

난황의 콜레스테롤 제거에 사용한 β -Cyclodextrin의 재활용

유익중 · 최성유 · 박우문 · 전기홍
한국식품개발연구원

Recycling of β -Cyclodextrin Used for Cholesterol Removal from Egg Yolk

I. J. Yoo, S. Y. Choi, W. M. Park and K. H. Jeon

Korea Food Research Institute

Abstract

The method used to remove cholesterol from egg by using β -cyclodextrin was relatively stable and efficient. The aim of this study was to cost down by recycling β -cyclodextrin used to remove cholesterol from egg yolk because β -cyclodextrin was expensive. The solvents used to separate β -cyclodextrin from β -cyclodextrin complex containing egg yolk cholesterol were butanol, chloroform, ether, hexane, methanol, 2-propanol and their mixture. The ratio of solvent and complex varied from 2 : 1 to 10 : 1. The condition of mixing time and temperature varied from 30 to 60°C and from 10 minutes to 3 hours to remove cholesterol from β -cyclodextrin complex. When the ratio of chloroform and methanol was 1 : 1, the removal efficiency of cholesterol was 98.8%. The efficiency of cholesterol removal was improved when the ratio of solvent : complex increased to 4 : 1. When mixing time and temperature was up to for 1hr, at 50°C respectively, the efficiency of cholesterol removal improved to 99%. It concluded that the efficiency of cholesterol removal of 50% renewed one contained β -cyclodextrin were 81.1% while the cholesterol removal efficiency of 100% renewed β -cyclodextrin was 24% if cholesterol removal efficiency of new β -cyclodextrin were 100%.

Key words : cholesterol, β -cyclodextrin, egg yolk, recycling, renew.

서 론

계란으로부터 콜레스테롤을 저하시키려는 노력은 여러 방법에 의해 시도되고 있는데 그 중 β -cyclodextrin에 의한 방법은 식품의 안전성 면이나 효율면에서 우수한 것으로 알려져 있다¹⁾. β -cyclodextrin은 흡착제의 일종으로 전분에 *Bacillus* 속의 미생물이 생산하는 효소를 작용시켜 생산되며 7개의 포도당 분자가 고리처럼 연결되어 분자내공의 친수성과 콜레스테롤의 친수성기가 서로 작용하여 난용성의 복합체를 형성하여 분리되므로 난황에 존재하는 콜레스테롤의 제거에 효과적이다²⁾. 그러나

β -cyclodextrin은 가격이 대체로 저렴하지 못하고 대부분이 수입되고 있으므로 본 연구에서는 난황의 콜레스테롤 제거에 이용된 β -cyclodextrin을 효과적으로 분리, 재활용함으로써 경제성을 향상시키기 위하여 본 시험을 실시하였다. 난황의 콜레스테롤을 흡착한 β -cyclodextrin complex로부터 β -cyclodextrin을 분리하기 위하여 butanol, chloroform, ether, hexane, methanol, 2-propanol 및 이들의 혼합용매를 사용하여 콜레스테롤 제거효과를 검토하였으며 이때 얻어진 β -cyclodextrin으로 난황의 콜레스테롤 제거효율을 검토하였다.

재료 및 방법

시험재료

본 시험에 사용된 계란은 (주)D축산에서 구입한 특란으로 산란 후 48시간 이내의 것으로

Corresponding author : Ick-Jong Yoo, Division of Animal Product Utilization, Korea Food Research Institute, San 46-1, Baekhyun-dong, Bundang-gu, Sungnam-si, Kyunggi-do 463-420, Republic of Korea.

공시하였으며 β -cyclodextrin은 일본식품화학공주식회사의 제품(B-37D5, 식품첨가물)을 사용하였다.

시료의 제조

난황과 난백을 분리하고 다시 난황을 300 μ m의 sieve를 통과시켜 난황막 및 알끈을 제거한 후 지 등⁽¹⁾의 방법에 의하여 난황을 3배량의 증류수로 희석함과 동시에 β -cyclodextrin의 최종농도가 2%(W/V)가 되도록 첨가하여 35°C에서 80rpm의 속도로 30분간 교반 후 5°C까지 냉각하였다. 이것을 2000×g에서 15분간 원심분리(Hanil Union 5 KR)하여 이때 생긴 침전물을 동결건조시켜 시료로 사용하였다.

시험방법

1) 용매선정 시험

β -cyclodextrin complex 5g을 butanol, chloroform, ether, hexane 등의 비극성용매와 methanol, 2-propanol 등의 극성용매 30ml에 넣어 혼합하고 50°C의 water bath에서 2시간 교반한 후 콜레스테롤 제거효율을 시험하였다. 또한 용매의 극성 정도가 콜레스테롤 제거에 미치는 효과를 살펴보기 위하여 chloroform과 methanol을 1:1, 1:2, 2:1의 비율로 혼합하여 시험하였으며^(3,4), 또한 hexane과 2-propanol을 3:2⁽⁵⁾로 혼합하여 시험을 실시하였다.

2) β -cyclodextrin complex로부터 콜레스테롤의 제거조건 검토시험

β -cyclodextrin complex를 chloroform : methanol = 1:1의 혼합용매에 넣어 혼합한 후 β -cyclodextrin complex와 용매의 혼합비율 및 교반온도, 시간 등을 변화시키며 콜레스테롤 제거효율을 시험하였다.

3) 재활용된 β -cyclodextrin의 콜레스테롤 제거효율 검토시험

사용하지 않은 β -cyclodextrin과 재활용된 β -cyclodextrin 및 이들의 1:1 혼합 β -cyclodextrin을 지 등⁽¹⁾의 방법에 의하여 난황을 3배량의 증류수로 희석한 것에 최종농도가 2%(W/V)가 되도록 첨가하여 50°C에서 30분간 교반 후 5°C까지 냉각하고 이것을 2,000×g

에서 15분간 원심분리(Hanil Union 5 KR)한 후 상층액의 잔존 콜레스테롤 함량을 측정하였다.

콜레스테롤 정량

분리, 정제된 콜레스테롤은 Boehringer Mannheim사의 콜레스테롤 정량 kit(Cat. No. 139050)를 사용하여 콜레스테롤 함량을 분석하였다. 시료에 methanolic potassium hydroxide와 isopropanol을 첨가하여 가열, 여과한 후 일정량을 catalase와 acetylacetone 및 ammonium phosphate buffer(pH 7.0)와 혼합하여 2개의 시험관에 분주하고 한 쪽에 cholesterol oxidase를 첨가하여 40°C에서 1시간 incubation하여 405nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

통계분석

평균값 및 표준오차의 산출은 SAS program⁽⁶⁾을 사용하여 얻어졌으며 Duncan의 다중 검정방법⁽⁷⁾으로 5% 수준에서 유의성 검정하였다.

결과 및 고찰

난황의 콜레스테롤을 제거하기 위하여 사용된 β -cyclodextrin을 효과적으로 재활용하기 위하여 시험을 실시하였다. 콜레스테롤 제거에 사용된 β -cyclodextrin으로부터 콜레스테롤 등 β -cyclodextrin에 흡착된 물질을 분리하기 위한 용매선정시험과 그 용매를 이용한 적절한 콜레스테롤 제거 시험조건을 구명하였으며 재활용된 β -cyclodextrin의 특성을 검토하였다.

β -cyclodextrin complex에서 콜레스테롤을 분리하기 위해 우선 각 단일용매의 콜레스테롤의 제거효율을 비교, 검토하였다(Fig. 1). 그 결과 methanol과 butanol은 β -cyclodextrin에 흡착되어 있는 콜레스테롤을 각각 89.6%와 91.6% 제거하였으나 hexane은 49.1%를 제거하여 사용 용매들 중 가장 낮은 제거율을 보였다. 그러나 butanol은 콜레스테롤 제거효율은 높으나 가격이 상대적으로 비싸며⁽⁸⁾ 또한 휘발성이 낮고 유해하여 산업화를 위하여 대량 사용하기에는 부적합한 것으로 생각되었다. 이에 반해 methanol은 콜레스테롤 제거효율도 높았고 가격도 저렴하여 β -cyclodextrin의 재활용 시험에 적합한 것으로 나타났다.

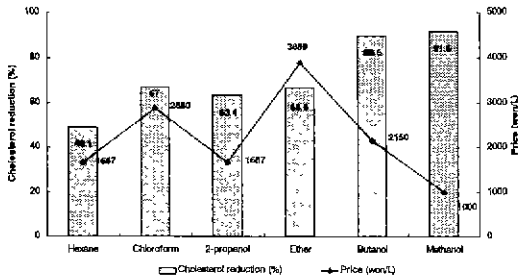


Fig. 1. Relative removal of cholesterol from β -cyclodextrin complex with various solvents. (Price : The information on commodity price, 1999. 1)

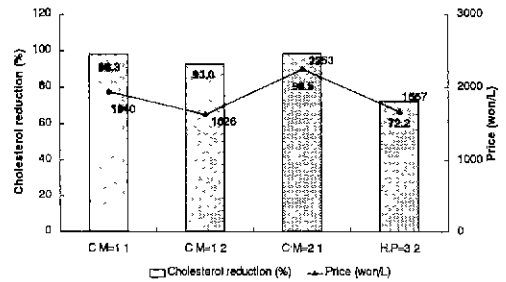


Fig. 2. Relative removal of cholesterol from β -cyclodextrin complex with various mixing solvents. (C : chloroform, M : methanol, H : hexane, P : 2-propanol)

β -cyclodextrin에 흡착되어 있는 지용성 분자인 콜레스테롤을 분리하기 위해서는 수용성 용매를 사용해야 분리가 용이하다는 보고⁹⁾에 따라 극성, 비극성 용매의 적절한 비율이 콜레스테롤 제거에 미치는 영향이 클 것으로 생각되어 극성 용매와 비극성 용매를 혼합하여 4가지의 다른 혼합용매를 만들어 각 혼합용매의 콜레스테롤의 제거효율을 검토하였다(Fig. 2). 그 결과 chloroform과 methanol의 혼합용매는 β -cyclodextrin에 흡착되어 있는 콜레스테롤을 90% 이상 제거하는 효과를 나타내어 72.7%의 hexane과 2-propanol의 3 : 2 혼합용매보다 높은 콜레스테롤 제거율을 나타내었다. 또한 chloroform과 methanol의 혼합용매 중 chloroform의 함량이 높아질수록 제거율이 높게 나타났으나 유의적인 차이는 보이지 않았다 ($p < 0.05$). 따라서 chloroform과 methanol의 1 : 1 혼합용액이 콜레스테롤 제거효율과 가격면에서 적절하다고 생각되었다.

β -cyclodextrin complex로부터 콜레스테롤 제거조건을 검토하기 위하여 우선 β -cyclodextrin complex와 용매의 적합한 비율을 찾아내기 위한 6가지의 혼합비율에 따른 콜레스테롤 제거효과를 Table 2에 나타내었다. 이때 콜레스테롤 제거에 사용된 용매는 chloroform과

Table 2. Effect of solvent ratio to β -cyclodextrin complex on removal of cholesterol from β -cyclodextrin complex

Solvent ¹⁾ : β -CD ²⁾ complex	Ratio(v/w)	Cholesterol reduction (%)
	2 : 1	95.9 \pm 0.8 ^{b3)}
	3 : 1	96.1 \pm 1.0 ^b
	4 : 1	99.0 \pm 0.2 ^a
	6 : 1	99.2 \pm 0.5 ^a
	8 : 1	99.7 \pm 0.1 ^a
	10 : 1	99.6 \pm 0.2 ^a

1) solvent : chloroform : methanol = 1 : 2
 2) β -CD : β -cyclodextrin
 3) Means in the same row with same superscripts are not significantly different ($p < 0.05$).

Treatment condition : mixing temp. 50°C, mixing time 120min.

methanol을 1:1로 혼합한 것이며 교반온도는 50°C, 교반시간은 2시간이었다. 그 결과 β -cyclodextrin complex와 용매의 비율이 4:1 이상인 경우에 β -cyclodextrin에 흡착된 콜레스테롤이 99% 이상 제거되었으며 용매의 비율이 그 이상 증가하여도 유의적인 차이는 나타나지

Table 1. Experimental design and reaction condition

Item	Reaction condition
Ratio(solvent : β -cyclodextrin complex, v/w)	2 : 1, 3 : 1, 4 : 1, 6 : 1, 8 : 1, 10 : 1
Mixing time(min)	10, 30, 60, 120, 180
Mixing temperature(°C)	30, 40, 50, 60

않았다($p < 0.05$). 그러나 용매의 비율이 그 이하로 감소되면서 콜레스테롤 제거효과도 감소하는 경향을 나타내어 3:1, 2:1의 비율로 혼합한 경우는 각각 96.1%와 95.9%의 제거효과를 나타내었다. 이러한 결과는 용매와 시료의 비율이 5:1이 적절하다는 Keen 등¹⁰⁾의 보고와 비슷한 경향을 보이고 있으나 동물성 유지로부터 콜레스테롤을 분리해 내는데는 8~10배의 용매가 바람직하다는 海野¹¹⁾의 보고보다는 적은 양의 용매로 대부분의 콜레스테롤을 분리해 낼 수 있었다. 적합한 교반시간을 결정하기 위하여 chloroform과 methanol을 1:1로 혼합한 용매와 β -cyclodextrin complex를 4:1로 혼합한 것을 50°C의 온도에서 10분, 30분, 1시간, 2시간, 3시간 동안 교반하여 콜레스테롤 제거율을 측정하였다. 그 결과는 Table 3에 나타난 바와 같이 2시간 교반한 경우에 β -cyclodextrin complex로부터 99%의 콜레스테롤을 제거할 수 있었다. 그러나 교반시간 1시간 이상에서는 유의적인 차이를 보이지 않았으며 30분의 교반으로는 β -cyclodextrin complex로부터 콜레스

테롤이 충분히 제거되지 않아 교반시간은 1시간 이상이 적합할 것으로 생각되었다. 이 결과는 교반시간이 120분~240분이 가장 바람직하다는 海野¹¹⁾의 보고와 비슷한 경향을 나타내었다.

β -cyclodextrin complex에서 콜레스테롤을 분리하는데 적합한 교반온도를 결정하기 위하여 chloroform과 methanol을 1:1로 혼합한 용매와 β -cyclodextrin complex를 4:1로 혼합한 것을 1시간 동안 30°C, 40°C, 50°C 및 60°C의 온도에서 교반하여 콜레스테롤 제거율을 측정하였다. 그 결과 Table 4에 나타난 바와 같이 60°C에서 β -cyclodextrin complex으로부터 99.6%의 콜레스테롤을 제거하였으며 50°C의 교반온도에서도 98.7%의 제거율을 나타내 60°C와 유의적인 차이는 나타나지 않았으나 그 외의 다른 온도와는 차이를 보였다($p < 0.05$). 이 결과는 Keen 등¹⁰⁾과 海野 등¹¹⁾은 40 ~ 45°C의 온도가 콜레스테롤의 분리에 가장 바람직하였다는 보고와 Pagington⁹⁾의 콜레스테롤이 복합체의 내부물질인 경우에는 60°C 이상으로 교반

Table 3. Effect of mixing time on removal of cholesterol from β -cyclodextrin complex

Mixing time (min)	Cholesterol reduction (%)
10	96.0 ± 0.3 ¹⁾
30	96.5 ± 0.9 ^b
60	98.7 ± 0.1 ^a
120	99.0 ± 0.2 ^a
180	98.9 ± 0.9 ^a

¹⁾ Means in the same row with same superscripts are not significantly different ($p < 0.05$).

Treatment condition : β -cyclodextrin : solvent = 1 : 4, mixing temp. 50°C

Table 4. Effect of mixing temperature on removal of cholesterol from β -cyclodextrin complex

Mixing temperature (°C)	Cholesterol reduction (%)
30	94.4 ± 1.2 ¹⁾
40	93.7 ± 2.6 ^b
50	98.7 ± 0.1 ^a
60	99.6 ± 0.2 ^a

¹⁾ Means in the same row with same superscripts are not significantly different ($p < 0.05$).

Treatment condition : β -cyclodextrin : solvent = 1 : 4, mixing time 60min

Table 5. Effect of mixing ratio of new β -CD to used β -CD on removal of cholesterol

Mixing ratio(w/w) New β -CD : Used β -CD	Cholesterol reduction (%)	Removal efficiency (%)
New β -cyclodextrin	61.1 ± 3.9 ^a	100
New β -CD : renewed β -CD = 1 : 1	49.7 ± 7.2 ^b	81.1
Renewed β -cyclodextrin	15.1 ± 1.1 ^c	24.7

¹⁾ β -CD : β -cyclodextrin

²⁾ Means in the same row with same superscripts are not significantly different ($p < 0.05$).

하는 것은 콜레스테롤의 분리에 적합하지 않다는 보고와 비교해 볼 때 50°C의 교반온도가 콜레스테롤의 제거에 적합하다고 생각되었다.

재활용된 β -cyclodextrin의 콜레스테롤 제거효율을 검토하기 위하여 앞의 최적조건에 의해 재활용된 β -cyclodextrin을 이용하여 계란의 콜레스테롤 제거효과를 검토한 결과를 Table 5에 나타내었다. 그 결과 사용하지 않은 β -cyclodextrin만을 사용하여 계란의 콜레스테롤을 제거하였을 경우에는 61.1%의 제거효율을 나타내었으나 재생된 β -cyclodextrin을 사용하였을 때는 15.1%의 낮은 제거효율을 나타내었다. 그러나 사용하지 않은 β -cyclodextrin과 재생된 β -cyclodextrin을 1:1로 혼합하여 사용하였을 때는 49.7%의 콜레스테롤 제거효율을 나타내어 사용하지 않은 β -cyclodextrin만을 사용했을 때의 81%의 제거효과를 나타내었다.

요 약

계란으로부터 cholesterol을 저하시키려는 노력은 여러 방법에 의해 시도되고 있는데 그 중 β -cyclodextrin에 의한 방법은 식품의 안전성 면이나 효율면에서 우수한 것으로 알려져 있다. 그러나 β -cyclodextrin은 가격이 비교적 고가이므로 본 연구에서는 난황의 cholesterol 제거에 이용된 β -cyclodextrin을 효과적으로 분리, 재활용함으로써 경제성을 향상시키기 위하여 본 실험을 실시하였다. 난황의 cholesterol을 흡착한 β -cyclodextrin complex로부터 β -cyclodextrin만을 분리하는 용매로 butanol, chloroform, ether, hexane, methanol, 2-propanol 및 이들의 혼합용매를 사용하였으며 용매와 complex를 2:1~10:1의 비율로 혼합하여 cholesterol 제거효과를 검토하였다. 또한 β -cyclodextrin complex에서 cholesterol의 효과적인 제거조건을 확립하기 위하여 교반시간과 온도를 각각 30°C~60°C와 10분~3시간으로 변화시키면서 cholesterol 제거효과를 검토하였다. 그 결과 chloroform과 methanol을 1:1의 비율로 혼합한 용액의 cholesterol 제거율이 98.3%로 비교적 높게 나타났으며 용매와 complex의 혼합비율에 있어서는 4:1의 비율까지 cholesterol 제거율이 증가하는 경향을 나타내

었다. 또한 교반시간은 1시간까지, 그리고 교반온도는 50°C까지 교반시간과 온도가 증가할수록 cholesterol 제거율이 99%까지 증가하는 경향을 나타내었으며 이러한 조건에서 얻어진 β -cyclodextrin으로 난황의 cholesterol 제거효율을 검토한 결과 사용하지 않은 β -cyclodextrin만을 사용해 cholesterol을 제거한 것에 비해 사용하지 않은 β -cyclodextrin과 재생된 β -cyclodextrin을 1:1로 혼합하여 사용한 경우는 81.1%의 제거효율을 나타내었으며 재생된 β -cyclodextrin을 사용하였을 경우는 24%의 제거효율을 나타내었다.

참고문헌

1. 지중룡, 유익중, 박우문, 전기홍, 김천제, 임상빈 : β -cyclodextrin을 이용한 난황의 콜레스테롤 제거. 한국축산학회지. 39(5), 599 (1997).
2. Oakenfull, D. G., Pearce, R. J. and Sidhu, G. S. : Low-cholesterol dairy products. *Australia Dairy Tech.*, 46, 110 (1991).
3. Folch, J. M. Lees and Sloan-staanley, G. H. : A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.*, 266, 497 (1957).
4. 菅野道廣, 今泉勝己 : 콜레스테롤. 신광출판사. 30 (1990).
5. Fletcher, D. L., Britton, W. M. and Cason, J. A. : A comparison of various procedures for determining total yolk lipid content. *Poultry Sci.*, 63, 1759 (1984).
6. SAS/STAT: User's guide. Release 6.03 edition SAS institute Inc., Cary. NC. USA.(1988).
7. Duncan, D. B. : Multiple range and multiple tests biometrics. 11(1), (1955).
8. 한국물가협회. 물가정보. 1월호 (1991).
9. Patington, J. S. β -cyclodextrin. Perfumer and flavorist. 11. February/March (1986).
10. Keen, A. R., Ward, D. D. and Hobman : 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, P. G. European patent, 0329347 (1988).
11. 海野, 工藥 : Recovery of cholesterol used in foods. Japan patent. 平-278181.
 12. Oakenfull, D. G., Sidhu, G. S. and Rooney, M. L. : Cholesterol reduction. Australia patent. WO 91/11114 (1991).
 13. Oakenfull, D. G., Sidhu, G. S. and Rooney, M. L. : Cholesterol removal. Australia patent, WO 91/16824 (1991).
 14. Smith, D. M., Awad, M. R., Bennink, M. R. and Gill, J. L. : Cholesterol reduction in liquid egg yolk using β -cyclodextrin. *J. Food Sci.*, 60(4), 691 (1995).
-

(2000년 1월 21일 접수)