J. Fd Hyg. Safety
Vol. 23, No. 4, pp. 338~342 (2008)

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

시판 우유 중 콜린 함량조사

정원철 · 김영일[1] · 손호영[2] · 김석 · 이후장*
경상대학교 수의과대학 생명과학연구원
[1]건양대학교 제약공학과
[2]경상남도 양산시 농업기술센터

Choline Contents Survey in Commercial Milks

Won Chul Jung, Young-Il Kim[1], Ho Yeong Shon[2], Suk Kim, Hu Jang Lee*
Research Institute of Life Sciences, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea
[1]Pharmaceutical Engineering, Konyang University, Nonsan 320-711, Korea
[2]Agricultural Technology Center, Yangsan City Hall, Yangsan, 626-701, Korea
(Received August 21, 2008/Revised November 20, 2008/Accepted December 9, 2008)

ABSTRACT – Choline is important an organic compound for normal membrane function, acetylcholine synthesis, lipid transport, and methyl metabolism. In biological tissues and foods, there are multiple choline compounds that contribute to choline content. Many researches suggest that memory and intelligence are improved by the supplement of choline. Recently, according to the effects of choline for memory, choline has been added to milk. In this study, the content of choline was analyzed the commercial whole milks and flavored milks by enzymatic method. The standard curve was linear with 0.00316 slope and 0.994 correlation coefficient. Recoveries varied between 89.8 and 97.6%. Contents of choline in whole milks and flavored milks were 14.56-15.19 and 4.11-11.50 mg/100g, respectively. The results of this study may be usable for the establishment of choline adequate intake for Korean.

Key words: Choline, Whole milk, Flavored milk, Enzymatic method

콜린은 세포벽을 구성하고 있는 인지질과 신경전달성 아세틸콜린 내에서 발견되는 비타민 B 복합체에 속하는 수용성의 필수 영양소이다. 콜린은 체내에서 세포막의 구조 유지와 신호전달, 아세틸콜린 합성, 그리고 메칠기의 공급 등의 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다[1,2].

미국 National Acadmies 산하 Istitute of Medicine의 Food and Nutrition Board의 개인의 비타민류 권장섭취량에 따르면, 유아, 어린이, 그리고 성인에 있어서 콜린의 하루 적정 섭취량은 각각 125-150, 200-375, 그리고 425-550 mg으로 설정되어 있다[3].

콜린 결핍이 일어나면, 인체에서는 간의 손상이 일어난다고 보고되고 있으며, 쥐에서는 간의 콜린과 콜린대사물의 농도가 감소하고, 간암의 발생 증가 및 발암성분에 대한 감수성의 증가와 상관성이 있는 것으로 보고되고 있다[4-6].

*Correspondence to: Hu Jang Lee. College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea
Tel : 055) 751-6642, Fax : 055) 751-5803
E-mail: hujang@gnu.ac.kr

과량의 콜린을 섭취할 경우, 생선 비린내가 나게 되는데, 이는 콜린이 체내에서 대사될 때, 생선 비린내를 내는 트리메틸아민을 과량으로 형성하게 되기 때문인 것으로 알려져 있다[7].

체내에서 콜린은 지질 대사작용에 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있어, 간 지방을 감소시키기 위한 영양 공급원으로 사용되기도 하지만, 콜린이 과도한 체지방의 감소에 어떤 효과가 있다거나 콜린의 과량섭취가 지방대사율을 증가시킨다는 명확한 증거는 없는 상태이다[8].

콜린의 가장 주요한 전달 형태인 phosphatidylcholine이 풍부한 식품들로는 난황, 닭고기, 송아지고기 그리고 칠면조 간 등이 있으며, 대부분의 식품들도 유리 콜린을 함유하고 있는 것으로 알려져 있다[9]. 미국 농무성은 2004년에 일반 식품들에 존재하는 콜린의 함량에 대한 database를 공개하였다. 이 database에 따르면, 총 콜린의 함량이 300 mg/100 g 이상인 식품으로는, 신선한 익히지 않은 달걀노른자, 익히거나 익히지 않은 쇠고기와 간, 프라이팬으로 익힌 닭고기와 간의 순서로 나타났다[9].

콜린은 신경전달성 아세틸콜린의 생산을 위한 화학적 전구물질로서, 체내에 섭취되었을 경우, 뇌 조직에서 신경전달 물질인 아세틸콜린의 농도를 증가시키고 콜린성 신경세포를 활성화시켜 학습 및 기억력 향상에 효과가 있는 것으로 보고되고 있다[10-12]. 또한, 콜린과 같은 아세틸콜린 전구물질은 galantamine과 함께 상승작용을 통하여 기억력을 증진시키고 알츠하이머병을 개선시키는 것으로 보고되고 있다[13,14].

콜린의 보충이 콜린성 신경세포의 활성을 통해 학습 및 기억력 향상에 효과가 있다는 연구 보고를 토대로, 시중에서 시판되는 많은 우유제품 속에 콜린 함유량을 증가시켜 뇌를 좋게 하는 기능성 식품으로 판매되고 있다.

따라서 본 연구에서는, 우유 중의 콜린의 농도을 측정하기 위해 사용되고 있는 효소측정법[15]을 이용하여, 시중에서 판매되고 있는 우유 중에 함유되어 있는 콜린 함량의 실태를 파악하기 위하여 진행하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 우유는 국내 5개 회사 (A, B, C, D, E로 표기)의 전유 제품과 첨가우유 제품 4종씩을 경남 진주시 소재 이-마트에서 각각 3차례에 걸쳐 구입하여, 4 °C 냉장고에 보관하면서, 시험에 사용하였다. 냉장 보관한 우유는 3일 이상 사용하지 않았다.

시약

본 연구에서 사용된 choline bitartrate, choline oxidase, phospholipase D, peroxidase, tris(hydromethyl)aminomenthane(Trizma), 그리고 4-aminoantipyrine 표준품은 Sigma-Aldrich Korea (Yongin, Korea)에서 구입하여 사용하였으며, 효소와 4-aminoantipyrine은 4 °C 냉장 보관하여 시험에 사용하였다. 기타의 시약은 분석용으로 구입하여 실험에 사용하였다.

실험용액의 제조

우유 중 콜린함량 분석을 위해 필요한 실험 용액들은 Woollard과 Indyk[15]의 실험방법에 따라 제조하여 본 실험에 사용하였다.

콜린 농도의 측정

우유 중에 함유된 콜린의 분석은 Woollard과 Indyk[15]의 효소측정법에 따라 수행하였다.

시료의 전처리

100 ml의 원심분리 시험관에 우유 5 ml를 넣고, 30 ml 1M HCl을 가한 다음, 뚜껑을 닫고 잘 흔들어 혼합하였다. 원심분리 시험관을 70 °C 수조에 3시간 동안 반응시킨 다음, 실온에서 식힌 후, 50 % NaOH 용액을 이용하여 pH를 3.5-4로 조정한 용액을 50 ml 부피플라스크에 옮겨 증류수를 이용하여 정량선까지 채웠다. 거름종이를 이용하여 가수분해물질을 제거한 여과액을 4 °C 냉암소에 3일 동안 보관한 후, 시험에 사용하였다.

콜린의 표준곡선의 작성

콜린 표준용액을 이용해 작성한 곡선의 기울기를 구하기 위하여 10 ml 원심분리 시험관 5개에 각각 50, 100, 150, 200, 그리고 250 μg/ml의 콜린 표준용액 0.1 ml를 가하고, 콜린 표준용액 대신 0.1 ml 증류수를 넣은 10 ml 시험관(reagent blank)을 더 준비하였다. 각각의 시험관에 발색제를 가하여 일정 조건에서 반응시킨 후, 흡광도를 측정하였다. 얻어진 흡광도와 콜린의 표준농도의 상관관계를 그래프로 작성하였다.

회수율 조사

시료에 대한 회수율을 조사하기 위하여 먼저 콜린이 전혀 함유되지 않은 우유를 구해야 하는데, 이것이 용이하지 않아 50, 100, 그리고 150 μg/ml 농도로 콜린 표준용액을 spike한 우유와 콜린 표준용액을 첨가하지 않은 우유를 준비하여, 시료의 전처리 방법에 따라 처리한 후, 흡광도를 측정하여 각각의 콜린 농도를 구한 다음, 아래의 식에 의해 계산하였다.

$$\text{회수율}(\%) = \frac{\text{콜린첨가 우유의 농도} - \text{비첨가 우유의 농도}}{\text{시료에 첨가된 콜린의 농도}} \times 100$$

콜린의 측정과 함량 계산

우유전처리 여과액 0.1 ml를 넣은 두 개의 시험관 중 한 개의 시험관(sample blank)에 3 ml 증류수를 넣고, 나머지 한 개의 시험관(sample test), 5개의 콜린 표준용액을 넣은 시험관, 그리고 reagent blank 시험관에 각각 3 ml 발색용액을 가하여 37 °C수조에서 15분 동안 반응시킨 후, 실온에서 15분 정도 식힌 다음, 각각의 반응액을 optical cell에 옮겨, 505 nm에서 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 콜린 표준곡선을 통해 기울기(S)를 구하고, 시료의 흡광도(A_{smp})에서 sample blank 흡광도(A_{bl})와 reagent blank 흡광도(A_{reag})를 빼낸 값을 시료의 총 흡광도(A)로 하여, 다음과 같이 콜린 함량을 구하였다.

Choline (as choline hydroxide, mg/100g) = A/S

결과 및 고찰

표준곡선

콜린의 표준용액을 이용해 작성한 표준곡선의 기울기(S)

는 0.00316 ± 0.00011 (n=10)이었으며, 상관계수, r^2값은 0.9980으로 매우 양호한 직선성을 나타내었다(Fig. 1).

Woollard와 Indyk[15]의 연구에서, 콜린의 표준용액을 이용하여 작성한 곡선의 기울기가 0.00322를 나타내어, 본 연구의 결과와 매우 유사한 값을 보였다. 또한, Lima 등[16]은 flow injection analysis(FIA) 시스템을 이용한 효소측정법을 개발하여 우유와 탈지분유에서 콜린의 함량을 측정하였는데, 표준곡선의 r^2값이 0.995를 나타내어, 본 연구에서의 표준곡선의 r^2값이 다소 높게 나타났다.

회수율조사

콜린 표준용액을 우유(5 ml)에 각각 50, 100, 그리고 150 μg/ml가 되도록 첨가하여 회수율을 구한 결과는 Table 1에 나타내었다.

우유에서의 콜린의 회수율은 50, 100, 그리고 150 μg/ml의 각각의 농도에서 97.6, 94.9, 그리고 89.8 %를 보여, 높은 농도의 콜린을 첨가한 우유 보다는 낮은 농도의 콜린을 첨가한 우유에서의 회수율이 높은 경향을 보였다.

Rader 등[17]은 Woollard과 Indyk[15]의 효소측정법을 이용하여 식이보조제에 함유된 콜린의 함량을 측정한 결과, 이유식을 포함한 식이보조제들에서의 콜린의 회수율이 85-114 %로 나타났다. Sala Vila 등[18]은 이유식과 모유에서의 콜린의 가장 주요한 전달 형태인 phosphatidylcholine의 농도를 high-performance liquid chromatography를 이용하여 분석하였는데, 모유에 콜린을 10과 25 μg/ml의 농도로 spiking하여 회수율을 조사한 결과, 각각 101.6과 99.8 %의 회수율을 보였다고 보고하였다.

본 연구에서 콜린을 50, 100, 그리고 150 μg/ml로 spiking한 우유에서의 회수율이 모두 89.9 % 이상의 결과를 보여, Rader 등[17]의 연구와 비슷한 결과를 보였으며, Sala Vila 등[18]의 연구 결과와는 다소 낮은 회수율을 나타내었다. 위의 연구과 비교하여 본 연구에서의 회수율이 다소 차이를 보이는 것은 대상 시료의 종류, 추출 방법, 그리고 분석방법 등에 따라 회수율이 편차를 보이는 것으로 사료된다.

우유시료에서의 콜린함량

시중에서 판매되는 5개의 우유제조회사 별로 전유 및 첨가우유들에 대한 콜린 분석 결과는 Table 2에 나타내었다.

시판되는 전유들의 콜린 함량은 14.56-15.19 mg/100 g으로 제품 간의 차이가 거의 없는 것으로 나타났다. 딸기 첨가우유의 경우, 콜린의 함량은 8.76-10.97 mg/100 g이었으며, E 회사 제품의 콜린함량이 가장 높게 나타났다. 초코 첨가우유의 경우, 콜린함량은 8.97-11.50 mg/100 g으로 조사되었으며, B 회사 제품의 콜린함량이 가장 높게 나타났다. 바나나 첨가우유의 경우, 대부분의 제품 중 콜린함량은 7.81-9.81 mg/100 g으로 비슷하게 나타났으나, E 회사 제품의 경우, 콜린함량이 4.11 mg/100 g으로 타 회사 제품

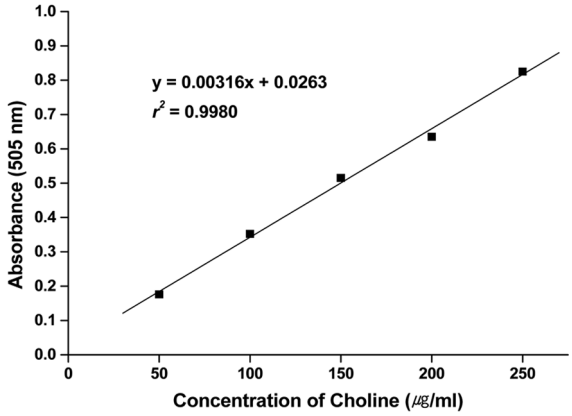

Fig. 1. Standard curve of choline. Standard curve represent the average of 10 curves. The slope of curve is 0.00316.

Table 1. Recoveries of choline from fortified whole milk samples

Fortified concentration (μg/ml)	Recovery (%)[a]	
	Range	Mean
50	95.2-100.5	97.6
100	90.2-99.6	94.9
150	88.7-91.5	89.8

[a]Values are the averages of three experiments.

에 비해 매우 낮게 나타났다. 커피 첨가우유의 경우, 콜린 함량은 8.23-11.39 mg/100 g으로 나타났으며, A 회사 제품의 콜린함량이 타 회사 제품에 비해 다소 높게 나타났다.

정[19]은 우리나라 사람의 상용식품을 대상으로 효소측정법을 이용하여 콜린함량을 조사하였는데, 그 결과에 따르면, 시판되는 전유들에 함유된 콜린함량은 12.97-17.46 mg/100 g이었고, B 회사 제품의 콜린함량이 가장 높은 것으로 보고하였다. 또한, 참가우유들에서의 콜린함량은 8.43-16.38 mg/100 g으로 제품들 간의 콜린함량의 편차가 높은 것으로 보고하였다. Woollard와 Indyk[15]는 효소측정법을 이용하여 분유와 이유식에 함유된 콜린의 양을 조사하였는데, 분유 중에 콜린의 함량은 98.8-138.4 mg/100 g으로 보고하였다. 이는 우유 중의 수분함량이 87 %[20]인 것을 고려하면, 우유 중에 12.8-18.0 mg/100 g의 콜린이 함유된 것으로 파악할 수 있다. Ziesel 등[21]의 연구에 따르면, liquid chromatography-electrospray ionization을 이용하여 전유를 포함하여 일반 식품 중에 함유된 콜린의 함량을 분석한 결과, 우유 중 콜린의 함량은 16.40 mg/100 g으로 보고하였다.

본 연구에서 분석한 시판 중인 전유에 함유된 콜린의 함량은 위의 연구들과 비교하여 매우 유사한 결과를 나타내었다. 첨가 우유에 있어서도 대부분 제품들의 콜린함량이 본 연구에서의 분석값과 비슷한 경향을 보였으나 일부 제품의 경우 본 연구에서의 콜린 분석값이 다소 낮게 나

Table 2. Contents of choline in market milks

Milks			Contents of Choline (mg/100g as choline hydroxide)[a]
Whole Milks		A	15.08 ± 0.37
		B	14.56 ± 0.55
		C	15.05 ± 1.56
		D	15.08 ± 1.28
		E	15.19 ± 0.63
Flavored Milks	Strawberry	A	10.55 ± 1.43
		B	8.97 ± 066
		C	10.97 ± 0.18
		D	8.76 ± 1.44
		E	10.97 ± 1.02
	Chocolate	A	10.23 ± 0.66
		B	11.50 ± 1.28
		C	9.92 ± 1.59
		D	8.97 ± 0.80
		E	9.92 ± 0.97
	Banana	A	8.23 ± 0.84
		B	9.81 ± 0.84
		C	9.18 ± 0.63
		D	7.81 ± 0.48
		E	4.11 ± 0.32
	Coffee	A	11.39 ± 0.32
		B	9.81 ± 0.95
		C	8.44 ± 0.66
		D	8.54 ± 0.95
		E	8.23 ± 1.64

[a]Values are the means and standard deviations of three experiments.

타났는데, 이는 첨가우유에 함유된 첨가성분들에 의해서 분석 상에 편차를 야기한 것으로 사료된다.

본 연구를 통하여, 시판 중인 일부 전유와 첨가우유들에 함유된 콜린함량을 조사하여 이에 대한 자료를 확보하였다. 향후, 본 자료는 필수영양소인 콜린에 대한 국민 권장수준을 확립하기 위한 기초자료로 활용되기를 기대한다.

감사의 글

이 논문은 2007년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2007-314-E00193).

요 약

콜린은 정상적인 세포벽의 기능, 아세틸콜린의 합성, 지질의 운송, 그리고 매칠기의 공급원으로서 중요한 유기화합물이다. 콜린의 보충이 콜린성 신경세포의 활성을 통해 학습 및 기억력 향상에 효과가 있다는 연구 보고를 토대로, 시중에서 시판되는 많은 우유제품 속에 콜린 함유량을 증가시켜 뇌를 좋게 하는 기능성 식품으로 판매되고 있다.

따라서 본 연구에서는 효소측정법을 이용하여, 시중에서 판매되고 있는 전유와 첨가우유들을 5개 회사의 제품을 대상으로 콜린의 함량을 분석하였다. 콜린의 표준용액을 이용하여 구한 표준곡선은 0.00316의 기울기와 0.998의 r^2 값을 나타내었다. 회수율은 89.8-97.6 %로 양호한 값을 나타내었다.

분석한 우유에서의 콜린함유량은, 전유에서는 14.56-15.19 mg/100 g이었고, 첨가우유에서는 4.11-11.50 mg/100 g을 나타내었다.

참고문헌

1. Best, C.H. and Huntsman, M.E.: The effects of components of lecithin upon deposition of fat in the liver. *J. Physiol*. **75**, 405-412 (1932).
2. 정한옥, 김초일, 이행신, 정영진: 한국인의 성별, 연령별, 지역별 콜린 섭취 추정량. *한국영양학회지*, **38**, 320-326 (2005).
3. Institute of Medicine, Food and Nutrition Board: Dietary Reference Intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin and choline. National Academy Press, Washington, DC (1998).

4. Burt, M.E., Hanin, I. and Brennan, M.F.: Choline deficiency associated with total parenteral nutrition. *Lancet* **2**, 638-639 (1980).
5. Tayek, J.A., Bistrian, B., Sheard, N.F., Zeisel, S.H. and Blackburn, G.L.: Abnormal liver function in malnourished patients receiving total parenteral nutrition: A prospective randomized study. *J. Am. Coll. Nutr*. **9**, 76-83 (1990).
6. Zeisel, S.H., Zola, T., daCosta, K. and Pomfret, E.A.: Effect of choline deficiency on S-adenosylmethionine and methionine concentration in rat liver. *Biochem. J*. **259**, 725-729 (1989).
7. Pardini, R.S. and Sapien, R.E.: Trimethylaminuria (fish odor syndrome) related to the choline concentration of infant formula. *Pediatr. Emerg. Care*. **19**, 101-103 (2003).
8. Piepenbrink, M.S. and Overton, T.R.: Liver metabolism and production of cows fed increasing amounts of rumen-protected choline during the periparturient period. *J. Dairy Sci*. **86**, 1722-1733 (2003).
9. Juliette, C.H., Juhi, R.W. and Joanne, M.H.: USDA database for the choline content of common food. USDA Nutrient Data Laboratory, Beltsville, pp. 1-26 (2004).
10. Meck, S.H. and Williams, C.L.: Characterization of the facilitative effects of perinatal choline supplementation on timing and temporal memory. *Neuroreport* **8**, 2821-2835 (1997).
11. Olariu, A., Tran, M.H., Yamada, K., Mizuno, M., Hefco, V. and Nabeshima, T.: Memory deficits and increased emotionality induced by beta-amyloid (25-35) are correlated with the reduced acetylcholine release and altered phorbol dibutyrate binding in the hippocampus. *J. Neural. Transm*. **108**, 1065-1079 (2001).
12. Moriyama, T., Uezu, K., Matsumoto, Y., Chung, S.Y., Uezu, E., Miyagi, S., Uza, M., Masuda, Y., Kokubu, T., Tanaka, T. and Yamamoto, S.: Effects of dietary phosphatidylcholine on memory in memory deficient mice with low brain acetylcholine concentration. *Life Sci*. **58**, PL111-118 (1996).
13. Modrego, P.J.: The effect of drugs for Alzheimer disease assessed by means of neuroradiological techniques. *Curr. Med. Chem*. **13**, 3417-3424 (2006).
14. Sweeney, J.E., Bachman, E.S. and Coyle, J.T.: Effects of different doses of galanthamine, a long-acting acetylcholinesterase inhibitor, on memory in mice. *Psychopharmacology* **102**, 191-200 (1990).
15. Woollard, D.C. and Indyk, H.E.: Determination of choline in milk and infant formulas by enzymatic analysis: collaborative study. *J. AOAC Int*. **83**, 131-138 (2000).
16. Lima, J.L., Delerue-Matos, C., Carmo, M. and Vaz, V.F.: Enzymatic determination of choline in milk using a FIA system with potentiometric detection. *Analyst* **125**, 1281-1284 (2000).
17. Rader, J.I., Weaver, C.M. and Trucksess, M.W.: Extension of AOAC official method 999.14 (choline in infant formula and milk) to the determination of choline in dietary supplements. *J. AOAC Int*. **87**, 1297-1304 (2004).
18. Sala Vila, A., Castellote-Bargalló, A.I., Rodríguez-Palmero-Seuma, M. and López-Sabater, M.C.: High-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection for the determination of phospholipid classes in human milk, infant formulas and phospholipid sources of long-chain polyunsaturated fatty acids. *J Chromatogr A*. **1008**, 73-80 (2003).
19. 정영진: 한국성인의 콜린 섭취 상태조사 및 한국인의 상용식품의 콜린 함량에 관한 연구. 보건복지부, 서울, pp. 25-30 (2004).
20. 정순동: 가축과 실험동물의 생리자료. 광일문화사, 서울, pp. 214-216 (1996).
21. Zeisel, S.H., Mar, M.H., Howe, J.C., Holden, JM.: Concentrations of choline-containing compounds and betaine in common foods. *J. Nutr*. **133**, 1302-1307 (2003).