

상이한 조건에서 저장한 버터로부터 생성된 콜레스테롤 산화물의 확인

장영상* · 양주홍 · 신효선

동국대학교 식품공학과, *농심기술개발연구소

Identification of Cholesterol Oxides Formed in Butter under Varied Storage Conditions

Young-Sang Chang*, Joo-Hong Yang and Hyo-Sun Shin

Department of Food Science and Technology, Dongguk University, Seoul

*Technology Development Institute, Nong Shim Co, Ltd., Kunpo

Abstract

The effect of storage conditions on the oxidative stability of cholesterol in butter was studied by identifying cholesterol oxides by TLC. Experimental variables for storage conditions were packaging(packaged and unpackaged), storage temperature(ambient and refrigerated), light source(dark, fluorescent and ultraviolet), and storage period(2, 4, 6, and 8 weeks). No cholesterol oxides were detected from packaged butter under all storage conditions. When unpackaged butter was stored under darkness at ambient and refrigerated temperatures, cholesterol oxides were not detected even after 6 weeks of storage, but small amounts of 7 α - and 7 β -hydroxycholesterols were detected after 8 weeks of storage. When unpackaged butter was stored under ultraviolet light at ambient temperature, 7 α -hydroxycholesterol, 7 β -hydroxycholesterol, cholestane-triol, and cholesterol epoxide were detected after 2 weeks of storage, and when fluorescent light was used instead of ultraviolet light, the same species of cholesterol oxides were detected after 6 weeks of storage.

Key words : cholesterol, cholesterol oxides, butter

서 론

콜레스테롤은 cyclopentanoperhydrophenanthrene의 골격구조에 하나의 이중결합을 가지고 있어 불포화 지방산의 경우와 같이 자유라디칼에 의한 연쇄반응에 의하여 자동산화 된다⁽¹⁾. 콜레스테롤의 주요 산화 생성물(cholesterol oxidation product; COP) 중 어떤 것은 실험동물에 대하여 세포독성(cytotoxicity)⁽²⁻⁴⁾, 혈관독성(angiotoxicity)⁽⁵⁾, 돌연변이 유발성(mutagenicity)^(6,7), 발암성(carcinogenicity)^(8,9), 스테롤 생합성 저해(sterol biosynthesis inhibition)^(10,11) 등 바람직하지 않는 작용을 나타낸다. 따라서 COP의 이러한 생물학적 작용 때문에 콜레스테롤을 다량 함유하고 있는 지방질 식품의 가공 및 저장 중 산화에 의하여 생성되는 COP의 확인 및 그 생성 메커니즘에 대한 연구가 최근 활발하게 진행되고 있다.

지방질 식품 중의 콜레스테롤은 불포화 지방산의 경

우와 같이 공기에 노출되거나, 높은온도, 자유라디칼 개시제(initiator), 광선 또는 이러한 여러 가지 복합적인 요인들에 의하여 쉽게 산화될 수 있다. 그리하여 콜레스테롤을 비교적 다량 함유하고 있는 난류 및 그 제품^(12,13), 버터^(14,15)와 분유⁽¹⁶⁾ 등의 낙농제품, 우지^(17,18) 등 여러 가지 동물성 식품을 가공 및 저장하였을 때 생성되는 각종 COP를 분리 동정한 보고가 발표되고 있다. 그러나 저장조건을 달리하였을 때 생성되는 COP에 대한 체계적인 연구는 매우 드문 편이다. 즉, 식품 중의 콜레스테롤은 불포화 지방산의 경우와 같이 자동산화되므로 암소에서는 그 산화의 진행 속도가 늦으나, 광선에 의해서는 촉진될 것이다. 특히 광원의 종류, 저장온도, 포장유무와 저장기간에 따라 산화정도가 달라질 것으로 콜레스테롤의 산화 생성물도 다를 것으로 예상된다. 따라서 본 연구에서는 콜레스테롤의 산화 안정성에 대한 광원, 저장온도, 포장유무 등 저장조건에 영향을 연구하여 콜레스테롤의 산화 양식의 일부를 규명하고자 시도한 것으로 콜레스테롤은 비교적 많이 함유하고 있는 버터를 일정기간 동안 저장하면서 생성되는 각종 COP를 TLC에 의하여 분리 확인한 결과 몇 가지 결론을 얻었기에 이에 보고하고자 한다.

Corresponding author : Hyo-Sun Shin, Department of Food Science and Technology, Dongguk University, Pildong 3 ga, Jung-gu, Seoul 100-715, Korea

재료 및 방법

시료

본 실험에서 사용한 버터는 보존료 및 산화 방지제를 첨가하지 않고 가열한 신선한 버터를 S사로부터 제조하여 -20°C 냉동고에 저장하면서 시료로 사용하였다. 시료로 사용한 버터의 일반성분과 몇 가지 특성은 Table 1과 같다.

콜레스테롤 산화물의 표준품

각종 콜레스테롤 산화물의 표준품들 중 5-cholesten-3 β -ol(cholesterol); 5-cholesten-3 β -ol-7-one; 5-cholestene-3 β , 25-diol; 5-cholestane-3 β , 5 α , 6 β -triol; 5-cholestane-3 β , 5 β , 6 α -triol; 4-cholesten-3-one; 5 α -cholestan-3 β -ol-6-one; 20-hydroxycholesterol; 5 α -cholestan-3 β , 7 α -diol; 5-cholestene-3 β , 7 β -diol; 3, 5-cholestadien-7-one; cholestan-5 α , 6 α -epoxy-3 β -ol; cholestan-5 β , 6 β -epoxy-3 β -ol; 5-cholestene-3 β , 4 β -diol; 5 α -cholestan-3, 6-dione; cholestan-3 β , 5 α -diol-6-one은 Steraloids회사(Wilton, NH, U.S.A.)에서 각각 구입하여 사용하였다.

시료의 처리 및 저장방법

버터를 적당한 크기(95 \times 34 \times 30 mm)로 절단하여 알루미늄 포일(aluminum foil 7 μ /tissue paper 40 g/m² melt 20 g/m²)로 포장한 것과 포장하지 않은 것으로 구분하여, 저온($4\pm 1^{\circ}\text{C}$)과 상온($24^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$)에서 각각 저장하였다. 광원의 조사를 위해 특별히 제작한 상자 내부를 알루미늄 포일로 도포하고 버터의 95 \times 34 mm 쪽이 위로 향하게 하고 각 시료간의 간격은 약 20 mm로 하여 일렬로 배열하였다. 그리고 저장기간 중 광원의 영향을 알아보기 위해 모든 광원을 완전 차단한 암소에서 저장한 것과 자외선등과 형광등으로 조사한 것을 각각 비교하였다.

즉, 빛을 완전히 차단한 암소에서 저장한 것을 대조군으로 하였고, 광원은 시료가 놓인 바닥에서 30 cm 거리에 설치하여 계속 조사하였다. 이 때 자외선등은 약 254 nm 파장을 가진 30와트 살균등으로 조도는 100 lux였고, 형광등은 450 nm 파장을 가진 30와트의 일반용 주광색등으로 조도는 1500 lux였다. 그리고 모든 시료는 매일 1회씩 순차적으로 위치를 바꾸어 빛을 고르게 받도록 하였다. 조사기간은 8주로 하였으며, 2주마다 시료를 12개씩 무작위로 채취하여 분석시료로 하였다.

지방질의 추출

시료 약 30g을 40°C 의 물 증탕에서 녹인 후 원심분리

Table 1. Proximate composition and characteristics of the butter used in this experiment

| Component and characteristics | Values ^{a)} |
|--------------------------------------|----------------------|
| Milk fat (%) | 82.75 |
| Moisture (%) | 14.80 |
| Crude protein (%) | 0.96 |
| Lactose (%) | 0.23 |
| Crude ash (%) | 1.26 |
| Salt (%) | 1.12 |
| Melting point ($^{\circ}\text{C}$) | 31.10 |
| Color (Y/R) | 4.0/1.1 |
| Acid value | 0.40 |
| Peroxide value (meq/kg) | 0.00 |
| Iodine value (Wijs) | 36.65 |
| Carbonyl value (meq/kg) | 1.40 |
| TBA value | 12.00 |

a) All values are means of triplicate determinations.

(3,000 rpm, 15분) 한 다음 위층을 제거하여 지방질층을 분리하였다. 추출한 지방질은 앰플에 넣고 질소가스로 충전한 후 냉동고(-20°C)에서 보관하면서 지방질의 분석시료로 사용하였다.

콜레스테롤 산화물의 분리 및 확인

콜레스테롤과 그 산화물의 추출은 Itoh 등의 방법⁽¹⁹⁾에 따라 시료 유지를 비누화한 후 비 비누화물을 분리하였다. 분리한 비 비누화물 중의 콜레스테롤 산화물의 분리 및 확인은 TLC에 의하였다.

이 때, 흡착제는 silica gel 60 H를 사용하여 0.5 mm 두께로 도포한 유리판을 하룻밤 건조시킨 후 120°C 에서 2시간 활성화하여 사용하였다. 전개용매는 ethyl acetate-heptane(1 : 1, v/v)을 사용하여 1차원 전개로 3번 전개한 후 50% 황산을 분무하여 120°C 에서 10분간 탄화시킨 다음 나타난 반점의 R_f 값과 같은 조건으로 전개한 콜레스테롤 산화물의 표준품의 R_f 값을 비교하여 확인하였다.

결과 및 고찰

포장한 버터에 대한 저장온도와 조사광원의 영향

포장한 시료를 상온과 저온의 암소에서 저장한 것과 같은 조건에서 형광등 및 자외선등으로 각각 2, 4, 6, 8 주간 조사한 시료로부터 추출한 비 비누화물을 TLC에 의하여 분리한 크로마토그램을 Fig. 1과 같다.

즉, 모든 시료에서는 TLC 상에 3개의 반점이 나타났으며, 이 중에서 자주색을 띠는 것은 콜레스테롤로 확인되었으나 이보다 위에 나타난 미갈색의 반점과 이보다 아래쪽에 나타난 황색반점은 확인할 수 없었다. 이와 같은 TLC 상의 결과로 보아 포장한 버터를 상온과 저

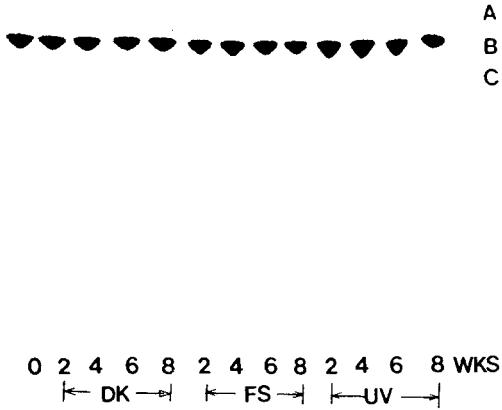


Fig. 1. Thin-layer chromatogram of the nonsaponifiable lipids from packaged butter samples after illumination during storage at ambient and refrigerated temperature

Adsorbent, silica gel H(0.5 mm) ; Solvent system, ethyl acetate-heptane(1 : 1, v/v) ; Visualization, heating at 120 °C for 10 min after spraying with 50% H₂SO₄. The spots were identified as follows : A and C, unknown ; B, cholesterol. Abbreviations are : DK, Dark ; FS, Fluorescent ; UV, Ultraviolet

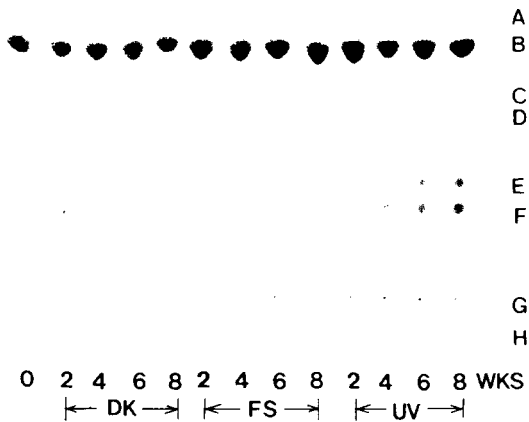


Fig. 2. Thin-layer chromatogram of the nonsaponifiable lipids from unpackaged butter samples after illumination during storage at ambient temperature

The spots were identified as A, unknown ; B, cholesterol ; C, unknown ; D, cholesterol epoxide ; E, 7 β -hydroxycholesterol ; F, 7 α -hydroxycholesterol ; G, cholestane-triol

온에서 형광등 및 자외선등으로 조사하면서 8주간 저장할 경우 콜레스테롤은 산화되지 않아 그의 산화물을 생성하지 않는다는 것을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는

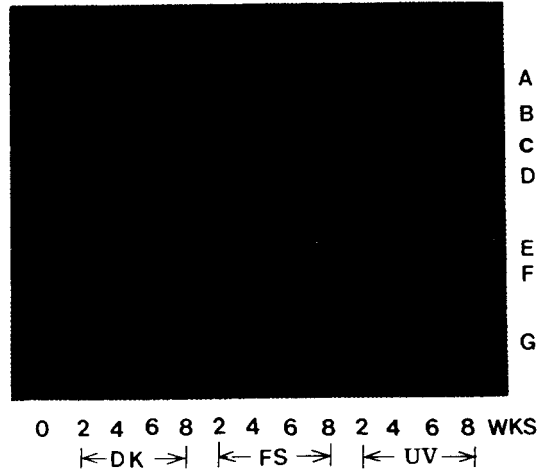


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of the nonsaponifiable lipids from unpackaged butter samples after illumination during storage at refrigerated temperature

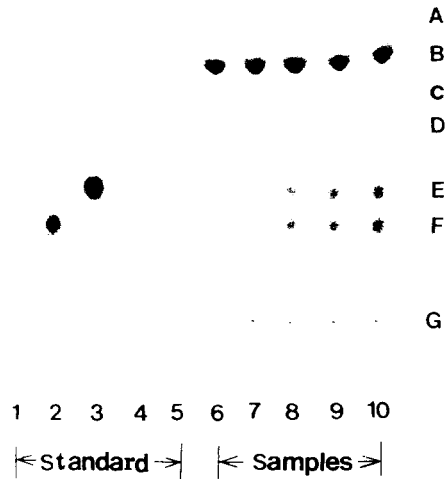


Fig. 4. Thin-layer chromatogram of the synthetic cholesterol oxides and the nonsaponifiable lipids from some butter samples used in this experiment

1, cholestane-triol ; 2, 7 α -hydroxycholesterol ; 3, 7 β -hydroxycholesterol ; 4, cholesterol epoxide ; 5, cholesterol ; 6, fresh butter ; 7, 8, 9 and 10, unpackaged butter after 2, 4, 6 and 8 weeks of ultraviolet light illumination at ambient temperature, respectively

알루미늄 포일이 광차단 효과가 매우 우수하여 버터 중의 콜레스테롤의 광산화를 매우 효과적으로 방지하여 줌을 나타내 주고 있다. Luby 등⁽¹⁴⁾은 상이한 포장재로 포장한 버터를 형광등으로 조사하면서 저장기간 중 과산화물 값의 변화를 조사하였는데, 암소와 알루미늄 포일로 포

Table 2. Identification of cholesterol oxides isolated from butter samples on TLC analysis

| R _f value | Spot color ^{a)} | Tentative identity |
|----------------------|--------------------------|--------------------------------|
| 1.00 | | Solvent front |
| 0.90 | Beige/brown | Unidentified |
| 0.80 | Magenta | Cholesterol |
| 0.69 | Yellow | Unidentified |
| 0.60 | Brown | Cholesterol epoxide |
| 0.43 | Blue | 7 β -Hydroxycholesterol |
| 0.34 | Blue | 7 α -Hydroxycholesterol |
| 0.10 | Brown | Cholestane-triol |

a) Color appeared after spraying with 50% H₂SO₄ and heating for 10 min at 120°C.

장한 것이 저장 15일 후 까지도 과산화물 값의 증가가 나타나지 않았고 그 외의 포장재로 포장한 것은 저온에서 저장한 것도 모두 과산화물값이 현저하게 증가되었다고 발표하였다. 이와 비슷한 연구는 Downey 등⁽²⁰⁾에 의해서도 보고된 바 있다.

포장하지 않은 버터에 대한 저장온도와 조사광원의 영향

포장하지 않은 시료를 상온의 암소에서 저장한 것과, 같은 조건에서 형광등 및 자외선등으로 각각 2, 4, 6, 8주간 조사하면서 저장한 시료로부터 추출한 비 비누화물을 TLC에 의하여 분리한 크로마토그램은 Fig. 2와 같다.

즉, 암소에 저장한 것은 Fig. 1의 포장하였을 경우와 같이 3개의 반점만이 나타나서 콜레스테롤 산화물이 검출되지 않았다. 그러나 형광등으로 조사하였을 때는 6주와 8주에 푸른색의 2개의 반점과 하나의 작은 갈색 반점이 나타났다. 그리고 자외선등을 조사하였을 때는 2, 4, 6, 8주에서 모두 2개의 푸른색 반점과 한 개의 갈색 반점과 아주 작은 다른 하나의 갈색 반점이 나타났다. 특히, 자외선등으로 조사하였을 때 나타난 이들 반점의 크기는 저장기간이 경과함에 따라 커지는 경향이었다. 이상과 같은 결과는 포장하지 않은 버터를 상온에서 자외선등으로 조사하였을 경우에는 저장 2주 후부터 콜레스테롤 산화물이 생성되며, 그 생성량은 저장기간이 경과함에 따라 증가하고, 형광등으로 조사하였을 때는 저장 6주 후부터 콜레스테롤 산화물이 생성됨을 나타내 주고 있어 온도 등의 저장조건이 동일할 경우에는 자외선등이 형광등보다 버터 중의 콜레스테롤의 광산화를 더욱 촉진시킨다는 것을 말해주고 있다. Fig. 2의 TLC 상에서 나타난 반점 중 푸른색의 2개의 반점(E와 F)은 각각 7 β -hydroxycholesterol과 7 α -hydroxycholesterol로, 원점위의 작은 갈색 반점(G)은 cholestane-triol로, 큰 갈색의 반점(D)은 cholesterol epoxide로 각각 확인되었다.

한편, 포장하지 않은 시료를 저온의 암소에서 저장한 것과, 같은 조건에서 형광등 및 자외선등으로 각각 2, 4, 6, 8주간 조사하면서 저장한 시료로부터 추출한 비 비누화물을 TLC에 의하여 분리한 크로마토그램은 Fig. 3과 같다.

즉, 포장하지 않은 버터를 저온에서 암소에 저장한 것과 같은 조건에서 형광등으로 조사하면서 저장한 것은 신선한 시료 때와 같이 3개의 반점만이 나타나서 콜레스테롤의 산화물이 검출되지 않았다. 그러나 같은 조건에서 자외선등으로 조사한 것은 저장 2주 후부터 7 β -hydroxycholesterol, 7 α -hydroxycholesterol, cholesterol epoxide가 검출되었고, 저장 4주 후에는 위의 콜레스테롤 산화물 이외에 cholestanetriol이 검출되었으며, 이들 반점의 크기는 저장기간이 경과함에 따라 커지는 경향이 있었다. 그러나 포장하지 않은 버터를 저온에서 자외선등을 조사한 것은 같은 조건의 시료를 상온에서 조사한 것 (Fig. 2)과 콜레스테롤 산화물의 종류는 같은 것이 검출되었으나, TLC 상의 반점의 크기는 상온의 경우가 저온의 경우보다 커서 저장온도도 콜레스테롤 산화에 큰 영향을 미침을 나타내주고 있다.

이상의 결과로 자외선등은 형광등 보다 버터 중 콜레스테롤 산화를 더욱 촉진시키며, 같은 광원을 조사하면서 상온에서 저장한 것은 저온에서 저장한 것보다 콜레스테롤의 산화가 더 심함을 알 수 있었다. Gilchrist 등⁽²¹⁾은 버터의 지방산의 광산화에 관여하는 가장 중요한 인자는 빛에 직접 노출되는 것이고, 온도와 저장시간은 광산화에 아주 적은 영향만을 미친다고 보고하였다.

Fig. 4에 몇 가지 콜레스테롤 산화물의 표준품과 본 실험에서 사용한 몇 가지 시료에서 추출한 비 비누화물을 TLC에 의한 분리한 크로마토그램을 나타내었다. 시료에서 나타난 반점은 콜레스테롤 산화물의 표준품이 나타난 반점의 R_f 값과 고유한 색깔로부터 각각 확인할 수 있었다. 그리고 그 결과를 종합하여 Table 2에 나타내었다.

본 실험의 시료에서 TLC 상으로 확인된 콜레스테롤 산화물은 앞에서 언급한 바와 같이 7 α -hydroxycholesterol, 7 β -hydroxycholesterol, cholesterol epoxide, cholestanetriol의 4가지였다. 이들 4가지 콜레스테롤 산화물은 포장유무, 저장온도 조사광원의 종류에 따라 버터로부터 생성되는 콜레스테롤 산화물의 종류와 양이 TLC 상의 크로마토그램으로 보아 상이하였다.

요 약

버터에 함유된 콜레스테롤의 산화안정성에 대한 저장 조건의 영향을 연구하기 위하여 버터를 포장한 것과 포장하지 않은 것을 저온과 상온에서 암소와 광원(형광

등 및 자외선등)으로 조사하면서 각각 일정기간 저장하는 동안 생성되는 콜레스테롤 산화물을 TLC에 의하여 분리 확인하였다. 포장한 버터를 상온과 저온의 암소에서, 같은 조건에서 형광등과 자외선등으로 조사하면서 각각 8주간 저장 하였을 경우 콜레스테롤 산화물은 검출되지 않았다. 또한, 포장하지 않은 버터를 상온과 저온의 암소에서 저장하였을 경우 6주까지는 콜레스테롤 산화물이 검출되지 않았으나 8주 후에는 미량의 7 α - 및 7 β -hydroxycholesterol이 검출되었다. 그러나 포장하지 않은 버터를 상온에서 자외선등으로 조사하였을 때는 저장 2주에, 같은 조건에서 형광등으로 조사하였을 때는 저장 6주에 각각 7 α -hydroxycholesterol, 7 β -hydroxycholesterol, cholestane-triol, cholesterol epoxide가 검출되었으며, 그 생성량은 저장기간이 경과함에 따라 증가하는 경향이였다.

감사의 말

이 연구는 1989년도 전반기 한국과학재단 연구비(과제번호 : 891-1508-027-1)의 지원에 의하여 수행된 것으로 이에 깊은 감사를 드립니다.

문 헌

- Smith, L.L. : *Cholesterol Autoxidation*. Plenum Press, New York, p. 125(1981)
- Peng, S.K., Taylor, C.B., Tham, P., Werthessen, N.T. and Mikkelsen, B. : Effect of autoxidation products from cholesterol on aortic smooth muscle cells. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 102, 57(1978)
- Baranowski, A., Adams, C.W., Bayliss High, O.B. and Bowyer, D.B. : Connective tissue response to oxysterols. *Atherosclerosis*, 41, 255(1982)
- Hill, J.C., Peng, S.K., Morin, J.R. and Taylor, C.B. : Effects of cholesterol autoxidation derivatives on hexose transport in cultured aortic smooth muscle cells. *Exp. Mol. Pathol.*, 41, 249(1984)
- Tokuyasu, K., Imai, H., Taura, S., Cho, B.H.S. and Kummerow, F.A. : Aortic lesions in nonlaying hens with endogenous hyperlipidemia. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 104, 41(1980)
- Smith, L.L., Smart, V.B. and Ansari, G.A.S. : Mutagenic cholesterol preparation. *Mutation Res.*, 68, 23(1979)
- Ansari, G.A.S., Walker, R.D., Smart, V.B. and Smith, L.L. : Further investigations of mutagenic cholesterol preparation. *Food Chem. Toxicol.*, 20, 35(1982)
- Bischoff, F. and Byron, G. : The pharmacodynamics and toxicology of steroids and related compounds. *Adv. Lipid Res.*, 15, 61(1977)
- Smith, L.L. and Kulig, M.J. : Sterol metabolism. XX-XIV. On the derivation of carcinogenic sterols from cholesterol. *Cancer Biochem. Biophys.*, 1, 79(1975)
- Kandutsch, A.A. and Chen, H.W. : Inhibition of cholesterol synthesis by oxygenated sterols. *Lipids*, 13, 704(1978)
- Brown, S. and Goldstein, J.L. : Suppression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and inhibition of growth of human fibroblasts by 7-ketocholesterol. *J. Biol. Chem.*, 249, 7306(1974)
- Naber, E.C. and Biggert, M.D. : Effect of heating on generation of cholesterol oxidation products in egg yolk. *Poult. Sci.*, 59, 1642(1980)
- Naber, E.C. and Biggert, M.D. : Direct analysis for cholesterol oxidation products in fresh and heat treated egg yolk lipids. *Poult. Sci.*, 60, 1700(1981)
- Luby, J.M., Gray, J.I. and Harte, B.R. : Effects of packaging and light source on the oxidative stability of cholesterol in butter. *J. Food Sci.*, 51, 908(1986)
- Luby, J.M., Gray, J.I. and Ryan, T.C. : Photooxidation of cholesterol in butter. *J. Food Sci.*, 51, 904(1986)
- Flanagan, V.P. and Ferretti, A. : Characterization of two steroidal olefins in nonfat dry milk. *Lipids*, 9, 471(1974)
- Ryan, T.C., Gray, J.I. and Morton, I.D. : Oxidation of cholesterol in heated tallow. *J. Sci. Food Agric.*, 32, 305(1981)
- Park, S.W. and Addis, P.B. : Identification and quantitative estimation of oxidized cholesterol derivatives in heated tallow. *J. Agric. Food Chem.*, 34, 653(1986)
- Itoh, T., Tamura, T. and Matsumoto, T. : Methylsterol compositions of 19 vegetable oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 50, 300(1973)
- Downey, W.K. and Murphy, M.F. : Light-barrier properties of various butter-wrapped materials. *J. Soc. Dairy Technol.*, 21, 104(1968)
- Gilchrist, M.R., Vijay, I.K. and Humbert, E.S. : Factors affecting suborganoleptic levels of light-induced oxidation. *Can. Inst. Food Technol. J.*, 1, 133(1968)

(1990년 7월 16일 접수)