

63 7. 1
L2936

최종보고서

우유 및 유제품의 콜레스테롤
제거 개발에 관한 연구

Development of cholesterol
removed milk and dairy products

사 업 구 분 : 첨단농림수산물기술개발 과제
연구(개발) 분야 : 첨단축산기술개발

주관 연구기관 : 세종대학교

협동연구기관 : 제주대학교

건국대학교

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “우유 및 유제품의 콜레스테롤 제거에 관한 연구”의
최종보고서로 제출합니다.

- (세부과제 “1. β -cyclodextrin을 이용한 콜레스테롤 제거에 관한 연구
2. Saponin을 이용한 콜레스테롤 제거에 관한 연구
3. 초임계 유체 추출법에 의한 유지방의 분획 및 콜레스테롤
제거에 관한 연구
4. 물성 및 관능검사에 관한 연구”)

1998. 12. .

주관연구기관명 : 세종대학교

총괄연구책임자 : 각 해 수

연구 원 : 오 훈 일

협동연구기관명 : 제주대학교

협동연구책임자 : 임 상 빈

협동연구기관명 : 건국대학교

협동연구책임자 : 유 제 현

요 약 문

I. 제 목

우유 및 유제품의 콜레스테롤 제거 기술에 관한 연구

II. 연구 개발의 목적 및 중요성

가. 총괄의 연구개발 목적 및 중요성

최근 국민소득의 증가에 따라 식생활 양식이 다원화해지면서 서구식 식문화가 확산되어 가고 있는 실정이다. 특히 우유 및 유제품의 소비가 급증하였고, 유아로부터 노인에 이르기까지 널리 소비되는 거의 완전식품으로서 영양이 풍부하고 cholesterol 함량도 비교적 낮으나 버터, 크림, 아이스크림, 치즈 등으로 가공될 경우 cholesterol 함량이 매우 증가하게 되어, 이들 제품의 과다 섭취에 의한 고혈압, 동맥경화, 관상동맥경화증과 같은 심장 및 순환계 질환이 증가될 소지가 있다. 따라서 우유와 크림에 내재하는 cholesterol 함량을 최소화하여 유제품을 개발하는 것은 국민건강 증진 뿐만 아니라 우유의 부가가치 향상의 측면에서도 중요한 의의가 있다고 할 수 있다.

본 연구는 다양한 방법을 이용하여 우유와 크림에 내재하는 cholesterol을 제거하는 효과적인 방법을 규명하고, 방법의 최적조건을 연구하며, cholesterol이 제거된 유제품을 개발하는데 목적을 두었다.

최근 선진 외국에서 연구가 진행되고 있는 우유 및 유제품 내의 cholesterol을 저하시키는 방법으로는 우유의 유지방을 일부 또는 전체 감소시

키는 방법과 cholesterol만을 선택적으로 감소시키는 방법으로 구분할 수 있다.

우유의 유지방 함량을 감소시키는 방법은 유제품의 향미와 조직감의 감소로 제품의 기호성이 저하되는 단점이 있다. 따라서 유지방의 막 부분에 80%, 유청에 20% 함유되어 있는 cholesterol을 선택적으로 감소시키는 방법에 대한 연구에 관심이 모아지고 있다. 이들 방법에서는 흡착제 (β -cyclodextrin, saponin), cholesterol분해 효소에 의한 분해 방법 및 steam-stripping방법 등이 있다. 그러나 이 분야에 대한 국내의 연구 개발은 전무한 실정이며 저 cholesterol 유제품에 대한 국민들의 관심은 고조되고 있는 실정이므로 본 연구의 개발은 매우 중요하다 하겠다.

본 연구의 개발이 원만하게 진행된다면, 다양한 저 cholesterol 유제품이 생산되어 부가가치가 향상된 제품이 개발되어 유가공 산업을 발전시키는데 중요한 역할을 할 것이다.

또한 국제경쟁력이 있는 제품개발이 가능하여 유제품의 수입을 최소화하고 수출도 가능하게 될 것이다. 그리고 관련 질병이 최소화되어 국민건강에도 중요한 역할을 기대할수 있기 때문에 본 연구개발은 매우 중요하다고 사료된다.

나. β -cyclodextrin을 이용한 cholesterol의 제거에 대한 개발

우유 및 유제품은 거의 완전식품으로 우리의 식탁에서 필수적인 식품으로 자리를 잡았다. 이들속에 함유되어 있는 cholesterol은 체내에서 필수적인 성분이지만 이의 함량이 버터, 크림, 아이스크림, 치즈 등 유제품에서는 매우 높기 때문에 관상동맥증 등의 질환을 유발할 가능성이 있기 때문에 cholesterol의 제거는 매우 중요하다. 그래서 cholesterol을 제거하려는 방법들이 개발되어 연구가 시도되어 왔으나 아직 산업화에 적합한 방법은 거의 없

는 실정이다.

최근에 흡착제를 이용한 cholesterol제거 방법 중 β -cyclodextrin이 적합한 방법임이 시사되어 이를 우유와 크림내에 있는 cholesterol제거에 적용시켰다. β -cyclodextrin은 cholesterol과 접촉, 결합하여 불용성을 갖는 복합체를 형성하게 되고, 원심분리로 침전시켜 분리제거 할 수 있다.

β -cyclodextrin은 환상형 다당류로서 α -1,4 glucosidic linkage로 결합되어 있으며, 상업적으로 glucose가 7개 결합되어 있다. 또한 이는 용해성이 낮아 용액상태에서 쉽게 분리할 수 있다. β -cyclodextrin은 직경이 cholesterol의 크기와 거의 비슷한 소수성의 원형공간이므로 비극성 분자인 cholesterol과 잘 결합하여 복합체가 형성되면 200℃의 열에도 안정하다. 또한 독성실험 결과도 매우 안전하기 때문에 사용에 문제가 없다. 그래서 본 연구는 제 1차년도에 cholesterol 정량 분석법을 개발하고 β -cyclodextrin을 이용한 우유 및 크림의 cholesterol제거를 위한 최적 조건을 확립한다. 제 2차년도에서는 β -cyclodextrin을 재활용하기 위한 최적 조건을 확립한 후, 제 3차년도에는 cholesterol이 제거된 우유 및 유제품을 산업화하기 위한 연구에 목적을 두었다.

다. Saponin의 고정화 연구와 cholesterol의 제거에 대한 개발

우리나라에서는 10~20년 전만 해도 심장병의 원인으로 판막증이나 선천성 심장병이 큰 비중을 차지하였으나 최근에는 동맥경화의 원인으로 생기는 협심증이나 심근경색증에 의한 성인병이 증가하는 추세를 보이고 있다. 미국, 유럽 등 서양사회에서는 심근경색이 사망원인의 1위를 차지하고 있으며 우리나라에서도 암, 뇌졸중에 이어 사망원인의 3위를 차지하므로 이에 대한 관심이 높아지고 있다.

동맥경화를 일으키는 대표적인 원인으로는 cholesterol의 과다섭취를 들 수

있는데, cholesterol은 동물성 식품에 존재하는 대표적인 sterol류로 인체의 기능을 정상적으로 유지하는데 필수적인 영양소임에도 불구하고 과다섭취할 경우 고혈압, 동맥경화, 관상동맥 경화증과 같은 심장 및 순환계 질환을 유발하기 때문에 서양에서는 오래전부터 관심의 대상이 되어 왔다. 이러한 현상은 국민소득의 증가와 함께 식생활이 다양화되고 특히 우유 및 유제품과 육제품의 소비가 증가하고 있는 우리나라에서도 예외는 아니다. 최근 미국에서는 1994년에 Nutrition Labeling and Education Act가 발효되어 식품 공장에서 생산되는 모든 제품의 포장용기에 cholesterol 함량을 의무적으로 표시하도록 되어 있다. 따라서 서구의 여러 낙농선진국들에서는 우유 및 유제품에 함유된 cholesterol을 감소시키고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있으나, 아직 국내에서는 이러한 연구들이 미비한 실정이다.

현재까지 우유 및 유제품의 cholesterol 제거를 위해 연구되고 있는 방법중에서 특히 흡착제를 이용한 cholesterol 제거 방법은 다른 방법에 비해 비용이 비교적 적게 들고, 생산라인을 크게 변화시키지 않아도 쉽게 현재의 유가공업의 생산라인에 적용할 수 있는 장점을 지니고있다.

이러한 흡착제 중 하나인 saponin은 5탄당 및 6탄당에 steroidal 및 triterpenoid aglycone이 결합되어 있는 배당체로 cholesterol과 선택적으로 결합하여 micelle 구조의 불용성 화합물을 생성하므로 최종제품의 품질을 변화시키지 않고, 원심분리나 여과를 통해 식품으로부터 쉽게 분리할 수 있으며, 또한 인체에 안전하므로 식품의 cholesterol 제거시 적합한 흡착제라 할 수 있다.

따라서, 본 연구는 saponin을 이용하여 cholesterol이 제거된 우유 및 크림을 개발하기 위해 우선 cholesterol의 정량방법을 확립하고자 HPLC를 이용한 방법과 비색정량방법을 이용한 cholesterol의 속성정량방법을 개발하였고, saponin을 이용한 우유 및 크림의 cholesterol 제거를 위한 최적조건을 확립하였다. 또한, 산업화시의 경제적 효율성을 고려하여, saponin을 고정화하는 연구를 수행하

였다.

라. 초임계 이산화탄소에 의한 유지방의 추출분획 및 콜레스테롤 제거

유지방은 식품공업에서 아이스크림, 초콜렛, 과자류, 튀김류, 쇼트닝 등에 풍미, 조직감을 부여하는 재료로 이용되어 오고 있다. 유지방은 97~98%가 triglycerides이며 미량성분으로서 스테롤, 유리지방산 그리고 인지질 등을 함유하고 있다. 유지방은 주요 20여개의 지방산으로 구성되어 있으며 유지방의 물리, 화학적 성질은 구성지방산의 탄소수와 불포화도에 의하여 결정된다. 유지방은 -40~40℃에서 녹으며 그 중간 온도에서는 고체상과 액체상의 혼합물로 존재한다. 상온에서 70%이상이 고체상으로 존재하기 때문에 빵, 크래커 등에 spread로 이용하는 경우 퍼짐성(spreadability)이 좋지 못한 단점을 가지고 있다.

유지방은 비록 유제품에 우수한 풍미, 향미, 조직감을 부여하지만, 유지방의 특이한 물리적 성질 즉 결정화, 낮은 퍼짐성, 넓은 범위의 용점 등은 여러 가지 식품에 첨가원료로 사용하는 경우 여러가지 문제점을 안고 있다. 따라서 유지방을 각 첨가식품에 필요로 하는 물리, 화학적 특성을 갖고, 불포화 지방산의 비율이 높은 분획으로 분별하여야 된다.

한편 유지방 중의 스테롤은 비검화물로서 그 중 95%는 콜레스테롤이다. 유지방 중의 콜레스테롤은 유리상태, 지방구의 lipoprotein과 결합상태 그리고 콜레스테롤 에스터 등 3가지 형태로 존재한다. 유지방은 성인병의 원인이 되는 콜레스테롤을 0.25~0.4% 함유하고 있으므로 저콜레스테롤 유제품을 만들기 위해서는 유지방 중의 콜레스테롤을 90% 이상 제거하여야 한다.

본 연구에서는 유지방을 초임계 이산화탄소를 이용하여 추출온도, 압력, 시간을 달리하여 일단계와 이단계로 추출하여 지방산 조성과 물리화학적

성질을 측정하였다. 또한 대기압 상태에서 콜레스테롤 흡착능이 있는 것으로 알려진 몇가지 흡착제를 선택하여, 고압에서 콜레스테롤 흡착능이 높은 것으로 알려진 florasil과 비교하기 위하여, 추출온도 40℃, 추출압력 276, 345 bar에서 3 또는 4시간 동안 추출하면서 흡착제의 종류별, 입자크기별, 비율별로 추출시간에 따른 유지방의 수율, 콜레스테롤 함량, 지방산 조성을 측정하였다.

마. 물성 및 관능검사 훈련과 cholesterol이 제거된 크림과 버터의 개발

하나의 신제품이 탄생하기 위해서는 여러 단계를 거쳐야 하지만, 그 중에서 간과해서는 안 될 분야가 바로 관능검사이다. 소비자가 원하는 제품의 성질을 파악하고 이것에 맞추어 신제품을 개발하는 것은 기업이 성장하기 위한 필수 조건이다. 신제품이 갖추어야 할 품질특성, 즉 소비자의 기호도가 높을 가능성이 있는 품질특성을 정하고 기준 표준물질과 비교하여 신제품의 기호도가 어떤 상태에 있는지를 조사하는데 관능검사의 중요성이 있다. 그러나 관능검사 전문요원의 능력 정도에 따라 사용되는 관능검사 방법의 종류와 이에따라 얻어지는 정보의 내용이 달라진다. 그러므로 특정한 제품에 필요한 관능검사 요원을 훈련시키는 것은 매우 중요하다. 훈련된 이 요원들이 개발의 초기부터 참여하여 개발이 진행되는 동안 제품의 특성을 평가하여 개발제품에 기여하는 효과는 매우 크다고 사료된다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구과제는 우유 및 유제품의 cholesterol 제거 개발에 관한 연구로서 제 1차년도에 cholesterol의 정량분석을 개발하고, β -cyclodextrin과 saponin에

의한 cholesterol 제거의 최적조건을 확립하고, 초임계 유체추출법에 의한 유지방 분획의 최적화와 우유와 유제품의 물성 및 관능검사의 기초를 확립한다. 제 2차년도에서는 β -cyclodextrin의 재활용 가능성을 확립하고, saponin의 고정화에 관한 개발을 하고, 초임계 유체 추출법을 위한 흡착제 선정과 최적 조건 확립 및 관능검사요원의 전문화와 유제품에 대한 물성 및 관능검사요원의 훈련을 실시한다. 그리고 제 3차년도에서는 산업화에 적합한 방법을 선정하여 우유, 크림, 휘핑크림, 버터의 개발과 β -cyclodextrin 재활용에 관한 표준제조공정을 확립하고 소생산시험과 대량생산을 실시하며, 소비자 기호도 조사를 실시하여 본 연구의 목적을 달성하도록 하였다.

더 자세한 연구개발 내용 및 범위는 각 과제의 결과보고를 참조하기 바람.

*** 연구과제별 연구책임자**

연구과제	기관명	연구책임자
◦ β -cyclodextrin을 이용한 cholesterol의 제거에 대한 연구	세종대학교	총괄 각해수 (책임자)
◦ Saponin을 이용한 cholesterol의 제거에 관한 개발	세종대학교	오훈일(공동연구)
◦ 초임계 유체추출법에 의한 유지방의 분획	제주대학교	임상빈(책임자)
◦ 물성 및 관능검사	건국대학교	유제현(책임자)

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1) 제 1 세부과제에서의 연구는 saponin을 이용한 cholesterol의 제거에 서는 saponin의 가격이 너무 높고, cholesterol의 제거율이 낮아서 산업화에 적용시키기에는 부적절하다고 사료되어 제 1, 2 차년도 연구결과로 계속연구를 종결시켰다. 그러나 β -cyclodextrin을 이용한 cholesterol의 제거율이 우유와 크림 모두에서 매우 양호하여 제 3 차년도의 크림에 실험결과를 이용하여 고급 아이스크림과 버터의 산업화와 휘핑크림을 이용한 케이크의 산업화가 조만간에 가능하도록 연구가 발전되었다.

또한 cholesterol을 제거한 우유를 이용하여 다양한 건강 기능성의 우유 및 유제품을 개발할 수 있다. 그러나 지난 3년간의 연구기간으로는 이들의 연구까지는 진척될 수 없었다. 만약에 새로운 3년간의 연구기간이 주어진다면, cholesterol이 제거되고 소화가 용이한 우유의 개발, cholesterol이 제거되고 혈중 cholesterol이 감소된 요구르트의 개발, 그리고 cholesterol이 제거된 저지방 피자치즈의 개발 등이 발전되어 국민의 건강에 매우 효과적이며, 우유의 소비가 촉진되어 낙농발전에 더욱 기여하리라 사료된다.

2) 제 2 세부과제에서의 연구는 우유와 크림의 cholesterol 함량을 효과적으로 분석할 수 있는 방법인 HPLC 방법과 신속정량을 위한 colorimetric method을 개발하였다. 이 두 방법은 recovery test 결과 정확성과 재연성이 높고, 추출과정에서 용매추출과정 없이도 cholesterol 추출을 효과적으로 할 수 있으므로 다른 방법들보다 신속하게 전처리를 할 수 있다. 특히 colorimetric method는 HPLC 방법에 비해 정확도는 조금 떨어지지만, 고가의 장비 없이 신속하게 정량이 가능하므로 품질관리에 이용이 가능하리라 생각된다.

Saponin을 이용하여 우유 및 크림 중의 cholesterol을 제거하는 연구에서는 free saponin을 이용할 경우 우유와 크림 모두에서 대체로 70~80%의 cholesterol이 제거되었다. 그러나, saponin의 가격이 고가이므로 경제성을 고려하여 saponin을 고정화하는 연구를 수행한 결과에서는, free saponin을 이용하여 우유중의 cholesterol을 제거하였을 때에 비하여 20~30%의 cholesterol만이 제거되어 상당히 낮은 결과를 나타내었다. 그래서 이를 개선하기 위하여 고정화 방법이 필요한데 이에 대한 연구는 본실험의 연구기간에 어느정도의 진척은 보았지만 좀 더 오래기간동안 연구되어야 한다고 사료된다. 따라서 앞으로 이에 대한 연구가 좀 더 진행된다면 고정화된 saponin을 이용한 저 cholesterol 우유 및 유제품의 생산이 가능하리라 생각된다.

3) 제 3 세부과제에서의 연구는 유지방의 추출수율은 추출시간에 따라 증가하였으며, 추출온도의 증가에 따라 감소하였다. 동일온도에서 저급(C4-C8)과 중급(C10-C12) 지방산들은 추출물 분획들에 농축되었고 그 농도는 추출시간의 증가에 따라 감소하였으나, 고급(C14-C18) 지방산들은 추출잔류물 분획에 농축되었다. 동일온도에서 고급불포화지방산들은 추출잔류물에, 고급포화 지방산들은 추출물 분획들에 농축되었다. 고급불포화지방산들과 고급포화 지방산들의 비율은 추출잔류물에서 현저히 증가하였다. 저급지방산들은 추출온도가 높을수록 선택적으로 많이 추출되었고, 중급지방산들은 추출온도에 따른 변화양상이 뚜렷하지 않았으며, 고급지방산들은 추출온도에 따른 변화가 적었다. 고급불포화지방산들은 추출온도가 높을수록 다소 증가하였고 고급포화지방산들은 다소 감소하였으며, 고급불포화지방산들과 고급포화지방산들의 비율은 증가하였다. 일단계 추출에 비하여 이단계 추출인 경우 지방산 조성에 있어서 보다 농축된 분획들을 얻을 수

있었다.

유지방을 초임계 이산화탄소 추출한 후 흡착제를 통과시켜 콜레스테롤이 제거되고, 지방산 조성이 다른 유지방 분획들을 얻기 위하여, 콜레스테롤 흡착능이 있는 것으로 알려진 몇가지 흡착제를 선택하여, 추출온도 40℃, 추출압력 276, 345 bar에서 3 또는 4시간 동안 추출하면서 흡착제의 종류별, 입자크기별, 비율별로 추출시간에 따른 유지방의 수율, 콜레스테롤 함량, 지방산 조성을 측정하였다. 흡착제로서 β -cyclodextrin, talc, celite, florisil 중에서 florisil이 유지방으로부터 콜레스테롤 제거율이 가장 높았다. Florisil의 입자크기별로 콜레스테롤 제거율은 30/60 mesh가 가장 높았으며, 그 다음 100/200, 60/100 mesh 순이었다. 유지방에 대하여 흡착제의 비율이 높으면 콜레스테롤 제거율은 높은 반면, 지방의 수율은 감소하였는데, 유지방의 수율을 높이면서 콜레스테롤 제거율을 높이기 위해서는 유지방과 흡착제의 비율은 20:10이 적당하였다. 추출분획물의 지방산 조성을 측정한 결과 저급지방산들은 초기 추출물 분획들에 농축되었고, 고급지방산들은 추출잔류물 분획에 농축되었다. 이상의 결과로부터 초임계유체 추출 및 흡착법은 유지방으로부터 콜레스테롤을 제거하는 동시에 저급지방산, 불포화지방산, 버터향, 색소가 농축된 분획들을 얻을 수 있었다.

4) 제 4세부과제에서의 연구는 관능검사요원을 선정하여 우유 및 유제품의 관한 훈련을 시키고, 또한 콜레스테롤이 제거된 제품의 개발에 관여하는 것이다. 관능검사요원의 훈련에서는 우유, 아이스크림, 크림, 버터, 치즈 등의 검사가 비교적 원만하게 이루어졌지만, 관능검사의 환경 또한 매우 중요함을 느꼈다. 그리고 이 요원들에게 incentive가 부여되는 것이 매우 효과적이라고 생각한다.

콜레스테롤이 제거된 크림과 버터의 연구에서는 크림의 콜레스테롤

제거 작업은 원만하게 이루어져 아이스크림과 힙핑크림 제조에 이용가능하였다. 그러나 버터의 제조에는 최적조건 확립이 어려워 더 많은 연구가 요구된다.

Summary

This study was investigated for cholesterol removal from milk and dairy products. To do this work, β -cyclodextrin, saponin and supercritical carbon dioxide extraction were applied. In addition, texture and sensory analysis were also studied. Finally, standard processes in line of pilot and scale for each product were developed and possibility of new product development was studied.

Part 1. The study on cholesterol removal from milk and dairy products by β -cyclodextrin

This study was investigated for cholesterol removal from milk and dairy products by β -cyclodextrin. A comparison of two different methods of determining cholesterol contents in milk and cream was examined. The cholesterol contents from the GC method was significantly higher compared with those from the enzymatic method ($p < 0.05$). In the GC method, milks containing different percentages of milk fat (2.6, 3.6, and 4.6%) showed 9.52, 13.14, and 16.83 mg cholesterol/100 g milk, respectively. By using the enzymatic method, 8.62, 12.28, and 15.78 mg/100 g milk were found. In cream (36% of milk fat), cholesterol content was determined as 108.60 mg/100 g cream by the GC method. The GC method showed 100.95% of recovery in milk, however, only 90.0% of cholesterol was recovered by using the enzymatic method. In the present study, the GC method has been found to be simpler, more accurate, faster and more economical in regard of solvents compared with the enzymatic method.

The present study was designed to develop the optimum conditions for cholesterol reduction in 3.6% homogenized milk by response surface methodology (RSM). The effects of five different factors such as β -cyclodextrin (β -CD) concentration, stirring time, temperature and speed, and centrifugation speed were determined by using a five level rotatable central composite design. The important factors influencing on cholesterol reduction were β -CD and stirring temperature. The optimum conditions for the cholesterol reduction in 3.6% homogenized milk were the addition of 1.15% β -CD, 17.5°C, 10 min, 800 rpm of stirring and 166 x g centrifugation. Based on above conditions, 98.4% of cholesterol in milk could be removed, and β -CD may be an effective compound on cholesterol reduction process.

Subsequently a process of cholesterol reduction in cream was optimized by using RSM. Among five factors, β -CD, stirring time and speed appeared to influence on cholesterol reduction. When β -CD was added 5%, the cholesterol reduction was 80.17%. With 10% β -CD addition, the effect of stirring speed was more profound than that of stirring time. With 15% β -CD addition, 93.85% of cholesterol was reduced. When stirring time was fixed as 10 and 20 min at 30°C, 15% β -CD addition resulted in the highest reduction as 94.81 and 97.99%, respectively. The present study indicated that although percent of cholesterol reduction varies with different factors and conditions, above 94% of the cholesterol in cream could be removed and β -CD concentration may play the most important role in cholesterol reduction process.

The next study was performed to optimize the conditions for β -CD

dissociation from β -CD-cholesterol complex. For extraction of cholesterol from the complex, the mixture of acetic acid : butanol = 3 : 1 was chosen. In addition, another optimum conditions were as followed: solvent : complex = 6 : 1, mixing speed : 100 rpm, mixing time : 2 h, mixing temperature : 50°C. Then RSM method was applied with three level rotatable central composite design. A model obtained from RSM showed that the optimum conditions were 100 rpm, 2 h mixing at 57°C, and the estimated value of cholesterol dissociation from complex reached to 96.5%. Therefore, this study showed the possibility of β -CD recycling and further study should be done in the future.

For the development of cholesterol-removed dairy products, milk treated with 0.5% β -CD appeared to be effectively used in economical and quality aspects. In addition, cholesterol-removed ice cream could be manufactured in industry when various fruit flavors was added. However, the study for the cholesterol-removed whipping cream need further experiments.

The recycling of β -CD from the β -CD-cholesterol complex showed a few difficulties in pilot plant scale, therefore this study also need more studies in the future.

Part 2. Studies on the immobilization of saponin and development of cholesterol removal method

A sensitive high-performance liquid chromatographic method with Nova-Pak C₁₈ column for the determination of cholesterol in milk products was studied. To optimize separation of cholesterol, various

mobile phases such as hexane / 2-propanol, hexane / tetrahydrofuran, hexane / ethyl acetate, acetonitrile / methanol, acetonitrile / methanol / 2-propanol was compared. Acetonitrile / methanol / 2-propanol was superior to other mobile phase systems in separation. A liquid-liquid extraction(LLE) for cholesterol was simplified with non-polar solvent, hexane to remove interfering compounds and had a recovery (100 ± 1.0) of cholesterol. A solid phase extraction(SPE) method using C₁₈ Sep-pak was developed and compared with LLE. The saponified sample was directly transferred into SPE tube and eluted fat-soluble compounds with acetic acid / ethanol. The cholesterol in SPE tube was collected by eluting ethyl acetate / hexane. The SPE method was rapid and highly reproducible. However, the SPE method is relatively expensive. The both extraction methods are useful in combination with saponification of esterified cholesterol to facilitate total cholesterol determination. The detection limit at 205nm was up to 0.01 μ g. The newly developed HPLC method was simple, accurate and has the advantage over the many methods commonly used. Although the rapid colorimetric method developed is less accurate than the HPLC method, this method does not requires expensive equipment, thus suitable to quality control laboratory in dairy industry.

In order to prepare low cholesterol milk and cream by treatment with saponin, the optimal conditions of reaction time, amount of celite addition, temperature, amount of saponin addition and pH of saponin solution were investigated.

The results revealed that the optimal conditions of cholesterol removal from milk were saponin conc. 1.5%, temperature of reaction with saponin 45°C, reaction time 30min and amount of celite addition 0.25%, removing 72.00% of cholesterol from milk.

In the case of cream, the optimal conditions of cholesterol removal from cream were saponin conc. 5%, pH of saponin solution 5.5, temperature of reaction with saponin 60°C and amount of celite addition 2.5%, removing 76.32% of cholesterol.

On the other hand, optimized conditions of the removal of cholesterol from milk using response surface methodology(RSM) were saponin conc. 0.5%, temperature of reaction with saponin 25°C, amount of celite addition 0.25% and reaction time 10min, removing 72.27% of cholesterol. The optimized conditions of the removal of cholesterol from cream using RSM were saponin conc. 8.3%, temperature of reaction with saponin 60°C, amount of celite addition 2.5%, removing 86.43% of cholesterol.

Therefore, the result of this study indicate that saponin is effective on removal of cholesterol from milk and cream.

To develop an immobilization method for the removal fo cholesterol from milk, saponin from quillaja bark or digitonin was immobilized onto Sepharose-4B. Immobilized saponin and digitonin removed 20% and 30% of cholesterol from milk, respectively. Using silica as support for the immobilization of saponin, optimization of reaction time between silica and epoxy(γ -glycidoxypropyltrimethoxysilane), and the amount of epoxy spacer were carried out. The optimal conditions

were reaction time 24hrs, and amount of epoxy spacer addition was 13.5ml/g silica.

Part 3. Cholesterol removal and fractionation from milk fat by supercritical carbon dioxide extraction

To develop milk fat fractions with desirable physico-chemical properties, anhydrous milk fat (AMF) was fractionated by one-and-two-stage extractions using supercritical CO₂ (SC-CO₂). Two-stage extraction of AMF was performed by first producing two fractions, an extract and a residue at 40°C/241 bar, which were subsequently used as the feed for an extraction at 60°C/241 bar and 40°C/345 bar, and separated into five and four fractions, respectively, based on extraction time. These fractions were quantified and analyzed for fatty acids and physico-chemical properties. Short-chain (C₄~C₈) fatty acids in extract fractions from an extract were 200~150% compared with those of the original AMF. Long-chain (C₁₄~C₁₈) fatty acids in extract fractions from a residue were 118~141%. The ratio of unsaturated to saturated fatty acids in the residue fraction was 131%. Melting point ranged from 22 to 43°C, iodine value 21.8 to 36.9, and saponification value 255 to 221 in the extract and residue fractions. SC-CO₂ fractionation of AMF by two-stage extraction offers the possibility of developing fractions with discrete fatty acid compositions, and physico-chemical properties such as melting point, iodine value and saponification

value.

The technical feasibility of removing cholesterol from milk fat by SC-CO₂ extraction followed by adsorption on different adsorbents and of fractionating milk fat into different fatty acid composition at 40°C/276 bar was investigated. Cholesterol could be selectively removed from milk fat by adsorption on a typical commercial florisil with SC-CO₂ extraction. Lower weight ratio of milk fat feed to florisil showed higher reduction of cholesterol, but gave lower yield in the milk fat fractions. The effective capacity of florisil for removing cholesterol from milk fat was 2.0 g/g, which is the ratio of the fat feed to the adsorbent for 89% cholesterol reduction with a fat yield of 57.5%. Fatty acid composition showed higher short-chain and lower unsaturated long-chain fatty acids in the extracted fractions. Milk fat fractionation method by supercritical fluid extraction in coupled with adsorption would appear suitable for removing undesirable ingredients such as cholesterol and for enriching short-chain fatty acids in the fractions.

Part 4. Training of sensory panel and development of cholesterol removed cream and butter

Twenty panelists were selected and trained for sensory properties such as sweetness, bitterness, saltiness, sourness of milk, cream, butter and cheese. In addition, rheological properties such as chewiness and texture of dairy products were tested by those panelists. To examine the

possibility of manufacture of cholesterol-removed cream and butter in pilot-scale and industry, sensory analysis of those products accomplished by well-trained panelists.

In cream, sweetness increased little because of β -CD addition, however, there was no difference in ice cream and whipping cream. For manufacture of cholesterol-removed ice cream, additional process to basic ice cream making was not needed except β -CD addition to cream.

For cholesterol-removed butter, determination of optimum condition of various factors such as β -CD addition, mixing time and temperature was difficult, therefore, more study should be accomplished in the future.

요 약

본 연구는 우유 및 유제품의 콜레스테롤을 제거하는 효과적인 방법을 규명하기 위하여 콜레스테롤 흡착제인 β -cyclodextrin과 saponin을 이용하였으며, 초임계유체추출법을 이용하여 유지방의 분획과 콜레스테롤 제거의 가능성을 관찰하였다. 그리고 물성과 관능검사를 실시하였다. 또한 산업화를 위하여 각 제품의 표준제조공정을 개발하고 개발제품으로의 가능성을 검토하였다.

제 1 세부과제. β -cyclodextrin을 이용한 우유 및 유제품의 콜레스테롤 제거에 관한 연구

본 과제에서는 β -cyclodextrin을 이용하여 우유 및 유제품의 콜레스테롤을 제거하기 위하여 실시되었다. 우유와 크림의 콜레스테롤 정량을 위해 GC와 효소 방법을 비교 분석하였다. GC 방법을 이용하여 정량한 콜레스테롤 수치가 효소 방법보다 높게 나타남을 알 수 있었다. 유지방 함량이 2.6, 3.6, 4.6%의 우유의 경우, GC 방법에 의하면 각각 9.52, 13.14, 16.83 mg/100g 였고, 효소 방법에 의하면 각각 8.62, 9.52, 15.78 mg/100g 였다. 크림의 경우에도 유사한 경향을 보였다. Recovery 실험에서는 GC 방법에 의하면 100.95%의 recovery를 나타내었고, 효소 방법을 사용하면 90.4%의 recovery에 그쳐 큰 차이를 보이는 것으로 나타났다. 이 실험 결과를 종합해 볼 때, 효소 방법에 비해 GC 방법이 더 빠르고 간단하고 정확하며, 또한 용매 소비량도 줄일 수 있어 우유 및 유제품의 콜레스테롤 정량 방법으로 적합한 것으로 사료된다.

두 번째 실험은 β -cyclodextrin (β -CD) 을 이용한 우유의 콜레스테롤 제거 방법을 개발하고자 실시되었다. 콜레스테롤 제거를 위해 첨가한 β -CD량은 1.0%, 교반온도 10℃, 교반 시간 10분, 교반 속도 800 rpm, 원심분리 속도 166 x g가

가장 적합한 조건으로 결정되었다. 이 조건들을 기준으로 하여 반응표면분석법을 실시한 결과, 선정된 최적조건들은 β -CD 1.0%, 교반 온도 17.5℃, 교반속도 800 rpm, 교반시간 10분, 원심분리 속도 166 x g 로 나타났으며, 이 조건에서 예측되는 콜레스테롤 제거율은 98.4%이고, 실제 측정 수치는 94.2%로 유의적 차이를 보이지 않았다.

연속된 세 번째 실험에서는 β -CD를 이용한 크림의 콜레스테롤 제거에 적합한 조건을 반응표면분석법을 이용해 알아내고자 실시되었다. 5가지의 조건 (β -CD, 교반시간, 교반온도, 교반속도, 원심분리 속도)들을 5가지 level 로 나누어 실험하였다. 다중회기 분석을 실시한 결과, 95% 유의 수준에서 크림의 콜레스테롤 제거율에 영향을 미치는 factor는 β -CD 첨가량, 교반 시간, 교반 속도였으며, 그 중 가장 주요한 factor는 β -CD인 것으로 나타났다. β -CD를 5% 첨가한 경우, 80.17%의 콜레스테롤 제거율을 보인 반면, 10%의 β -CD 첨가시에는 94.42%로 급격한 증가를 보였다. 15% β -CD 첨가시에 가장 높은 제거율을 보여 β -CD 첨가량 증가에 따라 크림의 콜레스테롤 제거율도 증가함을 알 수 있었다. 이 실험은 β -CD 외에도 위의 다른 조건들에 의해 크림의 콜레스테롤 제거율은 달라지나, β -CD를 이용해 94% 이상의 콜레스테롤을 제거할 수 있음을 알아내었다는 점에서 중요하다 하겠다.

이 세부과제의 네번째 실험은 콜레스테롤을 흡착한 β -CD-콜레스테롤 복합체에서 β -CD만을 분리해 내어 재활용하는 방법을 모색하고자 실시되었다. 콜레스테롤을 분리해낼 수 있는 용매로 acetic acid : butanol = 3 : 1 인 혼합 용매가 선정되었다. 용매와 복합체간의 비율은 6 : 1 인 것으로 나타났다. 교반속도는 100 rpm, 교반 시간은 2 시간, 교반 온도는 50℃일 때 가장 높은 분리율을 보였다. 이 조건들을 기준으로 하여 반응표면 분석법을 이용하여 콜레스테롤의 β -CD로부터의 분리의 최적 조건들을 찾아내었다. 실험 결과에 따르면, 교반 온도 57℃, 교반 속도 100 rpm, 교반 시간 2 시간일 때 예상치는 96.5%로 가장 높

게 나타났다. 따라서 β -CD의 재활용의 가능성을 볼 수 있었고, 재활용된 β -CD로 크림의 콜레스테롤 제거 실험을 한 결과, 재활용된 β -CD만을 사용하는 것보다는 사용하지 않은 β -CD와 6 : 4 의 비율로 혼합하여 사용한다면 95.59%라는 높은 콜레스테롤 제거율을 보일 수 있는 것으로 나타나 산업적 이용의 가능성을 찾아 볼 수 있었다.

콜레스테롤이 제거된 유제품의 개발에서는 0.5%의 β -CD를 첨가한 우유가 산업적으로 가장 효과적이었고, 콜레스테롤이 제거된 아이스크림의 개발에서는 다양한 과일향이 있는 고급 아이스크림의 개발이 성공적이었다. 그러나 콜레스테롤이 제거된 휘핑크림의 개발은 좀 더 다양한 연구가 요구된다. 그리고 β -CD의 재활용에 관한 산업적 이용에 관한 연구는 실험실에서의 연구처럼 용이하지 않았으며 β -CD의 회수 문제는 연구를 계속하는 것이 필요하다.

제 2 세부과제. Saponin의 고정화 연구와 cholesterol의 제거에 대한 개발

유제품 중의 cholesterol을 제거하기 위해 우선적으로 이를 정량하기 위한 Nova-Pak C₁₈을 이용한 HPLC 분석방법과 colorimetric method를 연구하였다. Cholesterol 분리 최적화를 위해 hexane / 2-propanol, hexane / tetrahydrofuran, hexane / ethyl acetate, acetonitrile / methanol, acetonitrile / methanol / 2-propanol과 같은 다양한 이동상으로 분석하여 비교하였다. 그 결과 acetonitrile / methanol / 2-propanol이 cholesterol 분리에 가장 효과적이었다. Cholesterol의 liquid-liquid extraction(LLE)을 비극성 용매인 hexane을 이용하여 방해물질들을 제거함으로써 단순화시켰고 recovery test 결과 100±1.0의 값을 얻게 되었다. 또 이와 함께 C₁₈ Sep-pak을 이용한 solid phase extraction(SPE)을 LLE와

비교, 검토하였다. 비누화된 시료를 SPE tube에 옮겨 acetic acid/ethanol 와 함께 지용성 성분들을 유출시키고 그 후, SPE tube에 남게되는 cholesterol을 ethyl acetate/hexane 으로 유출시켜 분리하였다. SPE방법은 LLE방법에 비해 비교적 비용이 많이 드는 단점이 있으나 대체로 이 두 방법은 cholesterol 추출에 효과적이다. 새롭게 개발된 HPLC 방법은 205nm에서 detection limit가 0.01 μ g이고, 간단하며 정확하기 때문에 일반적으로 사용되는 다른 방법들 이상의 장점을 가진다. Colorimetric method는 HPLC 방법보다 비교적 정확도는 떨어지지만, 고가의 장비가 필요하지 않고 신속하므로, 품질관리시에 효과적이라고 할 수 있다.

Saponin을 이용한 우유 및 크림 중의 cholesterol 제거 최적조건을 결정하기 위해 실험요소들 각각의 효과를 독립적으로 조사하는 방법과, 각 요소들 간의 상호효과를 확인할 수 있는 방법인 반응표면분석법(Response Surface Methodology)을 이용한 modeling method를 사용하였다. 각 실험요소들 각각의 효과를 독립적으로 조사한 결과, 우유의 경우는 cholesterol 제거율이 72.00%로 나타난 saponin 첨가량 1.5%, 반응온도 45 $^{\circ}$ C, 반응시간 30분, celite 첨가량 0.25%일 때였고, 크림 중 cholesterol 제거 최적조건은 cholesterol 제거율이 76.32%로 나타난 saponin 용액의 농도 5%, saponin 용액의 pH 5.5, 반응온도 60 $^{\circ}$ C, celite 첨가량 2.5%일 때라고 할 수 있다. 그리고, 반응표면분석법을 이용하였을 경우의 최적조건은 우유의 경우, 72.27%의 cholesterol이 제거된 saponin 첨가량 0.5%, 반응시간 10분, celite 첨가량 0.25%이며 반응온도가 25 $^{\circ}$ C인 경우이다. 크림은 celite 첨가량 2.5%, 반응온도 60 $^{\circ}$ C, saponin 용액의 농도 8.3%일 때가 cholesterol을 제거하기 위한 최적조건이며 이 때의 cholesterol 제거율은 86.43%였다. 이 두가지 방법에 의해 선정된 cholesterol의 최적조건에 차이가 있는 것은 첫 번째 방법을 독립적으로 실험요소들을 평가하는데 반해

두 번째 방법은 모든 실험요소들의 전체적인 영향을 평가하기 때문이다. 조건하에서 이러한 결과들은 saponin이 cholesterol을 제거하는데 효과적인 흡착제임을 나타내며, 앞으로 이를 이용한 저 cholesterol 제품의 생산 가능성을 시사하고 있다.

우유중의 cholesterol을 제거하기 위한 고정화 방법을 개발하기 위해 quillaja bark로부터 추출한 saponin과 digitonin을 Sepharose-4B에 고정화하였다. 고정화 된 saponin과 digitonin은 각각 20%와 30%의 우유 cholesterol을 제거하였다. 고정화시 saponin의 지지체인 silica와 epoxy(γ -glycidoxypropyltrimethoxysilane)의 최적 반응시간과 epoxy spacer의 양을 조사한 결과, 최적 반응시간은 24시간이었고, 가장 효과적인 epoxy spacer의 첨가량은 13.5ml/g silica였다.

제 3 세부과제. 초임계 이산화탄소에 의한 유지방의 추출분획 및 콜레스테롤 제거

유지방은 다른 유지와 비교해 볼 때 저급지방산을 다량 함유하고 있고, 또한 필수지방산의 원천이며, Vitamin E를 함유하고 있어서 항산화성이 있고, 특히 풍미가 우수하여, 유지방 그 자체로서, 또는 아이스크림, 초콜렛, 과자류 등 여러 종류의 식품에 첨가 원료로 다양하게 이용된다. 그러나 유지방은 농축된 에너지원이고 콜레스테롤을 0.25-0.4% 함유하고 있고, 약 65%의 포화지방산으로 구성되어 있으며, 퍼짐성이 좋지 않기 때문에 그 이용에 한계가 있다. 이와 같은 문제를 해결하기 위해서는 유지방으로부터 콜레스테롤을 제거하고, 각 첨가식품에 필요로 하는 물리화학적 특성을 갖는 분획으로 분별할 필요가 있다. 따라서 본 연구에서는 초임계유체와 흡착제를 이용하여 유지방을 추출흡착분획하여 유지방으로부터 콜레스테롤을 제거하고, 지방산 조성과 물리화학적 성질이 다른 유지방 분획들

을 얻었다.

유지방으로부터 콜레스테롤이 제거되고, 물리화학적 성질이 다른 여러 형태의 분획으로 분별하므로써 유지방의 이용을 극대화시킬 수 있음은 물론, 우수한 풍미, 향미, 조직감을 갖는 여러 가공식품 즉 아이스크림, 초콜릿, 과자류 등을 제조할 수 있다. 또한 콜레스테롤이 제거된 유지방을 이용하여 영양이 우수한 저콜레스테롤 우유등 유제품을 제조할 수 있으며, 농축된 콜레스테롤 분획은 의약품으로도 이용될 수 있다.

제 4 세부과제. 물성 및 관능검사 훈련과 cholesterol이 제거된 크림과 버터의 개발

관능검사 요원으로 능력이 있다고 인정되는 자들을 20명 선정하여 기본적으로 물성 및 관능검사를 훈련시켰다. 3점척도법으로 기본적인 단맛, 쓴맛, 짠맛, 신맛, 매운맛 등을 정확히 판단할 수 있도록 훈련을 실시하였다. 위의 훈련된 요원들을 이용하여 5점과 9점 척도법으로 시유, 크림, 버터, 치즈의 관능검사와 물성의 훈련을 실시하였다.

크림과 버터의 산업화를 위하여 각 제품의 표준제조 공정을 확립하고 pilot scale 생산과 대량생산 제조의 가능성을 타진하여 상품화를 위한 관능검사를 실시하였다.

크림의 경우는 관능적으로 단맛이 없었으나 아이스크림과 휘핑크림의 원료로 문제가 없었다. 또한 아이스크림의 제조에 필요한 특별한 공정이 필요하지 않았다. 버터의 개발에서는 최적조건의 확립이 매우 어려워 좀 더 연구가 진행되어야 할 것이다.

Contents

Part 1. Cholesterol removal in milk and dairy products using β -cyclodextrin

Chapter 1. Introduction	42
Chapter 2. Materials and Methods	46
Section 1. Comparison of methods for cholesterol determination	46
1. Materials	46
2. Determination of milk fat	46
3. Preparation of standard curve	47
4. Extraction of cholesterol	47
5. Quantitative analysis of cholesterol	48
6. Recovery test	50
7. Statistical analyses	50
Section 2. Cholesterol removal in homogenized milk with β -cyclodextrin	50
1. Materials	50
2. Cholesterol removal process	51
3. Response surface methodology	52
Section 3. Cholesterol removal in cream using β -cyclodextrin	54
1. Materials	54
2. Cholesterol removal process	54
3. Response surface methodology	57

Section 4. Optimization of β -cyclodextrin recycling for cholesterol removal from cream	57
1. Materials	57
2. Separation of β -cyclodextrin-cholesterol complex from cream ...	57
3. Pretest for the selection of solvents	58
4. Separation of cholesterol from β -cyclodextrin-cholesterol complex in cream	58
5. Optimization for response surface methodology	59
6. effects of β -cyclodextrin recycling on cholesterol removal from cream	61
Section 5. Development of cholesterol-removed dairy products	61
1. Materials	61
2. Standard manufacturing process	61
3. Sensory tests	61
4. Statistical analysis.....	62
Chapter 3. Results and Discussion	63
Section 1. Comparision of methods for cholesterol determination	63
1. Comparision of methods of quantitative analyses for cholesterol in milk and cream	63
2. Recovery test	65
Section 2. Cholesterol removal in homogeniged milk with β -cyclodextrin	66
1. Effect of β -cyclodextrin concentration	66
2. Effect of mixing temperature	68

3. Effect of mixing time	69
4. Effect of centrifugal force	70
5. Effect of centrifugation time	72
6. Optimization of β -cyclodextrin recycling for cholesterol removal from cream	73
Section 3. Cholesterol removal in cream using β -cyclodextrin	76
1. Optimization of β -cyclodextrin recycling for cholesterol removal from cream	76
2. Effect of β -cyclodextrin concentration	76
3. stirring temperature	78
4. stirring time	81
5. stirring speed	83
6. centrifugal force	85
Section 4. Optimization of β -cyclodextrin recycling for cholesterol removal from cream	89
1. Comparison of relative solubility of cholesterol with various solvents	89
2. The selection of relative solubility of cholesterol- β -cyclodextrin complex with various compound solvents	90
3. The selection of ratio of organic solvents on dissociation of cholesterol- β -cyclodextrin	91
4. The ratio of selected solvent and the complex	93
5. stirring speed	94
6. stirring time	95
7. stirring temperature	96

8. Optimization of dissociation of cholesterol- β -cyclodextrin in cream by response surface methodology	98
9. Effects of β -cyclodextrin recycling	100
Section 5. Development of cholesterol removed dairy products	101
1. Development of cholesterol removed milk	101
2. Development of cholesterol removed ice cream	103
3. Development of cholesterol removed whipping cream	106
4. Development of recycling of β -cyclodextrin	108
Chapter 4. References	110

Part 2. Studies on the immobilization of saponin and development of cholesterol removal method

Chapter 1. Introduction	114
Chapter 2. Materials and methods	117
Section 1. Development of cholesterol analysis methods in milk and cream	117
1. Materials	117
2. Extraction methods of cholesterol	117
3. Analysis of cholesterol using HPLC	119
4. Development of rapid cholesterol assay method using colorimetry	119
Section 2. Development of cholesterol removal methods in milk and cream using saponin	120
1. Materials	120

2. Development of cholesterol removal in milk using saponin···	120
3. Development of cholesterol removal in cream using saponin···	127
Section 3. Development of saponin immobilization method for the removal of cholesterol··········	133
1. Materials··········	133
2. Immobilization of saponin and digitonin··········	133
3. Optimization of reaction time between silica and epoxy spacer ··········	133
4. Analysis of epoxy spacer in epoxy-silica··········	134
Chapter 3. Results and discussion··········	134
Section 1. Development of cholesterol analysis methods in milk and cream··········	135
1. Selection of column and mobile phase for the HPLC analysis·	135
2. Effect of extraction method on the cholesterol contents···	135
3. Determination of cholesterol content and recovery test in milk and cream using HPLC and colorimetric method·········	140
Section 2. Development of cholesterol removal methods in milk and cream using saponin··········	142
1. Development of cholesterol removal in milk using saponin···	142
1) Determination of optimum conditions for cholesterol removal in milk ···········	142
2) Determination of optimum conditions for cholesterol removal in milk using response surface methodology·········	151
2. Development of cholesterol removal in cream using saponin·	161
1) Determination of optimum conditions for cholesterol removal	

in cream	161
2) Determination of optimum conditions for cholesterol removal in cream using response surface methodology.....	170
Section 3. Development of saponin immobilization method for the removal of cholesterol.....	180
1. Immobilization of saponin and digitonin.....	180
2. Optimization of reaction time between silica and epoxy spacer	180
3. Analysis of the amount of epoxy spacer in epoxy-silica.....	180
Chapter 4. References.....	182

**Part 3. Cholesterol removal and fractionation from milk fat by
 supercritical carbondioxide extraction**

Chapter 1. Introduction.....	188
Chapter 2. Materials and methods.....	192
Section 1. Fractionation of milk fat by supercritical fluid	192
1. Materials.....	192
2. Extraction of milk fat by supercritical CO ₂	192
3. Analysis of fatty acids.....	193
4. Melting point, saponification value and iodine value.....	194
Section 2. Reduction of cholesterol from milk fat by supercritical fluid extraction.....	195
1. Materials.....	195
2. Extraction of milk fat by supercritical CO ₂	195

3. Analysis of cholesterol.....	196
4. Analysis of fatty acids.....	196
Chapter 3. Results and discussion.....	199
Section 1. Fractionation of milk fat by supercritical fluid..	199
1. Single-extraction trial.....	199
1) Extraction yield of milk fat fractions at different extraction temperature.....	199
2) Fatty acid composition of milk fat fractions at different extraction temperature.....	199
2. Double-extraction trial.....	201
1) Extraction yields of extract and residue by double-extraction trial at different CO ₂ consumption.....	202
2) Fatty acid compositions of extract and residue by double-extraction trial.....	205
Section 2. Reduction of cholesterol from milk fat by supercritical fluid extraction.....	211
1. Fat yield and cholesterol reduction of milk fat fractions by supercritical CO ₂ with different adsorbents.....	211
2. Fat yield and cholesterol reduction of milk fat fractions by supercritical CO ₂ with different mesh size of adsorbents.....	214
3. Fat yield and cholesterol reduction of milk fat fractions by supercritical CO ₂ with different ratio of milkfat to adsorbent	216
4. Fatty acid composition	217
Chapter 4. Refereces	220

**Part 4. Rheological and sensory evaluation, Development of
cholesterol-removed cream and butter**

Chapter 1. Introduction	224
Chapter 2. Materials and methods.....	226
Section 1. Sensory evaluation of milk and dairy products	226
Section 2. Texture of milk and dairy products.....	226
Section 3. Statistical analyses	226
Section 4. Development of cholesterol-removed cream and butter...	226
Chapter 3. Results and discusion	228
Section 1. Results	228
1. Training of sensory evaluation of dairy products	228
2. Development of cholesterol-removed cream and butter	236
Chapter 4. Reference	239

목 차

제 1 세부과제(주관) β -cyclodextrin을 이용한 cholesterol 제거 에 관한 연구(과혜수)

제 1 장 서론	42
제 2 장 연구방법	46
제 1 절 콜레스테롤 정량 분석 방법의 비교	46
1. 재료 및 시약	46
2. 유지방 측정	46
3. 검량선 (stand curve)의 측정	47
4. 콜레스테롤의 추출	47
5. 콜레스테롤 정량 분석	48
6. Recovery 실험	50
7. 통계처리	50
제 2 절 β -cyclodextrin을 이용한 균질 우유의 콜레스테롤 제거 ...	50
1. 재료 및 시약	50
2. 콜레스테롤의 제거 실험	51
3. 통계처리 및 반응표면 분석법	52
제 3 절 β -cyclodextrin을 이용한 크림의 콜레스테롤 제거	54
1. 재료 및 시약	54
2. 콜레스테롤 제거 실험	54
3. 통계처리 및 반응표면 분석법	57

제 4 절 크림의 콜레스테롤 제거에 이용한 β -cyclodextrin	
재활용의 최적화 조건	57
1. 재료 및 시약	57
2. β -cyclodextrin-콜레스테롤 복합체 수거	57
3. 용매 선정에 위한 예비 실험	58
4. 복합체로부터의 콜레스테롤 분리	58
5. 반응 표면 분석법을 이용한 최적 조건 확립	59
6. 재활용된 β -cyclodextrin의 효율성 검토	61
제 5 절 콜레스테롤이 제거된 유제품의 개발	61
1. 재료 및 시약	61
2. 표준제조공정	61
3. 관능검사	61
4. 통계분석	62
제 3 장 연구결과	63
제 1 절 콜레스테롤 정량 분석 방법의 비교	63
1. 우유 및 크림의 콜레스테롤 정량 분석 방법의 비교	63
2. Recovery 실험	65
제 2 절 β -cyclodextrin을 이용한 균질 우유의 콜레스테롤 제거	66
1. β -cyclodextrin 첨가의 효과	66
2. 교반 온도의 영향	68
3. 교반 시간의 영향	69
4. 원심분리 속도의 영향	70
5. 원심분리 시간의 영향	72
6. 반응표면 분석법에 의한 콜레스테롤 제거 조건의 최적화	73
제 3 절 β -cyclodextrin을 이용한 크림의 콜레스테롤 제거	76

1. 반응표면 분석법에 의한 콜레스테롤 제거 조건의 최적화	76
2. β -cyclodextrin 첨가	76
3. 교반 온도	78
4. 교반 시간	81
5. 교반 속도	83
6. 원심분리 속도	85
제 4 절 크림의 콜레스테롤 제거에 이용한 β -cyclodextrin재활용의 최적화 조건	89
1. 콜레스테롤의 단일 용매에 대한 용해도의 비교	89
2. β -cyclodextrin-콜레스테롤 복합체의 용해도에 의한 용매 선정	90
3. 혼합 용매의 비율 선정	91
4. 선정된 용매와 복합체의 혼합 비율	93
5. 교반 속도	94
6. 교반 시간	95
7. 교반 온도	96
8. 반응표면 분석법에 의한 콜레스테롤 제거 조건의 최적화	98
9. 재활용된 β -cyclodextrin의 이용	100
제 5 절 콜레스테롤이 제거된 유제품의 개발	101
1. Cholesterol이 제거된 우유의 개발	101
2. Cholesterol을 제거한 아이스크림의 표준제조 공정의 개발	103
3. Cholesterol이 제거된 힙핑크림의 개발	106
4. β -cyclodextrin의 재이용에 대한 개발	108
제 4 장 참고문헌	110

**제 2 세부과제. Saponin의 고정화 연구와 cholesterol의
제거에 대한 개발**

제 1 장 서론	114
제 2 장 연구방법	117
제 1 절 우유 및 크림의 cholesterol 정량 분석 개발	117
1. 재료	117
2. Cholesterol 추출 방법.....	117
3. HPLC를 이용한 cholesterol 분석.....	119
4. Colorimetric method에 의한 cholesterol의 속성정량방법	119
제 2 절 Saponin을 이용한 우유 및 크림 중 cholesterol 제거에 대한 개발.....	120
1. 재료	120
2. Saponin을 이용한 우유 중의 cholesterol 제거에 대한 개발.....	120
3. Saponin을 이용한 크림 중의 cholesterol 제거에 대한 개발.....	127
제 3 절 Cholesterol 제거를 위한 saponin 고정화 방법 개발.....	133
1. 재료.....	133
2. Saponin과 digitonin의 고정화	133
3. Silica와 epoxy spacer 반응시간의 최적화.....	134
4. Epoxy-silica의 epoxy spacer 정량.....	134
제 3 장 연구결과 및 고찰.....	135
제 1 절 우유 및 크림의 cholesterol 정량 분석 개발.....	135
1. HPLC 분석을 위한 column의 선정 및 이동상의 선정.....	135
2. 추출방법에 따른 cholesterol 함량.....	135
3. HPLC 및 colorimetric method를 이용한 우유 및 크림의 cholesterol 함	

량 측정 및 recovery test.....	140
제 2 절 Saponin을 이용한 우유 및 크림 중 cholesterol 제거에 대한 개발.....	142
1. Saponin을 이용한 우유 중의 cholesterol 제거에 대한 개발.....	142
가. 우유의 cholesterol 제거 최적조건 결정	142
나. 반응표면분석법에 의한 우유중의 cholesterol 제거 최적조건 결정	151
2. Saponin을 이용한 크림 중의 cholesterol 제거에 대한 개발.....	161
가. 크림의 cholesterol 제거 최적조건 결정	161
나. 반응표면분석법에 의한 크림중의 cholesterol 제거 최적조건 결정...	170
제 3 절 Cholesterol 제거를 위한 saponin 고정화 방법 개발.....	180
1. Saponin과 digitonin의 고정화.....	180
2. Silica와 epoxy spacer 반응시간의 최적화.....	180
3. Epoxy-silica의 epoxy spacer 정량.....	180
제4장 참고문헌.....	182

**제 3 세부과제. 초임계 유체추출법에 의한 유지방의 분획 및
콜레스테롤 제거에 관한 연구**

제 1 장 서론.....	188
제 2 장 연구방법.....	192
제 1 절 초임계유체에 의한 유지방의 분획.....	192
1. 재료.....	192
2. 초임계 이산화탄소에 의한 유지방의 추출.....	192

3. 지방산 분석.....	193
4. 응점, 검화가, 요오드가 측정.....	194
제 2 절 초임계유체 추출법을 이용한 유지방의 cholesterol 제거...	195
1. 재료.....	195
2. 초임계 이산화탄소에 의한 유지방의 추출.....	195
3. 콜레스테롤 분석.....	196
4. 지방산 분석.....	196
제 3 장 연구결과 및 고찰.....	199
제 1 절 초임계유체에 의한 유지방의 분획.....	199
1. 일단계 추출.....	199
가. 추출온도에 따른 유지방의 추출수율.....	199
나. 추출온도에 따른 유지방 분획들의 지방산 조성.....	199
2. 이단계 추출.....	201
가. 이산화탄소 소비량에 따른 추출물과 추출잔류물의 이단계 추출수율.....	202
나. 유지방 추출물과 추출잔류물 분획들의 지방산 조성.....	205
제2절 초임계유체 추출법을 이용한 유지방의 cholesterol 제거....	211
1. 흡착제 종류에 따른 유지방의 수율 및 콜레스테롤 함량.....	211
2. 흡착제의 입자크기에 따른 유지방의 수율 및 콜레스테롤 함량...	214
3. 흡착제의 비율에 따른 유지방의 수율 및 콜레스테롤 함량.....	216
4. 지방산 조성.....	217
제 4 장 참고문헌	220

제 4 세부과제. 물성 및 관능검사

제 1 장 서론	224
제 2 장 연구방법	226
제 1 절 시유 및 유제품의 관능검사	226
제 2 절 시유 및 유제품의 조직검사	226
제 3 절 통계분석	226
제 4 절 콜레스테롤이 제거된 크림과 버터의 개발	226
제 3 장 연구결과 및 고찰	228
제 1 절 연구결과	228
1. 유제품의 관능검사 훈련	228
2. 콜레스테롤이 제거된 크림과 버터의 개발	236
제 4 장 참고문헌	239

본 문

제 1 세부과제. β -cyclodextrin을 이용한 cholesterol 제거에 관한 연구

제 1 장 서 론

국민들의 식생활 양식이 다원화해지면서 서구식 식문화가 확산되어 가고 있다. 특히 우유, 유제품, 육류 및 육제품의 소비가 급증하면서 동물성 지방의 섭취도 계속 증가하고 있는 추세이다. 우유 및 유제품의 소비는 1998년에 1인당 연간 우유 34.3kg에 불과했지만 1997년에는 53.3kg으로 지난 10년 사이에 55% 이상이 증가되었으며 소비가 계속적으로 증가될 추세이다. 따라서 동물성 지방에 존재하는 cholesterol의 섭취량도 증가하여 cholesterol 과다 섭취에 의한 고혈압, 동맥경화, 관상동맥 경화증과 같은 심장 및 순환계 질환이 증가될 가능성이 높다.

Cholesterol은 인체에 필수적인 영양소로서 중요한 기능을 하는 하나⁽¹⁾, 다량 존재할 경우에는 위에서 언급한 질환을 포함하는 성인병을 유발하는 것으로 알려져 있으며, 이에 대한 많은 연구가 활발히 진행되고 있다⁽²⁾. 실험 결과에 의하면, cholesterol 섭취량을 줄임으로서 체내 함유된 cholesterol량과 이에 관련된 질환에 의한 사망률을 최소화 할 수 있을 것으로 알려져 있다. 최근 우리나라를 포함한 대부분의 국가에서 cholesterol의 하루 섭취량을 300mg으로 제한하고 있으며^(3, 4), 영양표시란에 cholesterol 함량을 표시하도록 규정하고 있다. Cholesterol을 비교적 많이 함유하는 식품으로는 난황, 버터, 육류 등을 들 수 있으며, 유제품 중에서는 버터 210mg/100g, 37% 유지방의 크림 137mg/100g, 체다치즈

105mg/100g, 15% 유지방의 아이스크림 68mg/100g과 시유에는 비교적 적은 14mg/100g 등이 함유되어 있다⁽⁵⁾.

이와 같이 우유 및 유제품에 내재하는 cholesterol을 저하시키는 방법으로는 우유의 유지방 일부 또는 전체를 감소시키는 방법과 유지방 내의 cholesterol만을 선택적으로 감소시키는 방법으로 분류할 수 있다. 우유의 유지방 함량을 감소시키는 방법은 유제품의 향미와 조직감이 떨어짐에 따라 제품의 기호성이 저하되는 결함이 있기 때문에 흡착제인 β -cyclodextrin(β -CD)에 cholesterol을 흡착 또는 결합시켜 복합체를 만들어 제거하는 방법⁽⁶⁾이 가장 효과적인 것으로 알려져 있다.

Cyclodextrin은 환상형 다당류로서 α -1,4-glycosidic linkage로 결합되어 있으며, 상업적으로 glucose가 6, 7, 8개가 결합되어 있는 α -, β -, γ -CD가 각각 생산된다. 이중 β -CD가 가장 용해성이 낮으므로 용액상태에서 쉽게 분리할 수 있는 특성이 있다. β -CD는 glucose 7개가 α -1,4 결합을 하고 있는 cyclic oligosaccharide로서 도우넛과 같은 형태를 하고 있다. β -CD의 중앙은 직경이 cholesterol의 크기와 거의 비슷한 소수성의 원형공간이므로 비극성 분자인 cholesterol과 결합이 잘 되고, 비극성 물질과 결합하여 복합체가 형성되면 매우 안정하여 200℃까지 가열하여도 분리되지 않는다. β -CD는 미생물로부터 추출한 cyclodextrin glycosyl-transferase를 이용하여 전분을 분쇄한 후 재합성하는 방법으로 생산되므로 안정성이 높아, 독성실험 결과 β -CD를 mouse에 경구 투여 했을때 LD₅₀ 값이 12,500mg/kg으로 나타나 cholesterol 제거를 위한 적합한 물질로 사료된다⁽⁷⁾

β -CD를 이용하여 cholesterol을 제거하는 연구로는 Smith 등⁽⁸⁾이 egg yolk에서 89.2%의 cholesterol을 제거하였다고 보고하였으며, Lee 등⁽⁹⁾은 cream에서 83%의 cholesterol을 제거하였고, Yen 등⁽¹⁰⁾은 lard에서 90%의

cholesterol을 제거하였다고 보고하였다. 이와 같이 β -CD를 이용한 연구는 어느정도 진전되고 있으나, 이는 단지 β -CD의 cholesterol 제거의 가능성을 시사하는 수준이며 아직 산업화로 발전시킬 수 있는 단계에는 이르지 못하였다.

현재 상업적으로 생산되고 있는 β -CD의 가격이 대체로 저렴하지 못하고(7,000원/kg, 1997년 현재), 또한 수입되는 현실을 감안할 때, β -CD를 재활용하는 것은 원가절감 차원에서 중요하다고 사료된다. β -CD를 재활용하기 위하여 cholesterol과 결합된 β -CD를 회수하는 방법에는 hydrogen bond inhibitor를 이용하는 방법⁽¹¹⁾, resin을 이용하는 방법⁽¹²⁾, heating 처리에 의한 방법⁽¹³⁾, sodium chloride를 이용하는 방법⁽¹⁴⁾, 유기용매를 이용하는 방법^(7, 15, 16) 등이 있다. 이들 방법들은 여러가지 장단점이 있기 때문에 실용화하기에는 어려움이 많다. 그러나 이들 방법중에 용매에 의한 방법이 간단하고, 경제적이며 산업적으로 응용하기에 용이하다고 사료된다. 이러한 장점에도 불구하고 다음과 같은 여러 문제점들을 해결해야 한다. 용매로 인하여 단백질이 변성될 수 있고, 매우 복잡한 과정이므로 경제적 또는 효율면에서 적합하지 못하다⁽¹⁷⁾. 그리고 엄격한 안전규칙과 고비용이 요구되며⁽¹³⁾, 용매에 다른 지용성 성분이 cholesterol과 같이 추출될 수 있다⁽¹²⁾. 또한 사용한 유기용매의 잔존량은 섭취하기에 부적합하고 복합체를 분리해 내는 친유성 화합물이 다양하지 않은 점과 분자량이 작고 친수성을 가지고 있어 사용하기에 부적합한 점 등⁽¹⁸⁾이 문제시 된다. 이러한 점들을 고려하여 선정된 용매들로는 ethanol, hexane, chloroform, methanol, isopropanol, acetic acid, butanol 등이 있다. β -CD를 이용하여 cholesterol을 제거하는 데는 문제가 없지만, 이를 다시 회수하여 재사용하기에는 어려운 점이 많으므로 이를 해결하기 위하여 다각적인 연구가 필요하다.

본 연구의 목적은 우유와 크림을 시료로 하여 GC방법과 효소방법으로 cholesterol의 정량분석을 비교하므로서 정확한 분석방법을 규명하고, β -CD를 이용하여 우유와 크림에 내재하는 cholesterol을 제거하기 위한 최적조건을 확립하고, cholesterol이 흡착된 β -CD로부터 cholesterol을 분리하기 위하여 적당한 용매를 선정하여 β -CD 회수의 최적조건을 확립하며, 이러한 실험실에서의 연구 결과를 이용하여 산업화할 수 있도록 우유 및 유제품의 소생산 및 대량생산을 통하여 공정을 확립하고 제품을 개발하는 데 있다.

제 2 장 연구 방법

제 1 절 콜레스테롤 정량 분석 방법의 비교

1. 재료 및 시약

원유를 수거한 후 균질기 (HC 5000, Microfluidics Co., Newton, MA, USA)를 사용하여 이 시료를 175 kg/cm^2 로 균질하였다. 크림 분리기 (ELECREM, Elecrem Co, Vanves, France)를 이용하여 유지방의 함량이 평균 2.6, 3.6, 4.6%가 되도록 표준화 하였으며, 또한 유지방 함량이 36%인 크림은 삼익유가공에서 받아 사용하였다. 콜레스테롤과 내부표준물질인 5- α 콜레스테인은 Sigma Co. (순도 99%), St. Louis, Mo, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 효소 방법에 사용한 kit는 독일 Boehringer-Mannheim Biochemical 회사에서 구입하였으며 이 실험에 사용한 유기 용매들 (chloroform, hexane, isopropanol)은 GC용으로 사용하였다.

2. 유지방 측정

실험에 사용한 원유의 유지방 함량을 측정하고 표준화하기 위하여 거버 (Gerber) 방법을 사용하여 유지방을 측정하였다⁽²¹⁾. 즉, 92% 황산 10 ml를 butyrometer에 넣고 우유 1 ml와 이소아밀알콜 1 ml를 첨가하여, 고무마개로 막은 후 입자들이 용해될 때까지 위아래로 잘 섞어주고 1,100 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 60℃의 항온 수조에서 5분간 정치시킨 후, 분리된 지방량을 디바이더(divider)로 측정하였으며, 모든 실험은 3번 반복하였

다.

3. 검량선 (standard curve)의 작성

가. GC 방법

콜레스테롤 정량을 위해 chloroform 용액에 콜레스테롤과 콜레스테인을 녹여 1.0 mg/ml의 농도가 되도록 표준 용액을 만든 후, 두 용액을 각각 1ml씩 취하여 test tube에 넣은 혼합 용액의 0.5, 1.0, 1.5 μ l를 GC (Hewlett-Packard 5890 II, Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA, USA)에 주입하여 검량선을 작성하였다.

나. 효소 방법

Isopropanol 용액에 1.0 mg/ml 의 콜레스테롤 용액을 이용하여 표준용액 즉, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 ml 를 만들어 효소 정량 kit를 사용하여 검량선을 작성하였다.

4. 콜레스테롤의 추출

가. GC 방법

우유 1g (유지방 함량 2.6, 3.6, 4.6%)와 0.22g의 크림 (36%)을 뚜껑이 있는 test tube에 넣고 1 ml의 내부표준물질 (콜레스테인 1 mg/ml)과 5 ml의 2M ethanolic KOH 용액을 첨가, 혼합하였다⁽⁴⁾. 60℃의 항온수조에서

30분간 검화한 후, 실온에서 냉각되도록 정치시켰다. 5 ml의 hexane을 첨가하여 콜레스테롤을 추출하였고 같은 방법으로 이를 4회 반복 추출하였다. 추출액을 등근 플라스크에 넣고 40℃에서 감압 농축기로 (EYELA, Tokyo Rikakikai Co. LTD., Tokyo, Japan) 농축시킨 후, 1 ml의 hexane에 녹여 시료로 사용하였다.

나. 효소 방법

우유 10 ml를 등근 플라스크에 넣고 2M methanolic KOH 용액 50 ml를 첨가한 후, 냉각기를 부착하여 60℃에서 30분간 검화하였다. 검화액을 분핵여두로 옮긴 후, 100 ml 증류수와 100 ml ether/petroleum ether (1 : 1)를 첨가하고 혼합이 잘 되도록 섞은 후 정치시켰다. 분핵 여두의 상등액을 분리하고 40 ml ether/petroleum ether를 첨가하여 반복 추출하였다. 위와 같은 방법으로 농축시킨 후, 50 ml volumetric 플라스크에서 isopropanol로 정용하였으며, 이 용액을 본 실험의 시료로 사용하였다.

5. 콜레스테롤 정량 분석

가. GC 방법

위에서 분리한 추출액 1 μ l를 다음의 조건에서 GC에 주입하여 정량 분석하였다. 분석에 사용된 gas chromatography (GC)는 Hewlett-Packard Model 5890 Series II (Palo Alto, CA, USA) 로서 FID detector가 장착되어 있으며, 컬럼은 cross-linked 5% phenyl methyl silicon fused silica capillary column (HP-5, 30 m length x 0.32 mm I.D. x 0.25 μ m

thickness)를 사용하였다. Carrier gas로는 N_2 를 2 ml/min으로 사용하였고, air는 300 ml/min, H_2 는 30 ml/min, 그리고 auxiliary gas로는 N_2 를 28 ml/min 주입하였다. 시료의 split ratio는 1 : 50으로 조절하였으며, 모든 기체의 유량은 컬럼온도 35℃에서 측정하였다. 주입구의 온도는 270℃, 검출기의 온도는 300℃로 설정하였다. 컬럼은 최초 200℃에서 1분간 머무른 후, 분당 10℃씩 상승시켜 300℃로 올린 후 20분간 유지하였다. 콜레스테롤과 콜레스테인은 머무름 시간에 따라서 구분되며, 각각의 피크 면적에 의해 정량 분석하였다.

나. 효소 방법

Kit에는 3가지 종류의 용액이 들어 있으며, 용액 1은 pH 7.0 ammonium phosphate buffer, 2.6 mol/L methanol 그리고 220,000U catalase로 구성되어 있고, 용액 2는 0.05 mol/L acetylacetone 과 0.3 mol/L methanol의 혼합액, 그리고 용액 3은 12U cholesterol oxidase 현탁액으로 되어 있다. 용액 1과 2를 3 : 2의 비율로 혼합한 것을 reagent 용액이라 하였다.

5 ml 의 위의 reagent 용액과 0.4 ml 우유을 취하여 screw cap tube에 넣고 잘 혼합하였으며, 여기에서 2.5 ml를 취하여 다른 tube에 옮겨 이를 시료로 사용하였다. Blank에는 0.02 ml의 물을, 시료에는 0.02 ml의 cholesterol oxidase (용액 3)을 첨가한 후 잘 혼합한 후, 40℃ 항온 수조에서 60분간 정치시켜 30분간 실온에 방치하였다. Beckman DU 650 Spectrophotometer (Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, USA)를 사용하여 405 nm에서 blank에 대한 시료의 흡광도 차이를 측정하고 계산하여 우유의 콜레스테롤 함량을 측정하였다.

6. Recovery 실험

Recovery 실험은 두 분석 방법의 정확도와 신뢰도를 검증하기 위하여 수행하였다. GC 방법의 recovery 실험을 위해서는 3.6% 우유에 0.1, 0.2, 0.3 mg의 콜레스테롤을 첨가하여 각 우유의 콜레스테롤 함량을 측정하였고, 효소 방법의 경우에는 1.0 mg을 첨가하였다. GC 방법에서는 8회, 그리고 효소 방법에서는 4회 반복하였다.

7. 통계처리

분산 분석과 최소유의차 검정법을 사용하여 두가지 다른 콜레스테롤 정량 방법의 차이를 비교하였다⁽²³⁾. 모든 결과는 평균 \pm SD 로 표기하였고, 유의차는 $p < 0.05$ 수준에서 결정하였다.

제 2 절 β -cyclodextrin을 이용한 균질 우유의 콜레스테롤 제거

1. 재료 및 시약

유지방이 3.6%인 균질 우유를 시료로 사용하였으며, β -cyclodextrin (순도 99.1%)은 Nihon Shokuhin Cako Co. LTD., Osaka, Japan)에서, 콜레스테롤과 내부표준물질로 사용된 5 α -콜레스테인은 GC Grade로 미국 Sigma사에서 구입하였다.

2. 콜레스테롤의 제거 실험

5가지 factor 각각의 효과를 보기 위한 첫단계로 실시한 실험은 다음과 같다. β -cyclodextrin의 첨가량에 따른 콜레스테롤의 제거율을 측정하기 위하여 4가지 조건은 (교반 온도, 교반 시간, 원심분리 속도, 원심분리 시간) 일정하게 한 상태에서 실험을 하였다. 이와 같은 방법으로 4가지 조건 각각의 효과를 보고자 실험을 수행하였다.

위의 실험 결과를 토대로 β -cyclodextrin을 이용한 우유의 콜레스테롤 제거의 최적 조건들을 조사하기 위하여 반응표면 분석법을 적용하였다. 5가지의 factor에 각각 5 level을 설정하였으며 그 조합은 Table 1에 나타나 있다. 5개의 독립변수 각각을 x_1 (β -cyclodextrin 함량), x_2 (교반 온도), x_3 (교반 시간), x_4 (원심분리 속도), x_5 (원심분리 시간)로 하고

Table 1. Variables and levels for a rotatable central composite design used in process optimization for cholesterol removal in milk treated with β -cyclodextrin

Variable	Symbol	Coded-variable level				
		-1.5	-1	0	+1	+1.5
β -CD con. (%)	x_1	0.25	0.5	1	1.5	2.0
Mixing temp. (°C)	x_2	2.5	5	10	15	17.5
Mixing time (min)	x_3	2.5	5	10	15	17.5
Cent. force (x g)	x_4	55.5	111	166	222	250
Cent. time (min)	x_5	2.5	5	10	15	17.5

각각의 변수마다 level을 -1.5 (최하), -1, 0, +1, +1.5 (최고)로 설정하였다. 첫번 실험의 결과에서 가장 적합한 수치를 0으로 하였으며, 나타난

모든 조건들을 rotatable central design으로 조합하면 43번의 각각 다른 실험 조건이 설정된다. (Table 2).

각각의 조건에 맞추어 콜레스테롤의 제거 실험을 하기 위해 50g의 우유를 200 ml 비이커에 취하였다. 각각 다른 β -cyclodextrin 함량, 교반 온도, 교반 시간, 원심분리 속도, 원심분리 시간을 달리하여 항온 수조에서 800 rpm의 속도로 blender (Tops, Misung Co., Seoul, Korea)로 처리하였다. 그 다음 과정으로 시료를 500 ml 원심분리 용기에 담고 원심 분리 속도와 시간을 달리하면서 5℃에서 분리할 때 콜레스테롤- β -cyclodextrin 복합체가 아래로 침전되도록 하였다. 콜레스테롤이 제거된 시료 1g을 취하여 제 2장, 제 1절에서 서술한 바와 같은 방법으로 콜레스테롤 정량 분석을 하였다.

3. 통계처리 및 반응표면 분석법

독립변수와 종속변수들간의 관계는 SAS⁽²³⁾의 다중회귀분석법을 이용하여 아래의 수식에 맞는 2차함수 그래프가 되도록 하였다.

$$Y = B_0 + \sum B_i X_i + \sum B_{ii} X_i^2 + \sum B_{ij} X_i X_j$$
 (B_0, B_i, B_{ii}, B_{ij} 는 상수, X_i, X_j 는 종속 변수이다). 각각의 변수의 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 결정하여 콜레스테롤 제거에 주요한 효과를 보이는 변수들만을 이용하여 반응 표면 분석법으로 결과를 도출하였다.

Table 2. Fraction factorial block design used for removal (%) of cholesterol from milk treated with β -cyclodextrin

Treatment	Coded-variable level					Cholesterol removal (%)
	X1	X2	X3	X4	X5	
1	0	0	0	0	0	96.6
2	-1.5	0	0	0	0	64.6
3	0	-1.5	0	0	0	90.4
4	0	0	-1.5	0	0	92.6
5	0	0	0	-1.5	0	96.3
6	0	0	0	0	-1.5	96.3
7	+1.5	0	0	0	0	96.2
8	0	+1.5	0	0	0	93.9
9	0	0	+1.5	0	0	94.3
10	0	0	0	+1.5	0	90.8
11	0	0	0	0	+1.5	92.1
12	+1	+1	-1	-1	-1	96.2
13	+1	+1	+1	-1	-1	87.8
14	+1	+1	+1	+1	-1	96.1
15	+1	+1	+1	+1	+1	96.9
16	+1	+1	-1	+1	-1	95.2
17	+1	+1	-1	-1	+1	95.2
18	+1	+1	+1	-1	+1	96.4
19	+1	+1	-1	+1	+1	96.7
20	+1	-1	-1	-1	-1	93.6
21	+1	-1	+1	-1	-1	95.8
22	+1	-1	+1	+1	-1	95.6
23	+1	-1	+1	+1	+1	95.8
24	+1	-1	-1	+1	-1	93.8
25	+1	-1	-1	-1	+1	96.0
26	+1	-1	+1	-1	+1	94.7
27	+1	-1	-1	+1	+1	95.1
28	-1	+1	-1	-1	-1	93.5
29	-1	+1	+1	-1	-1	93.1
30	-1	+1	+1	+1	+1	92.5
31	-1	+1	+1	+1	+1	91.9
32	-1	+1	-1	+1	-1	91.3
33	-1	+1	-1	-1	+1	92.4
34	-1	+1	+1	-1	+1	88.2
35	-1	+1	-1	+1	+1	91.1
36	-1	-1	-1	-1	-1	90.4
37	-1	-1	+1	-1	-1	90.5
38	-1	-1	+1	+1	-1	93.5
39	-1	-1	+1	+1	+1	90.8
40	-1	-1	-1	+1	-1	84.9
41	-1	-1	-1	-1	+1	85.8
42	-1	-1	+1	-1	+1	87.8
43	-1	-1	-1	+1	+1	86.9

제 3 절 β -cyclodextrin을 이용한 크림의 콜레스테롤 제거

1. 재료 및 시약

유지방 함량이 36%인 크림을 삼익유가공으로부터 제공받아 시료로 사용하였다. 사용된 시약은 제 2장, 제 2절의 실험에서와 같다.

2. 콜레스테롤 제거 실험

β -cyclodextrin을 이용한 크림의 콜레스테롤 제거의 최적화를 위한 여러 조건들을 조사하기 위하여 반응표면분석법을 사용하였다. 5가지의 factor에 각각 5 level을 설정하였으며 그 조합은 Table 3에 나타나있다. 5개의 독립변수 각각을 x_1 (β -cyclodextrin 함량), x_2 (교반 온도), x_3 (교반 시간), x_4 (교반 속도), x_5 (원심 분리 속도)로 하고 각각의 변수마다 level을 -1.632 (최하), -1, 0, +1, +1.632 (최고)로 설정하였다. 모든 조건들을 rotatable central design으로 조합하여 43의 각각 다른 실험 조건이 설정되도록 하였다. (Table 4).

각각의 조건에 맞추어 콜레스테롤의 제거 실험을 하기 위하여 20g의 크림을 100 ml 비이커에 넣어, 각각 다른 β -cyclodextrin 함량, 교반 온도, 교반 시간, 교반 속도, 원심분리속도를 각각 달리하여 β -cyclodextrin을 첨가한 후, 항온 수조의 온도를 맞추어 blender로 교반 시간과 속도에

Table 3. Variables and levels for a rotatable central composite design used in process optimization for cholesterol reduction from cream treated with β -cyclodextrin

Variable	Symbol	Coded-variable levels				
		-1.632	-1	0	+1	+1.632
β -CD concentration (%)	x1	1.6	5	10	15	18.4
Stirring temperature (C)	x2	23	30	40	50	57
Stirring time (min)	x3	4	10	20	30	36
Stirring speed (rpm)	x4	530	800	1200	1600	1870
Centrifugal speed (x g)	x5	144	222	333	444	477

맞게 교반하였다. 그 후 시료를 원심분리 용기에 담고 원심 분리 속도를 각각 달리하여 5℃에서 10분간 원심분리하여 콜레스테롤- β -cyclodextrin 복합체를 침전시켰다. 콜레스테롤이 제거된 상등액 (유지방, 250 mg)을 취하여 콜레스테롤 정량분석을 제 2장, 제 1절에서 서술한 바와 같이 하였다.

Table 4. Fraction factorial block design used for reduction (%) of cholesterol from cream treated with β -cyclodextrin

Cholesterol Treatment	Coded-variable level					reduction (%)
	x1	x2	x3	x4	x5	
1	0	0	0	0	0	95.8
2	-1.632	0	0	0	0	43.1
3	0	-1.632	0	0	0	88.1
4	0	0	-1.632	0	0	92.9
5	0	0	0	-1.632	0	87.0
6	0	0	0	0	-1.632	94.4
7	+1.632	0	0	0	0	97.4
8	0	+1.632	0	0	0	94.4
9	0	0	+1.632	0	0	93.5
10	0	0	0	+1.632	0	91.6
11	0	0	0	0	+1.632	93.6
12	+1	+1	-1	-1	-1	94.2
13	+1	+1	+1	-1	-1	92.7
14	+1	+1	+1	+1	-1	96.7
15	+1	+1	+1	+1	+1	95.8
16	+1	+1	-1	+1	-1	94.2
17	+1	+1	-1	-1	+1	93.6
18	+1	+1	+1	-1	+1	95.0
19	+1	+1	-1	+1	+1	95.9
20	+1	-1	-1	-1	-1	79.0
21	+1	-1	+1	-1	-1	81.7
22	+1	-1	+1	+1	-1	85.5
23	+1	-1	+1	+1	+1	83.8
24	+1	-1	-1	+1	-1	72.1
25	+1	-1	-1	-1	+1	87.4
26	+1	-1	+1	-1	+1	84.9
27	+1	-1	-1	+1	+1	71.1
28	-1	+1	-1	-1	-1	95.4
29	-1	+1	+1	-1	-1	96.9
30	-1	+1	+1	+1	-1	95.8
31	-1	+1	+1	+1	+1	94.2
32	-1	+1	-1	+1	-1	94.5
33	-1	+1	-1	-1	+1	94.5
34	-1	+1	+1	-1	+1	93.1
35	-1	+1	-1	+1	+1	93.9
36	-1	-1	-1	-1	-1	76.0
37	-1	-1	+1	-1	-1	85.7
38	-1	-1	+1	+1	-1	87.3
39	-1	-1	+1	+1	+1	86.3
40	-1	-1	-1	+1	-1	78.6
41	-1	-1	-1	-1	+1	83.9
42	-1	-1	+1	-1	+1	86.5
43	-1	-1	-1	+1	+1	80.8

3. 통계처리 및 반응표면 분석법

제 2장, 제 2절에서와 동일함.

제 4 절 크림의 콜레스테롤 제거에 이용한 β -cyclodextrin 재활용의 최적화 조건

1. 재료 및 시약

유지방 함량이 36%인 크림을 삼익유가공으로부터 제공받아 시료로 사용하였다. 시약은 앞의 실험과 동일하며, 사용한 용매인 hexane, methanol, acetic acid, butanol, ethanol, isopropanol, chloroform 등은 순도가 특급인 것을 사용하였다.

2. β -cyclodextrin-콜레스테롤 복합체 수거

크림에 10%의 β -cyclodextrin을 첨가하여 50℃에서 30분간 교반하였다 (교반 방법은 제 2장, 제 3절과 동일). 복합체를 분리하기 위해 시료를 10분 동안 999 x g에서 원심 분리하였다. 상층부는 콜레스테롤 정량을 위하여 용기에 옮겨놓고, 아래에 침전된 복합체는 재활용 실험을 위해 수거하여 600 ml 동결건조 flask에 넣고 6시간 건조하여 냉장 보관한 후 시료로 사용하였다.

3. 용매 선정을 위한 예비 실험

가. 콜레스테롤의 용매에 대한 용해도 비교 측정

콜레스테롤 0.2g을 7가지의 다른 용매 즉, butanol, chloroform, hexane, isopropanol, acetic acid, ethanol, methanol 10ml에 넣고 ultrasonic cleaner (Branson Co., Danbury, CT, USA)에서 일정한 시간동안 용해하였다. 용매중 butanol에 대한 용해도를 1.00로 기준으로 정하여 다른 용매의 용해도를 비교 측정하였다.

나. 복합체의 다른 비율의 혼합 용매에 대한 용해도 비교 측정

β -cyclodextrin-콜레스테롤 복합체에서 콜레스테롤을 분리하여 β -cyclodextrin을 재활용하기 위한 실험으로, 우선 적합한 용매를 찾아내는 것이다. 그래서 복합체 1g을 6 ml의 여러 종류의 용매에 넣고 위와 같은 방법으로 용해도를 측정하여 적합한 용매를 선정하고자 하였다. 다른 용매와 비교하기 위하여 butanol : acetic acid = 1 : 3인 용매에 대한 용해도를 1.00으로 설정하였다.

4. 복합체로부터의 콜레스테롤 분리

5가지 factor 각각의 효과를 보기 위한 첫단계로 실시한 실험은 다음과 같다. 용매에 따른 콜레스테롤의 분리율을 측정하기 위하여 다른 4가지 조건(용매와 복합체의 비율, 교반 속도, 교반 온도, 교반 시간)은 일정하게 한 상태에서 실험을 하였다. 건조한 복합체를 용매와 일정한 비율로 10분

동안 ultrasonic cleaner에서 혼합한 후, shaking bath에서 교반하였다. 이와 같은 방법으로 각각의 4가지 조건의 영향을 관찰하고자 각각 실험을 수행하였다.

5. 반응 표면 분석법을 이용한 최적 조건 확립

위의 실험 결과를 토대로 β -cyclodextrin-콜레스테롤 복합체로부터 콜레스테롤을 분리하는 데 영향을 미치는 3가지의 최적 조건들을 조사하기 위하여 반응표면 분석법을 적용하였다. 3가지 factor에 각각 3 level을 설정하였으며 (Table 5), 그 조합은 Table 6에 나타나 있다. 3개의 독립변수를 각각을 x_1 (교반 온도), x_2 (교반 속도), x_3 (교반 시간)로 하고 각각의 변수마다 level을 -1, 0, +1로 설정하였다. 첫번 실험의 결과에서 가장 적합하다고 인정되는 수치를 0으로 하였다. 나타난 모든 조건들을 rotatable central design으로 조합하여 27번의 각각 다른 실험 조건이 설정하였다 (Table 6).

Table 5. Variables and levels for a rotatable central composite design used in process optimization for cholesterol removal from β -cyclodextrin-cholesterol complex

Variable	Symbol	Coded-variable levels		
		-1	0	+1
Stirring temperature (C)	x_1	40	50	60
Stirring speed (rpm)	x_2	50	100	150
Stirring time (hr)	x_3	1	2	3

Table 6. Fraction factorial block of experimental design for dissociation percentage of cholesterol β -cyclodextrin complex in cream

Treatment No.	Coded Var.			Dissociation percentage of cholesterol(%) ¹		
	X ₁	X ₂	X ₃	1 st	2 nd	Sum
1	0	0	0	59.85	26.10	80.95
2	0	0	-1	61.19	24.70	85.89
3	0	0	+1	60.60	20.56	81.16
4	0	-1	0	57.24	26.14	83.38
5	0	-1	-1	61.55	21.40	82.95
6	0	-1	+1	61.65	22.45	84.10
7	0	+1	0	63.95	22.73	86.67
8	0	+1	-1	68.21	22.04	90.25
9	0	+1	+1	65.72	23.11	88.82
10	-1	0	0	40.57	20.11	60.68
11	-1	0	-1	50.14	19.99	70.13
12	-1	0	+1	49.56	18.74	68.30
13	-1	-1	0	42.81	20.33	63.14
14	-1	-1	-1	40.01	25.46	65.47
15	-1	-1	+1	45.53	18.54	64.07
16	-1	+1	0	50.03	21.04	71.07
17	-1	+1	-1	45.88	25.86	71.74
18	-1	+1	+1	43.75	24.54	68.29
19	+1	0	0	67.59	18.50	86.09
20	+1	0	-1	68.36	17.95	86.31
21	+1	0	+1	70.12	20.46	90.58
22	+1	-1	0	66.66	19.49	86.15
23	+1	-1	-1	75.49	20.60	96.09
24	+1	-1	+1	70.15	20.36	90.51
25	+1	+1	0	66.84	20.12	86.96
26	+1	+1	-1	73.61	20.80	94.61
27	+1	+1	+1	66.80	19.09	85.89

¹Means of triplicated cholesterol extraction.

X₁ : Mixing temp.(°C)

X₂ : Mixing speed(rpm)

X₃ : Mixing time(hour)

6. 재활용된 β -cyclodextrin의 효율성 검토

재활용된 β -cyclodextrin만으로 크림의 콜레스테롤을 제거한 경우를 control로 하였고, 재활용 β -cyclodextrin에 사용하지 않은 β -cyclodextrin을 여러 비율로 혼합하여 크림의 콜레스테롤 제거율을 비교 분석하였다. 콜레스테롤 정량 분석은 제 2장, 제 2절에서 서술한 바와 같다.

제 5 절 콜레스테롤이 제거된 유제품의 개발

1. 재료 및 시약

제2장 제1절과 제2절에서와 동일함.

2. 표준제조공정

삼익유가공에서 크림, 롯데제과에서 아이스크림, 매일유업에서 힙핑 크림에 대한 pilot scale과 대량생산을 하면서 각 제품의 표준제조공정을 결정하였으며 시제품을 생산하였다.

3. 관능검사

선정된 관능검사요원을 훈련시켜 5점척도법으로 물성 및 관능검사를 실시하였다. 객관적 조직검사를 위하여 Rheometer(Fudo Co, Model

NRM-2002 J Type, Japan)을 사용하여 경도, 응집성, 탄력성 등을 측정하였다.

4. 통계분석

통계분석은 완전 임의배치법에 의해 Duncan's multiple range test로 분석하였다.

제 3 장 연구 결과

제 1 절 콜레스테롤 정량 분석 방법의 비교

1. 우유 및 크림의 콜레스테롤 정량 분석 방법의 비교

두가지 다른 방법에 의해 측정된 유지방 함량이 다른 우유 및 크림의 콜레스테롤 함량은 Table 7에서 비교하였다. 유지방 함량에 관계없이 GC 방법에 의해 측정된 콜레스테롤 함량이 효소 방법의 결과보다 유의적으로

Table 7. Cholesterol content of milk and cream as measured by GC and enzymatic methods¹

Sample	GC	Enzymatic	Difference ²	
Milk fat	(mg/100g)		(%)	
Milk	2.6%	9.52 ± 0.22 ^a	8.62 ± 0.22 ^b	9.45
	3.6%	13.14 ± 0.22 ^a	12.28 ± 0.22 ^b	6.54
	4.6%	16.83 ± 0.30 ^a	15.78 ± 0.11 ^b	6.24
Cream	36%	123.40 ± 1.93 ^a	110.77 ± 7.89 ^b	10.23

¹Means of 6 replicates. Means not followed by the same letter in the same row differ significantly(p<0.05).

²Calculated as GC-enzymatic×100/GC.

높게 나타났다 (p < 0.05). 유지방 2.6% 우유의 경우, GC 방법으로는 9.85 ± 0.22 mg/100 g 인 반면에, 효소 방법으로는 8.62 ± 0.17 mg/100 g으로 측정되었다. 또한 3.6% 우유의 경우에는 13.14 ± 0.22 mg/100 g (GC)와 12.18 ± 0.22 mg/100 g (효소)으로 비슷한 경향을 보였으며,

4.6% 우유의 경우에도 마찬가지로의 결과가 나타났다. 유지방 36%를 함유한 크림의 경우에도 GC 방법을 사용한 실험에서는 123.40 ± 1.23 mg/100 g의 콜레스테롤이 함유된 것으로 나타났고, 효소 방법을 사용한 실험에서 이보다 적은 110.77 ± 7.89 mg/100 g의 콜레스테롤 함량이 측정되었다. 이 수치는 Sweeney 등⁽²⁴⁾이 정리한 유제품들의 콜레스테롤 함량과 거의 일치하는 것이었다. 다른 실험들에 의한 우유의 콜레스테롤 함량은 10.0에서 17.6 mg/100 g으로 매우 넓은 범위에 걸쳐있으며 이는 우유의 유지방 함량, 콜레스테롤 추출과 정량에 사용한 방법이 각각 달라서 나타난 결과로 추정된다. 크림의 경우, 여러 실험의 결과들이 다른 이유는 일반적으로 판매하는 크림은 비균질 상태여서 샘플로 사용할 때 어려움이 있었을 것으로 추정된다.

또한 위의 결과는 예상했던 바와 같이 유제품의 유지방 함량의 증가와 더불어 콜레스테롤 함량도 비례적으로 증가함을 나타내었다 (Table 7). GC 방법으로는 물론이고, 효소 방법으로도 각각 다른 유지방 함량의 우유간의 콜레스테롤 함량이 유의적으로 다른 측정이 가능하였다. 그러나 그 수치는 GC 방법의 콜레스테롤 수치에 비해 현저히 낮게 측정되었다.

효소 방법은 사용이 편리하여 혈청 콜레스테롤 등을 측정하는 임상 실험에 주로 이용된다. 이 방법은 두가지 화학 반응을 이용하는데, 하나는 콜레스테롤 산화 효소에 의해, methanol을 formaldehyde로 전환시키는 것이며, 다른 하나는 생성된 formaldehyde와 acetylacetone과의 반응으로 405 nm에서 흡광도 측정이 가능한 lutidine을 생성하는 것이다⁽²⁵⁾. 이 방법에 의한 콜레스테롤 함량 측정은 수치도 GC 방법에 비해 낮게 나타났을 뿐 아니라 과정이 복잡하며, 오랜 시간을 필요로하고, 또한 많은 양의 유기 용매의 손실이 동반된다. 그러나 본 실험의 결과와 다른 실험들도 보고되었다. Karkalas 등⁽²⁵⁾에 따르면 GC와 효소 방법을 사용하여 육류와 치즈의

콜레스테롤 수치를 비교한 실험의 결과, 두 방법간의 차이를 볼 수 없었다고 한다. 또한 Shen 등⁽²⁶⁾은 난황의 콜레스테롤 수치가 유사하게 나타났음을 보고하였는데, 본 실험의 결과와의 차이를 설명할 수는 없지만, 아마도 각 식품에 따라 차이가 있는 것으로 보여진다.

최근에는 일반적으로 GC 방법이 정확하다고 알려져 있으며, 이 방법의 탁월한 선택성과 특이성때문에 적은 양의 시료만이 필요하다는 것도 하나의 장점이다. 또한 효소 방법에 비해 콜레스테롤 추출과정에 쓰이는 용매의 양이 1/10정도밖에 되지 않아 환경적으로도 바람직하다 하겠다. Jiang 등⁽²⁷⁾에 따르면 GC 방법이 다수의 난류 시료의 콜레스테롤 측정에서 효소 방법보다 먼저 선택되어야 한다고 하였다. 결과적으로 유지방의 함량이 각기 다른 우유와 크림의 콜레스테롤 함량에 대한 정보를 얻을 수 있어 매우 유익한 실험이었다고 사료된다.

2. Recovery 실험

GC 방법의 신뢰도와 정확도를 측정하기 위하여 0.1, 0.2, 0.3 mg의 콜레스테롤을 유지방 3.6% 우유에 첨가한 후 콜레스테롤 추출부터 정량 분석까지를 수행하였으며, 효소 방법에서는 1.0 mg의 콜레스테롤을 첨가하였다. GC 방법을 이용한 실험의 recovery는 100.07 ~ 101.9%로 나타나 실험의 신뢰도와 정확도가 높음을 알 수 있었다. 반면에 효소 방법은 recovery가 90.4%에 머물렀다. 또한 효소 방법에서 0.1 ~ 0.3 mg정도의 콜레스테롤 첨가는 양이 매우 적어 측정이 불가능하였다. 본 실험의 결과에 따라, 유제품의 콜레스테롤 함량의 정량 분석에는 효소 방법보다는 신뢰도나 정확도에서 우수한 GC 방법이 채택되는 것이 바람직하다고 사료된다.

Table 8. Recovery studies of cholesterol in milk as measured by GC and enzymatic methods

Cholesterol added (mg)	GC ¹ (%)	Enzymatic ²
0.1	100.89 ± 2.07	-
0.2	100.07 ± 1.46	-
0.3	101.90 ± 1.16	-
1.0	-	90.4 ± 1.34

¹Means of 8 replicates.

²Means of 4 replicates.

제 2 절 β-cyclodextrin을 이용한 균질 우유의 콜레스테롤 제거

1. β-cyclodextrin 첨가의 효과

β-cyclodextrin의 첨가량에 따른 콜레스테롤 제거율의 차이를 측정하기 위해 β-cyclodextrin 함량을 0.5, 1.0, 1.5, 2.0%로 달리하였으며, 다른 4가지 조건들은 다음과 같이 일정하였다: 교반 온도 10℃, 교반 시간 10분, 교반 속도 800 rpm, 원심분리 속도 111 x g, 원심분리 시간 10분이었다. Table 9에 나타난 바와 같이, 우유의 β-cyclodextrin 첨가량에 따른 콜레스테롤 제거율은 92.2 ~ 95.3%로 0.5, 1.0과 1.5%의 첨가에서 유의적 차이를 보이지 않았다 ($p > 0.05$). 반면에 2.0%를 첨가한 경우에는 1.0% 첨가시보다 약 6%정도 감소한 88.6%의 콜레스테롤 제거율이 나타났다. 본 결과에서 첨가량에 따른 콜레스테롤 제거율간에 차이가 나타나지 않은 이유는, 우유의 경우 콜레스테롤의 수치가 약 13 mg/100ml로 미미하여 제거

Table 9. Effect of β -cyclodextrin concentrations on cholesterol removal from milk^{1,2}

Concentration of β -cyclodextrin (%)	Cholesterol removal (%)
0.5	92.2 ^{ab}
1.0	94.0 ^a
1.5	95.3 ^a
2.0	88.6 ^b

¹Means of duplicate. Means in a column with the different letter are significant ($p < 0.05$)

²Other experimental factors include mixing speed, 800 rpm; mixing temp, 10C; mixing time, 10 min; centrifugal speed, 111 x g; centrifugation time, 10 min.

실험시에 0.5%의 첨가량만으로도 충분히 내재한 콜레스테롤이 제거되었기 때문으로 사료된다. 0.5%보다 더 적은 양의 β -cyclodextrin을 첨가한 결과가 있었다면 좋은 비교가 되었을 것으로 여겨진다. 반응 표면 분석법을 이용한 실험에서 첨가량이 0.25%인 경우가 있으므로 이에 대한 효과는 충분히 반영되었으리라 사료된다. 그 결과에 따르면 0.25% 첨가시 64.6% 정도의 낮은 제거율을 보이는 것으로 나타났다.

β -cyclodextrin의 콜레스테롤 제거 효과는 유제품을 이용한 다른 보고들에서도 볼 수 있다. 본 실험실에서 수행된 유지방 함량 36% 크림의 경우에도 95% 이상의 콜레스테롤 제거율이 나타났는데, 이 경우의 β -cyclodextrin 첨가량은 15% 이상으로 우유에 비해 현저히 많은 양이 필요함을 알 수 있었다⁽²⁸⁾. Oakenfull과 Sidhu는⁽²⁹⁾ 우유에서 1% β -cyclodextrin 첨가로 77.1%의 콜레스테롤 제거되었다고 보고하였다. 이상에서 나타난 결과로 β -cyclodextrin의 콜레스테롤 제거 효과가 탁월한 것으로 사료되나, 사용하는 시료와 제거시의 다른 조건등에 따라 첨가해야할

적당한 β -cyclodextrin의 함량은 다를 것으로 보인다.

2. 교반 온도의 영향

교반 온도에 따른 콜레스테롤 제거율의 차이를 보기 위하여 4, 10, 15, 20, 25℃의 온도를 달리하여 실험을 수행하였다. 설정된 다른 조건들은 다음과 같다: β -cyclodextrin 첨가량 1%, 교반 속도 800 rpm, 교반 시간 10분, 원심분리 속도 111 x g, 원심분리 시간 10분이었다. 교반 온도에

Table 10. Effect of various mixing temperatures on cholesterol removal from milk^{1,2}

Mixing temperature (℃)	Cholesterol removal (%)
4	93.7 ^a
10	94.6 ^{ab}
15	93.0 ^a
20	93.5 ^a
25	95.2 ^b

¹Means of duplicate. Means in a column with the different letter are significant. ($p < 0.05$)

²Other experimental factors include β -cyclodextrin added, 1%; mixing speed, 800 rpm; mixing time, 10 min; centrifugal speed, 111 x g; centrifugation time, 10 min.

따른 제거율의 변화는 4, 10, 15, 20, 25℃에서 유의적 차이가 없었으며 ($p < 0.05$) (Table 10), 콜레스테롤 제거율의 범위는 93.0 ~ 95.2% 정도로 높게 나타났다. 따라서 교반 온도가 콜레스테롤 제거에 미치는 영향은 그렇게 크지 않은 것으로 사료된다. 또한 주목할 만한 것은, 우유의 품질 저하를 억제하기 위해서 4℃에서 β -cyclodextrin 처리를 하여도 콜레스테

를 제거율에는 변화가 없었으므로 우유의 콜레스테롤 제거에 매우 효과적인 방법이 될 것으로 기대된다.

다른 실험의 결과를 보면, 교반 온도가 증가함에 따라 우유의 콜레스테롤 제거율이 떨어진다는 보고도 있었으며⁽²⁹⁾, 이와는 반대로 lard의 경우에는 27 와 40℃에서보다 50℃에서 교반한 경우의 제거율이 유의적으로 증가했다고 보고하였다⁽¹⁰⁾. 본 실험실에 수행된 크림의 경우에는 교반 온도가 미치는 영향이 크지 않은 것으로 나타났다⁽²⁸⁾.

3. 교반 시간의 영향

교반 시간에 따른 콜레스테롤 제거율의 차이를 관찰하기 위하여 5, 10, 15, 20, 25분으로 시간을 달리하여 실험을 수행하였다. 이 실험을 위해 설정된 다른 조건들은 다음과 같다: β -cyclodextrin 첨가량은 1%, 교반 속도는 800 rpm, 교반 온도는 10℃, 원심분리 속도는 111 x g, 원심분리 시간은 10분이었다. Table 11에 나타난 결과를 보면, 5, 10, 15, 20분간 교반한 경우에는 콜레스테롤 제거율에 유의적 차이를 보이지 않았으며 ($p > 0.05$), 제거율은 92.1 ~ 93.9%로 나타났다. 25분간 교반한 경우에는 90.3%로 제거율이 다소 감소하는 경향이 나타났는데, 이는 오랜 시간의 교반으로 생성된 β -cyclodextrin-콜레스테롤 복합체가 다시 떨어져서 나타나는 결과라고 사료된다. 위의 결과로 볼 때, 위에서 사용한 조건하에서 장기간의 교반만 피한다면 교반 시간이 우유의 콜레스테롤 제거에 미치는 영향은 적으므로 고려하지 않아도 될 것으로 보여진다. 그러나 이보다 적은 β -cyclodextrin 함량이 첨가되거나 교반 속도가 낮은 조건 등과 같이 다른 조건들의 변화에 따라서 제거율의 차이가 발생할 수 있음을 염두에 두어야 한다고 생각된다.

Table 11. Effect of various mixing times on cholesterol removal from milk^{1,2}

Mixing time (min)	Cholesterol removal (%)
5	93.2 ^a
10	93.9 ^a
15	92.1 ^a
20	92.5 ^a
25	90.3 ^b

¹Means of duplicate. Means in a column with the different letter are significant ($p < 0.05$).

²Other experimental factors include β -cyclodextrin added, 1%; mixing speed, 800 rpm; mixing temp, 10C; centrifugal speed, 111 x g; centrifugation time, 10 min.

Yen과 Tsui등에 따르면 lard의 콜레스테롤 제거는 30분에서 2시간까지는 β -cyclodextrin의 함량에 관계없이 증가하는 추세를 보이다가 2시간째에 일정 수준을 유지하는 것으로 보고하였다⁽¹⁰⁾. 난황의 경우에는 차이를 보이지 않았고⁽²⁹⁾, 치즈의 경우에는 교반 시간에 따른 제거율의 증가를 나타내었다⁽³⁰⁾. 위의 실험 결과와 본 실험의 결과가 일치하지 않는 이유는 시료의 종류가 각각 다르다는 점을 들 수 있겠고, 또한 각 실험마다의 교반 조건과 β -cyclodextrin 첨가량, 사용한 교반기의 차이등으로 인한 것으로 추정된다.

4. 원심분리 속도의 영향

원심분리 속도의 영향에 따른 콜레스테롤 제거율의 차이를 보기 위해 55, 111, 166, 222, 278 x g로 원심분리 속도를 달리하여 실험을 수행하였

다. 이 실험을 위해 설정된 다른 조건들은 다음과 같다: β -cyclodextrin 첨가량은 1%, 교반 속도는 800 rpm, 교반 온도는 10°C, 교반 시간은 10분, 원심분리 시간은 10분이었다. 제거 단계를 거쳐 β -cyclodextrin-콜레스테롤 복합체를 우유로 분리하기 위한 방법으로 원심분리 방법을 사용하였다. 복합체를 시료로부터 완전히 분리하기 위하여 원심분리 속도를 442 x g로 10분간 원심 분리한 결과 복합체의 침전은 잘 일어났으나, 우유의 크림층이 원심분리 용기의 벽에 묻어나 시료의 유지방 함량이 현저히 감소하는 현상을 관찰할 수 있었다. 따라서 본 실험에서는 최고 속도를 278 x g로 하여 이보다 낮게 5가지의 다른 원심분리 속도의 영향을 살피고자 하였다. 콜레스테롤 제거율은 55와 278 x g의 속도에서 유의적으로 낮은 콜레스테롤 제거율을 보였다 (Table 12). 반면에 111, 166, 222 x g 간에는 유의적 차이를 보이지 않았다 ($p > 0.05$). 가장 낮은 원심분리 속도인

Table 12. Effect of various centrifugal force on cholesterol removal from milk^{1,2}

Centrifugation speed (x g)	Cholesterol removal (%)
55	86.7 ^a
111	94.9 ^b
166	95.9 ^b
222	91.5 ^{ab}
278	87.3 ^a

¹Means of duplicate. Means in a column with the different letter are significant ($p < 0.05$).

²Other experimental factors include β -cyclodextrin added, 1%; mixing speed, 800 rpm; mixing temp, 10°C; mixing time, 10 min; centrifugal time, 10 min.

55x g 에서는 β -cyclodextrin-콜레스테롤 복합체의 침전이 완전하지 못함으로 인해 상등액에 남아있던 복합체가 재분리되어 콜레스테롤의 제거율이 다소 낮아진 것으로 사료된다. 이에 더해 278 x g로 분리한 경우에는 유지방이 원심분리 용기의 안쪽벽에 부착하여 결과적으로 콜레스테롤 양도 적어진 것으로 여겨진다. 본 실험의 원심분리 속도로 첨가한 β -cyclodextrin를 모두 침전시켜 시료에서 완전히 제거할 수 있는지는 의문으로 남아있어 연구가 더 필요할 것으로 보인다.

5. 원심분리 시간의 영향

원심분리 시간의 영향에 따른 콜레스테롤 제거율의 차이를 보기 위하여 5, 10, 15, 20, 25분으로 시간을 달리하여 실험을 수행하였다. 이 실험을 위해 설정된 다른 조건들은 다음과 같다: β -cyclodextrin은 첨가량 1%, 교반 속도는 800 rpm, 교반 온도는 10℃, 교반 시간은 10분, 원심분리 속도는 111 x g였다. 위의 조건으로 실험을 한 후 원심분리를 25분간 하였을 때, 콜레스테롤 제거율이 88.3%로 다른 시간에 비해 유의적으로 낮게 나타났으며($p > 0.05$), 다른 원심분리 시간의 경우에는 91.9 ~ 94.6%의 콜레스테롤 제거율을 보였다. 오랜 시간의 (25분) 원심분리에서 제거율이 감소하는 이유는 원심분리 속도가 큰 경우와 마찬가지로 유지방의 분리에 의한 것으로 보여진다.

Table 13. Effect of various centrifugation times on cholesterol removal from milk^{1,2}

Centrifugation time (min)	Cholesterol removal (%)
5	91.9 ^a
10	94.6 ^a
15	94.1 ^a
20	92.9 ^a
25	88.3 ^b

¹Means of duplicate. Means in a column with the different letter are significant. ($p < 0.05$).

²Other experimental factors include β -cyclodextrin added, 1%; mixing speed, 800 rpm; mixing temp, 10C; mixing time, 10 min; centrifugal speed, 111 x g.

6. 반응표면 분석법에 의한 콜레스테롤 제거 조건의 최적화

가. Fractional Factorial Block

Table 2에 나타난 바와 같이 5 factor를 5 level로 나누어 각각 다른 43개의 실험 조건을 찾았다. 교반 속도를 800 rpm으로 고정한 후, 5 factor를 독립변수로 콜레스테롤 제거율을 종속변수로 하여 측정한 결과는 Table 2에서와 같다. 이에 따르면, β -cyclodextrin 첨가량 1.5%, 교반 온도 15℃, 교반 시간 15분, 원심분리 속도 222 x g, 원심분리 시간 15분일 때 가장 높은 제거율인 96.9%를 나타내었다. 반면에 β -cyclodextrin 첨가량 0.25%, 교반 온도 10℃, 교반 시간 10분, 원심분리 속도 166 x g, 원심분리 시간 10분에서 64.6%로 최소의 제거율을 보였다.

나. 콜레스테롤 제거의 최적화 조건

위의 방법으로 얻어낸 결과를 토대로 종속변수와 독립변수들 간의 관계를 규명하기 위해, 다중회기 분석을 수행하였다⁽²³⁾. 수행한 결과를 95% 유의 수준에서 유의성이 있는 독립변수로 β -cyclodextrin (x_1), β -cyclodextrin² (x_1^2), 교반 온도² (x_2^2)항을 채택하여 다음과 같은 이차함수식을 얻었다.

$$Y = 40.089 x_1 - 16.555 x_1^2 + 0.013 x_2^2 + 70.219$$

따라서 우유의 콜레스테롤 제거에 영향을 미치는 주요 factor는 β -cyclodextrin 첨가량과 교반 온도로 나타났다. 반면에 나머지 3가지의 조건은 상관 관계가 없는 것으로 나타났다. 결과로 나타난 이차함수를 토대로 콜레스테롤 제거율을 유추한 contour 그래프를 그려보면 (Fig. 1), 다른 조건에 관계없이 β -cyclodextrin 첨가량이 1.15%일때 최대값을 나타내었으며, 그 이상 또는 이하의 첨가량에서는 감소율이 떨어지는 것으로 나타났다. 특히 0.25%를 첨가한 경우에는 79.2%로 현저히 낮아, β -cyclodextrin 첨가량이 0.5% 이상은 되어야 균질우유의 콜레스테롤 제거율이 90% 이상이 될 것으로 사료된다. 교반 온도가 콜레스테롤 제거율에 미치는 효과는 β -cyclodextrin 첨가량의 그것보다는 떨어지나, 95% 유의 수준에 달하였다. 다른 조건에 상관없이 교반 온도가 2.5에서 17.5℃까지 증가하면서 약 5% 증가하는 경향을 보였다. 또한 이차 함수식에 의해 결정된 콜레스테롤 제거를 위한 최적 조건은 β -cyclodextrin 첨가량 1.15%와 교반 온도 17.5℃로 결정되었으며 수식에 대입해 산출된 예상치는 98.4%였다. 이 수치는 실험에 의한 실제 측정치 94.2%와 유의적 차이가 없는 것이었다.

본 실험에 의해 나타난 결과들을 토대로, 균질 우유의 경우 소량의 β -

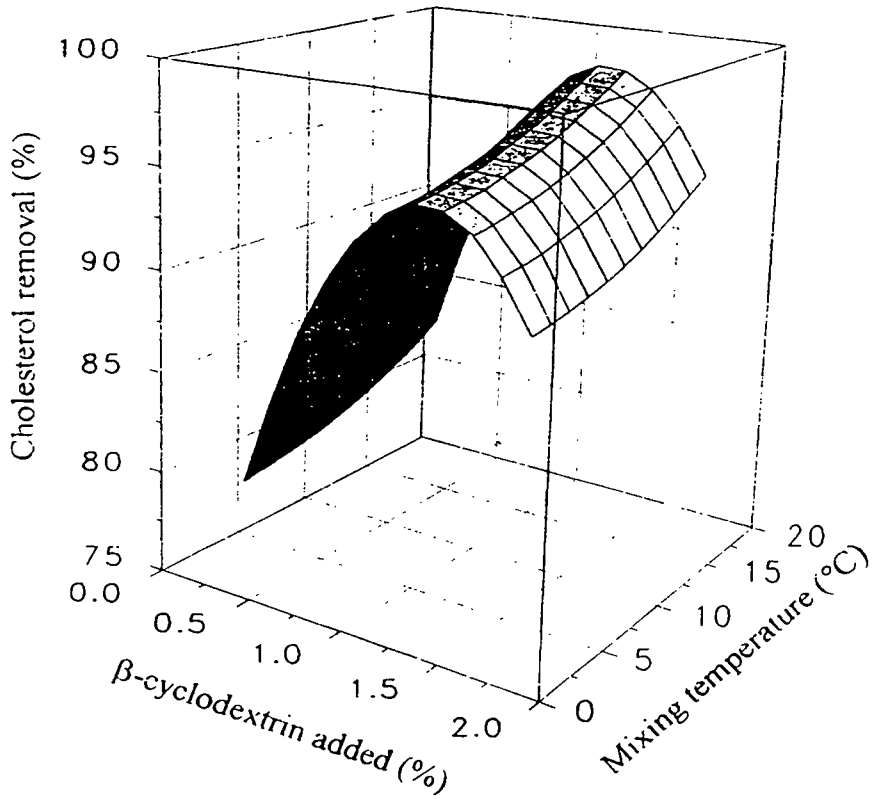


Fig. 1. Response surface plot cholesterol removal from milk affected by β -cyclodextrin concentration and mixing temperature

cyclodextrin의 첨가로도 90% 이상의 콜레스테롤을 제거하는 것이 가능하며, 또한 낮은 온도에서도 수행할 수 있다는 것을 알 수 있었다. 이는 높은 온도에 의한 우유의 변질 요인을 제거할 수 있다는 점에서 산업화가 이루어질 수 있는 좋은 조건이라 하겠다. 또한 제품의 품질에 거의 영향을 미치지 않아 우유뿐 아니라 다른 유제품에도 적용할 수 있다고 사료되어 이에 대한 연구가 이루어져야 할 것이다.

제 3 절 β -cyclodextrin을 이용한 크림의 콜레스테롤 제거

1. 반응표면 분석법에 의한 콜레스테롤 제거 조건의 최적화

43개의 각기 다른 조건들의 조합에 의해 수행한 실험 결과가 Table 4에 나타나 있다. 위의 결과들을 토대로 다중회기분석을 한 결과 95% 유의성 수준에서 크림의 콜레스테롤 제거율에 영향을 미치는 factor는 β -cyclodextrin 첨가량 (x_1), 교반 시간 (x_3) 및 교반 속도 (x_4)였다. 또한 β -cyclodextrin 첨가량과 교반 속도사이에는 상호연관성이 있는 것으로 보인다. 나타난 수식은 다음과 같다.

$$Y = 39.30 + 8.43 x_1 - 0.296 x_1^2 + 0.0027 x_3^2 + 0.0000048 x_4^2 - 0.00074 x_1 x_4$$

2. β -cyclodextrin 첨가

크림의 콜레스테롤 제거에 미치는 β -cyclodextrin 첨가의 효과를 보기 위하여 Table 4의 조합들 중 다른 조건들과는 관계없이 1.6, 5, 10, 15, 18.4% β -cyclodextrin 함량별로 따로 구분하여 평균값을 구하였다 (Table 14). 실험 결과에 나타난 바와 같이 10% 미만의 β -cyclodextrin 함량에서는 증가할수록 콜레스테롤 제거율도 급격히 증가함을 알 수 있었다. 1.6% 첨가시에는 43.5%, 그리고 5% 첨가시에는 81.9%를 나타내었다. 그러나 10% 이상의 β -cyclodextrin 첨가에서는 첨가량을 18.4%까지 증가하여도 큰 차이를 보이지 않아, 10% 정도만 첨가하면 크림의 콜레스테롤 제거율을 92% 이상까지 올릴 수 있을 것으로 사료된다.

Table 14. Effect of various β -cyclodextrin concentrations on cholesterol reduction from cream¹

β -cyclodextrin concentration (%)	Sample (n)	Cholesterol reduction (%)
1.6	2	43.5 ^a
5.0	32	81.9 ^b
10.0	18	92.4 ^c
15.0	32	94.8 ^c
18.4	2	97.4 ^c

¹Means in a column with the different letter are significant($p < 0.05$).

Data in each concentration were selected from Table 2, regardless of other factors.

β -cyclodextrin의 첨가량을 5, 10, 15% 로 달리 하였을 때, 크림의 콜레스테롤 제거에 영향을 미치는 조건들을 알아내기 위하여 다음 실험을 수행하였다. Table 4로부터 다른 조건에는 관계없이 각각 β -cyclodextrin을 첨가한 실험 결과를 각 β -cyclodextrin 첨가량별로 포집하여 다중회기분석을 수행하였다. 결과로 나온 수식들은 콜레스테롤 제거율을 유추하는데 사용하였다. 그 중 첨가량이 10%인 경우, 교반 시간(x축)과 교반 속도(y축)가 콜레스테롤 제거율에(z축) 영향을 미치는 주요 factor인 것으로 분석되었다. 도출된 이차함수식은 다음과 같다.

$$Z = 62.37 + 0.79 x + 0.03 y - 0.013 x^2 \quad (R^2 = 0.720)$$

이 수식에 의해 유추된 콜레스테롤 제거율은 교반 시간이 30분일 때 교반 속도가 1,330 rpm 으로 증가했을 때에 최고치를 나타내었다(94.4%), 그 이상의 교반 속도에서는 감소하는 추세를 보였다(Fig 2). 콜레스테롤 제거율과 β -cyclodextrin 첨가량과의 밀접한 관계는 여러 실험들에 의해 보

고된 바 있으나^(8-10, 29-31), 크림의 콜레스테롤 제거를 위해 10%의 β -cyclodextrin을 첨가할 경우에 위의 조건만 제공되면 제거율이 94% 이상이 될 수 있다는 본 실험의 결과는 제거율면에서 획기적이라 하겠다.

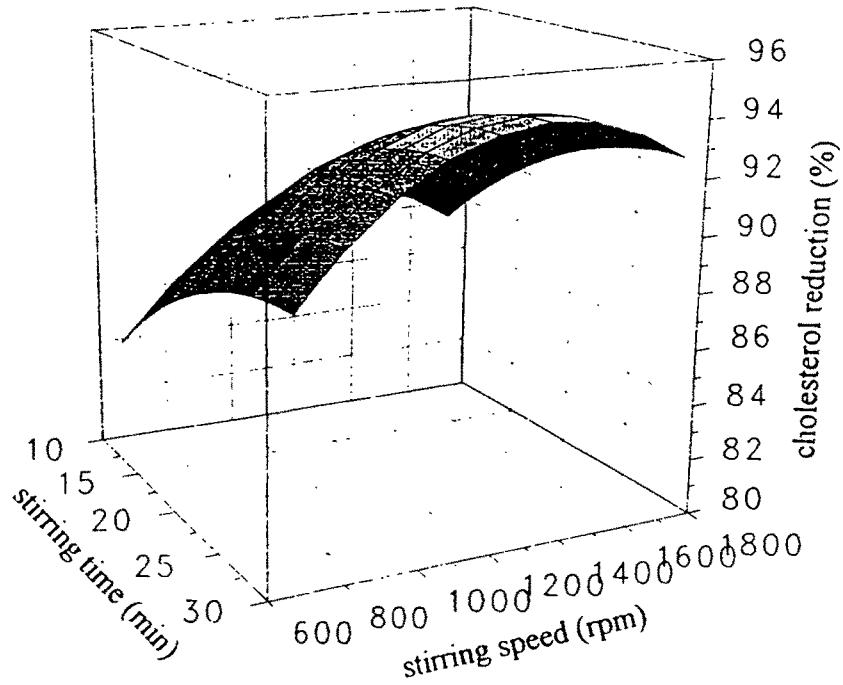


Fig. 2. Effects of stirring time and speed on cholesterol reduction from cream treated with 10% β -cyclodextrin

3. 교반 온도

교반 온도를 30, 40, 50 분으로 한 경우, 크림의 콜레스테롤 제거에 영향을 미치는 조건들을 알아내기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.

Table 4로부터 다른 조건에는 관계없이 여러 교반 온도로 수행한 실험 결과를 각 교반 온도별로 포집하여 다중회기분석을 수행하였다. 결과로 나온 수식들은 콜레스테롤 제거율을 유추하는데 사용하였다. 그 결과, 30과 40℃에서는 콜레스테롤 제거율이 β-cyclodextrin 첨가량에 의해서만 결정되는 것으로 나타났고, 첨가량이 증가할수록 제거율 또한 증가함을 보였다 (Table 15, 산출된 수식 포함). β-cyclodextrin 10%를 첨가했을때, 30℃에서는 88.1% 그리고 40℃에서는 85.6% 콜레스테롤이 제거된 것으로 나타났다.

Table 15. Effect of various β-cyclodextrin concentrations on cholesterol reduction from cream stirred at 30 and 40℃

β-cyclodextrin (%)	Stirring temperature (℃)	
	30 ¹	40 ²
5.0	82.1	68.3
10.0	88.1	85.2
15.0	93.9	99.9

The mean value was estimated by following equations: ¹Cholesterol reduction (%) = 76.13 + 1.19 β-cyclodextrin, ²Cholesterol reduction = 51.69 + 3.32 β-cyclodextrin.

위의 결과와는 다르게 교반 온도를 50℃로 상승시킨 경우에는 β-cyclodextrin 첨가량뿐만 아니라 교반 속도 또한 두 factor간의 상호 연관성도 제거율에 영향을 미치는 것으로 나타났다 (Table 16). β-cyclodextrin 함량이 증가할수록 또한 교반 속도가 증가할수록 콜레스테롤 제거율은 증가하는 결과를 보였다. 두 factor중 β-cyclodextrin 첨가량이 교반 속도보다 효과가 더 큰 것으로 나타났다. 보다 더 명확하게 비교해보

기 위해서는 다음과 같은 방법이 용이할 것이다. β -cyclodextrin이 10% 첨가되었을때, 86.1, 88.2, 90.2%로 교반 속도의 증가에 따라 완만한 증가선을 그리는데 반하여, 교반속도가 1,200 rpm의 경우를 보면에는 77.3, 86.1, 95.0%의 콜레스테롤이 β -cyclodextrin 첨가량 5, 10, 15% 첨가량에 따라 제거되어 증가 추세가 현저히 증가됨을 볼 수 있었다.

본 실험실에서 균질 우유의 콜레스테롤을 제거한 실험 결과에 의하면, 교반 온도에 의한 효과를 볼 수 없었다. 이는 우유의 경우에는 실온에서 액상으로 교반하기도 용이하며 유지방의 분리도 일어나지 않았으나, 사용

Table 16. Effects of various β -cyclodextrin concentrations and various stirring speeds on cholesterol reduction from cream stirred at 50°C¹

β -cyclodextrin (%)	Stirring speed (rpm)		
	800	1,200	1,600
5.0	77.3	81.1	86.7
10.0	86.1	88.2	90.2
15.0	95.0	95.2	95.4

¹The mean value was estimated by the following equation: Cholesterol reduction (%) = 57.14 + 2.51 β -cyclodextrin + 0.014 stirring speed - 0.00096 β -cyclodextrin x stirring speed.

한 크림의 경우에는 비균질 상태였고, 또한 온도의 차이에 따라 시료의 형태가 현저히 달라서 50°C 정도에서는 거의 액상에 가까우나 30°C에서는 거품과 같은 형태로 된다는 점이 다르다고 할 수 있다. 콜레스테롤 제거율이 일정 수준 이상만 된다면 40°C가 제품의 변질도 억제하면서 제거도 용이하다는 점에서 적합하다고 사료된다.

4. 교반 시간

교반 시간을 10, 20, 30분으로 한 경우, 크림의 콜레스테롤 제거에 영향을 미치는 조건들을 알아보기 위하여 다음 실험을 수행하였다. Table 4로부터 다른 조건에는 관계없이 여러 교반 시간으로 수행한 실험 결과를 각 교반 시간별로 포집하여 다중회기분석을 수행하였다. 이의 결과로 나온 수식들은 콜레스테롤 제거율을 유추하는데 사용하였다. 교반 시간을 10분으로 한 실험에서는 β -cyclodextrin 첨가량과 교반 속도등 두 factor의 p-value가 <0.001 로 나타나 콜레스테롤 제거에 중요한 영향을 미치는 것으로 나타났다 (Table 17). 또한 둘간의 상호작용도 있는 것으로 나타났

Table 17. Effects of various β -cyclodextrin concentrations and various stirring speeds on cholesterol reduction from cream stirred for 10 min¹

β -cyclodextrin (%)	Stirring speed (rpm)		
	800	1,200	1,600
5.0	77.7	80.8	83.8
10.0	85.9	87.4	88.8
15.0	94.1	93.6	93.8

¹The mean value was estimated by the following equation: Cholesterol reduction (%) = 60.48 + 2.25 β -cyclodextrin + 0.012 stirring speed - 0.0079 β -cyclodextrin x stirring speed.

다 ($p < 0.05$). β -cyclodextrin 첨가량이 5%일 때, 콜레스테롤이 77.7% (800 rpm)와 83.8% (1,600 rpm) 제거되었다. 반면에 94.1% (800 rpm) 와 93.8% (1,600 rpm)가 15% β -cyclodextrin 첨가시 제거되었다. 이 결과로 β -cyclodextrin 첨가량이 교반 속도보다 크림의 콜레스테롤 제거에 미치는

영향이 크다는 것을 알 수 있었다.

교반 시간을 20분으로 하였을 때의 콜레스테롤 제거율은 (z축) β -cyclodextrin 첨가량 (x축) 과 교반 속도 (y축)의 2차함수의 관계로 Fig. 3에 나타내었다 ($p < 0.05$). 도출된 수식은 다음과 같다.

$$z = 3.155 + 10.65 x + 0.366 x^2 - 0.000001 y^2 \quad (R^2 = 0.965)$$

크림의 콜레스테롤 제거율은 15% β -cyclodextrin이 첨가되었을 때 가장 높은 수치인 97.99%로 유추되었고, 더 이상의 첨가에는 오히려 제거율이 다소 감소하는 것으로 나타났다.

각 등⁽³¹⁾에 따르면 균질 우유에 β -cyclodextrin 1%를 첨가하고 교반 시간을 5, 10, 15, 20분으로 달리한 경우, 92.5 ~ 93.9% 정도의 콜레스테롤이 제거되었다고 하였다. 본 실험의 경우 10 ~ 20분 정도의 교반 시간에 15%의 β -cyclodextrin이 첨가되어야만 90% 이상의 제거율을 나타내는 것

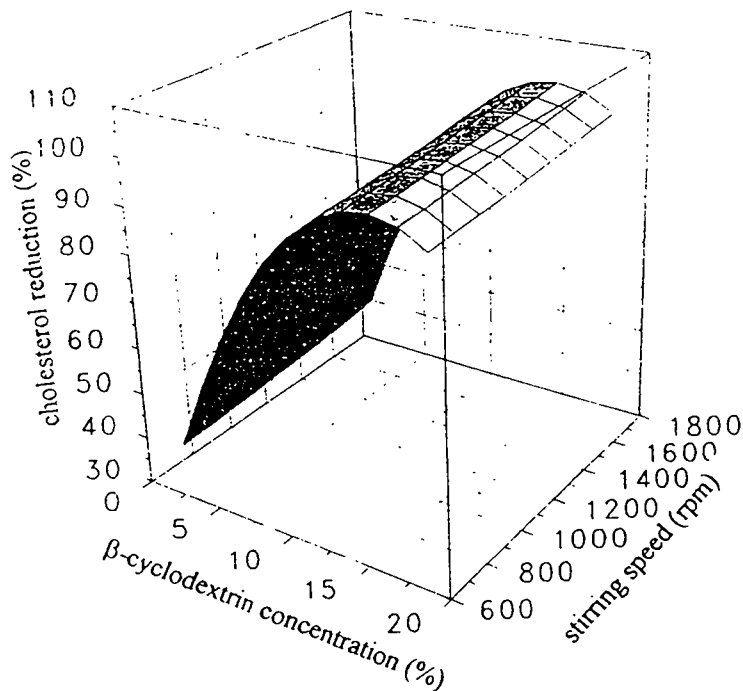


Fig. 3. Effects of β -cyclodextrin and stirring speed on cholesterol reduction from cream stirred for 20min

으로 볼 때, 유지방의 함량, 즉 콜레스테롤의 함량이 증가함에 따라 β -cyclodextrin 필요량이 비례적으로 증가함을 알 수 있었다. 다른 실험에서는 β -cyclodextrin 이 다르기는 하나 120분 정도의 교반 시간에 83%의 제거율을 보인 경우도 있었다⁽¹⁰⁾. Makoto등⁽³⁰⁾은 10% β - cyclodextrin이 첨가된 치즈 샘플에서 10분간 교반에서 62.9%, 20분 교반에서 91.1%, 그리고 30분 교반에서 94.6%의 콜레스테롤이 제거되었다고 하였다. 이 결과 20분 정도의 교반으로 90% 이상의 콜레스테롤 제거율을 보일 수 있다고 보고하였다. 그러나 난황의 콜레스테롤은 2.7% β - cyclodextrin를 첨가하고, 5, 10, 15분간 교반하였을 때, 64.2 ~ 73.1% 범위의 낮은 콜레스테롤 제거율을 보여 샘플의 종류, 특성, 실험시의 교반 조건 (온도, 속도 등)에 따라 상당한 차이를 보이는 것으로 나타났다. 따라서 콜레스테롤 제거율을 비교할 때, 이런 모든 조건들을 감안하여 결과를 분석하여야 할 것으로 사료된다.

5. 교반 속도

교반 속도를 800, 1,200, 1,600 rpm으로 한 경우, 크림의 콜레스테롤 제거에 영향을 미치는 조건들을 알아내기 위하여 다음 실험을 수행하였다. Table 4로부터 다른 조건에는 관계없이 다른 교반 속도로 수행한 실험 결과를 각 교반 속도별로 포집하여 다중회기분석을 수행하였다. 이 실험의 결과로 나온 수식들은 콜레스테롤 제거율을 유추하는데 사용하였다. 교반 속도가 800 과 1,600 rpm인 경우에는 콜레스테롤 제거율에 영향을 미치는 factor는 단지 β -cyclodextrin 뿐이었다 (Table 18, 수식 포함). 콜레스테롤 제거율은 β -cyclodextrin 첨가량에 정비례하는 것으로 나타났다. 800 rpm으로 교반시, 79.0 ~ 94.2%의 콜레스테롤 제거율이 5 ~ 15% β -

cyclodextrin 첨가로 나타났으며, 1,600 rpm의 경우에도 83.9 ~ 94.2%로 유사한 제거율을 보였다.

Table 18. Effect of various β -cyclodextrin concentrations on cholesterol reduction from cream stirred with different speeds

β -cyclodextrin (%)	Stirring speed (rpm)	
	800 ¹	1,200 ²
5.0	79.0	83.9
10.0	86.8	89.2
15.0	94.2	94.2

The mean value was estimated by following equations: ¹Cholesterol reduction (%) = 71.45 + 1.52 β -cyclodextrin, ²Cholesterol reduction (%) = 78.82 + 1.03 β -cyclodextrin.

이와는 다르게 1,200 rpm으로 교반한 경우에는 β -cyclodextrin 첨가량 (x축)과 교반 시간 (y축)축이 모두 영향을 미치는 이차함수 관계를 볼 수 있었다 (Fig. 4).

$$z = 17.99 + 10.39 x - 0.354 x^2 + 0.00025 y^2 (R^2 = 0.863).$$

수식에서 보는 바와 마찬가지로, β -cyclodextrin 첨가량이 교반 시간보다 콜레스테롤 제거율에 미치는 영향이 큼을 알 수 있었다. 수식에 의해 크림에 15% β -cyclodextrin 첨가에 30분간 1,200 rpm에서 교반시 최대 제거율은 97.82%로 유추되었다.

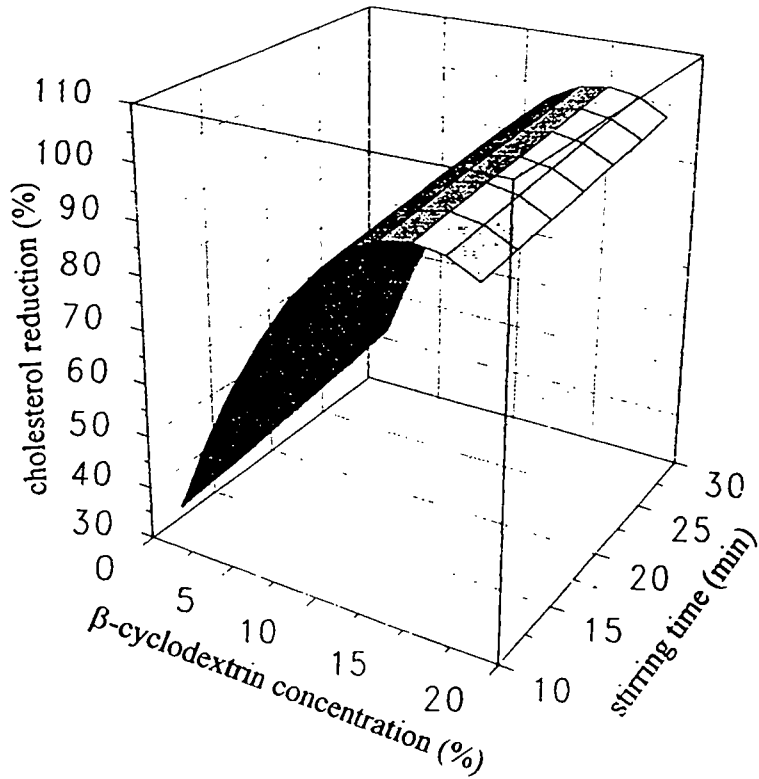


Fig. 4. Effects of β -cyclodextrin and stirring time on cholesterol reduction from cream stirred at 1,200rpm

6. 원심분리 속도

원심분리 속도를 222, 333, 444 x g 로 한 경우, 크림의 콜레스테롤 제거에 영향을 미치는 조건들을 알아보기 위하여 다음 실험을 수행하였다. Table 4로부터 다른 조건에는 관계없이 다른 원심분리 속도로 수행한 실험 결과를 각 원심분리 속도별로 포집하여 다중회기분석을 수행하였다.

이 실험의 결과로 나온 수식들은 콜레스테롤 제거율을 유추하는데 사용하였다. 원심분리 속도가 222 x g (Table 19) 와 444 x g (Table 20)인 경우, β -cyclodextrin 첨가량과 교반 속도가 콜레스테롤 제거율에 유의성을

Table 19. Effects of various β -cyclodextrin concentrations and stirring speeds on cholesterol reduction from cream centrifuged at 2000 rpm¹

β -cyclodextrin (%)	Stirring speed (rpm)		
	800	1,200	1,600
5.0	79.9	82.2	84.9
10.0	86.9	88.3	89.7
15.0	94.4	94.4	94.5

¹The mean value was estimated by the following equation: Cholesterol reduction (%) = 63.05 + 2.06 β -cyclodextrin + 0.01 stirring speed - 0.00067 β -cyclodextrin x stirring speed.

Table 20. Effects of various β -cyclodextrin concentrations and stirring speeds on cholesterol reduction from cream centrifuged at 4000rpm¹

β -cyclodextrin (%)	Stirring speed (rpm)		
	800	1,200	1,600
5.0	77.7	80.7	83.7
10.0	86.1	87.6	89.0
15.0	94.6	94.4	94.3

¹The mean value was estimated by the following equation: Cholesterol reduction (%) = 60.41 + 2.29 β -cyclodextrin + 0.011 stiring speed - 0.00077 β -cyclodextrin x stirring speed.

가지고 영향을 미침을 알 수 있었다. 이 두 factor중 β -cyclodextrin 첨가량이 미치는 효과가 교반 속도의 그것보다 큰 것으로 나타났다. Table 4에 나타난 바와 같이, 222 x g로 원심 분리한 경우에는 β -cyclodextrin 첨가량 증가에 비례하여 콜레스테롤 제거율도 증가하였다. 제거율은 800 rpm으로 교반하고 β -cyclodextrin 첨가량이 5 ~ 15% 일 때 79.4 ~ 94.4%이었고, 1600 rpm으로 교반한 경우에는 같은 β -cyclodextrin 첨가량에서 84.9 ~ 94.5%로 나타났다. 이와 비슷한 양상이 444 x g로 원심 분리한 실험에서도 나타났다.

원심 분리 속도가 333 x g 인 경우의 결과를 Fig. 5에 나타내었다. β -cyclodextrin 첨가량을 x축으로 하고 교반 시간을 y축으로 하는 이차함수 관계를 보였으며 그 수식은 아래와 같다.

$$z = 18.99 + 9.96 x + 0.281 y - 0.332 x^2 \quad (R^2 = 0.959)$$

β -cyclodextrin 첨가량이 교반 시간보다 크림의 콜레스테롤 제거에 미치는 효과가 더 큰 것으로 나타났다. 교반 시간이 10분이었을 때, β -cyclodextrin이 5, 10, 15%로 증가할수록 제거율도 각각 62.9, 88.0, 96.3%로 급격히 증가한다는 결과를 수식으로부터 유추할 수 있었다.

위의 모든 실험결과들을 종합해 볼 때, 크림의 콜레스테롤 제거를 위해 고려해야할 factor들과 각각의 조건들도 다양하지만, β -cyclodextrin 첨가량이 본 실험에서 적용된 factor들 중 가장 중요한 것으로 사료된다. β -cyclodextrin 첨가량만 적절하다면 크림의 콜레스테롤중 94% 이상을 제거하는 것이 가능하다고 보여진다. 또한 본 실험의 방법을 이용하여 콜레스테롤이 제거된 또는 감소된 이이스크림, 버터, 휘핑크림 등 다른 유제품의 개발에도 상당한 가능성을 제시한 실험이라 하겠다.

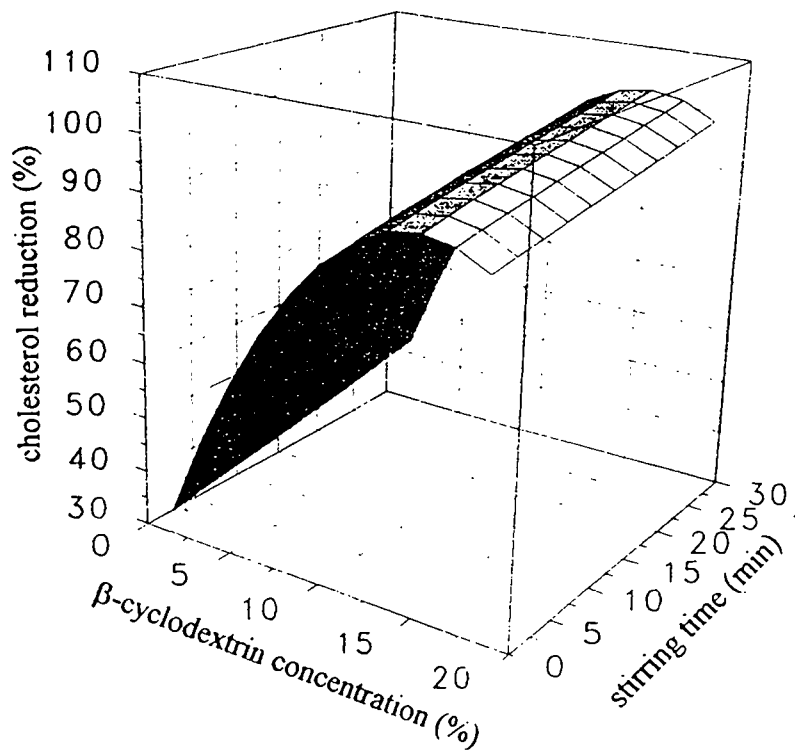


Fig. 5. Effects of β -cyclodextrin and stirring time on cholesterol reduction from cream centrifuged at 3,000rpm

제 4 절 크림의 콜레스테롤 제거에 이용한 β -cyclodextrin 재활용의 최적화 조건

1. 콜레스테롤의 단일 용매에 대한 용해도의 비교

β -cyclodextrin-콜레스테롤 복합체에서 콜레스테롤을 분리해내기 위하여 우선 용매를 선정하기 위한 예비 실험으로 단일 용매의 콜레스테롤의 용해도를 비교하였다 (Fig. 6). 콜레스테롤 용해도가 비교적 양호한 butanol을 1.00으로 하여 비교한 결과, chloroform이 1.05로 가장 높게 나타났으며, hexane isopropanol, acetic acid 순으로 0.92, 0.84, 0.80의 비교적 높은 용해도를 보였다. 반면에 ethanol과 methanol은 용해도가 0.57과 0.34로 낮게 나타났다. 비극성인 hexane, chloroform의 콜레스테롤

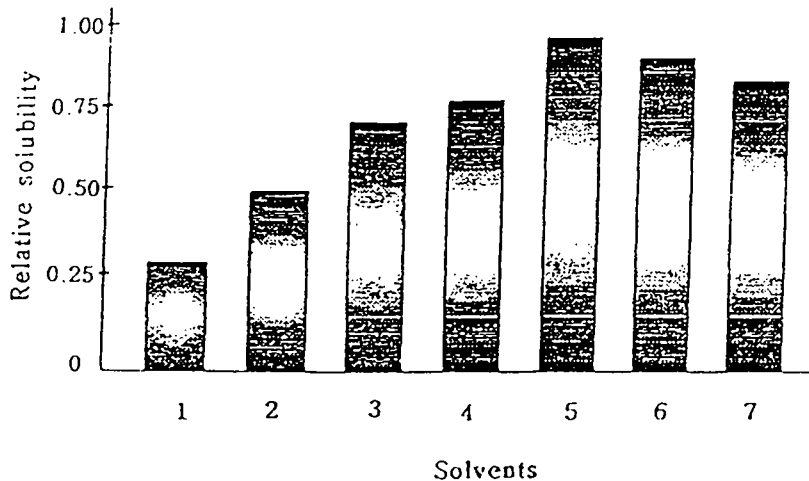


Fig. 6. Relative solubility of cholesterol with various solvents

- | | |
|-----------------|----------------|
| 1 : Methanol | 5 : Chloroform |
| 2 : Ethanol | 6 : Butanol |
| 3 : Acetic acid | 7 : Hexane |
| 4 : Isopropanol | |

용해도가 높았으나, 휘발성이 강하고 유해하며 가격도 상대적으로 비싸 산업화를 위해 대량 사용하기에는 부적합한 것으로 나타났다. 이에 반해 butanol, acetic acid, isopropanol 등은 콜레스테롤을 용해하는데 효과적이었고 가격도 저렴하여 재활용 실험에 적합한 것으로 나타났다. 따라서 수용액의 상태에 존재하는 β -cyclodextrin에 흡착되어 있는 비극성 분자인 콜레스테롤을 분리하기 위해서는 비극성 용매인 butanol과 극성 용매인 acetic acid나 isopropanol과 일정한 비율의 복합 용매가 높은 효과를 보일 것으로 기대되었다.

2. β -cyclodextrin-콜레스테롤 복합체의 용해도에 의한 용매 선정

이 실험에서는 7가지의 다른 혼합 용매를 만들어 비교 검토하였고, acetic acid : butanol = 3 : 1로 혼합한 용매를 1.00으로 기준값을 정하였다 (Fig. 7). 혼합 용매 중 hexane : isopropanol = 3 : 2 인 경우가 1.03으로 기준값과 유사한 용해도를 보였다. 다른 6가지 용매들의 용해도는 현저히 낮게 나타났으며, 비극성 용매의 비율이 커질 수록 용해도가 저하됨을 알 수 있었다. 이 결과는 Pagington⁽⁷⁾이 β -cyclodextrin과 결합하는 분자가 지용성일때는 수용성 용매를 사용하여야 β -cyclodextrin으로부터 분자를 분리해내기가 용이하다는 보고와 일치하는 결과였다. 따라서 극성, 비극성 용매의 적절한 비율이 콜레스테롤의 분리율을 결정하는데 중요하다고 사료된다. 본 실험 결과에 의하면, hexane : isopropanol = 3 : 2의 용해도가 가장 높으나 가격과 독성 여부의 측면에서 acetic acid 와 butanol 의 혼합 용매를 복합체로부터 콜레스테롤 분리에 이용하기로 결정하였다.

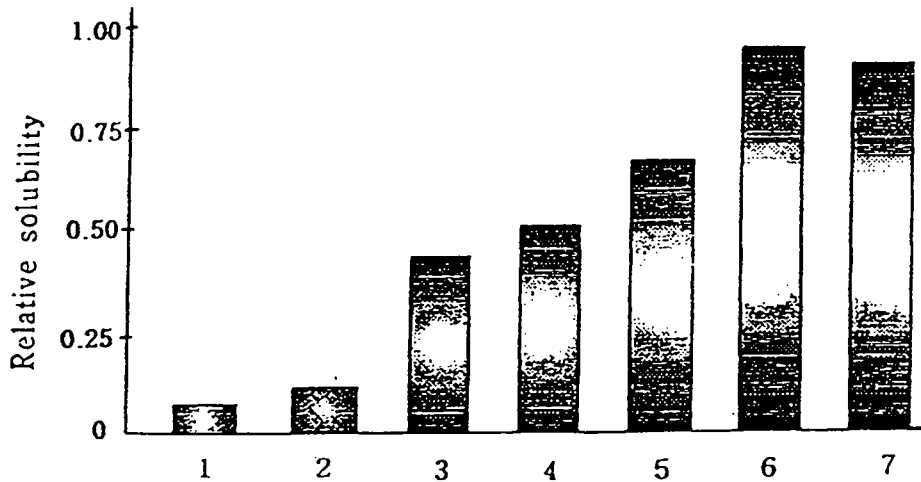


Fig. 7. Relative solubility of cholesterol- β -cyclodextrin complex with various compound solvents

- | | |
|--------------------------------|--------------------------------|
| 1. Chloroform : butanol = 2:1 | 5. Chloroform : hexane = 2:1 |
| 2. Butanol : hexanol = 1:2 | 6. Hexane : isopropanol = 3:2 |
| 3. Chloroform : ethanol = 2:1 | 7. Butanol : acetic acid = 1:3 |
| 4. Butanol : isopropanol = 2:1 | |

3. 혼합 용매의 비율 선정

복합체의 구조는 β -cyclodextrin의 중심에 콜레스테롤이 끼어 들어있는 형태로 이루어진다. 콜레스테롤을 분리해내기 위해서는 β -cyclodextrin의 용해가 먼저 이루어져야 하므로 비극성 용매에 비해 극성 용매의 비율을

늘여야 할 것으로 사료되었다. 따라서 위의 실험에서 선정된 acetic acid 와 butanol의 비율을 달리하면서 최대의 콜레스테롤 분리율을 얻기 위해 수행하였으며, 그 결과는 Table 21에 나타나 있다. 콜레스테롤 분리에 이

Table 21. Effect of ratio of organic solvents on dissociation of cholesterol β -cyclodextrin complex in cream

Solvent ratio(v/v) Acetic acid : butanol	Cholesterol dissociation(%) ¹		
	1 st	2 nd	Sum
4 : 1	51.63	18.16	69.80 ± 4.06 ^{ab}
3 : 1	70.23	8.08	78.31 ± 4.06 ^a
2 : 1	43.18	15.06	58.24 ± 4.06 ^{bc}
1 : 1	44.56	12.08	56.64 ± 4.06 ^b
1 : 2	36.10	7.09	43.19 ± 4.06 ^c

¹Means of triplicated cholesterol extraction. Means in a column without the same letter are significantly different(P<0.05)

Other factors : β -CD added : 10%, solvent : β -CD = 9 : 1, mixing speed : 100rpm, mixing temp. : 50°C, mixing time : 1hr.

용된 다른 조건들은 용매와 복합체의 비율이 9 : 1, 교반 속도는 100 rpm, 교반 온도는 50°C, 교반 시간은 1시간으로 정하였다. Acetic acid : butanol 의 비율이 3 : 1 인 경우에 콜레스테롤의 분리율이 78.31%로 최대였다. Butanol의 상대적 비율이 점차 증가할수록 콜레스테롤 분리율은 감소하는 추세를 보이는 것으로 나타났다. 그러나 acetic acid : butanol = 4 : 1 에서는 69.80%로 나타나 butanol의 비율이 너무 적어도 콜레스테롤 분리에 효과적이지 않은 것으로 보인다. 이 결과를 토대로 본 실험에서 복합체의 콜레스테롤 분리에 사용할 혼합 용매의 비율은 acetic acid : butanol = 3 : 1 로 선정하였다.

4. 선정된 용매와 복합체의 혼합 비율

가장 적합한 용매와 시료 (β -cyclodextrin-콜레스테롤 복합체)의 비율을 찾아내기 위하여 6가지의 다른 혼합 비율을 적용하여 콜레스테롤 분리율을 선정하고자 하였다 (Table 22). 콜레스테롤 분리에 이용된 다른 조건

Table 22. Effect of ratio of organic solvents to β -cyclodextrin on dissociation of cholesterol β -cyclodextrin complex in cream

Ratio (v/w) Solvent : β -CD	Cholesterol dissociation(%) ¹		
	1 st	2 nd	Sum
9 : 1	43.79	29.80	73.59 \pm 3.22 ^{ab}
8 : 1	42.77	33.71	76.48 \pm 3.22 ^{ab}
7 : 1	43.91	32.82	76.73 \pm 3.22 ^{ab}
6 : 1	53.16	29.34	82.50 \pm 3.22 ^a
5 : 1	40.96	28.90	69.86 \pm 3.22 ^b
4 : 1	39.40	29.93	69.33 \pm 3.22 ^b

¹Means of triplicated cholesterol extraction. Means in a column without the same letter are significantly different(P<0.05)

Other factors : β -CD added : 10%, solvent ratio of acetic acid : butanol = 3 : 1, mixing speed : 100rpm, mixing temp. : 50 $^{\circ}$ C, mixing time : 1hr.

들은 용매와 복합체의 비율이 9 : 1, 교반 속도는 100 rpm, 교반 온도는 50 $^{\circ}$ C, 교반 시간은 1시간으로 정하였다. 두차례 콜레스테롤을 추출한 결과에 의하면, 혼합 용매와 시료의 비율이 6 : 1인 경우에 82.5%로 최대 분리율을 보였다. 그러나 다른 비율 즉, 9 : 1 (73.59%), 8 : 1 (76.48%), 7

: 1 (76.73%)의 비율로 혼합한 경우와 유의적 차이는 없었다 ($p > 0.05$). 용매의 비율이 그 이하로 감소되면서 콜레스테롤 분리율도 감소하는 추세를 보였다. 유기 용매의 양을 시료의 20배로 증가하였을 때 콜레스테롤 분리율은 70.94%였다. 따라서 용매의 양이 증가하여도 콜레스테롤 분리에 미치는 영향은 그렇게 크지 않은 것으로 판단되었다. 또한 용매의 양이 너무 적은 경우에는 복합체와 용매의 혼합 후 콜레스테롤 정량을 위해 상층부를 분리해내는 단계에서 어려움이 나타났다. 본 결과를 종합하여 용매와 시료의 비율을 6 : 1 로 설정하였다.

5. 교반 속도

가장 적합한 교반 속도를 결정하기 위하여 50, 75, 100, 125, 150 rpm의 속도로 교반한 경우의 콜레스테롤 분리율을 측정하였다. 다른 조건들은

Table 23. Effect of various mixing speeds on dissociation cholesterol β -cyclodextrin complex in cream

Mixing speed ² (rpm)	Cholesterol dissociation(%) ¹		
	1 st	2 nd	Sum
50	33.81	33.98	67.79 \pm 1.95 ^b
75	35.17	35.40	70.58 \pm 1.95 ^a
100	51.63	24.96	76.59 \pm 1.95 ^a
125	47.17	26.71	73.88 \pm 1.95 ^a
150	49.92	23.13	73.05 \pm 1.95 ^a

¹Means of triplicated cholesterol extraction. Means in a column without the same letter are significantly different($P < 0.05$)

Other factors : β -CD added : 10%, solvent ratio of acetic acid : butanol = 3 : 1, solvent : β -CD = 6 : 1, mixing temp. : 50 $^{\circ}$ C, mixing time : 1hr. ²Mixing speed(rpm) is from shaking water bath.

acetic acid : butanol = 3 : 1 인 용매로 용매와 복합체의 비율을 6 : 1, 교반 온도는 50℃, 교반 시간을 1시간으로 정하였으며, 결과는 Table 23에 나타나 있다. 다섯 가지의 다른 속도 중 100 rpm으로 교반한 경우에 76.59%로 최대의 콜레스테롤 분리율을 나타내었다. 그러나 75, 125, 150 rpm으로 교반한 결과와 유의적 차이를 보이지 않아 분리율에 차이는 거의 없었다고 할 수 있다. 반면에 50 rpm으로 교반한 경우에는 67.79%의 분리율로 유의적으로 낮은 수치를 보였다 ($p < 0.05$). 따라서 50 rpm의 속도 1시간 교반하는 것은 복합체의 콜레스테롤이 용매에 충분히 용해될 조건으로는 부족한 것으로 사료된다. 결과적으로 100 rpm 에서 최대치를 나타내었고, 그 이상의 속도에서는 상승하지 않았으므로 적절한 교반 속도로 100 rpm을 선정하였다.

6. 교반 시간

적합한 교반 시간을 결정하기 위하여 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 시간 교반한 경우의 콜레스테롤 분리율을 측정하였다. 다른 조건들은 acetic acid : butanol = 3 : 1 인 용매로 용매와 복합체의 비율을 6 : 1, 교반 속도를 100 rpm, 교반 온도를 50℃으로 정하였으며, 이 실험의 결과는 Table 24에 나타나 있다. 사용한 시간별 실험을 비교해 보면 2시간 교반한 경우에 81.84%로 최대의 콜레스테롤 분리율이 나타남을 알 수 있었다. 콜레스테롤 분리율은 1시간 교반과 그 이상의 시간에서는 차이를 거의 보이지 않았으나, 30분간의 교반은 62.26%의 분리율을 보여 유의적으로 감소된 수치를 보였다 ($p < 0.05$). 따라서 교반 속도에서와 마찬가지로 30분의 교반으로는 복합체에서 콜레스테롤이 분리되는 데 충분하지 않다는 것을 알 수 있

었다. 그리고 장시간 (4, 5시간)의 교반 또한 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타나 2시간이 가장 적합한 것으로 판단되었다. 이 결과는 海野 등⁽³²⁾의 결과와 유사한 것으로, 그들의 실험에 따르면 교반 시간이 2 ~ 4 시간 정도일 때 복합체로부터 콜레스테롤을 분리해내는데 가장 적합하다고 보고

Table 24. Effect of various mixing times on dissociation cholesterol β -cyclodextrin complex in cream

Mixing time (hour)	Cholesterol dissociation(%) ¹		
	1 st	2 nd	Sum
0.5	42.49	19.77	62.26 \pm 2.22 ^b
1	46.84	29.21	76.05 \pm 2.22 ^a
2	52.77	29.07	81.84 \pm 2.22 ^a
3	50.48	29.34	79.82 \pm 2.22 ^a
4	45.41	27.33	72.74 \pm 2.22 ^{ab}
5	44.28	26.18	70.46 \pm 2.22 ^{ab}

¹Means of triplicated cholesterol extraction. Means in a column without the same letter are significantly different(P<0.05)

Other factors : β -CD added : 10%, solvent ratio of acetic acid : butanol = 3 : 1, solvent : β -CD = 6 : 1, mixing speed : 100rpm, mixing temp. : 50 $^{\circ}$ C

하였다.

7. 교반 온도

적합한 교반 온도를 결정하기 위하여 40, 50, 60, 70, 80 $^{\circ}$ C로 교반한 경우의 콜레스테롤 분리율을 측정하였다. 다른 조건들은 acetic acid : butanol = 3 : 1 인 용매로 용매와 복합체의 비율을 6 : 1, 교반 속도를

100 rpm, 교반 시간을 1시간으로 하였으며, 이 실험의 결과는 Table 25에 나타나 있다. 실험 결과에 따르면, 50℃일때가 최대치를 보였으며 그 수

Table 25. Effect of various mixing temperatures on dissociation of cholesterol β -cyclodextrin complex in cream

Mixing temp. ($^{\circ}$ C)	Cholesterol dissociation(%) ¹		
	1 st	2 nd	Sum
40	27.51	24.96	52.47 \pm 1.43 ^c
50	57.93	22.07	80.00 \pm 1.43 ^a
60	57.62	16.50	74.12 \pm 1.43 ^{ab}
70	51.72	20.15	71.87 \pm 1.43 ^b
80	49.33	20.22	69.56 \pm 1.43 ^b

¹Means of triplicated cholesterol extraction. Means in a column without the same letter are significantly different(P<0.05)

Other factors : β -CD added : 10%, solvent ratio of acetic acid : butanol = 3 : 1, solvent : β -CD = 6 : 1, mixing speed : 100rpm, mixing time : 2hrs.

치는 80.00%였다. 이는 60℃로 교반한 경우의 분리율과는 유의적 차이를 보이지 않았으나, 그 외의 다른 온도와는 차이를 보였다 (p < 0.05). 40℃에서의 교반은 매우 낮은 콜레스테롤 분리율을 보여 충분한 조건을 제공하지 못하는 것으로 나타났다.

Pagington⁽⁷⁾에 따르면 본 실험에서 처럼 열, 빛 그리고 산소등에 안정하지 못한 콜레스테롤이 복합체의 내부 물질인 경우에 60℃이상으로 교반하는 것은 콜레스테롤 분리에 적합하지 않다고 하였다. 따라서 50℃에서 위의 조건으로 교반하는 것이 적합하다고 사료된다.

8. 반응표면 분석법에 의한 복합체로부터 콜레스테롤 분리 조건 확립

가. Fractional Factorial Block

Table 6에 나타난 바와 같이 3 factor를 3 level로 나누어 각각 다른 27개의 실험 조건을 얻었다. 용매의 종류는 acetic acid : butanol = 3 : 1로, 용매 : 시료의 비율은 6 : 1로 고정한 후, 3 factor를 독립변수로 콜레스테롤 분리율은 종속변수로 하여 측정한 결과는 Table 5에 나타나 있다. 콜레스테롤 분리는 두번에 걸쳐 추출하였다. 이에 따르면 β -cyclodextrin-콜레스테롤 복합체로부터 콜레스테롤을 분리하기 위한 교반 속도 100 rpm, 교반 온도는 60℃, 교반 시간 1 시간일때 가장 높은 분리율 96.09%를 나타내었다. 반면에 교반 속도 100 rpm, 교반 온도 40℃, 교반 시간 2 시간에서 60.08%로 최소 분리율을 보였다.

나. 콜레스테롤 분리의 최적화 조건

위의 방법으로 얻어낸 결과를 토대로 종속변수 (분리율) 와 독립변수들 간의 관계를 규명하기 위하여, 다중회기 분석을 수행하였다⁽²³⁾. 수행한 결과, 95% 수준에서 유의성이 있는 독립변수로 교반 온도 (x_1), 교반 온도 (x_2^2)항이 채택되어 다음과 같은 이차함수식을 얻었다.

$$Y = 7.741 x_1 - 0.068 x_1^2 - 131.015$$

따라서 복합체에서 콜레스테롤 분리에 주요한 영향을 미치는 factor는 교반 온도인 것으로 나타났다. 반면에 나머지 2가지의 조건은 상관 관계가 없는 것으로 나타났다. 결과로 나타난 이차함수를 토대로 콜레스테롤 제거

을 유추한 이차함수 그래프를 그려보면 (Fig. 8), 다른 조건에 관계없이 교반 온도가 57℃일때까지 증가하다 최대값을 나타내었으며, 그 이상에서는 낮은 감소 추세를 나타내었다. 결과적으로 교반 속도와 교반 시간은 콜레스테롤 분리율에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 수식에 의한 예상치는 57℃의 교반온도에서 96.50%의 콜레스테롤 제거율을 얻을 수 있는 것이어서 β -cyclodextrin 재활용의 가능성을 제시한 유용한 결과라고 사료된다.

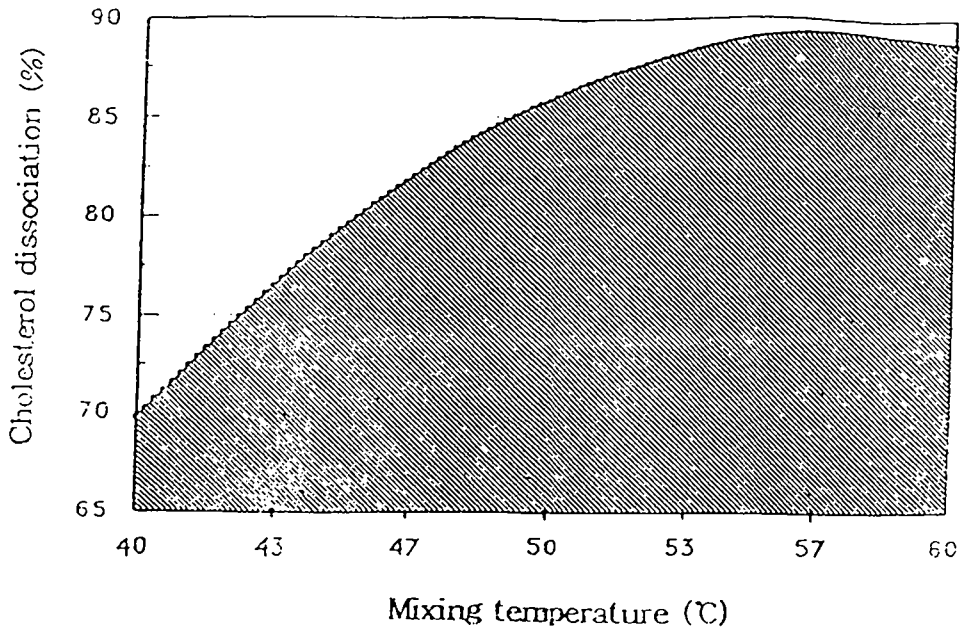


Fig. 8. Response surface plot of dissociation of cholesterol- β -cyclodextrin complex in cream

9. 재활용한 β -cyclodextrin의 이용

위의 최적 조건에 의해 재활용한 β -cyclodextrin만을 첨가한 크림의 콜레스테롤 제거율을 control로 하여, 5가지의 다른 재활용 β -cyclodextrin과 사용하지 않은 β -cyclodextrin 비율, 즉 8 : 2, 7 : 3, 6 : 4, 5 : 5, 4 : 6의 제거율을 비교하였다 (Table 26). 유지방 함량이 36%인 크림의 콜레스테롤 함량은 123.5 mg 이었고, 사용하지 않은 새로운 β -cyclodextrin 10%로 제거 실험한 결과 4.7 mg이 검출되어 96.17%의 제거율을 보였다. 그러나 표에 나타난 바와 같이, 같은 양의 재활용한 β -cyclodextrin을 첨가한 결과는 75.07%에 머물러 큰 차이를 나타내었다. 따라서 두 종류의 β -cyclodextrin을 여러 비율로 혼합하여 첨가하게 되었다. 재활용 β -cyclodextrin과 사용하지 않은 β -cyclodextrin 비율이 6 : 4인 경우에 콜레스테롤 제거율이 95.59%로 나타나, 사용하지 않은 β -cyclodextrin만을

Table 26. Mixing ratio of used β -cyclodextrin to new β -cyclodextrin on regeneration of β -cyclodextrin

Ratio(w/w) Used β -CD : new β -CD	Reduction of cholesterol ¹ (%)
Control	75.07 ± 2.33 ^b
8 : 2	81.83 ± 2.33 ^b
7 : 3	84.71 ± 2.33 ^b
6 : 4	95.59 ± 2.33 ^a
5 : 5	89.39 ± 2.33 ^a
4 : 6	87.72 ± 2.33 ^a

¹Means of triplicated. Means in a column without the same letter are significantly different (P < 0.05)

Other factors : β -CD added : 10%, solvent ratio of acetic acid : butanol = 3 : 1, solvent : β -CD = 6 : 1, mixing speed : 100rpm, mixing temp. : 57°C, mixing time : 2hrs.

넣은 경우와 근접한 높은 제거율을 보였다. 다른 4가지 다른 혼합 비율로 섞은 경우는 81.83 ~ 89.39%의 범위에 들어, control 보다는 높은 제거율을 보였으나 6 : 4의 비율에는 미치지 못하는 결과를 보였다. 따라서 재활용한 β -cyclodextrin 만을 사용하여 크림의 콜레스테롤을 제거하기에는 효율성이 떨어지므로 사용하지 않은 순수한 β -cyclodextrin을 혼합하여 첨가하면 경제성과 효율성 면에서 상당한 효과를 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

제 5 절 콜레스테롤이 제거된 유제품의 개발

본 연구의 실험은 제2장의 제 1, 2, 3, 4절에서 연구한 결과를 기초로 우유 및 유제품의 산업화 가능성을 관찰하기 위하여 실시되었다.

1. Cholesterol이 제거된 우유의 개발

가. 표준제조 공정

Cholesterol을 제거한 우유의 표준 제조공정은 Fig. 10에서와 같다. 일반 시유처리공정과 다른 것은 우유의 균질후 저장 탱크에 수유하여 50℃의 우유를 4℃ 정도로 냉각하고, 1%의 β -cyclodextrin을 첨가하여 100rpm으로 15분간 교반한다. 그후 cholesterol을 흡착한 β -cyclodextrin을 우유로부터 분리하기 위하여 여과 및 청정의 공정을 다시 실시한다. 그리고 분리된 우유를 살균처리하여 냉각후 포장한다.

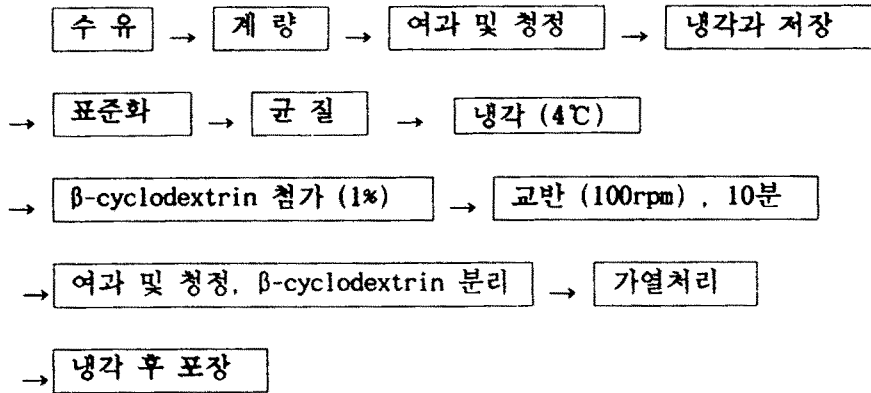


Fig. 10. Cholesterol을 제거한 우유의 표준제조 공정의 개발

위에서 개발된 표준공정에 따라 cholesterol이 제거된 우유를 개발한 결과, pilot scale과 대량생산 모두에서 cholesterol의 제거율이 94%로 양호하였으며, β-cyclodextrin의 분리도 양호하였다. 그러나 표준제조공정이 일반공정보다 다소 복잡한 면이 있었다.

나. 관능검사

위의 표준제조 공정을 이용하여 β-cyclodextrin의 함량 0.5, 1.0, 1.5, 2.0%를 각각 우유에 처리하여 생산된 제품을 관능검사한 결과는 Table 27과 같다. 전형적인 우유의 맛에서는 β-cyclodextrin 0.5와 1.0% 처리 시료는 대조군에서와 유사하였으며, 2.0% 처리 시료는 전형적인 우유 맛이 아니었다. 그리고 단맛에 대한 조사에서도 β-cyclodextrin 0.5와 1.0% 처리 시료는 대조군과 차이를 보이지 않았지만 2.0% 처리 시료는 단맛의 정도가 현저하게 높았다. 이취의 검사에서는 모든 시료가 대조군과 거의 차이가 없었다. 이 실험의 결과 β-cyclodextrin 2.0% 처리시 cholesterol의 제거율은 향상하나 단맛이 너무 높기 때문에 바람직 하지 않았으며 원가절감의 측면을 고려하면 β-cyclodextrin 0.5%

처리 우유가 가장 효과적이었다고 사료된다. 그래서 이 연구의 결과 개발된 고급 아이스크림의 산업화는 매우 가능한 것으로 사료된다.

Table 27. Sensory scores of cholesterol removed market milk treated with β -cyclodextrin¹

Sensory characteristics	Sensory score ²			
	A	B	C	D
Normal milk	3.20 ^a	3.18 ^a	3.15 ^a	2.50 ^b
Sweet	3.15 ^a	3.20 ^a	3.25 ^a	4.20 ^c
Off-flavor	1.50 ^a	1.55 ^a	1.53 ^a	1.58 ^a

¹Sample A : market milk(3.6% milk fat)

B : 0.5% β -cyclodextrin treated market milk

C : 1.0% β -cyclodextrin treated market milk

D : 2.0% β -cyclodextrin treated market milk

²Means of 5 replications. Means not followed by the same letter in the same row differ significantly(p<0.05)

As the value increases from 1 to 5, the intensity of sensory characteristics increases.

2. Cholesterol을 제거한 아이스크림의 표준제조 공정의 개발

유지방 함량이 14%인 고급 아이스크림을 제조하기 위하여 우선 아이스크림 믹스의 배합비를 다음과 같이 구축하였다.

아이스크림 믹스의 배합

· 콜레스테롤 처리 크림(36% 유지방) : 40%

· 콜레스테롤 처리 농축유 : 20%

- 정백당 : 19%
- 물 : 20.5%
- 안정제 : 0.35
- 색소 : 0.0014%
- 바닐라 맛 또는 초코렛맛 또는 딸기맛 : 0.27

가. 표준제조 공정

Cholesterol을 제거한 아이스크림의 표준제조 공정은 Fig. 11에서와 같다. 크림과 탈지농축유의 cholesterol 제거 과정을 거친 원료를 사용하여 유지방 14% 고급 아이스크림(바닐라맛, 초코렛맛, 딸기맛)을 각각 제조하기 위하여 필요한 배합비를 위헤서와 같이 작성하여 배합 탱크에서 각종 원료를 혼합하고 균질한다. 그후 냉각하여 저장탱크로 보내지며, 필요한 향료(바닐라, 초코렛, 딸기)를 첨가한 후 냉동시킨다. 과일과 견과류를 필요로 하는 경우 이들을 첨가하여 포장하고 -25℃의 낮은 온도에서 5시간 정도 경화하여 -27℃에서 1주간 또는 그 이상 저장한다.

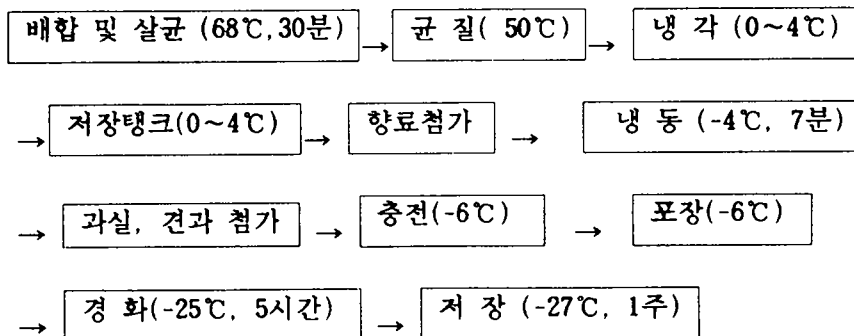


Fig. 11. Cholesterol을 제거한 아이스크림 표준 제조공정의 개발

위에서 개발된 표준공정에 따라 cholesterol이 제거된 아이스크림을 개발한 결과, pilot scale과 대량생산 모두에서 cholesterol의 제거율이 90%로 양호하였으며, 표준제조공정은 일반공정과 일치하여 생산작업이 매우 편리하였다. 그러나 크림과 농축 탈지유에서 cholesterol을 제거하는 과정이 더 첨가되므로 인건비와 제조비가 어느 정도 상승하는 면이 있다.

나. 관능검사

위의 표준제조 공정을 이용하여 10%의 β -cyclodextrin으로 처리한 크림(유지방 36%)을 사용하여 위의 아이스크림 믹스 배합율에 따라 바닐라맛, 초코렛맛, 그리고 딸기맛의 고급아이스크림을 생산하여 Table 28에서와 같이 관능검사를 실시하였다. 관능검사 내용은 전형적인 각 제품의 맛, 조직, 외모, 색깔 등이었다. 바닐라맛, 초코렛맛, 딸기맛 아이스크림 모두에서 맛, 조직, 외모, 색깔이 대조군과 거의 차이가 없었으며, 매우 양호하였다. 개발된 우유의 기호도 조사에서 단맛과 이취는 대조군과 거의 차이가 없었다. 그러나 β -cyclodextrin을 2% 첨가시에는 단맛의 정도가 높게 나타났다.

Table 28. Sensory scores of cholesterol removed ice cream treated with β -cyclodextrin¹

Ice cream	Flavor taste		Body & texture		Appearance & color	
	Control	Sample	Control	Sample	Control	Sample
Vanilla	4.3	4.2	4.4	4.5	4.5	4.5
Chocolate	4.2	4.3	4.5	4.4	4.5	4.6
Strawberry	4.3	4.1	4.3	4.6	4.6	4.4

¹As the value increases from 1 to 5, the intensity of sensory characteristics increases.

3. Cholesterol이 제거된 칩핑크림의 개발

가. 표준제조 공정

Cholesterol을 제거하는 칩핑크림의 표준공정은 Fig. 12에서와 같다. 우선 cholesterol을 제거한 크림을 제조하여 유화제와 증점제를 일정량씩 첨가하여 100rpm에서 10분간 칩핑한다.

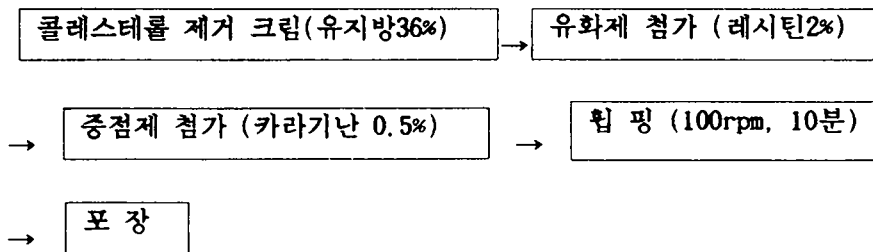


Fig. 12. Cholesterol을 제거한 칩핑크림 표준 제조공정의 개발

이때 사용하는 크림은 신선한 것이어야 하며 냉동크림은 칩핑크림의 품질 저하의 요인이 된다(버터밀크의 형태가 보임).

위에서 개발된 표준 공정에 따라 cholesterol이 제거된 칩핑크림을 개발한 결과, pilot scale과 대량생산 모두에서 cholesterol의 제거율이 90%이상으로 양호하였다. 그러나 표준 제조공정이 일반공정보다 다소 복잡하여 생산현장에서의 불편한 점은 있다.

나. 관능검사

위의 표준제조 공정을 이용하여 β -cyclodextrin의 함량이 6, 10%를 각각 크림에 처리하여 생산된 제품을 관능검사한 결과는 Table 29와 같다. 전형적인 휘핑크림의 맛에서 β -cyclodextrin 6% 처리한 시료는 대조군과 유사하였으나 β -cyclodextrin 10% 처리한 시료는 맛이 좀 떨어지는 경향을 보였다. 이취의 검사에서는 모두 이상이 없었으며, 크림의 조직에서는 6% β -cyclodextrin 처리한 시료는 대조군과 유사하였으나, 10% β -cyclodextrin 처리한 시료는 약간 미흡한 것으로 관찰되었다. 휘핑크림의 외관에는 모든 시료와 유사하였다.

Table 29. Sensory scores of cholesterol removed whipping cream treated with β -cyclodextrin^{1, 2}

Whipping cream	Flavor taste	Off-flavor	Creamy texture	Whippability	appearance
Control	4.5 ^a	1.2 ^a	4.6 ^a	4.2 ^a	4.5 ^a
A	4.2 ^a	1.3 ^a	4.3 ^a	4.1 ^a	4.4 ^a
B	3.8 ^b	1.5 ^a	3.9 ^b	4.0 ^a	4.6 ^a

¹Sample A : 6% β -cyclodextrin treated cream(36% milk fat)

B : 10% β -cyclodextrin treated cream(36% milk fat)

²Means of 5 replications. Means not followed by the same letter in the same column differ significantly($p < 0.05$)

As the value increases from 1 to 5, the intensity of sensory characteristics increases.

4 . β -cyclodextrin의 재이용에 대한 개발

제 2차년도에 실시한 β -cyclodextrin의 재이용에 관한 연구결과를 기초로 하여 크림의 cholesterol제거를 산업화 할때 원가를 절감하는 차원으로 β -cyclodextrin을 재활용하는 것은 중요하다. 그래서 이의 표준제조공정은 Fig. 13와 같다. 크림을 균질하고 β -cyclodextrin을 첨가하여 교반한다. 그 후 크림을 분리하고 분리액을 취하여 50℃까지 냉각시킨다. 이대 핵이 형성되어 가시적인 β -CD의 결정이 생성된다. 이것을 탈수하여 β -cyclodextrin을 포집하여 유기용매로 처리하므로써 cholesterol이 제거된 β -cyclodextrin이 수거된다.

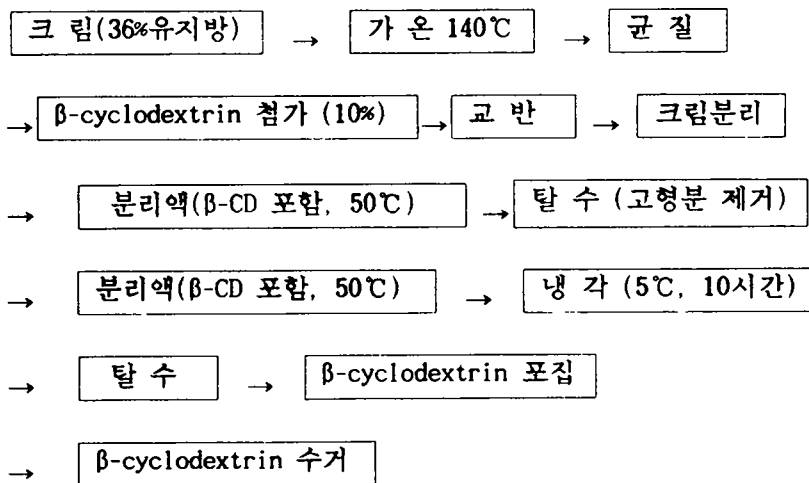


Fig. 13. β -cyclodextrin의 재활용을 위한 표준제조 공정의 개발

위에서 개발된 표준제조 공정애 따라 β -cyclodextrin의 재활용을 실시한 결과, pilot scale과 대량생산 모두에서 β -cyclodextrin의 수거율이 매우 저조하여 50% 이하가 되었다. 수거된 β -cyclodextrin을 acetic acid와 butanol의 비율을 3 : 1로 했을때 cholesterol분리율이 70%로 최대분리율을 나타내었다. 이때 생산된 재활용 β -cyclodextrin과 새로운 것을 6 : 4의 비율로 하여 크림에서 cholesterol을 제거시 제거율이 80%로 최대 분리율을 나타내었다.

그러나 β -cyclodextrin의 재활용에 관한 연구는 아직 완전한 실험의 결과로는 미흡하다고 사료되며 산업화의 적용에는 더 많은 연구가 요구된다.

제 4 장 참고 문헌

1. Gurr, M. I. (1983) Developments in Dairy Chemistry. Lipids.
2. Grundy, S. M., Brheimer, D. (1982) Rational of the diet-heart statement of the American Heart Association, Report of the Nutrition Committee, Circulation. 65:839A.
3. NRC (1989) Diet and Health: Implications for reducing chronic disease risk. Report of the committee on diet and health. Food and Nutrition Board. National Academy Press, Washington, D. C.
4. 한국영양학회 (1995) 한국인 영양권장량. 제 6차 개정.
5. USDA (1976) Composition of foods : Dairy and egg products, Agricultural HB 8-1, Agriculture Research Service.
6. Oakenfull, D. G., Pearce, R. G., and Sidju, G. S. (1991) Low cholesterol dairy products. Aust. Dairy Tech. 46:110.
7. Pagington, J. S. (1986) β -cyclodextrin. Perfumer and flavorist. 11. February/March.
8. Smith, D. M., Awad, A. C., Bennink, M. R., Gill, J. L. (1995) Cholesterol reduction in liquid egg yolk using β -cyclodextrin. J. Food Sci. 60(4):691.
9. Lee, J. S., Ustunol, E., and Smith, D.M. (1993) Cholesterol removal from cream using β -cyclodextrin and derivatives. J. Dairy Sci. Abst. D158.
10. Yen, G. C. and Tsui, L. T. (1995) Cholesterol removal from a

lard-water mixture with β -cyclodextrin. J. Food Sci. 60(3): 561.

11. Weu Shich, C. P., Timothy, B. P., and Allan, H. C. (1995) Cyclodextrin refining process. U. S. Patent, 5393880.
12. Nobnyuki, N. M., Mishima, Y., and Hideyuki, S. (1995) Method for recovering cyclodextrin. U. S. Patent, 5449771.
13. Mentink, L., Serpelloni, M., and Roquette, F. (1990) Process of refining mixture obtained from treatments of fatty media with cyclodextrin and containing complexes of cyclodextrin mainly with lipophilic substances other than fatty acids. Canadian Patent, 90/01007.
14. Wen Shieh, A. H. (1994) Process for separating cyclodextrin from a complex. U. S. Patent, 5371209.
15. Oakenfull, D. G., Sidhu, G. S., and Rooney, M. L. (1991) Cholesterol removal. Australia Patent, WO 91/16824.
16. Oakenfull, D. G., Sidhu, G. S., and Rooney, M. L. (1991) Cholesterol reduction. Australia Patent, WO 91/11114.
17. Cyclodextrin Technology Development Inc. Cyclodextrin information. <http://www.cyclodex.com>
18. Keen, A. R., Ward, D. D., and Hobman, P. G. (1988) Improvements in or relating to methods of removing sterols and/or other steroidal compounds from edible fats and/or oils and/or fats and/or oil from which such sterols and/or other steroidal compounds have been removed. European Patent, 0329347.

19. Kosikowski, F. V. (1990) "Cholesterol - Free milks and milk products : Limitations in production and labeling. Food Technology. November.
20. 곽해수 (1996) 최근 외국의 영양표시 실태와 운영 현황. Korean Dairy Technol. 14(1): 17.
21. Gerber 방법 : 한국 유가공 기술과학회: 우유 유제품 시험법. p103, 선진문화사.
22. Adams, M. L., Sullivan, D. M., Smith, R. L., and Richter, E. F. (1986) Evaluation of direct saponification method for determination of cholesterol in meats. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 69(5):844.
23. SAS User's Guide (1986) Statistics. SAS Institute Inc., Cary, NC.
24. Sweeney, J. and Weiraugh, J. (1976) Summary of available data of cholesterol in foods and methods for its determination., CRC Crit.Rev. Food Sci. Nutr. 8:131
25. Karkalas, J., Donald, A. E., and Clegg, K. M. (1982) Cholesterol content of poultry meat and cheese determined by enzymatic and gas-chromatography methods. J. Food Technol. 17:281.
26. Shen, C. J., Chen, I. S., and Sheppard, A. J. (1982) Enzymatic determination of cholesterol in egg yolk. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 65(5):1222.
27. Jiang, Z, Fenton, M., and Sim, J. S. (1991) Comparison of four

different methods for egg cholesterol determination. Poultry Sci. 70:1015.

28. Ahn, J. J. and Kwak, H. S (1998) Cholesterol reduction in cream using β -cyclodextrin. J. Food Sci. (accepted)
29. Oakenfull, D. G. and Sihdu, G. S. (1991) Cholesterol reduction. Pet Int. Appl. WO 91 11114, Aug. 8.
30. Makoto, K., Akio, O., and Reijiro, S. (1992) Cholesterol removal from animal with cyclodextrin by inclusion. Japan Patent 04168198.
31. Kwak, H. S., Lee, D. K., and Ahn, J. J. (1998) Cholesterol removal in homogenized milk with β -cyclodextrin. Abst. #70. 1998 ADSA-ASAS Joint Meeting, Denver, Colorado, USA.
32. 海野, 工薬 (1995) Recovery of cholesterol used in foods. Japan Patent 278181.

제 2 세부과제. Saponin의 고정화 연구와 cholesterol의 제거에 대한 개발

제 1 장 서 론

Cholesterol은 가장 대표적인 동물성 sterol류 중의 하나이며¹⁾, 인체에 필수적인 영양소로 체내에서 여러 대사경로를 거쳐 생리작용에 필요한 물질을 생산한다. Adrenal gland에서는 cholesterol이 steroid계 호르몬으로, 간에서는 담즙산으로 전환되고²⁾ 각 조직에서는 인지질과 함께 세포막을 구성하는데 이용되며 주로 고등동물의 근육조직, 뇌조직, 신경조직, 담즙, 혈액 및 일반 지방질에 널리 분포한다³⁾. 이처럼 cholesterol이 인체에 필수적이긴 하나, 다량 존재할 때는 고혈압, 동맥경화, 관상동맥 경화증과 같은 심장 및 순환계 질환을 유발하기 때문에 오늘날 전 세계적으로 심각한 문제로 대두되고 있다⁴⁾. 이러한 현상은 국민소득의 증가와 함께 식생활이 다양화되고 특히 우유 및 유제품과 육제품의 소비가 증가하고 있는 우리나라에서도 예외는 아니다. 그러나 서구의 여러 낙농선진국들에서는 우유 및 유제품에 함유된 cholesterol을 감소시키고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있으나, 아직 국내에서는 이러한 연구들이 미비한 실정이다.

따라서 최근 유지방의 섭취 증가에 따라 유지방중의 cholesterol에 대한 관심이 증가되고 있어 유제품의 cholesterol 함량을 신속하고 정확하게 측정하는 방법이 요구되고 있으며, 또한 식품중의 cholesterol이 성인병 및

심장질환기 질병과 높은 연관성을 갖고있어 식품중의 cholesterol을 줄이거나 제거하려는 연구들이 꾸준히 진행되고 있다⁵⁾.

지금까지 cholesterol을 정량하기 위한 많은 방법이 연구되었는데 이들 중에는 thin layer chromatography(TLC)^{6,7)}, gas chromatography(GC)^{5,8,9)} high-performance liquid chromatography(HPLC)^{10,11)}, enzymatic method(EM)^{12,13)}, colorimetric method^{14,15)}등이 있다. 이들 중 GC, EM, HPLC의 방법이 재현성과 정확성으로 뛰어난 방법으로 알려져 있는데⁵⁾, GC에 의한 방법은 cholesterol 추출 후 유도체화 하여 분석하거나 높은 oven 온도를 사용하고 Cholesterol을 유도체화하기 위해 시약과 반응에 따른 시간이 추가적으로 요구되며 이를 분석하는 제한된 column을 사용하게 된다. 유도체화하지 않고 직접적 분석하는 경우에는 높은 온도에서 분석해야함으로 column은 수명에 치명적이다. 효소에 의한 cholesterol 분석은 효소에 의해 ester 형태의 cholesterol도 비누화하지 않고 분석할 수 있는 장점이 있으나 식품 중에 hydrogen peroxide와 반응하는 성분을 함유하면 정량의 오류가 발생되며 또한 시료의 탁도에 따른 오차도 배제할 수 없다⁵⁾. 이에 반해 HPLC에 의한 cholesterol 정량은 시료 전처리 시 방해물질에 의해 장시간의 분석시간을 요구하나 방해 성분을 제거한다면 가장 좋은 cholesterol의 정량 방법이 될 수 있다. 또한 colorimetric method에 있어서도 정확성은 조금 떨어지지만, GC, EM, HPLC에 비해 비교적 신속하고 적은 비용으로 분석할 수 있는 장점을 가지고 있다.

이러한 cholesterol 정량 방법과 함께 우유 및 유제품의 cholesterol 제거를 위해 현재까지 연구되고 있는 방법으로는 흡착제에 cholesterol을 흡착 또는 결합시켜 복합체를 만들어 제거하는 방법¹⁶⁾, 초임계 유체추출법¹⁷⁾, 용융결정방법^{18,19,20)}, 미생물과 효소에 의한 cholesterol 분해법²¹⁾, steam-distillation법^{18,19,20)} 등이 있다. 이중에서 특히 흡착제를 이용한

cholesterol 제거 방법은 다른 방법에 비해 비용이 비교적 적게 들고, 생산라인을 크게 변화시키지 않아도 쉽게 현재의 유가공업의 생산라인에 적용할 수 있는 장점을 지니고 있다.

이러한 흡착제 중 하나인 saponin은 5탄당 및 6탄당에 steroidal 및 triterpenoid aglycone이 결합되어 있는 배당체로 cholesterol과 결합하여 micelle 구조의 불용성 화합물을 생성하므로 쉽게 cholesterol을 제거할 수 있다⁴⁾. 또한, saponin은 cholesterol에 대한 선택성이 강하므로 최종 제품의 품질을 변화시키지 않고, 현재 우유생산에 이용되는 생산라인을 크게 변형시키지 않아도 공정내에 사용가능한 장점을 지닌다. 반면에 가격이 비싼 단점이 있으나, 이는 고정화방법을 이용하여 해결할 수도 있다.

따라서, 본 연구에서는 HPLC와 colorimetric method를 이용하여 우유 및 유제품의 cholesterol을 정량하기 위한 시료의 전처리 방법과 최적의 분석 조건을 연구하였고 또한 saponin으로 우유 및 크림에서 cholesterol을 제거할 경우 이에 영향을 미치는 saponin의 농도 및 pH, saponin과의 반응온도 및 시간, celite의 첨가량 등의 효과를 조사하여, saponin을 이용한 우유 및 크림중의 cholesterol 제거를 위한 최적조건을 확립하였으며, saponin이 고가라는 점을 인식하여 cholesterol 제거방법의 경제성을 위해 saponin을 고정화하는 연구도 수행하였다.

제 2 장 연구 방법

제 1 절 우유 및 크림의 cholesterol 정량 분석 개발

1. 재료

본 실험에 사용한 우유는 서울우유협동조합의 균질한 시유(유지방함량 3.6%)를 시중에서 구입하여 사용하였고, 크림은 유지방 함량이 36%인 유크림을 (주)삼익유가공으로부터 공급받아 사용하였다.

2. Cholesterol 추출 방법

우유의 cholesterol 추출 방법은 액상-액상에 의한 방법과 solid-phase extraction(ESP) 의한 방법으로 하여 두 방법을 비교하였다. 또한 액상-액상에 의한 방법에 있어서 추출 용매에 따른 recovery와 HPLC의 분리에 미치는 영향을 비교 연구하였다.

가. 방법 I

우유 1ml, KOH(10%, w/v in ethanol) 0.5 ml, ethanol 5 ml을 15ml test tube에 넣고 60℃에서 30분간 수욕탕에서 비누화한 후 증류수 2 ml와 diethyl ether 5ml을 첨가한 후 교반하여 액상층과 diethyl ether층이 분리 되도록 10분간 정치한 후 diethyl ether층을 분리하였다. Diethyl ether로 2회 반복 추출 후 추출된 diethyl ether층을 rotary evaporator로 감압 농축하여 이를 1 ml HPLC 이동상으로 희석하여 분석용 시료로 사용하

였다.

Recovery test의 경우 cholesterol STD 1 ml (1 mg/1 ml in ethanol)을 첨가하여 위와 동일한 방법으로 추출하였다.

나. 방법 II

Method I에서 추출한 diethyl ether를 미리 methanol로 전 처리한 Sep-pak C₁₈ column에 통과시키고 이를 감압 농축하여 methanol 1ml로 희석하여 HPLC시료로 사용하였다.

다. 방법 III

Method I의 추출용매를 hexane으로 대체하여 추출하였다.

라. 방법 IV (Solid-phase extraction(SPE))

우유 1ml을 액상-액상 추출방법과 같이 비누화한 후 15% acetic acid 2ml을 test tube에 넣고 원심분리하여 상등액을 15ml test tube에 옮기고 ethanol 5ml과 15% acetic acid로 재 추출하여 상등액을 모아 미리 methanol 2ml과 1% acetic acid 2ml 로 전 처리한 Sep-pak C₁₈ column으로 통과시켰다. 여기에 증류수 2ml, 1% acetic acid 2ml, 50% methanol 0.5ml의 순서로 Sep-pak을 세척하였다. 이 Sep-pak C₁₈ column에 nitrogen을 통과시켜 건조한 다음 ethylacetate와 hexane의 혼합용액(20:80) 0.5ml로 column에 흡착된 cholesterol을 유출시키고(3회) 이를 nitrogen으로 농축 후 methanol 1ml로 희석하여 HPLC시료로 사용하였다.

Recovery test는 cholesterol STD 1 ml, 3 ml, 5 ml (1 mg/1 ml in ethanol)을 첨가하여 위와 동일한 방법으로 추출하였다(ethanol량은 각각 4 ml, 2 ml, 0 ml 첨가).

3. HPLC를 이용한 Cholesterol 분석

HPLC 조건은 Table 1 같고, 이동상은 다음과 같이 3 가지 이동상을 사용하였다²²⁾. 이동상 1, Acetonitrile : Methanol(3:1) : 이동상 2, Acetonitrile : 2-Propanol(8:1); 이동상 3, Acetonitrile : Methanol : Isopropanol(7:2:1)

Table 1. HPLC condition

Instrument : Waters Associates HPLC
Column : Nova Pak C18 (3.9 x 300 mm)
Detector : Waters 486 absorbance detector (205 nm)
Solvent : Acetonitrile : Methanol(3:1)
Acetonitrile : 2-Propanol(8:1)
Acetonitrile : Methanol : Isopropanol(7:2:1)
Flow rate : 1.6 ml/min

4. Colorimetric method에 의한 cholesterol의 속성 정량 방법

HPLC와 동일한 방법으로 cholesterol을 추출하고 감압농축한 시료에 발색시약인 *o*-phthalaldehyde(50mg/100ml glacial acetic acid) 4ml를 첨가하여 용해시킨 후 10분동안 방치했다가 conc. H₂SO₄ 2ml를 첨가하여 교반하였다²³⁾. 그 후 Beckman DU 650 spectrophotometer로 550nm에서 흡광도를 측정하였다.

Recovery test의 경우 cholesterol STD 1 ml, 3 ml, 5 ml (1 mg/1 ml in ethanol)을 첨가하여 위와 동일한방법으로 추출하였다(ethanol량은 각각 4 ml, 2 ml, 0 ml 첨가).

제 2 절 Saponin을 이용한 우유 및 크림 중 cholesterol 제거에 대한 개발

1. 재료

우유는 서울우유협동조합의 균질한 시유(유지방함량 3.6%)를 시중에서 구입하여 사용하였고, 크림은 유지방 함량이 36%인 유크림을 (주)삼익유가 공으로부터 공급받아 사용하였다. Saponin은 quillaja bark로부터 추출한 food-grade용으로 Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA)의 제품을 사용하였으며, 사포닌과 콜레스테롤의 복합체를 흡착하기 위한 흡착제로는 구조토의 일종인 celite 545를 Shinyo Pure Chem. Co. (Osaka, Japan)로부터 구입하여, 이를 증류수에 첨가하여 교반 후 정치시켰을 때, 가라앉는 부분만을 수거하여 100℃에서 건조 후 사용하였다.

2. Saponin을 이용한 우유 중의 cholesterol 제거에 대한 개발

가. 우유의 cholesterol 제거 최적조건 결정

1) 우유의 Saponin 처리

우유에 saponin을 첨가하고 수조에서 100rpm으로 교반하면서 일정시간 반응시킨 후 celite를 첨가하여 동일온도에서 1시간동안 흡착시켰다. 그후 saponin과 cholesterol의 복합체를 제거하기 위하여 5,000×g, 4℃에서 20분간 원심분리한 후, 지방층인 상층부를 모아 여과지(Whatman filter

paper No. 1)로 물기를 제거하였다(Fig. 1).

가) saponin 첨가량의 영향

Saponin을 우유량의 0.5~2.0%(w/v)까지 0.5%간격으로 우유에 첨가한 후 35℃에서 30분간 반응시킨 후, 원심분리하여 제거된 cholesterol의 함량을 측정하였다.

나) 반응온도의 영향

반응온도가 우유중의 cholesterol 제거에 미치는 영향을 조사하기 위하

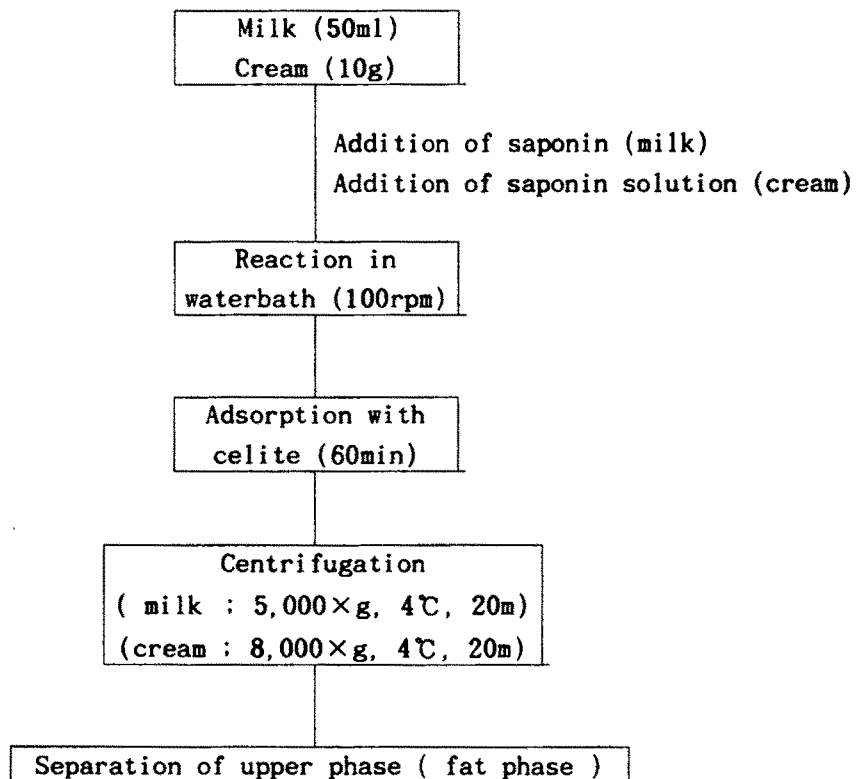


Fig. 1. Schematic diagram for the process of saponin treatment

여 우유와 1.5% saponin 혼합물을 25℃, 35℃, 및 45℃에서 각각 30분씩 반응시키고 원심분리하고 상층부를 분리하여 제거된 cholesterol의 함량을 측정하였다.

다) Saponin과의 반응시간의 영향

우유중의 cholesterol 제거에 대한 saponin과의 반응시간의 영향을 조사하기 위해 반응시간을 10분, 30분, 및 50분으로 설정하여 우유량의 1.5%에 해당하는 saponin을 우유에 첨가하여 45℃에서 반응시켰다.

라) Celite 첨가량의 영향

우유에 우유량의 1.5%에 해당하는 saponin을 첨가하여 45℃에서 30분간 반응시킨 후, celite를 0.25%, 0.75%, 및 1.25%(w/v)로 나누어 첨가하여 흡착시켜 원심분리한 후, 상층으로 제거된 cholesterol의 함량을 측정하였다.

2) Cholesterol 분석

가) Cholesterol의 추출

Cholesterol 추출은 제1절에서 그 우수함이 입증된 방법 III으로 아래와 같이 실시하였다. Screw cap test tube에 분리한 지방층 0.2g에, 95% ethanol 5ml와 80% KOH (in water, w/v) 1ml를 함께 첨가하여 교반한 후, 70℃ 수조에서 20분간 검화하였다. 검화후, 냉각시키고 증류수 2ml와 hexane 5ml를 첨가한 후 교반하여 액상층과 hexane층이 분리되도록 10분간 정치한 후 hexane층을 분리하였다. Hexane으로 2회 더 반복 추출한 후 추

출된 hexane층을 모아 rotary vaccum evaporator로 감압농축하였다.

나) HPLC를 이용한 cholesterol 분석

추출한 cholesterol을 HPLC용 methanol 1ml에 녹여 0.45 μ m Gelman filter로 여과한 후 제1절에서 확립한 HPLC 조건으로 cholesterol의 함량을 분석하였다. Cholesterol의 HPLC 분석 조건은 Table 1과 같다.

Table 2. Instrument and operation conditions for cholesterol analysis by high performance liquid chromatography

Instrument	:	Waters associates HPLC
Column	:	Nova-Pak C ₁₈ (3.9 \times 300nm)
Detector	:	Waters 486 absorbance detector (205nm)
Solvent	:	Methanol : Acetonitrile : Isopropanol = 7 : 2 : 1 (v/v)
Flow rate	:	1.6ml/min
Temperature	:	35 $^{\circ}$ C
Injection vol.	:	20 μ l

3) Saponin 처리 후 우유에 잔존하는 saponin 함량 측정

우유에 saponin 첨가량을 달리하여(0.5, 1.0, 1.5, 2.0%) 반응시켰을 경우와 saponin과 반응시킨 후 celite로 흡착하였을 때에, 우유에 잔존하는 saponin의 함량(%Quillaja Powder Residues content)을 Sundfeld 등 (1993b)의 방법으로 측정하였다. saponin 및 celite와 반응시킨 1000 \times g에서 20분간 우유를 원심분리하여 상층의 지방층을 모아 %QPR을 측정하였다.

나. 반응표면분석법에 의한 우유중의 cholesterol 제거 조건의 최적화

1) Experimental design block 설정

Stat-graphics (STSC Inc. Rockville, MD, USA)내의 central composite design(CCD) program을 이용하여 saponin과의 반응시간, celite의 첨가량, 반응온도, saponin농도 등을 독립변수로 3 level-4 factor의 fractional factorial block을 정하였다(Table 3). Saponin과의 반응시간은 최대 50분, 최소 10분, 중간값 30분동안 반응시키고, celite의 첨가량은 우유량에 대해 최대 1.25%, 최소 0.25%, 중간값 0.75%로, 반응온도는 최대 45℃, 최소 25℃, 중간값 35℃로, saponin의 양은 최대 1.5%, 최소 0.5%, 중간값 1.0%가 되도록 각각 독립변수의 level을 설정하였다.

2) 우유중의 cholesterol 제거

3 level-4 factor에 의해 design된 fractional factorial block에 따라 우유를 처리하고 4℃, 5,000×g에서 20분간 원심분리 한 후 이때 분리된 상층의 지방층에 함유되어 있는 cholesterol량을 구하여 제거된 cholesterol의 함량을 측정하였다.

3) Cholesterol의 정량분석

원심분리한 후 분리한 상층의 지방층의 물기를 filter paper(Whatman filter paper No. 4)로 제거하고 이를 시료로 삼아 cholesterol을 추출하

Table 3. Fractional factorial block of experimental design for cholesterol removal from milk

Treatment		Coded var.				Process var.			
No.		X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
1		-1	-1	-1	+1	10	0.25	25	1.5
2		-1	-1	+1	-1	10	0.25	45	0.5
3		-1	+1	-1	-1	10	1.25	25	0.5
4		-1	+1	+1	+1	10	1.25	45	1.5
5		+1	-1	-1	-1	50	0.25	25	0.5
6		+1	-1	+1	+1	50	0.25	45	1.5
7		+1	+1	-1	+1	50	1.25	25	1.5
8		+1	+1	+1	-1	50	1.25	45	0.5
9		0	0	0	0	30	0.75	35	1.0
10		0	0	0	0	30	0.75	35	1.0
11		-1	-1	-1	-1	10	0.25	25	0.5
12		-1	-1	+1	+1	10	0.25	45	1.5
13		-1	+1	-1	+1	10	1.25	25	1.5
14		-1	+1	+1	-1	10	1.25	45	0.5
15		+1	-1	-1	+1	50	0.25	25	1.5

(continued)

Treatment No.	Coded var.				Process var.			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
16	+1	-1	+1	-1	50	0.25	45	0.5
17	+1	+1	-1	-1	50	1.25	25	0.5
18	+1	+1	+1	+1	50	1.25	45	1.5
19	0	0	0	0	30	0.75	35	1.0
20	0	0	0	0	30	0.75	35	1.0
21	+1	0	0	0	50	0.75	35	1.0
22	-1	0	0	0	10	0.75	35	1.0
23	0	+1	0	0	30	1.25	35	1.0
24	0	-1	0	0	30	0.25	35	1.0
25	0	0	+1	0	30	0.75	45	1.0
26	0	0	-1	0	30	0.75	25	1.0
27	0	0	0	+1	30	0.75	35	1.5
28	0	0	0	-1	30	0.75	35	0.5
29	0	0	0	0	30	0.75	35	1.0
30	0	0	0	0	30	0.75	35	1.0

X₁ : reaction time with saponin (min).

X₂ : amount of celite addition (%).

X₃ : reaction temperature (°C).

X₄ : amount of saponin addition (%).

고 HPLC로 분석하였다.

4) 반응표면분석법에 의한 우유의 cholesterol 제거 최적조건의 결정

Saponin 처리에 의해 제거된 cholesterol 함량을 종속변수로 설정한 후 각 독립변수들 간의 관계를 SAS(SAS Institute Inc. Cary , NC, USA)로 다중회귀분석 및 분산분석을 실시한 후 유의성이 인정되는 변수만을 채택하여 각 종속변수에 해당하는 model식을 설정하고 이를 RSM에 의하여 등고분석과 3차원 분석을 실시하여 최적조건을 설정하였다.

3. Saponin을 이용한 크림 중의 cholesterol 제거에 대한 개발

가. 크림의 cholesterol 제거 최적조건 결정

1) 크림의 saponin 처리

크림 10g에 동량의 saponin 용액을 pH를 조절하여 첨가하고 수조에서 100rpm으로 교반하면서 30분간 반응시킨 후 celite를 첨가하여 동일온도에서 1시간동안 흡착시켰다. 그후 saponin과 cholesterol의 complex를 제거하기 위하여 8,000×g, 4℃에서 20분간 원심분리하고, 지방층인 상층부를 분리한 다음 여과지(Whatman filter paper No. 1)로 물기를 제거하였다 (Fig. 1).

가) Saponin 첨가량의 영향

Saponin용액의 농도를 1, 5, 10, 15%로 조절하여 pH를 7.0으로 맞추

후, 크림과 50℃에서 30분간 반응시켜 cholesterol의 함량을 측정하였다.

나) Saponin 용액의 pH 영향

크림의 cholesterol 제거에 대한 saponin 용액 pH의 영향을 조사하기 위해 5% saponin 용액의 pH를 5.5, 7.0, 8.5로 조절하여 크림에 첨가하고 50℃에서 30분간 반응시켜 cholesterol의 함량을 측정하였다.

다) 반응온도의 영향

반응온도가 크림의 cholesterol 제거에 미치는 영향을 조사하기 위하여 크림과 pH 5.5의 5% saponin 용액을 혼합하여, 40, 50, 60℃에서 각각 30분씩 반응시켰다.

라) Celite 첨가량의 영향

크림과 pH가 5.5인 동량의 5% saponin을 60℃에서 30분간 반응시킨 후, celite 농도를 크림량에 대해 2.5, 7.5, 12.5% 첨가하여 1시간동안 흡착시키고, 원심분리한 후 상층으로 제거된 cholesterol 함량을 측정하였다.

2) Cholesterol 분석

Saponin을 처리한 후 분리한 지방층을 우유의 cholesterol 분석과 동일한 방법으로 추출, 정량분석하였다.

3) Saponin 처리 후 크림에 잔존하는 saponin 함량 측정

크림과 saponin용액을 농도별(1, 5, 10, 15%)로 반응시켰을 경우와 크림

Table 4. Fractional factorial block of experimental design for cholesterol removal from cream

Treatment No.	Coded var.				Process var.			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
1	-1	-1	-1	+1	5.5	2.5	40	15
2	-1	-1	+1	-1	5.5	2.5	60	5
3	-1	+1	-1	-1	5.5	12.5	40	5
4	-1	+1	+1	+1	5.5	12.5	60	15
5	+1	-1	-1	-1	8.5	2.5	40	5
6	+1	-1	+1	+1	8.5	2.5	60	15
7	+1	+1	-1	+1	8.5	12.5	40	15
8	+1	+1	+1	-1	8.5	12.5	60	5
9	0	0	0	0	7.0	7.5	50	10
10	0	0	0	0	7.0	7.5	50	10
11	-1	-1	-1	-1	5.5	2.5	40	5
12	-1	-1	+1	+1	5.5	2.5	60	15
13	-1	+1	-1	+1	5.5	12.5	40	15
14	-1	+1	+1	-1	5.5	12.5	60	5
15	+1	-1	-1	+1	8.5	2.5	40	15

(continued)

Treatment No.	Coded var.				Process var.			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
16	+1	-1	+1	-1	50	0.25	45	0.5
17	+1	+1	-1	-1	50	1.25	25	0.5
18	+1	+1	+1	+1	50	1.25	45	1.5
19	0	0	0	0	30	0.75	35	1.0
20	0	0	0	0	30	0.75	35	1.0
21	+1	0	0	0	50	0.75	35	1.0
22	-1	0	0	0	10	0.75	35	1.0
23	0	+1	0	0	30	1.25	35	1.0
24	0	-1	0	0	30	0.25	35	1.0
25	0	0	+1	0	30	0.75	45	1.0
26	0	0	-1	0	30	0.75	25	1.0
27	0	0	0	+1	30	0.75	35	1.5
28	0	0	0	-1	30	0.75	35	0.5
29	0	0	0	0	30	0.75	35	1.0
30	0	0	0	0	30	0.75	35	1.0

X₁ : reaction time with saponin (min).

X₂ : amount of celite addition (%).

X₃ : reaction temperature (°C).

X₄ : amount of saponin addition (%).

과 saponin용액을 반응시킨 후 celite로 흡착하였을 때에, 크림에 잔존하는 saponin의 함량(%Quillaja Powder Residues content)을 Sundfeld 등의 방법²⁴⁾으로 측정하였다. Saponin 및 celite와 반응시킨 크림을 8000×g에서 20분간 원심분리하여 상층의 지방층을 모아 %QPR을 측정하였다.

나. 반응표면분석법에 의한 크림중의 cholesterol 제거 조건의 최적화

1) Experimental design block 설정

Stat-graphics (STSC Inc. Rockville, MD, USA)내의 central composite design(CCD) program을 이용하여 saponin 용액의 pH, celite의 첨가량, 반응온도, saponin농도 등을 독립변수로 3 level-4 factor의 fractional factorial block을 정하였다(Table 4). Saponin 용액의 pH는 최대 8.5, 최소 5.5, 중간값 7.0으로 맞추었으며, celite의 첨가량은 최대 12.5%, 최소 2.5%, 중간값 7.5%로, 반응온도는 최대 40℃, 최소 50℃, 중간값 60℃로, saponin의 농도는 최대 15%, 최소 5%, 중간값 10%가 되도록 각각 독립변수의 level을 설정하였다.

2) 크림중의 cholesterol 제거

3 level-4 factor에 의해 design된 fractional factorial block에 따라 cream을 처리하고 4℃, 8,000×g에서 20분간 원심분리를 시켜 이때 분리된 상층의 지방층을 이용하여 cholesterol을 분석하고 제거된 cholesterol의 함량을 측정하였다.

3) Cholesterol의 정량분석

원심분리후 분리한 상층의 지방층의 물기를 filter paper(Whatman filter paper No. 4)로 제거하고 이를 시료로 삼아 cholesterol을 추출하고 HPLC로 분석하였다.

4) 반응표면분석법에 의한 크림의 cholesterol 제거 최적조건의 결정

Saponin을 이용하여 제거된 cholesterol의 함량을 종속변수로 설정한 후 각 독립변수들 간의 관계를 SAS(SAS Institute Inc. Cary , NC, USA)로 다중회귀분석 및 분산분석을 실시한 후 유의성이 인정되는 변수만을 채택하여 각 종속변수에 해당하는 model식을 설정하고 이를 RSM에 의하여 등고분석과 3차원 분석을 실시하여 최적조건을 설정하였다.

제 3 절 Cholesterol 제거를 위한 saponin 고정화 방법 개발

1. 재료

우유는 서울우유협동조합의 균질한 시유(유지방함량 3.6%)를 시중에서 구입하여 사용하였고, saponin은 quillaja bark로부터 추출한 food-grade 용으로 Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA)의 제품을 사용하였으며, digitonin 역시 동일 회사에서 구입하여 사용하였다. 기타 다른 시약들은 모두 특급시약을 하용하였다.

2. Saponin과 digitonin의 고정화

Saponin 또는 digitonin은 epoxy을 spacer로하여 Sepharose 4B에 고정화하였다. Sepharose 4B(2g)를 증류수 (5L)로 충분히 세척후에 1,4-butane diglycidyl ether 2 ml와 0.6N sodium hydroxide 2 ml을 가하여 24간 동안 반응시킨후에 증류수(5L)로 세척하고 감압 건조하였다. Sepharose을 saponin 또는 digitonin 140 mg과 carbonate buffer (pH 10) 5 ml을 가하여 nitrogen blanket 상태에서 24시간 반응시켰다. 반응된 Sepharose 1g과 우유 10 ml을 혼합하여 1 시간동안 교반한 후 1 시간 정치하여 Sepharose을 침전시킨후에 우유를 분리하여 이를 HPLC 시료로 사용하였다.

Saponin을 고정화하기 위한 matrix로서 Sepharose 4B와 silica를 사용하여 예비 실험한 결과 Sepharose는 저온에서 저장하여야 하고, 가격도 silica에 비하여 상대적으로 비싸며, 반응조건도 까다로워 silica를

matrix로 선정하였다. Silica에 saponin을 고정화하기 위하여 이들이 두 물질을 연결하는 적당한 spacer로 γ -glycidoxypropyltrimethoxysilane을 선택하여 반응의 최적조건을 확립하였다.

3. Silica와 epoxy spacer 반응시간의 최적화

Porous silica와 실험에 사용되는 용기를 220℃에서 12 hr 건조시키고 toluene은 sodium으로, triethylamine은 KOH를 사용하여 수분을 제거하여 사용하였다. Silica 15g, toluene 300 ml, triethylamine 450 ml 와 γ -glycidoxypropyltrimethoxysilane 10ml을 혼합하여 6, 12, 18, 24, 및 30시간 reflux 하였다. Reflux하는 동안 6시간 간격으로 γ -glycidoxypropyl trimethoxysilane 3ml 첨가하였다.

4. Epoxy-silica의 epoxy spacer 정량

Epoxy-silica 1g에 0.06N periodate 용액 25 ml을 가하여 실온에서 30분 간 반응시킨 후 $MgSO_4$ 30 μ l을 가하고 현탁액이 될 때까지 1 N NaOH을 첨가하였다. 이 용액에 1 N H_2SO_4 를 첨가하여 투명한 용액을 만들고 $NaHCO_3$ 을 가하여 포화용액을 만들고 표준용액 arsenite용액 10 ml을 첨가하였다. 이 용액을 5분간 정치한 후 녹말 용액을 가하고 iodine 용액으로 적정하여 silica에 반응된 epoxy(γ -glycidoxypropyltrimethoxysilane)을 정량하였다.

제 3 장 연구결과 및 고찰

제 1 절 우유 및 크림의 cholesterol 정량 분석 개발

1. HPLC 분석을 위한 column의 선정 및 이동상의 선정

Column에 따른 cholesterol의 분리능을 비교하기 위하여 Nova pack과 μ Bondapak을 비교한 결과 μ Bondapak column은 Nova pack column을 사용할 경우 cholesterol 직전에 용출되는 성분을 분리하지 못하고 cholesterol과 같이 용출됨으로서 유제품의 cholesterol의 정량에는 부적합것으로 나타났다. 이동상의 조성에 따른 cholesterol의 분리는 Fig.2과 같다. 2-propanol을 이동상으로 사용할 경우 2-propanol의 높은 고유 점도를 고려하여야 한다. 이동상 1에서 2-propanol의 조성을 높이면 cholesterol의 용출 시간을 단축할 수 있으나 column에 높은 압력으로 column과 pump에 나쁜 영향을 줄 수 있다(Fig.2, A). 이동상으로 acetonitrile과 methanol을 사용할 경우 3:1의 조성이 가장 좋았으며 cholesterol의 용출 시간을 단축하기 위하여 methanol이나 acetonitrile의 조성을 높이면 분리의 효과는 낮아지는 것으로 나타났다. 이동상 2에 2-propanol을 추가할 경우에 cholesterol의 용출시간을 단축할수 있었다. 2-propanol의 조성을 높이면 cholesterol 이전에 용출되는 성분과 분리가 되지 않으며 column의 back pressure도 상당히 증가 되었다.

2. 추출방법에 따른 cholesterol 함량

추출방법에 따라 cholesterol과 함께 추출되는 성분은 많은 차이를 보여

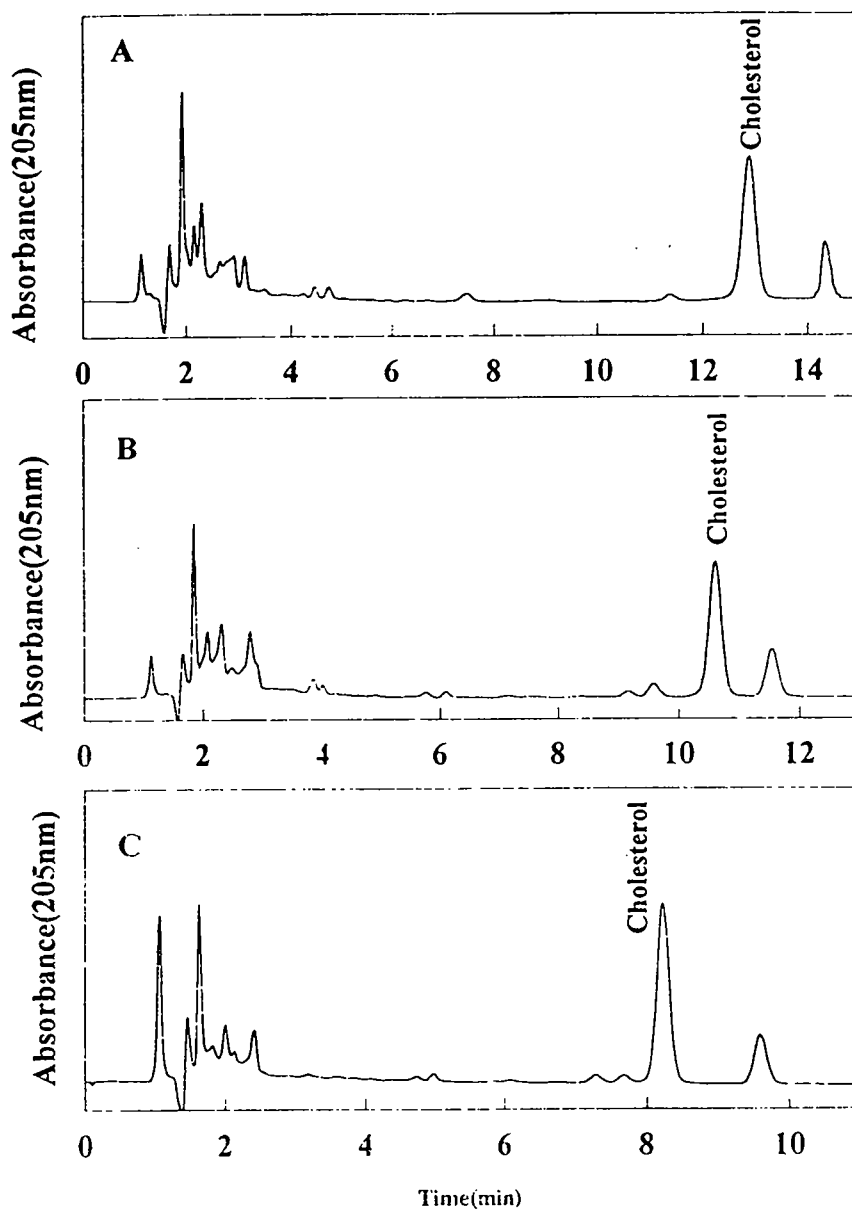


Fig 2. HPLC chromatograms of cholesterol in milk as affected by mobile phases

A: Acetonitrile : 2-propanol(8:1),

B: Acetonitrile : methanol(3:1),

C: Acetonitrile : methanol : 2-propanol(7:3:1)

준다(Fig. 3). 추출방법 I은 AOAC방법과 유사한데 이 방법이 cholesterol을 추출하는데 가장 많이 이용된다. cholesterol 추출시 diethyl ether를 사용하면 수용액 층의 자유지방산과 glycerol이 함께 추출이 되며 많은 극성 물질도 추출이 되어 cholesterol의 분리에 방해물질로 작용을 한다. Fig. 2의 A에 나타나지는 않았지만 cholesterol의 용출시간을 연장하면 cholesterol과 함께 다른 성분이 용출되는 것을 볼 수 있었다. Cholesterol 이외에 많은 성분이 추출되어 column에 주입이 되면 column의 수명에 많은 영향을 초래한다. Diethyl ether는 화기 위험성도 강할뿐만 아니라 gas 흡입 시 분석자의 건강을 해할 우려가 있어 실험에 있어 주의해야 하는 용매로 추출용매로 사용 시 고려해야 한다. 추출방법 II는 추출방법 I으로 추출한 시료를 Sep-pak C₁₈에 통과시킨 것으로 많은 성분들이 제거되었지만 chromatogram의 base line은 아직 많은 방해물질을 포함하는 것을 보여준다. 추출방법 II로 cholesterol 전에 용출되는 방해물질은 제거되지 않아 분리에 있어 실제 방법 I와 큰 차이점이 없는 것으로 간주된다. 추출방법 III는 diethyl ether대신에 hexane으로 cholesterol을 추출하였다. Hexane은 자유지방산등과 같은 극성물질을 적게 추출하여 바람직한 chromatogram을 보여준다. 최근에 hexane 추출용매로 diethyl ether의 대용으로 사용이 되며 hexane으로 회수율이 낮으면은 추출 시 수용액층에 물의 조성을 높여줌으로 의해 회수율을 높일 수 있다. 추출방법 IV(SPE)는 Sep-pak C₁₈을 이용하여 추출하는 방법으로 짧은 시간에 다량의 시료를 추출할수 있어 시료의 전처리 방법으로 널리 사용되고 있다. 그러나 Sep-pak C₁₈을 사용하기 위해서는 시료에 따라 Sep-pak C₁₈의 사용조건을 개발 해야하는 단점이 있다. SPE 방법에 있어 재현성해서는 비누화한 용액의 pH를 2-5의 범위로 조절해야 하며 여기서 사용된 15% acetic acid는 pH를 조절하기 위해 사용되었다. pH의 조절은 자유지방산에 의한

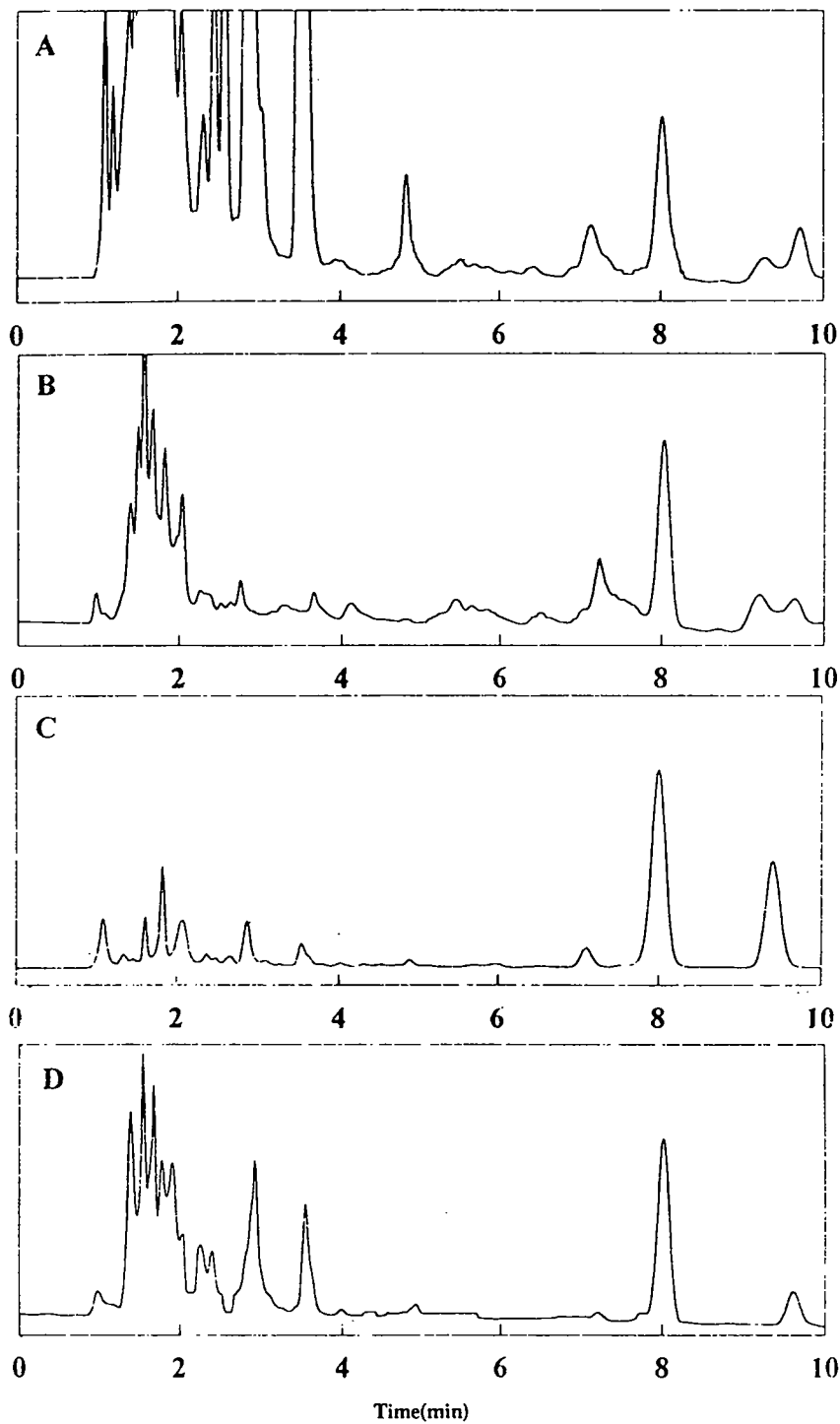


Fig 3. HPLC chromatograms of cholesterol in milk as affected by extraction method

A: Extraction Method I, B: Extraction method II
 C: Exartction Method III, D: Extraction method IV

cholesterol의 흡착 방해를 줄일 수 있다.

추출방법에 따른 회수율은 차이가 없었다(Table 5). 추출 방법 II에 있어서는 다소 낮은 회수율을 보였는데 이는 전처리 과정이 복잡하여 시료의 손실을 예상할 수 있으며 SEP tube에 흡착된 cholesterol이 용출되지 않을 수 있다. 회수율 결정에 사용되는 cholesterol의 농도를 높이면 회수율이 낮아질 수 있으므로 추출시 추출 용매를 많이 사용해야 한다. 특히 SPE의 경우에는 흡착제 흡착할수 있는 양을 산출하여 사용하여야 한다. 일반적으로 흡착제(C₁₈)가 흡수할수 있는 양은 약 5mg(100mg의 흡착제)인 것을 고려할 때 시료의 중의 지방산과 cholesterol양에 따라 추출 시료의 양을 조정해야 한다. SEP의 추출방법으로 유제품의 cholesterol을 추출하였다(Table 6). 유제품 중의 cholesterol을 추출할 경우 시료의 양은 시료가 포함하는 cholesterol의 양을 고려하여 0.2~1g을 취하여 시료를 전처리 하였다. SPE tube의 재사용은 시료의 성분에 따라서 고려해야 하는데 일반적으로 3회 이상 사용시 회수율은 급격히 감소하였다. HPLC을 이용하여 유제품의 cholesterol을 분석시 SPE에 의한 시료 전처리는 단시간에 소량의 용매로 다량의 시료를 처리할 수 있는 장점이 있다.

Table 5. Recovery of cholesterol as extracted by different methods.^a

Extraction method	Recovery		
	1mg	2mg	3mg
Method I	100±0.2	99.3±0.2	99.5±0.5
Method II	98.1±0.4	98.3±0.5	98.8±0.5
Method III	100.3±0.2	100.2±0.2	100.1±0.4
Method IV	99.7±0.3	100.5±0.3	100.7±0.5

^a means of 4 determinations

Table 6. cholesterol content in milk and milk products^a

Sample	Cholesterol (mg/100ml or 100g)
2.6% milk	10.1±0.3
3.6% milk	12.5±0.2
4.6% milk	17.5±0.2
Cream	113.5±0.5
Yoghurt	12.7±0.3
Ice Cream	26.5±0.5
Cheese	84.6±0.6
Butter	253.5±1.4

^a means of 4 determination

3. HPLC 및 colorimetric method를 이용한 우유 및 크림의 cholesterol 함량 측정 및 recovery test

유지방 함량이 2.6, 3.6, 4.6%인 우유와 36%인 크림을 HPLC를 이용한 방법과 비색정량 방법으로 측정하고, 두 방법을 비교하였다. 유지방 함량을 달리한 우유 시료의 cholesterol 함량은 실험 방법에 따라 약간의 차이를 보일 뿐 큰 차이는 없었으나, 비교적 유지방 함량이 낮은 2.6, 3.6, 4.6% 유지방 우유의 경우에는 HPLC 방법으로 분석하였을 때가 비색정량방법으로 분석하였을 때보다 그 함량이 높았고, 오히려 유지방 함량이 높은 크림에서는 비색정량방법으로 분석하였을 때에 cholesterol 함량이 더 높게 나타났다(Table 7). Cholesterol 정량분석의 recovery 실험 결과, HPLC 방법의 경우 99.95~100.10%, 비색정량방법에서는 100.10~101.10%로 대체로 두 방법 모두 매우 양호하게 나타났다(Table 8).

Table 7. Cholesterol content of milk and cream as measured HPLC and colorimetric methods¹

Sample	Cholesterol (mg/100ml)		
	HPLC	Colorimetric	
Milk	2.6%	10.06	9.35
	3.6%	12.46	11.20
	4.6%	17.52	16.07
Cream	36%	119.50	124.00

¹Means of 6 replicates.

Table 8. Recovery test of cholesterol in milk as measured by HPLC and colorimetric methods¹

Cholesterol added	Recovery (%)	
	HPLC	Colorimetric
1ml milk + 1mg	100.10	100.10
1ml milk + 3mg	99.95	101.10
1ml milk + 5mg	100.00	100.90

¹Means of 6 replicates.

제 2 절 Saponin을 이용한 우유 및 크림 중 cholesterol 제거에 대한 개발

1. Saponin을 이용한 우유 중의 cholesterol 제거에 대한 개발

가. 우유의 cholesterol 제거 최적조건 결정

1) Saponin 첨가량의 영향

Saponin으로 우유의 cholesterol을 제거할 때, saponin의 첨가량이 cholesterol 제거에 미치는 영향을 알아보기 위해, saponin의 첨가량을 우유량의 0.5, 1.0, 1.5, 2.0%(w/v)로 달리하여 35℃에서 30분간 반응시킨 결과, saponin 첨가량이 증가할수록 cholesterol 제거율이 증가하여 처리 전 우유의 cholesterol량인 12.46mg/100ml에서 saponin이 1.5% 첨가되었을 때의 cholesterol량은 3.75mg/100ml로 69.94%의 cholesterol이 제거되어 가장 높은 제거율을 나타내었으나, saponin 첨가량이 2.0%인 경우에는 cholesterol량이 3.97mg/100ml로 오히려 cholesterol 제거율이 68.11%로 낮았다(Fig. 4). 이는 saponin의 첨가량이 필요 이상이 될 때는 cholesterol에 대한 saponin분자들 간의 경쟁 작용이 심해져서 오히려 cholesterol 제거 효과가 저해되는 것으로 추정된다. 이 결과는 옥이²⁵⁾ cholesterol 용액에 인삼 saponin을 첨가하여 cholesterol의 용해도에 관한 실험을 했을 때, saponin의 첨가량이 증가할수록 free cholesterol의 양이 감소하다가 일정 수준 이상이 되면 더 이상 cholesterol의 양이 감소하지 않고 일정수준을 유지하게 된다는 결과와 유사하며, Micichi²⁶⁾가

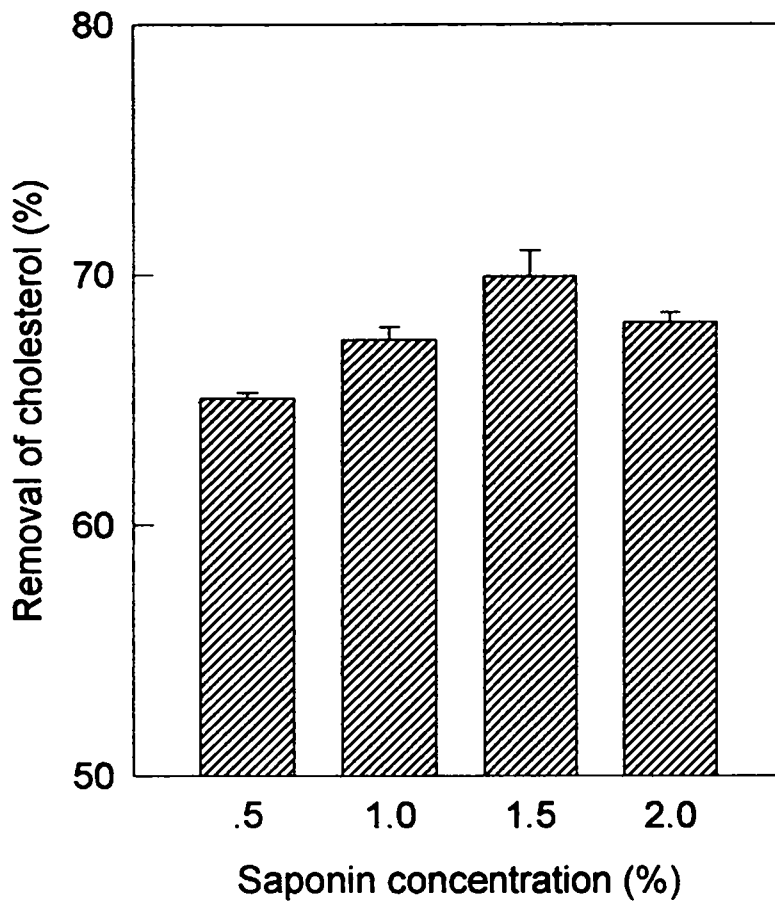


Fig. 4. Effect of saponin concentration on the removal of cholesterol from milk by reaction at 30min, 35°C.

digitonin의 양이 polymer g당 0.13mmol일때까지는 cholesterol의 제거율이 증가하다가, 그 이상의 양이 되면 cholesterol의 제거율이 서서히 감소하는 결과와도 일치한다. 이와 유사한 보고로는 Sundfeld 등²⁴⁾이 butteroil에서 cholesterol을 제거할 때 용액의 농도가 0.40g/ml인 것이 0.04g/ml인 경우 보다 1.4배 정도 제거 효과가 컸다고 보고하였다.

2) 온도의 영향

Saponin을 이용하여 우유의 cholesterol을 제거할 때, cholesterol 제거에 미치는 온도의 영향을 규명하기 위해 우유에 우유량의 1.5%의 saponin을 첨가하고 25℃, 35℃, 및 45℃에서 30분간 반응시켰다. 그 결과 45℃에서 반응한 경우가 cholesterol의 함량이 12.46mg/100ml에서 3.68mg/100ml로 감소되어 cholesterol 제거율이 70.48%로 가장 높았으며, 25℃와 35℃에서는 각각 4.61, 3.78mg/100ml로 감소되어 63.04, 69.92%의 cholesterol 제거율을 나타내었다(Fig. 5). 따라서, saponin과 cholesterol과의 결합이 온도가 높을수록 활발히 일어난다는 것을 알 수 있어 이들의 반응이 hydrophobic interaction에 기인한 것이라고 추정된다.

이 결과는 일반적으로 cholesterol을 흡착방법으로 제거할 때 40~50℃ 범위에서 흡착제와 반응시킨다는 보고¹⁶⁾와 일치하며, 옥²⁵⁾이 인삼 saponin 배당체를 첨가하여 cholesterol과 반응시켰을 때 비교적 높은 온도인 50~60℃에서 free cholesterol의 양이 가장 낮았다는 보고와도 유사하였다.

3) Saponin과의 반응시간의 영향

본 연구에서는 우유의 cholesterol과 saponin을 결합시키기 위한 적당한 반응시간을 선택하기 위하여 saponin이 우유와 쉽게 섞일 것을 고려해 반

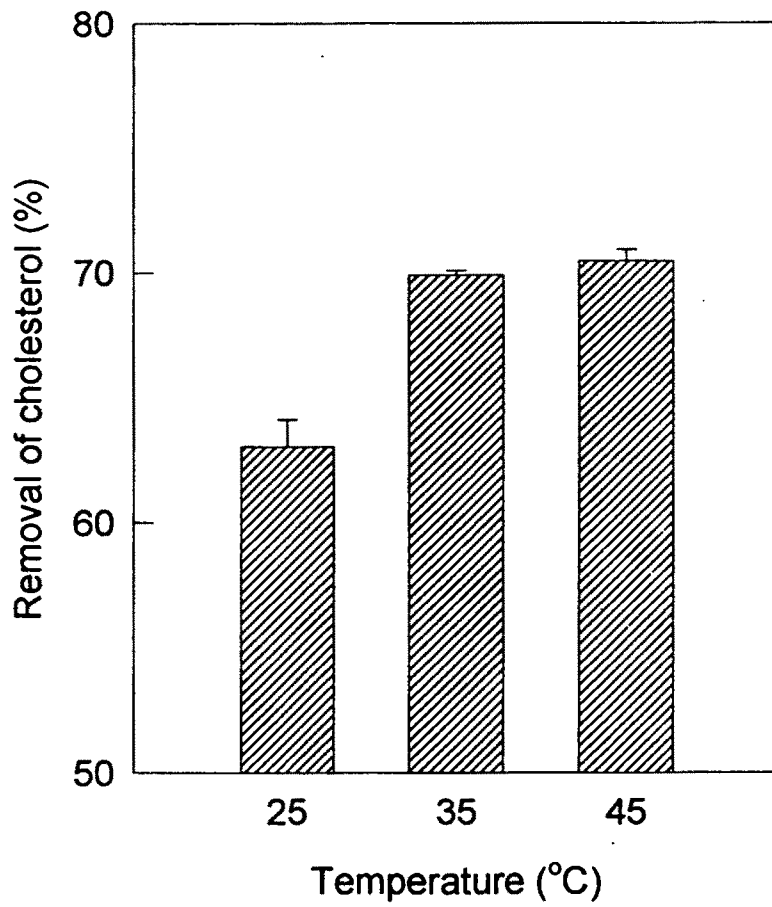


Fig. 5. Effect of temperature on the removal of cholesterol from milk by reaction with 1.5% saponin for 30min.

응시간을 10, 30, 50분으로 정하고, saponin 첨가량은 우유의 1.5%, 반응 온도는 45℃로 하여 반응시간의 영향을 비교한 결과는 Fig. 6와 같다. saponin과의 반응시간이 30분일 때, cholesterol의 함량은 12.46mg/100ml에서 3.68mg/100ml로 감소되어 cholesterol 제거율이 70.50%로 가장 높았고, 반응시간이 30분보다 짧거나 긴, 10분과 50분에서는 cholesterol량이 각각 4.67과 4.15mg/100ml로 감소되어 오히려 cholesterol 제거율이 각각 62.55, 66.73%로 낮았다. 따라서 saponin과 우유의 반응시간이 30분일 때가 cholesterol 제거에 가장 효과적이라는 것을 알 수 있었다. 이 결과는 saponin을 이용하여 butteroil로부터 cholesterol을 제거할 때 반응시간이 30분에서 최고이며, 그 이상의 반응시간에서는 큰 차이가 없었다는 Sundfeld 등⁴⁾의 보고와 유사하였고, 인삼 saponin 배당체인 panaxadiol과 panaxatriol이 cholesterol의 용해도에 미치는 영향을 연구한 옥²⁵⁾도 30분에서 최고의 제거율을 보였다고 보고한 바 있다. 따라서 saponin과 cholesterol의 반응에 있어서 반응시간이 너무 길어지면 오히려 saponin과 cholesterol간의 상호작용이 약해져서 micellar 복합체로부터 saponin과 cholesterol이 분리되어 나옴을 알 수 있었다.

4) Celite 농도의 영향

규조토의 일종인 celite는 일반적으로 식품공업에서 여과공정에 사용하며 다양한 유기 및 무기화합물을 제거하는 흡착력을 갖고 있어 많은 화합물의 흡착제로써 이용되고 있다⁴⁾. 따라서 celite를 이용하면 saponin과 cholesterol의 결합체를 흡착하여 우유로부터 효과적으로 cholesterol을 제거할 수 있기 때문에 saponin만으로 우유를 처리했을 때보다는 더 큰 cholesterol 제거효과를 기대할 수 있다.

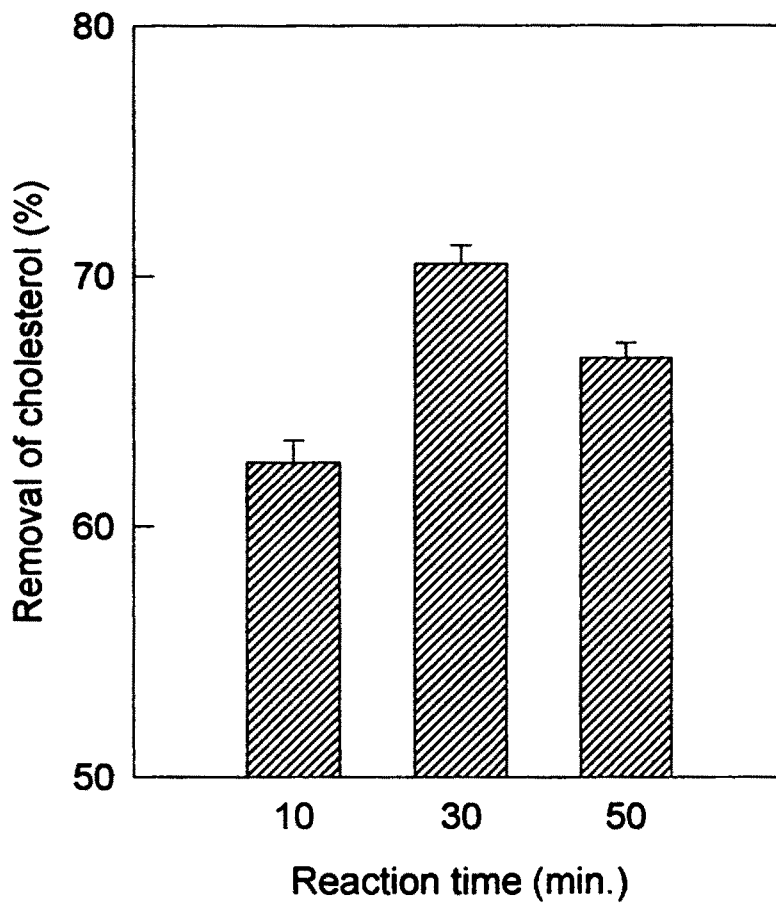


Fig. 6. Effect of reaction time on the removal of cholesterol from milk by reaction with 1.5% saponin at 45°C.

본 연구에서는 celite의 첨가가 콜레스테롤 제거에 미치는 영향을 알아보기 위해 우유를 사포닌만으로 처리한 경우와 사포닌과 celite를 같이 처리한 경우로 나누어 비교실험 하였다(Table 9). 사포닌만으로 처리한 우유는 콜레스테롤 제거율이 70.51% 이었으나, 사포닌과 celite를 같이 처리한 우유는 콜레스테롤 제거율이 71.02%로 그리 큰 차이는 없었으나 celite를 첨가한 경우의 콜레스테롤 제거율이 좀 더 높았다. 이는 Katz 등²⁷⁾과 Schwartz 등^{28,29)}이 celite를 이용함으로써 digitonin을 이용한 cholesterol 제거 실험에서 큰 효과를 얻었다는 보고와 유사한 결과이다.

또한, cholesterol 제거에 가장 효과적인 celite 첨가량을 결정하기 위하여 saponin을 1.5%첨가한 우유를 45℃에서 30분간 반응시킨 후, celite를 우유량에 대해 0.25, 0.75, 1.25%(w/v)씩 각각 첨가하여 비교실험 하였다. 그 결과 celite를 0.25% 첨가했을 때 cholesterol 함량은 12.46mg/100ml에서 3.49mg/100ml로 감소되어 cholesterol 제거율이 72.00%로 가장 높았고, 0.75% 첨가시에는 cholesterol 함량이 3.61mg/100ml로 감소되어 71.02%, 1.25% 첨가시에는 3.91mg/100ml의 cholesterol을 함유하고 있어 68.61%의 제거율을 나타내어 오히려 0.25%

Table 9. Effect of addition of celite on the removal of cholesterol from milk.

Treatment	Removal of cholesterol (%)
Saponin only	70.51 ± 0.33
Saponin and celite	71.02 ± 0.14

Reaction conditions were reaction time, 30 min. ; amount of celite addition, 0.75% ; temp., 45℃ and saponin, 1.5% of milk.

첨가할 때 보다 cholesterol 제거율이 떨어졌다(Fig. 7). 이는 butteroil 중의 cholesterol 제거시, saponin만으로 처리한 경우와 saponin과 함께 celite를 첨가한 경우의 cholesterol 양이 각 시료 1g당 2.08mg과 0.70mg으로 celite를 첨가했을 경우가 cholesterol 제거에 더욱 효과적이라는 Sundfeld 등⁴⁾의 결과와는 유사하나, celite의 첨가량이 증가할수록 cholesterol의 제거율이 증가한다는 결과와는 상이하였다. 이는 실험범위 설정의 차이로 본 실험에서는 celite 첨가농도를 비교적 높게 설정하여 celite 첨가량이 증가할수록 cholesterol 제거율이 커지는 한도범위인 0.25%를 가장 낮은 첨가량으로 설정하였기 때문이라고 생각된다. 따라서 과도한 양의 celite 첨가시, cholesterol과 saponin의 complex에 대한 celite분자간의 경쟁적 작용이 커져서 오히려 cholesterol 제거율이 감소하는 것으로 사료된다.

5) Saponin 처리 후 우유에 잔존하는 saponin의 함량 측정

우유를 saponin과 celite로 처리할 경우, celite는 saponin과 cholesterol의 복합체를 흡착하여 침전하게 되는데, 복합체를 흡착하지 않은 상태의 celite도 자체의 무게가 있어 쉽게 가라앉아 우유로부터 완전히 제거된다. 그러나 saponin의 경우에는 cholesterol을 흡착한 saponin은 모두 제거가 되나, 일부 cholesterol과 반응하지 않은 미량의 saponin은 완전히 제거되지 않고 우유에 잔존할 가능성이 있다²⁴⁾. 따라서 본 연구에서는 우유에 saponin 첨가량을 달리하여(0.5, 1.0, 1.5, 2.0%) 반응시켰을 경우와 saponin과 반응시킨 후 celite로 흡착하였을 때에, 우유에 잔존하는 saponin의 함량(%Quillaja Powder Residues content)을 측정하였다. 그 결과(Table 10), saponin의 첨가량이 증가할수록 높은 %QPR을 나타내었고, saponin만을 첨가한 경우보다, saponin과 celite를 함께 첨가한 경우

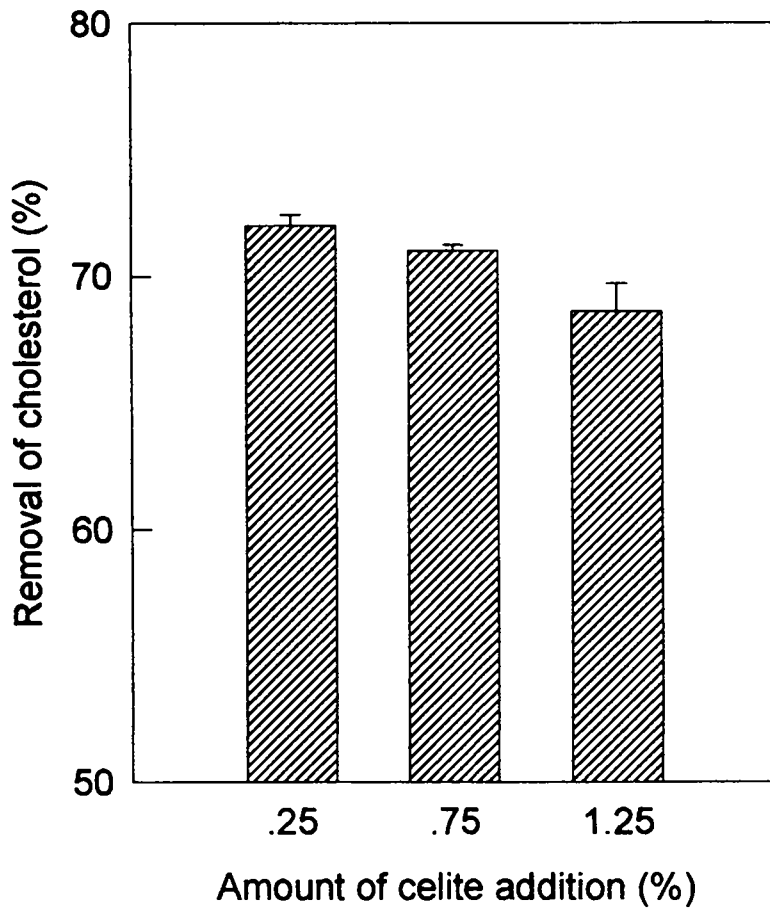


Fig. 7. Effect of amount of celite addition on the removal of cholesterol from milk by reaction with 1.5% saponin at 30min, 45°C.

Table 10. Effects of treatment process and amount of saponin on quillaja powder residue content(%QPR) from milk

Amount of saponin (%)	Saponin residue content (%)	
	Saponin only	Saponin and celite
0.5	0.08±0.002	0.06±0.003
1.0	0.12±0.003	0.07±0.002
1.5	0.13±0.004	0.07±0.002
2.0	0.32±0.008	0.17±0.002

Reaction conditions were reaction time, 30 min. ; amount of celite addition, 0.25% ; temp., 45℃.

의 %QPR이 더 낮았다. 따라서 celite를 첨가하는 것이 우유에 잔존하는 saponin을 제거하는데 좀더 효율적이라는 것을 알 수 있었다. 이는 Sundfeld 등²⁴⁾이 butteroil에서 cholesterol을 제거할 때, saponin과 celite를 함께 처리한 시료의 %QPR이 saponin만을 처리한 시료의 %QPR보다 그 수치가 낮았다는 보고와 유사하다. Saponin 처리후 우유에 잔존하는 사포닌의 양은 특히 콜레스테롤 제거에 가장 효율적인 사포닌 첨가량인 1.5%에서 %QPR은 0.07%로 극미량이며, 본실험에서 사용한 quillaja bark의 사포닌은 이미 식품산업에서 계면활성제 및 거품형성제로 사용되고 있는 물질⁴⁾이므로 안정성에는 문제가 없으리라 사료된다.

나. 반응표면분석법에 의한 우유중의 cholesterol 제거 최적조건의 결정

1) Cholesterol 제거에 대한 Fractional factorial block과 제거율.

Stat-graphics 내의 program중 하나인 central composite design(CCD)을 이용하여 3 level-4 factor로 design하여 우유의 cholesterol 제거율을 중

속변수로하여 측정된 결과는 Table 11와 같다. Saponin과의 반응시간 10분, celite의 첨가량 0.25%, 반응온도 45℃, saponin의 첨가량 1.5%에서 cholesterol 제거율이 72.24%로 가장 높았고, saponin과의 반응시간 50분, celite의 첨가량 1.25%, 반응온도 45℃, saponin의 첨가량 0.5%에서 cholesterol 제거율이 66.44%로 가장 낮았다. 반응시간 10분에서 최대값을 나타내고, 50분에서 최저값을 나타낸 것은 saponin과의 반응시간이 cholesterol 제거율에 영향을 주지 않는다는 Sundfeld 등⁴⁾의 결과와는 차이가 있으나, 일정범위 이내에서는 인삼 saponin과 cholesterol의 반응시간이 갈수록 cholesterol 제거율이 증가한다는 옥 등²⁵⁾의 결과와 고정화된 digitonin을 이용한 cholesterol 제거실험에서 일정 범위이내에서는 반응시간과 cholesterol 제거율이 비례적 관계를 갖고 있다는 Micich²⁶⁾의 보고와는 유사하였다. 또한 Oakenfull 등¹⁶⁾이 silca에 saponin의 일종인 diosgenin을 고정화하여 cholesterol 제거시 최소한 20분이내에 30%의 cholesterol이 제거된다고 하였다. 앞에서 반응시간만의 영향을 조사하였을 때는 30분이 최적반응시간이었으나, 본 실험에서는 반응시간의 단독효과만을 조사한 것이 아니라 반응시간 이외에 다른 조건들이 복합적으로 작용하는 것이기 때문에 그 결과에 차이가 있다고 설명할 수 있다. Celite는 첨가량이 우유의 0.25%일 때 최대의 cholesterol 제거율(72.24%)을 보이고, 1.25%일 때 최저의 제거율(66.44%)을 보이는데, 이것은 앞에서 언급했던 celite만의 단독효과에 대한 실험 결과와 일치하며 celite의 양이 증가할수록 butteroil의 cholesterol 제거율이 증가한다는 Sundfeld 등⁴⁾의 결과와 차이가 있으나, 이런 차이가 나타나는 것은 실험재료의 차이에 의한 것이라 할 수 있겠다. 반응온도는 45℃일 때 cholesterol이 가장 많이 제거되었는데, 이 결과는 saponin을 이용하여 butteroil에서 cholesterol 제

Table 11. Fractional factorial block of experimental design for cholesterol removal from milk

Treatment No.	Coded var.				Removal of cholesterol (%)
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	
1	-1	-1	-1	+1	71.28
2	-1	-1	+1	-1	69.19
3	-1	+1	-1	-1	71.57
4	-1	+1	+1	+1	71.37
5	+1	-1	-1	-1	69.82
6	+1	-1	+1	+1	69.98
7	+1	+1	-1	+1	70.08
8	+1	+1	+1	-1	66.44
9	0	0	0	0	66.66
10	0	0	0	0	66.66
11	-1	-1	-1	-1	70.74
12	-1	-1	+1	+1	72.24
13	-1	+1	-1	+1	69.23
14	-1	+1	+1	-1	71.63
15	+1	-1	-1	+1	70.19

(continued)

Treatment No.	Coded var.				Removal of cholesterol (%)
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	
16	+1	-1	+1	-1	70.79
17	+1	+1	-1	-1	68.57
18	+1	+1	+1	+1	69.50
19	0	0	0	0	66.66
20	0	0	0	0	66.66
21	+1	0	0	0	71.99
22	-1	0	0	0	68.97
23	0	+1	0	0	68.80
24	0	-1	0	0	68.49
25	0	0	+1	0	68.69
26	0	0	-1	0	68.44
27	0	0	0	+1	68.19
28	0	0	0	-1	69.22
29	0	0	0	0	66.66
30	0	0	0	0	66.66

X₁ : reaction time with saponin (min).

X₂ : amount of celite addition (%).

X₃ : reaction temperature (°C).

X₄ : amount of saponin addition (%).

거시 30℃보다 60℃에서 제거효과가 훨씬 크다는 Sundfeld 등²⁴⁾의 결과와 유사하였고, 반응온도의 단독효과에 대한 실험결과 및, Oakenfull 등³⁰⁾의 diosgenin을 고정화하여 cholesterol 제거 실험을 실시했을 때 18℃에서의 1.5%를 첨가하였을 때에 최대 제거율을, 0.5%를 첨가하였을 때에는 최소 제거율을 나타내었다. 이는 일정범위 이내에서 saponin의 첨가량이 증가할수록 butteoil에서 cholesterol 제거효과가 증가한다는 Sundfeld 등²⁴⁾의 결과와 일치하며, Micich 등²⁸⁾이 digitonin을 고정화하여 cholesterol을 제거할 때, smith 등³¹⁾이 난황에서 β -CD를 이용하여 cholesterol을 제거할 때에도 일정범위내에서 흡착제의 첨가량이 증가할수록 cholesterol 제거효과도 증가하였다는 보고와 일치하였다. 그러나 saponin 첨가량 단독효과에 대한 실험 결과와는 차이가 있는데, 이는 여러변수들이 혼합되어 복합적으로 작용하였기 때문인 것으로 생각된다.

2) 우유의 cholesterol 제거 조건의 최적화

Saponin을 이용하여 우유중의 cholesterol의 제거율을 높이기 위하여 saponin과의 반응시간, celite 첨가량, 반응온도, saponin 첨가량을 독립변수로 설정하고, cholesterol 제거율을 종속변수 Y로 설정하여 다중회기 분석을 수행한 결과는 Table 12와 같다. 이 결과를 근거로 하여 95% 유의수준에서 유의성이 있는 독립변수만을 채택하여 나머지는 기각 시키고 상수, X_1 항인 반응시간, 교호작용을 나타내지 않는 interaction terms 중 반응시간×celite 첨가량×반응온도, 동일한 변수들간의 교호작용을 나타내지 않는 quadratic terms 중 반응시간으로 model식 $Y = 76.170922 - 0.527165X_1 + 0.006374X_1^2 - 0.008311X_1X_2X_3$ 를 얻었다. 다중회기분석 전체에 대한 분산 분석 (Table 13)을 수행한 결과 유의수

Table 12. Values of regression coefficient calculated by RSM program for the removal of cholesterol

Ind. variable	Coefficient	t-value	Prob> T
Constant	76.170922	32.1917	0.0000***
X ₁	-0.527165	-4.1788	0.0006***
X ₃	-0.161345	-1.7704	0.0946
X ₁ ²	0.006374	5.8207	0.0000***
X ₁ × X ₂	0.120682	1.7131	0.1049
X ₁ × X ₃	0.006612	1.8624	0.0799
X ₁ × X ₄	0.068521	1.0422	0.3119
X ₂ × X ₃	0.137055	2.6196	0.0179
X ₂ × X ₄	-4.262896	-2.5785	0.0195
X ₃ × X ₄	0.091429	2.0983	0.0511
X ₁ × X ₂ × X ₃	-0.008311	-2.9442	0.0091**
X ₁ × X ₃ × X ₄	-0.004302	-1.7808	0.0928
X ₁ × X ₂ × X ₃ × X ₄	0.003748	2.7803	0.0128

X₁ : reaction time, X₂ : amount of celite addition, X₃ : reaction temp., X₄ : amount of saponin addition

p<0.01, *p<0.001

Table 13. Analysis of variance for full regression of the removal of cholesterol

Source	Sum of Squares	DF	Mean squares	F-value
Model	71.1206	12	5.92672	4.28993*
Error	23.4862	17	1.38154	
Total	94.6069	29		

* : p<0.1

준을 검정하는 F-value도 93% 수준에서 유의성을 나타내어 다중회기분석에 의하여 선정된 각 변수에 의해 설정된 model식이 93% 수준에서 유의성이 있었음을 알 수 있다. 위에서 얻은 model식에 대해 반응표면분석법을 수행하여 Fig. 8-10과 같은 결과를 얻었다. 독립변수 중 반응시간을 고정시켜 분석한 결과 반응시간 10분 일 때 celite 첨가량 0.32%, 반응온도 27℃ 부근에서 반응값이 70.8%로 최고 반응 값을 나타내었고, 반응시간 50분일 경우에는 celite 첨가량 1.25%, 반응온도 43℃ 부근에서 44.8%로 최저 반응값을 나타내었다. 독립변수 celite 첨가량을 고정하였을 때는 celite 첨가량 0.25%일 때 반응시간 11분, 반응온도 32℃ 부근에서 70.9%로 가장 높은 반응값을 나타내었고, celite 첨가량이 1.25%일 때 반응시간 47분, 반응온도 44℃ 부근에서 45.3%로 가장 낮은 반응값을 보였다. 반응온도를 고정시켰을 경우 온도가 25℃일 때 반응시간 10분, celite 첨가량 0.3% 부근에서 71.0%로 최고값을 보였고, 온도가 45℃일 경우에는 반응시간 47분, celite 첨가량 1.25% 부근에서 최소값 46.5%를 나타내었다. 이상의 결과로 적정 반응시간은 10~11분이며, celite 첨가량은 0.25~0.32%이고, 반응온도는 25~32℃임을 알 수 있었다. 최고의 cholesterol 제거효과를 보이는 각 독립변수의 최적조건값을 미분하여 반응시간 10분, celite 첨가량 0.25%, 반응온도 25℃를 얻었으며, 이 최적 조건을 model식에 대입하여 얻은 우유의 최대 cholesterol 제거율은 71.02%로, 실험에 의한 실측 제거율 72.27%와 거의 유사하였다.

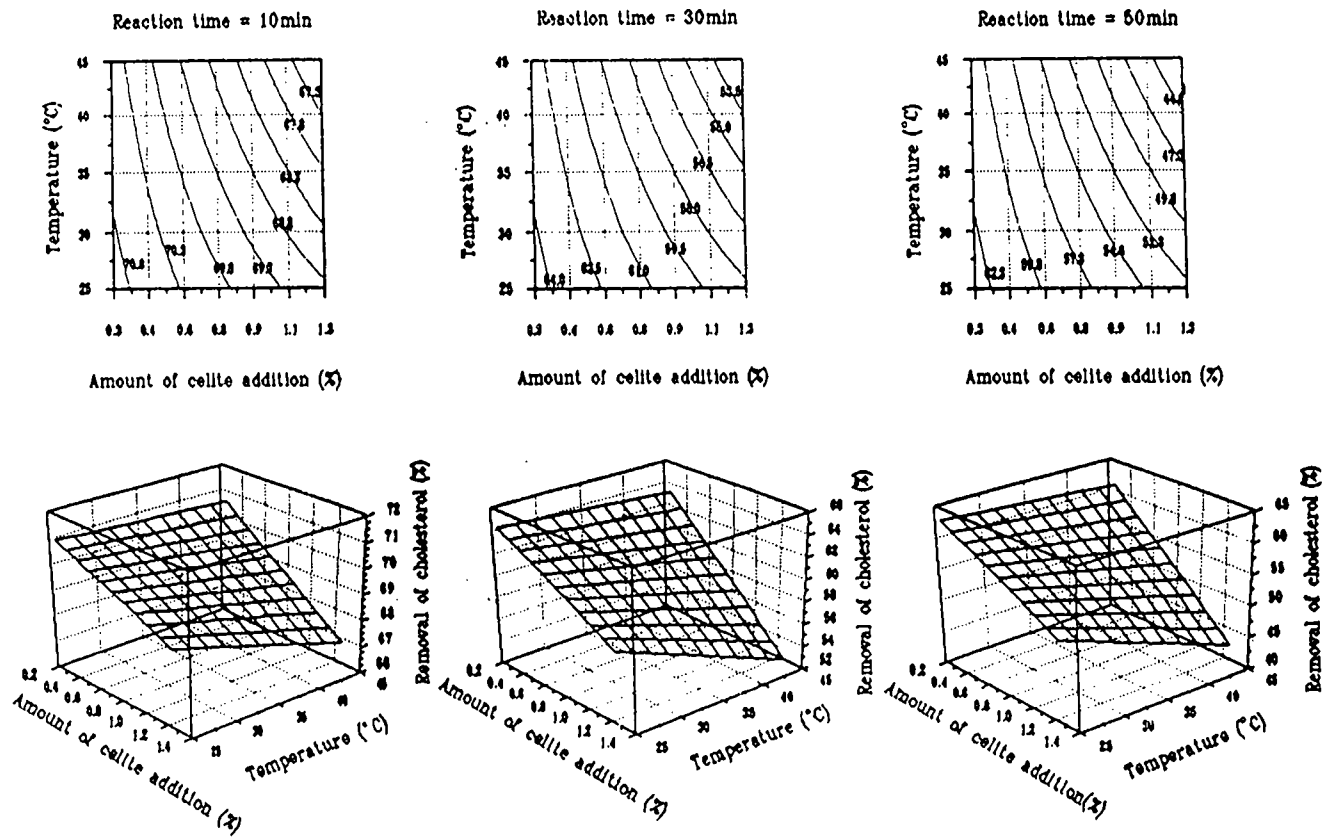


Fig. 8. Response surfaces and contour plots of the removal of cholesterol from milk at constant reaction time of 10, 20 and 30 min, respectively.

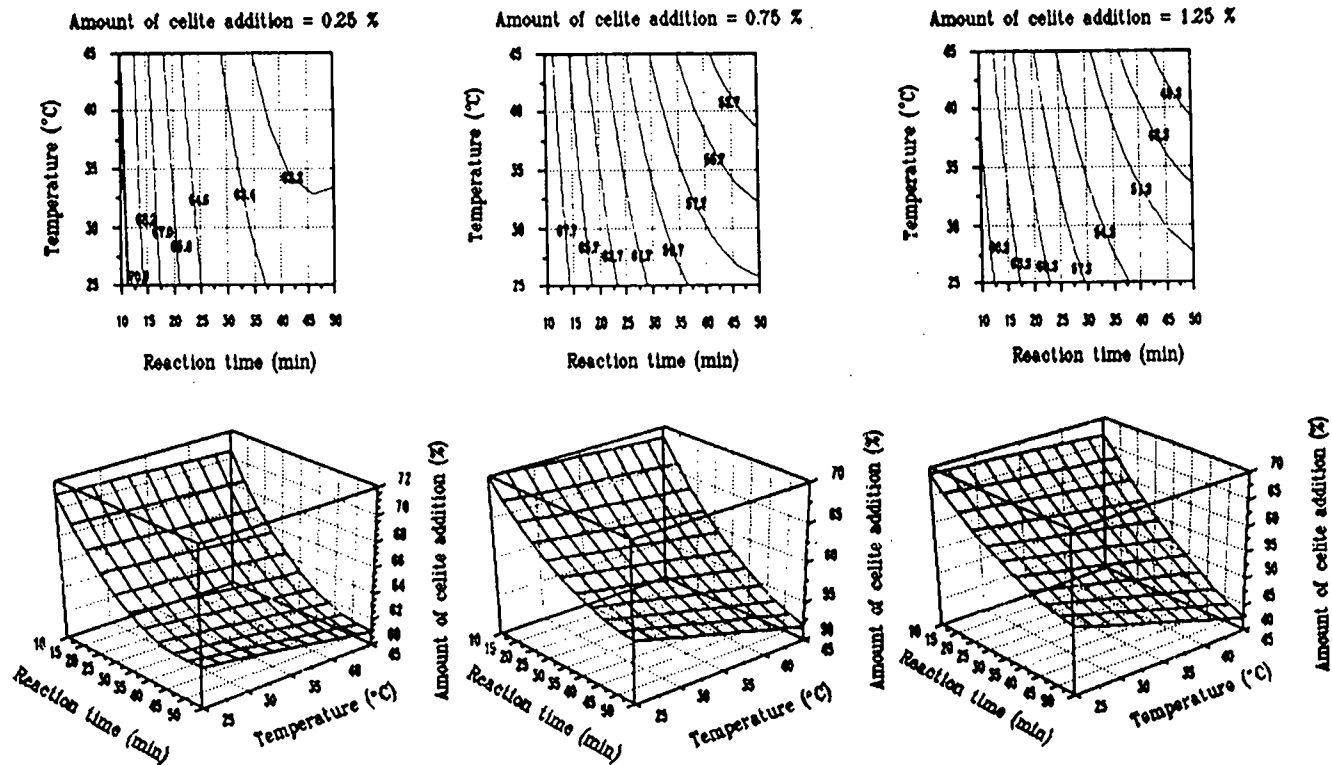


Fig. 9. Response surfaces and contour plots of the removal of cholesterol from milk at constant amount of celite addition of 0.25, 0.75 and 1.25%, respectively.

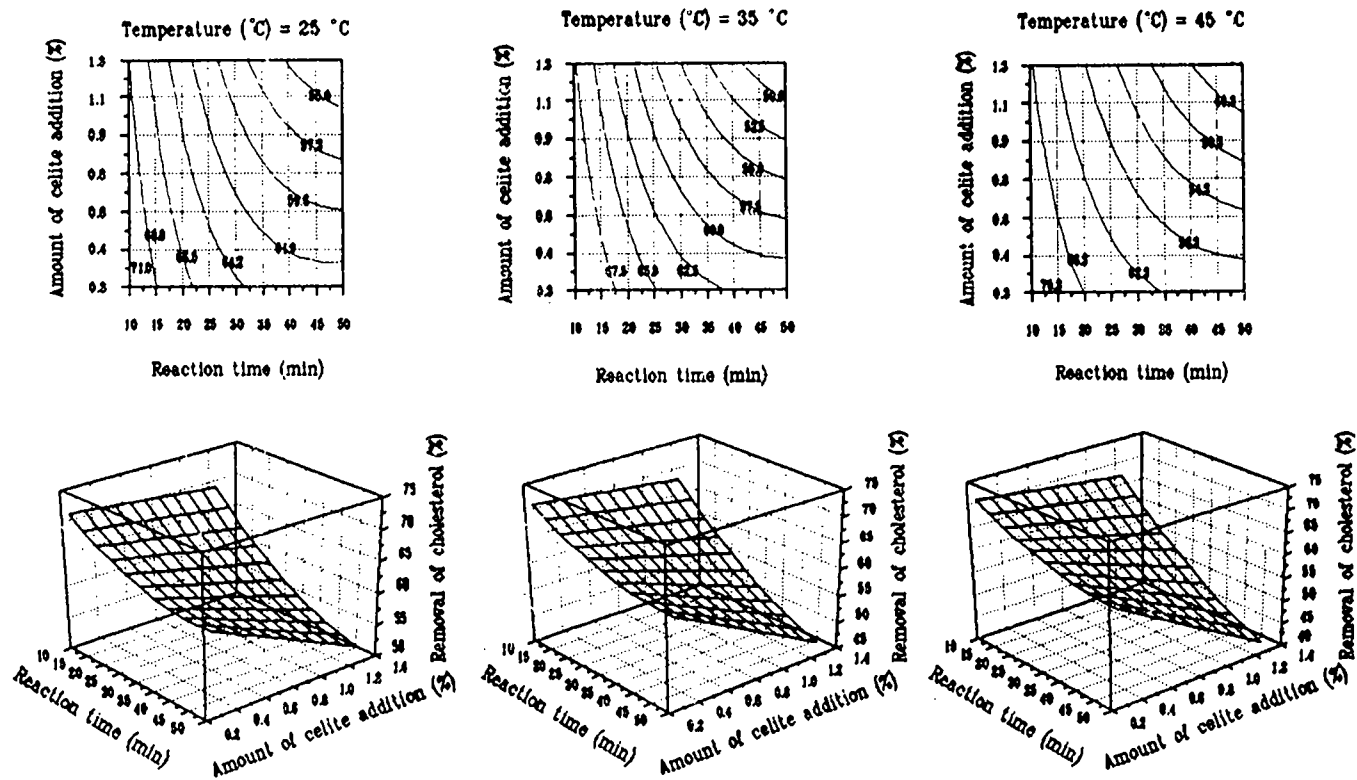


Fig. 10. Response surfaces and contour plots of the removal of cholesterol from milk at constant temperature of 25, 35 and 45 °C, respectively.

2. Saponin을 이용한 크림 중의 cholesterol 제거에 대한 개발

가. 크림의 cholesterol 제거 최적조건 결정

1) Saponin 농도의 영향

Saponin을 이용하여 크림의 cholesterol 제거시, saponin 용액의 농도가 cholesterol 제거에 미치는 영향을 알아보기 위해, 모든 조건은 동일하게 하고 saponin 용액의 농도만 1, 5, 10, 15%로 달리하여 실험한 결과, saponin 용액의 농도가 5%일 때 cholesterol이 71.67%로 가장 많이 제거되었고, saponin 용액의 농도가 1, 10, 15% 일 때에는 cholesterol 제거율이 각각 64.63, 69.06, 62.00%로 낮았다(Fig. 11). 이는 앞서 실시한 우유의 cholesterol을 saponin으로 제거할 때 saponin의 농도가 미치는 영향과 유사한 결과를 나타내었고, saponin을 고정화할 경우, saponin의 양이 polymer g당 일정 mmol일때까지는 cholesterol의 제거율이 증가하다가, 그 이상의 양이 되면 cholesterol의 제거율이 서서히 감소한다는 Micichi 등^{26,32,33)}의 결과와도 유사하다.

또한 Sundfeld 등²⁴⁾은 butteroil에서 cholesterol을 제거할 때 saponin 용액의 농도가 0.40mg/ml인 것이 0.04mg/ml인 경우 보다 1.4배 정도 제거 효과가 컸다고 하였으며, 옥²⁵⁾은 cholesterol 용액에 인삼 saponin을 첨가하여 cholesterol의 용해도에 관한 실험을 했을 때, saponin의 첨가량이 증가할수록 free cholesterol의 양이 감소하다가 일정 수준 이상이 되면 더 이상 cholesterol의 양이 감소하지 않고 일정수준을 유지하게 된다고 보고하였다. 이는 saponin의 첨가량이 필요 이상이 될 때는 cholesterol에 대한 saponin분자들 간의 경쟁 작용이 심해져서 오히려 cholesterol 제거 효과가 저해되는 것으로 사료된다.

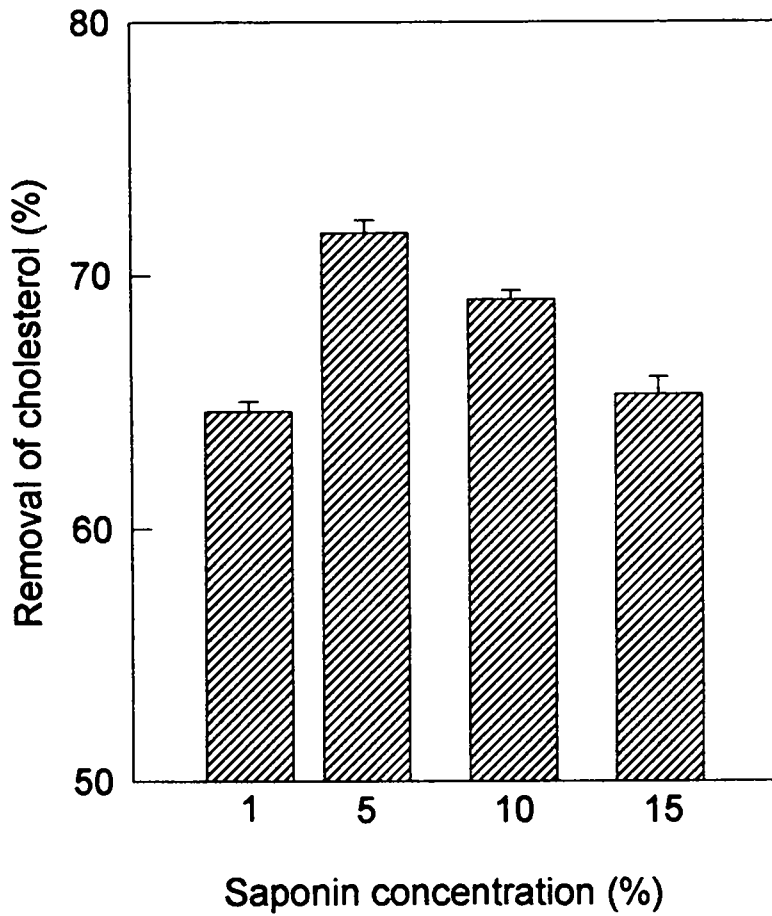


Fig 11. Effect of saponin concentration on the removal of cholesterol from cream by reaction with pH 7.0 saponin solution at 50°C for 30min.

2) Saponin 용액의 pH 영향

Saponin 용액의 pH는 saponin과 cholesterol 간의 micelle 복합체 형성에 영향을 주는 주요 인자이다⁴⁾. 우유의 경우는 pH가 낮을 경우 casein 단백질의 침전문제 및 최종제품의 pH가 pH 6.4~6.6 범위 이내여야 하므로 pH를 조절하는데는 많은 문제점이 있으나, 크림의 경우는 단백질 함량이 낮고 대부분이 지방이므로 크림의 pH를 조절하는 것이 우유에서와 같이 큰 문제가 되지 않는다³⁴⁾. 따라서, 본 연구에서는 크림의 cholesterol 제거시, cholesterol 제거효과에 가장 큰 영향을 미치는 saponin 용액의 pH를 선택하기 위하여 크림에 소량이지만 함유되어 있는 casein단백질이 침전되지 않게 casein의 등전점인 pH 4.6를 피하여 5% saponin 용액의 pH를 5.5, 7.0 및 8.5로 각각 조절하여 cholesterol의 제거율을 비교하였다 (Fig. 12). 그 결과 saponin 용액의 pH가 산성인 5.5에서 cholesterol 제거율이 73.40%로 가장 높았고, 중성 및 알칼리성인 pH 7.0과 8.5에서는 그 제거율이 71.74, 61.02%로 점진적으로 감소하여 saponin용액의 pH가 알칼리성이 될 수록 cholesterol의 제거율이 낮아지는 경향을 보여 주었다. 이는 Sundfeld 등⁴⁾이 saponin을 이용하여 butteroil의 cholesterol을 제거할 때 pH 4.5일 경우가 7.0일 때보다 제거효과가 컸다는 결과와, 인삼 saponin과 cholesterol을 반응시켰을 때, 인삼 saponin 용액의 pH가 낮을 수록 free cholesterol의 양이 감소한다는 옥⁽²⁵⁾의 보고와 유사하다.

3) Saponin과의 반응온도 영향

우유에 비해 크림은 점도가 높으므로 saponin 용액과 균일하게 반응시키기 위해서는 우유와 saponin과의 반응온도보다 온도를 높게 설정하여, 크림이 saponin 용액내에 균일하게 녹아들어 가게 해야 한다. 따라서, saponin을 이용하여 크림중에 함유되어 있는 cholesterol을 제거할 때,

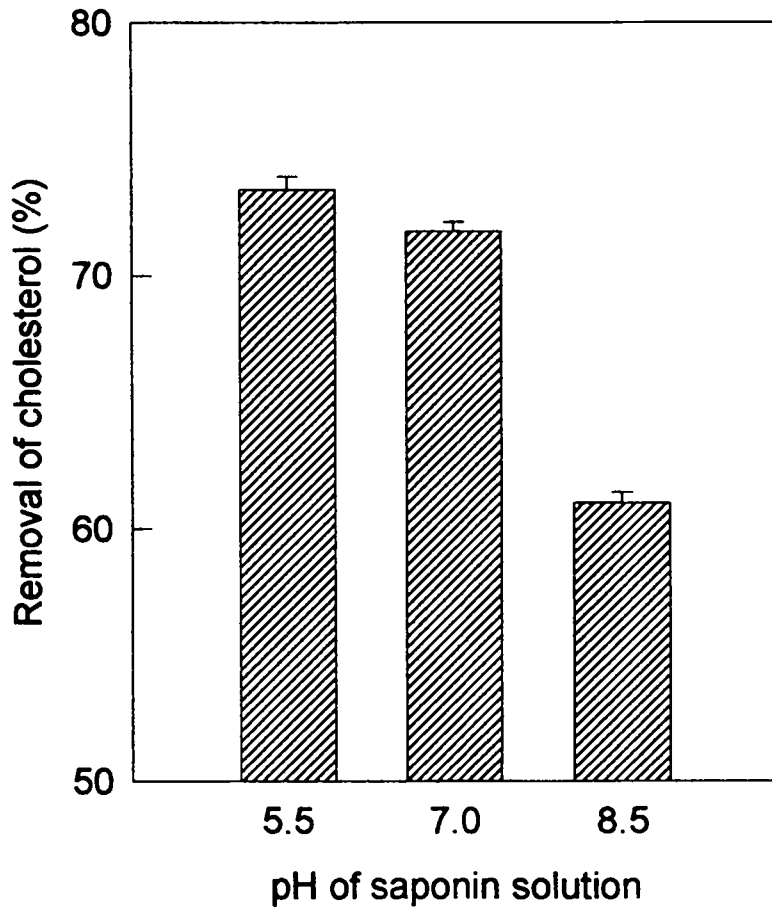


Fig 12. Effect of pH of saponin solution on the removal of cholesterol from cream by reaction with 5% saponin solution at 50°C for 30min.

cholesterol 제거에 미치는 온도의 영향을 규명하기 위해 크림에 pH가 5.5인 5% saponin 용액을 첨가하고 40, 50, 60℃에서 30분간 반응시켰다. 그 결과 60℃에서 반응한 경우 cholesterol 제거율이 74.34%로 가장 높았으며, 50℃와 40℃에서는 각각 73.32, 65.22%를 나타내었다(Fig. 13). 이 결과는 Sundfeld 등²⁴⁾이 saponin을 이용하여 butteroil의 cholesterol 제거시 30℃보다 60℃에서 cholesterol 제거효과가 더 우수했다고 보고한 것과 일치하였으며 옥²⁵⁾이 panaxadiol 및 panaxatriol 등의 인삼 배당체를 첨가하여 cholesterol과 반응시켰을 때 비교적 높은 온도인 50~60℃에서 free cholesterol의 양이 가장 낮았다는 결과와도 유사하다. 또한 Riccomini 등³⁵⁾은 cream과 butter fat을 saponin과 65℃에서 1시간동안 반응시켜 각각 80, 90%의 cholesterol을 제거하였으며, 앞에서 실험한 우유의 경우에는 saponin과의 반응온도가 25, 35℃일 때보다 45℃일 때가 cholesterol 제거율이 높았다. 따라서, saponin과 cholesterol과의 결합은 온도가 높을수록 활발히 일어나 hydrophobic interaction이 주요 반응기작이라고 사료된다.

4) Celite 농도의 영향

Celite의 첨가가 cholesterol 제거에 미치는 영향을 조사하기 위하여 크림을 saponin만으로 처리한 경우와 saponin과 celite를 같이 처리한 경우로 나누어 비교실험한 결과는 Table 14와 같았다. Saponin만으로 처리한 크림은 cholesterol 제거율이 74.34%였으나, saponin과 celite를 같이 처리한 크림은 cholesterol 제거율이 75.69%로 celite를 첨가하는 경우가 cholesterol 제거에 더욱 효율적임을 나타내었다. 이는 Katz와 Keeney²⁷⁾ 및 Schwartz 등^{28,29)}이 celite를 이용함으로써 digitonin을 이용한 cholesterol 제거 실험에서 큰 효과를 얻었다는 보고와 유사한 결과였으

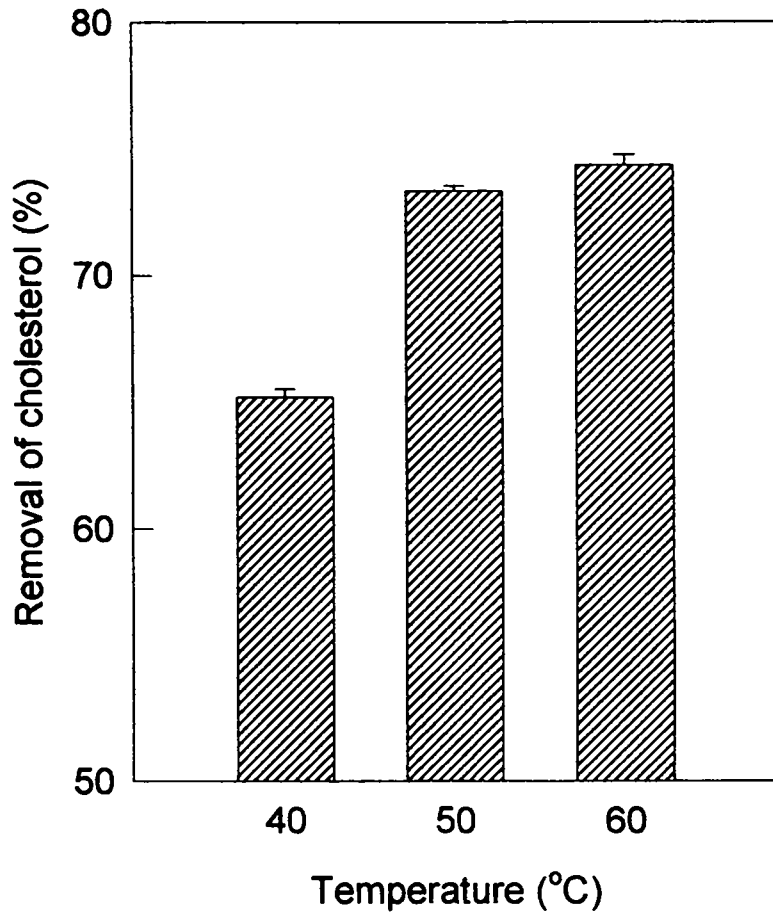


Fig 13. Effect of temperature on the removal of cholesterol from cream by reaction with pH 5.5, 5% saponin solution for 30min.

Table 14. Effect of celite addition on the removal of cholesterol from cream (triplicate)

Treatment	Removal of cholesterol (%)
Saponin only	74.34 ± 0.45
Saponin and celite	75.69 ± 0.33

Reaction conditions were pH of saponin solution, 5.5 : temp., 60°C : amount of celite addition, 2.5%.

며, Sundfeld 등⁴⁾이 butteroil에서 cholesterol을 제거할 때 saponin만을 첨가한 경우는 saponin과 celite를 같이 첨가한 경우보다 남아있는 cholesterol의 양이 3배 정도 많았다는 보고와도 유사하였다. 또한, saponin을 이용하여 우유의 cholesterol을 제거할 때 celite 첨가구가 무첨가구에 비해 cholesterol 제거에 훨씬 효율적었음이 앞 실험에서 이미 증명되었다.

크림의 cholesterol 제거에 가장 효과적인 celite 첨가량을 결정하기 위해 크림에 pH가 5.5인 5% saponin 용액을 첨가하고 60°C에서 30분간 반응시킨 후, celite를 크림량에 대하여 각각 2.5, 7.5, 12.5%씩 첨가하여 비교실험한 결과, celite를 크림량의 2.5% 첨가하였을 때 cholesterol 제거율이 76.32%로 가장 높았고, 7.5% 첨가하였을 때는 75.69%, 12.5% 첨가시에 72.80%로 오히려 2.5%를 첨가할 때보다 cholesterol 제거율이 떨어졌다 (Fig. 14). 이 결과는 우유를 이용한 실험에서 celite 첨가량이 우유량의 0.25%일 때가 0.75%나 1.25%일 때 보다 cholesterol 제거에 더 효과적이라는 앞선 실험의 결과와 유사하나, celite의 첨가량이 증가할수록 cholesterol의 제거량이 증가한다는 Sundfeld 등⁴⁾의 결과와는 차이가 있다. 이는 실험범위 설정의 차이로 Sundfeld의 실험에 비해 본 실험에서는 celite 첨가농도를 높게 설정하여 celite 첨가량이 증가할수록

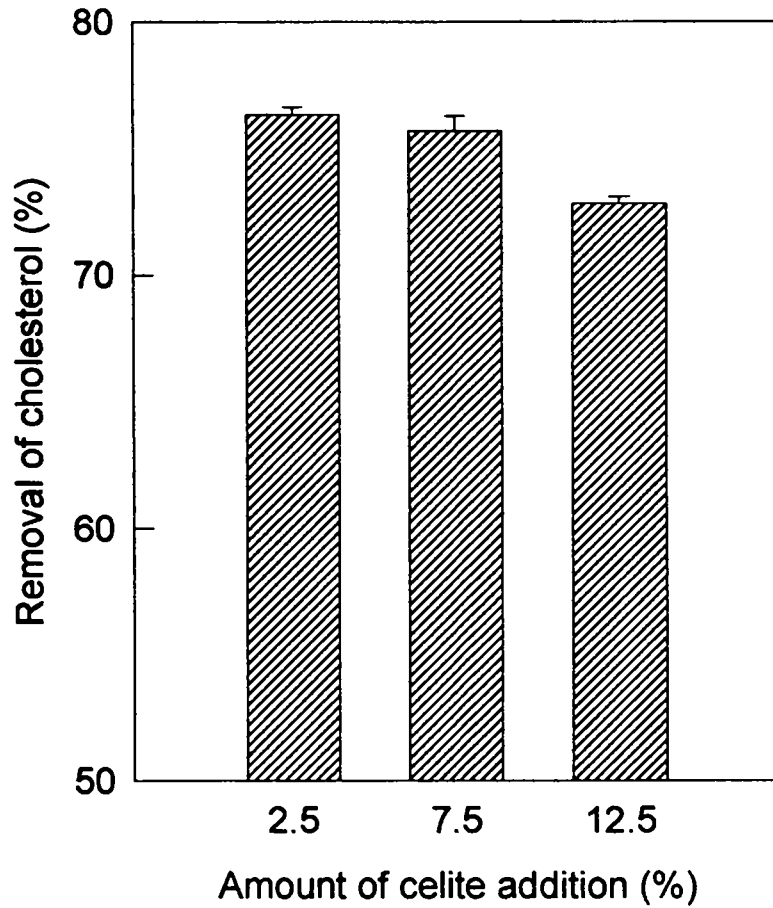


Fig 14. Effect of amount of celite addition on the removal of cholesterol from cream by reaction with pH 5.5 5% saponin solution at 60°C for 30min.

cholesterol 제거율이 커지는 한도범위인 2.5%를 가장 낮은 첨가량으로 설정하였기 때문이라고 생각된다. 따라서 과도한 양의 celite 첨가시, cholesterol과 saponin의 complex에 대한 celite분자간의 경쟁적 작용이 커져서 오히려 cholesterol 제거율이 감소하는 것으로 사료된다.

5) Saponin 처리 후 크림에 잔존하는 saponin의 함량 측정

크림을 saponin과 celite로 처리할 경우, celite는 saponin과 cholesterol의 복합체를 흡착하여 침전하게 되는데, 이러한 복합체를 흡착하지 않은 상태의 celite도 자체의 무게가 있어 쉽게 가라앉아 크림으로부터 완전히 제거된다. 그러나 saponin의 경우에는 cholesterol을 흡착한 saponin은 모두 제거가 되나, 일부 cholesterol과 반응하지 않은 미량의 saponin은 완전히 제거되지 않고 크림에 잔존할 가능성이 있다²⁴⁾. 따라서 본 연구에서는 크림과 saponin용액을 농도별(1, 5, 10, 15%)로 반응시켰을 경우와 크림과 saponin용액을 반응시킨 후 celite로 흡착하였을 때에, 크림에 잔존하는 saponin의 함량(%Quillaja Powder Residues content)을 측정하였다. 그 결과(Table 15), saponin용액의 농도가 1%와 5%일 때에는 %QPR이 다 0.02%로 차이가 없었으나, 그 이상의 농도에서는 saponin용액의 농도가 증가할수록 높은 %QPR을 나타내었고, saponin만을 첨가한 경우보다 사포닌과 celite를 함께 첨가한 경우 %QPR이 0.01%로 더 낮았다. 따라서 celite를 첨가하는 것이 크림에 잔존하는 saponin을 제거하는데 좀 더 효율적이라는 것을 알 수 있었다. 이는 Sundfeld 등²⁴⁾이 butteroil에서 cholesterol을 제거할 때, saponin와 celite를 함께 처리한 시료의 %QPR이 saponin만을 처리한 시료의 %QPR보다 그 수치가 낮았다는 보고와 유사하다. 또한 우유를 이용한 실험에서 이와 유사한 결과를 얻었다.

Table 15. Effects of treatment process and concentration of saponin solution on quillaja saponin residue content(%) from cream

Concentration of saponin solution (%)	Saponin residue content (%)	
	Saponin only	Saponin and celite
1	0.02±0.002	0.01±0.001
5	0.02±0.001	0.01±0.001
10	0.06±0.002	0.03±0.006
15	0.10±0.009	0.08±0.003

Reaction conditions were pH of saponin solution, 5.5 ; temp., 60℃ ; amount of celite addition, 2.5%.

Saponin 처리후 크림에 잔존하는 saponin의 양은 특히 cholesterol 제거에 가장 효율적인 saponin용액의 농도인 5%에서 %QPR은 0.01%로 극미량이며, 본 실험에서 사용한 quillaja bark의 saponin은 이미 식품산업에서 계면활성제 및 거품형성제로 사용되고 있는 물질⁴⁾이므로 안정성에는 문제가 없으리라 사료된다.

나. 반응표면분석법에 의한 크림중의 cholesterol 제거 최적조건의 결정

1) Cholesterol 제거에 대한 fractional factorial block과 제거율.

Stat-graphics 내의 program중 하나인 central composite design(CCD)을 이용하여 3 level-4 factor로 fractional factorial design을 하여 크림의 cholesterol 제거율을 종속변수로하여 측정한 결과는 Table 16와 같다. Saponin 용액의 pH 5.5, celite의 첨가량 12.5%, 반응온도 40℃, saponin

Table 16. Fractional factorial block of experimental design for cholesterol removal from cream

Treatment No.	Coded var.				Removal of cholesterol (%)
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	
1	-1	-1	-1	+1	72.54
2	-1	-1	+1	-1	74.26
3	-1	+1	-1	-1	66.25
4	-1	+1	+1	+1	77.36
5	+1	-1	-1	-1	65.20
6	+1	-1	+1	+1	78.43
7	+1	+1	-1	+1	70.23
8	+1	+1	+1	-1	74.02
9	0	0	0	0	68.76
10	0	0	0	0	68.76
11	-1	-1	-1	-1	66.74
12	-1	-1	+1	+1	77.86
13	-1	+1	-1	+1	86.70
14	-1	+1	+1	-1	71.99
15	+1	-1	-1	+1	69.09

(continued)

Treatment No.	Coded var.				Removal of cholesterol (%)
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	
16	+1	-1	+1	-1	74.86
17	+1	+1	-1	-1	64.53
18	+1	+1	+1	+1	75.73
19	0	0	0	0	68.76
20	0	0	0	0	68.76
21	+1	0	0	0	66.20
22	-1	0	0	0	69.95
23	0	+1	0	0	68.74
24	0	-1	0	0	69.85
25	0	0	+1	0	74.53
26	0	0	-1	0	68.04
27	0	0	0	+1	67.07
28	0	0	0	-1	64.66
29	0	0	0	0	68.76
30	0	0	0	0	68.76

X₁ : pH of saponin solution.

X₂ : amount of celite addition (%).

X₃ : reaction temperature (°C).

X₄ : saponin conc. (%).

용액의 농도가 15%일 때 cholesterol 제거율이 86.70%로 가장 높았고, saponin 용액의 pH 7.0, celite의 첨가량 7.5%, 반응온도 50℃, saponin의 첨가량 5%일 때 cholesterol 제거율이 64.66%로 가장 낮았다. Saponin 용액의 pH가 5.5에서 최대값을 나타내고 pH가 7.0일 때 최소값을 나타내는 것은 saponin 용액의 pH가 산성쪽으로 즉 pH가 낮을수록 cholesterol 제거효과가 크다는 Sundfeld 등⁴⁾과 옥²⁵⁾의 결과와 일치하며 앞에서 saponin 용액의 pH 영향을 조사하였을 때 pH 5.5에서 최고 cholesterol 제거효과가 나타난 것과 동일한 결과이다. Celite는 크림에 대한 첨가량이 크림 12.5%일 때 최대의 cholesterol 제거율을 보이고, 7.5%일 때 최저의 제거율을 보였다. 이것은 앞에서 언급했던 celite만의 단독효과에 대한 실험 결과와 차이가 있는데 여러변수들이 혼합되어 복합적으로 작용하였기 때문인 것으로 생각되며 celite의 양이 증가할수록 butteoil의 cholesterol 제거율이 증가한다는 Sundfeld 등⁴⁾의 결과와 일치한다. 반응온도는 40℃일 때 cholesterol이 가장 많이 제거되고 50℃에서 가장 작게 제거되는데, 이 결과는 saponin을 이용하여 butteoil에서 cholesterol 제거시 30℃보다 60℃에서 제거효과가 훨씬 크다는 Sundfeld 등²⁴⁾의 결과와 차이가 있고, 반응온도의 단독효과에 대한 실험결과와도 차이가 있다. 이것도 celite 첨가량과 같은 경우로 하나의 영향인자에 대한 것이 아니라 여러 영향인자들의 종합적인 상호관계에 의해 나온 결과이기 때문이다. Saponin 첨가량의 경우, saponin의 농도가 15%를 첨가하였을 때에 최대 cholesterol 제거율을, 5%를 첨가하였을 때에는 최소 제거율을 나타내었다. 이는 일정범위 이내에서 saponin의 첨가량이 증가할수록 butteoil에서 cholesterol 제거효과가 증가한다는 Sundfeld 등²⁴⁾의 결과와 일치하며, Micich²⁶⁾가 digitonin을 고정화하여 cholesterol을 제거할 때, smith 등³¹⁾이 난황에서 β -CD를 이용하여 cholesterol을 제거

할 때에도 일정범위내에서 흡착제의 첨가량이 증가할수록 cholesterol 제거효과가 증가하였다. 그러나 saponin 첨가량 단독효과에 대한 실험 결과와는 차이가 있는데, 이는 여러변수들이 혼합되어 복합적으로 작용하였기 때문인 것으로 생각된다.

2) 크림의 cholesterol 제거 조건의 최적화

Saponin을 이용하여 크림의 cholesterol 제거율을 높이기 위하여 saponin 용액의 pH, celite 첨가량, 반응온도, saponin 용액의 농도를 독립변수로 설정하고, cholesterol 제거율을 종속변수 Y로 설정하여 다중회기분석을 수행한 결과는 Table 17과 같다. 이 결과를 근거로 하여 99% 유의수준에서 유의성이 있는 독립변수만을 채택하고 나머지는 각각 시킨 결과 상수, X_3 항인 반응온도, 교호작용을 나타내지 않는 interaction terms 중 celite 첨가량×saponin 용액의 농도, 동일한 변수들간의 교호작용을 나타내지 않는 quadratic terms 중 반응온도로 model식 $Y = 141.929305 - 3.588439X_3 + 0.57712X_2X_4 + 0.041335X_3^2$ 를 얻었다. 다중회기분석 전체에 대한 분산 분석 (Table 18)을 수행한 결과 유의 수준을 검정하는 F-value도 99.9% 수준에서 유의성을 나타내어 다중회기분석에 의하여 선정된 각 변수에 의해 설정된 model식이 99.9% 수준에서 유의성이 있었음을 알 수 있었다. 위에서 얻은 model식에 대해 반응표면분석법을 수행하여 Fig. 15~17과 같은 결과를 얻었다. 독립변수 celite 첨가량을 고정시켜 분석한 결과 celite 첨가량이 12.5%일 때, 반응온도 46℃, saponin 용액의 농도 4.7% 부근에서 최고 반응 값99.1%를 나타내었고, celite 첨가량이 7.5%, 반응온도 44℃, saponin 용액의 농도 0.5% 부근에서 최저 반응값

Table 17. Values of regression coefficient calculated by RSM program for the removal of cholesterol

Ind. variable	Coefficient	t-value	Prob> T
Constant	141.929305	7.5684	0.0000 ^{***}
X ₃	-3.588439	-4.4793	0.0006 ^{***}
X ₄	2.037679	1.3319	0.2058
X ₂ ²	0.068114	2.2334	0.0437
X ₃ ²	0.041335	5.3115	0.0001 ^{***}
X ₄ ²	-0.051461	-1.6532	0.1222
X ₁ × X ₂	-0.238569	-2.0739	0.0585
X ₁ × X ₃	-0.006956	-0.4022	0.6940
X ₁ × X ₄	-0.09255	-0.5132	0.6164
X ₂ × X ₃	-0.045419	-2.7790	0.0156
X ₂ × X ₄	0.57712	3.9022	0.0018 ^{**}
X ₃ × X ₄	-0.018619	-0.6427	0.5316
X ₁ × X ₂ × X ₃	0.007436	2.5358	0.0249
X ₁ × X ₂ × X ₄	-0.052501	-2.3829	0.0331
X ₁ × X ₃ × X ₄	0.002451	0.6450	0.5302
X ₂ × X ₃ × X ₄	-0.007189	-2.3191	0.0373
X ₁ × X ₂ × X ₃ × X ₄	0.000541	1.1825	0.2582

X₁ : pH of saponin solution, X₂ : amount of celite addition,
X₃ : reaction temp., X₄ : saponin conc.

p<0.01, *p<0.001

Table 18. Analysis of variance for full regression of the removal of cholesterol

Source	Sum of Squares	DF	Mean Squares	F-value
Model	684.802	16	42.8001	24.6842 ^{***}
Error	22.5408	13	1.73391	
Total	707.342	29		

***: p<0.001

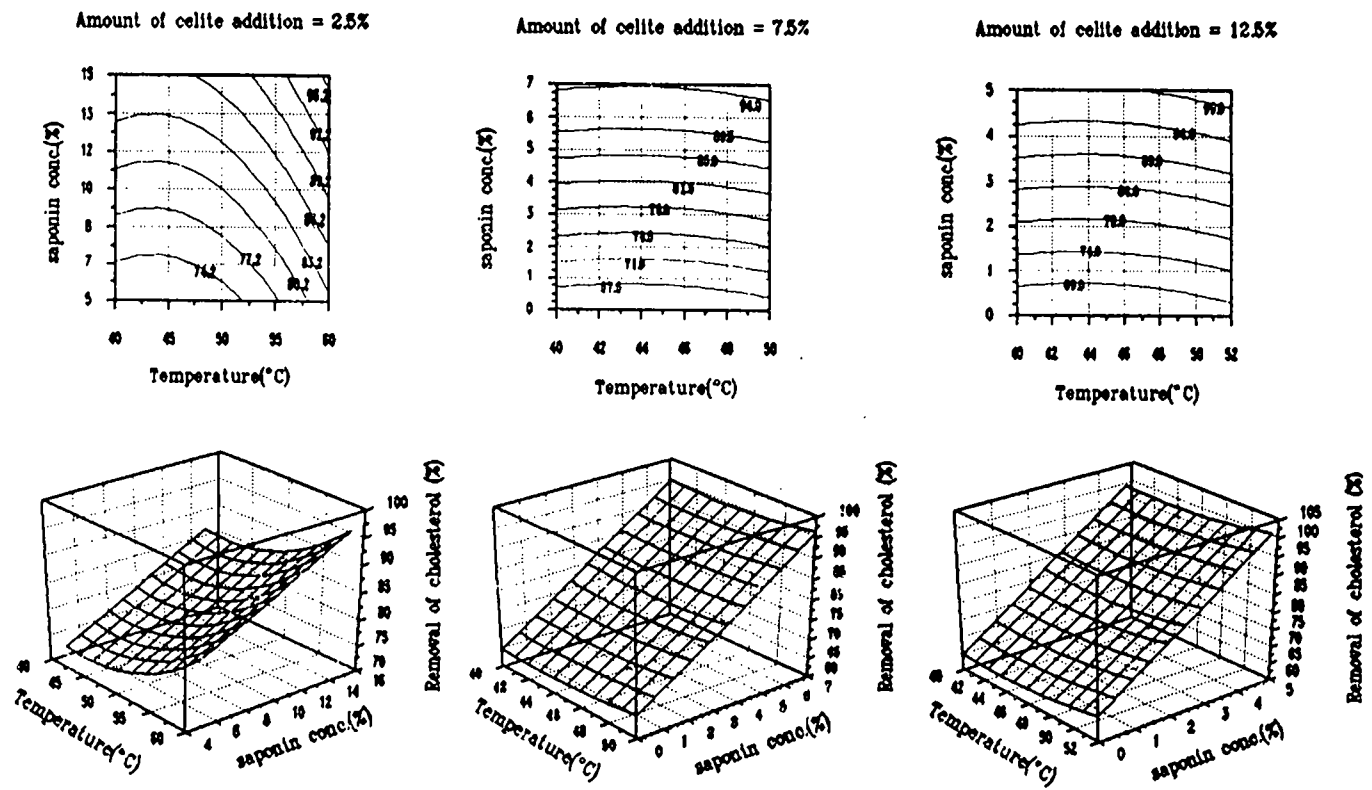


Fig. 15. Response surfaces and contour plots of the removal of cholesterol from cream at constant amount of celite addition of 2.5, 7.5 and 12.5%, respectively.

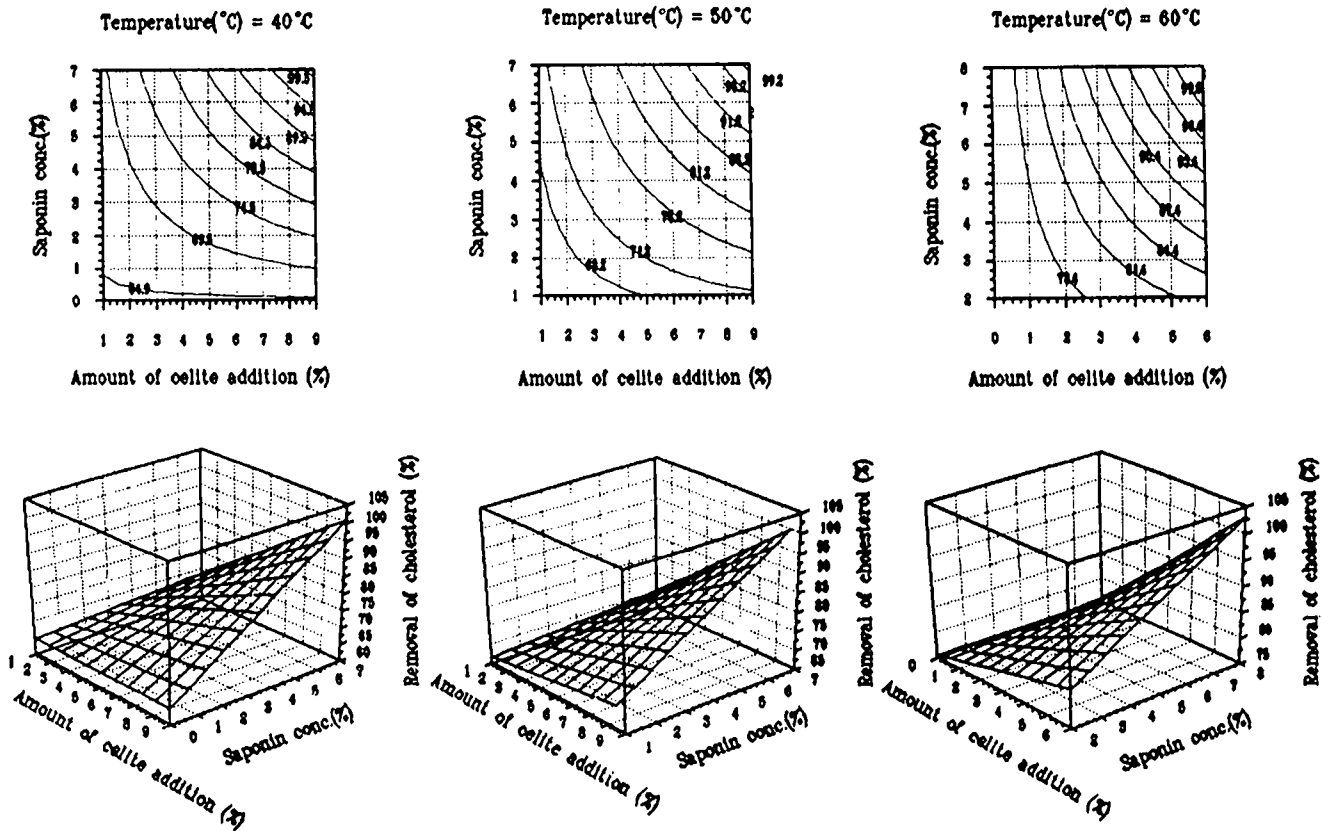


Fig. 16. Response surfaces and contour plots of the removal of cholesterol from cream at constant temperature of 40, 50 and 60 °C, respectively.

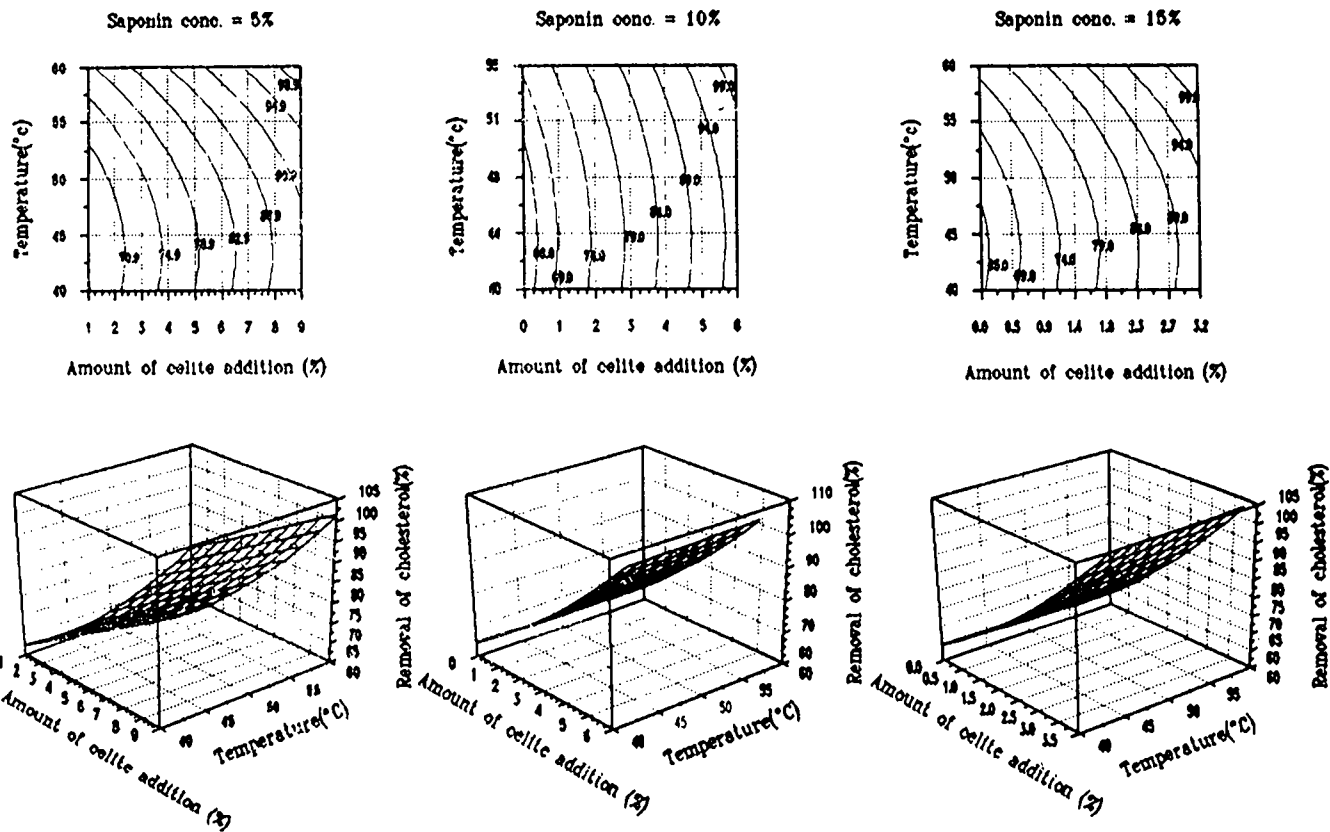


Fig. 17. Response surfaces and contour plots of the removal of cholesterol from cream at constant saponin conc. 5, 10 and 15%, respectively.

57.5%를 나타내었다. 독립변수 중 반응온도를 60℃로 고정하였을 때는, celite 첨가량 6%, saponin 용액의 농도 8% 부근에서 99.6%로 가장 높은 반응값을 나타내었고, 반응온도를 40℃로 고정하였을 경우에는 celite 첨가량 2.5%, saponin 용액의 첨가량 1.8% 부근에서 가장 낮은 반응값인 64.9%를 보였다. Saponin 용액의 농도를 고정시켰을 경우 saponin 용액의 농도를 10%로 고정시켰을 경우 반응온도 55℃, celite 첨가량 6% 부근에서 99.0%로 최고값을 보였고, saponin 용액의 농도가 15%, 반응온도 43℃, celite 첨가량 0.1% 부근에서 65.0%로 최소값을 나타내었다. 이상의 반응 표면분석 결과 최고치의 반응값이 직교좌표상에 나타나는 경향이 일정한 celite 첨가량과 반응온도를 각각 0.25%와 60℃로 고정시키고, 독립변수의 최저 또는 최고수준에서 종속변수가 최대치를 나타내지 않는 saponin 용액의 농도 변수에 대하여 model식을 편미분한 결과 saponin을 이용한 크림 중 cholesterol 제거의 최적 조건은 celite 첨가량 2.5%, 반응온도 60℃, saponin 용액의 농도 8.3%로 예측되었다. Model식의 최적조건에 의한 cholesterol 제거율은 87.40%였고, 실험에 의한 실측 cholesterol 제거율은 86.43%로 거의 유사하였으므로 이 조건이 saponin을 이용한 크림 중 cholesterol 제거의 최적조건임이 증명되었다.

제 3 절 Cholesterol 제거를 위한 saponin 고정화 방법 개발

1. Saponin과 digitonin의 고정화

Saponin을 고정화하였을 경우, 우유 cholesterol의 20%가 제거되었고, digitonin을 고정화하였을 경우에는 30%의 cholesterol이 제거되었다. 이 결과는 free saponin을 이용하여 우유중의 cholesterol을 제거하였을 때 72.00%를 제거할 수 있었던 것에 비하여 상당히 낮은 결과여서 3차년도에는 이 부분에 대한 연구를 연구계획에 포함시키지 않고 2차년도로서 연구를 종결시켰다.

2. Silica와 epoxy 반응 시간의 최적화

Silica에 epoxy spacer를 결합시키기 위한 최적 반응 시간을 결정하기 위하여 80℃(reflux下)에서 반응시간을 6시간부터 30시간까지 반응시킨 후 결합된 epoxy의 양을 periodate 적정법으로 결정한 결과 반응 24시간까지는 반응 시간이 증가함에 따라 epoxy spacer의 양이 증가하였으나 그 후에는 약간 증가하였다. 따라서 silica에 epoxy spacer를 고정화하기 위한 최적 반응시간은 시약의 소모량과 반응 시간을 고려할 때 24시간이 가장 효율적으로 생각한다(Table 19).

3. Silica와 반응하는 epoxy spacer양의 최적화

Silica 5g과 반응하는 epoxy spacer의 양을 9ml에서 27ml까지 4가지 농

Table 19. Amount of epoxy (γ -glycidoxypropyltrimethoxysilane) coupled in epoxy-silica determined by periodate oxidation*

Reaction time(hr)	Amount of epoxy coupled(μ mol)
6	150
12	250
18	510
24	780
30	805

*Values are means of triplicates.

도를 달리하여 80℃에서 24시간 반응시킨 후 silica에 결합된 epoxy의 양을 측정된 결과 epoxy spacer를 13.5ml 첨가하였을 때 epoxy spacer가 906 μ mol로 가장 많이 결합하였으며 첨가하는 spacer의 양이 증가함에 따라 결합된 epoxy spacer의 양이 감소하였다(Table 20).

Table 20. Optimization of amount of epoxy silica reacted with silica.

Silica (g)	5g			5g			5g		
	0hr	5hr	20hr	0hr	5hr	20hr	0hr	5hr	20hr
GPTS(ml)	4	2.5	2.5	6	3.75	3.75	8	5	5
Silica에 결합된 epoxy의 양(μ mol)	833			906			780		

Silica (g)	5g		
GPTS(ml)	0hr	5hr	20hr
	12	7.5	7.5
Silica에 결합된 epoxy의 양(μ mol)	780		

제 4 장 참고문헌

1. 한석현 : 축산식품과 콜레스테롤에 관한 고찰. 한국축산식품학회. Nov p.18 (1995)
2. Gurr, M. I. : Developement in Dairy Chemistry, Lipid. Elsevier Applied Science, p.35 (1983)
3. 김동훈 : 식품화학. 탐구당, p.486 (1995)
4. Sundfeld, E., Yun, S., Krochta, M. J. and Richadson, T. : Separation of cholesterol from butteroil using quillaja saponins. I. Effects of pH, contact time and adsorbent. *J. Food Process Eng.*, **16**, 191 (1993)
5. Tsui, I.C. : Rapid determination of total cholesterol in homogenized milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **72**, 421 (1989)
6. Teichman, R.J., Takei, G.H., and Cummins, J. M.: Detection of fatty acids, fatty aldehydes, phospholipids, glycolipids and cholesterol on thin-layer chromatograms stained with malachite green. *J. Chromatogr.*; **88**, 425 (1974)
7. Skipski, V.P., Good, J., Barclay, M., and Reggio, R.B. :

- Quantitative analysis of simple lipid classes by thin-layer chromatography. *Biochim. Biophys. Acta*, **152**, 10 (1968)
8. Stromer, M. H., Goll, D.E., and Roberts, J. H.: Cholesterol in subcutaneous and intramuscular lipid depots from bovine carcasses of different maturity and fatness. *J. Anim. Sci.* **25**, 1145 (1966)
 9. Parodi, P. W.: The sterol content of milk fat, animal fats, margarines, and vegetable oil. *Aust. J. Dairy Technol.*, **28**, 135 (1973)
 10. Brown, H.G.: Adaptation of an HPLC system to quantify cholesterol. *J. Am. Chem. Oil. Soc.*, **64**, 106 (1987)
 11. Tsai, L.S. and Hundson, C.A.: High-performance liquid chromatography of oxygenated cholesterol compounds. *J. Am. Chem. Oil. Soc.*, **58**, 931 (1981)
 12. Shen, Ch.S.J., Chen, I.S. and Sheppard, A.J.: Enzymatic determination of cholesterol in egg yolk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **65**, 1222 (1982)
 13. Karkalas, J., Donald, A.E. and Clegg, K.M.: Cholesterol content of poultry meat and cheese determined by enzymatic and gas-liquid chromatography methods. *J. Food Technol.*, **17**, 281 (1982)

14. Sperry, W. M. and Brand, F.C.: The colorimetric determination of cholesterol. *J. Biol. Chem.*, **150**, 135 (1943)
15. Sperry, W.M. and Webb, M.: A revision of the schoenheimer-sperry method for cholesterol determination, *J. Bio. Chem.*, **187**, 97 (1950)
16. Oakenfull, D. G., Pearce, R. J. and Sidhu, G. S.: Low-cholesterol dairy products. *Aust. Dairy Tech.*, **46**, 110 (1990)
17. Shishikara, A., Fujimoto, K., Kaneda T., Arai, K. and Saito, S. : Modification of butter oil by extraction with supercritical carbon dioxide. *Agr. Bio. Chem.*, **50**, 1209 (1986)
18. Arul, J., Boudreau, A., Makhoulf, J., Tardif, R. and Grenier, B.: Distribution of cholesterol in milk fat fractions. *J. Dairy Res.*, **55**, 361 (1988)
19. Morris, C. E.: Focus on fat reduction. *Food Eng.*, **62**, 91 (1981)
20. Sperber, R. M.: New technologies for cholesterol reduction. *Food Process.*, **50**, 154 (1989)
21. Beiz, C., Hartman, P. A., Young, H. W. and Zaks, A.: Use of enzyme to decrease cholesterol content of dairy product.

22. Fillion, L., Zee, J. A. and Gosselin, C. : Determination of a cholesterol oxide mixture by a single-run high-performance liquid chromatographic analysis using benzylation. *J. Chrom.*, **547**, 105(1991).
23. Bachman, K. C., Lim, J. H. and Wilcox, C. J. : Sensitive colorimetric determination of cholesterol in dairy products. *J. AOAC.*, **59**, 1146 (1976).
24. Sundfeld, E., Yun, S., Krochta, M. J. and Richardson, T. : Separation of cholesterol from butteroil using quillaja saponins. II. Effects of temperature, agitation and concentration of quillaja solution. *J. Food Process Eng.*, **16**, 207 (1993)
25. 옥성현 : Panaxadiol 및 panaxatriol계 glycoside가 cholesterol의 용해도에 미치는 영향. 조선대학교 약학과 석사학위 논문 (1984)
26. Micich, T. J. : Behavior of polymer supported digitonin with cholesterol in the absence and presence of butteroil. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 1839 (1990)
27. Katz, I. and Keeney, M. : Rapid method for isolation of unesterified sterols and its application to detection of milk fat adul-

- teration with vegetable oils, *J. Dairy Sci.*, **50**, 1764 (1967)
28. Schwartz, D. P., Brewington, C. R. and Burgwald, L. H. : Rapid quantitative procedure for removing cholesterol from butterfat. *J. Lipid Res.*, **8**, 54 (1967)
29. Schwartz, D. P., Brewington, C. R. and Burgwald, L. H. : Rapid quantitative removal of natural sterols from lipids. U.S. Patent 3,450,541 (1969)
30. Okenfull, D. G., Gurcharan, S. S. and Rooney, M. L. : Cholesterol removal. Australian patent., Au-A-54768/901598 (1990)
31. Smith, D. M., Award, A. C., Bennink, M. R. and Gill, J. L. : Cholesterol reduction in liquid egg yolk using β -cyclodextrin. *J. Food Sci.*, **60**(5), 691 (1995)
32. Micich, T. J. : Behavior of polymer supported tomatine toward cholesterol in the presence or absence of butteroil. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 1610 (1991)
33. Micich, T. J., Foglia, T. A. and Holsinger, V. H. : Polymer-supported saponins : an approach to cholesterol removal from butter oil. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 1321 (1992)

34. 김영교, 성삼경 : 축산식품학. 선진문화사, p.85 (1996).
35. Riccomini, M., Wick, C., Petersson, A., Jimenez-Flores, R. and Richardson, T. : Cholesterol removal from cream and anhydrous butter fat using saponins. *J. Dairy Sci.*, **73**, 107(Supplement 1) (1990)

제 3 세부과제. 초임계유체 추출법을 이용한 유지방의 분획 및 cholesterol 제거 의 개발

제 1 장 서 론

유지방은 식품공업에서 아이스크림, 초콜릿, 과자류, 튀김류, 쇼트닝 등에 풍미, 조직감을 부여하는 재료로 이용되어 오고 있다. 유지방은 97~98%가 triglycerides이며 미량성분으로서 스테롤, 유리지방산 그리고 인지질 등을 함유하고 있다. 유지방은 주요 20여개의 지방산으로 구성되어 있으며 유지방의 물리화학적 성질은 구성지방산의 탄소수와 불포화도에 의하여 결정된다. 유지방은 저급지방산을 특히 많이 함유하고 있어서 유제품에 특유의 풍미를 부여한다. 전 지방산의 66%가 포화지방산이며 주요 지방산으로서는 팔미틴산과 올레인산으로서 각각 전체 지방산의 20~30%이다.

유지방의 물리화학적성질 즉 융점, 퍼짐성 그리고 물성 등은 그 구성 지방산의 탄소수, 포화도, 구조 등에 기인한다. 유지방은 -40~40℃에서 녹으며 그 중간 온도에서는 고상과 액상의 혼합물로 존재한다. 상온에서 70%이상이 고상으로 존재하기 때문에 빵, 크래커 등에 spread로 이용하는 경우 퍼짐성(spreadability)이 좋지 못한 단점을 가지고 있다.

유지방은 비록 유제품에 우수한 풍미, 향미, 조직감을 부여하지만, 유지방의 특이한 물리적 성질 즉 결정화, 낮은 퍼짐성, 넓은 범위의 융점

등은 여러 가지 식품에 첨가원료로 사용하는 경우 여러 가지 문제점을 안고 있다. 따라서 유지방을 각 첨가식품에 필요로 하는 물리, 화학적 특성을 갖고, 불포화 지방산의 비율이 높은 분획으로 분별하여야 된다.

유지방을 물리적(분별, 조직화, 다른 유지와의 혼합) 및 화학적(에스테르 교환반응, 수소첨가반응, 탈수소반응) 방법에 의하여 변형시키려는 다양한 시도가 되어 왔다. 또한 유지방은 물리적 성질 및 분자량이 다른 다양한 triglycerides로 구성되어 있다는 그 물질 자체의 특성 때문에 용융결정법(melt crystallization), 용제분별법(solvent fractionation), 단단증류법(short-path distillation) 등에 의하여(Arul et al., 1988) 물리, 화학적 성질이 다른 여러 형태의 분획으로 분별하는 연구가 시행되어 오고 있다. 그러나 이 방법들은 가공공정 중 풍미와 비타민 등이 유실되거나 지방산 조성 차이가 크지 않은 분획을 얻는데 한계점이 있다(Arul et al., 1987).

한편 유지방 중의 스테롤은 비검화물로서 그 중 95%는 콜레스테롤이다. 유지방 중의 콜레스테롤은 유리상태, 지방구의 lipoprotein과 결합상태 그리고 콜레스테롤 에스터 등 3가지 형태로 존재한다(Walstra and Jeness, 1984). 유지방은 성인병의 원인이 되는 콜레스테롤을 0.25~0.4% 함유하고 있으므로 저콜레스테롤 유제품을 만들기 위해서는 유지방 중의 콜레스테롤을 90% 이상 제거하여야 한다(Kosikowski, 1990). 최근에 많은 연구자들이 제품의 물리·화학적 성질을 변화시키지 않고 식품으로부터 콜레스테롤을 제거하는 공정을 개발하여 왔다. 콜레스테롤 분자는 유리수산기(free hydroxy)를 가지고 있으므로 비교적 극성을 띠며, 지방보다 분자량이 2배 이상 크기 때문에, 이러한 성질을 이용한 콜레스테롤 제거방법으로는 분자 증류(Arul et al., 1988), 용매추출(Borges, 1996), 흡착(Shishikura et al., 1986; Lim, 1992; Sundfeld et al., 1993; Lim and Rizvi, 1996;

Kwon and Chao, 1996), cyclodextrin complex(Smith et al., 1995), 초임계유체 추출법(Shishikura et al., 1986; Lim, 1992; Lim and Rizvi, 1996; Kwon and Chao, 1996; Bradley, 1989; Chidambara et al., 1993) 등이 있다.

초임계유체 추출법은 다른 방법에 비하여 한 공정에서 유지방 중의 콜레스테롤을 제거함과 동시에 지방을 유리지방산 분자량과 포화도에 따라 분획하므로써 퍼짐성(spreadability)이 좋은 분획을 얻을 수 있는 이점을 가지고 있다. 초임계 이산화탄소가 유지방으로부터 콜레스테롤에 대한 선택도(selectivity)는 추출온도가 높을 때 또는 추출압력이 낮을 때 즉 이산화탄소의 밀도가 낮을 때 높지만, 이 조건에서는 유지방의 용해도가 낮으므로 이 공정은 실용성이 적다(Shishikura et al., 1986). 따라서 흡착제를 사용하지 않고 초임계유체 추출만을 행하여 유지방으로부터 콜레스테롤을 제거하는 공정은 비경제적이다.

초임계유체 추출법에 있어서 콜레스테롤과 선택적으로 반응하는 흡착제를 이용할 때 고려할 사항으로는 콜레스테롤 제거율과 수율, 최종제품의 품질(즉 향기관련 성분과 결합 방지), 생산원가, 식품첨가물로서의 허가여부, 오염물질의 잔류여부 등이다. 흡착제로 사용되는 물질은 생리적으로 무해하며, 비교적 가격이 저렴하고, 콜레스테롤만을 선택적으로 흡착하고, 나머지 지방, 지방산, 기타 천연의 향기, 색소 등을 가능한 적게 흡착하여야 한다. 또한 흡착조의 설계는 칼럼내에서 channeling을 방지하기 위하여 중요하며, 흡착제의 입자크기와 강도는 작은 입자로 부서져 칼럼이 막혀버리거나 유체의 흐름 경로를 막는 현상을 방지하기 위하여 중요하다. 따라서 흡착제는 펠렛, 과립상, glass beads 또는 rings 형태이어야 한다(McLachlan et al., 1991).

콜레스테롤 제거를 위한 초임계유체 추출공정의 설계 및 경제성 산출을

위해서는 반드시 유지방 분획 공정도 동시에 고려되어야 한다. 왜냐하면 콜레스테롤을 제거하기 위해서는 초임계유체에 유지방을 용해시켜 흡착제가 충전되어 있는 고압의 흡착조를 통과시킨 후 콜레스테롤이 제거된 유지방은 흡착조에서 단순히 압력을 낮춤으로써 쉽게 분획 시킬 수 있기 때문이다. 물리·화학적 성질이 다른 분획들은 제빵, 제과 또는 낙농제품에 용도에 따라 첨가물로 유용하게 이용될 수 있다.

지금까지 초임계유체 추출 및 흡착법을 이용하여 유지방으로부터 콜레스테롤 제거에 관한 연구로, Shishikura 등(1986)은 흡착제로 실리카겔을 사용하여 40℃/300 bar에서 유지방을 초임계 이산화탄소로 추출·흡착시켰을 때 지방 수율이 80%이면서 콜레스테롤이 75% 이상 제거된 분획을 얻었으며, 활성탄을 흡착제로 사용하였을 때는 콜레스테롤 함량을 80% 이상 제거하였지만 색소와 향기성분도 완전히 동시에 제거되었다고 보고하였다. McLachlan 등(1991)도 추출온도 30~60℃, 추출압력 150~300 bar에서 MgCO₃, MgO, CaCl₂, CaO 등을 흡착제로 사용하여 유지방으로부터 콜레스테롤을 100% 제거하였으나(수율 80%) 유지방과 흡착제의 비율이 0.001~0.11로 흡착제의 비율이 너무 높아 비실용적이었다.

따라서 본 연구에서는 유지방을 초임계 이산화탄소를 이용하여 추출온도, 압력, 시간을 달리하여 일단계와 이단계로 추출하여 지방산 조성과 물리화학적 성질을 측정하였다. 또한 유지방으로부터 콜레스테롤을 제거하기 위하여 대기압 상태에서 콜레스테롤 흡착능이 있는 것으로 알려진 몇가지 흡착제를 선택하여, 고압에서 콜레스테롤 흡착능이 높은 것으로 알려진 florasil과 비교하기 위하여, 추출온도 40℃, 추출압력 276, 345 bar에서 3 또는 4시간 동안 추출하면서 흡착제의 종류별, 입자크기별, 비율별로 추출시간에 따른 유지방의 수율, 콜레스테롤 함량, 지방산 조성을 측정하였다

제 2 장 연구 방법

제 1 절 초임계유체에 의한 유지방의 분획

1. 재료

본 실험에 사용한 무수유지방은 시중에서 구입한 버터를 60℃에서 녹인 후 상등액을 whatman No. 1 으로 여과하여 시료로 사용하였다.

2. 초임계 이산화탄소에 의한 유지방의 추출

본 실험에 사용한 초임계유체 추출장치(Autoclave Engineers, Inc. #08U-06-60-FS)는 최대 압력이 413 bar 까지 사용 가능한 연속 유통형으로 개략도는 Fig. 1과 같다. 먼저 추출조(EV)에 무수유지방 20g를 주입하였다. 탄산가스는 실린더(TK)로 부터 check valve(CV)를 거쳐 고압 피스톤펌프(HPP)에 의해 가압되었다. 이 때 탄산가스 주입부의 공동화 현상을 방지하기 위하여 -20℃ 냉각조(HE)를 설치하여 이산화탄소의 기화를 방지하였다. 가압된 이산화탄소는 역압 조절기(BPR)에 의하여 압력이 조절되었고 압력계(P)에 의해 압력이 측정되었고 추출조로 이송되었다. 추출조의 내용적은 300 ml이고, 온도는 비례형온도조절기에 의하여 조절되었으며 열전쌍온도계(T)에 의하여 측정되었다. 이와 같이 하여 일정 압력과 온도에서 정상상태로 유지된 후 추출조 출구로 나가는 고압의 혼합물은 가온된 metering valve(MV)를 통하여 분리조(S)에서 대기압으로 감압, 팽창되면서 탄산가스와 추출물로 분리되었다. 이때

통과되는 탄산가스의 유량은 rotameter(R)에 의하여 측정되었고 적산부피는 totalizer(FT)에 의하여 측정되어진 후 대기 중으로 방출되었다.

일단계 추출(single-extraction trial)은 241 bar에서 추출온도를 40, 50, 60℃로 달리하여 3시간 동안 추출하면서 매 30분마다 시료를 취하여 추출수율과 지방산 조성을 측정하였다. 이단계추출(double-extraction trial)은 먼저 40℃/241 bar에서 3시간 동안 추출하여 추출물 분획과 추출잔류물 분획을 얻은 후 추출물 분획 20g는 60℃/241 bar에서 다시 5시간 동안 추출하면서 매 30분마다 시료를 취하였고, 추출잔류물 분획 20g는 40℃/345 bar에서 4시간 동안 추출하면서 매 30분마다 시료를 취하여 지방산 조성과 용점, 검화가, 요오드가를 측정하였다. 이산화탄소의 유속은 4 l/min 이었다.

3. 지방산 분석

추출분획물의 지방산 조성은 GC(Hewlett-Packard 5890 series II)에 의하여 분석하였으며, column은 DBTM-WAX capillary(30 m x 0.25 mm i.d., Supelco, Inc., Bellefonte, PA, USA)를 사용하였고, 온도는 50℃에서 4분간 유지한 다음 10℃/min으로 250℃까지 온도를 올려 2분간 유지하였다. 검출기는 FID를 사용하였고, 검출기 및 주입구의 온도는 300℃, 250℃로 유지하였다. 운반기체로서 질소가스는 split ratio를 1:100으로 주입하였다.

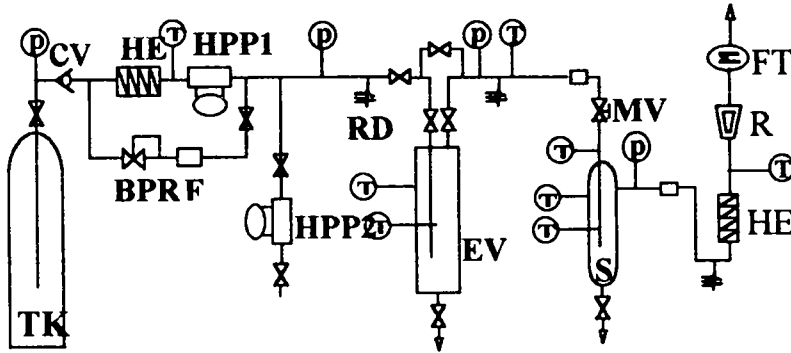


Fig. 1. Flow diagram of supercritical fluid extraction system(BPR: back pressure regulator, CV: check valve, EV: extraction vessel, F: filter, FT: flow totalizer, HE: heat exchanger, HPP: high pressure pump, MV: metering valve, P: pressure gauge, R: rotameter, RD: rupture disk, S: separator, T: temperature indicator, TK: carbon dioxide tank).

4. 용점, 검화가, 요오드가 측정

추출분획물의 용점은 AOCS의 Cc 1-25, 검화가는 Cd 3-25, 요오드가는 Cd 1-25 방법(AOCS, 1990)에 따라 측정하였다.

제 2 절 초임계유체 추출법을 이용한 유지방의 cholesterol 제거

1. 재료

본 실험에 사용한 무수유지방은 시중에서 구입한 버터를 60℃에서 녹인 후 상등액을 Whatman No. 1 으로 여과하여 시료로 사용하였다.

2. 초임계 이산화탄소에 의한 유지방의 추출

본 실험에 사용한 초임계유체 추출장치(Autoclave Engineers, Inc. #08U-06-60-FS)는 최대 압력이 413 bar 까지 사용 가능한 연속 유통형이다(Fig. 2). 먼저 추출조(EV)에 무수유지방 20 g를 주입하였다. 탄산가스는 실린더(TK)로부터 check valve(CV)를 거쳐 고압 피스톤펌프(HPP)에 의해 가압되었다. 이 때 탄산가스 주입부의 공동화 현상을 방지하기 위하여 -20℃ 냉각조(HE)를 설치하여 이산화탄소의 기화를 방지하였다. 가압된 이산화탄소는 역압 조절기(BPR)에 의하여 압력이 조절되었고 압력계(P)에 의해 압력이 측정되었고 추출조로 이송되었다. 추출조의 내용적은 300 ml이고, 온도는 비례형 온도조절기에 의하여 조절되었으며 열전쌍온도계(T)에 의하여 측정되었다. 이와 같이 하여 일정 압력과 온도에서 정상상태로 유지된 후 추출조 출구로 나가는 고압의 혼합물은 흡착제가 충전되어 있는 흡착조(AV)를 통과한 후 가온된 metering valve(MV)를 통하여 분리조(S)에서 대기압으로 감압, 팽창되면서 탄산가스와 추출물로 분리되었다. 이때 통과되는 탄산가스의 유량은

rotameter(R)에 의하여 측정되었고 적산된 부피는 totalizer(FT)에 의하여 측정되어진 후 대기 중으로 방출되었다. 이때 탄산가스의 유량은 7.16 g/min 였다. 추출온도 40℃, 추출압력 276, 345 bar에서 3 또는 4시간 동안 추출하면서 매 30분마다 시료를 취하여 유지방의 수율, 콜레스테롤 함량, 지방산 조성을 측정하였다. 흡착제로는 β -cyclodextrin(셀덱스 B-100, 일본식품화공(주), 일본), talc(hydrous magnesium silicate, Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, USA), celite(545, 신양화학공업(주), 일본), florisol(U.S. Silica Company, Berkeley Springs, W. VA, USA)를 사용하였다. 흡착조에는 유체의 흐름을 균일하게 하기 위하여 흡착조의 위와 아래에 직경 2 mm인 glass bead(WITEG, W. Germany)를 1.25 cm 높이로 충전하였다.

3. 콜레스테롤 분석

추출분획물 약 1 g에 2 M methanolic KOH 10 ml를 가하여 환류 냉각기에서 30분간 비누화 시킨 후, 250 ml 분액 깔때기에서 냉각시킨 다음 ethyl ether와 petroleum ether를 1:1로 혼합한 용매 20 ml를 가하여 2회 추출하였다. 이를 35℃에서 회전진공증발농축기로 농축시켜 isopropanol로 10 ml 정용한 후 cholesterol oxidase 방법(Boehringer, 1995)에 따라 콜레스테롤 함량을 측정하였다.

4. 지방산 분석

지방산 조성은 추출분획물을 메틸에스터화시킨(AOCS, 1990)후 GC (Hewlett-Packard 5890 series II)에 의하여 분석하였으며, column은

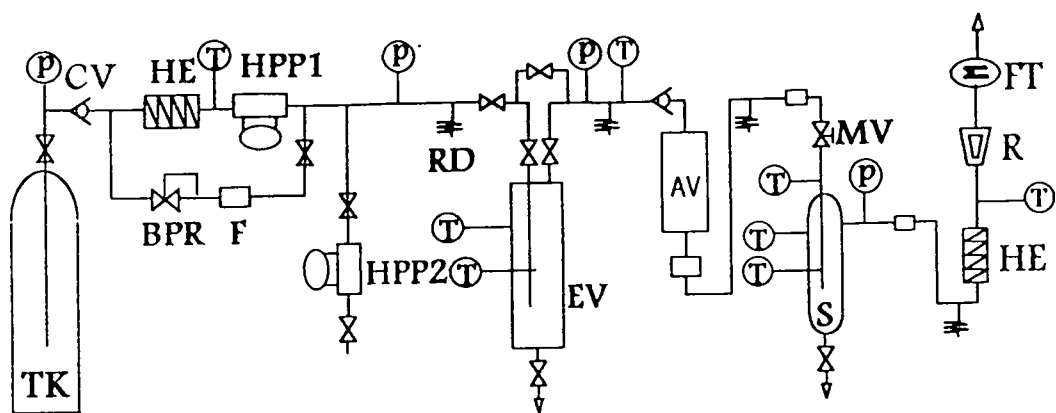


Fig. 2. Flow diagram of supercritical fluid extraction system(AV: adsorption vessel, BPR: back pressure regulator, CV: check valve, EV: extraction vessel, F: filter, FT: flow totalizer, HE: heat exchanger, HPP: high pressure pump, MV: metering valve, P: pressure gauge, R: rotameter, RD: rupture disk, S: separator, T: temperature indicator, TK: carbon dioxide tank).

DBTM-WAX capillary(30 m x 0.25 mm i.d., Supelco, Inc., Bellefonte, PA, USA)를 사용하였고, 온도는 50℃에서 4분간 유지한 다음 10℃/min으로 250℃까지 온도를 올려 2분간 유지하였다. 검출기는 FID를 사용하였고, 주입구와 검출기의 온도는 각각 250℃와 300℃ 였다. 운반기체로서 질소가스를 사용하였으며, split ratio는 100:1이었다.

제 3 장 연구결과 및 고찰

제 1 절 초임계유체에 의한 유지방의 분획

1. 일단계 추출(single-extraction trial)

무수유지방을 초임계 이산화탄소로 241 bar에서 추출온도를 40, 50, 60℃로 달리하여 3시간 동안 30분 간격으로 추출 분획한 후 각 분획들의 추출수율과 지방산 조성을 측정하였다.

가. 추출온도에 따른 유지방의 추출수율

유지방의 추출수율은 추출시간에 따라 증가하였는데(Table 1), 이는 추출시간이 증가할 수록 이산화탄소의 사용량이 많아짐에 따라 유지방에 대한 extract loading이 증가하기 때문이며, 추출온도의 증가에 따라 감소하였는데 이는 추출온도가 증가할 수록 초임계 이산화탄소의 밀도가 작아지므로 유지방의 extract loading이 저하되기 때문이다. 유지방을 241 bar에서 3시간 동안 추출하였을 때 추출온도 40, 50, 60℃에서의 추출수율은 각각 41.2, 37.3, 32.9% 였다.

나. 추출온도에 따른 유지방 분획들의 지방산 조성

동일온도에서 저급(C4-C8)과 중급(C10-C12) 지방산들은 추출된 분획들(E1~E3)에 농축되었고 그 농도는 추출시간의 증가에 따라 감소하였으나,

Table 1. Extraction yield(wt%) of anhydrous milk fat at various extraction temperatures(extraction pressure: 241 bar)

Extraction time(min)	Extraction temperature(℃)		
	40	50	60
30	3.5	3.1	3.3
60	10.4	11.0	10.4
90	19.8	16.8	16.4
120	29.1	25.3	22.7
150	34.4	30.8	27.7
180	41.2	37.3	32.9

고급(C14-C18) 지방산들은 추출잔류물 분획(R)에 농축되었다(Table 2~4). 동일온도에서 고급불포화지방산들(unsaturated)은 추출잔류물 분획에, 고급포화지방산들(saturated)은 추출물 분획에 농축되었다. 불포화지방산들과 고급포화지방산들의 비율(unsat/sat)은 추출잔류물에서 현저히 증가하였다. 저급지방산들과 중급지방산들은 추출온도가 높을 수록 선택적으로 많이 추출되었고, 고급지방산들은 추출온도가 높을 수록 추출잔류물에 농축되었다. 추출온도가 증가할수록 불포화 지방산들은 다소 증가하였고 고급포화지방산들은 다소 감소하였으며, 이에 따라 고급불포화 지방산들과 고급포화지방산들의 비율은 증가하였다. 저급지방산들은 온도에 따라 추출물 분획에 1.54~1.83배, 중급지방산들은 0.85~1.19배 농축되었고, 고급지방산들은 추출잔류물 분획에 1.06~1.08배 농축되었다. 고급불포화지방산들과 고급포화지방산들의 비율은 추출잔류물 분획에 1.08~1.15배 농축되었다.

Table 2. Fatty acid compositions(mol%) of AMF and its SC-CO₂ fractions obtained at 40℃/241 bar

Fractions	AMF	E1	E2	E3	R
Extraction time(min)	0	1	2	3	3
C4:0	7.3	12.2	11.6	10.7	5.3
C6:0	3.7	4.6	3.7	4.2	2.5
C8:0	2.0	2.5	2.5	2.1	1.5
C10:0	4.4	4.8	5.1	3.9	3.7
C12:0	4.7	4.8	5.4	3.9	4.1
C14:0	12.7	12.4	13.8	11.9	12.4
C16:0	27.6	27.2	27.1	27.8	28.4
C16:1	1.6	1.4	0.9	1.6	1.5
C18:0	10.8	8.70	8.80	10.0	12.2
C18:1	22.2	18.7	18.3	21.0	25.1
C18:2	2.4	2.3	2.3	2.5	2.5
C18:3	0.6	0.4	0.5	0.5	0.7
C4-C8	12.9	19.3	17.8	17.0	9.3
C10-C12	9.1	9.6	10.6	7.8	7.8
C14-C18	78.0	71.0	71.6	75.3	82.9
Unsaturated	26.8	22.8	22.0	25.6	29.9
Saturated	51.2	48.2	49.7	49.6	53.0
Unsat/Sat	0.52	0.47	0.44	0.52	0.56

2. 이단계 추출(double-extraction trial)

각 분획들의 지방산 조성 차이를 극대화시키기 위하여 즉 저급, 중급, 고급지방산들과 고급포화, 고급불포화지방산들이 보다 농축된 분획들을 얻기 위하여, 40℃/241 bar에서 일단계 추출로 얻은 추출물 분획은 60℃/241 bar에서 이단계로 5시간 동안 추출하였고, 추출잔류물 분획은 40℃/345 bar에서 이단계로 4시간 동안 추출하면서 매 30분마다 시료를 취하여 지방산 조성과 물리화학적 성질을 측정하였다.

Table 3. Fatty acid compositions(mol%) of AMF and its SC-CO₂ fractions obtained at 50°C/241 bar

Fractions	AMF	E1	E2	E3	R
Extraction time(min)	0	1	2	3	3
C4:0	7.3	14.6	10.6	10.7	5.3
C6:0	3.7	5.9	4.3	4.2	2.3
C8:0	2.0	3.1	2.1	2.1	1.4
C10:0	4.4	5.8	4.0	4.0	3.0
C12:0	4.7	5.0	4.5	4.0	3.7
C14:0	12.7	3.0	13.0	12.1	11.7
C16:0	27.6	25.3	29.0	27.7	28.1
C16:1	1.6	1.2	1.8	1.6	1.8
C18:0	10.8	10.7	9.36	10.0	12.9
C18:1	22.2	22.1	18.9	20.9	26.2
C18:2	2.4	2.7	2.0	2.2	2.8
C18:3	0.6	0.5	0.5	0.5	0.7
C4-C8	12.9	23.6	17.0	16.9	9.0
C10-C12	9.1	10.8	8.4	8.0	6.7
C14-C18	78.0	65.6	74.5	75.0	84.3
Unsaturated	26.8	26.6	23.2	25.2	31.6
Saturated	51.2	39.0	51.3	49.8	52.7
Unsat/Sat	0.52	0.68	0.45	0.51	0.60

가. 이산화탄소 소비량에 따른 추출물과 추출잔류물의 이단계 추출수율

이산화탄소 소비량에 따른 추출곡선은 서로 유사한 경향을 보였는데(Fig. 3), 이는 추출시간에 따른 이산화탄소 소비량의 증가로 extract loading이 증가하였기 때문이다. 그러나 추출시간의 증가에 따라 추출수율이 점차 감소하였는데, 이는 추출초기에 저급지방산들이 보다 많이 추출되어 버렸기 때문이다. 이러한 경향은 기보고된 문헌들과 일치하였다. 한편 추출초기에 lag phase가 관찰되었는데, 이는 실험조건하에서 추출시스템에 초기에 들어 있었던 이산화탄소는 유지방과

Table 4. Fatty acid compositions(mol%) of AMF and its SC-CO₂ fractions obtained at 60℃/241 bar

Fractions	AMF	E1	E2	E3	R
Extraction time(min)	0	1	2	3	3
C4:0	7.3	11.5	14.9	10.6	5.3
C6:0	3.7	4.8	5.7	5.1	2.5
C8:0	2.0	2.3	2.7	2.5	1.5
C10:0	4.4	4.4	5.1	4.6	3.6
C12:0	4.7	4.8	4.2	4.4	4.2
C14:0	12.7	13.3	9.71	11.9	12.2
C16:0	27.6	27.3	25.5	27.5	27.7
C16:1	1.6	1.5	1.2	1.3	1.7
C18:0	10.8	8.81	9.31	9.60	12.1
C18:1	22.2	18.4	19.2	19.8	25.8
C18:2	2.4	2.2	2.1	2.2	3.0
C18:3	0.6	0.5	0.4	0.4	0.4
C4-C8	12.9	18.7	23.3	18.2	9.4
C10-C12	9.1	9.3	9.3	9.0	7.7
C14-C18	78.0	72.0	67.4	72.8	82.9
Unsaturated	26.8	22.6	22.9	23.7	30.9
Saturated	51.2	49.4	44.5	49.0	52.1
Unsat/Sat	0.52	0.46	0.51	0.48	0.59

접촉할 기회가 없이 방출되었기 때문이다. 초임계 이산화탄소에 대한 무수유지방의 extract loading은 40℃/241 bar(밀도: 0.873 g/cm³)에서 0.645% 였다. 일단계 추출에서 무수유지방은 41.2:58.8의 무게비로 추출물과 추출잔류물로 분획되었다. 이단계 추출에서 추출물의 extract loading은 60℃/241 bar(밀도: 0.775 g/cm³)에서 0.686% 였고, 추출잔류물의 extract loading은 40℃/345 bar(밀도: 0.933 g/cm³)에서 0.847% 였다.

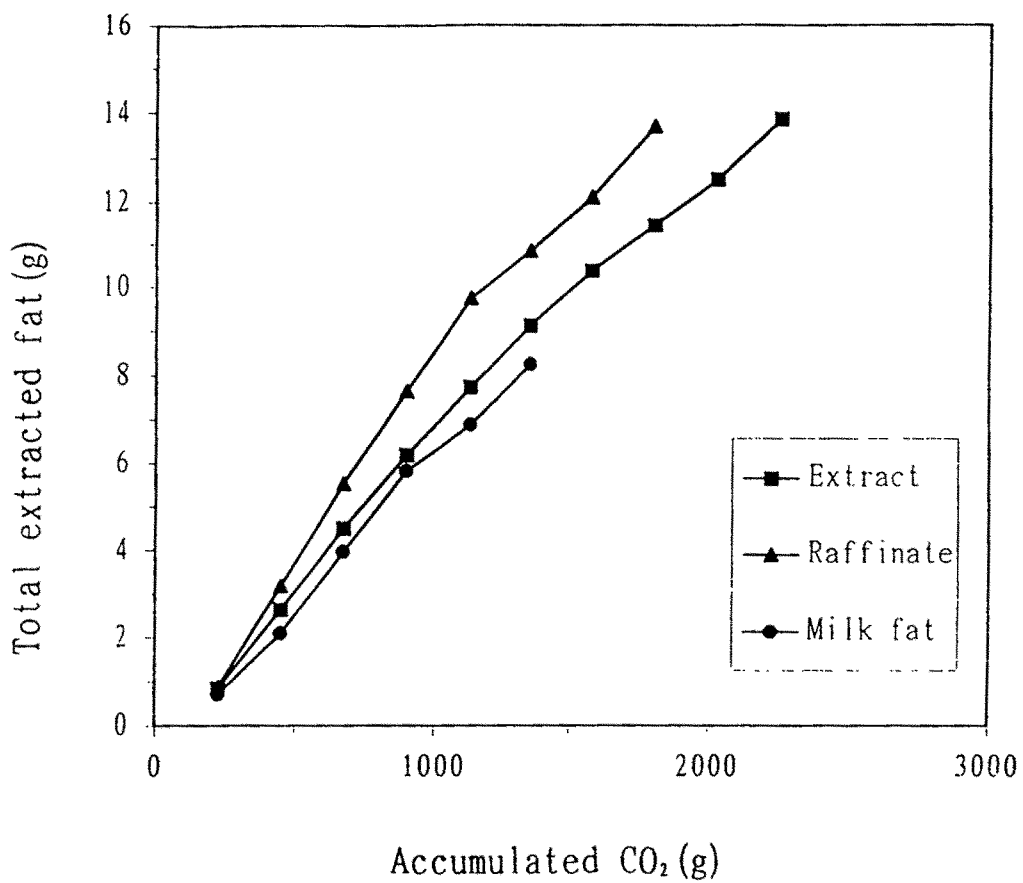


Fig. 3. Extraction curves of AMF at 40°C/241 bar, of an extract at 60°C/241 bar, and of a residue at 40°C/345 bar by SC-CO₂.

나. 유지방 추출물과 추출잔류물 분획들의 지방산 조성

Fig. 4와 5는 일단계 추출에서 얻어진 추출물과 추출잔류물로부터 이단계 추출에서 얻어진 추출물과 추출잔류물들의 지방산 조성을 나타내고 있다. 이단계 추출에서 추출물의 2차 추출(EE)은 일단계 추출에서와 동일한 압력에서 행하였다. 그러나 추출온도를 60℃로 높여 고급지방산들은 잔류물 분획(ER)에 농축시키려고 시도하였다. 마찬가지로 추출잔류물의 2차 추출(RE)은 일단계 추출과 동일한 온도인 40℃에서 행하였지만 추출압력을 345 bar로 높여 저급지방산들은 잔류물 분획(RR)에 농축시키려고 하였다. 이것은 초임계 이산화탄소에 의한 유지방의 분획은 지방의 용해도 차이에 의하여 이루어지기 때문에 가능하다.

추출물의 추출물 분획들(EE1-EE4)은 Fig. 4(a)에서 보는바와 같이 저급지방산이 상당히 농축되었고, 반면 추출잔류물의 추출물 분획들(RE2-RE4)은 고급지방산으로 보다 많이 농축되었음을 알 수 있었다. 추출물의 추출물 분획들(EE1-EE4)에서의 저급지방산들은 원료유지방과 비교하여 볼 때 150-200% 농축되었다. EE1에서 저급지방산 농도는 원료유지방의 2배 였는데, 이것은 지방산 다섯개 중 하나가 저급지방산임을 의미한다. 추출잔류물의 추출물 분획들(RE2-RR)에서 고급지방산 농도는 원료유지방과 비교하여 볼 때 118-141% 였다. 이단계 추출을 일단계 추출과 비교하여 볼 때 저급, 중급 지방산들이 추출물 분획으로 보다 많이 이동하였고, 고급지방산들은 추출물 분획으로 보다 많이 이동되었다.

Fig. 5는 각 분획들에 있어서 포화와 불포화 지방산들의 조성을 나타내고 있다. 일단계 추출과 비교하여 볼 때 이단계 추출에서 추출물의 추출물 분획들(EE1-EE4)에는 고급포화와 불포화지방산들이 많이

감소하였고, 반면 추출잔류물의 추출물 분획들(RE2-Re4)은 고급불포화 지방산들이 보다 많이 농축되었다. 불포화지방산들은 주로 추출 후기 분획들과 잔류물 분획들에 농축되었다. 추출잔류물의 추출잔류물 분획(RR)에서 불포화지방산과 포화지방산의 비율은 원료유지방에 비하여 131% 농축되었다. 따라서 초임계 이산화탄소는 무수유지방의 추출에서 포화도 보다는 주로 분자크기에 의하여 지방산들은 분리함을 알 수 있었다. 결국 일단계 추출에 비하여 이단계 추출인 경우 지방산 조성에 있어서 보다 농축된 분획들을 얻을 수 있었다.

다. 추출시간에 따른 유지방 추출물과 추출잔류물 분획들의 물리화학적 성질

이단계 추출 시험구에 의해 얻어진 추출물과 추출잔류물 분획들의 물리화학적 특성을 Table 5,6에 나타내었다. 녹는점은 21.8~43.1℃로서 분획간에 21.3℃의 차이를 보여주고 있다. 약 69.1%의 분획이 원료 무수유지방보다 낮은 온도에서 녹음을 알 수 있다. 지방의 불포화도를 나타내는 요오드가는 21.6~36.9로 추출잔류물 분획에서 높았고 분자량과 반비례하는 겔화가는 221~255로 추출물 분획에서 높았다. 녹는점과 겔화가 사이에는 높은 상관관계를 보였지만, 녹는점과 요오드가 사이에는 상반관계를 나타내었다. 추출잔류물의 높은 요오드가는 지방산 조성 데이터로 볼 때 고급불포화지방산들이 많이 함유되어 있다는 사실과 일치하였다. 그러나 이에도 불구하고 추출잔류물의 녹는점이 높다는 것은 고급포화지방산들이 많이 함유되어 있기 때문이다.

이와 같이 물리, 화학적 성질이 다른 여러 형태의 유지방 분획들로 분별하므로써 유지방의 이용을 극대화시킬 수 있음은 물론 우수한 풍미, 향미, 조직감을 갖는 여러 가지 가공식품을 제조할 수 있다. 즉 저급, 중급지방산이 농축되어 있는 분획은 미숙아, 화상을 입은 환자 또는 이와

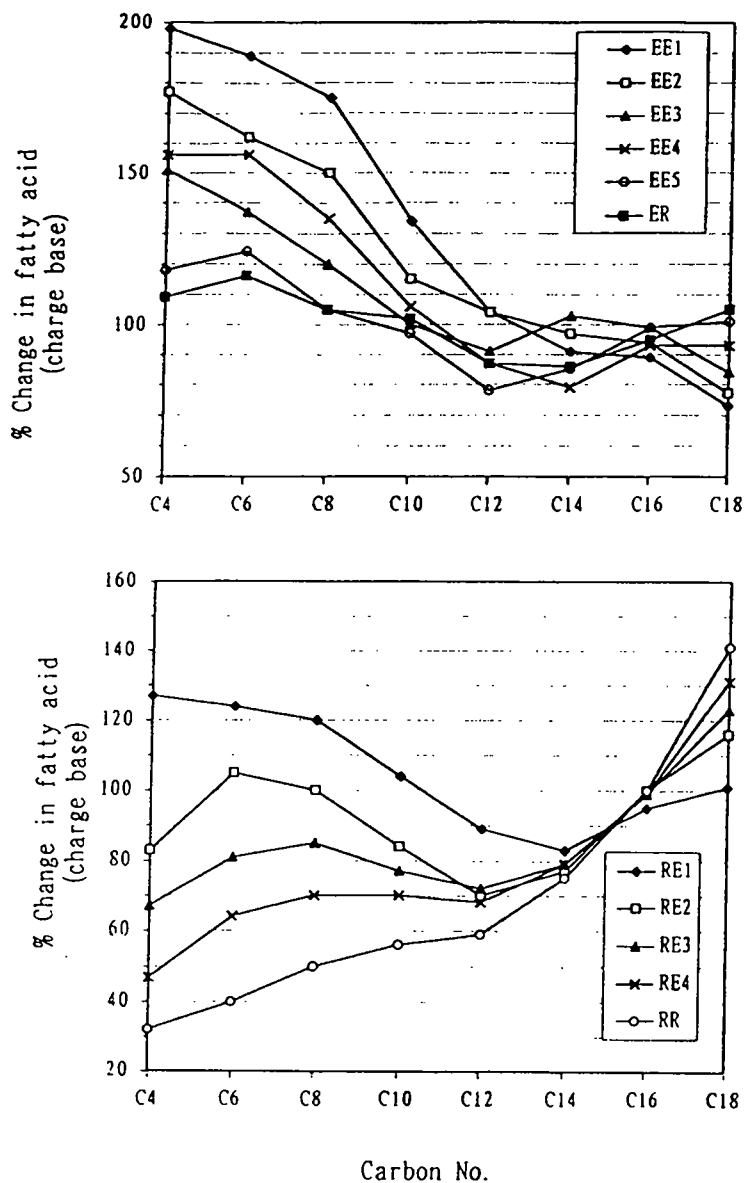


Fig. 4. Distribution of fatty acids in the fractions obtained in two-stage extraction trial from an extract(a) and a residue(b)(EE and ER: extract fractions and residue obtained in two-stage extraction trial from an extract in one-stage-extraction trial, RE and RR: extract fractions and residue obtained in two-stage extraction trial from a residue in one-stage-extraction trial)

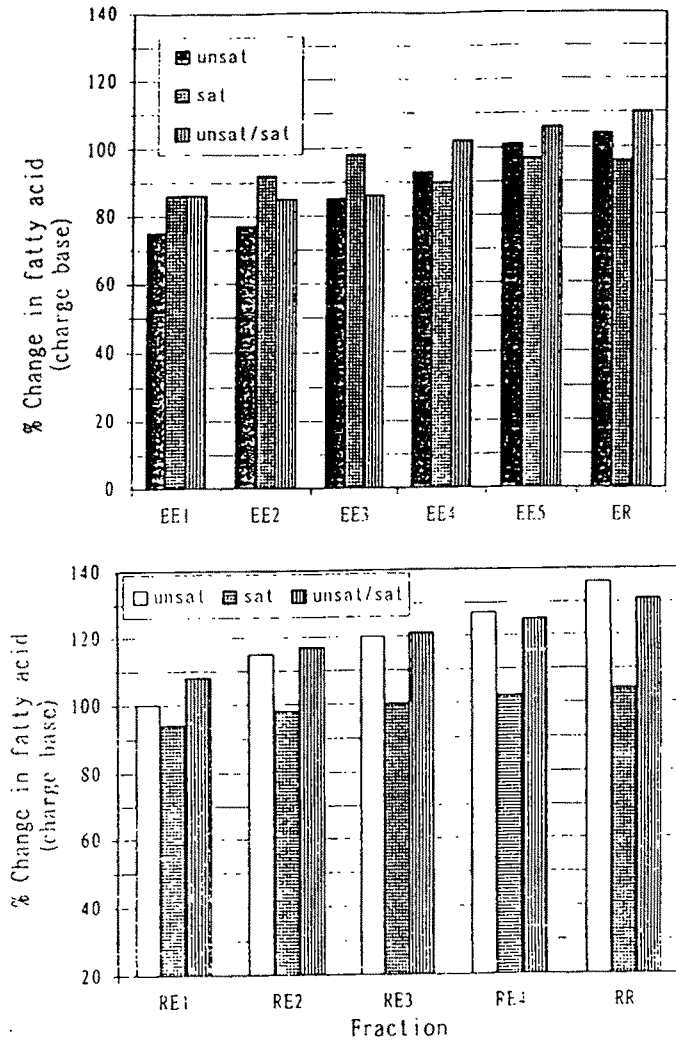


Fig. 5. Distribution of long-chain saturated and unsaturated fatty acids in the fractions obtained in two-stage extraction trial from an extract(a) and a residue(b)(EE and ER: extract fractions and residue obtained in two-stage extraction trial from an extract in one-stage-extraction trial, RE and RR: extract fractions and residue obtained in two-stage extraction trial from a residue in one-stage-extraction trial).

같이 에너지원이 급히 필요한 사람의 식이로 이용되어 질 수 있다. 중급지방산이 농축되어 있는 분획은 과자류 및 아이스크림 제조시 원료로 사용이 가능하고, 고급지방산이 농축되어 있는 분획은 pastry나 비스킷 제조, 그리고 고용점 버터 제조에 이용이 가능하다. 또한 불포화지방산으로 농축되고, 콜레스테롤이 제거된 분획을 이용하여 영양이 우수한 우유를 비롯한 유제품을 제조할 수 있다.

Table 5. Selected physico-chemical properties of the fractions obtained in two-stage extraction from an extract at 60°C/241 bar

Fractions	Fat yield (wt%)	Melting point (°C)	Iodine value	Saponification value
AMF	---	37	31.0	242
TE	100	33	27.2	237
EE1	13.1	22	21.8	255
EE2	17.9	25	22.8	256
EE3	14.7	27	21.4	244
EE4	11.5	32	26.5	246
EE5	12.2	33	30.3	236
ER	30.7	35	31.3	233

EE and ER: extract fractions and residue obtained in two-stage extraction trial from an extract (TE) in one-stage-extraction trial

Table 6. Selected physico-chemical properties in the fractions obtained in two-stage extraction from a residue at 40°C/345 bar

Fractions	Fat yield (wt%)	Melting point (°C)	Iodine value	Saponification value
AMF	---	37	31.0	242
TR	100	39	21.1	221
RE1	15.8	36	28.9	213
RE2	22.4	36	32.1	234
RE3	15.9	39	34.0	228
RE4	14.4	40	36.3	227
RR	31.5	43	36.9	221

RE and RR: extract fractions and residue obtained in two-stage extraction trial from a residue(TR) in one-stage-extraction trial

제 2 절 초임계유체 추출법을 이용한 유지방의 cholesterol 제거

1. 흡착제 종류에 따른 유지방의 수율 및 콜레스테롤 함량

β -cyclodextrin은 수용액상에서 콜레스테롤과 킬레이트 반응을 일으켜 착화합물을 형성하므로, 이 원리를 이용하여 대기압 하에서 우유와 버터로부터 콜레스테롤을 제거할 수 있는데, 이 방법은 제거할 콜레스테롤에 대하여 첨가하는 β -cyclodextrin의 비율이 너무 높은 단점을 가지고 있다 (Courregelonge and Maffrand, 1988; Oakenfull and Sidhu, 1991). 또한 talc는 콜레스테롤 포화용액으로 처리하여 감귤주스 중의 쓴맛 성분인 리모닌을 흡착 제거하는데 이용되었고(Piffere et al., 1990) celite는 수용액상에서 콜레스테롤-사포닌 착화합물을 흡착하는 것으로 알려져 있다 (Sundfeld et al., 1993).

이와 같이 대기압 상태에서 콜레스테롤 흡착능이 있는 것으로 알려진 이들 흡착제를 선택하여, 고압에서 콜레스테롤 흡착능이 높은 것으로 알려진 florisol과 비교하기 위하여, 추출온도 40℃, 추출압력 345 bar에서 유지방 20 g를 추출조에 주입하고, 흡착제로서 β -cyclodextrin은 40 g, talc, celite, florisol(100/200 mesh)은 각각 20 g를 흡착조에 충전한 후 추출·흡착시키면서 3시간 동안 매 30분마다 시료를 취하여 유지방의 수율과 콜레스테롤 함량을 측정하였다(Table 7). 유지방의 수율은 흡착제로 β -cyclodextrin, talc, celite를 통과시킨 시험구 모두 유사하여 추출 3시간 후 약 69%인 것으로 보아 흡착제를 통과시키지 않은 시험구(68.2%)와 비교하여 볼 때 이들 흡착제에는 유지방이 거의 흡착되지 않는 것으로 판

단되었다. 반면 florisol을 통과시킨 시험구는 추출 3시간 후 유지방의 수율이 매우 낮은 것으로 보아 florisol은 유지방을 많이 흡착하는 것으로 판단되었다.

시료로 사용한 무수유지방의 콜레스테롤 함량은 251.6 mg/g이었으며, 이를 기준으로 추출분획물들의 콜레스테롤 함량으로부터 콜레스테롤 제거율을 계산하였다. 유지방 분획들의 콜레스테롤 제거율은 β -cyclodextrin, talc, celite의 경우 초기 추출물에서는 다소 높았으나 추출시간의 증가에 따라 흡착제가 지방과 콜레스테롤로 포화되어 콜레스테롤 제거율은 감소하였다. β -cyclodextrin은 추출시간 60분까지는 약 20%의 콜레스테롤 제거율을 유지하였지만, talc는 120분까지 20% 이상의 콜레스테롤 제거율을 보인 반면, celite는 추출 30분까지는 약 48%의 높은 제거율을 보였지만 그 이후 급격히 감소하였다. 따라서 β -cyclodextrin의 경우는 Oakenfull와 Sidhu(1991)이 지적한 바와 같이 높은 콜레스테롤 제거율을 얻기 위해서는 유지방에 대하여 흡착제의 첨가 비율을 높여야 될 것으로 판단되었다. Talc의 경우는 콜레스테롤 제거율이 약 20% 수준에서 일정할 것으로 추정되는 바, 이는 magnesium silicate의 활성부위인 OH 그룹이 물분자에 의하여 차지되어 버려 콜레스테롤을 흡착시킬 수 있는 활성부위가 감소되었기 때문인 것으로 추정된다 (Pifferi et al., 1990). Celite의 경우는 추출초기에 콜레스테롤 제거율이 48.8%로 높은 것으로 보아 콜레스테롤 제거율은 높이기 위해서는 유지방에 대한 흡착제의 비율을 크게할 필요가 있을 것으로 추정된다.

반면 florisol의 경우 유지방 분획들의 콜레스테롤 제거율은 93% 이상으로 가장 높았다. 그러나 유지방의 수율은 추출 3시간 후 36.1%로 다른 흡착제의 약 반 정도로 매우 낮으므로, 높은 콜레스테롤 제거율을 유지하면서 유지방의 수율을 극대화할 수 있는 유지방과 흡착제의 비율을

Table 7. Fat yield, cholesterol concentration and percent cholesterol reduction of milk fat fractions by supercritical carbon dioxide with different adsorbents at 40°C/345 bar

Adsorbent	Extraction time(min)	30	60	90	120	150	180	Total
		β -Cyclo	CO ₂ used(g)	218	221	209	214	211
-	Fat yield(wt%)	4.9	14.7	16.2	14.9	12.2	6.9	69.8
dextrin	Chol. conc(mg/100 g)	178.5	202.8	226.7	248.6	264.2	256.3	232.4
(40:20) ¹⁾	Chol. reduction(%)	-29.0	-19.3	-9.8	-1.1	+5.0	+1.8	-7.6
	CO ₂ used(g)	218	216	213	213	218	209	1,287
Talc	Fat yield(wt%)	5.7	13.1	15.3	14.4	12.4	8.2	69.1
(20:20)	Chol. conc(mg/100 g)	200.8	174.6	177.8	189.7	221.8	235.2	196.2
	Chol. reduction(%)	-20.1	-30.6	-29.3	-24.6	-11.8	-6.5	-22.0
	CO ₂ used(g)	216	214	211	216	216	216	1,289
Celite	Fat yield(wt%)	3.7	15.7	15.3	14.2	11.7	9.1	69.7
(20:20)	Chol. conc(mg/100 g)	128.8	217.2	261.7	272.5	271.1	277.0	250.3
	Chol. reduction(%)	-48.8	-13.6	+4.0	+8.3	+7.7	+10.0	-0.5
	CO ₂ used(g)	211	214	200	230	202	218	1,275
Florisil	Fat yield(wt%)	--	--	3.2	12.4	10.2	10.3	36.1
(20:20)	Chol. conc(mg/100 g)	--	--	14.7	15.5	12.9	--	14.3
	Chol. reduction(%)	--	--	-94.1	-93.8	-94.8	--	-94.3

¹⁾ The weight ratio of milkfat to adsorbent

최적화할 필요가 있다. Lim과 Rizvi(1996)는 연속식 공정에서 40°C/241 bar로 유지방을 추출 함착시켜 54~86%의 콜레스테롤이 제거된 유지방 분획을 얻었다.

2. 흡착제의 입자크기에 따른 유지방의 수율 및 콜레스테롤 함량

Table 7에서 콜레스테롤 제거율이 가장 높은 것으로 알려진 florisol에 대한 흡착특성을 밝히기 위하여 추출온도 40℃, 추출압력 276 bar에서 유지방 20 g를 추출조에 주입하고, 흡착제로서 florisol의 입자크기별(30/60, 60/100, 100/200 mesh)로 각각 5 g를 흡착조에 충전한 후 추출·흡착시키면서 4시간 동안 매 30분마다 시료를 취하여 유지방의 수율과 콜레스테롤 함량을 측정하였다(Table 8). 추출시간에 따른 유지방의 수율은 30/60과 60/100 mesh의 경우는 약 68%로 거의 유사하였다. 그러나 100/200 mesh의 경우는 30/60과 60/100 mesh와 비교하여 볼 때 추출초기에는 유지방의 수율이 비슷하였으나 추출 2시간부터는 다소 감소하여 추출 3시간 후에는 64.8%였다. 유지방과 florisol의 비율이 20:20였을 때는(Table 7) 추출초기에 추출된 유지방이 모두 흡착되었지만 20:5였을 때는(Table 8) 추출초기에도 유지방의 수율이 높은 것으로 보아, 유지방의 수율을 높이기 위해서는 유지방에 대하여 흡착제의 비율을 적게하는 것이 바람직하였다.

추출시간에 따른 추출물 분획에서의 콜레스테롤 제거율은 추출초기에는 높은 반면 추출시간의 증가에 따라 서서히 감소하였는데, 이는 추출시간의 증가에 따라 흡착제가 지방과 콜레스테롤로 포화되고 있음을 보여주고 있다. 콜레스테롤 제거율은 30/60 mesh가 가장 높았으며, 그 다음 100/200, 60/100 mesh 순이었다.

일반적으로 동일 흡착제인 경우 입자크기가 작을수록 표면적이 커서 흡착능 즉 분리효율이 높은 것으로 알려져 있다(Carrol, 1961). 그런데 본 실험에 사용한 florisol(standard activation grade, 활성화 온도: 650℃)의 표면적은 30/60, 60/100, 100/200 mesh의 경우 각각 2.54, 2.91,

2.65 m²/g로 60/100 mesh가 가장 크고, 그 다음 100/200, 30/60 mesh 순으로 입자크기와 표면적과의 상관관계가 정반대였다. 이는 florisil이 합성품이며 등급과 입자크기에 따라 각각 다른 종류의 화합물과 반응하도록 제조되어, 석유산업에서는 30/60 mesh가, 유기염소계 농약에 대해서는 60/100 PR 등급(pesticide residue analysis grade, 활성화 온도: 675℃)이 가장 효과적인 것으로 보아, 입자크기가 표면적을 좌우하는 유일한 변수가 아니며, 활성화 온도와 시간 또한 중요한 역할을 하기 때문이다(US Silica, 1997).

Table 8. Fat yield, cholesterol concentration and percent cholesterol reduction of milk fat fractions by supercritical carbon dioxide with different mesh size of florisil at 40℃/276 bar(the weight ratio of milk fat to adsorbent is 20:5).

		Extraction time(min)							Total
		60	90	120	150	180	210	240	
30/60	CO ₂ used(g)	452	207	220	213	214	214	204	1724
	Fat yield(wt%)	8.0	11.0	16.4	8.8	9.4	8.2	6.8	68.6
	Chol. conc(mg/100 g)	31.8	22.8	35.2	57.1	79.8	99.3	131.7	58.9
	Chol. reduction(%)	-87.3	-90.9	-86.0	-77.3	-68.2	-60.5	-47.6	-76.5
60/100	CO ₂ used(g)	426	213	209	205	205	196	191	1,645
	Fat yield(wt%)	9.8	11.9	11.9	10.3	9.0	8.0	7.5	68.4
	Chol. conc(mg/100 g)	67.6	68.9	115.4	169.4	191.2	226.3	244.3	145.6
	Chol. reduction(%)	-73.1	-72.6	54.1	-32.6	-24.0	-10.0	-2.9	-42.1
100/200	CO ₂ used(g)	463	220	198	191	202	191	195	1,660
	Fat yield(wt%)	11.3	11.7	10.8	9.3	7.8	7.2	6.7	64.8
	Chol. conc(mg/100 g)	53.0	55.4	77.6	101.3	128.4	139.6	162.2	94.4
	Chol. reduction(%)	-78.9	-77.9	-69.1	-59.7	-48.9	-44.5	-35.5	-62.4

3. 흡착제의 비율에 따른 유지방의 수율 및 콜레스테롤 함량

유지방과 흡착제의 비율이 유지방의 수율과 콜레스테롤 제거율에 미치는 영향을 검토하기 위하여, 추출온도 40℃, 추출압력 276 bar에서 유지방 20 g를 추출조에 주입하고, 흡착제로서 florisol 30/60과 100/200 mesh를 각각 10 g를 흡착조에 충전한 후 추출·흡착시키면서 4시간 동안 매 30분마다 시료를 취하여 유지방의 수율과 콜레스테롤 함량을 측정하였다(Table 9). 추출 4시간 후 유지방의 수율은 30/60과 100/200 mesh의 경우 유지방과 흡착제의 비율이 20:5였을 때는(Table 8) 각각 68.6과 64.8%인 반면 20:10였을 때는(Table 9) 각각 57.5와 60.4%로 추출시간에 따른 유지방의 수율은 감소하였는데, 이는 유지방에 대하여 흡착제의 비율이 높을수록 유지방이 흡착제에 많이 흡착되었기 때문이다. 100/200 mesh의 경우 흡착제 비율의 증가에 따른 유지방의 흡착 정도는 30/60 mesh에 비하여 다소 적었다.

콜레스테롤 제거율은 유지방과 흡착제의 비율이 20:5였을 때는(Table 8) 추출시간에 따라 감소 폭이 큰 반면 20:10였을 때는(Table 9) 추출 210분까지는 91% 이상이었다. 이로 보아 유지방의 수율을 높이면서 콜레스테롤 제거율을 높이기 위해서는 유지방과 흡착제의 비율은 20:10이 적당하였다.

Shishikura 등(1986)은 흡착제로 실리카겔을 사용하여 40℃/300 bar에서 유지방을 추출·흡착시켰을 때 유지방 20 g에 대하여 실리카겔을 60 g 사용하였을 때는 수율이 50%였고, 콜레스테롤 제거율이 94%인 반면 실리카겔을 20 g 사용하였을 때는 수율이 80%였고, 콜레스테롤 제거율이 68%였다고 보고하였다. 또 Kwon과 Chao(1996)도 쇠기름을 40℃/345 bar에서 추출하여 florisol을 통과시킨 결과 쇠기름에 대하여 흡착제의 비율이 증가할

수록 쇠기름의 수율은 감소하였으나 콜레스테롤 제거율은 높았으며, 쇠기름 100 g에 대하여 florisil을 200 g 충전시킨 결과 콜레스테롤을 59% 제거할 수 있었다고 보고하였다. 이로 보아 시료에 대하여 사용되는 흡착제의 비율이 높으면 콜레스테롤 제거율은 높은 반면, 지방의 수율은 감소한다는 것을 알 수 있었다.

Table 9. Fat yield, cholesterol concentration and percent cholesterol reduction of milk fat fractions by supercritical carbon dioxide at 40°C/276 bar(the weight ratio of milk fat to adsorbent is 20:10).

Mesh size	Extraction time(min)								
	60	90	120	150	180	210	240	Total	
30/60	CO ₂ used(g)	445	218	207	207	213	204	184	1678
	Fat yield(wt%)	4.7	9.0	10.2	9.9	9.1	8.0	6.6	57.5
	Chol. conc(mg/100 g)	71.2	18.0	9.6	12.1	15.6	21.6	27.4	21.0
	Chol. reduction(%)	-71.6	-92.8	-96.1	-95.1	-93.7	-91.3	-89.0	-91.6
100/200	CO ₂ used(g)	470	227	218	200	205	196	196	1,712
	Fat yield(wt%)	8.4	11.0	10.6	9.5	7.5	6.9	6.5	60.4
	Chol. conc(mg/100 g)	6.9	11.6	8.3	12.4	18.1	14.3	45.8	15.2
	Chol. reduction(%)	-97.2	-95.3	-96.7	-95.0	-92.8	-94.3	-81.7	-93.9

4. 지방산 조성

추출온도 40°C, 추출압력 276 bar에서 유지방 20 g를 추출조에 주입하고, 흡착제로서 florisil 100/200 mesh 10 g를 흡착조에 충전한 후 추출·흡착시키면서 4시간 동안 매 30분마다 시료를 취하여 추출분획물의

지방산 조성을 측정하였다(Table 10). 저급지방산들은 초기 추출물 분획들에 농축되었고, 고급지방산들은 추출잔류물 분획에 농축되어, 원료 유지방의 지방산 조성과 다른 양상을 나타내었다. 초기 추출물 분획에서 저급 지방산의 비율은 높고 불포화 고급 지방산의 비율은 낮은 이유는 지방산의 증기압과 용해도에 대한 사슬길이의 영향이 불포화도의 영향보다 크기 때문이다(Chrastil, 1982). 이상의 결과로부터 초임계유체 추출 및 흡착법은 유지방으로부터 콜레스테롤을 제거하는 동시에 물리·화학적 성질이 다른 분획 즉 저급지방산이 농축된 분획, 불포화지방산이 농축된 분획 등을 얻을 수 있음을 보여주고 있다.

흡착제에 흡착된 콜레스테롤은 에틸아세테이트, 헥산, 에탄올에 의하여 회수할 수 있으며(Lim, 1992), 콜레스테롤은 현재 의약산업에서 호르몬, 스테로이드, 비타민 D 제조의 성분으로 이용되고 있는 바, 만일 유지방중으로부터 콜레스테롤이 농축된 분획을 얻을 수 있다면, 유지방 자체의 가격보다 더 높은 가격으로 판매될 수 있으며, 경제성을 분석한 결과 콜레스테롤이 90% 제거된 유지방을 제조하는데에는 \$0.15~0.20/lb이 더 소요될 것으로 예측하고 있다(Bradley, 1989). Chidambara 등(1993)은 연간 240 또는 800 톤의 용량을 가진 시설에서 초임계 이산화탄소로 유지방을 분획하면 kg 당 \$0.77 또는 0.34의 가공비용이 더 소요될 것이라고 보고하였다.

Table 10. Fatty acid composition of SC-CO₂ fractions from anhydrous milk fat passed through 100/200 mesh of florisil at 40°C /276 bar.

Fractions	Feed	E2 ¹⁾	E3	E4	E5	E6	E7	E8	R ²⁾
Extraction time(min)	---	60	90	120	150	180	210	240	---
CO ₂ used (g)	---	470	227	218	200	205	196	196	---
Fat yield (wt%)	100	8.4	11.0	10.6	9.5	7.5	6.9	6.5	39.6
C4:0	3.7	4.4	6.1	4.9	5.0	4.0	3.4	2.9	1.2
C6:0	1.9	2.9	3.1	2.6	2.5	2.5	2.3	2.1	1.1
C8:0	1.3	2.0	2.0	1.6	1.6	1.5	1.4	1.3	0.8
C10:0	3.0	4.4	4.3	3.8	3.5	3.4	3.3	3.2	2.1
C12:0	3.5	4.8	4.7	4.3	4.0	3.9	3.8	3.6	2.7
C14:0	11.2	13.1	13.2	12.7	12.1	11.9	11.7	11.4	9.6
C16:0	29.3	28.9	29.5	30.1	30.0	30.0	29.8	29.9	28.5
C16:1	1.5	1.6	1.5	1.5	1.5	1.5	1.6	1.5	1.5
C18:0	13.1	10.2	9.7	10.8	11.7	12.0	12.2	12.9	15.7
C18:1	27.4	24.0	22.2	24.0	24.4	25.6	26.5	27.2	32.4
C18:2	3.2	2.9	2.8	2.9	2.9	3.0	3.1	3.2	3.6
C18:3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3
C4-C8	6.9	9.3	11.2	9.1	9.1	8.0	7.1	6.3	3.1
C10-C12	6.5	9.2	9.0	8.1	7.5	7.3	7.1	6.8	4.8
C14-C18	86.6	81.5	79.8	82.8	83.4	84.7	85.8	86.9	92.1
unsat	33.0	29.3	27.4	29.2	29.6	30.8	32.1	32.7	38.3
sat	53.6	52.2	52.4	53.6	53.8	53.9	53.7	54.2	53.8
unsat/sat	0.61	0.56	0.52	0.54	0.55	0.57	0.59	0.60	0.71

¹⁾ Extract, ²⁾ Residue

제 4 장 참고문헌

A.O.C.S.: *Official Methods and Recommended Practice of the American Oil Chemists' Society*. 4th ed., American Oil Chemists' Society, Champaign, Illinois, Ce2-66 (1990)

Arul, J., Boudreau, A., Makhlof, J., Tardif, R. and Sahasrabudhe, M. R.: Fractionation of anhydrous milk fat by supercritical carbon dioxide. *J. Food Sci.*, **52**, 1231(1987)

Arul, J., Boudreau, A., Makhlof, J., Tardif, R. and Grenier, B.: Distribution of cholesterol in milk fat fractions. *J. Dairy Res.*, **55**, 361-371 (1988)

Boehringer Mannheim: *Methods of Enzymatic Bioanalysis and Food Analysis*, Mannheim, Germany, p.18 (1995)

Borges, S.V., Martucci, E.T. and Muller, C.O.: Optimization of the extraction of cholesterol from dehydrated egg yolk using acetone. *Lebensm.-Wiss.U.-Technol.*, **29**, 687-690 (1996)

Bradley, Jr., R. L.: Removal of cholesterol from milk fat using supercritical carbon dioxide. *J. Dairy Sci.*, **72**, 2834-2840 (1989)

Carrol, K.K.: Separation of lipid class by chromatography on florisil. *J. Lipid Res.*, **2(2)**, 135-141 (1961)

Chidambara, R.C.B., Bhaskar, A.R. and Rizvi, S.S.H.: Processing of milk fat with SC-CO₂: mass transfer and economic aspects. *Food Bioproducts Process Trans. Inst. Chem. Engr.*, Part C, **71**, 3-10 (1993)

Chrastil, J.: Solubility of solids and liquids in supercritical carbon dioxide. *J. Phys. Chem.*, **86**, 3016-3021 (1982)

Couregelonge, J. and Maffrand, J.P.: Process for the elimination of the cholesterol contained in animal fat and the reduced-cholesterol fat obtained. *Eur. Patent 0256911* (1988)

Oakenfull, D.G. and Sidhu, G.S.: Processing technology for cholesterol extraction. Proceedings of the 1991 Conference on Fat and Cholesterol Reduced Foods: Technologies and Ingredients, Atlanta, GA IBC USA Conference Inc., South Natick, MA, p.60 (1991)

Kosikowski, F.V.: "Cholesterol - Free" milks and milk products: limitations in production and labeling. *Food Technol.*, **44(11)**, 130-140 (1990)

Kwon, Y.A. and Chao, R.R.: Effect of combined adsorbents on beef tallow extracted by supercritical carbon dioxide. *Foods Biotechnol.*, **5**(1), 21-25 (1996)

Lim, S.: Performance characteristics of a continuous supercritical CO₂ separation system coupled with adsorption. *Ph.D. Thesis*, Cornell Univ., Ithaca, New York (1992)

Lim, S. and Rizvi, S.S.H.: Adsorption and desorption of cholesterol in continuous fluid processing of AMF. *J. Food Sci.*, **61**(4), 817-820 (1996)

McLachlan, C.N.S., Catchpole, O.J. and Hamilton, B.H.: Separation of sterols from lipids. *US Patent* 5,024,846 (1991)

Pifferi, P.G., Manenti, I., Palleschi, C., Romagnoli, S. and Malacarne, A.: Dibittering of citrus juices with adsorbents. In *Engineering and Food*, Spiess, W.E.L. and Schubert, H. (Eds.), Elsevier Applied Science, New York, Vol. 3, p.128-134 (1990)

Shishikura, A., Fujimoto, K., Kaneda, T., Arai, K. and Saito, S.: Modification of butter oil by extraction with supercritical carbon dioxide. *Agri. Biol. Chem.*, **50**, 1209-1215 (1986)

Smith, D.M., Awad, A.C., Bennink, M.R. and Gill, J.L.: Cholesterol reduction in liquid egg yolk using β -cyclodextrin. *J. Food Sci.*, **60**(4), 691-694, 720 (1995)

Sundfeld, E., Yun, S., Krochta, J.M. and Richardson, T.: Separation of cholesterol from butteroil using Quillaja saponins. *J. Food Process Eng.*, **16**, 191-205 (1993)

U.S. Silica: Silica, The preferred adsorbent for chromatography. U.S. Silica Company, Berkely Springs, WV. (1997)

Walstra, P. and Jenness, R.: *Dairy Chemistry and Physics*. John Wiley and Son Inc., New York, p. 58 (1984)

제 4 세부과제. 물성 및 관능검사

제 1 장. 서 론

관능검사는 식품의 특성을 시각, 후각, 미각, 촉각 및 청각으로 감지되는 반응을 측정, 분석 내지 해석하는 과학의 한 분야이다. 그래서 관능검사는 식품에 대한 소비자의 기대 또는 욕구를 알아내고 소비자의 제품선택에 미치는 이들 특성의 중요성을 결정하는데 있다. 관능검사의 명확한 목적을 달성하기 위하여 적합한 관능검사 방법을 선정하고 믿을 만한 패널을 동원하여 표준환경에서 관능검사를 실시하여 얻은 결과를 합당한 통계분석 방법으로 분석한 관능검사 결과의 해석은 산업체에서 중요한 결정을 하는데 믿을 만한 자료로 사용할 수 있다. 그런 반면에 검사의 방법이 잘못되었는지, 패널훈련이 잘 되지 못한 경우나 해석이 과학적이지 못할 경우, 관능검사는 잘못된 결정을 유도할 수 있다⁽¹⁾.

관능검사전에 특히 중요한 것은 패널요원의 선정과 훈련이다. 패널은 관능검사를 할 수 있는 자격을 지닌 사람의 집단으로 제품의 관능적 품질에 관한 정확한 정보를 얻기 위하여 감도나 재현성있는 패널을 확보, 유지하는 일은 매우 중요하다. 이런 능력있는 패널을 갖추려면 패널을 선정하여 교육 및 훈련을 하는 것이 중요하다^(2,3).

소비자가 원하는 제품의 성질을 파악하고 이것에 맞추어 신제품을 개발하는 것은 기업이 성장하기 위한 필수조건이다. 소비자의 기호도가 높을 가능성이 있는 품질특성을 정하고 기존 표준물질과 비교하여 신제품의 기호도가 어떤 상태에 있는지 조사하는데 관능검사의 중요성이 있다⁽⁴⁾.

본 연구는 패널요인을 정확하게 선정하고 훈련시켜 신제품 개발에 활용 하므로써 신제품이 소비자에게 환영받는 제품이 될 수 있도록 훈련하며, 또한 신제품 개발에 참여하여 콜레스테롤이 제거된 유제품을 개발하는데 목적을 두고 있다.

제 2 장. 연구 방법

제 1 절. 시유 및 유제품의 관능검사

훈련된 관능검사요원을 검사원으로 선정하여 3점, 5점 9점척도법으로 조직특성에 대한 관능검사를 실시하였다.

제 2 절. 시유 및 유제품의 조직검사

조직검사는 Rheometer(Fudo Co, Model NRM-2002 J Type, Japan)를 사용하여 경도(hardness), 응집성(cohesiveness), 탄력성(elasticity)를 측정하였다.

제 3 절. 통계분석

분석결과에 따른 통계분석은 완전임의배치법(C.R.D.)에 의거하여 Duncan's multiple range test로 분석한다⁽⁶⁾.

제 4 절. 콜레스테롤이 제거된 크림과 버터의 개발

본 연구는 주관 연구기관의 광혜수 교수가 제 1차년도와 제 2차년도에 수행한 크림의 콜레스테롤 제거에 관한 실험의 연속으로서 크림과 버터의 산업화를 위하여 계획되었다. 각 세부과제의 연구내용은 각 제품의 표준공정을 확립하

고, pilot scale 생산과 대량생산 제조의 가능성을 타진하며, 상품화를 위한 소비자 기호도 조사를 하는 것이다.

제 3 장. 연구결과 및 고찰

제 1 절. 연구결과

1. 유제품의 관능검사 훈련

관능검사요원의 기본맛에 대한 훈련을 위하여 단맛, 쓴맛, 짠맛, 신맛, 그리고 매운맛에 대한 실험을 3점검사를 통하여 실시하였는데, 그 결과는 Table 1에서와 같다. 관능검사요원으로 선정된 20명 모두 이들 기본맛의 시험에서 모두 정확하게 맞추었다

Table 1. 3점 검사를 통한 기본맛의 관능검사 훈련

검사	<u>단맛</u>	<u>쓴맛</u>	<u>짠맛</u>	<u>신맛</u>	<u>매운맛</u>	
요원	구분함	구분못함	구분함	구분못함	구분함	구분못함
1	○		○		○	
2	○		○		○	
3	○		○		○	
4	○		○		○	
5	○		○		○	
6	○		○		○	
7	○		○		○	
8	○		○		○	
9	○		○		○	
10	○		○		○	
11	○		○		○	
12	○		○		○	
13	○		○		○	
14	○		○		○	
15	○		○		○	
16	○		○		○	
17	○		○		○	
18	○		○		○	
19	○		○		○	
20	○		○		○	

위에서 기본적인 관능검사 훈련이 된 요원들에게 3점검사를 이용하여 우유의 이취인 산패취, 가열취, 산화취 그리고 쓴맛등의 검사를 훈련한 결과는 Table 2에서와 같다. 이 실험에서도 모든 관능검사요원들이 모든 이취를 정확하기 구별하였다.

Table 2. 3점 검사를 통한 우유의 이취 관능검사 훈련

검사 요원	산패취		가열취		산화취		쓴맛	
	구분함	구분못함	구분함	구분못함	구분함	구분못함	구분함	구분못함
1								
2	○		○		○		○	
3	○		○		○		○	
4	○		○		○		○	
5	○		○		○		○	
6	○		○		○		○	
7	○		○		○		○	
8	○		○		○		○	
9	○		○		○		○	
10	○		○		○		○	
11	○		○		○		○	
12	○		○		○		○	
13	○		○		○		○	
14	○		○		○		○	
15	○		○		○		○	
16	○		○		○		○	
17	○		○		○		○	
18	○		○		○		○	
19	○		○		○		○	
20	○		○		○		○	

시중에서 수거한 시유를 시료로 하여 관능검사 요원들에게 우유의 품질을 5점검사를 통하여 실시하였다. 예상했던 것과 마찬가지로 16명의 요원들이 3(보통이다)점을 주었으며, 4명은 4(조금좋다)점을 주어 비교적 정확한 우유의 품질을 구별하였다.

Table 3. 5점 검사를 통한 우유의 품질검사와 관능검사 훈련

관능 요원	1(나쁘다)	2(조금나쁘다)	3(보통이다)	4(조금좋다)	5(좋다)
1			○		
2			○		
3			○		
4			○		
5			○		
6					○
7			○		
8			○		
9			○		
10			○		
11			○		
12			○		
13			○		
14					○
15					○
16			○		
17			○		
18					○
19			○		
20			○		

시중에서 수거한 유지방 12% 바닐라 아이스크림을 시료로 하여 아이스크림의 물성 및 관능검사를 5점검사를 통하여 실시한 결과는 Table 4에서와 같다. 17명의 관능검사 요원들이 이 제품의 품질을 3(보통이다)으로 평가하고 3명만이 4(조금좋다)로 평가하여 대부분의 관능검사 요원들이 이 아이스크림 시료의 품질을 정확하게 구별하였다.

Table 4. 5점검사를 통한 아이스크림의 품질검사와 관능검사 훈련

관능 요원	1(나쁘다)	2(조금나쁘다)	3(보통이다)	4(조금좋다)	5(좋다)
1			○		
2			○		
3			○		
4			○		
5				○	
6			○		
7			○		
8			○		
9			○		
10			○		
11			○		
12				○	
13			○		
14			○		
15			○		
16			○		
17			○		
18			○		
19			○		
20				○	

숙성시키지 않은 2% 소금 첨가된 버터를 시중에서 구입하여 이 시료의 5점 검사의 관능검사 방법으로 선정된 관능검사 요원 20명이 검사한 결과는 Table 5에서와 같다. 14명의 요원이 4(조금좋다)점을 주었으며, 6명이 3(보통이다)점을 주어 이 버터의 품질평가에서 차이를 보였다. 버터는 숙성하지 않을 경우에 원료로 사용한 크림의 신선도와 관계한다. 국내에서 생산된 크림은 저장기간이 짧아 비교적 양호한 버터를 생산할 수 있는 반면, 수입크림으로 버터를 제조할 경우에는 산패취 등 이취를 가진 품질이 저하된 생산품이 될 수도 있다.

Table 5. 5점검사를 통한 버터의 품질검사와 관능검사 훈련

관능 요원	1(나쁘다)	2(조금나쁘다)	3(보통이다)	4(조금좋다)	5(좋다)
1					○
2					○
3					○
4			○		
5					○
6					○
7			○		
8					○
9			○		
10					○
11			○		
12					○
13			○		
14					○
15					○
16					○
17					○
18					○
19					○
20			○		

Table 6에서는 시유, 크림, 버터를 각각 4개의 시료를 각기 다른 회사의 제품으로 수거하여 20명의 관능검사요원들이 검사한 결과를 평균한 값들이다. 이때 사용한 관능검사 방법은 5점과 9점검사였다.

시험한 시유의 맛과 향미는 비교적 양호하였으며 시료간의 차이는 거의 없었다. 조직과 외모, 색깔에서 모두 유사한 결과를 얻었다. 크림과 버터에서도 총 점수가 유사하여 제품간의 품질차이가 거의 없었으며, 관능검사 요원들의 검사 능력이 많이 향상되었다.

Table 6. 우유 및 유제품의 관능검사와 물성

제품	Flavor taste**	Body&Texture*	Apperance&Color *	Total Score	
시유	1	6.4	3.1	3.8	13.3
	2	6.6	3.3	3.7	13.6
	3	6.4	3.2	3.8	13.4
	4	6.2	3.1	3.9	13.2
크림	1	5.7	3.9	4.0	13.6
	2	5.9	4.1	3.9	13.9
	3	6.1	3.9	3.8	13.8
	4	5.4	3.9	4.0	13.3
버터	1	6.3	4.0	3.0	13.3
	2	6.2	3.9	2.9	13.0
	3	6.4	3.7	3.0	13.1
	4	6.3	3.8	3.1	13.2

- * 5점검사 (1 : 아주 나쁘다. 2 : 나쁘다. 3 : 보통이다. 4 : 좋다. 5 : 아주 좋다)
- ** 9점검사 (1 : 극도로 싫다. 2 : 대단히 싫다. 3 : 보통으로 싫다. 4 : 약간 싫다 5 : 좋지도 싫지도 않다. 6 : 약간 싫다. 7 : 보통으로 싫다. 8 : 대단히 좋다. 9 : 극도로 좋다.)

Table 7은 아이스크림과 버터의 물성을 측정하기 위하여 Rhepometer를 이용하여 각 시료의 hardness, cohesiveness, elasticity 등을 측정한 결과로 시료 간의 유의적 차이가 없이 유사한 수치가 나왔다.

Table. 7 아이스크림과 버터의 물성 측정

시 료	Hardness	Cohesiveness	Elasticity	
아이스크림	1	155	0.31	0.38
	2	154	0.32	0.44
	3	156	0.30	0.42
	4	154	0.28	0.40
	5	158	0.33	0.39
버 터	1	1.03	0.22	0.34
	2	1.02	0.25	0.39
	3	0.93	0.26	0.37
	4	1.00	0.26	0.35
	5	0.97	0.24	0.35

훈련된 20명의 관능검사 요원을 통하여 우유 및 유제품의 관능검사를 5점 검사로 실시한 결과, 시유에서는 sample D, 크림에서는 sample A, 아이스크림에서는 sample C, 버터에서는 sample B, 치즈에서는 sample A가 가장 높은 점수를 나타내었다(Table. 8).

Table 8. 5점 검사를 통한 우유 및 유제품의 관능검사

시 료	Samples			
	A	B	C	D
시 유	3.20±0.40	3.20±0.40	3.20±0.40	3.50±0.50
크림	3.95±0.59	3.75±0.54	3.65±0.48	-
아이스크림	3.15±0.36	3.30±0.46	3.50±0.50	3.25±0.45
버터	3.70±0.41	4.15±0.48	3.80±0.50	-
치즈	3.45±0.50	3.30±0.46	3.30±0.46	-

- * 이 관능검사는 훈련된 20명의 관능검사 요원이 실시한 값의 평균임.
 ** 5점검사 (1 : 아주 나쁘다. 2 : 나쁘다. 3 : 보통이다. 4 : 좋다. 5 : 아주 나쁘다.)

아이스크림의 여러 시료에서 실시한 조직검사 결과, hardness는 sample D, cohesiveness는 sample D, elasticity는 sample B와 E가 가장 높은 점수를 나타냈지만 유의적인 차이는 없었다(Table 9).

Table 9. 아이스크림의 물성검사

Texture	Samples				
	A	B	C	D	E
Hardness	155.33±1.53 ^a	155.67±2.08 ^a	153.67±2.08 ^a	156.33±2.08 ^a	153.33±6.43 ^a
Cohesiveness	0.13±0.02 ^a	0.14±0.05 ^a	0.12±0.02 ^a	0.16±0.27 ^a	0.13±0.25 ^a
Elasticity	155.33±1.53 ^a	155.67±2.08 ^a	153.67±2.08 ^a	156.33±2.08 ^a	153.33±6.43 ^a

* Means with three replicated trials

a~c : Means with different supercripts differ at each row(P<0.05)

버터의 여러 시료에서 실시한 조직검사의 결과, hardness는 sample D, cohesiveness는 sample D, elasticity는 sample B가 높은 수치를 나타냈지만 유의적 차이는 없었다(Table 10).

Table 10. 버터의 물성검사

Texture	Samples			
	A	B	C	D
Hardness	0.99±0.09 ^a	0.98±0.10 ^a	0.94±0.07 ^a	1.05±0.17 ^a
Cohesiveness	0.24±0.04 ^a	0.25±0.03 ^a	0.26±0.03 ^a	0.26±0.04 ^a
Elasticity	0.36±0.04 ^a	0.38±0.05 ^a	0.37±0.06 ^a	0.37±0.07 ^a

* Means with three replicated trials

a~c : Means with different supercripts differ at each row(P<0.05)

체다치즈의 시료에서 실시한 조직검사의 결과, hardness는 sample E, cohesiveness는 sample E, elasticity는 sample A가 높게 나타냈지만 유의적 차이는 없었다(Table 11).

Table 11. 치즈의 물성검사

Texture	Samples			
	A	B	C	D
Hardness	1.25±0.11 ^c	1.34±0.09 ^{b,c}	1.37±0.05 ^{a,b,c}	1.48±0.08 ^{a,b}
Cohesiveness	0.24±0.04 ^a	0.23±0.04 ^a	0.22±0.05 ^a	0.21±0.05 ^a
Elasticity	0.38±0.06 ^a	0.35±0.07 ^a	0.35±0.06 ^a	0.33±0.05 ^a

* Means with three replicated trials

a~c : Means with different superscripts differ at each row(P<0.05)

2. 콜레스테롤이 제거된 크림과 버터의 개발

cholesterol을 제거한 크림의 표준제조공정은 Fig. 1에서와 같다. 이 공정을 살펴보면, 20% 유지방이 함유된 크림을 40℃ 정도로 가온한 후 10%의 β-cyclodextrin을 첨가하여 100rpm에서 20분 정도 교반한다. 그 후 크림분리기에서 40℃온도로 크림을 분리하면 크림과 cholesterol이 함유된 부분이 분리된다. 그리고 분리액을 3회 또는 그 이상 반복분리하여 36%의 유지방이 함유된 크림을 얻는다. 그 후 살균, 냉각하여 아이스크림, 힙핑 크림, 버터의 원료로 사용한다.

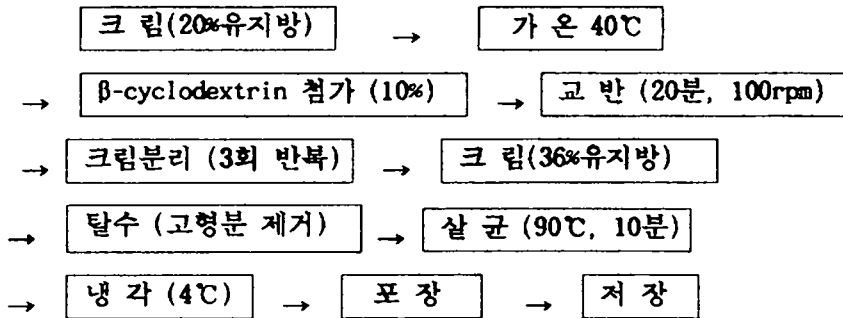


Fig. 1 Cholesterol을 제거한 크림의 표준제조 공정

위에서 개발된 표준공정에 따라 cholesterol이 제거된 크림을 개발한 결과, pilot scale과 대량 생산 모두에서 cholesterol의 제거율이 95%로 양호하였다. 그러나 산업화에서 원가절감을 위하여 β -cyclodextrin의 함량을 6%로 감속시켜 cholesterol 제거율이 90% 정도로 하는 것이 효과적인 것으로 나타났다.

원심분리시 β -cyclodextrin가 disc 사이에 많이 끼어 disc를 분해해야 하는 번거로움이 발생하는 것으로 나타났다. 처리된 크림의 맛은 약간 단 맛이 더하였으나 아이스크림, 힙핑크림, 버터의 원료로 사용하기에는 적합하였다. Cholesterol을 제거한 버터의 표준제조공정은 Fig. 2에서와 같다. 이 공정을 살펴보면, cholesterol이 제거된 크림(36% 유지방)의 온도를 14℃로 냉각하고 이 크림의 양을 버터제조기의 40%로 하여 분당 100회 정도로 30분 정도 교동하면 버터가 생성된다. 이때 생성된 버터밀크의 양과 동일하게 하여 50회전 정도 회전하므로써 연압을 실시한다. 이대 남아있는 버터밀크를 제거한다. 그리고 포장하여 냉장 또는 냉동 저장한다.

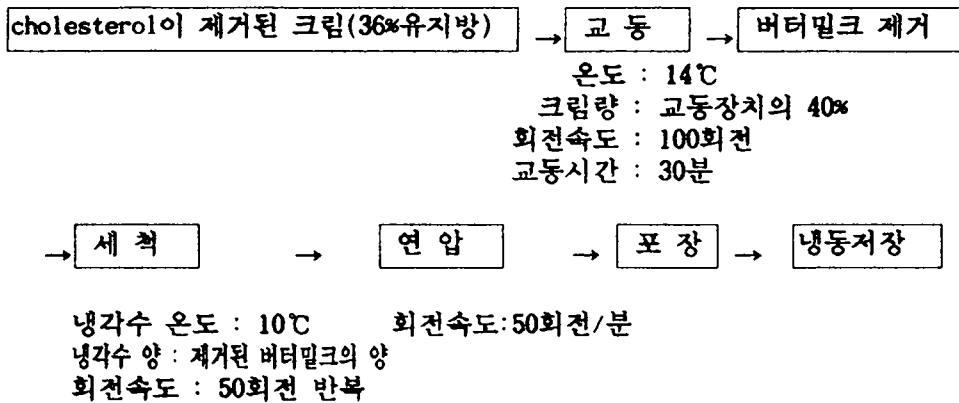


Fig. 2 Cholesterol을 제거한 버터의 표준제조 공정

위에서 개발된 표준공정에 따라 cholesterol이 제거된 버터를 개발한 결과, pilot scale과 대량생산 모두에서 cholesterol의 제거율이 95%로 양호하였다. 버터의 경도는 control 보다 약간 낮았으며, 탄력성도 약간 낮았다. 버터의 맛은 약간 단맛이 있었으며 약한 모래알상이 느껴졌다. 그래서 결과적으로 control 보다 전체적인 기호도가 낮기는 하지만 cholesterol이 제거된 기능이 뚜렷한 제품생산이 가능함을 관찰하였다.

제 4 장. 참 고 문 헌

1. 김광욱, 이영춘, 1991, 식품의 관능검사, 학연사.
2. 곽해수, 1992, 관능검사와 유제품, Korean Dairy Technol. 10(1) : 1~6.
3. American society for testing and materials, 1982, Guidelines for the selection and training of sensory panel members, ASTM special technical publication 758.
4. Piggott, J.R., 1984, Sensory analysis of foods, Elsevier applied science publishers.
5. Bodyfelt, F.W., J. Tobias, and G. M. Trout, 1988, The sensory evaluation of dairy products, Van Nortrand Reinhold 115 fifth Avenue New York, New York 10003.
6. Steel, R.G.D. and J.H.Torrie, 1980, Principles and process of statistics, A biometrical approach, 2nd ed., McGraw Hill Inc.