킨 다음, 시료 1 g을 취하여 킬날 플라스크에 넣고 c-HCl 5 ml와 c-H₂SO₄ 10 ml를 가한 후 150°C hot plate 상에서 분해액이 황색에서 무색이 될 때까지 c-HCl을 가하면서 유기물을 분해시켰다. 여기에 BTB 지시약 3방울을 떨어뜨리고, 암모니아수로 pH 9.5가 되도록 중화시킨 다음, (NH₄)₂SO₄ 용액(40 w/v%) 10 ml를 넣고 diethyl dithiocarbamate를 이용하여 작물을 만든 다음, methyl isobutyl ketone으로 중금속을 추출하여 원사 흡광광도계(Varium Spectra AA-30)로 중금속 함량을 분석하였다.

3) 새꼬막 조직내 metallothionein 함량 측정

새꼬막 연체부를 증류수로 충분히 씻은 후 조직 1 g을 취하여 생리식염수로 세척한 다음, 0.25 M sucrose 용액을 가하면서 Teflon glass homogenizer를 이용하여 조직을 균질화시켜 4°C에서 20분간 원심분리하였다. 이 조직액 0.2 ml에 0.03 M Tris-HCl(pH 8.0)완충용액을 첨가한 후 10 ppm의 CdCl₂ 1 ml로 포화시키고 실온에서 5분간 배양하였다. 여기에 rat RBC hemolysate 0.2 ml를 가하여 소량의 Cd과 MT를 제외한 모든 bioligand를 제거하고 Cd-bound hemoglobin을 100°C 수욕탕에서 1분간 정치하여 변성시킨 후 1000 g을 원심분리하여 상층액을 취하였다. 이상의 rat RBC hemolysate 첨가와 열처리 및 원심분리 과정을 3회 반복하여 얻은 시료의 카드뮴 농도를 측정에 이용하고 최종적인 MT 농도 계산은 카드뮴 6 g 원자와 1M의 MT(분자량 6,050)와 결합하는 것으로 환산하여 조직 g당 mgMT 농도를 계산하였다.

결 과

1. 키티, 키토산 및 dithiocarbamate chitosan 처리에 의한 수질내 카드뮴 농도 변화

CdCl₂를 이용하여 수조내의 카드뮴의 농도를 100 µg/l 되도록 한 후 키티, 키토산 및 dithiocarbamate chitosan을 처리한 결과 Table 1과 같은 결과를 얻었다. 카드뮴으로 처리한 후 키티으로 처리한 군의 수조내 카드뮴의 농도는 18.7% ~ 20.8% 감소 효과를 볼 수 있었으며, 처리기간을 길게 함에 따른 농도의 감소 효과는 거의 없었다(p>0.05). 카드뮴과 키토산을 동시에 처리한 군은 키티 처리군에 비하여 수조내 카드뮴이 약 10% 정도 감소하였다. Dithiocarbamate chitosan 처리한 군은 키티 및 키토산 처리군에 비하여 카드뮴이 현저히 감소하는 것을 볼 수 있었다(Table 1).

Table 1. Effect of cadmium concentration in water by chitin, chitosan and dithiocarbamate chitosan

| Group | Cadmium concentrations in water | | | |
|-------|---------------------------------|----------|----------|----------|
| | 1 week | 2 week | 3 week | 4 week |
| A | 100 | 100 | 100 | 100 |
| B | 81.3±3.1 | 80.6±3.7 | 79.2±1.9 | 80.4±1.5 |
| C | 73.5±2.5 | 71.2±3.1 | 70.1±4.1 | 72.7±2.7 |
| D | 38.6±1.9 | 37.3±2.5 | 37.3±2.5 | 38.1±2.6 |

A : cadmium 100 µg/l (Control)

B : cadmium 100 µg/l + chitin 100 mg/l

C : cadmium 100 µg/l + chitosan 100 mg/l

D : cadmium 100 µg/l + dithiocarbamate chitosan 100 mg/l

2. 키티, 키토산 및 dithiocarbamate chitosan 처리에 의한 새꼬막 조직내 카드뮴 농도

수조내의 카드뮴의 농도를 100 µg/l 되도록 하여 새꼬막을 사육시킨 결과, 시간이 지남에 따라서 새꼬막 조직내 카드뮴의 농도가 1.54 mg/kg (1주)에서 2.05 mg/kg(4주)로 증가하는 것을 볼 수 있었다. 카드뮴과 키티 처리군은 카드뮴 단독 처리군에 비해 카드뮴 농도가 약간 감소하였다(2.27% ~ 3.7%). 카드뮴과 키토산 처리군의 카드뮴의 농도는 1.25 mg/kg(1주)에서 1.72 mg/kg (4주)로 카드뮴 단독 처리군에 비하여 17.33% ~ 21.59% 감소하는 것을 볼 수 있었다. 또한 카드뮴과 dithiocarbamate chitosan 처리군의 카드뮴의 농도는 1.15 mg/kg(1주) ~ 1.49 mg/kg(4주)으로 나타났다. 이러한 결과를 볼 때 dithiocarbamate chitosan

Table 2. Effect of on accumulation of cadmium in *S. suberenata* by chitin, chitosan and dithiocarbamate chitosan.

| Group | Duration of administration | | | |
|-------|----------------------------|-------------|-------------|-------------|
| | 1 week | 2 week | 3 week | 4 week |
| A | 1.54 ± 0.31 | 1.76 ± 0.29 | 1.89 ± 0.27 | 2.05 ± 0.35 |
| B | 1.50 ± 0.27 | 1.71 ± 0.28 | 1.82 ± 0.27 | 1.98 ± 0.25 |
| C | 1.25 ± 0.18 | 1.38 ± 0.23 | 1.55 ± 0.19 | 1.72 ± 0.31 |
| D | 1.15 ± 0.26 | 1.24 ± 0.19 | 1.35 ± 0.20 | 1.49 ± 0.23 |

A : cadmium 100 μ g l (Control)
 B : cadmium 100 μ g l + chitin 100 mg l
 C : cadmium 100 μ g l + chitosan 100 mg l
 D : cadmium 100 μ g l + dithiocarbamate chitosan 100 mg l

에 의한 카드뮴의 제거율이 25.2%, 28.6%로 다른 처리군에 비하여 가장 큰 것을 알 수 있었다(Table 2).

3. 키틴, 키토산 및 dithiocarbamate chitosan 처리에 의한 새꼬막 조직내 Metallothionein 농도

카드뮴 단독 처리군과 카드뮴과 키틴 처리군에서의 새꼬막 조직내 metallothionein의 농도 변화는 거의 없었으나, 카드뮴과 키토산 처리군 및 카드뮴과 dithiocarbamate chitosan 처리군에서는 카드뮴 단독 처리군에 비해 metallothionein의 농도가 약간 증가하는 것을 볼 수 있었다. 특히 dithiocarbamate chitosan 처리군에서는 카드뮴 단독 처리군에 비해서 metallothionein의 농도가 23.5% ~ 33.3% 증가하였다(Table 3).

고 찰

카드뮴은 페인트, Cd축전지, 전기도금, 플라스틱 제조 등 공업 생산물로부터 배출되어 수질을 오염시키며, 수중에 함유되어 있는 물을 농업용수로 사용함에 따라서 농도에 카드뮴의 농축량을 증가시켜 이곳에서 배제되는 농작물에 축적되고, 이것을 식품으로 이용함에 따라서 인체에 농축된다고 보고하고 있다. 또한 공장폐수에서 배출되는 카드뮴이 강 주위의 하천에 서식하는 어패류에 카드뮴의 축적량을 증가시키고 있다. 따라서 먹이사슬에 의하여 최종 소비자인 인체에 축적

Table 3. Metallothionein concentration in *S. suberenata* by chitin, chitosan and dithiocarbamate chitosan

| Group | Duration of administration | | | |
|-------|----------------------------|-------------|-------------|-------------|
| | 1 week | 2 week | 3 week | 4 week |
| A | 0.15 ± 0.03 | 0.17 ± 0.02 | 0.18 ± 0.03 | 0.18 ± 0.04 |
| B | 0.15 ± 0.03 | 0.18 ± 0.02 | 0.18 ± 0.03 | 0.18 ± 0.03 |
| C | 0.17 ± 0.01 | 0.20 ± 0.03 | 0.21 ± 0.01 | 0.20 ± 0.03 |
| D | 0.19 ± 0.04 | 0.24 ± 0.02 | 0.24 ± 0.04 | 0.23 ± 0.02 |

A : cadmium 100 μ g l (Control)
 B : cadmium 100 μ g l + chitin 100 mg l
 C : cadmium 100 μ g l + chitosan 100 mg l
 D : cadmium 100 μ g l + dithiocarbamate chitosan 100 mg l

된 metallothionein의 축적이 인체에까지 전달 과정을 일으키는 것으로 보고되고 있다. 농성을 가진 카드뮴의 체내 대사작용은 세포막을 구성하는 단백질의 중합속과 친화력이 높은 sulfhydryl(SH)기와 결합하여 그 농도가 완화되는 것으로 보고되고 있으며, metallothionein은 cysteine이 있어 체내 저장 금속단백질을 형성시키는 것으로 보고되고 있다.

키틴, 키토산은 감귤껍질과 고등식물 등에 다량 함유되어 있어 자원용 풍부하나 거의 이용되지 못하였지만, 현재 그 이용량이 급격히 증가하고 있다(Mazzanti and Tanfani, 1981). 키틴, 키토산은 항균활성, 항종양 활성, 골다공증, 지하작물, 식품공업, 화장품, 섬유공업 및 폐수처리 등에 다양하게 이용되고 있다(Sakaguchi *et al.*, 1979). 키토산은 키틴을 탈아세틸화하여 얻어지며, 키토산은 유리아미노기의 증가로 중합속이온에 대하여 키틴보다 우수한 흡착능력을 가지고 있다고 보고되었다(Tong *et al.*, 1991).

키틴 유도체는 인체에 무해한 것으로 보고되고 있으며, 생체내 소화성이 좋고 성가공성이 용이하기 때문에 각종 의약품 소재로써 활용되고 있다. 또한 생체내 친화성이 있어 상처 치유의 촉진 효과를 가지며, 환경 단백질 등과 같은 혈액성분의 흡착능이 높아서 지혈효과가 있는 것으로 알려졌다(Marica *et al.*, 1982).

키틴은 아미노기를 가지고 있어서 양이온과 흡착할 수 있는 리간드 역할을 할 수 있기 때문에 카드뮴 2가 양이온이 아미노기에 흡착되어 착물을 이루어 카드뮴

배출효과가 있을 것으로 사료된다. 키토산은 키틴을 탈아세틸화하여 아미노기를 증가 시켰기 때문에 키틴보다 그 효과가 더 클 것으로 생각된다.

본 실험에서 나타난 수질내 카드뮴의 제거효과가 키틴에서 가장 낮은 흡착율을 보이는 것은 키틴내에 카드뮴과 착물을 형성할 수 있는 리간드가 적기 때문인 것으로 생각되며, 키토산은 금속과 안정한 착물을 형성할 수 있는 아미노기를 증가시키기 위하여 탈아세틸화도를 높였기 때문에 수중의 카드뮴의 제거율이 향상된 것으로 사료된다. Dithiocarbamate chitosan은 SH기가 있어서 -S-Cd-S-와 같은 결합을 형성하여 카드뮴의 제거 능력이 더욱더 증가되었다고 본다. 또한 새꼬막 조직내에 함유되어 있는 metallothionein은 키틴 처리군에서는 대조군과 거의 차이를 보이지 않는 것은 새꼬막 조직내 카드뮴의 제거효과가 낮은 것과 밀접한 상관성이 있는 것으로 생각된다($p < 0.05$). 또한 키토산 및 dithiocarbamate chitosan을 처리한 군에서는 키틴으로 처리한 군에 비하여 metallothionein의 함량이 높은 것을 볼 수 있는데 이는 metallothionein의 양이 증가할 수록 새꼬막 조직내 카드뮴의 제거효과가 큰 것으로 나타났다($p < 0.05$).

결 론

계 껍질에서 추출한 키틴, 키틴을 탈아세틸화하여 제조한 키토산 및 키토산을 알칼리성에서 CS_2 로 처리하여 얻어진 dithiocarbamate chitosan을 이용하여 수질내 카드뮴 제거효과를 조사하였고, 또한 새꼬막 조직내 카드뮴의 함량을 측정하고 metallothionein 생성량을 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 키틴, 키토산 및 dithiocarbamate chitosan 처리군에서의 카드뮴 제거효과는 각각 18.70% - 20.80%, 26.5% - 29.9%와 61.4% - 62.7%로 감소하는 결과로 보아 수조내 카드뮴 제거효율이 dithiocarbamate chitosan 처리군에서 가장 좋은 것을 볼 수 있었다.
2. 새꼬막 조직내 카드뮴 제거효과는 키틴 처리군에서 1.50 mg/kg(1주) - 1.98 mg/kg(4주)로 나타나 카드뮴 단독 처리군 1.54 mg/kg(1주) - 2.05 mg/kg(4주)에 비하여 약간 낮은 값을 보였으며, 키토산 처리군에서 1.25 mg/kg(1주) - 1.72 mg/kg(4주)로 키틴에 비하여 키토산의 제거율이 증가되었으며, dithiocarbamate chitosan 처리군에서는 1.15 mg/kg(1주) - 1.49 mg/kg

(4주)으로 카드뮴 제거율이 가장 높은 것을 알 수 있었다.

3. 새꼬막 조직내 metallothionein의 농도는 각 처리군에서 별 차이가 없었으나 dithiocarbamate chitosan 처리군에서 약간 높은 값을 보였다.

참 고 문 헌

- 김용부, 최규석, 정택상, 김창기 (1988) Chitosan의 황유도 체계 킬레이트 고분자의 합성 및 금속이온 흡착특성에 관한 연구. 한국고분자학회지, 12: 88-98.
- 김윤택 (1993) Chitosan 및 dithiocarbamate chitosan을 지지체로 이용한 고분자성 tetracycline의 개발에 관한 연구. 부산대학교 박사학위논문, pp. 1-107.
- 이병철 (1988) 흰쥐에서 만성 납중독이 뇌의 biogenic Amine함량에 미치는 영향. 연세의대학위논문집, 20: 225-241.
- 원종훈 (1979) 한국산 어패류 중의 수은, 카드뮴, 납, 구리의 함량. 한수지, 6(1): 31-42.
- 최규석, 류영환 (1990) 황성화된 chitosan계 분리용 소재의 제조와 금속이온분리능에 관한 연구. 고분자학회지, 14(4): 404-416.
- Bough, W.A. (1975a) Coagulation with chitosan acid to recovery of by productions from agg-breaking wastes. *Poultry Sci.* 54: 354-359.
- Bough, W.A. (1975b) Reduction suspended solids in vegetable scanning waste effulents by coagulation with chitosan. *J. Food Sci.* 40: 782-801.
- Eaton, D.L. and Toal, B.F. (1982) Evaluation of Cd-hemoglobin affinity assay for the rapid determination of metallothionein in biological tissues. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 66: 134-136.
- Hall, L.D. and Yalpani, M. (1980) Enhancement of the metal chelating properties of chitin and chitosan. *Carbohydrate Research*, 83: 15-17.
- Kagi, J.H.R. and Vallee B.L. (1961) Metallothionein: A cadmium and zinc containing protein from equine renal cortex. *J. Biol. Chem.*, 236: 2435-2442.
- Maruca, R., Suder, B.J. and Wightman, J. (1982) Interaction of heavy metals with chitin and chitosan III, Chromium. *J. Applied Polymer Science*, 27: 4827-4837.
- Meyer, W.E., Lewis, D.H., Vanderneer, R.K. and Lofgren, C.S. (1981) Polymer containing pendent

- insecticides, Proceedings of the controlled Release of Bioactive Materials Symposium, Fort Lauderdale, Florida, pp. 171.
- Muzzarelli, R.A.A. and Tanfani, F. (1981) The production of chitosans of superior quality, *J. Appl. Biochem.*, 3: 316-321
- Muzzarelli, R.A.A. and Tanfani, F. (1982) N-(o-carboxybenzyl)chitosan, N-carboxy-methyl chitosan and dithiocarbamate chitosan: New chelating derivatives of chitosan. *Pure & Appl. Chem.*, 54(11): 2141-2149.
- Pulido, P., Kagi, J.H.R. and Vallee, B.L. (1966) Isolation and some properties of human metallothionein. *Biochemistry*, 5: 1768-1777.
- Sakaguchi, T. Horikoshii and Vakajima A. (1979) Adsorption of heavy metal ions by chitin phosphate and chitosan phosphate, *Nippon Nogeidagaki Kaishi*, 53(5): 149-156.
- Sillen, L. and Martell, A. (1964) Stability constants of metal-ion complexes. compiled for IUPAC, London: *The Chemical Society*, 6(1): 67-75.
- Tong, P., Baba, Y., Adach, Y. and Paba, K. (1991) Adsorption of metal ions on a new chelating ion-Exchange resin chemically derived from chitosan. *Chemistry Letters*, 7: 1529-1532.
-