

L-Carnitine, pyridoxine hydrochloride, DL- α -tocopheryl acetate를 이용한 분유모델시스템의 마이알반응생성물 저감화 조건 최적화

정혜림 · 남미현 · 홍충의 · 표민철 · 오준구¹ · 김용기¹ · 최유영¹ · 권정일¹ · 이광원*
고려대학교 생명공학부, 매일유업(주) 중앙연구소

Optimization of Anti-glycation Effect of L-Carnitine, Pyridoxine Hydrochloride and DL- α -Tocopheryl Acetate in an Infant Formula Model System Using Response Surface Methodology

Hye-Lim Jung, Mi-Hyun Nam, Chung-Oui Hong, Min-Cheol Pyo, Jun-Gu Oh¹, Young Ki Kim¹,
You Young Choi¹, Jung Il Kwon¹, and Kwang-Won Lee*

Department of Food Bioscience and Technology, College of Life Science & Biotechnology, Korea University
¹Human Milk R&D Team, Maeil Dairies, Co., Ltd.

Abstract The Maillard reaction is a non-enzymatic reaction between amino and carbonyl groups. During milk processing, lactose reacts with milk protein through this reaction. Infant formulas (IFs) are milk-based products processed with heat-treatments, including spray-drying and sterilization. Because IFs contain higher Maillard reaction products (MRPs) than breast milk, formula-fed infants are subject to higher MRP exposure than breast milk-fed ones. In this study, we investigated the optimization of conditions for minimal MRP formation with the addition of L-carnitine (L-car), pyridoxine hydrochloride (PH), and DL- α -tocopheryl acetate (α -T) in an IF model system. MRP formation was monitored by response surface methodology using fluorescence intensity (FI) and 5-hydroxymethylfurfural (HMF) content. The optimal condition for minimizing the formation of MRPs was with 2.3 μ M L-car, 15.8 μ M PH, and 20.6 μ M α -T. Under this condition, the predicted values were 77.4% FI and 248.7 ppb HMF.

Keywords: anti-glycation, infant formula, response surface methodology, 5-hydroxymethylfurfural

서 론

조제분유는 영유아들이 모유를 먹을 수 없는 경우 또는 영양 보충의 목적을 위해 우유를 바탕으로 영유아가 필요로 하는 각종 영양소를 첨가하여 만든 식품으로 미생물학적 안전성과 제품의 보존성을 높이기 위해 살균, 농축 및 분무건조와 같은 열처리 제조공정을 거쳐 생산된다(1). 초고온 단시간 가열법(UHT, Ultra-high temperature sterilization, 130-135°C, 2-3초) 또는 멸균(110°C 이상, 10-30분)처리를 하면 유통기한이 수개월로 연장될 수 있지만(2) 이러한 고온의 열처리와 분무건조, 긴 저장기간은 조제분유의 조성 간 화학적 반응을 야기시킬 수 있다(3). 그 중 대표적인 화학적 반응인 마이알반응은 식품에서 가열 또는 저장 시 환원당의 카르복실기와 단백질의 아미노기의 비효소적 축합반응으로 일어나고 마이알 반응생성물(MRPs, Maillard reaction products)을 생성한다(4). 우유에 열처리를 가하면 환원당인 유당과 우

유단백질의 아미노기(주로 라이신잔기의 ϵ -아미노기)가 반응하여 다양한 MRPs를 생성한다. 마이알반응의 초기단계에서는 주로 아마도리 생성물인 lactulosyllysine이 생성되고 이 생성물은 아미노산 분석방법으로 측정할 수 있지만 시간이 많이 소요되는 단점이 있어 furosine 분석이 초기 마이알생성물 지표로서 더 많이 사용된다(5,6). Furosine은 산가수분해로 생성되고(7) HPLC와 이온교환 크로마토그래피를 이용하여 쉽게 분석이 가능하다(8,9). 반응이 지속되면서 아마도리 생성물로부터 5-hydroxymethylfurfural (HMF), lysylpyrraline, 3-deoxypentulose, galactosyl- β -pyranone 등과 같은 다양한 MRPs가 생성된다. HMF, lysylpyrraline, galactosyl- β -pyranone은 HPLC (High performance liquid chromatography)를 이용하여 쉽게 분석이 가능하다(10-14). 3-Deoxypentulose는 스펙트럼분석과 크로마토그래피 기술을 이용하여 분석이 가능하고 Troyano 등(15)은 가스크로마토그래피를 이용하여 상업적으로 살균된 우유 속 3-deoxypentulose함량을 측정하였다. 또한, 마이알반응 중 갈색색소가 만들어지기 전 단계에서 형광을 띤 MRPs가 생성되는데 형광도 측정을 통해 우유의 최종당화산물(AGEs, Advanced glycation end products) 생성 정도를 스크리닝 할 수 있다(16,17). 조제분유는 유당과 단백질의 함량이 높고 필수불가결하게 살균, 분무건조와 같은 열처리공정이 반드시 필요하기 때문에 마이알 반응이 더 활발히 진행되고 많은 함량의 MRPs가 생성된다. 조제분유는 모유보다 100-400배 높은 AGEs 함량을 가지고 있으며(18) 실제로 분유를 섭취한 영유아가 모유를 섭취한 영

*Corresponding author: Kwang-Won Lee, Department of Food Bioscience & Technology, College of Life Science and Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea
Tel: 82-10-8766-9319
Fax: 82-2-927-1970
E-mail: kwangwon@korea.ac.kr

Received August 16, 2014; revised November 25, 2014;
accepted November 26, 2014

Table 1. Independent variables and their levels used in the response surface design

Independent variables	Symbol	Levels				
		-1.682	-1	0	1	1.682
L-carnitine (μM)	X_1	1.7	2.2	3.0	3.8	4.3
Pyridoxine hydrochloride (μM)	X_2	9.9	14.0	20.0	26.0	30.1
DL- α -tocopheryl acetate (μM)	X_3	19.9	24.0	30.0	36.0	40.1

유아 보다 혈청 내 AGEs 함량이 더 높다고 보고되었다(19). AGEs 노출은 소아당뇨 및 이로 인한 미세혈관 합병증에 영향을 줄 수 있고(20) 인슐린 대사 이상(21), 면역이상 반응(염증발현)(22) 등을 유발할 수 있다고 보고되었다. 많은 식품들의 MRPs 저감화 연구는 이루어지고 있으며, 특히 항산화물질은 마이알반응 중 생성되어 반응을 더 촉진시키는 자유라디칼과 직접 반응함으로써 마이알반응을 억제시킬 수 있는 항당화 효과가 있다고 밝혀져 있다(23). 따라서, 본 연구는 분유모델시스템을 구축하고 식품공진상 조제분유의 첨가물로서 허용된 물질 중 항산화 및 항당화 효능이 있다고 알려진 L-carnitine, pyridoxine hydrochloride, DL- α -tocopheryl acetate (24-27)를 요인변수로 하고 열처리를 가한 우유의 MRPs 생성 정도의 지표로 사용될 수 있는 형광도와 HMF 함량을 종속변수로 설정하여 중심합성계획(CCD, Central composite design)에 의한 반응표면분석(RSM, Response surface methodology) (28)을 통해 분유모델시스템의 MRPs 생성을 저감화 할 수 있는 최적조건을 찾고자 하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

D-Lactose monohydrate, pyridoxine hydrochloride는 Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고 sodium caseinate는 Irish dairy board (Dublin, Ireland)에서 구입하였으며, DL- α -tocopherylacetate은 DMS Nutritional Products Ltd. (Basel, Switzerland)에서, L-carnitine은 CHEMCON GmbH (Freiburg, Germany)에서 구입하였다. 시료의 전처리 및 분석용 시약으로 oxalic acid, trifluoroacetic acid (TFA)은 Sigma Aldrich에서 구입하였고 methanol은 Burdick & Jackson Muskegon (Muskegon, MI, USA)에서 구입하였으며, trichloroacetic acid (TCA)은 Kanto Chemical Co., Inc. (Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였고, 표준 물질로서 5-hydroxymethylfurfural (HMF)은 TCI America Inc. (Portland, OR, USA)에서 구입하여 사용하였다.

반응 표면 분석법(Response surface methodology, RSM) 실험 설계

첨가물을 이용한 분유모델시스템의 당화생성물 저감화 연구를 위해 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)을 사용하였다. 독립변수는 L-carnitine (X_1), pyridoxine hydrochloride (X_2), DL- α -tocopheryl acetate (X_3)의 농도로 설정하였다. CCD에 의해 독립 변수들을 5단계(-1.682, -1, 0, 1, 1.682)로 부호화(Table 1)하여 실험설계를 하였고 설정된 17개의 실험조건에 맞춰 실험을 수행하였다(Table 2). 또한 독립변수에 의해 영향을 받는 종속변수(Y_n)는 형광도(Y_1), HMF 함량(Y_2)으로 하였고 반응표면분석 그래프는 Maple 7 (Waterloo Maple Inc., Waterloo, ON, Canada) 프로그램을 사용하여 나타냈다.

Table 2. HPLC¹⁾ operating conditions for the determination of HMF²⁾

Instrument	Agilent Series 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)
Column	C_{18} (4.6×250 mm, S-5 μm , Analytical column, YMC, Kyoto, Japan)
Mobile phase	0.05% TFA in distilled water/methanol
Wavelength	280 nm
Injection volume	10 μL
Flow rate	1 mL/min

¹⁾High performance liquid chromatography

²⁾5-Hydroxymethylfurfural

분유 모델시스템 구축

분유 모델시스템은 시중에서 판매되고 있는 조제분유 중 6개월에서 24개월의 영아가 섭취하는 제품의 유단백질과 유당의 비율인 1:2.8로 제조하였다. 유단백질로 sodium caseinate, 유당으로 D-lactose monohydrate를 사용 하였고 sodium caseinate (3 mg/mL)와 D-lactose monohydrate (8.4 mg/mL)를 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 용해한 후 혼합액의 최종 부피를 5 mL로 하였다. Ukeda 등(29)은 UHT열처리를 가한 우유 모델시스템을 구축하기 위해 유당과 카제인 혼합물을 항온수조 또는 가압멸균기를 이용하여 120°C에서 20분간 반응시켰다. 따라서, 본 연구에서는 유단백질-유당 혼합물을 항온수조를 이용하여 100°C에서 30분간 반응하여 UHT 열처리를 가한 분유 모델시스템을 구축하였다. 분유 모델시스템의 MRPs 생성여부는 형광도 측정을 통해 확인하였다. 형광도는 분광형광계(VICTOR3TM, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)를 사용하여 excitation 370 nm, emission 440 nm에서 측정하였고 결과는 열처리 반응종결 후 측정된 형광도 값에서 열처리 반응 전 측정된 형광도 값을 뺀 값으로 나타내었다(30).

HMF 분석

시료 500 μL 과 0.2 M oxalic acid 500 μL 를 혼합 후 항온수조에서 90°C에서 30분간 반응하였다. 실온에서 식힌 후, 300 μL 40% (w/v) TCA 용액을 가하여 격렬히 섞어주었다. 그 후에 10,000×g에서 10분간 원심분리 한 후 상등액을 0.45 μm syringe filter로 여과 하였다. 본 연구의 HMF 분석을 위해 검출기가 장착된 기기 high performance liquid chromatography system (HPLC) (1200 series, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 사용하였으며, 분석컬럼은 YMC-Triart C_{18} (4.6×250 mm)을 사용하였고 시료 주입량은 10 μL 로 하였다. 이동상으로는 Table 2에 나타낸 조건과 같이 이동상A (0.05% trifluoroacetic acid in distilled water)와 이동상B (methanol)을 각각 0.45 μm cellulose nitrate

Table 3. Regression coefficients and significance of the quadratic polynomial equation for different responses based on t-statistic

Variables ¹⁾	Y ₁ (fluorescence intensity, % of LC)		Y ₂ (5-hydroxymethylfurfural content, ppb)	
	Coefficient	p value	Coefficient	p value
Intercept	99.314	0.000	323.935	0.000
X ₁	1.669	0.040	2.157	0.589
X ₂	3.295	0.002	11.682	0.018
X ₃	3.985	0.001	13.215	0.010
X ₁ X ₁	-2.933	0.005	-8.973	0.070
X ₂ X ₂	-3.450	0.002	-17.469	0.004
X ₃ X ₃	-1.486	0.081	-5.562	0.227
X ₁ X ₂	1.843	0.071	2.139	0.681
X ₁ X ₃	-2.432	0.026	-6.963	0.205
X ₂ X ₃	-1.601	0.107	-5.416	0.313

¹⁾X₁: L-carnitine, X₂: pyridoxine hydrochloride, X₃: DL- α -tocopheryl acetate

membrane filters (Whatman, Dassel, Germany), 0.45 μ m polytetrafluoroethylene (PTFE) membrane filters (Advantec Toyo Kaisha Ltd., Tokyo, Japan)로 여과하고, 초음파 세척기로 탈기하여 사용하였다. 기울기 용리 조건은 이동상 A와 B의 비율을 100:0 (0 min), 0:100 (22 min)로 하였고 유속은 1.0 mL/min로 하였으며 측정파장은 280 nm였다.

표준용액 제조는 500 mg/L HMF 원액을 0.15-5 μ g/mL의 농도로 희석한 용액으로 검량선을 작성한 후 다음시료에 대한 농도를 측정하였다.

통계분석

첨가물 L-carnitine, pyridoxine hydrochloride, DL- α -tocopheryl acetate를 분유모델시스템에 적용하였을 때의 MRPs 저감화 특성은 통계프로그램(MINITAB statistical software Version 13, Minitab Inc., State College, PA, USA)을 이용하여 반응표면회귀분석으로 통계 처리하였다. 독립변수 X_i, X_j에 대한 종속변수 Y의 2차 회귀 모형은 다음과 같이 나타낼 수 있고, β_0 는 상수이며 β_i , β_{ii} , β_{ij} 는 회귀계수이다.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j$$

종속변수 형광도(Y₁), HMF 함량(Y₂)에 대한 회귀 계수는 Table 3와 같이 나타내었고 이를 통해서 반응표면 회귀식으로 나타내었다(Table 4). 반응표면분석에 의한 MRPs 저감화 조건의 최적화는 MINITAB statistical software를 이용하여 각각의 반응변수의 특성 값에 대한 목표 값을 설정하여 목표 값을 만족시키고 합성된 만족도(D)를 최대화하는 인자의 최적 조합으로 결정하였다.

Table 4. Polynomial equations for responses calculated by RSM¹⁾ program

Responses ²⁾	Quadratic polynomial models ³⁾
Y ₁	Y ₁ =Y ₁ =99.314+1.669X ₁ +3.295X ₂ +3.985X ₃ -2.933X ₁ ² -3.450X ₂ ² -1.486X ₃ ² +1.843X ₁ X ₂ -2.432X ₁ X ₃ -1.601X ₂ X ₃
Y ₂	Y ₂ =323.935+2.1567X ₁ +11.682X ₂ +13.215X ₃ -8.973X ₁ ² -17.469X ₂ ² -5.562X ₃ ² +2.139X ₁ X ₂ -6.963X ₁ X ₃ -5.416X ₂ X ₃

¹⁾Response surface methodology

²⁾Y₁: fluorescence intensity (% of LC), Y₂: 5-hydroxymethylfurfural content (ppb)

³⁾X₁: L-carnitine (μ M), X₂: pyridoxine hydrochloride (μ M), X₃: DL- α -tocopheryl acetate (μ M)

결과 및 고찰

마이알반응생성물(MRPs) 확인

형광을 띤 MRPs는 주로 마이알 반응 중 갈색색소가 만들어지기 전 단계에서 환원당과 아미노기의 비가역적인 결합으로 생성되고(31) 당의 이성질화와 분해로부터 기인될 수 있으며 형광을 나타내는 정도와 형성 기작은 아미노산의 종류와 존재여부에 따라 달라질 수 있다. 또한, 이 물질은 우유의 열처리 정도의 지표로 사용될 수 있다(30). Morales (30) 등은 유당과 유단백질-유당 혼합물에 열처리를 가하고 형광도 측정을 하였을 때 유단백질-유당 혼합물이 더 높은 형광도를 나타냈고 이를 통해 유당과 유단백질을 이용한 모델시스템에서도 마이알 반응 중 형광을 띤 MRPs가 생성되는 것을 확인하였다. 따라서 본 연구에서는 유단백질 sodium caseinate와 유당 lactose monohydrate를 이용하여 분유모델시스템의 MRPs를 제조하고 이를 형광도 측정을 통해 확인하고자 하였다. 유단백질(C), 유단백질과 유당을 1:2.8 비율로 섞은 혼합물(LC)을 항온수조를 이용하여 100°C에서 30분간 반응시켜 형광도를 측정된 결과(Fig. 1) LC는 C보다 약 6.5배 높은 형광도를 나타내었다. 따라서, 이를 통해 분유모델시스템에서 MRPs가 생성됨을 확인 할 수 있었다.

형광도에 대한 첨가물들의 영향

중심합성계획에 의해 설정된 구간범위에서 분유모델시스템에 생성된 MRPs의 형광도를 측정된 결과는 Table 5에 나타내었다. 중심합성계획에서 ANOVA상의 lack of fit은 0.05 이상인 경우 모형이 적합한 것으로 판단하고, R²는 1에 가까운 수치일수록 좋은 모델임을 나타낸다(32). Y₁에 대한 lack of fit은 P=0.691로써 모형이 적합하였고, R²는 0.942이었다(Table 6). t-Statistic에 근거한 종속변수 Y₁의 상수, 일차항(X₁, X₂, X₃), 이차항(X₁², X₂², X₃²), 상호항(X₁X₂, X₁X₃, X₂X₃)의 계수와 유의성을 나타낸 결과(Table 3)에서 상수항(p<0.01), X₁ (p<0.05), X₂, X₃ (p<0.01), X₁², X₂² (p<0.05), X₁X₃ (p<0.05)항이 통계적으로 유의성이 있었고 이를 제외한 나머지 항에서는 유의성이 인정되지 않았다. 또한, ANOVA 분산분석 결과(Table 6) 일차항(p<0.01), 이차항(p<0.01), 상호항(p<0.05) 모두 통계적으로 유의성이 있는 것으로 나타났다. 각 첨가물 L-carnitine (X₁), pyridoxine hydrochloride (X₂), DL- α -tocopheryl acetate (X₃)의 농도가 형광도 변화에 미치는 영향을 알아보기 위해 반응표면분석 그래프로 나타내었다(Fig. 2). L-carnitine의 농도가 높을 때 pyridoxine hydrochloride 20 μ M 이하 농도에서 형광도가 급격히 감소하였고, L-carnitine의 농도가 낮을 때 DL- α -tocopheryl acetate의 농도가 감소할수록 형광도가 감소하다가 20 μ M일 때 최저치를 나타냈다. 또한, pyridoxine hydrochloride의 농도가 높을 때 형광도는 DL- α -tocopheryl acetate 농도에 영향을 받지 않았으나 pyridoxine hydrochloride의 농도가 낮을 때는 DL- α -tocopheryl acetate의 농도가 감소할수록 형광도가 감소하였다. 위 결과를 종합하였을 때, 세 첨가물들을 병행처리 할 경우

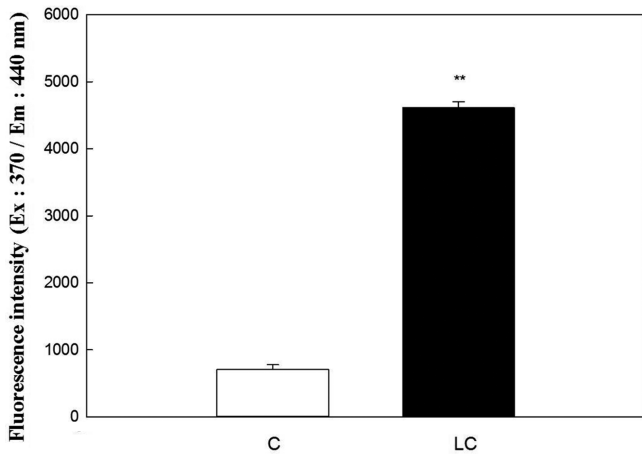


Fig. 1. Fluorescence intensity of infant model system. C: sodium caseinate (3 mg/mL), LC: lactose monohydrate (8.4 mg/mL)+ sodium caseinate (3 mg/mL). Sodium caseinate (3 mg/mL) in the presence of lactose monohydrate (8.4 mg/mL) in sodium phosphate buffer (pH 7.0) was glycosylated at 100°C for 30 min. Control was prepared in the same ways, without lactose monohydrate. To measure advanced glycation end products (AGEs) fluorescence intensity, AGEs were measured by fluorescence at excitation 370 nm and emission 440 nm. Values are mean±standard deviation of three replicate experiments. ** $p < 0.001$: significantly different from control group.

L-carnitine은 1.7-3.0 μM , pyridoxine hydrochloride은 9.9-15.4 μM , DL- α -tocopheryl acetate는 19.9 μM 일 때 형광도 값이 감소할 것으로 예상된다. 항산화물질들은 라디칼을 소거함으로써 마이알반응의 산화적인 가속화 반응을 억제시키고 형광을 띠는 MRPs와 최종당화산물의 생성을 감소시킬 수 있다(33,34). 본 연구에 사용된 L-carnitine, pyridoxine hydrochloride, DL- α -tocopheryl acetate의 라디칼 소거 능력은 여러 연구를 통해 보고된 바 있다. Gln 은 L-carnitine의 항산화 능력을 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 소거능력, 활성산소 소거능력, 과산화수소 소거능력, 환원력, 금속 킬레이트성 활성 등을 통해 확인한 바 있다(26). Pyridoxine hydrochloride는 비타민 B₆의 식이보조제이고 비타민 B₆는 높은 당함량에 노출된 적혈구 세포에서 라디칼 생성을 억제시켜줌으로써 지질산화와 글라이코실화 반응을 억제시킬 수 있다(35). DL- α -tocopheryl acetate (또는 DL- α -tocopherol)은 비타민 E의 여덟 개의 입체 이성질체의 혼합물로 이루어진 합성 비타민 E로서 페놀 구조의 수소원자를 라디칼에 제공함으로써 항산화 능력이 있는 것으로 잘 알려져 있고 산화방지제 및 비타민 보조제로 이용되고 있다(36-38). 따라서, 첨가물들은 라디칼을 소거함으로써 형광을 띠는 MRPs의 생성을 감소시켰을 것으로 생각된다.

HMF 함량에 대한 첨가물들의 영향

HMF는 마이알 반응 시 생성되는 중간생성물로서 3-deoxyglucosone의 분해 생성물로 잘 알려져 있고(39) sulfotransferases (SULT)에 의한 설폰화 반응으로 5-sulfoxymethylfurfural (SMF)로 변환된다. SMF의 황산염은 기질에서 쉽게 떨어져나갈 수 있는 탈리기로서 반응성이 매우 큰 중간생성물을 생성하고 DNA 및 다른 고분자들과 결합하여 독성 또는 돌연변이를 일으킬 수 있다고 알려져 있다(40,41). HMF생성은 열처리 온도, 시간에 영향을 많이 받기 때문에 우유에 가해진 열처리 정도에 대한 지표로 사용될 수 있고 우유에 열처리를 가해 발생하는 마이알반응의 대

Table 5. Central composite design and responses of dependent variables for anti-glycation effect

Exp. no.	Coded levels of variable ¹⁾			Responses ²⁾	
	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁	Y ₂
1	-1	-1	-1	82±2.7 ³⁾	249.2±9.3
2	1	-1	-1	85±4.3	265.6±17.0
3	-1	1	-1	86±4.0	275.4±18.7
4	1	1	-1	97±14.5	290.0±10.8
5	-1	-1	1	97±6.8	314.0±14.5
6	1	-1	1	91±15.1	292.1±11.0
7	-1	1	1	95±7.8	308.2±7.9
8	1	1	1	96±7.0	305.2±13.3
9	-1.68	0	0	87±6.2	298.0±9.1
10	1.68	0	0	96±11.2	311.8±20.8
11	0	-1.68	0	82±6.5	250.6±17.0
12	0	1.68	0	98±7.9	311.1±13.3
13	0	0	-1.68	88±1.7	302.3±20.3
14	0	0	1.68	103±6.6	326.7±1.5
15	0	0	0	97±7.9	329.3±20.3
16	0	0	0	102±4.1	327.8±20.3
17	0	0	0	99±6.1	312.5±13.6

¹⁾X₁: L-carnitine (μM), X₂: pyridoxine hydrochloride (μM), X₃: DL- α -tocopheryl acetate (μM)

²⁾Y₁: fluorescence intensity (% of LC), Y₂: HMF content (ppb)

³⁾Results are mean of triplicates±standard deviation.

표적인 지표로 사용된다(42-44). Gkmen과 Senyuva(45)는 우유를 바탕으로 한 영유아 식품의 HMF함량을 측정된 결과 0.18-0.25 mg/kg (180-250 ppb)이 생성됨을 확인하였고, Morales와 Jimenez-Perez(39)는 우유의 열처리방법에 따른 HMF 함량을 측정된 결과 UHT우유에서 약 3.46 $\mu\text{mol/L}$ (436.34 ppb)이 생성됨을 확인하였다. HMF 함량은 비색법과 HPLC분석을 이용하여 측정할 수 있다. HPLC를 이용한 HMF함량 분석은 1984년에 개발되었고 비색법 보다 더 정확하고 감도가 높으며 빠르게 측정할 수 있다(46,47). 따라서, 본 실험에서는 분유모델시스템의 HMF함량을 HPLC분석을 이용하여 측정하였다. C와 LC의 HMF함량을 측정된 결과, C에서는 HMF가 검출되지 않았고(data not shown) LC의 HMF 함량은 323.5±9.5 ppb였기 때문에 HMF 함량을 분유모델시스템에서 생성된 MRPs 함량의 지표로 적합하다고 판단하였다(Fig. 3).

중심합성계획에 의해 설정된 구간범위에서 분유모델시스템에서 생성된 HMF 함량을 측정된 결과는 Table 5에 나타났다. Y₂에 대한 lack of fit은 $P=0.281$, R²는 0.861로써 모형이 적합하였고 (Table 6) t-statistic에 근거한 종속변수 Y₂의 상수, 일차항(X₁, X₂, X₃), 이차항(X₁², X₂², X₃²), 상호항(X₁X₂, X₁X₃, X₂X₃)의 계수와 유의성을 나타낸 결과(Table 3)에서 X₂, X₃, X₂² ($p < 0.05$)항이 통계적으로 유의성이 있는 것으로 나타났고 이를 제외한 나머지 항에서는 유의성이 인정되지 않았다. 또한, ANOVA 분산분석 결과 (Table 6) 일차항과, 이차항($p < 0.05$)에서 통계적으로 유의성이 있는 것으로 나타났고 상호항은 유의성이 인정되지 않았다.

각 첨가물 L-carnitine (X₁), pyridoxine hydrochloride (X₂), DL- α -tocopheryl acetate (X₃)의 농도가 HMF 함량 변화에 미치는 영향을 알아보기 위해 반응표면분석 그래프로 나타내었다(Fig. 4). L-Carnitine의 농도는 HMF함량에 크게 영향을 미치지 않았고 pyridoxine hydrochloride의 농도가 20 μM 에서 10 μM 로 감소할수록 HMF 함량이 크게 감소했다. L-Carnitine과 pyridoxine hydro-

Table 6. Analysis of variance (ANOVA) for response of dependent variables (Y_1 , Y_2)

Responses ¹⁾	Sources	DF	SS	MS	F-value	p-value
Y_1	Model	9	677.55	75.28	12.52	0.002
	Linear	3	403.14	134.38	22.35	0.001
	Quadratic	3	179.43	59.81	9.95	0.006
	Cross-product	3	94.98	31.66	5.27	0.033
	Residual	7	42.09	6.01	-	-
	Lack of fit	5	26.29	5.26	0.67	0.691
	Pure error	2	15.79	7.90	-	-
	Total	16	719.63	-	-	-
Y_2	Model	9	8593.72	954.86	4.81	0.025
	Linear	3	4311.97	1437.32	7.24	0.015
	Quadratic	3	3622.62	1207.54	6.08	0.023
	Cross-product	3	659.13	219.71	1.11	0.408
	Residual	7	1390.20	198.60	-	-
	Lack of fit	5	1218.05	243.61	2.83	0.281
	Pure error	2	172.15	86.07	-	-
	Total	16	9983.91	-	-	-

¹⁾ Y_1 : fluorescence intensity (% of LC), Y_2 : 5-hydroxymethylfurfural content (ppb)

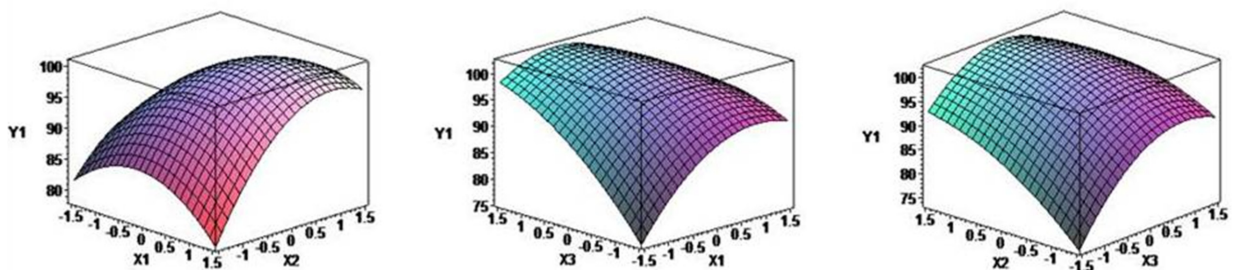


Fig. 2. Response surface plot for fluorescence intensity. X_1 (L-carnitine, μM), X_2 (pyridoxine hydrochloride, μM), X_3 (DL- α -tocopheryl acetate, μM), Y_1 (fluorescence intensity, % of LC), Y_2 (5-hydroxymethylfurfural content, ppb).

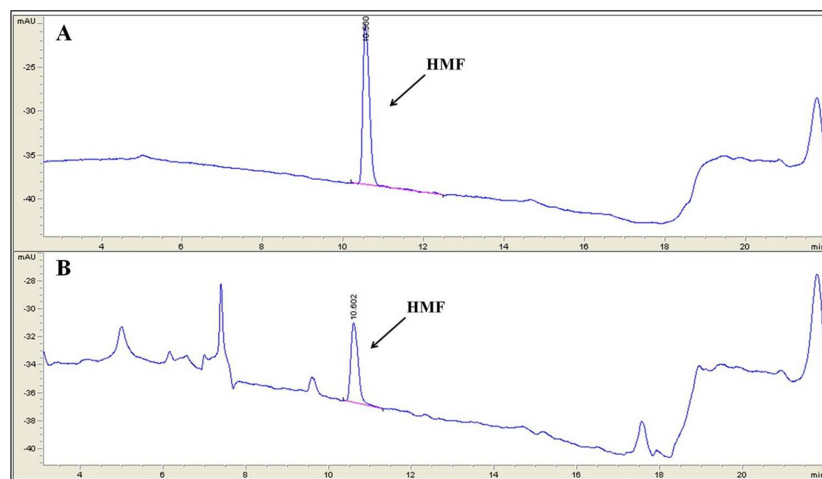


Fig. 3. Chromatographic determination of 5-hydroxymethylfurfural. (A) HMF standard 5 $\mu\text{g/mL}$, (B) HMF in infant formula model system.

chloride의 농도가 높을 때 DL- α -tocopheryl acetate의 농도는 HMF함량에 크게 영향을 미치지 않았지만 L-carnitine의 농도가 낮을 때는 DL- α -tocopheryl acetate의 농도가 감소할수록 HMF 함량이 급격히 감소했다. 또한, pyridoxine hydrochloride 농도가 낮고 DL- α -tocopheryl acetate의 농도가 20 μM 일 때 HMF함량이 최저값을 나타냈다. 위 결과를 종합하였을 때, 세 첨가물들을 병행

처리 할 경우 L-carnitine은 1.7-2.2 μM , pyridoxine hydrochloride은 9.9-17.4 μM , DL- α -tocopheryl acetate는 19.9 μM 일 때 HMF 함량이 감소할 것으로 예상된다. 마이알반응의 초기단계에서는 아마도리 전위가 발생하기 전 당분해반응과 프리라디칼 생성반응이 일어날 수 있고 환원당과 아미노기의 축합반응으로 생성된 Schiff's base가 아마도리 전위를 통해 아마도리 화합물을 생성할

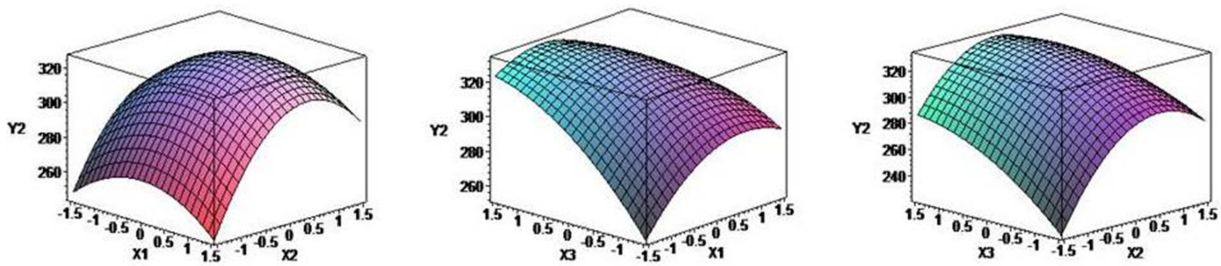


Fig. 4. Response surface plot for 5-hydroxymethylfurfural content. X_1 (L-carnitine, μM), X_2 (pyridoxine hydrochloride, μM), X_3 (DL- α -tocopheryl acetate, μM), Y_1 (fluorescence intensity, % of LC), Y_2 (HMF content, ppb).

Table 7. Optimal conditions for anti-glycation in infant model system

Critical value	Independent variables ¹⁾		
	X_1	X_2	X_3
Coded	-0.9190	-0.7046	-1.5623
Uncoded	2.26	15.77	20.63

¹⁾ X_1 : L-carnitine (μM), X_2 : pyridoxine hydrochloride (μM), X_3 : DL- α -tocopheryl acetate (μM)

Table 8. Predicted values of response variables in critical anti-glycation activity

Responses ¹⁾	Predicted values ²⁾	Experimental values
Y_1	77.4	79.3
Y_2	248.7	247.6

¹⁾ Y_1 : fluorescence intensity (% of LC), Y_2 : 5-hydroxymethylfurfural content (ppb)

²⁾Calculated using the predicted polynomial equations for response variables

수 있다(48,49). 마이알 반응이 계속 진행되면서 아마도리 화합물의 1,2 enolization과 당분해 반응으로 HMF가 생성될 수 있다(50,51). 항산화물질들은 라디칼과 반응함으로써 마이알반응을 지연시킬 수 있고 α -tocopherol, BHT, BHA, propyl gallate와 같은 항산화물질들의 마이알반응 지연과 마이알 초기반응의 대표적 물질인 furosine 함량 감소 효과가 보고된 바 있다(23). 따라서, L-carnitine, pyridoxine hydrochloride, DL- α -tocopheryl acetate와 같은 항산화물질들은 HMF가 생성되기 전 단계에서 라디칼을 제거함으로써 마이알반응의 진행을 지연시켜 HMF생성을 감소시켜줄 것으로 예상된다.

최적 저감화 조건

분유모델시스템의 MRPs저감화를 위한 최적조건을 구하기 위해 ANOVA 분석한 결과 형광도(Y_1)와 HMF함량(Y_2)은 모두 lack of fit의 값이 0.05 이상으로 반응표면분석 모델에 적합하였기 때문에 두 종속변수를 최적화 과정에 적용시켰다. Minitab statistical software의 Multiple Response Optimizer를 사용하여 종속변수 값의 최소값을 목표로 하여 최적농도를 예측한 결과 L-carnitine, pyridoxine hydrochloride, DL- α -tocopheryl acetate를 이용하여 분유 모델시스템에서 생성된 MRPs를 저감화 할 수 있는 최적 조건은 L-carnitine 2.26 μM , pyridoxine hydrochloride 15.77 μM , DL- α -tocopheryl acetate 20.63 μM 였다(Table 7). 그 결과, 형광도는 77.4%, HMF 함량은 248.7 ppb로 각각 LC대비 22.6, 23.1% 감소시킬 수 있다고 예측할 수 있었고 이 때의 만족도 값은 1.0이었

으며, 실제 실험값으로 형광도는 79.3%, HMF함량은 247.6 ppb로 예측 값과 비슷한 결과를 얻었다(Table 8).

요 약

본 연구는 분유모델시스템에 L-carnitine, pyridoxine hydrochloride, DL- α -tocopheryl acetate를 첨가하여 Maillard 반응에 의해 생성된 MRPs를 저감화 시키기 위한 최적조건을 찾기 위해 RSM의 CCD를 이용하였다. L-Carnitine (X_1), pyridoxine hydrochloride (X_2), DL- α -tocopheryl acetate (X_3)의 농도를 독립변수로 하고 형광도와 HMF 함량을 종속변수로 각각 설정하였다. 종속변수 회귀식의 결정계수(R^2)는 각각 0.942, 0.861로 반응표면분석 모델에 적합하였다. 형광도와 HMF 함량은 L-carnitine과 pyridoxine hydrochloride의 농도가 낮을 때 DL- α -tocopheryl acetate의 농도가 감소할수록 그 값이 급격히 감소하였다. L-Carnitine의 농도가 높을 때 pyridoxine hydrochloride의 농도가 20 μM 이하로 감소할수록 형광도가 감소하였고 HMF 함량은 L-carnitine의 농도에 관계없이 pyridoxine hydrochloride의 농도가 20 μM 이하로 감소할수록 감소하는 경향을 나타냈다. 본 실험에서 분유모델시스템에서 생성된 MRPs를 저감화 할 수 있는 최적조건으로 L-carnitine, pyridoxine hydrochloride, DL- α -tocopheryl acetate의 농도는 각각 2.26, 15.77, 20.63 μM 이었다. 이때 형광도는 77.4%였고 HMF 함량은 248.7 ppb로 각각 유단백질-유당 마이알 반응생성물(LC, lactose+sodium caseinate)대비 MRPs를 22.6, 23.1% 감소시킬 수 있다고 예측할 수 있었다. 또한, RSM을 통해 찾은 최적 조건의 실험값으로 형광도는 79.3%였고 HMF 함량은 247.6 ppb로 각각 LC대비 MRPs를 20.7, 17.8% 감소 시켰다. 따라서, L-carnitine, pyridoxine hydrochloride, DL- α -tocopheryl acetate의 최적화된 혼합을 통하여 분유 제조 시 MRPs 생성을 저감화시킬 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2013년 매일유업주의 지원 및 농림축산식품부 고부가 식품기술개발사업(314046-03-HD040)의 지원을 받아 수행된 결과의 일부로 이에 감사 드립니다.

References

- Pischetsrieder M, Henle T. Glycation products in infant formulas: chemical, analytical and physiological aspects. *Amino Acids* 42: 1111-1118 (2012)
- Sepulveda DR, Gongora-Nieto MM, Guerrero JA, Barbosa-Canovas GV. Production of extended-shelf life milk by processing pasteurized milk with pulsed electric fields. *J. Food Eng.* 67: 81-86

- (2005)
3. Hegele J, Buetler T, Delatour T. Comparative LC - MS/MS profiling of free and protein-bound early and advanced glycation-induced lysine modifications in dairy products. *Anal. Chim. Acta* 617: 85-96 (2008)
 4. Jaeger H, Janositz A, Knorr D. The Maillard reaction and its control during food processing. The potential of emerging technologies. *Pathol. Biol.* 58: 207-213 (2010)
 5. Henle T, Walter H, Klostermeyer H. Evaluation of the extent of the early Maillard-reaction in milk products by direct measurement of the Amadori-product lactuloselysine. *Z. Lebensm. Unters. For.* 193: 119-122 (1991)
 6. Van Boekel MAJS. Effect of heating on Maillard reactions in milk. *Food Chem.* 62: 403-414 (1998)
 7. Finot PA, Deutsch R, Bujard E. The extent of the Maillard reaction during the processing of milk. *Prog. Food Nutr. Sci.* 5: 345-355 (1981)
 8. Resmini P, Pellegrino L, Battelli G. Accurate quantification of furosine in milk and dairy products by a direct HPLC method. *Ital. J. Food Sci.* 2: 173-183 (1990)
 9. Hartkopf J, Erbersdobler HF. Stability of furosine during ion-exchange chromatography in comparison with reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 635: 151-154 (1993)
 10. Morales FJ, Van Boekel MAJS. Formation of lysylpyrraline in heated sugar-casein solutions. *Neth. Milk Dairy J.-NE* 50: 347-370 (1996)
 11. Morales FJ, Jimenez-Prez S. Study of hydroxymethylfurfural formation from acid degradation of the Amadori product in milk-resembling systems. *J. Agr. Food Chem.* 46: 3885-3890 (1998)
 12. Pischetsrieder M, Groß U, Schoetter C. Detection of Maillard products of lactose in heated or processed milk by HPLC/DAD. *Z. Lebensm. Unters. F. A.* 208: 172-177 (1999)
 13. Pellegrino L, Cattaneo S. Occurrence of galactosyl isomaltol and galactosyl β -pyranone in commercial drinking milk. *Nahrung* 45: 195-200 (2001)
 14. Ferrer E, Alegria A, Courtois G, Farr R. High-performance liquid chromatographic determination of Maillard compounds in store-brand and name-brand ultra-high-temperature-treated cows' milk. *J. Chromatogr. A* 881: 599-606 (2000)
 15. Troyano E, Olano A, Jimeno ML, Sanz J, Martinez-Castro I. Isolation and characterization of 3-deoxypentulose and its determination in heated milk. *J. Dairy Res.* 59: 507-515 (1992)
 16. Roux S, Courel M, Ait-Ameur L, Birlouez-Aragon I, Pain JP. Kinetics of Maillard reactions in model infant formula during UHT treatment using a static batch ohmic heater. *Dairy Sci. Technol.* 89: 349-362 (2009)
 17. Diez R, Ortiz MC, Sarabia L, Birlouez-Aragon I. Potential of front face fluorescence associated to PLS regression to predict nutritional parameters in heat treated infant formula models. *Anal. Chim. Acta* 606: 151-158 (2008)
 18. Mericq V, Piccardo C, Cai W, Chen X, Zhu L, Striker G, Vlassara H, Uribarri J. Maternally transmitted and food-derived glycotoxins: a factor preconditioning the young to diabetes. *Diabetes Care.* 33: 2232 - 2237 (2010)
 19. Ebekov K, Saavedra G, Zumpfe C, Somoza V, Klenovicsov K, Birlouez-Aragon I. Plasma concentration and urinary excretion of N-(carboxymethyl) lysine in breast milk- and formula-fed infants. *Ann. NY Acad. Sci.* 1126: 177-180 (2008)
 20. Chiarelli F, de Martino M, Mezzetti A, Catino M, Morgese G, Cuccurullo F, Verrotti A. Advanced glycation end products in children and adolescents with diabetes: relation to glycemic control and early microvascular complications. *J. Pediatr.* 134: 486-491 (1999)
 21. Unoki H, Yamagishi S. Advanced glycation end products and insulin resistance. *Curr. Pharm. Design* 14: 987-989 (2008)
 22. Cai W, He JC, Zhu L, Chen X, Zheng F, Striker GE, Vlassara H. Oral glycotoxins determine the effects of calorie restriction on oxidant stress, age-related diseases, and lifespan. *Am. J. Pathol.* 173: 327-336 (2008)
 23. Yen GC, Lai YH. Influence of antioxidants on Maillard browning reaction in a casein-glucose model system. *J. Food Sci.* 52: 1115-1116 (1987)
 24. Culbertson SM, Enright GD, Ingold KU. Synthesis of a novel radical trapping and carbonyl group trapping anti-AGE agent: A pyridoxamine analogue for inhibiting advanced glycation (AGE) and lipoxidation (ALE) end products. *Org. Lett.* 5: 2659-2662 (2003)
 25. Booth AA, Khalifah RG, Todd P, Hudson BG. *In vitro* kinetic studies of formation of antigenic advanced glycation end products (AGEs). Novel inhibition of post-Amadori glycation pathways. *J. Biol. Chem.* 272: 5430-5437 (1997)
 26. Glin I. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life Sci.* 78: 803-811 (2006)
 27. Cort WM. Antioxidant activity of tocopherols, ascorbyl palmitate, and ascorbic acid and their mode of action. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 51: 321-325 (1974)
 28. Yang W, Gao Y. Response surface methodology & its application in food industry. *China Food Addit.* 2: 68-71 (2005)
 29. Ukeda H, Goto Y, Sawamura M, Kusunose H, Kamikado H, Kamei T. Reduction of tetrazolium salt XTT with UHT-treated milk: Its relationship with the extent of heat-treatment and storage conditions. *Food Sci. Technol. Int.* 1: 52-57 (1995)
 30. Morales FJ, Romero C, Jimenez-Prez S. Fluorescence associated with Maillard reaction in milk and milk-resembling systems. *Food Chem.* 57: 423-428
 31. Baisier WM, Labuza TP. Maillard browning kinetics in a liquid model system. *J. Agr. Food Chem.* 40: 707-713 (1992)
 32. Son JM, Lee JH, Xue CL, Hong ST, Lee KT. Optimization of lipase-catalyzed interesterification for production of human milk fat substitutes by response surface methodology. *Korean J. Food Sci. Technol.* 43: 689-695 (2011)
 33. Khalifah RG, Baynes JW, Hudson BG. Amadorins: Novel post-Amadori inhibitors of advanced glycation reactions. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 257: 251-258 (1999)
 34. Fu M-X, Requena JR, Jenkins AJ, Lyons TJ, Baynes JW, Thorpe SR. The advanced glycation end product, N-(carboxymethyl) lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions. *J. Biol. Chem.* 271: 9982-9986 (1996)
 35. Jain SK, Lim G. Pyridoxine and pyridoxamine inhibits superoxide radicals and prevents lipid peroxidation, protein glycosylation, and (Na⁺ K⁺)-ATPase activity reduction in high glucose-treated human erythrocytes. *Free Radical Bio. Med.* 30: 232-237 (2001)
 36. Burton GW, Ingold KU. Autoxidation of biological molecules. 1. Antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants *in vitro*. *J. Am. Chem. Soc.* 103: 6472-6477 (1981)
 37. Burton G, Ingold KU. Vitamin E: Application of the principles of physical organic chemistry to the exploration of its structure and function. *Accounts Chem. Res.* 19: 194-201 (1986)
 38. Burton G, Ingold K. Mechanisms of antioxidant action: Preventive and chain-breaking antioxidants. pp. 29-43 In: *CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine II*. Miquel J, Quintanilha AT, Weber H (eds). CRC Press, Boca Raton, FL, USA (1989)
 39. Morales FJ, Jimenez-Perez S. HMF formation during heat-treatment of milk-type products as related to milkfat content. *J. Food Sci.* 64: 855-859 (1999)
 40. Glatt H, Sommer Y. Health risks of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) and related compounds. pp. 328-357. In: *Acrylamide and Other Hazardous Compounds in Heat-treated Foods*. Skog K, Alexander J (eds). Woodhead Publishing, Oxford, UK (2007)
 41. Surh YJ, Liem A, Miller JA, Tannenbaum SR. 5-Sulfoxymethylfurfural as a possible ultimate mutagenic and carcinogenic metabolite of the Maillard reaction product, 5-hydroxymethylfurfural. *Carcinogenesis* 15: 2375-2377 (1994)
 42. Keeney M, Bassette R. Detection of intermediate compounds in the early stages of browning reaction in milk products. *J. Dairy Sci.* 42: 954-960 (1959)
 43. Fink R, Kessler HG. HMF values in heat treated and stored milk. *Milchwissenschaft* 41: 638-641 (1986)
 44. Morales FJ, Romero C, Jimenez-Perez S. Evaluation of heat-induced changes in Spanish commercial milk: Hydroxymethylfurfural and available lysine content. *Int. J. Food Sci. Tech.* 31: 411-

- 418 (1996)
45. Gkmen V, Senyuva HZ. Improved method for the determination of hydroxymethylfurfural in baby foods using liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Agr. Food Chem.* 54: 2845-2849 (2006)
46. Marcy JE, Rouseff RL. High-performance liquid chromatographic determination of furfural in orange juice. *J. Agr. Food Chem.* 32: 979-981 (1984)
47. Mijares RM, Park GL, Nelson DB, McIver RC. HPLC analysis of HMF in orange juice. *J. Food Sci.* 51: 843-844 (1986)
48. Namiki M, Hayashi T. A new mechanism of the Maillard reaction involving sugar fragmentation and free radical formation. pp. 21 - 47. In: *The Maillard Reaction in Foods and Nutrition*. Waller GR, Feather MS (eds). American Chemical Society, Washington DC, USA (1983)
49. Hodge JE. Dehydrated foods, chemistry of browning reactions in model systems. *J. Agr. Food Chem.* 1: 928-943 (1953)
50. Van Boekel M, Zia-Ur-Rehman. Determination of hydroxymethylfurfural in heated milk by high-performance liquid chromatography. *Neth. Milk Dairy J.* 41: 297-306 (1987)
51. Morales FJ, Romero C, Jimnez-Prez S. Chromatographic determination of bound hydroxymethylfurfural as an index of milk protein glycosylation. *J. Agr. Food Chem.* 45: 1570-1573 (1997)