

Chitin 및 Chitosan이 생체내 카드뮴 축적에 미치는 영향 - Chitin, Chitosan 및 Dithiocarbamate Chitosan이 흰쥐 간내 카드뮴 축적에 미치는 영향 -

유일수 · 류문희* · 이종섭**

이리농공전문대학 화학공학과 및 *식품공학과, **원광대학교 의과대학 예방의학교실

A Study on the Effect of Chitin, Chitosan and Dithiocarbamate Chitosan on the Cadmium Accumulation in Liver of Rats

Il-Soo You, Moon-Hee Ryu* and Jong Sub Lee**

Department of Chemical Engineering,

Iri National College of Agricultural and Technology, Iksan, 570-110

**Department of Food Engineering,*

Iri National College of Agricultural and Technology, Iksan, 570-110

***Department of Preventive Medicine, School of Medicine,*

Wonkwang University, Iksan, 570-749

ABSTRATS

When rats are exposed to cadmium in their diet, the cadmium accumulates in the liver. This study was carried out to investigate the effect of chitin, chitosan and dithiocarbamate chitosan on the cadmium accumulation in liver of rats. For this experiment, 10 male Sprague-Dawley were used. The experimental groups were divided into four independent groups which were one control group and three experimental groups by cadmium alone treatment or chitin, chitosan and dithiocarbamate chitosan with cadmium. In order to investigate the eliminative effect of chitin, chitosan and dithiocarbamate chitosan on the cadmium accumulation in liver of rats, the cadmium concentration, the metallothionein level and the enzyme activities were measured. The results obtained revealed the eliminative effect of cadmium in liver of rats by chitin, chitosan and dithiocarbamate chitosan. The effect of chitin on the cadmium elimination was less than that of chitosan and dithiocarbamate chitosan. Also it shows that the eliminative effect of cadmium by dithiocarbamate chitosan was the highest.

Key words: Cadmium, Liver, Chitin, Chitosan, Dithiocarbamate chitosan, Metallothionein level, Enzyme activity

I. 서 론

카드뮴은 1817년 독일의 슈트르마이어가 산화아연을 연구하는 과정에서 발견되었으며 고대회랍어 카드메이어에서 유래된 것으로 알려졌다. 다양한 산업에 응용되고 있다. 특히 원자로에서 핵반응조정

에 카드뮴봉이 사용됨에 따라서 그 수요는 더욱 증가될 것으로 예측된다(조수현 등, 1989). 카드뮴은 산화카드뮴, 염화카드뮴 등의 형태로 존재하며, 원자량은 112.40, 비중이 8.642, 비점이 767°C 인 금속으로써 용광로, 용해로, 농축실 등에 근무하는 근로자 및 금, 은, 비스무스, 알루미늄합금 제조자, 카드뮴 축전지, 치과용 아말감 합금 공정에서 근무하는 사람들에 노출되며, 이와같은 생산과정에서 배출되는 카드뮴은 수질을 오염시키며 수중에 함유되어 있는

이 논문은 1996년 학술진흥재단의 공모과제에 의하여 연구되었음.

물을 농업용수로 사용함에 따라서 농토에 카드뮴의 농축량을 증가시킨다. 따라서 이곳에서 재배되는 농작물에 축적되어 이것을 식품으로 이용함에 따라서 인체에 농축된다고 보고하고 있으며, 또한 공장폐수에서 배출되는 카드뮴이 강 주위의 하천에 서식하는 어패류에 카드뮴의 축적량을 증가시키고 있다. 또한 수질내 카드뮴의 노출량이 많을수록 여기에 서식하는 어패류의 오염도가 증가되고, 이것을 최종적으로 섭취하게 되는 인간에게 농축되어 다양한 질병을 일으킨다(Kage *et al.*, 1961; Pulido *et al.*, 1966). 그 중독 현상은 급성중독으로는 금속열과 같은 고열, 기도, 폐를 손상케하며, 인후부 통증, 기침, 두통, 어지럼증과 구토증 및 호흡곤란등이 수반되고, 만성중독으로는 후각이상, 식욕부진, 반복성 설사, 위장 장애 및 체중감소등을 일으킨다.

중금속 해독제로는 Ca_2Na_2 EDTA를 사용하는데 이것은 중금속과 강한 친화성 킬레이트제이나 신장독성을 유발한다(Bough, 1975a, b; Kostonis and Klassen, 1977). 또한 해독제 Penicillamine은 위장관에서 잘 흡수되는 장점을 가지고 있으나, 백혈구 감소증, 재생 불량성 빈혈등을 유발시킬수 있는 것으로 알려졌다(Sillem and Martell, 1964; Pulido *et al.*, 1966).

N-acetyl-D,L-penicillamine은 독성이 약하고 생체내 안정도가 큰 금속-thiol 화합물을 형성하여 금속의 배출을 촉진 시키며 재흡수에 의한 위의 손상을 나타내지 않는다고 보고 되었다(이영옥과 박서의, 1986; Gabard, 1976).

키틴, 키토산은 갑각류와 고등식물등에 다량 함유되어 있어 자원은 풍부하나 거의 이용되지 못하였지만 현재는 그 이용량이 급격히 증가하고 있다(Muzzarell and Tafani, 1981). 키틴, 키토산은 항균활성, 항종양활성, 콜레스테롤 저하작용, 식품공업, 화장품, 섬유공업 및 폐수처리등에 다양하게 이용되고 있다(Sakaguchi *et al.*, 1979). 키틴을 탈아세틸화하여 얻어진 키토산은 유리 1차 아미노기의 증가로 중금속 이온에 대하여 키틴보다 우수한 흡착능력을 가지며, 키틴의 탈아세틸화가 증가됨에 따라서 Hg와 Cu의 흡착정도의 변화를 측정하여 보고한바 있다(Tong *et al.*, 1991; Hall and Yalpani, 1980; Maruca *et al.*, 1982). 또한 활성화된 키토산계 분리용 소재의 제조와 금속이온 분리능에 관한 연구에서 키틴 및 키토산의 다공성 분말 및 구형의 성형체를 제조하여 금속이온의 분리능을 실험한 결과 Cu^{2+} 및 Ni^{2+} 의 제조 효과가 있는 것으로 보고한 바 있다(최규석과 류영환, 1990).

키틴유도체는 인체에 무해한 것으로 보고되고 있으며(Meyer *et al.*, 1981), 생체내 소화성이 좋고 생가공성이 용이하기 때문에 각종 의료용 신소재로의 활용에 대한 연구가 진행 중이고(김용무 등, 1988; Bough, 1975), 또한 생체내 친화성이 있어 상처 치유의 촉진 효과를 가지며 혈청단백질등과 같은 혈액 성분의 흡착능이 높아서 지혈효과가 있는 것으로 알려졌다(Maruca *et al.*, 1982).

Jamall and Smith(1985)는 카드뮴을 투여한 집단의 glutathione peroxidase 활성도를 측정된 결과 카드뮴을 투여하지 않은 집단에 비하여 증가하는 것으로 보고하고 있으며, 안령미(1992)는 정상집단에 비하여 카드뮴 투여군에서 glutathione-peroxidase 활성도가 증가하는 것으로 보고 한 바 있다.

Boudreau(1988) 등은 카드뮴을 폭로시킨 쥐폐의 항산화효소의 활성도를 조사한결과 glutathione-reductase 활성도가 정상군에 비하여 카드뮴 폭로군에서 증가하는 것으로 보고한 바 있으며, 안령미(1992)는 카드뮴을 음용수에 용해시켜 쥐에게 투여한 결과 비폭로군에 비하여 폭로군의 간장 및 신장내 glutathione-reductase 활성도가 증가하였으며, 또한 카드뮴을 폭로시킨 후 부추를 식이시킨 결과 glutathione-reductase 활성도가 감소하였다고 보고 하였다.

Ohta and Imamiya(1986)는 카드뮴을 폭로시킨 집단의 glutathione-s-transferase 활성도가 카드뮴 비폭로집단에 비하여 증가하였고, 카드뮴과 셀레늄을 동시에 투여시키면 glutathione-s-transferase 활성도가 감소한다고 발표하였다.

본 실험에서는 흰쥐에게 카드뮴을 단독 투여하여 간장내 카드뮴의 농도를 측정하였고, 또한 계를 산, 알칼리처리하여 얻은 키틴, 키틴을 탈아세틸화하여 얻은 키토산 및 키토산을 알칼리성에서 CS_2 로 처리하여 얻어진 dithiocarbamate chitosan을 이용하여 흰쥐 간장내 카드뮴의 제거효과, metallothionein량 및 glutathione-peroxidase, glutathione-reductase와 glutathione-s-transferase의 활성도를 측정하여 키틴, 키토산 및 dithiocarbamate chitosan에 의한 흰쥐 간장내 카드뮴 농축량 감소효과를 조사하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

1) 실험동물

원광대학교 의과대학 실험동물 사육실에서 사육된 Sprague Dawley 흰쥐 3~4주령 숫컷을 공급받아 2주동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 사육실 환경은 온도 18~24°C, 습도 40~70% 범위를 유지하였다.

2) Chitin 제조

시중에서 구입한 계의 껍질을 물로 세척하여 불순물을 제거한후 2N-HCl 용액에 12시간 침적시켜 탄산칼슘을 용출해내고 분해하였다. 24시간 실온에서 방치한 후 충분히 세척한 다음 15°C 이하 온도에서 4%-NaOH 수용액으로 24시간 동안 처리하여 단백질을 분해 제거하고 증류수로 세척하였다. 이와 같은 산과 알칼리 처리 작업을 5회 반복한 다음, 3% H₂O₂-1N-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°C에서 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°C에서 진공 건조시켰다.

4) Dithiocarbamate Chitosan 합성

키틴 분말 60 g을 40%-NaOH 수용액 1 l를 넣고 110°C로 8시간 가열한 후 여과하여 증류수로 충분히 세척한 다음 메탄올 500 ml와 암모니아 100 ml를 분산시키고 CS₂ 60 ml를 넣어 2일간 실온에 방치한 후 여과하여 메탄올, 증류수로 7회 반복 세척하여 실온에서 건조시켜 건조기(desicator)에 보관하였다.

2. 실험방법

1. 흰쥐에 카드뮴, Chitin, Chitosan 및 Dithiocarbamate Chitosan 투여

흰쥐는 1개의 대조군과 3개의 실험군으로 각각 10마리씩 분류하였다. 대조군은 카드뮴 농도를 100 mg/l 되도록 만들어 12주 동안 음용수로 자유롭게 음용토록 하였다. 실험군은 100 mg/l 카드뮴과 키틴, 키토산 및 dithiocarbamate chitosan을 동물사료에 0.1%, 0.2%, 0.3% 비율로 혼합하여 12주 동안 흰쥐에게 무제한 식이토록 하였다.

2. 흰쥐 간장내 카드뮴농도 측정

흰쥐의 간장을 적출하여 0.5g을 취하여 킬달 플라스크에 넣고 여기에 Conc. HNO₃ 5 ml와 Conc. H₂SO₄ 10 ml를 가한 다음 100°C Hot plate 상에서 유기물을 분해 시켰으며, 이때 분해액의 색이 황색-무색이 될 때까지 Conc. HNO₃를 가하였다. 이와같이 유기물의 분해와 완료된 시료를 DDTc-MIBK 추출방법에 의하여 카드뮴을 추출후 원자흡광분광광도계(Varian spectra. AA-30)로 Wave length 217 nm, Lamp current 10 mA, Slit 0.7 nm에서 카드뮴 함량을 측정하였다.

3. 흰쥐 간장내 Metallothionein(MT)량 측정

조직중의 metallothionein은 간장을 0.5g 취하여 생리적 식염수로 세척한 후 0.25M 설탕용액(sucrose, Sigma)를 가하면서 Teflon glass homogenizer를 이용하여 조직을 균질화되도록 하였으며 4°C에서 20분간 원심분리하였다. 이 조직액 0.2 ml에 0.03M 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 수욕탕에 1분간 정지시켜 변성시킨 후 1,000 g을 원심분리하여 상층액을 취하였다. 이상의 rat RBC hemolysate 첨가와 열처리 및 원심분리 과정을 3회 반복하여 얻은 시료의 카드뮴 농도를 측정하는데 이용하고, 최종적인 MT 농도 계산은 카드뮴 6 g 원자와 1M의 MT(분자량 6,050)와 결합하는 것으로 환산하여 조직 g당 mgMT 농도를 구하였다.

4. 간장의 활성도 측정

1) Glutathione-peroxidase 활성도

Taglia의 방법을 응용한 방법 즉 인산염 완충용액에 GSH, NaN₃, NADPH, glutathione peroxide를 시험관에 넣고 효소액을 첨가하여 전체의 액량을 3 ml되게 만든다음 5 mM H₂O를 기질로 사용하여 분광광도계를 이용하여 340 nm에서 흡광도 감소량을 60초간 측정하였다. 효소의 단위는 1분당 1 mole의 NADPH가 감소되는 효소량을 1 units로 나타냈으며 E_c=6.22×10³ M⁻¹ cm로 부터 NADPH 감소되는 효소량을 구하였다.

2) Glutathione-reductase 활성도

Carlberg가 고안한 방법 즉 Glutathione, EDTA 및

NADPH를 함유하고 있는 인산염완충용액을 효소액에 첨가하여 30°C에서 온도평형을 맞춘 후 340 nm에서 흡광도를 1분간 측정하여 소비되는 NADPH 감소량을 $E_c=6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 로 부터 구하였다.

3) Glutathione-s-transferase 활성도

Jalcopy 등이 고안한방법 즉 인산염완충용액에 GSH, 효소액 및 1-chloro-2,4-dinitrobenzene을 넣고 37°C에서 평형온도를 맞추어 340 nm에서 흡광도를 측정하여 $E_c=9.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 를 이용하여 계산하였다.

4) 조직검사

조직을 10% 포르말린에 고정시킨 후 Haematoxylineosin 염색표본을 만든 후 형광현미경으로 조직 사진을 찍었다.

III. 결과 및 고찰

카드뮴은 페인트, Cd축전지, 전기도금, 플라스틱 제조등 공업생산물로부터 노출되어 수질을 오염시키며 수중에 함유되어 있는 물을 농업용수로 사용함에 따라서 농토에 카드뮴의 농축량을 증가시킨다. 따라서 이곳에서 재배되는 농작물에 축적되고 이것을 식품으로 이용함에 따라서 인체에 농축된다고 보고하고 있으며, 또한 공장폐수에서 배출되는 카드뮴이 강주위의 하천에 서식하는 어패류에 카드뮴의 축적량을 증가시키고 있다. 따라서 먹이사슬에 의하여 최종 소비자인 인체에 축적되어 metallothionein의 합성이 이루어지지 않아 중독을 일으키는 것으로 보고 되고 있다(Kage and Vallee, 1961; Pulido *et al.*, 1966). 이와같이 독성이 있는 카드뮴은 26개 sulfhydryl기를 가지고 있는 metallothionein과 결합하여 서서히 체외로 배설되어 카드뮴을 해독시킨다는 보고가 있다(최규석과 류영환, 1990; Eaton and Toal, 1982). 중금속, 특히 카드뮴과 같은 2가 금속은 metallothionein 형성에 중요한 요인으로 작용한다고 보고 되고 있으며, metallothionein은 cysteine을 가지고 있어 카드

뮴과 결합하여 카드뮴 독성을 완화 시키는 것으로 알려졌다(Hunt *et al.*, 1984).

본 실험에서 나타난 결과에서 흰쥐 간장내 카드뮴 농축량 감소효과는 키틴에서 가장 낮은 것은 키틴내에는 카드뮴과 착물을 형성할 수 있는 리간드가 적기 때문인 것으로 생각된다. 키토산은 키틴을 탈아세틸화하여 금속과 안정한 착물을 형성할 수 있는 아미노기를 증가시켰기 때문에 흰쥐 간장내 카드뮴 농축량 감소효과가 향상된 것으로 사료되며, 키토산 유도체인 dithiocarbamate chitosan은 키토산을 알칼리성에서 CS_2 로 처리하여 얻어지며, 이것은 thiol기가 있어서 카드뮴과 킬레이트결합을 형성하여 흰쥐 간장내 카드뮴 농축량 감소효과가 더욱 증가되는 것으로 사료된다.

흰쥐 간장내에 함유되어 있는 metallothionein량이 키틴 투여군에서는 대조군과 거의 차이를 보이지 않는 것은 흰쥐 간장내에서의 카드뮴 농축량 감소효과가 낮은 것과 밀접한 상관성이 있는 것으로 생각된다. 그러나 키토산 및 dithiocarbamate chitosan을 투여한 군에서는 키틴을 투여한 군에 비하여 metallothionein의 함량이 높은 것을 볼 수 있는데 이는 키토산 및 dithiocarbamate chitosan에 의한 흰쥐 간장내 카드뮴 농축량 감소효과가 크다는 것을 알 수 있었다.

흰쥐 사료에 키틴을 혼합하여 투여한 결과 효소 활성도에 큰 변화가 없는 것은 키틴에 의한 카드뮴 농축량 감소효과가 낮은 것으로 생각되며, 키토산 및 dithiocarbamate chitosan을 투여한 군에서는 투여량이 증가할 수록 또한 투여기간이 길어질 수록 간장내 glutathione-peroxidase 활성도가 증가하고, glutathion-reductase 활성도와 glutathione-s-transferase 활성도가 감소하는 것으로 보아 키토산 및 dithiocarbamate chitosan에 의한 흰쥐 간장내 카드뮴 농축량 감소효과가 크다는 것을 알 수 있었다.

Table 1. Concentration of cadmium in rat liver consuming water containing 100 mg/l cadmium chloride with basal diet and 0.1%, 0.2%, 0.3% chitin diet (Unit : mg/kg, Mean±SD)

Treatment	3weeks	6weeks	9weeks	12weeks
Cadmium only	15.36±3.12	16.55±2.32	18.37±3.30	19.02±3.16
Cadmium with 0.1% chitin	15.63±5.10	15.97±5.55	17.93±3.87	19.13±3.45
Cadmium with 0.2% chitin	15.03±2.98	16.37±3.90	19.33±5.11	18.93±2.98
Cadmium with 0.3% chitin	15.87±3.91	16.33±4.92	18.39±3.99	17.67±5.22*

*Significantly different from cadmium only treatment group at $P<0.05$.

Table 2. Concentration of cadmium in rat liver consuming water containing 100 mg/l cadmium chloride with basal diet and 0.1%, 0.2%, 0.3% chitosan diet (Unit : mg/kg, Mean ± SD)

Treatment	3weeks	6weeks	9weeks	12weeks
Cadmium only	15.36±3.12	16.55±2.32	18.37±3.30	19.02±3.16
Cadmium with 0.1% chitosan	14.31±5.34	15.39±3.67	17.12±5.66*	17.67±5.99*
Cadmium with 0.2% chitosan	14.11±3.32	15.20±2.09	18.09±3.89	18.35±3.77
Cadmium with 0.3% chitosan	15.23±4.30	15.56±5.98	17.38±3.08*	17.23±5.73

*Significantly different from cadmium only treatment group at P<0.05.

Table 3. Concentration of Cadmium in rat liver consuming water containing 100 mg/l cadmium chloride with basal diet and 0.1%, 0.2%, 0.3% dithiocarbamate chitosan diet (Unit : mg/kg, Mean ± SD)

Treatment	3weeks	6weeks	9weeks	12weeks
Cadmium only	15.36±3.12	16.55±2.32	18.37±3.30	19.02±3.16
Cadmium with 0.1% dithiocarbamate chitosan	14.29±4.88	15.67±5.96	18.22±5.93	18.12±4.95
Cadmium with 0.2% dithiocarbamate chitosan	13.24±3.28*	14.58±5.08*	16.82±5.31*	16.99±3.81*
Cadmium with 0.3% dithiocarbamate chitosan	13.77±2.90*	13.76±3.65*	16.11±3.23*	16.75±3.07*

*Significantly different from cadmium only treatment group at P<0.05.

1. 흰쥐 간장내 Cadmium 농도

흰쥐에게 카드뮴 농도를 100 mg/l 되도록 만들어 음용수로 자유롭게 음용시킨 결과 간장내 카드뮴 축적량은 15.36 mg/kg(3주), 16.55 mg/kg(6주), 18.37 mg/kg(9주), 19.02 mg/kg(12주)으로 카드뮴을 장기간 투여 할 경우 간장내 카드뮴의 농도가 증가 하는 것을 볼 수 있었다.

흰쥐의 사료에 키틴을 함량 비율로 혼합하여 식이 시킨 결과 카드뮴 단독 투여군에 비하여 간장내 카드뮴 농도가 감소하지 않았다(Table 1).

키토산을 0.1% 비율로 혼합하여 흰쥐에게 식이시킨 결과 카드뮴 농도가 3주 투여군에서는 14.31 mg/kg, 12주 투여군에서는 17.67 mg/kg로 감소되었다. 0.3% 키토산을 식이시킨 경우에는 카드뮴 농도가 15.23 mg/kg(3주)-17.23 mg/kg(12주)으로 감

소하는 것을 볼 수 있었다(Table 2).

0.1% dithiocarbamate chitosan을 혼합하여 식이시킨 결과 간장내 카드뮴 농도는 14.29 mg/kg(3주)~18.12 mg/kg(12주)이고, 0.3% 비율로 식이시켰을 때는 13.77 mg/kg(3주)-16.75 mg/kg(12주)로 dithiocarbamate chitosan의 비율을 증가시켜 식이시킬 수 록 간장내 카드뮴 농도가 감소하는 것을 알 수 있었다(Table 3).

2. 흰쥐 간장내 Metallothionein량

카드뮴 단독 투여군에서 3주군의 간장내 metallothionein량이 3.53 mg/g으로 나타났고, 6주(3.28 mg/g), 9주(2.62 mg/g), 12주(2.27 mg/kg)로 투여기간이 길어질수록 metallothionein량이 감소하는 것을 알 수 있었다.

Table 4. Metallothionein levels in rat liver consuming water containing 100 mg/l cadmium chloride with basal diet and 0.1%, 0.2%, 0.3% chitin diet (Unit : mg/g, Mean ± SD)

Treatment	3weeks	6weeks	9weeks	12weeks
Cadmium only	3.53±0.35	3.28±0.69	2.62±0.55	2.27±0.67
Cadmium with 0.1% chitin	3.55±0.23	3.34±0.35	2.59±0.31	2.39±0.34
Cadmium with 0.2% chitin	3.49±0.43	3.55±0.39	2.77±0.52	2.51±0.69*
Cadmium with 0.3% chitin	3.60±0.26	3.45±0.53	2.89±0.38*	2.50±0.32*

*Significantly different from cadmium only treatment group at P<0.05.

Table 5. Metallothionein levels in rat liver consuming water containing 100 mg/l cadmium chloride with basal diet and 0.1%, 0.2%, 0.3% chitosan diet (Unit : mg/g, Mean±SD)

Treatment	3weeks	6weeks	9weeks	12weeks
Cadmium only	3.53±0.35	3.28±0.69	2.62±0.55	2.27±0.67
Cadmium with 0.1% chitosan	3.61±0.41	3.45±0.19	2.93±0.32*	2.56±0.81
Cadmium with 0.2% chitosan	3.60±0.65	3.77±0.57*	2.89±0.51	2.71±0.25*
Cadmium with 0.3% chitosan	3.81±0.47*	3.79±0.73*	3.21±0.33*	3.11±0.45*

*Significantly different from cadmium only treatment group at P<0.05.

Table 6 Metallothionein levels in rat liver consuming water containing 100 mg/l cadmium chloride with basal diet and 0.1%, 0.2%, 0.3% dithiocarbamate chitosan diet (Unit : mg/g, Mean±SD)

Treatment	3weeks	6weeks	9weeks	12weeks
Cadmium only	3.53±0.35	3.28±0.69	2.62±0.55	2.27±0.67
Cadmium with 0.1% dithiocarbamate chitosan	3.89±0.37*	3.49±0.36	2.90±0.55*	2.77±0.25*
Cadmium with 0.2% dithiocarbamate chitosan	3.78±0.24	3.51±0.32*	2.87±0.63*	2.85±0.58*
Cadmium with 0.3% dithiocarbamate chitosan	4.13±0.56*	3.81±0.69*	3.20±0.33*	3.03±0.85*

*Significantly different from cadmium only treatment group at P<0.05.

사료에 키틴을 0.1%, 0.2%, 0.3% 비율로 혼합하여 식이 시킨 결과 흰쥐 간장내 metallothionein량은 거의 변화가 없었다(Table 4).

키틴산을 0.1% 비율로 혼합하여 식이시킨 군의 간장내 metallothionein량은 3.61 mg/g(3주)~2.56 mg/g(12주)이고, 0.3% 비율로 혼합하여 식이시킨 군은 3.81 mg/g(3주)~3.11 mg/g(12주)으로 키틴산의 양을 증가시킬수록 간장내 metallothionein량이 증가하는 것을 볼 수 있었다(Table 5).

Dithiocarbamate chitosan을 0.1%, 0.2%, 0.3% 비율로 사료에 혼합하여 식이시킨 결과 각 투여군에서의 metallothionein량은 각각 3.89 mg/g(3주)~2.77 mg/g(12주), 3.78 mg/g(3주)~2.85 mg/g(12주), 4.13 mg/g(3주)~3.03 mg/g(12주)으로 metallothionein 함량이 현저히 증가하는 것으로 나타났다(Table 6).

3. 흰쥐 간장내 Glutathione-Peroxidase 활성도

카드뮴을 음용수에 용해시켜 투여한 결과 흰쥐 간장내 glutathione-peroxidase 활성도가 5.01 mg/g(3주), 4.88 mg/g(6주), 4.63 mg/g(9주), 4.32 mg/g(12주)로 식이 기간이 길어질수록 감소하는 것을 알 수 있었다. 흰쥐 사료에 키틴을 혼합하여 먹인 결과 glutathione-peroxidase 활성도는 별 차이가 없었다. 0.3% 키틴산을 투여한 군에서는 5.31 mg/g(3주)~4.77 mg/g(12주)이었고, 0.3% dithiocarbamate chitosan을 먹인 집단에서는 5.55 mg/g(3주)~4.78 mg/g(12주)으로 투여량이 증가할수록 또한 투여기간이 길어질수록 간장내 glutathione-peroxidase 활성도 값이 증가하는 것을 볼 수 있었다(Table 7-9).

4. 흰쥐 간장내 Glutathione-Reductase 활성도

Table 7. Glutathione-peroxidase activity in rat liver consuming water containing 100 mg/l cadmium chloride with basal diet and 0.1%, 0.2%, 0.3% chitin diet (Unit : moles/min/g, Mean±SD)

Treatment	3weeks	6weeks	9weeks	12weeks
Cadmium only	5.01±0.98	4.88±1.36	4.63±0.99	4.32±1.21
Cadmium with 0.1% chitin	5.12±1.45	4.87±1.11	4.71±1.65	4.43±1.13
Cadmium with 0.2% chitin	5.09±1.21	5.00±0.92	4.85±1.09*	4.39±0.99
Cadmium with 0.3% chitin	5.23±1.39	4.98±1.43	4.91±1.19*	4.42±0.91

*Significantly different from cadmium only treatment group at P<0.05.

Table 8. Glutathione-peroxidase activity in rat liver consuming water containing 100 mg/l cadmium chloride with basal diet and 0.1%, 0.2%, 0.3% chitosan diet (Unit : moles/min/g, Mean±SD)

Treatment	3weeks	6weeks	9weeks	12weeks
Cadmium only	5.01±0.98	4.88±1.36	4.63±0.99	4.32±1.21
Cadmium with 0.1% chitosan	5.12±1.74	4.98±0.67	4.77±1.15	4.55±0.98
Cadmium with 0.2% chitosan	5.12±0.99	5.21±1.25*	4.79±0.82	4.56±1.22*
Cadmium with 0.3% chitosan	5.31±1.13*	5.22±1.51*	5.00±1.37*	4.77±1.53*

*Significantly different from cadmium only treatment group at P<0.05.

Table 9. Glutathione-Peroxidase activity in rat liver consuming water containing 100 mg/l cadmium chloride with basal diet and 0.1%, 0.2%, 0.3% dithiocarbamate chitosan diet (Unit : moles/min/g, Mean±SD)

Treatment	3weeks	6weeks	9weeks	12weeks
Cadmium only	5.01±0.98	4.88±1.36	4.63±0.99	4.32±1.21
Cadmium with 0.1% dithiocarbamate chitosan	5.23±1.35*	5.00±0.95	4.78±1.16*	4.41±0.91
Cadmium with 0.2% dithiocarbamate chitosan	5.21±0.69*	5.02±1.15	4.77±0.86*	4.45±1.10
Cadmium with 0.3% dithiocarbamate chitosan	5.55±2.01*	5.37±1.15*	4.92±1.19*	4.78±1.32*

*Significantly different from cadmium only treatment group at P<0.05.

흰쥐에게 카드뮴을 단독으로 투여한 결과 신장내 glutathione-reductase 활성도는 111.09 mg/kg(3주), 115.02 mg/kg(6주), 116.23 mg/kg(9주), 117.09 mg/kg(12주)로 투여기간이 길 수록 증가하였다. 사료에 키틴 0.3%를 혼합하여 식이시킨 결과는 108.72 mg/kg(3주)~114.91 mg/kg(12주)으로 glutathione-reductase 활성도의 변화는 미약하였다. 그러나 0.1%, 0.3% 키토산을 혼합하여 투여했을 때 신장내 glutathione-reductase 활성도는 각각 108.92 mg/kg(3주)~114.81 mg/kg(12주), 106.29 mg/kg(3주)~1e09.85 mg/kg(12주)이고, 0.1%, 0.3% dithiocarbamate chitosan을 투여한 결과는 각각 108.11 mg/kg(3주)~113.82 mg/kg(12주), 105.82 mg/kg(3주)~107.92 mg/kg(12주)으로 키토산과 dithiocarbamate chitosan을 투여한 흰쥐 신장내 glutathione-reductase 활성도가 현저히 감소하는 것을 볼 수 있

었다(Table 10-12).

5. 흰쥐 간장내 Glutathione-s-Transferase 활성도

카드뮴을 음용수에 용해시키어 3주간 폭로시킨 결과 glutathione-s-transferase 활성도는 391.67 mg/kg 이었으며 12주간 식이시킨 결과는 416.87 mg/kg으로 카드뮴 폭로기간이 길어질 수록 간장내에서 증가하는 것을 볼 수 있었다.

키틴을 0.1%, 0.2%, 0.3% 비율로 사료에 혼합하여 식이시켰으나 glutathione-s-transferase 활성도 변화가 거의 없는 것을 볼 수 있었다. 그러나 키토산 및 dithiocarbamate chitosan 식이군에서의 glutathione-s-transferase 활성도가 감소하는 것으로 나타나 키토산 및 dithiocarbamate chitosan은 흰쥐 간장내 카드뮴 제거효과가 있다는 것을 알 수 있었다(Table 12-15).

Table 10. Glutathione-reductase activity in rat liver consuming water containing 100 mg/l cadmium chloride with basal diet and 0.1%, 0.2%, 0.3% chitin diet (Unit : moles/min/g, Mean±SD)

Treatment	3weeks	6weeks	9weeks	12weeks
Cadmium only	111.09±8.07	115.02±10.23	116.23±9.13	117.09±10.87
Cadmium with 0.1% chitin	112.98±19.23	114.99±12.43	115.98±9.91	116.99±10.47
Cadmium with 0.2% chitin	108.99±10.92	113.97±9.81	115.28±10.39	116.83±9.82
Cadmium with 0.3% chitin	108.72±11.09	114.11±10.28	113.83±13.73	114.91±8.90

Table 11. Glutathione-reductase activity in rat liver consuming water containing 100 mg/l cadmium chloride with basal diet and 0.1%, 0.2%, 0.3% chitosan diet (Unit : moles/min/g, Mean±SD)

Treatment	3weeks	6weeks	9weeks	12weeks
Cadmium only	111.09±8.07	115.02±10.23	116.23±9.13	117.09±10.87
Cadmium with 0.1% chitosan	108.92±12.96	113.43±10.37	113.99±10.36	114.81±12.92
Cadmium with 0.2% chitosan	106.90±13.81	111.93±11.87	112.90±11.83	111.97±9.78
Cadmium with 0.3% chitosan	106.29±10.78	108.38±10.32*	107.81±13.33	109.85±13.89*

*Significantly different from cadmium only treatment group at P<0.05.

Table 12. Glutathione-reductase activity in rat liver consuming water containing 100 mg/l cadmium chloride with basal diet and 0.1%, 0.2%, 0.3% dithiocarbamate chitosan diet (Unit : moles/min/g, Mean±SD)

Treatment	3weeks	6weeks	9weeks	12weeks
Cadmium only	111.09±8.07	115.02±10.23	116.23±9.13	117.09±10.87
Cadmium with 0.1% dithiocarbamate chitosan	108.11±11.92	112.98±10.38	112.98±9.27	113.82±12.89
Cadmium with 0.2% dithiocarbamate chitosan	106.82±19.23	110.34±10.30	110.83±10.38	108.38±11.28*
Cadmium with 0.3% dithiocarbamate chitosan	105.82±16.88	107.32±16.21*	106.23±16.83*	107.92±10.22*

*Significantly different from cadmium only treatment group at P<0.05.

Table 13. Glutathione-s-transferase activity in rat liver consuming water containing 100 mg/l cadmium chloride with basal diet and 0.1%, 0.2%, 0.3% chitin diet (Unit : moles/min/g, Mean±SD)

Treatment	3weeks	6weeks	9weeks	12weeks
Cadmium only	391.67±23.97	394.78±39.23	405.48±28.81	416.87±35.80
Cadmium with 0.1% chitin	387.92±38.01	387.90±59.30	410.83±49.82	417.92±57.39
Cadmium with 0.2% chitin	398.90±50.23	389.99±45.11	400.28±39.72	408.43±69.93
Cadmium with 0.3% chitin	397.11±39.01	378.37±29.73*	406.12±40.79	406.02±73.08*

*Significantly different from cadmium only treatment group at P<0.05.

Table 14. Glutathione-s-transferase activity in rat liver consuming water containing 100 mg/l cadmium chloride with basal diet and 0.1%, 0.2%, 0.3% chitosan diet (Unit : moles/min/g, Mean±S.D)

Treatment	3weeks	6weeks	9weeks	12weeks
Cadmium only	391.67±23.97	394.78±39.23	405.48±28.81	416.87±35.80
Cadmium with 0.1% chitosan	387.82±39.43	389.01±38.28	390.32±40.22	410.23±63.21
Cadmium with 0.2% chitosan	379.21±65.32	385.32±66.91	387.38±50.38*	395.65±39.23
Cadmium with 0.3% chitosan	370.29±54.76*	376.87±67.91*	389.09±27.38*	390.91±69.96*

*Significantly different from cadmium only treatment group at P<0.05.

Table 15. Glutathione-s-transferase activity in rat liver consuming water containing 100 mg/l cadmium chloride with basal diet and 0.1%, 0.2%, 0.3% dithiocarbamate chitosan diet (Unit : moles/min/g, Mean±S.D)

Treatment	3weeks	6weeks	9weeks	12weeks
Cadmium only	391.67±23.97	394.78±39.23	405.48±28.81	416.87±35.80
Cadmium with 0.1% dithiocarbamate chitosan	382.39±49.02	378.91±58.32	391.77±57.32	407.24±58.39
Cadmium with 0.2% dithiocarbamate chitosan	380.88±39.72	370.23±58.27*	392.86±38.32	390.82±62.89*
Cadmium with 0.3% dithiocarbamate chitosan	357.16±78.09*	362.77±43.81*	377.81±19.83*	381.99±76.32*

*Significantly different from cadmium only treatment group at P<0.05.

IV. 결 론

키틴, 키토산 및 dithiocarbamate chitosan을 흰쥐 사료에 비율별로 혼합하여 투여하여 신장내 카드뮴의 농도, metallothionein의 량, glutathione-peroxidase 활성도, glutathione-reductase 활성도 및 glutathione-s-transferase 활성도를 측정한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 카드뮴 농도

카드뮴 단독 투여군의 흰쥐 간장내 카드뮴 축적량은 15.36 mg/kg(3주), 16.55 mg/kg(6주), 18.37 mg/kg(9주)과 19.02 mg/kg(12주)로 증가하였다.

1) 키틴의 함량과 투여기간에 관계없이 키틴에 의한 간장내 카드뮴 축적량을 감소시키는 데는 거의 영향을 주지 않았다.

2) 0.3% 키토산을 혼합하여 식이시킨 결과 카드뮴 농도가 15.23 mg/kg(3주)-17.23 mg/kg(12주)로 키틴 투여군에 비하여 카드뮴 축적량이 감소하였다.

3) Dithiocarbamate chitosan 0.3%을 혼합하여 식이시킨 결과 간장내 카드뮴의 농도가 13.77 mg/kg(3주)-16.75 mg/kg(12주)로 dithiocarbamate chitosan의 비율을 증가시켜 식이 시킬 수록 간장내 카드뮴 농도가 감소하였다.

2. Metallothionein 량

카드뮴 단독 투여군의 흰쥐 간장내 metallothionein 량은 식이 기간이 길수록 감소하였다.

1) 키틴 함량과 투여기간에 관계없이 간장내 metallothionein 량에는 거의 영향을 주지 않았다.

2) 키토산의 함량을 0.3% 비율로 하여 흰쥐에게 식이시켰을 때 metallothionein 량은 3.81 mg/kg(3주)-3.11 mg/kg(12주)로 metallothionein 량이 증가하였다.

3) Dithiocarbamate chitosan의 함량을 0.3% 비율로 하여 식이시킨 결과는 4.13 mg/kg(3주)-3.03 mg/kg(12주)로 dithiocarbamate chitosan의 비율을 증가시키고 투여기간이 길수록 간장내 metallothionein 량이 현저하게 증가하였다.

3. Glutathione-peroxidase 활성도

카드뮴 단독 투여군의 흰쥐 간장내 glutathione-peroxidase 활성도는 투여기간이 길수록 감소하였다.

1) 흰쥐의 사료에 키틴을 혼합하여 식이시킨 결과 키틴이 흰쥐 간장내 glutathione-peroxidase 활

성도에는 거의 영향을 주지 않았다.

2) 키토산을 0.3% 비율로 혼합하여 투여한 결과는 31 mg/kg(3주)-4.77 mg/kg(12주)로 glutathione-peroxidase 활성도가 증가하였다.

3) Dithiocarbamate chitosan의 함량을 0.3% 비율로 하여 식이시킨 결과 간장내 glutathione-peroxidase 활성도는 5.55 mg/kg(3주)-4.78 mg/kg(12주)로 현저하게 증가하였다.

4. Glutathione-reductase 활성도

카드뮴 단독 투여군의 glutathione-reductase 활성도는 투여기간이 길수록 점차 증가하였다.

1) 흰쥐의 사료에 키틴을 혼합하여 투여한 결과 glutathione-reductase 활성도가 약간 감소하였다.

2) 0.3% 키토산을 혼합하여 투여한 군의 glutathione-reductase 활성도는 106.29 mg/kg(3주)-109.85 mg/kg(12주)로 감소하였다.

3) Dithiocarbamate chitosan을 0.3% 비율로 하여 식이시킨 결과는 105.82 mg/kg(3주)-107.92 mg/kg(12주)로 glutathione-reductase 활성도가 현저하게 감소하였다.

5. Glutathione-s-transferase 활성도

카드뮴 단독 투여군에서의 glutathione-s-transferase 활성도는 투여기간이 길수록 점차 증가하였다.

1) 흰쥐의 사료에 키틴을 혼합하여 투여한 군에서의 glutathione-s-transferase 활성도는 별 변화가 없었다.

2) 0.3% 키토산에서 glutathione-s-transferase 활성도는 370.29 mg/kg(3주)-390.91 mg/kg(12주)로 감소하였다.

3) Dithiocarbamate chitosan 0.3% 비율로 혼합하여 식이시킨 결과는 357.16 mg/kg(3주)-381.99 mg/kg(12주)로 간장내 glutathione-s-transferase 활성도가 감소하는 것으로 나타났다.

이와 같은 결과를 볼 때 키틴은 흰쥐 간장내 카드뮴 농축량 감소에 별 영향을 주지 못했으며, 키토산 및 dithiocarbamate chitosan은 흰쥐 간장내 카드뮴 축적량 감소에 영향을 주는 것으로 사료된다.

참고문헌

- 1) 김용무, 최규식, 정택상, 김척기: Chitosan의 황유도

- 체제 킬레이트 고분자의 합성 및 금속이온 흡착특성에 관한 연구. 한국 고분자 학회지, **12**: 86-98, 1998.
- 2) 김윤택: Chitosan 및 Dithiocarbamate Chitosan을 지지체로 이용한 고분자성 Tetracycline의 개발에 관한 연구. 부산대학교 박사학위논문, 1-107, 1993
 - 3) 안령미: 카드뮴에 중독된 웅성흰쥐의 간, 신장 및 고환의 Glutathione peroxidase, Glutathione reductase, and Glutathione-S-transferase의 활성도와 부주의 효과. 한국환경위생학회지, **18**(1): 76-83, 1992.
 - 4) 이병철: 흰쥐에서 만성 납중독이 뇌의 Biogenic Amine 함량에 미치는 영향. 연세의대 학위논문집, 225-241, 1988.
 - 5) 원종훈: 한국산 어패류 중의 수은, 카드뮴, 납, 구리의 함량. 한수지, **6**(1): 31-42, 1979.
 - 6) 최규석, 류영완: 활성화된 Chitosan계 분리용 소재의 제조와 금속이온분리능에 관한 연구. 고분자학회지, **14**(4): 404-416, 1990.
 - 7) Bill Meyer, F. W., Textbook of polymer science. Wiley Inter. science. New Work, 1-252.
 - 8) Bough, W. A.: Coagulation with Chitosan acid to recovery of by-productions from egg-breaking wastes. *Poultry sci.*, **54**: 354-359, 1975a.
 - 9) Bough, W. A.: Reduction suspended solids in vegetable scanning waste effluents by coagulation with Chitosan. *J. Food sci.*, **40**: 782-801, 1975b.
 - 10) Broudreau J., R. Viccent, D. Nadeau and B. Trotter: Toxicity of inhaled cadmium chloride: early response of the antioxidant and surfactant systems in rat lungs. *J. Tox, Env. Heal.*, **23**: 241-256, 1988.
 - 11) Eaton D. L. and Toal, B. F.: Evaluation of Cd/henolobin affinity assay for the rapid determination of metallothionein in biological tissues. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **66**: 134-136, 1982.
 - 12) Hall L. D, yalpani M. Enhancement of the metal chelating properties of chitin and chitosan. *Carbohydrate Research*, **83**: 15-17.
 - 13) Hunt C. T., Boulanger Y., Fesik S. W. and Armitage I. M.: NMR analysis of the structure and metal sequestering properties of metallothioneins. *Environ. Health perspectives*, **54**: 135-143, 1984.
 - 14) Jamall I. S. and J. C. Smith: Effect of cadmium and Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and lipid peroxidation in the rat heart, a possible mechanism of cadmium cardiotoxicity. *Toxicol. appl. Pharmacol.*, **80**: 33-42, 1985.
 - 15) Kage J. H. R. and Vallee B. L.: Metallothionein: A cadmium and zinc-containing protein from equine renal cortex. *J. Biol Chem.*, **236**: 2435-2442, 1961.
 - 16) Kostonis, F. N. and Klaassen, C. D.: Toxicity and distribution of cadmium administered to rats at sublethal doses. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **41**: 667-671.
 - 17) Maruca R., Suder B. J. and Wightman J.: Interaction of heavy metals with chitin and chitosan III. Chromium. *J. of Applied polymer science*, **27**: 4827-4837, 1982.
 - 18) Meyer, W. E., Lewis, D. H., Vanderneer, R. K. and Lofgren, C. S.: Polymer containing Pendent Insecticides, "Proceedings of the controlled Release of Bioactive Materials" Symposium, Fort Lauderdale, Florida, pp.171, 1981.
 - 19) Muzzarelli, R. A. A. and Tanfani, F.: The production of chitosans of superior quality, *J. Appl. Biochem.*, **3**: 316-321, 1981.
 - 20) Muzzarelli, R. A. A. and Tanfani, F.: N-(o-carboxybenzyl)chitosan, N-carboxy-methyl chitosan and Dithiocarbamate chitosan: New chelating Derivatives of chitosan, *Pure & Appl. Chem.*, **54**(11): 2141-2149, 1982.
 - 21) Ohta H. and S. Imamiya: Selenium protection against the acute cadmium toxicity testis. *Kitasato Arch. Exp. Med.*, **59**(1-2): 27-36, 1986.
 - 22) Pulido P., Kagi, Vallee B. L.: Isolation and some properties of human metallothionein. *Biochemistry*, **5**: 1768-1777, 1966.
 - 23) Sakaguchi T. Horikoshii and Vakajima A.: Adsorption of heavy metal ions by Chitin phosphate and chitosan phostphate. *Nippon Nogeidagaki kaishi*, **53**(5): 149-156, 1979.
 - 24) Sillen, L. and Martell, A.: "Stability constants of Metal-Ion complexes," compiled for IUPAC, London: The chemical society, **6**(1): 67-75, 1964.
 - 25) Tong P, Baba Y., Adach Y. and Paba, K.: Adsorption of metal ions on a new chelating ion-Exchange resin chemically Derived from chitosan. *Chemistry Letters*, **7**: 1529-1532, 1991.