

## 효소적 갈변 반응에 의하여 생성된 갈변 물질이 흰쥐 혈청콜레스테롤 농도에 미치는 영향

조영수<sup>†</sup> · 정순재\*

동아대학교 농화학과, 원예학과\*

## Effects of proteins modified by enzymically oxidized caffeic acid on the concentration of serum cholesterol of rats. part II

Young-Su Cho<sup>†</sup> and Soon-Jae Jeong\*

Dept. of Agricultural Chemistry, Horticulturer\*  
Dong-A University Pusan 604-714, Korea

### Abstract

Casein or soybean protein was subjected to there action with caffeic acidtyrosinase system at 30-35°C, pH 6.8 with aeration for 5hr. The resulting brown proteins were washed with acetone until the washings were on longer colored. However, modified protein still retained a light brown. The washings were evaporated and freeze-dried to obtain brown compounds. The effects of the modified proteins and brown compounds on male Wistar strain rats were studied by pair-feeding of a cholesterol-free diet for 14days. Significant decrease in protein digestibility for the rats fed with the modified proteins were observed. Weight gain and protein digestibility were not influenced by feeding brown compounds, but the feeding of brown compound from casein caused an enlargement of caecum. The concentrations of serum cholesterol and triglyceride in the rats fed with modified proteins and brown compounds were mostly unchanged against the rats fed with untreated proteins. These results suggest that the decrease in protein digestibility induced by enzymic browning-reaction did not cause the decrease in concentration of serum chloesterol.

*Key words* : soybean protein, brown proteins, serum cholesterol

### 서 론

본 연구는 인구 증가에 따른 미래의 단백질 폭주에 따른 부족 현상에 조금이나마 공헌할 목적으로 미래의 단백질 자원으로 예상되어지는 녹엽 단백질<sup>1)</sup>(leaf protein, 이하 LP)을 조제, 영양 특성을 밝히든 중 조제 공정 과정에서

갈변이 일어나는 것에 착안, 갈변 반응을 받은 LP와 혈청 콜레스테롤 농도와의 관계를 알아 볼 목적으로 특히 조제시 많이 사용되어 지고 있는 LP 재료 중에서 화본과 목초인 italian ryegrass(*Lolium multiflorum* Lam.)를 선정 하였다. Italian ryegrass는 phenol 화합물 및 polyphenoloxidase를 함유하고 있기 때문에 줄기와 잎을 마쇄, 착즙 하는 동안에

<sup>†</sup> Corresponding author

phenol 화합물이 산화 중합되어, LP와 결합 혹은 흡착되어, 이러한 것에 의하여 LP는 결번되고, 그 결과 LP의 소화율이 저하하는 것을 Horigome등<sup>2)</sup>은 보고 하였다. 이와 같이 효소적 갈변에 의하여 단백질 소화율, 생물이 저하에 대해서는, diphenol 화합물-polyphenoloxidase계를 카제인에 반응시킨 모델 실험에 의해서도 밝혀져 있다.<sup>3)</sup> 한편, 갈변화 반응은 다르지만, 당과 아미노산과의 Maillard 반응에 의하여 생성되는 고분자성 갈색 물질인 melanoidin은 흰쥐 혈청 콜레스테롤을 저하시킨다는 보고가 있다.<sup>4)</sup> 이와 같이 당과 단백질과의 반응 결과 생긴 난소화성 갈변 단백질도 식이 섬유와 비슷한 혈청 콜레스테롤 저하작용이 있는 것으로 추측되어 지고 있다.<sup>5)</sup> 이러한 것들로부터 생각해보면, 효소적 갈변 반응을 받은 LP의 혈청 콜레스테롤 저하작용은 갈변반응 결과 생성된 갈변 물질에 기인될 가능성도 배제하지 않을 수 없다. 여기서 전보<sup>6)</sup>에서 효소적 갈변반응 단백질에 대해서는 검토하여 효소적 갈변반응 단백질 급여에 의하여 흰쥐의 혈청 콜레스테롤 농도는 약간 상승하는 것이 확인되었으며, 본보에서는 이러한 점을 제차 확인함과 동시에 caffeic acid를 기질로 하여 tyrosinase를 대두단백질과 카제인에 반응시켜, 갈변 단백질을 제조하고 아울러 兩 갈변 단백질에서 갈변물질을 추출하여 흰쥐에 급여 갈변물질이 흰쥐 콜레스테롤 농도에 미치는 영향을 밝힘으로 LP의 흰쥐 혈청 콜레스테롤 저하 기작의 일부를 밝힘과 동시에 LP섭취에 따른 안정성에 대해서도 도움을 줄 것으로 생각하여 본 실험을 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 갈변단백질의 조제

Hurrell 등<sup>3)</sup>의 방법에 준하여 Horigome등<sup>7)</sup>의 방법을 참고로 하여 갈변단백질을 조제하였다. 사용한 단백질은 분리 대두단백질 (Fuji Pro-R : Fuji Oil Co., Japan)과 카제인 (vitamin free : Sigma Chem., Co, USA)이다. 조제 방법은 다음과 같다. 각 단백질 100g을 0.04M-NaOH 200ml에 용해시켜 6M-HCl 용액으로 pH 6.6-6.8로 조정시킨 후, caffeic acid (Takyo Kasei Kogyo, Co., Japan) 10g을 용해시킨 용액 250ml(pH 6.6-6.8)를 가하여 30-35℃로 온도를 유지시키며, tyrosinase (E.C.1.14.18.1., 1 million units/1 mg, Sigma Chem., Co., USA)를 200mg 포함하고

있는 수용액 50ml를 가하고, compressor를 사용하여 공기를 불어 넣으면서 5시간 반응시켰다. 반응시킨 후 1M-HCl를 가하여 pH 4.2 전후로 조정하여 반응물을 응고, 칩건시켜, 침전물을 Buchner funnel에 옮겨 흡인 여과에 의하여 응고물을 분리하였다. 이 응고물을 아세톤으로 5-6회 세정하여 얻어진 것을 동결건조시켜 갈변 단백질을 제조하였다. 이렇게 하여 얻어진 단백질은 兩 단백질이 다 담갈색을 띠었다. 그리고 단백질 세정에 사용한 아세톤은 rotary evaporator에서 감압 건조에 의해 아세톤을 제거시킨 후, 모액을 투석시키고, 동결 건조시켜 갈변물질을 조제하였다. 兩 단백질로 부터 얻어진 갈변 물질은 갈색을 띠었다.

### 화학분석

질소는 Micro Kjeldahl법에 의했으며, 수분 및 조회분은 AOAC공정분석법<sup>8)</sup>으로 정량 하였으며, 아미노산 분석은 단백질 시료 약 10-20mg을 가수분해용 시험관에 정량하여 6N-HCl 6ml를 가하여 탈기, 질소 가스를 충전시키면서 봉관하고, 110℃에서 24시간 가수분해시킨 후, 개관하여 염산을 제거, pH 2.2 sodium citrate buffer에 용해시켜 25 ml로 정용한 후 아미노산 자동분석기 JLC-6AH(Nippon-Densi Co., Japan)로 분석하였다. 혈청 총 콜레스테롤 농도는 효소법을 이용한 kit(Sterozyme 545, Fuji Lebjo Co., Japan)로서 트리글리세라이드 농도는 triglyceride G-test kit(Wako Pure Chemical, co., Japan)로써 분석하였다. LDL-콜레스테롤 함량은 총 콜레스테롤에서 HDL-콜레스테롤을 뺀 Friedwald의 식으로 계산하였다.<sup>9)</sup> 실험결과 유의성 검정은 평균치의 분산분석(F검정)을 행하고, 개개의 군간의 유의차 검정은 Tukey의 방법에 의해 행하였다.

### 실험동물 및 사육조건

실험동물로서 6주령의 80g 전후의 Wistar系 (Jcl : Wistar ; Japan clear) 흰쥐 수컷을 사용하였으며, 본 실험 시작전 1주일간 시관용 사료(Japan clear, CE-2)로서 1주일간 사육 후 개별 체중을 측정, 각 집단이 균등하게 5마리씩 분리시켜 스테레스제 개별 케이지에서 14일간 실험용 식이로서 사육한 후 실험 마지막 날에 15시간 절식시킨 후 에텔 마취 하에서 경동맥에서 채혈, 30분간 실온에 방치시킨 후 3000rpm에서 15분간 원심분리 하여 혈청을 분리 혈청 지질 분석에 사용하였다. 사육실은 온도 22±2℃ 습

효소적 갈변 반응에 의하여 생성된 갈변 물질이 흰쥐 혈청콜레스테롤 농도에 미치는 영향

도 60%로 조절하였고 명암은 12시간 주기로서 07:00부터 19:00까지는 明期, 19:00시부터 07:00까지는 暗期로 하였다. 물과 사료는 자유 급여시켰다. 사료조성은 Nagata등<sup>10)</sup>의 보고를 참고로 한 저지방식으로 Table 1과 단백질로서 20.0% 혼합하였다. 부검은 채혈 후 복부 정중선을 따라 개복하여 맹장을 적출하여 칭량하였고, 단백질 소화율은 시험기간 최후 3일간 糞을 모아서 질소량을 분석하고, 섭취 질소량과 糞中질소량으로부터 단백질의 소화율을 산출하였으며, 체중은 4일에 한번씩 체중 증가량을 체크하였다.

서 나타난 아미노산 종류가 전부 포함되어 있는 것을 볼수 있었으며, 이 아미노산 조성은 카제인과 상당히 다른 조성을 하고 있고, 카제인의 일부 peptide가 갈변 물질로 이행되어 가는 것으로 생각되어 진다. 한편, Hurrell등<sup>3)</sup>의 보고에서는 카제인과 caffeic acid-tyrosinase 반응 (pH 7.0)에서 얻은 갈변 카제인은 lysine, tyrosine, histidine 및 tryptophane이 유의로 저하한다고 하였으나 본 실험에서는 큰 차이는 인정되지 않았다. 이러한 결과는 Hurrell등<sup>3)</sup>은 카제인에 대하여 caffeic acid의 첨가량이 본 실험의 3배이었고 반응시 pH 7.0보다 조금 높은 반응 조건 차이의 결과라고

Table 1. Composition of experimental diet(%)

Ingredient	Dietary group					
	Soybean protein	Brown Soybean protein	Soybean protein Brown compound	Casein	Brown casein	Casein brown compound
native protein	21.6	—	21.6	20.0	—	20.0
Brown protein	—	23.1	—	—	21.3	—
Brown compound	—	—	1.0	—	—	2.0
Corn oil	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
mineral mixture*	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
Vitamin mixture**						
Cellulose	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Sucrose	70.4	68.9	69.4	72.0	70.7	70.0

\* : Phillips-Hart's salt mixture

\*\* : Vitamin mixture. (per 1g) Vit. B<sub>1</sub> nitrate 0.2mg : Vit. B<sub>2</sub> 0.3mg : Pridoxin. HCl 1mg Ca pantothenate 1mg : Vit. C 7.5mg : DL- $\alpha$ -tocopherol acetate 5mg : Inositol 10mg Choline chloride 0.1mg : Rentinol palmitate 500 I. V. : Ergocalciferol 100 I. V. : Vit. K<sub>3</sub> 5mg Folic acid 0.1mg : Cyanocobalamine 0.5 by reference to NRC-allowances

### 결과 및 고찰

Table 2에 대두단백질, 카제인, 이들의 갈변단백질 및 카제인 갈변 물질의 질소 함량과 아미노산 조성을 나타내었다. 대두단백질에서는 효소적 갈변 반응에 의하여 염기성 아미노산인 lysine, histidine의 저하가 인정되었다. 산 가수분해에 의하여 tryptophane, cysteine은 손실되기 때문에 본 실험에서는 측정하지 않았다. 기타 아미노산의 손실은 거의 나타나지 않았다. 대두단백질의 갈변 물질 아미노산 분석은 실험도중 트라벨 관계로 급변의 실험에서는 측정하지 못하였다. 갈변 카제인의 아미노산 조성은 무처리 카제인과 거의 차이가 없었다. 그리고 갈변 물질에는 무처리 카제인에

추측되어진다. 한편, Pierpoint<sup>11)</sup>는 효소적 갈변 반응에서는 단백질의 histidine, tryptophan은 반응에 관여하지 않는다고 보고하고 있으며 반응 조건의 차에서 얻어진 결과라고 생각되어 진다. 곁들여서 available lysine (flurodinitrobenzene 반응 lysine)은 측정하지 않았지만, 지금까지의 보고<sup>7, 12, 13)</sup>에서와 마찬가지로 본 실험에서도 available lysine 효소적 갈변 반응에 의하여 감소되었을 것으로 추정되어진다.

Table 3에는 식이섭취량 체중증가량, 단백질 소화율, 맹장 무게를 나타내었다. 대두단백질 급여군에서는 사료 섭취량의 차이는 없었고, 단백질 소화율은 예상한 것과 같이 무처리 대두단백질군과 비교하여, 갈변 단백질군에서 유의하

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

	Dietary group				
	Soybean protein	Brown soybean protein	Casein	Brown Casein	Casein brown compound
Nitrogen (%)	16.24	15.20	15.25	14.30	9.97
Lysine	370	272	529	518	278
Histidine	150	121	185	208	169
Arginine	432	417	250	296	176
Aspartic acid	641	759	619	603	605
Threonine	211	243	280	268	287
Serine	286	322	368	368	350
Glutamic acid	1141	1320	1574	1629	1274
Proline	297	338	634	645	933
Glycine	229	272	119	114	183
Alanine	255	285	196	191	204
Valine	270	331	422	422	441
Methionine	48	54	170	157	203
Isoleucine	276	236	345	343	301
Leucine	440	523	612	597	738
Tyrosine	221	252	373	333	509
Phenylalanine	320	341	336	296	393
Total	5597	6176	7011	6990	7043

\* : value on ash-free dry matter basis.

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

	Dietary group					
	Soybean Protein	Brown Soybean protein	Soybean protein Brown compound	casein	Brown Casein	Casein brown compound
Feed intake (g/14 days)	159.2±0.3	158.2±1.8	157.0±2.0	158.2±1.2	150.5±1.7	155.3±1.5
Body weight gain (g/14 days)	49.2±2.4	41.7±5.4**	44.4±3.8	47.5±10.0	43.5±3.1	49.8±6.6
Protein digestibility (%)	95.6±0.5	93.6±1.0*	94.6±0.2	97.8±0.2	91.2±1.2*	95.7±1.4*
Caecum weight	2.2±0.1	1.9±0.3	2.1±0.2	1.6±0.1	1.7±0.2	5.8±1.6*

\*\* : Significantly different from the value for native protein : \*P &lt; 0.05, P &lt; 0.01

게 저하되었고(P<0.05) 이와 수반하여 증체량도 적었다. 그리고 갈변 물질군에서도 갈변 단백질군 정도는 아니지만, 무처리 대두단백질군에 비해서는 단백질 소화율이 유의로 저하하고 증체량도 적었다. 갈변물질군의 단백질 소화율이 저하된 것은 사료로서 무처리 대두단백질에 갈변물질을 첨가했기 때문에 갈변물질이 소화되지 않고 糞中으로 배설되었기 때문에 저하된 것으로 생각되어지며, 증체량이 감소하

고 있는 것은 갈변물질이 불확실하지만 어떤 영향을 미친 것으로 추측되어진다. 카제인군에서도 대두 단백질군과 비교하여 갈변 카제인군, 갈변 물질군에서 단백질 소화율이 유의로 저하하였다. 또, 갈변 물질군에서는 원인은 불분명하지만, 맹장이 현저하게 비대하고 있고, 이러한 것으로 미루어 볼때 갈변물질의 성질이 대두 단백질의 것과는 다른 것으로 시사되어진다. 맹장 중량을 뺀 보정 증체량은 유의

효소적 갈변 반응에 의하여 생성된 갈변 물질이 흰쥐 혈청콜레스테롤 농도에 미치는 영향

하지는 않지만 소화율의 저하에 수반하여 감소되는 경향이 있다. 조<sup>6)</sup>에 의하면 무처리 카제인군과 효소적 갈변 반응에 의해 제조되어진 갈변 카제인군의 사이에서 효소적 갈변 반응을 받은 급여군에서 맹장이 현저하게 비대 되었다고 보고하고 있다. 이 보고에서는 갈변 단백질에서 갈변 물질을 추출한 시험을 하지 않았기에 갈변 단백질의 급여가 맹장의 비대와 관련된다고 보고하였다. 본 실험의 결과는 갈변 단백질에서 갈변 물질을 추출 rat에 급여한 결과 맹장의 비대가 나타나 갈변 물질이 맹장의 비대에 어떠한 형태로 관여된 것으로 추정되어진다. 한편, 갈변 반응은 다르지만, Adrian 등<sup>14)</sup>은 비효소적 갈변이 상당히 진행된 단백질을 실험 동물에 투여하여 맹장, 간장, 신장의 비대, 번식률의 저하를 관찰하였으며 Lee 등<sup>15)</sup>은 갈변된 살구의 추출물은 rat에 투여한 결과 간장, 신장의 비대를 관찰하고 GOT, GPT의 증가를 보고하였다. 이러한 결과는 비 효소적 갈변 단백질의 독성 효과와 영양 장애에 의한 생리적 현상일 가능성이 내포된 것으로 시사되어 진다.

Table 4에는 혈청 지질 농도를 나타내었다. 혈청 총 콜

은 갈변 물질에 콜레스테롤 상승작용이 있는 것으로 생각 되어지지만 그 기작에 대해서는 불분명하다. 조<sup>6)</sup> 등의 보고는 갈변 대두 단백질군에서 혈청 총 콜레스테롤이 상승한다는 보고와 일치하며 갈변 물질이 상승 작용에 어떠한 형태로 관여하는 것으로 생각되어진다. 카제인군의 혈청 지질 농도는 혈청 총콜레스테롤 농도를 우선 보면 무처리 카제인군을 갈변 카제인군과 비교하여 갈변 카제인군에서는 유의차는 인정되지 않았다. 그리고 갈변 물질군에서는 카제인군과 비교하여 유의차는 인정되지 않았지만, 약간 상승하는 경향이였다. 이러한 경향은 조<sup>6)</sup>의 보고와 일치하였다.

이상의 결과에서 효소적 갈변반응에 의하여 소화율이 저하된 단백질 급여는 흰쥐의 혈청 콜레스테롤 저하작용은 나타나지 않았다. 그리고, 갈변물질, 특히 대두단백질로부터 얻어진 갈변물질에는 혈청 콜레스테롤 상승 작용이 인정되었다. 한편, 비 효소적 갈변 물질을 rat에 급여한 실험에서는 혈청콜레스테롤을 저하시키는 작용이 있다고 보고<sup>14)</sup>하고 있으나, 급변의 효소적 갈변과는 비효소적 갈변에서의 단백질에 대한 반응, 반응 생성물의 갈변 물질의 성질 등이 다르

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

	Dietary group					
	Soybean Protein	Brown Soybean protein	Soybean protein Brown compound	casein	Brown Casein	Casein brown compound
Total cholesterol(mg. dl)	71± 3	78±10	89±10**	95± 5	92± 5	103±13
HDL-cholesterol (gm. dl)	29± 2	31± 5	37± 6**	45± 5	40± 3	48± 7
LDL-cholesterol (gm. dl)	42± 4	46± 7	51± 6	50± 5	52± 3	55± 7
Triglyceride (gm./dl)	124±15	143±23	137±31	168±26	2138%31	187±27

\*, \*\* : Significantly different from the value for native protein : \*P<0.05, P<0.01

레스테롤은 갈변 대두단백질군에서는, 단백질 소화율이 저하하였음에도 불구하고 적은 양이지만, 무처리 대두 단백질군에 비하여 상승하는 경향이 나타났다. 그리고, 갈변 물질군에서는, 혈청 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤이 대두 무처리 군에 비하여 유의하게 (p<0.01) 증가 하였다. 이것

기 때문인 것으로 생각되어 진다. 그리고 위의 결과 녹엽단백질 제조 과정 중에 효소적 갈변이 일어나도 효소적 갈변 반응에 의하여 얻어진 갈변 단백질 급여군과 갈변 물질 급여군 단백질 혈청 콜레스테롤에서 저하 작용이 인정되지 않았기 때문에 LP 본래의 성질에 의한 것으로 추정되어지며

될 수 있는한 갈변을 방지시킨 LP를 미래의 식량자원 단백질로써 사용하는 것이 바람직스럽다고 생각되어 진다.

## 요 약

카제인, 대두 단백질에 caffeic acid와 tyrosinase를 첨가한 후 온도 30-35°C pH 6.8에서 5시간 공기를 불어넣으면서 효소적 갈변 반응을 행하여 갈변 단백질과 갈변 물질을 조제하였다. 무처리 단백질, 갈변 단백질, 갈변 물질을 단백질 수준 20.0% 되도록 콜레스테롤 무첨가 사료에 배합하여, 초체중 80g 전후의 Wistar계 흰쥐 수컷에 14일간 급여하였다. 갈변 대두 단백질의 아미노산은 lysine, histidine이 저하하였고, 갈변 카제인의 아미노산은 거의 차가 없었다. 단백질 소화율은 갈변 단백질, 갈변 물질에서 저하하였고, 카제인 갈변 물질 급여군에서는 맹장이 현저하게 비대가 인정 되었다. 갈변 대두 단백질에서는 오히려 상승하는 경향이였다. 대두 갈변 물질에서는 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤이 유의적으로 상승하였으며, 카제인 갈변 물질에서도 혈청 총 콜레스테롤 농도는 상승하는 경향이였다.

## 참고문헌

1. Pirie, N. W. : Leaf protein as a human food. *Science*, 152, 3730(1996)
2. Horigome, T. and Kandatsu, M. : Biological value of protein allowed to react with phenolic compounds in the presence of O-diphenol oxidase. *Agri. Biol. Chem.*, 40, 449(1966)
3. Hurrell, R. F., Finot, P. A. and Cuq, J. L. : Protein-phenol reactions 1. Nutritional and metabolic consequences of the reaction between oxidized caffeic acid and the lysine residues of casein. *Br. J. Nutr.*, 47, 191(1982)

4. 五明紀春, グエエン・ヴァン・チエエン : 메이라드反應生成物の營養生理學 第43回日本營養・食糧學會總會講演要旨集, 동경 51(1989)
5. 加藤博通 : 탄백質-糖系Maillard反應をぬぐる研究の展開. *日本營養・食糧學會志*, 41, 77(1988)
6. 조영수, 효소적 갈변 단백질이 흰쥐 혈청 콜레스테롤 농도에 미치는 영향. *한국농화학회지*, 37, 579(1994)
7. Horigome, T. and Kandatsu, M. : Phenol oxidative enzymes of several vegetables. *Agri. Biol. Chem.*, 32, 1093(1968)
8. AOAC Official Methods of Analysis of the AOAC International 16th edition, chapter 3, p.1(1995)
9. Friedewald, W. T., Levy, R. I. and Fredrickson, D.S. : Estmation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*, 18, 499(1972)
10. Nagata, Y., Tanaka, T. and Sugano, M. : Further studies on the hypocholesterolemic effect of soya-bean protein in rats. *Br. J. Nutr.*, 45, 233(1981)
11. Pierpoint, W. S. : O-Quinones formed in plant extracts, Their reactions with amino acids and peptides., *Biochem. J.*, 112, 609(1969)
12. 堀米隆男, 神田誠 : フェノールンジフェノールオキシダゼ系により褐變したカゼインの生物價 ; フェノール和合物の量の影響. *營養と食糧*, 24, 253(1971)
13. Davies, A. M. C., Newby, V. K. and Synge, L. M. : 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. Fd Agric.*, 29, 33(1978)
14. Adrian, J. and H. Susbielle, H. : *Ann. Nutr. Alim.* 29, 151(1975)
15. Lee, C. M., Chichester, C. M. and Lee, T. C. : Effect of maillard reaction products on disaccharidase activities in the rat. *J. Agr. Food Chemistry.*, 25, 775(1977)