

키토산 올리고당이 당뇨성 흰쥐의 혈당과 혈중 지질성분 및 효소활성에 미치는 영향

†김 한 수 · 성 종 환
부산대학교 식품공학과

Effects of Chitosan Oligosaccharide Supplementation on Blood Glucose, Lipid Components and Enzyme Activities in Hyperglycemic Rats

†Han-Soo Kim and Jong-Hwan Seong

Dept. of Food Science & Technology, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea

Abstract

The principal objective of this study was to assess the effects of chitosan oligosaccharide supplementation on the improvement of blood glucose, lipid components and enzyme activities in the serum of streptozotocin(STZ, 55 mg/kg B.W., I.P. injection)-induced hyperglycemic rats fed on experimental diets for 5 weeks. The concentrations of blood glucose, total cholesterol, atherosclerotic index, LDL, LDL-cholesterol, free cholesterol, cholesteryl ester ratio, triglycerides(TG) and phospholipids(PL) in serum were remarkably higher in the hyperglycemic group(group BSW) and STZ(I.P.)+chitosan oligosaccharide supplementation group(group ECW) than those in the control group(group BW, basal diet+water). However the concentrations of blood glucose, total cholesterol, atherosclerotic index, LDL, LDL-cholesterol, free cholesterol, cholesteryl ester ratio, TG and PL in serum were lower in the ECW group than in the BSW group, whereas the ratio of HDL-cholesterol concentration to total cholesterol and HDL-cholesterol concentration in the ECW group were higher than in the BSW group. The activities of alkaline phosphatase(ALP) and aminotransferase(AST, ALT) in serum were lower in the ECW group than in the hyperglycemic BSW group. The results shown above suggested that chitosan oligosaccharide supplementation effectively improves blood glucose, lipid composition and enzyme activities in the sera of STZ-induced hyperglycemic rats.

Key words: chitosan oligosaccharide, blood glucose, lipid components, enzyme activity, hyperglycemia.

서 론

당뇨병(diabetes mellitus)은 자가 면역 기전에 의해서 췌장에 있는 Langerhans 섬의 β -세포가 파괴되어 인슐린의 생리적 기능이 불균형을 이루며, 인슐린과 글루카곤의 비정상적 분비 상태로 생체 내 대사조절기능 장애와 모세혈관의 상피 세포막이 두꺼워져 심장순환기계 질환(coronary heart disease, CHD) 등 만성 대사성 증후군이 발생하는 고혈당이 특징인 질환이다^{1~3}). 생활 습관의 변화와 함께 고단백, 고지방 식

이 등 동물성 식품의 섭취가 증가되어 고혈압, 동맥경화증(atherosclerosis), 관상동맥성 심장질환 및 고지혈증 등 CHD와 더불어 치명적인 합병증이 문제시 되고 있는 실정이다^{4,5}). 심장순환기계 질환은 당뇨병 환자에 있어서 중요한 합병증으로, CHD 발생의 위험 인자는 이상지질혈증으로 알려져 있다^{6,7}). 당뇨병은 일반적으로 인슐린 의존형인 제1형 당뇨병과 인슐린 비의존형인 제2형 당뇨병으로 분류한다. 제1형은 인슐린이 절대적으로 부족한 상태로 당뇨병성 케톤산증이 발생하여 혼수에 빠지게 되는 질환으로 유전적 요인, 바이러스

† Corresponding author: Han-Soo Kim, Dept. of Food Science & Technology, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea. Tel: +82-55-350-5351, Fax: +82-55-350-5359, E-mail: kimhs777@pusan.ac.kr

감염 및 자가면역기전 등이 상호작용하여 췌장의 β -세포가 파괴되어 발생하는 질환이며, 제2형 당뇨병은 당뇨병 환자의 대부분을 차지하고, 인슐린 생산량은 혈당 수준의 상대적 부족에 의한 질환으로 유전적 감수성, 비만증, 고혈압 등과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다^{8,9)}. 일반적으로 당뇨병의 유병률은 여성에서 높게 나타나며, 여성의 성 호르몬은 인슐린 감수성에 영향을 주는 유전적인 소인의 하나인 것으로 밝혀져 있다^{10,11)}. 당뇨병의 예방 및 치료 효과의 개선을 위해선 혈당 및 혈중 지질 농도를 적절한 수준으로 낮추고 식사요법과 더불어 적당한 운동과 함께 합병증 등을 치료하는 약물요법을 병행하는 것이 바람직한 것으로 보고되어 있다^{12~14)}. 키토산의 원료가 되는 키틴은 N-아세틸-D-글루코사민이 β -1,4 결합한 다당류로 게, 새우 등의 갑각류의 외골격과 조류나 균류의 세포벽에 함유되어 있는 천연 고분자 물질로 D-글루코오스가 β -1,4 결합한 셀룰로오스와 유사한 구조를 가지고 있으며, 자연계에 풍부하게 존재하고 있다^{15~17)}. 전 세계적으로 키틴의 원료인 갑각류의 폐기물 발생량은 매년 증가되고 있으며¹⁸⁾, 갑각류의 종류와 계절에 따라 그 성분 조성은 다르게 나타나는 것으로 알려져 있다¹⁹⁾. 키틴을 탈아세틸화시켜 제조한 고품질의 키토산 또는 그 유도 물질들은 금속 이온과 배위 결합에 의한 착염을 형성하여 납, 철, 카드뮴, 아연, 수은 등의 중금속 흡착작용^{20,21)}을 가지며, 사이토크롬 P450 1A1 효소활성 억제 작용에 의한 유방암 유발 억제²²⁾ 등 면역증강 및 항암^{23,24)}, 항산화 작용²⁵⁾, 체내 지질성분 감소^{26~28)} 등이 있는 것으로 보고되어 지고 있다. 따라서 본 실험에서는 붉은 대게 껍질을 탈아세틸화시켜 제조된 저분자 키토산 올리고당 추출물의 섭취가 당뇨병 흰쥐의 혈당 저하 및 지질 개선 효과, 당질대사 이상 등에 의해서 발병되는 생활습관병 예방과 개선 효과에 미치는 영향을 비교한 후, 바이오헬스 기능성 소재 등으로 활용 방안을 검토하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

1. 키토산 올리고당 제조용 시료

경상북도 영덕군에서 붉은 대게(*Chinonectes japonicus*) 껍질을 수집하여 이물질을 제거하고, 수세한 후 40°C에서 12시간 열풍 건조시켜 분쇄한 다음 키토산 올리고당 제조용 시료로 사용하였다.

2. 키틴, 키토산 및 키토산 올리고당의 제조

Muzzarelli의 방법^{16,29)}에 준하여 분쇄한 시료에 10배 중량의 2.0 N HCl을 서서히 가하여 탄산가스가 더 이상 발생하지 않았을 때부터 실온에서 48시간 방치하여 최분을 제거한 후, 수세액이 중성에 달할 때까지 충분히 수세하였다. 이어 단백

질을 제거하기 위하여 1 N 수산화나트륨 용액을 시료 중량의 10배로 가하고 95~100°C에서 48시간 동안 처리하였다. 이를 중성이 될 때까지 수세한 후 40°C에서 열풍 건조하여 키틴을 얻었다. 제조된 키틴에 47% 수산화나트륨 용액을 10배 가하고 100~110°C에서 2시간 처리하여 탈아세틸화한 후 충분히 수세하고 열풍 건조시켜 키토산을 제조하였다. 이렇게 얻은 키토산 1 M에 대하여 물 200~2,000 ml, 초산 1~4 M, 황산 0.01~0.1 M을 혼합한 혼합액에 과산화수소 1~7 M을 첨가하여 가수분해한 후, 원심분리하여 잔사를 제거하고 한외여과막(ultrafiltration; Sigma, St. Louis, USA)을 이용하여 잔사와 불순물을 제거하였으며, 탈염과 농축을 위하여 다시 nano membrane filtration(Sigma, St. Louis, USA)을 사용하여 여과한 후, 동결 건조하여 최종적으로 키토산 올리고당을 제조하였다.

3. 키토산 올리고당의 분자량 분포 분석

표준시약(polyethylene glycol kit, type PEG-10; Sigma, St. Louis, USA) 및 제조한 키토산 올리고당 시료 0.01 g을 정칭하여 증류수(DW), 아세토니트릴(ACN) 및 트리플루오로초산(TFA)의 혼합 용매(DW:ACN:TFA=55:45:0.1, v/v/v)에 용해시켜 실온에서 하룻밤 방치한 후, 0.45 μ m membrane filter(Sigma, St. Louis, USA)로 여과한 것을 표준 및 시험용액으로 사용하였다. 표준시약을 HPLC에 주입하여 검량선을 작성한 다음, 검체에 대하여 ultrahydrogelTM 120(7.8×300 mm) column을 사용하여 size exclusion chromatography(SEC) 방법에 따라 시료의 분자량 분포를 GPC system Water 510(Waters Co, Ltd, Boston, Massachusetts, USA)을 이용하여 분석하였다.

4. 실험 동물

평균 체중이 60±5 g인 4주령 된 Sprague Dawley계 수컷 흰쥐(충북 음성군 Dae Han Biolink Co, Ltd, Korea)를 구입하여, 5% 옥수수유(Sindongbang, Co, Ltd, Seoul, Korea)를 함유하는 기초 식이를 9일간 예비사육하여 적응시킨 후 난괴법(Randomized Complete Block Design)에 의해서 6마리씩 3군으로 metabolic cage(JD-C-71, Jeongdo, Co, Ltd, Korea)에 나누어 5주간 실험 사육하였다. 예비사육 및 실험사육 기간 중 물은 자유로이 섭취시켰으며, 사육실의 온도는 20±1°C, 습도는 50±10%로 유지시켰고, 명암은 12시간(07:00~19:00) 주기로 조명하였다.

5. 식이 및 실험군

식이조성 및 실험군은 Table 1과 같다. 기본 식이에 물만 섭취시킨 대조군(BW군), streptozotocin(STZ, 55 mg/kg BW, IP, injection)을 0.01 M 구연산 완충용액(pH 4.5)에 용해한 후 복강 내 주사하여 실험사육시킨 실험군에 물 급여군(BSW군)

Table 1. Experimental groups and compositions of basal and experimental diet (g/kg diet)

Ingredient	Basal diet	Streptozotocin (STZ) (I.P.) ¹⁾	Experimental diet(STZ) (I.P.)
Casein	200	200	200
DL-methionine	3	3	3
Corn starch	150	150	150
Sucrose	500	500	400
Cellulose powder	50	50	50
Mineral mixture ²⁾	35	35	35
Vitamin mixture ³⁾	10	10	10
Choline bitartrate	2	2	2
Corn oil	50	50	50
Chitosan oligosaccharide	-	-	100

Group BW: Basal diet+Water(control group), BSW: Basal diet+STZ+Water, ECW: Experimental diet(STZ)+Chitosan oligosaccharide 10%+Water,

¹⁾ IP: intraperitoneal injection[STZ 55 mg/kg BW: 0.01 M citrate buffer sol'n (pH 4.6)],

²⁾ AIN-76TM mineral mixture contained(in g/kg mixture) calcium phosphate, dibasic, 500.0: sodium chloride, 74.0: potassium citrate, monohydrate, 220.0: potassium sulfate, 52.0: magnesium oxide, 24.0: manganous carbonate, 3.5: ferric citrate, 6.0: zinc carbonate, 1.6: cupric carbonate, 0.3: potassium iodate, 0.01: sodium selenite, 0.01: chromium potassium sulfate, 0.55: sucrose, 118.03,

³⁾ AIN-76TM vitamin mixture contained(in g/kg mixture) thiamine HCl, 0.6: riboflavin, 0.6: pyridoxine HCl, 0.7: niacin, 3.0: D-calcium pantothenate, 1.6: folic acid, 0.2: biotin, 0.02: vitamin B₁₂, 1.0: vitamin A palmitate, 0.8: vitamin E acetate, 10.0: vitamin D₃, 0.25: menadione sodium bisulfite, 0.15: sucrose, 981.08.

과 ECW군은 STZ을 복강 주사한 실험군에 키토산 올리고당 10%(100 g/kg diet)를 첨가 조제하였으며, 실험 전 기간 동안 물은 자유로이 섭취시켰다.

6. 실험동물의 처리

실험 사육 5주간의 최종일에는 7시간 절식시킨 후 에테르 마취 하에 심장채혈법으로 채혈하였으며, 혈액은 4℃에서 약 1시간 정도 방치한 후 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 취하여 실험에 사용하였다. 실험 사육 시작과 최종일에 체중을 측정하였으며, 사료 섭취량은 매일 사료 잔량을 측정하여 식이 효율을 산출하였다. 간 및 뇌와 심장, 폐장, 신장, 비장 등은 적출하여 0.9% 생리식염수로 씻은 다음 여과지로 물기를 제거하고 중량을 측정 후 체중에 대한 상대 중량비(%)를 구하였다.

7. 혈당 농도의 정량

혈당 농도는 혈당 측정용 kit 시약(GLZyme, Eiken, Tokyo, Japan)으로 측정하였다. 즉, 혈청 0.02 ml에 효소 시액 3.0 ml를 가하여 37℃에서 15분간 가온한 후, 500 nm에서 흡광도를 측정하여 산출하였다.

8. 혈청 중의 지질성분 농도 및 효소 활성 측정

1) 지질성분의 농도

혈청 중의 총 콜레스테롤 농도는 총 콜레스테롤 측정용 kit 시약(Cholestezyme-V, Eiken, Tokyo, Japan), HDL(high density lipoprotein)-콜레스테롤 농도는 HDL-콜레스테롤 측정용 kit 시약(HDL-C555, Eiken, Tokyo, Japan), 혈청 LDL(low density lipoprotein)의 농도는 LDL 측정용 kit 시약(β -lipoprotein C-Test, Wako, Osaka, Japan)으로 측정하였으며, LDL-콜레스테롤 농도는 LDL 농도에 0.35를 곱한 값으로 표시하였다. 유리 콜레스테롤 농도는 유리 콜레스테롤 측정용 kit 시약(Free-cholestezyme-V555, Eiken, Tokyo, Japan)으로 측정하였으며, 콜레스테롤 에스테르 농도는 총 콜레스테롤 농도에서 유리 콜레스테롤 농도를 뺀 평균값으로 표시하였다. 혈청 중의 중성지질 농도는 중성지질 측정용 kit 시약(Triglyzime-V, Eiken, Tokyo, Japan)으로 측정하였으며, 인지질 농도는 인지질 측정용 kit 시약(PLzyme, Eiken, Tokyo, Japan)으로 측정하였다.

2) 효소활성의 측정

혈청 중 alkaline phosphatase(ALP, EC 3.1.3.1) 활성은 혈청 ALP 측정용 kit 시약(NEW-K-PHOS, Eiken, Tokyo, Japan)을 사용하여 측정하였으며, 혈청 1 ml당 Unit로 표시하였다. Amino-transferase의 활성은 Reitman과 Frankel의 방법³⁰⁾에 준해 조제된 kit 시약(혈청 transaminase 측정시약, Eiken, Tokyo, Japan)을 사용하여 혈청 중 aspartate aminotransferase(AST, EC 2.6.1.1) 및 alanine aminotransferase(ALT, EC 2.6.1.2) 활성을 측정하였으며, 단위는 혈청 1 ml당 Unit로 표시하였다.

9. 통계 처리

분석 결과의 통계 처리는 실험군 당 평균치와 표준편차를 계산하였고, 군간의 차이는 One-way analysis of variance(ANOVA, ver. 12.0) 분석 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test에 의하여 각 실험군 간의 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 키토산 올리고당의 분자량 분포

붉은 대게(*Chinocetes japonicus*) 껍질을 이용하여 키토산

Table 2. Molecular weight distribution of chitosan oligosaccharide treated by enzyme

Range of molecular weight(MW)	Distribution ratio(%)
More than 800	1.9
700~800	22.6
600~700	74.4
500~600	1.1
Less than 500	0
Average molecular weight	674

을 제조한 다음, 가수분해하여 저분자화한 수용성 키토산 올리고당의 분자량 분포를 측정하는 것은 Table 2와 같다. 분자량의 범위는 대부분 600~800 정도의 분포를 보였으며, 분자량 700~800은 22.6%, 분자량 600~700의 분포가 74.4%로 분석되었고, 평균 분자량은 674로 나타났다. 최근, 당질이 갖는 유용한 기능이나 생리적 특성이 밝혀짐에 따라 수개의 단당이 배당체 결합된 수용성의 결정성 물질의 올리고당에 대한 관심이 높아지고 있으며, 키토산을 저분자화하여 수용성인 저분자 키토산 또는 키토산 올리고머가 생리적 활용에 더욱 효능이 있는 것으로 보고되어 있다^{25,31}).

2. 체중 증가량 및 식이효율

기본 식이에 물만을 급여한 대조군(BW), streptozotocin(STZ)

Table 3. Body weight gain, food intake and FER of rats fed the experimental diets for 5 weeks

Group*	Body weight gain(g)	Food intake(g)	FER**
BW	138.5±14.2 ^{a***}	456.0±16.7 ^a	0.30
BSW	117.7±13.8 ^a	447.4±17.5 ^a	0.26
ECW	132.9±13.1 ^a	449.6±14.2 ^a	0.29

* Group BW: Basal diet+Water(control group), BSW: Basal diet+STZ+Water, ECW: Experimental diet(STZ)+Chitosan oligosaccharide 10%+Water, ** FER: food efficiency ratio, *** Mean±SD(n=6). Means in the same column not sharing common superscript letters are significantly different($p<0.05$).

Table 4. Weights of liver, brain, heart, lung, kidney and spleen of rats fed the experimental diets for 5 weeks (g/100 g BW)

Group*	Liver	Brain	Heart	Lung	Kidney	Spleen
BW	3.12±0.06 ^{b***}	0.51±0.01 ^a	0.37±0.01 ^a	0.55±0.01 ^a	0.60±0.02 ^a	0.25±0.01 ^a
BSW	2.79±0.10 ^a	0.51±0.01 ^a	0.37±0.01 ^a	0.53±0.02 ^a	0.66±0.02 ^b	0.24±0.01 ^a
ECW	3.27±0.13 ^b	0.54±0.03 ^a	0.40±0.02 ^a	0.53±0.01 ^a	0.66±0.01 ^b	0.23±0.01 ^a

* Group BW: Basal diet+Water(control group), BSW: Basal diet+STZ+Water, ECW: Experimental diet(STZ)+Chitosan oligosaccharide 10%+Water, ** Mean±SD(n=6). Means in the same column not sharing common superscript letters are significantly different($p<0.05$).

을 복강 주사(STZ 55 mg/kg body weight)하여 당뇨를 유도시킨 BSW군과 당뇨를 유발하여 기본 식이에 키토산 올리고당 10%를 첨가한 ECW군에 있어서 5주간 실험 사육한 흰쥐의 체중 증가량 및 식이 섭취량, 식이 효율은 Table 3과 같다. 체중 증가량은 BW군(138.5 g)에 비하여 당뇨 유발군인 BSW군이 117.7 g으로 낮았으며, 키토산 올리고당 10%를 첨가한 군(ECW군)이 132.9 g으로 나타났다. BSW군의 체중 감소는 당뇨 유발과 식이 섭취량에 따른 현상으로 사료되며, 유의적인 변화를 보이지 않았다. 식이 섭취량 및 식이 효율은 BW군에 비해 BSW군과 ECW군이 약간 낮았으나, 세 군간의 유의한 차이는 없었다. 이는 STZ으로 유도된 당뇨성 흰쥐의 경우 체지방 및 단백을 분해시키는 퇴행성 대사로 인하여 체중과 식이 섭취량은 유의한 차이는 없었으나 감소되는 것으로 생각된다^{32,33}).

3. 간장 및 뇌, 심장, 폐, 신장, 비장의 중량

Table 4는 실험사육 5주간의 최종일 7시간 단식시킨 후 측정된 각 장기 및 조직의 중량을 나타낸 것으로, 간장의 중량은 대조군에 비해 STZ를 복강 주사한 BSW군에서 유의하게 ($p<0.05$) 낮게 나타났으며, 기본 식이(BW군)와 키토산 올리고당 급여군인 ECW군간은 유의한 차이가 없었다. 뇌 및 심장, 폐, 비장의 중량은 전 실험군 간에 별다른 차이는 보이지 않는 것으로 나타났다. 신장의 중량은 기본 식이군인 BW군에 비하여 STZ 복강 주사한 BSW군과 ECW군에서 높게 나타났는데, 이는 당뇨 유도에 따른 신장 기능의 장애로 추정되며, 시판용 키토산 및 가시발 새우 껍질 키토산을 3주간 흰쥐에게 급여하였을 때 간장의 중량이 낮게 나타난다고 보고된 바 있다³⁴).

4. 혈당 농도

키토산 올리고당의 당뇨성 흰쥐에 대한 혈당 농도에 미치는 영향을 Table 5에 나타내었다. Basal diet에 물을 투여한 대조군 쥐의 경우 혈당량은 118.6 mg/dl이었고, STZ을 투여하여 당뇨를 유발한 쥐의 혈당량은 약 368.4 mg/dl이었다. 한편, STZ에 의하여 당뇨를 유발한 쥐에 키토산 올리고당을 투여

Table 5. Effects of chitosan oligosaccharide on concentrations of glucose in blood of STZ-induced hyperglycemic rats fed the experimental diets for 5 weeks

Group*	Blood glucose(mg/dl)
BW	118.6±5.2 ^{a**}
BSW	368.4±7.4 ^c
ECW	309.5±6.9 ^b

* Group BW: Basal diet+Water(control group), BSW: Basal diet+STZ+Water, ECW: Experimental diet(STZ)+Chitosan oligosaccharide 10%+Water, ** Mean±SD(n=6). Means in the same column not sharing common superscript letters are significantly different($p<0.05$).

한 결과, 혈당량은 약 309.5 mg/dl인 결과를 보이므로 키토산 올리고당의 투여는 STZ에 의하여 유발되는 당뇨의 증상을 완화시키는 결과를 얻었다. 이상의 결과는 키토산 올리고당이 STZ 복강 주사 후 당뇨를 유발시킨 흰쥐의 체내 혈당 조절계에 영향을 준다는 보고³⁵⁾와 사람이 있어서 키토산 올리고당을 섭취하였을 때 혈당 농도가 유의하게 감소된다고 한 보고¹⁰⁾와 일치하는 경향을 보였다.

5. 혈청 중의 지질성분 농도

1) 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 농도 및 동맥경화지수
혈청 중의 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 농도와 그 비율 및 동맥경화지수는 Table 6과 같다.

혈청 중 총 콜레스테롤 농도는 기본 식이만 급여한 BW군(86.4 mg/dl)에 비해 전 실험군에서 높게 나타났지만, STZ(55 mg/kg BW, IP. injection)으로 유도된 당뇨성 흰쥐 실험군(BSW

Table 6. Effects of chitosan oligosaccharide on concentrations of total cholesterol, HDL-cholesterol, ratio of HDL-cholesterol to total cholesterol and atherosclerotic index in serum of STZ-induced hyperglycemic rats fed the experimental diets for 5 weeks (mg/dl)

Group*	Total cholesterol(A)	HDL-cholesterol(B)	(B)/(A)×100(%)	A.I.**
BW	84.6±3.2 ^{a***}	23.8±1.2 ^a	28.1	2.5
BSW	109.2±3.3 ^c	21.9±0.9 ^a	20.0	4.0
ECW	102.4±3.1 ^b	22.8±1.5 ^a	22.3	3.5

* Group BW: Basal diet+Water(control group), BSW: Basal diet+STZ+Water, ECW: Experimental diet(STZ)+Chitosan oligosaccharide 10%+Water, ** Atherosclerotic index: (Total chol-HDL-chol)/HDL-chol, *** Mean±SD(n=6), Means in the same column not sharing common superscript letters are significantly different($p<0.05$).

군)의 109.2 mg/dl에 비하여 키토산 올리고당을 급여한 ECW군이 102.4 mg/dl로 혈청 중의 총 콜레스테롤 농도가 유의적으로 감소되었다. 한편, HDL-콜레스테롤 농도는 BSW군(21.9 mg/dl)에 비해 키토산 올리고당을 섭취함으로써 ECW군이 22.8 mg/dl로 증가를 보였다. 총 콜레스테롤에 대한 HDL-콜레스테롤 농도 비는 BSW군(20.0%)보다 키토산 올리고당 급여군인 ECW군(22.3%)에서 높은 비율을 나타내었고, 동맥경화지수는 BSW군(4.0)에 비해 ECW군(3.5)이 낮게 나타났으나, 대조군인 BW군(2.5)의 수준에는 미치지 못하였다. 당뇨병 환자의 지질대사 장애에 따라 총 콜레스테롤 농도는 증가하고, HDL-콜레스테롤 농도는 저하되며^{36,37)}, 당뇨성 흰쥐에 있어서 당뇨가 진행될수록 혈중 VLDL(very low density lipoprotein) 제거율이 감소되어 혈액 중의 지질 성분이 증가되는 것으로 알려져 있다^{38,39)}. 따라서 본 실험 결과, 당뇨성 흰쥐에 대한 키토산 올리고당의 섭취에 의한 혈청 총 콜레스테롤 농도의 저하, HDL-콜레스테롤 농도의 상승 및 동맥경화지수의 저하 등으로 미루어 보아 혈청 지질 개선 효과가 있는 것으로 추정된다.

2) Low Density Lipoprotein(LDL) 및 LDL-콜레스테롤 농도

혈청 중의 LDL 및 LDL-콜레스테롤 농도는 Table 7에서와 같이, LDL 농도는 STZ 단독 급여군(BSW군)의 187.1 mg/dl보다 키토산 올리고당 섭취군인 ECW군(164.3 mg/dl)에서 유의적인 감소를 보였으나, BW군의 124.6 mg/dl의 수준에는 미치지 못하였다. LDL-콜레스테롤 농도는 각 군간에 있어서 LDL 농도와 같은 경향을 나타내었다. LDL-콜레스테롤은 콜레스테롤의 주된 운반형으로 동맥벽이나 말초조직에 콜레스테롤을 운반, 축적시킴으로써 동맥경화를 촉진시키는 인자라고 보고된 바 있다⁴⁰⁾. 따라서 키토산 올리고당을 섭취시킴으로써 LDL-콜레스테롤 농도를 저하시킨 것으로 미루어 보아, 당뇨병의 합병증으로 유발될 수 있는 동맥경화 등의 예방 및 개선에 효과가 있을 것으로 사료된다.

3) 유리 콜레스테롤 및 콜레스테롤 에스테르, 콜레스테롤 에스테르 비

혈청 중의 유리 콜레스테롤, 콜레스테롤 에스테르 및 총 콜레스테롤에 대한 콜레스테롤 에스테르의 비는 Table 7과 같다. 유리 콜레스테롤과 콜레스테롤 에스테르는 당뇨성 실험 동물군(BSW군)에 비해 키토산 올리고당 섭취군인 ECW군에서 낮은 경향을 보였고, 콜레스테롤 에스테르 비 또한, 키토산 올리고당 급여군(ECW군)에서 낮은 비율의 범위를 나타내었다. 콜레스테롤 에스테르 비는 고지혈증 및 그로 인한 합병증일 때 상승되며, 간 질환 진단의 지표로 사용되기도 한다⁴¹⁾. 따라서 본 실험 결과, 당뇨성 흰쥐에 대한 키토산 올리고당

Table 7. Effects of chitosan oligosaccharide on concentrations of low density lipoprotein, LDL-cholesterol, free cholesterol, cholesteryl ester, cholesteryl ester ratio, triglyceride and phospholipid in serum of STZ-induced hyperglycemic rats fed the experimental diets for 5 weeks (mg/dl)

Group*	BW	BSW	ECW
Low density lipoprotein	124.6±8.0 ^{a***}	187.1±5.4 ^c	164.3±4.6 ^b
LDL-cholesterol	43.6±2.8 ^a	65.5±1.9 ^c	57.5±1.6 ^b
Free cholesterol	17.2±1.0 ^a	22.3±1.3 ^b	20.1±0.8 ^b
Cholesteryl ester	67.4±2.2 ^a	86.9±2.0 ^b	82.3±3.0 ^b
Cholesteryl ester ratio(%)**	79.7	79.6	80.4
Triglyceride	75.4±2.2 ^a	101.4±3.9 ^c	91.8±1.8 ^b
Phospholipid	98.9±1.7 ^a	117.7±2.5 ^b	113.8±2.0 ^b

* Group BW: Basal diet+Water(control group), BSW: Basal diet+STZ+Water, ECW: Experimental diet(STZ)+Chitosan oligosaccharide 10%+Water, **Cholesteryl ester/Total cholesterol×100, ***Mean±SD(n=6). Means in the same column not sharing common superscript letters are significantly different($p<0.05$).

섭취는 혈청 지질 개선에 영향을 주는 것으로 나타났다.

4) 중성지질 및 인지질 농도

혈청 중 중성지질과 인지질 농도는 Table 7에서 보는 바와 같이, STZ으로 유발된 당뇨성 흰쥐 실험군(BSW군, ECW군)에 있어서, 대조군인 BW군에 비해 월등히 높게 나타났으나, 실험군간에 있어서는 당뇨 유발 실험군인 BSW군에 비해 키토산 올리고당 섭취군인 ECW군의 농도가 감소되는 경향을 보였다. 혈청 중성지질 농도의 감소는 키토산 올리고당 급여로 흰쥐 체내의 lipoprotein lipase에 의한 chylomicron 및 VLDL의 분해에 의한 것으로 사료된다⁴²⁾.

6. 혈청 중의 효소 활성

1) Alkaline Phosphatase(ALP)의 활성

혈청 ALP의 활성 변동은 Table 8과 같다. 기본 식이와 물만

Table 8. Effects of chitosan oligosaccharide on alkaline phosphatase(ALP, EC 3.1.3.1) activities in serum of STZ-induced hyperglycemic rats fed the experimental diets for 5 weeks

Group*	Alkaline phosphatase
	Activity (Unit/ml of serum)
BW	18.8±0.9 ^{a**}
BSW	24.2±1.1 ^b
ECW	20.2±0.9 ^a

* Group BW: Basal diet+Water(control group), BSW: Basal diet+STZ+Water, ECW: Experimental diet(STZ)+Chitosan oligosaccharide 10%+Water, ** Mean±SD(n=6). Means in the same column not sharing common superscript letters are significantly different($p<0.05$).

을 급여한 대조군인 BW군(18.8 Unit/ml)에 비해 전 실험군에서 유의성 있게 높게 나타났으나, STZ으로 유발된 당뇨성 흰쥐 실험군인 BSW군(24.2 Unit/ml)에 비해서 키토산 올리고당을 섭취시킨 ECW군(20.2 Unit/ml)에서 유의성 있는 감소 효과를 나타내었다. 따라서 본 실험 결과, 고지혈증과 합병증 및 간 조직이나 담관의 폐쇄에 의해서 ALP의 활성이 증가되며, 간장에서 담즙산 배설에 장애가 발생함으로써 혈청 콜레스테롤 농도가 상승한다는 기존의 결과⁴¹⁾와 일치하는 경향을 보였다.

2) Aminotransferase(AST, ALT)의 활성

키토산 올리고당이 STZ 투여에 의한 혈청 중 AST 및 ALT 활성에 미치는 영향을 관찰한 결과는 Table 9와 같다. 혈청 AST 활성은 STZ을 투여한 BSW군(74.8 Unit/ml)이 대조군인 BW군(64.5 Unit/ml)에 비하여 유의적으로 높게 나타났으나,

Table 9. Effects of chitosan oligosaccharide on aspartate and alanine aminotransferase(AST, EC 2.6.1.1; ALT, EC 2.6.1.2) activities in serum of STZ-induced hyperglycemic rats fed the experimental diets for 5 weeks

Group*	AST	ALT
	Activity(Unit/ml of serum)	
BW	64.5±1.9 ^{a**}	21.4±0.9 ^a
BSW	74.8±2.1 ^b	25.5±1.1 ^b
ECW	71.5±1.2 ^b	24.0±0.5 ^b

* Group BW: Basal diet+Water(control group), BSW: Basal diet+STZ+Water, ECW: Experimental diet(STZ)+Chitosan oligosaccharide 10%+Water, ** Mean±SD(n=6). Means in the same column not sharing common superscript letters are significantly different($p<0.05$).

키토산 올리고당 섭취(ECW군 71.5 Unit/ml)로 인하여 유의한 차이는 없었지만 감소되는 것으로 나타났다. 또한, 혈청 ALT 활성은 BW군(21.4 Unit/ml)에 비해 BSW군(25.5 Unit/ml) 및 ECW군(24.0 Unit/ml)에서 증가된 것으로 나타났으나, 키토산 올리고당 섭취로 인하여, ECW군이 감소되는 경향을 관찰할 수가 있었다. Aminotransferase 활성의 증가는 간 실질세포의 장애와 각종 간장 질환, 심근경색, 황달 등에 의해 혈중으로 방출되어 항진되어 나타나는 것으로⁴³⁾, 본 실험의 결과를 지지하였다.

요약 및 결론

Streptozotocin(STZ 55 mg/kg BW, IP. injection)으로 유발된 당뇨병 Sprague Dawley계 수컷 흰쥐에 있어서, 키토산 올리고당의 섭취에 의한 혈당, 혈청 지질 개선 효과 및 당질대사 이상 등에 관여하는 효소의 활성 변동을 생리생화학적 측면에서 검토하기 위하여 본 실험을 수행하였다. 기본 식이만을 급여한 대조군인 BW군을 비롯한 STZ 당뇨 유발군(BSW군), 당뇨 유발에 키토산 올리고당을 섭취시킨 군(ECW군)을 5주간 실험 사육하였다. 혈당 농도는 당뇨 유발군에 키토산 올리고당을 급여함으로써 유의적으로 저하됨을 관찰할 수가 있었다. 또한, 혈청 총 콜레스테롤, 동맥경화지수, LDL, LDL-콜레스테롤, 유리 콜레스테롤, 콜레스테롤 에스테르 비, 중성지방 및 인지질 농도 등은 키토산 올리고당을 섭취시킨 군(ECW군)에서 농도가 감소되는 것으로 나타났다. 한편, HDL-콜레스테롤 및 총 콜레스테롤에 대한 HDL-콜레스테롤 비 등은 키토산 올리고당 섭취(ECW군)에 의해서 증가되는 것으로 나타났다. 혈청 중 alkaline phosphatase(ALP) 및 aminotransferase (AST, ALT)의 활성은 STZ으로 당뇨 유발시킨 후 키토산 올리고당을 섭취시킴으로써 저하되는 것으로 나타났다. 이상과 같은 결과들을 미루어 볼 때, 키토산 올리고당이 STZ으로 유발된 당뇨병 흰쥐의 혈당 조절 기능이상 및 혈청 지질대사 이상 등에서 오는 각종 질환의 예방 및 개선 작용에 효과가 있을 것으로 추정된다.

감사의 글

본 연구는 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년) 지원에 의하여 수행되었음.

참고문헌

1. Nepom, GT. A unified hypothesis for the complex genetics of HLA association. *Diabetes*. 39:1153-1157. 1990

2. Wolff, SP. Diabetes mellitus and free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications. *Br. Med. Bull.* 49:642-652. 1993
3. Yoon, JW, Kim, CJ, Park, CY and McArthur, RG. Effect of environmental factors on development of insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin. Invest. Med.* 10:459-464. 1987
4. Kim, HS, Kim, SH, Cheong, HS, Kang, JO and Chung, SY. Effects of the feeding mixed oils with various levels of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acid on the lipid components and fatty acid metabolism of serum lipoprotein in hyperlipidemic rat. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* 22:543-551. 1993
5. Lim, SJ and Kim, YR. Effects of *Benincasa hispida* seeds intake on blood glucose and lipid levels in streptozotocin induced diabetic rats. *Kor. J. Nutr.* 37:259-265. 2004
6. Garcia, MJ, Mcnamara, PM, Gordon, T and Kannel, WB. Morbidity in mortality in diabetes in the framingham population. *Diabetes*. 23:105-108. 1974
7. Lind, L, Vessby, B and Sundstrom, J. The apolipoprotein B/AI ratio and the metabolic syndrome independently predict risk for myocardial infarction in middle-aged men. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26:406-410. 2006
8. Lee, TH. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Food Indust. Nutr.* 4:61-65. 1999
9. Zimmet, P, Ellenberg, M and Rifkin, H. Epidemiology of diabetes mellitus. In: "Diabetes mellitus theory and practice", pp.451. Medical examination publ. New Hyde Park. NY. USA. 1983
10. Kim, JW, Lee, KJ and Yoon, SP. Sexual comparison of decreased postprandial glucose concentration with chitosan-oligosaccharides. *J. Chitin Chitosan.* 12:222-227. 2007
11. Kalkhoff, RK, Jacobson, M and Lemper, D. Progesterone, pregnancy and the augmented plasma insulin response. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 31:24-29. 1970
12. American Diabetes Association. Nutrition recommendations and principles for people with diabetes mellitus(position statement). *Diabetes Care*. 21:32-35. 1998
13. Cho, HK. Diabetes mellitus and disorder of lipid metabolism. *J. Kor. Soc. Endocrin.* 21:101-105. 2006
14. Harold, J and Holler, RD. Diabetes medical nutrition therapy, A professional guide to management and nutrition education resources. *J. Am. Diet. Assoc.* 97:99-113. 1997
15. Weiner, ML. An overview of the regulation status and of the safety of chitin and chitosan as food and pharmaceutical ingredients, In advances in chitin and chitosan. pp.670-672.

- Elsevier Applied Science. London and NY. USA. 1992
16. Muzzarelli, RAA, Weeks, M and Filippini, O. Removal of trace metal ions from industrial waters, nuclear effluents and drinking water, with the aid of cross-linked N-carboxymethyl chitosan. *Carbohydr. Polymer.* 11:293-306. 1989
 17. Arvanitoyamis, IS, Nakayama, A and Aiba, S. Chitosan and gelatin based edible films: state diagrams, mechanical and permeation properties. *Carbohydr. Polymer.* 37:371-382. 1998
 18. Knorr, D. Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management. *Food Technol.* 45:114-119. 1991
 19. Kim, SK and Lee, EH. Biocompatibility and medical applications of chitin and chitosan. *J. Chitin Chitosan.* 2:39-74. 1997
 20. Park, JR and Lee, YS. Effects of dietary chitosan on blood and tissue levels of lead, iron, zinc and calcium in lead administered rats. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 34:336-341. 2005
 21. Lasko, CL, Pesic, BH and Oliver, DJ. Enhancement of the metal-binding properties of chitosan through synthetic addition of sulfur and nitrogen containing compounds. *J. Appl. Pol. Sci.* 48:1565-1570. 1993
 22. Nam, KS, Son, OL, Cho, HJ, Kim, MK and Shon, YH. Effect of chitosan oligosaccharides on chemopreventive enzymes of breast cancer. *J. Chitin Chitosan.* 10:198-201. 2005
 23. Shon, YH and Nam, KS. Effect of chitosan oligosaccharides on cancer initiation stage. *J. Chitin Chitosan.* 8:222-225. 2003
 24. Jeon, YJ and Kim, SK. Antitumor activity of chitosan oligosaccharides produced in ultrafiltration membrane reactor system. *J. Microbiol. Biotechnol.* 12:503-507. 2002
 25. Kim, KN, Joo, ES, Kim, KI, Kim, SK, Yang, HP and Jeon, YJ. Effect of chitosan oligosaccharides on cholesterol level and antioxidant enzyme activities in hypercholesterolemic rat. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 34:36-41. 2005
 26. Lee, JM, Cho, WK and Park, HJ. Effects of chitosan treated with enzymatic method on glucose and lipid metabolism in rats. *J. Kor. Nutr. Soc.* 31:1112-1120. 1998
 27. No, HK, Beik KY and Kim, SJ. Effect of chitosan-soybean curd on serum lipid metabolism in rats fed high-fat diet. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 31:1078-1083. 2002
 28. Lee, KH, Yoon, SY and Kim, HK. Effect of crab shell powder on lipid metabolism in diet-induced hyperlipidemic rats. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 29:453-459. 2000
 29. Muzzarelli, RAA. Chitin, pp.89. Pergamon Press Ltd. Oxford. England. 1977
 30. Reitman, S and Frankel, S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am. J. Clin. Pathol.* 28:56. 1957
 31. Lee, JM and Son, BK. Effects of chitosan of different molecular weights on lipid metabolism in rats. *J. Kor. Nutr. Soc.* 31:143-152. 1998
 32. Daniel, DG, Saari, C, Don, WS and Judith, MO. Diabetes increase excretion of urinary malonaldehyde conjugates in rats. *Lipids.* 28:663-666. 1993
 33. Zachania, M. Effect of brown rice and soybean dietary fiber on the control of glucose and lipid metabolism in diabetic rats. *Am. J. Clin. Nutr.* 38:388-393. 1983
 34. Chung, GH, Kim, BS, Hur, JW and Chung, SY. Effect of dietary lobster shrimp chitosan on lipid metabolism in diet-induced hyperlipidemic rats. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* 25:384-391. 1996
 35. Miura, T, Usami, M, Tsuura, Y, Ishida, H and Seino, Y. Hypoglycemic and hypolipidemic effect of chitosan in normal and neonatal streptozotocin-induced diabetic mice. *Biol. Pharm. Bull.* 18:1623-1625. 1995
 36. Goldberg, RR. Lipid disorders in diabetes. *Diabetes Care* 4:561-572. 1981
 37. Reaben, KM. Abnormal lipoprotein metabolism in noninsulin-dependent Diabetes mellitus. *Am. J. Med.* 83:31-40. 1987
 38. Baron, HE, Levy, Y, Oschry, Ziv, E and Scafrir, E. Removal effect of very low density lipoproteins from diabetic rats. *Biochem. Biophys. Acta.* 793:115-118. 1984
 39. Tol, AV. Hypertriglyceride in the diabetic rat effective removal of serum very low density lipoproteins. *Atherosclerosis.* 26:117-128. 1977
 40. Smith, EB. The relationship between plasma and tissue lipid in human atherosclerosis. *Adv. Lipid Res.* 11:1-7. 1974
 41. Kim, KH. A Translation: The Clinical Application of the Results of the Test, pp.164-209. Komoonsa. Seoul. Korea. 1980
 42. Kinnunen, PK, Virtanen, JJA and Vainio, P. Lipoprotein lipase and hepatic endothelial lipase. *Atheroscler. Rev.* 11:65-99. 1983
 43. Yi, KN and Rhee, CS. Clinical Pathology File, pp.101-283. Euihakmunwhasa, Seoul. 1996