

키토산의 효소분해물질이 흰쥐의 당 및 지방대사에 미치는 영향*

이종미 · 조우균** · 박혜진

이화여자대학교 식품영양학과, 가천길대학 식품영양과**

Effects of Chitosan Treated with Enzymatic Methods on Glucose and Lipid Metabolism in Rats

Lee, Jong Mi · Cho, Woo Kyoun** · Park, Hye Jin

Department of Food and Nutrition, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea
Department of Food and Nutrition,** Gachongil College, Incheon 405-701, Korea

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the effects of chitosan and beef tallow at different level on glucose and lipid metabolism in rats. Dietary fat level was 20% and 40%, and chitosan was given at levels of 0%, 3%, and 5%(wt/wt) of diet. Chitosan supplement tended to decrease the serum total lipids, total cholesterol, and triglycerides. HDL cholesterol and HDL cholesterol : total cholesterol ratio tended to increase with 5% chitosan supplementation. LDL cholesterol and VLDL triglyceride tended to decrease with chitosan supplementation. Lipid concentration of liver and epididymal fat pad(EFP) tended to decrease with medium dietary fat and chitosan treatment. Fecal excretion of total lipid and triglyceride exhibited a tendency to increase with high fat levels and chitosan. Length of small intestine and gastrointestinal transit time were not affected by dietary fat levels or chitosan supplements. Therefore, it could be suggested that chitosan supplement had beneficial effects on lipid metabolism. (*Korean J Nutrition* 31(7) : 1112~1120, 1998)

KEY WORDS : chitosan · enzymatic methods · lipid metabolism · glucose metabolism.

서 론

키토산과 키토산은 자연계에 널리 존재하는 천연의 열기성 다당이지만¹⁾, 오랫동안 미이용자원으로서 방치되어 왔었다. 그러나 최근에는 그 중요성이 대두되고 이용분야가 증가하고 있으며, 산업용으로 이용 가능한 키토산의 양이 연간 약 2백만톤 정도로 추정되어 cellul-

ose 다음가는 막대한 생물자원으로 각광받고 있다. 키토산의 원료가 되는 키토인(Chitin : poly-β-(1,4)-N-acetyl-D-glucosamine)은 게, 새우와 같은 갑각류의 껍질, 곤충의 표피 및 버섯, 균류의 세포벽에 존재하는 천연고분자물질이다²⁾. 키토산은 키토인의 탈아세틸화물로서 폐수처리용 응집제나 농업분야에서의 fertilizer, 토양개량제 등에 주로 사용되어 왔다. 또한 근래에 와서 키토산유도체물질들이 많이 개발되면서 의약품분야(항감염증, 항암효과, 흡수성 봉합사, 상처치료촉진제 등), 식품응용분야(clarifying agent), 화장품응용분야(viscosity building, coating, 수분보유제 등)에 응용범위가 확대되고 있다³⁻¹⁶⁾. 특히 식품분야에서는 antich-

채택일 : 1998년 7월 5일

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

olesterol 및 fat-binding, lactose intolerance inhibition, 항균작용, 보습성 및 유화안정성, 식이섬유가 갖는 생리적 기능성 등의 특성이 있어 이를 식품에 응용하려는 연구가 시도되고 있다. 또한 glucosamine의 일부 올리고머가 항암작용이 있다는 연구보고가 발표되어 관심을 끌고 있으며 중금속 제독 효과도 보고된 바 있다¹⁶⁾.

그러나 현재 생산되고 있는 키토산은 유기산의 수용액과 묽은 염산과 같은 무기산에만 용해되고¹⁶⁾, 짠맛과 쓴맛이 강하여 식품에 적용하기에는 문제점이 있어서, 무미·무취·무독성의 수용성키토산계 분해물질의 개발이 요구되고 있다. 이러한 키토산계 물질 개발의 일환으로 carboxymethyl chitosan(CMC)이 개발되었으나 식품첨가물로 허가 받지 못했고 수용성이 낮으며 높은 점성을 띄는 문제점이 있어 전망이 밝지 않다. 현재 키토산 분해물질의 제조법으로는 화학적인 방법과 효소적인 방법이 보고되고 있지만, 반응제어와 대량생산에 문제가 있다. 또한 키토산은 아질산과의 반응에 의해 탈아미노화를 동반하는 저분자화를 일으키는 아질산법¹⁷⁾으로 키토산분해물질을 얻을 수 있는데 이 분해물질은 화학적 이취가 강해 식품에의 이용에 어려움이 있다. 반면, 이미·이취가 없고 점도가 낮아 식품에의 이용이 가능하고 원하는 분자량대의 균일한 키토산분해물질을 얻을 수 있는 방법으로, esterase를 이용해서 키토산분해물질을 얻는 방법이 개발되고 있다¹⁸⁾. 우리나라가 사회경제적으로 발전되면서 식생활이 서구화되고 이에 따라 동맥경화에 의한 순환기계질환, 당뇨병, 암 등 만성퇴행성질환이 증가하고 있다¹⁹⁾. 국민영양조사보고²⁰⁾에 의하면 우리나라 국민의 지방섭취는 1980년 21.8g으로 총열량의 9.81%였던 것이 1995년에는 38.5g으로 총열량의 19.1%를 차지해 섭취량이 1.8배나 증가하였고, 이 중 동물성 지방은 18.0g으로 지방섭취량의 46.8%나 된다.

또한 식품수급표²¹⁾에 의하면 동물성유지중에는 우지가 일년간 5만4천톤이 공급되어 동물성유지 공급의 91.5%를 차지하고 있다. 관상동맥성 심장질환은 비정상적인 지방대사가 주요 위험인자로서 혈청의 콜레스테롤, 중성지방 및 LDL콜레스테롤의 농도와 정비례의 상관관계가 있고, 총열량 중 식이지방이 차지하는 비율이 혈청지질농도에 영향을 미친다. 최근 당뇨의 식이요법으로 고식이섬유질을 포함하는 복합당질섭취의 증가와 지방섭취의 감소를 권장하고 있고, 수용성 식이섬유가 당대사에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다. 키토산은 점성을 가지는 수용성 식이섬유소이므로 당대사에 대한 효과가 기대되나 아직 이에 대한 연구는 미비한

실정이다. 키토산은 추출방법에 따라 물리적, 화학적 성질이 달라지고 이에 따라 기능적 특성인 물, 지방, 중금속이온 등과의 결합능력이 달라진다. 현재 우리나라에서는 NOCC(N, O-carboxymethyl chitosan)와 화학적인 처리에 의한 키토산분해물질의 생리적 효과에 대한 연구는 일부 보고된 바 있으나²²⁾²³⁾, 효소적으로 처리한 키토산분해물질의 생리적 특성에 대한 연구는 전무한 실정이다. 또한 Ha²⁴⁾에 의하면 화학적인 처리에 의한 키토산분해물질은 관능상 식품에의 적용이 어려우나, 효소적인 처리에 의한 키토산분해물질은 이미·이취가 없어 식품에의 적용이 가능하다고 한다. 따라서 새로운 키토산분해방법인 esterase를 이용한 키토산분해물질의 생리적인 활성에 대한 연구가 요구된다.

따라서 본 연구에서는 식이지방수준과 키토산함량을 달리하여 효소적인 방법으로 처리한 키토산이 흰쥐의 지방대사와 당대사에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

1. 흰쥐의 사육

348.63±84.7g의 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐 42마리를 체중에 따라 난괴법(Randomized complete block design)에 의하여 6군으로 나누어 실험식으로 5주간 사육하였다(Table 1). 실험 전기간동안 실험동물을 한마리씩 분리하여 cage에서 사육하였고 물과 식이는 제한없이 먹도록 하였다. 식이의 지방급원으로는 우지(beef tallow, 롯데 삼강)를 사용하였으며, 그 수준은 국민 영양 조사²⁰⁾와 식품수급표²¹⁾에 근거하여 서구사회에서의 평균섭취율인 열량섭취의 40%(216g/kg diet)와 우리나라 국민의 평균지방섭취율인 20%(94g/kg diet)로 공급하였고, 키토산은 Lee의 방법¹⁸⁾으로 제조한 것으로, 키토산을 산업용 시판효소인 esterase로 가수분해시키고 한외여과를 거쳐 감압농축, 냉동건조한 것을 공급받아 사용하였고, 분자량은 3~100kDa 사이에 존재하며, pH 7.0에서 Brookfield viscometer(Model DV-II, Brookfield engineering laboratories, USA)로 측정된 이 키토산분해물질의 점도는 5%, 10%, 20%수용액에서 각각 4~23, 13~80, 35~1200cps였다¹⁸⁾. 키토산의 첨가수준은 선행연구결과²⁵⁾를 참조하여 식이무게의 3%, 5%수준으로 식이내에 섞어 공급하였다. 실험기간 동안의 식이섭취량은 주 2회, 체중은 1회 일정한 시간에 측정하였다.

2. 수분섭취량과 장통과시간의 측정

24일째에 식이를 공급하면서 수분의 섭취량을 측정

Table 1. Composition of experimental diet/Group(g/kg diet)

Ingredient	Corn starch	Casein	Beef tallow	Salt mixture ¹⁾	Vit mixture ²⁾	Methionine	Choline chloride	Chitosan
MC ³⁾	706	150	94	35	10	3	2	0
ML	706	150	94	35	10	3	2	30
MH	706	150	94	35	10	3	2	50
HC	584	150	216	35	10	3	2	0
HL	584	150	216	35	10	3	2	30
HH	584	150	216	35	10	3	2	50

1) AIN salt mixture(g/kg mixture) : Calcium phosphate, dibasic(CaHPO₄ · 2H₂O) 500, Sodium chloride(NaCl) 74, Potassium Citrate, monohydrate(K₃C₆H₅O₇ · H₂O) 220, Potassium sulfate(K₂SO₄) 52, Magnesium oxide(MgO) 24, Manganous carbonate(45 - 48% Mn) 3.5, Ferric citrate(16 - 17% Fe) 6, Zinc carbonate(70% ZnO) 1.6, Cupric carbonate(53 - 55% Cu) 0.3, Potassium iodate(KIO₃) 0.01, Sodium selenite(Na₂SeO₃ · 5H₂O) 0.01, Chromium potassium sulfate[CrK(SO₄)₂ · 12H₂O] 0.55, Sucrose finely powdered, to make 1,000.

2) AIN vitamin mixture(mg/kg mixture) : Thiamine · HCl 600, Riboflavin 600, Pyridoxine · HCl 700, Nicotinic acid(nicotinamide is equivalent) 3,000, D-calcium pantothenate 1,600, Folic acid 200, D-biotin 20, Cyanocobalamin(Vitamin B₁₂) 1, Retinyl palmitate or acetate(Vitamin A) as stabilized powder to provide 400,000IU vitamin A activity or 120,000 retinol equivalent, DL- α -Tocopheryl acetate(Vitamin E) as stabilized powder to provide 5,000IU vitamin E activity, Cholecalciferol(100,000IU, may be in powder form) 2.5, Menaquinone(Vitamin K, Menadione) 5, Sucrose finely powdered, to make 1,000.

3) MC(Medium beef tallow 20%+none), ML(Medium beef tallow 20%+chitosan 3%), MH(Medium beef tallow 20%+chitosan 5%), HC(High beef tallow 40%+none), HL(High beef tallow 40%+chitosan 3%), HH(High beef tallow 40%+chitosan 5%)

하였다. 26일째에 Marker로 Carmine red(Sigma Chem Co., USA)를 0.5%의 농도로 실험식에 첨가하여 공급하고, 매시간 변 중 marker의 배설을 관찰해 실험식 급여 시작시간과 carmine red가 변 중에 처음 나타나기까지의 시간을 관찰해 장통과시간(Gastrointestinal transit time)을 측정하였다.

3. 장기 · 혈액 · 변의 채취, 뇨배설량 측정과 이당류 분해효소를 위한 효소원액의 준비

실험종료 3일전에 대사장에서 24시간 동안 변을 채취하였고, 뇨량을 측정하였다. 실험종료전 12시간 동안 굶긴 동물을 ethyl ether로 마취시켜 회복하고 심장으로부터 혈액을 채취한 다음 실온에서 30분 이상 방치해 두었다가 2000rpm에서 30분간 원심분리하여 분리된 혈청의 일부는 지단백분석을 위한 시료로 사용하였고, 나머지 혈청은 지방 대사 측정을 위하여 냉동 보관하였다. 혈액을 취한 후 즉시 실험 동물들을 해부해서 소장을 떼어 내어 길이를 재고, 소장 상부 10~60cm사이를 잘라 절개한 후 냉장생리식염수로 세척한 다음 물기를 제거하고, 얼음위에서 knife로 장점막을 끊어 4배무게의 증류수와 함께 균질화해서 4℃, 7000rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 이당류분해효소활성의 측정을 위한 시료로 -70℃에서 냉동보관하였다. 간, 부고환 지방조직을 떼어 무게를 측정한 후 지방 함량 측정 때까지 냉동 보관하였다.

Lipoprotein fraction은 KBr과 NaCl로 만든 density solution을 이용하여 분리하고자 하는 lipoprotein

과 혈청의 밀도를 맞추고 원심 분리하면 상층에 lipoprotein이 분리되는 원리를 이용한 ultracentrifugation²⁶⁾²⁷⁾에 의해 Very Low Density Lipoprotein (VLDL, $d < 1.006$)과 Low Density Lipoprotein(LDL, $1.006 < d < 1.050$)을 분리하였다.

4. 이당류 분해효소(Sucrase, lactase, maltase)의 활성 측정

Lactase, maltase, sucrase활성은 Dahlqvist법²⁸⁾에 의해 측정하였다. 실험동물을 희생한 직후 처리해 놓은 효소원액을 희석시킨 효소시료와 각 이당류의 기질용액을 혼합해서 incubation시킨 다음, boiling waterbath에서 반응을 중지시켰다. 여기에 TGO(Tris-glucose oxidase) reagent를 첨가해 발색시켜 420nm에서 흡광도를 측정하였다. 이당류 분해효소 활성은 specific activity(units of activity/protein g)로서 나타내고 효소액의 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준물질로 사용하여 Lowry법²⁹⁾에 의해 정량하였다.

5. 지방대사의 측정

혈청의 총지방량은 Frings법³⁰⁾으로, 총콜레스테롤량은 Zak법³¹⁾으로 측정하였다. 혈청의 LDL 콜레스테롤량은 cholesterol hydrolase를 이용한 효소시약kit(영동 제약)로, HDL 콜레스테롤량은 cholesterol esterase를 이용한 효소시약kit(아산제약)로 측정했다. 혈청 및 VLDL의 중성지방량은 lipoprotein lipase와 glycerokinase를 포함하는 효소시약 kit(영동 제약)로 측정하였다. 간과 부고환지방의 총지방량은 Bligh와 Dy-

er법³²⁾과 Folch법³³⁾을 이용하여 정량하였고, 총콜레스테롤량은 추출한 총지방량을 methanol에 녹여 Zak법³¹⁾으로 비색정량하였으며, 중성지방량은 lipase와 glycerokinase를 포함한 효소시약kit(영동 제약)로 측정하였다.

6. 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. 식이지방의 함량(A), 키토산의 첨가량(B)의 영향을 $\alpha=0.05$ 수준에서 two-way ANOVA로 분석하였다. 모든 통계적 분석은 SAS program을 사용하였다.

결과 및 고찰

1. 식이섭취량과 체중증가량

식이섭취량과 체중증가량은 Table 2에 나타내었다. 식이섭취량은 식이지방수준에 따라서는 차이가 없었으나, 중지방3%키토산첨가군(ML)을 제외하고는 중지방섭취군에서 약간 높은 경향이였다. 또한 키토산첨가군에서 식이섭취량이 낮아졌다. 이는 식이지방수준이 낮아질수록 식이섭취량이 증가하는 경향을 보이며³⁴⁾³⁵⁾, 지방수준이 높아지면 식이의 맛과 calorie density에 영향을 주어 식이섭취량이 감소한다는 Yoshida 등³⁶⁾의 결과와 같았다. 실험기간동안 실험동물의 체중증가량은 고지방군에서 컸고, 키토산첨가군에서 적었다.

2. 당대사

1) 수분섭취량과 뇨량

수분섭취량과 뇨량은 Table 3에 나타내었다. 수분섭

Table 2. Daily food intake and weight gain

GROUP	Daily food intake(g/day)	Weight Gain (g)
MC	27.14 ± 1.37 ^{a1)2)}	92.032 ± 13.978 ^a
ML	19.14 ± 1.59 ^c	- 4.763 ± 15.903 ^c
MH	23.94 ± 0.63 ^{ab}	11.800 ± 14.013 ^c
HC	24.74 ± 1.34 ^{ab}	109.503 ± 11.094 ^a
HL	21.73 ± 0.88 ^{bc}	63.478 ± 17.278 ^{ab}
HH	20.02 ± 0.60 ^c	29.942 ± 21.666 ^{bc}
Significant factor ³⁾	B, A*B	A, B

- 1) Mean ± S.E.
- 2) Values with different alphabet within the column are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.
- 3) Statistical significance of A and B factors was calculated by 2-way ANOVA. A(Effect of fat was significant at $p < 0.05$), B(Effect of chitosan was significant at $p < 0.05$), A*B(Interaction of factor A and B was significant at $p < 0.05$)

취량은 키토산첨가에 의해 감소되었다. 하루동안 배설한 뇨량은 중지방3%키토산첨가군(ML)이 낮은 경향을 보인 것을 제외하고는 식이지방수준이나 키토산의 첨가에 의한 일정한 경향이 없었다.

2) 소장길이와 장통과시간(Transit time)

키토산이 흰쥐의 장기능에 미치는 영향을 알아 보기 위해 측정된 소장길이와 장통과시간은 Table 4에 나타내었다. 영양소의 흡수가 주로 이루어지는 소장의 길이는 식이지방수준이나 키토산첨가에 따른 차이가 없었다. 장통과시간 역시 식이에 의한 영향이 없었다. 장통과시간은 영양소의 흡수율에 영향을 미칠 수 있으므로 식이섬유의 첨가에 의해 당질 및 지질대사에도 영향을 줄 것으로 사료되는데, 식이에 cellulose를 첨가함으로써 장통과시간이 감소한다고 한 Vahouney 등³⁷⁾의 결과와는 달리 키토산의 첨가에 따라 장통과시간이 감소되지 않았다.

3) 이당류 분해효소 활성(Disaccharidase activity)

식이섬유가 당질대사를 개선시키는 기전으로 위 배

Table 3. Daily water intake and urine volume

GROUP	Daily water intake(ml/day)	Urine volume (ml/day)
MC	44.17 ± 7.57 ^{ab1)2)}	16.833 ± 3.600 ^{ab}
ML	28.33 ± 2.79 ^b	3.667 ± 1.085 ^b
MH	40.83 ± 7.35 ^{ab}	22.667 ± 7.102 ^a
HC	71.67 ± 14.70 ^a	21.500 ± 6.989 ^a
HL	41.67 ± 14.98 ^{ab}	24.500 ± 5.346 ^a
HH	25.83 ± 6.64 ^b	21.000 ± 5.989 ^a
Significant factor ³⁾	B	

- 1) Mean ± S.E.
- 2) Values with different alphabet within the column are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.
- 3) Statistical significance of A and B factors was calculated by 2-way ANOVA(See Table 2).

Table 4. Length of small intestine and Gastrointestinal transit time(TT)

GROUP	Small intestine(cm)	TT(hr)
MC	133.67 ± 6.07 ^{ns1)2)}	22.54 ± 2.82 ^{ns}
ML	130.58 ± 2.94	21.67 ± 2.23
MH	123.83 ± 4.80	14.38 ± 2.51
HC	129.17 ± 7.81	14.83 ± 2.45
HL	129.83 ± 7.38	21.98 ± 2.58
HH	119.75 ± 1.34	22.29 ± 2.63
Significant factor ³⁾		A*B

- 1) Mean ± S.E.
- 2) Not significant at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test
- 3) Statistical significance of A and B factors was calculated by 2-way ANOVA(See Table 2).

출속도의 지연, 장통과시간의 지연, 소장에서의 당류 확산속도의 지연 외에 소장상부에서의 다당류 가수분해속도의 지연, 소장에서의 단당류흡수속도의 지연 등이 제시되고 있어서³⁶⁾ 소장점막에서의 이당류분해효소의 활성을 측정하였다. 그 결과는 Table 5에 나타난 바와 같이 lactase, maltase, sucrase 모두 중지방군에서 키토산첨가에 의해 다소 증가되는 경향을 보였으나 식이에 의한 일정한 경향이 없었다.

3. 지질관련대사

1) 혈청과 지단백분획의 지질함량

혈청의 총지질함량, 총콜레스테롤함량, 중성지방함량은 Table 6에 나타내었다. 혈청 총지질함량은 식이지방수준에 따른 차이는 없었고, Son²³⁾, Kim과 Seol³⁹⁾의 보고와 같이 키토산을 첨가할수록 감소되는 경향을 보였다. 혈청 총콜레스테롤함량은 식이지방수준의 영향을 받지 않는다는 Middlton과 Schneeman⁴⁰⁾의 보고와 같이, 식이에 의한 영향이 없었으나, 키토산첨가에 의해 감소되는 경향이었으며, 중성지방함량도 키토산을 첨가할수록 감소되는 경향을 보였다. 키토산첨가에 의한 총콜레스테롤의 감소는 LeHoux와 Grondin⁴¹⁾의 연구에서도 보고되었는데, 이것은 키토산이 소화관내에서 콜레스테롤이 micelle로 통합되는 것을 방해함으로써 나타나는 hypocholesterolemic action에 의한

것⁴²⁾⁴³⁾이라 생각된다. 또 키토산은 탈아세틸화가 되어 $-NH_2$ 가 노출되면 polyanions와 gel을 형성하여, 펙틴이나 구아검과 같은 점성이 있는 식이섬유보다 더 viscose한 성질을 가지게 된다⁴⁴⁾. 따라서 높은 점성을 가진 키토산이 micelle에서 mucosa로의 콜레스테롤의 확산을 지연시키고, gastric emptying을 지연시켜, 장내에서 콜레스테롤의 흡수를 저하시킴으로써 hypocholesterolemic effects를 나타내는 것으로 생각된다. 키토산첨가에 의한 혈청 중성지질함량의 감소는 키토산의 십이지장내 점성의 증가, gastric emptying 지연, 지방흡수의 감소에 의한 hypotriglyceridemic response³⁹⁾의 결과인 것으로 생각된다.

혈청 지단백분획의 지질함량은 Table 7에 나타내었다. 동맥경화증에 예방적 효과가 있다고 알려진 HDL 콜레스테롤은 중지방군에서 높은 경향을 보였고, 5%키토산첨가군에서 증가되는 경향을 보였다. 따라서 HDL 콜레스테롤과 혈청총콜레스테롤의 비율은 중지방군에서 증가되는 경향을 보였고 키토산첨가에 의해 증가되어서 중지방 5%키토산첨가군(MH)에서 유의적으로 높은 값을 나타냈다. 이러한 경향은 키토산을 공급했을 때 식이지방의 장내 이용을 감소에 따라서 말초조직으로부터 간으로 운반되는 reverse cholesterol transport가 촉진되어 총콜레스테롤에 대한 HDL콜레스테롤 비율이 증가하였다는 Razdan과 Pettersson⁴²⁾의 보고와

Table 5. Disaccharidase enzyme activity of jejunal mucosa(specific activity)

GROUP	Lactase(unit/g protein)	Maltase(unit/g protein)	Sucrase(unit/g protein)
MC	5.28 ± 0.37 ^{ab1)2)}	23.69 ± 2.84 ^b	5.19 ± 0.97 ^{ms3)}
ML	7.92 ± 0.85 ^a	26.70 ± 3.04 ^{ab}	7.38 ± 1.85
MH	7.76 ± 1.21 ^a	35.16 ± 3.58 ^a	8.16 ± 1.31
HC	6.68 ± 1.08 ^{ab}	32.82 ± 3.11 ^{ab}	6.34 ± 1.56
HL	4.94 ± 0.90 ^b	23.74 ± 3.71 ^b	4.66 ± 1.14
HH	6.23 ± 0.36 ^{ab}	25.81 ± 2.26 ^{ab}	6.06 ± 0.72
Significant factor ⁴⁾	A*B	A*B	

1) Mean ± S.E.

2) Values with different alphabet within the column are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

3) Not significant at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

4) Statistical significance of A and B factors was calculated by 2-way ANOVA(See Table 2).

Table 6. Serum total lipid, total cholesterol and triglyceride concentrations

GROUP	Total lipid(mg/dl)	Total cholesterol(mg/dl)	Triglycerides(mg/dl)
MC	323.57 ± 25.44 ^{a1)2)}	101.71 ± 13.61 ^a	55.14 ± 8.59 ^a
ML	232.07 ± 22.52 ^b	80.46 ± 11.91 ^{ab}	29.77 ± 4.87 ^{ab}
MH	256.99 ± 34.41 ^{ab}	77.14 ± 11.82 ^{ab}	24.71 ± 2.76 ^b
HC	325.20 ± 17.55 ^a	85.13 ± 9.17 ^{ab}	49.59 ± 8.73 ^{ab}
HL	296.20 ± 13.71 ^{ab}	59.43 ± 10.28 ^b	54.14 ± 14.25 ^a
HH	271.08 ± 17.72 ^{ab}	64.94 ± 7.72 ^b	29.27 ± 3.82 ^{ab}
Significant factor ³⁾	B		B

1) Mean ± S.E.

2) Values with different alphabet within the column are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

3) Statistical significance of A and B factors was calculated by 2-way ANOVA(See Table 2).

일치하는 결과였다. 내인성콜레스테롤을 주구성성분으로 하는 LDL분획의 콜레스테롤 함량은 중지방3%키토산첨가군(ML)을 제외하고는 키토산첨가에 따라 감소되는 경향을 보였고, 내인성 중성지방이 주구성성분인 VLDL분획의 중성지방은 대조군보다 키토산첨가시 감소되는 경향을 보였다.

2) 간의 지질함량

간의 지질함량은 Table 8에 나타내었다. 간의 총지방함량은 식이지방수준의 감소와 키토산의 첨가에 의해 감소하는 경향이였다. 간의 총콜레스테롤과 중성지방은 비슷한 경향을 보였는데, 식이지방수준의 감소와 키토산첨가에 의해 감소되었다. 이는 키토산첨가에 의해 간의 중성지방과 콜레스테롤함량이 감소되었다고 보

고한 Sugano 등³⁴⁾, Kim과 Seol³⁹⁾의 연구와 일치하는 결과였다. 이는 또한 LeHoux과 Grondin⁴⁰⁾이 고콜레스테롤을 섭취한 쥐의 간에서 키토산이 체내 콜레스테롤합성의 주요조절효소인 HMG CoA reductase(3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A)의 활성을 감소시켜 외인성 콜레스테롤과 내인성 콜레스테롤간의 균형을 적절히 유지하도록 함으로써 간기능에 영향을 미친다고 한 보고와 관련이 있을 것으로 생각된다.

3) 부고환지방조직의 지질함량

간 이외에 또다른 체내 지방 축적기관인 부고환지방조직(Epididymal fat pad)의 지질함량은 Table 9에 나타내었다. 부고환지방조직의 총지방함량은 중지방군과 키토산첨가군에서 이들의 양이 감소되어 키토산이 체

Table 7. Lipid concentrations of lipoprotein fraction

GROUP	HDL Cholesterol (mg/dl serum)	HDL cholesterol /Total cholesterol	LDL cholesterol (mg/dl LDL fraction)	VLDL triglyceride (mg/dl VLDL fraction)
MC	26.39±6.28 ^{ab(12)}	29.16±6.91 ^b	15.15±2.73 ^{bc}	38.53±9.83 ^{ab}
ML	23.89±5.85 ^{ab}	29.00±5.17 ^b	48.81±3.79 ^a	17.20±5.31 ^b
MH	35.01±6.14 ^a	50.20±4.50 ^a	14.73±2.49 ^{bc}	33.69±20.43 ^{ab}
HC	22.83±6.29 ^{ab}	26.07±6.22 ^b	15.57±1.70 ^b	68.35±9.33 ^a
HL	11.41±3.10 ^b	20.78±6.34 ^b	13.04±3.49 ^{bc}	45.04±3.46 ^{ab}
HH	25.48±5.18 ^{ab}	37.98±4.72 ^{ab}	12.62±3.01 ^c	29.57±10.86 ^b
Significant factor ³⁾		B	A, B, A*B	

1) Mean±S.E.

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

3) Statistical significance of A and B factors was calculated by 2-wayANOVA(See Table 2).

Table 8. Liver total lipid, total cholesterol and triglyceride concentrations

GROUP	Total lipid(mg/total liver)	Total cholesterol(mg/total liver)	Triglycerides(mg/total liver)
MC	359.34±20.89 ^{bc(12)}	24.43±1.36 ^{ab}	57.90±11.01 ^{ab}
ML	257.38±43.80 ^c	15.69±1.61 ^d	20.90±6.60 ^c
MH	353.79±17.99 ^{bc}	19.34±1.61 ^{cd}	25.65±5.09 ^c
HC	491.81±59.07 ^a	26.96±2.44 ^a	69.70±14.06 ^a
HL	414.99±33.49 ^{ab}	20.91±0.92 ^{bc}	45.05±7.95 ^{abc}
HH	435.80±36.98 ^{ab}	20.63±1.15 ^{bc}	37.24±4.41 ^{bc}
Significant factor ³⁾	A	A, B	A, B

1) Mean±S.E.

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

3) Statistical significance of A and B factors was calculated by 2-wayANOVA(See Table 2).

Table 9. 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)
MC	5520.79±736.16 ^{ab(12)}	34.83±3.52 ^a	119.81±21.17 ^a
ML	2643.93±262.93 ^c	8.48±1.92 ^b	32.64± 5.28 ^c
MH	2237.71±126.85 ^c	15.12±0.79 ^b	69.25±19.05 ^{bc}
HC	6307.65±882.75 ^a	46.68±9.56 ^a	97.54± 4.46 ^{ab}
HL	4428.74±490.40 ^b	21.61±3.04 ^b	71.81±15.61 ^{bc}
HH	2818.53±334.53 ^c	10.45±1.23 ^b	45.54± 9.24 ^c
Significant factor ³⁾	A, B	B	B

1) Mean±S.E.

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

3) Statistical significance of A and B factors was calculated by 2-wayANOVA(See Table 2).

Table 10. Fecal total lipid, total cholesterol and triglyceride excretions

GROUP	Total lipid(mg/day)	Total cholesterol(mg/day)	Triglycerides(mg/day)
MC	96.93±6.74 ^{bc(12)}	5.54±0.66 ^{ab(3)}	3.23±0.25 ^b
ML	77.16±3.72 ^c	3.86±0.21 ^b	2.66±0.20 ^b
MH	121.18±8.50 ^a	6.19±0.81 ^a	5.28±0.67 ^a
HC	115.35±5.79 ^{ab}	7.44±0.55 ^a	5.21±0.17 ^a
HL	106.00±8.85 ^{ab}	6.99±0.87 ^a	5.82±0.58 ^a
HH	126.61±9.26 ^a	6.21±0.38 ^a	5.24±0.47 ^a
Significant factor ⁴⁾	A, B	A	A, B, A*B

1) Mean ± S.E.

2) Values with different alphabet within the column are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.3) Not significant at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

4) Statistical significance of A and B factors was calculated by 2-wayANOVA(See Table 2).

내 총지방축적을 억제하는 효과를 보였다. 부고환지방 조직의 총콜레스테롤함량과 중성지방함량도 동일한 경향을 보였다. 키토산을 첨가했을 때 체내 콜레스테롤축적이 감소되었다는 Son²³⁾, Park²⁵⁾의 보고와 같이 본 연구에서도 키토산첨가에 의해 부고환지방조직의 콜레스테롤이 감소되었다. 이러한 결과로 볼 때 효소적으로 처리한 키토산도 간에서의 지방축적과 지방조직에서의 지방저장을 억제하는 기능이 있음을 알 수 있다.

4) 변의 지질배설량

하루동안 배설한 변의 지질함량은 Table 10에 제시하였다. 변으로 배설된 총지질함량은 고지방군에서 높았으며, 키토산의 첨가에 의해 총지질배설량이 증가한다는 여러 보고²³⁾³⁹⁾와 같이 키토산무첨가군에 비해 5% 키토산첨가군에서 높았다. 변내의 총콜레스테롤함량 역시 고지방군에서 높았으나, 중지방5%키토산첨가군(MH)에서는 증가되는 경향을 보였지만 고지방군에서는 오히려 감소되는 경향을 보여 키토산첨가에 따른 유의적인 차이는 없었다. 일일중성지방배설량은 고지방군에서 높았고 중지방3%키토산첨가군(ML)을 제외하고는 키토산첨가에 의해 증가되는 경향을 보였다. 키토산의 첨가에 의해 중성지방배설량이 증가한 것은 키토산은 acidic steroid의 변배설을 증가시키지는 않지만, 중성 steroid의 배설을 증가시켜 결국 변으로의 중성지방 배설을 증가시키고⁴⁵⁾, micellar lipid와 결합한 키토산은 중성지방의 흡수를 막기 때문에⁴⁶⁾ 나타난 결과라고 생각된다. 효소적으로 처리한 키토산은 변으로 배설되는 총콜레스테롤함량보다는 총지질함량과 중성지방함량에 더욱 영향을 미치는 것으로 생각된다.

요약 및 결론

본 연구는 지방의 수준과 효소적으로 처리한 키토산의 수준을 달리하여 흰쥐의 당대사와 지방대사에 미치

는 영향을 알아보기 위해 실시하였다. 체중이 348.63±84.7g인 Sprague-Dawley종 수컷흰쥐에게 식이지방급원으로 우지를 열량의 20%, 40%로 하고, 효소적으로 처리한 키토산을 식이무게의 3%, 5%로 하여 5주간 사육하였다.

그 결과는 다음과 같다. 식이섭취량은 고지방군과 키토산첨가군에서 적었고, 체중증가량은 중지방군과 키토산첨가군에서 적었다. 또한 키토산첨가에 의해 수분섭취량이 감소하였다. 소장길이와 장통과시간, 소장점막에서의 이당류분해효소의 활성은 식이지방수준이나 키토산첨가에 의해 일정한 경향을 보이지 않았다. 혈청총지방함량은 키토산첨가에 의해 감소되었다. 혈청총콜레스테롤함량은 식이에 의한 일정한 경향이 없었다. 혈청중성지방함량은 중지방군, 키토산첨가군에서 낮은 경향을 보였다. HDL콜레스테롤과, 이에 따른 HDL콜레스테롤과 총콜레스테롤의 비율은 중지방군과 5%키토산첨가군에서 높았으며, LDL콜레스테롤과 VLDL중성지방은 키토산첨가에 의해 낮은 경향이였다. 간과 부고환지방조직의 총지방함량, 총콜레스테롤함량, 중성지방함량은 식이지방수준감소와 키토산첨가에 의해서 감소되었다. 변을 통한 총지방배설량과 중성지방배설량은 고지방군과 키토산첨가군에서 증가되었다.

이상의 결과로 볼 때 키토산첨가에 의해 혈청, 간, 부고환지방에서의 지질함량을 감소시키고, 변을 통한 지방배설, 혈청의 HDL콜레스테롤을 증가시켜서 흰쥐의 지방대사에 바람직한 영향을 미쳤다고 사료된다. 또한 키토산첨가에 의해 장길이나 장통과시간, 이당류분해효소의 활성에는 일정한 영향을 보이지는 않았으나 키토산의 효소분해물질이 점성을 가지므로 이것이 식이섬유로서 체내에 미치는 영향을 구체적으로 살펴볼 필요가 있다. 특히 식이요법으로 식이섬유의 섭취를 권장하는 당뇨병의 경우 당대사에 미치는 영향을 살펴볼 필요가 있다고 사료된다.

Literature cited

- 1) Muzzarelli RAA. Chitin in Nature and Technology. Plenum Press, New York, 1986
- 2) 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*. 663, Elsevier Applied Science, 1992
- 3) Knorr D. Use of chitinous polymers in food. *Food Technol* 38(1) : 85, 1984
- 4) Austin PR, Brine CJ, Castle JE, Zikakis JP. New facts of research. *Science* 212 : 749, 1981
- 5) Knorr D. Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management. *Food Technol* 44(1) : 114, 1991
- 6) Casio IG, Fisher RA, Carroad PA. Bioconversion of shellfish chitin waste : Waste pretreatment, enzyme production, process design and economic analysis. *J Food Sci* 47 : 901, 1982
- 7) Hirano S. Production and application of chitin and chitosan. Proceedings from the 4th International Conference in chitin and chitosan held in Trondheim, Norway 37, 1988
- 8) Sanford PS. Chitosan, commercial uses and potential application. Proceedings from the 4th International Conference in chitin and chitosan held in Trondheim, Norway 51, 1988
- 9) Knorr D, Imeri AG. Effects of chitosan on yield and compositional data of carrot and apple juice. *J Food Sci* 53 : 1707, 1988
- 10) Soto-peralta NV, Muller HA, Knorr D. Effects of chitosan treatment on the clarity and color of apple juice. *J Food Sci* 54 : 495, 1989
- 11) Latlief SJ, Knorr D. Effects of chitin as coagulating aid on protein yield, composition and functionality of tomato seed protein concentrates. *J Food Sci* 48 : 1587, 1983
- 12) Knorr D. Dye binding properties of chitin and chitosan. *J Food Sci* 48 : 36, 1983
- 13) No HK, Meyers SD. Recovery of amino acids from seafood processing waste treatment with a dual chitosan-based ligand-exchange system. *J Food Sci* 54 : 60, 1989
- 14) Yang Y, Hyun JH, Hwang YH. A basic study on chitin from krill and krill prawn for industrial use. *Korean J Food Sci Technol* 24(1) : 14, 1992
- 15) Cho JS, Han JJ, Lee CH. Physical properties of chitosan film made from crab shell. *Korean J Food Sci Technol* 24(6) : 574, 1992
- 16) Kim SK. Production and development of chitin, chitosan and its derivatives. *Food Industry* 106 : 63, 1990
- 17) Allan GG, Petron M. Chitin and chitosan. *Elsyier Applied Science*. 443, 1989
- 18) Lee YC. Production of chito-oligomer and development of functional food. Research paper of development work on health medical art, 1997
- 19) Choe EH, Byun YC. Recent pattern of mortality in Korea. *The Journal of the Population Association of Korea* 8(2), 1985
- 20) Report of investigation into national nutrition. The ministry of health and welfare, 1997
- 21) Food balance sheet. Korea rural economic institute, 1994
- 22) Bae KH, Kim MK. Effect of chitosan and N, O-Carboxymethyl Chitosan of different sources and molecular weights on cadmium toxicity. *Korean J Nutr* 30(7) : 751, 1997
- 23) Son BK. Effects of chitosan from different molecular weight on lipid metabolism in rats. Ewha womens univ., 1997
- 24) Ha SM. Properties of hydrolysate and its influence on the quality of model food. Ewha womens univ., 1997
- 25) Park HK. Production of chito-oligomer and development of functional food. Research paper of development work on health medical art, 1995
- 26) Hatch FT, Lees RS. Practical methods for plasma lipoprotein analysis. *Adv in Lipid Res* 6 : 1, 1968
- 27) Havel RJ, Eder HA, Bragdan JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 34 : 1345, 1955
- 28) Dahlqvist A. Intestinal disaccharidase. In : Elizabeth FN, Vivtor G. *Methods in enzymology* vol.8, Academic press pp.584, 1966
- 29) Lowry OH. Lowry method for protein determination. *J Biol Chem* 193 : 265, 1953
- 30) Frings CS, Dunn RT. A colorimetric method for determination of total serum lipid based on the sulfuric-phosphovanillin reaction. *Am J Clin Nutr* 53 : 89, 1970
- 31) Zak B. Total and free cholesterol. Standard method of clinical chemistry. 79, New York, Academic Press, Inc., 1968
- 32) Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37 : 911, 1959
- 33) Folch J, Lees M, Stanley GSH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem* 226 : 497, 1957
- 34) Sugano M, Fujikawa T, Hiratsuji Y, Nakashima K, Hasegawa Y. A novel use of chitosan as a hypocholesteremic agent in rats. *Am J Clin Nutr* 33 : 787, 1980
- 35) Kim HJ. Effects of exercise and different levels of lipid supply on the carbohydrate and lipid metabolism in the rats. Ewha womens univ., 1987
- 36) Yoshida A, Harper AE, Elvehjem CA. Effect of dietary level of fat and type of carbohydrate on growth and food intake. *J Nutr* 66 : 217, 1958
- 37) Vahouny GV, Roy T, Gallo LL, Story JA. Dietary fibers III. Effects of chronic intake on cholesterol absorption and

- metabolism in the rat. *Am J Clin Nutr* 33 : 2182, 1986
- 38) Park SH, Lee YK, Lee HS. The effect of dietary fiber feeding on gastrointestinal functions and lipid and glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Nutr* 27(4) : 311, 1994
- 39) 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
- 40) Middleton S, Schneeman BO. Rat plasma triglycerides and hepatic fatty acid synthesis mRNA, but not apolipoprotein B and A-IV mRNA, respond to dietary fat content. *J Nutr* 126 : 1627, 1996
- 41) LeHoux J, Grondin F. Some effects of chitosan on liver function in the rat. *Endocrinology* 1328, 1993
- 42) Razdan A, Pettersson D. Effect of chitosan on nutrient digestibility and plasma lipid concentrations in broiler chickens. *Br J Nutr* 72 : 277, 1994
- 43) Sugano M, Fujikawa T, Hirayasuji Y, Hasegawa Y. Hypocholesterolemic effects of chitosan in cholesterolemia-fed rats. *Nutr Rep Int* 18(5) : 531, 1978
- 44) 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
- 45) 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
- 46) Nauss JL, Thompson JL, Naajvary J. The binding of micellar lipids to chitosan. *Lipids* 18 : 714, 1983