

흰쥐에서 키토올리고당의 장 생태와 지질 상태에 미치는 용량에 따른 효과

김연록 · 최영선[†]
대구대학교 식품영양학과

Dose-Response of Chitoooligosaccharide on Gut Ecology and Lipid Status in Rats

Yeon-Rok Kim and Young-Sun Choi[†]

Dept. of Food and Nutrition, Daegu University, Gyeongbuk 712-714, Korea

Abstract

This study was carried out to investigate the dose-response of chitoooligosaccharide (with a molecular weight of 1~3 kDa) on antimicrobial activity and lipid lowering functions in rats. Sprague-Dawley male rats were given experimental diets containing 0 (control), 0.5, 2, or 5% chitoooligosaccharide (COS) for 5 weeks. Weight gain and food intake were significantly lower in rats fed 5% COS than control rats and rats fed 0.5 and 2% COS. The numbers of fecal bacteria, including bifidobacteria, lactobacilli, bacteroides, total anaerobes, and total aerobes, which reflect gut microbiota, were significantly decreased in rats fed 5% COS. Plasma triglyceride concentrations significantly decreased in a dose-dependent manner in rats fed 2% or 5% COS, while plasma total cholesterol was not significantly different among groups. The hepatic concentration of triglycerides was lower in rats fed 5% COS, and fecal triglycerides significantly increased in rats fed 5% COS. These results indicate that 5% COS supplementation in a diet may exert antimicrobial activity *in vivo*, and inhibit the proliferation of typical gut microbes, while lowering lipids.

Key words: chitoooligosaccharide, antimicrobial activity, fecal microbes, plasma lipids

서 론

키토올리고당은 갑각류의 껍질 성분인 키토산으로부터 아세틸기를 제거하여 생성된 키토산을 효소 처리하여 만든 중합도 2~10 DP의 올리고당으로서 수용성을 띠며 점도가 낮은 성질을 가진다(1). 현재 국내에서 식품의약품안전청은 키토산과 키토올리고당을 묶어 콜레스테롤 개선 효능을 가진 건강기능성분으로 인정하고 있으며, 일일섭취량을 1.2~4.5 g으로 설정하였다(2). 키토올리고당은 콜레스테롤 개선효과 외에도 항균활성(3), 항당뇨 효과(4), 비만억제(5), 면역능 활성(6), 항산화능(7), 암세포 성장 억제효과(8) 등 다양한 생리활성을 가지며, 최근 Xia 등(9)은 키토산과 키토올리고당의 생리활성을 자세하게 고찰하였다.

키토산과 키토올리고당의 항균성에 관한 연구는 주로 대장균(*Escherichia coli*), 콜레라균(*Salmonella cholera*), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 등의 식중독 발생의 원인균(10,11), 무좀균, 여드름균 등의 병원성균(12)에 대해 집중적으로 수행되어 왔다. 최근에는 키토산의 항균력을 이용한 화장품이나 항균기능성 섬유제품 등의 개발에 키토산 및 키토올리고당이 활용되고 있다(13). *Staphylococcus aureus*와 *Escherichia coli*에 대한 키토산(628 kDa)과 키토올리고

당(3 kDa 미만)의 항균 활성을 조사한 결과 키토산은 *Staphylococcus aureus*에 대해, 키토올리고당은 *Escherichia coli*에 대해 더 강한 항균성을 나타내어 세균의 종류에 따라 항균 활성이 차이가 있었다(14). 키토산과 키토올리고당의 항균 메커니즘은 현재까지 확실하게 밝혀지지 않았으며, 아세틸화의 정도와 분자량이 항균력에 영향을 미친다고 알려져 있다(15,16).

Lee 등(17)은 중합도 2~8 DP의 키토올리고당을 용량 0~0.5%로 첨가한 배지에서 bifidobacteria와 lactobacilli의 증식 정도를 조사한 결과, 키토올리고당의 용량이 높을수록 미생물 증식이 높아짐을 근거로 키토올리고당을 장내 유익한 세균의 증식을 높이는 prebiotic으로서 활용 가능하다고 하였다. Simunek 등(18)에 의하면 *in vitro* 실험을 통해 5 kDa 미만의 키토올리고당은 0.25%와 0.5%로 첨가한 배지에서 bifidobacteria 증식을 억제하지 않았다고 보고하였다. 또한 키토산과 키토올리고당의 분자 중합도가 낮을수록 인간 장내 비병원성 혐기성 균에 대한 항균 활성이 낮았으며, 2~3 kDa 키토올리고당은 현저히 항균성이 감소하였다(19). 키토올리고당은 비병원성균보다는 병원성균에 대한 항균력이 높으며, 항균력에는 분자량 10 kDa이 필요하다는 연구결과도 있다(15).

[†]Corresponding author. E-mail: yschoi@daegu.ac.kr
Phone: 82-53-850-6833, Fax: 82-53-850-6839

이처럼 키토산 또는 키토올리고당의 항균성에 관한 많은 연구들이 수행되었으나 이들 연구들은 대부분 *in vitro*에서 수행되었다. BALB/C mice에서 분자량 30~50 kDa 키토산의 항균력을 조사한 결과 식이 중 5% 수준에서 체중 감소와 장내 bifidobacteria와 lactobacilli 수를 감소시켰다는 보고(3)가 있을 뿐, 키토올리고당이 인간이나 동물의 위장관 내 세균 증식에 미치는 효과에 관한 연구는 보고된 바 없다.

한편 키토산(9,20)의 고콜레스테롤혈증과 고지혈증 개선 효과는 동물실험에서 검증되었으며, 키토올리고당에 의한 혈장 및 간 콜레스테롤 저하 효과도 다수 보고되었다(21,22). 키토산의 탈아세틸화 정도와 분자량이 클수록 혈장 중성지방, 콜레스테롤 및 LDL 콜레스테롤 농도는 낮았고 HDL 콜레스테롤 농도는 높았으며, 이러한 지질 개선은 키토산이 지질에 흡착, 정전기적 결합 및 trapping하여 변으로 지질 배출이 많아짐으로써 가능하다(23).

이처럼 선행연구들에서 키토산 및 키토올리고당의 분자량이 항균활성과 지질 개선에 미치는 영향이 크다고 보고되고 있으나, 저분자량 키토올리고당의 생체 내에서의 항균활성과 지질 대사에 미치는 효과에 관한 연구는 상대적으로 부족하다. 이에 본 연구는 흰쥐에서 저분자량 키토올리고당의 항균성이 장의 미생물생태계에 미치는 효과와 키토올리고당의 지질개선능을 조사하기 위하여 1~3 kDa 키토올리고당을 식이의 0.5%, 2%, 5% 수준으로 용량을 달리하여 그 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 식이

4주령 된 Sprague-Dawley 수컷 32마리(DBL Co., Eumseong, Korea)를 구입하여 1주일간 일반고형사료(Samyang-oil Co., Jecheon, Korea)를 급여하여 사육 환경에 적응시켰다. 난괴법에 따라 군당 8마리씩 분배하고 대조 식이와 키토올리고당(chitooligosaccharide, COS) 0.5%, 2% 및 5% 식이를 자유롭게 5주 동안 급여하였다. 사육실 환경은 온도 $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$, 12시간 주기 조명을 유지하였고, 실험동물의 체중과 식이섭취량은 2일에 한 번씩 측정하였으며 식이와 물은 자유롭게 섭취하게 하였다. 실험동물 사육의 전 과정은 대구대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 수행하였다.

대조식은 기본식이인 AIN 93G(24)에 쇠기름 15%를 더 첨가하여 총지방량을 식이의 20%(w/w)로 조절하였다. 실험식은 대조식을 기본으로 하고 키토올리고당을 0.5%, 2%, 5% 수준으로 조정하였다. 식이에 사용된 mineral mix, vitamin mix, L-cystine, choline bitartrate는 Harlan Laboratories(Madison, WI, USA)로부터 구입하였으며, 키토올리고당(분자량 1~3 kDa)은 키토라이프(Pyongtaek, Korea)로부터 구입하여 사용하였다. 실험식의 조성은 Table

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

Ingredients	Control	COS 0.5%	COS 2%	COS 5%
Constarch	379.5	379.5	379.5	379.5
Casein	200	200	200	200
Sucrose	120	115	100	70
Soybean oil	50	50	50	50
Beef tallow	150	150	150	150
Fiber	50	50	50	50
Mineral mix	35	35	35	35
Vitamin mix	10	10	10	10
L-Cystine	3	3	3	3
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5
COS ¹⁾	0	5	20	50
Total	1,000	1,000	1,000	1,000

¹⁾COS: Chitooligosaccharide (mol wt: 1~3 kDa).

1과 같다.

시료 처리

장 통과시간은 carmine red(TCI Co., Tokyo, Japan)를 식이에 0.5% 첨가하여 carmine red가 변에 처음 나타나기까지의 시간을 측정하는 것으로 해부하기 1주일 전에 수행되었다. 실험식이 급여 5주째에 4일 동안 분변을 수집하여 무게를 재고 -70°C 에 보관하였다. 해부 전 실험동물을 12시간 절식시키고, CO_2 로 마취하여 개복 후 heparin 처리한 주사기로 복부 대정맥에서 채혈하였으며, 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 간을 분리하여 생리식염수로 혈액을 제거한 후 무게를 측정하고 -70°C 에 보관하였으며, 소장의 무게와 길이를 측정하였다.

분변 미생물 측정

실험 5주째에 수집한 신선한 분변을 멸균한 phosphate buffer에서 균질화 시켜 희석하였다. Bifidobacteria, lactobacilli, bacteroides를 각각 BS(Bifidobacterium-selective) agar, MRS(Man, Rogosa and Sharpe)(Merck & Co., Inc., Darmstadt, Germany), VA(vancomycin-added) medium에서 37°C , 72시간 동안 Anaerocult[®] A(Merck & Co., Inc.)를 사용하여 배양하였다(25). Total anaerobes와 total aerobes는 BL(glucose liver blood) agar에서 각각 혐기성 및 호기성 조건을 맞추어 37°C , 72시간 동안 배양하여 집락 수를 측정하고 희석배수를 곱하여 분변 1 g당 균수를 계산하여 log₁₀ colony-forming units(CFU)로 나타내었다(26).

혈장 분석

혈장의 총 콜레스테롤과 중성지방, HDL-C(high density lipoprotein cholesterol) 농도는 측정용 효소시약(Asan pharmaceutical, Seoul, Korea)을 이용하여 효소비색법으로 각각 파장 500 nm, 550 nm, 500 nm에서 비색정량 하였으며, LDL-C(low density lipoprotein cholesterol) 농도는 지질 측정치를 이용한 Friedewald 식(27)에 따라 총콜레스테롤 - (HDL-C + 중성지방/5)를 이용하여 계산하였다. 혈장의 glu-

tamic pyruvic transaminase(GPT) 활성은 transaminase 측정용 시약(Asan pharmaceutical)을 이용하여 505 nm에서 분광광도계로 비색정량 하였다.

간과 분변의 지질 분석

간 조직 1 g에 생리식염수 2 mL를 넣어 homogenizer (Glas-Col, LCC, Terre Haute, IN, USA)로 얼음물에서 균질화한 다음, Folch 등(28)의 방법을 이용하여 총 지질을 추출하였다. 냉동 보관한 분변을 동결 건조기에서 항량이 될 때까지 건조시키고 곱게 분쇄한 후 0.5 g을 취하여 Folch 등(28)의 방법을 이용하여 총 지질을 추출하였다. 간 조직과 분변으로부터 추출한 지질은 질소를 사용하여 유기용매를 제거한 후 triton X-100과 에탄올에 용해시켜(29) 혈장 지질 분석용 효소시약(Asan pharmaceutical)을 사용하여 총 콜레스테롤과 중성지방을 측정하였다. 분변의 총 담즙산은 건조 분쇄한 변을 사용하여 Crowell과 Macdonald법(30)에 의해 추출한 후 총 담즙산 분석용 효소시약(Bio-Quant Inc, San Diego, CA, USA)을 이용하여 540 nm에서 측정하였다.

결과 및 고찰

체중과 장기 무게

5주 동안 실험식이를 섭취시킨 흰쥐의 초기 체중, 최종 체중, 체중증가량, 식이섭취량 및 식이효율(food efficiency ratio, FER)은 Table 2와 같다. COS 0.5% 첨가군과 COS 2% 첨가군은 대조군과 체중증가, 식이섭취량, 식이효율에 있어 차이가 없었지만, COS 5% 첨가군은 체중증가량, 식이섭취량 및 식이효율이 대조군의 59.8%, 80.6%, 72.7% 수준으로 유의하게 낮았다. 체중 100 g당 간의 무게는 군간 유의한 차이가 없는 반면에 맹장의 무게, 소장 무게와 길이는 COS 5% 첨가군이 다른 군에 비해 유의하게 높았다. 장 통과

시간은 군간 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 3).

본 연구에서 사용한 식이는 지방함량이 20%에 해당하는 고지방식이이다. 흰쥐의 체중증가량이 COS 2% 첨가군에서는 대조군과 차이가 없었으나, COS 5% 첨가군에서는 유의하게 감소하였다. 이러한 결과는 고콜레스테롤 식이에 분자량 1~20 kDa 키토올리고당을 식이의 1% 또는 2%로 첨가하여 먹인 결과 체중증가량, 식이섭취량, FER에서 유의적인 차이 없음(20)과 유사하였다. Tanaka 등(3)은 BALB/c mice에 30~50 kDa 키토산을 식이에 5% 수준으로 섭취시킨 결과 식욕이 감퇴하였고 이는 체중 감소와 유의하게 상관성을 나타냈다고 보고하였다. Choi 등(31)은 3.5 kDa 키토올리고당을 고지방식에 1%와 3% 수준으로 첨가한 식이를 5개월 급여한 결과 3% 첨가군에서 식이섭취량과 에너지섭취량은 차이가 없음에도 불구하고 체중이 15% 감소했다고 보고하였다. Kim과 Seong의 연구(21)에 의하면 당뇨성 흰쥐에게 저분자량(0.674 kDa)의 키토올리고당을 식이의 10% 수준으로 5주간 급여한 결과 키토올리고당 섭취군의 식이섭취량과 식이효율은 대조군과 유의적 차이를 보이지 않았다. 이상의 결과에서 1 kDa 미만의 저분자량의 키토올리고당은 체중 증가를 억제하지 않으며, 분자량이 1 kDa 이상으로 크더라도 식이의 2% 첨가는 크게 영향을 미치지 않는 듯하다.

본 연구에서 1~3 kDa 키토올리고당은 식이의 5% 수준에서 식이섭취량 감소, 식이효율 감소 및 체중증가량 감소를 보였는데, Choi 등(31)의 연구에서는 3 kDa 키토올리고당이 3% 수준에서 체중 감소를 나타냈다. 이처럼 키토올리고당의 중합도가 클수록 식이섭취량이 줄고 체중 증가가 낮아져 키토올리고당의 중합도에 따라 체중 변화에 대한 용량-반응 효과도 달라지는 것으로 판단된다.

한편 COS 5% 첨가군에서 체중 100 g당 소장의 무게 및 길이가 다른 군에 비해 유의하게 높은 것은 영양불량(32)의

Table 2. Body weight gains and food intakes of rats

Group	Initial weight (g)	Final weight (g)	Weight gain (g/day)	Food intake (g/day)	FER (g/g)
Control	156±5.34 ^{NS}	451±34.82 ^a	7.01±0.76 ^a	21.09±1.40 ^a	0.33±0.03 ^a
COS 0.5%	154±7.52	466±22.28 ^a	7.44±0.57 ^a	21.43±1.13 ^a	0.35±0.01 ^a
COS 2%	155±7.91	438±42.53 ^a	6.73±0.91 ^a	20.64±1.73 ^a	0.33±0.03 ^a
COS 5%	150±18.48	326±83.20 ^b	4.19±2.14 ^b	17.00±2.46 ^b	0.24±0.10 ^b

Values are mean±SEM for n=8.

Values in the same column not sharing common superscript letters are significantly different at p<0.05.

COS: Chitooligosaccharide. FER: Food efficiency ratio. NS: not significant.

Table 3. Relative weights of digestive organs, gut transit time and fecal weight

Group	Liver (g/100 g B.W.)	Cecum (g/100 g B.W.)	Small intestine (g/100 g B.W.)	Small intestine length (cm/100 g B.W.)	Gut transit time (hr)	Fecal weight (g/day)
Control	3.24±0.16 ^{NS}	0.49±0.15 ^b	1.37±0.09 ^b	27.34±2.20 ^b	10±1.20 ^{NS}	2.75±0.38 ^b
COS 0.5%	3.45±0.29	0.51±0.08 ^b	1.40±0.09 ^b	26.76±1.17 ^b	12±1.41	2.85±0.25 ^{ab}
COS 2%	3.32±0.21	0.58±0.14 ^b	1.50±0.08 ^b	28.43±2.46 ^b	11±2.77	3.24±0.48 ^a
COS 5%	3.47±0.45	0.91±0.42 ^a	1.96±0.52 ^a	39.59±10.63 ^a	11±2.50	3.00±0.72 ^{ab}

Values are mean±SEM for n=8.

Values in the same column not sharing common superscript letters are significantly different at p<0.05.

COS: Chitooligosaccharide. NS: not significant.

경우나 펙틴과 같은 식이섬유(33)의 다량 섭취 시 영양소의 흡수를 높이기 위해 소장 길이가 길어지고 용모의 높이와 crypt의 깊이가 증가하는 hyperplasia 현상 때문으로 이해된다. 장 통과시간이 키토올리고당의 용량에 따른 차이가 없었는 분자량이 적은 키토올리고당은 점성이 매우 낮기 때문에 사료된다. 분변량은 COS 2% 첨가군에서 대조군에 비해 증가하였으나, COS 5% 첨가군은 COS 2% 첨가군에 비해 오히려 분변량이 감소하였는데, 그 이유는 COS 5% 첨가군의 식이섬유량이 유의하게 감소하였기 때문으로 판단된다.

분변 미생물 상태

실험식이 급여 5주째 분변의 균수 측정 결과는 Table 4와 같다. 분변의 미생물 상태는 장내 미생물 상태를 반영하므로 분변의 미생물 균수는 키토올리고당의 장내 항균 활성을 예측하는 지표로 볼 수 있다. 분변 g당 bifidobacteria, lactobacilli, bacteroides, total anaerobes, total aerobes 균수는 대조군, COS 0.5% 첨가군, COS 2% 첨가군 간에는 유의한 차이가 없었으나, COS 5% 첨가군에서 유의하게 감소하였다. 키토올리고당 첨가에 의한 세균 수의 감소 효과는 total anaerobes에 비해 total aerobes에서 더 크게 나타났다.

*In vitro*에서 75 kDa 키토산과 7~10 kDa low-molar-mass 키토산은 bifidobacteria strain에 대해 증식억제를 나타내었으나, 5 kDa 미만의 키토올리고당은 영향이 없었다(18). Jeon 등(15)도 고분자량(10 kDa), 중간분자량(5 kDa) 및 저분자량(1 kDa)의 키토올리고당의 항균 활성을 비교한 결과 0.1% 농도에서 처리된 Gram-negative와 Gram-positive 병원균은 물론 유산균에 대한 성장 억제력을 가졌으며, 고분자량에서 억제 효과가 더 컸다고 보고하였다. 반면에 Lee 등(17)은 중합도 2~8 DP의 키토올리고당 배지에서 bifidobacteria와 lactobacilli가 증식하였으며, 키토올리고당 농도가 증가하면 bifidobacteria 수도 증가하였다고 보고하여 Jeon 등(15)의 실험결과와는 다른 결과를 보였다. 반면에 키토올리고당을 섭취한 후 *in vivo* 장내 세균에 미치는 항균 활성에 관한 연구는 드물다. Wang 등(34)은 키토올리고당(식이의 0.5%) 첨가 식이를 돼지에게 먹인 결과 대장균 수는 감소하였지만, lactobacilli 수에는 영향을 미치지 않았다고 보고하였다. 본 연구에서 1~3 kDa 키토올리고당은 식이의 2% 수준까지는 항균 활성이 없었으며, 5% 수준에서는 대표적인 장내 혐기성균인 bacteroides 증식 억제 효과가 크게 나타났을 뿐만 아니라, bifidobacteria와 lactobacilli도 억제

하였다. 이와 같은 결과는 분자량 30~50 kDa 키토산을 0.5%와 5% 수준으로 나누어서 14주 동안 생쥐에게 섭취시킨 결과 키토산 5%군이 0.5%군에 비해 분변의 bifidobacteria 및 lactobacilli 수를 감소시켰다고 보고한 Tanaka 등(3)의 결과와 유사하였다.

키토산과 키토올리고당의 항균 활성에 관한 메커니즘은 확실하게 밝혀지지 않았지만, 제안된 메커니즘은 키토산과 키토올리고당이 미생물 세포막의 투과성을 변화시켜 영양소의 흡수를 저해하거나 세포성분의 누출을 야기해 세균을 죽게 한다는 것이다(35). 키토올리고당 분자의 양전하를 띠는 성질은 amine 잔기에 의한 것이며(36), 양전하의 크기는 탈아세틸화와 중합 정도에 비례하며, 85~95% 탈아세틸화가 최대의 항균력을 제공한다(37). 키토올리고당의 항균 활성은 세균의 세포벽의 전하 특성에 따라 다를 수 있는데, Gram-negative bacteria는 Gram-positive bacteria에 비해 세포표면의 음전하 분포가 더 높아서 키토올리고당은 Gram-negative bacteria 표면에 흡착하기 쉬워 더 높은 항균 활성을 가지게 된다(35). 젖산을 생성하는 유익한 장내 세균인 bifidobacteria와 lactobacilli는 Gram-positive 박테리아인 반면, bacteroides는 Gram-negative bacteria이다. 본 연구에서 키토올리고당의 용량에 따른 장내 미생물 증식 억제 효과가 0~2% 용량에 비해 5% 용량에서 혐기성균에 비해 호기성균, 그리고 장내 유익균인 bifidobacteria와 lactobacilli에 비해 Gram-negative bacteria인 bacteroides에서 더 크게 나타났다.

혈장 간, 분변의 지질 양상

혈장 지질 양상은 Table 5와 같다. 총 콜레스테롤, HDL-C 및 LDL-C 농도는 대조군과 키토올리고당 첨가군 사이에 차이가 없었다. 중성지방 농도는 COS 2% 첨가군과 COS 5% 첨가군이 대조군에 비해 유의하게 낮은 농도를 보였으며, 올리고당의 용량이 높아질수록 낮아지는 경향을 보였다. 이처럼 혈장 콜레스테롤에 미치는 키토올리고당의 효과가 뚜렷하지 않은 반면에, 혈장 중성지방을 낮추는 용량-반응 효과는 뚜렷이 나타났다. 혈장 GPT 활성은 COS 5% 첨가군에서 대조군에 비해 2배 정도 높았다. 흰쥐에게 공급한 식이 5% 수준의 키토올리고당은 kg 체중당으로 환산할 경우 일일 2 g 이상에 해당하며, 이 용량은 식품의약품안전청이 설정한 키토산과 키토올리고당의 일일섭취량(2)의 50~100배의 수준에 해당한다. 키틴 및 키토산의 독성은 보고되지 않

Table 4. Concentrations of fecal bacteria in rats fed different doses of chitooligosaccharide (log₁₀ CFU/g feces)

Group	Bifidobacteria	Lactobacill	Bacteroides	Total anaerobes	Total aerobes
Control	8.46±0.13 ^a	8.44±0.18 ^a	9.59±0.13 ^a	7.30±0.08 ^a	9.44±0.04 ^a
COS 0.5%	8.55±0.17 ^a	8.48±0.45 ^a	9.45±0.11 ^a	7.17±0.23 ^a	9.37±0.06 ^a
COS 2%	8.59±0.14 ^a	8.57±0.29 ^a	9.61±0.10 ^a	7.03±0.34 ^a	9.36±0.07 ^a
COS 5%	7.12±0.20 ^b	7.10±0.63 ^b	7.84±0.54 ^b	6.97±0.36 ^b	7.93±0.18 ^b

Values are mean±SEM for n=8.

Values in the same column not sharing common superscript letters are significantly different at p<0.05.

COS: Chitooligosaccharide.

Table 5. Plasma concentrations of lipids and GPT activity

Group	Triglyceride	Total cholesterol	HDL cholesterol	LDL cholesterol	GPT (Karmen)
	(mg/100 mL)				
Control	86.29±32.73 ^a	65.89±22.99 ^{NS}	17.79±5.01 ^{NS}	30.84±15.29 ^{NS}	10.88±3.87 ^b
COS 0.5%	70.76±15.06 ^{abc}	59.87±9.39	14.48±2.38	31.24±7.68	12.88±5.28 ^b
COS 2%	56.05±20.58 ^{bc}	64.88±15.26	15.54±4.41	38.13±9.26	13.00±6.00 ^b
COS 5%	47.41±11.35 ^c	60.54±14.37	13.58±3.32	37.47±11.74	21.13±7.92 ^a

Values are mean±SEM for n=8.

Values in the same column not sharing common superscript letters are significantly different at p<0.05.

GPT: Glutamic pyruvic transaminase. COS: Chitooligosaccharide. NS: not significant.

Table 6. Hepatic and fecal concentrations of lipids

Group	Liver		Feces		
	Total cholesterol	Triglyceride	Total cholesterol	Triglyceride	Total bile acid
	(mg/g)		(mg/g)		(µmoles/g)
Control	1.01±0.41 ^{NS}	13.52±4.37 ^{ab}	0.84±0.27 ^{ab}	0.32±0.06 ^b	30.28±14.53 ^{ab}
COS 0.5%	0.94±0.66	16.19±5.93 ^a	0.68±0.34 ^b	0.29±0.12 ^b	40.96±6.81 ^a
COS 2%	0.92±0.24	11.71±5.53 ^{ab}	0.70±0.24 ^b	0.42±0.10 ^{ab}	27.56±11.07 ^{ab}
COS 5%	0.63±0.24	8.93±4.52 ^b	1.11±0.42 ^a	0.54±0.25 ^a	20.54±12.66 ^b

Values are mean±SEM for n=8.

Values in the same column not sharing common superscript letters are significantly different at p<0.05.

COS: Chitooligosaccharide. NS: not significant.

았으며, 키토올리고당의 독성에 관한 연구로서 마우스 체중 kg당 5 g까지 경구투여 후 급성독성검사에서 어떤 이상 증상도 발견되지 않았으므로(38), 증가된 GPT 활성에 대한 이유는 추가 실험이 필요하다고 본다.

간 조직 g당 총콜레스테롤 함량은 군간 유의한 차이가 없으며, 중성지방 함량은 COS 5% 첨가군이 COS 0.5% 첨가군에 비해 유의적으로 낮게 나타났다(Table 6). 본분의 총콜레스테롤 농도는 COS 0.5% 첨가군과 COS 2% 첨가군에 비해 COS 5% 첨가군에서 유의하게 높았으며, 중성지방 농도는 대조군과 COS 0.5% 첨가군에 비해 COS 5% 첨가군에서 유의하게 높았다. COS 5% 첨가군의 총 담즙산 농도는 대조군과는 차이가 없었으나, COS 0.5% 첨가군에 비해 유의하게 낮았다.

키토산의 혈청 콜레스테롤 개선 효과는 보충효과를 검증하는 임상실험을 포함하여 다양한 근거자료가 제시되었다(2). Liu 등(23)은 콜레스테롤 고지방식이에 3% 수준으로 첨가된 키토산을 3주와 8주 동안 먹인 흰쥐 혈장에서 총콜레스테롤, 중성지방, LDL-C 감소와 HDL-C 증가를 관찰하였다. 다이옥신계 TCDD에 노출된 흰쥐에서 식이의 4% 키토산(300 kDa) 첨가는 혈청 총콜레스테롤, LDL-C, HDL-C를 저하시킨 반면에, 키토산올리고머(5 kDa) 첨가는 영향을 미치지 않았다(22). 콜레스테롤 고지방식을 먹인 흰쥐에서 키토산 5% 첨가군이 대조군과 키토산 2.5% 첨가군에 비해 총콜레스테롤과 LDL-C 농도가 유의하게 낮았다(39). 반면에 저분자량의 키토올리고당에 의한 콜레스테롤 개선 효과에 관한 자료는 많지 않다. 흰쥐를 대상으로 고콜레스테롤 식이에 키토올리고당(1~20 kDa) 2% 첨가는 대조군에 비해 혈중 총콜레스테롤과 중성지방 농도를 유의하게 감소시켰

다(20). Kim과 Seong(21)의 연구에서는 당뇨성 흰쥐에게 키토올리고당(분자량 0.674 kDa) 10%를 5주간 섭취하게 한 결과 혈청 총콜레스테롤, LDL-C 및 중성지방은 대조군에 비해 감소하였으며 HDL-C는 증가하였다.

본 연구에서는 식이의 20%를 지방으로 조성한 고지방식이에 1~3 kDa 키토올리고당을 식이의 0.5%, 2%, 5% 수준으로 용량을 달리했을 때 혈장 콜레스테롤 변화는 없었으며, 혈장 중성지방 농도는 2%와 5% 첨가에서 첨가 용량이 높을수록 낮아지는 효과를 보였다. 선행 연구들에서는 대부분 콜레스테롤을 첨가한 고지방식을 사용하였으나, 본 연구에서는 고지방식을 사용하여 콜레스테롤보다 중성지방 감소 효과가 나타난 것으로 유추된다.

키토올리고당이 혈장 콜레스테롤을 낮추고 지질 상태를 개선하는 기전 중 하나로 키토산과 마찬가지로 키토올리고당의 양이온 구조가 담즙산염과의 이온결합을 통해 배설을 높임으로써 혈중 콜레스테롤을 감소시키거나 또는 지질을 직접 trapping하여 분변으로 배출시킴으로써 가능할 것이다(36). 본 연구에서 키토올리고당 5% 첨가는 분변으로의 지질 배설량을 증가시켰으므로 키토올리고당이 장내에서 지질을 흡착하여 trapping한 효과가 있다고 판단된다. 그러나 분변의 담즙산 함량에는 차이가 없으므로 1~3 kDa의 키토올리고당은 담즙산을 흡착하여 변으로 배설하는 능력은 크지 않으며, 그 결과로 간조직의 콜레스테롤 함량과 혈장 콜레스테롤 농도에는 영향을 미치지 않은 것으로 추정된다. 저분자량 키토올리고당이 흰쥐에서 성장, 식이효율, GPT 활성 및 장내미생물생태에 미치는 효과와 선행연구 결과들을 종합적으로 고려할 때, 식이의 2~3% 수준이 적절한 용량인 것으로 판단된다.

요 약

본 연구는 흰쥐에서 저분자량(1~3 kDa) 키토올리고당(chitooligosaccharide, COS)이 장내 미생물에 미치는 항균 활성과 지질 개선에 관한 용량-반응 효과를 조사하기 위하여 수행되었다. 4주령 된 Sprague-Dawley 수컷 32마리를 1주일 동안 사육 환경에 적응시킨 후 군당 8마리씩 4군으로 나누어서 고지방식에 키토올리고당을 0%(대조식), 0.5%, 2%, 5% 수준으로 첨가한 식이를 5주 동안 자유롭게 급여하였다. 실험식이 5주째에 장 통과시간을 측정하였고, 신선한 분변을 취하여 장내 균수를 측정하였으며, 회생 후 혈장 지질, 간 지질, GPT 활성, 분변 지질을 측정하였다. 체중 증가량과 식이섭취량은 COS 5% 첨가군에서 유의하게 낮았다. 분변 중 bifidobacteria, lactobacilli, bacteroides, total anaerobes, total aerobes 수는 대조군, COS 0.5% 첨가군과 COS 2% 첨가군 사이에 차이가 없었으나, COS 5% 첨가군에서는 모두 유의하게 감소하였다. 혈장 총 콜레스테롤, HDL-C 및 LDL-C 농도는 군간 차이가 없었으나, 중성지방 농도는 COS 2% 첨가군과 COS 5% 첨가군에서 유의하게 낮았으며, 키토올리고당의 용량이 높아질수록 낮았다. 간 조직의 중성지방 농도는 COS 5% 첨가군에서 낮았으며, 반면에 분변의 콜레스테롤 및 중성지방 농도는 COS 5% 첨가군에서 높았으나 담즙산은 차이가 없었다. 결론적으로 저분자량(1~3 kDa) 키토올리고당을 5% 첨가한 식이는 흰쥐의 식이섭취량, 체중증가량, 혈장 중성지방을 낮추어 지질 개선 효과를 보였고, 분변의 혐기성균 중에 bacteroides의 균수를 크게 감소시켰으며 bifidobacteria와 lactobacilli 균수도 억제함으로써 장 미생물생태 변화를 초래하였다.

감사의 글

이 논문은 2009학년도 대구대학교 학술연구비 지원에 의하여 수행되었기에 감사드립니다.

문 헌

- Son JK, Yoo J, Lee JW, Lee SB, Kwon IK. 2007. Review study of chitin oligosaccharide industry. *J Chitin Chitosan* 12: 187-197.
- Korea Food & Drug Administration. 2010. *Chitosan/chitooligosaccharide: criterion and standard*. Cheongwon, Korea.
- Tanaka Y, Tanioka SI, Tanaka M, Tanigawa T, Kitamura Y, Minami S, Okamoto Y, Miyashita M, Nanno M. 1997. Effects of chitin and chitosan particles on BALB/c mice by oral and parenteral administration. *Biomaterials* 18: 591-595.
- Liu B, Liu WS, Han BQ, Sun YY. 2007. Antidiabetic effects of chitooligosaccharides on pancreatic islet cells in streptozotocin-induced diabetic rats. *World J Gastroenterol* 13: 725-731.
- Sumiyoshi M, Kimura Y. 2006. Low molecular weight chitosan inhibits obesity induced by feeding a high-fat diet long-term in mice. *J Pharm Pharmacol* 58: 201-207.
- Yoon HJ, Moon ME, Park HS, Im SY, Kim YH. 2007. Chitosan oligosaccharide (COS) inhibits LPS-induced inflammatory effects in RAW 264.7 macrophage cells. *Biochem Biophys Res Commun* 358: 954-959.
- Mendis E, Kim MM, Rajapakse N, Kim SK. 2007. An in vitro cellular analysis of the radical scavenging efficacy of chitooligosaccharides. *Life Sci* 80: 2118-2127.
- Nam KS, So MS, Shon YH. 2007. Effect of chitosan oligosaccharide on carcinogenesis. *J Chitin Chitosan* 12: 95-98.
- Xia W, Liu P, Zhang J, Chen J. 2011. Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. *Food Hydrocolloids* 25: 170-179.
- Jung BO, Kim BR, Park HJ, Oh DY, Chung SJ. 2006. Antimicrobial activities of chitooligosaccharide and water-soluble chitosan. *J Chitin Chitosan* 11: 108-112.
- Fernandes JC, Tavoria FK, Soares JC, Ramos OS, João Monteiro MJ, Pintado ME, Xavier Malcata F. 2008. Antimicrobial effects of chitosans and chitooligosaccharides, upon *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, in food model systems. *Food Microbiol* 25: 922-928.
- Lee HS, Chung BO, Chung SJ, Lee GW, Kim IS, Choi YS, Choi CY. 2005. Antimicrobial activities of water-soluble chitosan and EuCs chitosan-derivatives. *J Chitin Chitosan* 10: 139-145.
- Lee JW, Son JK, Hahn H, Seo JH, Cho DM. 2012. The market analysis of chitosan and its derivatives in Japan. *J Chitin Chitosan* 17: 111-115.
- Eaton P, Fernandes JC, Pereira E, Pintado ME, Xavier Malcata F. 2008. Atomic force microscopy study of the antibacterial effects of chitosans on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Untramicroscopy* 108: 1128-1134.
- Jeon YJ, Park PJ, Kim SK. 2001. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. *Carbohydr Polym* 44: 71-76.
- Park PJ, Je YJ, Byun HG, Moon SH, Kim SK. 2004. Antimicrobial activity of hetero-chitosans and their oligosaccharides with different molecular weights. *J Microbiol Biotechnol* 14: 317-323.
- Lee HW, Park YS, Jung JS, Shin WS. 2002. Chitosan oligosaccharides, dp 2-8, have prebiotic effect on the *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus* sp. *Anaerobe* 8: 319-324.
- Simůnek J, Koppová I, Filip L, Tishchenko G, Belzecki G. 2010. The antimicrobial action of low-molar-mass chitosan, chitosan derivatives and chitooligosaccharides on bifidobacteria. *Folia Microbiol (Praha)* 55: 379-382.
- Simůnek J, Brandysová V, Koppová I, Simůnek J Jr. 2012. The antimicrobial action of chitosan, low-molar-mass chitosan, and chitooligosaccharides on human colonic bacteria. *Folia Microbiol (Praha)* 57: 341-345.
- Kim KN, Joo ES, Kim KI, Kim SK, Yang HP, Jeon YJ. 2005. Effect of chitosan oligosaccharides on cholesterol level and antioxidant enzyme activities in hypercholesterolemic rat. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 36-41.
- Kim HS, Seong JH. 2008. Effects of chitosan oligosaccharide supplementation on blood glucose, lipid components and enzyme activities in hyperglycemic rats. *Korean J Food & Nutr* 21: 328-335.
- Lee JH, Hwang SY, Lee YS. 2005. Preventive effects of chitosan on the disorders of hepatic functions and lipid metabolism in rats treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Korean J Nutr* 38: 689-697.
- Liu J, Zhang J, Xia W. 2008. Hypocholesterolaemic effects of different chitosan samples *in vitro* and *in vivo*. *Food Chem* 107: 419-425.

24. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123: 1939-1951.
25. Sung HY, Lim YJ, Choi YS. 2006. Soy isoflavones do not alter the effects of fructooligosaccharide on the intestinal ecosystem of colon-cancer model rats. *Food Sci Biotechnol* 15: 931-936.
26. Ji GE, Lee SK, Kim IH. 1994. Improved selective medium for isolation and enumeration of *Bifidobacterium* sp. *Korean J Food Sci Technol* 26: 526-531.
27. Fridewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18: 499-502.
28. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509.
29. Omodeo Salè F, Marchesini S, Fishman PH, Berra B. 1984. A sensitive enzymatic assay for determination of cholesterol in lipid extracts. *Anal Biochem* 142: 347-350.
30. Crowell MJ, Macdonald IA. 1980. Enzymic determination of 3 α -, 7 α -, and 12 α -hydroxyl groups of fecal bile salts. *Clin Chem* 26: 1298-1300.
31. Choi EH, Yang HP, Chun HS. 2012. Chitooligosaccharide ameliorates diet-induced obesity in mice and affects adipose gene expression involved in adipogenesis and inflammation. *Nutr Res* 32: 218-228.
32. Drozdowski L, Thomson AB. 2006. Intestinal mucosal adaptation. *World J Gastroenterol* 12: 4614-4627.
33. Chun W, Bamba T, Hosoda S. 1989. Effect of pectin, a soluble dietary fiber, on functional and morphological parameters of the small intestine in rats. *Digestion* 42: 22-29.
34. Wang JP, Yoo JS, Kim HJ, Lee JH, Kim IH. 2009. Nutrient digestibility, blood profiles and fecal microbiota are influenced by chitooligosaccharide supplementation of growing pigs. *Livestock Science* 125: 298-303.
35. Kim SK, Rajapakse N. 2005. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. *Carbohydr Polym* 62: 357-368.
36. Jeon YJ, Kim SK. 2001. Effect of antimicrobial activity by chitosan oligosaccharide N-conjugated with asparagine. *J Microbiol Biotechnol* 11: 281-286.
37. Chung YC, Su YP, Chen CC, Jia G, Wang HL, Wu JC, Lin JG. 2004. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacol Sin* 25: 932-936.
38. Jeon YJ, Kim SK. 1999. Effects of chitooligosaccharides on acute oral toxicity. *J Chitin Chitosan* 4: 115-120.
39. Hwang EK. 2006. Effect of chitosan on major lipid-related parameters in sera of rats fed high fat diet. *J Vet Clin* 23: 251-257.

(2012년 11월 30일 접수; 2013년 2월 5일 채택)