

한외여과막 효소반응기를 이용하여 제조한 키토산 올리고당의 칼슘흡수 촉진효과

전유진 · 김규형* · 박표잠 · 김세권¹
부경대학교 화학과, *키토라이프 기술연구소

Calcium Absorption Accelerating Effect of Chitosan Oligosaccharides prepared by Ultrafiltration Membrane Enzymatic Reactor

You-Jin JEON, Gyu-Hyung KIM*, Pyo-Jam PARK and Se-Kwon KIM¹

Dept. of Chemistry, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

*KITTO LIFE R & D CENTER, Pyungtaek 459-040, Korea

In spite of various bio-functionalities of chitosan, the effects *in vivo* were still ambiguous because of its low absorption on organism. Therefore, chitosan oligosaccharides (COSs) are necessary to elucidate for an efficient utilization *in vivo*. COSs were prepared from chitosan using ultrafiltration membrane enzymatic reactor system with MWCO (molecular weight cut-off) 3,000 Da of membrane. Calcium absorption accelerating effect using COSs was examined by two methods, *in vitro* and *in vivo*. *In vitro* experiment, calcium absorption by the addition of COSs in a mixture solution of calcium and phosphate was higher approximately 50% than that by control. *In vivo* using rats, group taken the diet contained 1% COSs and calcium chloride decreased about 75% of calcium content excreted from feces, and then, showed about 15% increase in breaking force of femur. These results demonstrated that COSs definitely involved in calcium metabolism *in vivo*.

Key words: chitosan oligosaccharide, calcium absorption, ultrafiltration membrane, breaking force of femur, rat

서 론

키토산은 지구상에서 셀룰로오스 다음으로 풍부하게 생산되는 천연 다당류로서 주로 갑각류의 껍질, 버섯 및 곰팡이의 세포벽 등에 분포하고 있다. 키토산의 화학구조는 주로 β-(1→4)-2-acetamido-D-glucose 단위가 반복되는 고분자형태를 취하고 있으며, 이것이 강알칼리로 처리되면 탈아세틸화반응에 의해 키토산으로 변형된다. 키토산은 일반적으로 β-(1→4)-2-amido-D-glucose 단위가 전체의 90% 이상을 차지하고 있는 경우를 말하며 (Andrady and Xu, 1997), hexose 반복단위의 두 번째 탄소위치의 아미노기는 pH 2~6의 산성 용액에서 양이온을 형성하면서 쉽게 녹는다. 키토산·키토산은 최근 많은 생리기능성이 밝혀짐으로써 크게 주목을 받고 있으며, 특히 면역증강에 의한 항종양활성 (Suzuki, 1996; Tsukada et al., 1990; Tokoro et al., 1988; Suzuki et al., 1986), 항균활성 (Yamada et al., 1993; Tokoro et al., 1989; Hirano and Nagao, 1989; Uchida et al., 1988; Kendra et al. Hadwiger, 1984), 콜레스테롤 저하작용 (次田隆志 and 坂本廣司, 1995; Maezaki et al., 1993) 및 고혈압 조절작용 (奥田拓道, 1995) 등에 많은 연구가 이루어져 왔다.

키토산은 고분자 polycation을 함유한 mucopolysaccharide로서 체내의 지질, 콜레스테롤, 중금속, 방사능오염물질 등을 배출하는 역할을 수행하며 (Deuchi et al., 1994; 渡辺 et al., 1995; Nishimura et al., 1994), 또한 칼슘이나 철과 같은 체내 필수 미네랄 등도 일부 배출하는 것으로 알려져 있다 (Wada et al., 1997). Gordon and Williford (1983)는 키토산을 다량으로 랫트에게 연속적으로

섭취시켰을 때 철분의 흡수가 약간 저하하였다고 보고하였는데, 이러한 결과는 키토산이 강력한 금속 결합성을 가지고 있다는 것을 증명하는 것이다.

그러나, 대부분의 동물, 특히 인간의 위장관에는 키토산을 직접 분해할 수 있는 chitosanase가 없기 때문에 셀룰로오스와 마찬가지로 체내에 흡수되지 못하고 체외로 배설되는 dietary fiber로서 작용할 가능성이 매우 높다 (Weiner, 1991). 따라서 체내 칼슘의 흡수촉진을 위해서는 키토산을 올리고당의 형태로 섭취하는 것이 체내 흡수율의 측면에서 매우 유리할 것으로 판단된다.

본 연구에서는 이전의 보고 (Kim and Jeon, 1997)에 따라 한외여과막 효소반응기에서 제조한 키토산 올리고당을 이용하여 생체 내 칼슘흡수 촉진효과를 *in vitro* 및 *in vivo* 두가지 방법으로 검토하였다.

재료 및 방법

1. 재료

키토산은 탈아세틸화도가 89%, 점도 20cps이며, 키토산의 가수분해에 이용되는 chitosanase (*Bacillus pumilus* BN-262 유래) 및 키토산 올리고당 표준품 (중합도 2에서 7까지)은 일본 Wako Pure Chemical Industries, Ltd.에서 구입하였으며, D-glucosamine은 Sigma Co.에서 구입하였다. 키토산 올리고당 제조에 이용되는 한외여과막 반응기 시스템은 Millipore Co.로부터 구입하였다. 칼슘 화합물은 전보 (Kim et al. 1998)의 방법을 이용하여 글썬질로

¹ Corresponding author. Fax: 82-51-628-8147; E-mail: sknkim@dolphin.pknu.ac.kr

Table 1. The composition of diets

(g/kg)

Ingredients	Basal (Ca deficient)	Control (CaCO ₃)	Non-addition		COS			
					1%		3%	
					CaCl ₂	CaHPO ₄	CaCl ₂	CaHPO ₄
ISP ¹	200	200	200	200	200	200	200	200
DL-Methionine	3	3	3	3	3	3	3	3
Starch	562.5	550.01	547.65	563.03	537.65	553.03	517.65	533.03
Fiber	50	50	50	50	50	50	50	50
Corn oil	100	100	100	100	100	100	100	100
Min. mix. ²	35	35	35	35	35	35	35	35
Vit. mix. ³	10	10	10	10	10	10	10	10
Choline Chloride	2	2	2	2	2	2	2	2
PEG #4000	20	20	20	20	20	20	20	20
KH ₂ PO ₄	17.5	17.5	17.5	—	17.5	—	17.5	—
COS ⁴	—	—	—	—	10	10	30	30
CaCO ₃ ⁵	—	12.49	—	—	—	—	—	—
CaCl ₂ ⁶	—	—	14.85	—	14.85	—	14.85	—
CaHPO ₄ ⁷	—	—	—	16.97	—	16.97	—	16.97

¹ISP : Isolated soy protein²Calcium-free mineral mixture (AIN-76)³Vitamin mixture (AIN-76)⁴COSs : Chitosan oligosaccharides⁵CaCO₃ contained 40.04% Ca⁶CaCl₂ contained 36.11% Ca⁷CaHPO₄ contained 29.46% Ca

부터 칼슘화합물을 제조한 것을 사용하였으며, 칼슘흡수 촉진효과의 검토에 사용될 실험동물은 115~125g의 수컷 흰쥐 (Sprague-Dawley rats, male)로서, 서울대학교 실험동물 사육장에서 구입하였다. 또한 대두 단백질 (isolated soy protein, ISP : PP500E)은 Ralston Purina International Co.에서 비타민 혼합물 (AIN-76 type)은 Oriental 酵母工業 (東京)에서 구입하였다. 그의 사용된 모든 시약은 분석용 특급을 사용하였다.

2. 키토산 올리고당의 제조

키토산 올리고당은 한외여과막 효소반응기 시스템하에서 분자량 한계범위 (molecular weight cut off: MWCO)가 각각 3,000 daltons인 막을 사용하여 효소적 가수분해로 제조하였다 (Kim and Jeon, 1997).

3. 키토산 올리고당 조성의 분석 및 분자량 측정

키토산 올리고당의 조성 분석은 TSKgel NH2-60 역상 컬럼 (4.6 × 250 mm, TOSOH Manufacturing Co., Ltd.)의 고속액체크로마토그래피 (high performance liquid chromatography: HPLC, Spectra Physics P2000)로 분석하였다. 시료분석은 반응액과 아세트 니트릴이 1 : 1 (v/v)로 혼합된 시료 20 μl를 컬럼에 주입한 후, 물과 아세트니트릴 40 : 60의 비로 함유된 용매로서 분당 0.8 ml의 유속으로 용출시켰다. 키토산 올리고당의 피크는 굴절률 검출기 (refractive index detector)로 검출하였다.

4. 칼슘흡수 촉진효과 측정

키토산 올리고당에 의한 칼슘흡수 촉진효과의 *in vitro* 시험은 Naito (1986)의 방법에 의해 시간경과에 따른 인산칼슘의 침전

형성 저지능으로 측정하였다. 즉, 시료 40 μg을 20 mM 인산수소 나트륨 (Na₂HPO₄) 용액 1 ml에 첨가한 후 20 mM 염화칼슘용액 0.25 ml를 가하여 37°C에서 0~12시간동안 반응시켜 원심분리 (1,500 × g, 5분)하여 얻은 상층액을 ICP (inductively coupled plasma) spectrometer (SPS 1200A plasmaspectrometer S II)를 사용하여 칼슘농도를 측정하였다.

랫트를 이용한 *in vivo* 시험법에서의 칼슘의 체내 흡수효과는 갖 이유한 3주령의 수컷 랫트를 3주간 칼슘 결핍식을 급여시켜 칼슘결핍을 유도하였고, 이후 3주간 칼슘이 첨가된 실험식을 제공하였다. 실험식이군은 대조군을 포함하여 키토산 올리고당 무첨가군, 1% 및 3% (w/w)첨가군으로 나누어 사육하였으며, 사용된 식이의 조성은 Table 1에 나타내었다. 시료 채취는 실험 최종일에 실험동물을 12시간 절식시킨 후 식이를 1.5시간동안 급여시켰다. 실험 종료 4일전까지 매일 동일한 시간에 24시간동안 수집된 뇨와 분을 채취하여 칼슘함량을 측정하였다. 또한 랫트의 양쪽 대퇴골을 적출하여 뼈의 골절강도를 instron (Instron Universal Testing Instrument, Model 1011)으로 측정하였다.

5. 통계분석

모든 결과는 평균 ± 표준오차로 제시하였으며, 유의성 검증은 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 이용하여 통계처리하였다.

결 과

1. 키토산 올리고당의 조성 및 분자량

한외여과막 효소반응기 시스템에서 키토산으로부터 제조된 키

토산 올리고당의 조성을 TSKgel NH2-60 컬럼이 장착된 HPLC로 분석한 것을 Fig. 1에 나타내었다. Fig. 1에서 볼 수 있듯이, 키토산 올리고당의 주분포는 표준물질인 chitobiose~chitoheptaose와 비교하였을 때 3당류~5당류이며 이들의 총 함량은 70% 이상이었다. 그리고 강력한 항종양활성 및 항균활성을 가진 것으로 알려져 있는 6당류와 7당류도 각각 14.2%와 11.3%로 높게 함유되어 있었으며, 상대적으로 저분자량인 2당류의 함량은 2.0%로 매우 낮았다. 그리고 단당류인 D-glucosamine은 전혀 검출되지 않은 것으로 보아, 이는 키토산의 가수분해에 이용된 *Bacillus* 유래 chitosanase에 의해서는 생성되지 않은 것으로 판단된다.

2. 칼슘흡수촉진효과

키토산은 체내 미네랄의 감소를 일으킬 가능성이 몇몇 보고 (Deuchi et al., 1995; Gordon and Williford, 1983)에서 제시되었다. 이러한 원인은 키토산이 고분자 물질의 dietary fiber로서의 역할을 수행하기 때문에 일어나는 현상이므로, 생체 흡수율이 높은 키토산 올리고당을 이용함으로써 이러한 효과를 방지할 수 있을 뿐만 아니라 칼슘의 체내 흡수를 촉진시킬 것으로 기대된다.

본 실험에서는 키토산 올리고당의 C-2 위치에 있는 아미노기와 C-6 위치의 카르복실기가 칼슘과 킬레이트결합 및 이온결합에 의해 칼슘의 체내흡수율이 증가될 것으로 판단되어, 그에 대한 *in vitro* 및 *in vivo* 시험으로 검토하였다.

1) *In vitro* 실험에 의한 칼슘흡수촉진 효과

20 mM의 염화칼슘 0.25 ml에 효소분해로 가수분해한 키토산 올리고당을 넣고 20 mM의 인산칼슘 1 ml를 첨가하여 0~12 시간 방치한 후 원심분리하여 침전된 인산칼슘을 제거하고 남아 있는 칼슘농도를 ICP spectrometer로 분석하였다. 전체적으로 침전 반응 후 2시간까지는 칼슘 이온 농도가 급격하게 감소하였지만 그 이후로는 일정한 농도를 유지하였으며, 키토산 올리고당의 첨가는 무첨가에 비해 약 50% 향상된 효과를 나타내었다 (Fig. 2). 이러한 결과는 키토산 올리고당의 아미노기와 카르복실기가 효율적으로 칼슘과 결합하여 칼슘을 가용화한 상태로 존재하도록 하였기 때문에, 체내 칼슘의 흡수율이 증가될 것으로 기대되었다.

2) *In vivo*에 의한 칼슘흡수촉진 효과

대사실험 기간동안 분과 뇨를 통한 1일 칼슘 배설량을 측정한 결과 (Table 2), 칼슘을 결핍시킨 군에서는 분과 뇨중 배설량이 크게 감소되어 칼슘결핍 상태에 있는 것을 알 수 있다. 여기서 분중 칼슘의 감소는 식이중 칼슘의 부족으로 인한 것이고, 뇨중 칼슘의 감소는 식이중 칼슘 부족으로 인한 칼슘 결핍을 최소화하기 위해 재흡수가 촉진되었기 때문이다. 키토산 올리고당을 섭취시킨 경우 뇨를 통한 1일 배설량은 유의적인 차이가 없었으나 올리고당을 1% 첨가하였을 경우, 분을 통한 칼슘의 배설량은 감소하였다. 이것은 뇨에 비하여 유의적 차이가 명확하게 나타났다. 즉, 칼슘화합물을 키토산 올리고당의 첨가없이 단독적으로 섭취시켰을 경우, 대조군보다 약 50% 칼슘 배설량이 감소하였고, 여기에 올리고당을 1% 첨가하였을 때는 70~75%의 칼슘 배설량 감소가 일어났으나, 그 이상의 올리고당 첨가(3%)에서는 오히려 칼슘 배설량이 증가되었다. 칼슘화합물의 형태는 염화칼슘이 인산화칼슘보다 흡수율이 약 7% 효율적이었는데, 이러한 결과는 올리고

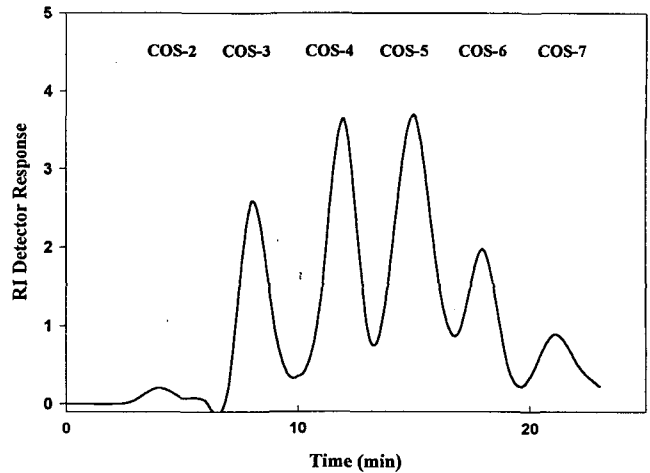


Fig. 1. HPLC chromatogram of chitosan oligosaccharides (COSs) obtained by enzymatic hydrolysis of chitosan in ultrafiltration membrane reactor. The components of COSs were separated and analyzed on TSKgel NH2-60 column (4.6×250 mm) and detected by monitoring the refractive index at ×8 attenuation. Standard materials: COS-2; Chitobiose dihydrochloride, COS-3; Chitotriose trihydrochloride, COS-4; Chitotetraose tetrahydrochloride, COS-5; Chitopentaose pentahydrochloride, COS-6; Chitohexaose hexahydrochloride, COS-7; Chitoheptaose heptahydrochloride.

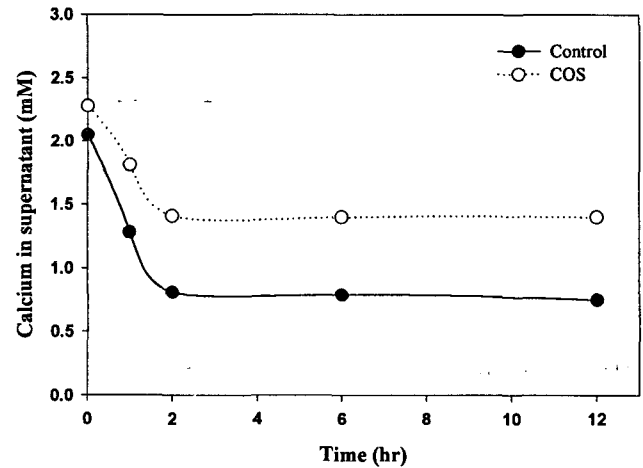


Fig. 2. Effect of COSs on calcium absorption *in vitro*. The effect was estimated as inhibitory ability on precipitation of calcium phosphate *in vitro*. One ml of 20 mM PO_4^{3-} was added to a mixture of 0.25 ml of 20 mM Ca^{2+} and 40 μg COS at pH 7.0. After various time, the concentration of soluble calcium in the supernatant solution was analyzed with ICP spectrometer.

당이 적정량 이상 섭취되었을 경우 칼슘의 흡수를 저해한다는 사실을 말해주고 있다. 결국, 뇨와 변을 통한 칼슘의 배설은 키토산 올리고당을 1% 정도 식이에 첨가하는 것이 가장 효율이 높음을 알 수 있었다.

3주간 칼슘을 결핍시킨 랫트에 칼슘을 키토산 올리고당과 함께 섭취시켰을 때의 대퇴골 회분량과 칼슘함량 및 뼈의 골질강도의 변화를 Table 3에 나타내었다. 칼슘이 결핍된 흰쥐에게 염화

Table 2. Daily fecal and urinary Ca excretion in calcium deficient model rats fed experimental diets

	Fecal excretion (mg/d)	Urinary excretion (mg/d)
Ca-Deficient	14.16 ± 1.75	0.13 ± 0.01
Control	64.10 ± 2.12 ^{a1}	0.89 ± 0.65 ^{NS2}
CaCl ₂	30.41 ± 3.31 ^b	1.37 ± 0.66
CaHPO ₄	32.13 ± 5.84 ^b	1.53 ± 1.18
CaCl ₂ +COSs (1%)	14.41 ± 2.20 ^c	0.43 ± 0.21
CaHPO ₄ +COSs (1%)	21.10 ± 4.41 ^{bc}	0.30 ± 0.02
CaCl ₂ +COSs (3%)	29.97 ± 3.66 ^b	0.87 ± 0.36
CaHPO ₄ +COSs (3%)	30.36 ± 4.11 ^b	0.47 ± 0.21

Values are mean ± SE of 6 rats

¹Superscripts with different alphabets in columns are significantly different at the 0.05 level by Duncan's multiple range test

²Not significantly different at the 0.05 level

Table 3. Effect of COSs on the ash and Ca content, and breaking force of femur in calcium deficient diet induced rats

	Ash (mg)	Ca (mg)	Breaking force (kg)
Ca-Deficient	102.50 ± 2.61	29.03 ± 1.07	2.58 ± 0.60
Control	268.75 ± 10.24 ^{bc1}	92.93 ± 4.45 ^{bc}	8.48 ± 0.48 ^{ab}
CaCl ₂	255.33 ± 4.73 ^c	89.41 ± 2.35 ^c	8.80 ± 0.54 ^{ab}
CaHPO ₄	267.97 ± 6.25 ^{bc}	92.29 ± 1.85 ^{bc}	9.25 ± 0.49 ^{ab}
CaCl ₂ +COSs (1%)	299.65 ± 16.03 ^{ab}	107.76 ± 5.79 ^a	10.15 ± 0.53 ^a
CaHPO ₄ +COSs (1%)	272.34 ± 10.55 ^{bc}	95.31 ± 2.84 ^{bc}	8.60 ± 0.66 ^{ab}
CaCl ₂ +COSs (3%)	326.25 ± 10.30 ^a	103.55 ± 3.11 ^{ab}	9.15 ± 0.73 ^{ab}
CaHPO ₄ +COSs (3%)	257.68 ± 10.95 ^c	97.47 ± 5.54 ^{abc}	8.12 ± 0.43 ^b

Values are mean ± SE of 6 rats

¹Superscripts with different alphabets in columns are significantly different at the 0.05 level

칼슘과 인산칼슘을 각각 단독적으로 섭취시켰을 때는 모든 항목에서 유의차가 없었으나, 염화칼슘에 올리고당을 함께 섭취시켰을 때는 모든 항목에서 유의적으로 증가하였다. 특히 1% 키토산 올리고당을 염화칼슘에 첨가하여 섭취시킨 후, 측정된 대퇴골의 골절강도는 대조군보다 약 20%, 올리고당 무첨가군보다 약 15% 증가를 보였으며, 대퇴골의 칼슘함량은 대조군보다 약 16%, 올리고당 무첨가군보다 약 20% 증가를 보여 칼슘의 체내 흡수효율을 크게 개선시킨 것으로 나타났다. 키토산 올리고당의 첨가량은 3% 보다는 1%가 효율적이었으며 인산칼슘의 형태보다는 염화칼슘의 형태가 좀 더 우수하였다.

고 찰

키틴과 그것의 탈아세틸화된 키토산은 지구상에서 셀룰로오스 다음으로 풍부한 천연 다당류 물질로서 최근에 신기능성 소재로 많은 주목을 받고 있다.

키토산과 셀룰로오스의 공통점은 장내 노폐물 배출, 지질 및 콜레스테롤의 흡수저해 등이 있으며, 차이점은 키토산이 셀룰로

오스와는 달리 칼슘의 체내 흡수를 촉진하여 골다공증의 예방으로서의 역할을 수행한다 (伊藤, 1995). 즉, 키토산은 마크로파지 유래 성장인자 (macrophage derived growth factor)를 매개로 하여 골아세포와 연골세포의 증식을 촉진하고 동시에 인터루킨 1을 활성화시킴으로써 뼈의 흡수를 촉진하고 결과적으로 뼈의 체내대사를 촉진한다고 설명하였다.

Deuchi et al. (1995)은 키토산을 다량으로 랫트에게 연속적으로 섭취시켰을 때 체내 칼슘이 약 60~70%로 감소하였다고 보고하였으며, Wada et al. (1997)은 비록 키토산이 생체내 독성이 없다고 하지만, 장기간 섭취할 때에는 칼슘의 대사에 영향을 미치는 것으로 보고하였다.

본 연구에서는 식이섭유로서 작용하는 키토산보다는 체내 흡수율이 높은 키토산 올리고당을 섭취시킴으로써 체내 칼슘의 흡수 촉진을 검토하였다. 그 결과, 키토산 올리고당 1%만을 염화칼슘과 함께 랫트에 섭취시켰을 경우 변으로 배출되는 칼슘량은 약 75% 감소하였으며, 대퇴골의 뼈골절강도는 대조군보다 약 20%, 올리고당 무첨가군보다 약 15% 증가하였다. 이러한 결과는 칼슘 보충제로 널리 알려져 있는 casein phosphopeptide (CPP)를 3.5% 첨가시켰을 때 대퇴골의 강도가 6.2% 증가하였다는 결과와 비교해 볼때 좀 더 우수한 것으로 나타났다. 따라서 키토산 올리고당은 명확히 체내 칼슘의 흡수를 촉진시키는 것으로 판단되었다.

伊藤 (1995)은 키토산을 함유한 탄산칼슘 혼합 체제를 골다공증 환자에게 섭취시켰을 때 골밀도의 개선이 확인되었다고 보고한 바 있다. 물론 칼슘과 같이 다량으로 섭취하게 되는 미네랄은 키토산에 의한 칼슘의 흡수가 촉진될 수도 있으나 다른 종류의 필수 미네랄의 감소를 가져올 수 있다. 이에 비해 올리고당에 의한 칼슘의 흡수촉진효과는 단지 소량의 첨가에 의해서도 효과가 크기 때문에, 동시에 다른 미네랄들의 흡수효율도 함께 증진시킬 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

최근 다양한 기능성의 발현으로 크게 각광받고 있는 키토산 올리고당을 이용하여 칼슘의 체내 흡수율의 효과에 미치는 영향을 *in vitro* 및 랫트를 이용한 *in vivo*에 의해 검토하였다.

1. 제조된 키토산 올리고당은 3당류~5당류가 주로 분포되어 있었으며, 이들의 총 함량은 70% 이상이었다. 그리고 강력한 항종양활성 및 항균활성을 가지는 것으로 알려져 있는 6당류와 7당류도 각각 14.2%와 11.3%로 비교적 높게 함유되어 있었다.

2. *In vitro*에서, 키토산 올리고당의 첨가는 무첨가에 비해 칼슘의 흡수율을 약 50% 향상시킨 것으로 나타났다.

3. 키토산 올리고당 1%만을 염화칼슘과 함께 랫트에 섭취시켰을 경우, 변으로 배출되는 칼슘량은 약 75% 감소하였으며, 대퇴골의 뼈골절강도는 대조군보다 약 20%, 올리고당 무첨가군보다 약 15% 증가하였다.

4. 이상의 결과를 종합적으로 검토하면, 키토산 올리고당은 칼슘의 체내 흡수율을 명확히 향상시키는 것으로 판단되었다.

참 고 문 헌

- Andrady, A.L. and P. Xu. 1997. Elastic behavior of chitosan films. *J. Poly. Sci.: Part B: Poly. Phys.*, 35, 517~521.
- Deuchi, K., O. Kanauchi, M. Shizukuish and E. Kobayashi. 1995. Continuous and massive intake of chitosan effects mineal and fat-soluble vitamin status in rats fed on a high-fat diet. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 1211~1216.
- Deuchi, K., O. Kanauchi, Y. Imasato and E. Kobayashi. 1994. Decreasing effect of chitosan on the apparent fat digestibility by rats fed on a high-fat diet. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 1613~1616.
- Gordon, D.T. and C.B. Williford. 1983. Chitin and chitosan: influence on element absorption in rats. *ACS Symposium Series 214, Unconventional Source of Dietary Fibers*, 156~184.
- Hirano, S. and N. Nagao. 1989. Effects of chitosan, pectic acid, lysozyme, and chitinase on the growth of several phytopathogens. *Agric. Biol. Chem.*, 53, 3065~3066.
- Kendra, D.F. and L.A. Hadwiger. 1984. Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antigungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*. *Exp. Mycol.*, 8, 276~281.
- Kim, S.K. and Y.J. Jeon. 1997. Production of chitosan oligosaccharide using enzyme in an ultrafiltration membrane reactor. *In Proceedings of the International Symposium and 1997 Spring Meeting of the Japanese Society for Chitin and Chitosan*, Shizuoka, Japan, 144~145.
- Kim, G.H., Y.J. Jeon, H.G. Byun, Y.S. Lee, E.H. Lee and S.K. Kim. 1998. Effect of calcium compounds from oyster shell bound fish skin gelatin peptide in calcium deficient rats. *J. Korean Fish. Soc.*, 31 (2), 149~159 (in Korean).
- Maizaki, Y., K. Tsuji, Y. Nakagawa, Y. Kawai, M. Akimoto, T. Tsugita, W. Takekawa, A. Terada, H. Hara and T. Mitsuoka. 1993. Hypocholesterolemic effect of chitosan in adult males. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 1439~1444.
- Naito, H. 1986. The mechanism of enhancement in intestinal calcium absorption with phosphopeptides derived during casein digestion. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, 39, 433~439 (in Japanese).
- Nishimura, Y., I. Kakuta, H. Takeda, J. Inaba, K. Imai, K. Watari and N. Matsusaka. 1994. Effect of natural chelating agents on the intestinal absorption of radiostromium in rats. *Radiat. Protect. Dosim.*, 53, 331~334.
- Suzuki, K. 1996. Studies on biological effects of water soluble lower homologous oligosaccharides of chitin and chitosan. *Fragrance J.*, 15, 61~68.
- Suzuki, K., T. Mikami, Y. Okawa, A. Tokoro, S. Suzuki and M. Suzuki. 1986. Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose. *Carbohydr. Res.*, 151, 403~408.
- Suzuki, K., Y. Okawa, S. Suzuki and M. Suzuki. 1987. Candidacidal effect of peritoneal exudate cells in mice administered with chitin or chitosan: The role of serine protease on the mechanism of oxygen-independent candidacidal effect. *Microbiol. Immunol.*, 31, 375~379.
- Tokoro, A., M. Kobayashi, N. Tatekawa, S. Suzuki and M. Suzuki. 1989. Protective effect of N-acetyl chitohexaose on *Listeria monocytogens* infection in mice. *Microbiol. Immunol.*, 33, 357~367.
- Tokoro, A., N. Tatewaki, K. Suzuki, T. Mikami, S. Suzuki and M. Suzuki. 1988. Growth-inhibitory effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose against Meth-A solid tumor. *Chem. Pharm. Bull.*, 36, 784~790.
- Tsukada, K., T. Matsumoto, K. Aizawa, A. Tokoro, R. Naruse, S. Suzuki and M. Suzuki. 1990. Antimetastatic and growth-inhibitory effects of N-acetylchitohexaose in mice bearing Lewis lung carcinoma. *Jpn. J. Cancer Res.*, 81, 259~265.
- Uchida, Y. and M. Izume and A. Ohtakara. 1988. Preparation of chitosan oligomers with purified chitosanase and its application. *In Proceedings from the 4th International Conference on Chitin and Chitosan*, Trondheim, Norway, pp. 373~382.
- Wada, M., Y. Nishimura, Y. Watanabe, T. Takita and S. Innami. 1997. Accelerating effect of chitosan intake on urinary calcium excretion by rats. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 1206~1208.
- Weiner, M.L. 1991. An overview of the regulatory status and of the safety of chitin and chitosan as food and pharmaceutical ingredients, *In Proceedings from the 5th International Conference on Chitin and Chitosan*, Princeton, USA, pp. 663~672.
- Yamada, A., N. Shibbuya, O. Kodama and T. Akatsuka. 1993. Induction of phytoalexin formation in suspension-cultured rice cells by N-acetyl chito oligosaccharides. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 405~409.
- 渡辺嘉人, 西村義一, 湯川雅枝. 1995. 키토산의 장기攝取가 랫트의微量元素代謝에 及ぼす影響, *キチン・キトサン研究*, 1, 84~85.
- 奥田拓道: 血壓調節とキトサンの役割, *月刊フドケミカル*, 2, 33~38 (1995).
- 伊藤不二不. 1995. 骨粗鬆症に對す補助食品キトサンの役割, *月刊フドケミカル*, 2, 39~44.
- 次田隆志, 坂本廣司. 1995. 키토산의 콜레스테롤改善作用と食品への利用, *月刊フドケミカル*, 2, 45~50.

1999년 3월 2일 접수

1999년 4월 17일 수리