

최종
연구보고서

혈중 콜레스테롤 강하 기능성 우유 및 유제품의 개발

Development of blood cholesterol lowering
functional milk and dairy products

연구기관
세종대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “혈중 콜레스테롤 강하 기능성 우유 및 유제품의 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004 년 10 월 12 일

주관연구기관명 : 세종대학교

총괄연구책임자 : 곽 해 수

세부연구책임자 : 곽 해 수

요 약 문

I. 제 목

혈중 콜레스테롤 강하 기능성 우유 및 유제품의 개발

II. 연구 개발의 목적 및 중요성

최근 국민소득의 증가에 따른 식생활이 다원화 및 서구식 식문화가 확산되어 가고 있으나, 동시에 건강에 대한 인식의 향상으로 건강 기능성 식품에 대한 필요성이 대두되고 있다. 종전까지는 식품의 중요한 기능을 인체의 영양소를 공급하는 영양기능인 제 1차 기능과, 식품의 맛과 향미 등에 영향을 주는 기호성인 제 2차 기능의 향상에 주력해 왔으나, 최근 유해 물질의 중화, 해독, 배설, 미네랄의 흡수촉진, 혈압 및 콜레스테롤 감소, 암의 예방 등의 생체조절 기능을 가진 식품의 제 3차 기능이 새로운 식품의 기능으로 자리 잡게 되었다. 따라서 인구의 노령화와 식생활의 풍요로움으로 현대인들에게 성인병 발병율이 증가하는 추세인 요즘, 질병의 예방 및 치료의 기능을 가진 기능성 식품의 개발이 필요하다 사료되어 본 연구과제는 혈중 콜레스테롤을 저하시키는 우유 및 유제품의 개발에 목적을 두었다.

우유 및 유제품은 서양에서 오래 전부터 중요한 식품으로 사용되어 왔고, 우리나라에서도 약 40여 년 전부터 발전하여 지금은 유아부터 노인에 이르기까지 널리 소비되는 거의 완전식품이나, 그 중 버터, 크림 및 치즈등은 콜레스테롤이 비교적 높은 것으로 알려져 있다. 유제품의 과다소비에 의하여 콜레스테롤 섭취 증가가 고혈압, 동맥경화, 관상동맥경화 등과 같은 심장 및 순환계 질환의 하나의 원인으로 밝혀지면서 콜레스테롤을 제거하는 연구가 최근 20여 년 동안에 활발하게 진행되어 왔다.

이 연구 중 우유의 유지방 함량을 감소시키는 방법은 유제품의 향미와 조직감이 현저하게 저하됨에 따라 제품의 기호성이 문제로 제시되어, 소비자의 선호

도를 향상시키기 위하여 콜레스테롤만을 선택적으로 감소시킬 수 있는 물리적, 화학적, 생물학적 방법들이 개발되었다. 이들 방법으로는, 미생물과 효소에 의한 콜레스테롤 분해 방법, 유기용매를 이용한 추출방법, 용융결정방법, 흡착제를 이용한 제거방법, 그리고 초임계 이산화탄소를 이용한 방법 등이 있다. 그런데 현재까지 국내·외적으로 가장 효과적인 콜레스테롤 제거 방법으로는 β -cyclodextrin (β -CD)를 이용하여 콜레스테롤만을 선택적으로 흡착 또는 결합시켜 복합체를 만들어 제거하는 흡착제 이용 방법이다.

β -CD는 7개의 글루코스로 구성된 환상형 다당류로써 도우넛과 유사한 형태를 하고 있으며, 분자의 중앙 부위는 콜레스테롤과 직경이 유사하고, 수소성의 원형공간이므로 비극성 분자인 콜레스테롤과 잘 결합할 수 있는 구조를 가지고 있다. β -CD는 인체에 대한 안전성도 높고, 식품 첨가물로서의 사용이 여러 나라에서 허용되어 있다. 그래서 β -CD를 이용하여 우유 또는 유제품에서 콜레스테롤을 제거하는 연구는 지난 15여 년 동안 수행되어 왔다. 이들 연구의 주요 방법은 β -CD를 액상 시료에 첨가하여 교반하고 원심분리를 통하여 β -CD와 결합된 콜레스테롤을 제거해 내는 것으로 β -CD가 콜레스테롤을 포집하여 액상 시료인 식품으로부터 제거해 내는 기술이다. 이 기술로 우유와 유제품으로부터 콜레스테롤만 선택적으로 90%이상 제거가 가능하고, 우유의 품질이 매우 양호한 것으로 나타났다.

여러 실험의 결과로 β -CD를 이용하여 우유 및 유제품에서 90%이상의 콜레스테롤을 용이하게 제거하는 것이 가능하게 되었으나, 우유의 지방산 중에서 혈중 콜레스테롤을 증가시키는 포화지방산들 (lauric acid, myristic acid, palmitic acid)이 약 40% 정도 포함되어 있기 때문에 콜레스테롤 문제가 완전히 해결되었다고 보기가 어렵다. 그리고 현재의 과학기술로는 아직 이들 포화 지방산들을 불포화 시킬 수 없기 때문에 이를 해결하는 유일한 방법으로는 혈중 콜레스테롤을 획기적으로 저하시킬 수 있는 물질을 이용하여 콜레스테롤을 제거한 우유 및 유제품의 제조에 적용시키는 것이다.

지금까지 혈중 콜레스테롤 저하 기능이 검증된 기능성 식품 소재들은 다양하게 개발되었는데, 예를 들면 β -sitosterol, 유리 phytosterol, 선인장 추출물, 천

연 생약제, 폴리만 뉴클레이트 추출물, 오렌지, 귤, 레몬 추출물, 유청 단백질, 달맞이꽃 종자유, 레시틴, 올리고키틴, 미강유, 카제인 분해물, 이소플라본, 은행, 마늘, 식이섬유, DHA, 아가리쿠스 등을 들 수 있다. 위의 기능성 물질들 중 우유 및 유제품의 제조에서 이용 시, 맛, 조직, 저장성 등의 품질이 저하되지 않도록 선별하는 것과, 그 콜레스테롤 저하 효과를 동물 실험으로 검증하는 실험이 이루어져야 하겠다. 따라서 본 연구의 목적은 콜레스테롤이 제거된 우유, 요구르트, 체다 치즈, 버터 제조 시 혈중 콜레스테롤 저하 기능성 물질을 선택적으로 적용하여 제품의 이화학적 및 관능검사 등의 실험을 통하여 제품의 품질을 관찰하고, 이들 제품의 동물 실험에 의하여 혈중 콜레스테롤 저하 기능을 규명하는데 있다.

본 연구의 개발이 원만히 진행된다면, 다양한 콜레스테롤이 저하된 유제품의 생산이 가능하여 부가가치가 상승된 제품의 개발로 유가공 산업의 발전에 중요한 역할을 하리라고 사료된다. 또한 국제 경쟁력이 제품 개발로 유제품의 수입을 최소화하고 국민 건강에도 중요한 역할을 기대할 수 있을 것이다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구과제는 혈중 콜레스테롤을 저하시키는 우유 및 유제품 개발에 관한 연구로서, 제 1차 년도에는 필요시 혈중 콜레스테롤 저하 물질을 미세 캡슐화 하고, 콜레스테롤이 제거된 우유에 혈중 콜레스테롤 저하 물질 또는 미세캡슐화한 혈중 콜레스테롤을 적용하는 실험을 수행하며, 동시에 요구르트, 치즈, 버터에도 동일한 실험을 적용하는데, 더 상세하게 설명하면, 혈중 콜레스테롤 저하 물질들이 콜레스테롤 제거 우유, 요구르트, 치즈, 버터에 각각 적합한지의 여부를 실험한다. 각각 혈중 콜레스테롤 저하물질에 적합한 코팅제를 선정하여 미세 캡슐의 최적 조건, 안정성, 관능검사, 조직검사 등을 실시하였다.

치즈의 연구에서는 혈중 콜레스테롤 저하물질이 콜레스테롤 제거 치즈에 적합성 여부를 실험하며, 개발된 치즈 제조의 최적 공정을 확립하고, 숙성 중 이화학적 실험, 조직검사, 관능검사 등을 수행한다. 그리고 버터의 연구에서는 혈중 콜레스테롤 저하물질이 콜레스테롤 제거 버터제조에 적합성 여부를 실험하여 제

조 최적 공정 확립, 저장성, 이화학적 및 관능검사 등을 실시하였다.

제 2차 년도에는 제 1차 년도에 개발된 제품들을 동물실험 하는데, 우선 실험동물을 선정, 구입, 사육, 식이결정, 실험 식이제조를 하며, 실험동물의 고 콜레스테롤 혈증을 유발 시킨다. 실험 기간동안 식이 급여, 체중, 식이 및 섭취량을 측정하며, 혈액을 채취하여 혈청 지질인 중성지방, 총 콜레스테롤, HDL 등을 측정하여 본 연구의 목적을 달성하도록 하였다. 더 자세한 연구개발 내용 및 범위는 본 과제의 결과 보고를 참조하기 바란다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구과제는 β -cyclodextrin을 이용하여 우유 및 유제품으로부터 90% 이상의 콜레스테롤을 제거한 기술에 혈중 콜레스테롤 저하 기능성 물질을 선별적으로 적용하여 혈중 콜레스테롤 저하 기능성 우유, 요구르트, 치즈, 버터를 개발하여 동물실험에서 혈중 콜레스테롤 저하가 규명되었다. 2년의 연구기간은 부족하였으나 최선을 다하여 성공적으로 실험을 수행하였다. 연구의 결과를 산업적으로 활용 가능한 제품(우유, 요구르트)도 있으며, 아직 산업화에서 경제성을 더 연구해야 할 제품(치즈, 버터)도 있다. 결과적으로 본 연구의 결과를 활용하려는 유가공 업체가 있을 것으로 사료되며, 국내·외적으로 중요한 기능성 제품으로 인정받을 수 있을 것으로 기대되며, 향후 인류건강과 우유의 소비촉진, 더 나아가서 낙농발전에 기여하리라 사료된다.

Summary

This study was designed to develop cholesterol lowering functional dairy products such as milk, yogurt, Cheddar cheese and butter, to examine the sensory and chemical properties in cholesterol-reduced dairy products and to prove lowering cholesterol by animal test. The materials applied were polyglycerol monostearate and medium-chain triacylglycerol as coating material chitooligosaccharide, isoflavone, phytosterol, and evening primrose oil containing gamma linolenic acid as cholesterol lowering material. Cholesterol-reduced dairy products were made by β -cyclodextrin treatment, which was indicated in our previous studies.

First two experiments were applied the microencapsulation technique to apply the lowering cholesterol materials into milk such as chitooligosaccharide and isoflavone. The objectives of the first study was to develop microencapsulated chitooligosaccharide containing cholesterol-reduced milk, to examine the changes of physical and sensory properties during storage, and to observe for lowering blood cholesterol in rats. Coating material was polyglycerol monostearate (PGMS), and the efficiency of microencapsulation was 88.08% with 10:1 ratio (w/w) as coating to core materials. When even 0.5% microencapsulated chitooligosaccharide was added, the L, a, b-values and viscosity were significantly different from that of control (uncapsulated chitooligosaccharide added). In stability measurement of microcapsules, the releases of chitooligosaccharide were 1.33 and 1.25% in distilled water and cholesterol-reduced milk for 15 day storage at 4°C, respectively. In a sensory analysis, the values of astringency, bitterness, and color were significantly different between control and encapsulated chitooligosaccharide-added cholesterol-reduced milk for 7 days of storage. Blood HDL-cholesterol

increased significantly in chitooligosaccharide added cholesterol-reduced milk-fed group, compared to that in commercial milk-fed control group. This result showed the possible application into milk, and HDL improving effect of microencapsulated chitooligosaccharide.

Similarly, second experiment was investigated the effect of microencapsulated isoflavone into milk using microencapsulation. Coating material was medium-chain triacylglycerol (MCT) and core material was water-soluble isoflavone. The microencapsulation efficiency was 70.2% when the ratio of coating material to core material was 15:1. The isoflavone release increased slowly at 3 day (8%) and plateaued thereafter when stored at 4°C milk. The scores of bitterness, astringency, and off-taste in capsulated water-soluble isoflavone added milk were slight different from those in unencapsulated isoflavone added milk, but not significantly different. *In vitro* study, microcapsules of water-soluble isoflavone in simulated gastric fluid at the range of 2 to 5 pHs were released 4.0-9.3%, however, in simulated intestinal fluid at pH 8, 87.6% of isoflavone was released from capsules at 40 min incubation time. Total cholesterol in blood was significantly higher in isoflavone-added cholesterol-reduced milk than that in control. No difference was found in blood HDL concentration. Therefore, this study indicated that MCT as a coating material was acceptable for the microencapsulation of water-soluble isoflavone, and little adverse effect was found in isoflavone-fortified milk in sensory attributes.

Next four experiments were focused on the effect of cholesterol lowering materials to apply dairy products without microencapsulation whether those materials were effective or not. Among them, one study used phytosterol and other three used evening primrose oil (EPO) containing 9% gamma-linolenic acid to apply.

Third study was carried out to investigate the effect of phytosterol ester

addition on lowering blood cholesterol in cholesterol-reduced Cheddar cheese, which was manufactured by the mixture of cholesterol-reduced cream and skim milk. After the cholesterol reduction process by β -CD treatment, the cholesterol removal rate was in the range of 91.2 to 92.1%. Amount of short-chain free fatty acid and free amino acids increased with an increase of phytosterol ester, and those were significantly different from that of control in all ripening periods. All rheological properties also increased with an increase of phytosterol ester during ripening period. In sensory analysis, the scores of rancid, bitterness, Cheddar flavor and off-flavor intensities increased significantly, while texture was decreased during ripening in phytosterol ester-added groups. In animal study, 18% of total blood cholesterol was lowered in 8% phytosterol ester-added Cheddar cheese, which was significantly different from that of control. This study indicated that phytosterol ester addition showed a profound lowering effect of blood with cholesterol-reduced Cheddar cheese.

In fourth, addition of EPO into cholesterol-reduced yogurt was examined in terms of physico-chemical and sensory characteristics, and cholesterol lowering effect in blood. There was no significant difference in pH and titratable acidity between control and EPO added groups in every storage intervals. As expected, TBA values increased with the higher amount of EPO addition and with longer period of storage. The production of total short-chain fatty acids dramatically increased with an increase of EPO addition and a longer storage period. In sensory analysis, most characteristics were significantly different between control and EPO-added groups, especially 6, 8, and 10% even from 0 day storage. For cholesterol lowering effect, the increase rate of total blood cholesterol was significantly lower in 10% EPO-added and cholesterol-reduced yogurt for 16 week feeding. The change of blood total cholesterol was 57.7 mg/dL and 39.2 mg/dL in control and EPO

added group, respectively. These results indicated that EPO addition showed an effective cholesterol lowering effect with little adverse effect in sensory characteristics.

Subsequently, the effect of EPO addition was examined in Cheddar cheese stored in 8 weeks for experimental cheese and 32 weeks for control. TBA value was higher in all cholesterol-reduced Cheddar cheeses, regardless of EPO addition, compared with that in control. The production of short-chain fatty acids increased in EPO-added groups, especially in 3 and 5% from 6 week storage and thereafter. In EPO-added groups, hardness and gumminess decreased, whereas elasticity, cohesiveness, and chewiness increased, compared with that in control. Among sensory properties, rancid and overall preference values were the most adversely affected by 5% EPO addition during storage. In blood analysis, no difference was found in total cholesterol and high-density lipoprotein, but triacylglyceride decreased significantly in 5% EPO-added group compared with that in control. This study provided the possibility of EPO-added Cheddar cheese with little adverse effect in sensory properties.

Finally, the effect of EPO added in cholesterol-reduced butter was examined. When 2% EPO was added, yield was higher compared with that of control, which was not added and β -CD treated. Acid value was highest in 2% EPO-added cholesterol-reduced butter even in initial period (0 week) and thereafter. Except for elasticity, not much difference was found in all textural properties among treatments, which increased with storage period. Cholesterol-reduced butter without EPO addition showed the highest value in elasticity. In sensory analysis, color, bitterness and greasiness scores were significantly higher in cholesterol-reduced and EPO-added butter, compared with others throughout the storage periods. Therefore, overall preference score was significantly higher in cholesterol-reduced and EPO added group. This is

the first evidence for the possibility of EPO addition in butter, even though some sensory properties affected adversely when EPO was added. Blood total cholesterol was not significantly different, but the increase rate was lower in 2% EPO-added and cholesterol-reduced butter after 6 week feeding, indicating the cholesterol lowering tendency of EPO.

Based on above results, we may conclude that it provided the possibility of the functional dairy product manufacture in industry. The cholesterol lowering effect was appeared in applied dairy products such as chitooligosaccharide, isoflavone, phytosterol and EPO. However, we proposed that some adverse effects in sensory properties should be improved in further studies.

Contents

The development of milk and dairy products with reducing blood cholesterol effect

Chapter 1. Introduction	25
Chapter 2. Materials and Method	28
Section 1. Development of improving HDL cholesterol-reduced milk by chitooligosaccharide microencapsulation	28
1. Materials and reagents	28
1) Core and coating materials	28
2) Reagents and instruments	28
2. Method	28
1) Microencapsulation	28
2) Animal study for cholesterol reducing effect of chitooligosaccharide	33
Section 2. Development of water-soluble isoflavone microencapsulation	36
1. Materials and reagents	36
1) Core and coating materials	36
2) Reagents and instrument	36
2. Method	37
1) Microencapsulation	37
2) Efficiency of microencapsulation	40
3) HPLC measurement	40

4) Sensory analysis	42
5) Stability of capsules	42
6) Animal study for cholesterol reducing effect of isoflavone	43
Section 3. Development of reducing blood cholesterol Cheddar cheese by phytosterol addition	46
1. Materials and reagents	46
1) Esterification	46
2) Butter and Cheddar cheese	46
3) Cholesterol removal	46
2. Method	46
1) Milk treatment	46
2) Manufacture of butter	47
3) Manufacture of Cheddar cheese	48
4) Milk fat	49
5) Chemical composition	49
6) Acid value	50
7) Peroxide value	50
8) Thiobarbituric acid (TBA)	51
9) Measurement of cholesterol	51
10) Short-chain free fatty acids (SFFAs)	52
11) Neutral volatile compounds	53
12) Free amino acids	54
13) Rheological analysis	55
14) Sensory analysis	56
Section 4. Development of reducing blood cholesterol yogurt by evening primrose oil	57

1. Materials and reagents	57
1) Evening primrose oil	57
2) Reagents	57
2. Method	57
1) Milk fat	57
2) Cholesterol removal	58
3) Manufacture of yogurt	58
4) Titratable acidity and pH	59
5) Thiobarbituric acid (TBA)	59
6) Measurement of cholesterol	59
7) Microbial counts	60
8) Viscosity	61
9) Free fatty acids	61
10) Sensory analysis	62
11) Animal study for cholesterol reducing effect of evening primrose oil	62

Section 5. Development of reducing blood cholesterol Cheddar cheese
by evening primrose oil

1. Materials and method	65
1) Materials and reagents	65
2. Method	65
1) Milk treatment	65
2) Manufacture of Cheddar cheese	66
3) Milk fat	67
4) Chemical composition	67
5) Thiobarbituric acid (TBA)	67
6) Measurement of cholesterol	67

7) Free fatty acids	68
8) Rheological analysis	69
9) Sensory analysis	70
10) Animal study for cholesterol reducing effect of evening primrose oil	70
Section 6. Development of reducing blood cholesterol butter by	
Gamma-linolenic acid	73
1. Materials and reagents	73
1) Materials	73
2. Method	73
1) Manufacture of butter	73
2) Milk fat	74
3) Chemical composition	74
4) Acid value	74
5) Thiobarbituric acid (TBA)	75
6) Measurement of cholesterol	75
7) Rheological analysis	77
8) Sensory analysis	77
9) Animal study for cholesterol reducing effect of γ -linolenic acid	77
Chapter 3. Results	80
Section 1. Development of improving HDL cholesterol-reduced milk by	
chitoooligosaccharide microencapsulation	80
1. The efficiency of microencapsulation	80
2. Microscopic observation	81

3. Physical properties	81
1) Viscosity	81
2) Color	83
4. Stability of microcapsules	84
5. Change of microbial counts	87
6. Sensory analysis	88
7. Animal study	91
 Section 2. Development of water-soluble isoflavone microencapsulation	 94
1. Coating material	94
2. Optimum conditions	96
1) The ratio of core to coating materials	96
2) Amounts of distilled water	98
3. Stability of microcapsules during storage	99
4. Sensory analysis	100
5. Stability of microcapsules	102
1) Microcapsule stability in simulated-gastric fluid	102
2) Microcapsule stability in simulated-intestinal fluid	104
6. Animal study	105
 Section 3. Development of reducing blood cholesterol Cheddar cheese by phytosterol addition	 108
1. Esterification	108
2. Cholesterol removal rate and chemical composition	108
3. Change of TBA	109
4. Production of short-chain fatty acids	110
5. Production of neutral volatile compounds	112

6. Production of free amino acids	114
7. Rheological characteristics	117
8. Sensory evaluation	119

Section 4. Development of reducing blood cholesterol yogurt by

evening primrose oil	121
1. Cholesterol removal rate and production of Ψ -linolenic acid	121
2. pH	121
3. Titratable acidity	121
4. Change of TBA	123
5. Viscosity	125
6. Viable microbial counts	126
7. Production of free fatty acids	127
1) Short-chain fatty acids	127
2) Ψ -linolenic acid	128
3) Total free fatty acids	131
8. Sensory evaluation	132
9. Animal study	135

Section 5. Development of reducing blood cholesterol Cheddar cheese by

evening primrose oil	139
1. Cholesterol removal rate and chemical composition	139
2. Change of TBA	140
3. Production of free fatty acids	142
1) Short-chain free fatty acids	142
2) Gamma-linolenic acid	144
4. Rheological characteristics	145
5. Sensory evaluation	147

6. Animal study	149
Section 6. Development of reducing blood cholesterol butter by Ψ -linolenic acid	152
1. Chemical composition	152
2. Acid value	152
3. Change of TBA	154
4. Rheological characteristics	155
5. Sensory evaluation	156
6. Animal study	157
Chapter 4. Reference	160

목 차

혈중 콜레스테롤 강하 기능성 우유 및 유제품의 개발

본 문

제 1 장 서 론	25
제 2 장 연구방법	28
제 1 절 키토올리고당의 미세캡슐화와 이를 이용한 HDL-콜레스테롤 향상 우유의 연구	28
1. 재료 및 시약	28
가. Core material과 coating material	28
나. 시약 및 기기	28
2. 실험방법	28
가. 미세캡슐에 관한 실험	28
나. 키토올리고당의 혈중 콜레스테롤 저하 기능을 위한 동물 실험	33
제 2 절 수용성 isoflavone의 미세캡슐화에 관한 연구	36
1. 재료 및 시약	36
가. Core material과 coating material	36
나. 시약 및 기기	36
2. 실험방법	37
가. 미세캡슐의 제조	37
나. 수율측정	40
다. HPLC 분석	40
라. 관능검사	42
마. 미세캡슐의 안정성	42
바. 이소플라본의 혈중 콜레스테롤 저하 기능을 위한 동물실험	43

제 3 절 Pytosterol을 첨가한 혈중 콜레스테롤 저하 cheddar cheese의 연구	46
1. 재료 및 시약	46
가. 에스테르화	46
나. Butter and Cheddar cheese	46
다. 콜레스테롤 제거	46
2. 실험방법	46
가. 우유의 처리	46
나. Butter의 제조	47
다. Cheddar cheese의 제조	48
라. 유지방 정량	49
마. 일반성분 분석	49
바. 산가(acid value)	50
사. 과산화 물가(peroxide value)	50
아. Thiobarbetic acid (TBA)	51
자. Cholesterol 정량분석	51
차. Short-chain free fatty acids (SFFAs)	52
카. Neutral volatile compounds	53
타. 아미노산 측정 (Free Amino acids)	54
파. Rheological	55
하. 관능검사	56
제 4 절 달맞이꽃 종자유를 첨가한 혈중 콜레스테롤 저하 기능성 요구르트의 연구	57
1. 재료 및 시약	57
가. 달맞이꽃 종자유	57
나. 시 약	57
2. 실험방법	57

가. 유지방 정량	57
나. 우유의 콜레스테롤 제거	58
다. 달맞이꽃 종자유를 첨가한 요구르트의 제조	58
라. 산도 및 pH 측정	59
마. 지방산화도 측정	59
바. Cholesterol 정량분석	59
사. 유산균 수의 측정	60
아. 점도 측정	61
자. 지방산 정량분석	61
차. 관능검사	62
카. 혈중 콜레스테롤 저하 기능을 위한 동물 실험	62
제 5 절 달맞이꽃 종자유를 첨가한 혈중콜레스테롤 저하 기능성 Cheddar cheese의 연구	65
1. 재료 및 방법	65
가. 재료 및 시약	65
2. 실험방법	65
가. 우유의 처리	65
나. Cheddar cheese의 제조	66
다. 유지방 정량	67
라. 일반성분 분석	67
마. 지방산화도 측정(TBA)	67
바. Cholesterol 정량분석	67
사. 지방산 정량분석	68
아. 물성 측정	69
자. 관능검사	70
차. 혈중콜레스테롤을 위한 동물실험	70

제 6 절 Gamma-linolenic acid를 첨가한 혈중콜레스테롤 저하 기능성 버터에 관한 연구	73
1. 재료 및 방법	73
가. 실험 재료	73
2. 실험 방법	73
가. butter 제조	73
나. 유지방 정량	74
다. 일반성분 분석	74
라. 산가(acid value)	74
마. Thiobarbituric acid (TBA)	75
바. 콜레스테롤 정량 분석	75
사. Rheological property	77
아. 관능검사	77
자. 혈중 콜레스테롤 저하 기능을 위한 동물 실험	77
제 3 장 연구 결과	80
제 1 절 키토올리고당의 미세캡슐화와 이를 이용 HDL-콜레스테롤 향상 우유의 연구	80
1. 미세캡슐화의 수율	80
2. 키토올리고당의 미세캡슐 사진	81
3. 미세캡슐 키토올리고당을 첨가한 우유의 특성	81
가. 점도 측정	81
나. 색도 측정	83
4. 저장 기간 중 키토올리고당 미세캡슐의 유리량 측정	84
5. 키토올리고당 미세캡슐의 향미생물 검사	87
6. 관능 검사	88
7. 동물 실험	91

제 2 절 수용성 isoflavone의 미세캡슐화에 관한 연구	94
1. 미세캡슐을 위한 coating material의 선정	94
2. 미세캡슐의 최적조건 결정	96
가. 미세캡슐을 위한 coating material의 비율	96
나. 미세캡슐을 위한 증류수의 영향	98
3. 저장기간에 의한 수용성 isoflavone의 유리	99
4. 관능적 특성	100
5. 미세캡슐의 안정성	102
가. 인공 위액에서 pH에 의한 미세캡슐의 안정성	102
나. 인공 소장액에서 pH와 효소에 의한 수용성 isoflavone 유리량	104
6. 동물실험	105
제 3 절 Phytosterol 에스테르화를 이용한 혈중 콜레스테롤 저하 기능을 가진 체다치즈의 연구	108
1. Physterol의 에스테르화	108
2. 콜레스테롤 제거율과 일반성분	108
3. Cheddar cheese 지방산화도(TBA)변화	109
4. Short-chain fatty acids 변화	110
5. Neutral volatile compounds 변화	112
6. 아미노산 측정	114
7. Rheological 측정	117
8. 관능검사	119
제 4 절 달맞이꽃 종자유를 첨가한 혈중 콜레스테롤 저하 기능성 요구르트의 연구	121
1. 콜레스테롤 제거율과 달맞이꽃 종자유 gamma linolenic acid 정량분석	121
2. pH 측정	121

3. 산도 측정	121
4. 지방산화도(TBA)변화	123
5. 점도 변화	125
6. 유산균수 측정	126
7. 유리지방산 정량 분석	127
가. Short-chain fatty acid	127
나. Gamma linolenic acid	128
다. Total free fatty acid	131
8. 관능검사	132
9. 동물 실험	135
제 5 절 달맞이꽃 종자유를 첨가한 혈중 콜레스테롤 저하 체다치즈의 연구	139
1. 콜레스테롤 제거율과 일반성분 및 달맞이꽃 종자유 의 gamma linolenic acid 정량분석	139
2. Cheddar cheese 지방산화도(TBA)변화	140
3. 유리지방산 정량 분석	142
가. Short-chain free fatty acids 변화	142
나. Gamma linolenic acid	144
4. 물성 검사	145
5. 관능검사	147
6. 동물실험	149
제 6 절 Gamma linolenic acid를 첨가한 혈중 콜레스테롤저하 버터에 관한 연구	152
1. 버터의 일반 성분 분석	152
2. 산가(acid value)의 변화	152
3. TBA의 변화	154

4. Rheological property	155
5. 관능검사	156
6. 동물실험	157
제 3 장 참고 문헌	160

본 문

제 1 장 서 론

최근 국민소득의 증가와 건강에 대한 관리 수준의 향상에 따른 식생활이 다원화 되어지면서 서구식 식문화가 확산되어 가고 있다. 또한 종전까지는 식품의 중요한 기능을 인체의 영양소를 공급하는 영양기능인 제 1차 기능과, 식품의 맛과 향미 등에 영향을 주는 기호성인 제 2차 기능의 향상에 주력해 왔다. 그러나 최근에는 유해 물질의 중화, 해독, 배설, 미네랄의 흡수촉진, 혈압 및 콜레스테롤 감소, 암의 예방 등의 생체조절 기능을 가진 식품의 제 3차 기능이 새로운 식품의 기능으로 자리 잡게 되었다. 또한 인구의 노령화와 식생활의 풍요로움은 육체 노동이 줄어든 현대인들에게 성인병이라는 다양한 질병을 유발시킨다. 따라서 현대인들에게 가장 많이 발생하는 질병을 식품과 의약품의 경계를 허물어 일상생활에서 보다 편리하고 안정적인 방법으로 예방 또는 치료 할 수 있는 기능성 식품의 개발을 필요로 하고 있다.

우유 및 유제품은 서양에서 오래 전부터 중요한 식품으로 사용되어 왔고, 우리나라에서도 약 40여년 전부터 발전하여 지금은 유아부터 노인에 이르기까지 널리 소비되는 거의 완전식품으로 영양이 풍부하고 콜레스테롤 함량도 비교적 낮으나, 콜레스테롤이 비교적 높은 유제품으로는 버터가 219mg/100g, 37% 유지방을 함유한 크림이 137mg/100g, 크림치즈가 110mg/100g, 체다치즈가 105mg/100g, 15% 유지방을 함유한 아이스크림이 68mg/100g 포함되어있다. 그러나 시유에는 14mg/100g으로 소량 함유되어 있다⁽¹⁾.

이들 유제품의 과다섭취에 의하여 고혈압, 동맥경화, 관상동맥경화 등과 같은 심장 및 순환계 질환이 성인병으로 문제시 되면서 콜레스테롤을 제거하는 연구가 최근 20여년 동안에 활발하게 진행되어왔다. 이 연구의 일환으로, 우유 및 유제품에 내재하는 콜레스테롤을 저하시키는 방법은, 우유 유지방의 일부 또는 전체를 감소시키는 방법으로 분류할 수 있다. 그런데 우유의 유지방 함량을 감소시키는 방법은 유제품의 향미와 조직감이 현저하게 저하됨에 따라 제품의 기호

성이 문제가 된다. 그래서 소비자의 선호도를 향상시키기 위하여 콜레스테롤만을 선택적으로 감소시킬 수 있는 물리적, 화학적, 생물학적 방법들이 개발되고 있다⁽²⁾.

이들 방법으로는, 미생물과 효소에 의한 콜레스테롤 분해 방법, 유기용매를 이용한 추출방법, 용융결정방법, 흡착제를 이용한 제거방법, 그리고 초임계 이산화탄소를 이용한 방법 등이 있다. 그런데 현재까지 국내·외적으로 가장 효과적인 콜레스테롤 제거 방법으로는 β -cyclodextrin(β -CD)를 이용하여 콜레스테롤만을 선택적으로 흡착 또는 결합시켜 복합체를 만들어 제거하는 흡착제 이용 방법이다⁽³⁾.

β -CD는 7개의 글루코스로 구성된 환상형 다당류로써 도우넛과 유사한 형태를 하고 있으며, 분자의 중앙 부위는 콜레스테롤과 직경이 유사하고, 소수성의 원형공간이므로 비극성 분자인 콜레스테롤과 잘 결합할 수 있는 구조를 가지고 있다. β -CD는 인체에 대한 안전성도 높고, 식품 첨가물로서의 사용이 여러 나라에서 허용되어 있다⁽³⁾. 그래서 β -CD를 이용하여 우유 또는 유제품에서 콜레스테롤을 제거하는 연구는 지난 15여년 동안 수행되어 왔다(일본 특허 04168198, 대한민국 특허 1997-18599, 1977-37128 등). 이들 연구의 주요 방법은 β -CD를 액상 시료에 첨가하여 교반하고 원심분리를 통하여 β -CD와 결합된 콜레스테롤을 제거해 내는 것으로 β -CD가 콜레스테롤을 포집하여 액상 시료인 식품으로부터 제거해 내는 기술이다. 이 기술로 우유와 유제품으로부터 콜레스테롤만 선택적으로 90%이상 제거가 가능하고⁽³⁾, 우유의 품질은 매우 양호하나 크림의 경우는 β -CD의 완전한 분리가 어려우며⁽⁴⁾, 체다 치즈의 경우에는 조직의 문제가 있다⁽⁵⁾. 또한 콜레스테롤 제거시 β -CD가 1%정도, 크림에서는 약 10%가 필요하므로 대량생산 시 매우 소비적이고, β -CD는 가격이 저렴하지 않으며(12,000원/kg), 수입에 의존하고 있을 뿐 아니라, 환경오염에도 문제가 있기 때문에 재활용(recycling) 하는 것이 바람직하다.

β -CD를 재활용하기 위하여 콜레스테롤과 β -CD를 회수하는 방법에는 hydrogen bond inhibitor를 이용하는 방법, 열처리에 의한 방법, sodium chloride를 이용하는 방법, 유기용매를 이용하는 방법 등이 있으며⁽⁶⁾, 또한 β -CD의 재활용과 우유 및 유제품의 품질저하를 예방하는 연구로서 β -CD의 고정화⁽⁷⁾와 가교

화에 관한 연구⁽⁸⁾도 수행되고 있다.

이상에서와 같이 발전된 연구의 결과로 β -CD를 이용하여 우유 및 유제품에서 90%이상의 콜레스테롤을 용이하게 제거하고 품질과 원가절감 면에서도 문제의 해결이 가능하게 되었다. 그러나 우유의 지방산 중에서 혈중 콜레스테롤을 증가시키는 포화지방산들(lauric acid, myristic acid, palmitic acid)이 약 40% 유제품에 포함되어 있기 때문에 콜레스테롤 문제가 완전히 해결되었다고 보기가 어렵다. 그리고 현재의 과학기술로는 아직 이들 포화 지방산들을 불포화 시킬 수 없기 때문에 이를 해결하는 유일한 방법으로는 혈중 콜레스테롤을 획기적으로 저하시킬 수 있는 물질을 이용하여 콜레스테롤을 제거한 우유 및 유제품의 제조에 적용시키는 것이다⁽⁹⁾.

지금까지 혈중 콜레스테롤 저하 기능이 검증된 기능성 식품 소재들은 다양하게 개발되었는데, 예를 들면 β -sitosterol, 유리 phytosterol, 선인장 추출물, 천연 생약재, 폴리만 뉴클레이트 추출물, 오렌지, 귤, 레몬 추출물, 유청 단백질, 달맞이꽃 종자유, 레시틴, 올리고키틴, 미강유, 카제인 분해물, 이소플라본, 은행, 마늘, 식이섬유, DHA, 아가리쿠스 등을 들 수 있다⁽⁹⁾.

이들 기능성 물질을 우유 및 유제품의 제조에서 맛, 조직, 저장성 등의 품질이 저하되지 않도록 선별하여 이용하는 것이 중요한 기술이다. 그리고 이를 혈중 콜레스테롤을 저하시키는 제품들을 개발하여 동물 실험을 하므로써 어떤 기능성 물질이 어떤 제품에 적합하며, 혈중 콜레스테롤 저하 효과를 검증하므로써 제품의 개발이 가능하게 될 것이다.

따라서 본 연구의 목적은 콜레스테롤이 제거된 우유, 요구르트, 체다 치즈, 버터 제조 시 혈중 콜레스테롤 저하 기능성 물질을 선택적으로 적용하여 제품의 이화학적 및 관능검사 등의 실험을 통하여 제품의 품질을 관찰하고, 이들 제품의 동물 실험에 의하여 혈중 콜레스테롤 저하 기능을 규명하는데 있다.

제 2 장 연구 방법

제 1 절 키토올리고당의 미세캡슐화와 이를 이용한 HDL-콜레스테롤 향상 우유의 연구

1. 재료 및 시약

가. Core material과 coating material

본 실험에서 사용된 core material인 키토올리고당은 (주) 태평양화학으로부터 제공받아 저온에서 보존하면서 사용하였으며, coating material은 fatty acid ester 종류의 하나인 PGMS (polyglycerol monostearate)를(주) 일신유화 (Seoul, Korea)에서 제공받아 사용하였고 유화제로는 Tween-60을 사용하였다.

나. 시약 및 기기

키토올리고당의 미세캡슐화 수율을 측정하기 위하여 사용한 acetyl acetone, Na_2CO_3 , ethylalcohol, μ -dimethylaminobenzaldehyde와 표준물질로 사용한 D(+)-glucosamine hydrochloride는 각각 Sigma Chemical Co. (St. Louis. Mo. USA)에서 구입했다. 키토올리고당과 표준물질의 정량 분석은 Beckman Du 650 spectrophotometer (Beckman Instrument. Inc. Fullerton. CA. USA)를 사용하였다⁽¹⁰⁾.

2. 실험 방법

가. 미세캡슐에 관한 실험

1) 미세캡슐의 제조

PGMS를 이용한 키토올리고당 미세캡슐의 제조는 다음과 같다⁽¹¹⁾. 고체의 PGMS를 증류수와 1:1로 잘 혼합하여 80℃에서 녹여 4℃에서 보관하였다. 증류수와 혼합한 PGMS를 5, 10, 15, 20g 취하여 50ml의 증류수와 혼합하여 55℃의 온

도에서 녹였다. PGMS가 녹은 후 1,200rpm으로 1분 동안 녹인 후 일정량의 키토올리고당을 첨가하여 혼합하였다. 0.05%의 Tween-60이 용해된 5℃의 분산액에 W-300 spray gun(Wagner Spray Tech. Co., Markdorf, Germany)으로 PGMS와 혼합한 키토올리고당을 분무하여 캡슐화 하였다. 분무한 후 24,900 × g에서 10분간 원심분리한 후 캡슐화 되지 않은 상등액과 캡슐화된 여액을 분리하여 미세캡슐화 된 키토올리고당을 취하였으며, 미세캡슐의 제조방법은 Fig. 1과 같다.

2) 우유의 cholesterol 제거

혈중 cholesterol을 저하 시키는 기능성 우유를 실험하기 위하여 우선 우유에 내재하는 cholesterol을 제거하여야 한다. 그래서 cholesterol을 흡착하기 위하여 β -cyclodextrin(β -CD) 1%를 우유에 첨가하고, 10℃의 교반온도, 800 rpm의 교반속도, 10분의 교반시간으로 조건을 맞추어 stirring을 하였다. 흡착된 β -CD를 우유로부터 분리하기 위하여 72 × g에서 10분간 원심분리 하였다⁽³⁾. 이렇게 처리된 우유의 cholesterol 제거율을 측정하기 위하여 gas chromatography(GC)의 조건을 Table 1에서와 같이 실험하였다.

3) 미세캡슐 수율 측정

미세캡슐화한 키토올리고당의 수율을 측정하기 위하여 원심분리 후 발생한 여액을 glass filter (3G3)로 여과한 후 여액을 D-glucosamine화 하였다. D-glucosamine화 방법은 다음과 같다⁽¹²⁾. Glass filter (3G3)로 여과한 용액 10ml에 6N HCl 7ml와 H₂O 3ml를 가하여 혼합시킨 후 질소로 탈기 밀봉하였다. 140℃에서 90분간 가열하여 키토올리고당을 glucosamine으로 분해하였으며, 분해된 시료는 60℃에서 물과 HCl이 모두 농축될 때까지 감압하였고, 감압 후에 증류수 5ml를 취하여 시료를 녹이고 glass filter (3G3)로 여과시켰다. Acetyl acetone 1.5 ml에 1.2N 탄산나트륨 50ml를 혼합하여 만든 액 2ml를 여과 시킨 여액 중 1ml와 혼합하고 water bath에서 96℃의 온도에서 1시간 동안 가열한 후 흐르는 냉각수에서 냉각하였다. 그리고 96% ethyl alcohol 20ml를 가한 후 혼합하였다. p -dimethylaminobenzaldehyde를 1.6g과 HCl 3ml 그리고 96% ethyl

alcohol 30ml를 가하여 만든 혼합액 2ml를 가한 후 실온에서 2시간 정치시킨 후 spectrophotometer의 흡광도 530nm에서 시료를 정량하였다.

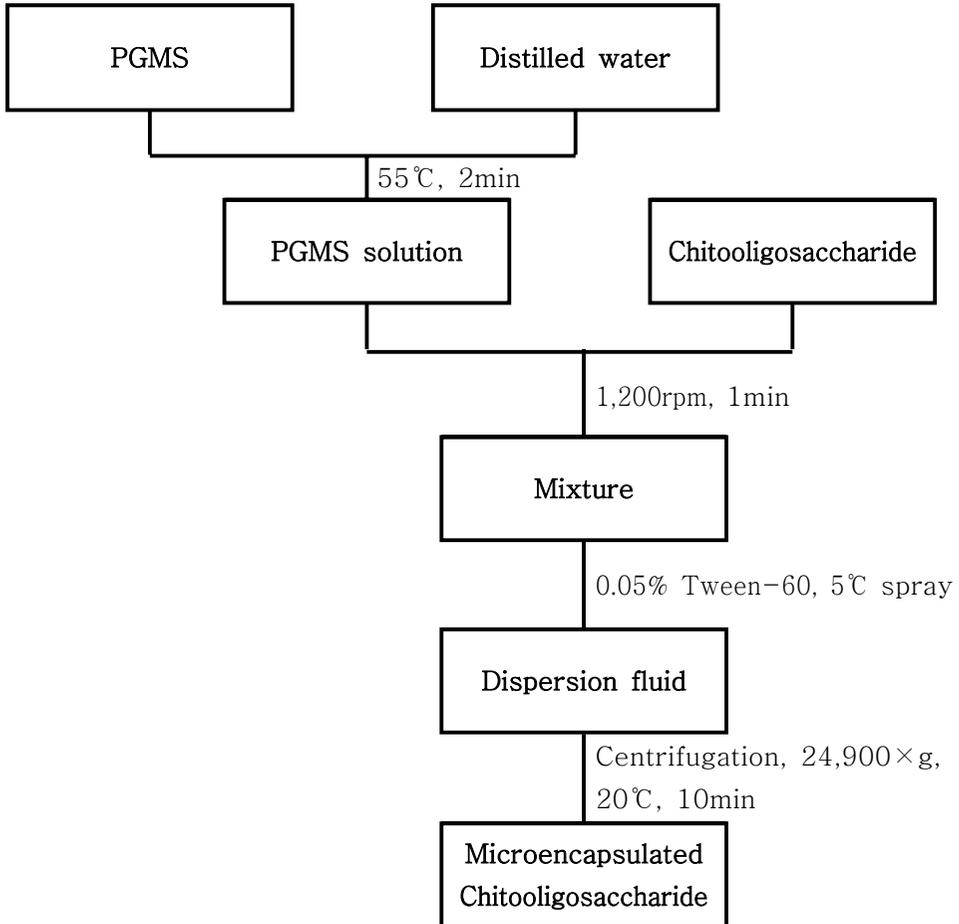


Fig 1. Schematic diagrams of chito oligosaccharide microencapsulation with polyglycerol monostearate

Table 1. Instrument and working conditions of cholesterol analysis by gas chromatography for milk treated with β -cyclodextrin

Instrument	HP Model 5890 series II (Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA, USA)
Column	HP-5 (30m×0.32m I.D. ×0.25 μ m film thickness)
Carrier gas	N (2ml/min)
Oven temperature	200°C→10°C/min→300°C (20min)
Injector temperature	270°C
Detector temperature	300°C
Detector	FID

4) 미세캡슐 키토올리고당의 사진

미세캡슐을 서울대학교 농업과학공동기기센터(NICEM)에서 주사전자현미경 (JSM 5410LV, Japan)으로 배율 ×100으로 촬영하였다.

5) 점도 측정

점도측정은 Brookfield viscometer (Model LVDV I+, Version 3.0, Stoughton, MA, USA)를 사용하였으며, control과 콜레스테롤을 제거한 시료 우유에 미세캡슐한 키토올리고당을 0.5, 1, 1.5, 2% 첨가한 것과 미세캡슐하지 않은 키토올리고당 0.5, 1, 1.5, 2% 처리한 시료를 4°C에서 spindle 2로 100rpm으로 측정한 후 centerpoise (cps)로 환산하여 표기하였다.

6) 색도 측정

색도측정은 Hunter 색차계 (Minolta CT-310, Osaka, Japan)를 사용하였으며, control과 콜레스테롤을 제거한 우유에 미세캡슐 0.5, 1, 1.5, 2% 처리한 것과 미세캡슐하지 않은 키토올리고당 0.5, 1, 1.5, 2% 처리한 시료의 색도를 실험하기 위하여 L, a, b values를 5회 측정 하였다.

7) 미세캡슐의 저장기간에 따른 안정성 측정

가) 증류수에 첨가한 미세캡슐의 저장기간에 따른 안정성 측정

최대의 수율로 키토올리고당을 미세캡슐화 하여 일정량을 증류수 100ml에 넣은 후 각각 4, 20, 30 °C의 저장 온도에서 0, 5, 10, 15, 20, 25 일 간 저장하는 동안에 미세캡슐의 안정성을 관찰하였다. 그리고 미세캡슐로부터 유리된 키토올리고당을 흡광도 530nm에서 정량하였다.

나) 우유에 첨가한 미세캡슐의 저장기간에 따른 안정성 측정

키토올리고당을 미세캡슐화 하여 일정량을 콜레스테롤이 제거된 우유 100ml에 넣은 후 4, 10, 15°C의 저장온도에서 각각 0, 3, 6, 9, 12, 15 일 간 저장하는 동안에 미세캡슐의 안정성을 관찰하였다. 그리고 미세캡슐로부터 유리된 키토올리고당을 흡광도 530nm에서 정량하였다.

8) 키토올리고당의 항미생물 실험

미세캡슐화한 키토올리고당과 미세캡슐화 하지 않은 것을 각각 0.5, 1, 1.5, 2%씩 콜레스테롤이 제거된 우유에 첨가한 시료와 처리하지 않은 시유를 대조구로 사용하였다. 시유는 항미생물 실험에 적합한 세균이 발견되지 않아 시유를 실온에 20°C에서 24시간 보관 후 사용하였다. PCA agar로 배지를 만들어 시료를 희석한 후 도말법으로 접종하여 35°C에서 48시간 배양한 후 나타난 집락수를 colony forming unit(CFU)/ml로 표시하였다.

9) 관능 검사

미세캡슐한 키토올리고당과 미세캡슐 하지 않은 키토올리고당을 0.5, 1, 1.5, 2% 농도별로 콜레스테롤이 제거된 우유에 첨가한 후 저장 기간별 0, 3, 5, 8, 12, 15일로 저장 후 뽀은 맛과 쓴맛에 대한 감도와 키토올리고당의 첨가 시 누런 정도, 기타이취, 점도, overall 등의 관능적 특성을 측정하기 위하여 관능검사를 실시하였다. 관능 검사 요원은 훈련된 관능검사 요원 10명을 선발하여 검사에 임하였다. 관능적 특성의 강도 평가는 설문지에서와 같이 다시료 비교법에 의한 7점 법으로 하였으며 관능검사에서 얻어진 결과는 SAS program을 이용하여 분산분석(ANOVA) 및 Duncan의 다범위 검정과 최소유의차 검정으로 통계 처리하였다⁽¹³⁾.

나. 키토올리고당의 혈중 콜레스테롤 저하 기능을 위한 동물 실험

1) 실험동물 및 사육 환경

본 실험에서 사용한 실험동물은 4주령의 Sprague-Dawley (SD) 랫트(12마리)를 중앙동물실험연구소에서 구입하여 일주일간 일반사료를 먹이며 적응기간을 거치는 동안 체중이 전체적으로 평균에 가까울 때 실험에 임하였다. 사육환경은 항온 21±3℃, 항습 50±10%를 유지하였으며 명암은 12시간 주기로 조명되는 동물 환경제어사육장치에서 각각 한 마리씩 스테인레스망 사육상자에 배치하여 사육하였다.

2) Sprague-Dawley의 사료

콜레스테롤 수치가 증가하는 8주 동안 모든 rat에 casein, nitrogen, corn starch, beef tallow, sucrose, cholesterol, cellulose, mineral mix, vitamin mix, cholic acid, DL-methionine, choline bitartrate가 포함되어 있는 high cholesterol-high fat diet(중앙동물실험연구소)를 먹이고 콜레스테롤 수치가 증가한 이후에는 8주 동안 casein, corn starch, sucrose, cellulose, corn oil, salt mix, vitamin mix, DL-methionine, choline bitartrate가 포함된 rodent purified diet를 모두 먹이고 그중 여섯 마리는 일일 일회 콜레스테롤이 제거된 우유 1ml에 키토올리고당 50mg을 섭취시켰다. 그리고 나머지 비교군 여섯 마리는 일일 일회 시유

를 1ml를 섭취 시켰으며, 사료의 성분은 Tables 2, 3에 표기하였다. 그리고 음수는 상수도수를 자유섭취 시켰다.

Table 2. Composition of 40% beef tallow modified AIN-76A purified rodent diet with 5% cholesterol and 0.5% cholic acid

Ingredient	g/kg
Casein, high nitrogen	200
Corn starch	150
Beef tallow	400
Sucrose	95
Cholesterol	50
Cellulose	50
Mineral mix ¹	35
Vitamin mix ²	10
Cholic acid	5
DL methionine	3
Choline bitartrate	2

¹AIN-76Mineral mix (g/kg) : CaHPO₄ 500, NaCl 74, K citrate monohydrate 220, K₂SO₄ 52, MgO, Mn carbohydrate 3.5, Fe citrate 6.0, Zn carbonate 1.6, Cu carbonate 0.3, KIO₃ 0.01, Na₂SeO₄ · H₂O 0.01, CrK(SO₄) · 12H₂O 0.55, Sucrose 118.

²AIN-76Vitamin mix (g/kg) : thiamin · HCl 0.6, riboflavin 0.6, pydoxine · HCl 0.7, nicotinic acid 3, D calcium pantothenate 1.6, folic acid 0.2, D biotin 0.02, cyanocobalamin 0.001, retinyl palmitate 0.8, DL α-tocopheryl acetate 20, cholecalciferol 0.00025, menaquinone 0.005.

Table 3. Composition of AIN-76 rodent purified diet

Ingredient (%)	g/kg
Casein	200
DL methionine	3
Corn starch	150
Sucrose	500
Cellulose	50
Corn oil	50
Salt mix ¹	35
Vitamin mix ²	10
Choline bitartrate	2

¹AIN-76 Mineral mix (g/kg): CaHPO₄ 500, NaCl 74, K citrate monohydrate 220, K₂SO₄ 52, MgO, Mn carbohydrate 3.5, Fe citrate 6.0, Zn carbonate 1.6, Cu carbonate 0.3, KIO₃ 0.01, Na₂SeO₄ · H₂O 0.01, CrK(SO₄) · 12H₂O 0.55, Sucrose 118.

² AIN-76 Vitamin Mix (g/kg): thiamin · HCl 0.6, riboflavin 0.6, phydoxine · HCl 0.7, nicotinic acid 3, D calcium pantothenate 1.6, folic acid 0.2, D biotin 0.02, cyanocobalamin 0.001, retinyl palmitate 0.8, DL α-tocopheryl acetate 20, cholecalciferol 0.00025, menaquinone 0.005.

3) 콜레스테롤 정량

혈청 중 총 콜레스테롤 농도와 HDL-cholesterol, 중성지질 농도를 한국동물 임상연구소에서 측정하였다. 총 콜레스테롤, 중성지질, HDL-cholesterol은 생화학 자동분석기(Olympus Au400, Japan)를 이용하여 비색법으로 각각 측정하였다.

제 2 절 수용성 isoflavone의 미세캡슐화에 관한 연구

1. 재료 및 시약

가. Core material과 coating material

본 연구에 사용한 core material인 30%의 수용성 isoflavone은 (주)태평양화학으로부터 제공받아 저온에 보존 사용하였으며, 배당체를 함유한 glycone의 형태를 이용하였다. 그리고, coating material은 (주)일신유화(Seoul, Korea)에서 구입한 fatty acid ester인 PGMS(polyglycerol monostearate)와 MCT(medium chain triglyceride)를 사용하였고, 이들은 모두 식품첨가물 등급이었다.

나. 시약 및 기기

Water-soluble isoflavone의 미세캡슐화 회수율을 측정하기 위하여 사용한 시약과, 표준물질로 사용한 genistin(4',5,7-tri hydroxyisoflavone-7-glucoside)과 daidzin(4'-hydroxyisoflavone -7-glucoside)은 각각 Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo. USA와 (주)Fujicco, Japan으로부터 구입하였다. 또한, 표준물질을 용해시키는데 사용한DMSO(Dimethylsulfoxide)는 Sigma Chemical에서 구입하였다. Water-soluble isoflavone과 표준물질은 HPLC(High performance liquid chromatography, Shimazu, Japan)를 사용하여 Yi 등⁽¹¹⁾의 방법을 수정 보완한 gradient solvent system으로 분석하였다. 분석시 사용된 column은 Waters사(USA)의 μ -Bondapak C18 column(3.9 mm \times 300 mm, 10 μ m)을 사용하였고, UV detector 및 pump gradient system은 Shimazu사(Japan)에서 구입하였다. mobile phase로 사용한methanol(HPLC grade)은 J.T. Baker(USA)에서 구입하였다.

2. 실험방법

가. 미세캡슐의 제조

1) PGMS로 coating한 미세캡슐의 제조

PGMS로 coating한 수용성 isoflavone의 미세캡슐 제조방법은 Figure 2와 같으며 그 내용은 다음과 같다. 수용성 isoflavone을 실온에서 점도가 높은 액상의 PGMS(polyglycerol monostearate)로 미세캡슐화 하기 위하여 우선 PGMS를 각각 5, 10, 15, 20g씩을 취하여 일정량의 증류수와 혼합하고 55℃에서 20분간 정치시킨 후 1,200rpm의 속도로 1분간 교반하여 spray가 가능하게 충분히 녹여주었다. 이 용액에 일정량의 수용성 isoflavone을 혼합하고 1,200rpm에서 1분간 교반한 후 이 혼합액을 W-300 spray gun(Wagner Spray Tech. Co. Markdorf, Germany)으로 0.05%의 Tween-60이 용해된 5℃의 분산액에 분무하고 이 분무액을 24,900×g에서 10분간 원심분리하여 캡슐화 되지 않은 상등액과 캡슐화 된 여액을 분리하고 다시 여액만을 취하여 동량의 Tween-60을 가해 캡슐화 되지 않고 남아있는 수용성 isoflavone을 제거하고 원심분리를 1회 더 실시하여 미세캡슐을 제조하였다⁽¹⁴⁾.

2) MCT로 coating한 미세캡슐의 제조

MCT로 coating한 수용성 isoflavone의 미세캡슐 제조방법은 Figure 3과 같으며 그 내용은 다음과 같다. 액상의 MCT(medium chain triglyceride)와 수용성 isoflavone을 일정 비율로 혼합하여 2,000rpm의 속도로 1분간 교반하였다. 이 혼합액을 W-300 spray gun(Wagner Spray Tech. Co. Markdorf, Germany)으로 0.5%의 Tween-60이 용해된 5℃의 분산액에 분무하고 이 분무액을 4,520×g에서 10분간 원심분리하여 캡슐화된 상층부와 캡슐화 되지 않은 여액으로 분리하고 상층부를 취하여 동량의 Tween-60 분산액을 가해 원심분리를 1회 더 실시하여 캡슐화 되지 않은 수용성 isoflavone을 제거하여 미세캡슐을 제조하였다⁽¹⁴⁾.

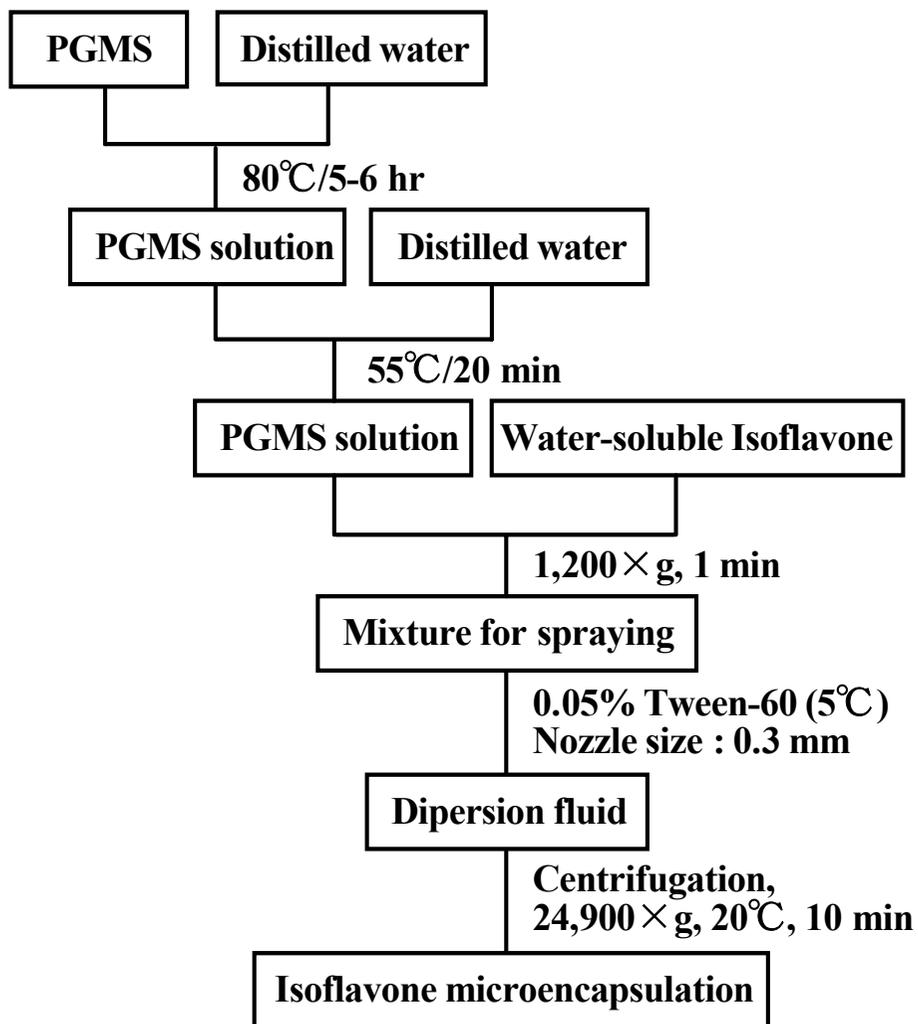


Fig 2. Schematic diagrams of water-soluble isoflavone microencapsulation with polyglycerolmonostearate

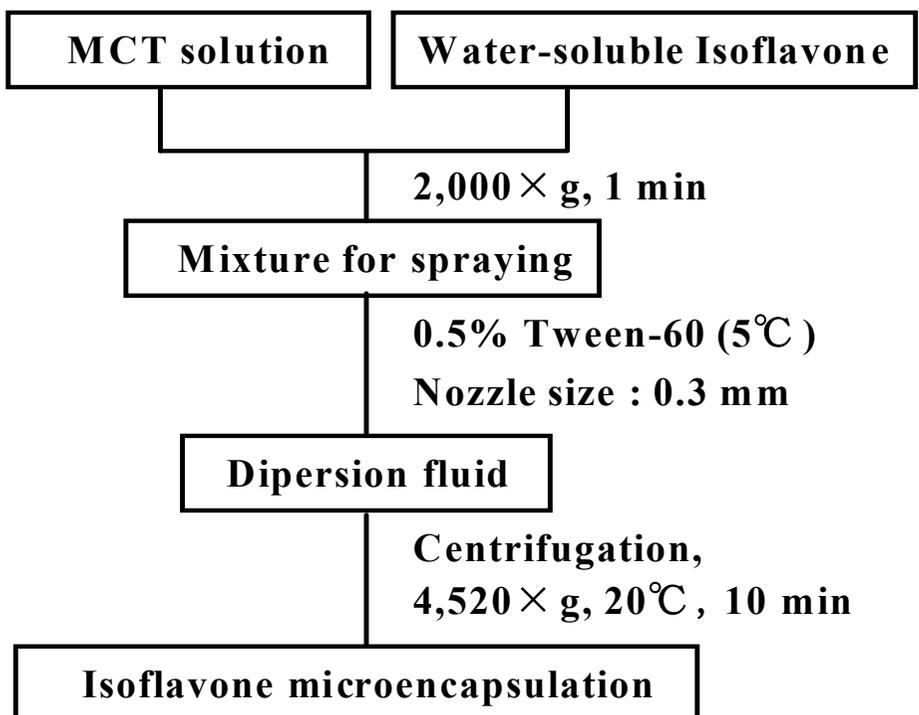


Fig. 3. Schematic diagrams of water-soluble isoflavone microencapsulation with polyglycerine monostearate

나. 수율측정

미세캡슐화 한 수용성 isoflavone의 수율측정은 간접적인 방법에 의하여 수용성 isoflavone을 분무한 분산액에서 미세캡슐 외부용액에 존재하는 수용성 isoflavone의 양을 측정하여 미세캡슐 내부에 존재하는 수용성 isoflavone량을 계산하는 방법을 사용하였으며, 방법은 다음과 같다. 먼저, 원심분리하여 얻은 미세캡슐의 외부용액을 적당량 취하여 HPLC의 시료로 사용하였다. HPLC의 결과, 시료의 각 peak의 area를 표준물질과 비교하여 수용성 isoflavone의 캡슐화 수율을 측정하였다.

다. HPLC 분석

수용성 isoflavone의 HPLC에 의한 분석은 Yi등⁽¹¹⁾의 방법을 수정 보완 gradient solvent system으로 분석하였다. 분석시 사용된 column은 Waters사(U.S.A.)의 μ -Bondapak C18 column, detector는 254nm UV detector(Shimazu, Japan)를 사용하였으며, injection volume은 20 μ l 로 하였다. mobile phase A, B는 20%, 60% methanol 을 사용하였으며, solvent gradient는 시료 주입 후 mobile phase A를 100으로 시작하여 50분까지 mobile phase B가 100으로 직선적으로 상승 시켰으며, 그 후 60분까지 mobile phase A를 100%로 하였으며, 그 후 65분까지 mobile phase A를 100%로 유지하여 detector와 column을 안정화 시켰다. HPLC의 사용조건은 Table 4에 나타냈다.

Table 4. Operating condition of HPLC for analysis of isoflavone from soybean

Instrument	: Waters Co. USA HPLC
Column	: Prontosil Eurobond C18 Column (4.0mm×250mm, 5.0 μ m, Germany)
Detector	: Waters 486 absorbance detector (254nm)
Mobile phase	: A Solvent - 20% Methanol B Solvent - 60% Methanol
Injection volume	: 20 μ l
Flow rate	: 1 ml/min

Gradient table : Waters gradient controller

Time	%A	%B
0	100	0
50	0	100
60	100	0
65	100	0

라. 관능검사

미세캡슐한 수용성 isoflavone을 우유에 일정한 농도별로 첨가하여 일정기간 (1, 3, 5, 8, 12일)동안 저장하면서 나타나는 이미와 이취의 정도, 기호도 등의 관능적 특성변화를 알아보기 위하여 실시하였다. 관능검사 요원은 우유의 맛을 구별할 수 있는 사람들을 선발한 후 일정 기간동안 훈련을 시켜 본 검사에 임하게 하였다. 관능적 특성의 평가는 평점법으로 하였으며 관능검사로 얻은 결과의 분석은 SAS⁽¹⁵⁾를 이용하여 분산분석과 최소유의차 검정으로 통계처리 하였다.

마. 미세캡슐의 안정성

1) 인공위액에서 미세캡슐의 안정성 조사

수용성 isoflavone의 안정성조사는 인공위액의 pH와 incubation 시간에 따른 미세캡슐로부터 수용성 isoflavone의 방출량을 측정하였으며 방법은 다음과 같다. 우선 증류수에 미세캡슐을 첨가하고 4ml의 pepsin용액(pH 1.2, 1mg/ml)을 첨가한 후, 1N HCl로 각각 다른 pHs 2, 3, 4, 5으로 맞춘다. 위의 용액을 각각 37°C 항온수조에서 각 시간별로(0, 20, 40, 60분) incubation⁽¹⁵⁾하면서 용액에 방출된 수용성 isoflavone을 HPLC에 의해 정량한다.

2) 인공소장에서 미세캡슐의 안정성 조사

인공위액으로 각각 다른 pH와 시간별로incubation 된 용액에 0.02M cholic acid, 0.02M deoxycholic acid(bile salt), 5mg lipase를 첨가하고 pancreatin 용액(1mg/ml phosphate buffer, pH 7.4)을 첨가한다. 이 용액을 1N HCl과 NaOH로 pH를 6, 7, 8로 조정한 후 37°C에서 각 시간(0, 20, 40, 60분)별로 incubation⁽¹⁵⁾하면서 수용성 isoflavone을 HPLC에 의해 정량한다.

바. 이소플라본의 혈중 콜레스테롤 저하 기능을 위한 동물실험

1) 실험동물 및 사육환경

본 실험에서 사용한 실험동물은 3주령 Sprague-Dawley(SD) 랫트(12마리)를 중앙동물실험연구서에서 구입하여 일주일간 일반사료를 먹이며, 적응기간을 가지게 하였다. 사육환경은 항온 $21 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 항습 $50 \pm 10\%$ 를 유지하였으며, 명암은 12시간 주기로 되어지는 사육장치에서 조절되었고, 각각 한 마리씩 스테인레스 망 사육상자에 배치하여 사육하였다.

2) Sprague-Dawley 사료

콜레스테롤 수치의 증가를 위해 7주 동안 high-cholesterol-high fat diet를 먹이고, 콜레스테롤 수치가 증가된 후, 6주 동안 fat free diet를 섭취시켰다. 12마리중 6마리는 fat free diet 와 함께 일일 일회 콜레스테롤이 제거된 우유 1ml에 이소플라본 10mg을 각각 섭취시켰다. 그리고 나머지 6마리는 일일 일회 시유 1ml만 섭취시켰고, 음수는 상수도수를 자유섭취 시켰다.

Table 5. Composition of 40% beef tallow modified AIN-76A purified rodent diet with 5% cholesterol and 0.5% cholic acid

Ingredient	g/kg
Casein, high nitrogen	200
Corn starch	150
Beef tallow	400
Sucrose	95
Cholesterol	50
Cellulose	50
Mineral mix ¹	35
Vitamin mix ²	10
Cholic acid	5
DL methionine	3
Choline bitartrate	2

¹AIN-76Mineral mix (g/kg) : CaHPO₄ 500, NaCl 74, K citrate monohydrate 220, K₂SO₄ 52, MgO, Mn carbohydrate 3.5, Fe citrate 6.0, Zn carbonate 1.6, Cu carbonate 0.3, KIO₃ 0.01, Na₂SeO₄ · H₂O0.01, CrK(SO₄) · 12H₂O0.55, Sucrose 118.

²AIN-76Vitamin mix (g/kg) : thiamin · HCl 0.6,riboflavin 0.6, phydoxine · HCl 0.7, nicotinic acid 3, D calcium pantothenate 1.6, folic acid 0.2, D biotin 0.02,cyanocobalamin 0.001, retinyl palmitate 0.8, DL α-tocopheryl acetate 20, cholecalciferol 0.00025, menaquinone 0.005.

Table 6. Composition of fat free AIN-76A

Ingredient (%)	g/kg
Casein	200
DL methionine	3
Corn starch	150
Sucrose	550
Cellulose	50
Salt mix ¹	35
Vitamin mix ²	10
Choline bitartrate	2

¹AIN-76 Mineral mix (g/kg): CaHPO₄ 500, NaCl 74, K citrate monohydrate 220, K₂SO₄ 52, MgO, Mn carbohydrate 3.5, Fe citrate 6.0, Zn carbonate 1.6, Cu carbonate 0.3, KIO₃ 0.01, Na₂SeO₄ · H₂O 0.01, CrK(SO₄) · 12H₂O 0.55, Sucrose 118.

² AIN-76 Vitamin Mix (g/kg): thiamin · HCl 0.6, riboflavin 0.6, phydoxine · HCl 0.7, nicotinic acid 3, D calcium pantothenate 1.6, folic acid 0.2, D biotin 0.02, cyanocobalamin 0.001, retinyl palmitate 0.8, DL α-tocopheryl acetate 20, cholecalciferol 0.00025, menaquinone 0.005.

제 3 절 Phytosterol을 첨가한 혈중 콜레스테롤 저하 Cheddar cheese의 연구

1. 재료 및 시약

가. 에스테르화

혈중 콜레스테롤 저하 물질인 physterol 90% (soybean source)를 사용하였으며 β -sitosterol 40%, campesterol 20% stigmasterol 10% 함유되어 있다. 에스테르화를 위해 oleic acid 이용하며 Shinyo Pure Chemical. Co. LTD에서 구입하였다. 1,3-dicyclohexylcarbodiimide 99%, 4-pimrthylaminopyridine 99%, dichloromethane 는 Sigma Chemical Co. (St Louis, Mo USA)에서 구입하였다.

나. Butter and Cheddar cheese

Butter와 cheese 제조를 위해 필요한 원유는 (주) 빙그레에서 구입하였으며, cheese 균주는 동결건조 된 mesophilic lactic starter culture (R-703, Chr. Hansen's Lab., Denmark)와 응고를 위해 rennet (Standard Plus 900, Chr. Hansen's Lab., Denmark)을 사용하였다.

다. 콜레스테롤 제거

우유 중의 콜레스테롤 제거를 위해 사용된 흡착제는 β -cyclodextrin(β -CD)(일본 식품화학주식회사, Japan)을 사용하였다.

2. 실험방법

가. 우유의 처리

시료의 제조를 위해 원유를 다음과 같이 처리하였다. 원유의 10% β -CD를 첨가 한 후 교반속도 1200rpm, 교반온도 40℃, 교반시간 10분 동안 처리하여 cholesterol 제거 후 166 x g의 속도로 원심 분리한다. Cheesse 제조 시 β -CD를

첨가하여 cholesterol 제거 후 skim milk와 혼합하여 1,000psi 압력으로 균질한다
(5, 16, 3)

나. Butter의 제조

유지방이 3.6%인 원유를 크림 분리하여 36%로 하였다. 크림은 10% β-CD처리
리를 하여 콜레스테롤을 제거하였다. 65℃에서 30분간 살균한 후 8~10℃로 냉각
시켰다. 버터 churn의 넣고 일정속도로 churning을 하였다. 버터입자가 생성되면
churning을 멈추고 버터밀크를 배출시킨 후 냉각수로 2회 세척하였다. 버터입자
를 모아서 버터 속의 수분이 완전히 빠지도록 짓이기는 작업을 하면서 버터의
2% 로 가염을 하였으며 에스테르화시킨 phytosterol을 2, 4, 6, 8%비율로 첨가하
였다. 버터를 틀에 넣어 모양을 만든 후 4℃에서 보관하였다⁽¹⁷⁾.

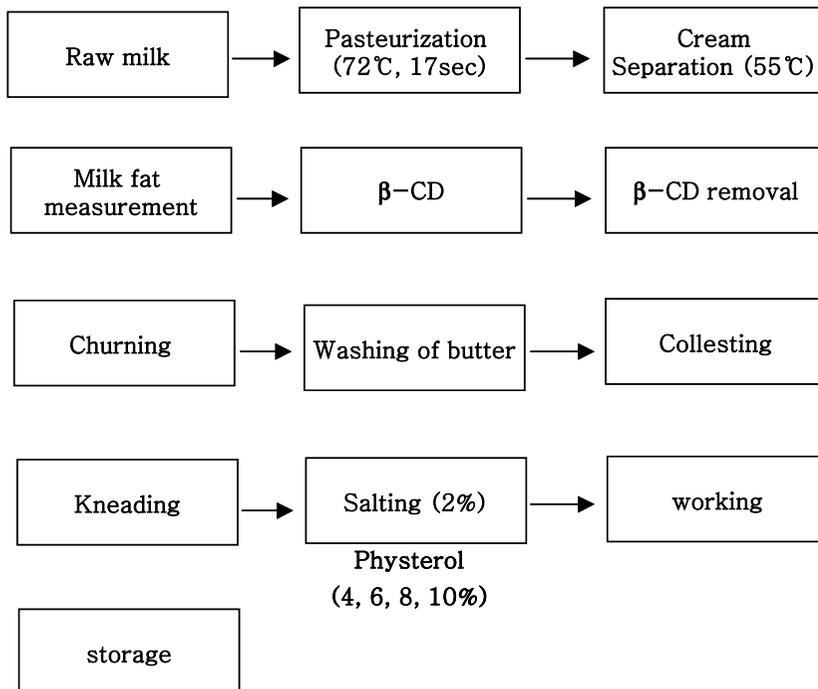


Fig 4. Schematic diagrams of Butter

다. Cheddar cheese의 제조

원유를 크림 분리하여 10%의 β -CD를 넣어 콜레스테롤을 제거한 후 skim milk와 1,000psi 압력으로 균질하였다. 이 원유를 치즈 vat에 넣고 온도가 32°C 유지되었을 때 starter culture를 첨가(원유의 0.004%)하여 고루 저어주며 30분간 방치하였다. 10% CaCl₂ (0.03%)와 rennet 0.019%를 첨가한 후 40~50분간 방치하였다. 절단에 알맞은 커드가 형성되면 절단한 후 15분간 커드가 뭉치지 않도록 서서히 교반한 후 커드 가운을 위해 30 분동안 일정한 온도간격으로 38°C까지 올렸다. 적정산도가 0.15% ~ 0.17% 이 되면 whey 방출하였다. 커드는 치즈 vat 양옆으로 모아서 쌓는다. 15분간격으로 cheddaring하여 산도가 0.5%가 될 때까지 반복하였다. 이 작업이 끝나면 커드를 분쇄한 후 커드량의 2.0%로 가염을 하며 에스테르화시킨 phytosterol을 4%, 6%, 8%, 10% 비율로 첨가하였다. 2.5kg/cm² 으로 overnight 하였다. 그 후 일정한 크기로 잘라 진공 포장하여 7°C에서 보관하였다^(5, 16, 18).

라. 유지방 정량

원유와 크림의 유지방 함량은 거버(Gerger)방법⁽¹⁹⁾으로 측정하였다. 90% 황산 10ml을 유지계(butyrometer)에 넣고 크림 10ml와 isoamylalcohol 1ml를 첨가하였다. 고무마개로 유지계를 막고 작은 입자들이 모두 용해 될 때까지 잘 섞은 후 60°C water bath에 15분간 정치한다. 1,100rpm의 속도로 5분간 원심분리 한 후 60°C water bath에 5분간 정치 후 분리된 지방을 디바이더를 이용하여 측정하였다.

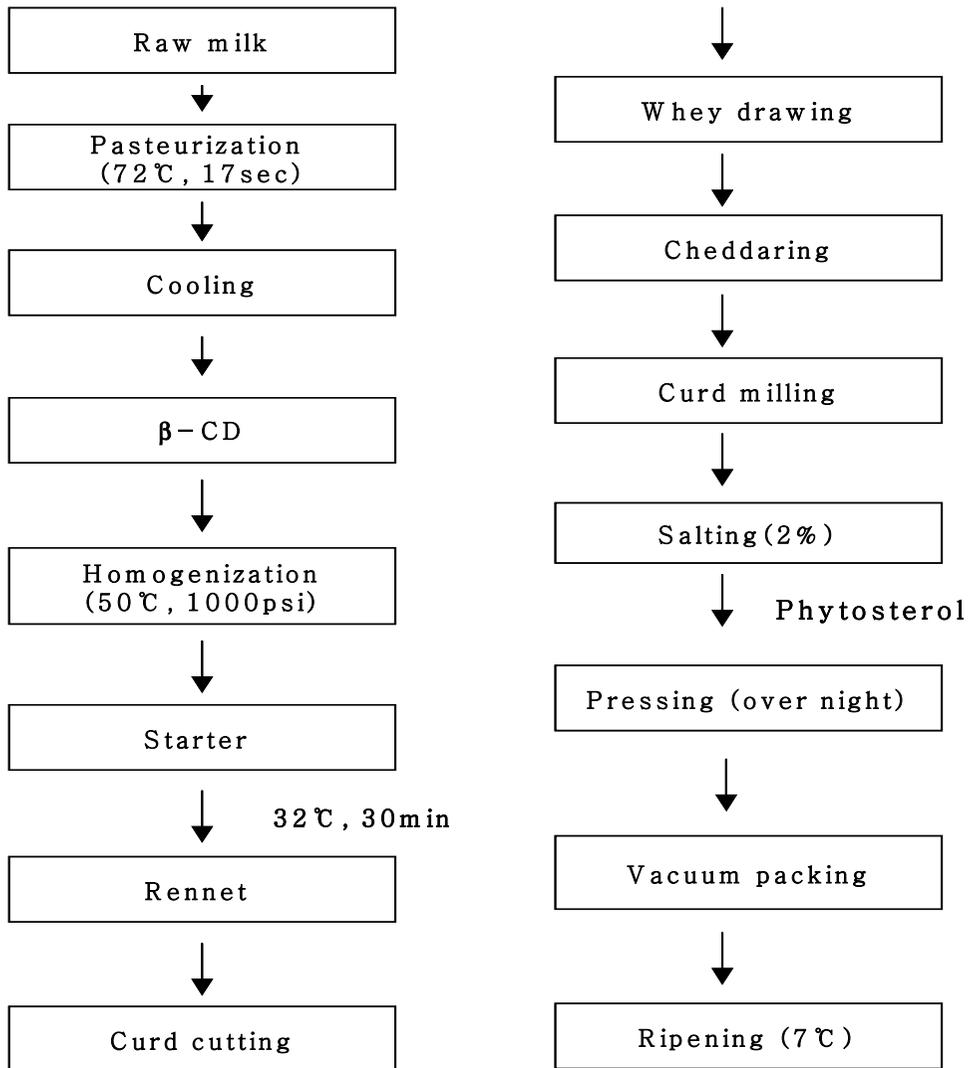


Fig 5. Schematic diagrams of Cheddar cheese manufacturing

마. 일반성분 분석

일반성분 분석으로는 수분, 회분, 조단백질(Kjeldahl 방법), 조지방(Soxhlet's 방법) 이 있으며 이는 AOAC 방법⁽²⁰⁾에 따랐다.

바. 산가(acid value)

버터를 3g을 200ml 삼각플라스크에 취하여 ether ethanol 혼합용액 20~40ml 을 가하여 완전히 녹였다. 여기에 1%-phenolphthalein 용액 2~3방울을 가하고 0.1N-KOH ethanol 용액으로 신속히 적정하였다. 용액이 미홍색으로 3초 간 지속될 때를 종말점으로 하였다⁽²¹⁾.

$$\text{산가} = \frac{(V_1 - V_0) \times 5.611 \times F}{S}$$

V1 : 본 시험의 0.1N-KOH 용액의 적정 소비량(ml)

V0 : 공 시험의 0.1N-KOH 용액의 적정 소비량(ml)

F : 0.1N-KOH 용액의 역가

S : 시료 채취량(g)

사. 과산화 물가(peroxide value)

시료 0.5~1.0g을 200ml 마개가 있는 삼각플라스크에 취하여 chloroform 10ml를 가하여 녹였다. 용액이 완전히 투명한 상태가 되면 빙초산 15ml를 가하여 혼합 후 KI포화용액 1ml를 가하여 마개를 하고 1분간 심하게 진탕한 후 5분 간 어두운 곳에 방치하였다. 여기에 물 75ml를 가하여 마개를 다시 하고 진탕한 후 1% 전분용액을 지시약으로 하여 0.01N-Na₂S₂O₃용액으로 적정하였다. 용액의 청남색이 완전히 무색으로 될 때를 종말점으로 하였다⁽²¹⁾.

$$\text{과산화물가} = \frac{(V_1 - V_0) \times 0.01 \times F}{S} \times 100$$

V1 : 본 시험의 0.01N-Na₂S₂O₃용액의 적정 소비량(ml)

V0 : 공 시험의 0.01N-Na₂S₂O₃용액의 적정 소비량(ml)

F : 0.01N-Na₂S₂O₃용액의 역가

S : 시료 채취량(g)

아. Thiobarbetic acid (TBA)

TBA는 malonaldehyde양을 측정^(20, 22)한 수치로 malonaldehyde는 산패취를 발생하는 반응의 부산물로 생성되며, 지방의 초기 산화단계에서 산화 정도를 측정하는 중요한 물질이다. 치즈 1g을 정량하여 glass centrifuge tube에 넣고 9ml의 15%(w/v) TCA, 0.375%(wt/vol) 4, 6-dihydroxypyrimidine-2-thiol, 그리고 0.25N HCl을 가하여 잘 혼합한 후 15분 동안 water bath에서 boiling 하였다. 반응액을 즉시 실온(20°C)으로 냉각한 후 7,000 x g 에서 15분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 투명한 pink-yellow color 상층액을 얻어 535nm에서 흡광도를 측정하였다.

자. Cholesterol 정량분석

1) GC정량을 위한 시료

Butter와 Cheddar cheese 1g을 screw cap tube에 넣고 1ml 내부표준물질(5 α -cholestane 1mg/ml 99.8% ethanol)과 5ml 2M ethanolic potassium hydroxide 용액을 첨가⁽³⁾ 한 후 잘 혼합하였다. 65°C에서 30분동안 항온수조에 검화⁽²³⁾ 한 후 실온에서 냉각시켰다. 그리고 5ml hexane과 5 ml의 distilled water을 첨가하여 cholesterol을 추출하였으며 이를 4회 반복하였다. 추출액을 둥근플라스크에 넣고 40°C에서 감압 농축기로 농축시킨 후 1ml hexane에 녹여 microtube에 보관하였다⁽²⁴⁾.

2) GC에 의한 정량 방법

분리한 추출액 1 μ l를 다음의 조건에서 GC에 injection 하여 cholesterol의 정량분석을 실시하였다. 분석에 사용된 GC는 Hewlett-Packard Model 5890 Series(Hewlett-Packard CO., Palo Alto, Ca, USA) split injector와 FID(flame ionized detector)가 장착되어 있으며, column은 30m \times 0.32mm I.D. \times 0.25 μ m film thickness 인 cross-linked 5% phenyl methyl silicone fused silica capillary(HP-5)을 사용하였다. Carrier gas로 N₂를 2ml/min 사용하였으며, air는 300ml/min, H₂는 30ml/min 그리고 auxiliary gas는 N₂를 28ml/min 주입하였다.

시료의 split ratio는 1 : 50으로 조절하였으며 모든 기체의 유량은 35℃에서 측정하였다. 주입구의 온도는 270℃, 검출기의 온도는 300℃로 설정하였다. 칼럼은 최초 200℃에서 1분간 머무른 후 분당 10℃씩 상승시켜 300℃로 올린 후 20분간 유지 gdkut다. Cholesterol과 cholestane은 머무름 시간에 따라서 구분되며, 각각의 피크면적에 의해 정량분석 하였다.

차. Short-chain free fatty acids (SFFAs)

SFFAs 를 정량 분석하기 위하여 Deeth 등⁽²⁵⁾의 방법을 사용하였으며, 이때 GC조건은 Table 7 과 같다. 정량분석을 상세히 설명하면 다음과 같다. 불활성 alumina 19.2g을 증류수 0.8ml에 넣고 유리막대로 저어 2시간 방치한다. 치즈 1g을 test tube에 넣고 ethly ether 5ml, 4N H2SO4 0.1ml, sodium sulfat 2.5g을 차례로 넣어 vortex mixing 후 2시간 방치하였다. 이 용액에 hexane 5ml을 혼합하여 vortex mixer하여 200 x g 에서 5분간 원심분리 하였다. Small glass chromatography column에 glass wool을 넣고 불활성 alumina 1g을 넣었다. 위에서 만들어진 용액을 small glass chromatography column (ID : 5mm, length : 15cm) 에 흘려주었다. hexane-diethyl ether(1:1 v/v) 5ml을 부어 이 과정을 2회 반복하였다. Alumina를 말린 후 10ml test tube에 옮긴 후 6% formic acid와 diisoprophy ether 1ml을 첨가하였다. 실온에서 2,000 x g로 5분간 원심분리 하여 micro reaction vessel 에 포집하였으며, 이를 시험용액으로 하여 GC로 분석하였다.

Table 7. Instrument and working condition for dissociation of free fatty acids in cheese by gas chromatography

Instrument	HP Model 5890 series II (Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA, USA)
Column	HP-5 15m× 0.53mm i.d. Nukol fuesdsilica capillary column (Supleco Inc., Bellefonte, PA)
Carrier gas	Helium 37ml/min Hydrogen gas 37ml/min, Air gas 300ml/min
Oven temp.	5min/50℃→110℃ 10min/110℃→10min/250℃
Injector temp.	250℃
Detector temp.	250℃
Detector	FID

카. Neutral volatile compounds

에스테르화 시킨 phytosterol을 첨가한 Cheddar cheese의 neutral volatile compounds를 측정하기 위하여 Bassette and Ward의 방법⁽²⁶⁾을 사용하였으며 GC조건은 Table 8에서와 같다. 정량분석방법을 설명하면 다음과 같다. Cheese 30g과 3차증류수 30ml에 혼합하여 총 고형분이 30%가 되도록 액화시켰다. 50ml을 Kemmer-Hallet type micro-kjeldahl distillation unit에 넣고 증류시켜 5ml을 수집하였다. 이때 사용할 시료로 물이 끓기 시작해서 2분 30초 후에 나온 것을 5ml 수집하였다. 2ml을 space vial(10ml)에 취하여 Na₂SO₄ 0.5g을 첨가한 후 teflon 마개로 밀봉하였다. 60℃ water bath에 2분간 정치한 후 2분간 vortex mixer로 혼합하였다. 다시 60℃ water bath에 8분간 정치하고 headspace gas 1ml을 취하여 GC로 분석하였다.

Table 8. Instrument and working condition for dissociation of neutral volatile compounds in cheese by gas chromatography

Instrument	HP Model 5890 series II (Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA, USA)
Column	HP-5 Supelcowax™ 10, 30m × 0.32 mm i.d. Bellefonte, PA
Carrier gas	N ₂ 1.2ml/min Hydrogen gas 30ml/min, Air gas 300ml/min
Oven temp.	32°C → 15°C/min, 140°C (30min)
Injector temp.	230°C
Detector temp.	230°C
Detector	FID

타. 아미노산 측정 (Free Amino acids)

Cheese의 쓴맛을 내는 유리아미노산을 측정⁽²⁷⁾하기 위해 cheese 5g과 증류수 5ml을 혼합한 용액에 1g의 sulphosalicylic acid를 첨가한 후 4°C에서 1시간 방치하였다. 이를 4000rpm에서 15분간 원심분리하고 그 상정액을 0.45 μ m 여과지로 여과한 후 시료로 사용하였다. 유리아미노산 분석은 다음 의 Table 9 과 같이 Lindroth와 Mopper의 OPA-percolum reaction 방법으로 전처리 한 후 HPLC를 사용하여 분석하였다. 이동상으로 A용액(0.05M sodium acetate, pH 6.3)과 B용액(Methanol : Tetrahydrofuran = 9:1 v/v)을 사용하여 최초에는 B용액을 20%, 6분까지 40%로 증가시킨 후 15분까지 42%로, 18분까지 50%로, 30분까지 70%로 증가시켰다. 시료의 주입량은 10 μ l였으며, 디오상의 속도는 2.0ml/min, column은 ODS- μ -Bondapak C18 (3.9mm × 30cm)를 사용하였고, 형광검출기 (Shimazu, FLD-6A, Japan)를 사용하였으며, 표준 아미노산은 Pierce H-type (2.5 μ mol/ml)을 사용하였다.

Table 9. Operating condition of HPLC for free amino acids analysis in Cheddar cheese

Instrument : Waters co. USA HPLC

Column : μ -Bondapak C18 column (3.9m × 300mm, 10 μ m, Waters Associates)

Detector : Waters 486 absorbance detector (254nm)

Mobile phase : A solvent - 0.05M sodium acetate, pH 6.3

B solvent - Methanol : Tetrahydrofuran = 9:1, v/v)

Injection volumn : 20 μ l

Flow rate : 1 ml/min

Gradient table : Shimazu 680 gradient controller

Time	%A	%B
0	80	20
6	60	40
15	58	42
18	50	50
30	30	70

과. Rheological

Cheese의 크기를 2cm 지름 × 2cm 높이로 준비하였다. SUN Rheometer(CR-200D, Sun Scientifis Co., LTD., Tokyo, Japan)을 사용하여 hardness, elasticity, cohesiveness, gumminess, chewiness를 측정하였다^(5, 16). 측정 조건은 cresshead 50mm/min, chart speed 200mm/min 이었다. hardness(경도)는 first bite의 가장 높은 피크의 높이를 force로 환산하였다. elasticity(탄력성)은 첫 번째 피크의 시발점에서 가장 높은 점까지의 거리와 두 번째 피크의 시발점에서 가장 높은 점까지의 거리의 비로 나타내었다. cohesiveness(응집성)은 두 번째 피크의 면적을 첫 번째 피크의 면적으로 나눈 값으로 표시하였다. gumminess(고무질성)은 hardness × cohesiveness, chewiness(저작성)은 gumminess × elasticity 으로 나타내었다.

하. 관능검사

버터와 치즈에 에스테르화 시킨 phytosterol을 첨가하여 버터는 4℃에서 보관하였으며 Cheddar cheese는 7℃에서 8주간 숙성하였다. 이 때 버터와 Cheddar cheese의 이미(off-taste), 이취(off-flavor), color, texture 등 관능적 특성을 5점 법으로 평가하였다. 관능적 특성의 강도 평가는 대단히 강하다(5점), 강하다(4점), 보통(3점), 약하다(2점), 대단히 약하다(1점)로 하였다. 관능검사로 얻은 결과의 분석은 SAS를 이용하여 분산분석(ANOVA)과 최소 유의차 검정으로 통계처리 하였다^(28, 29).

제 4 절 달맞이꽃 종자유를 첨가한 혈중 콜레스테롤 저하 기능성 요구르트의 연구

1. 재료 및 시약

가. 달맞이꽃 종자유

본 실험을 위해 혈중콜레스테롤 저하물질인 달맞이꽃 종자유(evening primrose oil : EPO)를 (주)일동제약에서 제공받아 사용하였고, yogurt 제조를 위해 필요한 원유는 (주)빙그레에서 제공받았으며, yogurt균주는 동결 건조된 *Streptococcus thermophilus*와 *Lactobacillus bulgaricus*(CH-1, Chr. Hansen's Lab, Denmark)혼합균주를 사용하였다.

나. 시약

우유 중의 콜레스테롤 제거를 위해 흡착제인 β -cyclodextrin(β -CD)(Nihon Shokuhin Kaku Co. Ltd. Japan)을 사용하였다. 유지방 정량을 위해 사용한 isoamyl alcohol과 H_2SO_4 는 Yakuri Pure Chemicals Co., Ltd(Osaka, Japan)을 사용하였으며, 검량선(Standard curve)을 작성하기 위하여 순도 99%정도의 cholesterol과 5 α -cholestane을 sigma(St. Louis, MO. USA)에서 구입하였다.

2. 실험방법

가. 유지방 정량

원유의 유지방 함량은 거버(Gerger)방법으로 측정하였으며⁽¹⁹⁾, 이 실험방법은 다음과 같다. 90% 황산 10mℓ을 유지계(butyrometer)에 넣고 우유 10mℓ와 isoamylalcohol 1mℓ를 첨가하였으며 고무마개로 유지계를 막고 작은 입자들이 모두 용해 될 때까지 잘 섞은 후 60℃ water bath에 15분간 정치하였다. 1,100rpm의 속도로 5분간 원심 분리 한 후 60℃ water bath에 5분간 정치 후 분리된 지방을 디바이더를 이용하여 측정하였다.

나. 우유의 콜레스테롤 제거

콜레스테롤을 흡착하기 위하여 β -CD 1%를 우유에 첨가하고 교반속도 800rpm, 교반온도 20°C, 교반시간 10분으로 조건을 맞추어 stirring하였다. 콜레스테롤이 흡착된 β -CD를 우유로부터 분리하기 위하여 10°C에서 1500rpm의 속도로 10분간 원심분리 하였다⁽³⁾.

다. 달맞이꽃 종자유를 첨가한 요구르트의 제조

시료의 제조를 위해 균질유에 1% β -CD를 넣어 콜레스테롤을 제거한 후 50°C에서 EPO를 2, 4, 6, 8, 10% 비율로 첨가하여 1,000psi압력으로 균질 하였다. 이를 40°C에서 skim milk 3.7% 와 starter culture 0.02%를 첨가한 후 incubator에 넣어 43°C에서 6시간 동안 발효시킨 후 10°C에서 하루 동안 안정화 하였다. 그 후 4°C에서 저장하였으며⁽³⁰⁾, 제조방법은 Fig. 6과 같다.

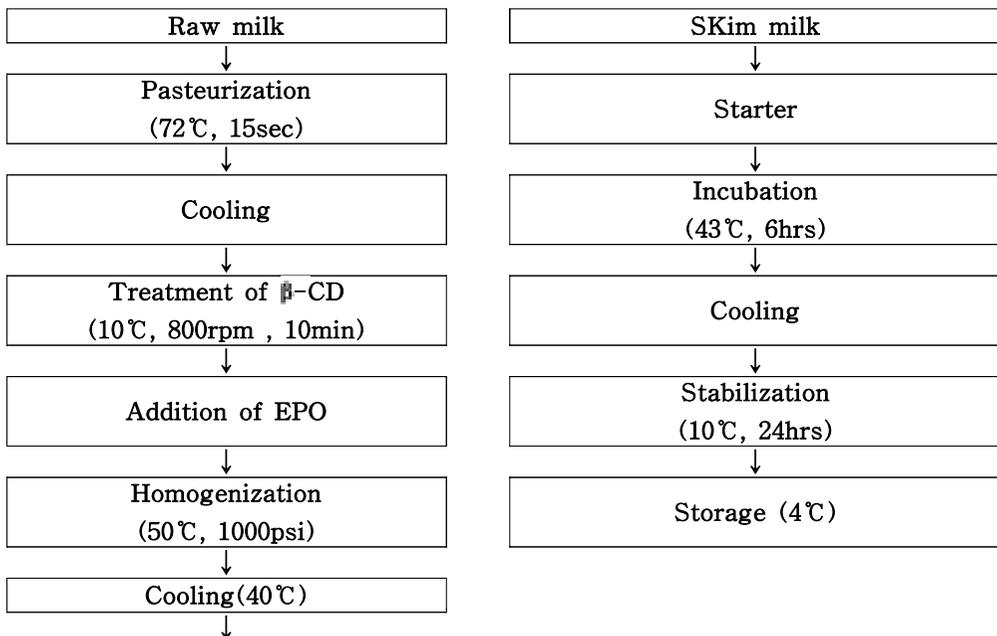


Fig 6. Schematic diagrams of yogurt treated with β -CD and added evening primrose oil

라. 산도 및 pH 측정

산도는 시료 9g과 증류수 18ml를 잘 혼합한 후 phenolphthalein 용액 0.5ml을 첨가하여 잘 혼합하고 0.1N NaOH로 적정하였다. 적정에 사용한 NaOH의 양을 유산%함량으로 나타내었고(1ml 0.1N NaOH = 0.009g lactic acid)⁽³¹⁾, pH는 pH meter(Sartorius, Germany)를 이용하여 측정하였다⁽²⁰⁾.

마. 지방산화도 측정

지방산화도(thiobarbituric acid value : TBA)가는 malonaldehyde양을 측정할 수치^(20, 22)로 malonaldehyde는 산패취를 발생하는 반응의 부산물로 생성되며, 지방의 초기 산화단계에서 산화 정도를 측정하는 중요한 물질이다⁽³²⁾. 요구르트 1ml를 정량하여 glass centrifuge tube에 넣고 9ml의 15%(w/v) TCA, 0.375%(wt/vol) 4,6-dihydroxypyrimidine-2-thiol, 그리고 0.25N HCl을 가하여 잘 혼합한 후 15분 동안 water bath에서 boiling 하였다. 반응액을 즉시 실온(20℃)으로 냉각한 후 7,000×g에서 15분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 투명한 pink-yellow color상층액을 얻어 535nm에서 흡광도를 측정하였다⁽³³⁾.

바. Cholesterol 정량분석

1) GC정량을 위한 시료

Yogurt 1g을 screw cap tube에 넣고 1ml내부표준물질(5 α -cholestane 1mg/ml 99.8% ethanol)과 5ml 2M ethanolic potassium hydroxide 용액을 첨가⁽³⁰⁾한 후 잘 혼합하였다. 65℃에서 30분 동안 water bath에서 검화⁽²³⁾한 후 실온에서 냉각시켰다. 그리고 5ml hexane과 5ml의 distilled water을 첨가하여 cholesterol을 추출하였으며 이를 4회 반복하였다. 추출액을 둥근플라스크에 넣고 40℃에서 감압농축기로 농축시킨 후 1ml hexane에 녹여 microtube에 보관하였다⁽²⁴⁾.

2) GC에 의한 정량 방법

분리한 추출액 1 μ l를 다음의 조건에서 GC에 injection하여 cholesterol의 정량분석을 실시하였다, 분석에 사용된 GC는 Donam Instruments, INC, Seoul, Korea로서 split injector와 FID(flame ionized detector)가 장착되어 있으며, column은

30m×0.32mm I.D.×0.25 μ m film thickness인 cross-linked 5%phenyl methyl silicone fused silica capillary(HP-5)을 사용하였다. Carrier gas로 N₂를 2ml/min사용하였으며, air는 300ml/min, H₂는 30ml/min 그리고 auxiliary gas는 N₂를 28ml/min 주입하였다. 시료의 split ratio는 1: 50으로 조절하였고 모든 기체의 유량은 35℃에서 측정하였으며, 주입구의 온도는 270℃, 검출기의 온도는 300℃로 설정하였다. 칼럼은 최초 200℃에서 1분간 머무른 후 분당 10℃씩 상승시켜 300℃로 올린 후 20분간 유지하였다. Cholesterol과 cholestane은 머무름 시간에 따라서 구분되며. 각각의 피크면적에 의해 정량분석 하였다.

**Table 10. Instrument and working conditions of cholesterol analysis
by gas chromatography for milk treated with β -cyclodextrin**

Instrument	Donam Instruments, INC, Seoul, Kor.
	HP-5
Column	30m×0.32mm×0.25 μ m i.d. cross-linked 5% phenylmethylsilicone fused silica capillary column
Carrier gas	N ₂ (2ml/min)
Oven temperature	Hydrogen gas 30ml/min, Air gas 300ml/min 200℃/11min→300℃/20min
Injector temperature	270℃
Detector Temperature	300℃
Detector	FID

사. 유산균 수의 측정

저장기간 동안 *Lactobacillus bulgaricus* and *streptococcus thermophilus* 혼합균주의 측정을 위해 BCP plate count agar를 증류수와 혼합하여 가열 후 autoclave에 넣어 121℃에서 15분간 멸균시켰다. 희석시킨 요구르트를 petri dish에 1ml를 넣은 후 40℃의 agar를 부어 균일하게 퍼지도록 하였다. 1시간 후 incubator에 넣어 36℃에서 72시간 배양시킨 후 균을 counting하였다⁽³⁴⁾.

아. 점도 측정

점성은 Bostwick consistometer(CSC scientific company, INC.)를 사용하여 측정하였다. 100g의 시료가 1분간 이동한 거리(cm)를 측정하여 점성의 지표로 하였다.

자. 지방산 정량분석

지방산을 정량 분석하기 위하여 Deeth 등⁽²⁶⁾의 방법을 이용하였으며, 사용한 정량 분석을 상세히 설명하면 다음과 같다. Alumina 19.2g에 증류수 0.8ml를 넣고 유리막대로 저어준 후 2시간 동안 방치하여 불활성화 시켰다. 요구르트 1ml를 test tube에 넣고 ethyl ether 5ml, 4N H₂SO₄ 0.1ml, sodium sulfate 2.5g을 차례로 넣어 vortex mixing 후 2시간 방치하였다. 이 용액에 hexane 5ml을 혼합하여 vortex mixer로 혼합한 후 200×g으로 5분간 원심분리 하였다. Small glass chromatography column에 glass wool을 넣고 불활성 alumina 1g을 넣었다. 위에서 만들어진 용액을 small glass chromatography column(ID : 5mm, length : 15cm)에 흘려주었다. Hexane-diethyl ether(1:1 v/v) 5ml을 넣어 이 과정을 2회 반복하였다. Alumina를 말린 후 10ml test tube에 옮긴 후 6% formic acid와 diisopropyl ether 1ml을 첨가하였다. 실온에서 200×g로 5분간 원심분리 하여 microreaction vessel에 포집하였으며, 이를 시험용액으로 하여 GC로 분석하였다. Gas chromatography(GC)의 조건은 Table 11에서와 같이 실험하였다.

Table 11. Instrument and working condition for quantitation of free fatty acids in yogurt by gas chromatography

Instrument	Donam Instruments, INC, Seoul, Kor.
Column	HP-5 15m×0.53mm i.d. Nukol fused silica capillary column(Supleco Inc., Bellefonte, PA, USA)
Carrier gas	Helium : 37ml/min Hydrogen gas 37ml/min, Air gas 300ml/min
Oven temp.	3min/130℃ 9min/130℃→53min/220℃
Injector temp.	250℃
Detector temp.	250℃
Detector	FID

차. 관능검사

콜레스테롤을 제거하여 달맞이꽃 종자유를 2, 4, 6, 8, 10% 비율로 첨가한 요구르트를 4℃에서 15일 동안 저장하면서 3일 간격으로 yogurt flavor, off-flavor, yogurt taste, off-taste, rancid, bitter, viscosity, overall preference 등 관능적 특성을 측정하기 위해 관능검사를 실시하였다. 관능검사요원은 훈련된 관능검사요원 10명을 선발하여 검사에 임하였다. 관능적 특성의 강도 평가는 5점법으로 하였으며 관능검사에서 얻어진 결과는 SAS program을 이용하여 분산분석(ANOVA) 및 Duncan의 다 범위 검정과 최소유의차 검정으로 통계 처리하였다^(28, 29).

카. 혈중 콜레스테롤 저하 기능을 위한 동물 실험

1) 실험동물 및 사육 환경

본 실험에서 사용한 실험동물은 4주령의 Sprague-Dawley (SD) rat(12마리)를 중앙동물실험연구소에서 구입하여 일주일간 일반사료를 먹이며 적응기간을 거치는 동안 체중이 전체적으로 평균에 가까울 때 실험에 임하였다. 사육환경은 항온 21±3℃, 항습 50±10%를 유지하였으며 명암은 12시간 주기로 조명되는 동물 환경제어

사육장치에서 각각 한 마리씩 스테인레스 망사육상자에 배치하여 사육하였다.

2) Sprague-Dawley의 사료

콜레스테롤 수치가 증가한 8주 동안 모든 rat에 casein, nitrogen, corn starch, beef tallow, sucrose, cholesterol, cellulose, mineral mix, vitamin mix, cholic acid, DL-methionine, choline bitartrate가 포함되어 있는 high cholesterol-high fat diet (중앙동물실험연구소)를 동물에 먹이고 콜레스테롤 수치가 증가한 이후에는 8주 동안 casein, corn starch, sucrose, cellulose, salt mix, vitamin mix, DL-methionine, choline bitartrate가 포함된 rodent purified diet를 모두 먹이고 그중 6마리는 일일 일회 일반적인 요구르트 2ml를 혼합하여 섭취시켰고, 나머지 실험군 6마리는 일일 일회 10% EPO-CD처리하여 10%의 EPO를 첨가한 요구르트 2ml를 혼합하여 섭취시켰으며, 사료의 성분은 Tables 12, 13에 표기하였다. 그리고 음수는 상수도수를 자유 섭취시켰다.

3) 콜레스테롤 정량

혈청 중 총 콜레스테롤 농도와 HDL-콜레스테롤, 중성지질 농도를 한국 동물 임상 연구소에서 측정하였다. 총 콜레스테롤, 중성지질, HDL-cholesterol은 생화학 자동분석기(Olympus Au 400, Japan)를 이용하여 비색법으로 각각 측정하였다.

Table 12. Composition of 40% beef tallow modified AIN-76A purified rodent diet with 5% cholesterol and 0.5% cholic acid

Ingredient	g/kg
Casein, high nitrogen	200
Corn starch	150
Beef tallow	400
Sucrose	95
Cholesterol	50
Cellulose	50
Mineral mix ¹	35
Vitamin mix ²	10
Cholic acid	5
DL methionine	3
Choline bitartrate	2

¹AIN-76 Mineral mix (g/kg) : CaHPO₄ 500, NaCl 74, K citrate monohydrate 220, K₂SO₄ 52, MgO, Mn carbohydrate 3.5, Fe citrate 6.0, Zn carbonate 1.6, Cu carbonate 0.3, KIO₃ 0.01, Na₂SeO₄ · H₂O 0.01, CrK(SO₄) · 12H₂O 0.55, Sucrose 118.

²AIN-76 Vitamin mix (g/kg) : thiamin · HCl 0.6, riboflavin 0.6, phydoxine · HCl 0.7, nicotinic acid 3, D calcium pantothenate 1.6, folic acid 0.2, D biotin 0.02, cyanocobalamin 0.001, retinyl palmitate 0.8, DL α-tocopheryl acetate 20, cholecalciferol 0.00025, menaquinone 0.005.

Table 13. Composition of fatfree AIN-76 purified diet

Ingredient (%)	g/kg
Casein	200
Corn starch	150
Sucrose	550
Cellulose	50
Salt mix ¹	35
Vitamin mix ²	10
DL-methionine	3
Choline bitartrate	2

¹AIN-76 Mineral mix (g/kg): CaHPO₄ 500, NaCl 74, K citrat monohydrate 220, K₂SO₄ 52, MgO, Mn carbohydrate 3.5, Fe citrate 6.0, Zn carbonate 1.6, Cu carbonate 0.3, KIO₃ 0.01, Na₂SeO₄ · H₂O 0.01, CrK(SO₄) · 12H₂O 0.55, Sucrose 118.

² AIN-76 Vitamin Mix (g/kg): thiamin · HCl 0.6, riboflavin 0.6, phydoxine · HCl 0.7, nicotinic acid 3, D calcium pantothenate 1.6, folic acid 0.2, D biotin 0.02, cyanocobalamin 0.001, retinyl palmitate 0.8, DL α-tocopheryl acetate 20, cholecalciferol 0.00025, menaquinone 0.005.

제 5 절 달맞이꽃 종자유를 첨가한 혈중콜레스테롤 저하 기능성 Cheddar cheese의 연구

1. 재료 및 방법

가. 재료 및 시약

1) 달맞이꽃 종자유(evening primrose oil:EPO)

본 실험을 위해 혈중 콜레스테롤 저하 물질인 달맞이꽃 종자유(evening primrose oil : EPO)는 (주) 일동제약에서 제공받아 사용하였다.

2) Cheddar cheese

Cheese 제조를 위해 필요한 원유는 (주) 빙그레에서 구입하였으며, cheese 균주는 동결건조 된 mesophilic lactic starter culture (R-703, Chr. Hansen's Lab., Denmark)와 응고를 위해 rennet (Standard Plus 900, Chr. Hansen's Lab., Denmark)을 사용하였다.

3) 콜레스테롤 제거

우유 중의 콜레스테롤 제거를 위해 사용된 흡착제는 β -cyclodextrin(β -CD) (Nihon Shokuhin Kaku Co. Ltd., Japan)을 사용하였다.

2. 실험방법

가. 우유의 처리

시료의 제조를 위해 원유를 다음과 같이 처리하였다. 원유의 36% 유지방이 함유된 크림에 10% β -CD를 첨가 한 후 교반속도 800rpm, 교반온도 40℃, 교반 시간 10분 동안 처리하여 cholesterol 제거 후 166 x g의 속도로 원심 분리한다. 이렇게 콜레스테롤을 제거한 크림에 skim milk와 혼합하여 1,000psi 압력으로 균질하며^(23, 5, 16), Cheddar cheese의 원료유를 제조하였다.

나. Cheddar cheese의 제조

처리된 원유에 EPO 1, 3, 5%을 첨가한 후 1,000psi 압력으로 균질하였다. 이 원유를 치즈 vat에 넣고 온도가 32℃ 조절하여 starter culture를 첨가(원유의 0.004%)하여 고루 저어주며 30분간 방치하였다. 10% CaCl₂ (0.03%)와 rennet 0.019%를 첨가한 후 40~50분간 정치하였다. 커드가 적절히 형성되면 절단한 후 15분간 커드가 뭉치지 않도록 서서히 교반한 후 커드 가운을 위해 30 분 동안 일정한 온도간격으로 38℃까지 올렸다. 적정산도가 0.15% ~ 0.17% 이 되면 whey 방출하였다. 커드는 치즈 vat 양옆으로 모아서 쌓은 후 15분간격으로 Cheddaring 하여 산도가 0.5%가 될 때까지 반복하였다. 약 1시간 작업이 끝나면, 커드를 분쇄한 후 커드량의 2.0%로 가염을 하였으며, 2.5kg/cm²의 압력으로 치즈를 overnight 하였다. 그 후 일정한 크기로 잘라 진공 포장하여 7℃에서 숙성하였다^(5, 16, 18).

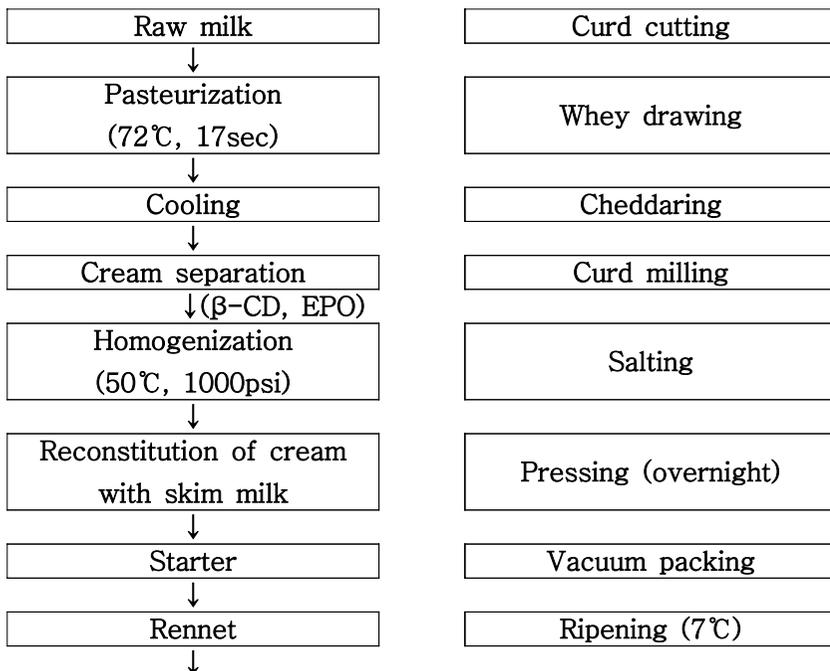


Fig 7. Schematic diagrams of Cheddar cheese treated with β-CD and added EPO

다. 유지방 정량

원유와 크림의 유지방 함량은 거버(Gerger)방법⁽¹⁹⁾으로 측정하였다. 90% 황산 10ml을 유지계(butyrometer)에 넣고 크림 10ml와 isoamylalcohol 1ml를 첨가한 후 고무마개로 유지계를 막고 작은 입자들이 모두 용해 될 때까지 잘 섞은 후 60°C water bath에 15분간 정치하였다. 이것을 1,100rpm의 속도로 5분간 원심분리 한 후 60°C water bath에 5분간 정치 후 분리된 지방을 디바이더를 이용하여 측정하였다.

라. 일반성분 분석

일반성분 분석으로는 수분, 회분, 조단백질(Kjeldahl 방법), 조지방(Soxhlet's 방법) 이 있으며 이는 AOAC 방법⁽²⁰⁾에 따랐다.

마. 지방산화도 측정(TBA)

지방산화도(thiobarbituric acid value : TBA)는 malonaldehyde양을 측정^(20, 22)한 수치로 malonaldehyde는 산패취를 발생하는 반응의 부산물로 생성되며, 지방의 초기 산화단계에서 산화 정도를 측정하는 중요한 물질이다.

치즈 1g을 정량하여 glass centrifuge tube에 넣고 9ml의 15%(w/v) TCA, 0.375%(wt/vol) 4, 6-dihydroxypyrimidine-2-thiol, 그리고 0.25N HCl을 가하여 잘 혼합한 후 15분 동안 water bath에서 boiling 하였다. 반응액을 즉시 실온(20°C)으로 냉각한 후 7,000 x g 에서 15분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 투명한 pink-yellow color 상층액을 얻어 535nm에서 흡광도를 측정하였다.

바. Cholesterol 정량분석

1) GC정량을 위한 시료

Cheddar cheese 1g을 screw cap tube에 넣고 1ml 내부표준물질(5 α -cholestane 1mg/ml 99.8% ethanol)과 5ml 2M ethanolic potassium hydroxide 용액을 첨가⁽²³⁾ 한 후 잘 혼합하였다. 65°C에서 30분 동안 항온수조에 검화⁽²³⁾ 한

후 실온에서 냉각시켰다. 그리고 5ml hexane과 5 ml의 distilled water을 첨가하여 cholesterol을 추출하였으며 이를 4회 반복하였다. 추출액을 둥근 플라스크에 넣고 40°C에서 감압 농축기로 농축시킨 후 1ml hexane에 녹여 microtube에 보관하였다⁽²⁴⁾.

2) GC에 의한 정량 방법

분리한 추출액 1 μ l를 다음의 조건에서 GC에 injection 하여 콜레스테롤의 정량분석을 실시하였다. 분석에 사용된 GC는 Donam Instruments. INC, Seoul, Kor.로서 split injector와 FID(flame ionuzed detector)가 장착되어 있으며, coulmn은 30m \times 0.32mm I.D. \times 0.25 μ m file thickness 인 cross-linked 5% phenyl methyl silicone fused silica capillary(HP-5)을 사용하였다. Carrier gas로 N₂를 2ml/min 사용하였으며, air는 300ml/min, H₂는 30ml/min 그리고 auxiliary gas는 N₂를 28ml/min 주입하였다. 시료의 split ratio는 1 : 50으로 조절하였으며 모든 기체의 유량은 35°C에서 측정하였다. 주입구의 온도는 270°C, 검출기의 온도는 300°C로 설정하였다. 칼럼은 최초 200°C에서 1분간 머무른 후 분당 10°C씩 상승시켜 300°C로 올린 후 20분간 유지하였다. Cholesterol과 cholestane은 머무름 시간에 따라서 구분되며, 각각의 피크면적에 의해 정량분석 하였다.

사. 지방산 정량분석

유리 지방산을 정량 분석하기 위하여 Deeth 등⁽²⁵⁾의 방법을 사용하였으며, 이때 GC조건은 Table 4 과 같다. 정량분석을 상세히 설명하면 다음과 같다. 불활성 alumina 19.2g을 증류수 0.8ml에 넣고 유리막대로 저어 2시간 방치한다. 치즈 1g을 test tube에 넣고 ethly ether 5ml, 4N H₂SO₄ 0.1ml, sodium sulfate 2.5g을 차례로 넣어 vortex mixing 후 2시간 방치하였다. 이 용액에 hexane 5ml을 혼합하여 vortex mixer하여 200 x g 에서 5분간 원심분리 하였다. Small glass chromatography column에 glass wool을 넣고 불활성 alumina 1g을 넣었다. 위에서 만들어진 용액을 small glass chromatography column (ID : 5mm, length : 15cm) 에 흘려주었다. hexane-diethyl ether(1:1 v/v) 5ml을 부어 이 과정을 2회 반복하였다. alumina를 말린 후 10ml test tube에 옮긴 후 6% formic

acid와 diisopropy ether 1ml을 첨가하였다. 실온에서 2,000 x g 로 5분간 원심 분리 하여 micro reaction vessel 에 포집하였으며, 이를 시험용액으로 하여 GC 로 분석하였다.

Table 14. Instrument and working condition for dissociation of free fatty acids in cheese by gas chromatography

Instrument	Donam Instruments, INC, Seoul, Kor.
Column	HP-5 15m×0.53mm i.d. Nukol fused silica capillary column(Supleco Inc., Bellefonte, PA, USA)
Carrier gas	Helium 37ml/min Hydrogen gas 37ml/min, Air gas 300ml/min
Oven temp.	3min/130℃ 9min/130℃→53min/220℃
Injector temp.	250℃
Detector temp.	250℃
Detector	FID

아. 물성 측정

치즈의 크기를 2cm 지름 × 2cm 높이로 준비하였다. SUN Rheometer(CR-200D, Sun Scientific Co., LTD., Tokyo, Japan)을 사용하여 hardness, elasticity, cohesiveness, gumminess, chewiness를 측정하였다^(5, 16). 측정 조건은 crosshead 50mm/min, chart speed 200mm/min 이었다. hardness(경도)는 first bite의 가장 높은 피크의 높이를 force로 환산하였다. elasticity(탄력성)은 첫 번째 피크의 시발점에서 가장 높은 점까지의 거리와 두 번째 피크의 시발점에 가장서 높은 점까지의 거리의 비로 나타내었다. cohesiveness(응집성)은 두 번째 피크의 면적을 첫 번째 피크의 면적으로 나눈 값으로 표시하였다. gumminess(고무질성)은 hardness × cohesiveness, chewiness(저작성)은 gumminess × elasticity 으로 나타내었다.

자. 관능검사

치즈에 EPO를 첨가하여 7℃에서 8주간 숙성하였다. 이 때 Cheddar cheese의 rancid, bitter, cheese-flavor intensity, off-flavor intensity, 등 관능적 특성을 7점법으로 평가하였다. 관능적 특성의 강도 평가는 대단히 강하다(7점), 보통 강하다(6점), 약간 강하다(5점), 보통이다(4점), 약간 약하다(3점), 보통 약하다(2점), 대단히 약하다(1점)로 하였다. 또한 overall은 대단히 좋다(7), 보통이다(4), 매우 싫다(1)로 나타내었다. 관능검사로 얻은 결과의 분석은 SAS를 이용하여 분산분석(ANOVA)과 최소 유의차 검정으로 통계 처리 하였다^(28 29).

차. 혈중콜레스테롤을 위한 동물실험

1) 실험동물 사육환경

본 실험에서 실험동물은 60~75g된 Sprague-Dawley (SD)종 수컷 흰쥐(16마리)를 중앙동물실험연구소에서 구입하여 일주일간 시판 고형 사료(제일사료)를 먹이며 적응기간을 거친 후 실험에 임하였다. 사육환경은 항온 21±3℃, 항습 50±10%를 유지하였으며 명암은 12시간 (07:00-19:00)점등을 실시하였으며 각각 한 마리씩 스테인리스 망 사육 상자에 배치하여 사육하였다. 혈장 검사를 하기 위해 동물들은 12시간 동안 금식을 하고 꼬리로부터 1.5mg의 혈장 sample을 얻었다. 그리고 3000rpm 10분 동안 원심 분리한 후 분석할 때까지 -20℃에 저장했다.

2) Sprague-Dawley의 사료

모든 식이는 American Institute of Nutrition에 의해 추천된 사료를 사용하였으며 콜레스테롤 수치가 증가한 5주 동안 모든 랫트에게 casein, nitrogen, corn starch, beef tallow, sucrose, cholesterol, cellulose, mineral mix, vitamin mix, cholic acid, DL-methionine, choline bitartrate가 포함되어 있는 high-cholesterol, high-fat diet를 동물에게 급여하였고 콜레스테롤 수치가 증가한 이후에는 6주 동안 두개의 group으로 나누어 control 랫트에게 콜레스테롤이 제거되지 않은 Cheddar cheese 0.5g/day을 혼합하여 casein, corn starch, sucrose, cellulose, salt mix, vitamin mix, DL-methionine, choline bitartrate가

포함된 fat free diet를 급여하였고 실험군 렛트에게는 5% EPO를 첨가한 Cheddar cheese 0.5g/day을 혼합하여 fat free diet를 급여하였다. 사료의 성분은 Table 15, 16에 표기하였다. 그리고 음수는 상수도수를 자유섭취 시켰다.

Table 15. Composition of 40% beef tallow modified AIN-76 A purified rodent diet with 5% cholesterol and 0.5% cholic acid

Ingredient	g/kg
Casein, high nitrogen	200
Corn starch	150
Beef tallow	400
Sucrose	95
Cholesterol	50
Cellulose	50
Mineral mix ¹	35
Vitamin mix ²	10
Cholic acid	5
DL-methionine	3
Choline bitartrate	2

¹AIN-76Mineral mix (g/kg) : CaHPO₄ 500, NaCl 74, K citrate monohydrate 220, K₂SO₄ 52, MgO, Mn carbohydrate 3.5, Fe citrate 6.0, Zn carbonate 1.6, Cu carbonate 0.3, KIO₃ 0.01, Na₂SeO₄ · H₂O0.01, CrK(SO₄) · 12H₂O0.55, Sucrose 118.

²AIN-76Vitamin mix (g/kg) : thiamin · HCl 0.6,riboflavin 0.6, pydoxine · HCl 0.7, nicotinic acid 3, D calcium pantothenate 1.6, folic acid 0.2, D biotin 0.02,cyanocobalamin 0.001, retinyl palmitate 0.8, DL α-tocopheryl acetate 20, cholecalciferol 0.00025, menaquinone 0.005.

Table 16. Composition of fat free AIN-76 purified diet

Ingredient (%)	g/kg
Casein	200
Corn starch	150
Sucrose	550
Cellulose	50
Salt mix ¹	35
Vitamin mix ²	10
DL-methionine	3
Choline bitartrate	2

¹AIN-76 Mineral mix (g/kg): CaHPO₄ 500, NaCl 74, K citrate monohydrate 220, K₂SO₄ 52, MgO, Mn carbohydrate 3.5, Fe citrate 6.0, Zn carbonate 1.6, Cu carbonate 0.3, KIO₃ 0.01, Na₂SeO₄ · H₂O 0.01, CrK(SO₄) · 12H₂O 0.55, Sucrose 118.

² AIN-76 Vitamin Mix (g/kg): thiamin · HCl 0.6, riboflavin 0.6, phydoxine · HCl 0.7, nicotinic acid 3, D calcium pantothenate 1.6, folic acid 0.2, D biotin 0.02, cyanocobalamin 0.001, retinyl palmitate 0.8, DL α-tocopheryl acetate 20, cholecalciferol 0.00025, menaquinone 0.005.

3) 콜레스테롤 정량

혈청 중 Serum high density lipoprotein(HDL), Serum triacylglycerol(TC), total cholesterol(TC)를 각각 측정하였으며 농도는 건국대학교 수의학과에 의뢰하여 측정하였다. 총 콜레스테롤은 총 콜레스테롤 측정용 kit(Fuji DRI-Chem slide TCHO-PⅡ, Fuji Photo Film Co., LTD, Kanagawa-ken, Japan), HDL-콜레스테롤은 HDL-콜레스테롤 측정용 kit(Fuji DRI-Chem slide HDL-C-P, Fuji Photo Film Co., LTD, Kanagawa-ken, Japan), 중성지질은 중성지질 측정용 kit(Fuji DRI-Chem slide TG-P, Fuji Photo Film Co., LTD, Kanagawa-ken, Japan)를 각각 사용하여 측정하였다.

제 6 절 Gamma-linolenic acid를 첨가한 혈중콜레스테롤 저하 기능성 버터에 관한 연구

1. 재료 및 방법

가. 실험 재료

1) Butter

Butter를 제조하기 위하여 유지방 함량이 36%인 크림을 (주)빙그레에서 제공 받았다.

2) 콜레스테롤 제거

크림 중의 cholesterol 제거를 위하여 사용된 흡착제는 β -cyclodextrin(Nihon Shokuhin Kaku Co., LTD, Osaka Japan)을 사용하였고 혈중 콜레스테롤 저하 기능을 가진 GLA(γ -linolenic acid)는 (주)일동 제약에서 제공 받았다.

2. 실험 방법

가. butter 제조

Butter의 제조 공정은 Fig. 8에서와 같으며, 공정 과정을 상세히 알아보면 다음과 같다. 실험군을 2군으로 나누어 β -CD를 처리한 버터와 β -CD 처리를 거치고 GLA를 첨가한 버터, 그리고 아무것도 첨가하지 않은 버터를 대조군으로 나누었다. 10% β -CD 처리를 하여 콜레스테롤을 제거한 크림을 하루 동안 숙성시킨 후 크림 양의 1% GLA와 함께 버터 churn에 넣고 8~10℃로 맞춘 다음 일정한 속도로 churning하였다. 버터 입자가 생성되면 보다 느린 속도로 약 10회 회전시킨 후 churning을 멈추고 버터밀크를 배출시킨다. 배출시킨 양만큼 냉각수를 넣고 느린 속도로 2회 수세를 하였다. 버터 입자를 모아서 버터 속의 수분이 완전히 빠지도록 짓이기면서 버터 중량의 1%로 가염 하였다. 버터를 틀에 넣어 모양을 만든 후 진공 포장하여 -20℃에서 냉동 보관하였다.⁽³⁸⁾

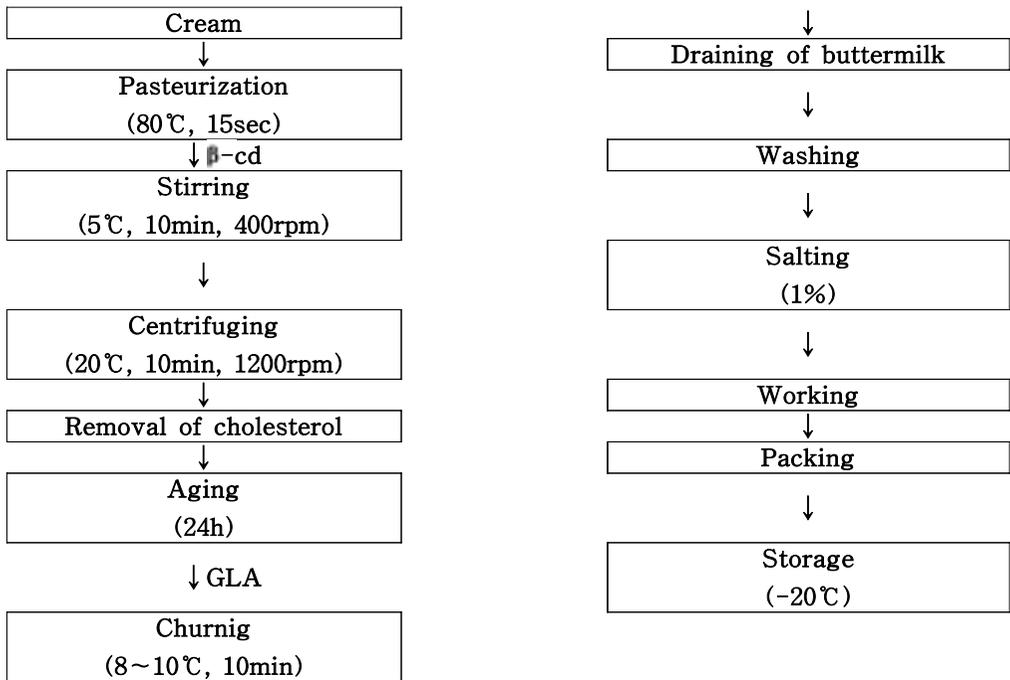


Fig. 8. Schematic diagram of butter treated with β -cd and added GLA

나. 유지방 정량

원유와 크림의 유지방 함량은 거버(Gerber)방법⁽¹⁹⁾으로 측정하였다. 90% 황산 10ml을 유지계(butyrometer)에 넣고 크림 10ml와 isoamylalcohol 1ml를 첨가하였으며 고무마개로 유지계를 막고 작은 입자들이 모두 용해 될 때까지 잘 섞은 후 60°C water bath에 15분간 정치한다. 1,100rpm의 속도로 5분간 원심분리한 후 60°C water bath에 5분간 정치 후 분리된 지방을 디바이더를 이용하여 측정하였다.

다. 일반성분 분석

일반성분 분석으로는 수분, 회분, 조단백질(Kjeldahl 방법), 조지방(Soxhlet's 방법) 이 있으며 이는 AOAC 방법⁽²⁰⁾에 따랐다.

라. 산가(acid value)

버터를 3g을 200ml 삼각플라스크에 취하여 ether ethanol 혼합용액 20~40ml 을 가하여 완전히 녹였다. 여기에 1% phenolphthalein 용액 2~3방울을 가하고 0.1N-KOH ethanol 용액으로 신속히 적정하였다. 용액이 미홍색으로 3초간 지속될 때를 종말점으로 하였다⁽²¹⁾.

$$\text{산가} = \frac{(V_1 - V_0) \times 5.611 \times F}{S}$$

V_1 : 본 시험의 0.1N-KOH 용액의 적정 소비량(ml)

V_0 : 공 시험의 0.1N-KOH 용액의 적정 소비량(ml)

F : 0.1N-KOH 용액의 역가

S : 시료 채취량(g)

마. Thiobarbituric acid (TBA)

TBA가는 malonaldehyde양을 측정^(20, 22)한 수치로 malonaldehyde는 산패취를 발생하는 반응의 부산물로 생성되며, 지방의 초기 산화단계에서 산화 정도를 측정하는 중요한 물질이다. 버터 1g을 정량하여 glass centrifuge tube에 넣고 9ml의 15% (w/v) TCA, 0.375%(wt/vol) 4, 6-dihydroxypyrimidine-2-thiol, 그리고 0.25N HCl을 가하여 잘 혼합한 후 15분 동안 water bath에서 boiling 하였다. 반응액을 즉시 실온(20℃)으로 냉각한 후 7,000 x g 에서 15분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 투명한 pink-yellow color 상징액을 얻어 535nm에서 흡광도를 측정하였다.

바. 콜레스테롤 정량 분석

1) GC정량을 위한 시료

버터 1g을 screw cap tube에 넣고 1ml 내부표준물질(5 α -cholestane 1mg/ml 99.8% ethanol)과 5ml 2M ethanolic potassium hydroxide 용액을 첨가⁽³⁾ 한 후 잘 혼합하였다. 65℃에서 30분 동안 항온수조에 검화⁽²³⁾ 한 후 실온에서 냉각시켰

다. 그리고 5ml hexane과 5ml의 distilled water를 첨가하여 cholesterol을 추출하였으며 이를 4회 반복하였다. 추출액을 둥근 플라스크에 넣고 40℃에서 감압 농축기로 농축시킨 후 1ml hexane에 녹여 microtube에 보관하였다⁽²⁴⁾.

2) GC에 의한 정량 방법

분리한 추출액 1 μ l를 다음의 조건에서 GC에 injection 하여 cholesterol의 정량분석을 실시하였다. 분석에 사용된 GC는 Donam Instruments, INC, Seoul, Kor. 로서 split injector와 FID(flame ionized detector)가 장착되어 있으며, column은 30m \times 0.32mm I.D. \times 0.25 μ m film thickness 인 cross-linked 5% phenyl methyl silicone fused silica capillary(HP-5)을 사용하였다. Carrier gas로 N₂를 2 ml/min 사용하였으며, air는 300ml/min, H₂는 30ml/min 그리고 auxiliary gas는 N₂를 28ml/min 주입하였다. 시료의 split ratio는 1 : 50으로 조절하였으며 모든 기체의 유량은 35℃에서 측정하였다. 주입구의 온도는 270℃, 검출기의 온도는 300℃로 설정하였다. Column은 최초 200℃에서 1분간 머무른 후 분당 10℃씩 10분 동안 상승시켜 300℃로 올린 후 20분간 유지하였다. Cholesterol과 cholestane은 머무름 시간에 따라서 구분되며, 각각의 피크면적에 의해 정량분석 하였다.

Table 17. Instrument and working conditions of cholesterol analysis by gas chromatography for butter treated with β -cyclodextrin

Instrument	Donam Instruments, INC, Seoul, Kor.
Column	HP-5 30m \times 0.32mm \times 0.25 μ m i.d. cross-linked 5% phenylmethylsilicone fused silica capillary column
Carrier gas	N ₂ 2ml/min Hydrogen gas 30ml/min, Air gas 300ml/min
Oven temp.	11min/200℃ \rightarrow 20min/300℃
Injector temp.	270℃
Detector temp.	300℃
Detector	FID

사. Rheological property

Butter의 크기를 2cm 지름 × 2cm 높이로 준비하였다. SUN Rheometer(CR-200D, Sun Scientifis Co., LTD., Tokyo, Japan)을 사용하여 hardness, elasticity, cohesiveness, gumminess, chewiness를 측정하였다^(5, 16). 측정 조건은 cresshead 50mm/min, chart speed 200mm/min 이었다. hardness(경도)는 first bite의 가장 높은 피크의 높이를 force로 환산하였다. Elasticity(탄력성)은 첫 번째 피크의 시발점에서 가장 높은 점까지의 거리와 두 번째 피크의 시발점에서 가장 높은 점까지의 거리의 비로 나타내었다. Cohesiveness(응집성)은 두 번째 피크의 면적을 첫 번째 피크의 면적으로 나눈 값으로 표시하였다. Gumminess(고무질성)은 hardness × cohesiveness, chewiness(저작성)은 gumminess × elasticity 으로 나타내었다.

아. 관능검사

콜레스테롤을 제거하여 GLA를 첨가한 버터를 4°C에서 0, 2, 4, 6, 8주 동안 저장하면서 저장기간 동안 버터의 texture, color, rancid, bitterness, acidity, greasiness를 7점법으로 평가하였다. 관능적 특성의 강도 평가는 대단히 강하다(7점), 보통(4점), 대단히 약하다(1점)로 하였다. 선호도 검사에서는 가장 좋은 것(1점)부터 가장 싫은 것(3점)으로 순서를 매겼다. 관능 검사 요원은 훈련된 요원 10명을 선발하여 검사에 임하였으며 관능검사로 얻은 결과의 분석은 SAS program을 이용하여 분산분석(ANOVA)과 Duncan의 최소 유의차 검정으로 통계 처리하였다^(28, 29).

자. 혈중 콜레스테롤 저하 기능을 위한 동물 실험

1) 실험 동물 및 사육 환경

본 실험에서 사용한 실험 동물은 4주령의 Sprague-Dawley (SD) rat(18마리)를 중앙동물실험연구소에서 구입하여 일주일간 일반사료를 먹이며 적응기간을 거치는 동안 체중이 전체적으로 평균에 가까울 때 실험에 임하였다. 사육환경은 항온 21±3°C, 항습 50±10%를 유지하였으며 명암은 12시간 주기로 조명되는 동물

환경 제어사육장치에서 각각 한 마리씩 스테인리스 망 사육상자에 배치하여 사육하였다.

2) Sprague-Dawley의 사료

콜레스테롤 수치가 증가하는 6주 동안 모든 rat에 casein, nitrogen, corn starch, beef tallow, sucrose, cholesterol, cellulose, mineral mix, vitamin mix, cholic acid, DL-methionine, choline bitartrate가 포함되어 있는 high cholesterol-high fat diet(중앙동물실험연구소)를 먹이고 콜레스테롤 수치가 증가

Table 18. Composition of 40% beef tallow modified AIN-76A purified rodent diet with 5% cholesterol and 0.5% cholic acid

Ingredient	g/kg
Casein, high nitrogen	200
Corn starch	150
Beef tallow	400
Sucrose	95
Cholesterol	50
Cellulose	50
Mineral mix ¹	35
Vitamin mix ²	10
Cholic acid	5
DL-methionine	3
Choline bitartrate	2

¹AIN-76Mineral mix (g/kg) : CaHPO₄ 500, NaCl 74, K citrate monohydrate 220, K₂SO₄ 52, MgO, Mn carbohydrate 3.5, Fe citrate 6.0, Zn carbonate 1.6, Cu carbonate 0.3, KIO₃ 0.01, Na₂SeO₄ · H₂O 0.01, CrK(SO₄) · 12H₂O 0.55, Sucrose 118.

²AIN-76Vitamin mix (g/kg) : thiamin · HCl 0.6, riboflavin 0.6, phydoxine · HCl 0.7, nicotinic acid 3, D calcium pantothenate 1.6, folic acid 0.2, D biotin 0.02, cyanocobalamin 0.001, retinyl palmitate 0.8, DL α-tocopheryl acetate 20, cholecalciferol 0.00025, menaquinone 0.005

Table 19. Composition of fat free AIN-76 rodent purified diet

Ingredient (%)	g/kg
Casein	200
DL-methionine	3
Corn starch	150
Sucrose	500
Cellulose	50
Corn oil	50
Salt mix ¹	35
Vitamin mix ²	10
Choline bitartrate	2

¹AIN-76 Mineral mix (g/kg): CaHPO₄ 500, NaCl 74, K citrate monohydrate 220, K₂SO₄ 52, MgO, Mn carbohydrate 3.5, Fe citrate 6.0, Zn carbonate 1.6, Cu carbonate 0.3, KIO₃ 0.01, Na₂SeO₄ · H₂O 0.01, CrK(SO₄) · 12H₂O 0.55, Sucrose 118.

² AIN-76 Vitamin Mix (g/kg): thiamin · HCl 0.6, riboflavin 0.6, phydoxine · HCl 0.7, nicotinic acid 3, D calcium pantothenate 1.6, folic acid 0.2, D biotin 0.02, cyanocobalamin 0.001, retinyl palmitate 0.8, DL α-tocopheryl acetate 20, cholecalciferol 0.00025, menaquinone 0.005.

한 이후에는 casein, corn starch, sucrose, cellulose, salt mix, vitamin mix, DL-methionine, choline bitartrate가 포함된 rodent purified diet를 모두 먹이고 그중 6마리 쥐는 일일 일회 cholesterol이 제거되지 않은 버터 0.5g을, 또 다른 6마리 쥐는 일일 일회 콜레스테롤이 제거된 버터 0.5g을, 나머지 6마리는 GLA가 첨가된 버터 0.5g을 혼합하여 급여하였다. 사료의 성분은 Tables 18, 19에 표기하였다. 그리고 음수는 상수도수를 자유섭취 시켰다.

3) 콜레스테롤 정량

랫트의 혈청 중 총 콜레스테롤 농도와 HDL-cholesterol, 중성지질 농도를 한국 동물 임상 연구소에서 측정하였다. 총 콜레스테롤, 중성지질, HDL-cholesterol은 생화학 자동분석기(Olympus Au400, Japan)를 이용하여 비색법으로 각각 측정하였다.

제 3 장 연구 결과

제 1 절 키토올리고당의 미세캡슐화와 이를 이용 HDL-콜레스테롤 향상 우유의 연구

1. 미세캡슐화의 수율

본 실험에서는 콜레스테롤을 제거한 우유에 키토올리고당을 첨가 했을 때 시유와 같은 맛과 향 등을 유지하기 위하여 키토올리고당을 미세캡슐하였는데 그 수율은 Table 20과 같다. PGMS : chitooligosaccharide의 비율은 5 : 1일 경우 미세캡슐의 수율이 83.67%, 10 : 1일 때는 88.08%, 15 : 1일 경우에는 84.84%, 20 : 1일 때는 80.49%였으며, PGMS : chitooligosaccharide의 비율이 10 : 1일 경우 88.08로 최고 수율의 결과를 나타내었다. 실험 결과 PGMS의 비율 10보다 높을 경우 수율은 감소하였다.

Kawk 등⁽¹¹⁾의 보고에 의하면, PGMS와 유당분해효소의 비율은 15 : 1에서 최고의 결과를 나타냈고 수율은 본 실험의 결과보다 낮아 72.8% 였다. 또한 Kawk 등⁽³⁶⁾의 연구 결과에 의하면, 철분을 core material로 이용 PGMS로 미세캡슐 했

Table 20. Yield of microencapsulation chitooligosaccharide with different ratios of coating materials to chitooligosaccharide¹

Ratio (w/v)		Yield (%)
PGMS ²	Chitooligosaccharide	
5	1	83.67 ^b
10	1	88.08 ^a
15	1	84.84 ^b
20	1	80.49 ^c
SEM		2.0

¹ Means of triplicate. Means within column with different superscript letter differ. (P<0.05)

² Polyglycerol monostearate

을 경우, 5:1일 경우 75%로 최적의 수율을 나타냈다. 이러한 결과는 미세캡슐화 수율에 core material과 coating material의 종류에 따라 함량 비율이 영향을 미칠 수 있다는 결과를 보여주었고 장 등⁽³⁷⁾에 의해서도 유사한 결과가 보고된 바 있다.

2. 키토올리고당의 미세캡슐 사진

본 실험에서는 spray gun의 nozzle의 크기와 분무 압력, 분무액 점성을 동일하게 하여 coating material은 PGMS를 사용하고 core material을 키토올리고당을 사용하여 미세캡슐을 제조한 것을 미세캡슐 사진을 Fig. 9에 나타내었다. 미세캡슐을 주사전자현미경(SEM)으로 촬영한 결과 직경이 평균 150~200 μm 이며 원형으로 관찰되었다. 본 실험에서는 지금까지 본실험실에서 관찰된 캡슐 size (2~5 μm)보다 크게 나타났는데 그 이유는 미세캡슐의 크기를 결정하는 요인 중의 하나인 core material인 키토올리고당의 점도가 비교적 높아서 제조 시 미세캡슐이 분산 될 때 크게 영향을 미친 것으로 사료된다.

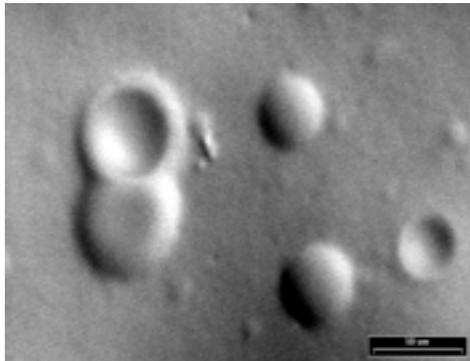


Fig 9. Scanning electron microscope (SEM) of microencapsulated chitooligosaccharide with PGMS ($\times 100$)

3. 미세캡슐 키토올리고당을 첨가한 우유의 특성

가. 점도 측정

미세캡슐한 키토올리고당을 콜레스테롤 제거 우유에 첨가 할 때 점도의 변

화를 측정된 결과는 Table 21과 같다. 키토올리고당을 미세캡슐하여 콜레스테롤이 제거된 우유에 0.5% 첨가한 우유의 점도는 0.79cps로 시유의 점도 0.75cps와 유사함을 보였으나, 미세캡슐하지 않은 키토올리고당을 콜레스테롤이 제거된 우유에 첨가했을 경우 1, 1.5, 2%의 첨가시 30.27, 43.00, 49.30cps로 시유와 각각 40, 57, 65배 차이를 보이며 본래의 우유의 점도보다 매우 높아 이것을 우유에 직접 첨가하는 것은 우유의 품질을 저하시키는 결과를 나타냈다. 미세캡슐을 1,

Table 21. Effect of viscosity on different concentrations of microencapsulated chitoooligosaccharide in cholesterol removed milk¹

Treatment	Concentration (%)	Viscosity (cps)
Control ²	0	0.75 ^g
Uncapsulated	0.5	3.24 ^e
	1	30.27 ^c
	1.5	43.00 ^b
	2	49.30 ^a
Encapsulated ³	0.5	0.79 ^g
	1	1.34 ^f
	1.5	1.59 ^f
	2	3.88 ^d

¹Means of triplicates. Means in a column with same letter are not significantly different. (P < 0.05)

² Market milk stored at 4°C for 1day .

³Microencapsulated chitoooligosaccharide by polyglycerol monostearate.

1.5, 2% 첨가한 우유는 점도가 1.34, 1.59, 3.88cps로 소폭으로 증가함을 보여 주었다. 그러나, Table 24의 관능평가의 점도를 측정된 결과를 기계적 측정의 결과와 비교하면 0.5, 1, 1.5, 2% 모두 대조군과 같은 점도로 평가되어 기계적 측정으로는 캡슐의 증가에 따라 점도가 조금씩 증가했지만 관능적으로는 점도의 차이를 느끼지 못하는 것으로 나타났다. 그리고 미세캡슐 하지 않은 0.5%의 첨가량은 3.88cps로 가장 첨가량이 많은 미세캡슐한 키토올리고당을 2% 첨가한 우유의 점도 3.24cps와 비슷한 결과를 보였으며 대조군 시유의 점도와는 차이가 나는 결과를 보였다.

이와 같이 키토올리고당의 식품 첨가시 점도의 문제를 해결하기 위하여 키

토올리고당의 분자량을 저분자화 시키는 방법과 키토올리고당에 앞서 키토산의 점도를 해결하기 위하여 키토올리고당이 개발된바 있다. 하지만, 김 등⁽³⁸⁾에 의하면, 키토올리고당의 점도는 분자량이 클수록 증가하였고 고분자량(100kDa이상)에서는 pH가 높을수록 점도가 증가하여 낮은 분자량은 식품에 첨가하는 것이 가능하나 키토올리고당은 첨가하기 전에 식품과 동일한 점도를 유지하기는 어려운 것으로 보고되었다. 본 실험에서는 미세캡슐한 키토올리고당을 우유에 첨가시에는 대조군과 점도의 차이가 크게나지 않는 것으로 사료된다.

나. 색도 측정

미세캡슐한 키토올리고당을 우유에 첨가 할 때 색깔의 변화를 방지하는 효과를 알아보기 위해 Hunter 'L'(밝기), 'a'(적색-녹색), 'b'(황색-청색)값을 측정 한 결과는 Table 22와 같다. 미세캡슐한 시료의 L-value는 미세캡슐의 양이 증가함에 따라 L-value의 증가함을 보였지만 시유와 유사한 값을 나타내었다. 즉 시유는 L-value가 5.7로 0.5, 1, 1.5, 2%일 경우에는 각각 5.3, 4.9, 4.4, 4.0으로 대조군 시유와 콜레스테롤 제거하고 미세캡슐을 첨가한 우유는 거의 동일한 밝기를 나타내었다. 그러나 미세캡슐 하지 않은 키토올리고당의 시료 0.5, 1%는 각각 2.5, 1.6으로 시유와 많은 차이를 보이며 1.5, 2%는 시료의 색이 너무 진해 기계적 측정이 어려웠다. 키토올리고당을 미세캡슐하지 않고 우유에 첨가할시에는 명도가 매우 탁해지는 결과를 볼 수 있었다.

a-value는 키토올리고당 미세캡슐의 양이 0.5, 1, 1.5, 2%로 증가함에 따라 각각 1.14, 2.14, 2.44, 3.19로 증가하였고, 미세캡슐 하지 않은 키토올리고당의 시료 0.5, 1%의 경우는 4.04, 5.89로 점차 증가하였으며, 1.5, 2%일때는 시료의 색이 진해 측정이 불가능하였다. 미세캡슐 하지 않은 시료의 경우 대조군 시유의 0.02와 값의 차이가 크게 나는 이유는 키토올리고당의 적색이 우유 속에서 나타나므로 양이 증가함에 따라 a-value가 증가하고 미세캡슐한 시료의 양이 증가함에 따라 a-value가 조금씩 증가하는 이유도 키토올리고당을 싸고 있는 PGMS의 영향으로 시유보다는 약간의 적색을 띠는 결과를 나타냈다.

b-value는 미세캡슐한 시료와 시유가 비슷한 값을 나타내었고 미세캡슐하지

않은 시료는 시유의 b-value보다 낮은 값을 나타내었다. 즉 미세캡슐을 0.5, 1, 1.5, 2% 첨가했을 때 각각 3.25, 2.87, 2.75, 2.54로 감소하는 경향을 나타냈으며, 미세캡슐 하지 않은 키토올리고당을 0.5, 1% 첨가했을 때는 1.56, 0.79를 나타냈으며 1.5, 2%는 시료의 색이 너무 어두워 측정이 불가능하였다.

Table 22. Effect of color on different concentrations of microencapsulated chitoooligosaccharide in cholesterol removed milk¹

Treatment	Concentration(%)	L-value	a-value	b-value
Control ²	0	5.7 ^a	0.02 ^f	3.49 ^a
Uncapsulated	0.5	2.5 ^f	4.04 ^b	1.56 ^f
	1	1.6 ^g	5.89 ^a	0.79 ^g
	1.5	NA ⁴	NA	NA
	2	NA	NA	NA
	Encapsulated	0.5	5.3 ^b	1.14 ^e
	1	4.9 ^c	2.14 ^d	2.87 ^c
	1.5	4.4 ^d	2.44 ^d	2.75 ^d
	2	4.0 ^e	3.19 ^c	2.54 ^e
SEM		0.001	0.15	0.001

¹Means of 5 replicates. Means in a column with same letter are not significantly different. (P < 0.05)

²Market milk stored at 4°C for 1day.

³Microencapsulated chitoooligosaccharide by polyglycerol monostearate.

⁴NA : not available due to too dark samples.

4. 저장 기간 중 키토올리고당 미세캡슐의 유리량 측정

미세캡슐 키토올리고당을 저장하는 동안에 유리량을 측정한 결과는 Figs. 10, 5와 같다. Fig. 10은 키토올리고당을 미세캡슐한 시료들이 증류수에서 저장기간에 따라 4, 20, 30°C에서 10일 까지 2mg씩 유리량이 증가하는 모습이 보이고 15, 20, 25일에는 거의 증가하지 않았다. 0일에는 4, 20, 30°C 모두 4.1 mg, 5일에는 각각 4.4, 4.4, 4.5mg, 10일에는 6.5, 6.5, 6.6mg, 15일에는 8.26, 8.2, 8.46mg, 20일에는 8.46, 8.4, 8.76mg, 25일에는 8.56, 8.7, 9.43mg의 결과를 보였다. 증류수에서의 미세캡슐은 저장 기간이 지남에 따라 유리량이 조금씩 증가하므로 저장기간에는 영향을 받음

을 알 수 있었지만, 4, 20, 30℃의 온도 모두에서는 유리량의 변화가 없으므로 온도에는 크게 영향을 받지 않는 것으로 나타났다.

Fig. 11는 키토올리고당을 미세캡슐화하여 콜레스테롤을 제거한 우유에 첨가하여 미세캡슐의 유리량을 살펴보았다. 우유에 첨가한 미세캡슐도 저장기간에는 유리량의 증가량을 보였으나 온도에는 큰 영향을 미치지 않는 결과를 보여주었다. 즉, 저장 0일 때에는 4, 10, 15℃온도에서 저장된 시료의 키토올리고당의 유리량은 모두 4.1mg으로 나타났고 저장 3일에는 4.1, 4.1, 4.2mg, 저장 6일에는 4.4, 4.7, 4.8mg, 저장 9일에는 5.4, 5.1, 6.2mg, 저장 12에는 6.0, 5.7, 6.3mg, 마지막 저장 날 15일에는 7.6, 7.6, 7.4mg으로, 저장 기간이 지남에 따라 키토올리고당의 유리량이 조금씩 증가 하였다. 저장 기간 10일 이후에는 증류수에 첨가한 것과 우유에 첨가한 것 모두 저장 기간에 따라서는 조금씩 증가하지만 온도에 따라서는 증류수와 우유에 저장한 것 모두 영향을 받지 않는 것으로 나타났다.

본 실험과 같이 core material과 coating material은 다르나 미세캡슐의 저장 기간동안의 유리량의 결과를 보면 김 등⁽³⁹⁾은 ω -3계 지방산을 agar와 gelatin으로

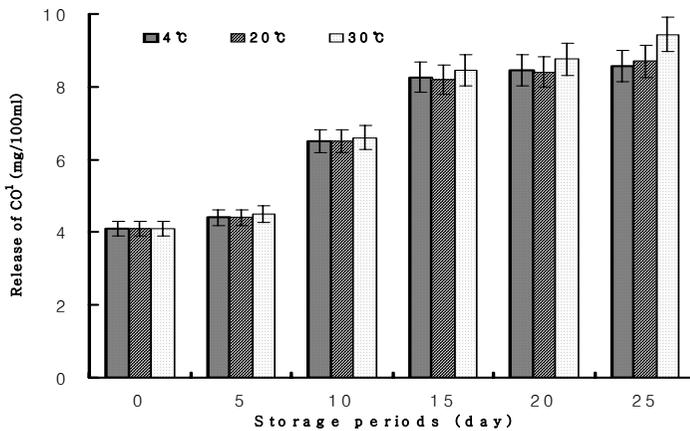


Fig 10. Effect of temperature on release of chitooligosaccharide microcapsules made by PGMS² in distilled water during storage

¹Release of chitooligosaccharide

² Polyglycerol monostearate

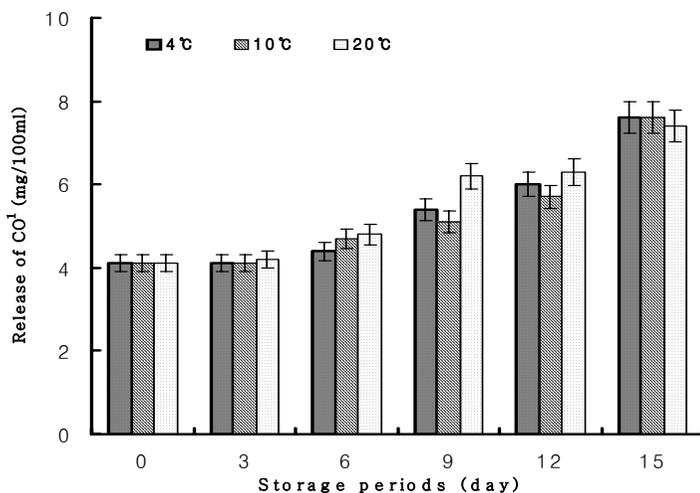


Fig 11. Effect of temperature on release of chitoooligosaccharide microcapsules made by PGMS² in cholesterol removed milk during storage

¹Release of chitoooligosaccharide

² Polyglycerol monostearate

미세캡슐한 결과 40°C에서는 각 시간별로 유리량이 5%이하 방출되어 안정성이 매우 높은 것으로 나타났으며 60°C 이상에서는 20%이하 core material이 방출되었고 80~100°C 처리구에서는 30~40% 유출되는 경향을 보고했다. 이러한 현상은 높은 열에 의한 미세캡슐의 형태변화와 물리적 안정성과 유화안정성의 파괴로 결론 내리고 있다. 또한 Magee 등⁽⁴⁰⁾은 유지방으로 치즈향을 캡슐 제조시 33°C 이하의 열처리를 요하는 것으로 나타내고 있다. 본 실험에서는 김 등의 결과와 비교하여 미세캡슐의 유리량이 적었으며 이는 coating material과 core material의 종류가 다른 이유 때문인 것으로 사료된다. Magee 등의 결과와 동일하게 10, 20, 30°C의 온도에서 미세캡슐의 유리량의 변화가 없는 것으로 보아 30°C이하의 온도에서는 미세캡슐의 유리량은 영향을 받지 않는 것으로 판단된다.

5. 키토올리고당 미세캡슐의 항미생물 검사

키토올리고당의 항미생물 기능을 관찰하기 위하여 총균수를 10^6 CFU/mg으로 조절한 미세캡슐한 키토올리고당과 미세캡슐을 하지 않은 것을 각각 첨가하여 저장기간 중 총균수를 측정된 결과는 Table 23과 같다. 키토올리고당을 미세캡슐한 시료들의 농도가 증가함에 따라 저장하는 동안 우유 총균수가 점차 증가하는 결과를 보였고, control의 증가와 유사한 결과를 보이므로 미세캡슐로 인하여 키토올리고당의 항미생물의 영향을 받지 못하는 것으로 나타났다. 그러나, 키토올리고당을 미세캡슐하지 않은 시료를 0.5, 1, 1.5, 2% 농도에서 저장 기간 3일부터 미생물이 모두 사멸하는 결과를 보이므로 키토올리고당이 우유의 총균수를 사멸하는 항미생물의 효과를 나타내는 결과를 보였다.

키토올리고당의 항미생물의 효과에 관하여 규명한 유 등⁽⁴¹⁾의 연구 결과는 본 연구의 미세캡슐하지 않은 시료에서와 동일한 경향의 결과를 보고하였다. 유 등은 키토올리고당을 0.005~0.2%의 농도에서 김치에 첨가한 결과 일반 김치의 보존기간이 2~6배의 연장효과가 있었으며 *Lactobacillus plantarum*과 *Leuconostoc mesenteroides*의 선택배지에 0.005~0.5% 직접 첨가한 결과 거의 자라지 않고

Table 23. Bacteria growth in cholesterol removed milk added by different concentrations of microencapsulated chitooligosaccharide during storage at 4°C for 15 days

Treatment	Concentration	Storage period (day)					
		0	3	6	9	12	15
		(CFU/mg)					
Control	0	1.1×10^6	1.1×10^6	1.7×10^6	1.8×10^6	1.8×10^6	1.9×10^6
	0.5	1.1×10^6	1.1×10^6	1.2×10^6	1.3×10^6	1.6×10^6	1.8×10^6
Uncapsulated ¹	1	1.2×10^6	1.2×10^6	1.4×10^6	1.4×10^6	1.7×10^6	1.9×10^6
	1.5	1.1×10^6	1.2×10^6	1.5×10^6	1.8×10^6	1.9×10^6	2.1×10^6
	2	1.1×10^6	1.6×10^6	1.7×10^6	1.9×10^6	2.0×10^6	2.5×10^6
	0.5	1.3×10^6	0	0	0	0	0
Encapsulated	1	1.2×10^6	0	0	0	0	0
	1.5	1.1×10^6	0	0	0	0	0
	2	1.1×10^6	0	0	0	0	0

¹Microencapsulated chitooligosaccharide by polyglycerolmonostearate.

일정하게 유지되었다. 그러므로 키토올리고당은 미생물의 생육을 억제하는 기능이 있는 것으로 판단되며 이 기능을 이용하여 식품의 유통기간을 안전하게 연장할 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 키토올리고당을 미세캡슐화하여 우유에 첨가한 경우 키토올리고당은 항미생물의 효과를 나타내지 못했으며 그에 따라 미세캡슐의 막이 키토올리고당을 잘 싸고 있는 것으로 확인됐다. 또한 키토올리고당의 항미생물의 기능을 저해하는 미세캡슐의 효과를 유용균을 사용하는 식품인 요구르트 등을 제조시 사용할 때는 요구르트의 유산균등의 균을 사멸시키지 않고 이용 할 수도 있으며 키토올리고당의 기능성도 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

6. 관능 검사

클레스테롤을 제거한 우유에 키토올리고당을 미세캡슐하여 첨가한 시료와 미세캡슐 하지 않고 첨가시 일반 시유를 대조군으로 저장기간에 따라 비교하여 Table 24에 나타내었다.

미세캡슐시 떫은 맛(astringency)은 미세캡슐의 농도가 증가하여도 시유와 유의적 차이를 보이지 않았으며 저장기간이 경과해도 떫은 맛의 변화는 거의 관찰되지 않았다. 그러나 미세캡슐 2%의 농도에서는 0.5, 1, 1.5%의 농도에 비교하여 떫은맛이 비교적 높게 느껴지는 결과를 나타냈다. 미세캡슐하지 않은 키토올리고당을 첨가시에는 키토올리고당의 농도가 증가할수록 떫은 맛의 정도가 증가하였으나 저장기간에 따라서는 큰 변화는 없었다. 쓴맛(bitterness)은 미세캡슐 농도가 1.5%까지는 시유와 유의적 차이를 보이지 않았고, 2%의 농도에서는 시유와 쓴맛이 유의적 차이를 보였다. 미세캡슐을 하지 않은 키토올리고당을 첨가한 시료는 농도가 증가할수록 쓴맛이 증가하였고 저장기간에는 영향을 받지 않았다. 미세캡슐된 키토올리고당이 우유의 색에 영향을 주는 정도는 1.5%의 농도까지 시유와 누런색의 정도(reddy-yellow)에서 유의적 차이가 없었으며, 미세캡슐하지 않은 키토올리고당에 의해 농도가 증가 할수록 누런색의 정도도 증가하는 경향을 나타냈다. 기타이취는 미세캡슐한 시료뿐만 아니라 키토올리고당 0.5%의 농도에서도 시유와 유의적 차이를 느낄 수 없는 결과를 보여주었다. 점도(viscosity)

Table 24. Sensory scores of cholesterol removed milk containing microencapsulated chito oligosaccharide at 4°C for 15 day storage¹

Treat- ment	Micro- capsule Concen- tration (%)	Storage period (day)	Sensory description					Overall
			Astringency	Bitterness	Color ³	Off-flavor	Viscosity	
Control	0	0	4.0 ^a	4.0 ^a	4.0 ^a	4.0 ^a	4.0 ^a	4.0 ^a
		3	4.0 ^a	4.0 ^a	4.0 ^a	4.0 ^a	4.0 ^a	4.0 ^a
		6	4.0 ^a	4.0 ^a	4.0 ^a	4.0 ^a	4.0 ^a	4.0 ^a
		9	4.0 ^a	4.0 ^a	4.0 ^a	4.0 ^a	4.0 ^a	4.0 ^a
		12	4.0 ^a	4.0 ^a	4.0 ^a	4.0 ^a	4.0 ^a	4.0 ^a
		15	4.0 ^a	4.0 ^a	4.0 ^a	4.0 ^a	4.0 ^a	4.0 ^a
Uncapsul- ated	0.5	0	4.9 ^a	5.0 ^a	5.2 ^a	4.1 ^a	4.7 ^b	5.5 ^{ab}
		3	4.8 ^a	4.7 ^a	5.2 ^a	4.1 ^a	4.9 ^{ab}	5.5 ^{ab}
		6	5.0 ^a	4.9 ^a	5.5 ^a	4.3 ^a	4.9 ^{ab}	5.5 ^{ab}
		9	5.1 ^a	5.0 ^a	5.3 ^a	4.2 ^a	5.4 ^a	5.8 ^a
		12	4.7 ^a	4.9 ^a	5.4 ^a	4.3 ^a	4.9 ^{ab}	5.0 ^b
		15	5.2 ^a	5.2 ^a	5.4 ^a	4.3 ^a	4.8 ^b	5.5 ^{ab}
	1	0	5.8 ^a	5.5 ^a	5.9 ^b	4.5 ^a	6.1 ^a	6.3 ^a
		3	5.6 ^a	5.5 ^a	6.0 ^{ab}	4.6 ^a	6.4 ^a	6.4 ^a
		6	5.7 ^a	5.6 ^a	6.2 ^{ab}	4.6 ^a	6.1 ^a	6.0 ^a
		9	5.5 ^a	5.7 ^a	6.3 ^a	4.3 ^a	6.6 ^a	6.3 ^a
		12	6.0 ^a	5.5 ^a	6.1 ^{ab}	5.0 ^a	6.1 ^a	6.2 ^a
		15	5.7 ^a	5.5 ^a	6.2 ^{ab}	4.7 ^a	6.3 ^a	6.3 ^a
1.5	0	6.1 ^a	6.1 ^a	6.5 ^a	5.4 ^a	6.4 ^a	6.9 ^a	
	3	6.3 ^a	6.1 ^a	6.6 ^a	4.5 ^a	6.4 ^a	6.9 ^a	
	6	6.1 ^a	5.9 ^a	6.6 ^a	5.1 ^a	6.2 ^{ab}	6.7 ^{ab}	
	9	6.2 ^a	5.6 ^a	6.8 ^a	4.4 ^a	6.4 ^a	6.6 ^{ab}	
	12	6.2 ^a	6.0 ^a	6.6 ^a	5.1 ^a	6.2 ^{ab}	6.5 ^b	
	15	6.0 ^a	5.8 ^a	6.4 ^a	4.8 ^a	5.8 ^b	6.4 ^b	
2	0	6.7 ^a	6.7 ^a	7.0 ^a	5.6 ^a	6.3 ^{ab}	7.0 ^a	
	3	6.5 ^a	6.4 ^a	7.0 ^a	5.3 ^a	6.5 ^{ab}	7.0 ^a	
	6	6.7 ^a	6.7 ^a	7.0 ^a	5.5 ^a	6.5 ^{ab}	6.8 ^a	
	9	6.5 ^a	6.4 ^a	7.0 ^a	5.0 ^a	6.8 ^a	6.9 ^a	
	12	6.7 ^a	6.6 ^a	7.0 ^a	5.4 ^a	6.7 ^a	6.9 ^a	
	15	6.5 ^a	6.4 ^a	7.0 ^a	5.7 ^a	6.3 ^b	6.9 ^a	

(continued)

Treat- ment	Micro- capsule Concen- tration (%)	Storage period (day)	Sensory description					Overall
			Astringency	Bitterness	Color ³	Off-flavor	Viscosity	
Encap- sulated ²	0.5	0	3.9 ^a	4.0 ^a	4.1 ^a	3.8 ^{ab}	4.0 ^a	4.1 ^a
		3	4.1 ^a	3.7 ^b	4.2 ^a	3.6 ^b	3.9 ^a	4.0 ^{ab}
		6	4.1 ^a	4.0 ^{ab}	4.1 ^a	3.7 ^{ab}	4.0 ^a	4.1 ^a
		9	4.3 ^a	4.1 ^a	4.0 ^a	4.0 ^{ab}	3.9 ^a	3.8 ^b
		12	4.1 ^a	4.0 ^{ab}	4.2 ^a	4.1 ^a	4.0 ^a	4.1 ^a
		15	4.1 ^a	4.0 ^{ab}	4.1 ^a	4.0 ^{ab}	4.0 ^a	4.0 ^{ab}
	1	0	3.6 ^b	4.0 ^a	4.0 ^a	3.6 ^a	4.0 ^a	4.0 ^{ab}
		3	4.4 ^a	3.7 ^a	4.1 ^a	3.8 ^a	3.8 ^a	4.3 ^a
		6	4.2 ^{ab}	4.2 ^a	4.1 ^a	3.8 ^a	3.9 ^a	4.1 ^a
		9	4.3 ^a	4.0 ^a	4.2 ^a	3.8 ^a	4.1 ^a	3.9 ^{ab}
		12	4.2 ^a	4.1 ^a	4.3 ^a	4.1 ^a	4.0 ^a	3.8 ^b
		15	4.3 ^a	4.2 ^a	4.2 ^a	4.1 ^a	4.0 ^a	4.3 ^a
	1.5	0	4.3 ^a	4.6 ^a	4.3 ^a	4.1 ^a	4.0 ^a	4.5 ^a
		3	4.2 ^a	4.0 ^b	4.4 ^a	4.0 ^a	4.0 ^a	4.5 ^a
		6	4.5 ^a	4.4 ^{ab}	4.3 ^a	4.0 ^a	4.1 ^a	4.1 ^a
		9	4.4 ^a	4.0 ^b	4.5 ^a	4.0 ^a	4.1 ^a	4.5 ^a
		12	4.3 ^a	4.3 ^{ab}	4.3 ^a	4.1 ^a	4.0 ^a	4.2 ^a
		15	4.4 ^a	4.3 ^{ab}	4.5 ^a	4.1 ^a	4.0 ^a	4.5 ^a
2	0	4.6 ^a	4.6 ^a	4.5 ^a	4.0 ^a	4.2 ^a	4.8 ^a	
	3	4.5 ^a	4.3 ^a	4.5 ^a	3.9 ^a	4.1 ^a	4.5 ^a	
	6	4.7 ^a	4.4 ^a	4.3 ^a	4.0 ^a	4.0 ^a	4.4 ^a	
	9	4.7 ^a	4.6 ^a	4.7 ^a	3.9 ^a	4.0 ^a	4.7 ^a	
	12	4.2 ^a	4.3 ^a	4.3 ^a	4.0 ^a	4.2 ^a	4.4 ^a	
	15	4.7 ^a	4.7 ^a	4.3 ^a	4.3 ^a	4.0 ^a	4.7 ^a	

¹ Mean of triplicates. Means within column by the same letter are not significantly different (P<0.05).

² Microencapsulated chitoooligosaccharide by polyglycerol monostearate.

³ Milk in uncapsulated chitoooligosaccharide color is reddy-yellow.

⁴ The scale of sensory score ; 1=very slight, 2=slight, 3=slight-moderate, 4=moderate, 5=moderate-strong, 6=strong, 7=very strong

는 미세캡슐시 시유와 유의적 차이가 없었고 키토올리고당을 콜레스테롤이 제거된 우유에 첨가 시 키토올리고당의 농도가 증가할수록 점도도 증가하는 것으로 나타났으나 저장기간에는 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. Overall은 미세캡슐 시 1.5%농도까지 시유와 유의적 차이가 없었으며 2%농도에서는 1.5%보다 조금 높게 평가되었다. 키토올리고당을 우유에 첨가 시 overall은 농도가 증가할수록 관능적 평가는 시유와 유의적 차이를 나타내었다. 따라서 콜레스테롤을 제거한 우유에 미세캡슐을 첨가한 우유 0.5, 1, 1.5% 시유간의 관능검사 결과는 유의적 차이를 나타내지 않았다.

Lee 등⁽⁴²⁾의 보고에 의하면, PGMS를 coating material로 사용하여 L-ascorbic acid를 core material로 하여 100, 250ppm을 우유에 첨가하여 12일 저장한 후 관능 평가한 결과 5일까지는 유의적 차이가 없었으나 8일 이후에는 신맛과 이취가 조금씩 증가함을 나타냈다고 하였다. 본 실험에서 15일 이후에도 관능적 평가에 변함이 없는 이유는 Figs 10, 11의 결과와 같이 저장기간에 따라 미세캡슐의 유리량이 변화가 크지 않기 때문에 미세캡슐을 첨가한 시료의 관능적 변화가 없는 것으로 판단된다.

7. 동물 실험

키토올리고당이 랫트의 콜레스테롤 함량이 미치는 영향을 관찰하기 위하여 high fat diet로 8주간 사육하고 8주간 rodent purified diet와 미세캡슐한 키토올리고당 콜레스테롤이 제거된 우유에 첨가하여 섭취시킨 랫트의 체중 증가량, 사료의 섭취량, 총 콜레스테롤의 함량과 중성지질, HDL-cholesterol의 함량을 측정 한 결과를 Tables 25, 26에 나타내었다. 콜레스테롤이 제거된 우유에 키토올리고당이 첨가된 실험식이를 8주 동안 하루 평균 26.82g/day 섭취했으며 대조군은 우유와 함께 실험식이를 평균 22.81g/day 섭취했다. 랫트의 무게는 8주 동안 키토올리고당을 섭취한 그룹과 대조군 각각 131.40, 126.26g으로 나타났다.

HDL-cholesterol의 농도는 키토올리고당을 섭취한 그룹이 섭취하기 전보다 36.6mg/dl에서 63.7mg/dl로 27.1mg/dl이 증가하였고 같은 식이를 섭취하고 키토올리고당을 섭취하지 않은 대조군은 41.8mg/dl에서 53.3mg/dl로 11.5mg/dl 증가하였지만 키토올리고당을 섭취한 랫트 그룹의 HDL-cholesterol 농도가 15.6mg/dl 더 증가한 것으로 나타났다. 총콜레스테롤 농도는 키토올리고당을 섭취한 그룹은

120.8mg/dl에서 161.75mg/dl로 40.9mg/dl이 증가하였고 대조군은 105.8mg/dl에서 161.25mg/dl로 55.4mg/dl이 증가하였다. TG의 농도는 키토올리고당을 섭취한 그룹은 44.3mg/dl에서 47.6mg/dl로 3.3mg/dl이 증가하였고 대조군은 45.8mg/dl에서 51mg/dl로 5.2mg/dl이 증가하였다.

Lehoux와 Grongin⁽⁴³⁾의 보고에 의하면 2.5, 5, 7.5% 키토산을 sterol과 함께 3주

Table 25. Effects of experimental diets on food intake and body weight gain¹

Treatment	Food intake (g/day)	Body weight gain (g/8week)
Control ²	22.81 ^b	126.26 ^a
Chitooligosaccharide ³	26.82 ^a	131.41 ^a

¹ Rats were fed for 16 weeks. Means within column by the same capital letter are not significantly different (P<0.05).

² Milk with no chitooligosaccharide addition no cholesterol removal.

³ Chitooligosaccharide added cholesterol reduced milk. (50mg/day)

Table 26. Effects of experimental diets on the change of blood triacylglycerol, total cholesterol and high density lipoprotein in rats fed for 16weeks¹

Treatment	TotalCH		TG		HDL	
	Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final
	(mg/dL)					
Control ²	120.8 ^b	166.0 ^a	45.8 ^a	51.0 ^a	41.8 ^a	53.3 ^a
CO ³	105.8 ^b	160.4 ^a	44.3 ^a	47.6 ^a	36.7 ^b	63.7 ^a

¹ Means in a column with the same letter are not significantly different (P<0.05).

² Milk with no chitooligosaccharide addition no cholesterol removal.

³ Chitooligosaccharide added cholesterol reduced milk. (50mg/day)

간 랫트에게 섭취시킨 결과 sterol만 섭취시킨 랫트는 HDL-cholesterol이 감소하였고 키토산을 sterol과 함께 섭취시킨 랫트는 HDL-cholesterol이 증가하는 결과를 나타냈다. 그리고 Sugano 등⁽⁴⁴⁾의 보고에 따르면 20~40mesh 키토산을 2, 5, 10%를 첨가한 식이를 급여한 결과 5, 10% 첨가 급여군에 있어 총콜레스테롤 농도를 유의적으로 저하시키고 HDL-cholesterol을 증가시켰다는 결과를 보고하였다. 본 실험은 HDL-cholesterol이 증가하는 것은 위의 연구 결과들과 일치하였지만 총콜레스테롤과 중성지질이 감소되는 결과는 일치하지 않았다. 키토올리고당을 섭취했음에도 총콜레스테롤과 중성지질이 대조군과 변화가 없는 결과를 나타낸 것은 키토올리고당의 섭취량이 적은 것이 문제점으로 기인할 수 있다고 사료된다. 그러나 총콜레스테롤과 중성지질의 증가에도 불구하고 키토올리고당의 섭취 후 혈중콜레스테롤을 저하 시키는 기능이 있는 HDL-cholesterol이 증가하는 결과를 나타내었다.

제 2 절 수용성 isoflavone의 미세캡슐화에 관한 연구

1. 미세캡슐을 위한 coating material의 선정

다양한 coating material로 수용성 isoflavone을 미세캡슐화하여 그 캡슐을 우유에 첨가한 후 관능검사를 실시하였는데, 이때 coating material로 사용된 지방산 에스테르 자체가 이미와 이취를 나타내므로 관능적으로 우수한 coating material 7종류를 선정하여 예비실험을 실시하였으며, 사용한 지방산 에스테르의 형태와 특징을 Table 27에 나타냈다. 사용한 coating material 중에서 SFAN-20은 직경이 1-3 μm , MCT는 1~6 μm , 큰 입자는 7~10 μm 를 나타내었다. PGMS는 2~4 μm 로 그 크기가 측정되었는데, 비교적 SFAN-20과 PGMS는 입자의 크기가 고른 분포를 보인 반면, SFAN-85와 MCT는 큰 입자와 작은 입자 사이에 크기 차이가 크게 나타났다. 그리고 ESPR-25는 1 μm 이하의 크기를 나타냈으며 캡슐의 크기가 1 μm 이하인 경우는 고속으로 원심분리 하여도 고농도의 미세캡슐을 취할 수 없었다. 또한 수용성 isoflavone 캡슐을 위한 coating material 선정에 이들에 관능검사를 실시한 결과, 거의 모든 coating material이 싸이지 않고 남은 수용성 isoflavone에 의해 미세캡슐과 함께 우유에 첨가 되었을 때 저장기간이 길어짐에 따라 이미, 이취를 증가시켰다. 또한 ES-7, ES-95, SFAN-85는 우유에 첨가시 지방성분이 우유표면에 부유하는 현상을 나타내어 coating material로 부적당 하였으며, 그 이유는 친유기 비율이 80% 이상으로 탄소수가 많고 에스테르화 정도가 크기 때문으로 사료된다. 캡슐화 공정에서는 사용된 coating material이 유화제의 역할을 하므로 여러 고분자 화합물 중에서 기본적으로 피막형성능이 우수한 물질을 캡슐화를 위한 coating material로 선택해야한다.⁽¹⁴⁾ 그래서, 이상적인 coating material의 조건은 캡슐화 공정 중 조작성이 용이하고 우수한 유화력과 안정성, 가공과 저장 중 core material과 반응성이 적어야 하고 외부의 환경으로부터 core material을 보호할 수 있어야 하며 경제성이 우수해야 한다⁽¹⁵⁾. 이러한 점들을 고려하여 볼 때, PGMS와 MCT는 각각의 장단점이 있으나 가장 양호하게 평가되어, 수용성 isoflavone을 피복하는coating material로서 적합하여 본 실험에 사용하였다. 지금까지 수용성 isoflavone의 미세캡슐에 대한 연구자료는 없으나, 철분이나 DHA 등을 미세캡슐한 결과는 다음과 같다. Raul 등⁽⁴⁵⁾과

Table .27 Type and characteristics of fatty acid ester

Name	Composition	Type	HLB	Melting Point(°C)
SFAN-20	Sorbitan monolaurate	Liquid	7.5	-
SFAN-85	Sorbitan trioleate	Liquid	1.8	-
SFAN-25	Polyglycerine polyricinoleate	Liquid	-	-
ES-95	Glycerol monostearate	Solid	4.2	63-68
ES-7	Mono and diglyceride of stearate	Solid	3.2	59-60
MCT	Medium chain triglyceride	Liquid	-	-
PGMS	Decaglycerine monostearate	Liquid	14	-

Alexis 등⁽⁴⁶⁾은 철분 생이용성을 위해 phospholipids를, 조 등⁽⁴⁷⁾은 수용성 철분캡슐을 위해 sodium alginate를, Jackson과 Lee⁽⁴⁸⁾는 치즈의 철분강화를 위해 stearine 단일 coating material을 사용하였다. 그러나 단일 coating material보다 혼합 피복제를 사용하는 방법이 상승효과가 있다는 Sharareh 등⁽⁴⁹⁾은 혼합 피복제를 사용하기도 하였으며, 이 등⁽¹⁵⁾은 철분피복제로 ethyl cellulose와 methacrylic acid copolymer를 사용하였고, Khalida등⁽⁵⁰⁾은 probiotic bacteria를 alginate와 starch로 캡슐화 하여 요구르트에 첨가하였고, 장 등⁽³⁷⁾은 starch와 agar를 혼합하여 사용하였으며, 유화제 종류에 따른 수율 측정시 HLB(hydrophilic lipophilic balance) 값이 4.5인 SFAN-60을 첨가한 처리구는 92~98%로 나타났으며, HLB 값이 6.0, 8.0인 지방산 에스테르인 F-50, F-70을 첨가한 처리구는 62~89%로서 HLB 값이 높아짐에 따라 수율이 낮아지는 것으로

나타났다. Chang 등⁽⁵¹⁾은 DHA를 waxy corn starch로 어유를 미세캡슐화 하였는데, HLB가 15보다 높은 유화제는 친수성으로 수중유적형 에멀전을 안정화시키기 때문에 수율이 90% 이상으로 높은 반면, HLB가 5 이하인 유화제는 친유성으로 유중수적형 에멀전을 안정화시키기 때문에 수율이 50% 이하로 감소하였다고 보고하였다. 그러나 본 실험에 사용한 PGMS는 상온에서 흰색고체로 물의 양이 적을 경우 열을 가하여도 분사하기가 어려운 단점이 있어 적당량의 물을 첨가해 주어야 한다. 온도를 높여주면 점성이 있는 물질로 되는데 HLB 값이 14로 친수성이 강한 수중유적형으로 우유에 잘 분산되는 장점이 있고, HLB를 3에서 13까지 변화시킬 수 있기 때문에 O/W, W/O 유화제가 되어 여러가지 식품에 적용되며, 우유 색을 띠기 때문에 육안으로 구별이 어렵고 분산력이 우수한 것으로 알려져 있다. 또한 본 실험에서 수용성 isoflavone을 캡슐화 한 결과 입자가 직경 2~5 μm 로 미세크기를 나타내어 섭취에 양호하며 우유 속의 MFGM(milk fat globule membrane)의 크기와 유사하고 우유 고유의 빛깔을 유지함으로써 양호한 결과를 보여주었다.

2. 미세캡슐의 최적조건 결정

가. 미세캡슐을 위한 coating material의 비율

Coating material로 사용한 PGMS는 상온에서 고체이므로, Kwak 등⁽¹¹⁾의 보고에 따라 동량의 증류수를 혼합하여 80℃에서 5시간 가온하여 녹인 후 사용하였고, 혼합액의 효과적인 분사를 위해서 PGMS 3, 5, 10, 15, 20g에 50ml의 증류수를 혼합액에 첨가하였다. 한편, MCT는 상온에서 액체상태이기 때문에 증류수를 첨가하지 않은 상태에서 PGMS와 같은 비율로 사용하였다. Coating material의 비율에 의해서 수용성 isoflavone 미세캡슐화의 최적조건을 결정하기 위해 다양한 비율로 PGMS와 수용성 isoflavone을 혼합하여 미세캡슐한 결과를 Table 28에 나타내었다.

PGMS : 수용성 isoflavone의 비율이 5 : 1일 때는 미세캡슐의 수율이 43.4%, 10 : 1일 때는 61.8%, 15 : 1일 때는 67.2%, 20 : 1일 때는 50.0%로 각각의 비율에서 수율은 큰 차이가 없었으나 유의적 수준에서는 차이가 있었다. 수율이 15 : 1의

비율에서 가장 우수하였고, PGMS의 비율이 15 : 1보다 높아지거나 낮아지면 수율이 낮아지는 경향을 보였다. 이러한 결과는 조 등⁽⁴⁷⁾이 보고한 0.5% sodium alginate 사용시 80% 수율을 얻었고, 1% 사용할 때 90% 수율을, 3% 사용할 때 85% 수율을 얻어 coating material의 비율에 의해 달라졌지만 본 실험보다는 높은 수율을 얻은 것으로 보고되었다. 이 등⁽⁵²⁾의 보고에 의하면, sorbitan monooleate를 이용한 옥배경화유 미세캡슐화에서 3%를 사용한 경우 86%로 가장 좋은 수율을 나타내었으며, coating material의 비율이 낮거나 높아질수록 수율이 감소하는 것으로 나타났다. 또한 이 등⁽⁵³⁾의 보고에서는 유지방을 이용한 glucose의 미세캡슐화에서 Span-60과 Span-85를 혼합하여 사용한 캡슐보다 Span-60을 단독으로 사용한 캡슐에서 94%의 높은 수율을 나타내어 본 실험에 비해 우수한 수율을 나타내었다. 이 등⁽⁴⁷⁾은 whey protein을 coating material로 사용시 core material과의 비율이 1.5 : 1, 1.5 : 2, 1.5 : 3, 1.5 : 4, 1.5 : 5로 core material에 비해 coating material의 비율을 점차 증가시켰으며 1.5 : 1, 1.5 : 2의 비율에서는 95%의 수율을, 1.5 : 5의 비율에서는 85%의 수율을 얻어 본 실험에 비해 캡슐효과가 매우 우수한 것으로 보고 되었다. 또한 Kwak 등⁽¹¹⁾은 유당분해효소를 미세캡슐화 하였는데 coating material(PGMS)과 core material의 비율이 5 : 1일 때는 80.87%, 10 : 1일 때는 64.91%, 15 : 1일 때는 72%, 20 : 1일 때는 65.90%로 본 실험의 결과와는 조금 높은 수율을 나타내었다.

그러나, MCT로 β -galactosidase를 캡슐할 경우, coating material과 core material 비율이 5 : 1일 때 61.8%, 10 : 1일 때 74.7%, 15 : 1일 때 94.9%, 20 : 1일 때 97.6%로 coating material이 증가할수록 수율이 높아지는 경향을 보였으며, 본 실험의 비율인 10 : 1, 15 : 1, 20 : 1의 비율보다 약 40%정도 우수한 것으로 보고되었다. 한편 본 실험의 MCT를 coating material로 사용한 경우는 15 : 1의 비율이 74.5%로 가장 피복률이 좋은 것으로 판명되었다(Table 29).

Table 28. Yield of microencapsulation with different ratios of PGMS and water-soluble isoflavone

Ratio (w/v)		Yield (%)
PGMS ¹	Water-soluble isoflavone	
5	1	43.4
10	1	61.8
15	1	67.2
20	1	50

Means within column with different superscript letter differ (p<0.05).

Means of triplicate.

¹ Polyglycerine monostearate.

Table .29 Yield of microencapsulation with different ratios of MCT and water-soluble isoflavone

Ratio (w/v)		Yield (%)
MCT ¹	Water-soluble isoflavone	
5	1	60.3
10	1	67.1
15	1	74.5
20	1	71.6

Means within column with different superscript letter differ (p<0.05).

Means of triplicate.

¹ Medium-chain triglyceride

나. 미세캡슐을 위한 증류수의 영향

미세캡슐을 위한 PGMS와 수용성 isoflavone의 비율이 결정된 후 증류수 첨가량에 의한 미세캡슐의 수율을 측정하여 Table 30에 나타내었다. PGMS가 5g, 수용성 isoflavone이 1g일 때 첨가된 물의 양이 30ml일 때는 75%로 수율이 가장 높았으며, 40ml일 때는 69%, 50ml일 때는 70%, 60ml일 때는 67%, 70ml일 때는

52%로 수율이 점차적으로 감소하는 경향을 보였다.

임⁽⁵⁴⁾은 PGMS로 β -galactosidase를 미세캡슐시coating material과 core material의 비율을 15 : 1로 하고 PGMS와 증류수의 비율을 5 : 5, 5 : 4, 5 : 3, 5 : 2로 하였을 때 5 : 4에서 72.8%로 최고 수율을 나타냈으며, 5 : 2일 때 57.9%로 가장 낮은 수율을 나타내어 본 실험과 유사한 결과를 나타내었다. 첨가되는 물의 양이 30ml 이하일 때는 PGMS의 점성 때문에 spray gun으로 분사가 어려웠으며, 70ml 이상에서는 PGMS의 농도가 낮아져 원심분리에 의한 분리력과 캡슐화 능력이 다소 낮아지는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 유화액 제조시 피복물질의 점도가 높으면 혼합효과가 저하되고 점도가 낮으면 core material과 균일한 혼합물을 제조하기가 어려워 유화안정성이 낮아지는 것으로 사료된다.

Table 30. Yield of water -soluble isoflavone with different addition of distilled water

Ratio (w/v)			Yield (%)
PGMS	Water-soluble isoflavone	distilled water	
5	1	30	75
5	1	40	69
5	1	50	70
5	1	60	67
5	1	70	52

Means within column with different superscript letter differ(p<0.05).

Means of triplicate.

¹ Polyglycerine monostearate.

3. 저장기간에 의한 수용성 isoflavone의 유리

수용성 isoflavone은 우유 속에서 isoflavone 특유의 이미, 이취, 색깔의 변화를 유발하여 관능적으로 좋지 못한 첨가제로 인식되어져 왔다. 본 실험에서는 수용성 isoflavone을 미세캡슐화하여 저장기간의 경과에 따른 수용성 isoflavone의 유리량을 파악하여 관능적으로 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과를 Fig. 12에

나타냈다.

본 실험의 결과, 수용성 isoflavone 미세캡슐의 저장을 위한 최적온도는 4℃인 것으로 판단되며, 캡슐화 isoflavone을 우유에 첨가하여 유통기간과 저장온도를 생각한다면, 캡슐화 isoflavone을 우유에 첨가하여 유통기간 동안 이미, 이취 및 색깔의 변화문제가 발생하지 않아 안정할 것으로 사료된다.

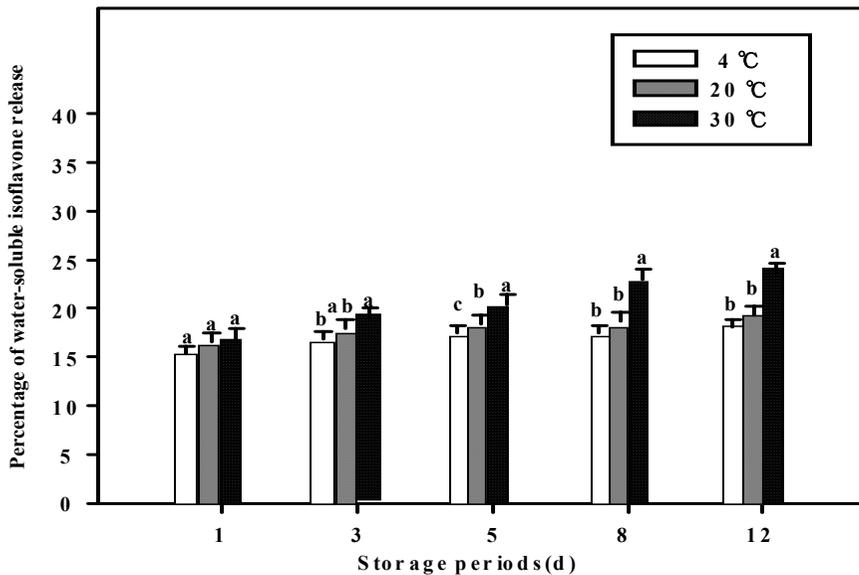


Fig. 12. Effect of different temperatures on water-soluble isoflavone release from microcapsules for 12 days.

Coating material : Polyglycerine monostearate

Core material : Water-soluble isoflavone

Each bar represents an average of three trials.

Error bar indicates a standard deviation and bar with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

4. 관능적 특성

수용성 isoflavone 미세캡슐을 우유에 첨가한 후 4℃에서 12일간 저장하면서 실시한 관능적 특성을 Table 31에 나타냈다. 쓴맛(bitterness)의 경우 저장기간

증가에 따른 변화는 모든 실험군에서 거의 없었다. 실험군간 차이도 저장 12일 간 크지 않았다. 이것은 수용성 isoflavone이 coating material의 시간경과에 따른 파괴에도 다른 이취를 생성하지는 않음을 의미하며, 우유 고유의 향미에 쓴맛에 대한 관능적 변화가 없음을 의미한다.

그리고 색깔(color)의 경우 isoflavone은 고유의 갈색을 띠고 있는 특성을 지니고 있어, 저장기간 증가에 따른 캡슐화 isoflavone의 색깔변화는 관능적으로 중요한 의미를 갖는다. 비캡슐화 isoflavone은 저장기간 증가에 따라 점차적으로 갈색을 띠는 것으로 평가 되었다. 특히 6일 저장 이후의 비캡슐화 isoflavone은 control에 비해 현저하게 갈색화되어 우유의 관능적 성질에 큰 유의차를 보인 반면, 캡슐화 isoflavone은 유관으로 판단하기 어려울 정도의 미묘한 유의차를 나타내었으며 9일 이후에는 관능적인 유의차를 약간 보였다. 이것은 저장기간이 길어짐에 따라 coating material의 파괴와 함께 우유 속에 녹아있던 isoflavone의 농도가 서서히 증가에 의한 것으로 사료된다.

콩비린내(bean flavor)의 경우는 비캡슐화 isoflavone의 경우는 저장 1일부터 control과 비교하여 현저하게 유의차를 보였으며, 저장기간이 증가함에 따라 콩비린내도 증가하였다. 한편, 캡슐화 isoflavone의 경우는 control과 비교하였을 때 약간의 유의차를 보였으나, 저장기간 증가함에 따라 서서히 증가하였으며, 저장 후 3일까지는 거의 변화가 없었으며 6일이 경과하면서 서서히 증가하는 추세를 보였으나, 제품의 상태를 크게 변화시키지는 못하였으며, 미약한 콩비린내는 coating material의 파괴에 기인하는 것으로 사료되며, 기존의 isoflavone의 콩비린내가 우유 200ml에 대해 약 20mg 수준으로 첨가한 경우 관능적으로 거의 이취를 느끼지 못하는 것으로 판단된다.

관능검사의 결과를 종합해보면, 캡슐화 isoflavone은 저장기간에 따라 쓴맛은 거의 변화가 없으며, 이제까지 첨가에 염려되었던 isoflavone 특유의 콩비린내와 색깔의 변화가 캡슐화함으로써 관능적으로 거의 control과 유의차를 보이지 않아 우유에 대한 캡슐화 수용성 isoflavone의 첨가가 유효한 것으로 사료된다.

Table .31 . Sensory score¹ of microencapsulated water-soluble isoflavone² fortified milk during storage at 4°C for 12 days³.

Sensory description	Condition of fortification	Storage period (day)				
		1	3	6	9	12
Beany flavor	Control	1.0 ^a	1.0 ^a	1.0 ^a	1.0 ^a	1.0 ^a
	Capsulated	1.7 ^c	2.0 ^b	2.1 ^b	2.4 ^{ab}	2.7 ^a
	Uncapsulated	4.3 ^b	3.9 ^c	4.7 ^{ab}	5.4 ^a	5.5 ^a
Bitter	Control	1.0 ^a	1.0 ^a	1.0 ^a	1.0 ^a	1.0 ^a
	Capsulated	1.17 ^a	1.3 ^b	1.5 ^{ab}	1.7 ^a	2.1 ^a
	Uncapsulated	1.5 ^b	1.4 ^b	2.2 ^{ab}	2.6 ^a	2.7 ^a
Color	Control	1.0 ^a	1.0 ^a	1.0 ^a	1.0 ^a	1.0 ^a
	Capsulated	1.4 ^c	1.6 ^c	2.1 ^b	2.5 ^{ab}	2.7 ^a
	Uncapsulated	4.9 ^c	5.3 ^b	5.6 ^a	5.45 ^{ab}	5.9 ^a

¹ The scale of each score; 1=none, 3=slight, 5=moderate, 7=strong, 9=very strong

² Coating material was PGM S.

³ Mean of duplicate. Means in a column without the same letter are not significantly different(P<0.05).

5. 미세캡슐의 안정성

가. 인공 위액에서 pH에 의한 미세캡슐의 안정성

미세캡슐화 isoflavone이 산성 영역의 pH와 소화효소 (pepsine)의 혼합물에 의해 유리되는 isoflavone량을 조사하기 위하여 시험관내 인공 위액을 제조하여 60분동안 반응시키면서 유리되는 isoflavone량의 측정결과를 Fig. 13에 나타내었다. 초기 반응시간 10분에는 모든 pH에서 유리된 isoflavone량이 3-5%로 매우 낮았으며, 반응 20분 후부터 유리되는 isoflavone량은 급격히 증가하였다. 즉 pH 3에서는 초기 0분에 3.5%였으나, 20분 후에는 14.73%로 4배 증가하여 유의적 차이가 분명하였으나 40분과 60분 후에는 유리된 isoflavone량이 20분 후에 유리된 양과 거의 유사하여 유의차가 없었다. pH 4에서는 방출된 isoflavone량이 초기 0분에는 4.53%였고, 반응 20분 후에는 0분 때와 방출된 isoflavone량이 유사하여 유의차가 없어 85%의 수율을 보였다. pH 5에서는 초기 0분에 3.03%였으나 시간이 지남에 따라 유리된 isoflavone량이 13, 14.2, 15.3%로 증가하여 시간마다 방

출된 isoflavone량은 유의차가 있었다. pH 6에서는 초기 0분에 3.66%였으나 시간이 지남에 따라 유리량이 증가하였으며, 유의적 수준에서도 시간마다 차이가 있는 것으로 나타났다.

조 등⁽⁴⁷⁾에 의한 sodium alginate를 coating material로 이용하여 제조된 동결 건조 페리틴 미세캡슐을 완충용액에 용해한 후 10% pepsin을 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 70% 정도의 철분이 용출되었다는 보고 보다 본 실험 결과에서 높은 수율을 얻었고, 10% pepsin에 의해 19.43%가 유리되었다는 김 등⁽³⁹⁾의 보고에서 보다도 더 높은 수율을 얻었다. PGMS로 캡슐화한 isoflavone을 섭취할 경우 위의 낮은 산성에서도 80%정도의 수율을 나타내는 것은 pepsin등 효소작용을 받지 않은 것으로 생각되며, 캡슐화된 isoflavone은 소장으로 유입 가능할 것으로 사료된다.

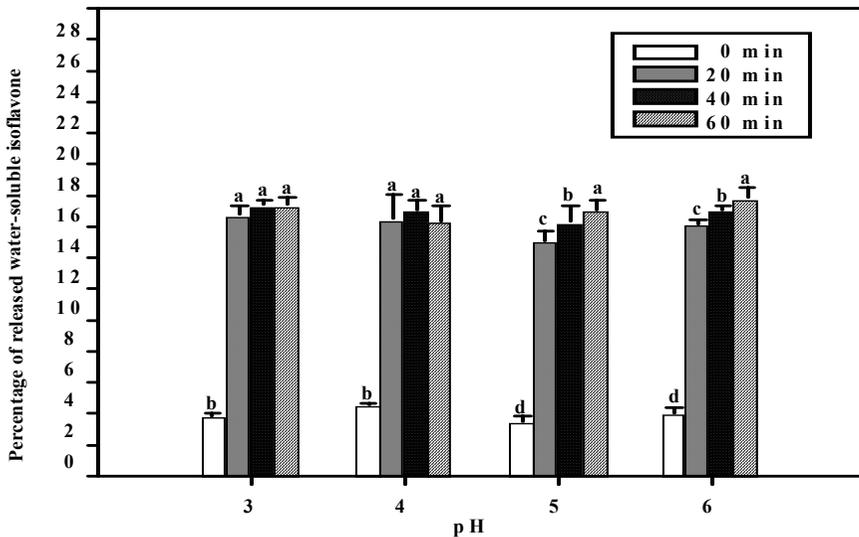


Fig. 13. Effect of different pH on water-soluble isoflavone release from microcapsules incubated at 37°C for 60 min *in vitro*.

Coating material : Polyglycerine monostearate

Core material : Water-soluble isoflavone

Each bar represents an average of three trials.

Error bar indicates a standard deviation and bar with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

나. 인공 소장액에서 pH와 효소에 의한 수용성 isoflavone 유리량

수용성 isoflavone의 coating material인 지방산에스터가 췌장에서 분비되는 lipase와 다른 활성 인자에 의해 분해되면, 소장의 상피세포내로 isoflavone이 쉽게 흡수되기 때문에 본 실험에서는 소화관과 유사한 환경인 시험관내에 소장액을 제조하여 반응 60분동안(20분간격) 방출되는 철분량을 측정하여 그 결과를 Fig. 6에 나타냈다. 유리된 isoflavone량을 측정한 결과, pH와 시간에 따라 isoflavone 방출량이 점차 증가하였는데, pH 5에서 0분일 때는 7.72%이며, 반응 60분 후에는 22.32%로 3배 이상, pH 6일때는 반응초기 7.62%에서 41.6%로 5배 이상, pH 7과 8에서는 반응초기 13.32, 11.0%에서 각각 95.66, 91.6%로 6배 이상으로 방출되는 isoflavone량이 증가하였으며, 반응시간과 pH에 따라 유리된 isoflavone량이 점차 증가하였다.

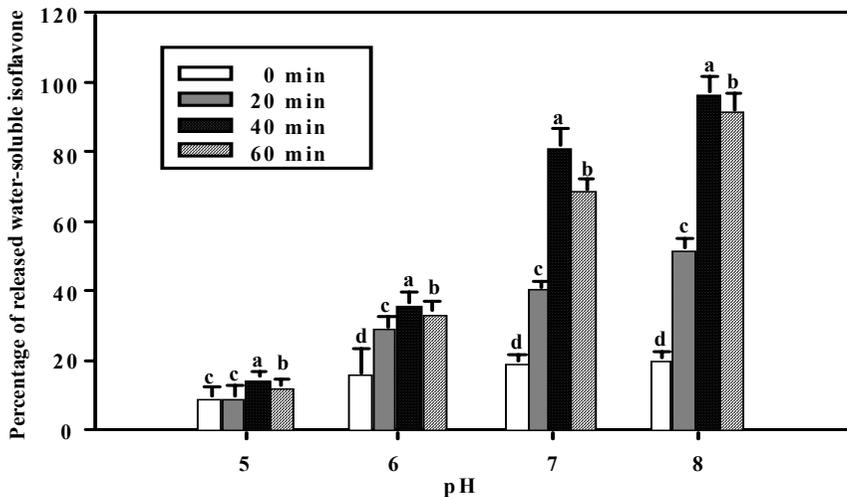


Fig. 14. Effect of different pH on water-soluble isoflavone release from microcapsules incubated stimulated intestinal condition *in vitro*.

Coating material : Polyglycerine monostearate

Core material : Water-soluble isoflavone

Simulated intestinal condition include enzymes such as lipase (5mg) and pancreatin (20mg), 37°C incubated for 60 min.

Each bar represents an average of three trials.

Error bar indicates a standard deviation and bar with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

Alginate로 lipophilic drugs를 캡슐화하여 intestinal media(pH 7.5) 75ml에 9g 용해하여 1시간 동안 유리된 양이 10% 미만이었고, 2시간 후 35%만이 유리되었다는 Antonio 등⁽⁵⁵⁾의 보고와 비교할 때 본 실험의 인공 소장액 조건에서 유리된 양은 3-9배나 되었다. 이렇게 증가한 이유는 소장의 pH는 보통 7-8이며 여러 종류의 소화효소가 소장에서 분비되는데 지방분해효소가 캡슐화 된 isoflavone을 유리하는데 영향을 주었을 것이라 생각된다. 캡슐화된 isoflavone을 섭취할 경우 90% 이상 isoflavone이 유리되어 소장의 상피세포에서 효과적으로 흡수가 일어날 것으로 사료된다. 이 등⁽⁵³⁾의 보고에 의하면, core material의 유리량은 coating material 및 core material과 깊은 연관성이 있으며, 특히 core material의 표면적의 영향이 클수록 유리량이 증가한다고 주장하는 반면, Thanoo 등⁽⁵⁶⁾은 chitosan 캡슐시 coating material 및 core material은 core material 유리에 관련성이 없는 것으로 주장하였다. 그러므로 본 실험에서 isoflavone 유리의 원인은 소화효소인 lipase가 pH 7-8 범위에서 활성화한 것으로 나타났다.

6. 동물실험

이소플라본이 랫트의 콜레스테롤 함량에 미치는 영향을 관찰하기 위해 high fat diet로 7주간 사육하고, 6주간 fat free diet와 미세캡슐한 이소플라본을 콜레스테롤이 제거된 우유에 첨가하여 섭취시킨 랫트의 체중증가량, 사료의 섭취량, 총 콜레스테롤 함량, 중성지질, HDL-cholesterol의 함량을 측정하여 Table 32, 33 에 나타내었다.

랫트의 식이섭취량을 볼 때, isoflavone을 섭취한 경우 23.85g/day, isoflavone을 섭취하지 않은 경우 19.21g/day로서 isoflavone을 섭취할 경우가 섭취하지 않았을 때 보다 4.64g/day 더 높았으며, 몸무게 증가량 또한 isoflavone을 섭취한 경우 107.93g/6week 로 isoflavone을 섭취하지 않았을 경우 (94.73g/6week)보다 13.20g/6week 더 높았다.

Table 32. Effects of experimental diet on food intake and body weight gain

Treatment	Food intake (g/day)	Body weight gain (g/6week)
Control	19.21 ^a	94.73 ^a
Isoflavone	23.85 ^a	112.58 ^a

1Rats were fed for 13weeks. Means with column by the same capital letter are not significantly different(P<0.05).

2Milk with no isoflavone addition no cholesterol removal.

3Isoflavone-added cholesterol-reduced milk. (10mg/day)

Table 33. Effect of experimental diets on the change of blood triacylglycerol, total cholesterol and high-density lipoprotein in rats fed for 13weeks

Treatment	Total CH		TG		HDL	
	Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final
	(mg/dL)					
Control	112.5 ^b	209.0 ^a	20.0 ^b	5.8 ^b	33.0 ^a	43.6 ^a
Isoflavone	124.6 ^b	174.1 ^a	38.3 ^a	7.0 ^b	31.6 ^a	41.6 ^a

1Means in a column with the same letter are not significantly different (P<0.05)

2Milk with no isoflavone addition no cholesterol removal

3Isoflavone-added cholesterol-reduced milk (10mg/day)

이 실험을 종합적인 결과에 의하면, PGMS 와 MCT로 수용성 isoflavone을 미세캡슐화하여 우유에 첨가 시 관능적으로 양호하여 섭취 시 골다공증 등의 질환을 예방 및 치료 할 수 있는 좋은 재료로 사료된다.

제 3 절 Phytosterol 에스테르화를 이용한 혈중 콜레스테롤 저하기능을 가진 체다치즈의 연구

1. Physterol의 에스테르화

불포화 지방산 또는 그의 에스테르 화합물이 포화 지방산 이나 그의 에스테르화 화합물보다 용점이 현저히 낮고 대부분이 실온에서 액상인 것을 이용하여 phytosterol을 불포화 지방산 메틸 에스테르화 반응시킴으로써 불포화 지방산으로 치환된 phytosterol 불포화지방산 에스테르 화합물을 제조하였으며 이는 액상 용액에 용해 가능하며 버터나 마아가린 등과 같은 고형 유제품에 첨가제로 사용될 수 있다. 메탄올을 이용하여 왁스 형태의 phytosterol 에스테르를 얻었으며 이때의 수율은 82% 였다. 이와 같은 실험방법으로 한 특허 결과에 의하면 메탄올을 이용한 침전방법으로 β -시토스테릴올레이트는 90%의 수율을 수득하였으며 메탄올/아세톤 혼합용매를 이용한 침전방법으로는 β -시토스테릴 올레이트를 51% 수율로 수득하였다고 보고하였다⁽⁵⁷⁾.

2. 콜레스테롤 제거율과 일반성분

Table 34. Mean chemical composition of cholesterol removal Cheddar cheese¹. (%)

Component	Control	Treatment ²	Treatment ³
Moisture	38.3 ^a	42.2 ^a	39.5 ^a
Fat	36.0 ^b	34.5 ^a	33.5 ^a
Protein	28.2 ^a	30.8 ^a	29.8 ^a
Choleaterol removal	0.0 ^a	91.2 ^c	92.1 ^c
Yield	10.5	12.5	11.0

¹Means within colum by the same capital letter are not significantly different (P<0.05)

²After cream separation, cream was treated with 10% β -CD and blended with skim milk at 1000 psi

³After cream separation, cream was treated with 10% β -CD and phytosterol-ester add

크림을 β -CD 처리하여 콜레스테롤을 제거한 후 제조한 Cheddar cheese의 콜레스테롤 제거율은 91.2%였으며, 수분함량은 43.2%, 조지방은 35.5%, 조단백질은 30.8% 와 같은 결과를 얻었다.

3. Cheddar cheese 지방산화도(TBA)변화

Phytosterol ester을 첨가한 Cheddar cheese의 숙성 중 지방산화도를 측정한 결과 다음의 Fig 15와 같다. 일반적인 Cheddar cheese인 control의 경우 숙성 0주에는 0.145에서 숙성 4주에는 0.142, 숙성 8주에는 0.144로 지방산화도가 대체로 일정하여 유의적 차이를 보이지 않았다. 반면에 β -CD를 이용하여 크림의

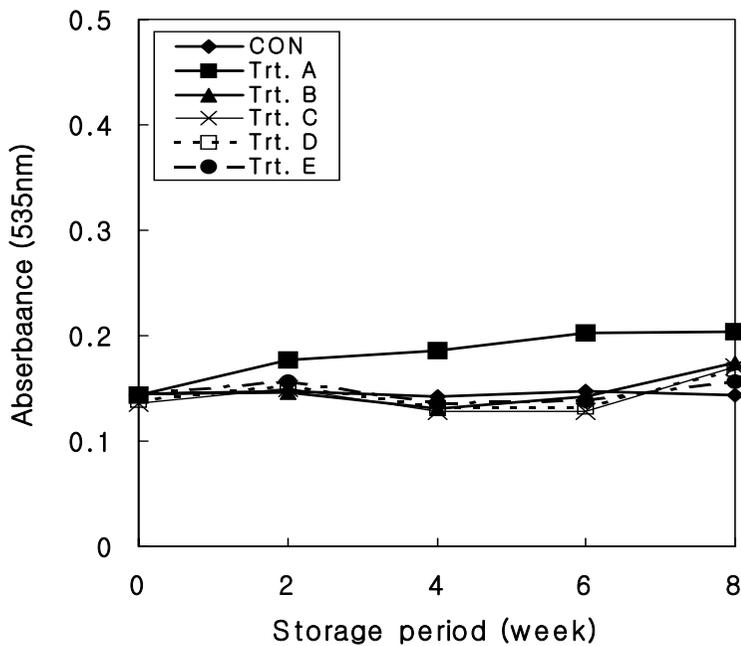


Fig 15. Change of TBA⁴ value at phytosterol-oliate added in Cheddar cheese ripened at 7°C for 8 weeks

²C: control,

³Trt A: cream was treated with 10% β -CD

⁴Trt B, ⁵Trt C, ⁶Trt D, ⁷Trt E: cream was treated with 10% β -CD and 2, 4, 6, 8% phytosterol ester added

cholesterol을 제거한 후 Cheddar cheese를 제조 한 실험군은 숙성 0주에는 0.144로 control과 유사한 수치를 나타내었으나 숙성 4주에서부터는 0.18, 숙성 8주에는 0.204로 숙성이 진행될수록 지방산화도(TBA)가 높아지는 결과를 얻었다. β -CD를 이용하여 cholesterol을 제거한 후 phytosterol ester을 첨가한 Cheddar cheese에서는 2% 첨가 시 숙성 0주에는 0.144에서 숙성 4주에는 0.131, 숙성 8주에는 0.174로 4% 첨가 시 숙성 0주에는 0.136에서 숙성 8주에는 0.167로 증가되었으며 6% 첨가 시 숙성초기에 0.138에서 0.168, 8% 첨가 시엔 0.145에서 0.167로 증가되었으며 control과 같은 경향을 보이며 증가하였다. 그러나 β -CD만 처리한 실험군에서는 다른 실험군들과 비교하여 숙성될수록 지방산화도가 높게 측정되었다. 이는 β -CD 처리 시 어떠한 변화로 인하여 지방산화를 촉진시키는 것으로 사료된다. 또한 phytosterol ester의 첨가로 지방산화도 변화를 지연시키는 것으로 나타났다.

4. Short-chain fatty acids 변화

Short-chain fatty acid($C_4 \sim C_{10}$)는 Cheddar cheese의 향미 성분에 중요한 성분 중의 하나이다⁽⁵⁸⁾. 이 실험에서는 phytosterol-ester을 Cheddar cheese에 강화하여 숙성동안에 short-chain fatty acid의 생성에 관한 것을 관찰한 것으로 그 결과는 Table 35에서와 같다. Cheese가 숙성하면서 생성되는 저급유리지방산의 C_4 , C_6 , C_8 , C_{10} 의 각 성분들은 숙성이 기간이 지남에 따라 증가되며 이들의 총 저급지방산은 아무것도 첨가하지 않은 control에서 숙성 0주에는 78.4ppm에서 4주에는 85.8ppm, 8주에는 90.5ppm으로 증가하였으나 유의적 차이를 나타내지는 않았다. 그러나 β -CD 처리한 실험군에서는 숙성 0주에 78.5ppm에서 4주에는 90.1ppm, 숙성 8주에는 103.5ppm으로 증가되었다. 또한 phytosterol ester 첨가한 cheese의 경우에도 2% 첨가 시 숙성 0주에 82.6ppm에서 숙성 마지막 단계인 8주엔 104.4ppm, 4% 첨가 시 숙성 0주에 90.1ppm에서 113.4, 6% 첨가 시 89.6ppm에서 112.6ppm, 8% 첨가한 cheese의 경우 83.7ppm에서 숙성 8주에는 113.8ppm으로 모두 숙성됨에 따라 증가되는 것을 볼 수 있었다. Control cheese의 보다 β -CD 처리한 cheese의 저급지방산의 증가량이 높았으며 phytosterol ester을 첨가하여

Table 35. Concentrations of short-chain fatty acids in phtoesterol ester
Cheddar cheese ripened at 5°C for 8 weeks¹

Treat- ment	Ripening period (mo)	FFA concentration (ppm)				
		C4	C6	C8	C10	Total
C ²	0	18.8 ^{ab}	17.2 ^a	22.6 ^a	19.8 ^a	78.4 ^a
	2	19.4 ^a	16.5 ^a	24.1 ^{ab}	24.3 ^a	83.4 ^a
	4	19.6 ^a	16.9 ^a	23.6 ^a	28.4 ^b	85.8 ^a
	6	21.3 ^a	17.5 ^a	24.7 ^{ab}	26.9 ^{ab}	89.0 ^a
	8	22.0 ^a	17.3 ^a	24.9 ^{ab}	26.3 ^{ab}	90.5 ^{ab}
Trt A	0	19.3 ^a	16.9 ^a	21.9 ^a	20.4 ^a	78.5 ^a
	2	22.7 ^a	17.3 ^a	22.1 ^a	24.9 ^a	87.0 ^a
	4	22.9 ^a	18.6 ^a	22.9 ^a	25.7 ^{ab}	90.1 ^{ab}
	6	23.6 ^a	18.2 ^a	24.2 ^{ab}	26.3 ^{ab}	92.3 ^{ab}
	8	27.8 ^b	19.6 ^a	26.3 ^a	29.3 ^b	103.3 ^c
Trt B	0	20.6 ^a	18.3 ^a	22.3 ^a	21.4 ^a	82.6 ^a
	2	21.3 ^a	18.7 ^a	22.9 ^a	21.9 ^a	84.8 ^a
	4	22.9 ^{ab}	19.3 ^a	24.6 ^{ab}	23.6 ^a	90.4 ^{ab}
	6	25.8 ^b	20.4 ^{ab}	25.7 ^{ab}	22.7 ^a	94.6 ^{ab}
	8	28.1 ^c	22.4 ^{ab}	27.6 ^b	26.3 ^{ab}	104.4 ^c
Trt C	0	21.3 ^a	20.7 ^{ab}	23.4 ^a	24.7 ^a	90.1 ^{ab}
	2	22.6 ^a	21.6 ^{ab}	24.9 ^a	25.9 ^{ab}	95.0 ^b
	4	22.3 ^a	21.4 ^{ab}	26.7 ^{ab}	26.3 ^{ab}	96.7 ^b
	6	24.9 ^{ab}	23.1 ^{ab}	27.0 ^b	28.3 ^b	103.3 ^c
	8	26.3 ^b	24.0 ^{ab}	29.6 ^b	33.5 ^c	113.4 ^c
Trt D	0	22.9 ^a	20.4 ^a	22.4 ^a	23.9 ^a	89.6 ^a
	2	22.1 ^a	21.6 ^a	23.6 ^a	25.1 ^a	92.4 ^{ab}
	4	23.6 ^a	22.4 ^{ab}	25.8 ^{ab}	25.9 ^{ab}	97.7 ^b
	6	24.8 ^a	22.2 ^{ab}	27.3 ^b	27.1 ^{ab}	101.4 ^c
	8	26.7 ^b	25.9 ^b	30.1 ^b	29.9 ^b	112.6 ^c
Trt E	0	19.6 ^a	18.2 ^a	22.5 ^a	23.4 ^a	83.7 ^a
	2	20.8 ^a	19.6 ^a	24.6 ^{ab}	24.7 ^a	89.7 ^a
	4	22.6 ^a	20.7 ^a	24.8 ^{ab}	25.0 ^{ab}	93.1 ^{ab}
	6	24.9 ^{ab}	23.9 ^a	28.0 ^b	26.8 ^{ab}	103.6 ^c
	8	27.7 ^b	25.5 ^b	30.5 ^b	30.1 ^{ab}	113.8 ^c

¹Means within column by the same capital letter are not significantly different (P<0.05)

²C: control, ³I: iron added, ⁴MI: microencapsulated iron added

⁵MIUC: microencapsulated iron and uncapsulated vitamin C added

⁶MIMC.: microencapsulated iron and microencapsulated vitamin C added

도 지방산의 함량에는 변화가 없었다. 또한 phytosterol ester의 첨가량을 달리 하여도 저급지방산에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 저급지방산은 cheese의 숙성과 관련하여 숙성이 진행될수록 저급지방산이 증가하게 된다. 위의 실험의 결과로 β -CD를 처리하여 제조한 Cheddar cheese는 control에 비하여 저급지방산의 변화가 커 숙성이 빨리 진행됨을 알 수 있으며 phytosterol ester을 첨가는 cheese의 숙성에 영향을 끼치지 않는다. Kwak⁽⁵⁾ 등은 β -CD를 이용하여 cream의 cholesterol을 제거한 Cheddar cheese를 5°C에서 7개월간 숙성하였으며 저급지방산의 변화가 control은 74.5ppm에서 83.5ppm으로 증가하였고 같은 숙성 기간동안 cream 처리 실험군에서는 80.8ppm에서 98.1ppm으로 크게 증가한다고 보고하여 위의 실험과 유사한 결과를 얻었다.

5. Neutral volatile compounds 변화

Cheddar cheese의 주요성분들이 효소작용을 받거나 미생물에 의해 또는 화학적 전환경로를 통하여 free fatty acids, esters, aldehydes, alcohols, ketones 및 sulfur compounds 등을 생성하게 되며, 이들이 Cheddar cheese의 향미를 결정하는 주요 성분들로 알려져 있다^(24, 25, 28). Phytosterol ester를 첨가한 Cheddar cheese를 숙성시키는 동안 생성되는 neutral volatile compounds의 분석결과를 Table 36에 나타내었다. 향미의 주요 각 성분들은 acetaldehyde, acetone, 2-butanone, ethanol, 2-heptanone으로 나타났다. Acetaldehyde의 경우 β -CD 처리한 실험군에서는 0.14ppm에서 0.52ppm으로 생성량이 증가 되었으며 phytosterol ester 2% 첨가 시 0.09ppm에서 0.40ppm, 4% 첨가 시 0.11ppm에서 0.39ppm, 6% 첨가 시 0.12ppm에서 0.45ppm, 8% 첨가 시 0.19ppm에서 0.52ppm으로 숙성이 진행됨에 따라 증가하였다. 특히 숙성 4주부터는 그 생성량이 급격히 증가되는 것을 볼 수 있었다. Control에서도 0.06ppm에서 0.22ppm으로 증가되었으나 각각의 실험군들 간에 차이를 나타내지 않았다. 또한 acetone과 2-Butanone, 2-heptanone의 경우에서도 control과 각각의 실험군마다 유의적 차이를 나타내지 않았으며 숙성기간에 따른 향미 성분의 생성량에도 변화가 없었다. 그러나 ethanol은 control에서는 3.08ppm에서 20.62ppm로, β -CD 처리 실험

Table 36. The production of neutral volatile flavor compounds in phytosterol ester Cheddar cheese ripened at 5°C for 8 weeks¹

Treat-ment	Ripening period (mo)	acet-aldehyde	acetone	2-buta-none	ethanol	2-hepta-none
		(ppm)				
C ²	0	0.06 ^a	7.01 ^a	1.09 ^a	3.02 ^a	2.54 ^a
	2	0.18 ^a	6.82 ^a	1.16 ^a	4.36 ^a	2.13 ^a
	4	0.19 ^a	6.98 ^a	1.19 ^a	5.02 ^a	2.56 ^a
	6	0.17 ^a	7.05 ^a	1.12 ^a	16.34 ^b	2.72 ^a
	8	0.22 ^b	7.12 ^a	1.17 ^a	20.62 ^c	2.86 ^a
Trt A ³	0	0.14 ^a	6.93 ^a	1.12 ^a	4.56 ^a	2.41 ^a
	2	0.26 ^a	7.23 ^a	1.16 ^a	15.36 ^{ab}	2.63 ^a
	4	0.29 ^a	7.25 ^a	1.18 ^a	26.71 ^{ab}	2.53 ^a
	6	0.35 ^{ab}	7.32 ^a	1.26 ^a	33.98 ^b	2.75 ^a
	8	0.52 ^{ab}	7.41 ^a	1.41 ^a	58.63 ^c	2.68 ^a
Trt B ⁴	0	0.09 ^a	6.95 ^a	1.04 ^a	12.52 ^a	2.13 ^a
	2	0.17 ^a	7.23 ^a	1.17 ^a	23.45 ^a	2.44 ^a
	4	0.31 ^a	7.56 ^a	1.26 ^a	29.67 ^a	2.48 ^a
	6	0.36 ^a	7.24 ^a	2.54 ^{ab}	49.21 ^{ab}	2.53 ^a
	8	0.40 ^{ab}	7.87 ^a	2.36 ^a	63.39 ^c	2.98 ^a
Trt C ⁵	0	0.11 ^a	7.11 ^a	1.11 ^a	5.02 ^a	2.03 ^a
	2	0.16 ^a	6.39 ^a	1.20 ^a	19.56 ^a	2.45 ^a
	4	0.27 ^a	6.98 ^a	1.19 ^a	27.60 ^{ab}	2.58 ^a
	6	0.35 ^{ab}	7.20 ^a	1.36 ^a	39.11 ^b	2.96 ^a
	8	0.39 ^{ab}	7.24 ^a	1.59 ^a	50.57 ^c	3.47 ^a
Trt D ⁶	0	0.12 ^a	7.12 ^a	1.16 ^a	16.99 ^a	1.19 ^a
	2	0.23 ^a	7.03 ^a	1.24 ^a	27.15 ^a	2.41 ^a
	4	0.35 ^a	7.56 ^a	1.34 ^a	29.03 ^a	2.87 ^a
	6	0.36 ^{ab}	7.47 ^a	2.31 ^a	48.77 ^{ab}	3.95 ^a
	8	0.45 ^c	7.59 ^a	2.04 ^{ab}	68.65 ^c	2.86 ^a
Trt E ⁷	0	0.09 ^a	7.14 ^a	1.17 ^a	14.02 ^a	2.68 ^a
	2	0.17 ^a	7.16 ^a	1.24 ^a	25.73 ^a	2.92 ^a
	4	0.33 ^a	7.26 ^a	1.33 ^a	29.65 ^a	3.45 ^a
	6	0.36 ^a	7.28 ^a	1.59 ^a	57.32 ^b	2.76 ^a
	8	0.52 ^{ab}	7.30 ^a	2.36 ^{ab}	85.37 ^c	2.98 ^a

¹Means within column by the same capital letter are not significantly different (P<0.05)

²C: control, ³Trt A: cream was treated with 10% β -CD

⁴Trt B, ⁵Trt C, ⁶Trt D, ⁷Trt E: cream was treated with 10% β -CD and 2, 4, 6, 8% phytosterol ester added

군은 4.56ppm에서 58.63ppm으로, phytosterol ester 첨가한 실험군에서는 14.02ppm에서 85.27ppm으로 증가하였다. 그러나 control보다는 phytosterol ester 첨가군과 β -CD 첨가군에서의 증가량이 크게 나타났다. 또한 β -CD에 의해 cholesterol 제거된 Cheddar cheese에서의 휘발성 향미성분의 측정결과 숙성 3개월 이후에 acetaldehyde의 급격한 생성과 ethanol의 생성량이 크게 증가되었음을 보여준다.

임 등⁽⁵⁷⁾은 혼합균주로 제조한 호상요구르트의 향미성분을 분석한 결과 요구르트의 향미를 유지하는 충분한 휘발성 향미성분을 생성한다고 보고하였다. 위 실험의 결과 β -CD 처리 실험군과 phytosterol ester 첨가군에서의 acetaldehyde와 ethanol의 생성량이 control보다 많은 것으로 나타났으며 phytosterol의 첨가량이 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

6. 아미노산 측정

Phytosterol ester를 첨가한 Cheddar cheese의 숙성기간동안 유리된 아미노산 측정 결과는 Table 37과 같다. 유리 아미노산은 control에서보다 β -CD 처리한 실험군과 phytosterol ester 첨가군에서 높게 나타났다. 또한 control을 제외한 각각의 실험군 모두에서 8주까지의 숙성이 진행되면서 유리아미노산 생성이 많아졌다. 숙성기간이 지남에 따라 쓴맛을 내는 유리아미노산이 생성되는데 이 실험의 결과 β -CD 처리군에서 phenylalanine이 처음 숙성 0주에는 2.3 $\mu\text{mol/ml}$ 에서 숙성 8주째에는 25.7 $\mu\text{mol/ml}$ 이 생성되었으며 8% phytosterol ester 첨가군에서도 처음 숙성 0주에는 2.6 $\mu\text{mol/ml}$ 에서 8주에는 25.7 $\mu\text{mol/ml}$ 으로 증가하였다. 또한 leucine, valine의 생성량도 숙성됨에 따라 증가되었다. Phytosterol ester 첨가군 경우 leucine의 생성량은 처음 0주에는 0.9 $\mu\text{mol/ml}$ 에서 8주에는 29.1 $\mu\text{mol/ml}$ 으로 증가되었으며 valine은 처음에 1.4 $\mu\text{mol/ml}$ 에서 24.6 $\mu\text{mol/ml}$ 으로 수치가 변하였다. 그러나 이와 같은 현상이 β -CD처리한 실험군과 phytosterol ester 첨가군에서만 볼 수 있었으며 이는 control보다 빨리 숙성되었다. Kwak 등⁽⁵⁾이 β -CD 처리한 크림으로 제조한 콜레스테롤 제거 치즈에서 숙성 기간동안의 쓴 아미노산 생성이 아무것도 처리하지 않은 control보다 월등히 높게 나타났다고 보고하였다.

Table 37. Comparison of free amino acid production in phytosterol ester added Cheddar cheese ripened at 5°C for 8 weeks

Treatment	Ripening period (week)	Asp	Gu	Ser	His	Gly	Thr	Arg	Ala
C	0	1.7	3.0	0.8	–	0.4	1.2	0.1	1.5
	2	3.5	12.4	1.6	–	2.4	1.5	2.5	2.6
	4	4.6	16.5	1.7	0.2	2.9	1.8	2.8	4.0
	6	4.8	25.4	2.4	0.5	3.5	2.0	2.8	4.5
	8	6.3	25.9	2.6	0.6	4.0	2.3	2.7	5.4
Trt A	0	1.9	3.2	0.5	–	0.2	1.3	–	1.3
	2	3.0	16.7	1.3	0.1	2.9	2.9	2.6	4.7
	4	4.8	25.0	3.6	0.6	3.5	3.5	2.7	7.4
	6	5.2	36.9	5.7	0.7	3.9	4.7	3.6	10.9
	8	9.3	41.5	7.7	0.7	4.8	6.8	4.0	11.4
Trt B	0	1.6	4.2	0.4	–	0.1	1.4	0.2	1.6
	2	2.5	25.1	1.7	–	1.6	3.0	2.9	4.7
	4	3.7	26.8	2.5	0.4	2.9	2.9	3.6	5.9
	6	4.8	34.7	5.7	0.5	3.8	6.7	4.0	12.4
	8	8.1	49.5	8.9	0.8	4.0	7.9	3.9	12.9
Trt C	0	1.4	3.5	0.6	–	0.3	1.6	–	1.4
	2	2.6	16.5	1.2	0.2	1.3	3.5	0.2	5.3
	4	3.5	23.9	2.0	0.6	1.2	4.0	3.6	7.8
	6	3.9	32.4	4.5	0.6	2.4	4.8	3.4	9.6
	8	7.6	49.5	8.2	0.9	4.9	8.8	4.4	10.2
Trt D	0	1.7	3.5	0.5	0.1	0.2	1.4	0.1	1.3
	2	3.2	12.5	1.5	0.5	1.6	3.7	2.1	4.0
	4	4.0	22.7	3.6	0.6	1.9	5.2	3.9	6.3
	6	5.8	36.8	4.0	0.8	2.6	6.9	4.2	9.7
	8	6.9	47.5	4.9	0.7	4.7	7.8	3.8	13.4
Trt E	0	1.7	3.1	0.7	–	0.3	1.2	0.3	1.4
	2	3.3	15.7	1.5	0.4	3.6	2.6	2.5	4.3
	4	4.1	26.5	2.7	0.6	4.5	4.7	3.4	6.8
	6	5.3	33.8	3.5	0.6	5.5	5.0	4.7	12.4
	8	6.7	46.2	4.9	0.8	6.8	6.8	4.8	13.5

(continued)

Treatment	Ripening period (week)	Tyr	Met	Val	Phe	Ile	Leu	Lys
C	0	0.5	0.2	1.4	2.2	0.5	2.3	3.0
	2	1.0	1.2	7.9	7.4	2.4	14.7	5.8
	4	1.0	1.6	12.4	9.3	2.9	16.2	13.5
	6	1.0	1.7	16.8	10.6	3.6	25.3	18.6
	8	0.9	2.3	16.7	12.7	3.5	26.7	18.0
Trt A	0	0.5	0.3	1.4	2.3	0.4	2.7	2.6
	2	1.0	1.4	12.3	4.6	16.7	24.1	16.5
	4	1.0	2.6	14.7	18.9	26.4	25.3	25.0
	6	1.0	3.9	19.0	21.6	28.5	25.6	32.7
	8	1.0	4.2	21.7	25.7	29.3	38.5	36.8
Trt B	0	0.3	0.2	1.9	2.6	0.1	1.9	2.1
	2	0.4	1.1	16.4	5.7	13.4	21.4	22.5
	4	0.9	2.4	17.3	9.8	15.7	26.7	26.8
	6	0.9	2.7	19.5	16.7	20.4	25.9	35.6
	8	1.2	5.3	22.1	25.0	26.9	30.5	40.1
Trt C	0	0.5	0.5	1.4	1.9	0.5	2.1	3.0
	2	1.2	1.1	12.6	12.5	16.3	23.5	19.5
	4	1.0	1.5	13.4	18.4	14.5	25.1	20.6
	6	1.0	2.6	12.8	23.5	25.7	29.8	28.9
	8	1.3	6.8	16.4	26.7	29.6	33.0	34.5
Trt D	0	0.6	0.2	1.8	1.8	0.6	2.5	2.6
	2	1.5	1.3	16.7	16.5	18.7	23.5	11.5
	4	1.4	1.9	17.9	15.8	25.9	26.1	25.9
	6	1.0	2.4	22.5	25.7	30.6	35.6	27.9
	8	1.6	2.6	26.4	26.8	32.5	40.0	45.2
Trt E	0	0.4	0.6	1.4	2.6	0.4	0.9	2.8
	2	1.0	1.5	12.5	15.8	23.5	16.4	23.5
	4	1.0	1.7	10.3	23.5	24.7	19.8	34.5
	6	1.6	2.6	21.4	24.8	33.6	25.7	33.7
	8	1.5	4.9	24.6	25.7	32.5	29.1	41.0

¹Means within column by the same capital letter are not significantly different (P<0.05)

²C: control, ³Trt A: cream was treated with 10% β -CD

⁴Trt B, ⁵Trt C, ⁶Trt D, ⁷Trt E: cream was treated with 10% β -CD and 2, 4, 6, 8% phytosterol ester added

7. Rheological 측정

Cheddar cheese의 물성을 측정하기 위해 Rheometer을 사용하여 hardness, elasticity, cohesiveness, gumminess, chewiness를 측정하였으며 그 결과는 Table 38에 나타내었다. 치즈의 경도(hardness)를 측정한 결과 control에서는 숙성 기간에 따른 유의적인 차이는 없었다. 그러나 β -CD를 처리한 cheese의 경우 숙성 0주에는 1194.5에서 2주 후에는 1993.0으로 증가되었으나 4주째부터는 1257.2, 6주에는 1154.7, 8주에는 1067.6으로 큰 차이를 나타내지 않았다. 2% Phytoesterol ester을 첨가한 cheese의 경우에서도 숙성 0주에는 1542.6,에서 숙성 2주에는 2123.4로 증가되며 4주 숙성 후부터는 유의적 차이를 나타내지 않았다. 또한 각각의 cheese에 4%, 6%, 8% phytosterol ester의 첨가량은 hardness에 영향을 미치지 않았으며 모든 실험군에서 숙성 2주 째에 hardness가 증가하였고 그 후부터는 큰 차이를 나타내지 않았다. 탄력성(elasticity)은 모든 실험군간에서 같은 경향을 보이며 유의적 차이를 나타내지 않았으나 β -CD처리한 실험군은 다른 실험군에 비교하여 낮은 수치를 나타내어 elasticity가 좋지 않은 것을 볼 수 있다. 응집성(cohesiveness)의 경우 control의 경우 숙성 0주에는 77.3에서 4주째에 88.3, 8주째에는 92.4로 증가하였다. Phytosterol ester을 2% 첨가 한 실험군은 0주에는 77.2에서 4주에는 91.5, 8주에는 88.6으로 증가하였다가 다시 감소하는 것을 볼 수 있었다. 4% phytosterol을 첨가한 실험군에서는 숙성 0주에 72.6, 4주에 82.6, 8주에는 90.6이며 8% phytosterol 첨가한 실험군에도 숙성 0주에 75.8, 4주에 82.4, 숙성 8주에는 79.5로 4주째까지 증가하였다가 다시 감소되는 것을 볼 수 있었으며 β -CD 처리한 실험군에는 다른 실험군과 비교하여 비교적 높은 수치를 나타내었나 같은 경향을 보였다. Gumminess와 chewiness는 모든 실험군에서 높은 수치를 나타내었으며 모두 숙성 0주에서부터 4주 째까지는 증가하였다가 감소하는 경향을 보였다. 따라서 phytosterol을 첨가 시 control과 비교하여 물성이 크게 변하지 않는 것을 알 수 있었으며 phytosterol ester의 첨가량에도 영향을 받지 않는 것을 관찰하였다. Kwak의 연구에도 β -CD를 이용하여 크림에 콜레스테롤을 제거하여 제조한 Cheddar cheese를 7개월간 저장 실험에서 물성 측정 결과 hardness의 경우 1숙성 1개월에 높은 수치를 보이다가 감

Table 38. Textural properties in phytosterol ester Cheddar cheese at 5°C for 8 weeks¹

Treat-ment	Ripened (week)	hard-ness	elasti-city	cohesi-veness	gummi-ness	chewi-ness
C	0	982.2	94.6	77.3	356.4	338.4
	2	2321.0	87.9	77.1	522.6	459.1
	4	1257.2	89.6	88.3	341.5	362.2
	6	1154.7	90.1	85.1	362.4	528.3
	8	1067.6	89.6	92.4	454.7	322.7
Trt A ²	0	1194.5	76.2	91.4	307.3	296.0
	2	1993.0	76.3	93.2	416.8	401.5
	4	1251.2	86.3	106.9	547.6	421.6
	6	1220.6	84.5	103.5	577.6	433.0
	8	1352.5	85.3	91.6	623.4	398.8
Trt B ³	0	1542.6	85.3	77.2	385.7	306.48
	2	2123.4	86.2	75.9	421.6	526.9
	4	1663.2	86.4	91.5	495.3	455.2
	6	2125.3	96.9	89.5	512.3	421.7
	8	1688.6	92.7	88.6	577.2	332.9
Trt C ⁴	0	1168.5	85.1	72.6	416.9	316.9
	2	1352.8	73.2	78.5	421.0	402.6
	4	1745.9	95.9	82.6	573.6	421.6
	6	1885.2	98.0	97.8	663.2	398.5
	8	1685.3	92.9	90.6	642.1	348.9
Trt D ⁵	0	1274.6	79.2	74.9	400.2	434.8
	2	1523.6	82.6	78.5	413.6	528.6
	4	2485.6	94.7	97.3	530.4	622.4
	6	1963.4	98.9	80.6	529.6	751.4
	8	2639.5	93.7	82.4	556.8	559.3
Trt E ⁶	0	1496.3	74.2	75.8	321.6	430.6
	2	2785.6	78.5	72.3	385.9	411.8
	4	2239.5	98.6	82.4	452.6	596.3
	6	2856.4	90.3	85.1	493.6	520.4
	8	2983.6	91.9	79.5	602.3	502.8

¹Means within column by the same capital letter are not significantly different (P<0.05)

²C: control, ³Trt A: cream was treated with 10% β -CD

⁴Trt B, ⁵Trt C, ⁶Trt D, ⁷Trt E: cream was treated with 10% β -CD and 2, 4, 6, 8% phytosterol ester added

소하였으며 cohesiveness는 control보다 높은 수치를 나타내었으며 gumminess는 control과 β -CD 처리 한 cheese 모두 높았다고 보고하였다.

8. 관능검사

Cheddar cheese의 관능검사 결과는 다음의 Table 39에서와 같다. Cheddar cheese를 5°C에서 8주간 숙성 된 것으로 5점법으로 평가하였다. Control에서는 이미, 이취를 나타내지 않았으며 숙성되면서 쓴맛의 정도가 숙성 0주에 3.00에서 8주에는 3.17로 증가하였으나 유의적 차이는 없었다. Color와 texture에서도 숙성 되면서 유의적 차이는 없었다. 또한 전체적인 기호도도 양호하게 평가되었다. β -CD를 처리 한 실험군 에서는 숙성되면서 쓴맛이 0주에는 3.00에서 4주에는 4.50, 8주에는 4.67로 높은 수치를 나타내었다. 이미 평가에서도 0주에는 3.00에서 8주에는 4.17로 높게 평가되었으나 유의적 차이를 나타내지는 않았다. 이취 평가 에서도 또한 숙성 0주에 2.83에서 숙성 4주에는 3.00, 숙성 8주에 2.33으로 차이를 내지 않아 같은 결과를 나타내었다. Color에서는 control과 비교하여 유의적 차이가 없어 양호한 것으로 평가되며 texture는 control과 비교하여 낮게 평가되었으며 쉬게 부스러지는 것이 관찰되었다. 전체적인 기호도도 control보다 낮은 수치를 보였다. Phytosterol ester를 첨가한 Cheddar cheese는 쓴맛이 숙성 0주에서 4.00으로 강하게 나타났으며 숙성이 진행 될수록 4.67로 더 높게 평가되었다. 이미, 이취도 평가에서도 0주에는 4.17에 4주에는 4.50, 8주에는 4.83 수치를 보여 이미 이취를 강하게 느꼈으며 phytosterol ester의 첨가량이 많을수록 이미, 이취가 생겨 좋지 않게 평가되는 것을 관찰하였다. Color나 texture는 control과 비교하여 유의적 차이가 없어 양호한 것으로 나타났으나 전체적인 기호도에서는 매우 낮게 평가되었다.

Table 39. Sensory characteristics phytosterol ester added in cheddar cheese ripened at 7°C for 8 weeks

Treat-ment	Ripened (week)	Bitter	Off-taste	Off-flavor	Color	Texture	Overall
C ¹	0	3.00 ^a	3.17 ^a	3.67 ^a	3.00 ^a	3.00 ^a	2.67 ^a
	2	3.17 ^a	3.00 ^a	3.17 ^a	3.33 ^a	3.00 ^a	3.00 ^a
	4	3.00 ^a	3.00 ^a	3.17 ^a	3.17 ^a	3.33 ^a	2.83 ^a
	6	3.17 ^a	3.00 ^a	3.50 ^a	3.33 ^a	3.33 ^a	3.00 ^a
	8	3.17 ^a	2.83 ^a	3.33 ^a	3.17 ^a	3.33 ^a	3.00 ^a
Trt A ²	0	3.00 ^a	3.00 ^a	2.83 ^{bc}	3.17 ^a	2.17 ^{ab}	3.00 ^a
	2	4.17 ^{ab}	2.83 ^a	3.17 ^a	3.33 ^a	2.33 ^{ab}	2.67 ^a
	4	4.50 ^b	3.00 ^a	3.00 ^a	3.50 ^a	1.83 ^c	2.33 ^a
	6	4.17 ^{ab}	3.83 ^b	2.83 ^{bc}	3.50 ^a	1.50 ^c	2.33 ^a
	8	4.67 ^b	4.17 ^c	2.33 ^{bc}	3.83 ^a	1.83 ^c	2.17 ^a
Trt B ³	0	4.17 ^{ab}	3.17 ^{ab}	3.00 ^a	3.00 ^a	3.00 ^a	3.17 ^a
	2	4.17 ^{ab}	3.83 ^b	3.00 ^a	3.33 ^a	3.83 ^a	2.83 ^a
	4	4.50 ^b	4.17 ^c	3.83 ^a	3.33 ^a	3.83 ^a	2.83 ^a
	6	4.67 ^b	4.50 ^{bc}	3.83 ^a	3.17 ^a	4.17 ^b	2.67 ^a
	8	4.67 ^b	4.50 ^{bc}	3.50 ^a	3.17 ^a	4.17 ^b	2.83 ^a
Trt C ³	0	4.00 ^{ab}	3.67 ^b	3.33 ^a	3.17 ^a	3.33 ^a	3.33 ^a
	2	3.83 ^a	4.17 ^c	3.50 ^a	3.17 ^a	4.17 ^b	3.17 ^a
	4	4.17 ^{ab}	4.50 ^{bc}	4.17 ^b	3.33 ^a	4.50 ^b	2.83 ^a
	6	4.67 ^b	4.67 ^{bc}	3.83 ^a	3.17 ^a	4.83 ^b	2.67 ^a
	8	4.50 ^b	4.50 ^{bc}	3.83 ^a	3.50 ^a	4.83 ^b	2.33 ^a
Trt D ³	0	3.83 ^a	3.67 ^b	3.50 ^a	3.50 ^a	4.17 ^b	2.83 ^a
	2	4.17 ^{ab}	4.17 ^c	4.17 ^b	3.17 ^a	4.17 ^b	2.67 ^a
	4	4.50 ^b	4.50 ^{bc}	4.50 ^b	3.17 ^a	4.50 ^b	2.67 ^a
	6	4.50 ^b	4.50 ^{bc}	3.83 ^a	3.33 ^a	4.50 ^b	2.83 ^a
	8	4.67 ^b	4.83 ^d	3.50 ^a	3.33 ^a	4.83 ^b	2.33 ^a
Trt E ³	0	4.00 ^{ab}	4.17 ^c	4.33 ^b	4.16 ^{ab}	3.33 ^a	2.33 ^{bc}
	2	4.17 ^{ab}	4.33 ^{bc}	4.33 ^b	3.33 ^a	4.00 ^b	2.67 ^a
	4	3.83 ^a	4.50 ^{bc}	4.17 ^b	4.16 ^{ab}	4.33 ^b	2.17 ^a
	6	4.67 ^b	4.50 ^{bc}	3.83 ^a	3.33 ^a	4.13 ^b	1.83 ^b
	8	4.67 ^b	4.83 ^d	3.50 ^a	3.50 ^a	4.67 ^b	1.83 ^b

¹Means within column by the same capital letter are not significantly different (P<0.05)

²C : Control ³Trt. A : cream was treated with 10% β-CD

⁴Trt. B : 8% phytosterol-ester added

⁵The Scale of sensory score ; 1= dislike extremely, 2=dislike moderately, 3=neither like nor dislike, 4= likemoderately, 5=like extremely

제 4 절 달맞이꽃 종자유를 첨가한 혈중 콜레스테롤 저하 기능성 요구르트의 연구

1. 콜레스테롤 제거율과 달맞이꽃 종자유의 γ linolenic acid 정량분석

콜레스테롤 제거율의 범위는 93.3~93.7%로 평균 93.5%였으며, β -CD 처리하여 달맞이꽃 종자유(EPO)를 첨가 시에도 유의적 차이를 나타내지 않았다. 본 실험과 같은 조건으로 우유에 β -CD 처리할 때 Lee⁽⁶⁾ 등의 보고에 의하면 95%의 콜레스테롤 제거율을 보였다고 보고했고, 김⁽⁵⁹⁾ 등의 보고에 따르면 93.5%의 콜레스테롤 제거율을 나타냈다고 하여 본 실험과 일치하였다. EPO에 포함되어있는 γ linolenic acid(GLA)의 함량을 알아보기 위해 정량분석 한 결과 약 7%가 측정되었다. 김⁽³⁵⁾ 등의 보고에서는 EPO에는 7~14%의 GLA가 포함되어 있다고 보고하여 본 실험과 일치하였다.

2. pH 측정

β -CD를 처리하고 달맞이꽃 종자유(EPO)를 첨가하여 제조한 요구르트의 저장 기간 중 pH를 측정한 결과는 다음의 Fig 16와 같다. 저장기간 15일이 경과함에 따라 모든 군에서 pH저하가 일어났고, 각 실험군의 pH는 4.2에서 3.9사이로 control과 차이가 없었고 EPO첨가가 많을수록 pH가 낮게 나타났다. 요구르트의 pH저하는 보존효과와 영양학적 가치 및 소화율을 향상시키며 바람직한 요구르트의 pH범위를 Kroger⁽⁶⁰⁾는 4.1~4.3가 적당하다고 하였다.

3. 산도 측정

산도는 요구르트 품질을 평가하는 기준의 하나로 β -CD를 처리하고 달맞이꽃 종자유(EPO)를 첨가하여 제조한 요구르트의 산도변화를 Fig 17에 나타내었다. 저장기간이 경과함에 따라 모든 군에서 산도의 증가가 관찰되었다. 저장 0일에 0.93%에서 저장 15일에 1.06~1.15%까지 증가하였으며 실험군간 차이는 없었으나, EPO첨가 비율이 높은 요구르트일수록 산도가 높은 경향을 나타내어 pH와 상관관계가

있을 것으로 사료된다. 요구르트에서 유산의 생성정도를 나타내는 적정산도는 0.9 1~0.93%범위에서 가장 좋은 향미를 얻을 수 있다고 한다⁽⁶¹⁾.

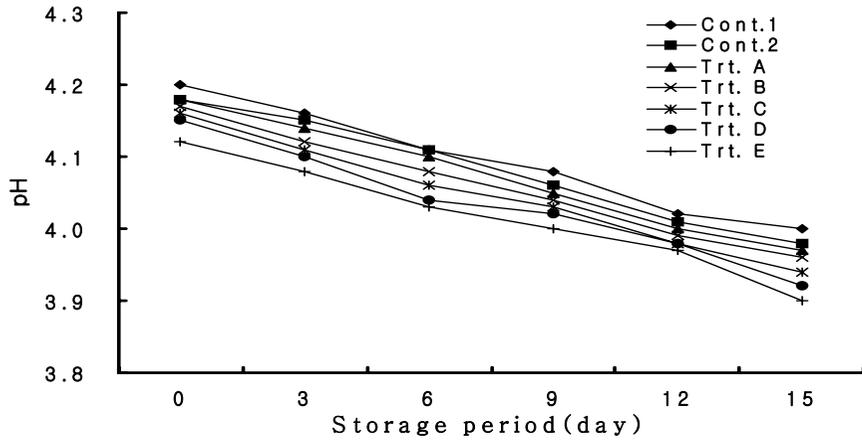


Fig 16. Changes of pH in evening primrose oil added and cholesterol-reduced yogurt stored at 4°C for 15 days¹

¹Milk used was treated with 1% β -cyclodextrin for Trts

²Cont .1 : no added

Cont. 2 : yogurt was treated with 1% β -cyclodextrin

Trt A , Trt B, Trt C, Trt D, Trt E : 2, 4, 6, 8 and 10% evening primrose oil was added in each treated cholesterol-reduced yogurt, respectively

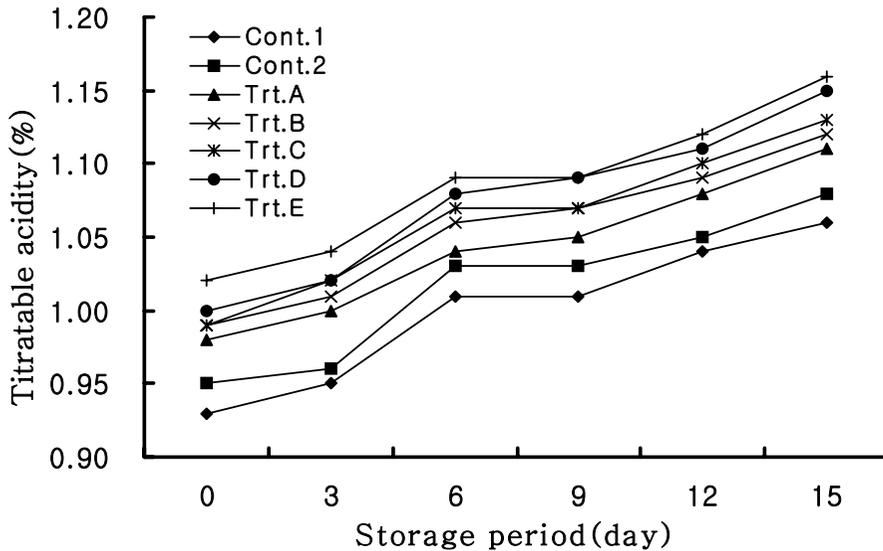


Fig17. Changes of titratable acidity in evening primrose oil added and cholesterol-reduced yogurt stored at 4°C for 15 days¹

¹Milk used was treated with 1% β -cyclodextrin for Trts

²Cont .1 : no added

Cont. 2 : yogurt was treated with 1% β -cyclodextrin

Trt A , Trt B, Trt C, Trt D, Trt E : 2, 4, 6, 8 and 10% evening primrose oil was added in each treated cholesterol-reduced yogurt, respectively

4. 지방산화도(TBA)변화

β -CD로 콜레스테롤을 제거한 후 달맞이꽃 종자유(EPO)를 첨가하여 제조한 요구르트의 저장 중 지방산화도를 측정된 결과는 다음의 Fig 18에서와 같다. 일반적인 호상요구르트인 control의 경우 저장 0일에는 0.058에서 저장 15일에는 0.096으로 변화하였고, β -CD를 처리하여 제조한 요구르트는 저장 0일에는 0.064에서 저장 15일에는 0.098로 저장기간이 경과할수록 지방산화도가 높아지는 결과를 얻었으며, control과 동일하였다. β -CD를 처리하여 EPO를 첨가한 요구르트에서는 2%첨가시 저장 0일 0.068에서 저장 15일에 0.116으로 증가하였으며, 4%첨가시 0.074에서 0.129로, 6%첨가시 0.078에서 0.147로, 8%첨가시 0.08에서 0.165로, 10%첨가시 0.086

에서 0.165로 저장기간이 경과함에 따라 모든 군에서 TBA값이 증가하였다.

Dawson 등⁽⁶²⁾에 따르면 불포화지방산은 이중결합의 구조로 인해 산소와 쉽게 결합할 수 있으며 이로 인해 과산화물의 생성과 radical 등의 생성에 의해 산패취가 발생하여 제품의 품질 저하를 가져올 수 있다고 보고하였고, Chan⁽⁶³⁾에 의하면, 특히 유지식품의 자동산화는 유리지방산 함량과 불포화도에 따라 증가한다고 보고하였다. 본 실험에서 요구르트에 첨가한 EPO에는 80%이상의 불포화지방산이 포함되어 있기 때문에 EPO의 첨가 비율이 높을수록 지방산화도가 높게 측정된 것으로 사료된다.

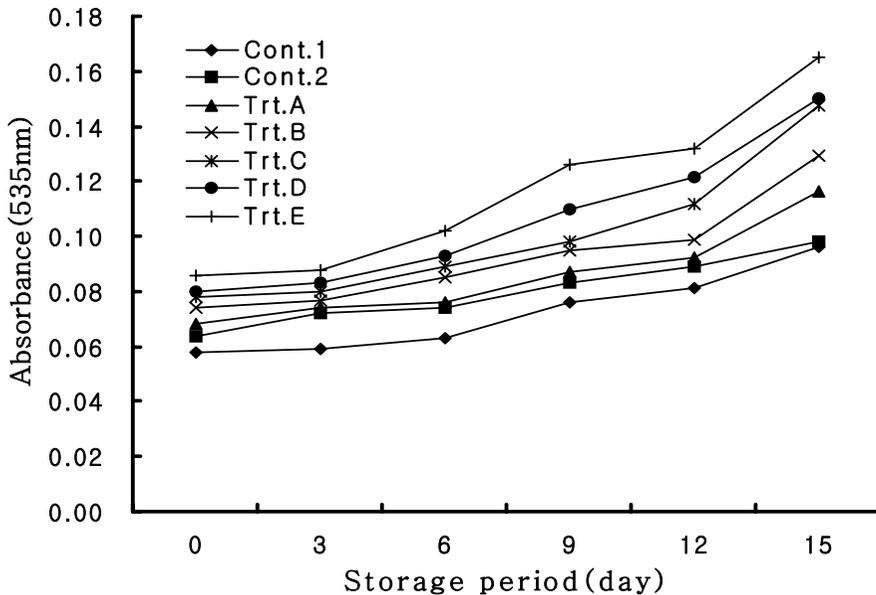


Fig18. Changes of thiobarbituric acid (TBA) values at 535nm in evening primrose oil added and

cholesterol-reduced yogurt stored at 4°C for 15 days¹

¹Milk used was treated with 1% β -cyclodextrin for Trts

²Cont .1 : no added

Cont. 2 : yogurt was treated with 1% β -cyclodextrin

Trt A , Trt B, Trt C, Trt D, Trt E : 2, 4, 6, 8 and 10% evening primrose oil was added in each treated cholesterol-reduced yogurt, respectively

5. 점도 변화

Consistometer를 이용하여 저장기간 15일 동안 요구르트의 점도를 측정된 결과를 Fig 19에 나타내었다. Consistometer에 의한 점도측정은 수치가 낮은 것이 높은 점도를 나타내며 수치가 높은 것이 낮은 점도를 나타낸다. Control의 경우 저장 0일에는 4에서 저장 15일에는 7.7로 변화하였고, β -CD를 처리한 요구르트는 저장 0일에는 4에서 저장 15일에는 6으로 저장기간이 경과할수록 점도가 감소하였으며, control과 동일하였다. β -CD를 처리하여 EPO를 첨가한 요구르트에서는 2% 첨가시 저장 0일에는 3.7에서 저장15일에는 5.2로 감소하였고, 4%첨가시 3에서 5로, 6%첨가시 2.4에서 4로, 8%첨가시 2.25에서 3.8로, 10%첨가시 1.8에서 3.4로 저장기간이 경과할수록 모든 군에서 점도가 감소하였고, EPO첨가 비율이 높을수록 점도가 낮게 측정되었다.

윤 등⁽⁶⁴⁾에 의하면, 유지의 점도는 고급지방산으로 된 triacylglycerol일수록 지방산의 분자 간 친화력 때문에 점도가 높아지고, 탄소길이가 같을 때는 불포화도가 높을수록 점도가 낮아진다고 보고하였다. EPO에는 80%이상의 불포화지방산이 포함되어 있기 때문에 저장기간이 경과할수록, EPO첨가량이 높을수록, 점도가 낮게 측정된 것으로 사료된다.

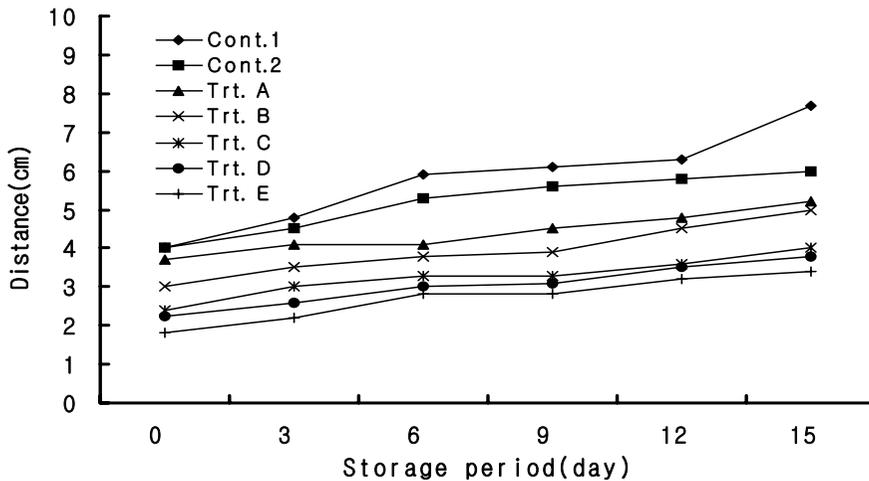


Fig 19. Changes of viscosity in evening primrose oil added and cholesterol-reduced yogurt

stored at 4°C for 15 days¹

¹Milk used was treated with 1% β -cyclodextrin for Trts

²Cont .1 : no added

Cont. 2 : yogurt was treated with 1% β -cyclodextrin

Trt A , Trt B, Trt C, Trt D, Trt E : 2, 4, 6, 8 and 10% evening primrose oil was added in each treated cholesterol-reduced yogurt, respectively

6. 유산균수 측정

Lactobacillus bulgaricus and *streptococcus thermophilus*의 일반적인 요구르트의 유산균수는 10^8 이 적합하다고 하였다⁽³⁴⁾. β -CD를 처리하여 EPO를 첨가한 요구르트의 저장 중 유산균수를 측정된 결과를 Table 40에 나타내었다. Control은 저장 0일에는 1.7×10^8 cfu/ml에서 저장 15일에는 5.5×10^7 cfu/ml로 감소하였고, β -CD를 처리하여 제조한 요구르트는 저장 0일에 1.5×10^8 cfu/ml에서 저장 15일에는 5.2×10^7 cfu/ml로 저장기간이 경과할수록 유산균수가 감소하는 결과를 얻었으며, control과 동일하였다. β -CD를 처리하여 EPO를 첨가한 요구르트에서는 2%첨가시 저장 0일에는 1.3×10^8 cfu/ml에서 저장 15일에는 4.7×10^7 cfu/ml로 감소하였고, 4%첨가시 1.3×10^8 cfu/ml에서 3.4×10^7 cfu/ml으로, 6% 첨가시 1.3×10^8 에서

2.1×10⁷cfu/ml으로, 8% 첨가시 1.2×10⁸cfu/ml에서 1.9×10⁷cfu/ml으로, 10% 첨가시 7.1×10⁷cfu/ml에서 1.0×10⁶cfu/ml으로 저장기간이 경과함에 따라 모든 군에서 유산균수가 감소하였으며, 적정산도와 비교시 산도가 높을수록 유산균수가 감소하는 경향이 나타났다. 따라서 산도가 높아져 유산균이 더 이상 자랄 수 없게 되어 균의 수가 감소된 것으로 사료된다.

Table 40. Changes of *Lactobacillus bulgaricus* and *streptococcus thermophilus* in evening primrose oil added and cholesterol-reduced yogurt stored at 4 for 15 days¹

Treat -ment	Storage period(day)					
	0	3	6	9	12	15
	(cfu/ml)					
Cont.1 ²	1.7×10 ^{8a}	1.3×10 ^{8a}	1.2×10 ^{8a}	9.0×10 ^{7a}	6.0×10 ^{7a}	5.5×10 ^{7a}
Cont.2	1.5×10 ^{8a}	1.5×10 ^{8a}	1.2×10 ^{8a}	8.7×10 ^{7a}	5.8×10 ^{7a}	5.2×10 ^{7a}
Trt.A	1.3×10 ^{8b}	1.2×10 ^{8b}	1.1×10 ^{8a}	8.1×10 ^{7ab}	6.0×10 ^{7ab}	4.7×10 ^{7b}
Trt.B	1.3×10 ^{8b}	1.1×10 ^{8b}	10×10 ^{7b}	7.6×10 ^{7b}	5.2×10 ^{7b}	3.4×10 ^{7c}
Trt.C	1.3×10 ^{8b}	1.0×10 ^{8bc}	8.6×10 ^{7b}	6.2×10 ^{7c}	5.1×10 ^{7b}	2.1×10 ^{7d}
Trt.D	1.2×10 ^{8b}	9.6×10 ^{7c}	6.0×10 ^{7bc}	5.7×10 ^{7c}	3.7×10 ^{7c}	1.9×10 ^{7d}
Trt.E	7.1×10 ^{7c}	1.9×10 ^{7d}	2.8×10 ^{7c}	1.0×10 ^{7d}	1.8×10 ^{6d}	1.0×10 ^{6d}

¹Means within column by the same letter are not significantly different (P<0.05)

²Milk used was treated with 1% β-cyclodextrin for Trts

³Cont .1 : no added

Cont. 2 : yogurt was treated with 1% β-cyclodextrin

Trt A , Trt B, Trt C, Trt D, Trt E : 2, 4, 6, 8 and 10% evening primrose oil was added in each treated cholesterol-reduced yogurt, respectively

7. 유리지방산정량분석

가. Short-chain fatty acid

본 실험에서는 β-CD를 처리하고 달맞이꽃 종자유(EPO)를 첨가하여 제조한 요구르트의 short-chain fatty acid(SFFA) 생성에 관한 것을 분석한 것으로 그 결과는 Table 41과 Fig 20에서와 같다. 저급유리지방산인 C₄, C₆, C₈, C₁₀의 각 성분들은 요구르트의 저장기간이 경과함에 따라 증가되었다. 전체적으로 SFFA 중 C₄와 C₁₀의

함량이 가장 많았으며, C₈이 가장 낮게 측정되었다. 저장 0일과 3일에는 수치가 조금씩 증가되었고, 저장 6일부터 15일까지는 EPO첨가량이 많을수록 수치가 증가되었다. 일반적인 요구르트인 control은 저장 0일에는 C₄와C₆가 각각 2.8, 2.1ppm이었고 저장 15일에는 5.7, 3.5ppm으로 측정되어 큰 차이는 없었으나 EPO를 10% 첨가한 요구르트에서는 저장 0일에 C₄와C₆가 각각 6.5, 7.1ppm이었고 저장 15일에는 13.3, 15.1ppm으로 약 2배정도 증가되었다. Total SFFA는 저장기간이 경과할수록 증가되었으나 0, 3, 6일까지는 실험군 간의 차이는 적었고 9일이후로는 EPO의 첨가량이 많을수록 증가되는 경향을 보였다. 일반적인 요구르트 control은 10.5ppm에서 19.1ppm으로 증가하였고, β-CD를 처리한 요구르트는 10.1ppm에서 17.2ppm으로 증가되었으며, β-CD를 처리하여 EPO를 2%첨가한 요구르트는 11.1ppm에서 26.3ppm으로, 4% 첨가시 13.3ppm에서 32.8ppm으로, 6%첨가시 20.56ppm에서 36.46ppm으로, 8%첨가시 22.2ppm에서 43.59ppm으로, 10% 첨가시 22.39ppm에서 46.98ppm으로 증가되었다.

나. Gamma linolenic acid

β-CD를 처리하고 EPO를 첨가하여 제조한 요구르트의 저장기간 중 gamma linolenic acid(GLA)의 함량변화를 분석한 결과를 Fig 21에 나타내었다. Control과 β-CD를 처리한 요구르트에서는 GLA가 측정되지 않았고, EPO의 첨가량이 많을수록 요구르트 내 GLA가 높게 측정되었다. 그러나 저장기간이 경과할수록 GLA함량이 약 2배가 감소되어 EPO를 2%첨가한 요구르트는 1.48ppm에서 0.67ppm으로 감소하였고, 4%첨가한 요구르트는 3.1ppm에서 1.16ppm으로, 6%첨가 시 4.79ppm에서 2.35ppm으로, 8%첨가 시 6.28ppm에서 2.68ppm으로, 10%첨가 시 8.0ppm에서 4.6ppm으로 감소되었다.

Hudson⁽⁶⁵⁾의 보고에 의하면, GLA는 all-cis 6:9:12 double-bond system이기 때문에 이성화, 중합화 및 기타의 화학적인 성분변화가 쉽게 일어날 수 있다고 보고하여 본 실험에서 7%의 GLA를 함유한 EPO의 자동산화는 매우 클 것으로 사료된다.

Table 41. Concentrations of short chain fatty acid in evening primrose oil added and cholesterol-reduced yogurt stored at 4°C for 15 days¹

Storage period (day)	SFFA concentration (ppm)	Treatment						
		Cont.1 ²	Cont.2	Trt.A	Trt.B	Trt.C	Trt.D	Trt.E
0	C ₄	2.8 ^c	3.5 ^b	3.8 ^b	4.8 ^{ab}	5.5 ^a	6.7 ^a	6.5 ^a
	C ₆	2.1 ^b	2.1 ^b	2.6 ^b	2.3 ^b	5.7 ^{ab}	6.2 ^a	7.1 ^a
	C ₈	1.2 ^b	1.0 ^b	1.3 ^b	1.8 ^{ab}	2.5 ^a	3.1 ^a	2.5 ^a
	C ₁₀	4.2 ^b	3.3 ^b	3.2 ^b	4.3 ^b	6.7 ^a	6.0 ^a	6.1 ^a
3	C ₄	3.2 ^b	3.6 ^b	3.6 ^b	4.4 ^b	5.7 ^a	6.8 ^a	6.3 ^a
	C ₆	2.7 ^c	2.2 ^c	2.2 ^c	3.8 ^{bc}	5.9 ^b	6.0 ^{ab}	8.3 ^a
	C ₈	1.7 ^b	1.6 ^b	1.1 ^b	1.7 ^b	2.7 ^a	3.8 ^a	2.7 ^a
	C ₁₀	4.8 ^b	3.1 ^c	3.6 ^{bc}	4.6 ^b	7.2 ^{ab}	9.8 ^a	7.1 ^{ab}
6	C ₄	4.9 ^b	3.7 ^c	3.0 ^c	6.6 ^b	5.1 ^b	9.7 ^a	10.9 ^a
	C ₆	3.7 ^{bc}	2.5 ^c	2.0 ^c	5.5 ^b	6.8 ^{ab}	7.3 ^a	10.1 ^a
	C ₈	1.8 ^c	1.8 ^c	1.7 ^c	2.1 ^b	2.9 ^{ab}	4.7 ^a	2.8 ^{ab}
	C ₁₀	4.4 ^{bc}	3.7 ^c	4.1 ^c	5.9 ^b	7.6 ^{ab}	10.4 ^a	10.6 ^a
9	C ₄	5.9 ^{bc}	4.0 ^c	4.9 ^c	8.0 ^{ab}	7.3 ^b	7.2 ^b	11.8 ^a
	C ₆	3.0 ^c	3.0 ^c	2.1 ^c	6.0 ^{bc}	8.8 ^b	10.3 ^a	12.5 ^a
	C ₈	2.4 ^b	2.1 ^b	2.6 ^b	2.0 ^b	3.2 ^a	4.5 ^a	3.7 ^a
	C ₁₀	5.9 ^b	4.8 ^{bc}	4.1 ^c	6.5 ^b	8.3 ^{ab}	11.3 ^a	11.2 ^a
12	C ₄	5.8 ^c	4.0 ^c	6.9 ^{bc}	8.8 ^b	9.7 ^{ab}	10.0 ^a	13.3 ^a
	C ₆	3.6 ^c	2.7 ^c	4.6 ^c	9.0 ^b	10.2 ^{ab}	12.8 ^a	15.4 ^a
	C ₈	2.6 ^b	2.7 ^b	2.7 ^b	3.9 ^a	3.5 ^{ab}	4.6 ^a	4.8 ^a
	C ₁₀	4.1 ^c	5.0 ^c	5.7 ^{bc}	8.9 ^b	10.2 ^{ab}	12.3 ^a	13.0 ^a
15	C ₄	5.7 ^c	4.5 ^c	8.6 ^b	9.3 ^{ab}	8.4 ^b	12.0 ^a	13.3 ^a
	C ₆	3.5 ^c	3.3 ^c	7.6 ^b	10.1 ^{ab}	11.2 ^a	13.4 ^a	15.1 ^a
	C ₈	3.0 ^b	3.2 ^b	3.6 ^{ab}	3.8 ^b	4.0 ^a	4.5 ^a	4.1 ^a
	C ₁₀	6.5 ^b	6.0 ^b	6.3 ^b	9.4 ^{ab}	12.7 ^a	13.4 ^a	13.5 ^a

¹Means within row by the same letter are not significantly different (P<0.05)

²Milk used was treated with 1% β-cyclodextrin for Trts

Cont .1 : no added, Cont. 2 : yogurt was treated with 1% β-CD

Trt A , Trt B, Trt C, Trt D, Trt E : 2, 4, 6, 8 and 10% EPO was added in each treated cholesterol-reduced yogurt, respectively

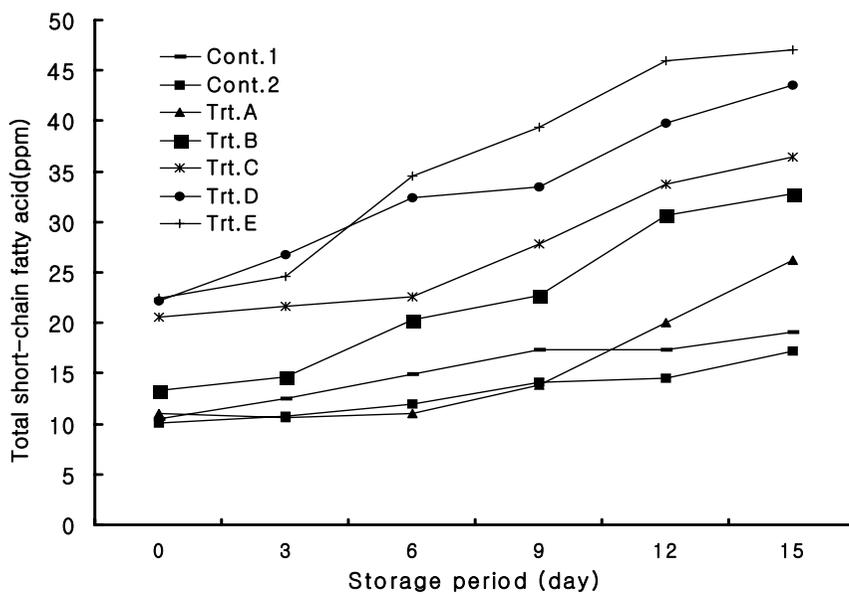


Fig 20. Production of total short-chain fatty acid concentrations in evening primrose oil added and cholesterol-reduced yogurt stored at 4°C for 15 days¹

¹Milk used was treated with 1% β -cyclodextrin for Trts

²Cont .1 : no added

Cont. 2 : yogurt was treated with 1% β -CD

Trt A , Trt B, Trt C, Trt D, Trt E : 2, 4, 6, 8 and 10% EPO was added in each treated cholesterol-reduced yogurt, respectively

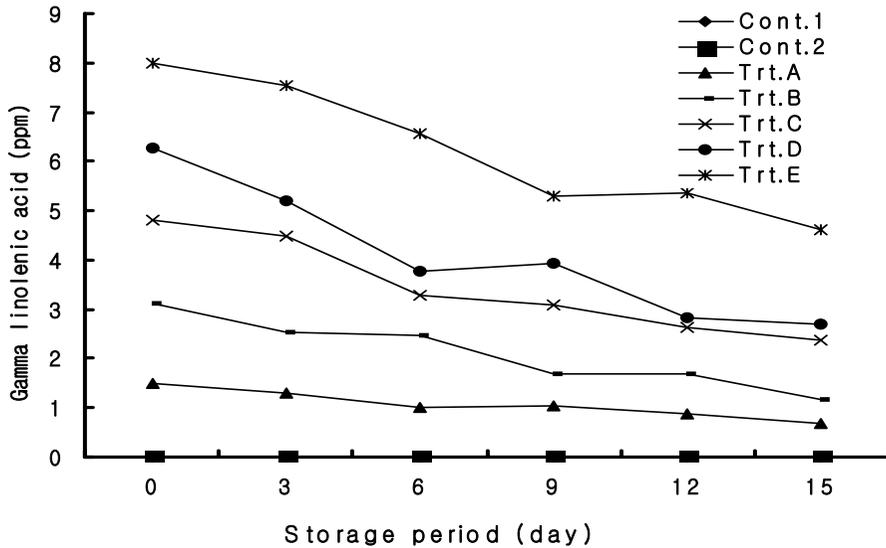


Fig 21. Production of gamma linolenic acid in evening primrose oil added and cholesterol-reduced yogurt stored at 4°C for 15 days¹

¹Milk used was treated with 1% β -cyclodextrin for Trts

Cont .1 : no added

Cont. 2 : yogurt was treated with 1% β -CD

Trt A , Trt B, Trt C, Trt D, Trt E : 2, 4, 6, 8 and 10% EPO was added in each treated cholesterol-reduced yogurt, respectively

다. Total free fatty acid

β -CD를 처리하고 달맞이꽃 종자유(EPO)를 첨가시켜 제조한 요구르트의 저장기간 중 total free fatty acid의 생성에 관한 것을 분석한 결과는 Fig 22에서와 같다. Total free fatty acid의 함량은 저장기간이 경과함에 따라 모든 실험군에서 증가되었다. 일반적인 요구르트 control은 99.9ppm에서 15일 후 123.1ppm으로, β -CD를 처리한 요구르트는 93.9ppm에서 113.8ppm으로 증가되었고, β -CD를 처리하여 EPO를 2%첨가한 요구르트에서는 99.9ppm에서 123.3ppm으로, 4%첨가한 요구르트는 114.5ppm에서 137.7ppm으로 , 6%첨가시 126.2ppm에서 151.1ppm으로, 8%첨가시 139.0ppm에서 165.4ppm으로, 10%첨가시 145.5ppm에서 178.1ppm으로 증가되

었다. 본 실험에서는 EPO의 70%를 차지하는 linolenic acid의 함량은 측정하지 않았기 때문에 모든 실험군의 total free fatty acid의 증가량이 비슷하다고 사료된다.

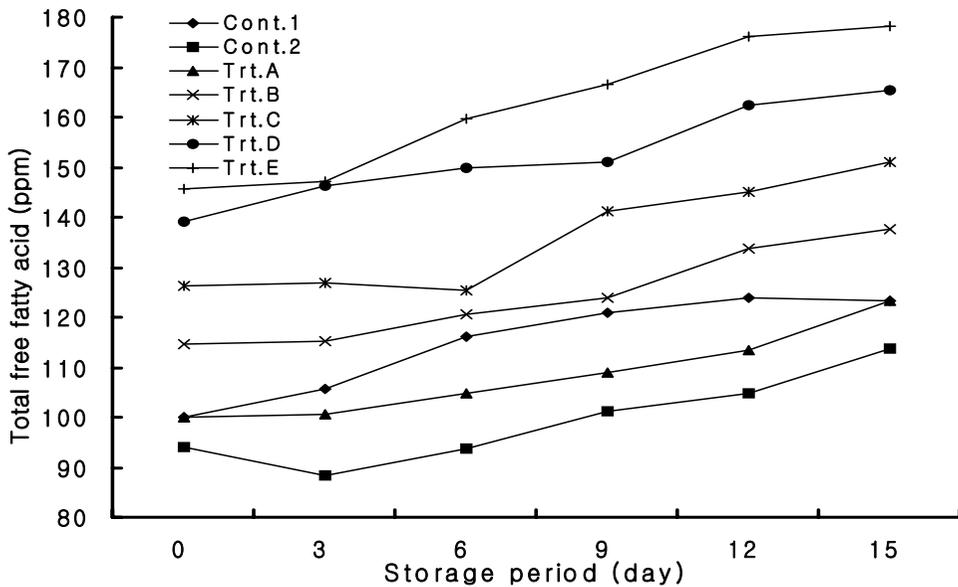


Fig 22. Production of total free fatty acid in evening primrose oil added and cholesterol-reduced yogurt stored at 4°C for 15 days¹

¹Milk used was treated with 1% β -cyclodextrin for Trts

Cont .1 : no added

Cont. 2 : yogurt was treated with 1% -CD

Trt A , Trt B, Trt C, Trt D, Trt E : 2, 4, 6, 8 and 10% EPO was added in each treated cholesterol-reduced yogurt, respectively

8. 관능검사

일반적인 요구르트를 대조군으로 하여 β -CD를 처리하고 달맞이꽃 종자유 (EPO)를 첨가하여 제조한 요구르트를 저장기간에 따라 비교한 관능평가 결과를 Table 42에 나타내었다. 요구르트는 4°C에서 15일 동안 저장한 것으로 5점법으로 평가하였다. 저장 0일에는 control의 평가가 4정도로 매우 좋게 나타났고, EPO의

첨가량이 증가할수록 좋지 않게 평가되었다. 기호도의 경우 control과 EPO를 2% 첨가한 실험군이 각각 5.0, 4.8로 유의적 차이가 없게 평가되었다. 저장 3일에는 전체 실험군의 특성과 기호도가 저장 0일과 비슷하게 평가되었으며, 저장 6, 9, 12, 15 일에는 control은 변화가 없었지만 EPO의 첨가 비율이 많을수록 off-taste, rancid, bitter의 수치가 높아져 EPO를 10%첨가한 실험군에서는 거의 5로 평가되었다. 기호도는 EPO를 6%첨가한 실험군의 수치가 높아져 3.7~4.0으로 평가되었으며, viscosity는 저장기간이 지남에 따라 낮은 수치로 평가되었다. Control에서는 저장기간이 경과하여도 전체적인 특성과 기호도가 양호하게 평가되었고, EPO를 2, 4, 6% 첨가한 실험군도 control과 유사하게 평가되었으나, EPO를 8, 10% 첨가한 실험군은 전체적인 특성이 좋지 않게 평가되었다.

Dawson 등⁽⁶²⁾의 보고에 따르면, 불포화지방산은 이중결합의 구조로 인해 산소와 쉽게 결합할 수 있으며 이로 인해 과산화물의 생성과 free radical등의 생성에 의해 산패취가 발생하여 제품의 품질 저하를 가져올 수 있다고 보고하여 위의 실험과 같은 결과를 얻었다. 저장기간이 경과할수록, EPO의 첨가량이 많을수록, 지방산화도와 유리지방산의 함량이 증가하였고, 관능평가에도 좋지 않은 영향을 미친 것으로 사료된다.

Table 42. Sensory characteristics for evening primrose oil added and cholesterol– reduced yogurt stored at 4°C for 15 days¹

Storage period (day)	Sensory description	Treatment					
		Cont ³	Trt.A	Trt.B	Trt.C	Trt.D	Trt.E
0	yogurt flavor	2.9 ^a	3.3 ^a	2.6 ^{ab}	2.1 ^b	1.4 ^c	1.4 ^c
	Off-flavor	2.9 ^b	2.7 ^c	3.3 ^b	4.0 ^a	4.1 ^a	4.5 ^a
	yogurt-taste	2.8 ^a	3.2 ^a	2.7 ^a	2.6 ^a	2.2 ^b	1.6 ^c
	Off-taste	2.9 ^b	2.2 ^{bc}	4.2 ^a	4.2 ^a	4.2 ^a	4.7 ^a
	Rancid	3.1 ^b	1.8 ^c	2.2 ^c	3.0 ^b	3.3 ^{ab}	3.7 ^a
	Bitter	2.8 ^c	2.7 ^c	3.1 ^{bc}	3.4 ^b	3.7 ^b	4.6 ^a
	Viscosity	3.0 ^c	4.2 ^b	4.2 ^b	4.5 ^a	4.7 ^a	4.8 ^a
	Overall	5.0 ^a	4.8 ^a	3.8 ^b	3.0 ^{bc}	2.4 ^c	1.7 ^d
3	yogurt flavor	3.0 ^a	2.7 ^a	2.6 ^a	2.1 ^b	1.7 ^{bc}	1.4 ^c
	Off-flavor	2.9 ^b	2.8 ^b	3.0 ^b	3.5 ^{ab}	3.8 ^a	4.2 ^a
	yogurt taste	3.1 ^a	3.0 ^a	2.8 ^a	2.8 ^a	2.7 ^a	1.7 ^b
	Off-taste	3.0 ^c	3.0 ^c	3.7 ^b	3.7 ^b	4.2 ^{ab}	4.8 ^a
	Rancid	3.1 ^b	2.0 ^c	2.2 ^c	2.5 ^{bc}	3.0 ^b	4.2 ^a
	Bitter	2.8 ^c	2.8 ^c	3.1 ^b	3.2 ^b	3.5 ^b	4.1 ^a
	Viscosity	3.0 ^b	3.3 ^b	3.7 ^a	3.7 ^a	4.1 ^a	4.2 ^a
	Overall	5.0 ^a	4.8 ^a	3.8 ^b	3.1 ^b	2.9 ^{bc}	1.2 ^c
6	yogurt flavor	3.0 ^a	2.7 ^a	2.6 ^a	2.1 ^b	1.7 ^{bc}	1.4 ^c
	Off-flavor	2.6 ^c	2.7 ^c	3.0 ^{bc}	3.2 ^b	3.6 ^b	4.8 ^a
	yogurt taste	3.0 ^a	2.1 ^c	2.4 ^b	2.6 ^b	2.7 ^{ab}	3.2 ^a
	Off-taste	3.1 ^c	3.0 ^c	3.8 ^{bc}	3.8 ^{bc}	4.2 ^b	5.0 ^a
	Rancid	3.2 ^b	2.0 ^c	2.6 ^b	2.8 ^b	3.5 ^a	4.0 ^a
	Bitter	2.7 ^b	2.1 ^c	2.7 ^b	3.1 ^b	3.7 ^{ab}	4.2 ^a
	Viscosity	2.8 ^c	2.8 ^c	3.1 ^c	3.7 ^b	4.0 ^b	4.7 ^a
	Overall	4.8 ^a	4.5 ^a	3.7 ^b	3.6 ^b	1.2 ^c	1.2 ^c

(continues)

Storage period (day)	Sensory description	Treatment					
		Cont. ³	Trt.A	Trt.B	Trt.C	Trt.D	Trt.E
9	yogurt flavor	2.9 ^a	2.8 ^a	2.6 ^a	2.2 ^b	1.7 ^c	1.2 ^c
	Off-flavor	3.0 ^b	2.7 ^b	3.0 ^b	3.2 ^b	4.4 ^a	4.5 ^a
	yogurt-taste	3.0 ^a	3.2 ^a	3.2 ^a	2.6 ^b	2.7 ^{ab}	2.4 ^b
	Off-taste	3.2 ^c	2.8 ^c	3.6 ^b	3.6 ^b	3.8 ^b	4.7 ^a
	Rancid	3.0 ^b	2.0 ^c	2.2 ^c	2.8 ^b	3.6 ^{ab}	4.2 ^a
	Bitter	2.7 ^c	2.4 ^d	2.8 ^c	3.0 ^c	3.4 ^b	4.1 ^a
	Viscosity	2.8 ^c	2.8 ^c	3.1 ^b	3.5 ^b	4.1 ^a	4.1 ^a
	Overall	4.5 ^a	4.3 ^a	3.8 ^b	3.8 ^b	1.7 ^c	1.3 ^c
12	yogurt flavor	2.9 ^a	3.0 ^a	2.7 ^a	2.0 ^b	2.0 ^b	1.2 ^c
	Off-flavor	3.0 ^c	3.0 ^c	3.0 ^c	3.5 ^b	3.6 ^b	4.2 ^a
	yogurt taste	3.0 ^a	3.2 ^a	3.2 ^a	2.7 ^{ab}	2.4 ^b	2.2 ^b
	Off-taste	3.0 ^c	2.8 ^c	3.5 ^b	3.8 ^{ab}	4.3 ^a	4.6 ^a
	Rancid	3.2 ^{bc}	2.0 ^d	2.2 ^d	2.7 ^c	3.6 ^b	4.2 ^a
	Bitter	2.8 ^b	2.4 ^c	2.7 ^{bc}	3.0 ^b	3.6 ^a	4.0 ^a
	Viscosity	2.7 ^c	2.8 ^c	3.2 ^b	3.5 ^{ab}	3.6 ^a	4.0 ^a
	Overall	4.3 ^a	4.1 ^a	3.8 ^b	4.0 ^{ab}	1.7 ^c	1.3 ^c
15	yogurt flavor	2.8 ^a	3.0 ^a	2.5 ^{ab}	2.4 ^b	2.1 ^b	1.2 ^c
	Off-flavor	3.0 ^c	2.7 ^c	3.0 ^c	3.5 ^b	3.5 ^b	4.2 ^a
	yogurt taste	3.0 ^b	3.5 ^a	3.1 ^b	2.6 ^c	2.3 ^c	2.2 ^c
	Off-taste	3.0 ^c	3.0 ^c	3.2 ^c	4.0 ^b	4.5 ^a	4.6 ^a
	Rancid	3.2 ^b	2.0 ^c	2.1 ^c	2.5 ^{bc}	3.4 ^b	4.1 ^a
	Bitter	2.8 ^b	2.5 ^b	2.8 ^b	2.8 ^b	3.4 ^a	3.7 ^a
	Viscosity	2.6 ^c	2.7 ^c	3.2 ^b	3.6 ^{ab}	3.6 ^b	4.2 ^a
	Overall	4.1 ^a	4.0 ^a	3.9 ^a	4.0 ^a	1.7 ^b	1.6 ^b

¹Means within row by the same letter are not significantly different(P<0.05)

The scale of sensory score : 1=very slight, 3=moderate, 5=very strong.

²The scale of overall score : 1=dislike extremely, 3=neitherlike nor dislike, 5=like extremely.

³Milk used was treated with 1% β -cyclodextrin for Trts

Cont .1 : no added, Cont. 2 : yogurt was treated with 1% β -CD

Trt A , Trt B, Trt C, Trt D, Trt E : 2, 4, 6, 8 and 10% EPO was added in each treated cholesterol-reduced yogurt, respectively

9. 동물 실험

달맞이꽃 종자유(EPO)가 랫트의 콜레스테롤 함량변화에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 high fat diet로 8주간 사육하고 8주간 rodent purified diet와 β -CD를 처리하고 EPO를 10%첨가시켜 제조한 요구르트를 섭취시킨 랫트의 체중 증가량, 사료의 섭

취량, 총 콜레스테롤의 함량과 중성지질, HDL-cholesterol의 함량을 측정된 결과를 Tables 43, 44에 나타내었다. 실험 랫트가 β -CD를 처리하여 EPO를 첨가시킨 요구르트 실험식이를 8주 동안 하루평균 21.97g/day 섭취했으며, 대조군은 일반적인 요구르트와 함께 실험식이를 평균 22.73g/day 섭취하였다. 랫트의 무게는 8주동안 EPO를 섭취한 그룹과 대조군에서 각각 77.02, 87.33g으로 나타났다. HDL-cholesterol의 농도는 EPO를 섭취한 그룹이 섭취하기 전보다 35.2mg/dl에서 57.6mg/dl로 22.4mg/dl가 증가하였고, 같은 식이를 섭취하고 EPO를 섭취하지 않은 대조군은 37.0mg/dl에서 58.4mg/dl로 21.4mg/dl 증가하였다. 총콜레스테롤 농도(TC)는 EPO를 섭취한 그룹은 132.8mg/dl에서 172mg/dl로 39.2mg/dl가 증가하였고, 대조군은 117.3mg/dl에서 175mg/dl로 57.7mg/dl가 증가하였다. 중성지질(TG)의 농도는 EPO를 섭취한 그룹은 73.5mg/dl에서 63.0mg/dl로 10.5mg/dl가 감소하였고, 대조군은 51.8mg/dl에서 61.2mg/dl로 9.4mg/dl가 증가하였다. 대조군과 비교하여 EPO를 10% 섭취한 그룹의 HDL-cholesterol의 농도는 1mg/dl가 증가하여 유의적 차이는 없었으나 EPO섭취전의 37mg/dl에서 6주후에 58.4mg/dl로 증가하였고, 총 콜레스테롤 농도가 대조군과 비교하여 18.5mg/dl가 감소하였으며, TG의 농도는 대조군이 9.4mg/dl가 증가한 것에 비하여 EPO를 섭취한 그룹은 10.5mg/dl가 감소한 결과로 보아 LDL-cholesterol 수치가 저하된 것으로 보인다. 따라서 EPO의 섭취로 혈중콜레스테롤을 감소시킬 수 있음이 증명되었다.

Watanabe 등⁽⁶⁶⁾의 보고에 의하면 47%의 γ -linolenic acid(GLA)를 함유한 GLA-rich diet를 섭취시킨 랫트가 혈청 HDL-cholesterol이 크게 증가한다고 보고하였다. 그리고 Morita 등⁽⁶⁷⁾의 보고에 의하면 GLA를 포함한 mold oil을 섭취시킨 랫트에서 총콜레스테롤은 감소시키고 HDL-cholesterol은 증가시켰다는 결과를 보고하였다. 최⁽⁶⁸⁾의 보고에서는 달맞이꽃 종자유를 식이의 15%수준으로 섭취시킨 랫트에서 혈장 총콜레스테롤이 감소하는 결과를 나타냈다. 본 실험에서는 총 콜레스테롤 농도와 TG의 농도가 감소하는 위의 연구결과들과 일치하였으나, HDL-cholesterol은 대조군과 유의적 차이가 없는 결과를 나타내었다.

Kannel 등⁽⁷⁴⁾에 의하면 EPO의 hypocholesterolemic effect는 혈장콜레스테롤 수준이 190mg/dl이상일 때에 보다 더 확실한 효과를 기대할 수 있었으나 그 이하인 경우에는 큰 효과가 없다고 하였다. 그리고 Rao 등⁽⁷⁵⁾은 *Streptococcus thermophilus*에

의하여 발효시킨 우유를 먹인 흰 쥐에서 혈중콜레스테롤이 낮아졌음을 보고하였다.

Table 43. Effects of experimental diets on food intake and body weight gain.¹

Treatment	Food intake (g/day)	Body weight gain (g/ 8week)
Control ²	22.73 ^a	87.33 ^a
EPO ³	21.97 ^a	77.02 ^b

¹Rats were fed for 16 weeks. Means within column by the same letter are not significantly different (P<0.05).

²Control : no added

³10% EPO added cholesterol reduced yogurt. (2ml/day)

Table 44. Effects of experimental diets on the change of blood triacyl-glycerol, total cholesterol and high density lipoprotein in rats fed for 16weeks¹

Treatment	TotalCH		TG		HDL	
	Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final
	(mg/dL)					
Control ²	117.3 ^b	175.0 ^a	51.8 ^b	61.2 ^a	35.2 ^a	57.6 ^a
EPO ³	132.8 ^a	172.0 ^a	73.5 ^a	63.0 ^a	37.0 ^a	58.4 ^a

¹Means in a column with the same letter are not significantly different (P<0.05).

²Control : no added

³10% EPO added cholesterol reduced yogurt. (2ml/day)

Hepner 등⁽⁷⁶⁾은 요구르트와 살균요구르트를 먹은 사람에게서 1주후에 혈중콜레스테롤이 5~10% 감소했다고 하였다. Jaspers 등⁽⁷⁷⁾은 10명의 성인 남자에게 매일 681g의 요구르트를 14~21일 동안 보충해서 준 결과 혈청 총 콜레스테롤 함량을 10~12%감소 시켰다고 보고하였다. 또한 Thakur 등⁽⁷⁸⁾은 고콜레스테롤 사료와 함께 발효유를 급여한 토끼에서 측정된 혈중 콜레스테롤 수준이 고콜레스테롤 사료만을 급여한 토끼의 혈중 콜레스테롤보다 낮음을 발견하였다. Grunewald⁽⁷⁹⁾는 *L.*

*acidiphilus*로 발효시킨 탈지유를 급여한 쥐에서는 이를 급여하지 않은 쥐의 혈중콜레스테롤 함량보다 낮은 콜레스테롤치를 보였다고 보고하였다. Kiyosawa 등⁽⁸⁰⁾은 탈지유와 요구르트를 먹인 토끼에서 동맥내의 총 콜레스테롤 함량이 상당히 낮았다고 하였다. 이러한 연구결과는 Gilliland⁽⁸¹⁾, Danielson 등⁽⁸²⁾ 지금까지 수많은 연구자에 의해서 주장되고 지지되었다. 이것으로 보아 GLA섭취량이 적은 것과 EPO섭취전의 혈중콜레스테롤이 132mg/dl으로 정상수준이었던 것과 발효유의 혈중콜레스테롤 저하작용이 문제점으로 기인할 수 있다고 사료된다. 이러한 문제점에도 불구하고 TC와 TG의 농도가 감소하였고, HDL-cholesterol농도도 EPO섭취전의 37mg/dl에서 6주후에 58.4mg/dl로 증가하였으므로, EPO를 첨가하여 제조한 요구르트는 혈중콜레스테롤을 낮추는 기능이 있다고 사료된다.

제 5 절 달맞이꽃 종자유를 첨가한 혈중 콜레스테롤 저하 체다치즈의 연구

1. 콜레스테롤 제거율과 일반성분 및 달맞이꽃 종자유의 γ linolenic acid 정량분석

β -CD 처리하여 콜레스테롤을 제거한 후 EPO를 첨가한 Cheddar cheese의 콜레스테롤 제거율과 일반성분은 다음 Table 45에서와 같다. 콜레스테롤 제거율에서 control 치즈인 경우 콜레스테롤을 제거하지 못하였으며 β -CD 처리한 치즈(Trt. A)는 91.2%, 1% EPO를 첨가한 치즈(Trt. B)는 91.8, 5% EPO를 첨가한 치즈(Trt. D)는 93.2로 EPO 첨가 비율이 높을수록 증가하였지만 EPO를 첨가 하였더라도 유의적 차이는 나타나지 않았다. 본 실험과 같은 조건으로 Kwak 등⁽⁵⁾의 연구에서는 β -CD를 이용하여 Cheddar cheese의 콜레스테롤을 제거하여 90% 이상의 콜레스테롤 제거율을 나타냈다고 하여 본 실험과 일치하였다. 수분 함량은 Control 치즈인 경우 38.3, Trt. A는 42.2, Trt. B는 35.5, 5% Trt. D는 34.4로 control과 비교시 낮았으며, EPO 첨가 비율이 높을수록 감소하는 경향을 나타내었다. 조지방 함량은 control인 경우 36.0, Trt. A는 34.5, Trt. B는 40.2, Trt. D는 34.4, 그리고 조단백질은 control 치즈인 경우 28.0, Trt. A는 30.8 Trt. B는 29.9, Trt. D는 31.3으로 EPO 첨가 비율이 높을수록 각각 증가하는 경향을 보였지만 유의적 차이는 나타나지 않았다. Hudson⁽⁵²⁾에 의하면 EPO의 일반성분은 단백질이 15.2%, 유지가 24.3%로 구성되어 있다고 보고하여 위의 실험과 같은 유사한 결과를 얻었다. 수율에서는 EPO를 첨가한 실험군이 control 치즈에 비해 높았으며, EPO에 포함되어있는 γ linolenic acid(GLA)의 함량을 알아보기 위해 정량분석 한 결과 약 7%가 측정되었다. 김⁽³⁵⁾ 등의 보고에서는 EPO에는 7~14%의 GLA가 포함되어 있다고 보고하여 본 실험과 일치하였다.

따라서 본 실험결과 EPO는 조단백질, 조지방 함량에 영향을 미치며, 또한 수율을 좋게 한다고 사료된다.

Table 45. Mean chemical composition of cholesterol-reduced Cheddar cheese¹.

Component	Moisture	Fat	Protein	Cholesterol Removal	Yield
Con	38.3 ^b	36.0 ^b	28.0 ^a	0.0 ^a	10.5 ^a
Trt.A	42.2 ^a	34.5 ^b	30.8 ^a	91.2 ^a	12.5 ^a
Trt.B	35.5 ^c	40.2 ^a	29.9 ^a	91.8 ^a	15.0 ^a
Trt.C	35.3 ^c	41.5 ^a	30.2 ^a	92.1 ^a	13.0 ^a
Trt.D	34.4 ^c	42.2 ^a	31.3 ^a	93.2 ^a	14.0 ^a

¹Means within column by the same letter are not significantly different (P<0.05).

²After cream separation cream was treated with 10% β -CD and blended with skim milk at 1,000 psi for Trts. Con : no added, Trt. A : Cheddar cheese was treated with 10% β -CD

Trt.B. Trt.C. Trt.D : 1, 3, 5% EPO added cholesterol-reduced cream, respectively

2. Cheddar cheese 지방산화도(TBA)변화

β -CD를 처리하여 EPO를 첨가한 Cheddar cheese 의 숙성 중 지방산화도를 측정된 결과 다음의 Fig 23과 같다. 일반적인 Cheddar cheese 인 control의 경우 숙성 0주에는 0.145에서 숙성 16주에는 0.142, 숙성 32주에는 0.144로 지방산화도가 대체로 일정하여 유의적 차이를 보이지 않았다. 반면에 β -CD를 이용하여 크림의 콜레스테롤을 제거한 후 Cheddar cheese를 제조 한 실험군은 숙성 0주에는 0.144로 control과 유사한 수치를 나타내었으나, 숙성 4주부터는 0.18, 숙성 8주에는 0.204로 숙성이 진행될수록 지방산화도(TBA)가 높아지는 결과를 얻었다. Kwak 등^(5, 16)의 연구결과에 의하면 β -CD를 이용하여 크림의 콜레스테롤을 제거한 치즈는 숙성이 빨리 진행되어 2, 4, 6, 8주간 숙성된 치즈는 control 치즈에서 각각 8, 16, 24, 32 주 숙성과 유사하다고 보고하였으며 위 실험에서도 같은 결과를 얻었다. β -CD를 이용하여 콜레스테롤을 제거한 후 EPO를 첨가한

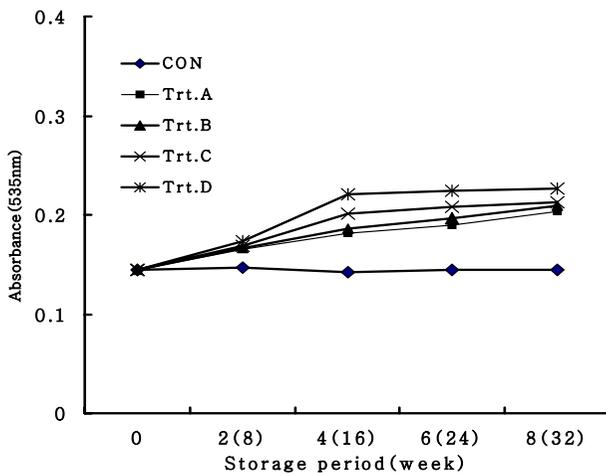


Fig 23. Changes of thiobarbituric acid(TBA) values at 535nm in evening primrose oil added and cholesterol-reduced Cheddar cheese ripened at 7°C for 8 weeks¹

¹Cream used was treated with 10% β -cyclodextrin for Trts

Con : no added, ripened at 7°C for 32weeks.

Trt. A : Cheddar cheese was treated with 10% β -CD

Trt.B, Trt.C, Trt.D : 1, 3, 5% EPO was added in each treated cholesterol-reduced Cheddar cheese, respective

Cheddar cheese 에서는 1% 첨가 시 숙성 0주에는 0.145에서 숙성 4주에는 0.186, 숙성 8주에는 0.209로 증가되었으며 3% 첨가 시 숙성초기에 0.146에서 0.213으로 증가되었으며 5% 첨가시 0.145에서 0.227로 증가되었으며 β -CD만을 처리한 실험군과 같은 경향을 보이며 숙성될수록 지방산화도가 높게 측정되었고 control을 제외한 모든 실험군간의 유의적 차이는 없었다. 이와 유사한 실험으로 β -CD를 이용하여 콜레스테롤을 제거한 휘핑크림에서는 저장 초기엔 값의 차이가 없으나 시간이 지날수록 지방산화도가 증가한다고 보고하였다⁽³⁵⁾.

Dawson 등⁽⁵⁴⁾에 따르면 불포화 지방산은 이중결합의 구조로 인해 O₂와 쉽게 결합할 수 있으며 이로 인해 과산화물의 생성과 free radical 등의 생성에 의해

산패취가 발생한다고 보고하였고 Chan⁽⁶²⁾에 의하면 특히 유지식품의 자동산화는 유지지방산 함량과 불포화도에 따라 증가한다고 보고하였다. 본 실험에서 Cheddar cheese에 첨가한 EPO에는 80% 이상의 linoleic acid나 gamma linolenic acid 같은 불포화지방산이 포함되어 있기 때문에 EPO의 첨가 비율이 높을수록 지방산화도가 높게 측정된 것으로 사료된다.

3. 유지지방산 정량 분석

가. Short-chain free fatty acids 변화

본 실험은 EPO를 첨가하여 제조한 Cheddar cheese의 숙성동안에 Short-chain fatty acid(SFFA) 생성에 관하여 분석 한 것으로 그 결과는 Table 46에 나타내었으며, Total free fatty acid는 Fig. 24에서와 같이 나타내었다. 치즈가 숙성되면서 생성되는 저급유리지방산인 C4, C6, C8, C10의 각 성분들은 숙성기간이 지날수록 증가되었다. 전체적으로 SFFA 중 C4와C10의 함량이 가장 많았으며, C8이 가장 낮게 측정되었다. 또한 이들의 총 저급지방산의 경우 0주에는 74.2ppm에서 16주에는 87.5ppm, 32주에는 84.1ppm으로 증가하였으나 유의적 차이는 나타나지 않았다. 그러나 β -CD 처리한 실험군에서 0주에는 control에 비하여 저급지방산의 변화가 높아 0주에는 78.5ppm에서 4주에는 90.1ppm, 8주에는 103.3ppm으로 증가되었다. 또한 EPO를 첨가한 치즈의 경우에는 1% 첨가 시 0주에는 75.6ppm에서 8주에는 105.7ppm이며, 3% 첨가 시 0주에는 76.1ppm에서 8주에는 110.7ppm이며 5% 첨가 시 0주에는 80.6ppm에서 8주에는 118.3ppm으로 모두 숙성될수록 증가하였다. 저급 지방산은 치즈의 숙성과 관련하여 숙성이 진행될수록 저급지방산이 증가하게 된다. 위의 실험 결과로 β -CD를 처리하여 제조한 Cheddar cheese가 숙성이 빨리 진행됨을 알 수 있으며 또한 EPO 첨가 비율이 높을수록 증가 하는 경향을 보였다. Kwak 등⁽¹²⁾은 β -CD를 이용하여 cream의 콜레스테롤을 제거한 Cheddar cheese의 저급지방산의 변화가 본 실험과 유사한 결과를 얻었다. 본 실험에서 control 치즈보다 β -CD 처리한 치즈의 저급지방산의 증가량이 높았으며, EPO 첨가 비율이 높을수록 저급지방산이 증가하였으므로 저급지방산 생성에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

Table 46. Concentrations of short chain fatty acid in EPO added and cholesterol-reduced Cheddar cheese ripened at 7°C for 8 weeks¹

Ripening period (week)	Treatment	SFFA concentration (ppm)			
		C ₄	C ₆	C ₈	C ₁₀
0	Con	18.2 ^b	17.1 ^a	20.4 ^a	15.5 ^{ab}
	Trt.A	19.3 ^b	16.9 ^a	21.9 ^a	20.4 ^a
	Trt.B	28.3 ^a	16.5 ^a	11.7 ^b	19.1 ^a
	Trt.C	28.7 ^a	16.8 ^a	12.1 ^b	18.5 ^a
	Trt.D	27.2 ^a	19.7 ^a	13.3 ^b	20.4 ^a
2(8)	Con	19.1 ^b	17.2 ^a	21.7 ^a	25.9 ^a
	Trt.A	22.7 ^b	17.3 ^a	22.1 ^a	24.9 ^a
	Trt.B	30.6 ^a	18.5 ^a	13.4 ^b	21.6 ^a
	Trt.C	31.4 ^a	18.1 ^a	13.4 ^b	23.5 ^a
	Trt.D	31.4 ^a	20.2 ^a	15.2 ^b	23.3 ^a
4(16)	Con	18.7 ^b	17.8 ^b	21.8 ^a	29.2 ^a
	Trt.A	22.9 ^b	18.6 ^{ab}	22.9 ^a	25.7 ^a
	Trt.B	31.2 ^a	19.1 ^a	14.1 ^b	22.5 ^b
	Trt.C	33.7 ^a	19.5 ^a	14.8 ^b	26.7 ^a
	Trt.D	35.5 ^a	23.5 ^a	18.2 ^a	27.4 ^a
6(24)	Con	19.8 ^b	18.1 ^b	23.5 ^a	25.9 ^{ab}
	Trt.A	23.6 ^b	18.2 ^b	24.2 ^a	26.3 ^a
	Trt.B	32.5 ^a	20.5	15.7 ^b	21.8 ^b
	Trt.C	36.6 ^a	21.3 ^{ab}	15.8 ^b	30.9 ^a
	Trt.D	35.9 ^a	26.3 ^a	19.6 ^{ab}	28.8 ^a
8(32)	Con	21.5 ^b	18.7 ^b	25.3 ^a	27.0 ^a
	Trt.A	27.8 ^b	19.6 ^b	26.4 ^a	29.3 ^a
	Trt.B	37.9 ^a	22.8 ^b	16.7 ^b	28.3 ^a
	Trt.C	39.6 ^a	24.9 ^a	16.6 ^b	29.6 ^a
	Trt.D	40.2 ^a	28.7 ^a	18.9 ^b	30.5 ^a

¹Means within column by the same letter are not significantly different (P<0.05)

con. : no added, ripened at 7°C for 32 weeks.

Trt. A : cream was treated with 10% β-CD

Trt.B, Trt.C, Trt.D cream was treated with 10% β-CD and 1, 3, 5% EPO added

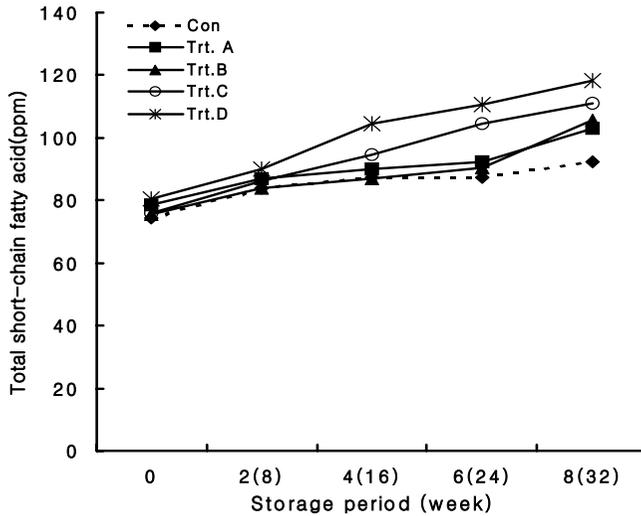


Fig. 24. Production of total free fatty acid concentrations in evening primrose oil added and cholesterol-reduced Cheddar cheese ripened at 7°C for 8 weeks¹

¹Cream used was treated with 10% β -cyclodextrin for Trts

Con. 1 : no added, Trt. A : Cheddar cheese was treated with 10% β -CD

TrtB, TrtC, TrtD : 1, 3, 5 EPO was added in each treated cholesterol-reduced Cheddar cheese, respectively

나. Gamma linolenic acid

β -CD를 처리하고 EPO를 첨가하여 제조한 Cheddar cheese의 저장기간 중 gamma linolenic acid(GLA)의 함량변화를 분석한 결과 control과 β -CD를 처리한 치즈에서는 GLA가 측정되지 않았고, EPO의 첨가 비율이 높을수록 치즈안에 GLA가 분석결과 높게 측정되었다. 그러나 저장기간이 경과할수록 1% 첨가 시 19.02ppm에서 8.59ppm으로, 3% 첨가 시 45.01ppm에서 23.19ppm, 5% 첨가 시 74.66ppm에서 32.41ppm으로 각각 두배 이상 감소하는 경향을 보였다.

Hudson⁽⁶³⁾의 보고에 의하면 GLA는 all-cis 6:9:12 double-bond system이기 때문에 이성화, 중합화 및 기타의 화학적인 성분변화가 쉽게 일어날 수 있다고

보고하여 본 실험에서 GLA를 함유한 EPO의 자동산화는 매우 클 것으로 사료된다.

4 물성 검사

Cheddar cheese의 물성을 측정하기 위해 Rheometer을 사용하여 hardness(경도), elasticity(탄력성), cohesiveness(응집성), gumminess(고무질성), chewiness(저작성)를 측정하였으며 그 결과는 Table 47에 나타내었다. 본 실험에서 Cheddar cheese의 물성 측정 결과 경도는 control 0주에는 804.6에서 32주에는 5542.2로 증가하는 경향이 나타났으며 β -CD처리한 치즈는(Trt. A) 숙성 0주에는 1194.5에서 8주에는 1067.6으로 감소하는 경향을 나타내었다. 1% EPO를 첨가한 치즈(Trt. B)의 경우 숙성 0주에는 2477.1에서 숙성 8주에는 3898.6으로 증가하였다. 그러나 3, 5% EPO를 첨가한 치즈의 실험군에서는 숙성 2주까지 증가하여 그 이후부터는 유의적 차이는 나타나지 않았다. 탄력성은 모든 실험군간에서 같은 경향을 보이며 유의적 차이를 나타내지 않았으나 Trt. A은 다른 실험군에 비하여 낮은 수치를 나타내어 탄력성이 좋지 않은 것으로 나타내었다. 응집성의 경우 control의 경우 숙성 0주에는 53.5에서 8주에는 66.6으로 증가하였고, Trt. B의 경우 숙성 0주에는 78에서 숙성8주에는 81.6으로 증가하였으며, Trt. C의 경우 86.9에서 87.3으로 Trt. D의 경우 84.5에서 87.6으로 증가하여 같은 경향이 나타내었다. 고무질성의 경우 control은 숙성 0주부터 8주까지 증가하였다가 감소하였고, 다른 군들은 모두 숙성기간이 경과할수록 증가하였다. 저작성의 경우 control과 Trt. A는 숙성 0주에서 4주에는 증가하였다가 감소하였고, 다른 군들은 모두 증가하였고, 높은 수치를 나타내었다.

본 실험결과 경도는 숙성기간(8주) 동안에 control과 실험군 간의 차이가 있었다. 경도는 EPO의 첨가 비율이 높을수록 감소되었으며 모든 숙성 기간동안 control은 실험군과 비교하여 탄력성이 더 높았으며 응집성, 고무질성 또한 탄력성과 같은 경향을 나타내었다. 본 연구에서 control의 숙성 기간동안의 성질이 EPO를 첨가한 치즈의 빠른 숙성 기간동안의 조직적 성질과 유사하였다.

Table 47. Textural properties in EPO added cholesterol-reduced Cheddar cheese ripened at 7°C for 8 weeks¹

Ripening period (week)	Treatment	Con	Trt.A	Trt.B	Trt.C	Trt.D
0	Hardness	804.6	1194.5	1846.8	2112.0	1977.9
	Elasticity	60.7	76.2	90.7	90.5	91.2
	Cohesiveness	53.5	91.4	78	86.9	84.5
	Gumminess	201.6	307.3	800.3	889.4	602.6
	Chewiness	122.4	296.0	726.5	730.5	819.7
2(8)	Hardness	1387.1	1993.0	2601.6	2250.7	2260.4
	Elasticity	75.8	76.3	95.2	95.1	91.9
	Cohesiveness	62.6	93.2	78.8	87.8	88.5
	Gumminess	1181.6	416.8	831.3	804.8	752.5
	Chewiness	849.0	401.5	935.1	761.4	889.9
4(16)	Hardness	1041.9	1251.2	2031.6	2453.0	2177.8
	Elasticity	79.6	86.3	94	93	92.8
	Cohesiveness	64.1	106.9	81.2	88.9	87.2
	Gumminess	781.2	547.6	1233.4	676.0	795.4
	Chewiness	622.2	421.6	1160.1	636.9	733.3
6(24)	Hardness	5328.2	1220.6	3797.6	2362.3	2057.5
	Elasticity	78.1	84.5	93.9	93.2	97.7
	Cohesiveness	65.7	103.5	80.1	87.2	91.1
	Gumminess	576.3	577.6	1167.3	795.4	682.1
	Chewiness	402.6	433.0	1223.4	733.3	666.6
8(32)	Hardness	5542.2	1352.5	3479.7	1994.2	2426.2
	Elasticity	76.7	85.3	93.8	92.8	93.6
	Cohesiveness	66.6	91.6	81.6	87.3	87.6
	Gumminess	439.5	623.4	1488.3	974.1	857.2
	Chewiness	337.2	398.8	1342.8	899.9	714

¹Means within row by the same capital letter are not significantly different (P<0.05)

con : no added, ripened at 7°C for 32 weeks.

Trt. A : cream was treated with 10% β -cyclodextrin for Trts

Trt.B, Trt.C, TrtD cream was treated with 10% β -CD and 1%, 3%, 5% EPO added

5. 관능검사

EPO를 첨가한 Cheddar cheese의 관능검사 평가는 다음의 Table 48 에서와 같다. Cheddar cheese를 7℃에서 control은 32주간 그리고 실험군은 8주간 숙성 한 것으로 7점법으로 평가하였다.

Control에서는 산패취와 이미 이취는 나타나지 않았지만 숙성되면서 쓴맛의 정도가 숙성 0주에 4.0~4.3으로 증가하였으나 유의적 차이는 나타나지 않았다. Cheddar cheese은 숙성 될수록 강하게 느껴졌으며 조직 평가 에서는 숙성 될수록 조직의 강도가 약해지는 것으로 나타났다. 숙성 0주 산패취인 경우 1% EPO를 첨가한 실험군(Trt.A)에서는 4.33, 3% EPO를 첨가한 실험군(Trt.B)에서는 5.0, 5% EPO를 첨가한 실험군(Trt.C)에서는 5.3으로 평가되어 EPO 첨가 비율이 높을수록 수치가 증가 하였다. 쓴맛인 경우 유의적 차이가 나타나지 않았으며 치즈향인 경우 3.6~3.3으로 평가되어 EPO 첨가 비율이 높을수록 수치가 감소하였다. 이미 이취인 경우 4.1~5.1, 조직인 경우 4.2~4.6으로 각각 평가되어 EPO 첨가 비율이 높을수록 수치가 증가하였다. 기호도는 control인 경우 7.0으로 대단히 좋다고 평가되었고 모든 실험군 에서는 유의적 차이가 나타나지 않았다. 숙성 2주 산패취인 경우 4.4~5.4, 이미 이취인 경우 4.1~5.0, 조직인 경우 4.3~4.5로 각각 평가되어 EPO 첨가 비율이 높을수록 수치가 증가하였지만 이와 반대로 치즈향인 경우 3.7~3.4로 EPO 첨가 비율이 높을수록 수치가 감소하였다. 숙성 8주 산패취인 경우 4.7~5.7, 이미 이취인 경우 4.3~5.3, 조직인 경우 4.1~4.4로 각각 평가되어 EPO 첨가 비율이 높을수록 수치가 증가하였지만 이와 반대로 치즈 향인 경우 4.22~3.66로 감소하였다. 본 실험 결과 control과 비교하여 실험군의 이미 이취, 산패취는 숙성 기간동안 증가 하였으나 반대로 조직은 감소하였다. 또한 EPO 첨가 비율이 높을수록 이미 이취, 산패취가 높았으며 반대로 치즈 향은 감소하였다. Dawson⁽⁶²⁾등의 보고에 따르면 불포화 지방산은 이중결합의 구조로 인해 O²와 쉽게 결합할 수 있으며 이로 인해 과산화물의 생성과 free radical 등의 생성에 의해 산패취가 발생하여 제품의 품질 저하를 가져올 수 있다고 보고하여 위의 실험과 같은 결과를 얻었다. 본 연구에서 EPO는 이미 이취, 산패취에는 영향을 끼치나 조직 평가에서 비교적 긍정적인 결과를 얻었다.

Table 48. Sensory characteristics of EPO-added cholesterol-reduce Cheddar cheese ripened at 7°C for 8 weeks¹

Storage period(day)	Sensory description	Treatment			
		Cont	Trt.A	Trt.B	Trt.C
0	Rancid	4.0 ^b	4.3 ^b	5.0 ^a	5.3 ^a
	Bitter	4.0 ^b	4.3 ^a	4.5 ^a	4.1 ^{ab}
	Cheddar flavor	4.0 ^a	3.6 ^{ab}	3.4 ^b	3.3 ^b
	Off-flavor	4.0 ^c	4.1 ^{bc}	4.5 ^b	5.1 ^a
	Texture	4.0 ^b	4.2 ^{ab}	4.5 ^a	4.6 ^a
	Overall	7.0 ^a	4.3 ^b	3.0 ^c	3.2 ^c
2(8)	Rancid	4.0 ^b	4.4 ^b	5.2 ^a	5.4 ^a
	Bitter	4.1 ^a	4.4 ^a	4.3 ^a	4.2 ^a
	Cheddar flavor	4.2 ^a	3.7 ^{ab}	3.5 ^b	3.4 ^b
	Off-flavor	4.0 ^b	4.1 ^b	4.6 ^a	5.0 ^a
	Texture	3.7 ^b	4.3 ^a	4.4 ^a	4.5 ^a
	Overall	7.0 ^a	2.7 ^b	3.4 ^b	2.7 ^b
4(16)	Rancid	4.0 ^c	4.5 ^b	5.2 ^a	5.5 ^a
	Bitter	4.3 ^b	5.0 ^a	4.4 ^{ab}	4.6 ^a
	Cheddar flavor	4.3 ^a	4.0 ^a	3.5 ^b	3.4 ^b
	Off-flavor	4.0 ^a	4.1 ^a	3.7 ^a	3.5 ^b
	Texture	3.5 ^b	4.2 ^a	4.3 ^a	4.5 ^a
	Overall	7.0 ^a	3.8 ^{bc}	4.3 ^b	1.4 ^c
6(24)	Rancid	4.0 ^c	4.6 ^b	5.2 ^a	5.5 ^a
	Bitter	4.2 ^b	5.3 ^a	4.8 ^a	5.1 ^a
	Cheddar flavor	4.3 ^{ab}	4.1 ^a	3.7 ^b	3.6 ^b
	Off-flavor	4.0 ^b	4.1 ^b	4.2 ^b	4.6 ^a
	Texture	3.4 ^b	4.2 ^{ab}	4.2 ^{ab}	4.6 ^a
	Overall	7.0 ^a	2.7 ^b	3.4 ^b	2.7 ^b
8(32)	Rancid	4.0 ^c	4.7 ^b	5.3 ^{ab}	5.7 ^a
	Bitter	4.2 ^{bc}	5.7 ^a	4.0 ^c	4.6 ^b
	Cheddar flavor	4.3 ^a	4.2 ^a	3.8 ^{ab}	3.6 ^b
	Off-flavor	4.0 ^b	4.3 ^b	4.7 ^{ab}	5.3 ^a
	Texture	3.4 ^b	4.11 ^a	4.2 ^a	4.4 ^a
	Overall	7.0 ^a	2.77 ^c	3.4 ^b	2.7 ^c

(continues)

8(32)	Rancid	4.0 ^c	4.7 ^b	5.3 ^{ab}	5.7 ^a
	Bitter	4.2 ^{bc}	5.7 ^a	4.0 ^c	4.6 ^b
	Cheddar flavor	4.3 ^a	4.2 ^a	3.8 ^{ab}	3.6 ^b
	Off-flavor	4.0 ^b	4.3 ^b	4.7 ^{ab}	5.3 ^a
	Texture	3.4 ^b	4.11 ^a	4.2 ^a	4.4 ^a
	Overall	7.0 ^a	2.77 ^c	3.4 ^b	2.7 ^c

¹Means within raw by the same letter are not significantly different (P<0.05).

The scale of bitter, off-taste, off-flavor, texture: 1=none, 4=moderate, 7= very strong.

The scale of overall scores: 1=dislike very much, 4= neither like nor dislike, 7= like very much.

¹Cream used was treated with 10% β-cyclodextrin for Trts

Con. : no added, ripened at 7°C for 32weeks.

Trt.A, Trt.B, Trt.C : 1, 3, 5% EPO was added in each treated cholesterol-reduced Cheddar cheese, respective

6. 동물실험

High-cholesterol, high-fat diet를 급여한지 6주 후 평균 식이 섭취량은 26~26.1g/day이며, 평균 체중은 control과 5% EPO를 첨가한 실험군에서 각각 66.5와 77.3g 으로 큰 차이는 보이지 않았다. 5주 동안 high-cholesterol, high-fat diet를 급여한 후 혈장 분석 결과 control과 실험군의 총콜레스테롤 농도가 평균적으로 153.4와 184mg/dl이다. 본 실험을 위하여 6주 동안 control 랫트에게 콜레스테롤이 제거되지 않은 치즈와 fat-free diet를 급여하였고 실험군 랫트에게 5% EPO를 첨가한 치즈와 fat-free diet를 혼합하여 급여한 후 혈중 콜레스테롤을 측정 한 결과 control 랫트의 혈중 콜레스테롤은 153.4에서 165.8mg/dl로 8% 증가하여 상대적으로 중요한 차이는 나타나지 않았으나 실험군 랫트에서는 184에서 137mg/dl로 혈중 콜레스테롤이 25%로 감소하였다. HDL-콜레스테롤의 농도는 5% EPO를 첨가한 식이를 섭취한 실험군이 37.4에서 38.8mg/dl로 1.4mg/dl이 증가하였지만 같은 diet를 섭취하고 5% EPO를 섭취하지 않은 control군은 32.3에서 31.4mg/dl

Table 49. Effects of experimental diets on food intake and body weight gain.¹

Treatment	Food intake (g/day)	Body weight gain (g/ 6week)
Control ²	26.0 ^a	66.5 ^a
EPO ³	26.1 ^a	77.2 ^a

¹Rats were fed for 12weeks. Means within column by the same letter are not significantly different (P<0.05).

²Control : no added

³5% EPO added cholesterol reduced Cheddar cheese. (0.5g/day)

Table 50. Effects of experimental diets on the change of blood triacyl-glycerol, total cholesterol and high density lipoprotein in rats fed for 12weeks¹

Treatment	Total CH		TG		HDL	
	Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final
	(mg/dL)					
Control ²	64.5 ^a	63.5 ^a	153.4 ^a	165.8 ^a	32.3 ^a	31.4 ^a
EPO ³	53.9 ^b	60.8 ^a	184 ^a	137.1 ^b	37.4 ^a	38.8 ^a

¹Means in a column with the same letter are not significantly different (P<0.05).

²Control : no added

³5% EPO added cholesterol reduced Cheddar cheese. (0.5g/day)

로 0.9mg/dl 감소하였다. TC의 농도는 control군은 153.4에서 165.8mg/dl로 12.4mg/dl이 증가하였고 실험군은 184에서 137.1mg/dl로 46.9mg/dl이 감소하였다.

Park⁽⁶⁹⁾ 등의 보고에 따르면 돼지기름, 옥수수기름 그리고 r-linolenic acid 급원으로서 EPO(저수준) 와 서양자초유(고수준)를 각각 5% 함유하는 실험식이

를 급여한 결과 총 콜레스테롤함량은 r-linolenic acid 함유량이 가장 많은 서양 자초유가 가장 낮으며 달맞이꽃 종자유, 옥수수기름, 돼지기름의 유의적인 감소 경향을 나타냈으며 HDL-콜레스테롤은 증가시켰으며, TG 함량의 유의적인 감소 경향이 나타났다는 결과를 보고 하였다. 또한 Watanabe 등⁽⁶⁶⁾의 보고에 의하면 47%의 γ -linolenic acid(GLA)를 함유한 GLA-rich diet를 섭취시킨 랫트가 혈청 HDL-콜레스테롤이 크게 증가한다고 보고하였으며, 최⁽⁷⁰⁾의 보고에서는 EPO를 첨가한 식이를 섭취시킨 랫트에서 혈장 총콜레스테롤이 감소하는 결과를 나타냈다.

본 실험은 Cheddar cheese에 5% EPO의 첨가가 혈중 콜레스테롤을 획기적으로 감소시켰으며 HDL-콜레스테롤과 TG농도가 각각 증가되는 결과가 위의 실험과 일치하였으며 다음(Table49, 50)과 같다.

제 6 절 Gamma linolenic acid를 첨가한 혈중 콜레스테롤저하 버터에 관한 연구

1. 버터의 일반 성분 분석

크림을 β -CD 처리하여 콜레스테롤을 제거한 후 제조한 버터와 β -CD 처리 후 GLA를 첨가한 버터의 일반 성분을 분석한 결과 수분 함량은 16.9~19.6%, 조지방은 77.3~78.2%, 조단백질은 2.0~2.3%와 같은 결과를 얻었으며 이는 일반적인 버터의 성분과 유사함을 보였다. 콜레스테롤 제거율은 92.7~98.2%로 이는 Ahn과 Kwak⁽⁴⁾의 보고와도 일치하였다.

Table 51. Mean chemical composition of butter treated β -CD and added GLA¹

Component	Control ²	Trt A ³	Trt B ⁴
Fat	77.3 ^b	80.6 ^a	78.2 ^{ab}
Moisture	18.8 ^a	16.9 ^a	19.6 ^a
Protein	2.4 ^a	2.3 ^a	2.0 ^a
Cholesterol removal	0.0 ^a	93.2 ^a	92.7 ^a
Yield	37.7 ^c	46.6 ^b	48.0 ^a

¹Means within column by the same capital letter are not significantly different (P<0.05)

²Control : no added

³Trt. A : butter was treated with 10% β -CD

⁴Trt. B : butter was treated with 10% β -CD and added GLA

2. 산가(acid value)의 변화

산가는 유지의 보존, 가열 등에 의하여 변하는 변수로서 유지 및 유지를 함유한 식품의 품질 판정에 필요한 함수이며, 특히 유지의 산패 정도를 나타내는 기준이 되는 값이다⁽⁷¹⁾.

β -CD 처리를 하여 cholesterol을 제거한 후 GLA를 첨가한 버터의 저장 기간 중 산가를 측정된 결과를 Fig. 25에 나타내었다. 일반적인 버터인 control의 경우 저장 0주에는 0.9527에서 저장 2주에는 1.6833으로, 4주에는 1.6746으로 변화하였고, β -CD를 처리하여 cholesterol을 제거한 버터는 저장 0주에 0.6234에서 저장 2주에는 0.7481, 저장 4주에는 1.9327로 저장 기간이 경과할수록 산가가 높아지는 결과를 얻었으며, 그 값은 control과 대체로 유사하였다. β -CD 처리를 거친 후 GLA를 첨가한 버터는 저장 0주에는 2.5370에서 저장 2주에는 2.9875, 저장 4주에는 3.4073으로 증가하였으며 이도 역시 저장기간이 경과함에 따라 지방 산화도가 증가하였으나 그 수치는 control과 β -CD만을 처리한 버터보다 더욱 높게 측정되었다. Smith⁽⁷²⁾에 의하면 불포화 지방산의 경우 자유 라디칼에 의한 연쇄 반응에 의하여 자동산화 된다고 보고하였다. 본 실험에서 버터에 첨가한 GLA가 불포화지방산으로 지방산화도에 영향을 미치는 것으로 판단된다.

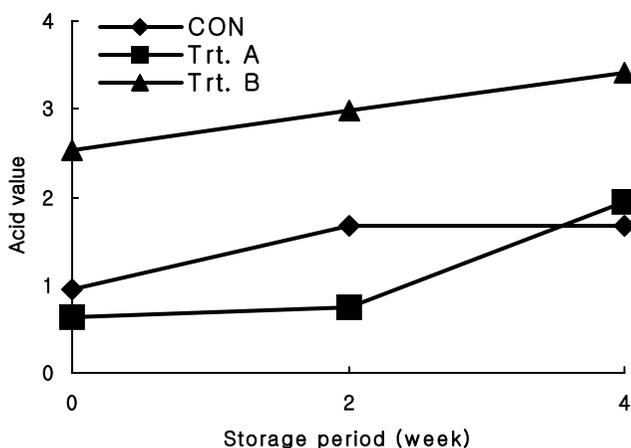


Fig 25. Change of acid value at treated with β -CD and added GLA in butter stored at 4°C for 4 weeks

¹Con : no added

²Trt. A : butter was treated with 10% β -CD

³Trt. B : butter was treated with 10% β -CD and added GLA

3. TBA의 변화

β-CD로 cholesterol을 제거한 후 GLA를 첨가한 버터의 저장기간 중 TBA를 측정된 결과는 Fig. 26에서와 같다. 일반적인 버터인 control의 경우 저장 0주에는 0.0845에서 저장 2주에는 0.1083으로, 4주에는 0.1661로 변화하였고, β-CD 처리를 하여 버터의 cholesterol을 제거한 버터는 저장 0주에는 0.1324에서 저장 2주에는 0.1083, 저장 4주에는 0.1861로 저장 기간이 경과할수록 TBA 수치가 높아지는 결과를 얻었으며, 그 값은 control과 대체로 유사하였다. β-CD 처리를 거친 후 GLA를 첨가한 버터는 저장 0주에는 0.1453에서 저장 2주에는 0.1635, 저장 4주에는 0.1861로 이도 역시 저장기간이 경과함에 따라 지방 산화도가 증가하였으며 그 수치는 control과 β-CD만을 처리한 버터보다 큰 값을 나타내어 지방 산화도를 나타내는 산가와 유사한 결과를 보였다.

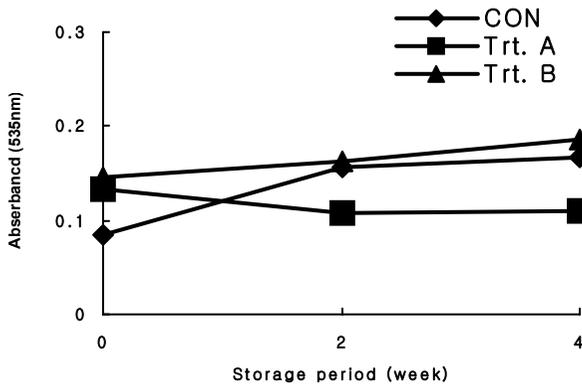


Fig 26. Change of TBA at treated with β-CD and added GLA in butter stored at 4°C for 4 weeks

¹Con : no added

²Trt. A : butter was treated with 10% β-CD

³Trt. B : butter was treated with 10% β-CD and added GLA

4. Rheological property

버터의 물성을 측정하기 위하여 Rheometer를 사용하여 hardness, elasticity, cohesiveness, gumminess, chewiness를 측정하였으며 그 결과는 Table 52에 나타내었다. 버터의 hardness를 측정한 결과 control에서는 저장 0주에는 457.1, 2주에는 515.7, 4주에는 683.1로 수치가 점점 증가하였다. 그러나 β -CD 처리한 버터와 GLA를 첨가한 버터는 저장 기간에 따른 유의적인 차이가 없었다. Elasticity는 모든 실험군 간에서 같은 경향을 보이며 유의적 차이를 나타내지 않았으나 β -CD 처리한 실험군은 다른 실험군에 비교하여 높은 수치를 나타내었다. Cohesiveness의 경우 control은 저장 0주에는 27.2에서 4주째에 43.8로 β -CD만을 처리한 버터는 저장 0주에는 46.8에서 저장 4주째에는 50.6으로, β -CD를 이용해 콜레스테롤을 제거한 후 GLA를 첨가한 버터는 저장 0주에는 24.1에서 저장 4주째에는 43.6으로 같은 경향을 보이며 증가되는 것을 관찰할 수 있었다. Gumminess와 chewiness는 모든 실험군에서 낮은 수치를 나타내었으며 저장 0주에서부터 4주째까지 약간씩 증가하는 것이 보였다. β -CD 처리한 실험군은 다른 실험군과 비교하여 모든 조직적 특성에서 대체적으로 높은 수치를 나타내었으나 저장 기간이 길어질수록 수치가 증가한다는 점은 공통적이었다. 그러므로 버터에 GLA의 첨가는 물성에 큰 영향을 주지 않는 것을 알 수 있었다.

Table 52. Textural properties in butter treated β -CD and added GLA at 4°C for 4 weeks¹

Treat-ment	Ripened (week)	hard-ness	elasti-city	cohesi-veness	gummi-ness	chewi-ness
Con ²	0	457.1	47.4	27.2	17.6	13.6
	2	515.7	57.0	36.7	21.7	16.7
	4	683.1	63.8	41.8	26.2	19.6
Trt. A ³	0	666.2	86.6	46.8	21.1	18.3
	2	683.2	93.3	46.3	20.4	19.0
	4	686.5	96.0	50.6	30.2	20.0
Trt. B ⁴	0	596.0	43.3	24.1	18.0	13.5
	2	564.1	39.2	32.1	24.2	21.7
	4	628.1	45.4	43.6	25.3	21.5

¹Means within column by the same capital letter are not significantly different (P<0.05)

²Con : no added

³Trt. A : butter was treated with 10% β -CD

⁴Trt. B : butter was treated with 10% β -CD and added GLA

5. 관능검사

콜레스테롤을 제거한 후 GLA를 첨가한 버터의 관능검사 결과는 Table 53에서와 같이 나타났다. 4°C에서 4주 동안 저장한 버터를 가지고 texture, color, 이취(off-flavor), 쓴맛, 신맛, 기름맛, 기호도를 7점법으로 평가하였다. Texture는 실험군 간에 유의적 차이를 나타내지 않았으나 노란 정도는 저장 기간이 길어질수록 약간씩 높아지는 것을 볼 수 있었다. control과 β -CD만을 처리한 버터에서 이취와 쓴맛, 신맛은 비슷한 수치로 나타났으나 GLA 첨가 버터는 그보다 약간 높게 평가되었으며 저장 기간이 길어질수록 수치가 약간씩 증가하였다. 기름맛은 control에서 수치가 가장 적게 나왔고 β -CD 처리한 버터와 유의적 차이를 보이지는 않았다. 그러나 GLA 버터는 수치가 큰 폭으로 증가해 다른 실험군과 구별되는 것을 볼 수 있었다. 기호도는 control과 β -CD만을 처리한 버터를 선호하는 것으로 나타났고 GLA를 첨가한 버터는 강한 기름맛으로 선호도가 낮을 것을 관찰할 수 있었다.

Table 53. Sensory characteristics for butter treated β -CD and added GLA stored at 4°C for 4 weeks¹

Storage period (week)	Treatment	Sensory description						
		Texture	Color	Rancid	Bitterness	Acidity	Greasi-ness	Over-all ²
0	Con. ³	4.0 ^a	4.0 ^c	4.0 ^b	4.0 ^b	4.0 ^b	4.0 ^b	1.4 ^b
	Trt.A	4.2 ^a	4.7 ^b	3.4 ^b	4.0 ^b	4.1 ^b	4.1 ^b	1.5 ^b
	Trt.B	4.0 ^a	5.5 ^a	4.8 ^a	4.5 ^a	4.6 ^a	5.5 ^a	3.0 ^a
2	Con.	4.0 ^a	4.1 ^c	4.8 ^a	4.2 ^a	4.1 ^a	4.5 ^b	1.7 ^b
	Trt.A	3.7 ^a	4.8 ^b	4.5 ^a	4.4 ^a	4.2 ^a	4.6 ^b	1.4 ^b
	Trt.B	3.7 ^a	5.5 ^a	4.9 ^a	4.7 ^a	4.3 ^a	5.7 ^a	2.9 ^a
4	Con.	4.4 ^a	4.2 ^c	4.2 ^a	4.5 ^b	4.4 ^a	4.9 ^b	1.2 ^c
	Trt.A	4.4 ^a	5.0 ^b	4.5 ^a	4.6 ^b	4.4 ^a	5.0 ^b	1.8 ^b
	Trt.B	4.2 ^a	6.0 ^a	4.9 ^a	5.3 ^a	4.7 ^a	6.0 ^b	3.0 ^a

¹Means within column by the same letter are not significantly different (P<0.05)

The Scale of sensory score : 1=very slight, 2=slight, 3=slight-moderate, 4=moderate, 5=moderate-strong, 6=strong, 7=very strong

²The scale of overall score ; 1=like extremely, 2=neither like nor dislike, 3=dislike extremely

³Con. : no added

⁴Trt. A : butter was treated with 10% β -CD

⁵Trt. B : butter was treated with 10% β -CD and added GLA

Lillard 등⁽⁷³⁾은 우유 지방질의 산화 정도인 TBA 값, 과산화물 값 및 carbonyl 값과 산패취 발생과는 높은 상관관계가 있다고 보고한 것으로 보아 지방 산화도가 높은 GLA 첨가 버터에서 이취와 이미가 더욱 강하게 느껴진 것과 일치한다.

6. 동물실험

GLA가 첨가된 버터의 혈중 콜레스테롤 저하 기능을 관찰하기 위하여 랫트에 6주간 high fat diet로 사육하고 6주간 rodent purified diet와 각각 control 버

터, β -CD 처리로 콜레스테롤을 제거한 버터 그리고 β -CD 처리 후 GLA를 첨가한 버터를 혼합하여 섭취시킨 랫트의 체중 증가량, 사료 섭취량, 총 콜레스테롤의 함량과 중성지방, HDL-cholesterol의 함량을 측정된 결과를 Table 54, 55에 나타내었다. 실험 랫트는 control 버터가 첨가된 실험 식이를 6주 동안 하루 평균 22.18g/day 섭취했으며, β -CD 처리로 콜레스테롤이 제거된 버터가 첨가된 실험 식이는 20.54g/day, GLA가 첨가된 버터가 혼합된 실험 식이는 22.69g/day 섭취했다. 랫트의 무게는 6주 동안 control 버터를 혼합한 식이를 섭취한 그룹과 β -CD 처리 버터를 혼합한 식이를 섭취한 그룹, 그리고 GLA 버터를 혼합한 식이를 섭취한 그룹에서 각각 125.65, 120.43, 115.17g으로 나타났다.

Table 54. Effects of experimental diets on food intake and body weight gain¹

Treatment	Food intake (g/day)	Body weight gain (g/6week)
Control ²	22.18 ^a	125.65 ^a
Trt.A ³	20.54 ^a	120.43 ^a
Trt.B ⁴	22.69 ^a	115.17 ^a

¹Rats were fed for 13 weeks. Means within column by the same letter are not significantly different (P<0.05).

²Con : no added

³Trt. A : butter was treated with 10% β -CD

⁴Trt. B : butter was treated with 10% β -CD and added GLA

랫트의 혈액을 분석한 결과 총 콜레스테롤 농도는 control 버터를 섭취한 그룹은 151.2mg/dl에서 230mg/dl로 78.8mg/dl가 증가하였고, β -CD 처리를 한 버터를 섭취한 그룹은 153.8mg/dl에서 201.8mg/dl로 48.0mg/dl가, GLA를 첨가한 버터를 섭취한 그룹은 114.4mg/dl에서 190.5mg/dl로 76.1mg/dl가 증가하였다. HDL-cholesterol 의 농도는 control 버터를 섭취한 그룹은 37.5mg/dl에서 48.7mg/dl로 11.2mg/dl의 증가를 보였고, β -CD 처리한 버터를 섭취한 그룹은

37.8mg/dl에서 48.7mg/dl로 10.9mg/dl만큼 증가하였다. GLA를 첨가한 버터를 섭취한 그룹은 34.7mg/dl~40.5mg/dl로 5.8mg/dl만큼의 증가를 보였다. Control 버터를 섭취한 그룹은 콜레스테롤이 제거된 버터를 섭취한 다른 그룹에 비해 혈중 콜레스테롤양이 더 많았다. 그러나 GLA 첨가 버터를 섭취한 그룹의 HDL-cholesterol의 증가는 관찰되지 않았는데 그 이유는 일일 섭취하는 GLA의 양이 적었고 식이 기간이 짧아서 이 같은 수치가 나온 것으로 사료된다.

Table 55. Effects of experimental diets on the change of blood triacylglycerol, total cholesterol and high density lipoprotein in rats fed for 6weeks¹

Treat- ment	Total CH		TG		HDL	
	Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final
	(mg/dl)					
Control ²	151.2 ^{bc}	230.0 ^a	35.5 ^a	25.5 ^{ab}	37.5 ^{ab}	48.7 ^a
Trt.A ³	153.8 ^{bc}	201.8 ^a	30.2 ^a	10.5 ^b	37.8 ^{ab}	48.7 ^a
Trt.B ⁴	114.4 ^c	190.5 ^{ab}	22.2 ^{ab}	13.0 ^a	34.7 ^b	40.5 ^{ab}

¹Means within column by the same letter are not significantly different (P<0.05).

²Control : no added(0.5g/day)

³Trt. A : butter was treated with 10% β-CD(0.5g/day)

⁴Trt. B : butter was treated with 10% β-CD and added GLA(0.5g/day)

위 실험의 종합적인 결과에 의하면, control 버터와 비하여 평균 93%의 콜레스테롤을 제거시킨 후 GLA를 첨가한 버터의 저장 기간 동안의 지방산화도는 증가하였으나 조직의 물성 부분에서는 control 버터와 유의적 차이를 보이지 않았다. 관능평가에서는 이미와 이취를 발생시켜서 바람직하지 않은 결과를 보였으나, 랫트 실험 결과 혈중 콜레스테롤과 중성지방의 수치 감소를 관찰할 수 있었으므로 혈중 콜레스테롤 저하 기능을 가진 버터로서의 기능이 있다고 사료된다.

제 4 장 참고문헌

1. USDA, 1976. Composition of foods ; Dairy and egg products, Agriculture HB 8-1, Agriculture Research Service
2. Kwak H. S. 2001. Health for adult and functional dairy products. Annual symposium(Spring) of Kor. Dairy Tech. Sci. Assoc. Proceedings : 19-27
3. Lee D. K., J. Ahn and H. S. Kwak. 1999. Cholesterol removal from homogenized milk with β -cyclodextrin. J. Dairy Sci. 82(11) : 2327-2330
4. Ahn, J. and H. S. Kwak. 1999. Optimizing cholesterol removal in cream using β -cyclodextrin and response surface methodology. J. Food. Sci. 64(4) : 629-632
5. Kwak H. S., C. S. Chung, S. Y. Shim and J. Ahn. 2002. Removal of cholesterol from Cheddar cheese by β -cyclodextrin. J. Agric. and Food Chem. 50(25) : 7293-7298
6. Kwak H. S., H. M. Sah, J. Ahn and H. J. Kwon. 2001. Optimization of β -cyclodextrin recycling process for cholesterol removal in cream. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 14(4) : 548-552
7. Kwak H. S., S. H. Kim, J. H. Kim, H. J. Choi and J. Kang, 2004., Immobilized β -cyclodextrin as a simple and recyclable method for cholesterol removal in milk. Arch. Pharm. Res. 27(8) : 873-877
8. Kim S. H., J. Ahn and H. S. Kwak, 2004, Crosslinking of β -cyclodextrin for cholesterol removal in milk. Arch. Pharm. Res. (in process)
9. Kwak H. S, 2003, Development of functional milk and dairy products for increase of consumption. J. Kor. Dairy Tech Sci. 21(1) : 13-22
10. 한국 식품 공전. 1999. 키토산 가공 식품. 한국식품의약품안전청. pp384-385
11. Kwak, H. S., Ihm, M. R and Ahn, J. 2001. Microencapsulation of β -galactosidase with fatty acid esters. J. Dairy Sci. 84 : 1576-1582

12. 한국 식품 공전. 1999. 키토산 가공 식품. 한국식품의약품안전청. pp384-385
13. 김우정, 구경영. 2001. 식품관능검사법. 호일. pp 68-74
14. Baldwin, E. A., Nisperoh, M. O., Hagenmaier, R. D., Baker, R. A. 1997. Use of lipids in coatings for food products. *Food Technology*. Vol. 51, N. 6 : 56-62.
15. 김윤지, 윤철석. 1999. 미세피복 된 철분을 첨가한 요구르트의 저장 중 품질 변화. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 28(3) : 542-546.
16. Kwak, H. S. Jung, C. S. Seok J. S. and J. Ahn. 2003. Cholesterol removal and flavor development in Cheddar cheese. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 2003. 16(3):409~416
17. G. H. Wilster. 1957. *Practical butter making*. U. S. A. p.9, 125, 205~207
18. Metzger, L. E., Mistry., V. V. 1995. A new approach using homogenization of cream in the manufacture of reduced fat Cheddar cheese. 2. Micro structure, fat globule distribution and free oil. *J. Dairy Sci.* 78:1883~1895
19. 한국 유가공 기술 과학회. 1998. 우유 유제품 시험법. 선진문화사. p.366~382
20. AOAC. *Official Methods of analysis*. 1995
21. 식품공전. *별책 일반시험법*. 2003. p.3~13
22. Kwak, H. S. Ju, Y. S. Ahn, H. J. Ahn J. and S. Lee. 2003. Microencapsulated iron fortification and flavor development in Cheddar cheese. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 16(6):1205~1211
23. Lee, J. S. Ustunol Z. and D. M. Smith. 1993. Cholesterol removal from cream β -cyclodextrin and derivatives. *J. Dairy Sci. Abs.* #158
24. Kovacs, M. I. Anderson, P. W. and Eand, R. G. 1979. A simple method for the determination of cholesterol and some plant sterol in fishery-based food products. *J. Food Sci.* 44:1299~1301
25. Deeth, H. C., Fitz-Gerald, C. H., and Snow, A. J. 1983. A gas chromatographic method for the quantitative determination of free fatty acids in milk and milk products. *New Zealand J. Dairy Sci. and Technol.*

26. Bassette, R., and Ward, G. 1975. Measuring part per billion of volatile materials in milk. *J. Dairy Sci.* 58:428
27. 이선행, 장윤희, 이광필. 1996. Achiral/Chiral coupled column법에 의한 식품 중의 D-아미노산 정량 분석, *Analytical Sci and Technol.* 9(1):52~61
28. SAS(R) users guides. Statistics version 5 edition. SAS Inst., Ins., Cary, NC, USA. 1985
29. 최기현, 한근식. 2002. SAS를 이용한 통계학. 자유 아카데미
30. Rasic, J. L. and Kurmann, J. A. : *Yogurt, Scientific grounds, technology, manufacture and preparations.* Technical Dairy publishing House, Copenhagen, Denmark, p.90(1978)
31. Richardson, G. H. 1985. *Standard methods for the examination of dairy products.* 15th ed.
32. Dziezak, J. 1989. Fats, oil, and fat substitutes. *food Tech.* 43(7), 66
33. Buege, J. A. and S. D. Aust, 1984. Microsomal lipid peroxidation. In *Methods in enzymology.* S. Fleischer and L. Parker, ed. Academic Press. New York, NY. P.105
34. 식품공전. 별책. 유산균수 측정법. 2000. P.104
35. 김종면, 정영미. 1995. 달맞이꽃 종자유에 면역조절작용. *Kor. J. Vet. Publ. Hlth.* 19(1) : 13~23
36. G.H. Willster. 1957. *Practical buttermaking.* U.S.A. p. 9, 124, 205~207
37. 장관식, 하재석, 노회진, 최진환. 2000. α -Tocopherol 미세캡슐화의 최적화 및 저장안정성 규명. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32(4) : 843-850
38. 김동호, 이찬, 김광옥, 이영춘. 1999. 수용성 chitosan의 이화학적 및 관능적 특성. *Korean J. Food Sci. Technol.* 31(1) : 83-90
39. 김철현, 이경옥, 백승천, 광해수, 강종옥. 1996. ω -3계 지방산의 미세캡슐화에 관한 연구. *Korean J. Food Sci. Technol.* 28(4) : 743-749
40. Magee, E. L. JR. Olson, N. F and Lindsay, R. C. 1980. Microencapsulation

- of cheese ripening systems : Production of diacetyl and acetoin in cheese by encapsulated bacterial cell-free extract. *J. Dairy Sci.* 64 : 616-621
41. 유은정, 임현수, 김진만, 송상호, 최명락. 1998. 김치의 숙성 및 보존기간 연장을 위한 키토올리고당의 응용. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 27 (5) : 869-874
 42. Lee, J. B., Ahn, J., Lee, J and Kwak, H. S. 2004. L-ascorbic acid microencapsulated with polyacylglycerol monostearate for milk fortification. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68(3) : 495-500
 43. Lehoux, J. G and Grondin, F. 1993. Some effect of chitosan on liver function in the rat. *The Endocrine Society.* 132 : 1078-1084
 44. Sugano, M., Fujikaw, Y., Nakashima, N., Fukuda, N and Hasegawa, Y 1980. A novel use of chitosan as a hypocholesterolemic agent in rats. *The American Journal of Clinical Nutrition* 33 : 787-793
 45. Raul, U., Fernando, P., Esteban, C., and Alejandro O' Donnell. 1999. Bioavailability of microencapsulation ferrous sulfate in fluid cow's milk. *Studies in human beings. Nutrition Research, Vol. 19, No. 6* : 893-897.
 46. Alexis, E., Lysionek., Marcela, B., Zubillaga., Maria, J., Salgueiro., Maria, I. Sarabia., Ricardo, A., Caro, Ricardo, W and Jose, R. B. 2000. Study of industrial microencapsulated ferrous sulfate by means of the prophylactic-preventive method to determine its bioavailability. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 46 : 125-129.
 47. 조우제, 이경옥, 백승천, 정운현. 2000. Sodium alginate를 이용한 페리틴의 미세캡슐화. *서울우유 기술연구지 제 1권 제 1호, Vol. 11, No. 1* : 41-51.
 48. Jackson, L. S. and Ken Lee. 1991. Microencapsulated iron for food fortification. *J. Food Sci. Vol. 56, No. 4* : 1047-1050.
 49. Sharareh, H., Donald, J., McMahan. 1996. Manufacture and quality of iron-fortified yogurt. *J Dairy Sci.* 80 : 3114-3122.
 50. Khalida, S., Georgia, G. N., Reynolds, R., Arumugaswamy, P., Peiris, K.

- K. 1999. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yogurt. *International Journal of Food Microbiology*. 62 : 47-55.
51. Chang, P. S. 1997. Microencapsulation and oxidative stability of DHA. In : *Flavor and lipid chemistry of seafoods*. Series, No. 674, American Chemical Society. 264-273.
52. 이경옥, 백승천, 김수광, 김형욱. 1998. 옥배경화우유를 이용한 미세캡슐의 수율 및 특성. *Korean J. Dairy Sci.* 20(3) : 169-176.
53. 이경옥, 김철현, 백승천, 1996. 유지방을 이용한 미세캡슐 수율의 변화. *서울우유 기술연구지*. 7 : 9-16.
54. 임미리. 1998. 우유의 소화증진을 위한 유당분해효소의 미세캡슐화 개발에 관한 연구. *세종대학교 석사논문*.
55. Antonio, J., Ribeiro, Ronald, J., Neufeld, Philippe Arnaud, Jean C., Chaumeil. 1999. Microencapsulation of lipophilic drugs in chitosan-coated alginate microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*. 187 : 115-123.
56. Thanoo, B. C., Sunny, M. C., Jayakrishnan, A. 1993. Controlled release of oral drugs from cross-linked polyvinyl alcohol microspheres, *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Vol. 45 : 16-20.
57. 노승권, 김갑식. 2000. 콜레스테롤 저하효과를 갖는 지용성 피토스테롤 또는 피노스타놀의 불포화 지방산 에스테르화합물의 제조방법. 10-0278194
58. 한영실. 1995. 자연치즈와 치즈향 농축물의 화학적, 관능적 분석에 의한 향미 비교. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* 24(6):925~931
59. 김송희. 2004. β -cyclodextrin 고정화 및 가교화와 이에 의한 우유 및 크림 치즈의 콜레스테롤 제거에 관한 연구. *세종대학교 대학원 석사학위 논문*
60. Koger, M. 1976. Quality of yogurt. *J Dairy Sci.* 58(2) : 344
61. Cawford, R. J. M. : How to succeed with yogurt. *Dairy Engineering*., 79, 4(1962)

62. Dawson, L. E. and Arnold, L. K. 1983. Lipid oxidation in mechanically deboned poul try,
a review. Food Tech. 37(112)
63. H. W. S. chan. 1987. Autoxidation of unsaturated lipids. Academic Press LTD : 57
64. 윤석권, 오훈일, 이형주, 윤탈화, 노봉수 공저. 식품화학. 수학사. p. 156
65. B. J. F. Hudson, Evning primrose (oenothera Spp.)oil and seed, JAACS, 61(3), 540(1984)
66. Watanabe, M. J., Umekawa. H., Takahashi. T., Furichi. Y., Effect of dietary alpha-or gamma-linolenic acid on levels and fatty acid compositions of serum and hepatic lipids, and activity and mRNA abundance of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in rats. Comparative Biochemistry and Physiology Part A 122(1999)213-220
67. Morita, A. and Arima. M., Niwa M., Effect of mold oil containing γ -linolenic acid on the blood cholesterol and eicosanoid levels in rats. Agric. Biol, Chem., 50(10), 2483~2491,1986
68. I. S. Choi. 1989. Effect of evening primrose oil on plasma cholesterol and fatty acid compositions of erythrocytemembrane and aorta in rats. Kor. J. Food Sci. Tech. 21(6) : 884~889
69. Park, B. S. 2003. Effect of Dietary Oil Containing γ -Linolenic Acid on the Plasma Lipid Levels and Thrombotic Activity in Rats. Korean J Nutrition 36(9) : 889~897
70. 최임순. 1989. 달맞이꽃 종자유의 섭취가 흰쥐의 혈장 콜레스테롤과 적혈구막 및 대동맥의 지방산조성에 미치는 영향. Koean J. Food Aci. Technol 21(6) :884-889
71. 채수규, 강갑식, 마상조, 방광웅, 오문현, 오성훈. 식품분석학. 지구문화사. 2000. p.336~338
72. Smith, L. L : Cholesterol autoxidation. Plenum Press, New York. p.125(1981)

73. Lillard, D. A. and Day, E. A. : Autoxidation of milk lipids. II. The relationship of sensory to chemical methods for measuring the oxidized flavor of milk fats. J. Dairy Sci., 44, 623(1961)
74. Kannel. W. B., Cholesterol in the prediction of atherosclerotic disease. Ann Intern Med 90 : 85-91, 1979
75. Rao, D. R., C. B. Chawan, S. R. Pulusani. : Influence of milk and thermophilus milk on plasma cholesterol levels and hepatic cholesterogenesis in rats. J. Food Sci., 46, 1339-1341(1981)
76. Hepner, G., R. Fried, Jeor. S., L. Fusetti, R. Morin. : Hypocholesterolemic effect of yogurt and milk. Am. J. Clin. Nutr., 32, 19-24(1979)
77. Jaspers, D. A., L. K. Massey, L. Luedeke. : Effect of consuming yogurts prepared with 3 culture strains on human serum lipoproteins. J. Food Sci., 49, 1178-1181(1984)
78. Thakur, C. P., A. N. Jha. : Influence of milk yogurt and calcium on cholesterol-induced atherosclerosis in rabbits. atherosclerosis, 39, 211-215(1981)
79. Grunewald, K. K. : Serum cholesterol levels in rats fed skim milk fermented by *Lactobacillus Acidophilus*. J. Food Sci., 47, 2078-2079(1982)
80. Kiyosawa, H., C. Sukanwara, N. Sagawara and H. Miyake. : Effect of skim milk and yogurt on serum lipids and development of sudanophilic lesions in cholesterol-fed rabbits. Am. J. Clin. Nutri., 40, 479-484(1984)

81. Gilliland, D. E., C. R. Nelson and C. Maxwell. : Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus Acidophilus*. Appl. Environ. Microbiol., 49,377-381(1985)
82. Danielson, A. D., E. R. Peo, K. M. Shahani, A. J. Lewis, P. J. Whalen and M. A. Amer. : Anticholesterolemic property of *Lactobacilli Acidophilus* yogurt fed to mature bears. J. Anim. Sci., 67, 966-974(1989)

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.