

키토산, 히비스커스 추출물 및 L-카르니틴 함유 식이가 흰쥐의 체중과 지질대사에 미치는 영향

박지영 · 김경진* · 이진희* · 이강표* · 김미경
이화여자대학교 식품영양학과, CJ (주) 식품연구소*
(2005년 2월 18일 접수)

Effect of Feeding Chitosan, Hibiscus Extract and L-Carnitine Mixture on Body Weight and Lipid Metabolism in Rats

JiYoung Park, KyungJin Kim*, JinHee Lee*, KangPyo Lee*, and MiKyung Kim

Department of Food & Nutritional Sciences, Ewha Womans University

*Division of Foods R&D, CJ Corp.**

(Received February 18, 2005)

Abstract

This study was performed to investigate effect of feeding experimental mixture containing chitosan, hibiscus extract and L-carnitine on body weight and lipid metabolism in rats. Forty-eight male rats(Charles River CD) of eight weeks old and weighing $336.5 \pm 2.3g$ were raised for five weeks with high fat diet(40% fat as calorie) to induce obesity. After induction of obesity, rats weighing $560.4 \pm 5.6g$ were blocked into four groups according to body weight and raised for eight weeks with diet containing either 0.09%(+1D group), 0.9%(+10D group) or 4.5%(+50D group) of experimental mixture. Aspartate aminotransferase(AST) and alanine aminotransferase(ALT), total protein and albumin were normal levels in plasma. Body weight gain and epididymal fat pad weight were lower in experimental mixture groups than control group. However, weights of perirenal fat pad and brown adipose tissue were not significantly different among all groups. There was no significant difference in plasma and hepatic lipid levels among all groups. Liver citrate lyase and carnitine acyltransferase activities were not significantly different among all groups, however, citrate lyase activity was tended to be decreased with increasing experimental mixture level in diet. Fecal total lipid and total cholesterol excretions were highest in +50D group, and triglyceride excretion was highest in +1D group. In conclusion, intake of experimental mixture containing chitosan, hibiscus extract and L-carnitine was effective in reducing body weight and body fat, and its inhibitory effects might lead to obesity improvement.

Key Words : chitosan, hibiscus extract, L-carnitine, body weight

I. 서론

우리나라는 경제성장과 생활수준의 향상으로 식

생활이 변화하였고 이에 따라 비만 유병률이 계속 증가되는 추세를 보이고 있다. 2001년 국민건강영양 조사¹⁾에서는 20세 이상 성인의 30.6%(남 32.4%, 여

29.4%)가 과체중이상 비만(BMI 25.0kg/m²)이라고 보고하였다. 비만은 고지혈증과 고혈압, 관상동맥질환, 당뇨병 같은 성인병을 유발하는 원인이 되므로 비만 유병률이 증가하는 것에 따라 체중조절에 대한 관심 역시 고조되고 있다. 체중조절을 위한 여러 가지 방법이 시도되는 가운데 대중적이며 손쉽게 사용되는 방법 중 하나로 다이어트 식품의 섭취를 꼽을 수 있다. 현재 체중감량의 효과가 있다고 알려진 물질이 여러 가지가 있는 가운데 본 연구에서는 키토산과 히비스커스 추출물, L-카르니틴(L-carnitine)을 포함하는 혼합물을 실험시료로 사용하고자 하였다.

키토산은 게, 새우 등 갑각류의 껍질, 곤충의 cuticle층, 연체동물의 껍질과 껍질, 균체의 세포벽 등에 널리 존재하는 키틴을 탈아세틸화시킨 천연고분자 물질로서, 장내에서 지방 흡착성질을 가지고 있으며 분자량에 따라 흡착능 및 생리효과가 다른 것으로 알려져 있다^{2), 3)}. 히비스커스 추출물에 함유되어 있는 hydroxycitric acid(HCA)는 미토콘드리아 내부에서 citrate를 oxaloacetate과 acetyl-CoA로 전환하여 지방합성을 촉진하는 효소인 citrate lyase를 억제하는 것으로 알려져 있으며 이로써 과량의 당질로부터 체지방 합성을 저해하여 지방세포의 지방 축적을 억제하는 것으로 보고되고 있다⁴⁾. L-카르니틴은 아민(amine)의 일종으로 정상인의 간과 신장에서 필수 아미노산인 lysine과 methionine으로부터 합성되며 지방산의 연소 시 미토콘드리아 내로 지방산을 운반하는 역할을 하여 지방 연소 작용을 촉진하는 것으로 알려져 있다^{5), 6)}.

최근 국내에서도 비만 인구가 급격히 증가하여 국민건강상 큰 문제로 대두되고 있다⁷⁾. 이에 따라 향후 비만 완화 및 체중감량에 효과적인 기능성 식품의 이용이 증가할 것으로 예상되나 이에 대한 기능성 실험 및 극단 섭취시의 안전성 확보가 미흡한 실정이다. 이에 본 연구에서는 흰쥐를 대상으로 키토산과 히비스커스 추출물, L-카르니틴을 포함하는 실험시료 혼합물의 체중저하 효과 및 혈액과 간, 변 중 지질농도를 분석하여 지방대사의 개선효과를 검증함으로써 기능성을 평가하고 혈장 내 단백질 농도 및 aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase(ALT)를 측정하여 이 시료의 안전성도 함께 검토하고자 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험시료 혼합물

본 연구에서는 키토산, 히비스커스 추출물 및 L-카르니틴 등이 함유된 분말형태의 실험시료를 CJ (주) 식품연구소로부터 공급받아 흰쥐에게 8주간 식이에 혼합하여 경구 투여하였다. 이 실험시료의 성분 및 배합비는 <Table 1>과 같았다.

<Table 1> Composition of experimental mixture

Ingredients	Percentage(%)
Chitosan	20.0%
Chitosan(water-soluble)	10.0%
Hibiscus Extract	32.0%
L-carnitine	15.0%
Excipients	23.0%
Total	100.0%

2. 실험동물의 사육 및 식이

실험동물은 생후 8주 된 Charles River CD 중 수컷 흰쥐 48마리를 (주) 바이오 제노믹스에서 구입하여 사용하였다. 실험동물은 1주일의 적응기간을 거친 후 <Table 3>과 같은 고지방 식이(high fat diet)로 5주간 비만을 유도하였다. 비만 유도기간 중 체중변화는 <Figure 1>과 같았으며, 유도 후 체중이 560.4±5.6g인 쥐들을 체중에 따라 난괴법(randomized complete block design)에 의해 10마리씩 4군으로 <Table 2>와 같이 분류하고 실험식을 제공하여 8주 동안 사육하였다.

<Table 2> Classification of experimental groups

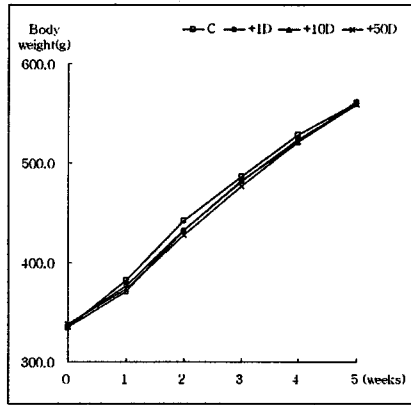
Groups ¹⁾	Sex	Number of animal	Feeding level of experimental mixture (g/kg diet)	Feeding period (week)
C	male	10	0	8
+1D	male	10	0.9	8
+10D	male	10	9	8
+50D	male	10	45	8

1) C : Control

+1D : 1 dose of experimental mixture added

+10D : 10 dose of experimental mixture added

+50D : 50 dose of experimental mixture added



<Figure 1> Body weight change in rats fed high fat diet

- 1) C : Control
- +1D : 1 dose of experimental mixture added
- +10D : 10 dose of experimental mixture added
- +50D : 50 dose of experimental mixture added

실험에 사용한 식이의 구성성분은 <Table 3>과 같다. 본 연구에서는 키토산과 HCA를 함유한 가르 시니아 캄보지아 추출물을 섭취시킨 Girola 등⁸⁾의 임상실험 결과와 설치류가 인체에 비하여 흡수율이 낮은 점, 인체와 실험동물의 체중비율 등을 고려하여 체중감량에 가장 적절한 실험시료 혼합물의 수준을 0.9g/kg diet으로 추정하여 이를 +1D군의 식이 수준으로 정하였다. 그리고 실험시료의 효과가 투여 수준에 따라 다른지를 알아보려고 10배인 9g/kg diet, 독성 여부를 알아보려고 50배인 45g/kg diet을 각각 +10D군, +50D군의 투여수준으로 정하였다. 실험시료를 제외한 식이성분은 (주) 바이오 제노믹스를 통하여 미국의 Harlan Teklad 제품을 구입하였으며 AIN-93 diet⁹⁾를 기본으로 배합하여 공급하였다.

<Table 3> Composition of experimental diets

(unit : g/kg diet)

Ingredients	Groups ¹⁾	High fat diet	C	+1D	+10D	+50D
Corn starch		271.192	465.692	464.792	456.692	430.692
Casein		174.000	140.000	140.000	140.000	140.000
Dextrinized Cornstarch		155.000	155.000	155.000	155.000	155.000
Sucrose		100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
Lard		100.000	-	-	-	-
Soybean oil		100.000	40.000	40.000	40.000	50.000
Fiber		50.000	50.000	50.000	50.000	30.000
Mineral mix ²⁾		35.000	35.000	35.000	35.000	35.000
Vitamin mix ³⁾		10.000	10.000	10.000	10.000	10.000
L-Cystine		1.800	1.800	1.800	1.800	1.800
Choline bitartrate		2.500	2.500	2.500	2.500	2.500
Experimental mixture		-	-	0.900	9.000	45.000
Cholesterol		0.500	-	-	-	-
Tert-butyl hydroquinone		0.008	0.008	0.008	0.008	0.008
Total		1000.000	1000.000	1000.000	1000.000	1000.000
Total Calorie(kcal/kg diet)		4463	3601	3598	3569	3565
Carbohydrates(% as calorie)		45.6	75.9	75.9	75.7	73.1
Protein(% as calorie)		14.1	14.1	14.1	14.2	14.3
Fat(% as calorie)		40.3	10.0	10.0	10.1	12.6

¹⁾ High fat diet : Diet containing 40% fat as calorie

C : Control diet without experimental mixture

+1D : 1 dose(0.9g/kg diet) of experimental mixture added

+10D : 10 dose(9g/kg diet) of experimental mixture added

+50D : 50 dose(45g/kg diet) of experimental mixture added

²⁾ Mineral mixture(AIN-93-M-MX)mg/kg diet : Calcium 5000, Phosphorus 3000, Magnesium 511, Sodium 1033, Potassium 3600, Chloride 1613, Sulfur (inorganic) 300, Iron 45, Zinc 35, Manganese 10, Copper 6, Iodine 0.2, Molybdenum 0.15, Selenium 0.17, Silicon 5, Chromium 1, Fluoride 1, Nickel 0.5, Boron 0.5, Lithium 0.1, Vanadium 0.1

³⁾ Vitamin Mixture(AIN-93-M-VX)mg/kg diet : Nicotinic acid 30, Ca pantothenate 15, Pyridoxine 6, Thiamin 5, Riboflavin 6, Folic acid 2, Biotin 0.2, Vitamin B-12 25µg, Vitamin K 860µg, Vitamin E 75IU, Vitamin A 4000IU, Vitamin D 1000IU, Choline 1000

실험동물은 한 마리씩 stainless steel cage에서 사육하였고 식이와 물은 자유롭게 먹도록 하였다. 동물 사육실은 온도 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, 습도 $50\pm 5\%$ 내외로 유지시켰으며, lighting cycle은 12시간 주기로 일정하게 하였다. 식이 섭취량은 일주일에 3회 일정한 시각에 측정하였고, 체중은 주 1회 같은 시각에 측정하였으며, 식이 섭취에서 오는 갑작스런 체중의 변화를 막기 위하여 체중 측정 2시간 전에 식이 그릇을 빼주었다.

3. 실험동물의 해부 및 혈액, 간, 변, 지방 조직의 채취

1) 변의 채취

실험동물을 희생하기 5일 전부터 12시간 씩 2회에 걸쳐서 24시간 동안의 변을 채취하였는데, 이때 식이에 변의 성분이 오염되는 것을 막기 위하여 식이 그릇을 넣어주지 않았다. 처음 1일간은 오후 9시부터 오전 9시까지 변을 채취하였고 그 날 오전 9시부터 다음날 오전 9시까지는 식이를 섭취하도록 한 후 시료채취 3일째인 날 오전 9시부터 12시간 동안 다시 변을 채취하였다. 이와 같이 12시간씩 두 번 채취한 변을 합쳐 1일간의 변으로 간주하였다. 이 기간 중 물은 제한 없이 공급하였으며 채취한 변은 무게를 측정 후 -20°C 에서 냉동보관 하였다.

2) 혈액과 장기 채취

실험기간이 종료된 동물들을 12시간 절식시킨 후 diethyl ether로 마취시켜 개복한 후 10ml 주사기를 이용하여 심장에서 혈액을 채취하였다. 이때 주사기는 혈액 응고를 방지하기 위하여 heparin(25000IU/5ml) 용액으로 혈액 10ml당 100-200IU가 되도록 내부를 coating하여 사용하였다. 채취된 혈액은 원심분리관에 담아 ice bath에서 20분간 방치한 후 2,800rpm, 4°C 에서 30분간 원심분리(Union32R Plus, Hanil, Korea)하여 혈장을 분리하고, -70°C deep freezer에 보관하였다.

혈액을 채취한 후 ice bath위에서 즉시 간을 떼어 ice cold saline에 넣어 세척한 다음 여지로 물기를 제거한 후 무게를 측정하고 바로 -70°C deep freezer에 보관하였다. 그 외 신장주변 지방, 부고환 지방, 갈색지방 조직을 떼어서 무게를 측정하였다.

4. 생화학적 분석방법

1) 혈장의 총 지방, 중성 지방, 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤 농도

혈장의 총 지방 농도는 Frings법¹⁰⁾으로 분석하였으며 파장 540nm에서 spectrophotometer(Genesis 10, Spectronic Unicam, USA)로 흡광도를 측정하여 비색 정량하였고, 중성 지방 농도는 glycerol phosphate oxidase 효소법을 이용한 분석 kit(영동제약)로 546nm에서 흡광도를 측정하였다. 혈장의 콜레스테롤 농도는 효소법을 이용한 분석 kit(영동제약)를 이용하여 spectrophotometer로 500nm에서 비색 정량하였고, HDL-콜레스테롤 농도는 LDL 및 VLDL을 침전시킨 후 효소법으로 측정하는 분석 kit(아산제약)를 이용하여 500nm에서 흡광도를 측정하였다. LDL-콜레스테롤은 Friedwald 공식[(총 콜레스테롤 - HDL 콜레스테롤) - 중성지방/5]을 이용하여 계산하였다.

2) 혈장의 aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase 활성 및 총 단백, 알부민 농도

혈장의 aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase(ALT)는 Retiman-Frankel법을 이용한 분석 kit(영동제약)로 505nm에서 흡광도를 측정하였다. 혈장의 총 단백질은 뷰렛반응을 이용한 분석 kit(영동제약)를 사용하여 spectrophotometer로 545nm에서 흡광도를 측정하였고, 알부민은 분석 kit(영동제약)를 이용하여 630nm에서 흡광도를 측정하여 비색 정량하였다.

3) 간의 총 지방, 중성 지방, 총 콜레스테롤 및 총 단백질 농도

간의 총 지방 농도는 Bligh와 Dyer법¹¹⁾으로 측정하였고, 중성 지방과 콜레스테롤 농도는 추출된 총 지방을 methanol로 녹여 혈장에서와 같은 방법으로 kit를 이용하여 측정하였다. 간의 총 단백질은 micro-Kjeldahl법¹²⁾에 의해 정량하였다.

4) 간의 citrate lyase와 carnitine acyltransferase의 활성

간의 citrate lyase 활성 측정을 위하여 간을 Melnick 등^{13), 14)}의 방법으로 전처리하여 cytosol 분획을 얻었다. 각각 100 μg 의 단백질을 취하여 Cuvette

A에는 assay solution A(20mM Na₃citrate, 10mM MgCl₂, 200mM hydroxylamine, 0.1mM CoA, 20mM Tris-HCl(pH 8.4))를 첨가하고, cuvette B에는 assay solution B(assay solution A에서 CoA 제외)를 첨가하여 각각의 총량이 475 μ l가 되게 하였다. Cuvette에 0.1M ATP 25 μ l를 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 12.5% trichloroacetic acid 1ml를 넣고 반응을 중지시켰다. 반응이 멈춘 cuvette에 FeCl₃ 0.2M을 첨가하여 520nm에서 spectrophotometer로 비색 정량하였으며, 표준용액은 acetohydroxamic acid를 이용하였고, cuvette A와 B의 흡광도 차이는 citrate lyase의 활성을 의미한다¹³⁻¹⁷).

Carnitine acyltransferase의 활성 측정을 위해 간을 Rahman 등¹⁸의 방법으로 전처리하여 효소원을 추출하였다. Cuvette A와 B에 효소원 100 μ l와 증류수 500 μ l를 넣은 후 각각 assay solution A(2.5mM EDTA, 2.5mM L-carnitine, 0.5mM 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid), 0.075mM palmitoyl-CoA, 0.2% Triton X-100, 116mM Tris-HCl(pH 8.0))와 assay solution B(assay solution A에서 L-carnitine 제외)를 500 μ l 첨가하였다. 3분 후 파장 412nm에서 흡광도를 측정하였으며, cuvette A와 B의 흡광도 차이는 Lambert-Beer 방법을 이용하여 계산하였고, 계산 결과는 carnitine acyltransferase의 활성을 의미한다¹⁸⁻²¹).

두 효소의 단백질 함량은 Lowry법²²에 준하여 측정하였다.

5) 변의 총 지방, 중성 지방, 총 콜레스테롤 및 총 단백 배설량

변의 총 지방 배설량 측정을 위하여 냉동 보관되었던 변을 105°C의 drying oven에서 항량이 될 때까지 건조시켜 desiccator에서 식힌 후 무게를 측정하고 지질분석을 하였다. 간과 같은 방법으로 총 지방을 측정 후, 이를 1일 총 지방 배설량으로 환산하였다. 변의 중성 지방과 콜레스테롤 배설량은 변에서 추출한 총 지방을 methanol로 녹여 혈장에서와 같은 방법으로 kit를 이용하여 측정하였고, 1일 중성 지방 및 총 콜레스테롤 배설량으로 환산하였다. 변의 총 단백 배설량은 micro-Kjeldahl법¹²에 의해 정량하여 1일 배설량으로 환산하였다.

5. 통계처리

모든 실험 결과는 Window용 SAS package를 이용하여 통계처리 하였다. 모든 측정치는 실험군당 평균과 표준오차를 계산하였고, 일원배치 분산분석(one-way analysis of variance)을 한 후 $\alpha=0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test에 의하여 각 실험군 평균치간의 유의성을 검정하였다. 모든 생화학 분석 시료는 2회 반복 측정하였으며 분석도중 손실된 시료의 분석 값은 제외되었고, 또한 같은 실험군 내에서 분석치가 평균으로부터 크게 벗어난 값은 기각검정을 통하여 제외되었다.

III. 결과 및 고찰

1. 식이 섭취량 및 체중 증가량

실험기간 중의 식이 섭취량과 열량 섭취량, 체중 증가량 및 100kcal 당 체중 증가량은 <Table 4>와 같았다. 식이 섭취량과 열량 섭취량은 모든 실험군 간에 유의적 차이가 없었으며 체중 증가량은 실험시료 공급으로 유의적으로 감소하였다. 열량 100kcal 당 체중 증가량은 대조군에 비해 실험시료군들에서 유의적으로 낮아서 동일한 열량을 섭취함에도 불구하고 체중 증가량의 감소가 유의적으로 관찰되었다. 따라서 세 실험시료군들에서의 체중증가 감소는 키토산, 히비스커스 추출물 및 L-카르니틴을 포함하는 실험시료의 영향으로 각 물질의 지방흡수와 지방축적 저하효과 및 지방연소의 촉진효과에 의한 것으로 보인다. 그러나 식이 내 실험시료 수준에 따른 차이는 없었다.

2. 신장주변 지방과 부고환 지방, 갈색지방 조직의 무게

실험동물의 신장주변 지방, 부고환 지방 및 갈색 지방 조직의 무게는 <Table 5>와 같았다. 신장주변 지방의 무게는 대조군에 비하여 실험시료 공급으로 낮아지는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었다. 부고환 지방의 무게는 실험시료군들이 대조군에 비해 유의적으로 낮았으며 실험시료 수준이 높을수록

<Table 4> Food intake and body weight gain in rats fed diets containing different level of experimental mixture

Groups ¹⁾	Food intake (g/day)	Calorie intake (kcal/day)	Weight gain (g/eight weeks)	Weight gain/calorie intake (g/100 kcal)
C	25.0±0.55 ^{NS,2),3)}	90.08±1.98 ^{NS}	124.0±7.00 ^{a,4)}	2.49±0.12 ^a
+1D	24.0±0.51	86.40±1.85	100.8±6.21 ^b	2.11±0.10 ^b
+10D	25.2±0.68	89.78±2.43	102.6±6.43 ^b	2.07±0.09 ^b
+50D	25.0±0.60	89.01±2.14	105.5±6.67 ^{ab}	2.16±0.13 ^b

1) See Table 2

2) Mean ± Standard Error(n=10)

3) Values within a column are not significant at α=0.05 level by Duncan's multiple range test

4) Values within a column with different letters are significantly different at α=0.05 level by Duncan's multiple range test

<Table 5> Adipose tissue weights in rats fed diets containing different level of experimental mixture (unit:g)

Groups ¹⁾	Perirenal fat pad	Epididymal fat pad	Brown fat pad
C	28.9±2.14 ^{NS,2),3)}	21.0±1.21 ^{a,4)}	0.55±0.07 ^{NS}
+1D	26.0±1.95	18.3±1.30 ^{ab}	
+10D	26.2±1.78	17.7±1.10 ^{ab}	0.56±0.05
+50D	25.6±1.47	16.6±0.84 ^b	

1) See Table 2

2) Mean ± Standard Error(n=10)

3) Values within a column are not significant at α=0.05 level by Duncan's multiple range test

4) Values within a column with different letters are significantly different at α=0.05 level by Duncan's multiple range test

무게가 낮았다. 한편, 갈색지방 조직의 무게는 식이 내 실험시료의 첨가에 의하여 유의적인 영향을 받지 않은 것으로 나타났다. 따라서 체지방 축적을 대표하는 부고환 지방의 뚜렷한 감소로 실험시료 혼합물의 체지방량 저하효과를 볼 수 있었다.

3. 혈장 내 aspartate aminotransferase와 alanine aminotransferase 활성

혈장 내 AST, ALT 활성은 <Table 6>과 같이 실험군간에 유의적인 차이는 없었으며 모든 실험군의 농도는 18주령의 SD종 수컷 흰쥐를 대상으로 정상 식이를 공급한 Song²³⁾의 분석치와 동일한 범위 (AST: 72.44~122.78U/L, ALT: 32.14~44.74U/L)에 해당하는 것으로 나타났으며 SD종 흰쥐의 임상 기준치^{24), 25)}(AST: 39~262U/L, ALT: 20~60U/L)에

<Table 6> Plasma AST and ALT activities in rats fed diets containing different level of experimental mixture

Groups ¹⁾	AST(U/L)	ALT(U/L)
C	93.72±14.40 ^{*NS,2),3)}	38.50±5.15 ^{NS}
+1D	103.50±8.79	26.50±3.53
+10D	89.85±11.71	26.80±2.28
+50D	91.20±7.74	30.90±7.47

1) See Table 2

2) Mean ± Standard Error(*: n=9, otherwise n=10)

3) Values within a column are not significant at α=0.05 level by Duncan's multiple range test

해당하였다. 따라서 실험시료 공급으로 인한 독성은 +1D 및 +10D군뿐 아니라 +50D군에서도 나타나지 않은 것으로 보여 실험시료 혼합물이 실험동물에 유해하지 않음을 알 수 있었다.

4. 혈장 내 총 단백질과 알부민 수준

혈장 내 총 단백질과 알부민 수준은 <Table 7>과 같이 대조군과 실험시료군들 사이에 유의적 차이가 없었으며 모든 군의 수치가 SD종 흰쥐의 임상 기준치²⁵⁾(총 단백질: 5.9~7.9g/dl, 알부민: 2.8~4.4g/dl)에 해당하는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과로 볼 때 실험시료의 섭취로 인하여 영양불량 상태가 초래되지 않았음을 알 수 있었다.

5. 혈장 내 총 지방, 중성 지방, 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 수준

혈장 총 지방, 중성 지방, 총 콜레스테롤, HDL-콜

<Table 7> Plasma total protein and albumin concentrations in rats fed diets containing different level of experimental mixture

Groups ¹⁾	Total protein(g/dl)	Albumin(g/dl)
C	6.56±0.23 ^{NS, 2), 3)}	3.49±0.09 ^{NS}
+1D	6.72±0.20	3.59±0.07
+10D	6.73±0.20	3.61±0.07
+50D	6.45±0.12	3.51±0.09

¹⁾ See Table 2

²⁾ Mean ± Standard Error(n=10)

³⁾ Values within a column are not significant at α=0.05 level by Duncan's multiple range test

레스테롤, 그리고 LDL-콜레스테롤 농도는 <Table 8>과 같이 모든 군간에 유의적인 차이가 없었다. 실험동물은 실험식이 섭취 전 비만을 유도했었음에도 불구하고 정상 식이를 섭취한 유사 연령의 SD종 흰쥐의 중성 지방과 총 콜레스테롤 기준치²⁴⁾(중성지방: 208.5±117.8mg/dl, 총 콜레스테롤: 71.9±

13.7mg/dl)에서 크게 벗어나지 않아 실험시료의 섭취로 인해 혈 중 지질 수준들이 큰 영향을 받지 않는 것으로 보인다.

6. 간 내 총 지방과 중성 지방, 총 콜레스테롤, 총 단백질 수준

간 내 총 지방, 중성 지방, 총 콜레스테롤 및 총 단백질 농도는 <Table 9>와 같았다. 간 내 총 지방 및 중성 지방 수준은 실험시료 공급으로 낮아지는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. 간 내 총 콜레스테롤 수준은 실험군간에 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 또한 간 내 총 단백질 수준도 모든 실험군간에 유의적인 차이가 없었다. 본 실험의 간 내 총 지방, 중성 지방, 총 콜레스테롤 농도는 유사 연령(9~24주령)의 수컷 흰쥐에 정상 식이를 공급한 연구^{26), 27)}의 분석치(총 지방: 37.14~53.54mg/g, 중성 지방: 3.46~7.31mg/g, 총 콜레스테

<Table 8> Plasma total lipid, triglyceride, total cholesterol, HDL-cholesterol and LDL-cholesterol concentrations in rats fed diets containing different level of experimental mixture

Groups ¹⁾	Plasma lipids (mg/dl)				
	Total lipid	Triglyceride	Total cholesterol	HDL-cholesterol	LDL-cholesterol
C	382.50±27.23 ^{NS,2),3)}	169.94±15.67 ^{*NS}	100.47±4.79 ^{*NS}	41.43±3.31 ^{NS}	25.86±2.61 ^{*NS}
+1D	372.44±24.95	145.95±14.20	87.04±5.01	37.18±2.90	20.67±3.93
+10D	431.74±19.23 [*]	166.57±20.77 [*]	97.11±6.76	44.27±3.62	16.74±4.13
+50D	368.05±27.39 [*]	145.55±17.76	96.85±5.49	40.95±2.23	24.38±2.40 [*]

¹⁾ See Table 2

²⁾ Mean ± Standard Error(*: n=9, otherwise n=10)

³⁾ Values within a column are not significant at α=0.05 level by Duncan's multiple range test

<Table 9> Liver total lipid, triglyceride, cholesterol and total protein concentrations in rats fed diets containing different level of experimental mixture

Groups ¹⁾	Lipids (mg/g wet weight)			Total protein (g/g dry liver)
	Total lipid	Triglyceride	Total cholesterol	
C	50.61±6.93 ^{NS,2),3)}	3.28±0.30 ^{*NS}	1.32±0.09 ^{NS}	0.39±0.02 ^{NS}
+1D	48.26±5.74 [*]	3.12±0.19	1.45±0.14	0.39±0.01
+10D	45.21±3.77 [*]	2.81±0.26 [*]	1.59±0.12	0.39±0.01
+50D	43.88±1.54	3.15±0.16	1.64±0.10	0.39±0.01

¹⁾ See Table 2

²⁾ Mean ± Standard Error(*: n=9, otherwise n=10)

³⁾ Values within a column are not significant at α=0.05 level by Duncan's multiple range test

를: 1.23~2.99mg/g)와 동일한 범위에 해당하는 것으로 나타나서 모두 정상범위 내에 있다고 사료된다.

7. 간의 citrate lyase와 carnitine acyltransferase의 활성

간의 citrate lyase와 carnitine acyltransferase 활성은 <Table 10>과 같았다. 간의 citrate lyase 활성은 실험시료의 섭취량이 증가할수록 감소하는 경향이 있었으나 그 차이가 유의적이지는 않았다. 이는 실험시료에 포함되어있는 히비스커스 추출물(HCA)이 미약하지만 citrate lyase의 활성에 영향을 미친 것으로 보인다. 그러나 carnitine acyltransferase의 활성은 실험군간에 유의적인 차이가 없었으며, 실험시료의 양에 따른 경향도 나타나지 않았다. 따라서 본 실험에서 실험시료 혼합물은 지방연소 증진보다는 지방합성 억제에 미치는 영향이 더 컸던 것으로 보인다.

<Table 10> Liver citrate lyase and carnitine acyltransferase activities in rats fed diets containing different level of experimental mixture

Groups ¹⁾	Citrate lyase (nmol hydroxamate/mg protein/30min)	Carnitine acyltransferase (nmol/mg protein/min)
C	0.24±0.03 ^{NS,2),3)}	3.34±0.19 ^{NS}
+1D	0.23±0.02	3.49±0.15
+10D	0.19±0.02	3.38±0.18
+50D	0.19±0.02	3.56±0.19

1) See Table 2

2) Mean ± Standard Error(*: n=9, otherwise n=10)

3) Values within a column are not significant at α=0.05 level by Duncan's multiple range test

그러나 이 두 효소 모두 유의적 변화가 없었던 것이 지방연소 촉진과 지방합성 억제라는 상반된 기전으로 작용하는 두 가지 물질이 동시에 투여되어 영향이 상쇄되었기 때문인지 투여량의 부족 때문인지는 앞으로 더 검토하여야 하겠다.

8. 변 무게 및 변 내 총 지방, 중성 지방, 총 콜레스테롤, 총 단백 배설량

변 무게 및 변으로의 총 지방, 중성지방, 총 콜레스테롤, 그리고 총 단백 배설량은 <Table 11>과 같았다. 변 무게는 실험시료 수준이 높았던 +50D군에서 대조군에 비하여 증가함을 보여주었다. 변으로의 총 지방, 총 콜레스테롤, 그리고 총 단백 배설량은 +50D군에서 대조군에 비하여 증가하였다. 이것으로 보아 +50D군에서는 변 배설량을 증가시키면서 변으로의 총 지방, 총 콜레스테롤, 그리고 총 단백 배설량을 높이는 효과가 있는 것으로 보인다. 이는 실험시료 중 키토산의 효과로 생각되는데 +1D군과 +10D군들에서 지질 배설량의 증가 효과가 나타나지 않은 것은 실험에 사용된 키토산의 양이 적을 뿐만 아니라 분자량이 작기 때문인 것³⁾으로 사료된다.

IV. 요약 및 결론

본 연구에서는 흰쥐를 대상으로 키토산과 히비스커스 추출물, L-카르니틴을 포함하는 실험시료 혼합물의 체중과 체지방량 저하 및 지방대사 개선의 효과와 이 혼합물의 유해성 여부도 함께 조사하였다. 그 결과는 다음과 같았다.

<Table 11> Feces weight, and fecal total lipid, triglyceride, cholesterol and total protein excretions in rats fed diets containing different level of experimental mixture

Groups ¹⁾	Feces weight		Fecal lipids and protein excretions			
	Wet weight (g/day)	Dry weight (g/day)	Total lipid (mg/day)	Triglyceride (mg/day)	Total cholesterol (mg/day)	Total protein (g/day)
C	1.61±0.19 ^{b,2),3)}	1.20±0.14 ^{*ab,4)}	20.38±4.67 ^{*ab}	0.26±0.06 ^{**ab}	1.13±0.28 ^{*ab}	0.34±0.05 ^{*ab}
+1D	1.54±0.13 ^b	1.05±0.11 ^b	16.27±2.64 ^{*ab}	0.40±0.09 ^{*a}	0.68±0.15 ^{*b}	0.31±0.02 ^{**b}
+10D	1.93±0.17 ^{ab}	1.36±0.11 ^{*ab}	15.27±2.87 ^{**b,5)}	0.18±0.02 ^{*b}	0.98±0.16 ^{**ab}	0.37±0.04 ^{**ab}
+50D	2.42±0.38 ^a	1.55±0.23 ^a	32.92±9.09 ^{*a}	0.28±0.06 ^{*ab}	1.95±0.58 ^{*a}	0.45±0.05 ^{*a}

1) See Table 2

2) Mean ± Standard Error(*: n=9, **: n=8, otherwise n=10)

3) Values within a column with different letters are significantly different at α=0.05 level by Duncan's multiple range test

1. 모든 실험동물은 동일한 열량을 섭취하였음에도 실험시료군들에서 체중 증가량이 유의적으로 저하되었다. 그러나 식이 내 실험시료 수준에 따른 차이는 없었다.

2. 부고환 지방의 무게는 실험시료군들에서 낮았으며 식이 내 실험시료수준이 높을수록 무게가 낮았다. 신장 주변의 무게는 유의적이지 않으나 실험시료군들에서 다소 낮은 경향을 보여주었다.

3. 혈장 내 aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase의 수준은 실험군간에 유의적인 차이가 없었으며 모두 정상범위 내에 있었다.

4. 혈장 내 총 단백질과 알부민 농도는 실험군간에 유의적인 차이가 없었으며 모두 정상범위 내에 있었다.

5. 혈장과 간 내 총 지방, 중성 지방, 총 콜레스테롤과 혈장 내 HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 수준 모두 실험군간에 유의적인 차이가 없었으며 임상적 정상 범위나 타 연구의 분석치와 비교 시 차이가 없었다.

6. 간의 citrate lyase 활성은 유의적이지 않으나 실험시료의 섭취량이 증가할수록 감소하는 경향이 있었고, carnitine acyltransferase의 활성은 모든 군간에 유의적인 차이가 없었다.

7. 변 중 총 지방, 총 콜레스테롤 및 총 단백질 배설량은 +50D군에서 대조군에 비하여 증가하는 경향이 있었다. 그러나 +1D와 +10D군에서는 지질과 단백질 배설량의 증가 경향이 없었다.

결론적으로 본 연구에서 사용한 키토산과 히비스커스 추출물, L-카르니틴을 포함한 실험시료 혼합물은 수컷 흰쥐에서 체중증가의 감소 및 체지방량의 감소효과를 나타내었으며 유해하지 않다고 볼 수 있겠다.

감사의 글

본 연구는 CJ (주) 식품연구소의 지원에 의해 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

■ 참고문헌

1) 보건복지부. 2001년 국민건강·영양조사 총괄편.

pp 98-99, 2002

2) Lee JongMee and Son BoKyung. Effects of chitosan of different molecular weights on lipid metabolism in rats. *Korean J Nutr* 31(2): 143-152, 1998

3) Bea KyeHyun and Kim Mikyung. Effect of chitosan and N,O-carboxymethyl chitosan of different sources and molecular weights on cadmium toxicity. *Korean J Nutr* 30(7): 770-780, 1997

4) Ishihara K, Oyaizu S, Onuki K, Lim K, Fushiki T. Chronic(-) hydroxycitrate administration spares carbohydrate utilization and promotes lipid oxidation during exercise in mice. *J Nutr* 130: 2990-2995, 2000

5) Feng Y, Guo G, Wei J, Yang J, Ge Y, Gao L. Necessity of carnitine supplementation in semistarved rats fed a high-fat diet. *Nutrition* 17: 628-631, 2001

6) Center SA, Harte J, Watrous D, Reynolds A, Watson TD, Markwell PJ, Millington DS, Wood PA, Yeager AE, Erb HN. The clinical and metabolic effects of rapid weight loss in obese pet cats and the influence of supplemental oral L-carnitine. *J Vet Intern Med* 14(6): 598-608, 2000

7) 오진주. 만성질환 실태와 관리방안. 한국보건사회연구원, 2001

8) Girola M, Bernardi M, Cantos S, Tripodi S, Ventura P, Guarino C, Marletta M. Dose effect in lipid-lowering activity of a new dietary integrator (Chitosan, Garcinia cambogia extract and chrome). *Acta Toxicol Ther* 17(1): 25-40, 1996

9) Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. 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, 1993

10) Frings CS, Dunn RT. A colorimetric method for determination of total serum lipid based on the sulfuric-phospho-vanillin reaction. *Am J Clin Nutr* 53: 89, 1970

11) Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37: 911-917, 1959

- 12) Micro-kjeldal method. microchemical determination of nitrogen. AOAC official method 960.52
- 13) Joel Z. Melnick, Paul A. Srere, Nabil A. Elshourbagy, Orson W. Moe, Patricia A. Preisig and Rpbert J. Alpern. Adenosine triphosphate citrate lyase mediates hypocitraturia in rats. *J Clin Invest* 98(10): 2381-2387, 1996
- 14) Joel Z. Melnick, Patricia A. Preisig, Rpbert J. Alpern and Michel Baum. Renal citrate metabolism and urinary citrate excretion in the infant rat. *Kidney Int* 57: 891-897, 2000
- 15) Paul A. Srere. The citrate cleavage enzyme. *J Biol Chem* 34(10): 2544-2547, 1959
- 16) Gene L. Cottam and Paul A. Srere. The sulfhydryl groups of citrate cleavage enzyme. *Arch Biochem Biophys* 130: 304-311, 1969
- 17) Takeda Y, F Suzuki and H Inoue. ATP citrate lyase. *Methods Enzymol* 13: 153-160, 1969
- 18) Shaikh Mizanoor Rahman, Yu-Ming Wang, Hiroaki Yostumoto, Jae-Young Cha, Seo-Young Han, Shuji inoue and Teruyoshi Yanagita. Effects of conjugated linoleic acid on serum leptin concentration, body-fat accumulation, and β -oxidation of fatty acid in oletf rats. *Nutrition* 17: 385-390, 2001
- 19) Ikuo Ikeda, Cha JaeYoung, Teruyoshi Yanagita, Noriaki Nakatani, Kazuhiro Oogami, Kastumi Imaizumi and Kazunaga Yazawa. Effects of dietary α -linolenic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on hepatic lipogenesis and β -oxidation in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 62(4): 675-680, 1998
- 20) Mary Ann K. Markwell, Estelle J. MCGroarty, Loran L. Bieber and N. E. Tolbert. The subcellular distribution of carnitine acyltransferases in mammalian liver and kidney. *J Biol Chem* 218(10): 3426-3432, 1973
- 21) Abdullah S. Alhomida. Oral theophylline changes renal carnitine palmitoyltransferase activity in rats. *Arch Med Res* 32: 394-399, 2001
- 22) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951
- 23) Song ChangWoo, Cho KyuHyeok, Han HyunSook and Han SangSeop. The effect of fasting time on haematological and blood biochemical parameters in SD rats. *Korean J Lab Ami Sci* 10(1): 73-80, 1994
- 24) Hasegawa K, Larson JL, White WJ, Clifford CB. Baseline data comparing CD(SD)IGS rats supplied from Charles River Japan, Charles River UK and Charles River USA. pp9-18, *CD(SD)IGS study group*, Yokohama, 2001
- 25) 한국식품영양과학회. 식품영양실험핸드북. 영양편. pp 655-676, 효일출판사, 2000
- 26) An Sojin and Kim MiKyung. Effect of dry powders, ethanol extracts and juices of radish and onion on lipid metabolism and antioxidative capacity in rats. *Korean J Nutr* 34(5): 513-525, 2001
- 27) Um MinYoung and Kim MiKyung. Effect of grape intakes on lipid metabolism of rats during aging. *Korean J Nutr* 35(7): 713-729, 2002