J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.
32(6), 913~920(2003)

한국식품영양과학회지

고도불포화지방산 함량이 높은 유지를 섭취시킨 흰쥐에서 양조간장과 멜라노이딘의 지질산화 억제효과

이상조 · 류승희 · 이영순* · 송영선 · 문갑순†

인제대학교 바이오헬스 소재 연구센터, 식품과학연구소 및 인제대학교 식품생명과학부
*경희대학교 식품영양학과

Protective Effect of Soybean Sauce and Melanoidin on Lipid Oxidation in Rats Fed High PUFA Oils

Sang-Jo Lee, Seung-Hee Ryu, Young-Soon Lee*, Young-Sun Song and Gap-Soon Moon†

Biohealth Products Research Center, Food Science Institute and School of Food and Life Science, Inje University, Kimhae 621-749, Korea
**Dept. of Food and Nutrition, Kyunghee University, Seoul 130-701, Korea*

Abstract

Soybean sauce, fermented with soybean and wheat, has been a major condiment of Korean diets from centuries ago. Melanoidin, a brown pigment generally found in various food systems, is a final product produced in amino-carbonyl reaction during soybean sauce processing. Antioxidative activities of soybean sauce and melanoidin were investigated *in vitro* system using linoleic acid emulsion. Soybean sauce and glucose-lysine model melanoidin showed the stronger antioxidative effect than control by ferric thiocyanate and conjugated diene assays. In addition, DPPH radical scavenging effect of soybean sauce was higher than melanoidin, which was ascribed to soluble peptide and low molecular protein existing in soybean sauce. To ascertain antioxidative effect of dietary soybean sauce and melanoidin *in vivo*, the male Wister rats were fed 10% soybean sauce or 10% glucose-lysine model melanoidin with corn oil or fish oil for 5 weeks. Fatty acid compositions in liver and plasma were influenced by oil source. Therefore, EPA and DHA contents of fish oil group were higher than those of corn oil group. When the inhibitory effect of soybean sauce and melanoidin on lipid peroxidation using TBARS methods was measured, fish oil group (FC) showed higher malondialdehyde (MDA) content than corn oil group (CC). However, supplementation of soybean sauce and melanoidin to fish oil group attenuated MDA formation. In the levels of phosphatidyl choline hydroperoxide (PCOOH) in liver and plasma by CL (chemi-luminescence)-HPLC method, PCOOH in FC group was significantly higher than that of CC group both in liver and plasma. Supplementation of soybean sauce to fish oil groups significantly inhibited the formation of PCOOH in plasma and liver, while melanoidin suppressed hepatic PCOOH formation. Based on these results, it can be suggested that soybean sauce possesses stronger antioxidative potential than melanoidin.

Key words: soybean sauce, melanoidin, fish oil, lipid oxidation, chemiluminescence

서 론

간장은 대두, 소맥 등을 원료로 하여 만들어진 발효식품으로서 된장, 고추장과 함께 우리 민족이 오랫동안 사용하여 온 조미료이다. Cheigh와 Moon(1-3)은 간장이 가열우육 및 리놀레산에 대하여 강한 항산화활성을 나타냄을 보고하였고, Ryu 등(4)은 불포화지방산의 함량이 높은 생선 조리시 간장을 사용하면 지방 산화를 상당히 억제하는 것으로 보고하였다. 간장의 항산화효과 원인 물질로는 대두에서 유래하는 flavone 물질, 각종 아미노산류, 펩티드들이 열거되고 있으나 가장 중요한 역할을 하는 것은 간장의 흑갈색 색소인 멜라노이딘인 것으로 밝혀져 있다(5-7). Amino-carbonyl 반응의 최종생성물인 멜라노이딘은 식품을 가공, 저장하는 과정에서 가장 빈번하게 생성되는 검은 색소물질로서 이들의 생리작용에 관해 관심이 높아지고 있다(8-11). 특히 멜라노이딘의 항산화효과는 여러 연구자들에 의해 보고된 바 있으며(12) Maillard 반응의 초기 반응에서 생성되는 reductone 구조로 인한 환원작용과 금속 킬레이트 작용 등이 중요한 항산화 메커니즘으로 알려져 있다(13). 간장 속에는 멜라노이딘 뿐만 아니라 다양한 콩 유래 항산화성분이 함유되어 있으므로 이들의 시너지효과로 인해 순수한 멜라노이딘보다 더 강한 항산화효과를 가질 것으로 기대되어진다. 그러나 간장

†Corresponding author. E-mail: fdsnmoon@inje.ac.kr
Phone: 82-55-320-3234, Fax: 82-55-321-0691

및 멜라노이딘의 항산화 효과에 관한 많은 연구가 *in vitro*에서 행해졌고, *in vivo* 연구로는 Chuyen 등(11)이 histidine-glucose, casein-glucose 또는 soy protein-glucose 모델 반응 혼합물을 흰쥐에게 투여하여 간의 TBARS 함량과 chemiluminescence 함량을 측정한 연구가 있을 뿐이다. Miyazawa(14)가 개발한 CL(chemiluminescence)-HPLC 방법은 생체내 인지질의 과산화반응 1차 산물에 대단히 민감한 분석방법으로 생체 내 과산화정도를 분자수준에서 정확히 측정할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 *in vitro*에서 양조간장과 glucose-lysine 모델 멜라노이딘의 항산화효과를 linoleic acid emulsion계를 이용하여 비교하고, DPPH법으로 유리 라디칼 소거활성을 측정하였다. 그리고 양조간장 및 모델 멜라노이딘의 항산화 효과를 *in vivo*에서 비교하기 위하여 옥수수기름과 어유을 쥐에게 5주간 섭취시키고 간과 혈장에서 지방산 조성과 과산화물의 축적 정도를 측정하였다. 이때 지질 산화측정방법으로 TBARS와 CL(chemiluminescence)-HPLC 방법을 이용하였다.

재료 및 방법

시료

Glucose-lysine 모델 멜라노이딘은 1 M glucose(D-glucose anhydrous, Sigma Chem. Co, USA)와 0.5 M lysine(L-lysine monohydrochloride, Nippon Rikagakuyakuhin Co., Japan)에 $NaHCO_3$ 0.1 M을 가해 12시간 가열하여 제조하였고, 양조간장은 전보(15)에서 항산화효과가 가장 높은 것으로 밝혀진 일본 K사의 농구간장을 사용하였다. 각 시료의 100배 희석액의 갈색도를 420 nm에서 측정하였을 때 양조간장은 0.08, 모델 멜라노이딘은 2.34의 갈색도를 나타내었다. 식이의 지질 급원으로 H사의 옥수수기름과 어유 급원으로서 Korean 상사(부산)에서 정제한 정어리 기름을 사용하였다.

*In vitro*에서 양조간장과 멜라노이딘의 항산화효과 측정

*In vitro*에서 양조간장과 멜라노이딘의 항산화효과는 linoleic acid emulsion 시스템에서 ferric thiocyanate법과 conjugated diene(CDA)법을 이용하여 측정하였고, α,α-diphenyl-β-pycryl-hydrazyl(DPPH) 라디칼에 의한 수소공여능을 측정하였다. 먼저 linoleic acid(Sigma Chem. Co., USA) 0.8413 g을 30 mL 에탄올에 녹인 후 인산 완충액(pH 7.0) 150 mL로 정용하였다. 이 용액 10 mL에 양조간장 또는 멜라노이딘 0.5 mL와 인산 완충액 8 mL를 혼합한 후 40°C에서 incubation하여 시료로 사용하였다. Ferric thiocyanate법에 의한 항산화효과는 Mitsuda 등(16)의 방법에 따라 incubation시킨 linoleic acid emulsion을 5시간 간격으로 0.1 mL씩 취해 75% 에탄올 4.7 mL, 30% rhodane ammonium 0.1 mL, 0.02 M 염화제1철(3.5% HCl) 0.1 mL을 혼합한 후 정확히 3분 후 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. CDA함량은 AOCS(17)의 방법에 따라 incubation시킨 linoleic acid emulsion을 5시간 간격으로 0.2 mL 취해 60% 메탄올 6 mL, 무수 메탄올 2 mL를 혼합한 후 234 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH에 의한 수소공여능의 측정은 Mitsuda 등(16)의 방법을 따라 시료 0.2 mL에 0.1 M 인산완충액(pH 6.5) 2.0 mL, 99% 에탄올 1.5 mL, 0.5 mM DPPH 알콜용액 1.0 mL를 혼합한 후 525 nm에서 5분간의 흡광도 감소로 측정하였다.

실험동물 및 식이조성

체중 100 g 가량의 Wister계 흰쥐 수컷(n=48)을 한국화학연구소(대전)에서 구입하여 시판 고형사료로 1주일간 적응시킨 후 옥수수기름 식이군(CC), 옥수수기름에 양조간장 10%를 첨가한 식이군(CS), 옥수수기름에 멜라노이딘 10%를 첨가한 식이군(CM), 어유 식이군(FC), 어유에 10% 양조간장을 첨가한 식이군(FS) 및 어유에 멜라노이딘 10%를 첨가한 식이군(FM)으로 나누어 5주간 사육하였다. 이때 식이조성은 Table 1에 나타내었으며, 사육기간 동안 식수 및 식이를 자유로이 섭취하도록 충분히 공급하였으며 사육실의 온도는 20~25°C로 유지하였고 12시간 간격으로 조명을 점등 및 소등하였다.

지방산 조성의 분석

간과 혈장의 지방산 조성을 분석하기 위해 Folch 등(18)의 방법을 약간 수정하여 간 및 혈장의 지질을 추출하고 Metcalfe 등의 방법(19)에 따라 methylation시켰다. 즉, 추출한 지질을 질소 가스로 농축시킨 뒤 BF_3-methanol(14%) 2.5 mL를 혼합하여 105°C dry bath(Thermolyne Co., USA)에서 1시간동안 가열하고 충분히 식힌 뒤 헥산 1 mL를 넣어 교반하고

Table 1. Composition of experimental diets (%)

Ingredients \ Group[1)]	CC	CS[2)]	CM	FC	FS[2)]	FM
Casein	24.0	23.4	24.0	24.0	23.4	24.0
Corn starch	60.3	52.5	50.3	60.3	52.5	50.3
Corn oil	10.0	10.0	10.0	-	-	-
Fish oil	-	-	-	10.0	10.0	10.0
Mineral mixture[3)]	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Vitamin mixture[3)]	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Choline chloride	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Soybean sauce	-	10.0	-	-	10.0	-
Melanoidin	-	-	10.0	-	-	10.0
NaCl[4)]	1.6	-	1.6	1.6	-	1.6
Total	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

[1)]Groups are divided as follow, CC: corn oil control, CS: Corn oil+soybean sauce, CM: corn oil+melanoidin, FC: fish oil control, FS: fish oil+soybean sauce, FM: fish oil+melanoidin.
[2)]The protein content and BV of soy sauce were 7.3% and 80%, therefore soy sauce diet group was subtracted 0.6 g casein content.
[3)]Mineral and vitamin mixture were purchased from Kurea Co. (Japan).
[4)]1.6% of NaCl was added to each diet groups except soybean sauce added groups because the NaCl content of soybean sauce was 16%.

3,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상등액을 취해 질소 가스로 농축하여 냉동고에 보관하면서 실험직전에 1 mL 헥산을 혼합하여 이 중 1 μL를 gas chromatograpy에 주입하여 지방산 조성을 분석하였다. 이때 사용한 기기는 Hewlett Packard 5890 GC였고, Ultra 2 cross linked 5% diphenyl, 95% dimethylpolysiloxane(25 m×0.32 mm×0.52 μm; Hewlett-Packard, USA) column을 사용하여 FID detector에서 검출하였다. Column 온도는 170°C, 200°C, 230°C에서 5분간 두었고 분당 2°C씩 승온시켰고, injector 및 detector 온도는 각각 210°C와 250°C로 하였으며 N_2를 carrier gas로 사용하였다. 분석된 각 지방산은 표준지방산과 retention time을 비교하여 확인하고 각 피크 면적을 상대적인 백분율, peak area %로 표시하였다.

TBARS에 의한 간 지질과산화물의 측정

간의 malonaldehyde 함량은 Tarladgis 등(20)의 방법에 따라 측정하였다. 즉 간 3 g을 증류수 15 mL를 넣은 비이커에 넣어 2분간 마쇄한 후 이 용액을 환저 플라스크에 옮긴 뒤 증류수 14.25 mL와 4 N HCl 0.75 mL를 가한 후 환류증류시키면서 10분간 증류액이 15 mL가 되도록 증류하였다. 증류액 중 5 mL를 screw cap tube에 취하고 TBA 시약 5 mL를 첨가하여 수조에서 35분간 중탕하고 충분히 식힌 뒤 538 nm에서 흡광도를 측정하였다.

CL-HPLC를 이용한 PCOOH(phosphatidyl choline hydroperoxide) 함량 측정

간 및 혈장에 존재하는 PCOOH는 Miyazawa 등(21)의 방법으로 CL(chemiluminescence)-HPLC에서 측정하였다. 간 0.2 g을 취해 10배량의 생리식염수를 혼합하여 약 30초간 균질화시킨 뒤 클로로포름 : 메탄올(2 : 1, v/v) 4 mL를 가하고 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 하층을 새로운 tube에 모았다. 상층에 다시 클로로포름 : 메탄올 용액을 가하여 동일한 방법으로 2회 하층을 추출한 뒤 sodium sulfate를 적당량 가하여 냉동실에서 하룻밤 방치한 뒤 여과지로 여과하여 rotary evaporator로 완전히 증류시키고, 질소 가스로 농축시킨 뒤 eluent 용액 100 μL에 녹여 이중 20 μL를 HPLC에 injection하여 분석하였다. 혈장 속의 PCOOH 측정을 위해 혈장 1 mL에 클로로포름 : 메탄올(2 : 1) 용액을 혼합하여 위와 동일한 방법으로 지질을 추출하여 HPLC로 분석하였다. 이때 분석조건은 Table 2에 나타내었다.

통계처리

실험의 분석결과는 평균±표준편차로 표시하였고 각 식이군간의 유의성은 one-way ANOVA로 조사하여 유의성이 있는 군에 대해서는 Fisher's least significant difference test로 사후 검정하였다.

결과 및 고찰

*In vitro*에서 양조간장 및 멜라노이딘의 항산화효과

Linoleic acid emulsion에 양조간장과 glucose-lysine 모델 멜라노이딘을 첨가하여 40°C에서 incubation시키면서 5시간 간격으로 ferric thiocyante법과 conjugated diene법으로 시료들의 항산화효과를 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 대조군에 비해 양조간장과 멜라노이딘 첨가시 linoleic acid 산화

Table 2. Conditions for CL-HPLC

Items	Conditions
HPLC	Gilson 306 model
Column	Sil-NH_2 (250×4.6 mm, 5 μm, JASCO)
Detector	Tohoku Electric Co. CLD-110
Integrator	Shimadzu CR6A, Japan
Mobile phase A	Hexane : iso-prophanol : methanol : water (5 : 7 : 2 : 1, v/v/v/v) Flow rate: 1 mL/min
Mobile phase B	Boric acid (50 mM), KCl (50 mM), Sodium carbonate (70 mM), Luminol (2 mg/L), Cytochrome C (10 mg/L) Flow rate: 1 mL/min

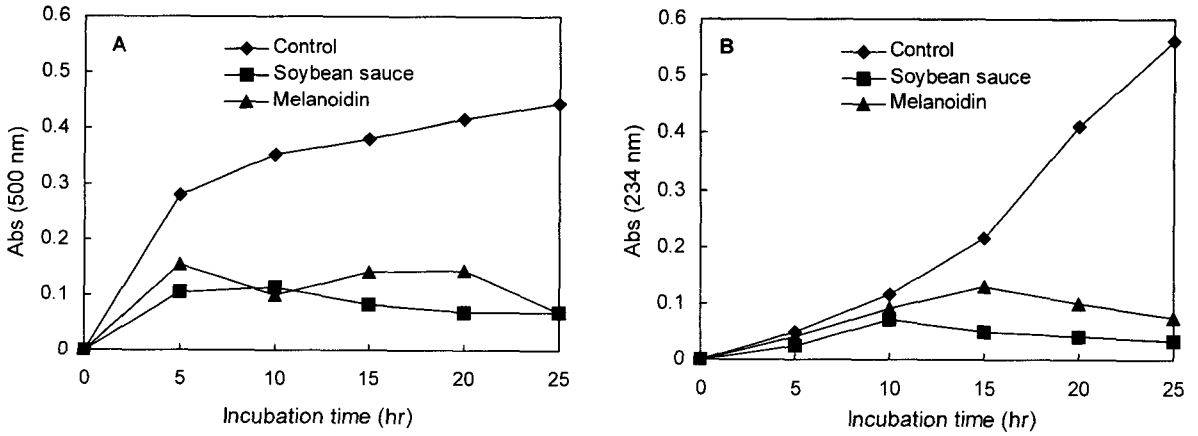

Fig. 1. Antioxidative activities of soybean sauce or glucose-lysine model melanoidin by (A) ferric thiocyanate method and (B) measurement of conjugated diene.

는 거의 일어나지 않았으며 양조간장의 효과가 약간 더 우수한 것으로 나타났다(Fig. 1-A). 234 nm에서 conjugated diene을 측정한 결과 역시 시료들의 항산화효과가 우수하였으며 마찬가지로 양조간장의 효과가 약간 더 우수한 것으로 나타났다(Fig. 1-B). 시료들의 DPPH 라디칼 소거능은 Fig. 2에서 나타난 것처럼 모델 멜라노이딘보다는 양조간장이 우수한 것으로 나타나 앞의 ferric thiocyanate법과 CDA법보다 예민한 것으로 나타났다. 이상의 결과 갈색도가 진한 모델 멜라노이딘보다 양조간장의 항산화효과가 높았으며 이는 양조간장이 항산화활성을 나타내는 물질로 멜라노이딘 뿐만 아니라 콩 유래 수용성 펩티드나 저분자 단백질을 다량 함유하고 있으며 이들의 상호작용에 의해 효과적으로 지질의 산화를 막은 것으로 여겨진다.

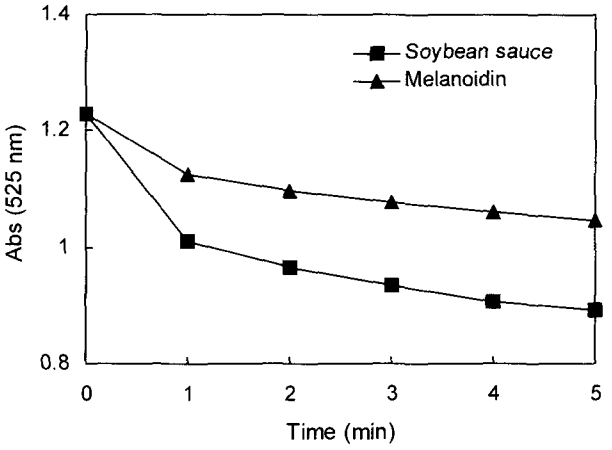

Fig. 2. Free radical scavenging activities of soybean sauce and glucose-lysine model melanoidin by DPPH method.

간과 혈장의 지방산 조성 비교

지질조성을 달리하여 실험 동물을 사육하고 양조간장과 멜라노이딘이 지방산 조성에 미치는 영향을 GC로 분석한 결과는 Table 3, 4와 같다. 실험에 사용되어진 옥수수기름의 지방산 조성은 18 : 2가 54.95%로 가장 높았고, 18 : 1이 28.63 %, 16 : 0이 11.95%로 Lee 등(22)의 실험에서 18 : 2가 57.4%, 18 : 1이 28.7%, 16 : 0이 11%인 것과 일치하였다. 어유 급원으로 사용되었던 정어리유는 16 : 0이 22.44%, 18 : 1이 18.51 %, 16 : 1이 14.37%, 20 : 5가 9.77%, 22 : 6이 5.47%로 Lee 등(22)과 Chung 등(23)의 결과와 유사하였으며 어유의 특징적인 지방산인 EPA(eicosapentaenoic acid)와 DHA(docosahexaenoic acid)가 상당량 함유되어 있음을 알 수 있었다.

실험 동물의 간 지방산 조성은 지방 급원에 따라 큰 차이를 나타내었는데 옥수수기름 섭취군의 경우 18 : 2가 27.8±3.71~28.6±6.09%로 가장 높았고, 16 : 0, 20 : 4, 18 : 1, 18 : 0 등의 함량이 높았다. 반면 어유 섭취군은 16 : 0의 함량이 가장 높았고, 18 : 0의 함량이 17.8±0.54~20.3±3.17%로 높게 나타났다. Chung 등(23)의 연구에서 18 : 2가 풍부한 옥수수기름을 섭취시켰을 때 쥐의 간에서 16 : 0, 18 : 0, 20 : 4 지방산이 높게 나타났으며, 미량의 18 : 2를 함유하고 있는 어유 섭취군의 간에서도 이들 지방산이 비슷한 비율로 존재하였음을

Table 3. Fatty acid composition of liver in rats fed experimental diets for 5 weeks (%)

Fatty acids	Corn oil group			Fish oil group		
	CC	CS	CM	FC	FS	FM
14 : 0	0.9±0.75	0.3±0.07	0.4±0.08	0.7±0.19	0.9±0.18	0.8±0.29
16 : 0	20.6±2.43	19.2±1.59	19.9±1.60	27.0±4.82	23.9±1.46	26.3±3.81
16 : 1	0.5±0.65	0.1±0.04	0.1±0.07	0.2±0.09	0.1±0.06	0.2±0 04
18 : 0	10.0±2.64	14.0±2.47	14.1±2.88	20.3±3.17	18.3±2.07	17.8±0 54
18 : 1 (n-9)	15.5±2.19	10.6±0.51	13.2±2.50	11.3±1.75	13.2±0.89	13.3±3 07
18 : 1 (n-7)	4.1±0.57	3.8±0.60	3.1±0.45	3.3±0.45	2.8±0.94	3.2±0 11
18 : 2	28.6±6.09	27.8±3.71	28.1±4.52	2.9±0.23	4.0±0.34	5.4±1.48
18 : 3	trace	trace	trace	trace	trace	trace
20 : 1	trace	trace	trace	trace	0.2±0.26	0.1±0.09
20 : 2	0.4±0.42	0.2±0.05	0.2±0.08	0.2±0.06	0.3±0.13	0.1±0.06
20 : 3	trace	trace	0.1±0.07	trace	0.2±0.13	0.1±0.03
20 : 4	15.9±1.88	19.3±1.81	17.1±3.14	11.4±1.79	13.3±1.67	13.7±1.66
20 : 5	-	-	-	7.7±0.88	7.9±1.27	6.4±1.38
22 : 1	0.3±0.12	0.3±0.20	0.4±0.20	0.4±0.16	0.4±0.13	trace
22 : 2	0.3±0.12	0.3±0.07	0.2±0.08	0.3±0.02	trace	trace
22 : 3	trace	trace	trace	0.2±0.03	0.1±0.05	trace
22 : 4	trace	-	0.3±0.15	0.2±0.01	0.3±0.16	0.2±0.16
22 : 5	1.2±0.64	1.9±0.62	1.0±0.17	trace	0.3±0.10	0.1±0.08
22 : 6	1.5±0.34	2.3±0.86	1.8±0.65	13.9±1.80	13.6±5.12	11.8±2.30
SFA	31.5±2.91	33.5±2.07	34.4±2.28	47.4±4.09	43.1±1.86	44.9±2.32
MUFA	20.4±1.77	14.8±0.68	16.8±1.61	15.2±1.23	16.7±1.14	16.8±1.66
PUFA	47.9±4.75	51.5±3.56	48.8±4.43	36.8±2.41	40.0±4.49	37.8±3.58

Groups are divided as follow, CC: corn oil control, CS: Corn oil+soybean sauce, CM: corn oil+melanoidin, FC: fish oil control, FS: fish oil+soybean sauce, FM: fish oil+melanoidin.
Values are mean±SEM (n=8).

Table 4. Fatty acid composition of plasma in rats fed experimental diets for 5 weeks (%)

Fatty acids	Corn oil group			Fish oil group		
	CC	CS	CM	FC	FS	FM
12 : 0	1.0±0.20	0.8±0.25	0.5±0.10	0.8±0.05	trace	1.3±1.01
14 : 0	4.4±0.72	4.6±1.43	3.1±0.58	4.8±1.49	6.4±1.88	7.4±3.90
16 : 0	32.3±9.80	30.0±4.24	27.0±5.75	28.7±8.01	23.8±5.34	27.5±3.23
16 : 1	trace	trace	trace	0.2±0.14	0.1±0.01	0.7±0.20
18 : 0	18.6±1.69	19.6±3.96	18.9±1.27	22.2±2.08	24.1±4.86	22.3±1.92
18 : 1 (n-9)	0.9±0.95	2.4±0.21	1.3±0.21	1.7±0.54	1.7±0.05	1.4±1.06
18 : 1 (n-7)	8.3±1.78	9.0±1.10	10.1±0.21	11.1±1.30	9.0±1.28	8.1±1.63
18 : 2 (n-6)	16.2±4.21	12.9±3.71	19.2±8.28	13.0±1.35	14.8±0.81	11.8±1.57
18 : 3	-	-	-	-	trace	trace
20 : 1	0.3±0.01	trace	-	-	trace	-
20 : 4	15.0±6.67	15.3±2.54	15.9±4.33	6.9±3.94	8.6±2.05	8.7±0.76
20 : 5	trace	0.1±0.08	0.3±0.16	5.8±1.44	5.2±1.96	5.8±2.16
22 : 1	-	1.6±0.87	0.2±0.09	0.8±0.05	-	0.1±0.05
22 : 2	-	-	trace	0.3±0.20	-	0.1±0.01
22 : 4	-	-	0.3±0.41	0.1±0.05	1.4±1.13	-
22 : 5	-	0.4±0.45	-	-	-	-
22 : 6	3.0±3.30	3.2±1.19	3.1±0.96	3.6±1.26	4.5±2.67	4.7±1.63
SFA	56.3±6.21	55.0±4.94	49.5±3.85	56.5±5.82	54.3±6.04	58.5±5.03
MUFA	9.5±1.37	13.0±1.09	11.6±0.26	13.8±1.02	10.8±0.67	10.3±1.47
PUFA	34.2±7.09	31.9±3.99	38.8±7.07	29.7±4.12	34.5±4.31	31.1±3.07

Group: see the legend of Table 3.

보고하여 체내 항상성 유지를 위한 대사과정인 것으로 여겨진다. 그밖에도 22 : 6의 함량이 옥수수기름 섭취군에서는 거의 낮았던 반면 어유 섭취군에서는 11.8±2.30~13.9±1.80%로 높았고, 20 : 5의 함량도 6.4±1.38~7.9±1.27%로 높아 어유에서 유래한 고농도의 EPA나 DHA가 섭취 후 생체에 반영됨을 알 수 있었다. 이는 Chung 등(23)과 Kwon과 Chung의(24)의 연구에서 어유나 EPA, DHA 농축어유를 섭취시킨 뒤 간의 인지질에서 지방산 조성을 조사한 결과 옥수수기름에 비해 EPA나 DHA 함량이 월등히 증가하였던 것과 일치하는 결과이다. SFA(saturated fatty acid)와 PUFA(polyunsaturated fatty acid)의 비를 살펴보면 옥수수기름 섭취군에서는 SFA가 31.5~34.4%, PUFA가 47.9~51.5%로 불포화지방산의 함량이 높았고 이는 옥수수기름에서 18 : 2의 함량이 높았던 것을 잘 반영하는 것으로 여겨진다. 어유 섭취군에서는 SFA가 43.1~47.4%, PUFA가 36.8~40.0%로 포화지방산의 함량이 약간 더 높은 것으로 나타났으며 n-3지방산의 함량이 18.3~21.8%로 상당히 높음을 알 수 있었다. 양조간장 및 멜라노이딘을 이들 기름에 혼합하여 투여한 영향은 뚜렷하지 않았다.

혈장에서 지방산조성 역시 옥수수기름 섭취군의 경우 16 : 0의 함량이 가장 높았고, 18 : 2 및 18 : 0, 20 : 4의 함량도 높은 것으로 나타났다. 어유 섭취군의 경우 16 : 0의 함량이 가장 높았고, 18 : 2, 18 : 1, 20 : 4, 20 : 5, 22 : 6의 순으로 함량이 높았다. SFA와 PUFA의 비는 옥수수기름 섭취군에서 49.5~56.3% : 31.9~38.8%였고, 어유 섭취군에서는 54.3~58.5% : 29.7~34.5%로 옥수수기름이나 어유 섭취시 혈장의 지방산 조성은 arachidonic acid나 EPA를 제외하고는 유사한 경향을 나타내었다. 이는 성인 여성을 대상으로 한 연구에서 식이지방산의 섭취패턴에 상관없이 PUFA/MUFA/SFA의 비율이 일정하게 유지되었다는 보고(25)와 건강한 남자 대학생에게 지방산 조성이 다른 식용유지를 5주간 섭취시켰을 때 실험전 수준과 동일하게 유지된다는 연구(26)와도 유사한 결과이다. 이는 섭취기간이 경과함에 따라 혈장, 간 및 지방 조직 사이에서 유리 지방산의 상호교환이 일어나 생체 항상성을 유지하기 때문으로 보여진다.

지질 과산화물의 함량

간의 지질과산화물 함량을 TBARS로 측정한 결과를 Fig. 3

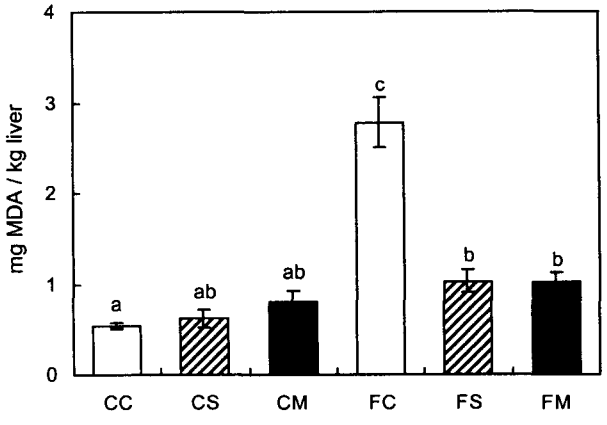

Fig. 3. Contents of malondialdehyde of liver in rats fed experimental diets for 5 weeks.
Groups are divided as follow, CC: corn oil control, CS: corn oil+soybean sauce, CM: corn oil+melanoidin, FC: fish oil control, FS: fish oil+soybean sauce, FM: fish oil+melanoidin. Values are mean±SEM (n=8).
[a-c]Values with different alphabets on the bar are significantly different by one-way ANOVA followed the Fisher's least significant difference test at the level of 0.05.

에 나타내었다. 옥수수기름 섭취군(0.54±0.03 mg MDA/kg liver)과 어유 섭취군(2.78±0.27 mg MDA/kg liver)의 지질과산화물 함량을 비교하였을 때 불포화지방산 함량이 높은 어유 섭취시 유의적으로 지질과산화가 증가되었고 이는 여러 연구자들에 의해 확인된 바 있다(27-30). 옥수수기름에 양조간장과 멜라노이딘의 첨가시 지질과산화물의 함량은 각각 0.62±0.10 mg MDA/kg liver와 0.80±0.12 mg MDA/kg liver로 다소 증가하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았고, 양조간장이나 멜라노이딘의 효과는 뚜렷하지 않았다. 그러나 어유에 양조간장(FS)과 모델 멜라노이딘(FM)의 첨가시 각각 1.03±0.13 mg MDA/kg liver와 1.02±0.10 mg MDA/kg liver로 대조군에 비해 지질과산화를 63% 억제하여 *in vivo*에서 이들의 항산화효과를 확인할 수 있었고 양조간장과 멜라노이딘의 갈색도 차이에도 불구하고 생체내 malondialdehyde 생성 억제 효과는 유사하였다. Rhee와 Choi(31)는 신선한 옥수수기름을 투여한 군에 비해 가열산화시킨 옥수수기름을 투여한 흰쥐의 간에서 지질 과산화물 함량이 훨씬 증가함을 보고하였고, 비타민 E 첨가시 지질과산화물의 증가를 억제하였다고 보고하였다. 따라서 본 연구결과에서 산화가 비교적 잘 일어나는 어유에서 간장 및 멜라노이딘은 우수한 항산화효과를 발휘한 것으로 여겨지며, 이들 물질의 높은 수소공여성이 지질 과산화 과정에서 생성되는 유리 라디칼을 효과적으로 제거하였기 때문으로 여겨진다.

CL-HPLC에 의한 지질 과산화물의 함량

CL-HPLC 방법에 의한 간과 혈장의 막 인지질 과산화물 측정 결과는 다음과 같다(Fig. 4). 식이조성에 따라 PCOOH 함량 차이가 크게 나타났다. 옥수수기름섭취군(CC)에서 간의 과산화물 함량은 8.58±0.92 nmol/g이었으며, 옥수수기름에 양조간장과 멜라노이딘을 첨가한 경우 3.91±0.66와 4.93±0.75 nmol/g으로 대조군에 비해 54%와 42% 억제효과를 나타내었다. 어유 섭취군의 경우 14.65±0.87 nmol/g으로 옥수수기름 섭취군에 비해 지질과산화물이 70% 이상 증가하였고, 양조간장과 멜라노이딘 섭취시 각각 9.03±1.09 nmol/g와 9.87±1.53 nmol/g으로 대조군에 비해 유의적으로 PCOOH의 함량을 감소시키는 것으로 나타났다.

혈장에서도 이와 동일한 경향으로 옥수수기름 섭취군(CC)의 경우 2.17±0.16 μM이었고, 양조간장과 멜라노이딘 첨가시 1.15±0.24와 1.63±0.20 μM으로 옥수수기름 섭취군과 비교하여 확연히 감소하는 경향을 나타내었고 특히 멜라노이딘보다는 양조간장의 항산화효과가 더 우수한 것으로 나타났다. 어유 섭취군의 혈장 PCOOH 함량은 3.44±0.47 μM으로 옥수수기름에 비해 높게 나타났고, 양조간장과 멜라노이딘 섭취시 1.23±0.10과 2.57±0.46 μM으로 감소하였으며 양조간장의 항산화효과는 멜라노이딘에 비해 유의적으로 우수함을 알 수 있었다.

생체 과산화물 측정에 여러 가지 방법들이 사용되어져 오고 있으나 Miyazawa(14)가 개발한 CL-HPLC에 의한 지질과산화물의 측정 방법은 지질 산화반응의 1차 산물인 hydroperoxide기에 대해 높은 특이성을 나타내며 고감도로 측정가능하다는 점에서 대단히 각광받는 분석방법이라 할 수 있다. 본 실험에서도 간과 혈장에서 CL-HPLC를 이용한 과산화물의 함량은 TBARS로 측정한 지질과산화와 비교하여 높은 감도에서 측정할 수 있었고, 이는 Miyazawa 등(21)이 흰쥐에게 10% 잇꽃기름과 10% 어유 식이를 3개월간 섭취시킨 후 간과 뇌의 PCOOH 함량을 측정한 결과 어유 투여군의 PCOOH 함량이 잇꽃기름 투여군에 비해 유의적으로 증가하였다는 보고와 일치한다.

과다한 불포화지방산의 섭취는 생체의 산화적 스트레스에 대한 방어계를 약화시켜 여러 가지 다양한 질병을 야기하게 된다(32). 그러나 고도불포화지방산의 함량이 많은 기름이라도 α-tocopherol이나 β-carotene의 첨가시 간의 지질과산화를 억제시키는 것으로 보고되어(33), 불포화지방산의 함량이 높은 어유 섭취시 항산화효과가 있는 물질을 함께 섭취하는 것이 필요하다 여겨진다.

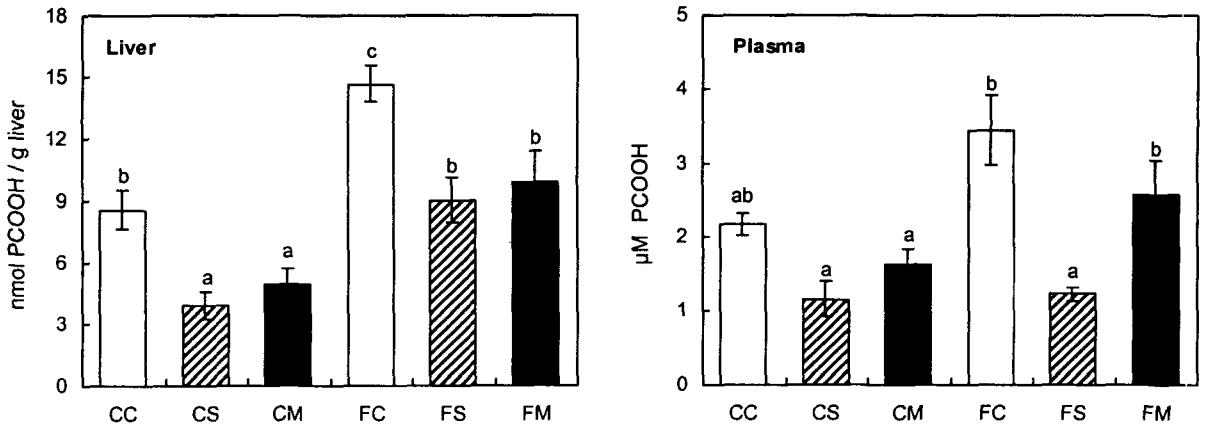

Fig. 4. Contents of phosphatidyl choline hydroperoxide (PCOOH) of liver and plasma in rats fed experimental diets for 5 weeks.
Group: see the legend of Fig. 3.

요 약

*In vitro*와 *in vivo*에서 양조간장과 glucose-lysine 모델 멜라노이딘의 항산화효과를 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다. *In vitro*에서 양조간장과 멜라노이딘의 항산화효과를 linoleic acid emulsion계를 이용하여 비교하였을 때 양조간장과 멜라노이딘은 대조군에 비해 우수한 항산화활성을 나타내었고 특히 양조간장의 효과가 더 우수한 것으로 나타났다. DPPH 라디칼 소거활성 역시 멜라노이딘에 비해 양조간장의 효과가 큰 것으로 나타났다. 지방산 조성이 상이한 옥수수기름과 어유를 섭취시킨 흰쥐에 10% 양조간장 및 멜라노이딘을 5주간 섭취시켰을 때 간의 지방산 조성은 섭취 지방산에 따라 차이가 뚜렷하였으나 양조간장과 멜라노이딘의 효과는 대조군과 유사하였다. 지질 과산화물 생성정도를 TBARS로 측정하였을 때 불포화지방산 함량이 높은 어유 섭취군에서 지질과산화가 증가하였으며 간장과 멜라노이딘은 지질과산화를 억제하는 효과를 나타내었다. CL(chemiluminescence)-HPLC 방법을 이용하여 간과 혈장의 막 인지질 PCOOH 함량을 측정한 결과, 어유의 섭취는 옥수수기름 섭취군에 비해 지질 과산화를 월등히 증가시켰고 양조간장과 멜라노이딘의 섭취는 유의적으로 지질 과산화를 억제한 것으로 나타났다. 특히 양조간장의 효과가 멜라노이딘 보다 우수하여 이는 콩유래 항산화물질인 수용성 펩티드나 저분자 단백질들이 효과적으로 항산화활성을 나타낸 것으로 여겨지며, 불포화지방산이 높은 식품의 섭취시 간장을 소스로 이용하는 것이 지질의 과산화를 억제할 것으로 기대되어진다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부·한국과학재단 지정 지역협력연구센터인 인제대학교 바이오헬스 소재 연구센터(Biohealth Products Research Center) 및 한국과학재단 특정기초연구(R01-2000-000-00187-0) 연구비 지원으로 수행되었고 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Cheigh HS, Moon GS. 1986. Antioxidative effect of soybean sauce on the lipid oxidation of cooked meat. *Korean J Food Sci Technol* 18: 313-318.
2. Cheigh HS, Moon GS. 1987. Antioxidative characteristics of soybean sauce in lipid oxidation process. *J Food Sci Technol* 19: 537-541.
3. Cheigh HS, Lee JS, Moon GS, Park KY. 1993. Antioxidative activity of browning products fractionated from fermented soybean sauce. *J Korean Soc Food Nutr* 22: 565-569.
4. Ryu SH, Lee YS, Moon GS. 2002. Effects of salt and soysauce condiment on lipid oxidation in broiled mackerel (*Scomber japonicus*). *Korean J Food Sci Technol* 34: 1030-1035.
5. Hayes RE, Bookwalter GN, Bagley EB. 1977. Antioxidant activity of soybean flour and derivatives-A review. *J Food Sci* 42: 1527-1531.
6. Moon GS. 1989. Separation of antioxidative substances in fermented soybean sauce using ion exchange resin. *Inje J Inje Univ* Korea 5: 119-127.
7. Cheigh HS, Moon GS. 1990. Separation and characteristics of antioxidative substances in fermented soybean sauce. *J Food Sci Technol* 22: 461-465.
8. Kawamura S. 1983. Seventy years of the Maillard reaction. In *The Maillard reaction in foods and nutrition.* Waller GR and Feather MS, eds. American chemical society, Washington DC. p 3.
9. Yamaguchi N. 1986. Antioxidative activity of the oxidation products prepared from melanoidins. In *Aminocarbonyl reactions in food and biological systems.* Fujimaki M, Namiki M, Kato H, eds. Elsevier, Tokyo. p 291-299.
10. Kim SB, Hayase F, Kato H. 1986. Desmutagenic effects of melanoidins against amino acid and protein hydrolyzates. In *Aminocarbonyl reactions in food and biological system.* Fujimaki M, Namiki M, Kato H, eds. Elsevier, Tokyo. p. 383-392.
11. Chuyen NV, Utsunomiya N, Hodaka A, Kato H. 1990. Antioxidative effects of Maillard reaction products in vivo. In *The Maillard reaction in food processing, human nutrition and physiology.* Pinot PA, ed. Birkhauser Verlag Bagel. p 285-290.
12. Namiki M. 1988. Chemistry of Maillard reaction : Recent studies on the browning reaction mechanism and the development of antioxidants and mutagens. *Adv Food Res* 32: 115-184.
13. Kirigaya N, Kato H, Fujimaki M. 1969. Studies on antioxidant activity of nonenzymatic browning reaction products. Part 2. Antioxidant activity of nondialyzable browning reaction products. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi* 43: 484-491.
14. Miyazawa T. 1989. Determination of phospholipid hydroperoxides in human blood plasma by a chemiluminescence-HPLC assay. *Free Radial Biol Med* 7: 209-218.
15. Moon GS. 1991. Comparison of various kinds of soybean sauces in their antioxidative activities. *J Korean Soc Food Nutr* 20: 582-589.
16. Mitsuda H, Yasumoto K, Iwami K. 1981. Antioxidative action of indole compounds during the antioxidation of linoleic acid. *Agric Biol Chem* 45: 735-739.
17. American Oil Chemists' Society. 1998. Spectrophotometric determination of conjugated dienoic acid. In *Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society* (Official Method Ti 1a-64). 5th ed. AOCS Press, IL.
18. Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GHS. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509.
19. Metcalfe LD, Schmitz AA, Pelka JR. 1966. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Anal Chem* 38: 514-515.
20. Tarladgis BG, Watts BM, Younathan MT. 1960. A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. *J Am Oil Chem Soc* 37: 44-48.
21. Miyazawa T, Suzuki T, Fujimoto K, Yasuda K. 1992. Chemiluminescent simultaneous determination of phosphatidyl choline hydroperoxide and phosphatidylethanolamine hydroperoxide in the liver and brain of the rat. *J Lipid Research* 33: 1051-1059.
22. Lee JJ, Han IK, Choi YJ, Kang JS, Chang YS. 1993. Effects of dietary lipid sources and levels on lecithine : cholesterol acyltransferase activity and cholesterol metabolism in rats. *Korean J Nutr* 26: 131-144.

23. Chung YJ, Park JS, Park HJ, Chang YK. 1994. Effect of dietary eicosapentaenoic acid on serum and liver lipids patterns of male rat. *Korean J Nutr* 27: 537-551.
24. Kwon SY, Chung YJ. 2001. The effect of dietary concentrated oils of eicosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid and perilla oil on lipid metabolism in rats fed low fat diet. *Korean J Nutr* 34: 626-636.
25. Oh KW, Lee SI, Song KS, Nam CM, Kim YO, Lee YC. 1995. Fatty acid intake pattern and compositions of serum phospholipids-fatty acids of the Koreans adults. *Korean J Lipidol* 5: 153-165.
26. Oh EJ, Kwon JS, Chang YK. 1997. Effect of dietary fatty acids on serum lipids and fatty acid composition of serum phospholipid in men. *Korean J Nutr* 30: 415-424.
27. Mouri K, Ikesu J, Esaka T, Igarashi O. 1984. The influence of marine oil intake upon levels of lipids, alpha-tocopherol and lipid peroxidation in serum and liver of rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 30: 307-318.
28. Saito M, Nakatsugawa K. 1994. Increased susceptibility of liver to lipid peroxidation after ingestion of a high fish oil diet. *Int J Vit Nutr Res* 64: 144-151.
29. Gonzalez M, Gray J, Schemmel R, Dugan L, Welsch C. 1992. LIpid peroxidation products are elevated in fish oil diets even in the presence of added antioxidation. *J Nutr* 122: 2190-2195.
30. Polavarapu R, Spitz D, Sim J, Follansbee M, Overley L. Rahemtulla A, Nanji A. 1998. Increased lipid peroxidation and impaired antioxidant enzyme function is associated with pathological liver injury in experimental alcoholic liver disease in rats fed diets high in corn oil and fish oil. *Hepatology* 27: 1317-1323.
31. Rhee SJ, Choi WK. 1991. Effects of heated oil and vitamin E on lipid peroxidative liver damage in rat. *J Korean Soc Food Nutr* 20: 111-120.
32. Park GY, Rhee SJ. 1988. Effect of dietary polyunsaturated fatty acid and α-tocopherol on lipid peroxidatior in rat liver. *Korean J Nutr* 21: 295-304.
33. Kim HY, Jun YS, Song YO. 1995. Effects of α-tocopherol and β-carotene supplementation on oxidative damage by lipid oxidation in rat liver. *J Korean Soc Food Nutr* 24: 371-377.

(2003년 4월 26일 접수; 2003년 7월 31일 채택)