

(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)(51) Int. Cl.<sup>7</sup>C08B 37/08  
A61K 31/722  
A61K 35/84(11) 공개번호 10-2005-0061517  
(43) 공개일자 2005년06월22일(21) 출원번호 10-2005-7005950  
(22) 출원일자 2005년04월07일  
번역문 제출일자 2005년04월07일  
(86) 국제출원번호 PCT/JP2003/012920  
국제출원일자 2003년10월08일(87) 국제공개번호 WO 2004/033502  
국제공개일자 2004년04월22일

(30) 우선권주장 JP-P-2002-00295379 2002년10월08일 일본(JP)

(71) 출원인 가부시끼가이샤 리코무  
일본국 도쿄도 토시마쿠 미나미이케부쿠로 1초메 19반 12고(72) 발명자 오카자키, 히데오  
일본 도쿄 207-0014, 히가시야마토-시, 난가이, 1-36-14  
하마야, 타다오  
일본 도쿄 112-0002, 분쿄-구, 코이시카와, 5-1-11  
쿠리하라, 쇼이치  
일본 도쿄 135-0016, 코토-구, 토요, 5-17-9

(74) 대리인 백남훈

심사청구 : 있음

## (54) 키토산 함유 다당, 그 제조방법 및 용도

## 명세서

## 기술분야

본 발명은 신규한 키토산 함유 다당, 그 제조방법, 이를 유효성분으로 함유하는 의약조성물 및 식품에 관한 것이다.

## 배경기술

현재까지 게, 새우 등 갑각류의 키토산(이하 게키토산이라 칭함)의 성질, 제조방법에 대하여 많은 연구가 이루어져왔으나, 버섯을 대표로 하는 식물성 키토산 및 그 제조법에 대해서는 연구문헌이 거의 발견할 수 없는 현실이다.

흑곰팡이, 물곰팡이, 방선균 등의 균류가 생산하는 키토산에 대하여, 몇 가지 연구보고가 있으나, 이들 균류의 배양이 곤란하며, 미지의 독성물질도 함유되어 있을 가능성이 강하여, 균류가 생산하는 키토산은 식품 및 의약품 등 인체에 대한 안전성이 문제가 되는 경우에는 사용이 불가능하였다.

한편, 신장병에 효과가 있는 것으로 알려져 있는 머쉬룸(아가리쿠스 비스포라스)(*Agaricus bisporus*)의 친수성 용매추출물(상품명 샴피니온엑기스)에는 키토산의 주요 성분인 글루코사민이 미량 함유되어 있음을 알 수 있으며, 이 미량의 글루코사민이 생리학적인 의미를 갖고 있는가하는 점에 대해서는 불명확하였다. 그리고 머쉬룸(아가리쿠스 비스포라스)을 비롯한 버섯류에서 키토산 함유 다당을 적극적으로 제조하려는 시도는 거의 이루어지지 않았다.

일본을 포함한 아시아지역에서는 표고버섯(*Lentinus edodes*) 및 목이버섯, 주머니버섯, 민가닥버섯, 마이다케(舞茸 : *grifolafrondosa*)는 예부터 우수한 건강식품으로서 널리 이용되어 왔으며, 의식동원(醫食同源)의 기본이 되는 식재이다. 서양에서는 17세기부터 머쉬룸(샴피니온)(아가리쿠스 비스포라스)가 식용으로 널리 제공되어 왔다.

이른바 머쉬룸 또는 샴피니온이라 하면, 본래 모든 버섯을 총칭하는 말이나, 좁은 의미로서는 17세기부터 파리근교의 동굴에서 재배되고 있는 아가리쿠스 비스포라스를 지칭한다. 혼란을 피하기 위해 본 명세서에서는 머쉬룸 또는 샴피니온을 [아가리쿠스 비스포라스], 모든 식용버섯류를 의미할때는 [버섯]으로 기재하는 것으로 한다.

세계에서 아가리쿠스 비스포라스의 연간생산량은 240~350만톤으로, 전세계 재배버섯의 30~38%를, 미국에서는 재배버섯의 90%를 차지하고 있다. 역사적으로는 식물성 키틴은 알칼리에 불용성인 고분자 물질로, 1811년 프랑스사람 식물학자 브라코노(Braconnot)에 의해 머쉬룸에서 최초로 추출되었다. 1859년 Rouget는 키틴을 수산화칼륨의 진한 용액 중에서 가열하면, 유기산에 가용하게 되는 사실을 발견하였고, 1894년 Hoppe-Seyler에 의해 이 물질은 [키틴산]으로 명명되었다.

1999년 ~ 2000년 러시아 연구자들이 흑곰팡이(*Aspergillus niger*)로부터 키틴-글루칸 화합물을 분리하였다. 키틴-글루칸 화합물은 15~20%의 글루칸을 함유하고 있었다. 이 키틴과 글루칸은 강한 공유결합으로 결합하고 있기 때문에 효소처리만으로는 완전히 분리할 수 없다(비특허문헌 1 및 비특허문헌 2 참조)

1981년에 시다(志田) 연구팀은 표고버섯(*Lentinus edodes*)의 알칼리(24%, 5 °C)에 불용인 골격 글루칸에 대하여 보고하고 있다. 메틸화 분석에 의해 글루칸부분의 구조는 고도로 분기(分岐)한  $\beta$ -1,6 및  $\beta$ -1,3결합을 갖는 당사슬인 것을 알 수 있었다. 글루칸은 키틴과 결합하여 표고버섯의 내부골격을 형성하고 있다(비특허문헌 3)

1994년, Hartland연구팀은 효모(*Saccharomyces cerevisiae*)의 세포벽에서 알칼리 가용성인 (1-3) $\beta$ 글루칸이 키틴과 결합하여, 알칼리에 불용인 (1-3) $\beta$ 글루칸이 되는 것을 발견하였다(비특허문헌 4)

버섯 및 곰팡이류의 세포벽 구성부분은  $\alpha$ (1-3)글루칸과 키틴이라고 알려져 있으며, 이들 균류의 성장과정에서 다당류의 재구성 및 재조직화가 빈번하게 이루어지고 있다. 아가리쿠스 비스포라스의 성장 사이클에서도  $\alpha$ 와  $\beta$ 의 구조 비율이 변화한다고 알려져 있다. 증식과정에서는  $\beta$ (1-4)가, 자실체 등에서는  $\beta$ (1-6)의 비율이 증가하는 것으로 알려져 있다.

그러나, 현재에도 이들 키틴을 포함하는 버섯의 골격성분은 화학적으로 안정하며, 물이나 희박한 산 또는 알칼리, 유기용매에는 용해하지 않기 때문에, 유효하게 이용되는 경우는 거의 없었다. 그 이유 중 하나가 버섯에 함유되어 있는 키틴이 거의 모든 용매에 불용성이며, 생리학적으로도 불활성이며, 건강식품 및 의약으로서의 유용성이 거의 기대되지 않는 점에 있다.

버섯유래의 당류로서는, 열수추출된 표고버섯의 수용성 성분인  $\beta$ 글루칸에 면역증강작용이 있는 것이 확인되면서, 면역증강제로서 개발되어 왔다. 또한, 아가리쿠스 비스포라스에 화학적 관심이 모아진 것이 최근의 일로, 리코무(RICOM)사가 처음으로 그 열수추출물에 소취작용이 있다는 사실이 발견되어, 소취제로서 상품화되어 있다.

다른 대부분의 버섯은 현재도 운지(雲芝), 영지버섯, 여지, 브라질산 '아가리쿠스' 등, 그 모양 그대로, 또는 매우 단순하게 처리한 열수추출물 및 그 동결건조품이 건강식품으로서 제공되고 있는 정도에 불과하다.

#### 비특허문헌 1

Gamayurova et al. Synthesis of soluble derivatives of chitin-glucan complex, Chemistry and Computational Simulation. Butlerov Communications, 1999;No.1.

#### 비특허문헌 2

Shabrukova et al. Study of the nature of chitin-glucan complex. Chemistry and Computational Simulation. Butlerov Communications, 2001;No.4.

#### 비특허문헌 3

Shida, et al. Structure of the alkali-insoluble skeltal glucan of *Lentinus edodes*. J-Biochem-Tokyo. 1981;90(4):1093-1100

#### 비특허문헌 4

Hartland et al. The linkage of (1-3)-beta-glucan to chitin during cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae* Yeast. 1994;10(12):1591-1599

### 발명의 상세한 설명

#### 발명의 개시

본 발명의 목적은 신규한 키틴산 함유 다당을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기 키토산 함유 다당의 제조방법을 제공하는 것이며, 특히, 머쉬룸(아가리쿠스 비스포라스) 및 표고버섯을 비롯하여 널리 식용으로 제공되고 있는 안전한 버섯키토산에서 키토산 함유 다당을 효율 좋게 대량으로 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은, 상기 키토산 함유 다당의 용도, 특히 이를 함유하는 의약품, 식품을 제공하는 것이다.

본 발명은 이하와 같다.

# 1. 하기 특성을 갖는 키토산 함유 다당

(1) 구성당: 글루코사민과 글루코오스로 구성되며, 구성몰비가 1~5:5~1이다.

(2) 분자량: 오스트왈드형 점도계로 측정된 분자량은 약 5만~약40만이다. 또한, 겔 여과 크로마토그래피에 의해 측정된 분자량은 약 4만~약 20만이다.

(3) 구성단위: 주로 키토산부분과 글루칸부분으로 구성되어 있다.

(4) 결합의 종류:  $\beta(1\rightarrow4)$  결합 및  $\beta(1\rightarrow3)$  결합을 함유하나,  $\beta(1\rightarrow3)$  결합을 함유하지 않는다.

(5) 효소에 의한 분해성: 키토사나아제에 의해 올리고당으로 분해되나, 셀룰라아제에 의해 분해되지 않는다.

(6) 단백질 및 환원성 다당: 단백질 및 환원성 다당을 포함하지 않는다.

(7) 정색반응: 요소-전분반응에 음성이다.

(8) 물질의 색: 무색(백색)이다.

(9) 용해성: 5~10 질량%의 초산, 사과산 또는 아스코르빈산 수용액에 용해하나, 물, 에탄올, pH 10 이상의 알칼리성 수용액에는 용해하지 않는다.

2. 글루코오스와 글루코사민의 구성몰비가 1:1인 상기 1 기재의 키토산 함유 다당.

3. 키토산 함유량이 18~72%인 상기 1 또는 2 기재의 키토산 함유 다당.

4. 키토산부분이 글루코사민의 호모폴리머인 상기 1~3 중 어느 1항 기재의 키토산 함유 다당.

5. 글루칸부분이 글루코오스의 호모폴리머인 상기 1~4 중 어느 1항 기재의 키토산 함유 다당.

6. 버섯을 25~50 질량%의 가성 알칼리 수용액 중, 가열처리한 후, 고액분리하고, 얻어진 고형분을 유기산 수용액에 용해하고, 여기에 알코올을 첨가하거나 또는 pH 10 이상이 되도록 가성 알칼리를 첨가하여 침전을 생기게 하고, 이 침전을 세정, 건조하는 것을 특징으로 하는 상기 1~5 중 어느 1항 기재의 키토산 함유 다당의 제조방법.

7. 가성 알칼리 수용액 중의 가열처리 전에, 버섯을 셀룰라아제 또는 글루카나아제에 의해 예비 처리하는 것을 특징으로 하는 상기 6 기재의 키토산 함유 다당의 제조방법.

8. 버섯이 아가리쿠스 비스포라스인 상기 6 또는 7 기재의 키토산 함유 다당의 제조방법

9. 버섯을 25~50 질량%의 가성 알칼리 수용액 중, 가열처리한 후, 점도를 3~20 mPa·s로 조정된 후, 고액분리하고, 얻어진 고형분을 세정, 건조하는 것을 특징으로 하는 상기 1~5 중 어느 1항 기재의 키토산 함유 다당의 제조방법.

10. 가성 알칼리 수용액 중 가열처리한 후, 물 또는 산을 첨가하여 점도를 3~20mPa·s로 조정하는 상기 9기재의 키토산 함유 다당의 제조방법.

11. 상기 1~5 중 어느 1항 기재의 키토산 함유 다당을 유효성분으로 함유하는 의약조성물.

12. 생활습관병의 치료 또는 예방을 위한 상기 10항 기재의 의약조성물.

13. 상기 1~5 중 어느 1항 기재의 키토산 함유 다당을 유효성분으로 함유하는 식품.

본 발명의 키토산 함유 다당은 게키토산에서 보여지는 불순물의 단백질, 함유아미노 화합물 등의 알레르기물질들을 포함하지 않기 때문에, 신규 기능성 식물재료로서 유용하다. 갑각류, 예를들어 게를 출발원료로 하는 게키토산에는 게특유의 이

취 및 불쾌한 잡맛이 있으나, 본 발명의 키토산 함유 다당에는 버섯을 원료로 한 경우에는 버섯 특유의 좋은 향이 함유되어 있으며, 이취나 불쾌한 잡맛 전혀 없다. 또한, 본 발명의 키토산 함유 다당에는 글루코사민 이외에 50% 정도 다당류가 함유되어 있고, 게키토산에는 발견할 수 없는 새로운 생리활성이 존재할 가능성에 대해 기대되고 있다.

더욱이 키토산 함유 다당이 유리한 것은, 새우, 게 등의 갑각류에서 분리되는 키토산과 달리, 그 구성당류가 거의 글루코오스로 이루어진 다당류·글루칸인 점에 있다.

#### 발명을 실시하기 위한 최적의 형태

이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

우리들은 리코무사에서 건강식품으로서 제공되고 있는 아가리쿠스 비스포라스 유래의 샴피니온엑기스 성분이, 유기산에 가용이며 알칼리에 불용인 성분에 착안하여, 그 물질의 분석을 시험한 결과, 키토산과 매우 유사한 성질을 갖는 다당류가 존재하는 것을 발견하고, 연구를 거듭한 결과, 아가리쿠스 비스포라스로부터 키토산을 다량으로 추출하는 데 성공하였다. 아가리쿠스 비스포라스로부터 추출한 키토산은 기본적인 성질에 있어서 갑각류에서 추출된 게키토산과 유사하나, 글루칸형 다당류를 함유하는 점에 있어서, 글루코사민만으로 구성된 단순한 호모폴리머인 게키토산과는 그 성분을 달리하는 신규물질인 사실을 알았다.

이하 이 명세서에서, 그 신규물질을 [키토산 함유 다당]으로 부르기로 한다.

키토산은 역사적으로는 앞에서 서술한 바와 같이 [mushroom]에 대하여 발견된 것이나, 그 후 오로지 연구를 갑각류를 주로 한 연구를 진행하여, 키토산이라 하면 게키토산을 가리키는 것이라고 하여도 좋다. 키토산의 정의로서는, 게키토산의 경우는 N-아세틸글루코사민이 거의 100%로 구성된 단순폴리머이므로, 그 아세틸기가 80%이상 탈아세틸화된 것으로 되어 있다. 그러나, 본래 키토산의 정의는, 전술한 바와 같이, 회박한 알칼리에 불용이며, 회박한 유기산에 가용인 다당을 의미하는 것이다. 이와 같은 정의에 따르면, 버섯의 키토산 함유 다당은 마땅히 키토산의 패밀리라고 말할 수 있다.

본 발명의 신규한 키토산 함유 다당은 널리 식용으로 제공되는 거의 모든 버섯류로부터 제조 가능하다. 키토산 함유 다당은 천연에도 미량 존재하나, 그 대부분이 글루칸과 강하게 결합한 키틴질로 밖에 존재하지 않으며, 우리가 개발한 방법에 따라 처음으로 그 내용이 밝혀졌다.

본 발명의 키토산 함유 다당의 제조방법을 이하 상세하게 설명한다.

본 발명의 키토산 함유 다당을 제조하기 위한 원료는 키토산함유 다당을 함유하는 것일 경우, 특별히 한정하지 않으나, 얻어진 키토산 함유 다당이 불쾌취나 이취가 적은 관점에서 보면 식물성 재료가 바람직하고, 특히 버섯이 바람직하다. 버섯 중에서 바람직한 것으로는 아가리쿠스 비스포라스, 표고버섯, 팽이버섯, 민가닥버섯, 마이다케, 나메코 등이 있으며, 특히 바람직한 것은, 아가리쿠스 비스포라스, 표고버섯, 팽이버섯, 민가닥버섯 등이 있다.

원료로서 버섯을 사용하는 경우, 생선물이나 건조물 모두 좋으며, 통상 기둥부분을 제거하고, 물로 씻어서 흙 등의 부착물을 완전하게 제거한다. 여기서 잘 세정하지 않으면 불순물이 최종제품까지 남게 된다. 이렇게 손질된 것을 필요에 따라 믹서나 슬라이서로 분쇄 또는 슬라이스한 후, 고농도의 가성 알칼리수용액, 바람직하게는 25~50 질량%의 가성 알칼리수용액 중 가열처리한다. 가성 알칼리로서는 가성소다, 가성칼륨이 바람직하다. 원료 100 질량부(건조질량)에 대하여 가성 알칼리 수용액을 바람직하게는 40~50 질량부 가하고, 바람직하게는 90~120 ℃에서 0.2~30시간, 더욱 바람직하게는 100~110 ℃에서 1~10시간 가열처리한다.

또한, 본 발명에서는 농가성 알칼리 수용액을 사용하므로, 반응용기는 자기 또는 경질 글라스제를 사용하는 것이 바람직하다. 가열처리는 상압에서도 감압 또는 가압상태에서도 좋으나 통상은 상압에서 충분하다.

또한, 가열처리 전에 셀룰라아제, 글루카나아제, 프로테아제 등에 의한 효소처리 및 냉동 해동처리를 실시하여도 좋다. 효소처리는 물에 상기 효소를 바람직하게는 0.01~0.1 질량% 첨가하여 25~40 ℃에서 2~24시간 실시하면 좋다. 효소처리에 의해 세포벽 또는 단백질이 분해되어, 키토산 함유 다당의 제조가 용이하게 된다. 또한, 냉동한 후, 해동시키면, 조직(세포벽)이 파괴되어 키토산 함유 다당의 제조가 용이하게 된다. 특히, 냉동해동 처리, 슬라이스에 의한 단편화, 또는 믹서에 의한 분쇄 등의 전처리를 행하면, 버섯의 섬유질이 풀어져, 효소 처리(셀룰라아제 처리 등)의 효율이 좋게 된다.

예를 들어, 전처리한 버섯 10 kg을 순수 20L에 현탁하고, 셀룰라아제를 6 ~ 60 g 정도 가하고, 40 ℃에서 2시간, 60 ℃에서 2시간, 다시 온도를 높여 비등할 때까지 가열한다. 상기 셀룰라아제로서는, 예를 들어, *Aspergillus niger* 유래, *Bacillus*속 유래(알칼리성 셀룰라아제), *Tricoderma reesei* 유래, *Anthrobacter* 유래의 것을 들 수 있다.

식혀서 열을 제거한 후 가성소다 또는 가성칼륨을 최종농도가 50 질량% 정도가 되도록 첨가한다. 이때, 온도가 100 ℃ 이상으로 상승하나, 그대로 약 2~4시간 정도 계속해서 가열한다. 가열이 종료하면 반응용기에 그대로 뚜껑을 덮고 하룻밤 방냉한다. 뚜껑은 알칼리가 공기 중의 탄산가스를 흡수하여 열화하지 않도록 하기 위해 필요하다. 이와 같은 가열처리를 통해 키틴 함유 다당의 아미노기가 탈아세틸화되어, 키토산 함유 다당이 생성된다.

알칼리 처리액의 상부표면에 생성한 키토산 함유 다당의 층을 스테인레스 금망(100메쉬)으로 떠서 얻는다. 디캔트하여 저부에 생성된 침전도 회수한다. 남은 알칼리액은 그대로 재차 다음 알칼리 처리에 사용하는 것이 가능하다.

얻어진 혼합물을 원심분리, 여과, 디캔트 등의 방법을 이용하여 고액분리한다. 얻어진 고형분은 키토산 함유 다당을 주성분으로 하는 것이다. 구체적으로는 고형분 즉 조제 키토산 함유 다당을 약 2~10배 양의 순수에 현탁하고, 무명천 등에 옮겨, 순수(純水)로 세척이 거의 중성으로 될 때까지 잘 씻는다. 이때 순수를 사용하는 것이 중요하다. 그 이유는 얻어진 조제

키토산 함유 다당은 수돗물에서 금속이온 등의 불순물을 매우 효율적으로 흡착하기 때문이다. 또한, 이때 세정처리를 빨리 하지 않으면 점도가 높게 되고, 후 처리공정이 곤란하게 된다. 점성이 너무 높아졌을 때에는 에탄올 등의 유기용매로 처리하는 것이 효과적이다. 이런 처리로 여과가 용이하게 된다.

다음으로, 물로 세정한 조제 키토산 함유 다당을 유기산 수용액에 용해한다. 유기산으로서는 초산, 사과산, 아스코르빈산 등이 있다. 유기산의 농도는 바람직하게는 1~20 질량%, 더욱 바람직하게는 5~10 질량%가 적당하다. 용해는 5~40 °C, 0.1~48시간, 통상은 실온에서 하루밤 방치하면 된다. 키토산 함유 다당은 고분자이므로 용해에 충분한 시간이 필요하기 때문이다. 키토산 함유 다당을 용해한 용액에서 원심분리, 여과, 디캔트하여 불용물을 제거한다. 용액의 점성이 높기 때문에, 여과, 디캔트로 는 시간이 꽤 필요하므로 원심분리가 바람직하다.

얻어진 청명한 키토산 함유 다당용액에 알코올(예를 들어 에탄올, 메탄올), 아세톤, 또는 가성알칼리(예를 들어 가성소다)를 가하여 키토산 함유 다당을 침전시키고 회수한다. 예를 들어, 키토산 함유 다당용액 100 질량부에 대하여 가성소다를 0.01~0.5 질량부 첨가하면, 키토산 함유 다당이 침전한다. 이를 원심분리 등으로 고액분리하여 순 키토산 함유 다당을 회수한다. 에탄올 침전은 여과가 비교적 용이하므로 조작이 용이하나, 대량의 용매가 필요하다. 키토산 함유 다당의 용액에 대하여 적어도 2~3배의 에탄올이 필요하다. 더욱이 알코올로 조제한 키토산 함유 다당은 조해성(潮解性)이 높은 경향이 있다. 또한, 아세톤 및 메탄올의 사용은 키토산을 식품 및 의약품, 화장품등에 사용하는 경우에는 용매로서는 바람직하지 않다.

따라서 통상의 고액분리 공정에서는 알칼리에 의한 침전조작이 바람직하다. 본 처리공정을 반복함으로써 불순물을 제거하는 것이 가능하나, 키토산 함유 다당은 불순물의 흡착력이 높기 때문에 필요이상으로 처리를 복잡하게 하지 않는 것이 바람직하다.

한편, 대량으로 키토산 함유 다당을 얻은 경우에는, 고액분리의 수단으로, 농알칼리액의 대량 원심분리는 위험하며, 또한 곤란점을 수반한다. 이러한 경우에는 이하와 같이 [원심분리를 이용하지 않는 방법]을 이용하는 것이 바람직하다.

즉, 잘 세정하고, 1~3 mm 두께로 슬라이스한 머쉬룸, 슬라이스한 표고버섯, 반으로 자른 팽이버섯, 건조 아카리쿠스를 물에 불린 것에, 알칼리, 예를 들어, 가성소다를 최종농도로 40~60 질량%, 예를 들어, 50 질량%가 되도록 첨가한다. 알칼리가 잘 용해하도록 필요에 따라 극소량의 증류수를 첨가하여도 좋다. 80~120 °C에서 3~30시간, 예를 들어, 110 °C 이상에서 2시간이상 가열하여 방냉시킨다. 여기에 필요에 따라 등량 이상, 바람직하게는 3~4배양의 증류수, 또는 10~20 질량%의 무기산(예를 들어, 염산, 황산) 또는 유기산(예를 들어 초산, 아스코르빈산, 유산)을 가하여 점도를 3~20 mPa·s, 바람직하게는 5~10 mPa·s로 조정한다. 이 상태에서 하루밤 정치하고, 필요에 따라 pH를 9~6.5, 바람직하게는 7이 되도록 조정한다. 이어서, 필터, 예를 들어 스테인레스제, 무명천 또는 치즈크로스(cheesecloth)제 필터로 여과한다.

여기에서 점성이 높게되면 이후의 여과처리공정이 곤란하게 되므로, 점도가 올라가지 않도록 증류수 및 무기·유기산의 첨가방법을 조정하는 것이 중요하다. 그러기 위해서는 시료의 일부를 사용하여 예비테스트를 실시하는 것이 좋다. 무기산 또는 유기산을 첨가한 경우는 pH가 9~6.5, 바람직하게는 7이 되도록 첨가한다.

얻어진 고형분을 증류수에 재현탁하고, 가볍게 교반하면서 pH가 9~6.5, 바람직하게는 항상 7이 되도록 조정한다. 재차, 여과 또는 디캔트하여 증류수를 가하여 염분농도와 pH가 충분히 저하할때까지 상기 조작을 반복한다. 최후에 치즈크로스로 여과하고, 압력을 가하여 탈수하고, 고형분을 동결건조하여 건조품을 만든다.

얻어진 조제 키토산 함유 다당에서 키토산 함유 다당을 얻는 것은, 조작하는 양도, 알칼리도도 낮기 때문에 통상의 [원심분리를 사용한 방법]이 사용 가능하다. 즉, 조제 키토산 함유 다당을 5~10% 초산으로 용해하여, 충분히 교반하고 나서 원심분리하고, 그 상청액을 알칼리로 중화하여, 재차 원심분리하고, 얻어진 키토산 분획·침전부를 물로 세정하고, 무명천 또는 치즈크로스로 여과, 압착하여 수분을 적게 한 다음 동결건조하여 정제 키토산 함유 다당을 얻는다.

본 발명의 키토산 함유 다당 중의 키토산 함유량은 제조조건에 따라 바뀌나 통상은 5~80 질량%, 특히 15~75 질량%의 범위에 있다.

키토산 함유 다당 중의 키토산 함유량은 이하의 방법으로 구한다.

키토산 함유 다당 분말 0.5 g을 정확히 칭량하고, 이를 5 용량% 초산에 녹여 정확하게 100g으로 한다. 이 용액 1 g을 200 ml 삼각플라스크에 정확하게 재서 취하고, 탈이온수 30 ml를 가하고, 충분히 교반 혼합한다. 지시약으로서 0.1% 톨루이딘블루(toluidine blue) 용액 2~3 방울을 가하고, N/400 폴리비닐황산칼륨용액[C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>OSK]<sub>n</sub>, n=1500 이상]으로 적정한다. 탈아세틸화도(즉, 키토산 함유량=글루코사민함유량)는 하기의 식에 따라 구한다.

$$\text{탈아세틸화도} = (X/161) / [(X/161) + (Y/203)] \times 100(\%)$$

$$X = (1/400) \times (1/1000) \times f \times 161 \times v$$

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

$$v = N/400 \text{ 폴리비닐황산칼륨 용액 정적치(ml)}$$

$$f = N/400 \text{ 폴리비닐황산칼륨 용액의 팩터}$$

팩터 f는 1.005이다.

식을 다시 쓰면

$$\text{탈아세틸화도} = [203X / (203X + 161Y)] \times 100(\%)$$

$$X = 1.005 \times 161 \times v(\text{적정치; ml})$$

$$Y = 5 - X$$

정제 키토산 함유 다당은, 필요에 따라 상기 희박한 유기산, 예를 들어 1~5% 초산, 사과산, 아스코르빈산 등에 재용해하여 알칼리에 의한 중화침전처리를 반복함으로써 더욱 정제할 수 있다. 그러나, 통상은 1회로 충분하다. 가용성 정제 키토산 함유 다당을 희박한 유기산에 용해한 그대로 스프레이드라이 또는 동결건조함으로써 백색분말로 만들 수 있다. 이 가용성 키토산 함유 다당은 순수에 순식간에 용해한다. 알칼리 침전처리로 얻어진 순 키토산 함유 다당은, 그대로 동결 건조한다. 이것은 순수에는 용해되지 않기 때문에, 희박한 유기산, 예를 들어 아스코르빈산 또는 사과산에 용해하여 사용할 수 있다. 염산에는 녹기 힘들다.

키토산 함유 다당을 사용한 의약품 또는 식품

본 발명의 키토산 함유 다당은, 혈압, 당뇨치, 혈당치, 요산치, 총콜레스테롤치, 중성지방치 등의 저하작용을 갖는다. 따라서, 본 발명의 키토산 함유 다당은, 고혈압증, 당뇨병 등의 생활습관병, 성인병의 검사수치 개선에 큰 효과가 있으며, 의약품 또는 식품의 형태로 사용하는데 적합하다.

본 발명의 키토산 함유 다당을 액제의 형태로 사용하려면, 키토산 함유 다당에 안식향산나트륨, p-옥시안식향산메틸, 디히드로초산나트륨 등의 보존제, 사과산, 아스코르빈산, 구연산, 초산 등의 용해보조제, 그리고 착색제, 향료, 풍미제, 글루코오스, 만니톨 등의 감미제 등을 필요에 따라 배합하고, 여기에 증류수, 생리 식염수 등의 희석제를 필요에 따라 첨가하여 의약품 또는 식품을 조제한다.

키토산 함유 다당을 유효성분으로 한 의약품은, 통상, 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 좌제 등의 고형제제의 형태로 조제한다. 이때, 이들 의약품은 통상 사용되는 충전제, 증량제, 결합제, 수분부여제(付濕劑), 붕괴제, 계면활성제, 활택제 등의 희석제 또는 부형제를 이용하여 조제된다.

제형의 형태로 형성할 때에는, 담체로서 당 분야에서 종래 공지된 것을 널리 사용할 수 있으며, 예를 들어, 유당, 만니톨, 백당, 염화나트륨, 포도당, 전분, 탄산칼슘, 카오린, 결정셀룰로오스 등의 부형제, 증류수, 생리식염수, 단미시럽(백당의 85% 수용액), 포도당액, 전분액, 젤라틴용액, 카르복시메틸셀룰로오스, 인산칼슘, 폴리비닐피롤리돈 등의 결합제, 건조전분, 알긴산나트륨, 한천분말, 탄산수소나트륨, 탄산칼슘, 라우린황산나트륨, 스테아린산모노글리세리드, 전분, 유당 등의 붕괴제, 백당, 스테아린, 카카오버터, 수소첨가유등의 붕괴억제제, 초산, 아스코르빈산, 사과산 등의 용해흡수촉진제, 글리세린, 전분, 유당, 카오린, 벤토나이트, 콜로이드상 규산 등의 흡착제, 정제 탈크, 스테아린산염, 폴리에틸렌글리콜 등의 활택제 등이 있다. 또한, 정제는 필요에 따라 당의정, 젤라틴 피복정, 장용피정, 필름코팅정 또는 이중정, 다중정으로 할 수 있다.

환제의 형태로 성형하는 때에는 담체로서 당분야에서 종래 공지된 것을 널리 사용할 수 있으며, 예를 들어, 포도당, 유당, 만니톨, 전분, 카카오지, 경화식물유, 카오린, 탈크 등의 부형제, 아라비아고무, 젤라틴 등의 붕괴제 등이 있다. 좌제의 형태로 성형하는 때에는 담체로서 종래 공지된 것을 널리 사용가능하며, 예를 들어 카카오지, 고급알코올의 에스테르류, 젤라틴 등이 있다.

유효성분으로서 사용하는 키토산 함유 다당의 함유량은 특별히 한정하지 않고 광범위하게 선택되며, 통상 제제중에 1~90 질량%, 바람직하게는 10~70% 질량으로 함유시키는 것이 좋다.

투여량은 특별히 한정되지 않으며, 용법, 환자의 연령, 성별, 질환의 정도 등의 조건에 따라 적절하게 선택할 수 있으며, 체중 1 kg에 대하여 키토산 함유 다당이 0.1~10 mg, 바람직하게는 0.5~5 mg이 되는 양을 1일 1~4회 나누어서 경구투여한다. 키토산 함유 다당의 함유량이 많으면, 철분 및 비타민을 흡수, 포집하기 때문에 철분 및 비타민 결핍증이 되는 경우가 있으며, 상기 범위의 투여량이면 키토산 함유 다당의 함유량이 비교적 낮기 때문에 철분 및 비타민을 보충할 필요는 없다.

본 발명의 키토산 함유 다당을 함유하는 식품은 특별히 한정하지 않으나, 예를 들어, 스프, 된장국, 드링크, 젤리, 구미 등이 있다. 이들 식품 중의 키토산 함유 다당의 함유량은 바람직하게는 0.01~5.0 질량%, 더욱 바람직하게는 0.02~1.0 질량%, 가장 바람직하게는 0.05~0.5 질량%이다.

이하, 본 발명의 키토산 함유 다당의 제조법, 키토산 함유 다당의 생화학적 성질을 실시예로 상세하게 설명한다.

## 실시예

### 제조예 1 (버섯키티의 제조)

아가리쿠스 비스포라스의 흙이 묻은 기둥을 잘라버리고, 칭량하여 440 g을 얻었다. 여기에 1% 사과산, 0.1% 아스코르빈산을 포함하는 수용액 900 ml를 가하고, 2회로 나누어 믹서로 20초간 블렌드하였다. 이를 중탕(100 ℃)으로 가끔 저어 주면서 120분간 보온하였다. 상기 현탁액의 온도는 70 ℃ 정도에서 85 ℃ 정도가 되도록하였다. 이어서 이 현탁액을 2~3시



간 천천히 흡인여과하였다. 여과지에 남은 것을 스파틀러로 긁어서 얻고, 나머지는 순수로 세정하면서 회수하였다. 용량으로 약 600 ml의 조(粗) 키틴 현탁액을 얻었다. 여기에 N-NaOH를 600 ml 가하고, 60 °C에서 20분간, 중탕가열하고 흡인여과하였다. 같은 여과지에서 순수, 에탄올로 세정하였다. 여과지위에 남은 조 키틴 함유 다당을 순수 1000 ml로 현탁하고, 버섯키틴 함유 다당 현탁액을 N-HCL로 중화하고, 4500 rpm으로 원심분리하였다. 침전부분의 버섯키틴분획을 99% 에탄올에 현탁하고, 약 1000 ml정도가 되면 여과지를 2매 겹쳐서 여과하였다. 에탄올 약 500 ml로 세정하고, 완전히 흡인하였다. 정제 키틴 함유 다당분획의 수분포함 질량은 약 53 g이었다. 실리카겔을 깔아서 채운 데시케이터(desiccator)에 넣고 감압건조하여 정제 키틴 함유 다당 5.54 g을 얻었다.

생 아가리쿠스 비스포라스 100 g당 건조·정제 키틴 함유 다당의 수확량은 1.260 g이 된다. 건조한 키틴 함유 다당의 성상은 전병상이며, 핀셋으로 간단히 풀어서 썰 수있다.

## 제조예 2 (버섯키틴 함유 다당으로부터 키토산 함유 다당의 제조)

제조예 1로 제조한 아가리쿠스 비스포라스의 건조한 정제 키틴 함유 다당 4.99 g에 50% NaOH 수용액 200 ml를 가하여 현탁하였다. 90 °C에서 2시간동안 가끔 교반하면서 가열 처리하였다. 원심분리(4500 rpm, 15분, 4 °C; 원심분리 조건은 이하동일)하고, 고형분을 회수하였다. 이 고형분의 주성분은 키토산 함유 다당이다. 여기에 10% 초산 수용액 1000 ml를 가하여 호모지나이제하고, 그대로 하룻밤 실온에서 정치하고, 키토산 함유 다당을 용해시켰다. 용액은 꽤 점도가 있어 밀도가 진하다. 재차, 원심분리하여 상청 분획물을 회수하였다. 침전분획물은 다시 10% 초산 수용액으로 재용해하여 키토산 함유 다당을 추출하여 상청에 가하였다. 합친 상청을 pH 10으로 조정하였다. 원심분리하고, 침전분획물에 순수를 1000 ml 가하여 현탁하고, 원심분리하고, 그 조작을 3회 반복하였다. 첫번째 세정에서는 pH 10, 두번째 세정에서는 pH 7.5, 3회 세정에서는 최종적으로 pH는 6.5로 되었다.

침전을 여과지상으로 옮겨서 25 °C에서 40시간 감압건조하였다.

전체 1050 mg, 글루코사민의 함유량이 55%인 키토산 함유 다당이 얻어졌다.

키틴 함유 다당 1g당 키토산 함유 다당의 수확량은 210 mg이다.

이 키토산 함유 다당을 이하의 조건에서 가수분해하고, 가수분해물을 이하의 박층 크로마토그래피 조건에서 분석한 결과, 글루코사민과 글루코오스가 약 3:1의 비율로 검출되었다. 이외의 당당류 및 갈락토사민은 검출되지 않았다. 박층크로마토그래피에 의해 분석된 글루코사민의 양이 폴리비닐황산법에 의한 분석치보다 높은 이유로서는, 4M-HCL 중, 100 °C의 가수분해조건에서 글루코사민에 비해 글루코오스의 생성량이 적거나, 더욱 가수분해를 받은 것 등으로 생각된다.

키토산 함유 다당의 가수분해조건:

4M-HCl 중 100 °C에서 3시간

가수분해물의 박층크로마토그래피 조건:

담체: Whatman 4860-820(두께 250 μm)

전개용매: n-부탄올/피리딘/0.1M-HCl(5:3:2)

실온에서 약 2시간 전개

발색시약: 디페닐아민/아닐린/인산

## 제조예 3 (슬라이스한 아가리쿠스 비스포라스로부터 키토산 함유 다당의 제조)

아가리쿠스 비스포라스의 흠이 묻은 기둥부분을 잘라내고, 칭량하여 546 g을 얻었다. 이를 칼 또는 푸드프로세서로 약 1 mm 두께로 슬라이스처리하였다. 1000 ml 비커 2개에 각각 270 g의 슬라이스를 넣고, 고체의 NaOH를 270 g씩 가하였다. 15분간 정도 정치하면, 아가리쿠스 비스포라스가 알칼리에 녹아 용량이 감소하였다. 비커를 1개로 모아서 중탕으로 가열하였다. 교반하면서 약 2시간 90~95 °C로 가열한 후 실온까지 방냉하였다.

떠있는 버섯(주성분은 키토산 함유 다당임)을 잿물채취 주걱으로 조심스레 떠서, 80% 에탄올로 3회 씻는다. 600~800 ml정도의 에탄올을 사용하여, 10분간 정도 가볍게 교반하면서 씻었다. 그리고 순수 1000 ml로 2회 세정하고, 초산 25 ml를 첨가하여 pH가 중성이 되는것을 확인하고, 1/10용량의 초산을 가하여 실온에서 하룻밤 방치하고, 키토산 함유 다당을 용해시켰다. 치즈크로스로 여과하고, 여과액을 50% NaOH로 중화하고, 키토산 함유 다당을 침전시켰다.

생긴 침전을 원심분리하고, 초산에 용해하여 4 °C에서 이틀 밤낮(64시간) 보존하고, 키토산 함유 다당을 용해시켰다. 키토산 함유 다당의 초산용액(10% 초산 600 ml)를 원심분리하여 상청(pH 4.48)을 회수하였다. 침전분획물을 10% 초산(pH 2.18) 500 ml로 재추출하여 상청에 가하였다. 상청을 모아서 중화(pH 10)하고, 얻어진 키토산 함유 다당의 침전을 원심분리하여 회수하였다. 이를 10% 초산 500 ml로 용해하고, 원심분리하고, 상청을 회수하였다. 다시 50% NaOH를 가하여 중화하고, 얻어진 침전을 원심분리하여 회수하였다.

침전에 물 500 ml를 가하고 현탁하고 원심분리하는 조작을 2회 실시하였다. 갈색 침전을 얻었다. 이 침전을 드라이아이스/아세톤으로 동결하여 동결건조하였다.

동결건조후의 수확량은 2702 mg이었다. 키토산 함유 다당 중의 글루코사민 함유량은 19.6%, 생버섯 100 g당 키토산 함유 다당의 수확량은 495 mg이었다.

#### 제조예 4 및 5 (오토크레이브 처리와 사과산의 첨가효과)

생아가리쿠스 비스포라스를 기둥부분을 제거하여 수세한 후, 믹서로 30초간 분쇄하였다. 이를 두 개로 나누어, 하나는 순수 200 ml를, 다른 하나에는 5% 사과산 수용액 200 ml를 가하고, 120 ℃에서 30분간 오토크레이브 처리한 후, 하룻밤 방치하였다. 거즈로 여과하고 순수에 현탁하고 200 ml로 하였다.

각각에 NaOH 200 g을 가하고, 오토크레이브에서 120 ℃, 30분간, 가열처리하였다. 각각에 순수 약 200 ml를 가하여 원심분리하였다. 키토산 함유 다당의 침전을 회수하여 10% 초산에 녹였다. 이 용액을 원심분리하여 얻어진 상청을 25% NaOH로 중화하고, 생겨난 키토산 함유 다당의 침전을 원심분리하였다. 얻어진 키토산 함유 다당의 침전을 다시 원심분리법에 따라 순수 500 ml로 3회 세척하였다. 순수 세정을 3회 실시하면 pH는 약 7.5 정도까지 저하하였다.

동결건조하고 수확량과 글루코사민의 함유량을 측정하였다. 수확량은 각각 643 mg 및 713 mg, 글루코사민의 함유량은 각각 71.3% 및 37.6%이었다.

또한, 글루코사민의 함유량은 순수 처리하여 오토크레이브에 걸었던 것이 가장 높은 수치를 나타냈다.

#### 제조예 6 (셀룰라아제 전처리를 수반한 키토산 함유 다당의 제조)

이번예에서는 신선한 아가리쿠스 비스포라스를 원료로 하여, 셀룰라아제, 농알칼리 가열처리를 실시하여, 희박한 유기산에 가용이면서, 알칼리에 불용인 키토산 함유 다당을 얻었다. 이를 동결건조하여 분말 약 11 g을 얻었다. 이하 상세하게 설명한다.

아가리쿠스 비스포라스 3.2 kg을 재빨리 물로 씻고, 부착되어 있는 흙을 완전히 제거하였다. 이어서 1 mm 두께로 슬라이스하였다. 슬라이스한 것을 순수 5600 ml에 현탁하고, 셀룰라아제(Aspergillus niger 유래, 식품용)을 12 g 가하고, 40 ℃에서 2시간, 60 ℃에서 2시간, 더욱 온도를 높여서 비등할 때까지 가열하였다.

식혀서 열을 제거하고 가성소다를 최종농도가 50%가 되도록 가하였다. 이때, 온도가 110 ℃까지 상승하며, 그 상태로 약 3시간 가열을 계속하였다. 가열 종료 후, 그대로 뚜껑을 닫고 3시간 정치하였다. 이어서 알칼리처리액의 상부표면에 생긴 키토산 함유 다당층을 스테인레스 금속망(100메쉬)으로 걸어서 댔다. 디캔트하여 저부에 생성한 키토산 함유 다당의 침전도 회수하였다.

얻어진 조제 키토산 함유 다당 15 g을 약 300배 양의 순수로 현탁하고, 무명천으로 옮기고, 순수로 세액이 약 중성이 될 때까지 잘 씻었다. 세정한 조제 키토산 함유 다당을 10% 초산에 천천히 1~2시간에 걸쳐 용해하였다. 키토산 함유 다당을 용해한 용액을 원심분리하여 불용물을 제거하였다. 얻어진 청명한 키토산 함유 다당 용액 3500 ml에 10N-NaOH 약 500 ml를 가하여 키토산 함유 다당을 침전시켜, 회수하였다. 침전을 순수 3L로 세정하고, 원심분리하였다. 얻어진 정제 키토산 함유 다당을 동결건조하여 회백색분말 10.8 g을 얻었다.

표 1에 키토산 함유 다당 제조예 2~6의 결과를 나타냈다.

[표 1]

키토산 함유 다당시료	원재료질량	키토산 함유 다당의 건조질량	글루코사민함량(%) 주1	비고
제조예2	440g	1050mg	55.5	믹서로 분쇄처리
제조예3	546g	2702mg	19.6	슬라이스한 버섯사용
제조예4	200g	643mg	71.3	오토크레이브처리
제조예5	200g	713mg	37.6	오토크레이브처리
제조예6	3.2kg	10.8g	64.1	셀룰라아제사용
왕게큐티쿨라(cuticula)	8g*	801mg	82	*키틴 1g에 상당
중하큐티쿨라	16g*	781mg	85	*키틴 1g에 상당

(주 1) 후술하는 바와 같이 본 글루코사민의 함유량(%) 측정량은 키토산 함유 다당의 경우에는, 키토산 함유량을 반영하고 있는 것으로 생각된다.

#### 제조예 7 (원심분리를 사용하지 않은 [조제키토산 함유 다당]의 제조법)

잘 세정하고, 1~3 mm 두께로 슬라이스한 머위톱, 슬라이스한 표고버섯, 절반으로 자른 팽이버섯, 건조 아가리쿠스를 물에 불려 생환산으로 약 120 kg이 되도록 혼합하고, 여기에 약 500 kg의 NaOH를 최종농도로 50%가 되도록 가하였다. NaOH가 잘 용해하도록 100 kg의 증류수를 가하였다. 90~100 ℃에서 2시간이상, 가열하여 하룻밤 방냉하였다. 여기에 5 배량의 20 질량% 구연산을 가하고, 이 상태에서 하룻밤 정치하였다. pH는 8.0이었다. 다음날, 치즈크로스제 필터로 여과하였다.



얻어진 고형분을 증류수 1000 L에 재현탁하고, 가볍게 교반하면서 pH가 항상 7이 되도록 조정하였다. 다시 여과하고 증류수를 가하여 염분농도와 pH가 충분히 저하할 때까지 상기 조작을 3회 반복하였다. 마지막으로 치즈크로스로 여과하고, 압력을 걸어 탈수하고, 고형분을 동결건조하고 약 5.6 kg의 건조품을 얻었다. 조제 키토산 함유 다당의 회수율은 원료를 480 kg으로 하여 1.2%이었다.

조제 키토산 함유 다당 5.6 kg을 10 질량% 초산 100 L에 용해하여, 충분히 교반하고 나서 원심분리하고, 그 상청을 가성소다로 중화하고, 원심분리하고 얻어진 키토산 분획부·침전부를 물로 세정하고, 치즈크로스로 여과, 압착하여 수분을 제거한 다음, 동결건조하여 키토산 함유 다당 1.2 kg을 얻었다.

키토산 함유 다당의 회수율은 원재료에 대하여 0.25%, 또는 조제키토산 함유 다당 중에는 20% 이상의 키토산 함유 다당이 함유되게 된다.

## 제조예 8

제조예 7에서 알칼리 가열처리 후, 5배량의 20 질량% 구연산 대신에 20 질량% 유산 2000 L를 가하고, 그 상태에서 하룻밤 정치하는 것을 제외하고는 같은 조작을 실시하였다. 동일한 결과가 얻어졌다.

## 제조예 9

제조예 7에서 알칼리 가열처리 후, 5배량의 20 질량% 구연산 대신에 20 질량% 초산 2000 L를 가하고 그 상태에서 하룻밤 정치하는 것을 제외하고는 같은 조작을 실시하였다. 동일한 결과가 얻어졌다.

## 제제예 1 (키토산 함유 다당을 함유하는 정제)

제조예 6에서 제조한 키토산 함유 다당 10 g에, 사과산 10 g, 아스코르빈산 10 g을 가하고 1000 ml 물로 용해하고, 동결건조하여 수용성 키토산을 제조하였다. 이것은 순수에 순식간에 용해하는 특성을 갖는다. 이 동결건조물 10 g에 만니톨 20 g, 유당 50 g, 폴리텍스트로스 20 g을 가하여 잘 혼합하고, 결합제로서 자당지방산에스테르 2 g을 가하여 정제를 만든다.

이 정제는 고혈압, 당뇨병 등의 생활습관병, 성인병 환자의 혈압, 당뇨치, 혈당치, 뇨산치, 총 콜레스테롤치, 중성지방치등의 저하작용을 갖는다.

## 실시예 1 (정제키토산 함유 다당의 성분분석)

제조예 6에서 제조한 키토산 함유 다당에 대하여 이하의 분석을 실시하였다.

뷰렛법에 따라 단백질의 존재를, 안트론황산법에 의해 환원다당의 존재를 확인하였으며, 단백질 및 환원다당은 어떤 것도 검출되지 않았다.

요소-전분반응은 음성이었으나, 키토산에 고유의 차갈색의 증색이 약간 확인되었다.

폴리비닐황산법 및 엘손물건법에 의해 키토산 함유 다당 중의 글루코사민 함유량을 정량하였다. 근사한 측정치를 나타냈다.

$\beta(1 \rightarrow 3)$ 글루칸 분석을 실시하였으며, 검출한계 이하였다.

또한, 제조예 6에서 가성소다 대신에 에탄올을 사용하여 침전시킨 키토산 함유 다당은 상당한 조해성 또는 흡습성을 갖는다.

제조예 1과 같이 믹서로 분쇄처리한 경우, 다당 부분이 물리적으로 깎여서 짧게 되고, 키토산 부분의 양이 증가하고, 한편, 제조예 3과 같이 슬라이스처리한 경우에는 다당 부분이 많고 보다 자연 상태에 가까운(즉, 키토산부분의 양이 많은) 키토산 함유 다당이 얻어진것 같다.

## 실시예 2 (시장에서 흔히 발견할 수 있는 버섯류중의 키토산 함유 다당)

제조예 2 방법에 따라 시장에서 볼수 있는 각종 버섯을 처리하여 키토산 함유 다당을 얻었다. 생버섯 100 g당 키토산 함유 다당의 함유량(mg), 키토산 함유 다당중의 글루코사민의 함유량(질량%) 및 키토산 함유 다당의 분자량을 표 2에 나타냈다. 분자량은 키토산 함유 다당을 5% 초산에 용해하여 실온에서 하룻밤 정치한 것(키토산 함유 다당농도 0.05%)에 대하여, 오스트왈드형 점도계(시바타(紫田)2630-1)를 이용하여 측정한 것이다. 여기서 분자량은 하기식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Log}M=(\log(1/C*1n(n_{rel}))+3.50)/0.71$$

여기서  $[n_{rel}]$ 은 실험결과로 구해진 상대점도이다.

[표 2]

원재료	키토산 함유 다당 함유량(mg) (주 2)	글루코사민 함유량(%)	키토산 함유 다당 분자량 (만)
민가닥버섯	86	24	15.8
표고버섯	217	26	12.3
팽이버섯	496	15	12.9
아가리쿠스 비스포라스	239	51	39.8
마이다케	19	26	19.5
나메코	5.2	-	1.70
왕게	약10그램	76	

(주2) 버섯은 생버섯으로 약 90%의 수분을 함유한다. 건조버섯으로는 10배량의 키토산이 얻어진다. 마이다케와 나메코로부터, 거의 키토산 함유 다당이 얻어지지 않은 것은 원래 키틴질이 적기 때문으로 생각된다. 이 실험결과, 팽이버섯, 아가리쿠스 비스포라스 및 표고버섯이 원료 가격 및 입수도 용이하고, 본 발명의 키토산 함유 다당의 제조원료로서 적합하다는 것을 알 수 있다.

### 실시예 3 (키토산 함유 다당의 성분분석)

제조예 3에서 제조한 키토산 함유 다당 및 시판 게키토산을, 4M-HCL에서 100 °C, 3시간 가열하므로써 가수분해하였다. 이 가수분해물을 실리카겔 박층 크로마토그래피(Whatman)에서 전개하였다.

전개용제: 부탄올/프로판올/염산

당류 발색에는 아닐린 시약을 사용하였다.

(Ghebregzabher, M., Rufini, S., Sapia, G. M. and Lato, M. 1979; J. Chromatography, 180, 1. 및 Zweig, G. and Sherma, J. (eds.) 1972; CRC Handbook of Chromatography, Vol. 1. 참조)

대조로는 글루코오스, 갈락토오스, 갈락토사민, 글루코사민 및 N-아세틸글루코사민을 이용하고, 본 발명의 키토산 함유 다당 및 게키토산의 산가수분해물을 동시에 전개하였다.

게키토산의 산가수분해물은 글루코사민과 그 이합체(dimer)의 스폿을 부여하며, 키토산 함유 다당의 산가수분해물은 게키토산의 산가수분해물과 동일하게, 글루코사민과 그 이합체의 스폿 외에, 글루코오스의 스폿을 부여하였다.

글루코사민 이합체 양은 게키토산의 산가수분해물 및 키토산 함유 다당의 산가수분해물 모두, 글루코사민 모노머 양의 약 10%이었다.

제조예 3에서 제조한 키토산 함유 다당은 글루코오스의 모리쉬(molisch)반응에 의한 정색반응이 제조예 2에서 제조한 키토산 함유 다당 보다도 강하게 확인되었다. 이 결과는 글루코사민의 함유량 데이터와 잘 일치하고 있다.

또한, 가수분해물 중에 글루코사민과 글루코오스로 이루어진 이당(二糖)의 존재가 확인되지 않기 때문에, 키토산 함유 다당은 글루코사민과 글루코오스의 키메라구조를 갖지 않거나, 그 존재량이 매우 적은 것이 밝혀졌다. 또한, 이러한 키메라구조는 생합성과정이 매우 복잡할 것으로 예상되어, 그러한 구조가 존재할 가능성은 낮은 것으로 추정된다.

키토산 함유 다당의 키토산부분은 글루코사민의 호모폴리머이며, 이 부분이 키토산 함유 다당의 물성을 지배하고 있다. 즉, 키토산 함유 다당에서는, 이 부분이 다당전체의 수%이라도, 글루코사민을 거의 100% 함유하는 갑각류의 키토산과 마찬가지로, 희박한 유기산에 가용이며, 알칼리에 불용이라는 키토산으로서 정의된 성질을 구비한다. 이러한 사실은, 키토산 함유 다당의 글루칸부분의 친수성이 높고, 희박한 유기산에 대한 용해성을 키토산부분이 담당하고 있기 때문으로 생각된다.

### 실시예 4 (키토산 함유 다당의 분자량 및 흡수스펙트럼)

제조예 3 및 6에서 제조한 키토산 함유 다당의 분자량은 측정조건에 의해 변하며, 결과는 다음과 같다.

또한, 오스트왈드형 점도계를 사용한 측정은 2회 실시한 것이다.

[표 3]

측정법	분자량		
	제조예3	제조예6	게키토산
겔여과크로마토그래피법	-	약15만	40만
오스트왈드형 점도계	6~13만	14~28만	40~58만

겔여과크로마토그래피의 겔담체는 셀로파인GCL 2000 m(생화학공업사제조 상품명), 용매는 10% 초산을 사용하였다. 분자량의 마커로서는 페리틴(4만), 감마글로불린(16만), 헤모글로빈(6.45만), 난백알부민(4.6만), 티토크롬C(1.25만)을 사용하였다. 제조예 6의 키토산 함유 다당은 단일 피크를 나타내지 않고, 5만~40만에 분산되며, 중심 분자량은 약 15만이였다. 게키토산은 2만에서 100만에 분산하고, 중심분자량은 40만이였다.

한편, 오스트왈드형 점도계로, 용매로서 0.2M 초산/0.1M NaCl/4M 요소를 사용하여 분자량을 구하면, 제조예 3의 키토산 함유 다당은 6만~13만, 제조예 6의 키토산 함유 다당은 14~28만, 게키토산은 40만~58만이였다. 여기서 분자량의 계산에 Mark-Houwink-사쿠라다식  $[\eta]=K \cdot M^a$ 를 사용하여 계산하였다. 여기서  $[\eta]$ 은 실험결과로부터 구한 고유점도이며, K와 a의 수치로서, 각각  $8.93 \times 10^{-4}$ 와 0.71을 이용하였다.

제조예 2의 키토산 함유 다당에 대하여 농도 2 mg/ml(5% 초산)에서 자외가시흡광도를 측정하였다. 236~239 nm에 작은 피크가 확인되었다.

본 발명의 키토산 함유 다당의 오스트왈드형 점도계로 측정된 분자량은 약 5만~약 40만이였다.

이상의 결과는, 본 발명의 키토산 함유 다당의 글루칸 부분이 복잡한 분기구조를 갖는 글루코오스의 호모폴리머인 사실을 시사하고 있다. 글루칸 부분의 친수성이 높은 것,  $\beta(1-3)$ 글루칸이 검출되지 않는 점, 셀룰라아제에 의해 분해되지 않는 사실로부터, 글루칸 부분의 구조는  $\beta(1-6)$ 의 분기를 많이 가진 글리코젠 및 아밀로펙틴과 유사한 구조를 갖는 것으로 추정된다.

#### 실시예 5 (키토산 함유 다당의 식감테스트)

본 발명의 제조예 2의 키토산 함유 다당 및 시판의 게키토산을 10명의 남녀 각 5명에게 각각 50 mg씩 시식시켰다. 시식한 모든 사람이 게키토산의 불쾌한 잡맛을 느꼈으나, 본 발명의 키토산 함유 다당은, 양호한 식미로 불쾌한 맛은 전혀 없다고 응답하였다. 이러한 사실은 본 발명의 키토산 함유 다당이 식품에 첨가하여도 식미를 거의 손상시키지 않는 사실을 나타내고 있다.

#### 실시예 6 (키토산 함유 다당 섭취에 의한 건강진단 수치 개선효과)

본 발명의 제조예 1의 키토산 함유 다당제제(100 mg/일)을 6개월간, 사람(54세:남성)에게 경구 투여하고, 각종 검사항목에 대하여 그 개선효과를 조사하였다. 결과(키토산 함유 다당의 경구 투여 전후 검사수치의 변화(54세:남성))를 표 4에 나타냈다.

[표 4]

검사항목	투여전	투여후	표준치(참고)
체중	58.6kg	59.0kg	
혈압	최고 120 최저80	최고 98 최저64	90-139 50-89
당뇨	3(+)	1(-)	1(-)
노단백	1(-)	1(-)	1(-)
총콜레스테롤	160	141	120-219
중성지방	71	60	30-149
노산	7.7	6.5	4.0-7.5
클레아티닌	0.7	0.8	0.7-1.2
요소질소	12.9	11.8	8-21.9
수시혈당(식후2시간)	145	112	70-110

본 발명의 키토산 함유 다당제제를 장기(6개월) 경구 투여하므로써, 뇨당, 혈당치, 뇨산 등의 주요 항목에 대하여 개선효과가 확인되었으며, 수치는 정상치로 돌아왔다.

본 발명의 키토산 함유 다당제제 투여 중에 생활태도 및 환경, 체중의 변화는 없이, 건강진단 수치 개선이 확인된 것으로부터 본 발명의 키토산 함유 다당은 고혈압 및 당뇨병 등의 생활습관병, 성인병의 검사수치 개선에 큰 효과가 있다고 할 수 있다.

#### 산업상 이용 가능성

본 발명의 키토산 함유 다당 제조기술을 응용하므로써, 지금까지 대량으로 버려왔던 키토질을 포함한 산업폐기물, 예를 들어 맥주효모 및 향미생물 생산후의 방사선 등의 미생물 고형성분 및 버섯추출물 또는 각종 과실 및 식물의 잔사, 곡물의 종피로부터 신규한 식물성 함량유래의 키토산 함유 다당을 제조하는 것이 가능해졌다. 얻어진 식물성 키토산 함유 다당은 의약 및 건강식품 등의 기능성 식품으로서의 이용이 기대된다. 무엇보다도, 이들 맥주, 에탄올 제조 플랜트의 산업폐기물은 아미노산 및 핵산, 단백질 등을 대량으로 함유하고 있어, 키토산 함유 다당의 정제가 번잡해지므로, 직접 키토산 함유 다당의 원료로 하는 것보다도 버섯의 콘포스트로 실제 이용되고 있기 때문에, 버섯으로 재생산하고, 이것으로부터 키토산 함유 다당을 제조하는 것이 바람직하다고 생각된다. 그렇게 하는 것이 순도가 높은 식물성 키토산 함유 다당을 용이하게 얻는 것이 가능하기 때문이다.

본 발명의 키토산 함유 다당의 제조방법은, 기본적으로는 키토를 함유하는 모든 곡물 및 식물성분에 응용가능하며, 일반적인 유용성이 매우 높다.

## (57) 청구의 범위

### 청구항 1.

하기 특성을 갖는 키토산 함유 다당

- (1) 구성당: 글루코사민과 글루코오스로 구성되며, 구성몰비가 1~5:5~1이다.
- (2) 분자량: 오스트왈드형 점도계로 측정한 분자량은 약 5만~약40만이다. 또한, 겔 여과 크로마토그래피에 의해 측정한 분자량은 약 4만~약 20만이다.
- (3) 구성단위: 주로 키토산부분과 글루칸 부분으로 구성되어 있다.
- (4) 결합의 종류:  $\beta(1\rightarrow4)$  결합 및  $\beta(1\rightarrow6)$  결합을 함유하나,  $\beta(1\rightarrow3)$ 결합을 함유하지 않는다.
- (5) 효소에 의한 분해성: 키토사나아제에 의해 올리고당으로 분해되나, 셀룰라아제에 의해 분해되지 않는다.
- (6) 단백질 및 환원성 다당: 단백질 및 환원성 다당을 포함하지 않는다.
- (7) 정색반응: 요소-전분반응에 음성이다.
- (8) 물질의 색: 무색(백색)이다.
- (9) 용해성: 5~10 질량%의 초산, 사과산 또는 아스코르빈산 수용액에 용해하나, 물, 에탄올, pH 10 이상의 알칼리성 수용액에는 용해하지 않는다.

### 청구항 2.

글루코오스와 글루코사민의 구성몰비가 1:1인 상기 청구항 1 기재의 키토산 함유 다당.

### 청구항 3.

키토산 함유량이 18~72%인 상기 청구항 1 또는 2 기재의 키토산 함유 다당.

### 청구항 4.

키토산부분이 글루코사민의 호모폴리머인 상기 청구항 1~3 중 어느 한 항 기재의 키토산 함유 다당.

### 청구항 5.

글루칸부분이 글루코오스의 호모폴리머인 상기 청구항 1~4 중 어느 한 항 기재의 키토산 함유 다당.

### 청구항 6.

버섯을 25~50 질량%의 가성 알칼리 수용액 중, 가열처리한 후, 고액분리하고, 얻어진 고형분을 유기산 수용액에 용해하고, 여기에 알코올을 첨가하거나 또는 pH 10 이상이 되도록 가성 알칼리를 첨가하여 침전을 생기게 하고, 이 침전을 세정, 건조하는 것을 특징으로 하는 상기 청구항 1~5 중 어느 한 항 기재의 키토산 함유 다당의 제조방법

## 청구항 7.

가성 알칼리 수용액중의 가열처리 전에, 버섯을 셀룰라아제 또는 글루카나아제에 의해 예비 처리하는 것을 특징으로 하는 상기 청구항 6 기재의 키토산 함유 다당의 제조방법.

## 청구항 8.

버섯이 아가리쿠스 비스포라스인 상기 청구항 6 또는 7 기재의 키토산 함유 다당의 제조방법.

## 청구항 9.

버섯을 25~50 질량%의 가성 알칼리 수용액 중, 가열처리한 후, 점도를 3~20 mPa·s로 조정한 후, 고액분리하고, 얻어진 고형분을 세정, 건조하는 것을 특징으로 하는 상기 청구항 1~5 중 어느 한 항 기재의 키토산 함유 다당의 제조방법.

## 청구항 10.

가성 알칼리 수용액중 가열처리한 후, 물 또는 산을 첨가하여 점도를 3~20 mPa·s로 조정하는 상기 청구항 9 기재의 키토산 함유 다당의 제조방법.

## 청구항 11.

상기 청구항 1~5 중 어느 한 항 기재의 키토산 함유 다당을 유효성분으로 함유하는 의약조성물.

## 청구항 12.

생활습관병의 치료 또는 예방을 위한 상기 청구항 11 기재의 의약조성물

## 청구항 13.

상기 청구항 1~5 중 어느 한 항 기재의 키토산 함유 다당을 유효성분으로 함유하는 식품.

## 요약

키토산 함유 다당, 그 제조방법, 이를 포함하는 의약품, 식품을 제공한다. 버섯을 농가성(濃苛性) 알칼리 수용액 중, 가열처리한 후, 고액분리하여, 얻어진 고형분을 유기산 수용액에 용해하고, 여기에 알코올 또는 가성 알칼리를 가하여 침전을 일으키고, 그 침전을 세정, 건조하여 얻어진 키토산 함유 다당. 키토산 함유 다당은 글루코사민의 호모폴리머와 글루칸이 공유결합으로 결합한 화합물이며, 글루코사민과 글루코오스의 구성몰비는 1~5:5~1, 분자량 약 15만,  $\beta(1\rightarrow4)$  결합 및  $\beta(1\rightarrow6)$ 결합을 함유하며,  $\beta(1\rightarrow3)$ 결합을 함유하지 않는다. 단백질 및 환원성 다당을 포함하지 않는다. 본 키토산 함유 다당은 고혈압, 당뇨병 등의 생활습관병의 예방 및 치료에 효과가 있다.

## 색인어

키토산, 다당, 버섯, 고혈압, 당뇨병