

고콜레스테롤혈증 흰쥐에서 비숙성치즈의 보충섭취가 지질 및 항산화 체계에 미치는 영향

서보영¹ · 베른하르트 스펡글러² · 안드레아스 뢰프² · 이본 쇼버² · 윤여창³ · 박은주^{1*}

¹경남대학교 식품영양학과

²유스투스-리비히 대학교 무기·분석화학 연구소

³건국대학교 축산식품생물공학과

Effects of Unripened Cheese Supplements on Lipid and Antioxidant Status in Hypercholesterolemic SD Rats

Bo-Young Seo¹, Bernhard Spengler², Andreas Römpf², Yvonne Schober²,
Yoe-Chang Yoon³, and Eunju Park^{1*}

¹Dept. of Food and Nutrition, Kyungnam University, Gyeongnam 631-701, Korea

²Institute for Inorganic and Analytical Chemistry, Justus-Liebig University, Gießen, Germany

³Dept. of Food Science and Biotechnology of Animal Resources, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effects of unripened cheese supplements on lipid metabolism and antioxidant status in hypercholesterolemic SD rats. Rats were induced to have hypercholesterolemia by feeding them high cholesterol diet (0.5% cholesterol and 0.2% sodium cholate) for 4 weeks and then divided into 2 groups. One group was fed a high cholesterol diet with 5% unripened cheese (URC) daily for 6 weeks, and the other one was fed a high cholesterol diet without 5% unripened cheese (URC) daily for 6 weeks. Significantly-increased plasma total cholesterol (TC), triglycerides (TG), and AST activity because of the high-cholesterol diet were reduced 18.8%, 40.5%, and 33%, respectively, by URC supplementation. Also, URC lowered hepatic total lipids, TCs, and TGs, whereas fecal lipid profiles were not changed by URC. The supplementation of URC resulted in an increase of plasma retinol and α -tocopherol by 40.5% and 39.2% and leukoytic DNA resistance to oxidative stress by 52.3% compared to hypercholesterolemic control. These results suggest that unripened cheese supplements could exert significant health benefits to those with hypercholesterolemia through ameliorating lipid profiles and antioxidant effects.

Key words: unripened cheese, hypercholesterolemia, antioxidant, lipid metabolism, DNA damage

서 론

현대사회는 서구화된 식생활 패턴에 의해 탄수화물, 지방, 단백질 등의 열량 영양소 과다섭취와 운동부족에 따라 혈액 내 콜레스테롤 및 지방의 축적이 증가될 뿐만 아니라 각종 심혈관질환 및 당뇨와 같은 만성질환 유병률이 급증하고 있다(1-3). 사망원인 중 심혈관질환은 세계적으로 높은 비중을 차지하고 있으며(4), 한국에서도 전체 사망률의 30% 이상을 차지한다(5).

체내 축적된 다중 불포화지방산이나 체내 각종 지질성분은 superoxide anion(O₂⁻), hydrogen peroxide(H₂O₂), hydroxy radical(OH[·]) 등과 같은 활성 산소종(ROS: reactive oxygen species)에 의해 산화되고 그 결과, malondialdehyde(MDA)와 같은 지질과산화물로 전환된다(6,7). 지질과

산화는 체내 산화적 스트레스를 증가시키고, 항산화물과 활성산화물 간의 불균형을 초래하여 세포의 단백질, 탄수화물, 지질뿐만 아니라 DNA까지 손상시켜 심혈관질환 및 암 등을 유발한다(8).

심혈관질환은 다른 질병에 비해 식이적인 영향이 크다고 알려져 식품 내 항동맥경화성 활성을 나타내는 성분을 함유한 물질 탐색 관련 연구가 활발히 진행되고 있다(4,9).

치즈는 영양적 가치가 높은 식품으로 우유와 비교 시 거의 비슷한 영양분을 가지거나 더 많은 양의 단백질, 칼슘, 인 등의 영양소뿐만 아니라 비타민 A, B와 미네랄 등을 포함하는 발효 유제품으로, 최근 국내 치즈 소비량이 지속적으로 증가하는 실정에 있다(10). 일반적으로 치즈는 전유, 탈지유, 크림 등의 주원료를 이용하여 유산균, 렌넷, 산 및 각종 효소를 첨가하여 casein을 응고시켜 유청을 제거한 후 가압, 가

*Corresponding author. E-mail: pej@kyungnam.ac.kr
Phone: 82-55-249-2218, Fax: 82-55-244-6504

열, 성형 등의 처리를 거쳐 만들어진 유제품을 뜻하며, 신선한 응고물 자체의 비숙성치즈(unripened cheese)와 발효숙성을 통해 생산되는 숙성치즈(ripened cheese)로 나뉜다(11). 대표적인 숙성치즈인 cheddar는 열량 423 kcal/100 g 단백질 함량 25.7%, 지방 33.8%, 수분이 35.3% 함유되어 있어 열량이나 단백질, 지방의 함량은 매우 높은 것으로 나타난 반면 비숙성치즈의 대표적인 cottage의 경우 열량 105 kcal/100 g, 단백질 13.3%, 지방 4.5%, 수분 79%가 함유된 것으로 보고된 바 있다(12). 따라서 치즈의 종류에 따라 그 영양성분에 큰 차이가 있음을 알 수 있다. Chi 등(13)은 우유 및 요구르트, 치즈를 포함하는 유제품 섭취가 총콜레스테롤, HDL 콜레스테롤, LDL 콜레스테롤의 혈중 농도에 영향을 미쳐 매일 우유 및 유제품을 섭취하는 그룹에서 그렇지 않은 그룹보다 그 농도가 높게 나타났다고 보고하였다. 이와 반대로, Abou-Zeid의 연구(14)에서는 일반 숙성치즈와 이집트에서 주로 생산되는 부드럽고 짙은 백색의 Domiati치즈를 60일간 쥐에게 보충섭취 시킨 결과, 일반 숙성치즈 섭취군에서는 혈청과 간의 콜레스테롤 농도가 증가한데 반해 Domiati 섭취군에서는 혈청 및 간의 콜레스테롤 농도가 감소하였다. 이외에도 식물성 oil이 풍부한 치즈를 보충 섭취한 경우에도 혈중 지질에 긍정적인 영향을 미친다는 연구들이 선행된 바 있다(15,16). 이와 같이 치즈의 보충섭취에 따른 지질대사에 미치는 영향은 치즈의 종류나 제조방법에 따라 차이 날 수 있어 아직 논란의 여지가 있는 것으로 판단된다.

그러나 현재까지 비숙성치즈의 섭취가 지질대사에 미치는 영향에 대해서는 보고된 바 없어 본 연구에서는 식이로 유도한 고콜레스테롤혈증 흰쥐에 비숙성치즈를 보충 투여하였을 때 나타나는 간과 혈액 내 지질상태 및 항산화 상태의 변화를 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

시료제조

공시균주는 *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*와 *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*를 1:1로 혼합 동결한 TCC-3(Chr. Hansen, Horsholm, Denmark)를 사용하였으며, 탈지분유를 원료로 사용하여 비숙성치즈를 제조하였다. 응유효소인 rennet는 standard plus 900(Chr. Hansen)을 사용하였다.

탈지분유를 이용한 비숙성치즈 제조 방법은 Fig. 1과 같다. 탈지분유를 고온단시간 살균법(high temperature short time sterilization, 75°C/15 sec)으로 살균 후 31°C로 냉각시켰다. 냉각된 원료유를 starter와 rennet을 첨가하여 pH 4.6이 될 때까지 4~6시간 정치시켰다. pH 4.6에서 8 mm의 치즈용 칼로 자른 후 약 15분간 정치한 후 처음 30분 동안은 30~38°C, 그 다음 30분 동안 38~45°C, 나머지 30분 동안 55°C까지 일정 비율로 상승시키면서 적당한 속도와 강도로

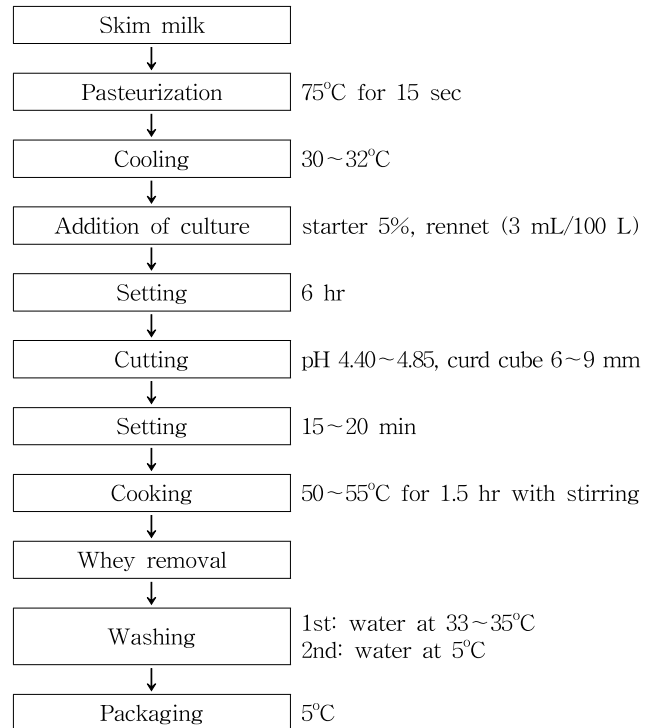


Fig. 1. Manufacturing procedure of unripened cheese.

교반하면서 열처리하였다. 그 후 유청을 배제시키고 정제수로 수세하여 치즈를 33~35°C로 냉각시킨 후, 5°C로 다시 한 번 냉각시켰다. 치즈를 자루에 넣고 10시간 동안 세척수를 완전히 제거하여 curd를 밀봉하고 냉장 보관하였다. 식이로 이용된 치즈는 동결건조(EYELA PFM-1000, Tokyo, Japan) 후 사용하였다.

실험동물 및 실험식이

평균 체중이 350 g인 12주령의 Sprague-Dawley 종 수컷 흰쥐 24마리를 코아텍(Koatech, Pyungtack, Korea)으로부터 받아 1주간 pellet으로 적응시키고 난 후에 쥐의 무게를 달아 난피법으로 3군으로 나누어 cage에 한 마리씩 분리 사육하였으며, 정상대조군(normal control group, NC)을 제외한 2그룹은 고콜레스테롤식이(0.5%의 콜레스테롤, 0.2%의 sodium cholate 및 5% lard 함유)로 4주간 고콜레스테롤혈증을 유발(17)한 뒤 다시 고콜레스테롤혈증대조군(hypercholesterolemic control, HC)과 5%의 비숙성치즈투여군(unripened cheese group, URC)으로 나누어 6주간 사육하였다(Fig. 2).

본 실험에 사용한 비숙성치즈는 탄수화물 5.1%, 단백질 11.6%, 지방 5.5%, 무기질 0.8%를 함유한 것으로 분석되었다. 따라서 실험식이 제조 시에는 5% 비숙성치즈에 함유된 열량 영양소의 함량을 제외하고 모든 군 간의 열량을 404.0 kcal로 일정하게 맞추어 제조하였다(Table 1). 물은 자유공급 하였으며 실험식은 pair feeding 하였다. 사육실의 실내 온도는 22±2°C, 습도는 50±5%를 유지하고, 전등을 조절하



Fig. 2. Flow diagram outlining for this study. NC: normal control group, HC: high cholesterol diet group, URC: high cholesterol + unripened cheese.

Table 1. Composition of the experimental diet (g/100 g diet)

Ingredients	NC ¹⁾	HC	URC ²⁾
Casein	18	18	17.4
Corn starch	50.5	50.5	50.2
Sucrose	10	10	10
Corn oil	10	4.75	4.6
Lard	0	4.75	4.6
Cholesterol	0	0.4	0.4
Cellulose	6.5	6.5	6.5
Vitamin mixture ³⁾	1	1	1
Mineral mixture ⁴⁾	3.5	3.5	3.5
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2
DL-Methionine	0.3	0.3	0.3
BTH	0.001	0.001	0.001
Sodium cholate	0	0.2	0.2
Unripened cheese	0	0	5
Total weight (g)	100	100	100
Total energy (kcal)	404.0	404.0	404.0

¹⁾NC: normal control group, HC: high cholesterol diet group, URC: high cholesterol + unripened cheese.

²⁾Values are adjusted from considering of protein (0.6%), carbohydrate (0.3%) and lipids (0.3%) contents contained in 5% unripened cheese.

³⁾AIN 93 vitamin mixture contained (in g/kg of mixture): thiamine HCl 0.6; riboflavin 0.6; pyridoxine HCl 0.7; niacin 3; d-calcium pantothenate 1.6; folic acid 0.2; d-biotin 0.02; cyanocobalamin (vitamin B₁₂) 2.5; dry vitamin A palmitate (500,000 U/d) 0.8; dry vitamin E acetate (500 U/d) 15; vitamin D₃ trituration (400,000 U/g) 0.25; vitamin K1 0.075 menadione sodium bisulfite complex 0.15; sucrose finely powdered 981.08.

⁴⁾AIN 93 mineral mixture contained (in g/kg of mixture): calcium phosphate, dibasic 500; sodium chloride 74; potassium citrate, monohydrate 220; potassium sulfate 52; magnesium oxide 24; manganous carbonate (43~48% Mn) 3.5; ferric citrate (16~17% Fe) 6; zinc carbonate (70% ZnO) 1.6; cupric carbonate (53~55% Cu) 0.3; potassium iodate 0.01; sodium selenite 0.01; chromium potassium sulfate 0.55; sucrose, finely powdered 118.03.

여 낮 12시간, 밤 12시간으로 조절하였다. 식이섭취량은 하루에 한 번, 체중은 일주일에 한 번 일정한 시간에 측정하였다. 실험 기간 동안의 체중증가량을 같은 기간 동안의 총 식이섭취량으로 나누어 식이효율을 구하였다.

$$\text{식이효율(FER)} = \left(\frac{6\text{주간 체중증가량(g)}}{6\text{주간 식이섭취량(g)}} \right) \times 100$$

혈액 및 각종 장기의 채취

실험동물을 희생시키기 전 12시간 동안 금식시킨 후, 에틸에테르 마취하여 복부 대동맥으로부터 혈액을 채취하고 hepatocentri 튜브를 이용하여 응고를 방지하였다. Comet assay를 위하여 전혈 10 mL를 이용한 후 남은 혈액을 3000 rpm에서 30분간 원심분리 하여 혈장을 획득한 다음 분석 시 까지 -70°C에 냉동 보관하였다. 실험동물의 장기는 적출하여 생리식염수에 세척하여 흡수지로 물기를 제거하였으며 무게 측정 후 액체질소로 급속 냉동시켜 분석 시까지 -70°C에 냉동 보관하였다. 번은 동물을 희생시키기 3일 전부터 회수하여 분석 시까지 -70°C에 보관하였다.

혈장 내 지질 분석

혈장의 총 콜레스테롤, 중성지방, HDL-콜레스테롤의 농도 및 alanine aminotransferase(ALT)와 aspartate aminotransferase(AST)의 활성은 효소비색법에 의한 정량용 kit 시약(Bioclinal system, Anyang, Korea)을 사용하여 측정하였다.

간의 지질 농도 측정

1.5 mL의 생리식염수에 침지시켜 균질화한 0.5 g의 간을 2:1 비율의 chloroform과 methanol을 첨가하여 교반한 후 30분간 실온에 방치하였다. 그 후 격렬히 섞여 2.5 mL의 chloroform을 첨가하여 2분 동안 방치하고 증류수를 첨가하여 섞은 후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리 과정을 거쳐 하층에서 지질을 분리하였다. 이 과정을 5회 반복하여 여과시킨 추출물에서 유기물의 증발 전과 후의 무게를 측정하여 total lipid 양을 측정하였으며, 여기에 일정량의 methanol을 첨가하여 총콜레스테롤과 중성지방을 정량용 kit 시약(Bioclinal system)을 사용하여 효소비색법으로 측정하였다(18).

분변의 지질 대사물 분석

고온에서 말린 시료 0.5 g을 분쇄하여 3 mL의 chloroform : methanol(2:1, v/v) 혼합액에 넣어 균질화한 후 2,500×g에서 10분간 원심분리 하였다. 상층액의 methanol을 따라내고 고형물 아래의 지질이 함유된 chloroform층을 분리하여 여과한 뒤, 감압 건조하여 무게를 측정하였다. 전후 무게 차이를 이용하여 total lipid의 양을 계산하였다. 추출된 지질은 methanol 용액에 녹여 효소비색법에 의한 정량용 kit(Bioclinal system)를 사용하여 중성지방과 총콜레스테롤을 측정하였다(18).

혈장의 과산화지질(baseline diene conjugation in LDL lipids) 측정

혈장 100 µL에 1.1 mg EDTA와 1,100 µL trisodium citrate buffer(0.064 M)를 진탕혼합 후 600 µL trisodium citrate buffer(0.064 M)를 다시 혼합하여 2,500 rpm에서 10분간 원심분리 하여 LDL-cholesterol을 획득하였다. 분리한 LDL-

cholesterol에 0.1 M Na-phosphate buffer 100 μ L, chloroform, methanol과 3차 증류수를 2:1:1(v/v/v) 비율로 혼합하여 2,500 rpm에서 10분간 원심분리 하였고, 다시 분리한 chloroform 층을 질소(N₂)가스로 치환한 후 cyclohexane 1 mL를 첨가하여 UV/VIS spectrometer(UV 1601, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 234 nm에서 측정하였다(19).

혈장 내 지용성 항산화비타민 분석

혈장 내 retinol 및 α -, γ -tocopherol 분석을 위하여 ethanol로 단백질을 제거한 후 n-hexane으로 지방을 추출하였으며 질소 가스로 n-hexane을 증발시켰다. 시료는 mobile phase(methanol : dichloromethane=85:15, v/v)에 녹여 high performance liquid chromatography(Dionex, Sunnyvale, CA, USA)로 측정하였다. 각 성분의 파장은 retinol 325 nm, α -, γ -tocopherol 295 nm를 이용하였다(20).

산화적 스트레스에 의한 DNA 손상 민감도 측정을 위한 comet assay

전혈 10 μ L을 채취하여 75 μ L의 0.7% low melting agarose gel(LMA)과 섞은 후, 0.5% normal melting agarose (NMA)가 precoating된 fully frosted slide 위로 전혈과 LMA의 현탁액이 골고루 분산되게 한 후 cover glass로 덮어 4°C 냉장고에 보관하였다. Gel이 굳으면 cover glass를 벗기고 그 위에 다시 0.7% LMA 용액 75 μ L로 한 겹 더 덮었다. 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상을 유도하기 위해 세포가 도포된 슬라이드를 4°C의 200 mM H₂O₂에 5분간 방치한 후 PBS로 세척하였다. Cell lysis를 위해 미리 준비해 둔 차가운 alkali lysis buffer(2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM tris)에 사용 직전에 1% Triton X-100을 섞은 후 slide를 담가 저온, 암실에서 1시간 침지시켰다. Lysis가 끝난 slide를 electrophoresis tank에 배열하고 DNA의 double strand를 풀어주기 위하여 4°C의 electrophoresis buffer(300 mM NaOH, 10 mM Na₂EDTA)를 채워 20분간 unwinding 시킨 후 25 V/300 \pm 3 mA의 전압을 걸어 20분간 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 0.4 M Tris 완충용액(pH 7.4)으로 충분히 세척하고 20 μ g/mL 농도의 ethidium bromide로 핵을 염색하여 형광현미경(Leica, Wetzlar, Germany)에서 관찰하고 CCD camera(Nikon, Tokyo, Japan)를 통해 보내진 각각의 세포핵 image는 comet image analyzing system(Kinetic Imaging, Komet 4.0, Liverpool, UK)이 설치된 컴퓨터상에서 분석하였다. 백혈구의 H₂O₂에 의한 DNA 손상 민감도는 핵으로부터 이동한 DNA 손상정도(% Tail DNA)를 정량하여 측정하였다(21).

자료의 처리

모든 자료의 처리는 SPSS-PC+ 통계 package. Ver. 14 (IBM, Chicago, IL, USA)를 사용하여 처리하였다. 각 항목에 따라 백분율과 평균치 \pm 표준오차(SE)를 구하고, 군별 유의성 검증을 위해서는 one-way 분산분석(ANOVA)을 시행

하여 F 값을 구한 뒤, Duncan's multiple range test를 이용하여 각 군 간의 유의성 차이(p<0.05)를 검증하였다.

결과 및 고찰

체중증가량 및 장기 무게에 미치는 영향

실험기간 중 평균 식이섭취량은 그룹 간 유의적 차이를 보이지 않았으나 체중 변화량과 식이효율은 다른 군에 비해 비숙성치즈섭취군(URC)이 유의적으로 낮았다(Table 2). 우유에 함유되어 있는 κ -casein은 체중조절 효과를 가지는 casomorphin을 함유하고 있다는 결과(22,23)가 보고된 바 있으나, 비숙성치즈에 포함된 어떤 성분이 체중 감소에 효과가 있는지는 아직 보고된 바 없으므로 추후 이와 관련된 심도 있는 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

실험식이 보충섭취가 장기무게에 미치는 영향을 체중으로 환산하여 Table 3에 나타내었다. 간의 무게는 정상대조군(NC)에 비해 고콜레스테롤혈증대조군(HC)에서 유의적으로 높게 나타났으며 비숙성치즈섭취군(URC)은 HC군에 비해 감소하는 결과를 보였다. HC군에서 증가한 간의 무게는 10주간의 콜레스테롤의 섭취에 의해 유발된 콜레스테롤혈증에 의한 간 비대증의 결과(24)로 사료되며 치즈의 섭취가 간 비대증을 억제시키는 것을 알 수 있다. 심장의 무게는 NC군에 비해 HC군에서 유의적으로 감소하였으며 비숙성치즈의 보충섭취에 의해 다소 증가하였으나 유의적인 변화는 없었다. 고콜레스테롤혈증은 심장의 hypertrophy를 유발

Table 2. Effects of unripened cheeses on body weight gains, food intake and FER in rats fed high cholesterol diet

	NC ¹⁾	HC	URC
Food intake (g/day)	18.8 \pm 0.3 ^{3)ns4)}	19.5 \pm 0.2	21.2 \pm 1.6
Body weight gains (g)	35.6 \pm 5.5 ^{b5)}	41.9 \pm 4.4 ^b	19.9 \pm 3.3 ^a
FER ²⁾ (%)	4.8 \pm 0.7 ^b	5.5 \pm 0.6 ^b	2.4 \pm 0.4 ^a

¹⁾NC: normal control group, HC: high cholesterol diet group, URC: high cholesterol+unripened cheese.

²⁾FER: food efficiency rate.

³⁾Mean \pm SE.

⁴⁾ns: not significant.

⁵⁾Values in the same row that share a common superscript are significantly different at the p<0.05 level.

Table 3. Effects of unripened cheeses on liver, heart, spleen and kidney in rats fed high cholesterol diet (g/kg B.W)

	NC ¹⁾	HC	URC
Liver	2.19 \pm 0.05 ^{2)a3)}	2.83 \pm 0.07 ^c	2.64 \pm 0.05 ^b
Heart	0.33 \pm 0.02 ^b	0.29 \pm 0.01 ^a	0.31 \pm 0.01 ^{ab}
Spleen	0.16 \pm 0.01 ^{ns4)}	0.16 \pm 0.01	0.17 \pm 0.01
Kidney	0.60 \pm 0.01 ^{ns}	0.60 \pm 0.01	0.57 \pm 0.01

¹⁾NC: normal control group, HC: high cholesterol diet group, URC: high cholesterol+unripened cheese.

²⁾Mean \pm SE.

³⁾Values in the same row that share a common superscript are significantly different at the p<0.05 level.

⁴⁾ns: not significant.

하는 직접적인 원인으로 알려져 있으며 이는 혈류량을 증가시키고 심장 박출량을 증가시켜 혈관확장을 유발하여 궁극적으로 좌심실의 이상비대를 초래하는 것으로 확인된 바 있다(25). 뿐만 아니라 고콜레스테롤혈증은 체내 산화적 스트레스를 증가시켜 심장조직의 괴사 및 세포 사멸을 유도하여 심장기능 이상을 초래한다는 선행연구도 이루어져 있다(26, 27). 그러나 본 연구에서와 같이 단순한 심장 무게만으로는 그 기능의 이상 유무를 판단하기 어려움이 있으므로, 좀 더 체계적인 기전 규명이 필요할 것으로 사료된다. 비장 및 신장의 무게는 각 군 간의 유의성이 없는 것으로 나타났다.

혈중 지질 양상에 미치는 영향

비숙성치즈의 보충섭취에 따른 혈중 지질농도의 변화는 Table 4와 같다. 혈중 총콜레스테롤과 중성지방은 NC군에 비해 HC군에서 유의적으로 높은 수준을 보인 반면, 비숙성치즈를 보충 섭취한 URC군은 HC군에 비해 유의적으로 감소하였다. 총콜레스테롤과 중성지방은 HC군에 비해 각각 18.8%(HC: 122.9±9.6 mg/dL, URC: 103.4±3.1 mg/dL), 45%(HC: 78.3±4.5 mg/dL, URC: 54.0±2.7 mg/dL) 감소하는 것으로 나타났으며, 중성지방의 경우 URC군(54.0±2.7mg/dL)과 NC군(63.6±4.9 mg/dL)이 동일 수준인 것으로 확인되었다. HDL-콜레스테롤은 NC군에 비해 모든 군에서 유의적으로 감소하는 결과를 보였으며 HC군은 URC군에 비해 다소 증가하는 경향은 보였으나 유의적인지는 않았다.

AST 및 ALT는 간세포 내에 존재하는 효소로써 간세포가 손상될 경우 혈액으로 방출되어 혈중 수치가 증가한다(28). 본 연구에서는 고콜레스테롤혈증 유발에 의해 AST의 활성이 유의적으로 증가한데 반해, 비숙성치즈의 보충섭취는 AST 활성이 고콜레스테롤혈증대조군에 비해 33% 유의적 감소를 나타내었다. ALT 분석결과에서는 군간 유의적 차이가 없었다. 본 연구의 결과는 고콜레스테롤 식이로 유도된 고지혈증 쥐에서 AST 농도가 대조군에 비해 증가한 반면 ALT 농도에는 변화가 없었다는 Kim 등(29)의 선행연구 결과와 일치한다. 따라서 고콜레스테롤 식이섭취로 인해 축

적된 지방은 간의 손상을 초래하는데 반해 비숙성치즈의 보충섭취는 손상된 간을 보호하는 효과를 가지는 것으로 사료된다. 치즈의 보충섭취가 지질대사에 미치는 영향을 수행한 관련 연구들은 대부분 간이나 혈액 내의 지질농도 분석에 초점이 맞춰져 있었으며, 간 손상 지표에 대한 분석은 이루어지지 않았다. 따라서 비숙성치즈의 보충섭취에 의한 간보호 효과가 어떠한 기전에 의한 것인지 대해서는 차후 연구가 필요할 것으로 보인다.

간의 지질농도 및 분변의 지질 대사물 농도에 미치는 영향

간조직의 지질성분 중 총 지질함량, 중성지방과 총콜레스테롤의 농도를 분석한 결과(Table 5), 대조군에 비해 HC군에서 유의적으로 증가하였다. 이는 고콜레스테롤 식이로 유도된 지방간 생성에 의한 결과로 보인다. 6주간의 비숙성치즈 보충섭취는 혈중 지질농도 분석 결과와 마찬가지로 HC와 비교 시 유의적으로 감소하였으며 총지질 함량이 45.4%, 중성지방이 30.7%, 총콜레스테롤이 29.6% 감소하였다. 콜레스테롤은 70% 가량이 간에서 합성되고 30% 정도만이 식이섭취에 의해 대사되며 이 중 일부만 담즙산으로 전환되어 배설되고 나머지는 재흡수된다. 이 모든 과정은 간에서 이루어지므로 간은 지질대사와 관련한 지표를 분석하기 위한 중요한 표적기관이다(2). 따라서 본 연구 결과는 비숙성치즈 섭취가 간의 지질대사에 직접적으로 작용하여 지질의 배출을 촉진하는 것을 보여준다. 우유에 함유되어 있는 단백질 중 κ-casein은 치즈 제조 시 rennin과 작용하여 glycomacro-peptide(GMP)를 생성하고 생성된 GMP는 간 기능을 증진시키는데 효과적인 것으로 밝혀진 바 있다(30,31). URC군의 간 내 지질농도 감소 효과는 비숙성치즈에 함유되어 있는 GMP 또는 GMP 가수분해물에 의해 생성된 기능성 peptide에 의한 것으로 사료된다. Hamad 등(32)은 비알콜성 지방간을 유도한 쥐에게 GMP를 경구투여한 후 조직학적 분석을 실시한 결과, 지방간 유도 후 일반 식이를 섭취한 군에 비해 GMP 섭취군에서 간세포로 유입되는 지방 양이 감소되었으며, 이는 간 기능을 향상시키는 것으로 보고하였다. 따라서 GMP는

Table 4. Effects of unripened cheese on plasma lipid profiles in rats fed high cholesterol diet

	NC ¹⁾	HC	URC
TC (mg/dL) ²⁾	85.0±2.5 ^{3)a4)}	122.9±9.6 ^c	103.4±3.1 ^b
TG (mg/dL)	63.6±4.9 ^a	78.3±4.5 ^b	54.0±2.7 ^a
HDL-Chol (mg/dL)	40.5±4.0 ^b	18.4±1.0 ^a	21.3±2.5 ^a
AST (U/L)	80.8±5.3 ^a	115.8±13.2 ^b	77.3±3.6 ^a
ALT (U/L)	38.9±1.9 ^{ns5)}	47.9±3.4	48.4±6.7

¹⁾NC: normal control group, HC: high cholesterol diet group, URC: high cholesterol+unripened cheese.

²⁾TC: total cholesterol, TG: triglyceride, HDL-chol: high density lipoprotein cholesterol, AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase.

³⁾Mean±SE.

⁴⁾Values in the same row that do share a common superscript are significantly different at the p<0.05 level.

⁵⁾ns: not significant.

Table 5. Effects of unripened cheese on fecal and hepatic tissue total lipid, triglyceride and total cholesterol concentration in rats fed high cholesterol diet

	NC ¹⁾	HC	URC
Hepatic tissue lipid profiles			
Total lipid (mg/g)	23.6±5.5 ^{2)a3)}	95.2±23.9 ^b	52.0±10.3 ^a
TG (mg/g)	3.61±0.06 ^a	5.96±0.32 ^b	4.13±0.23 ^a
TC (mg/g)	1.96±0.07 ^a	2.77±0.10 ^b	1.95±0.10 ^a
Fecal lipid profiles			
Total lipid (mg/g)	19.8±1.6 ^{ns}	22.8±1.6	21.7±3.2
TG (mg/g)	1.28±0.04 ^{ns}	1.38±0.03	1.36±0.04
TC (mg/g)	1.56±0.13 ^a	3.03±0.15 ^b	3.41±0.11 ^b

¹⁾NC: normal control group, HC: high cholesterol diet group, URC: high cholesterol+unripened cheese.

²⁾Mean±SE.

³⁾Values in the same row that do share a common superscript are significantly different at the p<0.05 level.

간으로의 지방흡수를 억제시킴으로써 간 보호 효과를 가지는 것으로 보이며, 본 연구의 결과에서 비숙성치즈의 보충섭취가 고지혈증유발군에 비해 간기능이 향상된 것은 치즈 제조 중 생성된 GMP의 영향인 것으로 유추된다.

분변의 총 지질함량 및 중성지방 분석 결과, 모든 군 사이의 유의적 차이가 없는 것으로 나타났다. 분변 중 총콜레스테롤 함량은 NC군에 비해 HC군에서 유의적으로 높게 나타나 총콜레스테롤 배출량이 증가한 것으로 나타났으나, 비숙성치즈 보충섭취에 따른 영향은 없었다(Table 5).

우유는 전 연령대에 널리 이용되는 완전식품이기는 하나 치즈나 버터로 가공될 경우 콜레스테롤 함량이 증가한다(33). 이러한 이유에서 국민의 건강 증진을 위해 콜레스테롤이나 지방의 함량을 감소시킨 유제품 개발에 대한 연구의 필요성이 제기되고 있으며 낙농 선진국에서는 이미 관련 연구가 진행되고 있다(14,33). 따라서 비숙성치즈 섭취로 인한 혈액 및 간의 지질 강화효과는 매우 의미 있는 자료가 될 것으로 사료된다.

혈장 내 지질과산화(conjugated dienes in LDL lipids, CD)에 미치는 영향

혈액 내 생성된 지질과산화물 농도(Fig. 3)는 NC군에 비해 HC군에서 유의적으로 증가하였다. 최근 연구 결과에 따르면, 고콜레스테롤 함유식이 섭취는 활성산소 생성에 직접적으로 관여하여 지질과산화물 생성을 증가시킨다(34). 본 연구 결과 역시 고콜레스테롤 함유식이에 의해 과산화지질의 농도가 유의적으로 증가하여 NC군에 비해 HC군에서 유의적으로 높은 수치를 보였다. URC군에서는 HC군에 비해 다소 감소하는 경향만을 확인하였다.

혈장 내 지용성 항산화비타민 농도에 미치는 영향

혈장 내 지용성 항산화비타민 분석 결과는 Table 6과 같다. 지용성 비타민은 혈액 내 순환하는 지질농도에 의존하여

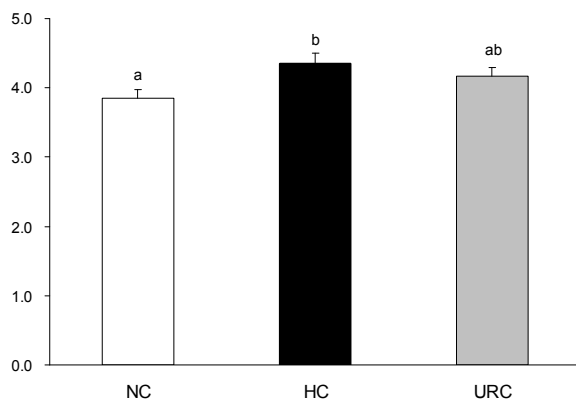


Fig. 3. Effects of unripened cheese on plasma lipid peroxidation in rats fed high cholesterol diet. Values are mean with standard error. NC: normal control group, HC: high cholesterol diet group, URC: high cholesterol+unripened cheese. Values not sharing the same letter are significantly different from one another ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

Table 6. Effects of unripened cheese on plasma lipid antioxidant vitamins in rats fed high cholesterol diet

	NC ¹⁾	HC	URC
Retinol/TG	0.63±0.08 ^{ab}	0.44±0.08 ^a	0.74±0.04 ^b
g-tocopherol/TG	0.12±0.03 ^{ns}	0.06±0.02	0.07±0.03
a-tocopherol/TG	10.63±1.54 ^{ab}	7.65±1.56 ^a	12.59±1.43 ^b

¹⁾NC: normal control group, HC: high cholesterol diet group, URC: high cholesterol+unripened cheese.

²⁾Mean±SE.

³⁾Values in the same row that do share a common superscript are significantly different at the $p < 0.05$ level.

흡수된다는 Horwitt 등의 연구(35)를 바탕으로 지용성 비타민 농도를 중성지방 농도로 보정시킨 후 사용하였다. 혈장 retinol과 γ -tocopherol, a-tocopherol 농도는 NC군에 비해 HC군에서 유의적이지는 않으나 낮은 경향을 보인 반면, 비숙성치즈 보충섭취 후 혈장 retinol, a-tocopherol 비타민의 농도는 HC군에 비해 유의적으로 증가하였다. 2005년 한국 영양섭취기준 수록된 식품성분자료(12)에 따르면 비숙성치즈인 cottage에는 비타민 E와 retinol이 38.0 R.E/100 g, 35 μ g/100 g 함유되어 있다. 따라서 URC군의 혈중 retinol과 a-tocopherol 농도가 증가한 것은 비숙성치즈에 함유되어 있는 retinol과 비타민 E의 영향을 받은 것으로 사료된다. Intorre 등의 연구(36)에 의하면 건강한 대상자에게 일반숙성치즈(대조군)와 5% 아마인유를 함유한 옥수수 및 목초사료를 섭취한 소의 우유로 만든 치즈(실험군)를 4주간 섭취시켰을 때, 대조군에 비해 실험군에서 혈중 비타민 C와 E 농도가 유의적으로 증가하는 결과를 보여 본 연구결과에서와 같이 치즈섭취로 인해 혈중 항산화비타민 농도에 긍정적인 영향을 미침을 알 수 있었다. 인체는 산화적 스트레스에 대한 방어를 위해 효소적 체계와 비효소적 체계를 가지며, 식품으로 섭취되는 비타민 C, 비타민 E, 베타카로틴 등과 같은 항산화비타민과 셀레늄 등의 무기질은 대표적인 비효소적 방어 물질이다(37). 이들은 체내에서 서로 보완, 절약, 상승작용을 통해 지질대사에 밀접한 관계를 가지며 특히 지질과산화에 직접적인 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(38). 지용성비타민은 지질과산화를 직접적으로 억제함으로써 활성산소종을 방어하는 항산화능을 증가시킨다(39). 본 연구에서 식이에 의해 유도된 고콜레스테롤혈증에 의해 증가된 지질과산화(Fig. 2)를 방어하기 위해 혈중 retinol 및 a-tocopherol이 이용된 것으로 보이며 이는 비숙성치즈의 보충섭취가 체내 retinol과 a-tocopherol의 농도에 영향을 미칠 뿐만 아니라 절약작용에 도움을 준 결과 URC군에서 혈중 retinol, a-tocopherol의 농도가 높게 나타난 것으로 사료된다.

백혈구의 DNA 손상에 미치는 영향

비숙성치즈의 보충섭취가 산화적 스트레스로 유도된 백혈구의 DNA 손상에 미치는 영향에 대한 결과는 Fig. 4과 같다. 200 μ M 농도의 H_2O_2 로 유도된 산화적 스트레스에 의해 손상된 DNA의 핵으로부터 이동해 떨어져 나간 꼬리부분

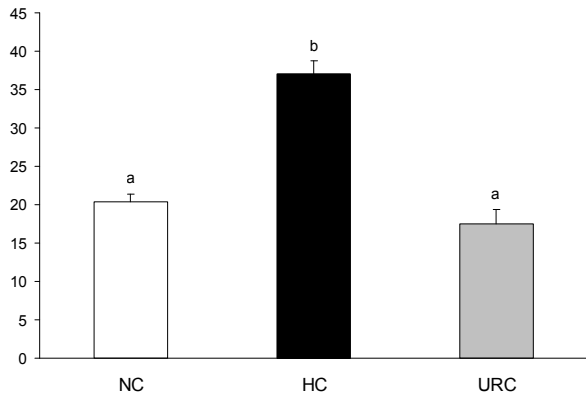


Fig. 4. Effects of unripened cheese on leukocytes 200 mM H₂O₂ induced DNA damage in rats fed high cholesterol diet. Values are mean with standard error. NC: normal control group, HC: high cholesterol diet group, URC: high cholesterol+unripened cheese. Values not sharing the same letter are significantly different from one another (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

내 DNA% 함량을 측정하였을 때 고지혈증유발 식이는 산화적 스트레스에 대한 백혈구 DNA 손상을 유의적으로 증가시킨 것으로 나타난 반면, 비숙성치즈의 보충섭취는 이를 52.3% 감소시켰다(p<0.05). 혈액 내 높은 지질농도는 체내 항산화 체계의 불균형에 이르는 과정에 직접적으로 관여하는 인자로서 활성산화물 생성을 촉진하여 활성산소종에 의한 세포막 투과성의 변화를 초래, 지질과산화물을 촉진하여 DNA의 손상을 유발한다(8). 따라서 본 연구의 DNA 손상 억제 효과는 비숙성치즈의 보충섭취에 따른 지질대사의 긍정적인 영향에 의해 지질과산화를 억제함으로써 산화적 스트레스로부터 DNA 손상을 방어하는 것으로 보인다.

치즈는 앞서 밝힌바와 같이 고단백식품임에 불구하고 고지방 함유식품으로 이들의 섭취를 줄이기 위해 주의를 기울여야 하는 식품으로 인식되어온 것이 사실이다(32,33). 그러나 본 연구를 통해 비숙성치즈를 보충섭취에 의해 콜레스테롤 저하 효과뿐만 아니라 항산화 및 항유전독성에서도 긍정적인 효과를 확인하였다. 따라서 비숙성치즈는 기능성을 가진 식품으로써 손색이 없을 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 식이로 유도한 고콜레스테롤혈증 흰쥐에 비숙성치즈를 보충 투여하였을 때 간과 혈액 내 지질상태 및 항산화 상태의 변화를 분석하고자 하였다. 정상대조군을 제외한 나머지 그룹은 4주간 고콜레스테롤 식이섭취를 통해 고콜레스테롤혈증을 유발한 뒤 고콜레스테롤식이 및 고콜레스테롤 식이+비숙성치즈 첨가식이를 6주간 더 투여하였다. 실험기간 중 평균 식이섭취량은 그룹 간 유의적 차이를 보이지 않은 반면, 체중 변화량과 식이효율은 다른 군에 비해 비숙성치즈섭취군에서 유의적으로 낮게 나타났다. 정상대조군에 비해 고콜레스테롤혈증대조군에서 간 무게, 혈장

총콜레스테롤, 중성지방농도 및 혈장 AST 활성이 유의적으로 높게 나타났으며 비숙성치즈섭취군에서는 고콜레스테롤혈증대조군에 비해 감소하는 효과를 보였다. 고콜레스테롤 식이에 의해 유의적으로 증가한 간조직의 총 지질함량, 중성지방과 총콜레스테롤의 농도도 비숙성치즈 보충섭취에 의해 유의적으로 감소하였다. 분변의 지질성분에는 비숙성치즈 보충섭취에 따른 영향은 없었다. 혈장 retinol과 γ -tocopherol, α -tocopherol 농도는 정상대조군에 비해 고콜레스테롤혈증대조군에서 낮은 경향을 나타내었으나 유의적 차이는 없었으며, 비숙성치즈 보충섭취 후 혈장 retinol, α -tocopherol의 농도는 유의적으로 증가하였다. 고콜레스테롤혈증 유발 식이는 산화적 스트레스에 대한 백혈구 DNA 손상을 유의적으로 증가시킨 것으로 나타난 반면, 비숙성치즈의 보충섭취는 이를 52.3% 감소시켰다. 이상 본 연구의 결과, 고콜레스테롤혈증을 유발한 동물모델에서 비숙성치즈의 보충섭취는 지질대사 개선 및 항산화 상태 개선에 효과적이라는 것을 확인할 수 있었다. 향후 본 연구를 기반으로 한 분자생물학적 수준의 기전 연구가 필요하다고 생각되어지며 비숙성치즈의 지질개선 및 항산화 효과 등의 기능성식품 소재로의 활용이 기대된다.

감사의 글

본 연구는 2009년도 농림수산식품부 농림기술개발사업의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

1. National Statistical Office (<http://kostat.go.kr/wnsearch/search.jsp>). 2006. Death by Causes 2007.
2. Song YB, Jong SK, Park SB, Wee JJ, Do JH, Kim YS. 2008. Influence of Korean red ginseng water extract on recovery of hepatic function in hypercholesterolemic mice fed high cholesterol diet. *J Ginseng Res* 32: 283-290.
3. Kim RJ, Lee SJ, Kim MJ, Hwang CR, Kang JR, Jung WJ, Sung NJ. 2010. Effects of fresh, red and black garlic powder on lipid metabolism of obese rats induced by high fat diet. *J Agriculture & Life Science* 44: 159-170.
4. Glowinska B, Urban M, Koput A. 2002. Cardiovascular risk factors in children with obesity, hypertension and diabetes: lipoprotein(a) level and body mass index correlate with family history of cardiovascular disease. *Eur J Pediatr* 161: 511-518.
5. Yoon HJ, Park YS. 2010. Effects of *Scutellaria baicalensis* water extract on lipid metabolism and antioxidant defense system in rats fed high fat diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 219-226.
6. Kim DY, Chang JC. 1998. Radioprotective effect of ginseng components on antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation of liver γ -irradiated mice. *J Ginseng Res* 22: 1-10.
7. Lee HJ, Kim DY, Chang JC. 1999. Antioxidant effects of Korean red ginseng components on the antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in the liver of mouse treated with paraquat. *J Ginseng Res* 23: 182-189.

8. Halliwell B. 1996. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr* 16: 33-50.
9. Kim AR, Lee JJ, Lee H, Chang HC, Lee MY. 2010. Body-weight-loss and cholesterol-lowering effects of Cheong-gukjang (a fermented soybean paste) given to rats fed a high-fat/high-cholesterol diet. *Korean J Food Preserv* 5: 688-697.
10. Chun HN. 2005. Development of Korean dairy industry-cheese. *J Kor Dairy Technol Sci* 23: 161-166.
11. Jo AR, Noh HW, Kim KS, Chung KH, Jeon WM. 2010. The development of limited cheese using whole milk powder and fermented milk. *Kor J Food Sci Ani Resour* 31: 102-109.
12. The Korean Nutrition Society. 2000. *Recommended dietary allowances for Koreans 7th revision*. Joongang Publishing Co., Seoul, Korea. p 386-387.
13. Chi D, Nakano M, Yamamoto K. 2004. Milk and milk products consumption in relationship to serum lipid levels: a community-based study of middle-aged and older population in Japan. *Cent Eur J Public Health* 12: 84-87.
14. Abou-Zeid NA. 1992. New type of Domiati cheese of potential benefit to people with high blood cholesterol. *J Dairy Res* 59: 89-94.
15. Jauhainen T, Salo P, Niittynen L, Poussa T, Korpela R. 2006. Effects of low-fat hard cheese enriched with plant stanol esters on serum lipids and apolipoprotein B in mildly hypercholesterolaemic subjects. *Eur J Clin Nutr* 60: 1253-1257.
16. Karvonen HM, Tapola NS, Uusitupa MI, Sarkkinen ES. 2002. The effect of vegetable oil-based cheese on serum total and lipoprotein lipids. *Eur J Clin Nutr* 56: 1094-1101.
17. Lee CU, Koh JB. 2006. Effects of Cheonggukjang on lipid metabolism in female rats fed cholesterol diet. *J Life Sci* 16: 932-937.
18. Folch J, Lees M, Stanley GH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-502.
19. Ahotupa M, Marniemi J, Lehtimäki T, Talvinen K, Raitakari O, Vasankari T, Viikari J, Luoma J, Ylä-Herttuala S. 1998. Baseline dienes conjugation in LDL lipids as a direct measure of in vivo LDL oxidation. *Clin Biochem* 31: 257-261.
20. Genser D, Kang MH, Vogelsang H, Elmadfa I. 1999. Status of lipid soluble antioxidants and TRAP in patients with Crohn's disease and healthy controls. *Eur J Clin Nutr* 53: 675-679.
21. Betti C, Davini T, Giannessi L, Loprieno N, Barale R. 1994. Micro gel electrophoresis assay (comet assay) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutat Res* 307: 323-333.
22. Chiba H, Tani F, Yoshikawa M. 1989. Opioid antagonist peptides derived from kappa-casein. *J Dairy Res* 56: 363-366.
23. Trompette A, Claustre J, Caillon F, Jourdan G, Chayvialle JA, Plaisancié P. 2003. Milk bioactive peptides and beta-casomorphins induce mucus release in rat jejunum. *J Nutr* 133: 3499-3503.
24. Nestel PJ, Chronopulos A, Cehun M. 2005. Dairy fat in cheese raises LDL cholesterol less than that in butter in mildly hypercholesterolaemic subjects. *Eur J Clin Nutr* 59: 1059-1063.
25. Stapleton PA, Goodwill AG, James ME, Brock RW, Frisbee JC. 2010. Hypercholesterolemia and microvascular dysfunction: interventional strategies. *J Inflamm (Lond)* 7: 54-64.
26. Kloner RA, Przyklenk K, Whittaker P. 1989. Deleterious effects of oxygen radicals in ischemia/reperfusion. Resolved and unresolved issues. *Circulation* 80: 1115-1127.
27. Singh N, Dhalla AK, Seneviratne C, Singal PK. 1995. Oxidative stress and heart failure. *Mol Cell Biochem* 147: 77-81.
28. Kim YJ. 2008. Interpretation of liver function tests. *Korean J Gastroenterol* 51: 219-224.
29. Kim TH, Son YK, Hwang KH, Kim MH. 2008. Effect of *Angelica keisei* Koidzumi and Tumeric extract supplementation on serum lipid parameters in hypercholesterolemic diet or P-407-induced hyperlipidemic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 708-713.
30. Dziuba J, MinKiewicz P. 1996. Influence of glycosylation in micelle-stabilizing ability and biological properties of C-terminal fragment of cow's k-casein. *J Int Dairy* 6: 1017-1044.
31. Shon DH. 1997. Nutritional and bioactive components of soymilk and cow's milk (a review). *Korea Soybean Digest* 14: 66-76.
32. Hamad EM, Taha SH, Abou Dawood AG, Sitohy MZ, Abdel-Hamid M. 2011. Protective effect of whey proteins against nonalcoholic fatty liver in rats. *Lipids Health Dis* 57: 1-7.
33. Jung CS. 2002. A development of cholesterol removed cheese. *J Appl Tourism Food & Beverage Management and Res* 13: 129-147.
34. Zhang X, Dong F, Ren J, Driscoll MJ & Culver B. 2005. High dietary fat induces NADPH oxidase-associated oxidative stress and inflammation in rat cerebral cortex. *Exp Neurol* 191: 318-325.
35. Horwitt MK, Harvey CC, Dahm CH Jr, Searcy MT. 1972. Relationship between tocopherol and serum lipid levels for determination of nutritional adequacy. *Ann NY Acad Sci* 18: 223-236.
36. Intorre F, Foddai MS, Azzini E, Martin B, Montel MC, Catasta G, Toti E, Finotti E, Palomba L, Venneria E, Raguzzini A, Fumagalli A, Testa MF, Rossi L, Maiani G. 2011. Differential effect of cheese fatty acid composition on blood lipid profile and redox status in normolipidemic volunteers: a pilot study. *Int J Food Sci Nutr* 62: 660-669.
37. Robles R, Palomino N, Robles A. 2001. Oxidative stress in the neonate. *Early Hum Dev* 65: S75-S81.
38. Miwa K, Okinaga S, Fujita M. 2004. Low serum alpha-tocopherol concentrations in subjects with various coronary risk factors. *Circ J* 68: 542-546.
39. Burton GW. 1989. Antioxidant action of carotenoids. *J Nutr* 119: 109-111.

(2011년 10월 11일 접수; 2011년 12월 10일 채택)