

분자량이 다른 키토산이 흰쥐의 지방대사에 미치는 영향*

이종미·손보경

이화여자대학교 식품영양학과

Effects of Chitosan of Different Molecular Weights on Lipid Metabolism in Rats

Lee, Jong-Mee · Son, Bo-Kyung

Department of Food and Nutrition, Ewha Womans University, Seoul Korea

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the effects of chitosan, chitosan oligomer and beef tallow of different levels on lipid metabolism in rats. Seventy male rats of the Sprague-Dawley strain were blocked into 10 groups according to body weight, and were raised for 4 weeks. Dietary fat levels were 20% and 40%, and chitosan and chitosan oligomer were given at levels of 0%, 3% and 5%(wt/wt) of diet. The results are summarized as follows. Chitosan oligomer supplement decreased serum total lipid, as chitosan did, and exhibited a tendency to decrease serum total cholesterol. Chitosan oligomer supplement tended to increase the HDL cholesterol : total cholesterol ratio as chitosan did. Liver total lipid and triglyceride concentration were lower in high fat groups than in low fat groups. Liver total lipid concentration was decreased slightly by chitosan and significantly by chitosan oligomer. Epididymal fat pad total lipid, total cholesterol and triglyceride concentration were slightly decreased by chitosan and chitosan oligomer supplement, especially in high fat groups. Fat absorptivity was decreased by low fat level, chitosan and chitosan oligomer supplement. Fecal excretion of total lipid and triglyceride were increased by high fat level, chitosan and chitosan oligomer supplement. However, fecal excretion of total cholesterol was increased by high fat level and chitosan supplement. This indicated that chitosan and chitosan oligomer were effective in interfering with lipid and triglyceride absorption. In conclusion, chitosan oligomer at levels of 3% and 5% has more effective lipid, cholesterol and triglyceride lowering activity than chitosan. (*Korean J Nutrition* 31(2) : 143-152, 1998)

KEY WORDS : chitosan · chitosan oligomer.

서론

키토산의 원료가 되는 키틴은 N-acetyl-D-glucosamine이 β -(1, 4) 결합한 다당류 (poly- β -1, 4-

채택일 : 1997년 12월 29일

*This work was supported by the Development Work on Health Medical Art from the Ministry of Health and Welfare.

cetyl-D-glucosamine)로 계, 새우 등의 갑각류의 껍질이나 곤충류의 표피, 오징어 등 연체동물의 뼈, 뼈젓이나 박테리아의 세포벽, 식물세포의 벽 등에 널리 분포되어 있는 천연 고분자 물질이다¹⁾. Chitin은 Figure 1에 나타나 있듯이 D-glucose가 β -(1, 4) 결합한 cellulose와 유사한 구조를 가진 결사슬이 없는 매우 긴 사슬구조의 고분자 물질로 2번 탄소에 히드록시기 (hydroxyl group)대신에 아세틸 아미노기(acetyl amino group)를 가지고 있다.

키틴을 deacetylation시켜 제조한 키토산(Fig. 1)은 폐수처리나 농업분야에 주로 사용되어 왔으나 근래에 와서 키틴과 키토산의 인체무해성이 밝혀지고, 고품질의 키토산 또는 그 유도물질들이 개발되기 시작하면서 의약품분야, 식품분야, 화장품분야 등에 그 응용범위가 확대되기 시작하였다^{2,15)}. 또, 키토산은 fat-binding 능력이식이섬유보다 훨씬 강하여 동물실험에서 장내 지방흡수를 줄이고, 혈중 콜레스테롤 수준을 감소시켜 고콜레스테롤혈증 및 동맥경화증의 예방과 치료효과가 있으며¹⁶⁻²⁴⁾, anti-lactose intolerance, 항균작용, 보습성 및 유화안정성, 식이섬유가 갖는 생리적 기능성 등이 있어 이를 고부가 제품개발에 응용하려는 연구가 시도되고 있다¹⁾¹⁵⁾.

그러나 현시점에서 식품에 사용이 허가된 물질은 키틴과 키토산뿐이다. 키틴은 물이나 일반적인 유기용매에 용해되지 않고 특수한 용매에 용해되기는 하나 용해정도가 일정치 않아 식품첨가제로 이용하기에는 제한

점이 있어¹⁵⁾ microcrystalline chitin(MCC) 형태로만 이용될 수 있다. 키토산은 물이나 알콜에는 용해되지 않고 유기산의 수용액과 무기산에만 용해되므로 pH 6.0이하인 식품에만 첨가가 용이하며¹⁵⁾, 그 용액은 강한 짠맛과 쓴맛을 갖고 있어 식품에 응용하기에는 어려움이 있다. 이런 문제점을 해결하고자 유도체인 carboxymethyl chitosan이 개발되었는데, 중성 pH에서 일부 용해성이 있고 이미-이취가 없는 장점은 있으나, 점성이 강하고 특히 식품첨가물로 사용이 허가되지 않아 응용 전망이 밝지 않다. 그러므로 키토산의 생리적 기능을 식품에 적용시킬 수 있는 기능성 식품소재로 개발하기 위해서 우선 식품에 사용 가능한 키토산 물질 즉 생리활성을 가지며 독성이 없고 수용성이며, 이미-이취가 없고, 점성이 높지 않은 키토산 분해물질을 제조하는 것이 문제가 된다. 키토산을 저분자화하여 수용성인 저분자 키토산 또는 키토산 올리고머를 제조하는 것은 키틴, 키토산의 유효 이용에 중요한 분야이다.

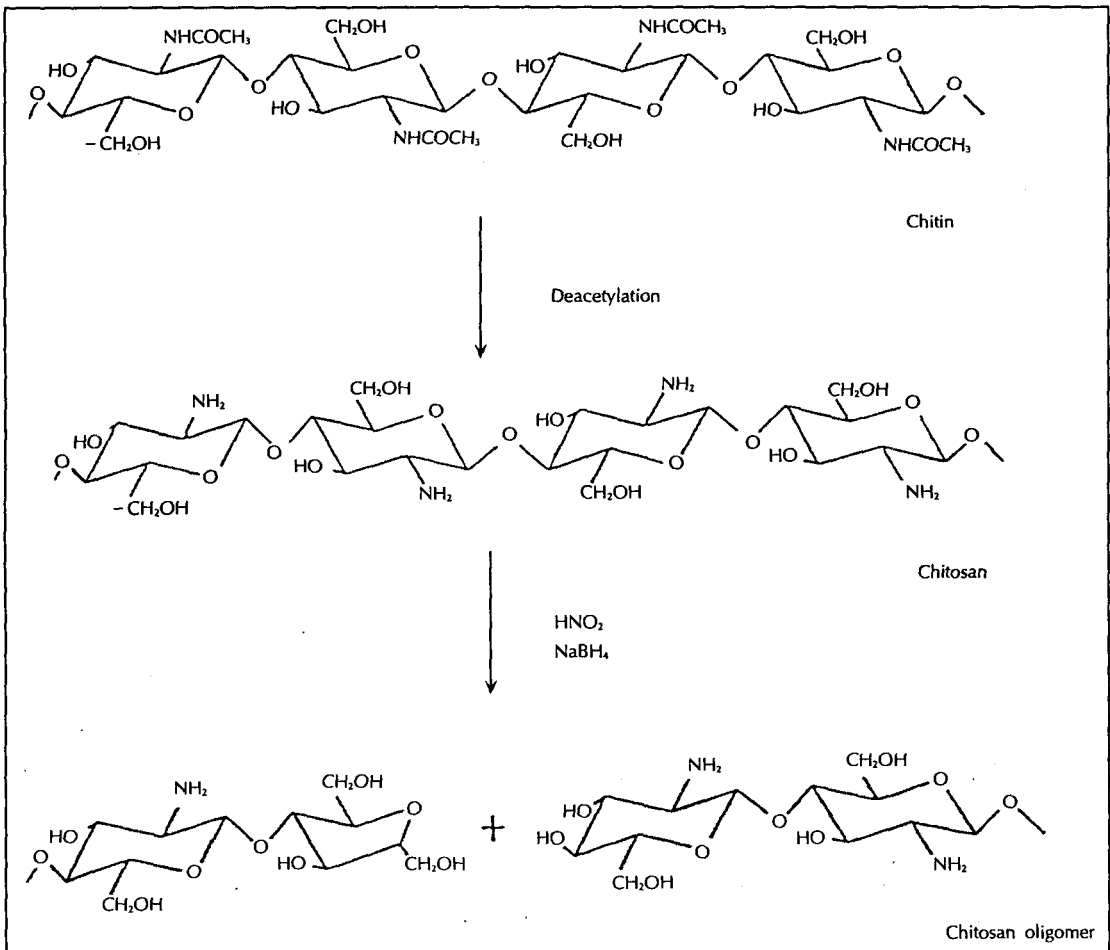


Fig. 1. Chitin, chitosan and chitosan oligomer.

현재 키틴, 키토산 분해물질의 제조법으로는 화학적 방법과 효소적 방법이 보고되고 있다. 화학적 방법으로는 진한 염산, 불화수소, 과산화수소 및 과산화붕소에 의한 가수분해법이 행해지고 있지만, 반응조건이 과격하기 때문에 반응의 제어가 어렵고, 반응중에 Schiff염기를 기점으로 하는 Maillard반응으로 인하여 부생성물이 생기는 문제가 있다. 효소적인 방법으로는 chitinase, chitosanase, cellulase 등에 의해서 분해되지만 배지에 사용될 수 있는 키틴과 키토산의 양이 한정되어 있어, 대량생산에는 부적합하다는 문제가 있다. 한편 키토산은 아질산과의 반응에 의해 탈아미노화를 동반하는 저분자화가 일어나는데 반응속도는 분자량에 의존하지 않고, 아질산 농도에 비례하며, 키토산 농도와 탈아세틸화에 의해서도 영향을 받는다. 반응생성물의 말단은 2, 5-anhydro-D-mannose로서 aldehyde기를 가져 불안정하기 때문에 이것을 환원시켜 alcohol인 2, 5-anhydro-D-mannithol로서 안정화시킴으로써 Fig. 1에 나타나 있는 키토산 올리고머를 얻을 수 있다²⁰⁾.

최근 우리나라 사회 경제면의 급속한 발달에 따라 식습관과 생활습관은 끊임없이 변화하고 있으며 변화된 식생활 양상과 질병과는 매우 밀접한 관계를 가지고 있다. 우리나라 국민의 지방섭취는 1980년 21.8g으로 총열량의 9.81%였던 것이 1993년에는 36.9g으로 총열량

의 18.2%를 차지해 섭취량이 1.7배 증가되었다. 이 중 동물성 지방은 16.6g으로 지방섭취량의 44.9%로 증가하고 있어 양적인 면과 질적인 면에서 동물성 지방의 섭취가 증가함을 알 수 있다²⁶⁾. 또, 동물성지방중에는 우지가 일년간 5만2천톤이 공급되었고, 어유가 1만4천톤 공급되어 우지는 동물성지방 공급의 78.8%를 차지한다²⁷⁾.

선행연구중 키틴과 키토산이 지방대사에 미치는 영향에 대한 연구는 많이 이루어져 있으나 기능성 식품소재로 이용하기 위해 개발된 아질산 분해법에 의한 키토산 분해물질 즉 키토산 올리고머의 생리활성에 대한 연구는 거의 전무한 실정이다.

이에 본 연구에서는 키토산과 화학적 분해방법에 의해 생산된 저분자 키토산 올리고머를 대표적 동물성지방인 우지의 수준을 달리한 식이에 첨가하여 흰쥐의 체내 지방대사에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물의 사육과 식이

Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐 70마리 405.6±18.3g된 쥐들을 체중에 따라 난괴법(Randomized complete block design)에 의하여 7마리씩 10군으로 나누어 4주간 사육하였다. 실험 전기간동안 실험동물들을 한

Table 1. Composition of experimental diet

Ingredient	(g/per kg diet)									
	LN	LC3	LC5	LCO3	LCO5	HN	HC3	HC5	HCO3	HCO5 ³⁾
Corn starch	706	706	706	706	706	584	584	584	584	584
Casein	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150
Beef tallow	94	94	94	94	94	216	216	216	216	216
Salt mixture ¹⁾	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35
Vit mixture ²⁾	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Methionine	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Choline chloride	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Chitosan	0	30	50	0	0	0	30	50	0	0
Chitosan oligomer	0	0	0	30	50	0	0	0	30	50

1) AIN-76 mineral mix(g/kg mix) : CaHPO₄ 500, NaCl 74, K₂C₂H₂O₇ · H₂O 220, K₂SO₄ 52, MgO 24, MnCO₃ 3.5, FeC₂H₂O 6, ZnCO₃ 0.3, CuCO₃ · Cu(OH)₂ · H₂O 0.012, KIO₃ 0.01, Na₂SeO₃ · 5H₂O 0.01, Crk(SO₄)₂ · 12H₂O 0.55, Sucrose to make 1kg

2) AIN-76 Vitamin mix(g/kg mix) : thiamin · HCl 0.6, riboflavin 0.6, pyridoxine · HCl 0.7, nicotinic acid 3, D-biotin 0.02, cyanocobalamin 0.001, retinyl palmitate 0.8(400,000IU), dl-α-tocopheryl acetate 20(5,000IU), cholecalciferol 0.0025, Menaquinone 0.005, D-calcium pantothenate 1.6, folic acid 0.2, sucrose to make 1kg

3) LN : Low beef tallow + none chitosan/chitosan oligomer
 LC3 : Low beef tallow + Chitosan 3%
 LC5 : Low beef tallow + Chitosan 5%
 LCO3 : Low beef tallow + Chitosan Oligomer 3%
 LCO5 : Low beef tallow + Chitosan Oligomer 5%
 HN : High beef tallow + none chitosan/chitosan oligomer
 HC3 : High beef tallow + Chitosan 3%
 HC5 : High beef tallow + Chitosan 5%
 HCO3 : High beef tallow + Chitosan Oligomer 3%
 HCO5 : High beef tallow + Chitosan Oligomer 5%

마리씩 분리하여 cage에서 사육하였고 물과 식이는 제한없이 먹도록 하였다.

본 실험에서 사용한 식이의 구성성분은 Table 1과 같다. 실험식이의 지방수준은 국민영양조사²⁶⁾와 식품수급표²⁷⁾에 근거하여 서구사회와 우리나라 국민의 평균섭취율인 열량섭취의 40%(216g/kg diet), 20%(94g/kg diet)로 공급하였다. 키토산 급원으로는 시판용 키토산(Sigma Co.)과 키토산 분해물질인 키토산 올리고머를 공급하였다. 이 키토산 올리고머는 손²⁸⁾이 제조한 것을 공급받았으며 그 방법은 키토산을 NaNO₂, NaBH₄와 반응시켜 제조한 것으로, 분자량은 4100~5900, MBTH법(3-methyl-2-benzo-thiagalone hydragone)²⁹⁾에 의해 측정된 탈아세틸화도는 33~45%였다. 키토산과 키토산 올리고머의 첨가수준은 선행연구 결과²⁸⁾에 의해 식이무게의 3%, 5% 수준으로 식이 내에 섞어 공급하였다.

실험기간 동안의 식이섭취량은 전기간을 통하여 매주 2회 일정한 시간에 측정하고, 체중은 1주일에 1회 일정한 시간에 측정하였다.

2. 장기 혈액 변의 채취

실험 동물을 희생하기 3일전에 대사장(metabolic cage)에서 24시간 동안 변을 채취하였다. 실험 기간의 종료전 12시간 동안 굶긴 동물을 ethyl ether로 마취시켜 단두하여 희생시킨 후 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액을 2000rpm에서 30분간 원심 분리하여 분리된 혈청의 일부는 지단백분석을 위한 시료로 사용하였고, 나머지 혈청은 지방 대사 측정을 위하여 냉동 보관하였다. 혈액을 취한 후 즉시 실험 동물들을 해부하여 간, 부고환 지방조직을 떼어 무게를 측정된 후 지방 대사 측정 때까지 냉동 보관하였다.

Lipoprotein fraction은 KBr과 NaCl로 만든 density solution을 이용하여 분리하고자 하는 lipoprotein과 혈청의 밀도를 맞추고 원심 분리하면 상층에 lipoprotein이 분리되는 원리를 이용한 ultracentrifugation²⁹⁾³⁰⁾에 의해 very low density lipoprotein(VLDL, d<1.006)과 low density lipoprotein(LD-L, 1.006<d<050)을 분리하였다.

3. 생화학적분석

혈청의 총지방량은 Frings³¹⁾법에 의해, 총콜레스테롤량은 Zak³²⁾법에 의해 측정하였다. 혈청의 LDL 콜레스테롤량은 cholesterol hydrolase를 이용한 효소시약 kit(영동 제약)로, HDL 콜레스테롤량은 cholesterol esterase를 이용한 효소시약 kit(국제시약, 일본)로 측

정하였다. 혈청 및 VLDL의 중성지방량은 lipoprotein lipase와 glycerokinase를 포함하는 효소시약 kit(영동 제약)로 측정하였다.

간과 부고환지방조직, 변의 총지방량은 Bligh와 Dyer 법³³⁾과 Folch법³⁴⁾을 이용하여 정량하였다. 콜레스테롤량은 추출한 총지방을 methanol에 녹여 Zak³²⁾법에 의해 비색정량하였고, 중성지방량은 lipase와 glycerokinase를 포함한 효소시약 kit(영동 제약)로 측정하였다.

4. 자료 처리 및 분석

모든 실험 분석의 결과는 평균치와 표준 오차로 계산하였고 각 실험군의 평균치간의 유의성은 $\alpha=0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test로 검증하였다. 각 식이인자들, 즉 식이 지방(A), 첨가된 키토산(B), 키토산 올리고머(C)의 영향은 $\alpha=0.05$ 수준에서 2요인 분산 분석으로 분석하였다. 즉 먼저 모든 군을 2요인 분산 분석하여 식이지방의 영향을 알아본 뒤 LN, HN군과 키토산 첨가군인 LC3, LC5, HC3, HC5군을 분석하여 키토산의 영향을, LN, HN군과 키토산 올리고머 첨가군인 LCO3, LCO5, HCO3, HCO5군을 분석하여 키토산 올리고머의 영향을 알아보았다. 모든 통계적 분석은 SAS program을 사용하였다.

Table 2. Daily food intake and weight gain

GROUP	Daily food intake (g/day)	Weight gain (g/day)
LN	¹⁾ 20.484±0.457 ²⁾	1.284±0.661 ³⁾⁴⁾
LC3	16.684±1.733 ^{ab}	-0.976±1.029
LC5	18.667±1.691 ^{ab}	0.562±1.026
LCO3	17.284±1.555 ^{ab}	0.423±1.164
LCO5	18.515±1.033 ^{ab}	1.200±1.099
HN	16.180±2.074 ^{ab}	1.636±1.151
HC3	16.995±1.174 ^{ab}	1.324±1.519
HC5	20.456±1.272 ^a	1.607±0.750
HCO3	16.026±1.062 ^{ab}	1.199±1.346
HCO5	15.779±1.018 ^b	-0.140±1.274

Significant factor⁴⁾

1) Mean±S.E.

2) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test

3) Not significant at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test

4) Statistical significance of A, B and C factors was calculated by 2-way ANOVA

A : Fat effect was significant at $\alpha=0.05$

B : Chitosan effect was significant at $\alpha=0.05$

C : Chitosan oligomer effect was significant at $\alpha=0.05$
 AB : There was interaction between fat and chitosan at $\alpha=0.05$

AC : There was interaction between fat and chitosan oligomer at $\alpha=0.05$

결과 및 고찰

1. 식이섭취량과 체중증가량

실험동물 각군의 식이섭취량과 체중증가량은 Table 2와 같다. 일일평균 식이섭취량은 LN군과 HC5군이 높아 가장 적게 섭취한 HCO5군과 유의적인 차이가 있었으나, 식이 지방수준이나 키토산, 키토산 올리고머의 첨가유무에 따른 일정한 경향을 나타내지는 않았다. 실험동물의 체중은 군간 유의적인 차이가 없었다.

2. 혈청과 지단백의 지질함량

혈청의 총지질 함량과 총콜레스테롤 함량, 중성지방 함량은 Table 3에 나타나있다. 혈청의 총지질함량은 키토산 올리고머의 첨가에 의해 유의적으로 감소하였다. 키토산의 첨가는 무첨가군에 비해 혈청 총지질량을 감소시키는 경향을 보였는데 이는 김 등³⁵⁾의 보고와 일치하였다. 키토산 올리고머를 첨가한 경우 총지방량을 유의적으로 감소시켰는데, 고지방군에서 더 크게 낮추어 고지방 식이를 하는 경우 키토산보다 더 우수한 hypolipidemic effect를 가진다고 생각된다. 혈청 총콜레스테롤 함량은 유의적인 차이는 없었으나 키토산 올리고머의 첨가에 의해 감소되는 경향이 있었다. 총콜레스테롤 함량은 키토산을 첨가하는 경우 낮아지는 경향을 보였는데, 이런 결과는 키토산은 혈청 콜레스테롤을 낮춘다는 보고¹⁷⁻²⁰⁾²³⁾³⁵⁾³⁶⁾와 일치하였다. 키토산은 산성인 위와 pH 6정도의 산성환경에서 수화되고 부분적으로 이온화되어 polyglucosamine chain으로서 molecular solution을 형성한다. *In vitro* 실험에서 이 polyglucosamine chain의 polyelectrolyte cation은 지방질의 micelle전부, 즉 중성지방(neutral lipids)과 음이온을

둘러싸서 흡수되지 못하도록 막는다는 것이 밝혀졌다. 또한 *in vivo*에서 키토산의 hypocholesterolemic action의 기전은 장내에서 주로 내인성, 외인성 sterol의 흡수를 방해함으로써 이루어진다. 즉 키토산은 소화관 내에서 주로 micelle로 콜레스테롤이 통합되는 것을 방해함으로써 hypocholesterolemic 활성을 보인다고 한다¹⁹⁾²¹⁾. 또 키토산은 -NH₃⁺가 되면 polyanions와 gel을 형성해 viscous한 성질을 가지게 된다¹⁶⁾. 장내 viscosity가 높을수록 식이섭취는 micelle에서 mucosa로의 콜레스테롤 확산을 늦추고, bile acid 대사를 방해하고, micelle 형성을 늦추며, gastric emptying을 지연시켜 장내에서 콜레스테롤의 흡수율을 저하시킴으로써 혈청의 콜레스테롤 수준을 낮춘다는 보고¹⁶⁾³⁷⁾³⁸⁾도 볼 때 본 실험에서 사용한 키토산도 장내 콜레스테롤의 흡수에 영향을 주어 혈청내 콜레스테롤 함량을 낮추는 경향을 보였다고 생각된다. 키토산 올리고머를 첨가한 경우 저지방군, 고지방군에서 공통적으로 첨가수준이 높을수록 혈청 총콜레스테롤 함량이 감소하였으며, 고지방의 경우 감소효과가 더 컸다. 키토산 올리고머가 키토산에 비해 혈중 콜레스테롤 함량을 더 감소시키는 것으로 볼 때 우수한 hypocholesterolemic effect를 가지는 것을 알 수 있다. 혈청 중성지방 함량은 식이에 의한 유의적인 차이는 없었지만 키토산을 첨가한 경우 감소하는 경향을 보여 키토산이 십이지장내 점성의 증가, gastric emptying 지연, 장내 운동성의 감소, 지방흡수의 감소로 인해 혈청내 중성지방 수준을 감소시켜 hypotriacylglycerolemic response를 보인다는 보고¹⁹⁾²⁰⁾³⁵⁾와 일치하는 결과를 보였다. 키토산 올리고머를 첨가한 경우 LCO3, HCO3군에서 혈청 중성지방 함량이 낮아지는 경향을 보여 3%수준에서 더 우수하게 작용하는 것으로 보인다.

Table 3. Serum total lipid, total cholesterol and triglyceride concentrations

GROUP	Serum total lipid(mg/dl)	Serum total cholesterol(mg/dl)	Serum triglycerides(mg/dl)
LN	¹⁾ 720.63 ± 103.03 ^{ab2)}	108.73 ± 12.49 ^a	144.29 ± 28.93 ^{N,S3)}
LC3	613.96 ± 99.37 ^{abc}	101.57 ± 7.87 ^{ab}	132.16 ± 30.84
LC5	500.00 ± 71.17 ^{bcd}	82.82 ± 14.89 ^{ab}	110.55 ± 33.84
LCO3	521.85 ± 115.58 ^{abcd}	92.82 ± 14.03 ^{eb}	105.44 ± 17.12
LCO5	405.30 ± 40.75 ^{cd}	76.18 ± 7.92 ^{ab}	146.37 ± 29.70
HN	769.54 ± 111.99 ^a	95.31 ± 7.4 ^{ab}	128.94 ± 35.76
HC3	514.13 ± 41.68 ^{bcd}	91.85 ± 15.43 ^{ab}	87.57 ± 9.68
HC5	580.13 ± 76.77 ^{abc}	109.21 ± 18.64 ^a	112.11 ± 22.36
HCO3	311.63 ± 26.11 ^{cd}	71.47 ± 9.11 ^{ab}	84.75 ± 6.24
HCO5	392.29 ± 30.98 ^d	65.70 ± 6.34 ^b	140.87 ± 14.67

Significant factor⁴⁾

C

1) Mean ± S.E

2) Values with different alphabet within the column are significantly different at α=0.05 by Duncan's multiple range test

3) Not significant at α=0.05 by Duncan's multiple range test

4) Statistical significance of A, B and C factors was calculated by 2-way ANOVA(see Table 2)

Table 4. Lipid concentration of lipoprotein fraction

GROUP	HDL-cholesterol (mg/dl serum)	HDL cholesterol/total cholesterol ratio (%)	LDL cholesterol (mg/dl LDL fraction)	VLDL triglyceride (mg/dl VLDL fraction)
LN	¹⁾ 22.91 ± 2.06 ^{b2)}	27.73 ± 5.72 ^{N.S.3)}	19.75 ± 4.10 ^{N.S.}	208.62 ± 19.59 ^{N.S.}
LC3	36.86 ± 6.57 ^a	35.85 ± 4.20	15.42 ± 3.79	171.88 ± 5.31
LC5	25.18 ± 3.89 ^{ab}	27.82 ± 4.45	16.44 ± 3.27	163.02 ± 36.66
LCO3	28.16 ± 3.88 ^{ab}	33.78 ± 11.04	13.23 ± 5.55	249.13 ± 48.76
LCO5	23.59 ± 2.31 ^{ab}	33.52 ± 4.38	15.73 ± 7.06	202.74 ± 64.05
HN	22.72 ± 3.25 ^b	23.12 ± 1.29	20.81 ± 4.56	171.36 ± 27.87
HC3	24.76 ± 1.68 ^{ab}	36.55 ± 7.16	20.93 ± 7.43	181.67 ± 43.08
HC5	31.58 ± 5.56 ^{ab}	48.72 ± 17.18	13.02 ± 2.85	242.65 ± 60.61
HCO3	31.28 ± 4.94 ^{ab}	53.80 ± 16.91	12.30 ± 5.91	147.62 ± 14.38
HCO5	28.65 ± 4.74 ^{ab}	49.04 ± 11.72	14.15 ± 3.01	188.20 ± 17.30

Significant factor⁴⁾

1) Mean ± S.E.

2) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test3) Not significant at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test

4) Statistical significance of A, B and C factors was calculated by 2-way ANOVA(see Table 2)

Table 5. Liver total lipid, total cholesterol and triglyceride concentrations

GROUP	Total lipid(mg/g)	Total cholesterol(mg/g)	Triglycerides(mg/g)
LN	¹⁾ 57.086 ± 6.937 ^{a2)}	2.01 ± 0.161 ^{N.S.3)}	7.940 ± 1.192 ^a
LC3	46.500 ± 3.298 ^{abc}	2.569 ± 0.198	7.229 ± 0.505 ^{ab}
LC5	49.371 ± 7.117 ^{abc}	2.149 ± 0.251	7.484 ± 0.932 ^{ab}
LCO3	37.500 ± 2.069 ^{bc}	2.534 ± 0.389	5.884 ± 0.618 ^{abc}
LCO5	39.000 ± 1.571 ^{bc}	2.469 ± 0.312	6.024 ± 0.233 ^{abc}
HN	49.833 ± 6.369 ^{ab}	2.460 ± 0.158	5.860 ± 0.518 ^{bc}
HC3	42.200 ± 3.621 ^{bc}	1.911 ± 0.034	7.309 ± 0.936 ^{ab}
HC5	40.514 ± 2.045 ^{bc}	2.167 ± 0.292	6.240 ± 0.247 ^{abc}
HCO3	34.033 ± 3.754 ^c	2.159 ± 0.200	6.190 ± 0.702 ^{abc}
HCO5	35.943 ± 2.120 ^{bc}	2.303 ± 0.161	4.487 ± 0.361 ^c

Significant factor⁴⁾

A, C

A

1) Mean ± S.E

2) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test3) Not significant at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test

4) Statistical significance of A, B and C factors was calculated by 2-way ANOVA(see Table 2)

지단백(lipoprotein)의 콜레스테롤과 중성지방 함량은 Table 4에 제시하였다. 동맥경화증에 예방적 효과가 있다고 알려진 HDL의 콜레스테롤은 군간 유의적인 차이가 있었는데 무첨가군에 비해 키토산, 키토산 올리고머 첨가군이 높은 경향을 보였다. HDL 콜레스테롤 : 총콜레스테롤 비는 유의적인 차이는 없었지만 키토산 올리고머 첨가군에서 높은 경향을 보였으며, 특히 고지방군에서 두드러졌다. 또한 키토산 첨가 시에도 HDL 콜레스테롤 : 총콜레스테롤 비가 증가하는 경향을 보였는데, 이러한 결과는 식이지방의 장내 이용률 감소로 인해 이화작용(catabolism)과 배설을 위해 말초조직으로부터 간으로 운반되는 reverse cholesterol transport가 촉진되어 HDL 콜레스테롤 : 총콜레스테롤 비가 증가하였다는 Razdan 등¹⁹⁾의 보고와 일치하였다. 키토산 올리고머를 첨가한 경우 HDL 콜레스테

롤 : 총콜레스테롤 비는 특히 고지방군에서 키토산을 첨가한 경우보다 더 높은 경향을 보여 고지방 식이시 콜레스테롤의 이화작용(catabolism)과 배설을 더 촉진시키는 것으로 생각된다.

내인성 콜레스테롤을 주구성성분으로 하는 LDL 콜레스테롤은 군간 유의적 차이는 없었으나 키토산에 의해 약간 감소되는 경향을 보였으며, 키토산 올리고머의 경우 키토산과 유사한 쪽으로 LDL 콜레스테롤을 감소시켰다. 내인성 중성지방이 주구성성분인 VLDL 중성지방은 군간 유의적인 차이가 없었다. 저지방인 경우 키토산은 VLDL 중성지방을 낮추는 경향이 있었으나 고지방군에서는 오히려 증가해 키토산의 영향은 없었다고 생각된다. 키토산 올리고머는 VLDL 중성지방을 오히려 증가시키는 경향을 보여 이에 대한 연구가 더 이루어져야 하리라 생각된다.

3. 간의 지질함량

간의 총지질함량, 총콜레스테롤 함량, 중성지방의 함량은 Table 5에 나타나있다. 간의 총지질함량은 식이 지방수준의 증가와 키토산 올리고머의 첨가에 의해 유의적으로 감소하였다. 키토산의 첨가는 총지방량을 감소시키는 경향을 나타내었으나 키토산 올리고머의 첨가는 고지방군, 저지방군에서 총지방 함량을 유의적으로 크게 감소시켜 간조직내 총지질함량을 낮추는 효과가 더 우수한 것으로 나타났다. 간의 총콜레스테롤 함량은 군간 유의적인 차이가 없었으며, 식이에 의한 일정한 경향을 나타내지 않았다. 간의 중성지방 함량은 지방수준의 증가에 의해 유의적인 차이가 있어 저지방군이 더 높게 나타났다. 그러나 키토산을 첨가한 경우 키토산 첨가에 의해 간 중성지방량이 유의적으로 감소한다고 한 Sugano 등¹⁷⁾, Nagyvary 등²⁰⁾, 김 등³⁵⁾의 보

고와는 달리 간의 중성지방 함량이 감소하지 않았다. 키토산 올리고머를 첨가한 경우 유의성은 없으나 감소시키는 경향을 보였다.

4. 부고환 지방조직의 지질함량

부고환지방의 총지질함량, 총콜레스테롤 함량, 중성지방의 함량은 Table 6에 제시하였다. 부고환 지방조직의 총지질함량은 군간 유의적인 차이가 있었다. 유의적으로 높은 값을 보면 HCO5군을 제외하면 부고환 지방조직의 총지질함량은 키토산 첨가에 의해 감소되는 경향을 보였고, 키토산 올리고머를 첨가한 경우는 더 낮은 수치를 보여 체내 총지방 축적억제에 더 큰 효과를 보였다. 부고환 지방조직의 총콜레스테롤 함량은 키토산 올리고머의 첨가에 의해 감소되는 경향을 보였으나 키토산의 첨가 시에는 같은 효과를 보이지 않았다.

Table 6. Epididymal fat pad(EFP) total lipid, total cholesterol and triglyceride concentrations

GROUP	Total lipid(mg/total EFP)	Total cholesterol(mg/total EFP)	Triglycerides(mg/total EFP)
LN	¹⁾ 7124.43 ± 1024.46 ^{ab2)}	113.007 ± 16.561 ^{ab}	1020.28 ± 215.547 ^{ab}
LC3	6529.19 ± 1184.29 ^{ab}	118.491 ± 15.790 ^a	1028.45 ± 235.500 ^{ab}
LC5	5421.84 ± 679.425 ^b	88.402 ± 14.318 ^{ab}	827.705 ± 79.689 ^{ab}
LCO3	5134.28 ± 909.423 ^b	96.035 ± 14.787 ^{ab}	900.114 ± 99.338 ^{ab}
LCO5	5523.72 ± 749.229 ^b	75.585 ± 9.360 ^{ab}	978.499 ± 221.748 ^{ab}
HN	6184.70 ± 1317.03 ^{ab}	98.047 ± 22.049 ^{ab}	953.059 ± 190.455 ^{ab}
HC3	5775.21 ± 616.324 ^b	99.596 ± 12.365 ^{ab}	597.434 ± 155.805 ^b
HC5	8549.13 ± 582.525 ^a	107.767 ± 12.562 ^{ab}	1442.312 ± 220.089 ^a
HCO3	4268.54 ± 823.313 ^b	68.324 ± 9.911 ^b	896.169 ± 217.743 ^{ab}
HCO5	5046.49 ± 482.808 ^b	71.988 ± 10.261 ^{ab}	887.499 ± 190.487 ^{ab}

Significant factor³⁾

1) Mean ± S.E.

2) Values with different alphabet within the column are significantly different at α=0.05 by Duncan's multiple range test

3) Statistical significance of A, B and C factors was calculated by 2-way ANOVA(see Table 2)

Table 7. Fat absorptivity, total lipid, total cholesterol and triglyceride excretion

GROUP	Fat absorptivity ¹⁾ (%)	Total lipid(mg/day)	Total cholesterol(mg/day)	Triglycerides(mg/day)
LN	²⁾ 98.32 ± 0.20 ^{ab3)}	32.19 ± 3.79 ^c	2.154 ± 0.447 ^d	0.370 ± 0.079 ^c
LC3	94.06 ± 1.55 ^d	85.27 ± 16.03 ^b	5.823 ± 1.173 ^b	1.482 ± 0.438 ^b
LC5	96.38 ± 0.46 ^{bc}	63.91 ± 9.94 ^{bcd}	4.604 ± 1.052 ^{bc}	0.835 ± 0.145 ^{bc}
LCO3	97.46 ± 0.42 ^{abc}	38.58 ± 3.86 ^{de}	2.031 ± 0.307 ^d	0.480 ± 0.065 ^{bc}
LCO5	96.15 ± 0.51 ^c	65.86 ± 7.24 ^{bcd}	3.098 ± 0.420 ^{cd}	0.788 ± 0.113 ^{bc}
HN	98.24 ± 0.33 ^{ab}	54.67 ± 8.15 ^{cde}	3.897 ± 0.574 ^{bcd}	0.743 ± 0.080 ^{bc}
HC3	98.49 ± 0.17 ^a	55.83 ± 8.78 ^{cde}	3.793 ± 0.215 ^{bcd}	1.230 ± 0.079 ^b
HC5	96.88 ± 0.28 ^{abc}	114.04 ± 8.06 ^a	8.548 ± 0.898 ^a	2.456 ± 0.483 ^a
HCO3	98.09 ± 0.49 ^{abc}	54.01 ± 7.75 ^{cde}	2.724 ± 0.628 ^{cd}	0.874 ± 0.154 ^{bc}
HCO5	97.74 ± 0.42 ^{abc}	70.13 ± 7.71 ^{bc}	3.403 ± 0.437 ^{cd}	0.927 ± 0.100 ^{bc}

Significant factor⁴⁾

fat intake-lipid excretion

1) Fat absorptivity = $\frac{\text{fat intake-lipid excretion}}{\text{fat intake}} \times 100$

2) Mean ± S.E.

3) Values with different alphabet within the column are significantly different at α=0.05 by Duncan's multiple range test

4) Statistical significance of A, B and C factors was calculated by 2-way ANOVA(see Table 2)

부고환 지방조직의 중성지방 함량은 키토산 첨가군의 경우 저지방군에서는 5%, 고지방군에서는 3% 첨가군에서 감소하는 경향을 보였으나 HC5군에서 증가해 일정한 경향을 보이지 않았다. 키토산 올리고머 첨가시 저지방군, 고지방군 모두에서 첨가수준에 관계없이 무첨가군보다 감소하는 경향을 보였으며, 저지방군보다 고지방군에서 더 낮아졌다.

5. 지방흡수율, 변의 지질배설량

지방흡수율, 일일배설 변의 총지질함량, 총콜레스테롤 함량, 중성지방의 함량은 Table 7에 제시하였다. 지방흡수율은 식이지방의 수준, 키토산과 키토산 올리고머의 첨가, 식이지방수준과 키토산첨가수준의 상호작용에 의해 유의적인 차이가 있었다. 지방흡수율은 키토산 첨가에 의해 유의적으로 감소되었는데, 이는 식이에 키토산을 5%수준으로 첨가했을 때 키토산이 콜레스테롤과 oleic acid의 림프관 흡수율을 각각 63%, 58% 감소시켰다고 한 Vahouny 등¹⁶⁾의 보고와 일치하는 결과였다. 키토산 올리고머 첨가 역시 유의적으로 지방흡수율을 감소시켰으며, 첨가수준이 증가할수록 지방흡수율이 감소되는 경향을 보였다.

변을 통한 총지방 배설량은 식이의 지방수준 증가, 키토산의 첨가, 키토산 올리고머의 첨가, 지방수준과 키토산 첨가수준의 상호효과에 의해 유의적이었다. 이는 키토산의 첨가에 의해 총지질 배설량이 증가한다는 보고³⁵⁾와 일치하는 결과이다. 키토산 올리고머를 첨가한 경우 저지방군과 고지방군 모두에서 3% 수준에서는 무첨가군과 비슷한 결과로 효과가 나타나지 않았지만 5% 첨가시 저지방, 고지방 모든 군에서 총지방 배설량을 증가시켰다. 총콜레스테롤 배설량은 식이지방 수준의 증가, 키토산의 첨가, 지방수준과 키토산 첨가의 상호효과에 의해 유의적이었다. 이는 키토산의 첨가에 의해 변콜레스테롤 배설이 증가한다는 Sugano 등²¹⁾, 김 등³⁵⁾의 연구와 일치하였다. 키토산은 지방과의 결합(binding)과 분해(disintegration)를 통해 지방가수분해의 가능성을 제한해 enterohepatic lipid pool의 크기를 줄이게 된다¹⁹⁾. 또 장에서의 transit time을 짧게 하여 bile acid와 콜레스테롤을 재흡수하여 이용할 수 있는 시간을 감소시키고, bile acid와 결합함으로써 bile acid가 간으로 되돌아가는 enterohepatic circulation을 억제하여 결국 콜레스테롤의 간으로의 이동을 막고 콜레스테롤과 결합함으로써 장내 micelle의 형성을 방해하여 콜레스테롤의 흡수에도 영향을 미친 것으로 사료된다²¹⁾³⁹⁾. 중성지방 배설량은 지방수준의 증가, 키토산의 첨가, 키토산 올리고머의 첨가, 지방수준과

키토산 첨가수준의 상호효과에 의해 유의적이었다. 키토산의 첨가에 의해 중성지방 배설량이 증가한 것은 키토산, 키토산은 acidic steroid의 변배설을 증가시키지는 않지만, 중성 steroid의 배설을 증가시켜 결국 변으로의 중성지방 배설을 증가시키고²¹⁾³⁹⁾⁴⁰⁾, micellar lipid와 결합한 키토산은 중성지방의 흡수를 막기 때문에⁴¹⁾ 나타난 결과라고 생각된다. 키토산 올리고머의 첨가는 무첨가군보다는 중성지방 배설을 증가시켰고 첨가 수준이 높아질수록 증가하였다.

요약 및 결론

본 연구는 지방급원인 우지의 수준과 키토산, 키토산 올리고머의 첨가수준을 달리한 식이가 흰쥐의 지방대사에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 체중이 405.6±18.3g인 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐에게 식이 지방 급원으로 우지를 열량의 20%, 40%로 하고, 키토산과 키토산 올리고머를 식이무게의 0%, 3%, 5%로 하여 총 10군으로 나누어 4주간 사육하였다. 실험결과 는 다음과 같다.

식이섭취량과 체중증가량은 식이에 의한 영향이 없었다. 체중이 큰 쥐를 사용한 관계로 체중이 오히려 감소하는 군도 있었다.

혈청내 총지방 함량은 키토산 올리고머의 첨가에 의해 감소하였고 키토산 첨가에 의해 감소하는 경향을 보였다. 혈청 콜레스테롤의 함량은 키토산 올리고머의 첨가에 의해 감소하였다. 혈청 중성지방은 식이에 의한 차이가 없었으나 키토산 첨가에 의해 감소되는 경향이 있었으며, 키토산 올리고머 3%첨가군에서도 감소되는 경향을 보였다. HDL 콜레스테롤은 가장 높은 수치를 보인 저지방 키토산 3%첨가군과 고지방, 저지방 무첨가군간에 유의적인 차이가 있었다. HDL 콜레스테롤 : 총콜레스테롤 비는 키토산과 키토산 올리고머의 첨가에 의해 증가되는 경향이였다. LDL 콜레스테롤은 군간 유의적인 차이는 없었으나 키토산과 키토산 올리고머의 첨가에 의해 약간 감소되는 경향을 보였고, VLDL 중성지방은 유의적인 차이는 없었으나 저지방군에서는 키토산 첨가로, 고지방군에서는 키토산 올리고머의 첨가로 낮아지는 경향이 있었다. 간의 총지방함량은 식이지방수준의 증가와 키토산 올리고머의 첨가에 의해 유의적으로 감소했다. 간의 총콜레스테롤 함량은 식이에 따른 유의성을 보이지 않았으나 중성지방 함량은 지방수준의 증가에 의해 유의적으로 감소하였다. 부고환 지방조직의 총지방함량과 총콜레스테롤 함량, 중성지방 함량은 키토산 올리고머 첨가에 의해 감소하

는 경향을 보였다. 지방흡수율은 저지방군이 낮았으며, 키토산과 키토산 올리고머의 첨가에 의해 감소했다. 변을 통한 총지방 배설량과 중성지방 배설량은 고지방군이 저지방군보다 높았으며 키토산과 키토산 올리고머의 첨가에 의해 증가했다. 총콜레스테롤 배설량은 지방수준의 증가와 키토산 첨가에 의해 증가했다.

이상의 결과로 볼 때 키토산과 키토산 올리고머를 식이무게의 3%, 5% 수준으로 첨가했을 때 흰쥐의 체내 지방대사에 있어 총지질 함량과 총콜레스테롤 함량, 중성지방 함량을 낮추는 효과를 가지며, 변으로의 총지방과 중성지방의 배설을 증가시켰고, 지방 흡수율을 감소시켰다. 특히 키토산 올리고머는 키토산보다 더 효과적으로 작용하는 것으로 나타났다.

이상의 결과로 미루어 볼 때 아질산 분해법에 의한 키토산 분해물질인 키토산 올리고머의 기타 생리활성 효과와 더불어 안전성, 식품에의 응용을 위한 연구가 더 필요하리라 생각된다.

Literature cited

- Weiner ML. An overview of the regulation status and of the safety of chitin and chitosan as food and pharmaceutical ingredients. *Advances in chitin and chitosan*. Elsevier Applied Science. pp.663, 1992
- Knorr D. Use of chitinous polymers in food. *Food Technol* 38(1) : 85, 1984
- Austin PR, Brine CJ, Castle JE, Zikakis JP. New facts of research. *Science* 212 : 749, 1981
- Knorr D. Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management. *Food Technol* 44(1) : 114, 1991
- Casio IG, Fisher RA, Carrood PA. Bioconversion of shellfish chitin waste : waste pretreatment, enzyme production, process design and economic analysis. *J Food Sci* 47 : 901, 1982
- Hirano S. Production and application of chitin and chitosan. *Proceedings from the 4th International Conference in chitin and chitosan held in Trondheim, Norway*. pp.37, 1988
- Sanford PS. Chitosan, commercial uses and potential application. *Proceedings from the 4th International Conference in chitin and chitosan held in Trondheim, Norway*. pp.51, 1988
- Knorr D, Imeri AG. Effects of chitosan on yield and compositional data of carrot and apple juice. *J Food Sci* 53 : 1707, 1988
- Soto-peralta NV, Muller HA, Knorr D. Effects of chitosan treatments on the clarity and color of apple juice. *J Food Sci* 54 : 495, 1989
- Latlief SJ, Knorr D. Effect of chitin as coagulating aid on protein yield, composition and functionality of tomato seed protein concentrates. *J Food Sci* 48 : 1587, 1983
- Knorr D. Dye binding properties of chitin and chitosan. *J Food Sci* 48 : 36, 1983
- No HK, Meyers SD. Recovery of amino acids from seafood proceeding waste treatment with a dual chitosan-based ligand-exchange system. *J Food Sci* 54 : 60, 1989
- Yang Y, Hyun JH, Hwang YH. A basic study on chitin from krill and kruma prawn for industrial use. *Korean J Food Sci Technol* 24(1) : 14, 1992
- Cho JS, Han JJ, Lee CH. Physical properties of chitosan film made from crab shell. *Korean J Food Sci Technol* 24(6) : 574, 1992
- Kim SK. Production and development of chitin, chitosan and its derivatives. *Food Industry* 106 : 63, 1990
- Vahouny GV, Satchihanandam S, Cassidy MM, Lightfoot FB, Furda I. Comparative effects of chitosan and cholestyramine on lymphatic absorption of lipids in the rat. *Am J Clin Nutr* 38 : 278, 1983
- Sugano M, Fujikawa T, Hiratsuji Y, Nakashima K, Hasegawa Y. A novel use of chitosan as a hypocholesterolemic agent in rats. *Am J Clin Nutr* 33 : 787, 1980
- Kobayashi T, Otsuka S, Yugari Y. Hypocholesterolemic effect of chitosan. *Nutr Rept Int* 19(3) : 327, 1979
- Razdan A, Pettersson D. Effect of chitosan on nutrient digestibility and plasma lipid concentrations in broiler chickens. *Br J Nutr* 72 : 277, 1994
- Nagyvary JJ, Falk JD, Hill ML, Schmidt ML, Wilkins AK, and Bradbury EL. The hypolipidemic activity of chitosan and other polysaccharides in rats. *Nutr Rep Int* 20 : 677, 1979
- Sugano M, Fujikawa T, Hiratsuji Y, Hasegawa Y. Hypocholesterolemic effects of chitosan in cholesterol-fed rats. *Nutr Rep Int* 18(5) : 531, 1978
- Jennings CD, Boleyn K, Bridgas SR, Wood PJ, Anderson JW. A comparison of the lipid-lowering and intestinal morphological effects of cholestyramine, chitosan, and oat gum in rats. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine* 189 : 513, 1988
- Fukada Y, Kimura K, Ayaki Y. Effect of chitosan feeding on intestinal bile acid metabolism in rats. *Lipids* 26 : 395, 1991
- Knorr D. Functional properties of chitin and chitosan. *J Food Sci* 47 : 593, 1982
- Allan GG, Petron M. Chitin and chitosan. *Elsyier Applied Science*. pp.443, 1989
- Report of investigation into national nutrition. The ministry of health and welfare. 1995

- 27) Food balance sheet. Korea rural economic institute. 1992
- 28) Park HK. Production of chito-oligomer and development of functional food. Research paper of development work on health medical art. 1995
- 29) Hatch FT, Lees RS. Practical methods for plasma lipoprotein analysis. *Adv in Lipid Res* 6 : 1, 1968
- 30) Havel Rd. Chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 34 : 1345, 1955
- 31) Frings CS, Dunn RT. A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfuric-phospho-vanillin reaction. *Am J Clin Nutr* 53 : 89, 1970
- 32) Zak B. Total and free cholesterol. Standard method of clinical chemistry. New York, Academic Press, Inc. pp.79, 1968
- 33) Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37 : 911 1959
- 34) Folch J, Lees M, Stanley GSH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226 : 497, 1957
- 35) Kim MK, Seol EY. Effect of dietary chitin and chitosan on cadmium toxicity and lipid metabolism in rats. *Korean J Nutr* 27(10) : 996, 1994
- 36) LeHoux J and Grondin F. Some effects of chitosan on liver function in the rat. *Endocrinology* 1328, 1993
- 37) Furda I. Interaction of dietary fiber with lipids-mechanistic theories and their limitations. In new developments in dietary fiber. New York Plenum Press, 1990
- 38) Johnson IT, Gee JM. Effect of gel forming gums on the intestinal unstirred layer and sugar transport *in vitro*. *Gut* 22 : 398, 1981
- 39) Sugano M, Watanabe S, Kishi A, Izume M, Ohtakara A. Hypocholesterolemic action of chitosan with different viscosity in rats. *Lipids* 23 : 187, 1988.
- 40) Chang HJ, Chun DW, Lee SR. In vitro study on the functionality in digestive tract of chitin and chitosan from crab shell. *Korean J Food Sci Technol* 26(4) : 348, 1994
- 41) Nauss JL, Thompson JL, Naajvary J. The binding of micellar lipids to chitosan. *Lipids* 18 : 714, 1983