



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0010018
(43) 공개일자 2011년01월31일

(51) Int. Cl.

A61K 31/722 (2006.01) A61K 31/194 (2006.01)

A61K 31/375 (2006.01) A61P 3/04 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0067517

(22) 출원일자 2009년07월23일

심사청구일자 2009년07월23일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(주)이엘바이오

서울시 성동구 성수동2가 3동 277-17 성수아카데미타워 7층 6호

(72) 발명자

서형주

서울특별시 양천구 목동 902 8/5 목동신시가지아파트 233-504

(74) 대리인

특허법인 대아

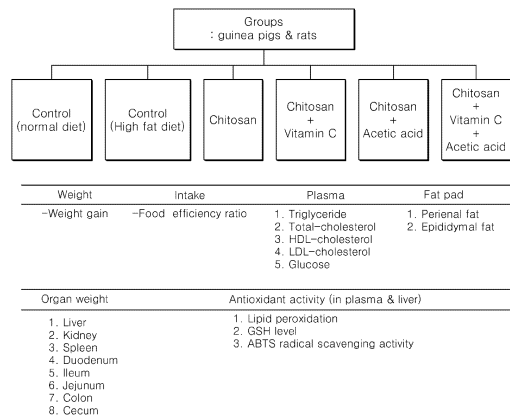
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 복합첨가물을 포함하는 항산화성 키토산 혼합물

(57) 요약

본 발명은 복합첨가물을 포함하는 항산화성 키토산 혼합물에 관한 것으로, 키토산에 비타민 C 및 초산(acetic acid)과 같은 유기산을 복합 첨가시킴으로써, 우수한 지방 축적 억제 효과, 체중 증가 감소효과, 체내에 지방 조직의 축적 억제에 대한 효과를 제공하도록 하고, 항비만의 증진 효과뿐만 아니라 항산화활성 효과도 증진시킬 수 있도록 하는 발명에 관한 것이다.

대표도



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 000308730108

부처명 식품영양학과

연구관리전문기관

연구사업명 산학연공동기술개발사업

연구과제명 키토산이 함유된 다이어트 복합기능

기여율

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2008년 07월 01일 ~ 2009년 6월 30일

특허청구의 범위

청구항 1

키토산에 비타민 C 및 유기산이 복합 첨가물로서 혼합된 것을 특징으로 하는 항산화성 키토산 혼합물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 혼합물은 키토산 100 중량부에 대하여, 상기 비타민 C 1 ~ 25 중량부 및 상기 유기산 1 ~ 25 중량부가 혼합되는 것을 특징으로 하는 항산화성 키토산 혼합물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 유기산은 초산(acetic acid), 구연산(citric acid), 젖산(lactic acid), 말레산(maleic acid) 및 주석산(tartaric acid) 중 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 항산화성 키토산 혼합물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 복합첨가물을 포함하는 항산화성 키토산 혼합물에 관한 것으로, 키토산에 비타민 C 및 초산(acetic acid)과 같은 유기산을 복합 첨가시킴으로써, 키토산의 항비만 효과를 증진시킬 수 있도록 하는 기술에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 들어 비만 인구가 점점 증가함에 따라 비만과 관련된 여러 질환들의 발병률 또한 증가하고 있어 비만 치료에 대한 관심이 고조되고 있다. 비만인을 대상으로 한 식사요법, 운동요법, 행동수정요법 등은 장기간 지속하는데 어려움이 많고 5년 안에 실패할 확률이 95% 정도로 보고되고 있다. 이에 체중 감량을 위해 또는 체중 감량 프로그램에 잘 따르도록 하기 위해 보조적인 요법이 요구되고 있다.

[0003] 보조적인 요법으로 비만 치료 약제의 사용은 1930년대부터 시작되어 왔으나 심각한 부작용으로 인해 진전이 없다가 1995년 이후 비만과 관련된 유전자의 생화학적 경로와 표적 기관이 알려짐에 따라 새로운 약제의 개발이 활발히 진행되고 있다. 현재 임상에서 사용되고 있는 비만 치료 약제 중 FDA(Food and Drug Administration)에서 승인을 받은 것은 식욕 억제제인 시부트라민(Sibutramine)과 지방 흡수 억제제인 오르리스타트(Orlistat)가 있다. 그러나 시부트라민 복용시 혈압과 맥박이 상승될 수 있으며 그 밖에 입 마름, 식욕 부진, 변비, 불면, 어지러움 등의 부작용이 보고되고 있고 오르리스타트는 지방변, 복부 팽만감 등 소화기계 이상과 지용성 비타민 E와 K, β -carotene의 혈중 농도 저하 등이 나타날 수 있다. 또한 시부트라민과 오르리스타트를 비롯한 대부분의 약제들에 의한 체중 감량은 약 6개월 이후 정체를 이루는데 그 이유에 대해서는 아직 알려져 있지 않으나 시상하부에 대한 뇌피질 중추에 내성이 생기는 것으로 생각되고 있다.

[0004] 상기한 바와 같이, 약제의 부작용과 한계로 인한 불신으로 식품에 대한 새로운 해석이 이루어지고 있으며, 기초과학과 생명 공학의 발달로 생체 활성 효능 검증이 용이해짐에 따라 인체에 무해하며, 약제와 유사한 작용을 하는 기능성 다이어트 식품 소재에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0005] 수많은 천연물로부터 새로운 활성을 갖는 물질을 찾아내며 또한 독특한 성분과 구조적으로 유사한 유도체를 화

학적으로 합성함으로써, 개선된 효능과 안전성을 갖는 식품 소재를 얻을 수 있게 되었다. 이에 항비만 효과가 있는 비자극적인 식품 소재 중 하나인 식이 섬유소의 생리적, 기능적 역할에 대한 기대가 높아지고 있다.

[0006] 식이 섬유소의 함유 비율이 높은 차전자피(Psyllium)는 질경이과에 속하며 주로 야생에 자생되는 질경이 씨앗의 껍데기로 물에 넣으면 점액층을 형성하며 겔과 같은 모양을 하고 있다. 차전자피는 자신의 무게보다 무려 40배나 되는 수분을 흡수하는데 흡수한 수분은 결코 내놓지 않는 특징이 있다. 즉, 차전자피는 부피가 크게 팽창하여 장벽에 붙은 불순물을 배설시켜 숙변을 없애고 배설물을 깨끗이 배설시키므로 변의 양을 증가시킨다. 게다가 차전자피는 장관벽에 작용하여 연동 운동을 촉진시켜 대장의 운동 리듬을 되살려주며 배설하기에 알맞은 변의 크기를 유지해 준다. 또한, 변의 양을 늘려주는 작용을 하기 때문에 의존성이나 부작용의 우려가 없다.

[0007] 아울러, 차전자피는 담즙산 및 중성 스테로이드 배설량을 증가시켜 혈중 콜레스테롤 수치를 감소시키는 효과도 보고되고 있다.

[0008] 한편, 식이 섬유와 구조가 유사하여 동물성 식이 섬유로 알려져 있는 키토산(chitosan)은 다양한 생리 기능이 가진 천연고분자물질로 인체는 물론 환경 오염에 영향을 미치지 않아 식품, 화장품 및 의료 소재로 이용되고 있다. 특히, 식품 분야에 있어 키토산은 지방 결합력이 식이 섬유보다 훨씬 강하여 장내 지방 흡수를 줄이고 혈중 콜레스테롤 수준을 감소시켜, 고콜레스테롤혈증 및 동맥경화증에 효과가 있는 것으로 보고되면서 여러 식품들에 첨가되어 품질과 기능을 향상시키고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 최근 이러한 키토산의 지방 결합력으로 인한 지방 소화 억제 효과는 체중 감량을 초래하는 것으로 보고되고 있다.

[0009] 그러나 차전자피와 키토산은 체중 감량에 대한 명확한 기전에도 불구하고 효과적인 측면에 있어 작용이 미미하다는 단점이 있다. 따라서 부작용이 없이 차전자피와 키토산의 체중 감량 효과를 증진시킬 수 있는 촉진제의 발견이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0010] 본 발명은 키토산의 지질 대사 작용을 촉진시킬 수 있는 첨가물을 개발하고, 그 적정성을 확인할 수 있는 실험을 실시함으로써, 인체내에서 체중 및 체지방 감량 효과를 증진 효과 및 항산화 작용 증진 효과를 갖는 항산화성 키토산 혼합물을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

과제 해결수단

[0011] 본 발명에 따른 복합첨가물을 포함하는 항산화성 키토산 혼합물은 키토산에 비타민 C 및 유기산이 첨가된 것을 특징으로 한다.

[0012] 여기서, 상기 혼합물은 키토산 100 중량부에 대하여, 상기 비타민 C 1 ~ 25중량부 및 상기 유기산 1 ~ 25중량부가 혼합되는 것을 특징으로 하고, 상기 유기산은 초산(acetic acid), 구연산(citric acid), 젖산(lactic acid), 말레산(maleic acid) 및 주석산(tartaric acid) 중 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 한다.

효 과

[0013] 상기와 같은 구성 및 바람직한 실시예를 가지는 본 발명 복합첨가물을 포함하는 항산화성 키토산 혼합물은 유기산 및 비타민 C를 복합 투여함으로써, 우수한 지방 축적 억제 효과, 체중 증가 감소효과, 체내에 지방 조직의 축적 억제에 대한 효과를 제공한다.

[0014] 아울러, 본 발명에 의해 비타민 C 및 초산의 복합 첨가가 키토산의 항비만 효과를 증진시킬 수 있고, 항비만의 증진 효과뿐만 아니라 항산화활성 효과도 증진시킬 수 있는 효과를 제공한다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0015] 상기와 같은 기술적 과제를 해결하기 위하여 본 발명에서는 먼저, 비타민 C가 키토산의 지질 대사 작용을 촉진

하는 효과가 있음을 검증하였다. 그 결과, 비타민 C를 첨가한 키토산이 인체내에서 체중 및 체지방 감량 효과를 증진시키는 것으로 나타났다.

[0016] 이에 본 발명에서는 기니피그와 쥐를 대상으로 키토산의 체중 및 체지방 감량에 대한 대사 작용을 증진시키는 비타민 C를 포함하는 복합 첨가물의 기능을 살펴보고, 또한 복합 첨가물을 포함하는 키토산이 비만의 원인이 되는 산화 스트레스 감소에 미치는 영향을 알아보고자 항산화 작용에 대한 실험을 하였다.

[0017] 이하, 첨부된 도면 및 도표들을 참조하여 본 발명에 따른 복합 첨가물을 포함하는 키토산에 관하여 상세하게 설명하는 것으로 한다.

[0018] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 첨부되는 도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다. 명세서 전체에 걸쳐 동일 참조 부호는 동일 구성요소를 지칭한다.

[0019] 본 발명 일실시예에 따른 복합첨가물을 포함하는 항산화성 키토산 혼합물은 키토산에 비타민 C 및 유기산이 첨가되도록 한다.

[0020] 이때, 키토산 100 중량부에 대하여, 비타민 C 1 ~ 25 중량부가 첨가되도록 하며, 유기산 1 ~ 25중량부가 혼합되도록 한다. 여기서, 비타민 C 및 유기산 중 하나라도 생략되면, 항산화성이 현저하게 감소하고, 비타민 C 가 1 중량부 미만으로 첨가되면 항비만 특성이 감소되고, 25 중량부 이상이 첨가되더라도 첨가량 대비 항비만 특성 증진 효과가 미미해지므로, 증량의 실익이 떨어진다.

[0021] 아울러, 유기산이 1 중량부 미만으로 첨가되면 항산화성이 감소되고, 25 중량부 이상이 첨가되더라도, 첨가량 대비 항산화성 증진의 실익이 떨어질 수 있다.

[0022] 이러한 첨가비율의 유의적 의의에 대해서는 아래의 실험예들을 통하여 설명될 수 있도록 하며, 유기산은 초산(acetic acid), 구연산(citric acid), 젖산(lactic acid), 말산(maleic acid) 및 주석산(tartaric acid) 중 선택되는 하나 이상의 것을 사용하는 것이 바람직하다.

[0023] 먼저, 본 발명에서 사용한 키토산은 5종류로 키토산(세롬바이오, 한국), 상하이나이스 키토산(중국), 경화상사(한국) 키토산, 미래바이오텍 키토산(한국), 유후환(중국) 키토산을 각각 구입하여 실험에 사용하였으며, 오일 구속력(oil binding capacity) 실험을 위한 기름은 대두유(해표 식용유)를 사용하였다. 그 외에 분석에는 일급 이상의 시약을 사용하였다.

[0024] 1. 키토산특성 평가

[0025] 키토산의 특성을 평가하고자 오일 구속력, 담즙산 구속력, 탈아세틸화 정도 및 팽윤정도를 다음과 같은 방법을 사용하여 측정하였다.

[0026] 먼저, 오일 구속력(oil binding capacity) 실험을 위해서, 키토산 20mg을 0.6M HCl 2mL로 녹인다.

[0027] 다음에는, 대두유 25g을 첨가한 후, 2시간 동안 항온수조에서 37℃로 흔들어 준다.

[0028] 그 다음에는, 2시간 후에 10mM 인산염 완충제(phosphate buffer, pH 7.4) 8mL을 첨가한다.

[0029] 그 다음에는, 1M NaOH를 이용하여 pH를 7.0으로 맞춘 후, 다시 30분간 항온수조에서 배양한다. 30분 후에 3000 rpm에서 10분간 원심분리를 한 후, 상정액을 취한다. 침전물의 무게 및 키토산의 양으로 키토산의 오일 구속력(oil binding capacity)을 측정한다.

[0030] 다음으로, 담즙산 구속력(bile acid binding capacity) 측정을 위해서, 키토산을 0.01M HCl 2mL에 용해시킨 후

한 시간 정도 흔들어 준다.

[0031] 다음에는, pH를 7.0으로 맞춘 후, 10mM 인산염 완충제(phosphate buffer, pH 7.4) 5mL에 담즙산 5mL을 녹이고 다시 한 시간 동안 흔들어 준다.

[0032] 그 다음에는, 샘플을 1g 취한 뒤 70% 황산(sulfuric acid) 5mL를 첨가하고 5분간 배양시킨 후, 25% 푸르푸랄(furfural) 1mL을 첨가한 뒤 한 시간 정도 방치했다가 510nm에서 흡광도를 측정하여, 키토산의 담즙산 구속력(bile acid binding capacity)을 측정한다.

[0033] 다음으로, 탈아세틸화 정도(Deacetylation degree) 측정을 위해서, 키토산 0.5g을 5% 초산(초산(acetic acid))에 녹인 다음 5% 초산을 더 첨가하여 키토산-초산 용액의 총량이 100mL가 되도록 한다.

[0034] 다음에는, 키토산-초산 용액 1mL을 취하여 D.W를 30mL 가한 다음 0.0025N PVS-K(potassium polyvinyl sulfate solution)로 적정한다. 이때, 지시약으로 1% 톨루이딘 블루(toluidine blue)를 사용한다.

[0035] 그 다음에는, 하기 수학적식 1 내지 수학적식 3을 이용하여 탈아세틸화 정도(Deacetylation degree, DD(%))를 측정한다.

[0036] [수학적식 1]

$$X = f0.0025 \frac{1}{1000} v161$$

[0037]

[0038] [수학적식 2]

$$Y = 0.5 \frac{1}{100} - X$$

[0039]

[0040] [수학적식 3]

$$DD(\%) = \frac{X/161}{(X/161)+(Y/203)} \times 100(\%)$$

[0041]

[0042] 다음으로, 팽윤 정도(Swelling capacity) 측정을 위해서, 키토산 0.4g 취한 다음 10mM 인산염 완충 용액(phosphate buffer solution)에 녹인 다음, 37℃에서 8시간 동안 흔들어 준다. 그 후, 침전물의 양을 구한 다음 팽윤 정도(volume of sediment/weight of sample)(mL/g)를 계산한다.

[0043] 2. 키토산의 특성 평가 결과

[0044] 키토산의 항비만 효과는 상술한 바와 같이 키토산의 오일 구속력(oil binding capacity), 담즙산 구속력(bile acid binding capacity) 등 키토산의 특성이 주요한 영향을 미친다.

[0045] 따라서 본 발명에서는 5가지 키토산의 특성을 먼저 평가하였다. C-1(새롭바이오 키토산), C-2(경화상사 키토산), C-3(미래바이텍 키토산), C-4(유후환 키토산), C-5(상하이나이스캠 키토산)을 측정 대상으로 하였으며, 도 1은 본 발명에 따른 키토산의 오일 구속력(oil binding capacity)을 각각 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

[0046] 도 1을 참조하면, C-5에 해당하는 상하이나이스캠 키토산의 흡착능력이 가장 우수하였다. 그리고, C-2(경화상사 키토산), C-3(미래바이텍 키토산), C-4(유후환 키토산)는 비슷한 오일 구속력(oil binding capacity)을 보였다.

[0047] 도 2는 본 발명에 따른 키토산의 팽윤 정도(Swelling capacity)를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

[0048] 각각 키토산의 팽윤 정도를 평가하였다. 키토산은 위산에 의해 용해된 후에 소장 에 이르러 소장의 pH 6.8에서

젤을 형성한다. 이때, 젤을 형성하면서 기름을 포집하여 체외로 배출하게 되는데 키토산의 팽윤 정도는 젤 형성에 중요한 인자로 여겨지고 있다.

[0049] 도 2를 참조하면, C-3(미래바이텍 키토산)와 C-5(상하이나이스캠 키토산)의 팽윤 정도가 가장 높았으며, 오일 구속력(oil binding capacity)이 비교적 높았던 C-4(유후환 키토산)의 팽윤 정도가 가장 낮았다.

[0050] 도 3은 본 발명에 따른 키토산의 탈아세틸화 정도를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

[0051] 키토산은 N-아세틸글루코사민과 글루코사민의 β -(1, 4) 글리코시드 결합으로 이루어진 공중합체이며 키토의 탈아세틸화 공정으로 얻을 수 있다. 키토의 탈아세틸화 공정은 키토산의 평균분자량과 탈아세틸화 정도를 조절할 수 있으며 일반적으로 키토의 중량평균분자량은 $1.03 \times 10^6 \sim 2.5 \times 10^6$ g/mole이지만 알칼리 가수분해에 의해 탈아세틸화된 키토산의 중량평균분자량은 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ g/mole이다. 이와 같이 탈아세틸화 반응은 분자량을 감소시키며, 키토의 근원과 탈아세틸화 공정의 조건에 따라 다르지만 일반적으로 탈아세틸화 정도가 30 ~ 95%인 키토산의 평균분자량은 300×10^3 에서 1000×10^3 g/mole 이상의 범위까지 나타난다.

[0052] 도 3을 참조하면, 본 발명에 따른 키토산은 73.6 ~ 77.2% 탈아세틸화 정도를 보였으며, 키토산간의 유의 차이는 없었다.

[0053] 이상의 결과에 의하면 5가지 종류의 키토산중 항비만 효과가 가장 높을 것으로 추정되는 상하이나이스캠 키토산을 선정하여 비타민 C와 유기산과 같은 복합첨가물에 의한 오일 구속력(oil binding capacity) 등의 상승 효과에 대해서는 다음과 같은 실험을 통해 각각 측정하였다.

[0054] 3. 키토산의 항비만 효과 실험

[0055] (1) 실험 동물

[0056] 본 발명에서는 6주령 웅성 하틀리 기니피그(Hartley guinea pigs, 310 ± 20 g) 36마리와 6주령 웅성 스프래그 다우리(Sprague-Dawley; SD) 쥐(160 ± 10 g) 48마리를 대상으로 하였으며, 실험 동물은 중앙실험동물(Central Lab Animal Inc., Korea)에서 공급받았다.

[0057] (2) 실험 처치

[0058] 실험 동물은 1주 동안 예비 사육으로 적응시킨 후 5 ~ 6주 동안 본 발명을 실시하였다. 실험 동물은 사육케이지(42cm×28cm)를 이용하였으며, 한 사육케이지에 기니피그 2마리, 쥐 4마리씩 사육하였다. 실험실의 온도는 22 ~ 24℃, 습도는 60%가 유지되며 밤낮 주기(12시간 빛(light)/12시간 어둠(dark))가 환경 조절 장치에 의해 조절되는 고려대학교 동물실에서 사육하였다.

[0059] 도 4의 본 발명에 따른 키토산 특성 실험의 표본 추출군 및 분석항목을 나타낸 개략도이다.

[0060] 상기 도 4에 따라 전 실험 기간 동안 물과 사료는 제한 없이 섭취하도록 하였다. 실험 동물은 무작위 표본 추출에 의하여 일반 식이 섭취군(control), 고지방 식이 섭취군(F-control), 키토산 5중량% 함유 고지방 식이 섭취군(chitosan-1), 키토산 5중량%와 비타민 C 0.5중량% 함유 고지방 식이 섭취군(chitosan-2), 키토산 5중량%와 초산 0.3중량% 함유 고지방 식이 섭취군(chitosan-3), 키토산 5중량%와 비타민 C 0.25중량% + 초산 0.15중량% 함유 고지방 식이 섭취군(chitosan-4)으로 분류하였다. 실험 기간 동안의 식이 섭취량은 전 기간을 통하여 매주 2회, 체중은 1회 일정한 시간에 측정하였다.

[0061] 하기 표 1은 기니피그 그룹의 실험 식단 구성을 나타낸 표이고, 표 2는 쥐 그룹의 실험 식단 구성을 나타낸 표이다.

[0062] [표 1] Composition of the experimental diets in guinea pigs

[0063]

(g/100g diet)

Ingredient	Control	F-control	Chitosan-1	Chitosan-2	Chitosan-3	Chitosan-4
Soybean protein	19.5	22.8	22.8	22.8	22.8	22.8
Corn starch	11	7	7	7	7	7
Cellulose	12	14	9	9	4	4
Sucrose	44	28	28	28	28	28
Fat mixture ¹⁾	5.1	19	19	19	19	19
Cholesterol	0.15	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17
Mineral mixture ²⁾	7.1	8.2	8.2	8.2	8.2	8.2
Vitamin mixture ³⁾	0.9	1	1	1	1	1
Chitosan	0	0	5	5	5	5
Acetic acid	0	0	0	0	0.3	0.15
Vitamin C	0.02	0.02	0.02	0.5		0.25

[0064]

[0065]

¹⁾ 지방 혼합물(Fat mixture): 24중량% 올리브 오일(olive oil), 49중량% 팜핵유(palm kernel oil) 및 27중량% 홍화유(safflower oil).

[0066]

²⁾ 미네랄 혼합물(Mineral mixture)(g/kg diet): Calcium Carbonate, 221.32; Calcium Phosphate Dibasic, 301.00; Magnesium Sulfate · 7H₂O, 224.27; Potassium Chloride, 169.68; Sodium Chloride, 73.77; Ferric Citrate (16~17중량% Fe), 5.16; Manganese Sulfate · H₂O, 2.36; Zinc Carbonate, 1.48; Cupric Sulfate · 5H₂O, 0.59; Chromium Potassium Sulfate · 12H₂O, 0.32; Potassium Iodide, 0.03; Sodium Selenite, 0.02.

[0067]

³⁾ 비타민 혼합물(Vitamin mixture): ICN Vitamin mixture(Thiamin HCl, 0.3; Riboflavin, 0.4; Pyridoxine HCl, 0.4; Niacin, 1.1; Calcium Pantothenate, 2.0; Folic Acid, 0.4; Biotin, 0.04; Vitamin B₁₂ (0.1중량%), 1.0; Vitamin A Palmitate (500,000 IU/g), 5.0; Vitamin D₃ (400,000 U/g), 0.26; Vitamin E Acetate (500 U/g), 10.0; Menadione Sodium Bisulfite, 0.8; Sucrose, finely powdered 978.30.

[0068]

[표 2] Composition of the experimental diets in rats

[0069]

(g/100g diet)

Ingredient	Control	F-control	Chitosan-1	Chitosan-2	Chitosan-3	Chitosan-4
Casein	19.6	26.2	26.2	26.2	26.2	26.2
Corn starch	56.6	27.6	27.6	27.6	22.6	22.6
Cellulose	5	5	0	0	0	0
Sucrose	9.95	9.95	9.95	9	9.95	9
Lard	0	22.4	22.4	22.4	22.4	22.4
Soybean oil	4	4	4	4	4	4
Mineral mixture ¹⁾	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture ²⁾	1	1	1	1	1	1
L-methionine	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Chitosan	0	0	5	5	5	5
Acetic acid	0	0	0	0	0.3	0.15
Vitamin C	0.05	0.05	0.05	0.5	0.05	0.25

[0070]

[0071]

¹⁾ 미네랄 혼합물(Mineral mixture)(g/kg diet): CaPO₄ · 2H₂O, 145.6; KH₂PO₄, 257.2; NaH₂PO₄, 93.5; NaCl, 46.6; calcium lactate, 350.9; ferric citrate, 31.8; MgSO₄, 71.7; ZnCO₃, 1.1; MnSO₄ · 4H₂O, 1.2; CuSO₄ · 5H₂O, 0.3; KI, 0.1.

[0072]

²⁾ 비타민 혼합물(Vitamin mixture): ICN Vitamin mixture(No 904654)

[0073]

(3) 혈액 분석

[0074]

12시간 동안 굶긴 실험 동물을 에틸 에테르(ethyl ether)로 마취시켜 희생시킨 후 흉강을 열고 대동맥에서 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 즉시 이디티에이(EDTA, ethylene diamine tetra초산(acetic acid))를 1.8mg/mL 넣은 시험관에 담은 후 4℃, 3,000×g에서 5분 동안 원심 분리 하여 상정액인 혈장을 취하였다.

[0075]

다음으로, 혈액 자동 분석기(FUJI DRI-CHEM 3500, Fuju Photo Film Co., Japan)로 혈장내의 포도당(glucose),

중성 지방, 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤을 분석하였으며 LDL-콜레스테롤은 Friedwald 등(1972)의 계산식으로 계산하였다.

[0076] 그 다음, 혈장의 일부는 -20℃에서 냉동 보관하였다가 과산화 지질 및 항산화 반응 측정에 사용하였다.

[0077] (4) 장기 및 지방 조직의 무게

[0078] 혈액 채취 후 실험 동물을 해부하여 간(liver), 신장(kidney), 비장(spleen), 십이지장(duodenum), 회장(ileum), 공장(jejunum), 결장(colon), 맹장(cecum)과 신주의(Periental fat) 및 정소 상체 지방 조직(Epididymal fat)을 적출하여 무게를 측정하였다. 적출한 간은 0.15M NaCl로 씻고 여과지로 불순물을 제거한 후 5g의 취해 50mM 칼륨 인산염 완충제(potassium phosphate buffer, pH 7.0) 4.5mL에 넣고 균질기로 분쇄하였다. 분쇄된 현탁액은 4℃, 13,000×g에서 4분 동안 원심 분리 한 후 상정액의 부피를 측정하고 -20℃에서 냉동 보관하였다가 과산화 지질 및 항산화 반응 측정에 사용하였다.

[0079] (5) 과산화 지질

[0080] 혈장 및 간 조직내 과산화 지질의 함량 측정은 Ohkawa 등(1979)의 방법에 따라 실시하였다. 혈장 또는 간 조직 100μl에 10% 트라이클로로아세트산(trichloroacetic acid) 200μl를 넣고 15분간 실온에서 방치한 후 4℃, 2,200×g에서 15분간 원심 분리를 하였다. 상정액 200μl에 0.67% 티오바르비투릭산(thiobarbituric acid) 200μl를 첨가하여 혼합한 다음 100℃의 항온 수조에서 10분간 반응시키고 냉각하여 532nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 다음, MDA(Malondialdehyde)를 표준 물질로 하여 표준 곡선을 작성하였다.

[0081] (6) GSH(Glutathione reduced form) 함량

[0082] 혈장 및 간 조직내 GSH 함량 측정은 Tietz(1969)의 방법에 따라 실시하였다. 혈장 또는 간 조직에 동량의 5% 설포살리실린산(sulfosalicylic acid)을 첨가하고 4℃, 2,000×g에서 10분간 원심 분리를 하였다. 상정액 100μl에 0.3mM Na₂HPO₄ 800μl와 0.1% 구연산나트륨(sodium citrate)에 0.04%가 되도록 5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoic acid(DTNB)을 섞은 용액 100μl을 첨가하고 5분 후 412 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0083] (7) 2,2'-azinoabis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate)(ABTS) radical 소거능

[0084] 혈장 및 간 조직내 ABTS radical 소거능 측정은 Re 등(1999)의 방법에 따라 실시하였다. 7 mM ABTS에 2.45 mM 과황산칼륨(potassium persulfate)을 첨가하여 암소에서 실온으로 12 ~ 16시간 방치한 후 414nm에서 흡광도가 1.4 ~ 1.5가 되도록 증류수로 희석시켰다. 혈장 또는 간 조직 50μl에 희석된 ABTS radical 용액 1mL을 넣어 90분간 반응시키고 414nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS radical 소거능은 ascorbic acid equivalent antioxidant activity(AEAC)로 나타내는데 구하는 공식은 다음 수학적 4와 같다(Shui 및 Leong, 2002).

[0085] [수학적 4]

$$[0086] AEAC = (A_{\text{sample}} / A_{\text{aa}}) \times C_{\text{aa}}$$

[0087] A_{sample}: 시료의 흡광도 변화,

[0088] A_{aa}: vitamin C의 흡광도 변화,

[0089] C_{aa}: vitamin C의 농도(mg/ml)

[0090] (8) 통계 분석

[0091] 상술한 자료 처리는 SPSS program(ver. 10.0)을 이용하였다. 각 항목에 대한 평균(mean) 및 평균의 표준 편차

(standard deviation, SD)를 산출하였다. 그룹간 차이는 $p=0.05$ 수준에서 일원배치 변량분석(one-way ANOVA)로, 구체적인 사후 검정은 던칸 멀티플 레인지 테스트(Duncan's multiple range test)로 유의성을 검증하였다.

4. 복합첨가물을 포함하는 키토산의 오일 구속력(oil binding capacity)

키토산에 비타민 C를 첨가시 오일 구속력(oil binding capacity)이 증가되는 것으로 알려져 있다. 비타민 C 첨가시 키토산의 오일 구속력(oil binding capacity) 증가 기작은 정확히 알려져 있지 않지만 비타민 C의 염 형태인 나트륨(sodium) 또는 칼륨(potassium)을 함유하는 비타민 C는 오일 구속력(oil binding capacity) 증가 효과가 없는 것으로 보아 이는 pH 감소에 따른 효과 추정된다. 따라서 본 발명에서는 비타민 C 이외의 다른 유기산, 초산(acetic acid), 구연산(citric acid), 젖산(lactic acid), 말레산(maleic acid), 주석산(tartaric acid)을 각각 키토산에 첨가 하여 오일 구속력(oil binding capacity) 증가 효과를 측정하였다.

도 5는 본 발명에 따른 유기산을 포함하는 키토산의 오일 구속력을 나타낸 그래프이다.

도 5를 참조하면, 유기산 첨가시 키토산의 오일 구속력(oil binding capacity)이 일부 증가되는 것을 확인할 수 있다. 특히 비타민 C(Vita-C로 표기)첨가시 250mg까지 오일 구속력(oil binding capacity)이 증가되는 것을 알 수 있으며, 주석산(tartaric acid), 젖산(lactic acid) 첨가 시 오일 구속력(oil binding capacity)의 증가 효과를 얻을 수 있었고, 구연산(citric acid), 초산(acetic acid)와 말레산(maleic acid)을 각각 200mg, 150mg 과 200mg 첨가 시 오일 구속력(oil binding capacity)이 더 증가함을 확인하였다.

5. 고지방 식이 투여한 기니피그 군에서의 키토산과 유기산 첨가 효과

(1) 체중 증가율, 식이섭취 및 식이효율

비타민 C의 합성 능력이 없는 기니피그 군(guinea pigs)에 키토산과 더불어 비타민 C 0.05g/100g, 0.5g/100g 및 초산 0.3중량%, 비타민 C 0.25+초산 0.15g/100g을 투여하였을 경우, 고지방식이에 대한 키토산의 항비만 효과를 측정하였다.

하기 표 3은 기니피그 군에 대한 체중의 변화와 식이섭취량 및 식이섭취효율을 각각 측정한 결과를 나타낸 것이다.

[표 3] Body weight gain, food intake, and FER in guinea pigs fed high-fat diet.

Parameter	Control	F-control	Chitosan-1	Chitosan-2	Chitosan-3	Chitosan-4
Body weight gain (g/day)	1.98±0.91 ^b	5.38±2.07 ^a	4.01±2.39 ^{ab}	1.77±1.57 ^b	1.84±0.64 ^b	2.84±1.05 ^b
Food intake (g/day)	30.25±7.26	36.59±10.95	30.64±10.71	33.40±15.67	29.19±9.62	26.80±9.78
FER ¹⁾	0.065±0.013 ^b	0.147±0.019 ^a	0.131±0.022 ^a	0.053±0.010 ^b	0.063±0.007 ^b	0.106±0.011 ^a

¹⁾ FER = body weight gain/food intake.

Values are expressed as mean ± SD of 6 guinea pigs in each group.

Means with different letters within a row are significantly different ($p<0.05$).

chitosan-1: chitosan (5중량% chitosan), chitosan-2: chitosan (5중량% chitosan + 0.5중량% vitamin C), chitosan-3: chitosan (5중량% chitosan + 0.3중량% acetic acid), chitosan-4: chitosan (5중량% chitosan + 0.25중량% vitamin C + 0.15중량% acetic acid)

상기 표 3을 참조하면, 체중의 증가량은 고지방식이군(F-control)은 5.38g/day로 가장 높은 체중 증가량을 보인 반면, 정상식이군은 1.98g/day로 가장 낮은 체중 증가량을 보였다. 반면, 고지방식이에 키토산을 투여한 실험군

(chitosan-1, chitosan-2, chitosan-3 및 chitosan-4)은 chitosan-1군을 제외하고는 1.77 ~ 2.84g/day의 체중 증가량을 보였다. chitosan-1군은 F-control군 뿐만 아니라 실험군과의 체중증가량에 유의적인 차이를 보이지 않았으며, 실험군 역시 정상식이군인 control군과 체중증가량에서 유의적인 차이를 보이지 않았다. 키토산군에 비타민 C를 각각 0.05g/100g과 0.5g/100g 투여한 군인 chitosan-1과 chitosan-2군에서는 비타민 C투여에 따른 체중증가 감소 효과를 확인할 수 있었으며, 초산과 비타민 C+초산(acetic acid)를 투여한 그룹(chitosan-3 및 chitosan-4)에서도 체중증가 억제에 대한 효과를 확인하였다. 비타민 C첨가뿐만 아니라 초산(acetic acid) 또는 비타민 C+초산(acetic acid)군에서도 체중증가 억제 효과를 확인하였다.

[0107] 식이섭취량과 식이효율을 비교시, 식이섭취는 각 군사이에 유의적인 차이가 없었으나, 식이효율의 경우 정상 식이군(control), chitosan-2, chitosan-3과 F-control, chitosan-1, chitosan-4군 사이에는 사료섭취효율에 유의적인 차이를 보였으나($p<0.05$), 실험군과 정상 식이군 사이에는 일정한 경향을 보이지 않았다.

[0108] (2) 장기 및 지방 조직에 대한 영향

[0109] 하기 표 4는 기니피그 군에 고 지방 식이와 더불어 키토산과 차전자피를 투여시 각 군의 장기무게에 대한 영향을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

[0110] [표 4] Weights of liver, kidney, spleen, ileum, jejunum, duodenum, colon, and cecum (weight/100 g of body weight) of guinea pigs fed high-fat diet.

Organ	Control	F-control	Chitosan-1	Chitosan-2	Psyllium-1	Psyllium-2
Liver	3.75±0.80 ^b	4.35±0.75 ^b	4.55±0.51 ^b	5.76±1.25 ^a	4.34±0.76 ^b	4.25±0.20 ^b
Kidney	1.53±0.99 ^a	0.85±0.07 ^b	0.84±0.05 ^b	0.81±0.10 ^b	1.00±0.19 ^{ab}	0.86±0.04 ^b
Spleen	0.10±0.04 ^b	0.14±0.02 ^{ab}	0.14±0.02 ^{ab}	0.15±0.04 ^a	0.15±0.02 ^a	0.11±0.02 ^{ab}
Ileum	1.18±0.16 ^a	0.55±0.28 ^b	0.61±0.19 ^b	0.73±0.24 ^b	0.78±0.08 ^b	0.91±0.31 ^{ab}
Jejunum	3.57±0.16	3.42±0.09	4.15±0.83	3.31±0.90	3.20±0.44	4.32±1.21
Duodenum	0.39±0.07 ^a	0.48±0.16 ^{ab}	0.64±0.16 ^a	0.66±0.04 ^a	0.55±0.14 ^{ab}	0.50±0.07 ^{ab}
Colon	3.62±0.01	2.50±0.31	3.11±0.78	3.32±0.84	3.32±0.40	3.75±1.52
Cecum	18.72±6.42 ^a	10.39±1.67 ^b	13.77±2.69 ^{ab}	12.62±1.69 ^b	12.45±0.95 ^b	15.93±4.41 ^{ab}

[0111] Values are expressed as mean ± SD of 6 guinea pigs in each group.

[0113] Means with different letters within a row are significantly different ($p<0.05$).

[0114] chitosan-1: chitosan (5중량% chitosan), chitosan-2: chitosan (5중량% chitosan + 0.5중량% vitamin C), chitosan-3: chitosan (5중량% chitosan + 0.3중량% acetic acid), chitosan-4: chitosan (5중량% chitosan + 0.25중량% vitamin C + 0.15중량% acetic acid)

[0115]

[0116] 상기 표 4를 참조하면, 공장과 결장은 각 군 사이에 유의적인 차이가 없었으며, 키토산 투여군에서 맹장과 십이지장의 무게가 다소 증가하였으나, control 또는 F-control군과는 유의적인 차이가 없었다. 장기무게에 별다른 유의적 차이가 관찰되지 않음에 따라 실험군(chitosan-1, chitosan-2)에 사용하였던 키토산과 더불어 첨가하였던 비타민 C, 초산(acetic acid)의 안전성을 간접적으로 확인할 수 있었다.

[0117] 도 6은 키토산을 투여하였을 때 체내의 지방 축적에 대한 효과를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

[0118] 도 6을 참조하면, Perirenal fat과 epididymal fat의 함량이 chitosan-1과 chitosan-2에 비하여 chitosan-3와 chitosan-4의 지방축적정도가 낮았으나, 각 군 사이에 유의적인 차이($p<0.05$)는 없었다.

[0119] (3) 혈액내에 지방성분

[0120]

[0121] 하기 표 5는 기니피그 군(Guinea pig)에 식이섭취와 더불어 비타민 C를 투여한 군에서의 혈액지표 사이의 유의

적 차이를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

[표 5] Plasma lipid concentrations of guinea pig with high fat diet

Parameter (mg/dL)	Control	F-control	Chitosan-1	Chitosan-2	Chitosan-3	Chitosan-4
Glucose	203.8±35.3 ^a	119.5±25.2 ^b	127.3±24.8 ^b	177.4±77.4 ^{ab}	150.7±20.7 ^{ab}	165.2±33.6 ^{ab}
Total-cholesterol	103.7±39.1 ^{ab}	150.0±25.5 ^a	73.0±11.5 ^b	74.2±22.2 ^b	133.0±82.3 ^{ab}	137.8±44.9 ^{ab}
Triacylglycerol	141.8±69.9 ^{bc}	245.0±106.3 ^a	102.8±23.2 ^{bc}	96.6±33.0 ^c	191.3±7.4 ^{ab}	100.8±31.6 ^{bc}
HDL-Cholesterol	3.5±0.6 ^{bc}	1.8±1.4 ^b	3.3±0.5 ^{bcd}	2.0±1.0 ^{cd}	5.3±1.5 ^a	4.2±1.2 ^{ab}
LDL-cholesterol	135.9±77.4 ^{ab}	213.3±103.6 ^a	84.9±25.1 ^b	79.8±32.5 ^b	159.4±16.3 ^{ab}	81.3±18.4 ^b

Values are expressed as mean ± SD of six guinea pigs in each group.

Means with different letters within a row are significantly different (p<0.05).

표 5를 참조하면, F-control군에서의 콜레스테롤은 150.0mg/dL로 가장 높은 수치를 보였으며, 실험군들은 73.0 ~ 137.8mg/dL 수치를 보였다. 특히 chitosan-1, chitosan-2투여군은 chitosan-3, chitosan-4에 비하여 낮은 콜레스테롤 수치를 보였으나 chitosan-1, chitosan-2군과 chitosan-3, chitosan-4군 사이에 유의적인 차이가 없었다.

중성지방의 경우 F-control군에서의 245.0mg/dL로 가장 높은 수치를 보였으며, chitosan-1 및 chitosan-3에 비하여 chitosan-2 및 chitosan-4에서 낮은 중성지방 수치를 보임에 따라, 비타민 C는 식이섭취의 지방축적 억제에 상승효과를 가지고 있음을 확인하였으며, 초산(acetic acid)과 비타민 C 복합 사용시 중성지방의 수치가 감소하여 비타민 C처럼 키토산의 효과를 상승시키는 것을 확인 하였다. LDL 콜레스테롤의 수치에서도 역시 중성지방과 유사한 경향을 보였다.

(4) 과산화지질과 glutathione 함량에 미치는 영향

하기 표 6은 Vitamin C를 실험군에 각각 0.05와 0.5g/100g을 투여하므로, vitamin C가 지니는 항산화활성에 대한 효과를 과산화지질의 함량과 항산화활성을 지니는 glutathione(GSH)의 함량을 혈액과 간 조직에서 함량을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

[표 6] Lipid peroxides contents of plasma and liver in guinea pig with high-fat diet

Parameter	Sample	Control	F-control	Chitosan-1	Chitosan-2	Chitosan-3	Chitosan-4
TBARS	Plasma (mol/L)	5.28±1.98 ^{ab}	6.75±3.27 ^a	3.68±1.71 ^{bc}	2.64±0.84 ^{bc}	4.89±1.88 ^{abc}	1.92±1.33 ^c
	Liver (mol/g)	0.96±0.28	1.00±0.39	0.68±0.12	0.59±0.14	0.72±0.25	0.71±0.15
GSH	Plasma (mol/L)	164.8±65.5	123.9±31.8	163.8±73.7	186.4±25.9	153.8±90.1	193.5±72.8
	Liver (mol/g)	16.3±2.4 ^{ab}	7.6±2.7 ^d	13.2±4.3 ^{abc}	8.9±2.6 ^{cd}	10.2±3.0 ^{bcd}	16.6±3.0 ^a

TBARS(thiobarbituric acid reactive substances) content was calculated as the MDA(malondialdehyde) content.

Values are expressed as mean ± SD of six guinea pigs in each group.

Means with different letters within a row are significantly different (p<0.05).

표 6을 참조하면, 혈액에서의 과산화지질의 생성량은 비타민 C를 투여한 chitosan-2와 chitosan-4에서 가장 낮은 2.64와 1.92 μmol/L 수치를 보였으며, 비타민 C의 투여가 낮은 chitosan-1과 chitosan-3은 각각 3.68과

4.89 $\mu\text{mol/L}$ 로 비교적 높은 수치를 보였다. 반면, 간 조직에서의 과산화지질의 함량은 각 군 사이에 유의적인 차이가 없었다.

[0137] Glutathione 함량의 변화는 혈액에서는 각 군사이에 유의적인 차이가 없었으나, 간에서는 chitosan-1과 chitosan-4군에서 각각 13.2와 16.6 $\mu\text{mol/L}$ 의 수치를 보인 반면, F-control에서는 7.6 $\mu\text{mol/L}$ 함량으로 유의적인 차이를 보였다($p<0.05$).

[0138] 키토산에 비타민 C를 첨가한 결과 비타민 C가 지닌 항산화효과가 나타남을 확인하였다. 비타민 C는 키토산의 항비만 효과에 대한 상승효과뿐만 아니라 항산화활성을 부여하는 것을 확인하였으며, 비타민 C와 더불어 초산(acetic acid)를 복합 사용시에도 비타민 C 단독 사용한 경우보다 다소 낮은 농도를 첨가하였음에도 불구하고 유사한 항비만효과와 항산화효과를 지님을 확인하였다.

[0139] (5) 항산화활성에 미치는 영향

[0140] 도 7은 고 지방 식이와 더불어 vitamin C를 각각 투여한 실험군과 대조군 사이의 항산화활성을 측정한 그래프이다.

[0141] 도 7을 참조하면, 항산화활성은 AEAC값으로 환산하여 표시함에 따라 AEAC값이 높을수록 항산화활성이 높은 것을 의미한다. 따라서 혈액과 간에서의 항산화활성은 실험군(chitosan-1, chitosan-2, chitosan-3 및 chitosan-4)에서 대조군(control 및 F-control)에 비하여 높은 AEAC값, 즉 높은 항산화활성을 보였으나 실험군간에 유의적인 차이는 없었다. chitosan-3과 chitosan-4는 F-control과 비교시 유의적인 차이를 보였다.

[0142] 혈액내에서 항산화효과는 비타민 C 첨가 보다는 초산(acetic acid) 또는 초산(acetic acid)+비타민 C의 병용 첨가가 F-control에 비하여 높은 항산화활성을 보였다. 간에서의 AEAC값은 각 실험군과 control, F-control군간의 유의적인 차이는 없었다.

[0143] 6. 고지방식이 투여한 쥐 군 에서의 키토산과 초산 첨가효과

[0144] (1) 체중 증가율, 식이섭취 및 식이효율

[0145] 비타민 C의 합성 능력이 있는 쥐 군(SD rats)에 키토산과 더불어 비타민 C 0.05g/100g과 0.5g/100g, 초산(acetic acid) 0.3g/100g, 초산(acetic acid) 0.3g+ 비타민 C 0.25g/100g 투여하였을 경우, 고지방식이에 대한 키토산에 초산 첨가에 따른 항비만 효과를 측정하였다.

[0146] 하기 표 7은 쥐 군에 대한 체중의 변화와 식이섭취량 및 식이섭취효율을 각각 측정한 결과를 나타낸 것이다.

[0147] [표 7] Body weight gain, food intake, and FER in rats fed the diets

Parameter	Control	F-control	Chitosan-1	Chitosan-2	Chitosan-3	Chitosan-4
Body weight gain (g/day)	4.60±0.22 ^{bc}	5.68±0.50 ^a	4.76±0.84 ^{bc}	4.08±0.58 ^c	5.08±0.11 ^b	4.64±0.52 ^{bc}
Food intake (g/day)	21.69±3.24 ^b	19.27±2.35 ^b	18.44±1.57 ^b	26.02±6.29 ^a	17.82±2.47 ^b	21.06±4.19 ^b
FER	0.21±0.07 ^{ab}	0.29±0.02 ^a	0.26±0.05 ^{ab}	0.16±0.09 ^b	0.29±0.04 ^a	0.22±0.01 ^{ab}

[0148]
[0149] FER = body weight gain/food intake.

[0150] Values are expressed as mean $\pm$ SD of 8 rats in each group.

[0151] Means with different letters within a row are significantly different ($p<0.05$).

[0152] 표 7을 참조하면, 체중의 증가량은 고지방식이군(F-control)은 5.68g/day로 가장 높은 체중 증가량을 보인 반면, 정상식이군은 4.60g/day로 비교적 낮은 체중 증가량을 보였다. 반면, 비타민 C가 상대적으로 많은 양이 투여한 군인 chitosan-2 및 chitosan-4군은 4.08, 4.64g/day로 비타민 C가 0.05g/100g 투여군(chitosan-1 및 chitosan-3)에 비하여 낮은 체중 증가량을 보였다. 비타민 C와 더불어 초산(acetic acid)의 체중증가 억제에

대한 상승효과 및 초산(acetic acid)와 비타민 C 복합 사용 시 항비만에 대한 상승효과를 보였다.

[0153] 식이섭취량의 경우 chitosan-2군에서 약간 높은 사료섭취량을 보인 반면, 나머지 군 사이에는 유의적인 차이가 없었다. 식이효율은 실험군인 chitosan-2와 chitosan-3에서는 유의적인 차이를 보였다($p<0.05$).

[0154] (2) 장기 및 지방 조직의 무게에 대한 영향

[0155] 하기 표 8은 쥐 군에 고지방식이와 더불어 키토산과 차전자피를 투여시 각 군의 장기무게에 대한 영향을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

[0156] [표 8] Weights of liver, kidney, spleen, ileum, jejunum, duodenum, colon, and cecum (weight/100 g of body weight) of rats fed high-fat diet.

Organ	Control	F-control	Chitosan-1	Chitosan-2	Chitosan-3	Chitosan-4
Liver	3.29±0.33 ^{ab}	3.33±0.37 ^a	3.34±0.14 ^a	3.25±0.15 ^{ab}	3.00±0.48 ^{ab}	2.89±0.19 ^b
Kidney	0.62±0.24	0.66±0.06	0.70±0.06	0.75±0.08	0.68±0.05	0.70±0.03
Spleen	0.18±0.01	0.16±0.02	0.17±0.03	0.17±0.02	0.17±0.02	0.17±0.02
Ileum	0.32±0.10 ^{bc}	0.28±0.03 ^c	0.41±0.14 ^{abc}	0.58±0.10 ^a	0.49±0.22 ^{ab}	0.41±0.15 ^{abc}
Jejunum	3.57±0.16	3.42±0.09	4.15±0.83	3.31±0.90	3.20±0.44	4.32±1.21
Duodenum	0.20±0.09	0.20±0.05	0.24±0.05	0.23±0.06	0.22±0.05	0.24±0.04
Colon	0.33±0.09 ^c	0.53±0.14 ^{ab}	0.50±0.33 ^{ab}	0.76±0.32 ^a	0.71±0.21 ^a	0.75±0.30 ^a
Cecum	1.17±0.32 ^{ab}	0.94±0.16 ^b	1.15±0.06 ^b	1.46±0.19 ^a	1.10±0.22 ^b	1.44±0.28 ^a

[0157] Values are expressed as mean ± SD of 8 rats in each group.

[0159] Means with different letters within a row are significantly different ($p<0.05$).

[0160] 신장(kidney), 비장(spleen), 공장(jejunum)과 십이지장(duodenum)은 각 군사이에 유의적인 차이가 없었으며, chitosan-2와 chitosan-4에서 맹장(cecum)의 무게가 다소 증가하였으나, control또는 F-control군과는 유의적인 차이가 없었다. 장기무게에 별다른 유의적 차이가 관찰되지 않음에 따라 실험군에 사용하였던 키토산과 더불어 비타민 C, 초산(acetic acid)의 안전성을 간접적으로 확인할 수 있으며, 그 결과는 아래의 도 8과 같이 나타난다.

[0161] 도 8은 식이섭취를 투여하였을 때 체내의 지방 축적에 대한 효과를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

[0162] 도 8을 참조하면, Perirenal fat의 함량은 F-control을 제외한 나머지 군사이에서는 유의적인 차이가 없었으며, epididymal fat의 함량이 chitosan 투여군에 비하여 차전자피 투여군에서 낮은 함량을 보였으나, 두 군사이에 유의적인 차이는 없었다.

[0163] (3) 혈액내에 지방성분

[0164] 하기 표 9는 쥐 군에 식이섭취와 더불어 비타민 C 및 초산(acetic acid)을 투여한 군에서의 혈액지표 사이의 유의적 차이를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

[0165] [표 9] Plasma lipid concentrations of rats fed high-fat diet.

Parameter (mg/dL)	Control	F-control	Chitosan-1	Chitosan-2	Chitosan-3	Chitosan-4
Glucose	188.0±168.1	196.7±92.7	340.3±36.5	270.7±102.9	291.7±78.6	255.3±124.7
Total-cholesterol	77.0±11.1	70.3±10.5	65.8±14.2	74.7±18.0	57.3±10.2	55.7±15.0
Triacylglycerol	120.7±9.0 ^{ab}	135.0±12.1 ^a	127.3±21.4 ^a	124.3±11.4 ^{ab}	119.7±33.1 ^{ab}	86.7±23.8 ^b
HDL-Cholesterol	47.3±25.7	26.3±3.5	35.4±11.9	34.7±13.2	26.2±2.9	23.8±8.3
LDL-cholesterol	41.3±4.5 ^a	34.8±3.5 ^a	17.9±5.2 ^d	17.9±5.2 ^{bc}	19.2±4.3 ^{cd}	23.2±6.2 ^{cd}

[0166]

[0167] Values are expressed as mean ± SD of 8 rats in each group.

[0168] Means with different letters within a row are significantly different (p<0.05).

[0169] 표 9를 참조하면, 콜레스테롤의 수치는 각 군사이에 유의적인 차이가 없었으며, 중성지방의 수치는 F-control이 135.0mg/dL로 비교적 높은 수치를 보인 반면, 실험군인 chitosan 투여군에서는 86.7 ~ 127.3mg/dL의 수치를 보였다. 특히 chitosan-1, chitosan-2에 비하여 chitosan-3, chitosan-4군에서는 119.7과 86.7mg/dL의 함량을 보였다(p<0.05). 이때, F-control과 chitosan-3군 사이에는 유의적인 차이가 있었다. 비타민 C의 투여량에 대한 효과는 유의적인 차이는 없었으나 중성지방 축적 억제에 대한 상승효과를 가지고 있었고, 초산(acetic acid)+비타민 C 복합 투여시 중성지방 축적 억제 효과가 우수하였다.

[0170] (4) 과산화지질과 glutathione 함량에 미치는 영향

[0171] 하기 표 10은 비타민 C를 실험군에 각각 0.05와 1g/100g을 투여하고, 비타민 C가 지니는 항산화활성에 대한 효과를 과산화지질의 함량과 항산화활성을 지니는 glutathione(GSH)의 함량을 혈액과 간 조직에서 함량을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

[0172] [표 10] Lipid peroxides and glutathione contents of plasma and liver in rats fed high-fat diet.

Parameter	Sample	Control	F-control	Chitosan-1	Chitosan-2	Chitosan-3	Chitosan-4
TBARS	Plasma (μmol/L)	2.10±0.77 ^b	5.23±2.41 ^a	5.03±2.55 ^a	3.68±0.86 ^{ab}	2.83±1.33 ^{ab}	2.40±0.66 ^b
	Liver (μmol/g)	0.76±0.65 ^b	2.29±0.85 ^a	0.98±0.51 ^b	0.86±0.16 ^b	1.26±0.39 ^b	1.23±0.18 ^b
GSH	Plasma (μmol/L)	141.7±46.6	104.9±7.5	163.8±73.7	176.4±15.2	138.6±82.9	143.9±36.4
	Liver (μmol/g)	16.9±10.8 ^{ab}	8.5±3.1 ^b	11.2±3.1 ^b	16.6±9.9 ^{ab}	9.9±3.9 ^b	22.1±5.9 ^a

[0173]

[0174] Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) content was calculated as the malondialdehyde (MDA) content.

[0175] Values are expressed as mean ± SD of 8 rats in each group.

[0176] Means with different letters within a row are significantly different (p<0.05).

[0177] 표 10을 참조하면, 혈액에서의 과산화지질의 생성량은 실험군에서는 비타민 C를 과량 투여한 chitosan-2와 chitosan-4에서 가장 낮은 3.68, 2.40 μmol/L 수치를 보였으며, 비타민 C의 투여가 낮은 chitosan-1과 chitosan-3은 각각 5.03과 2.83 μmol/L로 비교적 다소 높은 수치를 보였다. 반면, 간조직에서의 F-control이 2.29 μmol/L인 반면 실험군은 0.86 ~ 1.2 μmol/L의 함량으로 유의적인 차이를 보였다(p<0.05).

[0178] Glutathione 함량의 변화는 혈액에서는 각 군사이에 유의적인 차이가 없었으나, 간에서는 chitosan-2과

chitosan-4군에서 각각 16.6와 22.1 $\mu\text{mol/L}$ 의 수치를 보인 반면, F-control에서는 8.5 $\mu\text{mol/L}$ 함량을 보였으며, 이때 chitosan-4와 F-control 군 사이에 유의적인 차이를 보였다($p<0.05$). Guinea pig에서도 이와 유사한 결과를 보였다. 초산(acetic acid)나 비타민 C 단독 사용한 경우 보다 초산(acetic acid)과 비타민 C를 복합 사용하는 것이 항비만 효과뿐만 아니라 항산화 증진 효과가 있음을 확인하였다.

[0179] (5) 항산화활성에 미치는 영향

[0180] 도 9는 고지방식이와 더불어 비타민 C를 각각 투여한 실험군과 대조군 사이의 항산화활성을 측정한 그래프이다.

[0181] 항산화활성은 AEAC 값으로 환산하여 표시함에 따라 AEAC값이 높을수록 항산화활성이 높은 것을 의미한다. 따라서 도 9를 참조하면 알 수 있는 바와 같이, 혈액과 간에서의 항산화활성은 chitosan-2 와 chitosan-4에서 대조군(control 및 F-control)에 비하여 높은 AEAC값, 즉 높은 항산화활성을 보였다.

[0182] 특히 chitosan-2, chitosan-4군은 control과 F-control의 중간정도의 항산화활성을 보였으며, 초산(acetic acid)과 비타민 C 병용 첨가는 첨가된 비타민 C의 농도가 0.25g으로 단독 투여한 경우 0.5g보다 낮은 양이 첨가하였음에도 불구하고 비타민 C 단독 투여와 동일한 효과를 보였다.

[0183] 간에서의 초산(acetic acid)와 비타민 C 병용 첨가는 비타민 C 단독 사용보다 높은 항산화활성을 보였다. 이상의 결과에 의하면 동물간의 개체 차이에도 불구하고 초산(acetic acid)이나 비타민 C 단독 사용 보다는 초산(acetic acid)과 비타민 C 복합 사용하는 것이 항비만 효과나 항산화 효과의 증진효과가 우수하였다.

[0184] 상술한 바와 같이 본 발명에 따른 복합첨가물을 포함하는 항산화성 키토산 혼합물은 항비만 상하이ना이스캠 키토산이 가장 우수할 것으로 판단되어 이를 기본 소재로 사용하였다. 아울러, 유기산에 대한 오일 구속력(oil binding capacity)를 측정한 결과 구연산(citric acid), 초산(acetic acid)에 비타민 C에 버금가는 항비만 상승효과를 지닌 것을 확인하였다.

[0185] 아울러, 키토산과 비타민 C, 초산(acetic acid) 단독투여 또는 복합 투여에 따른 항비만효과를 쥐 군과 기니피그 군에서 지방 축적 억제 효과를 측정한 결과, 체중 증가율에 있어서 두 실험동물에서는 비타민 C를 단독 투여군 보다는 초산(acetic acid)과 비타민 C 복합 투여한 군(chitosan-4)에서 체중증가 감소효과를 확인할 수 있었고, 체내에 지방 조직인 perirenal fat 과 epididymal fat의 축적 억제에 대한 효과는 복합 첨가물 사용에 따른 효과가 우수한 것으로 확인하였다. 또한 키토산의 효능으로 항산화 효과를 측정한 결과 비타민 C 단독 투여보다는 초산(acetic acid)와 비타민 C 복합 사용이 효과적임을 확인하였다.

[0186] 즉, 본 발명에 의해 비타민 C 및 초산(acetic acid)의 복합 첨가가 키토산의 항비만 효과를 증진시킬 수 있음이 확인 되었다. 특히, 비타민 C 첨가시 항비만의 증진 효과뿐만 아니라 항산화활성을 기대할 수 있었으며, 항산화 효과는 비타민 C 단독 투여 보다는 초산(acetic acid)와 복합 투여시 높은 항산화효과를 확인하였다.

[0187] 이상 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예들을 설명하였으나, 본 발명은 상기 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 제조될 수 있으며, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면의 간단한 설명

[0188] 도 1은 본 발명에 따른 키토산의 오일 구속력(oil binding capacity)을 각각 측정한 결과를 나타낸 그래프.

[0189] 도 2는 본 발명에 따른 키토산의 팽윤 정도(Swelling capacity)를 측정한 결과를 나타낸 그래프.

[0190] 도 3은 본 발명에 따른 키토산의 탈아세틸화 정도를 측정한 결과를 나타낸 그래프.

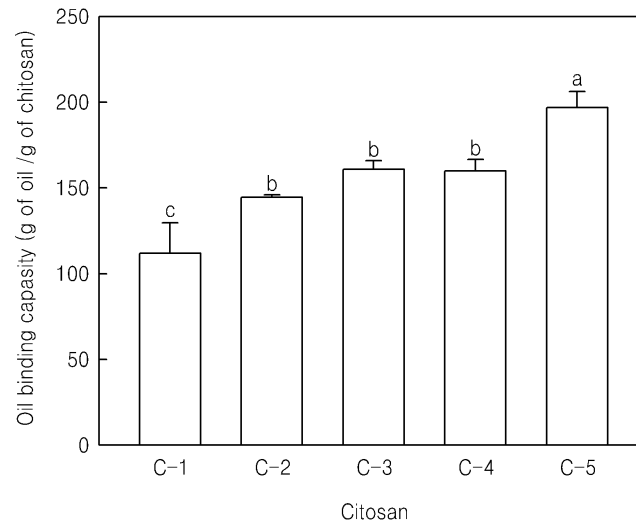
[0191] 도 4의 본 발명에 따른 키토산 특성 실험의 표본 추출군 및 분석항목을 나타낸 개략도.

[0192] 도 5는 본 발명에 따른 유기산을 포함하는 키토산의 오일 구속력을 나타낸 그래프.

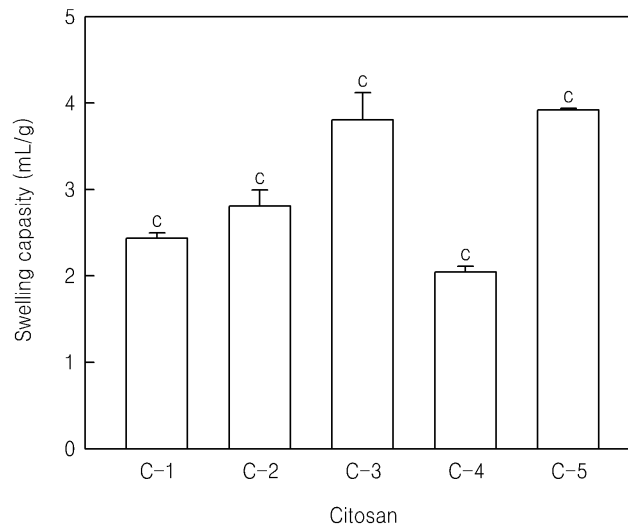
- [0193] 도 6은 키토산을 투여하였을 때 체내의 지방 축적에 대한 효과를 측정한 결과를 나타낸 그래프.
- [0194] 도 7은 고 지방 식이와 더불어 비타민 C를 각각 투여한 실험군과 대조군 사이의 항산화활성을 측정한 그래프.
- [0195] 도 8은 식이섬유를 투여하였을 때 체내의 지방 축적에 대한 효과를 측정한 결과를 나타낸 그래프.
- [0196] 도 9는 고지방 식이와 더불어 비타민 C를 각각 투여한 실험군과 대조군 사이의 항산화활성을 측정한 그래프.

도면

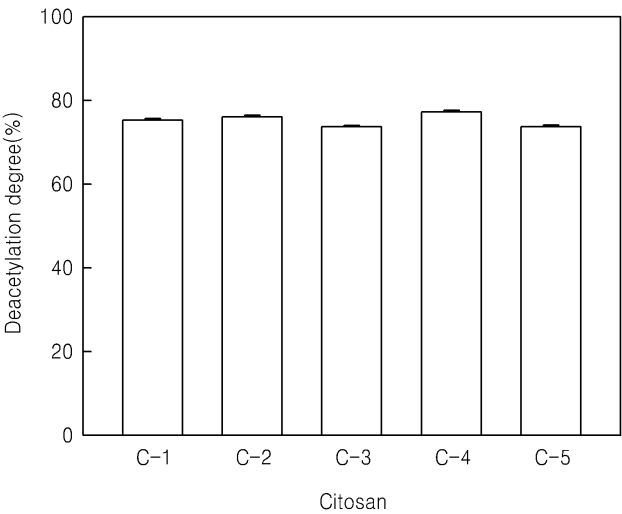
도면1



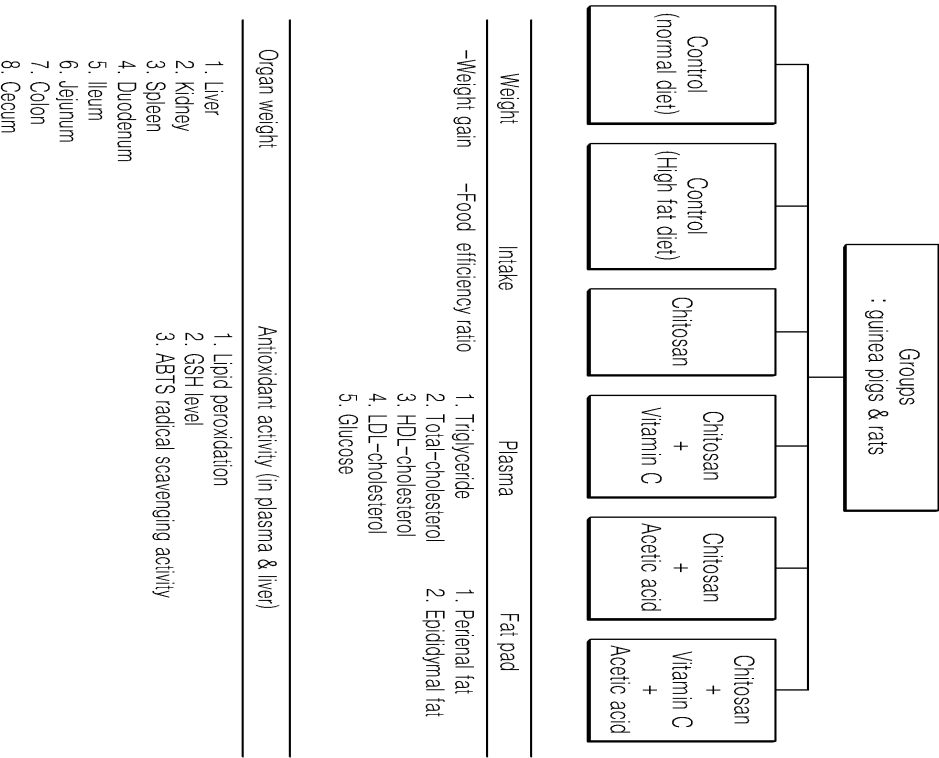
도면2



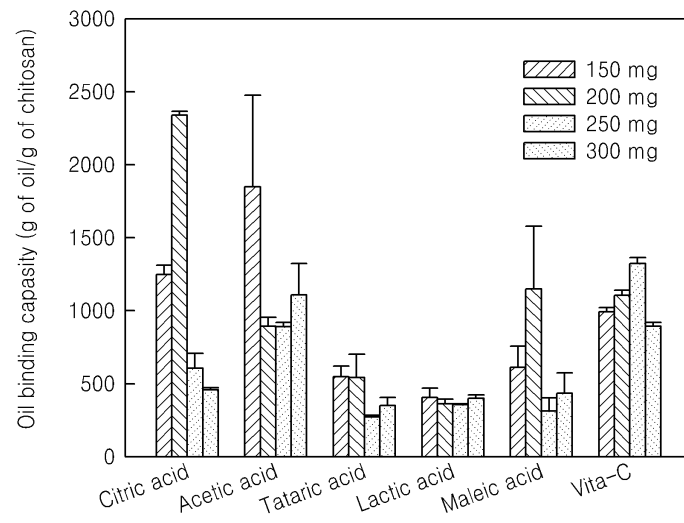
도면3



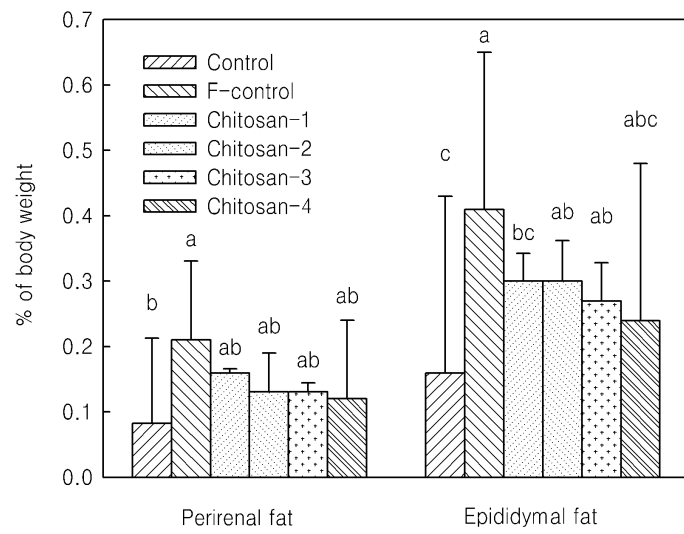
도면4



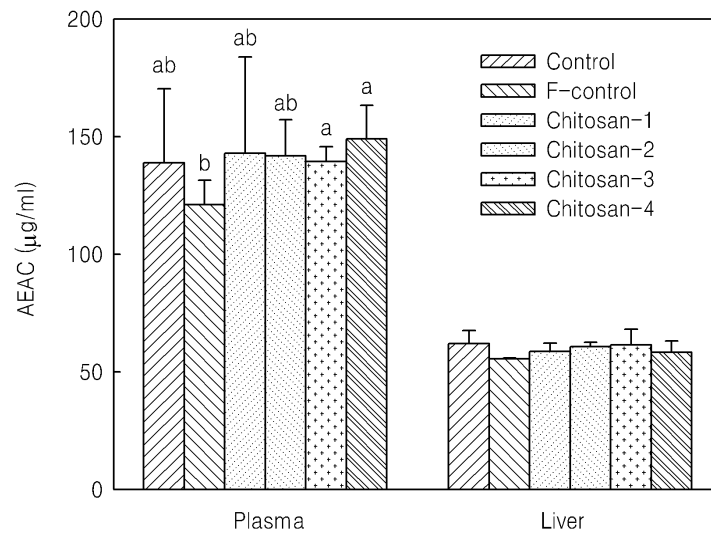
도면5



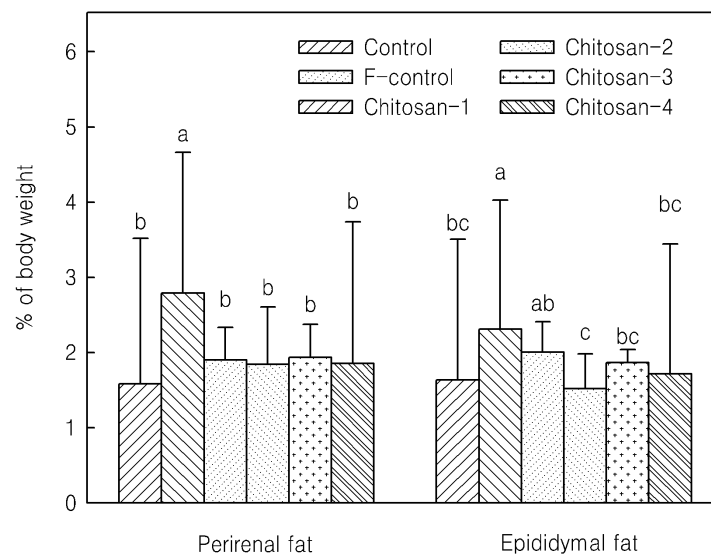
도면6



도면7



도면8



도면9

