

지방 및 탄수화물 흡수억제 메커니즘을 활용한 비만 개선 식이 연구

김석기* · 안국환 · 윤승원 · 이영춘¹ · 하상도¹

(주)바이오랩, ¹중앙대학교 식품공학과

A Study on Dietary Supplement to Reduce Obesity by the Mechanism of Decreasing Lipid and Carbohydrate Absorption

Seok-Gi Kim*, Guk-Hwan An, Seung-Won Yoon, Young-Chun Lee¹ and Sang-Do Ha¹

BioLab, Research Center

¹Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University

Pancreatic lipase and α -amylase inhibitory activities in purified extracts of pumpkin and job's tear were studied. Pancreatic lipase inhibitory activity was determined by measuring the rate of releasing oleic acid from triolein, and α -amylase inhibitory activity was determined by iodometric method. The extracts of pumpkin and job's tear were purified using silica gel and C-18 gel column chromatographies. Treatment of pumpkin extract (120 μ g/mL) in 3T3-L1 preadipocyte decreased differentiation about 95% and blocked accumulation of lipid. Body weights of rats fed high-fat diet containing dietary supplement decreased about 13% as compared with those fed only high-fat diet. These results revealed dietary supplement is a good obesity-reducing material for decreasing lipid and carbohydrate absorptions.

Keywords: obesity, pumpkin, job's tear, pancreatic lipase, α -amylase, lipid and carbohydrate absorption

서 론

비만증은 당뇨병, 고지혈증, 고혈압 및 관상 동맥질환 등과 밀접한 연관성이 있기 때문에 비만한 사람에게 이러한 질병들의 유병률 및 사망률이 높은 것은 이미 잘 알려져 있다⁽¹⁾. 비만 치료를 위해서 가장 적극적인 방법으로 지방과 탄수화물을 비롯한 에너지원의 섭취 제한이 이용되고 있으며, 이런 에너지 섭취 제한은 기초 대사량의 감소와 체지방 감소 등의 문제점이 발생한다. 따라서, 정상적인 식사를 진행하면서 비만 증상을 완화시키는 방법은 매우 중요하다고 할 수 있다. 특히 우리나라 식습관은 탄수화물 위주의 식사를 하므로 비만을 개선하기 위한 시도에는 기존의 지방흡수 억제 뿐 아니라 탄수화물의 흡수 억제 또한 겸비되는 방법이 바람직할것으로 사료된다.

호박(*Cucurbita spp.*)은 박과에 속하는 일년생 덩굴성 초본으로 열대 아메리카가 원산지이며, 이들은 크게 동양계 호박(*C. moschata Duch.*), 서양계 호박(*C. maxima Duch.*) 및 페포계 호박(*C. pepo L.*)으로 나누어진다. 우리나라에서 재배되는 호박은 대부분 동양계에 속하고 품종과 종류는 여러 가

지가 있지만 성숙도에 따라 애호박과 늙은 호박으로 구분되고 있다.

우리나라의 호박은 다른 박과 채소류에 비하여 병해충이 심하지 않고 약제를 살포할 필요가 거의 없으므로 무공해식품으로도 그 가치가 높은 것으로 평가되고 있고, 비타민 A, C 및 비타민 A의 전구체인 β -carotene과 무기물, 식이 섬유, 전분, 자당, 포도당 등이 풍부하다⁽²⁾. 최근 늙은 호박의 소비량이 증가하는 것은 호박이 부기를 빼는 효능과 이뇨 성분이 있어 전신이 자주 붓는 사람, 산후의 임신부 등이 호박을 삶아 먹으면 부기가 쉽게 빠지면서 회복이 빨라진다고 알려져 민간약으로 널리 이용되어 왔기 때문이며, 최근에는 항암효과가 있는 β -carotene의 함량이 높고⁽³⁾, 당뇨병, 야맹증, 각막건조증 등에도 효과가 있는 것으로 알려져 관심을 끌고 있다.

호박은 성숙함에 따라 당질 등의 영양성분이 증가하게 되어 주식으로도 가치가 높은 것으로 평가되고 있다. 호박에 관한 연구로는 Cho의 미숙 호박과 완숙호박의 화학성분⁽⁴⁾, 늙은 호박의 부위별 함량⁽⁵⁾, 호박의 지방산의 조성⁽⁶⁾ 등이 있으며, 기능성을 이용한 호박 가공식품의 제조 방법에 관한 연구로는 호박음료의 제조방법, 호박 분말의 제조방법, 호박 농축물을 이용한 호박차 및 호박 음료의 제조방법과 정의 호박 열수 추출 조건의 모니터링⁽⁷⁾ 등이 있다. 그러나 호박이 첨가된 건강식품의 기능적 특성과 제품 개발에 관한 연구는 미비한 실정이다.

*Corresponding author: Seok-Gi Kim, BioLab, Research center, Gwangyang-dong 1451-1, Anyang-city, Kyunggi-do 431-807, Korea
Tel: 82-31-426-1264
Fax: 82-31-426-1268
E-mail: s2k3kim@hanmail.net

본 연구는 호박이 저칼로리이지만 먹으면 포만감이 있고 배설을 촉진하며, 혈중 콜레스테롤과 체내에 지방이 쌓이지 않도록 하는 등 다이어트에 매우 좋은 야채로 알려져 있는 점에 근거(2,3)하여 비만인들을 위한 다이어트 식이 조성물을 개발하기 위해 호박추출물을 이용하였다. 호박추출물의 비만 억제에 관련된 활성 확인을 위하여 췌장 lipase 저해 실험과 3T3-L1 세포 분화 억제 실험을 행하였다.

췌장 lipase는 췌장에서 분비되어 triglyceride의 ester결합을 가수분해하는 효소로서 글리세롤과 지방산을 생성한다. 분해된 글리세롤과 지방산은 소장 세포에서 흡수되어 에너지원으로도 사용되지만 에너지원으로 못 쓰인 지방은 monoacylglycerol경로를 통해 다시 triacylglycerol로 합성되어 체내에 축적된다(8-10). 췌장 lipase 활성을 억제하면 triacylglycerol이 글리세롤과 지방산으로의 가수분해가 저해되어 소장 점막을 통해서 지방흡수가 억제되어 체내에 축적되는 양이 줄어들어 비만을 예방할 수 있다.

비만 연구에 많이 사용되고 있는 3T3-L1세포는 적절한 조건 하에서 배양하면 지방세포(adipose cell)로 분화하는 성질을 갖고 있다(11,12). 3T3-L1세포는 3T3으로부터 유래된 세포 주로서 그 생물학적 특성이 잘 밝혀져 있다. 분화과정은 새로운 지방합성 및 triglyceride 대사와 관련된 효소활성도의 급격한 증가를 수반하며, 이 과정에서 지방합성 및 지방분해 유도 호르몬에 대한 감수성 또한 증가되고, 지방합성과정에 관여하는 지방세포 특이 유전자의 발현 양이 증가하는 것으로 보고 되어있다(13). 또한 최근 한약재를 이용하여 3T3-L1 세포의 분화과정에 대한 연구도 보고되고 있다(14). 따라서 본 연구에서 3T3-L1세포는 호박추출물에 의해 분화가 억제하는지 확인하는데 사용하였다.

율무(*Coix lachryma-jobi* L. var. *Ma-yuen* Stapf)는 포아풀과에 속하는 1년초로서 벼과에 속하며 인도를 중심으로 한 동남아시아 지역이 원산지이며, 열대, 아열대, 온대남부에서 재배된다. 우리나라에서 생산되고 있는 율무 생산량의 85%가 경기도 연천군에서 재배 생산되고 있으며, 생산량 대부분이 율무쌀로 이용되고 있고 이 외에는 율무차 등으로 이용되고 있다. 율무는 다른 곡류에 비하여 고단백, 고지방의 곡류이고 전분의 대부분이 amylopectin으로 되어 있으며 섬유소 뿐만 아니라 Ca, Fe, Vit B₁, B₂ 등이 풍부하게 함유되어 있어 건강식품으로 인식되고 있다(15). 또한 율무는 우리나라에서 약용으로 지양강장제, 이노제, 건위제, 진통제, 소염제 및 폐결핵, 관절통 등에 효력이 있다고 알려져 있으며, 영양학적으로 혈장 콜레스테롤 및 중성지방 함량을 저하시키고 조직과 혈장간의 콜레스테롤 재분배를 담당하는 HDL-콜레스테롤 함량을 증가시켜 전체적인 지질대사에 관여한다(16). 이와 같이 영양학적으로 매우 우수한 율무는 식품으로서의 이용이 매우 제한적이었으며 이에 관한 연구가 매우 부족한 실정이다. 율무는 칼로리가 낮고 이노작용을 돕는 등 여러 가지 기능이 있어 민간요법으로 주로 당뇨병 환자에게 다이어트 식품으로 애용되고 있다. 율무의 탄수화물 흡수를 억제하는 물질을 분리 확인하기 위해서 탄수화물 분해에 이용되는 α -amylase의 활성억제 효과를 이용하였다.

Amylase는 녹말(아밀로오스 및 아밀로펙틴)이나 글리코겐과 같이 α -결합의 글루코오스로 되어 있는 다당에 작용한다.

α -amylase는 녹말이나 글리코겐 등의 글루코오스 사슬을 안쪽에서부터 규칙성 없이 절단하여 섭취된 다당류를 말토오스가 주성분이 되도록 분해하여 소화되기 쉽게 한다. 따라서 α -amylase 활성을 억제하면 섭취된 다당류의 가수분해를 저해하므로 과잉으로 섭취한 탄수화물의 체내 흡수를 줄여주어 비만을 예방할 수 있다.

본 연구의 목적은 비만개선을 위한 시도로 지방 흡수 억제 뿐 아니라 과잉의 탄수화물의 흡수억제가 함께 작용하는 방법을 통해 한국인에게 적합한 비만 개선책을 찾고자 호박과 율무를 이용하여 장내의 지방과 탄수화물 소화 효소 억제활성을 *in vitro* 상에서 확인하고자 하였고, 이를 첨가한 비만개선용 식이조성물이 체중증가를 억제시키는데 효과적인지 동물 실험을 통해 확인하는데 있다.

재료 및 방법

율수 추출물 준비

호박으로부터 율수를 이용하여 추출물을 얻기 위하여 호박 10 kg을 1×1 cm 크기로 절단하여 물 20 L 넣고 밀폐된 용기에서 95°C의 열수를 이용하여 4시간 추출하였다. 율수 추출 후 호박 찌꺼기는 여과를 통하여 제거하고 추출액은 동결 건조하여 분말화 하여 냉동보관하면서 표준 시료로 이용하였다.

율무로부터 율수를 이용하여 추출물을 얻기 위하여 율무 2 kg을 물 8 L 넣고 호박과 같은 조건으로 추출하여 분말화 하였다.

율수 추출물에서 지방 및 탄수화물 활성 저해 측정

호박율수에서 췌장 lipase 활성 저해 측정: Lipase 활성 측정은 triolein에서 유리되는 oleic acid의 방출율로 측정하였다. triolein(80 mg), lecithin(10 mg), taurocholic acid(5 mg)를 0.1 M NaCl이 첨가된 0.1 M N-tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfaonic acid(Tris, pH 7.0) 9 mL에 넣고 5분간 sonication하여 준비한 기질 0.15 mL에 0.1 mL 췌장 lipase(200 units/mL)와 호박 율수 추출물을 첨가하여 최종 volume이 0.4 mL 되게 하여 37°C에서 30분간 incubation하였다.

Incubation mixture에 3 mL의 chloroform : heptane(1 : 1, 2% methanol함유)용액을 가하여 10분간 shaking하면서 추출하고, mixture를 2000×g에서 20분간 원심 분리하여 상층액은 suction하여 버리고 하층의 organic phase에 1 mL copper reagent 첨가한 후 10분간 shaking하고 다시 2000×g에서 20분간 원심분리 하였다.

추출된 유리 지방산의 copper salts가 함유되어 있는 organic phase 0.5 mL에 0.1% bathocuprine과 0.05% 3-(2)-tert-butyl-4-hydroxy-anisol(BHA)을 녹인 chloroform용액을 0.5 mL 첨가 후, 이 혼합액을 720 nm에서 흡광도(EL-800, Bio-TEC instruments, Seoul)를 구하였다.

율무 율수에서 α -amylase 활성 저해 측정: α -amylase에 대한 활성 저해를 확인하기 위하여 요오드시험을 이용하여 탐색하였다. α -Amylase의 기질로서 수용성 전분을 50 mM 생리식염이 포함된 pH 6.9의 0.02 M phosphate buffer에 1%의 농도가 되도록 용해하여 0.5 mL 사용하였다. α -amylase의 농

Table 1. Composition of hebal extract and dietary supplement

Herbal extract		Dietary supplement	
Herb	Weight (g/mL)	Components	Weight (g/mL)
<i>Cucurbita moschate</i> ¹⁾	1.5	Herbal extract	24
<i>Coix lachryma-jobi var. mayuen</i> ²⁾	2	Souble dietary fiber	2.8
<i>Glycine max</i>	0.2	Garcinia cambosia	0.3
<i>Rahmannia glutinosa Liboschita</i>	0.8	Oligosaccharide	2.2
<i>Liriope plaryphylla</i>	1.5		
<i>Citrus unshiu MARKOVICH</i>	0.5		

¹⁾extract from pumkin.

²⁾extract from job's tear.

도는 기질 0.5 mL을 37°C에서 15분간 반응 시켰을 때 완전히 분해하는 1 unit을 사용하였다. 효소저해제의 활성을 정량하기 위하여 양성 대조군으로 기질, 50 mM phosphate buffer, α -amylase(1 unit), 증류수를 포함하며 반응용량은 2 mL로 37°C에서 15분간 반응시켰다. 효소 저해제의 검사는 기질, 50 mM phosphate buffer, α -amylase(1 unit), 울무 추출물과 증류수를 포함하며 반응용량은 2 mL로 37°C에서 15분간 반응시켰다. 반응이 종료된 후에는 발색반응을 위하여 요오드시약 1 mL를 가한 후 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

열수 추출물에서 지방 및 탄수화물 흡수 저해 물질 분리 정제

호박 열수에서 췌장 lipase 활성 저해 물질 분리 정제: 호박 열수 추출물과 ethyl acetate를 4:1의 비율로 혼합한 후 2시간 교반하여 추출하였다. Ethyl acetate 추출액은 evaporator (N-1000, EYELA, Japan)를 이용하여 50°C에서 감압 농축하였으며 농축 후 소량의 ethyl acetate에 녹여서 회수하였다. 회수된 활성농축액은 column chromatography를 이용하여 분리 정제하였다.

Silica gel(silica gel 60, Merck) 500 mL를 60×4 cm의 glass column에 충전 후 ethyl acetate로 평형 시킨 다음 소량의 ethyl acetate에 녹인 활성 sample을 loading후 ethyl acetate와 methanol을 이용하여 stepwise gradient method를 이용하여 elution 하였다. 각 분획은 농축한 후에 methanol에 녹인 다음 췌장 lipase 활성을 측정하였다. Lipase 활성 저해가 나온 분획은 농축하여 C-18(Linchromprep RP-18, Merck) column chromatography의 sample로 이용하였다.

C-18 Column chromatography는 소량의 활성 sample을 loading 후 증류수와 methanol을 이용하여 stepwise gradient로 elution 하였으며 활성 분획을 확인하였다.

울무 열수에서 α -amylase 활성 저해 물질 분리 정제: 울무 열수에서 α -amylase 활성 저해 물질 정제 과정은 유기용매를 chloroform을 사용하여 위의 호박열수와 동일한 방법으로 실시하였다.

호박 추출물의 3T3-L1세포의 분화 억제능 측정

세포 배양: 3T3-L1세포를 10% FBS(Fetal Bovine Serum, Sigma)를 함유한 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco)으로 배양하였으며, 2일 간격으로 세포가 confluency되기 전에 subconfluent monolayer로 유지하면서

PBS(Phosphate Buffered Saline, Gibco)용액으로 세포표면을 세척하고 0.25% trypsin 용액을 처리하여 탈착시킨 후 탈착된 세포는 10% FBS를 첨가한 DMEM배양액에 suspension한 뒤, 1:20의 split ratio로 계대 배양하면서 preadipocyte상태로 유지하였다.

3T3-L1세포의 분화능 측정: 배양중인 3T3-L1세포를 10% FBS를 함유한 DMEM배양액에 4×10^5 cells/well로 조정하여 6 well plate에 접종하였다. 세포가 포화상태에 도달한 후 배양액에 분화 유도물질인 0.25 μ M dexamethason(DEX), 0.5 mM 2-isobutylmethylanthine(MIX), 1 μ g/mL insulin을 첨가하여 2일간 배양하였다. 그 후에는 2일 마다 새로운 배양액으로 교환해주었다.

3T3-L1세포의 분화에 미치는 호박추출물의 효과를 관찰하기 위해서 호박추출물을 분화유도물질과 동시에 첨가하여 호박추출물이 3T3-L1세포의 분화에 미치는 영향을 조사하였다.

동물실험

비만 개선용 식이 혼합물의 조성: 이미 동물실험을 통해 지방과 탄수화물의 흡수를 억제하는 효과를 나타낸 것으로 보고된 천연물 조성과 본 연구를 통해 *in vitro* 상에서 지방과 탄수화물 소화 효소억제 활성이 확인된 호박과 울무를 추가하여 새로운 비만 개선용 식이혼합물의 조성을 완성하였다. 사용된 천연식물소재인 호박(*Cucurbita moschate*), 울무(*Coix lachryma-jobi var. mayuen*), 검정콩(*Glycine max*), 숙지황(*Rahmannia glutinosa Liboschita*), 맥문동(*Liriope plaryphylla*), 진피(*Citrus unshiu MARKOVICH*) 등은 경동시장(서울시 동대문구 제기동)에서 구입하여 이용하였다. 호박과 울무 등은 원료량의 3배량의 증류수를 넣고 97°C 정지상태에서 8시간동안 추출하여 시료 brix가 6.5가 될 때까지 추출하여 herbal extract로 사용하였으며, 후 첨가 원료로서 수용성 식이섬유, 가르시니아 캄보지아, 올리고당을 첨가하였다. 비만개선용 식이 혼합물의 최종 조성은 Table 1과 같으며, 내용량은 1포당 25 mL로 하였다.

실험식이 제조 및 사료 효율 측정: 실험 동물은 체중이 평균 408.14±3.09 g, 14주령의 수컷 흰쥐(Sprague Dawley (SD) rat)를 이용하였다. 실험식에 대한 비만개선용 식이조성물의 흡수 억제 효과를 확인하기 위해 흰쥐를 이용하여 실험식과 비만개선용 식이조성물을 병행 급여하여 체지방의 축적억제를 조사하였다. 실험 군은 정상식이군을 대조군으로 하고 정상식과 비만개선용 식이조성물, 고지방식이, 고지

Table 2. Composition of control and experimental diet

	Control diet (%)	High fat diet (%)
Casein	16	15
Sucrose	10	10
Corn starch	59	31
Lard (80% contained)	-	37
Corn oil	5	-
Cellulose	5	2
Vitamin mix	1	1
Mineral mix	3.5	3.5
Choline bitartrate	0.2	0.2
DL-Methionine	0.3	0.3
Energy (kcal/100 g)	385	557
Energy from fat (%)	11.7	59.7

방식이와 비만개선용 식이조성물의 3 group으로 1군당 8마리를 사용하였다. 모든군은 1주간 적응 후 8주간 급여하였다. 이들 실험동물은 대사cage에 2마리씩 수용하여 매일 일정 시간에 사양 관리를 하였다. 실험식은 AIN-93G에 근거하여 식이를 제조하였다(Table 2).

정상 식이는 전체 열량 중 지방으로부터 11.7%를 얻도록 하였으며, 고지방식이군은 지방으로부터 59.7%의 열량을 얻도록 하였다. 실험 기간 중 실험동물의 체중은 매주 1회 측정하였으며, 식이 섭취량은 매일 오전 사료 잔량을 측정하여 산출하였다. 사료 효율(Feed efficiency ratio: FER)은 8주간의 총 사료 섭취량에 대한 체중의 증가량의 비로써 다음 식에 따라 계산하였다.

$$FER (\%) = \text{Weight gain (g)} / \text{Food intake (g)}$$

안전성 실험: 수컷 C57BL/6 마우스와 SD rat를 1주일간 사육실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 8주간 비만개선용 식이조성물을 섭취시킨 후 섭취 전과 섭취 후의 사망률, 체중, 이상행동, 간 기능 지표(GOT; glutamic oxaloacetic transaminase, GPT; glutamic pyruvic transaminase) 및 혈액학적 분석을 행하였다.

통계처리

실험결과는 평균±표준 오차의 형태로 도시하였으며, 통계적 유의성 검증은 SPSS 9.0을 이용하여 unpaired t-test로 수행하였다.

결과 및 고찰

췌장 lipase 활성 최적 반응조건 결정

췌장 lipase 활성 최적 반응조건을 확인하기 위한 실험에서 췌장 lipase(pH 7.0)와 기질반응시 최적 농도는 Fig. 1과 같이 췌장 lipase가 기질을 0.15 mL로 고정시 37°C에서 30분간 반응하면 20 units/mL까지는 첨가량에 비례하여 증가하다가 이후 크게 증대되지 않았다.

췌장 lipase의 반응 농도가 20 units/mL에서 최적이므로 lipase 농도를 20 units/mL로 고정하고 기질의 최적 농도를 결정하기 위해 기질을 농도별로 실험한 결과 0.15 mL까지 증

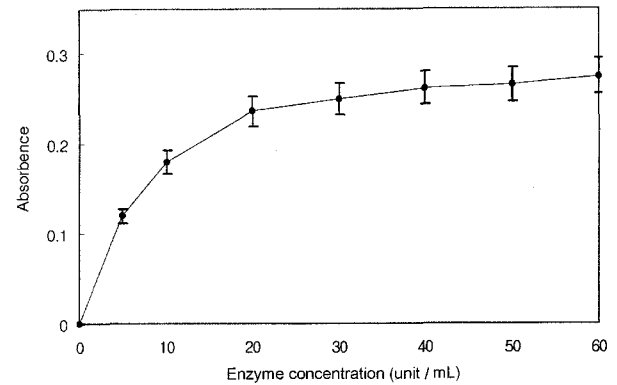


Fig. 1. Initial reaction of pancreatic lipase as affected by concentration.

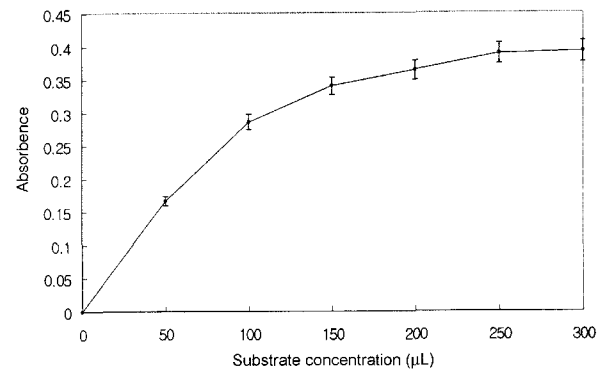


Fig. 2. Effects of substrate concentration on initial reaction rate of lipase.

가하다가 포화되는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 2).

본 연구에서는 위의 결과에 의해 췌장 lipase의 반응 농도를 20 units/mL과 기질농도 0.15 mL을 이용하여 췌장 lipase 활성 저해를 측정하였다.

열수 추출물에서 지방 및 탄수화물 활성 저해 물질 분리 정제

호박 열수 추출물에서 췌장 lipase 활성 저해 물질 분리 정제: 호박열수 추출물에서 췌장 lipase 활성 저해 물질 분리 정제하기 위해 췌장 lipase 활성 저해 물질을 호박의 열수 추출물에서 유기용매를 이용하여 추출하였다. 호박의 열수 추출물을 25% volume의 ethyl acetate를 이용하여 2시간 동안 교반하면서 추출하였으며 췌장 lipase 활성 저해를 확인하였다(Fig. 3). 호박에서 lipase 활성 저해 물질을 빠른 시간에 적은 유기용매량을 이용하여 다량으로 정제하기 위해 호박의 ethyl acetate 추출물을 농축하여 silica gel과 C-18 gel column chromatography를 이용하였으며, silica gel column chromatography를 이용하여 췌장 lipase 활성 저해 물질을 분리한 결과 호박의 췌장 lipase 활성 저해 물질은 20~50% methanol 분획에서 높게 나타남을 확인하였다(Fig. 4). Lipase 활성저해가 높게 나오는 분획을 모아서 농축 후 C-18 column chromatography를 이용하여 분리한 결과 20% methanol 분획에서 췌장 lipase 활성 저해가 높게 나타남을 확인하였다(Fig. 5).

울무 추출물에서 α-amylase 활성 저해 물질 분리 정제: 울

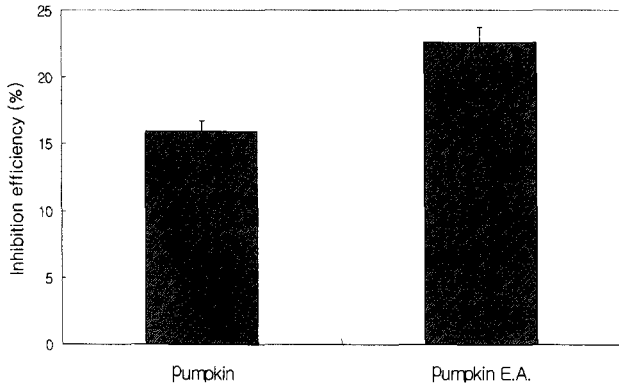


Fig. 3. Inhibitory effects of water and ethyl acetate extracts of pumpkin on pancreatic lipase activities.

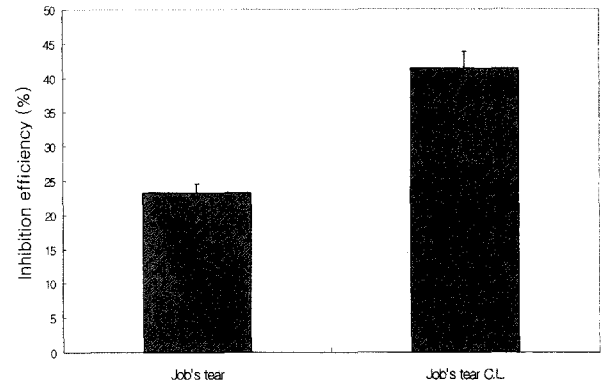


Fig. 6. Inhibitory effects of water and chloroform extracts of Job's tear on α -amylase activities.

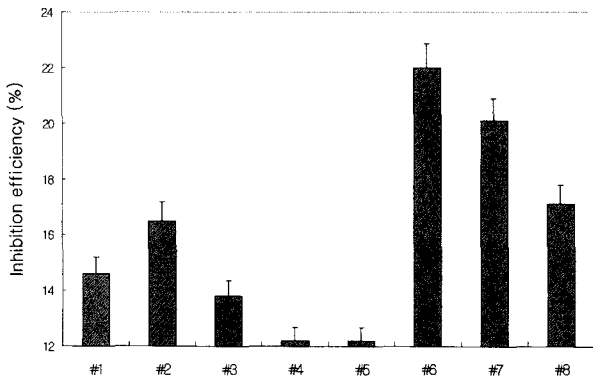


Fig. 4. Inhibitory effects of silica gel fractions of pumpkin extract on pancreatic lipase activities.

#1: 100%Ethyl Acetate(E.A.), #2: 99%E.A.+1% methanol, #3: 98%E.A.+2% methanol, #4: 95%E.A.+5% methanol, #5: 90%E.A.+10% methanol, #6: 80%E.A.+20% methanol, #7: 50%E.A.+50% methanol, #8: 100% methanol.

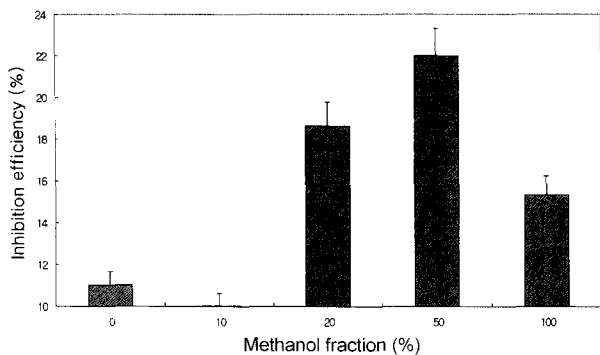


Fig. 5. Inhibitory effects of C18 gel fractions of pumpkin extract on pancreatic lipase activities.

무 추출물에서 탄수화물 흡수억제 물질을 추출하기 위해 25% volume의 chloroform을 이용하여 2시간 동안 교반하면서 추출하여 α -amylase 활성 저해를 확인하였다(Fig. 6). 율무의 chloroform 추출물을 농축하여 silica gel column chromatography를 통과후 α -amylase 활성 저해 물질을 20~50% methanol 분획에서 높게 나타남을 확인하였다(Fig. 7). α -amylase 활성 저해가 높게 나오는 분획을 모아서 농축 후 C-18

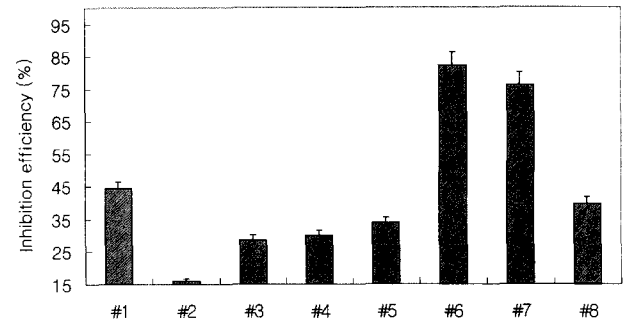


Fig. 7. Inhibitory effects of silica gel fractions of Job's tear extract on α -amylase activities.

#1: 100%chloroform(CL), #2: 99%CL+1% methanol, #3: 98%CL+2% methanol, #4: 95%CL+5% methanol, #5: 90%CL+10% methanol, #6: 80%CL+20% methanol, #7: 50%CL+50% methanol, #8: 100% methanol.

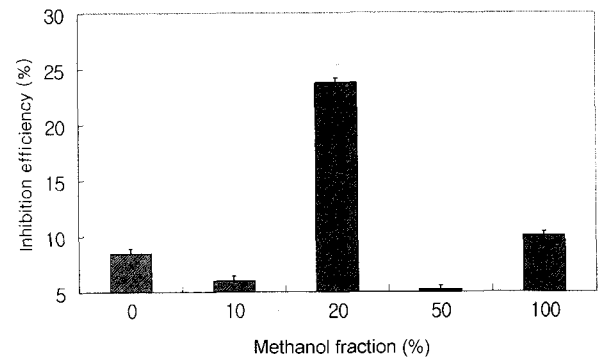


Fig. 8. Inhibitory effects of C18 gel fractions of Job's tear extract on α -amylase activities.

column chromatography를 이용하여 분리한 결과 20% methanol 분획에서 α -amylase 활성 저해가 높게 나타남을 확인하였다(Fig. 8).

호박 열수 추출물의 3T3-L1세포의 분화능 측정

3T3-L1 세포의 지방 세포로의 분화에 미치는 호박 열수 추출물의 효과를 알아보기 위해, 미 분화상태의 전지방(pre-adipocyte)세포를 4×10^5 cells/well로 조정하여 6 well plate에 접종하고 세포를 포화상태에 도달하게 한 후 초기 배양 2일

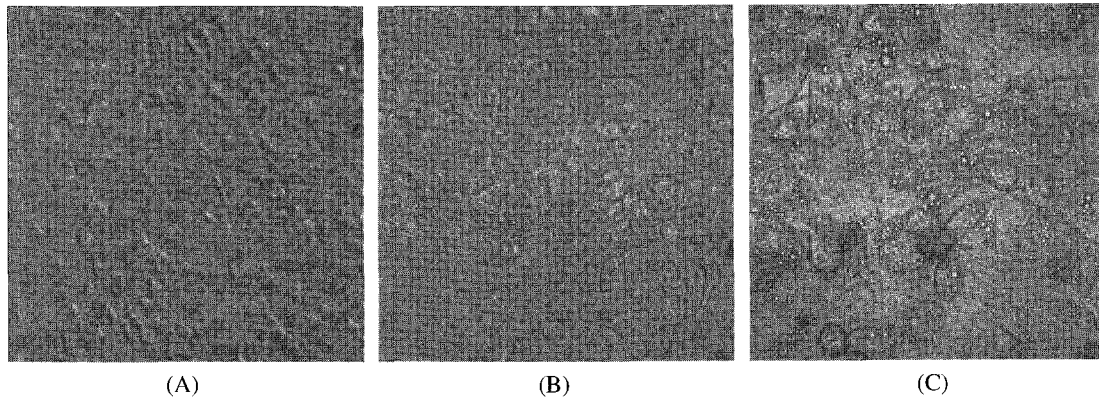


Fig. 9. Treatment for differentiation media (A) and differentiation media+pumpkin extract (120 µg/mL) in 3T3-L1 cell (B), control (C).

Table 3. Changes in weight, weight gain and feed efficiency ratio of rats fed experimental and control diet for 8 weeks

Group	weeks	0	4	8	Weight gain (%)	FER (%)
C ¹⁾		402.76 ± 3.06 ²⁾	465.81 ± 3.02	518.03 ± 3.02	28.62 ± 0.67	0.46 ± 0.06
C+D S ³⁾		406.40 ± 0.10	466.92 ± 2.26	509.21 ± 4.51	25.29 ± 1.08	0.41 ± 0.03
H ⁴⁾		407.14 ± 8.34	534.35 ± 4.12	587.24 ± 3.27	44.53 ± 2.58	1.39 ± 0.17
H+D S		416.32 ± 0.80	507.61 ± 5.20	545.43 ± 3.75	31.01 ± 0.65	0.60 ± 0.08

Notes: ¹⁾C: Control diet. ²⁾Values are mean ± SD. ³⁾D S: Dietary supplement. ⁴⁾H: High fat diet.

간 분화유도물질 혹은 분화유도물질과 호박 추출물을 동시에 첨가하여 지방세포로의 분화 정도를 control 세포와 비교 조사하였다.

지방 세포에 분화유도물질을 처리하지 않은 control 세포에 비해서 분화 유도물질만 처리한 경우 대부분의 세포가 지방 세포로의 분화가 일어나고, 세포내에 지방 축적이 일어남을 확인 할 수 있었다(Fig. 9 A, C). 3T3-L1에 분화 유도물질과 호박 추출물을 동시에 처리한 결과, 호박 추출물 120 µg/mL 처리 시 세포내에 지방축적이 일어나는 지방세포로의 분화가 약 5% 이하로 일어났다(Fig. 9 B).

동물 실험

실험 동물의 체중변화 및 사료 효율: 실험식이와 비만개선용 식이조성물을 섭취한 흰쥐의 8주간의 체중 변화와 사료 효율은 Table 3와 같으며, 실험 기간이 경과함에 따라 정상 식이군에서는 0주에 402.7 ± 3.06 g에서 8주에 518.0 ± 1.23 g으로 체중이 증가하는 양상을 보였고, 정상 식이와 비만개선용 식이조성물을 함께 섭취한 군은 406.4 ± 0.10 g에서 8주에 체중이 509.2 ± 4.51 g이었고, 고지방식이군과 고지방식이와 비만 개선용 식이조성물을 함께 섭취한 군은 각각 407.1 ± 8.34 g과 416.3 ± 0.80 g에서 8주에 587.2 ± 3.27 g과 545.4 ± 3.75 g으로 비만개선용 식이조성물을 함께 섭취한 군의 체중 증가율이 실험식이만 섭취한 군보다 감소하는 것으로 나타났다. 또한 전체 군에서 0주체의 체중 값을 기준으로 주간별 체중변화는 증가하는 양상이었으며, 고지방식을 섭취한 군은 정상 식이만을 섭취한 군보다 유의적인 체중 증가양상을 나타내어 비만이 유발되었음을 알 수 있었고, 고지방식이와 비만 개선용 식이조성물을 함께 섭취한 군의 체중 증가율이 고지방식이만을 섭취한 군 보다 13% 정도 감소되는 것으로 조

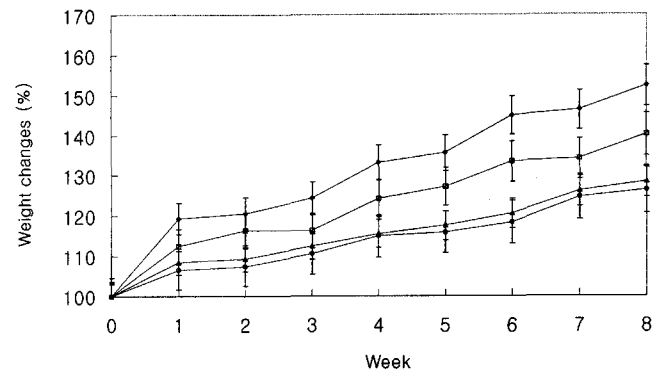


Fig. 10. Weight changes of rats fed experimental diets and dietary supplement.

-◆- High fat diet, -□- High fat diet + dietary supplement, -▲- Control diet, -○- Control diet + dietary supplement.

사되었다(Fig. 10). 사료 효율 역시 고지방식이군에서 더욱 높게 나타나 고지방식이가 식이성 비만의 요인이 됨을 알 수 있었다. 고지방식이군의 높은 사료효율이 비만 개선용 식이조성물을 섭취한 경우 현저히 감소한 것을 알 수 있었다.

안전성 실험: 비만개선용 식이조성물은 식품으로 사용이 허가된 천연식물소재를 중심으로 구성되어 있어 체내에서 높은 안전성을 확보할 것으로 추측되며, 이를 확인하기 위하여 마우스와 흰쥐를 대상으로 생존율, 체중, 혈액 생화학적 분석 및 일반 소견을 관찰하였다. C57BL/6 마우스에 인간 용량 또는 4배 인간용량의 비만개선용 식이조성물을 1일 1회 8주 이상 투여하여 혈액의 생화학적 분석에 의한 간 기능 지표(GOT, GPT)도 투여 전후에 변화 없이 기준치에 부합되었다(Table 4). 흰쥐에 인간 용량의 비만개선용 식이조성물을 1

Table 4. Effects of dietary supplement on serum GPT and GOT activity on C57BL/6 mouse

	GPT (Karmen Unit)	GOT (Karmen Unit)
Control	43.0 ± 2.5 ¹⁾	289 ± 23
Dietary supplement × 1	43.8 ± 2.3	282 ± 36
Dietary supplement × 4	42.0 ± 2.0	287 ± 28

¹⁾Values are mean ± SD.**Table 5. Effects of dietary supplement on blood biochemical index on rats**

	BUN ¹⁾	Chol ²⁾	Glu ³⁾	CK ⁴⁾	Crea ⁵⁾	TG ⁶⁾
Control	17.3 ± 0.3 ⁸⁾	52.0 ± 1.4	109 ± 5	525 ± 43	0.58 ± 0.02	53.9 ± 4.1
D S ⁷⁾	15.5 ± 0.4	21.9 ± 1.3	111 ± 3	316 ± 38	0.55 ± 0.04	45.9 ± 2.5

¹⁾BUN: Blood Urea-Nitrogen. ²⁾Chol: Cholesterol. ³⁾Glu: Blood glucose concentration.⁴⁾CK: Creatin kinase activity. ⁵⁾Crea: Creatin. ⁶⁾TG: Triglyceride.⁷⁾D S: Dietary supplement.⁸⁾Values are mean ± SD.

일 1회 8주 이상 투여해 본 결과 사망한 개체가 발생하지 아니하였고, 혈액학적 분석에서도 비만개선용 식이조성물의 투여는 일부 수치가 대조군에 비하여 변화를 보였으나 모두 기준치에 부합되는 것으로 나타났다(Table 5).

요 약

본 연구에서는 한국인에게 적합한 비만 개선책을 찾고자 지방 흡수억제 기전뿐만 아니라 과잉의 탄수화물 흡수억제가 함께 작용하는 방법으로 호박 열수에서 췌장lipase 활성 저해와 지방세포 분화억제에 대한 지방흡수 억제 물질과 울무 열수에서 α -amylase 활성 저해에 대한 탄수화물 흡수 억제 물질이 첨가된 비만 개선 식이조성물이 동물 실험 시 체중 증가가 억제됨을 확인하였다.

호박의 열수 추출물을 ethyl acetate로 추출하여 췌장 lipase 활성 저해를 확인하였으며, 호박의 ethyl acetate 추출물을 농축하여 silica gel column chromatography와 C-18 column chromatography를 이용하여 활성 저해 물질을 분리하였다. 또한 울무 열수는 chloroform으로 추출하여 호박 열수와 같은 방법으로 분리하여 α -amylase 활성 저해를 확인하였다.

3T3-L1 분화억제 확인 실험에서는 3T3-L1에 분화 유도물질만 처리한 경우 지방 세포로 분화되어 세포내에 지방축적이 일어났지만, 분화 유도물질과 호박 추출물을 동시처리 결과 지방 세포로의 분화가 호박 추출물 120 μ g/mL 처리 시 약 5% 이하로 일어났으며, 세포내에 지방축적도 거의 일어나지 않았다.

동물실험에서 고지방 식이와 비만개선용 식이조성물을 동시에 섭취한 군의 체중 증가가 고지방 식이만 섭취한 군보다 13% 정도 감소함을 확인할 수 있었고, 비만개선용 식이조성물을 8주간 경구 투여한 뒤 간 기능 지표와 혈액학적 지표 및 흰쥐의 행동학적 소견에서 차이를 나타내지 않아 비만개선용 식이조성물이 경구 투여에 의한 안전성이 있는 것으로 확인되었다.

이들 결과를 종합하면, 호박의 췌장 lipase 활성 저해물질과 울무의 α -amylase 활성 저해물질을 첨가한 비만개선용 식이조성물이 동물 실험에서 체중 증가를 효과적으로 억제할

수 있음을 관찰하였으며, 이는 비만 환자들의 다이어트 식이로 유용할 것으로 사료되었다.

문 헌

1. Sjostrom, L.V. Morbidity of severely obese subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 55: 508-513 (1992)
2. Sharma, B.R., Saimbhi, N.S., Bawa, A.S. and Shukla, F.C. Varietal variation in the chemical composition of summer squash. *Indian J. Agri. Sci.* 49: 30-34 (1979)
3. Burton, G.W. and Ingold, G.W. An unusual type of lipid antioxidant. *Science* 224: 56-63 (1984)
4. Cho, G.S. Chemical compositions of the green and ripened pumpkin (*Cucurbita moschata Duch.*). *Korean J. Food Sci. Technol.* 29: 657-662 (1997)
5. Park, Y.K., Cha, H.S., Park, M.W., Kang, Y.H. and Seong, H.M. Chemical composition in different parts of pumpkin. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 26: 639-646 (1997)
6. Nam, H.K. and Koh, D.H. Fatty acid composition of Korean pumpkins. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 7: 95-99 (1994)
7. Jeong, Y.J. Monitoring on extraction conditions of old pumpkin using response surface methodology. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 30: 466-470 (2001)
8. Williams, J.A. and Goldfine, I.D. The insulin-pancreatic acinar axis. *Diabetes* 34: 980-985 (1985)
9. Park, J.H. and Lee, Y.C. Studies on the immobilization of lipase by adsorption method. *Korean J. Food Sci. Technol.* 17: 75-80 (1985)
10. Kim, C.J., Cheigh, H.S. and Byun, S.M. A simple and modified photometric method for measuring lipase activity. *Korean J. Food Sci. Technol.* 16: 251-253 (1984)
11. Green, H. and Kehinde, O. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* 3: 127-133 (1974)
12. Green, H. and Kehinde, O. An established preadipose cell line and its differentiation in culture II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* 5: 19-27 (1976)
13. Coleman, R.A., Reed, B.C., Mackall, J.C., Student, A.K., Lane, M.D. and Bell, R.M. Selective changes in microsomal enzymes of triglycerol, phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine biosynthesis during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J. Biol. Chem.* 253: 7256-7261 (1978)
14. Kim, S.B., KO, B.H. and Song, I.B. The effects of proliferation and differentiation on adipocyte(3T3-L1) by prescriptions and herbs of taeyang-in and taem-in. *J. Const. Med.* 10: 533-564 (1998)
15. Yoon, W.B., Kim, B.Y. and Shin, D.H. Viscosity and dynamic

- rheological properties of job's-tears as a function of moisture content. Korean J. Food Sci. Technol. 29: 932-938, 1997
16. Lee, J.E., Suh, M.H., Lee, H.G. and Yang, C.B. Characteristics of Job's tear gruel by various mixing ratio, particle size and soaking

time of Job's tear and rice flour. Korean J. Soc. Food Cookery Sci. 18: 65-71 (2002)

(2003년 5월 20일 접수; 2003년 6월 3일 채택)