

투스 유래 수용성 다당류의 Lipase 저해활성과 지질 및 체중변화에 미치는 영향

백 구¹ · 구본근¹ · 안병제² · 박제권^{3*}

¹가천대학교 약과학과

²전남해양바이오산업센터

³가천대학교 생명과학과

Effects of Water-Soluble Polysaccharides from Tott on Lipid Absorption and Animal Body Weight

Gu Baek¹, Bon Geun Goo¹, Byung Jae Ahn², and Jae Kweon Park^{3*}

¹Dept. of Pharmaceutical Science, Gachon University, Incheon 406-799, Korea

²Jeonnam Marine Bio-industry Center, Cheonnam 537-807, Korea

³Dept. of Life Science, Gachon University, Incheon 406-799, Korea

Abstract

We examined the anti-obesity effects of water-soluble polysaccharides (WSP-A) extracted from the seaweed *Hijikia fusiforme* (Tott in Korean). The extracted alginate-like polysaccharide (verified by FT-IR and HPAEC-PAD analysis) was examined in a lipase inhibition assay and animal experiments. WSP-A inhibited lipase up to 30%, with over 80% of the initial activity retained until the 1 hour reaction *in vitro*. There was a 30% loss in the rate of weight gain in rats fed a high-fat diet. WSP-A therefore seems to serve as a healthy weight loss agent by inhibiting lipases, thus preventing the absorption of fat in the body.

Key words: seaweed, Tott (*Hijikia fusiforme*), polysaccharides, anti-obesity, lipase inhibitor

서 론

비만은 에너지 섭취와 소비의 불균형으로 인하여 체내에 주로 지방이 축적되어 체중이 증가하는 현상으로 인슐린 비의존성 제2형 당뇨, 뇌혈관 질환, 허혈성 심장 질환, 담석증, 호흡기 장애, 고혈압, 심지어 암과 같은 다양한 질병을 유발하여 조기사망의 주요인이 되고 있다(1,2). 중요한 이유로서 현대인의 고지방 위주의 식습관이 거론되고 있으며 이러한 식습관은 지방 축적에 기여하기도 하지만 보다 주요한 요인은 지방의 대사이용률이 있는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 음식으로 섭취하는 지방의 90%는 여러 종류의 triglycerides(TG_s)로 구성되어 있어 이들이 흡수되기 위해서는 가수분해 과정이 필요하며, 여러 가지 lipase들은 음식으로 섭취되는 지방의 50~70%를 사람이 흡수할 수 있는 fatty acid로 분해시킨다. 지방은 다른 주요 에너지원들인 탄수화물이나 단백질보다 높은 에너지를 생산하는 반면 대사 이용률이 낮아 쉽게 축적되어 비만을 유발하게 된다. 비만을 치료하기 위해 운동 요법을 가장 우선으로 하고 있으며, 의학 적 기술도 사용되지만 최근에는 건강기능성 식품 및 약물 치료의 중요도가 높아지고 있다. 대표적인 예로서 항비만

기능을 가진 기능성식품 및 약물치료로 사용되는 항비만제는 크게 식욕을 억제하는 방법, 대사 활성을 높이는 방법, 그리고 지방의 흡수를 억제하는 방법으로 3가지 기전에 따른 약물로 나눌 수 있다. 하지만 식욕을 억제하는 항비만제는 우울증과 같은 심각한 부작용을 유발할 수 있고, 약물치료를 중단한 후 다시 비만 상태로 되돌아가는 등과 같은 위험성이 있는 것으로 알려져 있지만 리파아제 억제제(lipase inhibitor)로써의 항비만제인 제니칼(Xenical, orlistat)이 현재까지도 시판되고 있다는 점에서 지방의 흡수를 억제하는 방법을 이용한 항비만제는 어느 정도 예상 가능한 부작용을 나타낼 뿐 안전하고 유용성이 높은 것으로 알려져 있다(3). 따라서 최근에는 천연물에서 인체 친화적인 리파아제 억제제를 찾고자 하는 연구들이 활발하게 진행되고 있다(4,5).

해조류는 다양한 기능성을 가지고 있어 식·의약 소재 개발을 위한 유용한 자원 중 하나로 평가되고 있고, 특히 해조류 중 토티(*Hijikia fusiforme*, Tott)은 아시아의 해안에 많이 분포하는 갈조류로 항산화(6), 항응고(7), 심근재생(8) 등 다양한 생리활성물질을 포함하고 있는 것으로 보고되고 있다. 토티의 주 다당류 성분은 갈조류의 세포벽을 주로 이루는 alginate로 1→4 linked α-L-guluronic acid와 β-D-mannur-

*Corresponding author. E-mail: jkpark@gachon.ac.kr
Phone: 82-32-820-4782, Fax: 82-32-820-4782

onic acid 사슬로 구성되어 있어 인체 내에서 쉽게 분해되지 않는 식이성 다당류이며 pH 또는 칼슘이온 여부에 따라 수소이온, 칼슘이온과 흡착하여 겔(gel)을 형성하는 특성으로 (9) 식품 공정에서 형태 유지, 안정제로 이용되기도 하며, 또한 구강 내 보정물질로써 이용하거나(10) 세포를 마이크로 캡슐화하여 약물전달체로 이용(11) 또는 흡착 활성 물질(12), 혈류 치료(13) 등 의약용으로도 많이 이용되고 있다. 그 밖에 fucoidan 또한 갈조류를 구성하는 다당류로 항암, 항바이러스, 면역유도, 항응고, 소염, 항산화, 혈중 지방 조절, 항알레르기, 소화기계 보호효과 등으로 최근에 많은 연구가 이루어지고 있다(14).

현재까지 갈조류의 주요 성분들에 대한 다양한 생리활성 및 산업적 응용에 대한 연구 보고들이 있지만(6-14), 투스의 대부분을 구성하고 있는 수용성 다당류의 생리활성에 대한 연구는 미비한 실정에 있다. 따라서 본 연구에서는 투스 추출물로부터 수용성 다당(water-soluble polysaccharide, WSP)류를 분리하여 FT-IR을 이용해 1차적 구조 분석을 수행하였으며, 당성분 분석을 통해 주요 당성분을 확인하였다. 또한 WSP가 porcine pancreatic lipase(PPL)와 human pancreatic lipase(HPL)의 활성에 미치는 영향을 확인하였으며, WSP 섭취에 의한 흰쥐의 몸무게 변화를 측정함으로써 투스 다당류가 lipase 활성을 억제해 항비만 효과를 나타낼 수 있는지를 알아보았고 이를 토대로 투스 다당류가 항비만 효과를 가진 건강 기능성식품 소재, 의약품 등에 이용될 수 있을지 그 가능성을 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

추출방법

본 연구에 이용된 투스는 전남 완도군의 해양바이오산업센터에서 제공받아 이를 분쇄하여 일정 압력의 조건(150 kPa)에서 15~20분 가량 열수추출 하였다. 추출물로부터 수용성 다당(WSP) 성분을 분리하기 위해 에탄올을 이용하여 다당류 성분을 침전시켰고, 두 차례에 걸쳐 반복적으로 수용화 및 에탄올 침전으로 수용성 다당류 이외의 물질을 제거하여 부분 정제된 시료로 이용하고자 이후 동결건조(FD5505, Ilshin Lab Co., Ltd., Seoul, Korea) 하여 실험에 이용하였다. 또한 수용성 다당류의 효율적 추출을 위해 추출 조건을 최적화 하였다(121°C, 15분). 이때 시료의 양 변화, 온도 변화, pH 변화, 추출시간 변화를 두어 각각의 조건에서의 수율량(건조중량)을 계산하고 최적화된 방법으로 이용하였다.

추출물 성분 분석

최적조건에서 추출한 WSP의 성분분석을 위해 일정량의 고분자 물질을 멸균 증류수에 1% 되도록 녹여 4 M trifluoroacetic acid(TFA)에 부피비로 1:2가 되도록 넣고 100°C에서 3시간 동안 반응시켜 완전가수분해를 거친 다음, 감압진공건조기(Biotron, Bucheon, Korea)를 이용하여 건조 후

증류수에 용해시켰다. 다시 감압 증발시켜 건조 상태의 시료를 얻고 여기에 소량의 증류수를 넣어 재 용해시킨 용액을 일회 주사용 0.22 μm 여과지(DISMIC-25 AS, Toyo Roshi Kaisha, Ltd, Tokyo, Japan)를 이용하여 여과한 다음, High-Performance Anion Exchange Chromatography(HPAEC, Dionex, Sunnyvale, CA, USA), Bio-LC system(DX600, Dionex)에 장착된 column(CarboPac PA-1, 4×250 mm, Dionex)에 20 μL 주입하여 용출되는 각각의 표준물질과 추출물을 electrochemical detector(Dionex)를 이용하여 성분당 분석을 수행하였다. 이때 표준물질로 여러 종류의 단당류(monosaccharides), 즉 fucose, galactose, glucose, mannose 그리고 xylose를 이용하였으며, HPLC grade를 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 그 밖에 다른 화학물질은 모두 고 순도 제품을 구입하여 본 연구에 사용하였다. 추출한 수용성 다당 성분에 포함된 단백질 함량을 정량하고자 Bradford 방법을 이용하였다(15). 추출한 수용성 다당 총 함량(16)과 황산기 함량(17)을 정량적으로 측정하기 위해 alginate는 2 M CaCl₂ 용액으로 침전시켰고, 상층액을 취해 재침전이 일어나지 않음을 확인한 다음 원심분리(13,000 rpm, 30분) 하여 얻은 상층액에 부피비로 2.5배 냉각 에탄올을 가하여 침전물을 회수하였다. 침전물을 건조한 다음 황산기 정량을 통해 후코이단 유사 다당(fucoidan-like polysaccharide)의 함량을 결정하였다.

FT-IR 분석

WSP-A의 흡수 FT-IR 스펙트럼(400~4,000 cm⁻¹)은 Nicolet 6700 FT-IR 분석기(Nicolet Analytical Instruments, Madison, WI, USA)에 의해 KBr 펠릿에 기록된 스펙트럼 해상도로 계산되었다. 스펙트럼은 Omnic 8.0(Nicolet Analytical Instruments) 소프트웨어를 사용하여 해석되었으며, 중첩 밴드의 위치는 두 번째 파생 알고리즘에 의해 추정되었다. 그런 다음 스펙트럼은 CSV 형식으로 6.0 소프트웨어(Microcal Origin, Madison, WI, USA)에 변환 및 그래프화 하여 도식되었다.

Porcine pancreatic lipase 저해활성 실험

투스 유래 물질의 리파아제 저해활성은 Sigma-Aldrich Co.에서 제공한 실험 설명서인 Enzymatic Assay of LIPO-PROTEIN LIPASE(Sigma quality control test procedure)의 방법을 일부 변형하여 기질로써 *p*-니트로페닐 부틸레이트(*p*-nitrophenyl butyrate)를 이용하여 효소반응으로 생산되는 *p*-nitrophenol의 흡광도를 측정하여 지방분해 억제활성을 알아보았다. 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.2)에 150 mM sodium chloride와 0.5%(v/v) triton X-100을 포함하는 buffer 0.9 mL에 1 U의 lipase(Sigma-Aldrich Co., PPL)를 현탁하여 효소액으로 이용하였고, 일정 농도의 저해물질 100 μL를 넣은 뒤, 50 mM *p*-nitrophenyl butyrate 10 μL를 첨가하여 37°C에서 30분간 효소반응을 진행하였다. 효

소반응으로 생산된 *p*-nitrophenol은 microplate reader(μ Quant, BIO-TEK instruments, Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였고, 이는 상관계수(1 M=17,000 abs)를 이용하여 농도로 변환하여 효소 활성으로 나타내었다. 효소 반응 30분간 매 10분마다 효소 활성을 비교하여 효소 활성의 안정도 또한 알아보았다. 리파아제 저해활성은 백분율(%)로 나타내었으며, 활성물질의 존재 또는 비존재 하에서의 기질에 대한 효소활성을 비교하여 상대 활성으로 나타내었다.

인간췌장유래 리파아제 저해활성 시험

인간췌장유래 리파아제 human pancreatic lipase(HPL) 저해활성 측정은 기질로 triolein을 이용하여 분해산물인 fatty acid와 oleic acid를 thin layer chromatography로 전개하여 분해 정도를 토대로 알아보는 실험으로 다음과 같은 방법을 이용하여 실험을 수행하였다. 0.125 U의 HPL(Sigma-Aldrich Co.)을 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 6.8)에 현탁하여 효소액을 만들었고 효소액 50 μ L에 일정 농도의 저해물질 100 μ L를 혼합한 뒤, 40 mg triolein을 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 6.8) 1 mL에 현탁하여 준비한 기질을 넣고 37°C에서 60분간 반응을 진행하였다. 반응액과 같은 부피의 chloroform을 넣고 혼합하여 기질 및 반응산물인 triolein과 oleic acid 및 fatty acid 성분을 추출하였다. 이 추출물은 thin layer chromatography(TLC)를 이용하여 benzene/ether/ethyl acetate/acetic acid(80:10:10:0.2, v/

v)를 전개용매로 분리하였고, 10% sulfuric acid로 분무 및 가열하여 가시화하였다.

실험동물의 사육

5주령 Sprague-Dawley계 암컷 흰쥐를 KOATECH (Pyeongtaek, Korea)에서 구입하여 일반 고형 사료 및 일정한 조건(온도 20 \pm 2°C, 습도 50%, 12시간 주기로 명암조절)에서 2일간 예비 사육하여 환경에 적응시킨 뒤 각 그룹당 9마리씩 3군으로 나누었다. 비만을 유도하기 위하여 4주간 25% 고지방 식이를 하였고 각 군의 목적에 따라 음용수를 달리하였다. 즉 대조군(C, control, n=9)으로 일반 음용수를 4주간 섭취시켰고, 비만 치료군(M, medication)은 일반 음용수를 1주간 섭취시킨 후 나머지 3주간을 동물체중(kg) 대비 35 g의 양으로 톳 추출물을 섭취시켰으며, 비만 예방군(P, prevention)은 4주간 동물체중(kg) 대비 35 g의 양으로 톳 추출물을 함유한 음용수를 공급하였다. 본 연구에서의 모든 동물실험은 가톨릭대학교 동물실험윤리위원회(The Catholic University of Korea Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인 하에 수행하였다. 총 28일간의 실험기간 동안 2일마다 체중변화를 측정하였다.

통계분석

최소 3번의 실험을 바탕으로 평균값을 얻었으며, 얻어진 결과의 통계적 유의성은 GraphPad InStat(GraphPad InStat Version 3.00, 2003, GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) 통계 package를 이용하여 실험군당 \pm 표준편차로 표

Table 1. Infrared band (cm^{-1}) assignment for WSP-A, sodium alginate and alginic acid

WSP-A ¹⁾		Sodium alginate	Alginic acid	Band assignment
Salt	Acid			
431	438	435	428	skeletal
			499	skeletal
620	611	624	611	skeletal
676	673		671	skeletal
719		725		skeletal
			751	skeletal
778		782		skeletal
821	815	820	812	skeletal
889	880	887	876	skeletal
	932	947	944	v(CO), v(CC)
1,035	1,038	1,031	1,034	v(CO), v(CC)
1,103	1,084	1,095	1,101	v(CO), v(CC)
1,142	1,142	1,150sh	1,149sh	v(COC), v(CO)
1,170	1,171	1,182sh	1,177sh	v(COC)-glycosidic bonds
1,258	1,252		1,248	δ (COH), δ (CH)
1,296		1,303		δ (CCO), δ (CCH), τ (CH ₂)
	1,375		1,377	δ (CCO), δ (CCH)
1,418	1,416	1,417	1,416	v _s (COO ⁻), δ (CCO), δ (CCH)
1,615				v _{as} (COO ⁻)
	1,630		1,639	δ (H ₂ O)
	1,738		1,741	v(C=O)-COOH
	2,652	1,613	2,641	v(OH)-COOH
2,852		2,851	2,854	v _s (CH ₂), v(CH)
2,923	2,924	2,925	2,925	v _{as} (CH ₂), v(CH)
3,420	3,423	3,418	3,428	v(OH)-ROH, water

¹⁾WSP-A: water-soluble polysaccharide-A.

시하였고, 이에 대한 표준편차는 \pm SD로 나타내었다. 통계 중요성 또는 각 평균 값 사이의 차이에 대한 유의성은 각각의 실험의 t-테스트에 의해 결정되었으며, p값(0.05 미만)을 유의성 있는 값으로 Tukey-Kramer multiple comparisons test에 의해 고려되었다. 표준편차로 나타내지 않은 결과에 대한 값은 최소 3번 이상의 실험을 통해 얻은 결과의 평균값으로 나타내었다.

결과 및 고찰

수용성 다당 추출 최적화 조건 확립

수용성 다당(water-soluble polysaccharides, WSP)류의 효율적 추출을 위해 시료의 양 변화, 온도 변화, pH 변화, 추출시간 변화를 두어 각각의 조건에서의 수율량을 계산하고 최적화된 방법으로 이용하였다. 우선 무게의 변화에 따른 추출량 분석 결과, 30 g 건조 시료당 500 mL 증류수를 이용하여 추출하였을 때 건조중량으로 최대 약 8.6%의 수득율을 나타내었다. 여러 온도 변화에 따른 추출율을 분석한 결과, 온도가 높아질수록 추출물 함량이 높아짐이 확인되었다 (Fig. 1). 반면 추출시간은 물의 증발을 고려하여 최대 30분으로 하여 추출하였고, 결국 121°C 및 30분 그리고 낮은 pH 조건(pH 4)에서 다소 높은 수율을 나타냄을 확인할 수 있었다. 비록 낮은 pH 조건(pH 4)에서 약 2.5% 높은 추출율을 보였으나, 친환경적이며 생체친화적 추출방법을 고려하여 여러 pH 범위에서의 추출을 피하고, 멸균 증류수를 이용하여 최대 수율을 올리도록 하였다. 고온 및 높은 pH 조건(pH 8.5)에서는 시료로 쓰인 톳의 유색성분이 동시에 많이 추출되어 더 이상 추출조건으로 고려하지 않았다.

열수 가압 추출물에 에탄올 침전을 수행하여 침전된 수용성 고분자 다당류의 함량차이를 동결건조 한 후 계량하여 비교한 결과, 건조 톳을 이용한 경우 가압열수 추출 시 약 8.6%, 생 톳으로부터는 약 5.3%의 수율을 얻었다. 수용성

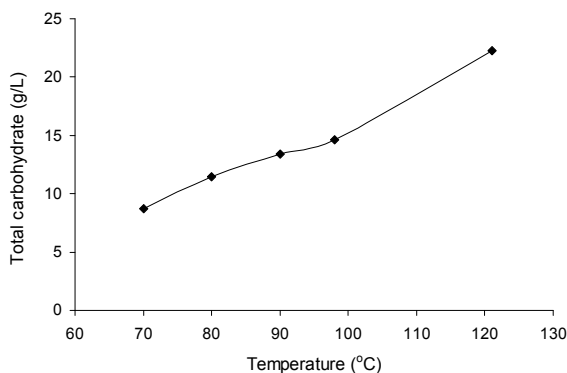


Fig. 1. Effect of temperature on isolating of water-soluble polysaccharides. Macro alga was treated at various temperature between 70 to 121°C for 15 min, respectively. The amount of total carbohydrate was measured by Sulfuric-Phenol method. Values obtained were illustrated as the average from three separate experiments.

다당류를 포함하는 추출액의 단백질 함량은 1.9% 함유된 것으로 측정되었다. 결과적으로 건조 톳으로부터 보다 높은 함량의 에탄올 침전된 고분자 다당류를 획득할 수 있었다. 하지만 건조시키는 전 처리 과정까지의 비용이 훨씬 큰 것을 감안하면, 오히려 생 톳을 이용한 가압열수 추출법에 의한 추출물 획득이 훨씬 경제적인 것으로 사료된다. 반면 생 톳을 이용할 경우 부피가 크고 무게가 있으며 특히 장기 보관이 어렵다는 점에서는 다소 부정적인 사항이지만, 추출 공정 설비가 문제없이 작동한다면 채취 즉시 세정 공정만을 거쳐 추출공정으로 이동가능 할 것이다. 하지만 가압열수 추출 후 에탄올 침전과정을 거치게 된다면 부피증대로 오히려 건조 톳을 이용함이 전체적인 경제성, 생산성 등을 고려한다면 건조 톳 이용이 더욱 바람직하다 하겠다.

성분 분석

수용성 다당의 주요 구성 성분을 분석하고자 HPAEC를 이용하여 성분당 분석 결과, 주요 구성당 성분으로는 fucose, galactose, xylose 순임을 알 수 있었다(Fig. 2). Fucose가 주요한 당 성분이라는 결과는 톳 유래 다당류의 구성 성분이 fucose를 포함하는 fucoidan 성분을 포함하고, 또한 여러 단당으로 구성된 복합 다당임을 알 수 있었다. 하지만 HPLC에 의한 단당의 분석 시 유의사항 중의 하나로서 uronic acid인 데 fucose와 거의 동일한 RT(retention time)를 갖고 peak가 나타나는 점을 고려할 때 fucose 단일 성분으로만 결론내리기 어렵다는 점이다. 이는 alginate로 1→4 linked α -L-guluronic acid와 β -D-mannuronic acid 사슬로 구성된 주요 다당의 가수분해에 따른 uronic 분자가 유래된 것으로 판단되어 Fig. 2에서 나타난 것처럼 매우 큰 peak가 검출된 것으로 사료된다. 이러한 결과는 수순 alginate의 동일한 조건에서 가수분해 하여 분석한 결과로서 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 Fig. 2에 나타난 것처럼 분리 정제한 WSP-A의 주요 구성당이 alginate와 매우 유사한 다당임을 확인한 FT-IR 결과를 뒷받침해 준다 하겠다. 또한 톳 유래 fucoidan

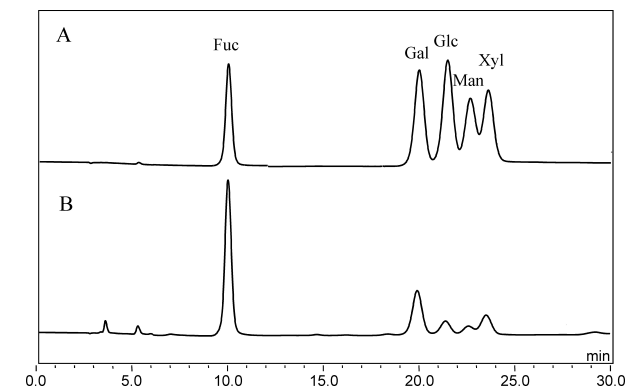


Fig. 2. Monosaccharides composition of WSP-A analyzed by fully acid-hydrolysis and detected using HPAEC-PAD. (A) Monosaccharides used for HPLC analysis as standards are: Fuc, fucose; Gal, galactose; Glc, glucose; Man, mannose; Xyl, xylose. (B) Hydrolysates of WSP-A.

Table 2. Determination of total amount of carbohydrates in WSP-A

Contents	Total carbohydrate ¹⁾	
	% (w/v)	Yield (%)
Crude extracts	129.1 (±1.54)	100
Purified alginate	91.6 (±0.91)	70.9
Fucoidan-like polysaccharide	37.5 (±0.23)	29.1

¹⁾Total amount of carbohydrates and sulfate contents in WSP-A were determined by phenol-sulfuric acid method (16) and determined by Loui's method (17) using sulfuric acid as standard material.

의 구조 분석에 관한 연구를 살펴보면 fucose, galactose 순으로 주요 당 성분으로 구성되어 있고(18), 건조 톳의 경우 alginate 성분이 70.9%를 차지하는 반면, fucoidan 성분은 29.1% 정도로 적은 양이 포함되어 있다(Table 2). 반면 당 성분 일부가 황산기로 치환되어 있을 것으로 가정하여 대표적인 양이온성 분자인 키토산과 혼합하였을 때 반응 시작점에서 침전이 일어나는 것을 볼 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 톳 추출물의 수용성 고분자 다당류는 alginate와 fucoidan-like(후코이단 유사) 음이온성 치환기를 갖는 다당으로 본 연구를 통해 확인하였다(Fig. 2, Table 2).

추출한 수용성 다당류(WSP-A)의 주요 구성당을 확인으로 복합다당체임을 밝혔으나 WSP-A를 구성하는 주요 구성 다당체를 확인하기 위해 수용화-에탄올 침전을 반복하고 gel-filtration을 거쳐 정제한 물질을 이용하여 FT-IR에 의한 구조분석을 수행하였다. 그 결과 톳 유래 수용성 다당 성분이 alginate와 유사한 구조로 밝혀졌다(Fig. 3). 거의 모든 구간에서 유사한 peak 양상을 보였으나 염(salt) 형태의

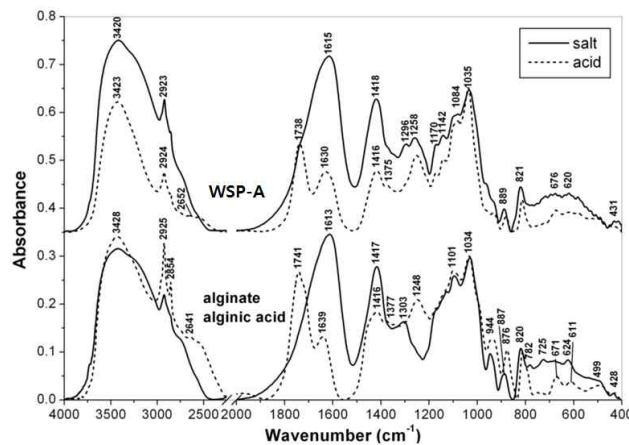


Fig. 3. FT-IR analysis of WSP-A isolated from Tott. FT-IR spectra of WSP-A (parent sample and after washing with acidic ethanol) were measured and compared with the corresponding spectra of commercial sodium alginate and alginic acid, the latter was prepared by washing of sodium alginate with acidic ethanol like in the case of WSP-A. Obtained results are summarized in FT-IR spectra and Table 1 (IR band assignments). Based on the FT-IR analysis I identify WSP-A polysaccharide as alginate. Several IR bands in the region of 800~1,200 cm⁻¹ are also typical for alginates or alginic acids.

1,250 nm 주변의 파장에서는 확연한 차이를 보인다. 이는 톳 유래 다당류 성분이 알지네이트 유사(alginate-like) 다당임을 확인할 수 있었다. 하지만 HPLC에 의한 구성당 성분 분석결과에서 보였던 것처럼 주요 구성당 성분으로는 fucose, galactose, 그리고 xylose였음을 바탕으로 고찰해보면 FT-IR 분석 결과로는 알지네이트 유사 다당임에 매우 가능성이 높지만 fucoidan과 같은 톳을 구성하는 음이온성 고분자 다당의 혼합체임을 간과할 수 없다. 이를 확인하고자 정제 WSP-A를 다시 멸균증류수에 용해한 다음 고농도의 CaCl₂ 용액(2 M)을 시료의 부피에 대해 여러 부피비로 넣어 반응시킨 다음 13,500 rpm에서 10분간 원심분리를 통해 WSP-A를 침전시켰다. 이때의 수율은 약 71%에 달하였다. 침전 후 상층액에 대해 부피비로 2.5배 되도록 에탄올을 가하여 alginate 이외의 다른 고분자 당의 침전을 확인하였다. 침전된 양은 건조된 시료의 무게비로 약 29%에 달하는 것을 확인하였다. 침전물을 회수하고, 동결건조 하여 여기에 황산기 함량을 분석(19)한 결과 황산기 함량이 약 19%로 확인되었다. 이러한 결과를 바탕으로 WSP-A는 비록 함량은 매우 낮았지만 fucoidan을 포함하는 복합다당이었음을 확인하였다.

Lipase 저해 활성

톳 유래 수용성 다당 WSP-A가 항비만 효과를 나타내는 지에 대한 생리활성 탐색을 위해 PPL에 대한 효소 활성에 미치는 영향에 대해 검토한 결과는 Fig. 4A와 B에 나타내었다. 매 10분마다 효소 반응을 관찰한 결과, 30분까지 점점 활성이 낮아지면서 이후에는 거의 변화 없는 활성을 보였다. WSP-A는 초기에는 최대 50%에 근접하는 활성을 보이며, 차츰 줄어들어 30% 미만의 안정된 활성을 나타냈으며, 다른 순수 alginate와 비교하여 보았을 때도 WSP-A가 가장 높은 활성을 나타내었다. 이러한 결과는 분자량의 차이보다는 FT-IR 분석을 통하여 알아본 바와 같이 최적 추출 조건에서 추출한 WSP-A는 주로 alginate로 구성된 다당이지만 fucoidan을 포함하는 복합 수용성 다당으로 연구목적으로 구입한 순수한 alginate와의 구조적 그리고 성분적 차이에서 기인한 것으로 사료된다. 이러한 저해활성을 토대로 보다 더 체내 상호작용과 적합한 결과를 나타내기 위하여 인간체장유래 리파아제 PPL을 이용하여 저해 활성을 측정하였다. Fig. 4A에 나타낸 것처럼 톳 유래 WSP-A의 농도 비례적으로 lipase의 활성이 저해됨을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 톳 유래 수용성 다당류가 lipase의 아미노산 잔기에 작용하기보다는 담즙염과 작용하여 지방의 확산을 막음으로써 lipase의 작용을 감소시키는 것으로 사료된다(20,21). 반면 alginate와 정제한 또는 제공(가톨릭대학교 생명공학과) 받은 fucoidan 각각의 인간체장유래 리파아제에 대한 효소 저해활성을 비교한 결과, 유의성 있는 농도 의존적인 저해활성은 관찰되지 않아 인간체장유래 리파아제 저해활성을 나타내기 위해서는 WSP-A의 복합 다당처럼 alginate와 fucoi-

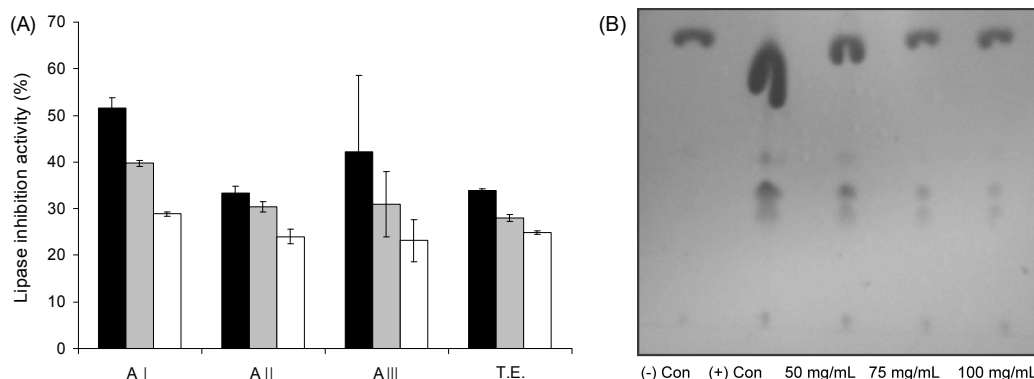


Fig. 4. Inhibitory activity of WSP-A toward porcine pancreatic lipase (A) or human pancreatic lipase (B). A I, WSP-A from Tott; A II, commercial alginate-1; A III, commercial alginate-2; T.E., WSP-A of Tott extract. Final concentration of sample was equivalent to 0.125% (w/v), respectively. Bar with different color indicates the different reaction times from the left side to right side (10, 20 and 30 min), respectively. (-)Con: negative control without enzyme, (+)Con: with enzyme which catalyzes the degradation of triolein used as substrate, and samples treated with different concentration of WSP-A in the presence of human pancreatic lipase and substrate.

dan의 일정 성분비가 중요한 요인이 될 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 이후의 동물을 이용한 체중 증가량 변화에 대한 실험은 WSP-A 자체로 실험을 수행하였다.

체중 증가량 변화

실험동물을 고지방식으로 비만을 유도하고 일반음용수 또는 WSP-A를 녹인 용액을 음용수로 공급하였다. 경구투여를 위해 강제 투여로 인한 동물의 스트레스를 고려하여 자연적인 섭취방법을 본 연구에서 수행하였다. 따라서 물과 WSP-A 용액 음용수의 소비량 역시 중요한 인자임을 고려하여 체중 측정 때마다 소비량을 고려한 결과를 도출하였다. 비만 예방군은 고지방식이와 함께 WSP-A를 제공함으로써 체중 증가율의 감소를 나타내기 위한 그룹이며, 비만 치료군은 1주간 고지방식으로 과다하게 증가한 체중을 WSP-A를 제공함으로써 체중 감량을 나타내기 위한 그룹이다. 고지방식으로 비만을 유도한 결과, Fig. 5에 나타낸 것처럼 대조군의 체중 증가는 초기 1주간은 상대적으로 저조하지만 이후로는 가장 높은 증가율을 보이며 결과적으로 시작 0일과 비

교하여 28일에 89.9% 증가하였다. 반면에 비만 치료군과 예방군은 결과적으로 약 60%(비만치료군, 비만 예방군 각각 60.9%, 63.1%)로 평균 약 30% 정도 유의적으로 감소된 체중 증가량을 보였다($p < 0.04$). 또한 비만예방군은 비만 치료군에 비해 전체적으로 낮은 체중 증가율을 나타냈으며, 특히 초기 1주간은 평균 23.2%의 유의적인 차이($p < 0.03$)를 보이며 체중 증가율 감소 등 예방의 효과를 보인다고 할 수 있다. 다만 대조군의 체중 증가 추이가 완만하지 않은 것으로 보아 더 많은 시간을 두고 관찰이 필요할 것으로 사료된다. 또한 톡에 포함되어 있는 다량의 식이섬유의 섭취는 칼로리가 거의 없고 만족감을 주며 체중과 식이효율의 감소를 가져와 비만 억제에 효과가 있다고 하였다(22). 그리고 수용성 식이섬유는 장의 점성을 증가시켜 연동운동 중 내용물과 영양성분이 이동하는 것을 둔화시킴으로써 포도당뿐만 아니라 단백질, 지질의 흡수율을 감소시키고, 그 결과 체중 증가와 식이효율을 감소시킨다고 보고된 바가 있다(23,24). 이러한 결과를 바탕으로 저자들은 톡 유래 수용성 다당 WSP-A가 항비만 유효물질로서의 활용가능성이 매우 높다고 본 연구를 통해 제안하고자 하며, 특히 친환경, 친생체적합적 해양 거대조류를 이용한 연구결과로서 고부가가치 창출 가능성을 보고하고자 한다.

요 약

본 연구에서는 기존의 유기용매를 이용한 추출을 지양하고 환경 친화적이고 간단한 추출방법을 고안하여 톡의 다당류 성분(WSP-A)을 추출해내었고, WSP-A가 지질의 흡수에 미치는 효과를 알아보기 위하여 *in vitro* 상으로 lipase inhibition assay와 *in vivo*로 고지방 식이로 비만을 유도한 rat을 이용한 동물실험을 수행하였다. 그 결과 톡 유래 다당류는 alginate와 유사한 성분이지만 성분당 분석을 통하여 fucose가 주 당성분인 polysaccharide로 밝혀졌고, 이는 al-

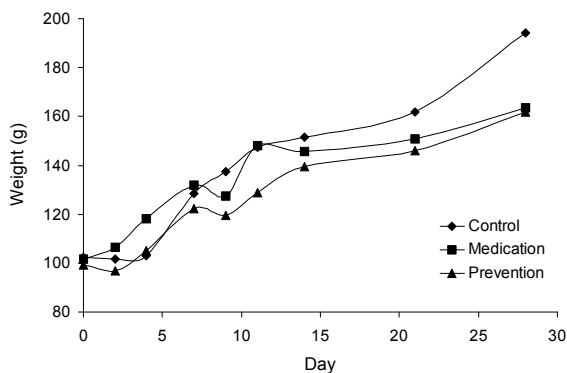


Fig. 5. Effect of WSP-A on body weight change of SD rat. All the groups were induced obesity by providing high-fat diet prior to treat with WSP-A. Control, served tap water for 4 weeks; Medication group, served tap water for 1 week and WSP-A for 3 weeks; Prevention, served WSP-A for 4 weeks.

ginate보다 뛰어나고 안정한 lipase inhibitor로써 작용하였다. 또한 동물실험에서는 WSP-A를 포함하는 음용수로 제공한 것과 제공하지 않은 대조군은 무게 변화량에 유의적인 차이를 보일 뿐 아니라 비만 예방군과 비만 치료군 사이에서도 유의적인 차이를 나타내었다. 식이섬유를 이용한 연구와 비교해보았을 때, 톳 유래 다당류는 식이섬유 이상의 효과뿐만 아니라 뛰어난 lipase inhibitor로 체중감량을 나타내었고 이는 인간췌장유래 리파아제(human pancreatic lipase)의 저해활성과 더불어 인체 내에서의 작용 가능성을 짐작하고 있다. 따라서 톳 유래 다당류 성분은 식이성 섬유 공급원뿐만 아니라 추후에 효소활성 저해 효과에 대한 보다 명확한 작용기전을 밝혀낸다면 단순한 건강 기능성 식품 소재보다 lipase inhibitor로써 항비만 약물로 고부가가치를 창출해낼 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 지식경제부(과제번호 70007093)로 지원된 연구과제 지원금으로 수행되었으며 저자들은 이에 감사를 표합니다.

문헌

- Higgins M, Kannel W, Garrison R, Pinsky J, Strokes J 3rd. 1988. Hazards of obesity—the framingham experience. *Acta Med Scand Suppl* 723: 23-36.
- Pi-Sunyer FX. 1993. Medical hazards of obesity. *Ann Intern Med* 119: 655-660.
- Hadváry P, Lengsfeld H, Wolfer H. 1988. Inhibition of pancreatic lipase in vitro by the covalent inhibitor tetrahydrolipstatin. *Biochem J* 256: 357-361.
- Finer N, James WPT, Kopelman PG, Lean ME, Williams G. 2000. One-year treatment of obesity: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicentre study of orlistat, a gastrointestinal lipase inhibitor. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24: 306-313.
- Mayer MA, Höcht C, Puyó A, Taira CA, 2009. Recent advances in obesity pharmacotherapy. *Curr Clin Pharmacol* 4: 53-61.
- Munro MHG, Luibrand RT, Blunt JW. 1987. The search for antiviral and anticancer compounds from marine organisms. In *Bioorganic Marine Chemistry*. Scheuer PJ, ed. Verlag Chemie, Berlin, Germany. Vol 1, p 93-176.
- Siriwardhana N, Jeon YJ, Kim SH, Ha JH, Heo SJ, Lee KW. 2004. Enzymatic hydrolysis for effective extraction of anti-oxidative compounds from *Hizikia fusiformis*. *Algae* 19: 59-68.
- Kim KI, Seo HD, Lee HS, Cho HY, Yang HC. 1998. Studies on the bloodanticoagulant polysaccharide isolated from hot water extracts of *Hizikia fusiforme*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 1204-1210.
- Draget KI, Skjåk-Braek G, Smidsrød O. 1997. Alginate based new materials. *Int J Biol Macromol* 21: 47-55.
- Ertesvåg H, Valla S. 1998. Biosynthesis and applications of alginates. *Polym Degrad Stab* 59: 85-91.
- Uludag H, De Vos P, Tresco PA. 2000. Technology of mammalian cell encapsulation. *Adv Drug Deliv Rev* 42: 29-64.
- Ingram M, Wright TA, Ingoldby CJ. 1998. A prospective randomized study of calcium alginate (Sorbsan) versus standard gauze packing following haemorrhoidectomy. *J R Coll Surg Edinb* 43: 308-309.
- Bryan JL, Little SL, Sykes J, Baxter T, Dettmar PW. 2001. Efficacy and safety of a unique anti-reflux agent, gaviscon advance, for the treatment of heartburn in pregnancy. *Gastroenterol* 120: 434.
- Morya VK, Kim J, Kim EK. 2012. Algal fucoidan: structural and size-dependent bioactivities and their prospectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 93: 71-82.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Dubois N, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substance. *Anal Chem* 28: 350-356.
- Silvestri LJ, Hurst RE, Simpson L, Settine JM. 1982. Analysis of sulfate in complex carbohydrates. *Anal Biochem* 123: 303-309.
- Li B, Wei XJ, Sun JL, Xu SY. 2006. Structural investigation of a fucoidan containing a fucose-free core from the brown seaweed, *Hizikia fusiforme*. *Carbohydr Res* 341: 1135-1146.
- Dodgson KS, Price RG. 1962. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. *Biochem J* 84: 106-110.
- Hadváry P, Sidler W, Meister W, Vetter W, Wolfer H. 1991. The lipase inhibitor tetrahydrolipstatin binds covalently to the putative active site serine of pancreatic lipase. *J Biol Chem* 266: 2021-2027.
- Vahouny GV, Roy T, Gallo LL, Story JA, Kritchevsky D, Cassidy M. 1980. Dietary fibers. III. Effects of chronic intake on cholesterol absorption and metabolism in the rat. *Am J Clin Nutr* 32: 2182-2191.
- Watanabe T, Hirayama T, Takahashi T, Kokubo T, Ikeda M. 1979. Toxicological evaluation of arsenic in edible seaweed, *Hizikia* species. *Toxicology* 14: 1-22.
- Rolls BJ, Ello-Martin JA, Tohill BC. 2004. What can intervention studies tell us about the relationship between fruit and vegetable consumption and weight management? *Nutr Rev* 62: 1-17.
- Gordon DT. 1989. Functional properties vs physiological action of total dietary fiber. *Cereal Foods World* 34: 517-521.

(2013년 1월 4일 접수; 2013년 2월 7일 채택)