한국농화학회지 제37권 제5호(1994)
Agricultural Chemistry and Biotechnology
Vol. 37, No. 5, pp. 379~384(1994)

효소적 갈변 단백질이 흰쥐 혈청콜레스테롤 농도에 미치는 영향

조 영 수
동아대학교 농화학과

초록 : 카제인, 대두 단백질에 caffeic acid와 tyrosinase를 첨가한 후 온도 30~35℃, pH 6.8에서 5시간 반응시켜 갈변단백질을 조제하였다. 이러한 갈변단백질 및 무처리 카제인, 대두단백질을 단백질 수준 20.0% 되도록 콜레스테롤 무첨가 사료에 혼합, 7주령의 Wistar계 흰쥐 수컷에 14일간 급여하였다. 갈변단백질의 아미노산은 cystine의 손실이 눈에 띄는 것 이외 아미노산 손실은 인정되지 않았다. 단백질 소화율은 갈변에 의하여 저하되고, 갈변 카제인의 경우는 현저한 맹장의 비대가 인정되었다. 혈청 총콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, 트리글리세라이드 농도는 갈변에 의해 유의차는 인정되지 않았으나, 상승하는 경향이었다. 단백질은 효소적 갈변에 의해 단백질 소화율이 저하되고, 그로 인한 糞量도 증가하지만, 혈청지질의 저하작용은 없었다(1994년 8월 12일 접수, 1994년 10월 2일 수리).

서 론

高콜레스테롤 혈증은, 동맥경화의 위험인자이며, 血中 콜레스테롤 농도가 음식물에 의하여 영향을 받기 때문에, 음식물에 의한 예방, 개선이 시도되어지고 있다. 血中 콜레스테롤 농도는, 음식물 성분중 지질, 단백질, 섬유질 등에 의하여 주로 영향을 받는다. 그 중에서 단백질은 일반적으로 동물성 단백질 섭취에 비교해서 식물성 단백질 섭취에서 혈청콜레스테롤 농도는 저하하는 경향이 있다.[1-5] 식물성단백질의 대표적인 대두단백질은 동물성 단백질의 대표적인 카제인과 비교하여, 혈청콜레스테롤 저하작용이 있는 것이 알려져 있지만, 그 작용기작은 아직 분명히 밝혀져 있지않다. 그 중에서 하나의 가설로서 대두단백질은 소화율이 카제인에 비해 낮기 때문에, 그 소화되지 않은 성분이 腸內에서 담즙산과 결합하여 콜레스테롤의 재 흡수를 저해하고, 肝腸循環을 방해한다. 담즙산은 콜레스테롤 대사산물로서 결과적으로 체내의 콜레스테롤 대사가 촉진되어, 혈청콜레스테롤 농도가 저하한다.

한편, 식품성분간 반응 중에서 효소적 갈변은 植物性 食品의 加工, 保存에 있어서 대단히 중요한 문제이며 우리의 생활 주변에서 흔히 일어나고 있으며 가공, 조리 혹은 장기간 저장에 의하여 효소적, 비효소적 갈변에 의해 형성되어진 갈변화 단백질을 일상 식품으로 섭취하고 있는 실정이다. 이러한 것은 *in vivo*에서 명확하게 나타내기는 어렵지만 식품학, 영양학의 중요한 문제의 하나라고 생각되어진다. 본 실험은 녹엽단백질의 혈청 콜레스테롤 저하작용 시험 중 녹엽단백질 조제 공정과정에서 갈변이 일어나고 있는 것에 착안,[6] 효소적 갈변반응에 의한 영향을 조사함과 동시에 갈변반응에 의한 단백질의 소화율 저하와 콜레스테롤농도와의 관계를 조사하였다. 효소적 갈변에 의한 단백질의 소화율 저하에 대해서는 diphenol화합물 및 polyphenol oxydase系를 카제인에 반응시킨 모델시험에 의해서도 밝혀진 바 있다.[7] 또, 갈변화 반응은 다르지만 糖과 아미노산과의 maillard반응에 의하여 생성된 고분자성 갈색물질, melanoidin은 흰쥐 혈청 콜레스테롤 농도를 저하시킨다는 보고가 있다.[8] 이러한 것으로부터, 효소적 갈변 반응결과 생성된 갈변 단백질도 소화율 저하가 생각되어져, 단백질 소화율과 혈청 콜레스테롤 농도와의 관계를 확인하기 위하여 caffeic acid를 기질로 하여 tyrosinase를 카제인과, 대두단백질에 반응시켜, 갈변 단백질을 제조, 흰쥐 혈청 콜레스테롤 농도에 대하여 검토하였다.

Key words : Casein, soybean protein, caffeic acid-tyrosinase system. modified protein, protein digestibility, serum cholesteral, caecum, triglyceride
*Corresponding author : Y.-S. Cho.

재료 및 방법

갈변 단백질의 조제

Hurrell 등[8]의 방법에 준하여 Horigome 등[7]의 방법을 참고로 하여 갈변 단백질을 조제하였다. 사용한 단백질은 분리대두단백질(Fuji Pro-R; Fuji Oil Co., Japan)과 카제인(Vitamin free; Hammarstein, Merck Co., Sweden)이다. 조제방법은 다음과 같다. 각 단백질 100 g을 0.04 M-NaOH 1700 ml에 용해시켜 pH 6.8로 조정시킨 후, caffeic acid(Tokyo kasei kogyo Co., Japan) 10 g을 용해시킨 용액 250 ml(pH 6.8)을 가하여 30~35℃로 보온 유지시키며, tyrosinase(E.C.1.14.18.1., 1 million units/1 mg, Sigma. Chem., Co., USA)를 200 mg을 포함하고 있는 수용액 50 ml를 가하고, compressor를 사용하여 공기를 불어 넣어면서 5시간 반응시켰다. 반응시킨 후 1M-HCl을 가하여, pH 4.6으로 조정하여 갈변 단백질을 응고, 침전시켰다. 침전물을 Büchner funnel에 옮겨 흡인, 여과하여 될 수 있는 한 수분을 제거시킨 후 동결건조하여 얻어진 단백질은 兩蛋白質이 다 같이 짙은 갈색내지 어두운 갈색을 띠었다.

공시동물 및 사육조건

공시 동물로서 7주령의 90 g 전후의 Wistar系(Jcl: Wistar; Japan clear) 흰쥐 수컷을 사용하였으며, 본 실험 시작전 1주일간 시판용 식이(Japan clear, CE-2)로서 예비 사육 후 개별 체중을 측정, 각 군이 균등하게 5마리씩 분리시켜 스텐레스제 개별 케이지에서 14일간 실험용 식이로서 사육한 후 실험 최종일에 15시간 절식시킨 후 에테르 마취하에서 경동맥에서 채혈, 30분간 실온에 방치시킨 후 3000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 분리 혈청지질 분석에 사용하였다. 사육환경은 온도 22±2℃, 습도 60%로 조절하였고, 조명은 12시간(07 : 00~19 : 00)으로 하였으며 물과 식이는 자유 급이시켰다. 식이 조성은 Nagata 등[4]의 보고를 참고로 한 저지방 식이로서 Table 1과 같다. 단백질 함량은 조단백질로서 20.0% 혼합하였다. 한편 부검은 채혈한 후 복부 정중선을 따라 개복하여 장기중 肝臟과 맹장을 적출하여 칭량하였고, 단백질 소화율은 시험기간 최후 3일간 糞을 모아서 분석하고, 섭취 질소량과 糞중 질소량으로부터 단백질의 소화율을 산출하였으며, 체중은 4일에 한번씩 체중 증가량을 확인하였다.

화학분석

질소는 Micro Kjeldahl법에 의했으며, 수분 및 조회분은 AOAC 공정분석법[11]으로 정량하였으며 아미노산 분석은 단백질 시료 약 10~20 mg을 가수분해용 시험관에 정평하여 6N-HCl 6 ml를 가하여 탈기 질소가스를 충진시키면서 봉관하고, 110℃에서 24시간 가수분해 시킨 후, 개관하여 염산을 제거, pH 2.2 sodium citrate buffer에 용해시켜 25 ml로 정용한 후 아미노산 자동분석기

Table 1. Composition of experimental diets (%)

Ingredient	Dietary group			
	Soybean protein	Brown soybean protein	Casein	Brown Casein
Soybean Protein	22.5	–	–	–
Brown soybean Protein	–	22.8	–	–
Casein	–	–	20.0	–
Brown Casein	–	–	–	21.7
Corn oil	1.0	1.0	1.0	1.0
Mineral mixture*	4.0	4.0	4.0	4.0
Vitamin mixture**	1.0	1.0	1.0	1.0
Cellulose powder	2.0	2.0	2.0	2.0
Sucrose	69.5	69.2	72.0	70.3

*: Phillips-Hart's salt mixture.[9]

**: Vitamin mixture. (per lg) Vit. B_1 nitrate 0.2 mg; Vit. B_2 0.3 mg; pyridoxine-HCl 1 mg; Ca pantothenate 1 mg; Vit. C 7.5 mg; DL-α-tocopherol acetate 5 mg; Inositol 10 mg; Choline chloride 0.1 g; Retinol palmitate 500I.U.; Ergocalciferol 100 I.U.; Vit. K_3 5 mg: Folic acid 0.1 mg; Cyanocobalamine 0.5 μg by reference to NRC-allowances.[10]
Nitrogen content in protein sources (%): Soybean protein 13.83, brown soybean protein 13.65, casein 13.90, brown casein 12.76.

JLC-6AH(Nippon-Densi Co., Japan)로 분석하였다. Cystine은 performic acid으로 산화시킨 후 가수분해를 하여 cysteic acid로서 정량하였다. 혈청 총 콜레스테롤 농도는 효소법을 이용한 kit(Sterozyme 545, Fuji Lebio Co., Japan)로써, 트리글리세라이드 농도는 triglyceride G-test kit(Wako Pure Chemical, Co., Japan)로, HDL-콜레스테롤 농도는 HDL-cholesterol test kit(Wako Pure Chemical, Co., Japan)로써 분석하였다. LDL-콜레스테롤 함량은 total-cholesterol에서 HDL-cholesterol을 뺀 Friedwald의 식으로 계산하였다.[12] 糞中 콜레스테롤 함량은 Katas 방법[13]에 따라서 추출, 혈청 총콜레스테롤과 같은 방법으로 측정하였으며, 糞中 담즙산은 Kalek 등[14]의 방법에 따라서 추출, 담즙산 측정용 시약 kit(Kyokuto bile acid reagents, kyokuto Seiyaku Kogyo Co., Japan)로써 측정하였다. 실험결과 통계처리는 각 분석 항목에 따라 평균±표준편차를 구하였으며 처리군별로 평균치간의 유의성은 Duncan의 다중검정법으로 1%, 5% 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

Table 2에 대두 단백질, 카제인 및 각각 이들 갈변단백질의 질소 함량 및 아미노산 조성을 표시하였다. 단백질에 결합내지 흡착하고 있는 갈변 물질을 측정할 적당한 방법이 없으므로, 갈변반응 전 및 갈변반응 후의 단백질 시료의 無灰分, 無水分 중 질소함량(Table 2)에서 갈변 물질의 양을 계산하였다. 갈변 대두 단백질의 경우, 흡착 갈변물질의 양은 9.85%, 갈변 카제인의 경우 8.85%이었다. Hurrell 등[8]의 보고에 의하면 카제인과 caffeic acid-tyrosinase반응(pH 7.0)에서 얻은 갈변 카제인은 lysine, tyrosine, histidine 및 tryptophan이 유의로 저하한다고 하였지만, 본 실험에서는 cystine이 손실된 이외, 큰 차이는 인정되지 않았다. 이것은 추측컨데 Hurrell 등[8]은 카제인에 대하여 caffeic acid의 첨가량을 본 실험의 3배량으로 하고 있고, 반응시 pH도 7.0보다도 조금 높았다. 이러한 반응조건의 차이가 결과적으로 차이를 나타낸 것으로 여겨진다. 또, Pierpoint는[15] 효소적 갈변반응에서는 단백질의 histidine, tryptophan은 반응에 관여하지 않는다는 것을 보고하고 있고 반응조건의 차이가 이러한 결과를 나타낸 것으로 사료되어진다. 그리고 유효성 lysine(flurodinitrobenzene 반응 lysine)은 측정하지

Table 2. Amino acid composition of native proteins and brown proteins (expressed as mg amino acid per 1 g nitrogen)

	Dietary group			
	Soybean protein	Brown soybean protein	Casein	Brown casein
Nitrogen(%)*	16.24	14.64	15.25	13.90
Lysine	400	388	507	492
Histidine	169	167	203	195
Arginine	451	445	251	240
Aspartic acid	739	765	494	498
Threonine	264	270	310	318
Serine	342	347	405	401
Glutamic acid	1332	1313	1652	1647
Proline	400	383	893	880
Glycine	275	270	131	134
Alanine	297	297	206	213
Cystine	81	62	31	20
Valine	356	367	485	499
Methionine	75	73	188	180
Isoleucine	355	343	403	418
Leucine	530	524	648	661
Tyrosine	255	244	400	394
Phenylalanine	362	365	365	363
Total	6683	6624	7572	7553

*: Value on ash-free dry matter basis.

Table 3. Feed intake, body-weight gain, protein digestibility, liver weight and caecum weight in rats given native proteins and brown proteins (Mean value with S. D. of five rats/group)

	Dietary group			
	Soybean protein	Brown soybean protein	Casein	Brown casein
Feed intake (g/14 days)	159.8± 0.3	158.2± 1.8	158.2± 1.0	150.5± 1.7**
Body weight gain (g/14 days)	54.3± 2.0	47.6± 1.7**	56.4± 2.1	53.4± 4.0
Protein digestiblilty(%)	93.7± 0.5	86.6± 0.9**	95.3± 0.5	92.9± 0.9*
Liver weight (g/100g body weight)	4.8± 0.1	4.3± 0.1*	5.0± 0.2	3.9± 0.3*
Caecum weight(g)	2.5± 0.3	2.7± 0.5	2.6± 0.3	8.8± 1.2**
Fecal output (g/3 days)	2.87± 0.20	3.53± 0.26**	2.38± 0.12	2.39± 0.28

*, **: Significantly different from the value for untreated protein; *p<0.05, **p<0.01.

Table 4. Serum and fecal lipids in rats given native proteins and brown proteins (Mean value with S. D. of five rats/group)

	Dietary group			
	Soybean protein	Brown soybean protein	Casein	Brown casein
Serum lipids(mg/dl)				
Total Cholesterol	77.2± 9.5	89.8± 7.9	112.1± 10.2	145.1± 29.5
HDL-Cholesterol	31.6± 3.2	34.1± 2.1	34.5± 1.9	37.3± 3.5
LDL-Cholesterol	45.6± 9.1	55.6± 7.4	77.2± 8.1	107.7± 30.2
Triglyceride	137.6± 20.6	145.2± 39.7	198.5± 12.3	240.0± 32.8
Fecal lipid (mg/day excretion)				
Total cholesterol	1.86± 0.23	2.87± 0.60*	1.36± 0.21	2.10± 0.62
Bile acid	0.85± 0.16	0.07± 0.03**	0.89± 0.23	0.06± 0.01**

*, **: Significantly different from the value for untreated protein: *p<0.05, **p<0.01.

않았지만, 지금까지의 보고[16,17]에서와 마찬가지로 본 실험에서도 유효성 lysine은 갈변에 의하여 감소되었을 것으로 추측되어진다.

Table 3에 식이섭취량, 체중증가량, 단백질 소화율, 간중량, 맹장무게를 표시하였다. 갈변 대두 단백질급여군에서는 식이 섭취량의 차이는 없었지만, 체중증가량이 적고, 무처리 대두 단백질급여군에 대하여 유의차가(P< 0.05) 인정되었다. 이러한 원인은 갈변반응을 통하여 아미노산의 손상이 적었던 결과, 주로 단백질 소화율 저하에 의한 것으로 사료된다. 한편, 갈변 카제인급여군의 경우 식이 섭취량, 단백질 소화율 같이 저하 하였음에도 불구하고, 체중증가량에는 유의차가 없었다. 그러나, 갈변카제인급여군의 맹장은 현저하게 비대하여 맹장의 무게를 보정하여 보면 체중증가량은 44.5 g로 되고 카제인 무처리군 53.8 g과는 유의차(P<0.05)를 나타낸 것이 된다. 효소적 갈변카제인군의 맹장비대 원인은 불분명하지만, 식이섭취량의 저하로 단백질결핍에 기인된 영양장애가 맹장비대와 관련이 있을 것으로 추측되어진다. 한편, 비효소적 갈변반응에서 Adrian 등[18]은 갈변이 상당히 진행된 단백질을 동물에 투여하여 맹장, 간장, 신장의 비대, 번식율의 저하를 관찰하였으며, 또, Lee 등[19]은 갈변살구의 추출물을 rat에 투여한 결과 간장, 신장의 비대를 관찰하고, GOT, GPT의 증가를 인정하였다. 이러한 결과는 비효소적 갈변단백질의 독성효과와 영양장

애에 의한 생리적 현상일 가능성이 내포된 것으로 시사되어진다.

이상의 결과에서 갈변 대두단백질, 갈변카제인 급여군 어느 경우에서도 단백질의 소화율이 저하하고, 체중증가량도 무처리 단백질급여군에 비해 적은 것이 인정되었다. 그러나 같은 조건에서 갈변화반응을 행하여 갈변물질의 흡착량이 그렇게 큰 차이가 없음에도 불구하고 갈변 대두단백질 급여군의 경우에는 단백질 소화율의 저하가 크고, 갈변 카제인의 경우는 맹장의 현저한 비대가 일어나는 등, 생리작용에 차이가 나타난 이유에 대해서는 불분명하다.

Table 4에는 혈청지질, 糞中 콜레스테롤 농도 및 담즙산 농도를 표시하였다. 혈청 총 콜레스테롤농도는 兩단백질 급여군에서 같이 갈변단백질 급여군이 무처리 단백질급여군에 비교하여 유의성은 없으나 상승하는 경향이다. HDL-콜레스테롤 농도는 거의 변화가 인정되지 않았다. LDL-콜레스테롤 농도는 유의성은 인정되지 않았으나 높은 경향이었다. 이것은 총 콜레스테롤 농도에서 HDL-콜레스테롤 농도를 뺀 차가 LDL-콜레스테롤 농도를 나타낸 결과인 것으로 여겨진다. 또, 트리글리세라이드 농도도 무처리 단백질 급여군에 비교하여 갈변단백질 급여군에서는 상승하는 경향이나 유의성은 인정되지 않았다.

한편, 糞中 콜레스테롤 배설량은 갈변단백질 급여군에서 농도가 높은 경향을 나타내었고 특히, 갈변 대두단백질군에서는 무처리 급여군에 대하여 유의차가 인정되었다. 그러나 담즙산 배설량 농도는 兩갈변 단백질 급여군이 현저하게 낮고, 糞中 콜레스테롤 배설량과 담즙산 배설량의 합계치에서 보면 무처리급여군의 그것과는 거의 차이가 없었다. 갈변 단백질 급여군은 소화율이 저하하고, 糞量의 증가, 스테로이드 類의 증가는 나타나지 않았고, 혈청콜레스테롤농도의 저하는 인정되지 않았다. 이러한 결과 녹엽단백질의 혈청콜레스테롤 저하작용 실험에서 녹엽단백질 제조 공정에서 polyphenol 화합물에 의하여 효소적 갈변이 일어나도 녹엽단백질 자체는 약간의 영양가 손상을 입을 것으로 생각되지만, 효소적 갈변반응을 받은 단백질이 본 실험조건 하에서는 혈청콜레스테롤 농도에는 영향이 미치지 않을 것으로 판단되어진다.

감사의 글

이 연구는 1993년도 동아대학교 학술연구 조성비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Carroll, K. K. and R. M. G. Hamilton (1975) Effects of dietary protein and carbohydrate on plasma cholesterol levels in relation to atherosclerosis, *J. Food Sci.* 40, 18-23
2. Kritchevsky, D. (1979) Vegetable protein and atherosclerosis, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 56, 135-140
3. 菅野道廣 (1982) 化學と生物. 日本農藝化學會, 20, 155-160
4. Nagata, Y., T. Tanaka and M. Sugano (1981) Further studies on the hypocholesterolemic effect of soya-bean protein in rats, *Br. J. Nutr.*, 45, 233-241
5. 曺永守, 堀米隆男, 坂口 英, 内田仙二 (1988) ラット血清コレステロール濃度におよぼす緑葉タンパク質給與の影響, 日本營養食糧學會誌. 41, 127-132
6. 曺永守 (1989) 緑葉蛋白質のラット血清コレステロール降下作用に關する研究, 岡山大學大學院博士學位論文
7. Horigome, T. and M. Kandatsu (1968) Biological value of proteins allowed to react with phenolic compounds in presence of o-diphenol oxidase, *Agr. Biol. Chem.*, 32, 1093-1102
8. Hurrell, R. F., P. A. Finot and J. L. Cuq Protein-polyphenol reactions, 1. Nutritional and metabolic consequences of the reaction between oxidized caffeic and the lysine residues of casein, *Br. J. Nutr.*, 47, 191-211
9. Phillips, P. H. and E. B. Hart (1935) *J. Biol. Chem.*, 109, 657-659
10. National Research Council (1972) In Nutrient Requirement of Laboratary Animals, 2nd ed. National Academy of Sciences (Washington, D. C.)
11. A.O.A.C (1975) Official Methods of Analysis of the A.O.A.C. 12th ed. 222-225
12. Friedewald, W. T., R. I. Levy and D. S. Fredrickson (1972) Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge, *Clinical Chemistry*, 18, 499-502
13. Katas, M. (1972) In Technique of Lipidology, North-Holland, Amsterdam, 327-329
14. Kalek, H. D., F. Stellaard., W. Kruls and G. Paumgartner (1984) Detection of increased bile acid excretion by determination of bile acid content in single stool samples, *Clinica Chimica Acta*, 140, 85-87
15. Pierpoint, W. S. (1969) o-Quinones formed in plant extracts, Their reactions with amino acids and pep-

tides, Biochem. J. 112, 609-616
16. Horigome, T. and M. Kantatsu (1971) Biological value of protein allowed to react with phenolic compounds in the presence of o-diphenol oxidiase; Effect of o-diphenol concentration on the biological value of proteindiphenol mixtures, *J. Japan Soc. Food and Nutr.*, 24, 253-258
17. Davies, A. M. C., V. K. Newby and R. L. M. Synge (1978) Bound quinic acid as a measure of coupling of leaf and sunflower seed proteins with chlorogenic acid congeners: Loss of availability of lysine, *J. Sci. Food Agric.*, 29, 33-41
18. Adrian, J. and H. Susbielle (1975) *Ann. Nutr. Alim.*, 29, 151-160
19. Lee, C. M., C. O. Chichester and T. C. Lee (1977) Effect of maillard reaction products on disaccharidase activities in the rat, *J. Agr. Food Chem.*, 25, 775-783

Effect of Proteins Modified by Enzymically Oxidized Caffeic Acid on the Concentration of Serum Cholesterol of Rats

Young-Su Cho (Department of Agricultural chemistry, Dong-A University, Pusan, 604-714, Korea)

Abstract : Casein or soybean protein was subjected to the reaction with caffeic acid-tyrosinase system at 30~35℃ pH 6.8 with aeration for 5 hr. The effects of the modified proteins on male Wistar rats were studied by pair-feeding of a cholesterol-free diet for 2 weeks. Significant decrease in protein digestibility for the rats fed with the modified proteins was observed. The feeding of modified protein from casein caused an enlargement of caecum. The concentration of serum cholesterol and triglyceride in the rats fed with modified proteins were mostly unchanged against the rats fed with untreated proteins. These results suggest that the decreas in protein digestibility induced by enzymic browning-reaction did not cause the decrease in concentration of serum cholesterol.