

녹차유부 섭취가 실험쥐의 혈청지질에 미치는 영향

이미영¹ · 염윤기^{2*}

Antihyperlipidemic Effects of Fried Beancurd Containing Powdered Green Tea in Rats

Mi-Young Lee¹ and Yoon-Ki Yum^{2*}

요 약 본 연구에서는 녹차분말이 포함된 녹차유부의 시제품 섭취가 실험쥐의 혈청지질에 미치는 영향을 조사하였다. 녹차분말이 포함된 유부 제품의 성분을 HPLC로 분석한 결과 녹차의 기능성 성분인 epigallocatechin, epicatechin, epicatechin gallate, epigallocatechin gallate 등이 공정단계에서 파괴되지 않고 잘 보존됨을 확인할 수 있었다. 개발된 녹차유부 시제품을 실험쥐에 섭취시킨 후 혈청의 HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglyceride와 포도당농도를 측정된 결과 일반 유부를 섭취한 대조군에 비하여 혈중 LDL-cholesterol 농도와 혈당량이 유의성 있게 감소되었다.

Abstract Effect of fried beancurd containing powdered green tea on the serum lipid metabolism in rats were investigated. HPLC analysis of green tea-fried beancurd showed that epigallocatechin, epicatechin, epicatechin gallate and epigallocatechin gallate were intact without degradation during manufacturing process. Serum HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglyceride and glucose concentrations were measured in rats fed experimental diet containing green tea-fried beancurd. Serum LDL-cholesterol contents and blood glucose were significantly decreased with treatment of green tea-fried beancurd comparing to control.

Key Words : Fried beancurd, Green tea, Lipid, Glucose

1. 서 론

최근 우리나라에서는 점차 고혈압, 동맥경화증 및 뇌졸중 등을 비롯한 만성적인 순환기 계의 질환으로 인한 사망율이 증가추세에 있어 사회학적으로 문제가 되고 있다. 이러한 질병의 유발 인자는 매우 다양하며, 특히 혈청 콜레스테롤이나 중성지방의 수준상승과 밀접한 관계가 있음이 밝혀지면서 혈청 콜레스테롤 축적을 효과적으로 억제시키기 위한 연구가 활발하게 수행되어 왔다.

콜레스테롤은 4개의 고리로 된 perhydrocyclopentanophenanthrene 핵을 포함하여 27개의 탄소를 가진 steroid의 일종으로, 세포막의 구성성분, 호르몬 및 비타민의 전구체 등으로서 생명 현상의 유지와 조절에 필수적인 생리 물질이다[1]. 콜레스테롤은 체내에 약

140 g이 존재하는데 이 중 약 7%가 혈장에 분포되어 있다. 이 혈장 콜레스테롤이 심근경색, 뇌혈전 및 동맥경화 등과 같은 순환기계 성인 질환의 발생과 밀접하게 관련되어 있다. 혈액내의 콜레스테롤 함량이 과다하면 atherosclerotic plaque를 형성하여 각종 질환을 유발할 가능성이 크다. 따라서 콜레스테롤의 혈액내에서 안전한 이동과 혈액으로부터의 적절한 제거가 효율적으로 조절되어야 한다. 혈액내의 콜레스테롤은 단백질, 인산지방질과 결합하여 지방단백질형으로 운반되는데 밀도에 따라 chylomicron, 초저밀도지방단백질(VLDL), 저밀도지방단백질(LDL), 중간 저밀도지방단백질(IDL), 고밀도지방단백질(HDL)등으로 분류한다. 식이성 지방이나 콜레스테롤은 장에서 chylomicron으로 합성되어 순환 혈관으로 수송되고 간에서 합성된 VLDL은 혈액을 통해 순환되는데 장에서 분비되는 lipoprotein lipase에 의해 chylomicron은 간으로 흡수되고 VLDL은 IDL을 거쳐 LDL로 분해되어 각 장기에 흡입된다[2].

콜레스테롤을 운반하는 혈청 LDL의 농도를 저하시키기 위해서 다양한 약물이 개발되어 있다. HMG-CoA로부터 mevalonate로 전환시키는 효소인 HMG-CoA

녹차유부 시제품을 제공하여 주신 (주)신미식품에 감사드립니다.

¹순천향대학교 생명과학부

²순천향대학교 약리학과 교실

*교신저자: 이미영(miyoung@sch.ac.kr)

reductase는 cholesterol 합성속도의 율속단계 효소이며, HMG-CoA reductase 활성의 저하는 LDL-receptor의 활성을 증가시켜 혈청 cholesterol 농도를 감소시킨다고 보고되었다[3]. 이와 관련하여 지금까지 알려진 HMG-CoA reductase의 억제제로는 penicillium citrinum이 생산하는 Compactin과 Lovastatin, Pravastatin, Simvastatin 등이 있다[4-7]. 또 다른 cholesterol 합성저해제로는 squalene synthase의 저해제인 Zaragozic acid가 알려져 있다. 이밖에 cholesterol의 흡수저해제로는 Acyl CoA: Cholesterol acyltransferase(ACAT)저해제에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있는데 일본에서 개발된 purpactin, epicohliquinone A, acaterin, gypsetinpyripyropenes등이 보고되어 있다[8, 9]. 뿐만 아니라 cholesteryl ester transfer protein(CETP)의 혈중 농도를 줄이거나 활성을 억제하여 혈중의 HDL을 증가시키고 LDL을 저해시키려는 연구도 진행되고 있다. 그러나 최근에는 생리적인 접근방법으로서 자연식이 요인을 이용한 혈청 콜레스테롤 축적 억제인자에 많은 관심을 두고 있다. 이 중 다 불포화 지방산(PUFA)을 과량 함유하는 식물성유가 혈중 콜레스테롤 축적을 효과적으로 억제시킬수 있다고 알려져 있다. 혈청 콜레스테롤 수준은 식이내 여러인자에 의해 영향을 받는다고 알려져 있으며, 특히 식이지방의 종류와 수준 및 콜레스테롤 함량이 큰 영향을 미친다는 것이 잘 밝혀져 있다. 식이지방의 불포화지방산 함량이 높은 식물성유는 혈장 콜레스테롤의 축적을 억제시키는 효과를 나타내고 반대로 포화지방산 함량이 높은 동물성 지방은 혈장 콜레스테롤 상승효과를 나타낸다고 일관성있게 보고되고 있다[10].

또한 보리나 귀리등의 곡류에 다량 함유되어 있는 glucan이 혈중 콜레스테롤의 축적을 억제시켜 동맥경화 예방효과가 있음이 최근 밝혀졌다. 곡류뿐만 아니라 녹차, 마늘, 고추, 홍삼, 인삼, 버섯 및 각종 천연식물도 콜레스테롤 합성 억제효과가 보고되고 있다. 따라서 본 연구에서는 콜레스테롤 억제효과가 알려진 녹차 분말이 첨가된 녹차유부 시제품이 혈청 지질 성분에 미치는 효과에 관하여 살펴보았다.

2. 실험재료 및 방법

2.1 기능성 녹차유부

녹차 분말이 첨가된 기능성 녹차유부의 시제품은 (주) 신미식품에서 공급받아 사용하였다.

2.2 기능성 녹차유부에서 catechin 추출 및 HPLC 분석

기능성 녹차유부에서 추출한 catechin을 분석하기 위

하여 SYKNCM(Germany)사 HPLC를 사용하였고, column은 Macherey-Nagel C₁₈(4.6×250 mm)을 사용하였다. 녹차 유부제품으로부터 catechin을 추출하기 위하여 Ikegaya 분석법을 변형하여 사용하였다[11]. 분쇄한 유부녹차 시료 50 g을 1000 ml 용량 플라스크에 넣었다. 여기에 뜨거운 물 400 ml을 넣은 다음 20분 정도 충분히 흔들어 준 뒤 80°C 항온수조에서 30분간 방치하여 가온 추출하였다. 그리고 플라스크를 실온까지 식힌 후 여과지 No. 2로 여과하였다. 여과된 여액 100 ml을 분액깔대기에 취한 후 ethyl ether 100 ml을 넣어주고 충분히 흔들어 준 후 하층을 새로운 분액깔대기로 옮겼다. Ethyl ether 100 ml을 다시 넣어주고 카페인, 지질, 색소가 녹아있는 상층을 제거하여 주었다. 이러한 조작을 3회 반복 후 카페인이 제거된 물 용액에 다시 butanol 100 ml을 넣어 충분히 흔들어 준 후 하층을 새로운 분액깔대기에 취하였다. 다시 butanol 100 ml을 넣어준 후, 상층을 round flask에 모았다. 이 과정을 3회 반복한 후 round flask에 모인 butanol 용액을 rotary evaporator로 감압농축한 후 methanol에 녹였다. 이 추출액을 0.45 μm micropore로 여과하여 HPLC로 분석하였다(Fig. 1).

2.3 기능성 녹차유부 섭취가 실험쥐의 혈청 지질과 혈당 농도에 미치는 영향

2.3.1 식이섭취 방법

1군은 사료와 유부가 50%씩 혼합되어있는 pellet 사료를 섭취시켰고, 2군은 1군 사료를 기준으로 녹차분말이 0.1% 함유된 녹차유부, 3군은 0.3% 녹차유부, 4군은 0.5% 녹차유부가 함유되도록 하여 각각 실험쥐에 급여하였다. 각 실험군마다 5마리의 실험쥐를 8주간 사육하였다.

2.3.2 체중 측정

실험기간 중 체중을 이틀에 한번씩 오전 11시에 측정하였고, 혈청을 채취하기 하루 전날의 체중을 마지막 체중으로 결정하였다.

2.3.3 혈액의 처리방법

채취한 혈액은 상온에서 혈액응고를 확인하고 4°C에서 30분 동안 방치한 후, 3,000 x g에서 10분 동안 원심분리하여 혈청을 분리하였다.

2.3.4 혈청내 총콜레스테롤 측정법[12]

혈청중에는 유리형 및 에스터형 콜레스테롤이 존재하는데 에스터형에 cholesterol ester hydrolase 효소를 반응시키면 유리형과 지방산으로부터 분해되고, 유리형에 콜레스테롤 산화효소를 반응시키면 H₂O₂와 4-cholestenone이 생성된다. 생성된 H₂O₂에 과산화효소와 4-아미노안티피린 및 phenol을 동시에 반응시키면 산화

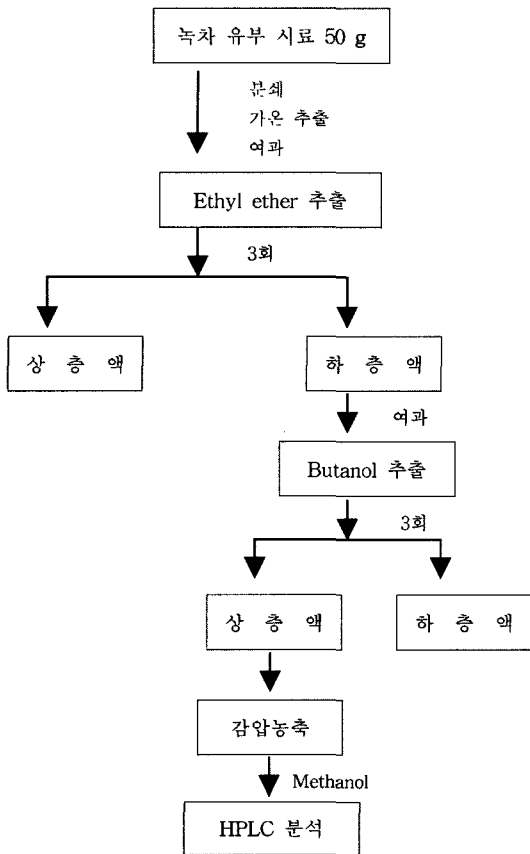


Fig. 1. Scheme of catechin isolation from fried beancurd containing powdered green tea.

적 축합반응으로 키논이 생성되는데 이를 비색하여 콜레스테롤을 정량하였다. 소반응 측정을 위하여 효소시약 3 ml와 표준액 20 µl를 혼합하고, 효소시약 3 ml와 검체 혈청 20 µl를 혼합하였고, 37°C에서 5분간 반응시킨 후 맹검을 대조로 하여 검체 및 표준액의 흡광도를 500 nm에서 측정하였다.

2.3.5 HDL(High density lipoprotein)-cholesterol 측정법[13]

Dextran sulfate와 magnesium sulfate를 이용하여 LDL과 VDL의 lipoprotein을 침전시킨 후 상층에 남아 있는 HDL 중의 콜레스테롤을 측정했다. 우선 혈청 1.0 ml을 원심분리용 tube에 넣고 침전시약 0.1 ml을 넣어 혼합한 후 5분간 실온에서 방치하고, 침전물을 제거하기 위해서 10분간 3000 rpm에서 원심분리하여 상층액을 검체로 사용하였다. 효소시약 3 ml와 표준액 20 µl, 효소시약 3 ml와 검체 혈청 20 µl와 혼합하여 37°C에서 5분간 반응시킨 후 맹검을 대조로하여 검체

및 표준액의 흡광도를 500 nm에서 측정하였다.

2.3.6 중성 지질(triglycerides) 함량 측정법[12]

효소반응에 의해 생성된 H₂O₂가 아미노안티피린 및 TOOS와 반응하여 산화적 축합반응으로 적색의 퀴논을 생성하는 방법을 사용하였다. 효소시약 3 ml와 표준액 20 µl, 효소시약 3 ml와 검체(혈청) 20 µl와 혼합하여 37°C에서 5분간 반응시킨 후 맹검을 대조로하여 검체 및 표준액의 흡광도를 546 nm에서 측정하였다.

2.3.7 포도당(glucose) 함량 측정법[14]

발색법을 이용하여 포도당 농도를 측정하는 방법을 사용하였다. 효소시약 3 ml와 표준액 20 µl, 효소시약 3 ml와 검체 혈청 20 µl와 혼합하여 37°C에서 5분간 반응시킨 후 맹검을 대조로하여 검체 및 표준액의 흡광도를 505 nm에서 측정하였다.

2.3.8 LDL(Low density lipoprotein)-cholesterol 측정법

LDL-cholesterol은 Friedwald 공식을 사용하여 계산하였다[15].

$$\text{Friedwald 공식} : \text{LDL} = \text{TC} - (\text{TG}/5 + \text{HDL})$$

TC : Total cholesterol

TG : Triglyceride

HDL : High density lipoprotein

2.4 자료 처리

실험 결과는 컴퓨터 프로그램을 이용하여 평균과 표준편차를 구한 후 유의성을 검토하였다.

3. 결과 및 고찰

보리나 귀리, 메밀 등의 곡류에 다량 함유되어 있는 glucan 뿐만 아니라 녹차, 홍삼, 인삼, 버섯 및 각종 천연식물에도 콜레스테롤 합성 저해효과가 있는 것으로 알려져 있다. 이중 유부 제조공정단계에서 직접 사용할 수 있을 뿐만 아니라 상품으로서의 높은 이미지를 가지고 있고 제품의 단가 면에서도 경쟁력이 있다고 판단되어진 녹차 분말이 기능성 천연첨가제로 선정되었다. 유부의 제조공정단계에서 녹차분말을 첨가한 녹차유부 시제품을 (주)신미 식품에서 제조하였다.

기능성 콜레스테롤 억제제로 선정된 녹차분말의 성분을 HPLC로 분석한 결과 이미 알려진 바와 같이 epigallocatechin gallate(EGCG), epicatechin gallate(ECG), epigallocatechin(EGC) 및 epicatechin(EC) 등의 catechin류가 존재하고 있었다(Fig. 2). 유부의 공정 단계에는 유당단계가 있다. 따라서 catechin류가 유당단계에서 파괴되지 않고 안정하게 존재하는지 알아보기 위하여 제조된 녹차유부에서 성분 물질을 추출하여 epigallocatechin gallate(EGCG), epicatechin gallate

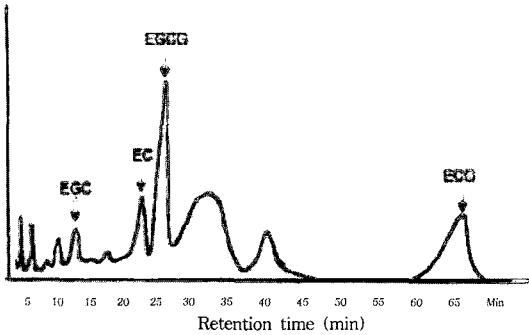


Fig. 2. HPLC chromatogram of catechin from powdered green tea.

EGC : epigallocatechin
 EC : epicatechin
 EGCG : epigallocatechin gallate
 ECG : epicatechin gallate

(ECG), epigallocatechin(EGC) 및 epicatechin(EC) 등의 catechin류를 분석하였다. 그 결과 유탕처리된 녹차 유부제품에서도 동일한 catechin류가 존재함을 확인 할 수 있었다(Fig. 3). Fig. 4에서는 8주 동안 녹차유부를 섭취한 실험쥐의 체중 변화를 측정하였다. 그 결과 실험 초기에는 일반 유부를 섭취한 대조군과 실험군의 체중 사이에 큰 차이가 없었지만, 섭취기간이 늘어날수록 현저한 체중의 차이를 나타내었다. 녹차분말이 0.5%가 포함된 4군의 초기 체중은 약 90 g이었고 8주 후 체중은 약 359.4 g이어서 8주간 약 269.4 g의 체중이 증가하였다. 이에 비해 대조군인 1군의 초기체중은 약 78.8 g이었고 8주후 평균 체중이 375 g이어서 8주간의

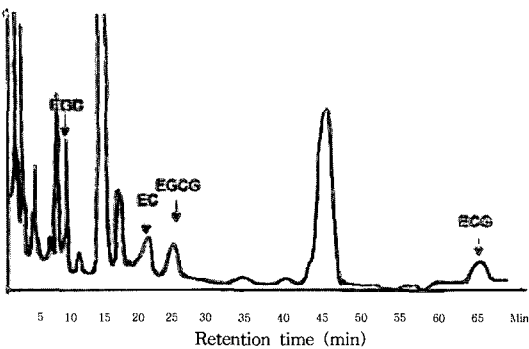


Fig. 3. HPLC chromatogram of catechin from fried beancurd containing powdered green tea.

EGC : epigallocatechin
 EC : epicatechin
 EGCG : epigallocatechin gallate
 ECG : epicatechin gallate

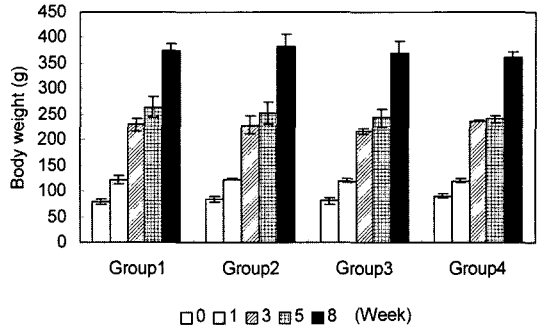


Fig. 4. Effects of green tea-fried beancurd on the body weight of rat fed experimental diet for 8 weeks.

Group 1 : control
 Group 2 : green tea component 0.1%
 Group 3 : green tea component 0.3%
 Group 4 : green tea component 0.5%

체중 증가량이 약 296.3 g이었다. 이러한 결과는 0.5% 녹차유부 섭취가 대조군에 비하여 약 27 g의 체중 감소 효과를 나타냄을 보여준다. 특히 녹차 분말이 함유되어 있는 유부를 섭취한 실험쥐의 체중은 녹차의 함유량이 많을수록 유의성있게 감소된다는 것을 보여주었다(Fig. 4). Fig. 5에서는 녹차유부 섭취가 실험쥐의 혈청 지질 성분에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 총 콜레스테롤 수치는 녹차의 함량이 높을 수록 대조군에 비해 최대 15% 감소하였다. 위험예방인자로서의 가치가 인정된 HDL-콜레스테롤에 있어서는 전체적인 유의성은 없었으나 1군과 4군에 비해 2군과 3군에서 높게 나타났다. 중성지질(triglyceride)의 경우 1군과 비교해 보았

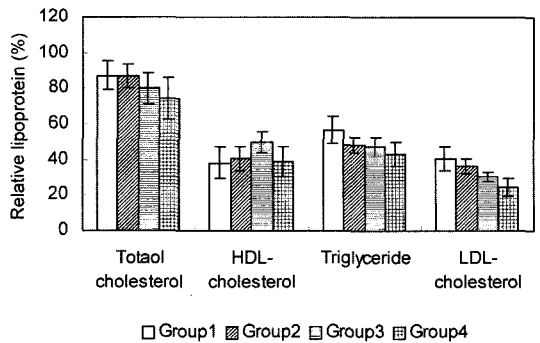


Fig. 5. Effects of green tea-fried beancurd on the level of cholesterols in serum of rat fed experimental diet for 8 weeks.

Group 1 : control
 Group 2 : green tea component 0.1%
 Group 3 : green tea component 0.3%
 Group 4 : green tea component 0.5%

Table 1. Effects of green tea-fried beancurd on the glucose concentration of rat fed experimental diet for 8 weeks.

Group	1	2	3	4
Glucose (mg/dl)	241.3 ± 18	239 ± 10	235 ± 19	214 ± 19

Group 1 : control
 Group 2 : green tea component 0.1%
 Group 3 : green tea component 0.3%
 Group 4 : green tea component 0.5%

을 때 기능성 녹차 유부군에서는 전체적으로 감소하는 경향을 보였다. LDL-콜레스테롤 경우 체내에 많이 축적되면 고지혈증이나 동맥경화증등을 유발할 수 있기 때문에 많은 문제가 되고 있다. 녹차유부를 섭취시킨 결과 녹차의 함량이 많아질수록 실험쥐의 LDL-콜레스테롤 수치가 유의성있게 감소되는 것으로 나타났다. 따라서 기능성 유부 제품을 섭취했을 경우에도 고지혈증, 동맥경화증과 같은 고혈압성 질환을 예방하는데 도움이 될 것으로 추측된다. 최근의 연구에 의하면 녹차의 catechin류는 혈당치의 상승을 억제하고 당뇨병을 예방하는 효과가 있다는 것이 밝혀졌다. 그 유효성분은 데오키시노 지니마이신(DNJ)라고 알려져 있는데 당분해 효소(α 글루코시다제)의 작용을 저해하는 작용이 있다고 알려져 있다. DNJ는 이당분해효소의 작용을 저해하여 포도당의 흡수를 억제하므로써 과혈당치를 억제하는 것으로 보고되어 있다[16]. Table 1에서 알 수 있듯이 녹차의 함량이 높은 유부를 섭취할수록 혈중 포도당의 함량수치가 대조군에 비하여 2, 3, 4군이 각각 1, 2.6, 12.7% 감소하였다. 이러한 결과는 기능성 녹차유부 제품을 섭취했을 때 혈당치의 상승을 억제할 가능성을 보여준다. 기능성 유부제품이 높은 기능성을 가지고 있다고 하더라도 식품으로 생산되려면 강도, 조직감, 맛, 색택 및 종합적 수용도 등을 기준으로 관능 평가를 실시하여 식품으로 생산가능한 지를 확인하여야 한다. 녹차가 0.1%, 0.3%, 0.5%가 첨가된 기능성 녹차유부 시제품의 경우 7점 평가를 기준으로 하여 관능평가를 실시하였다. 그 결과 녹차의 함유량이 높을수록 종합적 수용도가 낮아지는 특징을 보였다(결과미제시). 관능평가를 통하여 종합적 수용도를 높이기 위하여 녹차의 함량을 고려하여 제조한다면 기능성 유부 시제품의 품질을 향상시킬 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 기능성이 나타날 수 있는 조건에서 녹차 함량을 최소한으로 낮추어 식품으로서의 품질을 향상시킬 수 있는 방안이 향후 모색되어야 할 것으로 생각된다.

참고문헌

- [1] J. N. Lee and Y. K. Paik, "Cholesterol biosynthesis from lanostreol: Development of a novel assay method, cahracterization and solubilization of rat hepatic microsomal sterol-7-reductase", *J. Biochem. Mol. Biol.*, 30, 370-377, 1997.
- [2] T. T. Yang and M. W. Koo, "Hypocholesterolemic effects of Chinese tea", *Pharmacol. Res.*, 35, 505-512, 1997.
- [3] M. S. Brown and J. L. Goldstein, "Heart attacks: gone with the century?", *Science*, 272, 629, 1996.
- [4] F. H. Hulcher and W. H. Oleson, "Simplified spectrophotometric assay for microsomal HMG-CoA reductase by measurement of coenzyme A", *J. Lipid Res.*, 14, 625, 1973.
- [5] J. G. Hattersley, "Lowering cholesterol with lovastatin : the wrong approach", *J. Orthomolecul. Med.*, 9, 54, 1994.
- [6] Y. H. Lee, Y. M. Shin, J. E. Lee, Y. S. Choi and S. Y. Lee, "In vitro screening of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition from plant extracts", *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 6, 55-61, 1991.
- [7] F. Lucie, "Biological effects of resveratrol", *Life Science*, 66, 663-673, 2000.
- [8] S. H. Bae and Y. K. Paik, "Cholesterol biosynthesis from lanosterol: development of a novel assay method and characterization of rat liver microsomal lanosterol-24-reductase", *Biochemical J.* 326, 609-616, 1997.
- [9] T. Komai and Y. Tsujita, "Hepatocyte selectivity of HMG-CoA reductase inhibitor", *DNA & P*, 7, 279-288, 1994.
- [10] L. Masucci-Mangoulas, P. Moulin, X. C. Jiang, H. Richardson, A. Walsh, J. L. Breslow and A. Tall, "Decreased cholesteryl ester transfer protein (CETP) mRNA and protein and increased high density lipoprotein following lipopolysaccharide administration in human CETP transgenic mice", *J. Clin.*, 95, 1587-1594, 1995.
- [11] N. Hasegawa, N. Yamda and M. Mori, "Powdered green tea has antilipogenic effect on Zucker rats fed a high-fat diet", *Phytother Res.*, 17, 477-480, 2003.
- [12] W. Chen, K. Matuda, N. Nishimura and H. Yokogoshi, "The effect of taurine on cholesterol degradation in mice fed a high-cholesterol diet", *Life Science*, 74, 1889-1898, 2004.
- [13] D. Bobkova, E. Honsova, J. Kovar and R. Poledne,

- “Effect of diets on lipoprotein concentrations in heterozygous apolipoprotein E-deficient mice”, *Physiol. Res.*, 53, 635-643, 2004.
- [14] J. G. Rowe, M. Bobadilla, A. Fernandez, J. C. Encarnacion and T. R. Preston, “Molasses toxicity in cattle: rumen fermentation and blood glucose entry rates associated with this condition”, *Trop. Anim. Prod.*, 4, 78-89, 1977.
- [15] K. Sayama, “Effects of green tea on growth, food utilization and lipid metabolism in mice”, *In Vivo.*, 14, 481-484, 2000.
- [16] G. Zhang G, “Effects of dietary powdered green tea and theanine on tumor growth and endogenous hyperlipidemia in hepatoma-bearing rats”, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66, 711-716, 2002.