

Effects of Powders of Soybean and Doenjang on Cholesterol Level and Antioxidant Activities in Rats Fed with a High Cholesterol Diet

Jae Joon Lee, Ah Ra Kim, Hwan Lee, Cheol Ho Kim, Hae Choon Chang and Myung Yul Lee*

Department of Food and Nutrition, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

Received May 10, 2010 / Accepted June 30, 2010

This study was carried out to investigate the effects of powders of autoclaved soy flour and doenjang fermented using *Bacillus subtilis* DJI on lipid profiles and antioxidative activities of rats fed a high cholesterol diet. Sprague-Dawley male rats weighing 200~210 g were divided into four groups: normal diet group (N), high cholesterol diet group (HC), autoclaved soy flour and high cholesterol diet group (SHC), and doenjang and high cholesterol diet group (DHC). The serum ALT, AST and ALP activities of the SHC and DHC groups were lower than those of the HC group, but exerted no significant change on serum LDH activity. Serum triglyceride, total cholesterol and LDL-cholesterol levels were markedly decreased by autoclaved soy flour and doenjang administration, while the serum HDL-cholesterol level was higher in groups given autoclaved soy flour and doenjang administration. The GSH-Px and catalase activities in liver elevated by a high cholesterol diet were significantly decreased by autoclaved soy flour and doenjang administration ($p < 0.05$). Liver GSH levels of the SHC and DHC groups were significantly decreased compared to the HC group ($p < 0.05$). Liver TBARS level was significantly decreased in the DHC group fed with doenjang powder compared with those of the HC group ($p < 0.05$). These results suggest that soy flour and doenjang may reduce levels of serum cholesterol and prevent oxidative stress by stimulating antioxidative systems in rats fed a high cholesterol diet.

Key words : Autoclaved soy flour, doenjang, high cholesterol diet, lipid profiles, antioxidative effect

서 론

최근 동물성 식품 위주의 식습관으로 인하여 체내 콜레스테롤 함량이 증가되고 이로 인하여 고혈압, 동맥경화증을 비롯한 심혈관계 질환 등 각종 대사성 질환이 주요 사망 원인이 되고 있다. 특히 심혈관계 질환의 위험인자로 알려진 고콜레스테롤혈증은 혈장 내에 콜레스테롤이 비정상적으로 증가된 상태로 동맥경화증의 직접적인 요인이 되므로 임상적으로 중요한 문제가 되고 있다[30]. 고콜레스테롤 상태에서는 산화적 스트레스(oxidative stress)가 촉진되는데[25], 이때의 항산화 효소의 양과 활성은 충분하지 않아 생체 내 자유라디칼의 제거체인 항산화 방어계에 불균형을 가져오게 되어, 심혈관계 질환을 유발하는데 중요한 병인으로 작용한다고 보고[44]되고 있다. 이들 자유라디칼은 low density lipoprotein (LDL)의 산화, fatty streak가 생성되어 혈관 내피 세포의 섬유화, 혈소판 응집에 의한 포말세포(foam cell) 등이 형성되어 동맥경화증을 유발하는 것으로 알려져 있다[13].

우리가 매일 섭취하는 식품 중에는 이러한 생체의 산화적 손상으로부터 보호할 수 있는 다양한 성분들을 많이 함유하고 있다. 동양인의 경우 서양인에 비하여 다양한 형태의 대두 및

대두 가공제품의 꾸준한 섭취로 인하여 이들 질환이 상대적으로 적은 것으로 보고되고 있다[39]. 대두는 영양적 우수성 이외에 isoflavone, saponin, lecithin, phytic acid, trypsin inhibitor, 식이섬유소, 대두올리고당 등 여러 생리활성 성분이 함유되어 항암효과 및 항산화효과를 지니고 있음이 밝혀지면서 기능성 식품 소재로서 관심과 연구의 대상이 되고 있다[20]. 이 외에도 대두 성분에는 chlorogenic acid, ferulic acid 및 p -coumaric acid 등을 함유하고 있고 이들 성분들도 항산화효과가 있는 것으로 밝혀졌다[39,40].

이러한 대두의 대표적인 발효식품인 된장은 원료 콩 자체가 지니는 기능적 특성과 발효과정 중에 생성 또는 증감되는 성분으로 다양한 생리활성을 지니는 것으로 알려져 있다. 즉 된장의 주성분인 대두는 본래 함유되어 있는 항산화물질 뿐만 아니라 발효 숙성 과정 중에 새로이 생성된 항산화물질인 이소플라본의 aglycones, 유리아미노산, 펩타이드, 갈변물질 등을 함유하고 있으며, 대두발효식품은 발효균종[17], 발효 및 숙성기간[22], 갈변물질의 생성 정도[18]와 페놀물질 분획[37]에 따라 *in vitro* 상에서 항산화효과가 다르게 나타나는 것으로 연구 보고되고 있다.

이와 같이 대두 혹은 된장의 생리활성에 관한 연구는 다양하게 수행되었으나, 대두와 대두를 발효시킨 된장의 생리적 역할의 차이점을 비교한 연구는 적은 편으로 대부분 *in vitro* 연구로 수행되었다[9,36,28]. Lee와 Kim [28]은 콩 및 된장 추

*Corresponding author

Tel : +82-62-230-7722, Fax : +82-62-225-7726

E-mail : mylee@mail.chosun.ac.kr

출물이 구강유상피암세포인 KB세포에 대한 증식 억제효과에 관한 *in vitro* 연구에서 두 시료 모두 증식억제효과가 관찰되었으며, 된장 추출물이 콩 추출물에 비하여 억제효과가 큰 것으로 나타나 된장 추출물의 효과는 콩의 발효로부터 증강되는 것으로 추측하였다. 또한 동일 원료를 사용한 대두로부터 제조한 증자대두, 청국장 및 된장 추출물의 항산화 효능을 비교한 Oh와 Kim [36]의 연구에서도 된장이 증자대두와 청국장에 비하여 항산화력이 우수한 것으로 나타났으며, 이는 된장의 오랜 숙성과정 중에 생성된 페놀화합물과 갈변물질의 증가가 영향을 미친 것이라고 하였으며, Choe 등[9]도 된장이 메주와 대두에 비하여 항산화 효과 및 아질산염 소거능이 우수하였고 보고하였으며 된장은 대두로부터 유래된 물질 뿐만 아니라 여기에 대두 고분자 영양물질이 여러 미생물에 의한 발효과정을 거쳐 새로운 저분자 물질이 첨가되어 나타난 효과라 하였다.

최근 재래식 된장과 개량식 된장의 단점을 보완하여 세균형 코지를 사용하여 새로운 된장 제조방법을 개발하여 Chang과 Chang [8]이 보고하였다. 세균형 코지를 이용하여 제조한 된장은 재래된장에 비하여 암모니아취가 적었으며, 구수한 재래된장 특유의 맛과 향을 지니고 있는 것으로 확인되었다. 또한 기존의 메주나 곱팡이를 이용한 코지방식이 아닌 세균형 코지방식에 의하여 콩 100% 된장이 2개월 안에 제조가 가능하여 숙성기간을 단축시키는 장점을 지니고 있다. 이렇게 제조된 된장은 가정식 재래된장에 비하여 혈전용해능이 우수한 것[8]으로 나타났으며, *in vitro*에서 항산화효과[24] 및 암세포 성장 억제효과가 있는 것[29]으로 보고되었다.

따라서 본 연구는 고콜레스테롤식으로 산화적 스트레스를 유발시킨 흰쥐에게 대두분말과 Chang과 Chang [8]이 제조한 된장분말을 급여하여 체내 지질대사 개선효과와 항산화효과에 미치는 영향을 알아보고자 실시하였다.

재료 및 방법

재료 및 세균형 코지를 이용한 된장의 제조

동일 품종의 가압 증자한 대두와 된장의 제조에 사용된 콩은 국내에서 생산되는 콩나물 콩을 이용하였다. 대두 시료는 정선한 콩을 20°C에서 20시간 침지한 후 121°C에서 40분 간 가압·증자하였다. *Bacillus subtilis* DJI 균주를 이용한 세균형 코지의 제조와 이 세균형 코지를 이용하여 제조한 된장은 조선대학교 식품영양학과 식품미생물실험실에서 Chang과 Chang [8]이 Fig. 1과 같이 제조한 것을 사용하였다. 세균형 코지의 제조과정은 *B. subtilis* DJI 균주를 종균으로 사용하였으며, 균은 37°C에서 24시간 전 배양하여 LB 액체배지에 1% 접종한 후 9시간 배양하였다. 준비된 *B. subtilis* DJI을 4°C 9,950×g에서 15분간 원심분리하여 균체를 회수하고 회수된 균체를 멸균된 3차 증류수로 2회 수세하였다. 정선한 콩 1 kg을 20°C에서 20시간 침지한 후 121°C에서 40분 간 증자하였다. 증자 후

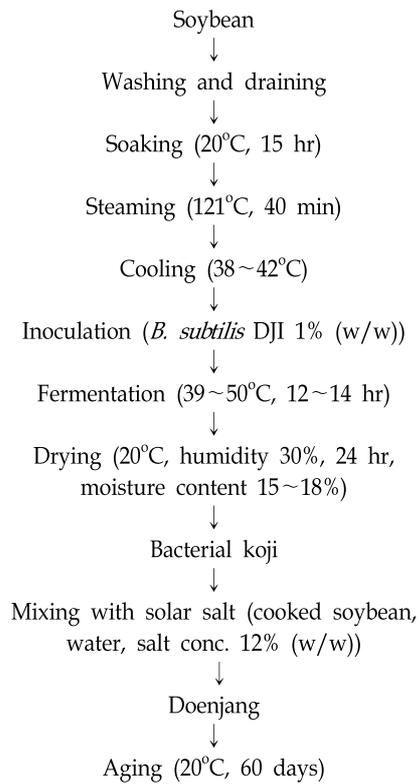


Fig. 1. Manufacturing process of bacterial-koji and Doenjang.

40°C로 냉각시키고 미리 준비해 둔 *B. subtilis* DJI를 가수하기 전 원료 콩의 1%(w/w) 비율로 접종하였으며, 접종 후 39~50°C 온도에서 12~14시간 배양하였다. 이를 항온항습 장치에서 온도 20°C, 습도 30%로 유지하면서 24시간 풍건시켜 수분 함량이 15~18% 되도록 건조하여 세균형 코지로 사용하였다. 된장의 제조는 세균형 코지에 삶은 콩(원료 콩을 기준으로 코지와 같은 양)을 가하고 천일염(Shinan-docho, Korea)으로 소금물을 만들어 섞었으며, 소금의 농도는 최종 제조 된장의 소금 농도가 12%(w/w)가 되도록 하여 20°C에서 2개월간 숙성시킨 것을 사용하였다. 가압 증자한 대두와 된장은 동결 건조 후 분쇄하여 분말화하였으며, 수율은 각각 46.8%와 49.5%이었다. 동결 건조한 시료는 진공 포장한 다음 -70°C에 보관하면서 이후 실험에 사용하였다. 가압 증자한 대두 및 된장분말의 수분, 조지방, 조단백질, 조회분 및 탄수화물의 일반성분 분석은 전남대학교 공동실험실습관(여수)에서 실시하였고, 식이섬유소 분석은 (주)다산생명과학원(광주)에서 실시하였는데 그 결과는 Table 1과 같다.

실험동물 및 실험식이

실험동물은 평균 체중 200~210 g 정도의 Sprague Dawley 계 수컷 흰쥐를 1주일 동안 일반 배합사료로 적응시킨 후, 난괴법(randomized block design)에 따라 각 처리 군 당 6마리씩 4군으로 나누어 stainless steel wire cage에 한 마리 씩 분리하

Table 1. Proximate analysis of freeze dried samples (% dry basis)

Ingredients	Casein	Autoclaved soy flour	DJI Doenjang
Moisture	5.23	4.96	5.69
Crude protein	89.70	33.55	36.28
Crude lipid	0.52	15.80	17.40
Ash	-	4.77	8.56
Dietary fiber	-	15.29	16.34
Carbohydrate ¹⁾	4.55	20.67	15.74

¹⁾Carbohydrate=100-(moisture+crude protein+crude lipid+ash+dietary fiber)

여 사육하였다. 본 실험에 사용된 식이는 Table 2에서와 같이 AIN-93 정제식이 조성[41]을 변형하여 사용하였으며, 실험식이는 정상군(N), 고콜레스테롤군(HC), 고콜레스테롤과 대두분말식이군(SHC) 및 고콜레스테롤과 DJI 된장분말식이군(DHC)으로 나누어 4주간 사육하였다. 각 실험 식이는 Table 1에서와 같이 건조분말 시료의 일반성분 분석 자료를 기초로 하여 열량, 당질, 지방, 단백질 및 식이섬유소 함량을 동일하도록 조정하였다. 물과 식이는 제한 없이 공급하였고, 사육실 환경온도는 18±2°C, 상대습도는 65±5%로 유지하였으며, 명암은 12시간 주기(08:00~20:00)로 조절하였다. 체중과 식이섭취량은 1주일 간격으로 같은 시각에 측정하였으며 사육기간의 체중증가량을 동일 기간의 식이섭취량으로 나누어 각 실험군의 식이효율을 계산하였다.

실험동물 처치

실험동물은 처치 전 12시간 이상 절식시킨 후 CO₂로 가볍게 마취시킨 다음, 개복하고 복부 대동맥에서 채혈하여 4,500×g

Table 2. Composition of the experimental diet (g/kg diet)

Diet composition	Groups ¹⁾			
	N	HC	SHC	DHC
Corn starch	530.0	520.0	435.7	456.2
Sucrose	100.0	100.0	100.0	100.0
Casein	200.0	200.0	100.0	100.0
Autoclaved soy flour	-	-	267.4	-
DJI Doenjang	-	-	-	247.2
DL-cystine	3.0	3.0	3.0	3.0
Soybean oil	70.0	70.0	27.8	27.0
Cellulose powder	50.0	50.0	9.1	9.6
Vitamin mixture ²⁾	10.0	10.0	10.0	10.0
Mineral mixture ³⁾	35.0	35.0	35.0	35.0
Cholesterol	-	10.0	10.0	10.0
Choline bitartrate	2.0	2.0	2.0	2.0

¹⁾The Experimental diet groups are as follow; N: normal diet, HC: high cholesterol diet, SHC: Autoclaved soy flour and high cholesterol diet, DHC: doenjang and high cholesterol diet.

²⁾Based on AIN-93 vitamin mixture.

³⁾Based on AIN-93G mineral mixture.

에서 20분간 원심분리 후 분리한 혈청을 AST, ALT, ALP 및 LDL 활성 측정에 사용하였다. 간은 적출하여 0.9% 생리식염수로 남아 있는 혈액 및 기타 부착물질을 제거하고 여지로 수분을 제거한 후 효소 활성 저하를 예방하기 위하여 급속 동결하여 -70°C의 deep freezer에 보관하면서 항산화 관련 효소 활성 및 항산화 능력 측정에 사용하였다.

혈청 중 효소 활성과 지질 함량 측정

혈청 중 aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), alkaline phosphatase (ALP) 및 lactate dehydrogenase (LDH) 활성과 중성지방(TG), 총콜레스테롤(TC) 및 HDL-콜레스테롤 함량은 혈액생화학적 검사 자동분석기 (Fuji Dri-Chem 3500, Fujifilm, Japan)를 사용하여 측정하였다. LDL-콜레스테롤 함량은 Friedwald식 {총콜레스테롤-(HDL-콜레스테롤-중성지방/5)}[14]에 의하여 계산하였다.

간 조직 중 항산화 효소계의 활성 측정

간 조직 1 g과 4배량의 0.25 M sucrose buffer (pH 7.5)를 가하고 4°C에서 ultra turax homogenizer (Janke & Kunkel, Staufen, Germany)로 10,000×g에서 2분간 마쇄하였다. 마쇄액은 600×g에서 10분간 원심분리하여 핵과 미마쇄 부분을 제거한 다음 상정액을 다시 한번 더 15,000×g에서 20분간 원심분리하였다. 상정액을 취하여 catalase 및 glutathione peroxidase (GSH-Px) 활성 측정을 위한 효소원으로 사용하였다. Catalase 활성은 Aebi의 방법[1], GSH-Px 활성은 Flohe 등의 방법[12]으로 측정하였다. 단백질의 정량은 bovine serum albumin을 표준 단백질 용액을 사용하여 Lowry 등의 방법[32]을 이용한 protein assay Kit (Sigma, USA)를 사용하여 비색정량하였다.

간 조직 중 GSH 함량 측정

간 조직 중 GSH 함량은 Tietze의 방법[43]을 변형하여 측정하였는데 간 조직 0.1 g과 10배(w/v)의 5%(w/v) sulfosalicylic acid 2 ml를 첨가하여 마쇄한 다음 10,000×g에서 10분간 원심분리한 후 상정액을 GSH 함량 측정을 위하여 사용하였다. 시험관에 working buffer 700 µl, 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid 100 µl, 20 µl 시료액 및 180 µl 중류수를 가하여 30°C에서 3분간 방치한 후 GSSG reductase 용액 5 µl를 첨가하고 412 nm에서 1분 동안 변화되는 흡광도를 측정하였다. 0.04 mM GSH를 제조하여 standard curve를 그린 후 흡광도에 대한 농도를 환산하였다.

간 조직 중 과산화지질 함량 측정

과산화지질(thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) 함량은 Buege와 Aust의 방법[5]을 변형하여 측정하였다. 간 조직 중 항산화 효소계 활성 측정을 위하여 제조한 균질액의

일부를 취하여 단백질 함량을 protein assay Kit (Sigma, USA) 를 이용하여 비색 정량하여 측정하였다. 단백질 함량으로 1 mg 함유한 균질액 1.0 ml에 0.2 N HCl 용액 내 0.357% thio-barbituric acid를 함유한 시약 1.0 ml에 butylated hydrox-toluene의 최종 함량이 0.01%가 되도록 첨가한 후 잘 혼합한 다음 98°C로 15분간 가열하였다. 즉시 냉각시켜 1,500× g로 15분간 원심분리한 후 535 nm에서 상징액의 흡광도를 측정하였는데, 과산화지질 함량은 TBA법을 사용하여 malondialdehyde (MDA) 함량으로 정량하였다.

통계처리

본 실험에서 얻은 결과는 SPSS 12.0 (Statistical package for the social science) P/C package를 이용하여 실험군당 평균과 표준오차를 계산하였고, 일원배치분산분석(one-way ANOVA) 을 실시하였으며, 사후검정은 Tukey's test에 의하여 실행하였다. 본 연구에 이용된 통계적 유의성 검증은 α<0.05 수준에서 이루어졌다.

결과 및 고찰

증체량, 식이섭취량 및 식이효율

고콜레스테롤과 대두 혹은 된장분말 식이를 4주간 급여한 흰쥐의 체중증가량, 식이섭취량 및 식이효율에 미치는 결과는 Table 3과 같다.

Table 3에서와 같이 체중증가량과 식이섭취량은 정상식이를 급여한 N군과 고콜레스테롤식이를 급여한 HC군 간에 유의적인 차이가 없었다. 그러나 고콜레스테롤과 대두 혹은 된장분말을 함께 급여한 SHC군과 DHC군은 CH군에 비하여 체중증가량과 식이섭취량이 모두 유의하게 저하되었으며 (p<0.05), N군에 비해서도 유의하게 저하되었다(p<0.05). 그러나 Yang 등[45]의 연구에서는 카제인을 섭취한 대조군에 비하여 찐콩군과 청국장군에서 식이섭취량이 낮았음에도 불구하고 체중증가량의 차이가 보이지 않았고, 이는 가열처리 발효

과정을 통해 콩의 단백질 이용 효율이 카제인에 비하여 높아짐으로써 식이효율이 증가하였기 때문이라고 보고한 연구와는 다른 경향을 나타내었다. 이런 실험상의 차이점은 Yang 등[45]의 연구에서는 고혈압 쥐를 사용하였고 본 연구에서는 건강한 쥐를 사용하였기 때문으로 보여 진다. SHC군과 DHC군 간에는 체중증가량과 식이섭취량의 유의차가 없었다. 식이효율은 각 실험군 간에 유의차가 없었다. 본 연구와 상반되게 Kwon 등[21]은 흰쥐에게 된장 급여 시 식이섭취량은 차이가 없었으나 체중 저하효과가 있었으며, 된장은 청국장에 비해서 콩의 발효 숙성기간이 길어 체중 감소효과가 더 크다고 하였다. 된장이 실험동물의 체중 감소효과에 미치는 영향은 된장 내 대두 단백질이 지질대사에 영향을 주어 체중이 감소되며 [27], 이들 성분 중 isoflavone이 중요한 역할을 한다고 하였다 [2]. 특히 된장은 발효기간 중에 genistin과 daidzin이 각각의 aglycone인 genistein과 daidzin으로 많이 전환됨으로써 항비만 효과에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다[3]. 대두는 또한 식이섬유소도 풍부하여 위에 오래 머무르면서 포만감을 주며, 대두의 사포닌 성분도 지방 합성을 억제하여 비만을 예방하는 것으로 알려져 있다[11]. 한편 단백질 급원으로 카제인을 급여한 N군과 HC군에 비하여 대두와 된장분말을 급여한 SHC군과 DHC군에서 식이섭취량이 낮은 이유는 실험동물이 동물성 단백질인 카제인에 비하여 식물성단백질인 대두와 된장식에 낮은 섭식 기호도를 나타내는 것으로 보고되었다[33]. 따라서 본 연구 결과는 대두와 된장 분말을 급여하였을 경우 체중이 저하된 이유는 대두 및 된장 분말에 함유된 성분에 기인된 것이 아니라 식이섭취량 저하로 기인된 것으로 사료되어 진다.

혈청 중 AST, ALT, ALP 및 LDL 활성

고콜레스테롤과 대두 혹은 된장분말 식이를 4주간 급여 후 간 기능 지표로 사용되는 혈청 중 AST, ALT, ALP 및 LDL 활성에 미치는 영향은 Table 4와 같다.

고콜레스테롤식이를 급여한 HC군의 혈청 중 AST 활성은 50.29±4.29 U/l로 가장 높았으나 고콜레스테롤과 대두 혹은 된장분말을 함께 급여한 SHC군은 39.23±3.14 U/l, DHC군은 36.17±2.17 U/l로 HC군에 비하여 유의하게 저하되었으며 (p<0.05), N군의 42.34±1.32 U/l과는 유의차는 없었으나 낮은 수치를 나타내었다. 혈청 중 ALT 활성은 HC군에 비하여 SHC군은 유의하게 저하되었으나(p<0.05), DHC군은 유의차가 없었다. 그러나 혈청 중 ALP 활성은 고콜레스테롤과 된장 분말을 함께 급여한 DHC군이 가장 낮은 경향을 보였다. 혈청 중 LDH 활성은 실험군 간의 유의적인 차이가 없었다. AST와 ALT 효소는 간이나 심장 근육에 많이 존재하며 혈청 중에는 보통 적은 양이 함유되어 있으나 산화적 스트레스를 받았을 때에는 활성이 현저히 증가되며[6], AST와 ALT 활성의 증가는 또한 간에서 담즙 배설 장애를 유발하여 혈청 콜레스테롤 함량을 증가시킨다[34]. LDL과 ALP 활성도 간질환 시 급격히

Table 3. Body weight gain, food intake and food efficiency ratio in rats fed experimental diets

Groups ¹⁾	Body weight gain (g/day)	Food intake (g/day)	FER ²⁾
N	4.43±0.31 ^{a3)}	21.89±2.42 ^a	0.20±0.04 ^{NS4)}
HC	4.59±0.73 ^a	22.46±1.84 ^a	0.20±0.07
SHC	4.09±0.24 ^b	18.05±1.52 ^b	0.23±0.04
DHC	4.02±0.21 ^b	17.52±3.98 ^b	0.23±0.05

¹⁾See the legend of Table 2.

²⁾FER: Food efficiency ratio (body weight gain/food intake).

³⁾Mean±S.E. (n=6), values with different superscripts in the same column are significantly different (p<0.05) among groups by Tukey's test.

⁴⁾NS: not significantly different among groups.

Table 4. Activities of AST, ALT, ALP and LDH in serum of rats fed experimental diets (unit: U/l)

Groups ¹⁾	AST	ALT	ALP	LDH
N	42.34±1.32 ^{b2)}	31.03±5.01 ^b	95.31±10.24 ^{ab}	43.76±3.12 ^{NS3)}
HC	50.29±4.29 ^a	45.33±4.35 ^a	101.29±12.84 ^a	46.23±2.65
SHC	39.23±3.14 ^b	35.33±2.23 ^b	92.31±9.65 ^{ab}	44.36±4.11
DHC	36.17±2.17 ^b	39.17±3.05 ^{ab}	81.82±8.21 ^b	45.23±2.08

¹⁾See the legend of Table

²⁾Mean±S.E. (n=6), values with different superscripts in the same row are significantly different ($p < 0.05$) among groups by Tukey's test.

³⁾NS: not significantly different among groups.

상승한다고 보고되었다[15,19]. 본 연구에서도 고콜레스테롤 식이 급여로 산화적 스트레스를 유발시킨 HC군이 혈청 중 AST, ALT 및 ALP 활성이 가장 높게 나타났으나, 대두 혹은 된장분말 섭취로 고콜레스테롤혈증으로 인한 간 손상을 방지하여 간 기능을 보호하는 것으로 나타났다. 본 연구와 유사하게 Lim 등[31]도 고지혈증 흰쥐에 대두 분말 급여 시 혈청 중 AST와 ALT 활성이 유의하게 감소한다고 하였다. Shin과 Jeon [42]은 사염화탄소에 의하여 간 손상을 유발한 흰쥐에서 대두에서 분리한 pinitol를 투여 시 혈청 중 AST 및 ALT 활성을 저하시켜 간 보호효과가 있다고 하였으며, Niho 등[34]은 isoflavone 성분들이 AST 및 ALT 활성을 억제시킨다고 하였다.

혈청 중 지질 함량

고콜레스테롤과 대두 혹은 된장분말 식이를 4주간 급여 후 혈청 중 중성지질, 총콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤 함량에 미치는 영향은 Table 5와 같다.

Table 5에서와 같이 고콜레스테롤식이로 증가되어진 중성지질 함량은 대두 혹은 된장분말을 함께 급여하였을 경우 유의하게 저하되었으나($p < 0.05$) N군에 비해서는 다소 높은 경향을 보였다. 혈청 중 총콜레스테롤 함량은 고콜레스테롤을 급여한 HC군에 비하여 고콜레스테롤과 대두 혹은 된장분말을 동시에 급여한 SHC군과 DHC군의 경우 유의하게 저하되었으며($p < 0.05$), 특히 DHC군은 N군과 비슷한 경향을 나타내었다. 혈청 중 LDL-콜레스테롤 함량은 HC군이 가장 높았으며, 대두 혹은 된장분말을 함께 급여하였을 경우 유의하게 저하되었다($p < 0.05$). 반면 혈청 중 HDL-콜레스테롤 함량은 HC군이 가장 낮았으며, 대두 혹은 된장분말을 함께 급여로 유의하게 증가

되었다($p < 0.05$). 혈청 중 중성지질, 총콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤 함량이 SHC군과 DHC군 간에는 유의차가 없었다. 대두단백질의 isoflavone 화합물 중 genistein은 동맥경화 예방 효과의 가능성이 있는 물질로서 혈청 중의 총콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤 농도를 저하시키고, HDL-콜레스테롤 농도를 증가시킨다고 보고되었다[7]. 또한 Choi와 Lee[10]는 대두단백질이 체내에서 가수분해 되어질 때 생성되는 peptides가 담즙산의 배설을 촉진하여 이로 인하여 혈청 총콜레스테롤 함량이 저하되는 것으로 보고하였다. 대두에는 이들 성분 이외에도 phytosterol, 펙틴, 리그닌, 식이섬유소, 불포화지방산 등에 의해서도 혈청 콜레스테롤 함량을 저하시키는 것[16]으로 사료되어진다.

간 조직 중 catalase 및 GSH-Px 활성

고콜레스테롤과 대두 혹은 된장분말 식이를 4주간 급여 후 측정된 유리기 소거에 관여하는 효소인 catalase 및 GSH-Px 활성을 측정한 결과는 Table 6과 같다.

Table 6에서와 같이 간 조직 중 catalase 활성은 고콜레스테롤을 급여한 HC군이 5.96±0.15 unit로 N군의 4.73±0.35 unit에 비하여 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$). 고콜레스테롤 급여로 증가되어진 간 조직 중 catalase 활성은 고콜레스테롤과 된장분말을 함께 급여로 유의하게 저하되었으며($p < 0.05$), 정상식이를 급여하였을 경우와 비슷한 활성을 나타내었다. SHC군과 DHC군 간에는 간 조직 중 catalase 활성의 차이가 보이지 않았다. 간 조직 중 GSH-Px 활성은 catalase 활성과 유사하게 대두 혹은 된장분말을 급여한 SHC군과 DHC군이 고콜레스테롤만을 급여한 HC군에 비하여 유의적으로 저하되었다($p < 0.05$).

Table 5. Contents of triglyceride, total cholesterol, LDL-cholesterol and HDL-cholesterol in serum of rats fed experimental diets (unit: mg/dl)

Groups ¹⁾	Triglyceride	Total cholesterol	LDL-cholesterol	HDL-cholesterol
N	101.39±5.29 ^{b3)}	71.23±6.31 ^b	46.28±2.36 ^b	45.23±1.60 ^a
HC	141.09±9.53 ^a	91.23±5.46 ^a	85.19±6.59 ^a	34.26±3.26 ^b
SHC	119.67±7.09 ^b	67.27±4.29 ^b	46.44±8.12 ^b	41.29±3.02 ^a
DHC	117.25±6.75 ^b	69.08±6.75 ^b	46.10±3.07 ^b	46.43±3.98 ^a

¹⁾See the legend of Table 2.

²⁾Mean±S.E. (n=6), values with different superscripts in the same column are significantly different ($p < 0.05$) between groups by Tukey's test.

Table 6. Activities of catalase and GSH-Px in liver of rats fed experimental diets

Groups ¹⁾	Catalase ²⁾	GSH-Px ³⁾
N	4.73±0.35 ^{b4)}	122.28±10.32 ^b
HC	5.96±0.15 ^a	145.23±13.20 ^a
SHC	5.13±0.21 ^{ab}	124.23±14.15 ^b
DHC	4.69±0.16 ^b	119.84±17.11 ^b

¹⁾See the legend of Table 2.
²⁾Decreased H₂O₂ μmoles/min/mg protein.
³⁾Decreased NADPH μmoles/min/mg protein.
⁴⁾Mean±S.E. (n=6), values with different superscripts in the same column are significantly different (p<0.05) between groups by Tukey's test.

이처럼 고콜레스테롤만을 급여한 HC군의 GSH-Px 활성이 높게 나타난 것은 고콜레스테롤식으로 인하여 증가된 산화물들을 환원시키기 위한 것으로 사료된다.

간과 적혈구에서 생성된 H₂O₂ 등은 GSH-Px와 catalase 등의 항산화 효소들의 작용에 의하여 H₂O로 전환되어 무독화됨으로써 산소독으로부터 생체를 보호하는 것으로 알려져 있다[4]. 고콜레스테롤 급여로 인하여 불포화 지방산의 함량이 높은 생체막의 지질과산화는 촉진되어 세포 소기관들의 산화적 손상이 가속화되면 간은 생체를 보호하기 위해 항산화 효소 활성이 증가되어지는데 본 연구에서도 고콜레스테롤 급여로 간 조직 중 catalase 및 GSH-Px 활성이 증가되었다. 그러나 대두 혹은 된장분말을 함께 급여하였을 경우 이들 항산화 관련 효소의 활성이 저하되었는데 이는 고콜레스테롤식에 의한 산화적 손상을 감소시킴으로써 활성이 낮아지는 것으로 판단된다. 따라서 대두 혹은 된장분말은 고콜레스테롤 섭취로 인하여 증가되어진 산화적 스트레스를 저하시키는 것으로 판단되어진다. 또한 체내 생성된 유리기들은 동맥경화증 발생에 상당한 관련이 있다고 보고되었으며, catalase는 고지혈증 시 활성이 증가되는 것으로 알려져 있다[38]. 본 연구에서도 혈청 중 총콜레스테롤 함량이 가장 높았던 HC군이 간 조직 중 catalase 활성도 가장 높게 나타났다.

간 조직 중 GSH 함량

고콜레스테롤과 대두 및 된장분말 식이를 4주간 급여 후 간 조직 중 GSH 함량에 미치는 영향은 Fig. 2와 같다.

간 조직 중의 GSH 함량은 Fig. 2에서와 같이 고콜레스테롤만을 급여하였을 경우 가장 낮았으나, 고콜레스테롤과 대두 혹은 된장분말을 함께 급여하였을 경우에는 증가되었다 (p<0.05). 간에서 GSH는 외부의 산화적 손상에 세포의 방어작용을 나타내는 효소인 glutathione-S-transferase (GST)와 GSH-Px의 기질로 작용하여 세포내 지질과산화물과 이물질 제거, 아미노산 수송 및 thiol기의 저장고로써 또한 여러 가지 해독반응, 단백질이나 DNA합성 등 생체 내에서 생물학적으로

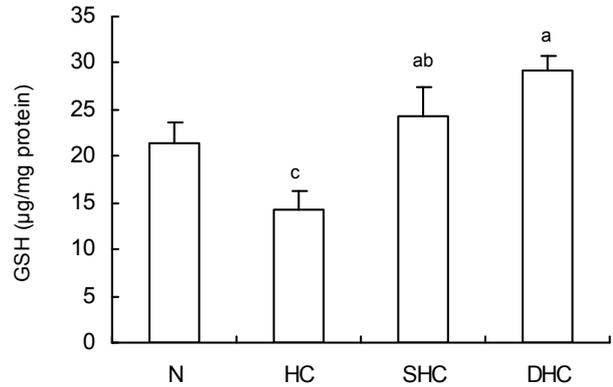


Fig. 2. Levels of GSH in liver of rats fed experimental diets. Abbreviations: See the legend of Table 2. Values are mean±S.E. of 6 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at p<0.05 by Tukey's test.

로 중요한 반응에 직접 관여한다[35]. 고콜레스테롤을 급여한 HC군은 간 조직 중 GSH 함량이 N군에 비하여 낮게 나타났는데 (p<0.05) 이는 GSH를 기질로 하여 H₂O₂를 제거하는 GSH-Px 활성 증가에 의하여 GSH가 소모된 것으로 생각된다. 또한 고콜레스테롤과 대두 혹은 된장분말을 함께 급여한 SHC군과 DHC군이 고콜레스테롤만을 급여한 HC군보다 GSH 함량이 높게 나타난 것은 된장분말이 고콜레스테롤식으로 증가되어진 산화물들을 소거하여 GSH-Px를 소모시킴으로써 그 양이 감소되어 나타난 결과로 추정된다.

간 조직 중 과산화지질 함량

고콜레스테롤과 대두 및 된장분말 식이를 4주간 급여 후 간 조직 중 과산화지질 함량에 미치는 영향은 Fig. 3과 같다.

Fig. 3에서와 같이 고콜레스테롤식이 급여로 증가된 간 조

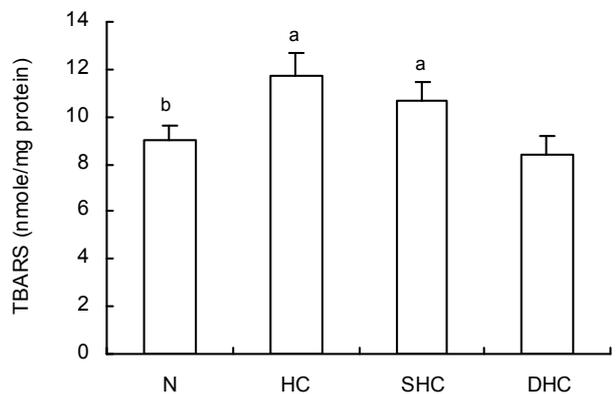


Fig. 3. Levels of TBARS in liver of rats fed experimental diets. Abbreviations: See the legend of Table 1. Values are mean±S.E. of 6 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at p<0.05 by Tukey's test.

직 중 과산화지질 함량은 고콜레스테롤과 대두 혹은 된장분말을 함께 급여로 증가되었으나 DHC군만 유의하게 감소되었다($p<0.05$). 콜레스테롤의 과잉 섭취는 간 조직의 지질과산화물을 촉진시키는 것으로 알려졌는데, Chung 등[11]의 연구 결과에서도 정상식이군에 비하여 고콜레스테롤식을 급여한 군이 70% 정도 유의하게 과산화지질 함량을 증가시켰다. 대두분말을 급여한 SHC군에 비하여 된장분말을 급여한 DHC군이 간 조직 중 지질과산화 함량이 유의하게 저하시켰다($p<0.05$). 된장은 대두에 비하여 항산화물질인 총폴리페놀 함량이 많다고 보고[36,37]되었는데, 이는 된장이 발효숙성과정 중에 폐놀성 물질인 isoflavone의 배당체가 β -glucosidase에 의해 aglycone 형태로 변화되어 genistein과 daidzin의 함량이 증가하고, 발효과정 중에 삶은 대두에는 검출되지 않았던 caffeic acid와 ferulic acid 등의 유리 phenolic acid 함량이 증가하기 때문이라고 하였다[26]. *In vitro* 연구에서도 된장 추출물이 대두 추출물에 비하여 항산화효과 및 아질산염 소거능이 우수한 것으로 나타났다[9]. Lee 등[23]은 알코올로 장기간 산화적 스트레스를 유도한 흰쥐에게 대두분말과 청국장분말이 간 조직 중 과산화지질 함량에 미치는 연구한 결과를 살펴보았는데 청국장분말과 대두분말 간에는 유의차가 없었다고 하였으나, 카제인을 급여한 대조군에 비해서는 유의하게 저하되었다고 하였다. 그러나 본 연구에서는 대두분말과 된장분말 간에 간 조직 중 과산화지질 함량은 차이가 나타났으나 이러한 효과가 된장이 가지고 있는 생리활성 중 어떠한 물질에 의한 것인지는 더 많은 연구가 필요하다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부 지방기술혁신 사업(과제번호: B0009747)에 의한 연구비로 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

References

- Aebi, H. 1984. Catalase *in vitro* *Method Enzymol.* **105**, 121-126.
- Al, A. A., M. T. Belasquez, C. T. Hansen, A. I. Mohamed, and S. J. Bhatena. 2004. Effects of soybean isoflavone, probiotics, and their interactions on lipid metabolism and endocrines system in an animal diabetes. *J. Nutr. Biochem.* **15**, 583-590.
- Banz, W. J., J. Davis, R. Peterson, and M. J. Iqbal. 2004. Gene expression and adiposity are modified by soy protein in male Zucker diabetic fatty rats. *Obesity Res.* **12**, 1907-1913.
- Britton, C., S. Helmut, and B. Alberto. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organ. *Physical. Rev.* **59**, 527-605.
- Buege, J. A. and S. D. Aust. 1978. Microsomal lipid peroxidation, pp. 302-310, In Dacker, L. (ed.), *Methods in enzymology*, Vol. **52**, Academic Press, New York.
- Camandola, S., M. Aragno, J. C. Cutrin, E. Tamagno, O. Danni, E. Chiarpotto, M. Parola, G. Leonarduzzi, F. Biasi, and G. Poli. 1999. Liver AP-1 activation due to carbon tetrachloride is potentiated by 1,2-dibromoethane but is inhibited by α -tocopherol or gadolinium chloride. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 1108-1116.
- Cassidy, A. 1996. Physiological effects of phytoestrogens in relation cancer and other human health risks. *Proc. Nutr. Soc.* **55**, 399-417.
- Chang, M. and H. C. Chang. 2007. Characteristics of bacterial-koji and doenjang (soybean paste) made by using *Bacillus subtilis* DJI. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 325-333.
- Choe, G. S., S. Y. Lim, and J. S. Choi. 1998. Antioxidant and nitrite scavenging effect of soybean, meju and doenjang. *J. Life Sci.* **8**, 473-478.
- Choi, Y. S. and S. Y. Lee. 1993. Cholesterol lowering effects of soybean products (curd and curd residue) in rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **22**, 673-677.
- Chung, E. J., Y. S. Um, H. W. Nam, and T. Park. 2003. Changes in lipid peroxidation level and antioxidant enzyme activities of rats supplemented with dietary cholesterol and/or taurine. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **32**, 1310-1317.
- Flohe, L., A. Wolfgang, and W. A. Gunzler. 1984. Assay of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* **105**, 114-130.
- Fogelman, A. M., I. Schechter, J. Sager, M. Hokom, S. Child, and P. A. Edward. 1980. Malonyldialdehyde alteration of low density lipoproteins lead to cholesterol ester accumulation in human monocyte macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 2214-2224.
- Friedwald, W. T., R. L. Levy, and D. S. Fredrickson. 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* **18**, 499-502.
- Kahn, B. H., H. Y. Son, H. S. Lee, and S. W. Song. 1995. Reference values of hematology and serum chemistry in kite Sprague-Dawley rats. *Korean J. Lab. Ani. Sci.* **11**, 141-145.
- Kim, B. N., J. D. Kim, S. S. Ham, and S. Y. Lee. 1995. Effects of spice added natto supplementation on the lipid metabolism in rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **24**, 121-126.
- Kim, B. S., C. H. Rhee, Y. A. Hong, C. J. Woo, C. M. Jang, Y. B. Kim, and H. D. Park. 2007. Changes of enzyme activity and physiological functionality of traditional doenjang during fermentation using *Bacillus sp* SP-KSW3. *Korean J. Food Preserv.* **14**, 545-551.
- Kim, H. J., K. H. Shon, S. H. Chae, T. K. Kwak, and S. K. Yim. 2002. Brown color characteristics and antioxidizing activity of *Doenjang* extracts. *Korean J. Soc. Food Cookery Sci.* **18**, 644-654.
- Kim, K. H. 1980. A translation: The clinical application of the results of the test. Ko Moon Sa. Seoul. pp. 164-167.
- Kwon, C. S., T. W. Kwon, and J. S. Kim. 2000. Effects of soy isoflavone-supplemented diets on benzo(a)pyrene-induced lung and forestomach tumorigenesis in mice. *Food Sci. Biotechnol.* **9**, 249-252.
- Kwon, S. H., K. B. Lee, K. S. Im, S. O. Kim, and K. Y. Park. 2006. Weight reduction and lipid lowering effects of Korean traditional soybean fermented products. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **35**, 1194-1199.

22. Kwon, S. H. and M. Y. Shon. 2004. Antioxidant and anti-carcinogenic effects of traditional Doenjang during maturation periods. *Korea J. Food Preserv.* **11**, 461-467.
23. Lee, E. H. and J. H. Chyun. 2007. Effects of chongkukjang intake on lipid metabolism and liver function in ethanol consumed rats. *Korean J. Nutr.* **40**, 684-692.
24. Lee, J. J., Y. M. Lee, H. C. Chang, and M. Y. Lee. 2009. Antioxidative effects of *Deonjang* fermented using *Bacillus subtilis* DJI. *Korean J. Food Preserv.* **16**, 554-561.
25. Lee, J. M., S. W. Choi, S. H. Cho, and S. J. Rhee. 2003. Effect of seeds extract of *Paeconia lactiflora* on antioxidative system and lipid peroxidation of liver in rats fed high-cholesterol diet. *Korean J. Nutr.* **36**, 793-800.
26. Lee, K. H., S. H. Ryoul, Y. S. Lee, Y. M. Kim, and G. S. Moon. 2005. Changes of antioxidative activity and related compounds on the *Chungkukjang* preparation by adding drained boiling water. *Korean J. Food Cookery Sci.* **21**, 163-170.
27. Lee, M. D. and I. C. Kim. 2000. Soy protein and obesity. *Nutr.* **16**, 459-460.
28. Lee, S. L. and J. G. Kim. 2005. Inhibitory effects of Doenjang (Korean fermented soybean paste) and soybean extracts on the growth of KB cells. *Kor. J. Env. Hlth* **31**, 444-450.
29. Lee, S. M. and H. C. Chang. 2009. Growth-inhibitory effect of the solar salt-*Deonjang* on cancer cells, AGS and HT-29. *J. Korean Soc. Sci. Nutr.* **38**, 1664-1671.
30. Levy, R. I. 1991. Cholesterol, lipoprotein, apoproteins and heart disease; present status and future prospects. *Clin. Chem* **27**, 653-657.
31. Lim, A. K., H. K. Jung, J. H. Hong, J. S. Oh, J. H. Kwak, Y. H. Kim, and D. I. Kim. 2008. Effects of the soybean powder with rich aglycone isoflavone on lipid metabolism and antioxidative activities in hyperlipidemic rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **37**, 302-308.
32. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
33. Mitchell, G. V., M. Y. Jenkins, and E. Grudel. 1989. Protein efficiency ratios and net protein ratios of selected protein foods. *Plant Foods Hum. Nutr.* **39**, 53-58.
34. Niho, Y., T. Yamazaki, Y. Nakajima, H. Itoh, T. Takeshita, J. Kinjo, and T. Nohara. 1990. Pharmacological studies on puerariae flos. The effects of puerariae flos on alcohol induced unusual metabolism and experimental liver injury in mice. *Yakugaku Zasshi.* **110**, 604-611.
35. Oh, D., S. S. Ham, S. Y. Lee, B. K. Park, S. H. Kim, C. K. Chung, and I. J. Kang. 1998. Effect of irradiation and blanching on the quality of juices of *Spuriopinella brachycarpa* during storage. *Korean J. Food Sci. Technol.* **30**, 333-340.
36. Oh, H. J. and C. S. Kim. 2007. Antioxidant and nitrite scavenging ability of fermented soybean foods (*Chungkukjang Doenjang*). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **36**, 1503-1510.
37. Park, J. W., Y. J. Lee, and Y. S. Lee. 2007. Total flavonoids and phenolics in fermented soy products and their effects on antioxidant activities by different assays. *Korean J. Food Culture* **22**, 353-358.
38. Prasad, K. and J. Kalra. 1993. Oxygen free radicals and hypercholesterolemic atherosclerosis; effect of vitamin E. *Am Heart J.* **125**, 958-973.
39. Pratt, D. E. 1982. Water soluble antioxidant activity in soybeans. *J. Food Sci.* **37**, 322-332.
40. Pratt, D. E. and P. M. Birac. 1979. Source of antioxidant activity in soybeans and product. *J. Food Sci.* **44**, 1720-1728.
41. Reeves, P. G., F. H. Nielson, and G. C. Fahey Jr. 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* **123**, 1939-1951.
42. Shin, Y. H. and J. Y. Jeon. 2004. The physiological activities of pinitol isolated from soybean. *Food Industry Nutr.* **9**, 28-35.
43. Tietze, F. 1969. Enzymatic methods for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. *Anal. Biochem.* **27**, 502-522.
44. Yokozawa, T., T. Nakagawa, and K. Kitani. Antioxidative activity of green tea polyphenol in cholesterol-fed rats. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 3549-3552.
45. Yang, J. L., S. H. Lee, and Y. S. Song. 2003. Improving effect of powders of cooked soybean and chongkukjang on blood pressure and lipid metabolism in spontaneously hypertensive rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **32**, 899-905.

초록 : 대두와 된장분말이 고콜레스테롤식이를 급여한 흰쥐의 콜레스테롤 농도 및 항산화 활성에 미치는 영향

이재준 · 김아라 · 이환 · 김철호 · 장해춘 · 이명렬*
(조선대학교 식품영양학과)

본 연구는 고콜레스테롤식이를 급여한 흰쥐에게 동일 품종의 국산 원료 대두로부터 제조된 감압 증자한 대두 분말 혹은 *B. subtilis* DJI 균주로 접종 후 전일염을 첨가하여 제조한 된장분말을 함께 급여하였을 경우 혈청 중 콜레스테롤 저하효과와 간 조직 중 항산화효과에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실시하였다. 실험군은 정상군(N), 고콜레스테롤군(HC), 고콜레스테롤과 대두분말식이군(SHC) 및 고콜레스테롤과 DJI 된장분말식이군(DHC)으로 나누어 4주간 실시하였다. 체중증가량과 식이섭취량은 SHC군과 DHC군이 HC군과 N군에 비하여 유의하게 감소되었다($p < 0.05$). 식이효율은 실험군 간에 유의적인 차이가 없었다. 혈청 중 AST, ALT 및 ALP활성은 고콜레스테롤과 대두 혹은 된장분말을 함께 급여한 SHC군과 DHC군이 고콜레스테롤만을 급여한 HC군에 비하여 저하되었으며($p < 0.05$), N군과는 비슷한 활성을 나타내었다. 혈청 중 중성지방, 총콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤 함량은 HC군에 비하여 SHC군과 DHC군에서 유의적으로 감소되는 경향이었고($p < 0.05$), HDL-콜레스테롤 함량은 증가하는 경향을 보였다. 대두 혹은 된장분말을 함께 급여하였을 경우 고콜레스테롤식으로 증가된 간 조직 중 유리기해독계 효소인 catalase 및 GSH-Px 활성 억제와 항산화작용을 나타내는 GSH 함량을 증가시킴으로서 지질과산화물에 대한 방어력이 증가되었다. 콜레스테롤 저하 및 항산화효과는 대두분말과 된장분말 간에 차이가 거의 없었다. 이상의 결과 대두 혹은 된장분말은 고콜레스테롤식으로 유도된 산화적 손상에 대한 간 보호효과와 혈청 중 콜레스테롤 저하효과가 있는 것을 알 수 있었다.