

GOVP 12007932

GA0128-9913

최 종
연구보고서

150

저콜레스테롤 계란제품의 생산기술 개발

Development of Production Technology of
Low-cholesterol Egg Products

연구기관
한국식품개발연구원

농 립 부



제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “저콜레스테롤 계란제품의 생산기술 개발” 과제의 최종
보고서로 제출합니다.

1999. 12. 20

주관연구기관명 : 한국식품개발연구원
총괄연구책임자 : 유 익 종
연구 원 : 박 우 문
연구 원 : 전 기 홍
연구 원 : 강 통 삼
연구 원 : 지 중 룡
연구 원 : 김 윤 숙
연구 원 : 최 성 유
연구 원 : 김 현 수
연구 원 : 최 원 회
연구 원 : 이 회 애
연구 원 : 황 선 주
연구 원 : 조 혜 연

협동연구기관명 : 제 주 대 학 교
협동연구책임자 : 고 영 환
협 동 연 구 원 : 임 상 빈
협 동 연 구 원 : 좌 미 경
협동연구기관명 : 건 국 대 학 교
동물자원연구센터
협동연구책임자 : 김 천 제
협 동 연 구 원 : 이 의 수

여 백

요 약 문

I. 제목

저콜레스테롤 계란제품의 생산기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

오늘날 동맥경화나 순환기계 질환은 선진외국은 물론 우리나라에서도 주요사망의 원인이 되고 있는 질병으로서 이들 질환의 발병에 콜레스테롤이 주요 인자로서 작용한다는 사실은 많은 연구결과에 의해 잘 밝혀져 있다(Connor 등, 1981). 미국의 American National Heart, Lung and Blood Institute(NHLB)에서는 이와 같은 질환의 예방을 위해서 하루에 섭취하는 콜레스테롤량을 300 mg 이하로 제한하고 있으나 사실상 이는 실천하기가 매우 어렵다. 왜냐하면 계란 한개에 함유되어 있는 콜레스테롤 함량만 하더라도 평균 275 mg정도가 되기 때문이다(Bogin, 1991). 그러나 계란의 콜레스테롤이 앞에서 언급한 질병들의 직접적인 원인이 되고 있지는 않으며 계란을 통해 섭취하는 식이 콜레스테롤이 혈중 콜레스테롤치에 영향을 미치지 않는다는 연구결과(O'Brien과 Reiser, 1980; Flaim 등, 1980)에도 불구하고 소비자들의 콜레스테롤에 대한 부정적인 인식을 쉽게 불식시키지 못하고 있어 지난 수년간 계란의 소비량은 지속적인 감소경향을 면치 못하고 있는 실정이다. 따라서 이러한 추세를 극복하기 위한 일환으로서 콜레스테롤의 함량을 완전히 제거하였거나(무콜레스테롤, 2mg 미만/1회식) 혹은 부분적으로 저하시킨 저콜레스테롤 계란 제품(2-24 mg/1회식)의 개발은 난가공업계는 물론 식품산업계가 직면하고 있는 당면과제임이 분명하다는 견해가 지배적이다.

계란의 콜레스테롤을 낮춰 주는 기술적 방법에는 크게 두가지가 있을 수 있다. 첫째는 사양학적 방법에 의한 것으로서 계란에 물리, 화학적 처

리를 직접 가하지 않고 사양시에 사료의 조성을 변화시켜 준다든지 (Weiss, 1967; Naber, 1976), 콜레스테롤의 흡수, 배설 및 합성과정을 저해시키는 약물을 닭에게 투여한다든지 혹은 닭의 품종이나 종류를 유전적으로 취사선택하거나 닭의 산란주기, 나이, 계란의 크기 등을 조절함으로써 저콜레스테롤 계란을 생산하는 것이다(Singh 등, 1979; Hausheer 와 Fisher, 1978; Bogin, 1991). 이러한 사양학적 방법에 의한 저콜레스테롤 계란의 생산은 콜레스테롤의 저하율이 극히 낮아 실용화된 기술의 경우에는 15% 미만이며 30% 이상 저하시킬 경우 산란율이 크게 떨어지는 등 문제점이 지적되고 있는 것이 한계이다.

두번째 방법은 첫번째 방법과는 달리 계란에 기술적으로 물리, 화학적 처리를 실시하여 콜레스테롤을 저하시키는 방법이다. 콜레스테롤을 제거하기 위한 계란의 기술적인 처리방법에는 흡착제나 효소를 이용하거나 (Riccomini 등, 1990; Beitz, 1993) 초임계 추출법이나 용매 추출법을 사용하여 콜레스테롤을 제거하는 방법이 있으며(Bradley, 1989; Yano 등, 1980). 또한 식용유를 이용하여 난황의 지질을 제거하는 방법(Bracco 등, 1992; Fioriti 등, 1979)등을 들 수 있다. 이들 방법은 제각기 장·단점이 있으나 무엇보다도 운영측면에서 관리비가 저렴하며 공정이 간편할 뿐만 아니라 콜레스테롤의 제거효율이 70% 이상에 달하여 선진 미국에서도 주로 후자를 이용한 저콜레스테롤의 계란제품 생산에 주력하고 있다. 물론 일부 방법은 인체의 안정성 문제와 관능적 및 기능적 품질의 저하가 일어나 상품성이 떨어지는 문제점이 지적되고 있으나 이러한 점들을 보완하고 경제적인 공정이 개발된다면 소비자들에게 계란의 소비를 기피하게 만드는 주요 요인을 제거하여 새로운 수요창출에 기여하리라 사료된다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. 연구개발의 최종목표

계란으로부터 콜레스테롤이 70~95% 제거된 계란제품 즉, 액란과 난분을 생산하는 기술을 확립하고 이를 이용한 계란가공제품의 생산기술 개발을 본 연구의 최종목표로 한다.

2. 연구개발의 내용 및 범위

1) β -cyclodextrin 등 흡착제를 이용한 콜레스테롤 제거

β -cyclodextrin 등 흡착제를 이용하여 계란의 콜레스테롤을 효율적으로 제거하기 위한 시험조건인 원심력, 교반온도, 교반시간, 회석비율, 흡착제의 첨가량 등에 따른 콜레스테롤 제거율을 검토하였음.

2) 대두유 등 식물성 유지를 이용한 콜레스테롤 제거

식물성 유지를 이용하여 난황의 지방 중에 존재하는 콜레스테롤을 분리 제거하는 주요 공정을 확립하고 콜레스테롤 제거율을 향상시키기 위하여 적정 pH의 선택, pH의 조정방법, 증류수 등의 혼합비율 등을 검토하였음.

3) 초임계유체 추출법의 적용을 통한 건조란으로부터 콜레스테롤 제거

계란의 특성에 손상을 주지 않으면서 효율적으로 콜레스테롤을 제거하는 공정의 개발을 확립하기 위하여 추출온도, 압력, 시간, 초임계유체의 유량 및 보조용매의 적정 적용조건을 검토하였으며 콜레스테롤이 제거된 난황분의 기능적 특성과 지방산 조성 등 화학적 특성을 검토하였음.

4) 식물성 유지와 초임계 추출법에 의한 신선액란으로부터 콜레스테롤 제거

식물성 유지를 이용한 콜레스테롤 제거 방법과 초임계유체 추출법을 동시에 이용하여 신선액란으로부터 콜레스테롤 제거효율을 극대화 하고자 하였음. 전처리에 해당되는 식물성 유지의 적용조건과 함께 초임계유체 추출

시 적정 추출압력, 시간, 온도, 보조용매의 종류와 첨가량 등을 확립하였으며 생산물의 기능적 특성과 지방산 조성 등 화학적 특성을 검토하였음.

5) 흡착제 이용법과 기타 콜레스테롤 제거방법의 복합적용에 의한 콜레스테롤 제거효율의 극대화 방안 연구

두가지 이상의 콜레스테롤 제거공정을 함께 적용하여 콜레스테롤 제거효율을 극대화하는 HURDLE TECHNIQUE을 적용하였으며 주요 방법은 흡착제 이용법과 식물성 유지 처리법의 복합적용, 흡착제 이용법과 콜레스테롤 분해효소처리법의 복합적용, 흡착제 이용법과 초임계유체 추출법의 복합적용 등이 시도되었으며 이렇게 처리된 생산물의 기능적 특성과 지방산 조성 등 화학적 특성을 검토하였음.

6) 콜레스테롤 함량이 낮아진 계란의 가공식품개발 연구

콜레스테롤 함량이 낮아진 계란을 이용하여 계란발효음료의 생산 공정을 확립하기 위하여 유산균 스타터의 적정 첨가량, 당의 첨가량 및 최적살균조건 등이 검토되었음.

7) 콜레스테롤 제거에 사용된 흡착제의 재활용 방안 연구

계란의 콜레스테롤 제거시 사용된 흡착제를 재활용하기 위한 적정처리 방안을 강구하기 위하여 적정 용매의 선택과 혼합비율, 적정 교반 시간과 온도 등이 확립되었으며 재생된 흡착제의 콜레스테롤 제거효과 등이 검토되었음.

8) 저콜레스테롤 계란의 부산물로부터 콜레스테롤의 분리 정제

계란으로부터 콜레스테롤 제거시 생산되는 부산물에는 다량의 콜레스테롤이 함유되어 있으며 이 콜레스테롤 또한 중요한 자원이므로 이를 이용하기 위하여 부산물로부터 콜레스테롤의 분리 정제를 적정처리조건을 검토하였음.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

1) β -cyclodextrin을 이용한 난황의 콜레스테롤 제거

β -cyclodextrin(β -CD)이 난황중의 oil-water interface에 분포된 콜레스테롤과 결합하여 난용성의 복합체를 형성하는 특성을 이용하여 난황으로부터 콜레스테롤을 제거함에 있어서 처리조건(원심력, 교반온도, 교반시간, 회석비율, β -CD와 콜레스테롤의 몰비)을 달리하였을 때 각각의 콜레스테롤 제거율을 살펴보았다. β -CD · cholesterol의 불용성 복합체를 제거하기 위한 최적원심력, 온도 및 교반시간은 각각 2,000 g, 35℃, 15분으로 나타났으며, 난황과 증류수의 회석비율은 1 : 3일 때 콜레스테롤 제거율과 고형성분의 잔존면에서 유효하게 나타났다. 또한 β -CD과 난황중의 콜레스테롤의 몰비가 3 : 1일 때 콜레스테롤 제거율은 75.0% 이었으며, 잔존 고형성분은 68.2%을 나타내었고, β -CD와 콜레스테롤의 몰비가 5 : 1에서는 콜레스테롤 제거율 88.9%, 잔존 고형성분 64.6%를 나타내었다. 몰비가 6 : 1로 되었을 때는 콜레스테롤 제거율이 95.9% 이었지만 잔존 고형성분이 56.9%로 첨가 β -CD의 양이 많을수록 콜레스테롤 제거효과는 향상되었지만 난황의 유효영양성분이 많이 유실됨을 알 수 있었다. 따라서 β -CD와 콜레스테롤의 몰비는 3 : 1~5 : 1에서 콜레스테롤 제거가 이루어지는 것이 난황의 유효성분의 잔존면을 고려할 때 유효하리라 판단되었다.

2) 대두유를 이용한 난황의 콜레스테롤 제거

난황의 콜레스테롤을 저하시키기 위하여 대두유를 사용할 때 일정량의 물의 첨가와 함께 미세한 분산상을 만들기 위하여 빠른 속도로 교반하였다. 이 때 미생물의 성장 억제와 난황의 콜레스테롤 제거를 용이하도록 하기 위하여 난황에 대해 10%의 NaCl을 첨가하였는데, 8,000 rpm에서 교반시 30분 이상의 충분한 교반시간이 필요하였으며 온도가 높을 수록 난황중

의 콜레스테롤 제거 효과가 좋은 것으로 나타났다. 따라서 난황의 단백질 변성에 영향을 주지 않는 가능한 높은 온도로 처리하는 것이 콜레스테롤 제거에 유리한 것을 알 수 있었다. 대두유 : 난황 : 증류수의 첨가비율이 2 : 1 : 0.4일 때 콜레스테롤 제거효율은 62.2%이었으며 잔존 고형성분은 101.6%을 나타내었다. 이는 대두유를 적게 사용하고도 콜레스테롤을 다량 제거하는 효과를 나타내는 첨가비율이었지만 잔존 고형 성분이 100%를 초과하는 것으로 보아 수중유적형(O/W)의 emulsion이 다소 형성됨을 알 수 있었다. 또한 대두유 : 난황 : 증류수의 첨가 비율을 4 : 1 : 0.8로 하였을 때는 콜레스테롤 제거율과 잔존 고형성분이 각각 67.1%, 89.3%를 나타내었다. 신선란의 pH 이하로 저하시킬 수록 수중 유적형의 emulsion이 형성되어 난황층과 기름층의 분리가 어려웠으며 난황에 대한 NaCl의 첨가 농도는 높을 수록 콜레스테롤 제거 및 난황층과 기름층의 분리가 용이함을 알 수 있었다.

3) 난황액의 pH 및 pH 조정제가 대두유를 이용한 난황콜레스테롤의 제거효율에 미치는 영향

난황액 중의 콜레스테롤을 제거하기 위하여 대두유를 사용하는데 있어서 난황액의 pH 및 pH 조정제가 콜레스테롤 제거효율에 미치는 영향을 알아 보았다. pH 조정제로서 1N NaOH 또는 1N KOH를 사용하여 난황액의 pH를 7, 8, 9 및 10으로 조정하고, pH에 따른 콜레스테롤 제거율과 잔존고형성분함량을 알아보았다. 1N NaOH 또는 1N KOH를 사용하였을 경우 모든 처리구에서 pH 증가에 따라 콜레스테롤 제거율도 증가하였는데, 난황액의 pH가 9일 때에 콜레스테롤 제거율이 가장 높았다. 이것은 난황액의 pH를 증가시키면 유화안정성이 깨져 난황액의 콜레스테롤이 기름층으로 쉽게 전이되기 때문이었으며 pH 조정제의 선택에 있어서는 1N NaOH 보다는 1N KOH를 사용하는 것이 난황액의 pH를 9로 조정하는데 드는 소요량이 다소 많기는 하나 콜레스테롤 제거율이 각각 74%와 86.76%, 잔존

고형분함량이 57.94%와 64.46%로서 콜레스테롤 제거효과와 잔존고형분 면에서 좋았다. 난황에 대하여 적당한 대두유와 증류수의 첨가비율은 pH조정제로서 1N NaOH를 사용하였을 경우에는 대두유, 난황, 증류수의 비가 3 : 1 : 0.6, 0.8이었을 때에 콜레스테롤 제거율이 81.65%, 84.38%로서 높았고, 이 때의 잔존고형분의 함량은 68.56%와 69.02%이었다. 또한 pH 조정제로서 1N KOH를 사용하였을 경우에는 대두유, 난황, 증류수의 비가 2 : 1 : 0.4에서 제거율은 84.38%이었고, 잔존고형분은 68.32%로서 pH 조정제로는 1N KOH를 사용하고 대두유, 난황, 증류수의 비를 2 : 1 : 0.4로 하는 것이 대두유의 사용을 줄이면서 콜레스테롤 제거율을 높이는데 바람직하다고 사료되었다.

4) 초임계 이산화탄소에 의한 난황분으로 부터의 콜레스테롤 추출

난황분을 초임계 이산화탄소로 추출온도, 압력, 시간을 달리하여 추출하여 난황 지방과 콜레스테롤의 용해도와 선택도 및 추출잔류물의 색도, 지방산 조성을 측정하였다. 초임계 이산화탄소에 대한 지방과 콜레스테롤의 용해도는 이산화탄소의 밀도 증가에 따라 증가하였는데, 추출온도보다는 추출압력에 의하여 크게 좌우되었다. 이산화탄소에 대한 콜레스테롤의 선택도는 동일 압력에서 추출온도의 증가에 따라 증가하였다. 난황분을 40℃/276 bar에서 3시간 추출하였을 때 콜레스테롤이 46.1% 제거된 난황 63.2%를 얻을 수 있었다. 이산화탄소의 밀도와 추출시간이 증가할수록 적색과 황색이 많이 추출되어 추출잔류물의 색깔이 밝아졌다. 추출시간의 증가에 따라 불포화 지방산들은 많이 추출되었고, 포화지방산들은 추출잔류물에 농축되었다.

5) 추출압력과 시간이 초임계 이산화탄소를 이용한 콜레스테롤 제거에 미치는 영향

초임계 이산화탄소를 이용하여 난황분으로부터 콜레스테롤을 제거하기

위하여 추출압력과 추출시간을 달리하였을 때 추출압력과 시간이 증가할수록 콜레스테롤은 많이 제거되었고 수분감소율과 중량감소율도 증가함을 알 수 있었으며 추출압력 5,000psi이고 추출시간이 2시간일 때에 난황분으로부터 61.71%의 콜레스테롤을 제거하였다. 일정온도(40℃)에서 추출압력과 시간이 증가하면 불포화지방산의 추출이 많아져 추출잔류물의 포화지방산의 함량이 증가하였고 불포화지방산의 함량이 감소하였으며 추출잔류물의 L(명도)값은 증가하였고 a(적색도)값과 b(황색도)값은 감소하였다.

6) 추출온도와 CO₂의 유량이 초임계 이산화탄소를 이용한 콜레스테롤 제거에 미치는 영향

초임계 이산화탄소를 이용하여 난황분으로부터 콜레스테롤을 제거하는데 있어 추출온도와 이산화탄소의 유량이 미치는 영향을 알아보았다. 추출압력 5,000psi, 추출시간 2시간으로 고정하였을 때에 추출온도 50℃에서 콜레스테롤 제거율이 83.18%로서 가장 많았으며, 중량 감소율과 수분 감소율은 추출온도에 크게 영향을 받지 않았다. 추출온도에 따라 추출 후 잔류물의 포화지방산의 함량이 다소 증가하였고 불포화지방산의 함량은 변화가 없었다. 이산화탄소의 유량이 증가할수록 콜레스테롤 제거율도 증가하였으며 추출압력 5,000psi, 추출시간 2시간, 추출온도 50℃일 때에 이산화탄소의 유량이 1.0ml/min에서 77.05%의 콜레스테롤이 제거되었다. 중량 감소율과 수분 감소율은 이산화탄소의 유량이 많아지면 증가하기는 하나 1.0ml/min 이상에서는 뚜렷한 차이를 나타내지 않았으며 이산화탄소의 유량이 많아질수록 포화지방산인 C16:0과 C18:0의 함량은 증가하였으며 불포화지방산인 C18:1은 감소하였고 C18:2는 증가하였다. 추출온도가 증가하거나 이산화탄소의 유량을 증가시키는 경우 모두에서 추출잔류물의 L(명도)값은 증가하였고 a(적색도)값과 b(황색도)값은 감소하였다.

7) 보조용매가 초임계 이산화탄소를 이용한 난황분으로부터 콜레스테롤 제거에 미치는 영향

난황분으로부터 콜레스테롤을 제거하기 위하여 초임계 이산화탄소 추출 시에 비극성의 성질을 가지며 비교적 용해력이 약한 초임계 이산화탄소의 단점을 보완하기 위하여 유기용매를 첨가함으로써 용해력을 증가시키고자 보조용매의 사용을 검토하였다. 보조용매로서 에탄올과 메탄올을 사용하여 콜레스테롤 제거율, 중량 감소율과 추출 후 잔류물의 지방산 조성의 변화와 색도 변화를 알아보았다. 추출압력 5,000psi, 추출시간 2시간, 추출온도 50℃, 이산화탄소의 유량을 1.0ml/min으로 고정하여 초임계 이산화탄소에 의한 추출을 실시하였다. 초임계 이산화탄소 단독 사용시의 콜레스테롤 제거율 77.05% 보다 에탄올이나 메탄올 5% 병용 사용시의 콜레스테롤 제거율이 83.95%와 91.90%로 증가하였으며 이것은 에탄올과 메탄올은 용매의 극성을 증가시켜 지단백질 복합체의 분리를 도와 추출을 촉진한 것으로 사료되었다. 에탄올 10.0% 이상 첨가구에서와 메탄올 7.5%이상의 첨가구에서는 오히려 콜레스테롤의 제거율이 감소하는 경향을 나타내었으며 중량 감소율은 5% 첨가구까지 차이가 없었으나 에탄올 10% 첨가구에서와 메탄올 7.5% 이상의 첨가구에서는 중량감소율이 떨어졌다. 추출 후 잔류물의 지방산 조성의 변화는 에탄올이 메탄올의 첨가에서 경우와 비슷한 양상을 보여 포화지방산인 C16:0과 C18:0이 다소 증가하기는 하였으나 큰 차이가 없었으며 C18:1과 C18:2의 불포화지방산은 감소하였다. 추출 후 잔류물의 색도는 에탄올과 메탄올 사용에서 비슷한 결과를 보였으며 보조용매의 사용량이 증가할수록 L(명도)값은 감소하였고 a(적색도)값은 차이가 없었으며 b(황색도)값은 증가하였다.

8) SFE와 식물성유지 등 복합처리에 의한 난황액으로부터 콜레스테롤 제거시험 및 저콜레스테롤 가공식품 제조

식물성유지인 대두유와 증류수를 난황액에 대해 각각 2배, 0.4배 첨가하여 원심분리하여 난황으로부터 콜레스테롤을 1차 제거하여 61%의 콜레스테롤을 제거한 후 추출압력 5,000psi, 추출온도 35℃, 추출시간 2시간의 조

건에서 ethanol을 보조용매로 사용하므로써 난황액의 콜레스테롤을 86.5% 까지 제거할 수 있었으며 추출압력 4,500psi의 조건에서는 85.4%의 콜레스테롤 제거율을 나타내었다. 초임계유체 단독처리에 의해서는 5,000psi의 추출압력, 50℃의 추출온도, 2시간의 추출시간에 의해서 난황분으로부터 91.7%의 콜레스테롤 제거가 가능하였다. 초임계유체처리시 보조용매로서 ethanol을 5% 사용할 경우 5,000psi의 추출압력, 50℃의 추출온도, 2시간의 추출시간 조건하에서 난황분의 콜레스테롤을 98% 제거 가능하였다. 대두유처리와 초임계유체추출의 병용처리에 의해 콜레스테롤이 86% 제거된 난황액과 원료 난황액의 가공적성을 비교한 결과 유화력이 약 4% 감소되었으나 유화안정도는 변함이 없었다. 거품특성에 있어서는 기포력에 변화가 없었으나 기포안정성이 20% 정도 낮아졌으며 색깔이 다소 얼어지는 현상이 있었다. 대두유 처리와 초임계유체추출의 병용처리에 의해 콜레스테롤 86% 제거된 난황액과 원료 난황액의 지방산을 분석한 결과 리놀레산(18:2)과 리놀렌산(18:3)이 원료 난황에 비해 각각 4%, 1% 감소하는 변화가 있었으나 아미노산 조성은 변화가 없었다. 콜레스테롤 분해효소처리에 의해 84% 콜레스테롤 저하된 난황의 기능특성과 화학성분을 분석한 결과 콜레스테롤 저하된 난황의 점도가 다소 떨어졌을 뿐 유화특성, 거품특성, 색도에 큰 차이가 없었으며 각각 1%씩 낮아졌고 팔미트산(16:0)과 스테아르산(18:0)의 함량이 각각 1% 정도 높아졌다. 그러나 아미노산 조성에서는 변화가 발견되지 않았다. 콜레스테롤이 86% 제거된 난황액을 이용하여 난백과 재구성한 후 유산균 발효 계란음료를 생산하기 위한 최적 살균온도 조건은 75℃ 이상으로 확인되었다. 저콜레스테롤 계란의 유산균 발효를 성공적으로 수행하기 위하여서는 계란 고형분이 10% 이하이어야 하며 당의 사용량은 계란 회석액의 4% 이상이 적절한 것으로 나타났다. 유산균 스타터 컬처의 접종량은 0.002% 이상이면 16시간 이내에 유산발효를 완성시킬 수 있으나 산업에의 적용시에는 현장조건 등을 고려하여 결정함이 바람직할 것으로 사료된다.

9) Hurdle 기법에 의한 저콜레스테롤 난황의 생산 및 품질 평가

난황으로부터 콜레스테롤을 보다 효과적으로 제거하기 위하여 두 가지 이상의 콜레스테롤 제거 방법을 적용하는 hurdle technique을 이용하였으며 이렇게 생산된 저콜레스테롤 난황에 대해 가공적성 등 품질평가를 실시하였다. β -cyclodextrin을 이용하여 콜레스테롤이 75% 제거된 난황액을 시료로 대두유를 난황액의 2배 첨가하여 균질하고 원심분리함으로써 콜레스테롤 제거효율을 극대화하고자 하였다. 이때 난황액의 pH를 9로 조정하였을 때 콜레스테롤을 92%까지 제거할 수 있었으며 대두유를 난황액에 대해 3배 첨가할 경우 95.4%의 콜레스테롤을 제거할 수 있었다. β -cyclodextrin을 이용하여 콜레스테롤이 75% 제거된 난황액을 시료로 38°C의 조건에서 4종의 콜레스테롤 분해효소를 적용한 결과 *Pseudomonas fluorescens*로부터 생산된 cholesterol oxidase가 가장 높은 효과를 나타내어 8시간만에 95.8%의 콜레스테롤을 제거하였으며 반응 24시간 후에는 98.3%의 콜레스테롤 제거율을 나타내었다. β -cyclodextrin을 이용하여 콜레스테롤이 75% 제거된 난황액을 시료로 초임계이산화탄소를 이용하여 콜레스테롤을 추출한 결과 4,500psi, 35°C의 조건에서 5%의 co-solvent를 이용하여 4시간 추출할 경우 92.5%의 콜레스테롤이 제거된 난황액을 생산할 수 있었다. 이렇게 처리된 저콜레스테롤 난황의 품질 특성을 분석한 결과 유화특성의 경우에는 β -cyclodextrin과 대두유처리 및 β -cyclodextrin과 cholesterol oxidase 처리에 의해 생산된 저콜레스테롤 난황의 유화력은 대조구에 비해 낮아지지 않았다. 거품특성에 있어서는 기포력은 처리전후 차이가 없었으나 기포 안정성에 있어서는 모든 처리구가 공히 다소 낮아졌으며 겔보기점도도 함께 낮아졌다. 저콜레스테롤 난황의 색깔은 L value가 높아져서 대조구에 비해서 밝은 빛을 띠었고 a value 와 b value는 낮아진 결과를 나타내었다. β -cyclodextrin과 대두유처리에 의해 생산된 저콜레스테롤 난황의 지방산 조성은 대조구에 비해 C18:2와 C18:3이 증가한 반면 C16:1과 C18:1이 감소한 결과를 나타내었다. β -cyclodextrin과 cholesterol

oxidase 처리에 의해 생산된 난황의 지방산 조성은 C18:1이 다소 증가하였고 C16:0이 다소 감소하였다. β -cyclodextrin와 SFE처리에 의해 생산된 난황의 지방산 조성은 C16:0과 C18:0 등 포화지방산이 다소 증가하였고 C16:1과 C18:1 등 단일불포화지방산이 감소하는 경향을 나타내었다.

10) 난황의 콜레스테롤 제거에 사용한 β -cyclodextrin의 재활용

계란으로부터 cholesterol을 저하시키려는 노력은 여러 방법에 의해 시도되고 있는데 그 중 β -cyclodextrin에 의한 방법은 식품의 안정성면이나 효율면에서 우수한 것으로 알려져 있다. 그러나 β -cyclodextrin은 가격이 대체로 저렴하지 못하고 대부분이 수입되고 있으므로 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℃~60℃과 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 나타내었다. 또한 교반시간은 1시간까지, 그리고 교반 온도는 50℃까지 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 제거시의 효율을 100%로 할 때 사용하지 않은 β -cyclodextrin과 재활용된 β -cyclodextrin를 1 : 1로

혼합하여 사용한 경우는 81.1%의 제거효율을 나타내었으며, 재활용된 β -cyclodextrin을 사용하였을 경우는 24%의 제거효율을 나타내었다.

11) 저콜레스테롤 난황 생산시 생성되는 부산물로부터 콜레스테롤의 분리 정제

저콜레스테롤 난황액 생산시 생성되는 부산물 중의 콜레스테롤을 β -cyclodextrin의 흡착 및 검화 작용을 응용하여 분리, 정제하였다. 시료는 저콜레스테롤 난황액 생산시 침전되는 β -cyclodextrin과 콜레스테롤의 복합체를 chloroform으로 추출한 후 농축하여 제조하였으며, 콜레스테롤 농도는 3,069.6mg/100g이었다. β -cyclodextrin으로의 정제를 위해 증류수에 의한 50% 혼합용매를 용해 용매로 사용하였을 때, 순도 5.82%인 콜레스테롤을 얻었으나 반복적으로 3회 정제한 결과 콜레스테롤의 순도 3.06~3.14%로 유의차($p < 0.05$)가 없어 β -cyclodextrin은 정제를 위해 부적합한 것으로 사료되었다. 검화 정제시 콜레스테롤 추출을 위해 혼합용매로 hexane을 사용할 때 순도 38.89%인 콜레스테롤을 얻었으며 검화 용액 (95% ethanol : 33% KOH=94 : 6)을 시료 무게의 40~80배로 처리한 결과 60배(v/w) 처리구에서 콜레스테롤 순도 35.74%로 비교적 양호한 결과를 나타냈다. 1회의 검화 정제시 순도 32.8%의 콜레스테롤을 얻었으며 반복적인 검화 정제를 4회 실시한 결과 순도는 95.7%까지 개선되어 콜레스테롤 정제에 효과적인 것으로 사료되었다. 초기 시료가 난황분일 때와 β -cyclodextrin과 콜레스테롤 복합체일 때를 비교하기 위해 반복적인 검화 정제를 실시한 결과 난황분을 초기시료로 하였을 때 순도 97.8%의 콜레스테롤을 얻을 수 있었다.

2. 활용에 대한 건의

계란으로부터 콜레스테롤이 80~95% 이상 제거된 저콜레스테롤 계란 제품의 생산공정을 개발한 바 개발된 기술이 국내 액란 가공산업에 이용되어 저콜레스테롤 액란 제품의 생산에 적용될 수 있기를 기대하며 계란을 이용한 가공식품 중 계란발효음료를 비롯한 계란가공제품이 원재료로 이용되어 저콜레스테롤 가공식품의 생산에 적용되길 기대한다. 그러나 국내 액란 가공산업이 국내의 한정된 액란수요로 말미암아 타업종에 비해서 경쟁력이 떨어지므로 신기술의 적용에 의한 새로운 제품의 개발과 국내 시장 개척을 위해서는 정부의 가공산업 육성 사업을 통한 간접적인 지원이 함께 이루어질 필요가 있다고 사료된다.

3. 학술논문게재, 발표실적 및 특허사항

1) 학술지 논문 게재

- β -cyclodextrin을 이용한 난황콜레스테롤의 제거.
한국축산학회지. 39(5) : 599. (1997)
- 초임계이산화탄소에 의한 난황분의 추출.
한국식품영양학회지. 26(5) : 860. (1997)
- 대두유를 이용한 난황의 콜레스테롤 제거.
한국축산식품학회지. 17(1) : 6. (1997)
- 난황액의 pH와 pH 조정제가 대두유를 이용한 난황콜레스테롤의 제거에 미치는 영향. 한국축산식품학회지. 19(2) : 145. (1998)
- 난황의 콜레스테롤 제거에 사용한 β -cyclodextrin의 재활용.
한국축산식품학회지(투고중)
- 저콜레스테롤 난황 생산시 생성되는 부산물로부터 콜레스테롤의 분리 정제. 한국축산식품학회지(투고중)

2) 국내학회 발표

- 대두유에 의한 난황의 콜레스테롤 제거.
1996년 11월 16일. 한국축산식품학회 추계심포지움.
- β -cyclodextrin에 의한 난황의 콜레스테롤 제거.
1996년 6월 14일. 한국축산식품학회. 제17차 학술 발표회.
- 난황으로부터 콜레스테롤 제거를 위한 초임계추출법의 응용.
1996년 10월 2일. 한국식품과학회 제 57차 학술발표회.
- SFE에 의한 난황분의 콜레스테롤 제거.
1997년 11월 4일. 한국축산식품학회 제 20차 추계학술발표회
- 난황액의 pH와 pH 조정제가 대두유를 이용한 난황콜레스테롤의 제거에 미치는 영향.
1997년 11월 14일. 한국축산식품학회 제 20차 추계학술발표회
- 계란의 부가가치 향상을 위한 기술개발.
1998년 5월 22일. 한국축산식품학회 제 21차 춘계학술발표회
- 난황분으로부터 초임계이산화탄소를 이용한 콜레스테롤 제거시 보조 용매의 영향. 1999년 6월 4일. 한국축산식품학회 학술발표회
- 저콜레스테롤 난황 생산시 생성되는 부산물로부터 콜레스테롤의 분리 정제. 1999년 10월 22일. 한국축산식품학회 제 24차 추계학술발표회
- 난황의 콜레스테롤 제거에 사용한 β -cyclodextrin의 재활용 방안
1999년 10월 22일. 한국축산식품학회 제 24차 추계학술발표회

3) 특허

- 난황의 pH조정에 따른 콜레스테롤의 제거방법.

여 백

SUMMARY

1) Removal of cholesterol from liquid egg yolk by β -cyclodextrin treatment

This study was carried out to remove cholesterol from liquid egg yolk by using properties of β -cyclodextrin(β -CD) which formed insoluble complex by binding with cholesterol existed in oil-water interface of egg yolk. The conditions of treatment were varied by means of centrifugal force, mixing temperature, mixing time, distilled ratio and β -CD : cholesterol molar ratio, and the removal efficiency of cholesterol of each treatment was measured. Optimal condition of centrifugal force, mixing temperature and mixing time to remove β -CD · cholesterol complex was 2000 g, 35°C and 15 min, respectively. The ratio of egg yolk to distilled water was 1 : 3 with the most cholesterol removal and with the highest solid content remained. Also when molar ratio of β -CD to cholesterol from egg yolk was 3 : 1, cholesterol removal efficiency was 75.0% and remnant solid content was 68.2%. With 5 : 1 molar ratio of β -CD to cholesterol, cholesterol removal efficiency was 88.9% and remnant solid was 64.6%. With 6 : 1 molar ratio of β -CD to cholesterol, cholesterol removal efficiency was 95.9%, but remnant solid was 56.9%. As amount of added β -CD increased, cholesterol removal efficiency was increased but valuable nutrients of egg yolk also decreased. Therefore these results showed that molar ratio of 3 : 1 ~ 5 : 1 for β -CD : cholesterol was most effective in removing cholesterol from egg yolk, considering the amount of valuable components remaining.

2) Removal of cholesterol from liquid egg yolk with soybean oil

Soybean oil was added to reduce cholesterol content in the liquid egg yolk. Soybean oil emulsion was made by addition of water with rapid agitation speed. Simultaneously, 10% NaCl was added to inhibit microbial growth and to reduce cholesterol from egg yolk effectively. Cholesterol from the emulsion was removed efficiently at high temperature where egg yolk protein was not denatured yet, and agitation was required over 30 minutes. When the ratio of soybean oil(SO) : egg yolk(EY) : distilled water(DW) was 2 : 1 : 0.4, efficiency of cholesterol removal was 62.2%, and content of solid residue was 101.6%. This ratio was very efficient for high removal of cholesterol only with the small amount of soybean oil, but solid content more than 100% revealed that O/W emulsion was formed in some amount. When the ratio of SO : EY : DW was 4 : 1 : 0.8, efficiency of cholesterol removal was 67.1% and content of solid residue was 89.3%. At the lower pH than that of fresh egg, O/W emulsion was formed and the separation of egg yolk phase and oil phase got difficult. The removal of cholesterol and separation of egg yolk phase from oil phase were made easier by the addition of NaCl to egg yolk .

3) The effect of pH on the removal of cholesterol from egg yolk with soybean oil

In order to examine the effect of pH on the removal of cholesterol from egg yolk with soybean oil, the pH of egg yolk was adjusted to 7, 8, 9 and 10 using either 1N NaOH or 1N KOH before extraction of cholesterol by soybean oil. The efficiency of cholesterol removal was higher as the pH increased, showing maximum at pH 9. The higher

rate of cholesterol extraction at alkaline pH was thought to be due to disturbance of emulsion stability, which, in turn, facilitated transfer of cholesterol to oil phase. Although higher amount was required to get pH 9, KOH was better than NaOH in the removal of cholesterol and yield of solid residue. In addition, the removal of cholesterol and the yield of solid residue at pH 9 were the highest when the ratio of soybean oil/egg yolk/distilled water was 3/1/0.8.

4) Supercritical carbon dioxide extraction of cholesterol from dried egg yolk

Investigations were performed on the effects of extraction temperature, pressure, time on solubility and selectivity of egg yolk lipid and cholesterol, and color and fatty acid composition of the residue in supercritical carbon dioxide(SC-CO₂) extraction. Lipid and cholesterol solubility increased as the increase of CO₂ density and was found to strongly depend on the extraction pressure rather than the extraction temperature. The relative concentration of cholesterol in the extract increased with an increase in temperature and decreased with an increase in pressure and extraction time. Extraction of dried egg yolk for 3hr at 40°C/276 bar removed 46.1% of cholesterol from the residual egg yolk with a yield of 63.2%. SC-CO₂ extraction produced a lighter color egg yolk with less redness and yellowness. As the extraction time increased, the resultant residual egg yolk became more saturated in fatty acids. SC-CO₂ extraction offers a safe, natural method of removing cholesterol from dried egg yolk.

5) The effect of extraction time and pressure on cholesterol removal from egg yolk powder using supercritical carbon dioxide.

In this study, the extraction time and pressure of supercritical carbon dioxide extraction was varied to remove cholesterol efficiently from dried egg yolk. The more increased extraction time and pressure, the more cholesterol was removed and the decrease rate of moisture and weight of the residues increased. At the extraction time 2 hours and the extraction pressure 5,000 psi., 61.71% of cholesterol was removed from dried egg yolk. As the extraction time and pressure increased, the more unsaturated fatty acid was extracted. In the residues, the amount of saturated fatty acid increased, unsaturated fatty acid decreased and L-value increased and a-value and b-value decreased, at the constant temperature 40°C.

6) The effect of extraction temperature and carbon dioxide flow rate on cholesterol removal from egg yolk powder using supercritical carbon dioxide

This study was performed to investigate the effect of extraction temperature, CO₂ flow rate on cholesterol removal from egg powder using supercritical CO₂. When extraction time and pressure fixed at 2 hours and 5,000 psi., the highest rate of removed cholesterol was 81.18%, at the temperature 50°C; but the variation of extraction temperature did not affect the decrease rate of weight and moisture. In accordance with extraction time, the amount of saturated fatty acid increased more or less, while that of unsaturated fatty acid was not changed. As the CO₂ flow rate increased, the rate of removed cholesterol increased. At the extraction pressure 5,000 psi, time 2 hrs,

temperature 50°C and CO₂ flow rate 1.0ml/min, 77.05% of cholesterol was removed. Although the decrease rate of weight and moisture on the residues increased as the CO₂ flow rate, noticeable change was not found. According to the increase of CO₂ flow rate, the amount of saturated fatty acid, C16:0 and C18:0 increased and the amount of unsaturated fatty acid, C18:1 increased while C18:2 decreased. As both extraction temperature and CO₂ flow rate increased, L-value of residues increased but a-value and b-value decreased.

7) The effect of concentration of different co-solvents on cholesterol removal from egg yolk powder using supercritical carbon dioxide

This study was carried out to investigate the effect of organic solvents, ethanol and methanol, as the co-solvent which can improve the solubility of polar materials from egg powder using supercritical CO₂. After extraction, the rate of cholesterol removed from egg powder and the decrease rate of weight on the residues was investigated and the changes of fatty acid component and color of the residues were also examined. Dried egg yolk extracted at extraction pressure 5,000psi, time 2 hours, temperature 50°C and flow rate 1.0ml/min. In both treatments, 5% ethanol and 5% methanol, the rate of removed cholesterol increased to 83.95% and 91.90%, from 77.05% with extracted only CO₂. These results were caused by the effect to separate and extract the lipo-protein complexes with increased polarity by ethanol and methanol. It showed that the rate of removed cholesterol tends to decrease in the treatment of over 10.0% ethanol and over 7.5% methanol, and the decrease rate of weight on the residues decreased in the group of

10.0% ethanol and 7.5% methanol. After extraction, saturated fatty acids, C16:0 and C18:0, increased more or less but unsaturated fatty acid, C18:1 and C18:2, decreased as the similar result between ethanol and methanol treatment. As more co-solvent was added, L-value declined, a-value showed no difference and b-value increased which was the similar result between ethanol and methanol treatment.

8) Removing of cholesterol from egg yolk with multi-treatment using SFE and vegetable oil and manufacturing of low-cholesterol processed food

Firstly, cholesterol was removed 61% from egg yolk with centrifuge treatment after mixing 2 times of soybean oil and 0.4 times of distilled water to the egg yolk volume. 86.5% of cholesterol of egg yolk could be removed by SFE at the condition of extract pressure 5,000psi, extract temp. 35°C and extract time 2hrs with using ethanol as a second solvent but at the condition of extract pressure 4,500psi, 85.4% of cholesterol could be removed. 91.7% of cholesterol from egg yolk powder removed by SFE treatment at the condition of extract pressure 5,000psi, extract temp. 50°C and extract time 2hrs. and 98.0% of cholesterol from egg yolk powder could be removed by SFE treatment at the same above SFE condition with using ethanol as a second solvent. There is no differences in emulsion stability and forming capacity between egg yolk which was removed 86% of cholesterol with soybean oil and SFE treatment and egg yolk in raw state. but that decreased 4% in emulsion capacity, 20% in foaming stability and changed its color. Linolic acid(18:2) and linoleic acid(18:3) of the fatty acids decreased 4% and 1% each in the same material but no changes

in amino acids. Functional and chemical test resulted almost no changes in emulsion and foaming characteristics and color differences of egg yolk which was decreased 86% of cholesterol by enzyme treatment, but decreased in viscosity and increased in palmitic acid(16:0) and stearic acid(18:0). Optimum sterilized temperature to develop the fermented egg yolk drink with 86% cholesterol free egg yolk and restructured egg white was over 75°C. It resulted that egg solid had to below 10% and above 4% of sugar contents in the diluted egg solution in the formula to make successful fermentation in the low-cholesterol egg drink product. When the content of the starter culture was over 0.002% in the egg drink product, fermentation could be finished within 16hrs, but manufacturing condition had to be considered with industry-scale production.

9) Production and quality evaluation of low cholesterol liquid egg yolk produced using hurdle technique

Hurdle technique was used to remove cholesterol efficiently from liquid egg yolk. The quality of the low cholesterol egg products from the process were evaluated. From the 75% cholesterol reduced egg yolk through β -cyclodextrin treatment, 2 times weight of soy bean oil was added to the egg yolk and homogenized followed by centrifuged to be maximized to remove cholesterol. When the pH of the yolk was adjusted to 9, 92% of cholesterol was removed while 95.4% of cholesterol was removed when 3 times weight of soy bean oil was added to the egg yolk. As the results of application of cholesterol oxidase to the 75% cholesterol reduced egg yolk through β -cyclodextrin treatment, cholesterol oxidase from *Pseudomonas*

fluorescens showed the best effectiveness. At 8 hours after application of the cholesterol oxidase at 38°C, 95.8% of the cholesterol was removed from the egg yolk. As the results of application of supercritical carbon dioxide extraction to the 75% cholesterol reduced egg yolk through β -cyclodextrin treatment, 92.5% of the cholesterol was removed from the egg yolk at 35°C, 4,500 psi, for 4 hours under co-solvent. The quality characteristics of the produced low cholesterol egg products were analysed. The cholesterol reduced egg yolk produced from β -cyclodextrin and soy bean oil treatment and β -cyclodextrin and cholesterol oxidase treatment showed the lower emulsion capacity compared with control. The fatty acid composition of the cholesterol reduced egg yolk produced from β -cyclodextrin and soy bean oil treatment showed increased C18:2 and C18:3 compared with control while decreased C16:1 and C18:1 compared with control. The fatty acid composition of the cholesterol reduced egg yolk produced from β -cyclodextrin and cholesterol oxidase treatment showed increased C18:1 compared with control while decreased C16:0 compared with control.

10) Recycling of β -cyclodextrin used to cholesterol removal from egg yolk

The method that remove cholesterol from egg by β -cyclodextrin was stable and efficient in food. The aim of this study was to save the cost by recycling of β -cyclodextrin used to remove cholesterol from egg yolk because β -cyclodextrin was expensive and imported. The solvent that separated β -cyclodextrin from β -cyclodextrin complex adsorbing egg yolk cholesterol was butanol, chloroform, ether, hexane, methanol, 2-propanol and their mixture. The treatment ratio of solvent

and complex was 2 : 1~10 : 1. And condition of mixing time and temperature varied with 30~60°C and 10min~3hr 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% and cholesterol removal efficiency 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, cholesterol removal efficiency improved to 99%. It was concluded that the efficiency of removing cholesterol with recycled : non-recycled β -cyclodextrin(1 : 1), only recycled β -cyclodextrin were 81.1%, 24% respectively, if the efficiency of non-recycled β -cyclodextrin were 100%.

11) Isolation and purification of cholesterol from by-products of low-cholesterol egg yolk products

This study was carried out to purify egg cholesterol from the by-product of reduced cholesterol egg product. β -cyclodextrin and cholesterol complex from the low cholesterol egg yolk was concentrated after extracted with chloroform, and used as the purification sample which was stored at -5°C. The sample was purified in two ways, β -cyclodextrin adsorption and saponification. The conditions of β -cyclodextrin adsorption varied with the kinds of solvents, water, and methanol, ethanol, acetone, isopropanol and propanol mixture with water, that was used to dissolve the β -cyclodextrin and sample, and numbers of treatment. The conditions of saponification varied with kinds of solvents, hexane, ether and chloroform, for extracting the cholesterol, the quantity of hydrolysis solution(95% ethanol:33% KOH=94:6), from 40 times to 80 times of sample, and numbers of the procedure. Egg

powder was purified by the saponification to compare the effectiveness with by-product. For β -cyclodextrin adsorption, the proper dissolving solution was the ethanol : DW=1 : 1 that purified the cholesterol by $5.82 \pm 0.14\%$, but more treatment was not effective. For the saponification, the more effective extracting solution was hexane at the purity of $38.89 \pm 1.21\%$. The hydrolysis solution of 60 times(v/w) was relatively effective at the purity of $35.74 \pm 0.15\%$ and the 4 times repeated saponification improved the purity to $95.74 \pm 2.99\%$. As the result of the egg powder purification, cholesterol was purified to $97.83 \pm 3.91\%$ with 3 times repeated treatment.

CONTENTS

SUMMARY(KOREAN)	3
SUMMARY(ENGLISH)	19
Chapter 1. Removal of cholesterol from liquid egg yolk by β -cyclodextrin treatment	37
Section 1 Introduction	37
Section 2 Material and methods	38
Section 3 Results and discussion	40
Section 4 References	45
Chapter 2. Removal of cholesterol from liquid egg yolk with soybean oil	47
Section 1 Introduction	47
Section 2 Material and methods	48
Section 3 Results and discussion	49
Section 4 References	55
Chapter 3. The effect of pH on the removal of cholesterol from egg yolk with soybean oil	57
Section 1 Introduction	57
Section 2 Material and methods	58
Section 3 Results and discussion	60
Section 4 References	65
Chapter 4. Supercritical carbon dioxide extraction of cholesterol from dried egg yolk	67
Section 1 Introduction	67
Section 2 Material and methods	69
Section 3 Results and discussion	71

Section 4	References	78
Chapter 5.	The effect of extraction time and pressure on cholesterol removal from egg yolk powder using supercritical carbon dioxide	81
Section 1	Introduction	81
Section 2	Material and methods	82
Section 3	Results and discussion	86
Section 4	References	92
Chapter 6.	The effect of extraction temperature and carbon dioxide flow rate on cholesterol removal from egg yolk powder using supercritical carbon dioxide	95
Section 1	Introduction	95
Section 2	Material and methods	96
Section 3	Results and discussion	99
Section 4	References	107
Chapter 7.	The effect of concentration of different co-solvents on cholesterol removal from egg yolk powder using supercritical carbon dioxide	109
Section 1	Introduction	109
Section 2	Material and methods	110
Section 3	Results and discussion	114
Section 4	References	120
Chapter 8.	Removing of cholesterol from egg yolk with multi-treatment using SFE and vegetable oil and manufacturing of low-cholesterol processed food	123
Section 1	Introduction	123
Section 2	Material and methods	125

Section 3 Results and discussion	128
Chapter 9. Production and quality evaluation of low cholesterol liquid egg yolk produced using hurdle technique	153
Section 1 Introduction	153
Section 2 Material and methods	154
Section 3 Results and discussion	156
Chapter 10. Recycling of β -cyclodextrin used to cholesterol removal from egg yolk	175
Section 1 Introduction	175
Section 2 Material and methods	175
Section 3 Results and discussion	177
Section 4 References	184
Chapter 11. Isolation and purification of cholesterol from by-products of low-cholesterol egg yolk products	187
Section 1 Introduction	187
Section 2 Material and methods	188
Section 3 Results and discussion	191
Section 4 References	199
Appendix 1 : SFE equipment and egg products	201
Appendix 2 : Patent pended	207

여 백

목 차

요약문	3
SUMMARY	19
제 1 장 β -cyclodextrin을 이용한 난황의 콜레스테롤 제거	37
제 1 절 서설	37
제 2 절 재료 및 방법	38
제 3 절 결과 및 고찰	40
제 4 절 참고문헌	45
제 2 장 대두유를 이용한 난황의 콜레스테롤 제거	47
제 1 절 서설	47
제 2 절 재료 및 방법	48
제 3 절 결과 및 고찰	49
제 4 절 참고문헌	55
제 3 장 난황액의 pH 및 pH 조정제가 대두유를 이용한 난황콜레스테롤의 제거효율에 미치는 영향	57
제 1 절 서설	57
제 2 절 재료 및 방법	58
제 3 절 결과 및 고찰	60
제 4 절 참고문헌	65
제 4 장 초임계 이산화탄소에 의한 난황분으로 부터의 콜레스테롤 추출	67
제 1 절 서설	67
제 2 절 재료 및 방법	69
제 3 절 결과 및 고찰	71
제 4 절 참고문헌	78
제 5 장 추출압력과 시간이 초임계 이산화탄소를 이용한 콜레스테롤 제거에 미치는 영향	81

제 1 절 서설	81
제 2 절 재료 및 방법	82
제 3 절 결과 및 고찰	86
제 4 절 참고문헌	92
제 6 장 추출온도와 CO ₂ 의 유량이 초임계 이산화탄소를 이용한 콜레스테롤 제거에 미치는 영향	95
제 1 절 서설	95
제 2 절 재료 및 방법	96
제 3 절 결과 및 고찰	99
제 4 절 참고문헌	107
제 7 장 보조용매가 초임계 이산화탄소를 이용한 난황분으로부터 콜레스테롤 제거에 미치는 영향	109
제 1 절 서설	109
제 2 절 재료 및 방법	110
제 3 절 결과 및 고찰	114
제 4 절 참고문헌	120
제 8 장 SFE와 식물성유지 등 복합처리에 의한 난황액으로부터 콜레스테롤 제거시험 및 저콜레스테롤 가공식품 제조	123
제 1 절 서설	123
제 2 절 재료 및 방법	125
제 3 절 결과 및 고찰	128
제 9 장 Hurdle 기법에 의한 저콜레스테롤 난황의 생산 및 품질 평가	153
제 1 절 서설	153
제 2 절 재료 및 방법	154
제 3 절 결과 및 고찰	156
제 10 장 난황의 콜레스테롤 제거에 사용한 β -cyclodextrin의 재활용 ...	175
제 1 절 서설	175

제 2 절 재료 및 방법	175
제 3 절 결과 및 고찰	177
제 4 절 참고문헌	184
제 11 장 저콜레스테롤 난황 생산시 생성되는 부산물로부터 콜레스테롤의 분리 정제	187
제 1 절 서설	187
제 2 절 재료 및 방법	188
제 3 절 결과 및 고찰	191
제 4 절 참고문헌	199
부록 1 : 초임계추출장치 및 제품관련 사진	201
부록 2 : 발명특허출원서	207

여 백

제 1 장 β -cyclodextrin을 이용한 난황의 콜레스테롤 제거

제 1 절 서 설

계란은 영양분을 골고루 갖춘 완전식품의 대표이지만 콜레스테롤 함량이 높아 건강상에 문제를 일으킬 수 있다는 인식이 계란의 소비를 위축시키는 요인중 하나가 되고 있다. 실제로 계란 한개에 함유되어 있는 콜레스테롤 함량은 평균 272 mg 정도(Bogin, 1991)로 미국의 NRC(National Research Council)에서 권장하는 하루 콜레스테롤 섭취량 300 mg(NRC, 1989)에 거의 육박하는 수준이다. 러시아의 Anitschkow(1967)에 의해 콜레스테롤이 죽상동맥경화증(atherosclerosis)의 유발에 기여한다는 보고가 있는 후 Masironi(1970)은 계란의 섭취와 관상성 심장질환과 유의적인 상관관계가 있는 것으로 보고하였다. 따라서 계란으로부터 콜레스테롤을 저하시키려는 노력은 여러방법에 의해 시도되고 있는데 닭에게 급여하는 사료의 조성 변화에 따른 방법(Hargis, 1988) 및 azasterol등의 약물을 사용하여 계란의 콜레스테롤을 감소시키면서도 산란율이나 계란의 크기에는 영향을 주지 않는 방법(Singh et al., 1972) 및 유전학적 품종 선별방법(Bogin, 1991) 등 사양적인 방법이 있으나 콜레스테롤 제거율은 50%이하로 저조하다. 또한 생산된 계란에 직접 물리, 화학적인 처리를 하여 콜레스테롤을 감소시키는 방법으로는 흡착제, 식물성유지, 효소이용 및 용매추출법(Larsen and Frong, 1981 ; Bracco et al., 1982 ; Warren et al., 1991 ; Smith et al., 1995) 등이 이용되고 있으며 콜레스테롤 제거효율은 80~90%를 나타낸다. 계란의 콜레스테롤을 낮추는 기술에서 요구되는 사항은 저비용으로 효율적인 제거가 이루어져야 하며 식품으로서 안정성을 확보하여야한다. 본 연구에서 사용한 β -cyclodextrin(β -CD)은 흡착제의 일종으로서 전분에 Bacillus 속의

미생물이 생산하는 효소를 작용시켜 생산되며 7개의 포도당 분자가 고리처럼 연결되어 분자내공의 친수성 기와 콜레스테롤의 친수성 기가 서로 작용하여 난용성의 복합체를 형성(Oakenfull et al., 1991)하며 복합체는 원심분리에 의해 분리가 용이하다. 또한 쥐에 대하여 2.5g/kg/일(경구) 및 0.42g/kg/일(피하)에 30일간 투여하였을 때 독성학적으로 아무런 이상이 관찰되지 않았다(Miyazki et al., 1979)고 하였다.

Oakenfull (1990) 등은 난황을 0.16 M NaCl로 1 : 1로 희석시키고 0.5~3.5% (W/V)의 β -CD를 사용하여 10~40% 정도의 콜레스테롤 제거효과를 보았으며, Smith (1995) 등은 난황의 pH를 10.5로 조정하고 50℃에서 β -CD와 콜레스테롤의 물비를 4 : 1로 하였을 때 89.2%의 콜레스테롤 제거율을 나타내었다고 보고하였다. 본 연구에서는 pH의 조정없이 난황의 변성에 거의 영향을 미치지 않는 35℃에서 액상의 β -CD를 처리한 것이 특징으로 기존의 β -CD를 이용한 콜레스테롤 제거 방법을 보다 간편하게 유도 하면서 콜레스테롤 제거 효과를 극대화하기 위한 시도로 β -CD와 콜레스테롤의 복합체 침전시의 원심력, 교반온도, 교반시간, 난황과 증류수와의 희석비율 및 β -CD와 난황 콜레스테롤과의 물비를 체계적으로 연구하였으며 콜레스테롤 제거시 간과하기 쉬운 잔존고형분과 콜레스테롤 제거효율을 비교 검토하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 난황과 β -cyclodextrin의 반응 및 처리조건

평균난중 64.8g의 갈색란(K 축산, 위생란)으로 부터 난황과 난백을 분리하고 다시 난황을 300 μ m의 sieve를 통과시켜 난황막 및 알끈을 제거한 후 시료로 사용하였다. Oakenfull 등(1990)의 방법을 변형하여 이 순수한

난황을 3배량의 증류수로 회석함과 동시에 β -cyclodextrin (셀텍스 B-100, 일본식품화공)의 최종농도가 2%(W/V)가 되도록 첨가하여 50℃에서 30분 간 교반후 5℃까지 냉각하였다. 1000~3000g로 원심분리(Hanil, Union 5 KR)하여 β -CD·cholesterol complex를 제거하고 상징액에 대한 콜레스테롤 및 잔존 고형성분의 함량을 측정하였다.

난황콜레스테롤 제거의 최적화를 위하여 교반온도, 교반시간 및 난황에 대한 증류수의 회석비율은 각각 25~50℃, 5~60분 및 1~6배로 변화시켰으며 첨가하는 β -CD의 양은 난황중의 콜레스테롤과의 몰비로 1~6배로 까지 변화시켜 최적처리 조건을 모색하였다.

2. 시료의 콜레스테롤 정량

난황 및 처리된 시료의 콜레스테롤 정량은 Boehringer Mannheim사의 정량 kit(Cat. No. 139050)을 사용하였다. 시료에 methanolic potassium hydroxide와 isopropanol을 첨가하여 가열, 여과 후 일정량의 sample을 catalase와 acetylacetone 및 ammonium phosphate buffer(pH 7.0)와 혼합한 후 전체용액을 2개의 시험관에 분주하고 한쪽에는 cholesterol oxidase를 첨가하여 40℃에서 1시간 동안 incubation한 후 405 nm에서 흡광도 (Jasco, spectrophotometer, UVIDEC-610)를 측정하여 콜레스테롤을 정량하였다(Roschlau et al., 1974).

3. 통계분석

평균값 및 표준오차의 산출은 3반복한 실험결과를 SAS program(1988)을 사용하여 얻어졌으며 Duncan의 다중검정방법(Duncan, 1955)으로 5% 수준에서 유의성을 검정하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

Table 1.은 β -CD에 의한 난황의 콜레스테롤 제거시 원심력의 변화에 따른 콜레스테롤의 제거율 및 잔존고형성분의 변화를 나타내고 있다. 원심력 1,000 g로 β -CD · cholesterol complex를 침전시키고 얻어진 상정액의 콜레스테롤 제거율은 51.0%에 달하였으며 잔존 고형성분은 87.9%를 나타내었다. 또한 원심력을 1,500 g, 2,000 g로 높임에 따라 콜레스테롤 제거율은 각각 55.0%와 60.6%로 향상되었지만 고형성분의 잔존량은 각각 76.3%와 74.8%로 난황의 유효성분은 원심력이 높아지는 만큼 유실됨을 알 수 있었다. 그리고 2,000 g이상의 원심력에서는 콜레스테롤 제거면에서 유의적인 차이를 보이지 않았지만 고형성분의 유실은 현저해지는 것을 알 수 있었다. 따라서 콜레스테롤 제거를 위한 최적 원심력은 콜레스테롤 제거와 고형성분의 잔존율을 감안할 때 2,000 g이하가 적당할 것으로 판단되며 본 실험에서는 2,000 g를 실험에 적용하였다.

Table 1. Effect of centrifugal force on removal of cholesterol from liquid egg yolk by β -cyclodextrin treatment.

Centrifugal force(g)	Supernatant	
	Cholesterol reduction(%)	Solid residue(%)
1,000	51.0±2.4 ^c	87.9
1,500	55.0±1.7 ^{bc}	76.3
2,000	60.6±2.6 ^a	74.8
2,500	59.4±4.6 ^{ab}	66.4
3,000	58.0±2.2 ^{ab}	61.3

Treatment condition ; β -cyclodextrin conc. : 2%(W/V), Egg yolk : Distilled water=1 : 3, Mixing temperature : 50℃, Mixing time : 30 min, Centrifugal time : 10 min

a, b, c ; Column means with the same letter are not significantly different (P<0.05)

Table 2는 β -CD 농도를 난황의 2%(W/V), 난황과 증류수의 비율을 1 : 3, 교반시간 30분, 원심력 2,000 g로 일정하게 하고 교반시의 온도를 변화시켰을 때 난황으로부터 콜레스테롤이 얼마나 제거되었으며 고형성분의 유실은 어떠한가를 나타내었다.

교반시의 온도를 25~50℃로 변화시켰을 때 난황으로부터의 콜레스테롤 제거 효과와 고형성분 소실에는 커다란 영향을 미치지 않았다. 그러나 30℃ 이하의 낮은 온도에서는 β -CD의 용해도가 낮아 석출되는 현상을 보여 35℃ 이상의 온도에서 β -CD와 난황의 콜레스테롤을 반응시키는 것이 효과적이라고 판단되며 단백질 변성 등에 따른 관능적인 변화를 일으키지 않는 최적 온도는 가능한 낮은 온도인 35℃가 적당하다고 판단하였다.

Table 2. Effect of mixing temperature on removal of cholesterol from liquid egg yolk by β -cyclodextrin treatment.

Mixing temp.(℃)	Supernatant	
	Cholesterol reduction(%)	Solid residue(%)
25	60.0±1.2 ^a	72.4 ^a
30	59.8±3.5 ^a	73.0 ^a
35	60.1±1.9 ^a	74.4 ^a
40	57.8±5.0 ^a	72.3 ^a
45	57.9±5.2 ^a	74.2 ^a
50	58.9±4.5 ^a	75.7 ^a

Treatment conditions ; β -cyclodextrin conc. : 2%(W/V), Egg yolk : Distilled water.=1 : 3, Mixing time : 30 min, Centrifugal force : 2,000 g
a, b ; Column means with the same letter are not significantly different (P<0.05)

교반시간이 난황의 콜레스테롤 제거효율에 미치는 영향 (Table 3)을 살펴 보면 교반시간을 5분으로 하였을 때 59.5%의 콜레스테롤 제거율을 나타 내었고, 교반시간을 10분과 15분으로 하였을 때 각각 64.5%, 67.1%의 제거율을 나타내었다. 그러나 그 이상의 교반시간을 길게 하면 오히려 콜레스테롤 제거율이 저하되어 20분일 때 62.0%, 30분일 때 61.0%, 1시간일 때 58.6%를 나타 내었고, 교반시간에 따른 고형성분의 소실은 시간 변동에 관계없이 거의 일정함을 알 수 있었다. 따라서 난황의 콜레스테롤 제거를 최대로 하기 위한 교반시간으로는 15분을 채택하여 이후 실험에 적용하였다.

Table 3. Effect of mixing time on removal of cholesterol from liquid egg yolk by β -cyclodextrin treatment.

Mixing time(min)	Supernatant	
	Cholesterol reduction(%)	Solid residue(%)
5	59.5 ^b	72.4 ^a
10	64.6 ^{ab}	70.9 ^a
15	67.1 ^a	70.2 ^a
20	62.0 ^{ab}	70.7 ^a
30	61.0 ^a	72.3 ^a
60	58.6 ^b	73.1 ^a

Treatment conditions ; β -cyclodextrin conc. : 2%(W/V), Egg yolk : Distilled water=1 : 3, Mixing temperature : 35°C, Centrifugal force : 2,000 g

a, b, c; Column means with the same letter are not significantly different (P<0.05)

Table 4는 난황과 증류수의 희석비율에 따른 콜레스테롤의 제거효율 및 각각의 잔존 고형성분량을 나타내고 있다.

난황과 증류수와의 희석비율은 난황의 콜레스테롤 제거에 커다란 영향을 미친다는 것을 알 수 있었는데, β -CD 농도 2% (W/V), 교반온도 35°C, 교반시간 15분, 원심력 2,000 g로 일정하게 하고 난황과 증류수의 비율 1 : 1에서 1 : 6까지 높였을 때 콜레스테롤 제거율은 42.3% 에서 94.2%로 향상되어 증류수의 희석비율을 높이면 높일수록 콜레스테롤 제거효율은 현격하게 높아졌다. 그러나 이와는 반대로 잔존고형성분은 난황과 증류수의 비가 1 : 1일 때 76.2%이던 것이 1 : 6에서는 26.6%까지 저하되었다. 이 결과는 난황에 대해 다량의 증류수를 첨가하였을 때 비록 콜레스테롤 제거효율은 월등하였지만 난황의 유효 고형성분의 소실을 동반하기 때문에 영양적, 관능적인 면에서 커다란 결손을 초래하리라 사료된다. 따라서 콜레스테롤 제거율 및 잔존 고형분 성분의 양면을 생각할 때 영양 손실은 최소화하며 콜레스테롤 제거는 최대로 할 수 있는 비율은 1 : 3이 적당하였다.

Table 4. Effect of egg yolk : distilled water(W/V) ratio on removal of cholesterol from liquid egg yolk by β -cyclodextrin treatment.

Egg yolk : Distilled water	Supernatant	
	Cholesterol reduction(%)	Solid residue(%)
1 : 1	42.3±5.9 ^f	76.2 ^a
1 : 2	53.6±6.7 ^e	75.0 ^a
1 : 3	63.6±5.2 ^d	72.6 ^a
1 : 4	71.9±2.3 ^c	60.6 ^b
1 : 5	84.5±2.4 ^b	33.0 ^c
1 : 6	94.2±2.6 ^a	26.6 ^c

Treatment conditions ; β -cyclodextrin conc. : 2%(W/V), Mixing temperature : 35°C, Mixing time : 15 min, Centrifugal force : 2,000 g
a, b, c, d, e, f ; Column means with the same letter are not significantly different (P<0.05)

Table 5는 β -CD와 난황중의 콜레스테롤과의 molar ratio에 따른 콜레스테롤 제거율을 나타내고 있다. 난황과 증류수를 1 : 3, 교반온도 35℃, 교반시간 15분, 원심력 2,000 g로 일정하게 하고 β -CD와 난황중에 콜레스테롤 비율을 변화시키면 콜레스테롤에 대한 β -CD의 molar ratio가 클수록 콜레스테롤 제거율은 향상되고, 고형성분의 소실은 점차 많아지는 것을 알 수 있었다. β -CD와 난황중의 콜레스테롤이 molar ratio로 1 : 1일 때 콜레스테롤 제거율이 32.9%로 저조하였으나 molar ratio가 6 : 1에서는 95.9% 나타내었다. 그러나 고형성분의 소실을 고려할 때 최적 β -CD량을 결정하는데 신중한 검토가 필요하며 β -CD와 콜레스테롤의 molar ratio는 3 : 1~5 : 1 사이가 적당하다고 판단되었다.

Table 5. Effect of β -cyclodextrin : cholesterol ratio on removal of cholesterol from liquid egg yolk by β -cyclodextrin treatment.

Molar ratio (β -cyclodextrin : cholesterol)	Supernatant	
	Cholesterol reduction(%)	Solid residue(%)
1 : 1	32.9 \pm 7.0 ^c	71.6 ^a
2 : 1	50.2 \pm 7.9 ^d	70.8 ^a
3 : 1	75.0 \pm 3.3 ^c	68.2 ^a
4 : 1	83.8 \pm 6.3 ^{bc}	65.3 ^a
5 : 1	88.9 \pm 8.4 ^{ab}	64.6 ^a
6 : 1	95.9 \pm 2.4 ^a	56.9 ^b

Treatment conditions ; Egg yolk : Distilled water = 1 : 3, Mixing temperature : 35℃, Mixing time : 15 min, Centrifugal force : 2,000 g
a, b, c, d, e : Column means with the same letter are not significantly different (P < 0.05)

지금까지 사용되어온 흡착제로는 digitonin(Micich, 1990)과 saponin (Riccomin et al., 1990) 등이 있으나 주로 크림이나 버터유에서 콜레스테롤 제거에 사용되었으며 80~90%의 제거율을 나타내었다. 그러나 이들은 가격이 비싸 저콜레스테롤 난황의 생산에 있어 적합하지 못한 것으로 판단되며 앞으로 안정성이 확보되고 저비용으로 콜레스테롤의 제거를 극대화할 수 있는 β -CD의 이용이 제고될 것으로 사료된다.

제 4 절 참고문헌

1. Anitschkow, N. N. 1967. A history of experimentation on arterial atherosclerosis in animals. In : Blumental, H. T. (ed) : Cowdey's arteriosclerosis : A survey of the problem(ed 2), 21. Springfield, Thomas
2. Bogin, E. 1991. Low cholesterol eggs. Proceeding of the 4th European symposium on the quality of eggs products. 97
3. Bracco, U. and Viret, J. L. 1982. Decholesterization of egg yolk. U. S. Pat. 4,333,959
4. Duncan, D. B. 1955. Multiple range and multiple tests Biometrics. 11:1
5. Hargis, P. S. 1988. Modifying egg yolk cholesterol in the domestic fowl - a review. World's Poult. Sci. J. 44 : 17
6. Larsen, J. E. and Froning, G. W. 1981. Extraction and processing of various components from egg yolk. Poult. Sci. 60 : 160
7. Masironi, R. 1970. Dietary factors and coronary heart disease. Bull. WHO, 42 : 103
8. Micich, T. J. 1990. Behavior of polymer-supported digitonin with cholesterol in the absence and presence of butter oil. J. Agir. Food Chem. 38 : 1839

9. Miyazaki, Y., Kawahara, K. and Nozoe, S. 1979. Saga Univ., Nogaku Iho. 47 : 17
10. 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.
11. Oakenfull. D. G., Gurcharan, S. S. and Rooney, M. L. 1990. Cholesterol reduction. Aust. Pat. AU-A-54768/90
12. Oakenfull. D. G., Pearce, R. J. and Sidhu, G. S. 1991. Low-cholesterol dairy products. Aust. Dairy Tech. 46 : 110
13. Oh, S. Y. and Miller, L. T. 1985. Effect of dietary egg on varyability of plasma cholesterol levels and lipoprotein cholesterol. Am. J. Clin. Nutr. 42:421
14. Riccomini, M., Wick, C., Peterson, A., Jimenez-Flores, R. and Richardson, T. 1990. Cholesterol removal from cream and anhydrous butter fat using saponins. J. Dairy Sci. 73 : 107
15. Roschlau, P., Bernt, E. and Gruber, W. 1974. Enzymatische Bestimmung des Gesamt-Choliserins im Serum. Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 12 : 403
16. SAS/STAT 1988. user's guide. Release 6.03 edition SAS institute Inc., Cary. NC. USA.
17. Singh, R. A., Weiss, J. F. and Naber, E. C. 1972. Effect of azasterols on sterol metabolism in the laying hen. Poult. Sci. 51 : 449
18. Smith. D. M., Awad, A. C. Bennink, M. R. and Gill, J. L. 1995. Cholesterol reduction in liquid egg yolk using β -cyclodextrin. J. Food. Sci. 60(4) : 691.
19. Warren, M. W., Ball, H. R., Jr, Froning G. W. and Davis, D. R. 1991. Lipid composition of hexane and supercritical carbone dioxide reduced cholesterol dried egg yolk. Poult. Sci. 70 : 1991

제 2 장 대두유를 이용한 난황의 콜레스테롤 제거

제 1 절 서 설

계란은 단백질, 지질, 비타민, 무기질을 골고루 갖춘 영양적으로 매우 우수한 식품이지만 콜레스테롤 함량이 높아 건강상에 문제를 일으킬 수 있다는 인식이 계란의 소비를 위축시키는 요인중의 하나가 되고 있다. 특히 계란 한 개에 함유되어 있는 콜레스테롤 함량은 평균 272 mg 정도⁽¹⁾로 미국의 NRC(National Research Council)에서 권장하는 하루 콜레스테롤 섭취량 300 mg⁽²⁾에 거의 육박하는 수준이 함유되어 있다. 러시아의 Anitschkow⁽³⁾에 의해 콜레스테롤이 죽상동맥경화증(atherosclerosis)의 유발에 기여한다는 보고가 있는 후 Masilomi⁽⁴⁾은 계란의 섭취와 관상성 심장 질환과 유의적인 상관관계가 있는 것으로 보고하였으며 식이 콜레스테롤의 섭취가 심장병 등 순환기계 질환 및 동맥경화의 발병 요인이 된다는 보고가 계속되고 있다^(5,7). 한편으론 계란을 통해 섭취되는 식이 콜레스테롤이 혈중 콜레스테롤에 영향을 미치지 않는다는 연구들^(8,9)도 있으나 이에 대한 정확한 해답은 나와 있지 않다. 또한 만약 식이 콜레스테롤이 보상작용에 의해 혈중 콜레스테롤에 영향을 미치지 않는다고 하더라도 20~30% 정도의 비보상체질을 갖는 사람^(10,11)에 대해서는 여전히 식이 콜레스테롤이 문제가 될 것이라는 의견도 있다. 따라서 체내의 콜레스테롤 보상 작용 기능이 저하된 환자나 저콜레스테롤 음식을 선호하는 소비자를 위하여 저콜레스테롤 계란의 개발이 요구되는 바이다.

본 연구는 식물성 유지(대두유)를 이용하여 난황과 함께 빠른 속도로 교반한 후 난황층과 기름층을 분리하면 난황층의 콜레스테롤이 기름층으로 이행함으로써 난황의 콜레스테롤을 제거하는 방법^(12,13)을 응용하여 난황으로부터 콜레스테롤 제거효율을 증가시키기 위하여 실험을 실시하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 난황과 대두유와의 교반

계란은 K 축산의 위생란을 사용하였으며 할란 후 난황을 300 μm 의 sieve를 통과시켜 난황막 및 알끈을 제거하였다. 난황에 일정량의 물과 함께 미세한 분산상을 만들기 위하여 가온한 대두유를 첨가하여 8,000rpm(IKA-Labortechnik, ultra-turrax T25, Germany)으로 교반하였다. 이를 일정 시간 분액여두에 방치하여 난황층과 기름층을 분리한 후 난황층에 함유된 콜레스테롤 함량 및 고형분 함량을 측정하였다.

2. 시료의 콜레스테롤 정량

난황 및 처리된 시료의 콜레스테롤 정량은 Boehringer Mannheim사의 정량 kit(Cat. No. 139050, Germany)을 사용하였다. 시료에 methanolic potassium hydroxide와 isopropanol을 첨가하여 가열, 여과 후 일정량의 시료를 catalase와 acetylacetone 및 ammonium phosphate buffer(pH 7.0)와 혼합한 후 전체 용액을 2개의 시험관에 분주하고 한 쪽에는 cholesterol oxidase를 첨가하여 40 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 동안 incubation한 후 405 nm에서 흡광도(Jasco spectrophotometer UVIDEC-610)를 측정하여 콜레스테롤을 정량하였다.

3. 통계분석

평균값 및 표준오차의 산출은 3반복한 실험 data를 SAS program⁽¹⁴⁾을 사용하여 얻어졌으며 Duncan의 다중검정방법⁽¹⁵⁾으로 5% 수준에서 유의성을 검정하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

난황의 콜레스테롤 저하에 이용할 수 있는 식물성유로는 옥수수유, 잇꽃유, 대두유, 참깨유, 해바라기씨유, 낙화생유, 등 매우 다양한데, 신선란 중의 난황에 염산이나 인산등을 첨가하여 pH를 낮추어 유화상태를 불안정화 시킨 후에 미세한 분산상을 만들기 위하여 식물성유를 첨가한다. 이를 원심분리하는 방법 등을 이용하여 난황층과 기름층으로 분리하면 난황중의 콜레스테롤이 기름층으로 옮겨가 저콜레스테롤 난황을 손쉽게 얻을 수 있게 된다. Bracco 등⁽¹²⁾은 낙화생유를, Conte등⁽¹⁶⁾은 해바라기씨유를 이용하여 난황으로부터 80~90%의 콜레스테롤을 제거 하였는데 본연구에서는 비교적 가격이 저렴하고, 구입이 용이한 대두유를 사용하여 콜레스테롤 제거 시의 교반시간, 온도 및 대두유 : 난황 : 증류수의 최적 비율을 검토 하였다. 우선 난황중의 1.2~1.4%가 함유된 콜레스테롤을 제거하기 위하여 난황에 증류수를 첨가하여 premixture (난황중량의 10% 염화나트륨 함유)를 생산한 후, 여기에 40℃로 가온한 대두유를 첨가하여 혼합함으로써 콜레스테롤이 유층으로 추출되도록 하였을 때 교반시간이 콜레스테롤 제거에 미치는 영향을 살펴보았다(Table 1).

Homogenizer의 회전 속도를 8,000 rpm으로 일정하게 하고 교반시간을 5~60분으로 점차 증가시킴에 따라 콜레스테롤 제거율은 14.6%에서 45.6%까지 상승되었다. 교반시간이 길수록 콜레스테롤 제거는 향상되었지만 고형성분의 점진적 소실을 동반함을 알 수 있었다. 따라서 교반에 의한 난황 premixture와 대두유의 혼합시 난황중의 콜레스테롤이 대두유 층으로 추출되기 위해서는 30분 이상의 충분한 시간이 필요하였다. 교반시간이 30분일 때 콜레스테롤 제거율과 잔존 고형성분의 양은 각각 45.3%와 89.3%로 60분간 교반하였을 때의 45.6%와 87.1%와 비교하여 커다란 차이를 보이지 않았으므로 이후 실험에는 교반시간을 30분으로 일정하게 하였다.

Table 1. Effect of mixing time on cholesterol removal of liquid egg yolk by soybean oil.

Mixing time (min)	Cholesterol reduction(%)	Solid residue(%)
5	14.6 ± 1.4 ^d	98.2 ± 0.7 ^a
10	15.5 ± 1.6 ^d	98.1 ± 1.6 ^d
15	29.1 ± 1.5 ^c	96.8 ± 0.4 ^a
20	34.8 ± 1.2 ^b	89.8 ± 0.5 ^b
30	45.3 ± 4.1 ^a	89.3 ± 0.7 ^b
60	45.6 ± 1.9 ^a	87.1 ± 0.3 ^c

Treatment conditions ; Mixing temperature : 40℃, NaCl conc. : 10% to egg yolk, soybean oil : egg yolk : distilled water = 3 : 1 : 0.6

a, b, c, d : Column means with the same letter are not significantly different (P < 0.05)

Table 2은 대두유에 의한 난황 콜레스테롤 제거시 교반온도의 영향을 알아 본 실험결과이다. 난황의 가열에 의한 응고는 65℃ 정도에서 시작되며 70℃의 가열에 의해 완전히 응고⁽¹⁷⁾하기 때문에 교반 온도를 40℃로부터 5℃ 간격으로 상승시켜 난황단백질의 변성에 영향을 미치지 않는 60℃까지 상승시켜 실험을 실시하였다. 이때 온도상승에 따라 콜레스테롤 제거효과는 현격하게 증진되었다. 교반온도 60℃, 대두유 : 난황 : 증류수의 비율이 3 : 1 : 0.6이고 교반시간 30분, 염화나트륨 농도가 난황의 10%일 때 콜레스테롤 제거율은 57.2%이었으며 이 때의 잔존 고형성분은 94.2%를 나타내었다.

Table 2. Effect of mixing temperature on cholesterol removal from liquid egg yolk.

Mixing time (min)	Cholesterol reduction(%)	Solid residue(%)
40	39.2 ± 3.5 ^d	92.4 ± 1.4 ^a
45	44.3 ± 3.6 ^{cd}	94.4 ± 4.0 ^a
50	46.5 ± 1.7 ^{bc}	97.6 ± 1.6 ^a
55	52.3 ± 2.9 ^{ab}	98.5 ± 0.5 ^a
60	57.2 ± 1.1 ^a	94.2 ± 4.4 ^a

Treatment conditions ; Mixing time : 30 min, NaCl conc. : 10% to egg yolk, soybean oil : egg yolk : distilled water = 3 : 1 : 0.6

a, b, c, d : Column means with the same letter are not significantly different (P < 0.05)

난황의 콜레스테롤 제거를 위한 대두유 사용시, 대두유 : 난황 : 증류수의 최적 혼합비율을 알기 위한 실험결과는 Table 3에 나타내었다. 대두유와 난황의 비율을 2 : 1로 일정하게 하고 증류수의 비율을 난황의 0.8, 0.6 및 0.4로 하였을 때의 콜레스테롤 제거율은 각각 58.5, 56.7 및 62.2%로 나타났다. 또한 잔존 고형성분에 있어서는 세 경우 모두 100%를 상회하는 결과를 나타내고 있어 이와 같은 혼합비율하에서는 수중유적형의 emulsion이 일부 형성되어 분액여두에 의한 난황층과 기름층의 분리시 난황층에 대두유가 다소 포함되기 때문에 생기는 결과라고 판단되었다. 또한 대두유와 난황의 비율은 3 : 1로 일정하게 하고 난황에 대한 증류수의 비율은 0.8, 0.6, 및 0.4로 하였을 때 콜레스테롤 제거율은 각각 65.7, 60.2 및 58.0%를 나타내었으며, 잔존고형성분은 각각 93.6, 95.2 및 90.6%를 나타내어 난황에 대한 증류수의 혼합비율이 높을 수록 콜레스테롤 제거효율이 향상됨을 알 수 있었다. 그러나 증류수를 너무 많이 첨가하는 경우 emulsion 형성이 용이하여 유지 및 난황상의 분리가 곤란하다.

Table 3. Effect of soybean oil : egg yolk : distilled water(W/W/W) ratio on cholesterol removal from liquid egg yolk.

S.O : E.Y : D.W (W/W/W)	Cholesterol reduction(%)	Solid residue(%)
2 : 1 : 0.8	58.5 ± 0.8 ^a	116.8 ± 5.7 ^a
2 : 1 : 0.6	56.7 ± 4.6 ^a	120.3 ± 7.6 ^a
2 : 1 : 0.4	62.2 ± 2.0 ^a	101.6 ± 4.8 ^a
3 : 1 : 0.8	65.7 ± 4.7 ^a	93.6 ± 3.6 ^a
3 : 1 : 0.6	60.2 ± 1.4 ^a	95.2 ± 1.4 ^a
3 : 1 : 0.4	58.0 ± 2.2 ^a	90.6 ± 5.8 ^a
4 : 1 : 0.8	67.1 ± 2.3 ^a	89.3 ± 1.6 ^a
4 : 1 : 0.6	66.6 ± 5.3 ^a	85.8 ± 5.4 ^a
4 : 1 : 0.4	63.8 ± 0.6 ^a	84.3 ± 2.5 ^a

Treatment conditions ; Mixing time : 30 min, Mixing temperature 60°C,
NaCl conc., : 10% to egg yolk,

A : Column means with the same letter are not significantly different (P < 0.05)

한편 대두유 및 난황의 비율은 4 : 1로 일정하게 하고 증류수의 비율은 난황의 0.8, 0.6 및 0.4로 하였을 때는 콜레스테롤 제거율은 67.1, 66.6 및 63.8%를 나타내었으며 잔존 고형성분은 각각 87.3, 84.3%를 나타내었다. 이는 Kijowsk 와 Lombardo⁽¹³⁾에 의해 실시된바 있는 대두유의 비율과 처리 온도를 변화시켰을 때 난황으로 부터 71.6~84.6%의 콜레스테롤을 제거한 결과에 미치지 못하는 결과이지만, 상기의 보고 내용에는 난황액의 회수량 혹은 잔존고형성분의 양이 표시되어 있지 않아 실제 제거된 콜레스테롤의 양은 불명확한 것으로 판단되며, 이상의 실험 결과를 토대로 대두유의 양을 적게 사용하고도 콜레스테롤 제거 효과가 비교적 좋은 대두유 : 난황 : 증류수 = 2 : 1 : 0.4의 혼합비율과 콜레스테롤 제거 효율이 가장 좋은 4 : 1 : 0.8의 혼합 비율에서 premixture의 pH 변화에 따른 콜레스테롤 제거에

미치는 영향(Table 4)과 첨가되는 salt(염화나트륨)의 양에 따른 콜레스테롤 제거 효과에 미치는 영향(Table 5)을 살펴보았다.

Table 4에 나타낸 바와 같이 pH 4.0 이하에서는 콜레스테롤 제거시 emulsion을 형성하여 분리가 불가능하였으며, pH가 낮을 수록 콜레스테롤 제거율은 저하되었다. 또한 잔존 고형성분이 많아지는 것으로 보아 pH 저하로 인하여 일부 유화가 진전되어 난황층과 기름층이 분리가 잘 이루어지지 않는다는 것을 알 수 있었다. 따라서 콜레스테롤 제거시에는 신선란의 pH를 변화시키지 않고 중성부근의 pH에서 처리하는 것이 콜레스테롤 제거에 유리하다는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 낙화생유를 이용하여 난황과 난황분으로부터 콜레스테롤을 제거할 때 pH를 저하시킨 군이 저하시키지 않은 군에 비하여 4~5%의 콜레스테롤 제거효과가 좋았던 Bracco⁽¹²⁾의 결과와 상반되는데, 이는 사용한 식물성유지의 종류가 다르고 pH 조정제의 첨가수준과 방법 등의 차이에 따른 결과로 판단되며 더욱 세밀한 검토가 필요하다.

Table 5에 나타낸 바와 같이 대두유 : 난황 : 증류수의 혼합 비율이 4 : 1 : 0.8에서 염화나트륨을 첨가하지 않았을 때 54.6%이던 것이 난황 중량의 5%를 첨가하면 63.5%, 10% 첨가시 68.5%로 콜레스테롤 제거효율이 좋아짐을 알 수 있었고 잔존 고형성분의 양은 salt의 첨가량이 많을 수록 점차 감소됨을 알 수 있었다. 이러한 결과는 대두유 : 난황 : 증류수의 혼합 비율이 2 : 1 : 0.4에서도 유사한 경향을 나타내었는데 난황의 유효 영양성분에 손실을 고려하여 염화나트륨의 첨가량은 10% 내외로 한정하는 것이 바람직하다고 판단된다.

Table 4. Effect of pH on cholesterol removal of liquid egg yolk by soybean oil.

S.O : E.Y : D.W. (W/W/W)	pH	Cholesterol reduction(%)	Solid residue(%)
2 : 1 : 0.4	4.0	Formation of emulsion	
	5.0	56.7 ± 4.6 ^a	120.3 ± 7.6 ^a
	6.0	62.2 ± 2.0 ^a	101.6 ± 4.8 ^a
	6.6	60.2 ± 1.4 ^a	95.2 ± 1.4 ^a
4 : 1 : 0.8	4.0	Formation of emulsion	
	5.0	67.1 ± 2.3 ^a	89.3 ± 1.6 ^a
	6.0	66.6 ± 5.3 ^a	85.8 ± 5.4 ^a
	6.6	63.8 ± 0.6 ^a	84.3 ± 2.5 ^a

S.O., soybean oil ; E.Y., egg yolk ; D.W., distilled water

Treatment conditions ; Mixing time : 30min, Mixing temperature : 60°C, NaCl conc. : 10% to egg yolk

a, b : Column means with the same letter are not significantly different (P < 0.05)

Table 5. Effect of salt on cholesterol removal of liquid egg yolk by soybean oil.

S.O. : E.Y. : D.W.	NaCl(% to E.Y.)	Cholesterolreduction(%)	Solid residue(%)
2 : 1 : 0.4	0	35.5±2.9 ^b	132.0±1.6 ^b
	5	50.5±2.1 ^{ab}	107.2±2.2 ^a
	10	57.3±1.4 ^a	101.5±1.1 ^a
4 : 1 : 0.8	0	54.6±1.6 ^b	116.6±1.4 ^a
	5	63.5±2.8 ^{ab}	94.9±3.2 ^{ab}
	10	68.5±3.0 ^a	85.8±1.5 ^b

Treatment conditions ; Mixing time : 30min, Mixing temperature : 60°C

A, B : Column means with the same letter are not significantly different (P < 0.05)

이상과 같은 식물성기름(대두유)를 사용하여 난황으로부터 콜레스테롤을 제거하는 방법은 기존의 유기용매를 사용하여 콜레스테롤을 추출한 후 다시 잔류유기용매를 회수하는 용매 추출법^(18, 19)에 비하여 간단하면서도 비교적 높은 콜레스테롤 제거효과를 나타내며, 인체에 유해시비가 없는 유효한 방법이라 사료된다.

제 4 절 참고 문헌

1. Bogin, E. : Low cholesterol eggs. Processing of the 4th European symposium on the quality of eggs products. 97(1991)
2. NRC. Diet and Health : Implications for reducing chronic disease risk. Report of the Committee on Diet and Health, Feed and Nutrition Board. National Academy Press. Washington, D. C. (1989)
3. Anitschkow, N. N. : A history of experimentation on arterial atherosclerosis in animal. In : Blumental, H. T. (ed) : Cowdeys arteriosclerosis : A survey of the problem(cd 2), 21. Springfield, Thomas(1967)
4. Masiromi, R. : Dietary factors and coronary heart disease. Bull. WHO, 42:103(1970)
5. Wissler, R. : The Myocardium: failure and infarction. H. P. Pub. Co., N. Y.(1974)
6. Gordon. T., W. P. Castell and M. C. Hjortland. : High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease : The Framingham study: Summary. Am. J. Med. 62:707(1977)
7. Lippel, K., H. A. Tyroler and H. Eder. : Meeting summary : relationship of hypertriglyceridemia to atherosclerosis. Atherosclerosis. 1: 406(1981)

8. O'Brien, B. C. and K. Reiser. : Human plasma lipid responses to red meat, poultry, fish and eggs. *Am. J. Clin. Nutr.* 33 : 2578(1980)
9. Flaim, E., L. F. Ferreri, F. W. Thye, J. E. Hill and S. J. Ritchey. : Plasma lipid and lipoprotein cholesterol concentrations in adult males consuming normal and high cholesterol diets under controlled condition. *Am. J. Clin. Nutr.* 54:1103(1981)
10. Oh, S. Y. and L. T. Miller. : Effect of dietary egg on variability of plasma cholesterol levels and lipoprotein cholesterol. *Am. J. Clin. Nutr.* 42:421(1985)
11. McNamara, D. J. : Heterogeneity of cholesterol homeostasis in man. *J. Clin. Invest.* 79(6):1729(1987)
12. Bracco, U. and J. L. Viret. : Decholesterization of egg yolk. U. S. Pat. 4,333,959.(1982)
13. Kijowski, M. and S. P. Lombardo : Extraction of cholesterol from egg yolk. JP. Pat. 6,504,665.(1994)
14. SAS/STAT user's guide. Release 6.03 edition SAS institute Inc., Cary. NC. USA.(1988)
15. Duncan, D. B. : Multiple range and multiple F test, *Biometrics.* 11:1(1955)
16. Conte Jr., J. A., B. R. Johnson, R. J. Hsieh and S. S. Ko. : Method for removing cholesterol from eggs. U. S. Pat. 5,091,203.(1992)
17. 浅野悠輔, 石原良三 : 卵 -その化学と加工技術-, KOHRIN THCHNO-BOOKS 3, p. 121(1985)
18. Melnick, D. : Low cholesterol dried egg yolk and process. U. S. Pat. 3,563,765.(1971)
19. Yano, N., I. Fukinbara, K. Yoshida and Y. Wakuyama. : Decholesterolized and defatted egg powder and method producing same. U. S. Pat. 4,234,619(1980)

제 3 장 난황액의 pH 및 pH 조정제가 대두유를 이용한 난황콜레스테롤의 제거효율에 미치는 영향

제 1 절 서 설

전란의 모든 콜레스테롤과 지방은 lipoprotein의 형태로써 단백질과 결합되어 난황에 존재하며 난황 지질의 주요성분은 중성지방, 인지질 및 콜레스테롤이다⁽¹⁾. 계란 1개에 함유되어 있는 콜레스테롤 함량은 평균 272mg⁽²⁾으로 난황을 통한 콜레스테롤 섭취가 혈중 콜레스테롤을 높이며 심장질환 및 동맥경화를 일으킬 수 있는 요인이 될 수 있다⁽³⁾는 개념 때문에 콜레스테롤을 낮추려는 시도가 이루어져 왔다.

난황중의 콜레스테롤을 제거하기 위한 방법 중의 하나인 식물성유지를 사용하는 방법은 유화방지제로써 일정량의 물을 첨가함과 동시에 가운하여 유화상태를 불안정화 시킨 후 식물성유지를 첨가하여 빠른 속도로 교반하고 원심분리하면 난황층과 기름층으로 분리되는 과정에서 난황액중의 콜레스테롤이 기름층으로 이동하게 되므로써 난황액에서 콜레스테롤을 제거할 수 있는 방법이다^(4, 5). Stouffer 등(1994)⁽⁶⁾은 식물성유지를 사용하여 난황으로부터 70~80%의 콜레스테롤을 제거하였다. 미세한 분산상을 만들기 위하여 사용되는 식물성유로는 옥수수유, 잇꽃유, 대두유, 참깨유, 해바라기씨유, 면실유, 쌀겨유, 포도씨유, 호박씨유, 낙화생유 등 매우 다양하다. 식물성유지를 이용하는 방법의 장점은 n-hexane을 사용하여 난황분으로부터 콜레스테롤을 95%이상 제거한 용매추출법⁽⁷⁾과는 달리 유기용매를 사용하지 않아도 되며 따라서 잔류유기용매의 회수문제와 인체에 대한 유해여부를 걱정하지 않아도 된다는 것이다⁽⁸⁾.

난황에 식물성유지를 첨가하기 전에 난황의 pH를 낮추면 난황의 불안정화 뿐만 아니라 점도를 낮추어 원심분리시 pH의 저하 이전 보다 콜레스테롤 추출이 용이해지며⁽⁹⁾, pH 조정을 위한 염의 첨가는 lipoprotein 복합

체를 불안정화 시키고 용액의 점도를 감소시키며 계란 중 단백질의 용해성을 증가시킨다⁽¹⁰⁾.

Bracco 등(1982)⁽⁴⁾은 난황에 hydrochloric acid나 phosphoric acid 같은 산을 첨가하여 pH를 낮추고 난황의 3~5배의 식용유지를 첨가하면 신선한 난황의 pH에서 콜레스테롤 함량은 1.24%이었으나 pH를 5.65로 낮추면 0.25%로 감소하였고 pH 3이하는 좋지 않았으며 pH 4~6사이가 좋다고 보고하였다.

본 시험에서는 난황중의 콜레스테롤을 제거하기 위하여 식물성유지 중 대두유를 사용하고, 난황액의 pH 조정제로서 1N NaOH 또는 1N KOH를 사용하여 난황의 pH를 알칼리 영역으로 조정하고, 대두유를 첨가하여 빠른 속도로 교반함으로써 난황층과 기름층의 분리를 유도하여 난황액의 pH가 콜레스테롤 제거율에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 공시재료

본 시험에서는 K축산의 위생란을 구입하여 사용하였다. 할란 후 난황을 300 μ m의 sieve를 통과시켜 난황막 및 알끈을 제거하여 콜레스테롤 추출을 위한 시료로서 사용하였다. 공시재료 난황액의 평균 콜레스테롤 함량은 1240mg%이었으며 pH는 6.34이었다.

2. 난황액의 pH 조정 및 콜레스테롤 제거

유 등(1997)⁽¹¹⁾의 방법에 따라 대두유를 사용하여 난황액에서 콜레스테롤 제거를 실시하였다. 난황액 중량(20g)에 대하여 대두유 : 난황 : 증류수의 비가 2 : 1 : 0.4가 되도록 하였다. 우선 난황액에 대두유를 첨가하기 전에 시료에 대한 pH 조정제로서 1N NaOH 또는 1N KOH를 첨가하여 난황액의 pH를 7, 8, 9 및 10으로 조정한 후 처리구별 시료량의 변화는 증류수

로 보정하고 혼합하였다. 이 premixture에 미리 60℃로 가온한 대두유를 첨가하고 8,000rpm(IKA-Labortechnik, ultra-turrax T25, Germany)으로 15분간 교반하였다.

이를 분액여두에 방치하여 두면 위의 기름층과 아래의 난황층으로 분리되었다(Fig. 1)아래의 난황층을 회수하여 콜레스테롤 함량 및 잔존고형분 함량을 측정하였다.

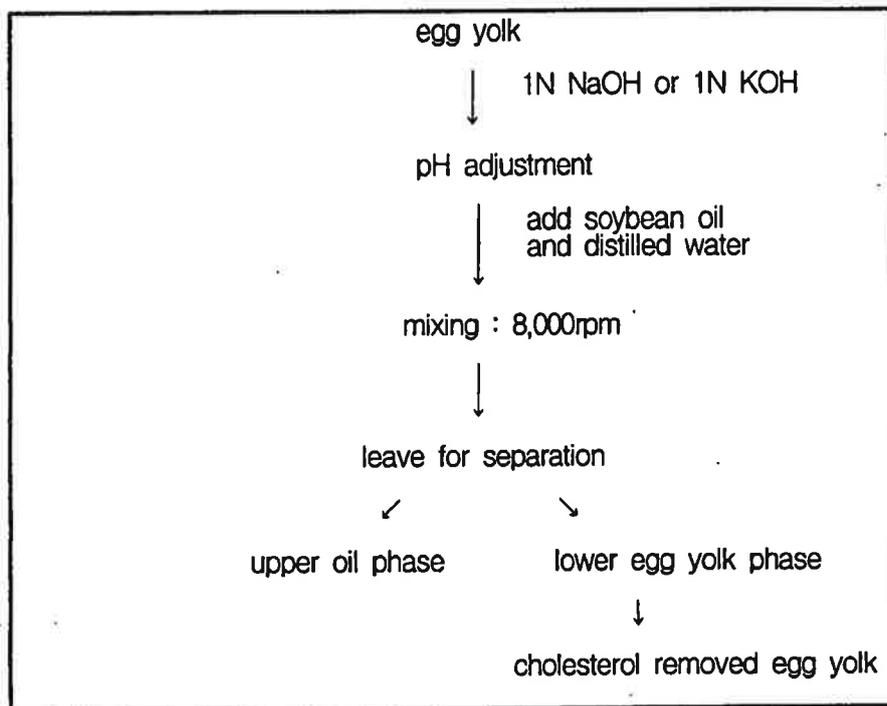


Fig 1. Schematic diagram showing the pH adjustment and removal of cholesterol from liquid egg yolk.

3. 콜레스테롤 분석

난황 및 처리된 시료의 콜레스테롤 측정은 Boehringer Mannheim사의 정량 kit(Cat. No. 139050, Germany)을 사용하여 실시하였다. 시료에

methanolic potassium hydroxide와 isopropanol을 첨가하여 가열, 여과 후 일정량의 시료를 catalase와 acetylacetone 및 ammonium phosphate buffer(pH 7.0)와 혼합한 후 전체 용액을 2개의 시험관에 분주하고 한 쪽에는 cholesterol oxidase를 첨가하여 40℃에서 1시간 동안 incubation한 후 405nm에서 흡광도(Jasco spectrometer UVDEC-610, 일본분광공업주식회사, 동경, 일본)를 측정하여 콜레스테롤을 정량하였다.

4. 통계분석

실험 data 분석은 통계분석용 SAS program⁽¹²⁾을 사용하여 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan의 다중검정으로⁽¹³⁾ 비교 분석 하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

난황에 염산이나 인산 등을 첨가하여 pH를 낮추어 유화상태를 불안정화시킨 후에 미세한 분산상을 만들기 위하여 대두유를 첨가하여 원심분리하는 방법 등으로 난황층과 기름층을 분리하여 난황층의 콜레스테롤이 기름층으로 옮겨가 저콜레스테롤 난황을 얻을 수 있는 방법⁽⁴⁾을 응용하여 본 연구에서는 1N NaOH 또는 1N KOH를 사용하여 난황액의 pH를 알칼리 영역으로 증가시켰을 때의 pH가 콜레스테롤 제거율에 미치는 영향을 알아보았다.

Table 1에 나타낸 바와 같이 난황액에 1N NaOH를 첨가하여 난황액의 pH를 증가시키면 콜레스테롤 제거율도 증가하여 pH 9에서 콜레스테롤 제거율이 74%로서 콜레스테롤 제거효과가 좋았고 이 때의 잔존고형분함량은 57.94%이었다. 그러나 난황액의 pH 10에서는 pH 증가에 따른 콜레스테롤 제거율은 다소 감소하였다. 잔존고형분함량도 pH 9 이상에서 감소하였다.

Table 1. Changes of cholesterol reduction and solid residue on removal cholesterol with soybean oil and distilled water from liquid egg yolk at various pH levels adjusted with 1N NaOH.

pH	Consumed amount of NaOH(ml)	Cholesterol reduction(%)	Solid residue(%)
control(6.34)	0 ^e	61.15±0.55 ^c	66.48±0.11 ^b
7	0.44±0 ^d	71.33±0.32 ^b	68.39±0.06 ^a
8	0.70±0 ^c	70.45±1.05 ^b	68.32±0.04 ^a
9	1.25±0 ^b	74.00±2.05 ^a	57.94±0.15 ^c
10	2.00±0 ^a	71.10±0.50 ^b	53.27±0.32 ^d

^{a~e} : Means with the same letter in the same column are not significantly different(p<0.05).

또한 pH 조정제로서 1N KOH를 사용하였을 때의 콜레스테롤 제거율은 Table 2에 나타낸 바와 같이 난황액의 pH가 증가하면 콜레스테롤 제거율도 증가하여 pH 9일 때의 콜레스테롤 제거율이 86.76%로서 높았으며 잔존고형성분함량은 64.46%이었다. Table 1의 실험결과에서와 마찬가지로 난황액의 pH 10에서는 오히려 콜레스테롤 제거율이 낮아졌는데 이는 난황층과 기름층의 분리가 잘 이루어지지 않았기 때문이라고 사료되었다. 잔존고형성분의 함량은 pH 증가에 따라 유의적인 차이(P<0.05)가 없었다.

Bracco(1982) 등⁽⁴⁾은 난황액에 산을 첨가하여 pH를 낮추면 유화안정성이 깨지고 점도가 낮아지고, 난황층과 기름층의 분리가 잘 이루어져 콜레스테롤이 기름층으로 전이되기 쉬운 상태로 되어 난황액에 산을 처리하여 pH를 저하시키면 79.84%~89.25%의 콜레스테롤이 제거되었다고 보고하였다. Conte 등(1992)⁽⁹⁾은 염을 첨가하면 난황단백질의 점도가 감소하고 lipoprotein의 안정성이 깨져 콜레스테롤을 제거하기 쉬운 상태로 된다고

하였다. 또한 Lombardo 등(1994)⁽¹⁴⁾은 oil in water emulsion 형성 전에 산이나 염을 첨가하면 이 혼합물은 산을 포함하게 되고, 산이나 염이 빠르게 기름방울을 작게 부수는데 이용되어 유화가 깨져 콜레스테롤이 쉽게 추출될 수 있는 상태가 된다고 하였다. 난황의 pH를 증가시켜도 점도가 낮아져 난황층과 기름층의 분리가 잘 이루어져 콜레스테롤 제거율이 증가하였다고 사료되었다.

Table 2. Changes of cholesterol reduction and solid residue on removal cholesterol with soybean oil and distilled water from liquid egg yolk at various pH levels adjusted with 1N KOH.

pH	Consumed amount of KOH(ml)	Cholesterol reduction(%)	Solid residue(%)
control(6.34)	0 ^e	61.15±0.55 ^d	66.48±0.11 ^{ab}
7	0.50±0 ^d	70.30±1.00 ^c	65.58±0.67 ^{ab}
8	0.95±0 ^c	80.06±0.70 ^b	67.69±3.17 ^a
9	1.38±0 ^b	86.76±1.67 ^a	64.46±0.09 ^{ab}
10	2.20±0 ^a	77.10±2.10 ^b	61.27±0.17 ^b

^{a-e} : Means with the same letter in the same column are not significantly different(p<0.05)

이상의 결과에서 pH 조정제의 사용에 있어서 난황액의 pH를 9로 조정하는데 1N KOH의 소모량이 1N NaOH 보다 난황 20g 당 1.25ml와 1.38ml로서 다소 많기는 하나 1N KOH를 사용하는 것이 콜레스테롤 제거효율과 잔존고형분함량 면에서 효율적이었다.

난황액의 pH를 알칼리로 상승시키고 대두유와 증류수의 첨가비율에 대한 영향을 알아보기 위하여 pH 조정제로서 1N NaOH를 사용하고 난황액

의 pH가 9로 하였을 때 대두유와 증류수의 첨가비율에 따른 콜레스테롤 제거율을 Table 3에 나타내었다. Conte 등(1992)⁽⁹⁾은 해바라기씨유를 사용하여 mixing temperature는 70℃ 이하, 교반시간은 15분이었을 때 식물성 기름을 500g 사용하였을 때의 콜레스테롤 제거율은 83%이었고, 사용하는

Table 3. Effect of soybean oil, liquid egg yolk and distilled water ratio on cholesterol reduction and solid residue at pH 9 adjusted with 1N NaOH

Soybean oil : liquid egg yolk : distilled water (W/W/W)	Cholesterol reduction(%)	Solid residue(%)
2 : 1 : 0.8	76.68±1.74 ^{bc}	65.09±2.26 ^{bc}
2 : 1 : 0.6	75.02±1.51 ^d	62.00±1.47 ^c
2 : 1 : 0.4	77.56±1.33 ^{cd}	63.84±1.37 ^{bc}
3 : 1 : 0.8	84.38±0.17 ^a	69.02±1.57 ^{ab}
3 : 1 : 0.6	81.65±0.67 ^{ab}	68.56±0.01 ^{ab}
3 : 1 : 0.4	78.38±1.17 ^{bcd}	67.42±0.34 ^{ab}
4 : 1 : 0.8	79.42±0.61 ^{bc}	68.26±1.77 ^{ab}
4 : 1 : 0.6	80.40±0.95 ^{bc}	70.45±0.77 ^{ab}
4 : 1 : 0.4	79.62±1.48 ^{bc}	72.18±1.72 ^a

^{a-d} : Means with the same letter in the same column are not significantly different($p<0.05$)

기름의 양을 1,000g과 2,000g으로 증가시켰을 때의 콜레스테롤 제거율은 각각 86%와 87%로서 증가하였는데 사용하는 식물성유지의 사용량이 적으면 분리되는 난황층이 적어 콜레스테롤 제거율이 저하되었다고 보고하였으며 이 결과와 같이 대두유의 첨가비율을 증가시키면 콜레스테롤 제거율도

증가함을 볼 수 있었고 난황액 중량에 대하여 대두유 : 난황 : 증류수의 비가 3 : 1 : 0.8 이었을 때 콜레스테롤 제거율이 84.38%로서 높았으며 이는 신선 난황액에 대하여 증류수의 혼합비율이 높을수록 콜레스테롤 제거효율이 향상되었다는 유 등(1997)⁽¹¹⁾의 보고에 일치하는 결과이었다. 이 때의 잔존고형분함량은 69.02%이었다. 잔존고형분은 대두유의 첨가비율이 증가할수록 다소 증가하기는 하나 유의차($P < 0.05$)가 크지 않았다.

또한 pH 조정제로서 1N KOH를 사용하고 난황액의 pH를 9로 하였을 때 대두유와 증류수의 첨가비율에 따른 콜레스테롤 제거율은 Table 4에서 나타낸 바와 같다. 대두유와 난황의 비율은 3 : 1로 일정하게 하면서 증류수의 비율을 0.8과 0.6으로 하였을 때의 콜레스테롤 제거율이 87.99%와 85.86%로 높았으며 그 이상의 대두유 첨가는 유의적인 차이($P < 0.05$)가 없었다. 잔존고형성분은 대두유 : 난황 : 증류수의 비가 3 : 1 : 0.8이었을 때 76.33%이었고 대두유의 첨가 비율이 증가할수록 잔존고형분함량은 증가하였다.

이상의 결과에서 pH 조정제가 1N NaOH 또는 1N KOH를 사용할 경우 마찬가지로 대두유 : 난황 : 증류수의 비가 3 : 1 : 0.8이었을 때 콜레스테롤 제거율이 각각 84.38%, 87.99%로서 가장 높았고, 잔존고형분의 함량도 각각 69.02%와 76.33%로서 pH 조정제로 1N KOH를 사용하는 것이 콜레스테롤을 제거하는 데 효과적이라고 사료되었다. 또한 pH 조정제로서 1N KOH를 사용하는 경우 대두유 : 난황 : 증류수의 비가 2 : 1 : 0.4일 때에 콜레스테롤 제거율이 84.38%로서 대두유 사용의 경제적인 면을 고려한다면 대두유 : 난황 : 증류수의 비를 2 : 1 : 0.4로 하는 것도 가능할 것으로 사료되었다.

Table 4. Effect of soybean oil, liquid egg yolk and distilled water ratio on cholesterol reduction and solid residue at pH 9 adjusted with 1N KOH

Soybean oil : liquid egg yolk : distilled water (W/W/W)	Cholesterol reduction(%)	Solid residue(%)
2 : 1 : 0.8	82.50 ± 0.00 ^{ab}	65.09 ± 2.26 ^f
2 : 1 : 0.6	78.00 ± 3.51 ^b	64.44 ± 0.19 ^g
2 : 1 : 0.4	84.38 ± 1.11 ^{ab}	68.32 ± 0.01 ^e
3 : 1 : 0.8	87.99 ± 0.16 ^a	76.33 ± 0.09 ^c
3 : 1 : 0.6	85.86 ± 1.17 ^a	75.02 ± 0.05 ^d
3 : 1 : 0.4	81.00 ± 1.18 ^{ab}	75.69 ± 0.02 ^d
4 : 1 : 0.8	81.23 ± 4.35 ^{ab}	79.70 ± 0.05 ^b
4 : 1 : 0.6	84.89 ± 0.59 ^{ab}	76.51 ± 0.01 ^c
4 : 1 : 0.4	84.34 ± 1.48 ^{ab}	80.67 ± 0.01 ^a

^{a-g} : Means with the same letter in the same column are not significantly different(p<0.05)

제 4 절 참고문헌

1. Chung, S. L. and Ferrier, L. K. : Partial lipid extraction of egg yolk powder : The effects on emulsifying properties and soluble protein fraction. *J. Food Sci.*, **56**, 1255 (1991).
2. Bogin, E. : Low cholesterol eggs. Proceeding of the 4th European symposium on the quality of eggs products. 97 (1991).
3. Lippel, K., Tyroler, H. A. and Eder, H. : Relationship of hypertriglyceridemia to atherosclerosis. *Atherosclerosis*, **1**, 406 (1981).

4. Bracco, U. and Viret, J. L. : Decholesterization of egg yolk. *U.S. Patent 4 333, 959*(1982).
5. Kijowsk, M. and Lombardo, S. P. : Extraction of cholesterol from egg yolk. *Japanes Patent 6 504, 655* (1994).
6. Stouffer, S. C., and Majeres, L. J. : Method for extracting cholesterol from egg yolk. *U.S. Patent 5 316, 780* (1994).
7. Yano, N., Fukinbara, I., Yoshida, K. and Wakuyama, Y. : Decholesterolized and defatted egg powder and method producing same. *U.S. Patent 4 234, 619* (1980).
8. 이복희, 유익중, 강통삼 : 계란콜레스테롤 함량 조절 기술에 관한 고찰. *한국가금학회지*, 20, 217 (1993).
9. Conte, Jr. J. A., Johnson, B. R., Hsieh R. J. and Ko, S. S. : Method for removing cholesterol from eggs. *U.S. Patent 5 091, 203* (1992).
10. Chung, S. L. and Ferrier, L. K. : pH and sodium chloride effects on emulsifying properties of egg yolk phosvitin. *J. Food Sci.*, 57, 40 (1992).
11. 유익중, 지중룡, 김현수, 박우문, 전기홍 : 대두유를 이용한 난황의 콜레스테롤 제거. *한국축산식품학회지*, 17, 6 (1997).
12. Stephenie, P. J. : SAS/SAT™ Guide for personal computers, Version 6 Edition, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. P. 58 (1985).
13. Duncan, D. B. : Multifl range and F test, *Biometrics*, 11, 1 (1995).
14. Lombardo, S. P. and Kijowski, M. : Reduction of cholesterol in egg yolk by the addition of either acid or both salt and acid. *U.S. Patent 5 312, 640* (1994).

제 4 장 초임계 이산화탄소에 의한 난황분으로 부터의 콜레스테롤 추출

제 1 절 서 설

계란은 양질의 단백질, 비타민, 무기질을 함유하고 있고, 용이한 소화도, 저렴한 단백질 가격, 우수한 향미, 다양한 부재료로의 용도로 인하여 완전식품임으로 알려져 있다. 그러나 계란에 다량 함유되어 있는 포화지방산과 콜레스테롤이 관상성 심장병 및 고지혈증 등의 발병에 한 요인으로 작용한다는 각종 역학적 연구가 발표되고 있고(1, 2), 또한 American Heart Association에서도 이와 같은 질병의 예방을 위해서는 하루에 섭취하는 콜레스테롤량을 300 mg 이하로 권장하고 있음에(3) 따라 계란의 소비량은 감소 추세에 있다.

이를 극복하기 위하여 계란 중의 콜레스테롤 함량을 낮추는 기술이 개발되고 있는데, 이에는 사료의 조성을 변화시켜준다든지, 콜레스테롤의 흡수, 배설 및 합성과정을 저해시키는 약물을 닭에게 투여하므로써 저콜레스테롤 계란을 생산하는 사양학적인 방법(4)과 계란을 흡착제, 효소, 유기용매 등으로 처리하여 콜레스테롤을 제거하는 물리, 화학적 방법(5~8)이 있다. 그런데 물리, 화학적 방법은 콜레스테롤 제거율이 낮음은 물론 계란의 극성 지질인 인지질도 제거하며, 단백질을 변성시키므로써 계란의 기능적, 관능적 성질을 저해하는 문제점이 있다. 특히 유기용매로 추출하면 지방으로부터 콜레스테롤을 선택적으로 제거하기 어렵고, 유기용매의 잔류가능성이 높으며, 사용용매의 가격이 비싸다는 단점을 가지고 있다. 따라서 계란중의 콜레스테롤만 선택적으로 제거하면서 기능성과 관능적 성질을 변화시키지 않는 기술의 개발이 시급하다. 이 때 고려할 사항으로는 계란중의 protein fragmentation과

oligomerization에 관여하는 효소의 열변성 온도는 중성과 알칼리성 pH에서 lysozyme은 약 75℃이고, ribonuclease는 약 60℃이므로(9) 단백질 변성을 방지하기 위해서는 가능한 저온에서 가공하여야 한다. 또한 계란중의 인지질이 제거되지 않는 추출방법이 바람직하다.

초임계유체는 식품으로부터 콜레스테롤을 선택적으로 추출하는데 이용되어 왔다(10, 11). 콜레스테롤 분자는 free hydroxy group을 가지고 있으므로 지방에 비하여 비교적 극성을 띠며, 분자량이 두배 이상 크기 때문에 지방으로부터 선택적으로 제거될 수 있다. 초임계유체 추출은 한 단계로(one-step extraction and separation) 지방과 콜레스테롤을 추출할 수 있고, 지방을 지방산 조성이 다른 분획으로 분별할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 또한 초임계유체는 온도가 낮을 수록 밀도가 높아 추출에 용이하므로, 계란을 단백질 변성에 관여하는 효소의 열변성 온도보다 저온에서 초임계 이산화탄소로 가공할 경우 단백질 변성을 방지할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 인지질은 극성인 반면 추출용매인 이산화탄소는 비극성이므로 인지질이 계란으로부터 추출되지 않고 추출잔류물에 남아있을 것으로 기대된다.

한편 계란으로부터 콜레스테롤을 추출할 때 시료로서 전란이나 난황액보다는 수분이 적은 난황분이 유리한데, Novak 등(12)은 난황액을 35℃/241 bar에서 추출하였을 때 추출 과정 중 난황액 일부가 응고되었는데, 이는 난황으로부터 계란유와 수분이 추출됨에 따라 추출잔류물의 점도가 증가되어 결국 잔류되어 있는 단백질과 인지질이 응고되었거나, 또는 초임계 이산화탄소가 계란 단백질의 겔화 또는 변성을 일으키기 때문인 것으로 추정하고 있다.

따라서 본 연구는 난황분을 초임계 이산화탄소로 40~60℃, 207~345 bar, 1~3시간 추출하여 난황 지방과 콜레스테롤의 용해도, 선택도 및 추출잔류물의 색도, 지방산조성을 측정하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 시험재료

본 실험에 사용한 난황분은 Canadian Inovatech Inc.(Abbotsford, Canada) 제품으로 입자크기는 100 mesh 이하였고, 수분함량은 4.5%였다.

2. 초임계 이산화탄소에 의한 난황분의 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.

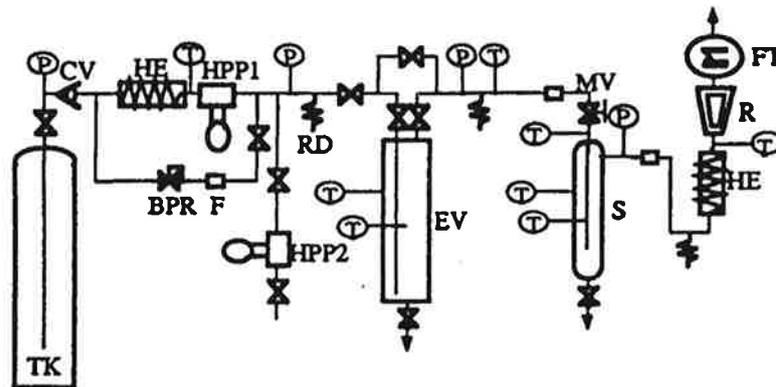


Fig. 1. Flow diagram of supercritical fluid extraction system.

(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).

먼저 추출조(EV)의 뚜껑을 열고 난황분 20g를 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. 일정 압력과 온도에서 정상상태로 유지시킨 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.

실험변수로 추출온도는 40~60℃, 압력은 207~345 bar, 추출시간은 1~3시간이었고, 이산화탄소의 유속은 4 l/min 였다. 일정 온도, 압력 조건에서 일정 시간 동안 추출한 후 추출되지 않고 잔류되어 있는 난황분 추출잔류물을 수거하여 칭량한 후 콜레스테롤 함량, 색도, 지방산 조성을 측정하였다.

3. 콜레스테롤 분석

추출잔류물의 콜레스테롤 함량은 cholesterol oxidase 방법(13)을 이용하여 측정하였다.

4. 색도 측정

추출잔류물의 색깔은 색차계(color and color difference meter, model TC-1, Tokyo Denshoku Co., LTD, Japan)로 측정하여 L(명도), a(적녹도), b(황청도) 값으로 나타내었다.

5. 지방산 분석

추출잔류물의 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 200℃를 유지하였다. 검출기는 FID를 사용하였고, 주입구 및 검출기의 온도는 250, 300℃로 유지하였다. 운반기체로서 질소가스는 split ratio를 1:100으로 주입하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 이산화탄소의 밀도에 따른 난황 지방과 콜레스테롤의 용해도

Fig. 2는 난황분을 여러 온도와 압력에서 한시간 동안 추출하였을 때 이산화탄소의 밀도에 따른 난황 지방과 콜레스테롤의 용해도를 나타내고 있다. 초임계 이산화탄소에 대한 지방과 콜레스테롤의 용해도는 이산화탄소의 밀도 증가에 따라 증가하였는데, 이는 일반적으로 용해도는 이산화탄소의 밀도에 비례하여 증가하기 때문이다(10, 11). 추출압력 207 bar에서 추출온도를 40(밀도: 0.852 g/cm³), 50(0.798), 60℃(0.738)으로 달리하였을 때 용해도는 서서히 증가하였으나, 추출온도 40℃에서 추출압력을 276(0.905), 345 bar(0.940)로 달리하였을 때 용해도는 급격히 증가하였다. 이로 보아 난황 지방과 콜레스테롤의 용해도는 추출온도보다는 추출압력에 의하여 크게 좌우되는 것으로 판명되었다. Shishikura 등(14)도 유지방의 용해도를 측정한 결과 40℃/150 bar에서 0.41%(wt/wt)였지만 추출압력을 300 bar로 2배 증가시켰을 때 1.88%로 4.6배 증가하였다고 보고하였다.

지방과 콜레스테롤의 용해도 증가 현상을 비교하여 보면 이산화탄소의 밀도 0.852 g/cm³을 기점으로 다르게 나타났는데, 저밀도 영역에서는 콜레스테롤의 용해도가 지방의 용해도 보다 높다가, 고밀도 영역에서는

거의 유사하게 증가하는 현상을 보였다. 이는 저밀도의 이산화탄소에 용해되는 저급지방산에 대하여 콜레스테롤의 친화도가 높아 선택적으로 많이 추출되다가, 고밀도에서는 이산화탄소의 높은 용해 능력으로 인하여 지방과 콜레스테롤이 동시에 많이 추출되었기 때문이다. 따라서 추출물의 상대적 콜레스테롤 농도는 추출온도의 증가에 따라 증가하였고, 추출압력의 증가에 따라 감소하였다.

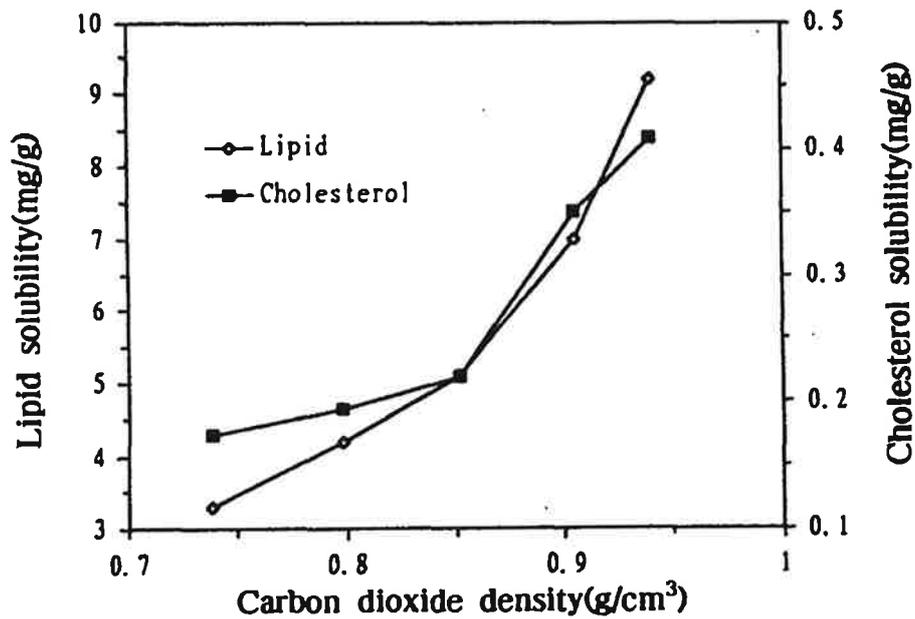


Fig. 2. Solubility of lipid and cholesterol in egg yolk as a function of CO₂ density.

난황을 이산화탄소의 밀도 0.738, 0.798, 0.852, 0.905, 0.940 g/cm³에서 추출하였을 때 추출잔류물의 수율은 각각 92.6, 90.6, 88.5, 84.3, 79.2%였으며, 콜레스테롤 제거율은 각각 11.9, 12.3, 13.2, 25.4, 28.5%로, 이산화탄소의 밀도 증가에 따라 추출잔류물의 수율은 감소된 반면 콜레스테롤 제거율이 증가하였는데, 이는 용해도 증가에 따라 지방과 콜레스테롤이 많이 추출되었기 때문이다. Bulley와 Labay(15)도 난황분을 360 bar에서 추출온도를 75℃에서 55℃로 감소시켰을 때 즉 이산화탄소의 밀도를 증가시켰을 때 난황분의 용해도는 1.45배 증가하였다고 보고하였다.

3. 추출온도에 따른 콜레스테롤의 선택도

추출공정에서 분리효율을 극대화하기 위하여 선택도(selectivity)라는 개념이 도입되는데, 선택도는 분리 대상이 되는 두성분의 추출물과 추출잔류물에서의 농도 비로 나타낸다. Fig. 3은 추출압력 207 bar에서 추출온도에 따른 이산화탄소에 대한 콜레스테롤의 선택도를 나타내고 있다. 동일 압력에서 추출온도의 증가에 따라 선택도가 증가하였는데, 이는 온도 증가 즉 밀도 감소에 따라 콜레스테롤에 비하여 지방의 용해도가 상대적으로 감소하였기 때문이다.

Lim과 Rizvi(11)도 추출 온도와 압력을 달리하여 유지방을 추출하였을 때 고온과 저압 즉 저밀도의 이산화탄소에 대하여 콜레스테롤의 선택도가 높았다고 보고하였고, Majewski 등(16)도 이산화탄소에 대한 유지방의 콜레스테롤 선택도는 온도 증가에 따라 증가하였다고 보고하였다. 본 연구에서는 추출온도와 압력이 60℃/207 bar에서 선택도가 2.83였다. Krukonis(10)도 버터중의 콜레스테롤의 이산화탄소에 대한 선택도는 60℃/150 bar 에서 3.89인 반면, 80℃/155 bar에서 5.73으로 온도 증가에 따라 증가하였다고 보고하였다.

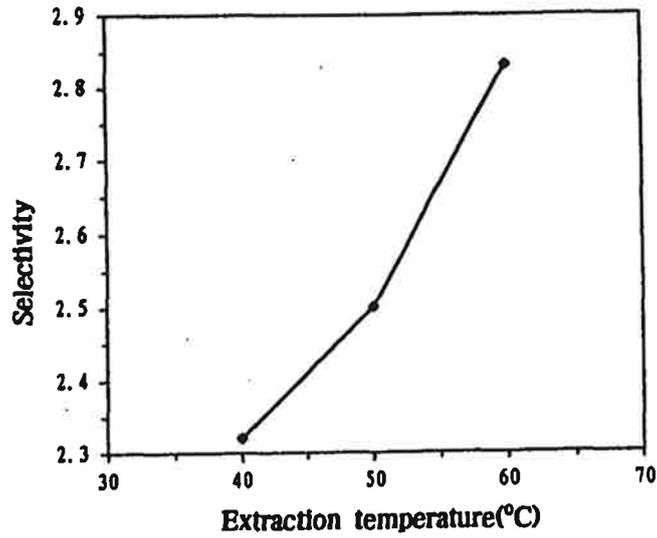


Fig. 3. Carbon dioxide selectivity for cholesterol from egg yolk at 207 bar as a function of extraction temperature.

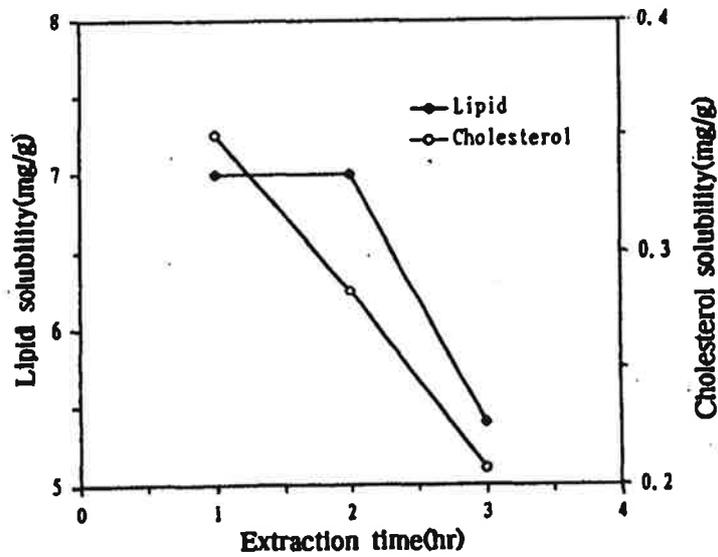


Fig 4. Solubility of lipid and cholesterol in egg yolk at 40°C/276 bar as a function of extraction time.

4. 추출시간에 따른 난황 지방과 콜레스테롤의 용해도

Fig. 4는 40°C/276 bar에서 추출시간에 따른 난황 지방과 콜레스테롤의 용해도 변화를 나타내고 있다. 지방의 용해도는 추출 2시간까지는 거의 유사하였으나, 그 이후에는 급격히 감소하였다. 이와 같은 현상은 추출대상물질의 조성이 추출시간에 따라 변화하기 때문에 일어나며, 짧은 추출시간에는 용해도가 높은 저급지방산으로 구성된 지방이 많이 추출되어 용해도가 높은 반면, 추출시간이 길어질수록 추출잔류물에 용해도가 낮은 고급포화지방산으로 구성된 지방이 농축되어 용해도가 낮아지는 것이다. 콜레스테롤 또한 초임계유체에서의 농도가 급격히 감소하였는데, 이는 추출 잔류물에서의 콜레스테롤 함량이 감소하였기 때문이다.

추출시간에 따른 추출잔류물의 수율은 추출시간 1, 2, 3시간에서 각각 84.3, 68.3, 63.2%였으며, 콜레스테롤 제거율은 각각 25.4, 41.7, 46.1%였는데, 이는 추출시간의 증가에 따라 이산화탄소의 소비량이 증가하므로 추출량이 증가하기 때문이다. 따라서 난황분을 40°C/276 bar에서 3시간 추출하였을 때 콜레스테롤이 46.1% 제거된 난황 63.2%를 얻을 수 있었다.

5. 이산화탄소의 밀도와 추출시간에 따른 난황 추출잔류물의 색도 변화

Table 1과 2는 각각 이산화탄소의 밀도와 추출시간에 따른 추출잔류물의 색깔 변화를 나타내고 있다. 이산화탄소의 밀도와 추출시간이 증가할수록 L값은 증가하였으나 a와 b값은 감소하여, 적색과 황색이 많이 추출되었으며 결국 추출잔류물의 색깔이 밝아지고 있음을 보여주고 있다. 이는 이산화탄소의 밀도가 높을수록, 추출시간이 증가할수록 초임계 이산화탄소에 의하여 난황의 carotenoids와 xanthophyll 색소가 보다 많이 추출되었기 때문이다. Favati 등(17)은 초임계 이산화탄소에 의하여 leaf protein concentrates로부터 carotenoids와 lutein이 추출되었고, 임과 좌(18)도 초임계 이산화탄소에 의하여

당근으로부터 carotenoids가 추출되었다고 보고하였다.

Table 1. Effect of CO₂ density on color values of the residue in supercritical CO₂ extraction of dried egg yolk

CO ₂ density (g/cm ³)	Color value		
	L	a	b
Control	79.39	2.93	33.38
0.738	80.65	2.83	32.63
0.798	81.24	2.77	32.53
0.852	81.38	2.57	32.18
0.905	82.65	2.45	32.28
0.940	83.03	2.53	31.79

Table 2. Effect of extraction time on color values of the residue in supercritical CO₂ extraction of dried egg yolk

Extraction time(hr)	Color value		
	L	a	b
Control	79.39	2.93	33.38
1	82.23	2.75	32.55
2	84.39	2.02	29.20
	84.47	2.12	28.99

Extraction temperature/pressure: 40°C/276 bar

6. 추출시간에 따른 추출잔류물의 지방산 조성 변화

난황을 초임계 이산화탄소로 추출하면 지방의 구성지방산 종류에 따라 초임계 이산화탄소에 대한 용해도가 다르기 때문에 지방산 조성이 다른

지방 분획을 얻을 수 있을 것으로 기대된다. 탄소수가 적고, 극성이 낮은 지방산으로 구성된 지방일수록 초임계 이산화탄소에 대하여 용해도가 높기 때문에 추출시간에 따라 추출잔류물의 지방산 조성에 변화를 주게 된다.

Fig. 5는 40°C/276 bar에서 추출시간을 달리하여 난황분을 추출하였을 때 추출잔류물의 지방산 조성 변화를 나타내고 있다. 추출시간의 증가에 따라 포화지방산인 C16:0과 C18:0 함량은 증가하였으나, 불포화지방산인 C16:1, C18:1, C18:3은 감소하였다. 3시간 동안 추출하였을 때 추출잔류물의 C18:0은 150% 증가한 반면, C16:1과 C18:3은 각각 58, 65%로 감소하였다. 즉 추출시간의 증가에 따라 불포화 지방산들은 많이 추출되어 추출잔류물에서의 그 조성이 낮아짐을 보여주고 있으며, 그 반대로 포화지방산들은 적게 추출되어 추출잔류물에 농축되고 있음을 보여주고 있다. 이는 초임계 이산화탄소가 난황의 불포화지방산을 선택적으로 추출하기 때문인 것으로 추정되며, Froning(19)의 연구결과와 일치하고 있다.

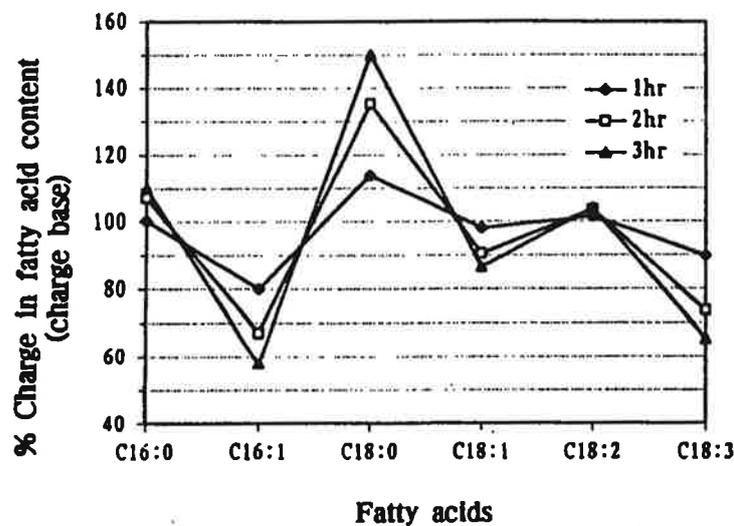


Fig. 5. Profiles of fatty acid content in the residues as a function of extraction time.

제 4 절 참고문헌

1. Wood, D.A., Butler, S., Riemersma, R.A., Thomson, M., Oliver, M.F., Fultone, M., Birtwhistle, A. and Elton, R. : Adipose tissue and platelet fatty acids and coronary heart disease in scottish men. *The Lancet*, July 21, p.117(1984)
2. Stamler, J. and Skekelle, R. : Dietary cholesterol and human coronary heart disease. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 112, 1032(1988)
3. American Heart Association : *Dietary guideline for healthy american adults*. Dallas, Texas, p.1(1986)
4. Hargis, P.S. : Modifying egg yolk cholesterol in the domestic fowl—a review. *Words Poultry Sci. J.*, 44, 17(1988)
5. Larsen, J.E. and Froning, G.W. : Extraction and processing of various components from egg yolk. *Poultry Sci.*, 60, 160(1981)
6. Warren, M.W., Ball, H.R., Jr, Froning G.W. and Davis, D.R. : Lipid composition of hexane and supercritical carbon dioxide reduced cholesterol dried egg yolk. *Poultry Sci.*, 70, 1991(1991)
7. Smith, D.M., Awad, A.C., Bennink, M.R. and Gill, J.L. : Cholesterol reduction in lipid egg yolk using β -cyclodextrin. *J. Food Sci.*, 60, 691(1995)
8. Bringe, N.A., Howard, D.B. and Clark, D.R. : Emulsifying properties of low-fat, low-cholesterol egg yolk prepared by supercritical CO₂ extraction. *J. Food Sci.*, 61, 19(1996)
9. Arntfield, S.D., Bulley N.R. and Crerar, W.J.: Supercritical CO₂ extraction of egg yolk : impact of temperature and entrainer on residual protein. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69, 823(1992)
10. Krukonis, V.J. : Supercritical fluid processing: current research and operation. In "*First international symp. on supercritical fluids*"

Perrut, M.(ed.), Nice, France, p.541(1988)

11. Lim, S. and Rizvi, S.S.H. : Continuous cocurrent extraction of milk fat by supercritical carbon dioxide. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 23(3), 459(1994)
12. Novak, R.A., Reihler, W.J., Pasin, G., King, A.J. and Zeidler, G. : Supercritical fluid extraction of cholesterol from liquid egg. In "*Fat and cholesterol reduced foods*" Haberstron, C. and Morris, C.E.(eds.), Gulp Publishing Co., Houston, p.289(1991)
13. Boehringer Mannheim : *Methods of enzymatic bioanalysis and food analysis*. Mannheim, Germany, p.18(1995)
14. 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(5), 1209(1986)
15. Bulley, N.R. and Labay L. : Extraction/fractionation of egg yolk using SC-CO₂ and alcohol entrainers. In "*Proceedings 2nd international symposium on supercritical fluids*" McHugh, M.A.(ed.), Boston, Massachusetts, p.10(1991)
16. Majewski, W., Mengal, P., Perrut, M. and Ecalard, J.P. : Supercritical fluid fractionation of butter oil. In "*Supercritical fluid processing of food and biomaterials*" Rizvi, S.S.H.(ed.), Blackie Academic & Professional, New York, p.123(1994)
17. Favati, F., King, J.W., Friedrich, J.P. and Eskins, K. : Supercritical carbon dioxide extraction of carotene and lutein from leaf protein concentrates. *J. Food Sci.*, 53, 1532(1988)
18. 임상빈, 좌미경 : 초임계 이산화탄소에 의한 당근중의 베타카로틴 추출. *한국식품과학회지*, 27, 424(1995)
19. Froning, G. W. : Supercritical fluid extraction of cholesterol from dried egg. In "*Fat and cholesterol reduced foods*" Haberstron, C. and Morris, C.E.(eds.), Gulp Publishing Co., Houston, p.277(1991)

여 백

제 5 장 난황분으로부터 초임계 이산화탄소에 의한 콜레스테롤 제거시 추출시간과 압력의 영향

제 1 절 서 설

초임계 유체추출법은 기체의 임계점 보다 높은 온도와 압력하에 주어진 물질로부터 용질을 추출하는 방법이다. 최근 들어 이 공정이 많은 관심을 끄는 이유는 이것으로 제품의 고품질화와 높은 수율을 기대할 수 있으며 조작하는 방법이 광범위하기 때문이다. 초임계유체는 기체와 액체 사이의 중간적인 물리, 화학적 특성을 가지며 밀도는 액체에 가깝고, 점도는 기체의 점도에 가까워 용해력과 침투력이 커진다. 간단히 추출 온도와 압력을 변화시켜 용해력을 조절할 수 있으므로 목적물을 선택적으로 추출할 수 있으며 용매 추출법 보다 사용용매의 범위가 넓으며 용매가 제품으로부터 쉽게 제거될 수 있다는 장점이 있다. 초임계유체로 식품산업에서는 이산화탄소가 주로 사용되는데 그 이유는 이산화탄소의 임계온도는 31.1℃이며, 비화염성, 무독성, 무공해이고 비싸지 않기 때문에 다른 기체나 액체와 비교하였을 때 가장 좋은 초임계유체이다⁽¹⁾.

초임계 유체추출 과정은 추출과 분리의 기초적인 두 단계로 이루어지며 추출되기 위한 혼합물은 추출조내 특별한 온도와 압력 내에서 초임계유체와 접하는 곳에 있게 됨으로서 추출이 이루어진다⁽²⁾. 현재 초임계 유체추출법은 호프, 차, 커피, 담배, 향신료, 동식물유 등의 많은 제품에 시도되고 있으며, 커피에서의 카페인 제거와 호프의 추출 경우는 실제로 산업화되고 있다. Froning 등⁽³⁾은 1990년에 374atm, 55℃에서 난황분으로부터 2/3의 콜레스테롤을 제거하였으며, 94년에는 4,000psi, 40℃에서 76%의 콜레스테롤을 제거하였다⁽⁴⁾. Zeidler와 King(1994)⁽⁵⁾은 난황분으로부터 70%의 콜레스테롤을 추출하였다. 우리 나라에서는 초임계유체 이산화탄소를 사용하여

참치유에서 EPA 및 DHA를 추출하였으며⁽⁶⁾, 좌 등(1996)⁽⁷⁾은 감귤주스의 향기 및 성분파괴 등 품질저하를 방지할 목적으로 초임계 이산화탄소 처리 시 관능적 성질에 나쁜 영향을 미치지 않았으며 138bar에서 93℃보다 낮은 온도인 50℃에서도 동일한 PE가 불활성화 되었다. 또한 임 등(1997)⁽⁸⁾은 난황분으로부터 40℃, 276bar에서 46.1%의 콜레스테롤을 제거하였으며, 한 등(1998)⁽⁹⁾은 홍화로부터 황색소 추출을 시도 하였는 바 60℃, 4,000psi에서 황색소 추출수율이 가장 높게 나타났다.

본 시험에서는 초임계 이산화탄소를 이용하여 난황분으로부터 콜레스테롤을 제거하는 데에 추출압력과 시간이 미치는 영향을 검토하기 위하여 초임계추출을 실시한 후 콜레스테롤 제거율, 중량 감소율, 수분 감소율 및 추출 후 잔류물의 지방산 조성의 변화와 색도 변화를 측정하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 공시재료

본 시험에 사용한 난황분은 상업용 난황분(Inovatech, Inc., Canada)을 구입하여 사용하였으며 4℃에서 보관하였다. 공시재료의 수분함량 4.26%이었다. 주용매로서 사용한 이산화탄소의 순도는 99.9%이었다.

2. 추출 장치 및 조건

본 시험에서 사용한 초임계 유체추출 장치(SFX™ 220, ISCO, U. S. A)는 Extractor, Controller, Syringe, Pumps로 구성되어 있으며, extractor는 bench top으로서 controller에 의하여 조절되었다(Fig. 1). 최대압력은 10,000psi이며 9ml 용량의 추출용기에 시료 3.0g을 충전하고 추출조에 넣었다. 이 때 -5℃의 refrigerated circulator를 가동시켜 이산화탄소의 기화를 방지하였다. 펌프에 의하여 가압된 이산화탄소는 추출조로 이송되었고, 일정 압력과 온도로 유지된 후 추출조 출구로 나가면서 대기압으로 감압, 팽

창되면서 이산화탄소와 추출물로 분리되었다. 이 때 이산화탄소의 유량은 1.3ml/min이었다.

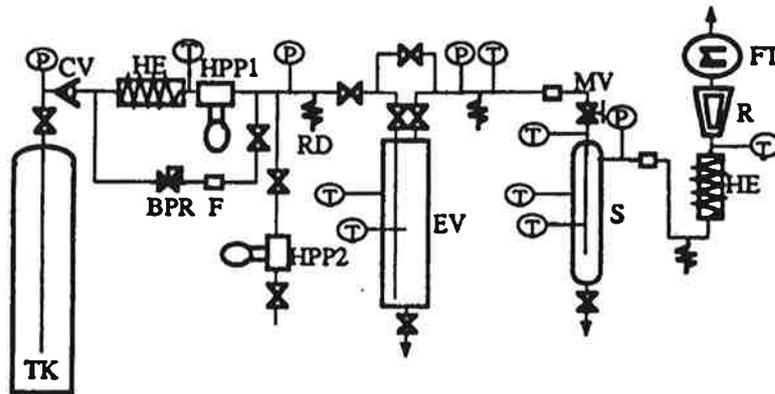


Fig. 1. A flow diagram for the supercritical fluid extraction process.

3. 콜레스테롤 분석

초임제이산화탄소에 의하여 추출된 시료의 콜레스테롤 분석은 Fenton 과 Sim(1991)⁽¹⁰⁾의 방법에 의하여 실시하였다. 시료 0.3g에 internal standard(5 α -cholestane) 0.5ml와 hydrolysis solution 10ml를 넣고 60 $^{\circ}$ C water bath에서 1시간 반응시킨 후 증류수 10ml와 hexane 5ml을 넣고 혼합하여 1000rpm에서 10분간 원심분리 한 후 상층의 hexane층만을 모았다. 여러 번 반복 추출하여 모아진 hexane용액을 여과하여 용매취가 없어질 때까지 농축하고 다시 hexane 1ml로 녹여 1 μ l를 GC에 injection하였다.

1) GC의 분석조건

Gas chromatography의 기종은 HEWLETT PACKARD 6890(H. W. Co., Avondale, PA)의 것을 사용하였고 Column은 Supelco SE-30 Fused Silica Capillary Column(30m 0.25mm ID 0.25 μ m film)이었다. Oven의 온도는 265 $^{\circ}$ C로 맞추었고 detector는 flame ionization detector(FID)를 사용하였고

detector의 온도는 290℃이었다. Injection port의 온도는 280℃이었으며 Carrier gas로는 헬륨을 사용하였다. Run time은 15분이었고 injection 양은 1μl이었다.

4. 지방산 분석

1) 시료의 지방 추출

초임계유체추출 후 시료의 지방 추출은 Folch 등(1958)⁽¹¹⁾의 방법에 의하여 실시하였다. 균질한 난황분을 chloroform과 methanol의 2 : 1 혼합용액을 시료의 4배 정도의 양으로 하여 붓고 지방이 추출되도록 하였다. 탈지면과 여과장치를 사용하여 용액을 여과한 후 여과용액의 약 1/4 정도의 증류수를 첨가하여 3,000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리 후 하층액을 취하여 분액여두에 옮겨 담고 chloroform층이 완전히 분리될 때까지 정치시킨 후 chloroform층을 취하여 chloroform을 완전히 증발시킨 후 지방을 준비하였다. 지방을 추출한 다음에는 아래의 방법으로 전처리하였다.

2) 시료의 지방산 전처리

시료의 지방산 전처리는 Morrison과 Smith(1964)⁽¹²⁾의 방법으로 실시하였다. 추출한 지방 8~20mg을 정확히 취한 후 0.5N NaOH 2ml를 가하여 sand bath에서 15분간 가열한 후 냉각시키고 BF₃-methanol 용액 4ml를 가한 후 15분간 sand bath에서 가열하였다. 가열 후 완전히 냉각시키고 heptane 2ml, NaCl 포화용액 4ml를 가하여 vortex에서 1분간 혼합하였다. 혼합 후 30분간 실온에서 정치시키고 주사기 acro disk를 사용하여 heptane층을 여과한 후 injection하였다.

3) GC의 분석조건

Gas chromatography의 기종은 HEWLETT PACKARD 6890(H. W. Co., Avondale, PA)의 것을 사용하였고 Column은 Omegawax 320 fused with silica capillary Column(30m×0.32mm ID)이었으며 Column내 film 두

계는 0.25 mm이었다. Column의 온도는 처음에는 170℃에서 5분간 holding 시킨 다음 분당 2.5℃씩 올려서 17분간 holding하여 210℃로 맞추었고 detector는 flame ionization detector(FID)를 사용하였고 detector의 온도는 260℃이었다. Injection port의 온도는 250℃이었으며 Carrier gas로는 헬륨을 분당 35ml씩 흘려주었으며 수소는 분당 0.8kg, 공기는 분당 1.2kg씩 흘려주었다. Run time은 40분이었고 injection 양은 1 μ l이었다.

5. 색도 측정

추출 후 시료의 색도측정은 Color difference meter(Yasuda Seiki Seisakusho LTD., UC 600-IV)를 이용하여 L(명도), a(적도), b(황적도)값을 측정하였다. 이 때의 표준색은 L=89.2, a=0.921, b=0.783이었다.

6. 수분 분석

AOAC법(1990)⁽¹³⁾에 의하여 분석하였다.

7. 통계 분석

실험 data 분석은 통계분석용 SAS program⁽¹⁴⁾을 사용하여 p<0.05 수준에서 Duncan의 다중검정으로⁽¹⁵⁾ 비교 분석하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

초임계이산화탄소를 이용하여 난황분으로부터 콜레스테롤을 제거하는데 있어서 추출압력과 추출시간이 미치는 영향을 검토하기 위하여 추출압력과 시간을 달리하여 초임계이산화탄소추출을 시도하고 추출후의 콜레스테롤 제거율, 중량 감소율, 수분감소율 및 추출 후 잔류물의 지방산 조성의 변화와 색도 변화를 측정하였다.

1. 추출압력의 영향

우선 추출압력이 콜레스테롤 제거율, 중량 감소율 및 수분 감소율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 추출온도 40℃, 추출시간 1시간, 이산화탄소의 유량은 1.3ml/min으로 고정하고 추출압력을 3,000~7,000psi로 달리하여 초임계 유체추출을 실시하였다. 그 결과 table 1에 나타낸 바와 같이 추출압력이 증가함에 따라 콜레스테롤 제거율은 3,000psi일 때 18.1%, 5,000psi일 때 34.04%이었고 7,000psi에서 48.57%로서 추출압력이 증가함에 따라 콜레스테롤 제거율도 증가하였다. 이러한 이유는 같은 온도에서 추출압력이 높아지면 콜레스테롤이 더 많이 제거된다는 Hung과 Unger(1995)⁽²⁾의 보고에서와 같이 압력이 증가하면 이산화탄소의 밀도가 증가하고 그에 따라 용해력이 증가하여 콜레스테롤이 많이 제거되었다. 중량감소율은 각각 11.89%, 19.11%, 27.11%로서 압력이 증가하면 중량감소가 많아짐을 알 수 있었다. 추출압력이 증가함에 따라 수분 감소율도 증가하나 일정한 방향으로 크게 증가하지 않았으며, 이상의 결과로써 추출압력 5,000psi에서 콜레스테롤 제거율은 41.30%로 다소 낮기는 하나 중량감소율과 수분감소율을 고려할 때 적당한 추출압력이라고 사료되었다.

Table 1. Effect of supercritical carbon dioxide extraction of dried egg yolk at various pressure on cholesterol reduction, weight loss and moisture reduction.

Pressure (psi)	Cholesterol reduction(%)	Weight loss(%)	Moisture reduction(%)
3,000	28.72 ^e	11.89 ^c	55.29 ^d
4,000	33.50 ^d	14.56 ^{bc}	66.07 ^c
5,000	41.30 ^c	19.11 ^b	67.16 ^c
6,000	45.37 ^b	21.11 ^{ab}	75.79 ^b
7,000	63.85 ^a	27.11 ^a	86.75 ^a

Treatment condition ; CO₂ flow rate : 1.3±0.1ml/min

Extraction time : 1hr., Extraction temperature : 40℃

^{a-e} : Means with the same letter in the same column are not significantly different (p < 0.05)

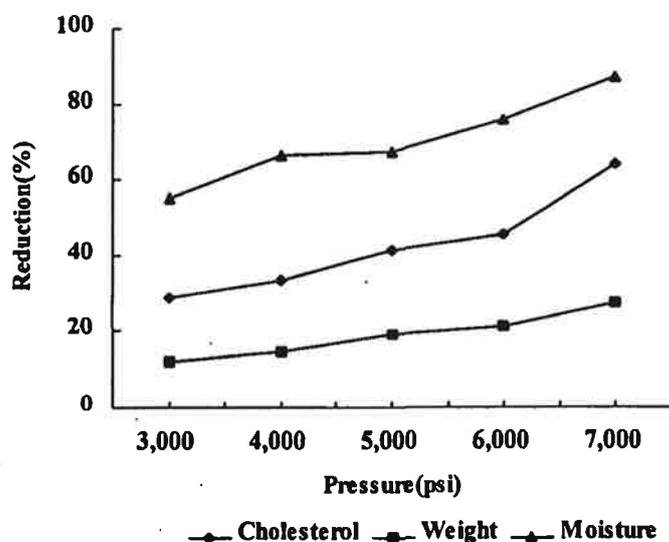


Fig. 2. Effect of supercritical CO₂ extraction of dried egg yolk at various pressure on cholesterol reduction, weight loss and moisture reduction.

추출압력에 따른 추출 잔류물의 주요 지방산 조성의 변화를 알아본 결과 table 2에 나타낸 바와 같다. 일정한 온도에서 추출압력이 증가하면 C16:0, C18:0이 증가하였고 18:1, C18:2, C18:3은 감소하였다. 이것은 추출압력이 증가하면 불포화지방산의 추출이 증가하고 따라서 추출물의 포화지방산의 함량이 증가한다는 Hung과 Unger(1995)⁽²⁾의 보고와 일치하는 결과이었다. 색도의 변화를 알아본 결과 table 3에 나타낸 바와 같이 추출압력이 증가할수록 L값은 증가하였고 a값은 변화가 없었으며, b값은 감소하였다.

Table 2. Changes of fatty acid from supercritical carbon dioxide extraction treated egg yolk powder at various extraction pressure.

Fatty acid	Control	Extraction pressure(psi)				
		3,000	4,000	5,000	6,000	7,000
16:0	27.17 ^b	26.19 ^b	26.32 ^{ab}	26.87 ^{ab}	26.62 ^a	27.02 ^{ab}
18:0	9.25 ^e	9.81 ^d	10.68 ^c	12.04 ^b	11.85 ^b	12.58 ^a
18:1 ω9	44.39 ^a	43.70 ^b	42.09 ^c	39.95 ^d	40.04 ^d	37.89 ^e
18:1 ω7	2.25 ^a	2.24 ^a	2.19 ^b	2.10 ^c	2.09 ^c	1.98 ^d
18:2 ω6	14.60 ^a	14.47 ^{bc}	14.39 ^c	14.35 ^d	14.28 ^d	14.52 ^b
18:3 ω3	0.52 ^a	0.53 ^a	0.47 ^b	0.40 ^c	0.40 ^c	0.33 ^d
20:4 ω6	1.82 ^d	2.01 ^d	2.47 ^c	2.90 ^b	3.07 ^b	3.69 ^a
22:5 ω6	0.27 ^c	0.29 ^c	0.36 ^{bc}	0.40 ^b	0.46 ^b	0.56 ^a
22:6 ω3	0.69 ^b	0.76 ^{cd}	0.95 ^{cd}	1.00 ^{bc}	1.19 ^{ab}	1.43 ^a

Treatment condition ; CO₂ flow rate : 1.3±0.1ml/min

Extraction time : 1hr., Extraction temperature : 40°C

^{a-d}: Means with the same letter in the same column are not significantly different (p < 0.05)

Table 3. Changes of color values from supercritical carbon dioxide extraction treated egg yolk powder at various extraction pressure.

Pressure (psi)	Color value		
	L	a	b
Control	74.87 ^d	2.80 ^a	28.33 ^a
3,000	79.93 ^c	2.80 ^{ab}	28.33 ^a
4,000	80.33 ^{bc}	1.74 ^b	26.97 ^{ab}
5,000	81.60 ^b	2.35 ^{ab}	26.17 ^b
6,000	81.0 ^b	2.14 ^b	27.0 ^{ab}
7,000	31.1 ^a	28.43 ^b	26.5 ^c

Treatment condition ; CO₂ flow rate : 1.3±0.1ml/min

Extraction time : 1hr., Extraction temperature : 40℃

^{a-d} : Means with the same letter in the same column are not significantly different (p < 0.05)

2. 추출시간의 영향

추출시간이 난황분으로부터 콜레스테롤을 제거에 미치는 영향을 알아보기 위하여 추출압력 5,000psi, 추출온도 40℃, 이산화탄소의 유량을 1.3ml/min으로 고정하고 추출시간을 0.5시간~4시간까지 변화시켜 추출한 후 콜레스테롤 제거율, 중량 감소율 및 수분 감소율을 알아보았다. Table 4에 나타낸 바와 같이 추출시간이 0.5시간일 때의 콜레스테롤 제거율은 31.81%이었고 1시간으로 추출시간을 증가시키면 44.05%로 증가하였으며 2시간일 때는 61.71%, 4시간에서는 86.07%로서 동일 압력과 동일 온도에서 추출시간의 증가에 따라 콜레스테롤 제거율이 상당히 증가하였는데 이것은 추출시간의 증가에 따라 이산화탄소의 소비량이 증가하기 때문이었다⁽⁸⁾. 난황분의 콜레스테롤 제거율은 추출시간에 영향을 많이 받는 것을 알 수 있었다. 추출시간이 증가할수록 중량감소율이 많아졌으며 수분감소율은 0.5시간 일

Table 4. Effect of supercritical carbon dioxide extraction of dried egg yolk at various time on cholesterol reduction, weight loss and moisture reduction.

Time (hr.)	Cholesterol reduction(%)	Weight loss(%)	Moisture reduction(%)
0.5	31.81 ^d	14.89 ^c	42.59 ^c
1	44.05 ^c	19.89 ^{bc}	66.82 ^{bc}
2	61.71 ^c	22.00 ^b	74.04 ^b
3	71.59 ^b	31.89 ^{ab}	80.86 ^{ab}
4	86.07 ^a	41.22 ^a	87.19 ^a

Treatment condition ; CO₂ flow rate : 1.3±0.1ml/min

Extraction pressure : 5,000psi, Extraction temperature : 40°C,

^{a-d} : Means with the same letter in the same column are not significantly different (p < 0.05)

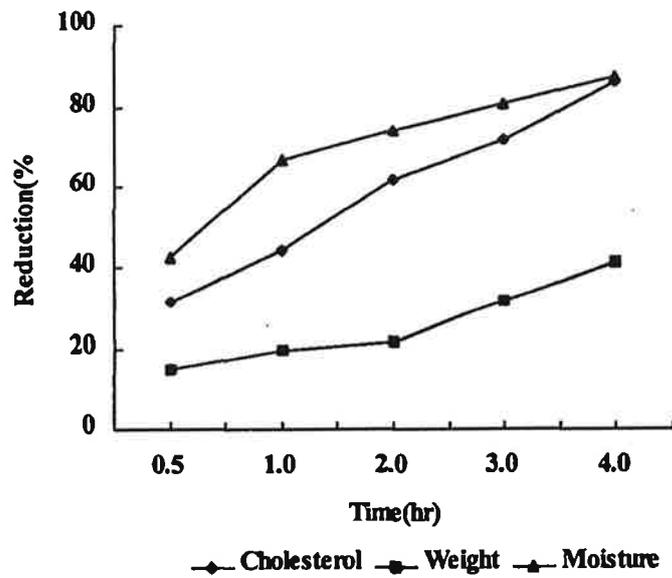


Fig. 3. Effect of supercritical CO₂ extraction of dried egg yolk at various time on cholesterol reduction, weight loss and moisture reduction.

때 42.59%에서 4시간에는 87.19%로서 크게 증가하여 추출시간을 계속적으로 증가시키면 콜레스테롤을 많이 제거시킬 수 있겠지만 수분감소율과 증량감소가 많았으므로 2시간이 적정 추출시간으로 사료되었다.

추출시간에 따른 지방산의 변화는 table 5에 나타낸 바와 같다. 추출시간의 증가에 따라 포화지방산인 C16:0과 C18:0 함량은 증가하였으며, 불포화지방산인 C18:1 C18:3은 감소하였다. 추출시간의 증가에 따라 불포화지방산들은 많이 추출되었고 포화지방산들은 적게 추출되어 추출잔류물에 농축되어짐을 알 수 있었다.

추출 후 잔류물의 색도변화를 알아본 결과 Table 6에 나타낸 바와 같이 추출시간이 증가할수록 L값은 증가하였고 a값과 b값은 감소하였는데 임 등(1997)⁽⁸⁾의 추출시간이 증가할수록 난황의 carotenoid와 xanthophyll 색소가 많이 추출되었기 때문이라고 하는 보고와 유사하였다.

Table 5. Changes of fatty acid from supercritical carbon dioxide extraction treated egg yolk powder at various extraction time.

Fatty acid	Control	Extraction time(hr.)				
		0.5	1	2	3	4
16:0	27.17 ^c	26.22 ^c	26.52 ^c	26.73 ^b	27.34 ^b	28.20 ^a
18:0	9.25 ^t	9.89 ^e	11.44 ^d	11.87 ^c	12.43 ^b	14.50 ^a
18:1 ω9	44.39 ^a	43.50 ^b	40.70 ^c	39.59 ^d	37.21 ^e	37.89 ^t
18:1 ω7	2.25 ^a	2.23 ^b	2.12 ^c	2.05 ^d	1.94 ^e	1.71 ^t
18:2 ω6	14.60 ^c	14.49 ^d	14.36 ^e	14.42 ^{ed}	14.83 ^b	15.13 ^a
18:3 ω3	0.52 ^a	0.51 ^a	0.41 ^b	0.37 ^c	0.34 ^d	0.24 ^e
20:4 ω6	1.82 ^a	2.08 ^a	2.90 ^a	3.22 ^a	3.84 ^a	5.16 ^a
22:5 ω6	0.27 ^t	0.30 ^e	0.43 ^d	0.49 ^c	0.58 ^b	0.79 ^a
22:6 ω3	0.69 ^t	0.78 ^e	1.12 ^d	1.26 ^c	1.49 ^b	2.02 ^a

Treatment condition ; CO₂ flow rate : 1.3±0.1ml/min

Extraction pressure : 5,000psi, Extraction temperature : 40°C,

^{a~t} : Means with the same letter in the same column are not significantly different (p < 0.05)

Table 6. Changes of color values from supercritical carbon dioxide extraction treated egg yolk powder at various extraction time.

Time (hr.)	Color value		
	L	a	b
Control	74.87 ^t	2.80 ^a	28.33 ^a
0.5	79.43 ^e	2.13 ^b	28.13 ^a
1	81.83 ^d	1.93 ^b	26.33 ^b
2	82.90 ^c	0.41 ^c	25.30 ^c
3	84.87 ^b	0.40 ^c	22.23 ^d
4	85.53 ^a	0.26 ^c	20.63 ^e

Treatment condition ; CO₂ flow rate : 1.3±0.1ml/min

Extraction pressure : 5,000psi, Extraction temperature : 40°C,

^{a-t} : Means with the same letter in the same column are not significantly different (p < 0.05)

제 4 절 참고문헌

1. Rizvi S. S. H, Benado A. L., Zollweg, J. A., and Daniels, J. A. : Supercritical fluid extraction : fundamental principles and modeling methods. *Food Technology*, 40, 55-65(1986).
2. Hung Tran V. and Unger, M. A. : Cholesterol reduced egg yolk by supercritical fluid extraction, *Food Australia*, 47(5), 227-231 (1995).
3. Froning G. W., Wehling, R. L., Cuppett, S. L., Pierce, M. M., Niemann, L. and Siekman, D. K. : Extraction of cholesterol and other lipid from dried egg yolk using supercritical carbon dioxide. *J. of Food Science*, 55(1), 95-98 (1990).

4. Frong G. W. : Egg cholesterol removal by supercritical fluid extraction technology, *Egg uses and processing technologies*, New Development, CAB International, p.106-114 (1994).
5. Zeidler G., Pasin, G. and King, A. : Removing cholesterol from liquid egg yolk by carbon dioxide-supercritical fluid extraction, *Egg uses and processing technologies*, New Development, CAB International, p. 115-126 (1994).
6. 윤정로 : 초임계이산화탄소를 이용한 참치유에서의 EPA 및 DHA 추출. *한국식품과학회지*. 25(3), 288-294 (1993).
7. 좌미경, 임상빈, 양영택, 고정삼 : 초임계 이산화탄소 처리가 감귤주스 품질에 미치는 영향. *한국식품과학회지*. 28(4), 750-755 (1996).
8. 임상빈, 좌미경, 고영환, 유익종 : 초임계 이산화탄소에 의한 난황분의 추출. *한국식품영양학회지*, 26(5), 860-865 (1997).
9. 한병석, 김공한, 정인석 : 초임계 이산화탄소를 이용한 홍화로부터 황색소 추출. *한국농화학회지*. 41(5), 363-366 (1998).
10. Fenton M. and Sim, J. S. : Determination of egg yolk cholesterol content by on-column capillary gas chromatography. *J. of Chromatography*, 540, 323-329 (1991).
11. Folch, J., Lees, M. and Sloan, S. : A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissue. *J. Bio. Chem.* 226, 447-509 (1958).
12. Morison, M. R. and Smith L. M. : Preparation of fatty acid methylesters and dimethylacetals from liquid boron fluoride methanol, *J. Lipid Res.*, 5, 600-608 (1964).
13. A.O.A.C : Official method of analytical, 15th edition. Association of official analytical chemist, Washington, D.C.
14. Stephenie, P. J. : SAS/SAT™ Guide for personal computers Version 6 Edition, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. p. 58 (1985).
15. Duncan, D. B. : Multifl range and F test, *Biometrics*, 11, 1 (1995).

여 백

제 6 장 난황분으로부터 초임계 이산화탄소에 의한 콜레스테롤 제거시 추출온도와 CO₂유량의 영향

제 1 절 서 론

난황은 약 50%가 고형물로서 단백질 16%, 지질 32%, 미네랄 2%, 탄수화물 1%로 구성되어 있다. 난황지질의 주요 성분은 트리글리세라이드, 인지질과 콜레스테롤이며 이 중 콜레스테롤은 난황 중의 1.6%로서⁽¹⁾ 난황을 통한 콜레스테롤 섭취가 혈중 콜레스테롤을 높이며 심장질환 및 동맥경화를 일으킬 수 있는 요인이 될 수 있다는 소비자들의 부정적인 인식 때문에 지난 수년간 계란의 소비량은 감소하고 있는 실정이며 이러한 추세를 극복하기 위한 일환으로 콜레스테롤 함량을 낮추려는 시도가 이루어지고 있다.

난황 중의 콜레스테롤을 제거하기 위한 기술적인 방법에는 계란에 물리, 화학적 처리를 실시하여 콜레스테롤을 저하시키는 방법으로 흡착제나⁽²⁾ 효소를 이용하거나⁽³⁾ 또는 초임계추출법 또는 용매추출법⁽⁴⁾이 있고 식물성 유지를 이용하여⁽⁵⁾ 난황의 콜레스테롤을 제거하는 방법 등이 있다. 그런데 물리, 화학적 방법은 계란의 극성 지질인 인지질도 제거하며, 단백질을 변성시키므로써 계란의 기능적, 관능적 성질을 저해하는 문제점이 있다.

초임계유체추출법은 기체의 임계점 보다 높은 온도와 압력 하에 주어진 물질로부터 용질을 추출하는 방법으로서 최근 들어 이 공정이 많은 관심을 끄는 이유는 제품의 고품질화와 높은 수율을 기대할 수 있으며 조작하는 방법이 광범위하기 때문이다⁽⁶⁾.

본 시험에서는 초임계 이산화탄소를 사용하여 난황분으로부터 콜레스테롤을 제거할 때에 추출온도와 이산화탄소의 유량이 미치는 영향을 알아보기 위하여 초임계유체추출을 실시하였으며 콜레스테롤 제거율, 중량 감소

을, 수분 감소율을 알아보고 더불어 추출 후 시료의 지방산 조성의 변화와 색도의 변화를 알아보았다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 공시재료

본 시험에 사용한 난황분은 상업용 난황분(Inovatech, Inc., Canada)을 구입하여 사용하였으며 4℃에서 보관하였다. 공시재료의 수분함량 4.26%이었다. 주용매로서 사용한 이산화탄소의 순도는 99.9%이었다.

2. 추출 장치 및 조건

본 시험에서 사용한 초임계 유체추출 장치(SFX™ 220, ISCO, U. S. A)는 Extractor, Controller, Syringe, Pumps로 구성되어 있으며, extractor는 bench top으로서 controller에 의하여 조절되었다(Fig. 1). 최대압력은 10,000psi이며 9ml 용량의 추출용기에 시료 3.0g을 충전하고 추출조에 넣었다. 이 때 -5℃의 refrigerated circulator를 가동시켜 이산화탄소의 기화를 방지하였다. 펌프에 의하여 가압된 이산화탄소는 추출조로 이송되었고, 일정 압력과 온도로 유지된 후 추출조 출구로 나가면서 대기압으로 감압, 팽창되면서 이산화탄소와 추출물로 분리되었다. 이산화탄소의 유량은 1.3ml/min이었다.

3. 콜레스테롤 분석

초임계 이산화탄소에 의하여 추출된 시료의 콜레스테롤 분석은 Fenton과 Sim(1991)⁽⁷⁾의 방법에 의하여 실시하였다. 시료 0.3g에 internal standard(5 α -cholestane) 0.5ml와 hydrolysis solution 10ml를 넣고 60℃ water bath에서 1시간 반응시킨 후 증류수 10ml와 hexane 5ml을 넣고 혼합하여 1000rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층의 hexane층만을 모았다.

여러 번 반복 추출하여 모아진 hexane용액을 여과하여 용매취가 없어질 때까지 농축하고 다시 hexane 1ml로 녹여 1 μ l를 GC에 injection하였다. 이때 GC의 분석조건은 다음과 같이 Gas chromatography의 기종은 HEWLETT PACKARD 6890(H. W. Co., Avondale, PA)의 것을 사용하였고 Column은 Supelco SE-30 Fused Silica Capillary Column(30m 0.25mm ID 0.25 μ m film)이었다. Oven의 온도는 265 $^{\circ}$ C로 맞추었고 detector는 flame ionization detector(FID)를 사용하였고 detector의 온도는 290 $^{\circ}$ C이었다. Injection port의 온도는 280 $^{\circ}$ C이었으며 Carrier gas로는 헬륨을 사용하였다. Run time은 15분이었고 injection 양은 1 μ l이었다.

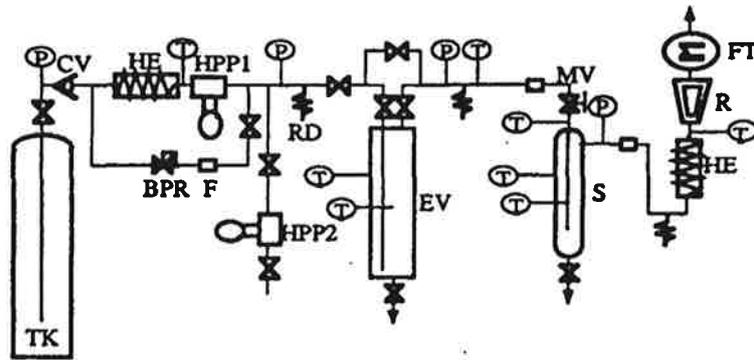


Fig. 1. A flow diagram for the supercritical fluid extraction process.

4. 지방산 분석

1) 시료의 지방 추출

초임계유체추출 후 시료의 지방 추출은 Folch 등(1958)⁽⁸⁾의 방법에 의하여 실시하였다. 균질한 난황분을 chloroform과 methanol의 2 : 1 혼합용액을 시료의 4배 정도의 양으로 하여 붓고 지방이 추출되도록 하였다. 탈지면과 여과장치를 사용하여 용액을 여과한 후 여과용액의 약 1/4 정도의 증류수를 첨가하여 3,000rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 하층

액을 취하여 분액여두에 옮겨 담고 chloroform층이 완전히 분리될 때까지 정치시킨 후 chloroform층을 취하여 chloroform을 완전히 증발시킨 후 지방을 준비하였다. 지방을 추출한 다음에는 아래의 방법으로 전처리 하였다.

2) 시료의 지방산 전처리

시료의 지방산 전처리는 Morrison과 Smith(1964)⁽⁹⁾의 방법으로 실시하였다. 추출한 지방 8~20mg을 정확히 취한 후 0.5N NaOH 2ml를 가하여 sand bath에서 15분간 가열한 후 냉각시키고 BF₃-methanol 용액 4ml를 가한 후 15분간 sand bath에서 가열하였다. 가열 후 완전히 냉각시키고 heptane 2ml, NaCl 포화용액 4ml를 가하여 vortex에서 1분간 혼합하였다. 혼합 후 30분간 실온에서 정치시키고 주사기 acro disk를 사용하여 heptane층을 여과한 후 injection하였다.

3) GC의 분석조건

Gas chromatography의 기종은 HEWLETT PACKARD 6890(H. W. Co., Avondale, PA)의 것을 사용하였고 Column은 Omegawax 320 fused with silica capillary Column(30m×0.32mm ID)이었으며 Column내 film 두께는 0.25 mm이었다. Column의 온도는 처음에는 170℃에서 5분간 holding시킨 다음 분당 2.5℃씩 올려서 17분간 holding하여 210℃로 맞추었고 detector는 flame ionization detector(FID)를 사용하였고 detector의 온도는 260℃이었다. Injection port의 온도는 250℃이었으며 Carrier gas로는 헬륨을 분당 35ml씩 흘려주었으며 수소는 분당 0.8kg, 공기는 분당 1.2kg씩 흘려주었다. run time은 40분이었고 injection 양은 1μl이었다.

5. 수분 분석

AOAC법(1990)⁽¹⁰⁾에 의하여 분석하였다.

6. 색도 측정

추출 후 시료의 색도 측정은 Color difference meter(Yasuda Seiki Seisakusho LTD.,UC 600-IV)를 이용하여 L(명도), a(적도), b(황적도)값을

측정하였다. 이 때의 표준색은 $L=89.2$, $a=0.921$, $b=0.783$ 이었다.

7. 통계 분석

실험 data 분석은 통계분석용 SAS program⁽¹¹⁾을 사용하여 $p<0.05$ 수준에서 Duncan의 다중검정으로⁽¹²⁾ 비교 분석하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 추출온도의 영향

추출온도의 영향을 살펴보기 위하여 추출압력 5,000psi, 이산화탄소의 유량을 1.3ml/min으로 고정하고 추출온도를 35℃~55℃로 달리하여 2시간 추출한 후 콜레스테롤 제거율, 중량 감소율 및 수분 감소율을 알아보았다. 그 결과 table 1에 나타낸 바와 같이 추출온도가 35℃에서 40℃로 증가하면 콜레스테롤 제거율은 51.75%에서 71.78%로 증가하였고, 45℃에서는 79.10%이었으며 50℃에서는 83.18%로서 온도가 증가함에 따라 콜레스테롤의 제거율이 증가하였으나 55℃에서는 79.97%로서 감소하였다. 이러한 결과는 추출온도가 40, 50, 60℃에서 콜레스테롤의 제거율은 13.2, 12.3, 11.9%로서 동일압력에서 추출온도의 감소에 따라 콜레스테롤의 감소율은 증가하였는데 이는 추출온도의 감소에 따라 이산화탄소의 밀도가 증가하기 때문이라는 보고와 다른 결과이었는데⁽¹³⁾, McLachlan 등(1991)⁽¹⁴⁾은 이산화탄소를 사용할 경우 적당한 추출온도는 30℃~60℃라고 보고하였으며, Froning 등(1990)⁽¹⁵⁾은 55℃, 374atm의 조건에서 2/3의 콜레스테롤 제거하였고, Warren과 Ball(1994)⁽¹⁶⁾은 45℃, 238atm의 조건에서 84%, 45℃, 306atm에서 87%, 55℃, 374atm에서 98%의 콜레스테롤을 제거하여 온도, 압력이 증가함에 따라 콜레스테롤 제거율도 증가한다고 보고하였다. 이는 Hung과 Unger(1995)⁽¹⁷⁾의 일정온도에서 압력이 170bar에서 310bar로 증가하면 15%에서 33%로 지방이 많이 제거되었으나 50℃이하에서는 동일 온

도에서 압력이 증가하면 지방의 제거율이 증가하는 반면 동일 압력에서 온도가 증가하면 지방제거가 감소하였는데 310bar에서만은 33%에서 35.6%로 증가하였다고 보고하였다. 또한 추출압력 270bar에서 온도를 40℃, 50℃, 60℃로 증가시키면 콜레스테롤의 용해도는 서서히 증가한다⁽¹⁸⁾고하였다. 한 등(1998)⁽¹⁹⁾은 4,000psi에서 온도를 60~80℃로 변화시켜 홍화로부터 황색소를 추출하였는데 60℃에서 최대이었고 그 이상의 온도에서는 감소하는 경

Table 1. Effect of supercritical carbon dioxide extraction of dried egg yolk at various temperature on cholesterol reduction, weight loss and moisture reduction.

Temperature (°C)	Cholesterol reduction(%)	Weight Loss(%)	Moisture reduction(%)
35	51.76 ^d	28.00 ^a	61.01 ^b
40	71.78 ^c	31.56 ^a	76.24 ^a
45	79.10 ^b	31.33 ^a	77.85 ^a
50	83.18 ^a	33.22 ^a	80.31 ^a
55	79.97 ^b	35.11 ^a	77.31 ^a

Treatment condition ; CO₂ flow rate : 1.3±0.1ml/min

Extraction pressure : 5,000psi, Extraction time : 2 hr.

^{a-d} : Means with the same letter in the same column are not significantly different (p < 0.05)

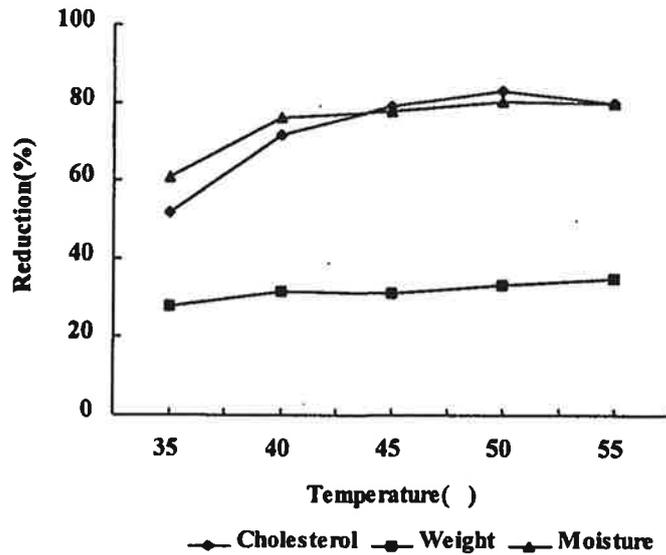


Fig. 2. Effect of supercritical carbon dioxide extraction of dried egg yolk at various temperature on cholesterol reduction, weight loss and moisture reduction.

향을 나타내었다. 이와 같이 서로 다른 결과를 보이는 것은 추출장치의 차이와 추출압력과 이산화탄소의 유량이 서로 다르며 추출하려는 시료의 주입량이 달라짐으로서 다른 결과를 보인 것으로 사료되었다. 이것으로 보아 난황 지방과 콜레스테롤의 용해도는 추출온도 보다는 추출압력에 좌우되는 것을 알 수 있었다. 김 등(1996)⁽²⁰⁾은 초임계유체로 β -carotene 추출의 주요 인자는 압력, 시간, 온도의 순 이라고 하였다. 또한 추출온도에 따른 중량 감소율과 수분 감소율은 크게 영향을 받지 않음을 알 수 있었다.

Table 2. Changes of fatty acid from supercritical carbon dioxide extraction treated egg yolk powder at various extraction temperature.

Fatty acid	Control	Extraction temperature(°C)				
		35	40	45	50	55
16:0	27.17 ^c	29.68 ^b	27.59 ^a	26.93 ^b	27.45 ^a	27.33 ^a
18:0	9.25 ^d	11.94 ^c	13.50 ^a	12.32 ^c	12.94 ^b	12.86 ^b
18:1 ω9	44.39 ^a	41.41 ^b	35.57 ^f	38.46 ^c	36.50 ^e	36.99 ^d
18:1 ω7	2.25 ^a	2.16 ^a	0.98 ^b	2.04 ^b	1.92 ^b	1.95 ^b
18:2 ω6	14.60 ^{bc}	14.35 ^d	14.70 ^{ab}	14.50 ^{cd}	14.80 ^a	14.78 ^{ab}
18:3 ω3	0.52 ^a	0 ^c	0 ^c	0.36 ^b	0.22 ^c	0.24 ^b
20:4 ω6	1.82 ^b	2.14 ^b	4.32 ^a	3.51 ^a	4.01 ^a	3.95 ^a
22:5 ω6	0.27 ^c	0 ^f	0.65 ^a	0.52 ^d	0.60 ^b	0.59 ^c
22:6 ω3	0.69 ^e	1.02 ^d	1.70 ^a	1.36 ^c	1.56 ^b	1.55 ^b

Treatment condition ∴ CO₂ flow rate : 1.3±0.1ml/min

Extraction pressure : 5,000psi, Extraction time : 2 hr.

^{a-d} : Means with the same letter in the same column are not significantly different (p < 0.05)

추출온도에 따른 추출 후 잔류물의 지방산 조성의 변화는 table 2에 나타난 바와 같이 추출온도에 의하여 크게 영향을 받지 않음을 알 수 있었다. 포화지방산인 C16:0과 C18:0 함량은 다소 증가하였으며, 불포화지방산인 C18:1, C18:2, C18:3은 큰 변화 없었다. 이러한 결과는 Froning 등(1990)⁽¹⁵⁾은 추출온도와 압력이 증가하면 포화지방산의 함량이 증가한다는 보고와 유사하였다. 추출 후 잔류물의 색도변화는 추출온도가 증가할수록 L값은 증가하였고 a값과 b값은 감소하였다(Table 3). Froning 등(1990)⁽¹⁵⁾은 초임계 이산화탄소에 의해 난황분에서 xanthophyll 색소가 제거되었기 때문에 L값은 증가하였고 a값과 b값은 감소하였고, Hung과

Unger(1995)⁽¹⁷⁾는 추출온도와 압력이 높으면 많은 색소가 제거된다고 하였으며 초임계유체추출에 의하여 제거되는 색소로는 annatto, xanthophyll, carotene과 lutein이라고 하였다(Chao 등, 1991)⁽²¹⁾.

Table 3. Changes of color values from supercritical carbon dioxide extraction treated egg yolk powder at various extraction temperature.

Temperature(°C)	Color value		
	L	a	b
Control	74.87 ^d	2.80 ^a	28.33 ^a
35	80.00 ^c	1.47 ^b	26.90 ^b
40	84.10 ^a	0.28 ^c	21.70 ^d
45	82.70 ^b	1.06 ^b	23.33 ^c
50	84.73 ^a	0.57 ^c	20.60 ^c
55	82.79 ^b	0.36 ^c	22.60 ^c

Treatment condition ; CO₂ flow rate : 1.3±0.1ml/min

Extraction pressure : 5,000psi, Extraction time : 2 hr.

^{a-f} : Means with the same letter in the same column are not significantly different (p < 0.05)

2. 이산화탄소 유량의 영향

이산화탄소의 유량이 난황분의 콜레스테롤 제거에 미치는 영향을 알아보기 위하여 추출압력 5,000psi, 추출시간 2시간, 추출온도를 50℃로 고정하고 이산화탄소의 유량을 0.5~2.0ml/min으로 달리하여 추출한 후 콜레스테롤 제거율, 중량 감소율 및 수분 감소율을 알아보았다. 그 결과 table 4에 나타낸 바와 같이 1.0ml/min에서의 콜레스테롤 제거율은 77.05%이었으며 1.5ml/min에서는 84.85%, 2ml/min에서는 88.74%로서 이산화탄소의 유량을 증가시키면 콜레스테롤 제거율도 증가하였으며 중량감소율과 수분감소율은

이산화탄소의 유량이 많아지면 증가하기는 하나 1.0ml/min 이상에서는 뚜렷한 차이를 나타내지 않았으며 1.5ml/min에서는 중량감소율이 다소 많아 1.0ml/min이 적정 이산화탄소의 유량이라고 사료되었다. 이러한 결과는 폐칸으로부터 지방을 추출하는데 이산화탄소의 유량을 1.0에서 7.5로 증가시켰을 때에 유량을 1에서 3으로 증가시키기에 따라 지방추출은 3배로 증가하지 않았으며, 4.0에서 7.5로 증가시키면 21.52%에서 21.66%로서 어느 정도의 유량 이상에서는 효과가 없었다⁽²²⁾는 보고와 유사한 결과이었다.

Table 4. Effect of supercritical carbon dioxide extraction of dried egg yolk at various CO₂ flowrate on cholesterol reduction, weight loss and moisture reduction.

CO ₂ flowrate (ml/min)	Cholesterol reduction(%)	Weight loss(%)	Moisture reduction(%)
0.5	57.39 ^d	5.56 ^{bc}	45.54 ^b
1.0	77.05 ^c	27.67 ^b	76.16 ^a
1.5	84.85 ^b	38.11 ^a	83.57 ^a
2.0	89.74 ^a	44.11 ^a	88.47 ^a

Treatment condition ; Extraction pressure : 5,000psi, Extraction time : 2 hr.,
Extraction temperature : 50°C

^{a-e} : Means with the same letter in the same column are not significantly different (p < 0.05)

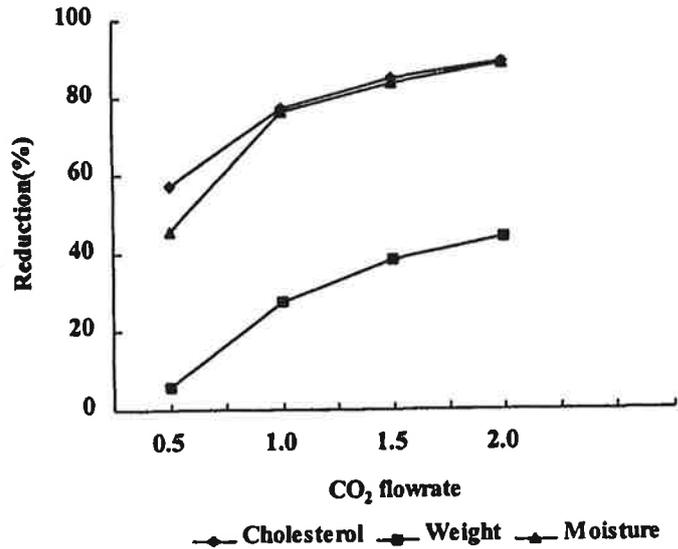


Fig. 3. Effect of supercritical carbon dioxide extraction of dried egg yolk at various CO₂ flowrate on cholesterol reduction, weight loss and moisture reduction.

이산화탄소의 유량에 따른 추출 후 잔류물의 지방산 조성의 변화는 table 5에 나타낸 바와 같다. 이산화탄소의 유량이 많아질수록 포화지방산인 C16:0과 C18:0의 함량은 증가하였으며, 불포화지방산인 C18:1은 감소하였으며 C18:2는 증가함을 볼 수 있었다. 추출 후 잔류물의 색도 변화를 알아본 결과 table 6에 나타낸 바와 같이 이산화탄소의 유량이 증가할수록 L 값은 증가하였고 a값과 b값이 뚜렷하게 감소함을 알 수 있었다. 이것은 이산화탄소의 유량이 증가하면 시료가 이산화탄소와 접촉하는 양이 많아지기 때문이라고 사료되었다.

Table 5. Changes of fatty acid from supercritical carbon dioxide extraction treated egg yolk powder at various CO₂ flowrate.

Fatty acid	Control	CO ₂ flowrate(ml/min)			
		0.5	1.0	1.5	2.0
16:0	27.15 ^e	26.63 ^c	27.00 ^d	27.28 ^b	28.60 ^a
18:0	9.25 ^e	9.62 ^c	11.06 ^d	12.94 ^b	14.62 ^a
18:1 ω 9	44.39 ^a	44.63 ^b	42.15 ^a	39.32 ^c	34.74 ^d
18:1 ω 7	2.25 ^d	2.28 ^c	2.18 ^a	2.09 ^d	1.87 ^e
18:2 ω 6	14.60 ^c	14.85 ^b	14.85 ^b	14.77 ^b	15.28 ^a
20:4 ω 6	1.82 ^e	1.99 ^c	2.75 ^b	3.69 ^d	4.89 ^a

Treatment condition ; Extraction pressure : 5,000psi, Extraction time : 2 hr.,
Extraction temperature : 50 °C

^{a-e} : Means with the same letter in the same column are not significantly different (p < 0.05)

Table 6. Changes of color values from supercritical carbon dioxide extraction treated egg yolk powder at various CO₂ flowrate.

CO ₂ flowrate(ml/min.)	Color value		
	L	a	b
Control	74.87 ^d	2.80 ^a	28.33 ^b
0.5	74.05 ^d	2.07 ^b	29.53 ^a
1.0	78.47 ^c	1.88 ^b	27.33 ^c
1.5	83.87 ^b	0.71 ^c	21.63 ^d
2.0	84.80 ^a	0.27 ^d	19.97 ^e

Treatment condition ; Extraction pressure : 5,000psi, Extraction time : 2 hr.,
Extraction temperature : 50 °C

^{a-e} : Means with the same letter in the same column are not significantly different (p < 0.05)

제 4 절 참고문헌

1. 한석현 : 계란의 과학과 그 이용. 선진문화사. p. 79-91 (1996).
2. Smith, D. M., Award, A. C., Bennink, M. R and Gill, J. L. : Cholesterol reduction in liquid egg yolk using β -cyclodextrin. *J. of Food Sci.*, 60(4), 691 (1995).
3. Christodoulou S., Hung T. V., Trehwell M. A. and Black R. G. : Enzymatic degradation of egg yolk cholesterol, *J. of Food Protection*, 57(10), 908-912 (1994).
4. Yano, N., Fukinbara, I., Yoshida. K. and Wakuyama Y. : Decholesterolized and defatted egg powder and method producing same, *U.S. Patent* 4 234 619 (1980).
5. Bracco U. and Viret J. L. : Decholesterization of egg yolk, *U.S. Patent* 4 333 959 (1982).
6. Rizvi S. S. H, Benado A. L., Zollweg, J. A., and Daniels, J. A. : Supercritical fluid extraction: fundamental principles and modeling method, *Food Technology*, 40, 55-65 (1986).
7. Fenton M. and Sim, J. S. : Determination of egg yolk cholesterol content by on-column capillary gas chromatography. *J. of Chromatography*, 540, 323-329 (1991).
8. Folch, J., Lees, M. and Sloan, S. : A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissue. *J. Bio. Chem.* 226, 447-509 (1958).
9. Morison, M. R. and Smith L. M. : Preperation of fatty acid methylesters and dimethylacetals from liquid boron fluoride methanol, *J. Lipid Res.*, 5, 600-608 (1964).
10. A.O.A.C : Official method of analytical, 15th edition. Assóciation of official analytical chemist, Washington, D.C.
11. Stephenie, P. J. : SAS/SAT™ Guide for personal computers, Version 6 Edition, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. p. 58 (1985).

12. Duncan, D. B. : Multifur range and F test, *Biometrics*, 11, 1 (1995).
13. 임상빈, 좌미경, 고영환, 유익종 : 초임계 이산화탄소에 의한 난황분의 추출. *한국식품영양학회지*, 26(5), 860-865 (1997).
14. McLachlan C. N. S., Catchpole, O. J., Catchpole and Hamilton, B. H. : Separation of sterols from lipids, *U.S. Patent* 5 024 846 (1990).
15. Froning G. W., Wehling, R. L., Cuppett, S. L., Pierce, M. M., Niemann, L. and Siekman, D. K. : Extraction of cholesterol and other lipid from dried egg yolk using supercritical carbon dioxide, *J. of Food Science*, 55(1), 95-98 (1990).
16. Warren, M. W. and Ball, H. R. JR. : Lipid composition and supercritical carbon dioxide reduced cholesterol dried egg yolk^{1,2,3}. *Poultry Science*. 70(9), 1991-1997 (1991).
17. Hung Tran V. and Unger, M. A. : Cholesterol reduced egg yolk by supercritical fluid extraction, *Food Australia*, 47(5), 227-231 (1995).
18. Frong G. W. : Egg cholesterol removal by supercritical fluid extraction technology, *Egg uses and processing technologies*, New Development, CAB International, p. 106-114 (1994).
19. 한병석, 김공한, 정인석 : 초임계 이산화탄소를 이용한 홍화로부터 황색소 추출. *한국농화학회지*. 41(5), 363-366 (1998).
20. 김영호, 장규섭, 박영덕 : 초임계 유체에 의한 당근의 β -carotene 추출의 최적화. *한국식품과학회지*. 28(3), 411-416 (1996).
21. Chao, R. R., Mulvaney, S. J., Sanson, D. R., Hsieh, F. H. and Tempesta, M. S. : Supercritical CO₂ extraction of annatto(*Bixa orellana*) pigments and some characteristics of the colour extracts. *J. of Food Science*, 56, 80-83 (1991).
22. Alexander, W. S., Bruswitz, G. H. and Maness, N. O. : Pecan oil recovery and composition as affected by temperature, pressure, and supercritical CO₂ flow rate, *J. of Food Science*, 62(4), 762-766 (1997).

제 7 장 난황분으로부터 초임계 이산화탄소에 의한 콜레스테롤 제거시 보조용매의 영향

제 1 절 서 설

계란은 질 좋은 단백질과 미네랄, 비타민 그리고 다른 필수지방산의 공급원으로서 인간 식생활에 많이 이용되어왔으며 계란의 영양가치 뿐만 아니라 난황은 유화제로서의 특성을 가지고 있어 마요네즈, 드레싱, 아이스크림 등에 사용되어 왔다. 난황은 약 50%가 고형물로서 32%의 지방, 16%의 단백질, 2%의 미네랄과 1%의 탄수화물로 구성되어 있다⁽¹⁾. 난황 100g에 포함되어 있는 콜레스테롤 함량은 1,300mg으로서 다른 식품에 비하여 난황의 콜레스테롤 함량이 높아⁽²⁾ 계란을 섭취하면 난황중의 함유된 콜레스테롤을 섭취하게 되므로 이것이 혈중 콜레스테롤을 높여 건강상에 문제를 일으킬 수 있다는 인식이 때문에 계란을 기피하는 경향이 있어 이를 극복하기 위하여 콜레스테롤을 제거하기 위한 기술개발이 여러 모로 시도되고 있다.

초임계 유체추출법은 기체의 임계점 보다 높은 온도와 압력 하에 주어진 물질로부터 용질을 추출하는 방법이다. 초임계 유체추출법은 용매추출법 보다 사용용매의 범위가 넓고 용매가 제품으로부터 쉽게 제거될 수 있다. 식품산업에서는 초임계유체로서 이산화탄소가 많이 사용되는데 그 이유는 이산화탄소의 임계온도가 31.1℃로서 낮고, 비 화염성, 무독성, 무공해이고 비싸지 않기 때문이다⁽³⁾. 계란에 초임계 이산화탄소를 사용하는 장점은 인지질이나 단백질 같은 기능성 성분은 그대로 놔두고 콜레스테롤만을 선택적으로 추출할 수 있다는 것이며⁽⁴⁻⁵⁾, 초임계 이산화탄소는 난황분을 통과하면서 중성지방과 콜레스테롤을 녹이고 지방과 콜레스테롤 입자는 가스와의 함께 배출되어 진다⁽⁶⁾. 보조용매는 비극성의 성질을 갖는 초임계 이산

화탄소의 단점을 보완해 주기 위해 사용된다. 즉 비교적 용해력이 약한 초임계 이산화탄소에 유기용매를 첨가함으로써 용해력을 증가시켜 주는 역할을 하며 주로 알콜류가 많이 사용된다⁽⁷⁾.

본 시험에서는 초임계 이산화탄소를 이용하여 난황분으로부터 콜레스테롤을 제거하는 데에 보조용매가 미치는 영향을 알아보기 위하여 보조용매로써 에탄올과 메탄올을 사용하였을 때의 콜레스테롤 제거율, 중량 감소율과 추출 후 잔류물의 지방산 조성의 변화와 색도 변화를 알아보았다.

제 2 절 재 료 및 방 법

1. 공시재료

본 시험에 사용한 난황분은 상업용 난황분(Inovatech, Inc., Canada)을 구입하여 사용하였으며 4℃에서 보관하였다. 공시재료의 수분함량 4.26%이었다. 주용매로서 사용한 이산화탄소의 순도는 99.9%이었고, 보조용매로서 사용한 에탄올과 메탄올은 각각 순도 99.9%와 99.85%의 특급시약을 사용하였다.

2. 추출 장치 및 조건

본 시험에서 사용한 초임계 유체추출 장치(SFX™ 220, ISCO, U. S. A)는 Extractor, Controller, Syringe, Pumps로 구성되어 있으며, extractor는 bench top으로서 controller에 의하여 조절되었다(Fig. 1). 최대압력은 10,000psi이며 9ml 용량의 추출용기에 시료 3.0g을 충전하고 추출조에 넣었다. 이 때 -5℃의 refrigerated circulator를 가동시켜 이산화탄소의 기화를 방지하였다. 펌프에 의하여 가압된 이산화탄소는 추출조로 이송되었고 일정 압력과 온도로 유지된 후 추출조 출구로 나가면서 대기압으로 감압, 팽창되면서 이산화탄소와 추출물로 분리되었다. 이 때 이산화탄소의 유량은 1.3ml/min이었다.

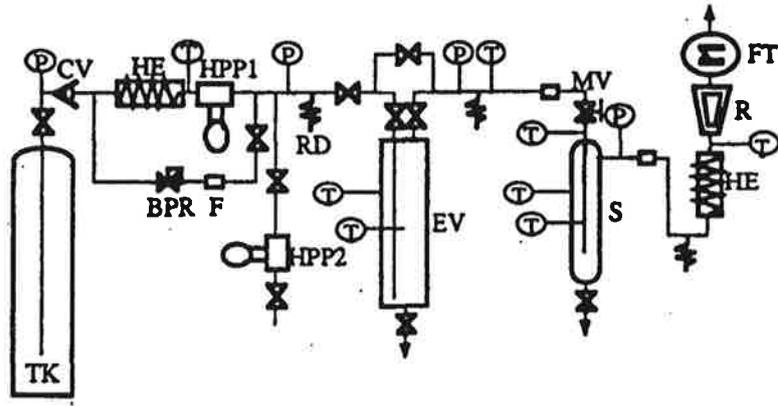


Fig. 1. A flow diagram for the supercritical fluid extraction process.

2. 콜레스테롤 분석

초임계 이산화탄소에 의하여 추출된 시료의 콜레스테롤 분석은 Fenton 과 Sim(1991)⁽⁸⁾의 방법에 의하여 실시하였다. 시료 0.3g에 internal standard(5 α -cholestane) 0.5ml와 hydrolysis solution 10ml를 넣고 60°C water bath에서 1시간 반응시킨 후 증류수 10ml와 hexane 5ml을 넣고 혼합하여 1000rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층의 hexane층만을 모았다. 여러 번 반복 추출하여 모아진 hexane용액을 여과하여 용매취가 없어질 때까지 농축하고 다시 hexane 1ml로 녹여 1 μ l를 GC에 injection하였다.

1) GC의 분석조건

Gas chromatography의 기종은 HEWLETT PACKARD 6890(H. W. Co., Avondale, PA)의 것을 사용하였고 Column은 Supelco SE-30 Fused Silica Capillary Column(30m 0.25mm ID 0.25 μ m film)이었다. Oven의 온도는 265°C로 맞추었고 detector는 flame ionization detector(FID)를 사용하였고 detector의 온도는 290°C이었다. Injection port의 온도는 280°C이었으며 Carrier gas로는 헬륨을 사용하였다. Run time은 15분이었고 injection 양

은 1 μ l이었다.

3. 지방산 분석

1) 시료의 지방 추출

초임계유체추출 후 시료의 지방 추출은 Folch 등(1958)⁽⁹⁾의 방법에 의하여 실시하였다. 균질한 난황분을 chloroform과 methanol의 2 : 1 혼합용액을 시료의 4배 정도의 양으로 하여 붓고 지방이 추출되도록 하였다. 탈지면과 여과장치를 사용하여 용액을 여과한 후 여과용액의 약 1/4 정도의 증류수를 첨가하여 3,000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리 후 하층액을 취하여 분액여두에 옮겨 담고 chloroform층이 완전히 분리될 때까지 정치시킨 후 chloroform층을 취하여 chloroform을 완전히 증발시킨 후 지방을 준비하였다. 지방을 추출한 다음에는 아래의 방법으로 전처리 하였다.

2) 시료의 지방산 전처리

시료의 지방산 전처리는 Morrison과 Smith(1964)⁽¹⁰⁾의 방법으로 실시하였다. 추출한 지방 8~20mg을 정확히 취한 후 0.5N NaOH 2ml를 가하여 sand bath에서 15분간 가열한 후 냉각시키고 BF₃-methanol 용액4ml를 가한 후 15분간 sand bath에서 가열하였다. 가열 후 완전히 냉각시키고 heptane 2ml, NaCl 포화용액 4ml를 가하여 vortex에서 1분간 혼합하였다. 혼합 후 30분간 실온에서 정치시키고 주사기 acro disk를 사용하여 heptane층을 여과한 후 injection하였다.

3) GC의 분석조건

Gas chromatography의 기종은 HEWLETT PACKARD 6890(H. W. Co., Avondale, PA)의 것을 사용하였고 Column은 Omegawax 320 fused with silica capillary Column(30m×0.32mm ID)이었으며 Column내 film 두께는 0.25 mm이었다. Column의 온도는 처음에는 170℃에서 5분간 holding시킨 다음 분당 2.5℃씩 올려서 17분간 holding하여 210℃로 맞추었고 detector는 flame ionization detector(FID)를 사용하였고 detector의 온도는

260℃이었다. Injection port의 온도는 250℃이었으며 Carrier gas로는 헬륨을 분당 35ml씩 흘려주었으며 수소는 분당 0.8kg, 공기는 분당 1.2kg씩 흘려주었다. run time은 40분이었고 injection 양은 1 μ l이었다.

4. 수분 분석

AOAC법(1990)⁽¹¹⁾에 의하여 분석하였다.

5. 색도 측정

추출 후 시료의 색도 측정은 Color difference meter(Yasuda Seiki Seisakusho LTD., Japan, UC 600-IV)를 이용하여 L(명도), a(적도), b(황적도)값을 측정하였다. 이 때의 표준색은 L=89.2, a=0.921, b=0.783이었다.

6. 통계 분석

실험 data 분석은 통계분석용 SAS program⁽¹²⁾을 사용하여 p<0.05 수준에서 Duncan의 다중검정으로⁽¹³⁾ 비교 분석하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

보조용매로서 에탄올과 메탄올을 사용하여 추출압력 5,000psi, 추출시간 2시간, 추출온도를 50℃로 고정하고 이산화탄소의 유량을 1.0ml/min으로 하여 추출한 후 콜레스테롤 제거율과 중량 감소율을 알아보고 추출후 잔류물의 지방산 조성의 변화와 색도 변화를 알아보았다. 우선 보조용매로서 에탄올을 사용하였을 경우에 table 1에 나타난 바와 같이 사용하는 대조구에서의 콜레스테롤 제거율이 77.05%이었으며 2.5% 에탄올을 사용하면 88.45%, 5%에서는 83.95%로서 7.5%에서는 93.95%로서 에탄올의 양을 증가시키면 콜레스테롤 제거율도 증가하였다. 이러한 결과는 난황분을 추출 온도 50℃, 추출시간 1시간, 추출압력 15mpa에서 이산화탄소만을 사용하였을 때보다 에탄올을 5% 사용하였을 때 지방 추출과 콜레스테롤 제거가 증가하였다⁽¹⁴⁾는 보고와 일치하였다. Zeidler와 King(1994)⁽¹⁵⁾은 에탄올을 사용하였을 경우에 콜레스테롤의 용해성이 증가하여 5% 에탄올의 병용하였을 경우에 난황분으로부터 콜레스테롤의 제거가 71.4%에서 83%로 증가하였다고 보고하였다. Hardarottir 등(1988)⁽¹⁶⁾은 연어근육으로부터 지방과 콜레스테롤을 제거하기 위하여 4,000psi, 40℃에서 초임계 이산화탄소의 단독사용으로 78%의 지방을 제거하였고, 에탄올을 병용하였을 경우에는 97%의 지방을 제거하여 에탄올은 용매의 극성을 증가시켜 지단백질 복합체의 분리를 도와 추출을 촉진하였다고 보고하였다. 그러나 10.0% 사용에서는 84.71%로서 오히려 에탄올의 사용량을 늘리면 콜레스테롤 제거율이 낮아졌는데 이러한 결과는 한 등(1998)⁽¹⁷⁾이 홍화로부터 황색소를 추출하는데 물을 보조용매로서 0-14%까지 사용하였을 경우에 6-10% 사용하였을 때에 추출수율이 가장 높게 나타났고 그 이상의 농도비를 사용하였을 경우에는 감소하는 경향을 나타내었다는 보고와 유사하게 나타났는데 이것은 보조용매를 사용함으로써 이산화탄소의 흐름이 원활히 이루어지지 못하였기 때문이라 사료되었다. 에탄올 병용에 의한 중량감소율은 유의적인 차이

Table 1. Effect of supercritical carbon dioxide extraction of dried egg yolk with ethanol on cholesterol reduction and weight loss.

Ethanol content(%)	Cholesterol reduction(%)	Weight loss(%)	(%)
0	77.05 ^c	27.67 ^c	76.16 ^a
2.5	88.45 ^b	29.89 ^a	57.88 ^{ab}
5.0	83.95 ^b	27.11 ^a	+30.46 ^{bc}
7.5	93.45 ^a	20.78 ^a	+69.28 ^d
10.0	84.71 ^b	9.33 ^b	+127.88 ^e

Treatment condition ; Extraction pressure : 5,000psi, Extraction time : 2 hr.,

CO₂ flow rate : 1.0±0.1ml/min, Extraction temperature : 50°C

^{a~e} : Means with the same letter in the same column are not significantly different (p < 0.05)

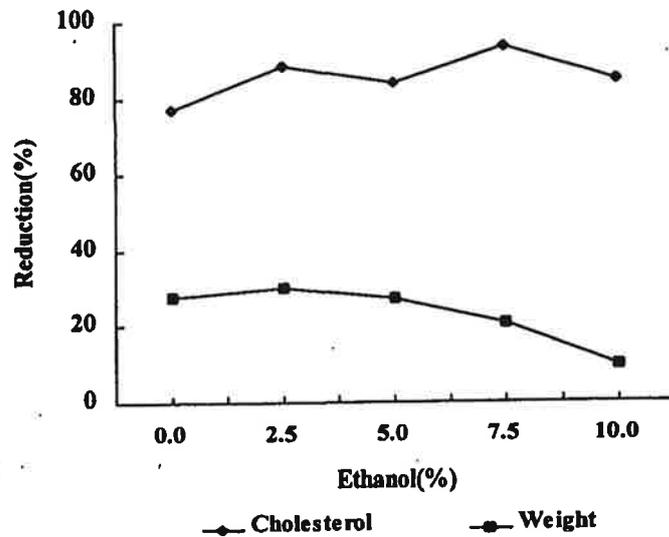


Fig. 2. Effect of supercritical carbon dioxide extraction of dried egg yolk with ethanol on cholesterol reduction and weight loss.

($P < 0.05$)를 보이지 않았으며 10.0% 사용에서만이 9.33%로서 중량감소율이 감소하였는데 이것은 콜레스테롤 제거가 제대로 이루어지지 않았기 때문에 중량감소율이 적었다.

Table 2. Changes of fatty acid from supercritical carbon dioxide extraction treated egg yolk powder various ethanol content.

Fatty acid	Control	Ethanol content(%)				
		0	2.5	5.0	7.5	10.0
16:0	27.17 ^d	27.00 ^c	27.68 ^b	28.41 ^a	28.25 ^a	28.37 ^a
18:0	9.25 ^d	11.06 ^c	12.29 ^b	13.29 ^a	12.75 ^{ab}	12.95 ^{ab}
18:1 ω 9	44.39 ^a	42.15 ^b	39.61 ^c	36.97 ^e	38.66 ^d	38.72 ^d
18:1 ω 7	2.25 ^a	2.18 ^b	2.05 ^c	1.96 ^e	2.00 ^d	2.01 ^d
18:2 ω 6	14.60 ^d	14.85 ^c	14.92 ^{bc}	15.17 ^a	15.09 ^a	15.06 ^{ab}
20:4 ω 6	1.82 ^c	2.75 ^b	3.45 ^{ab}	4.20 ^a	3.24 ^b	2.88 ^b

Treatment condition ; Extraction pressure : 5,000psi, Extraction time : 2 hr.,
 CO₂ flow rate : 1.0±0.1ml/min, Extraction temperature : 50°C
^{a-e} : Means with the same letter in the same column are not significantly different ($p < 0.05$)

에탄올 병용에 따른 추출 후 잔류물의 지방산 조성의 변화는 table 2에 나타낸 바와 같이 에탄올의 사용에 따라 C16:0과 C18:0이 5.0% 사용까지는 다소 증가하기는 그 이상의 첨가에서는 차이가 없었으며 C18:1와 C18:2의 불포화지방산은 감소하였다. 추출 후 잔류물의 색도 변화를 알아본 결과 table 3에 나타낸 바와 같이 보조용매의 사용이 증가할수록 L값은 감소하였고 a값은 차이가 없었으며 b값은 증가하였다

Table 3. Changes of color values from supercritical carbon dioxide extraction treated egg yolk powder various ethanol content.

Ethanol content(%)	Color value		
	L	a	b
Control	74.87 ^c	2.80 ^{ab}	28.33 ^c
0	78.47 ^a	1.88 ^b	27.33 ^d
2.5	78.97 ^a	2.41 ^a	28.77 ^{bc}
5.0	77.40 ^b	2.96 ^{ab}	29.07 ^b
7.5	74.53 ^c	3.63 ^a	30.30 ^a
10.0	73.20 ^d	3.31 ^a	29.47 ^{ab}

Treatment condition ; Extraction pressure : 5,000psi,

Extraction time : 2 hr., CO₂ flow rate : 1.0±0.1ml/min

^{a-f} : Means with the same letter in the same column are not significantly different (p < 0.05)

추출압력 5,000psi, 추출시간 2시간, 추출온도를 50℃로 고정하고 이산화탄소의 유량을 1.0ml/min으로 하고 보조용매로서 메탄올을 사용하여 추출한 후 콜레스테롤 제거율, 중량 감소율 및 수분 감소율을 table 4에 나타내었다. 메탄올의 첨가량을 증가시키면 콜레스테롤 제거율도 증가하였으나 7.5%이상의 첨가구에서는 이산화탄소의 흐름이 방해를 받아 콜레스테롤의 제거율이 오히려 감소하는 경향을 나타내었으며 중량 감소율은 5% 사용까지는 차이가 없었으나 7.5% 이상의 사용에서는 중량감소율이 감소하였다. 메탄올 사용에 따른 추출 후 잔류물의 지방산 조성의 변화는 table 5에 나타낸 바와 같이 에탄올의 사용에서의 경우와 비슷한 양상을 보였으며 포화 지방산인 C16:0과 C18:0이 다소 증가하기는 하나 큰 차이가 없었으며 C18:1과 C18:2의 불포화지방산은 감소하였다. 추출 후 잔류물의 색도 변화를 알아본 결과 table 6에 나타낸 바와 같이 에탄올 사용에서의 비슷한 결과를 보였는데 메탄올의 사용이 증가할수록 L값은 감소하였고 a값은 차이가 없었으며 b값은 증가하였다

Table 4. Effect of supercritical carbon dioxide extraction of dried egg yolk with methanol on cholesterol reduction and weight loss.

Methanol content(%)	Cholesterol reduction(%)	Weight loss(%)	(%)
0	77.05 ^d	27.67 ^a	76.16 ^b
2.5	81.23 ^c	29.67 ^a	51.75 ^a
5.0	91.90 ^b	27.22 ^a	+28.43 ^a
7.5	81.91 ^a	12.78 ^a	+76.16 ^a
10.0	70.97 ^b	8.67 ^a	+100.06 ^a

Treatment condition ; Extraction pressure : 5,000psi, Extraction time : 2 hr.,
 CO₂ flow rate : 1.0±0.1ml/min, Extraction temperature : 50℃
^{a-c} : Means with the same letter in the same column are not significantly different (p < 0.05)

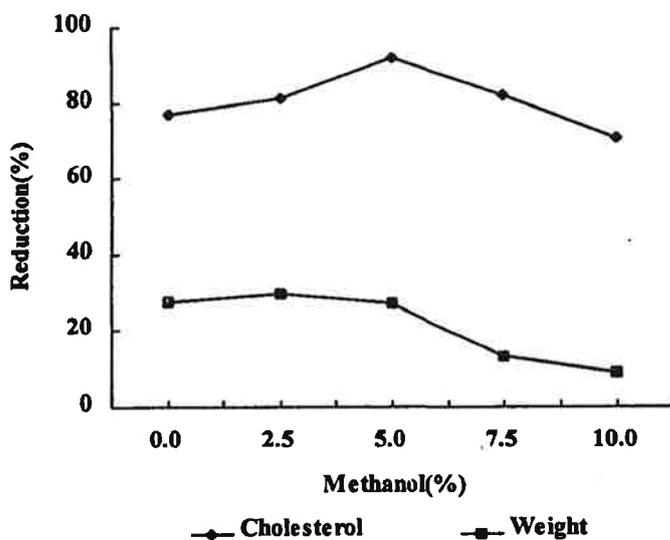


Fig. 3. Effect of supercritical carbon dioxide extraction of dried egg yolk with methanol on cholesterol reduction and weight loss.

Table 5. Changes of fatty acid from supercritical carbon dioxide extraction treated egg yolk powder at various methanol content.

Fatty acid	Control	Methanol content(%)				
		0	2.5	5.0	7.5	10.0
16:0	27.17 ^a	27.00 ^{ab}	27.86 ^a	26.99 ^a	27.76 ^a	27.11 ^{ab}
18:0	9.25 ^{ab}	11.06 ^c	12.00 ^a	10.69 ^d	11.65 ^b	11.77 ^b
18:1 ω 9	44.39 ^a	42.15 ^c	39.35 ^f	42.77 ^b	40.20 ^e	40.97 ^d
18:1 ω 7	2.25 ^a	2.18 ^b	2.04 ^e	2.19 ^b	2.09 ^d	2.12 ^c
18:2 ω 6	14.60 ^c	14.85 ^b	15.08 ^a	14.82 ^b	15.06 ^a	14.83 ^b
20:4 ω 6	1.82 ^d	2.75 ^c	3.68 ^a	2.55 ^c	3.23 ^b	3.20 ^b

Treatment condition ; Extraction pressure : 5,000psi, Extraction time : 2 hr.,
 CO₂ flow rate : 1.0±0.1ml/min, Extraction temperature : 50°C
^{a-e} : Means with the same letter in the same column are not significantly different (p < 0.05)

Table 6. Changes of color values from supercritical carbon dioxide extraction treated egg yolk powder at various methanol content.

Methanol content(%)	Color value		
	L	a	b
Control	74.87 ^d	2.80 ^b	28.33 ^b
0	78.47 ^b	1.88 ^a	27.33 ^c
2.5	79.90 ^a	2.42 ^{ab}	28.07 ^b
5.0	77.83 ^b	2.22 ^b	29.13 ^a
7.5	76.03 ^c	2.89 ^a	29.07 ^a
10.0	75.50 ^c	2.66 ^{ab}	28.30 ^b

Treatment condition ; Extraction pressure : 5,000psi,
 Extraction time : 2 hr., CO₂ flow rate : 1.0±0.1ml/min
^{a-f} : Means with the same letter in the same column are not significantly different (p < 0.05)

제 4 절 참고문헌

1. 한석현 : 계란의 과학과 그 이용. 선진문화사. p. 79-91 (1996).
2. 한영근 : 콜레스테롤 이야기. 삼성기획.p. 23-27 (1995).
3. Rizvi S. S. H, Benado A. L., Zollweg, J. A., and Daniels, J. A. : Supercritical fluid extraction: fundamental principles and modeling methods, *Food Technology*, 40, 55-65 (1986).
4. Froning G. W., Wehling, R. L., Cuppett, S. L., Pierce, M. M., Niemann, L. and Siekman, D. K. : Extraction of cholesterol and other lipid from dried egg yolk using supercritical carbon dioxide, *J. of Food Science*, 55(1), 95-98 (1990).
5. Warren, M. W. and Ball, H. R. JR. : Lipid composition and supercritical carbon dioxide reduced cholesterol dried egg yolk^{1,2,3}, *Poultry Science*. 70(9), 1991-1997 (1991).
6. Bringe, N. A. and Cheng J. : Low fat, low-cholesterol egg yolk in food applications, *Food Technology*, 5, 94-106 (1995).
7. Mark, A. M. and Krukonis, V. J. : Supercritical fluid extraction, Butterworth Publication(1993).
8. Fenton M. and Sim, J. S. : Determination of egg yolk cholesterol content by on-column capillary gas chromatography, *J. of Chromatography*, 540, 323-329 (1991).
9. Folch, J., Lees, M. and Sloan, S. : A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissue, *J. Bio. Chem.* 226, 447-509 (1958).
10. Morison, M. R. and Smith L. M. : Preparation of fatty acid methylesters and dimethylacetals from liquid boron fluoride methanol, *J. Lipid Res.*, 5, 600-608 (1964).

11. A.O.A.C : Official method of analytical, 15th edition. Association of official analytical chemist, Washington, D.C.
12. Stephenie, P. J. : SAS/SAT™ Guide for personal computers, Version 6 Edition, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. p. 58 (1985).
13. Duncan, D. B. : Multifl range and F test, *Biometrics*, 11, 1 (1955).
14. Rossi M., E. Spedicato and Schiraldi, A. : Improvement of supercritical CO₂ extraction of egg lipids by means of ethanolic entrainer. *Ital. J. Food Sci.* 4. 249-255 (1990).
15. Zeidler G., Pasin, G. and King, A. : Removing cholesterol from liquid egg yolk by carbon dioxide-supercritical fluid extraction, Egg uses and processing technologies, New Development, CAB International, p. 115-126 (1994).
16. Hardarottir I. and Kinsella, J. E. : Extraction of lipid and cholesterol from fish muscle with supercritical fluids, *J. of Food Sci.* 53(6) 1656-1658 (1988).
17. 한병석, 김공한, 정인석 : 초임계 이산화탄소를 이용한 홍화로부터 황색소 추출. *한국농화학회지*. 41(5), 363-366 (1998).

여 백

제 8 장 식물성유지와 초임계추출법에 의한 저콜레스테롤 난황 생산 및 가공식품 개발

제 1 절 서 설

계란은 양질의 단백질, 비타민, 무기질을 함유하고 있고, 용이한 소화도, 저렴한 단백질 가격, 우수한 향미, 다양한 부재료로의 용도로 인하여 천연의 완전식품임에도 불구하고 계란에 다량 함유되어 있는 포화지방산과 콜레스테롤이 관상성 심장병 및 고지혈증 등 발병의 한 요인으로 작용한다는 각종 역학적 연구가 발표되고 있고, 또한 American Heart Association에서도 이와 같은 질병의 예방을 위해서는 하루에 섭취하는 콜레스테롤량을 300mg 이하로 권장하고 있어 서구에서는 지난 수년 전부터 계란의 소비량은 계속 감소 추세에 있다.

이를 극복하기 위하여 계란 중 콜레스테롤 함량을 낮추려는 기술 개발이 시도되고 있는데, 이에 는 사료의 조성을 변화시키거나, 콜레스테롤의 흡수, 배설 및 합성과정을 저해시키는 약물을 닭에게 투여한다든지 혹은 닭의 품종이나 계통을 유전적으로 취사 선택하거나 닭의 산란주기, 나이, 계란의 크기 등을 조절함으로써 저콜레스테롤 계란을 생산하는 사양학적인 방법(Washburn and Nix, 1974; Hargis, 1988)과 계란에 직접적으로 물리, 화학적인 처리를 실시하여 콜레스테롤을 저하시키는 방법으로 흡착제나 효소를 이용하거나, 용매추출법을 이용하여 콜레스테롤을 제거하는 방법이 있다. 그런데 위 방법들은 계란의 지방산 조성을 변화시킬 수 있으나 콜레스테롤 제거효과는 적으며, 또한 계란의 기능성에 중요한 역할을 하는 극성 지질인 인지질도 제거할 뿐만 아니라, 단백질을 변성시킴으로써 기능적, 관능적 성질을 저해하는 문제점이 있다(Larsen and Froning, 1981; Bracco, 1982;

Warren et al., 1996; Conte et al., 1992; Stouffer et al., 1994; Smith et al., 1995; Bring et al., 1996). 따라서 계란중의 콜레스테롤만 선택적으로 제거하면서 나머지 성분이 유지되어 기능성과 관능적 성질을 변화시키지 않는 기술 개발이 시급한데, 이 때 고려할 사항으로 계란중의 protein fragmentation과 oligomerization에 관여하는 효소의 열변성 온도는 중성과 알칼리성 pH에서 lysozyme은 약 75°C이고, ribonuclease는 약 60°C이므로 (Arntfield et al., 1992) 단백질 변성을 방지하기 위해서는 가능한 낮은 온도에서 가공하여야 한다.

초임계유체는 식품으로부터 콜레스테롤을 선택적으로 추출하는데 이용되어 왔다. 그런데 초임계유체는 온도가 낮을수록 밀도가 높아 추출에 용이하므로 초임계이산화탄소를 이용하여 계란중의 단백질 변성에 관여하는 효소의 열변성 온도보다 저온에서 가공할 경우 단백질 변성을 방지할 수 있을 것으로 기대된다.

Leiner(1986)는 난황분을 40°C/300bar에서 초임계이산화탄소로 추출하였는데 추출물은 triglyceride, free fatty acids, waxes, 콜레스테롤을 함유하고 있는 반면 인지질은 추출잔류물에 남아 있었고, 단백질도 변성되지 않았다고 보고하였다. Froning 등(1994)도 난황분을 40~50°C, 163~374bar에서 추출하였는데 이산화탄소의 밀도가 높은 추출조건에서 비극성인 triglyceride는 초임계이산화탄소에 많이 용해되지만 극성인 인지질은 용해되지 않아 추출잔류물에 농축되었다고 보고하였다. 인지질은 계란의 바람직한 성질인 emulsion 특성과 밀접한 관련이 있으므로 추출잔류물에 농축되어지는 것은 계란의 기능적 성질을 유지하는데 필수적이다.

한편 계란으로부터 콜레스테롤을 추출할 때 시료로서 전란이나 난황액 보다는 수분이 적은 난황분이 유리한데 Novak et al.(1991)은 난황분을 40°C/276 bar, 난황액을 35°C/241bar에서 추출하였을 때 콜레스테롤 제거율은 각각 78.34%로서 난황액 추출은 비효율적이며 추출과정 중 난황액 일부가 응고되었다고 보고하였다.

따라서 본 장에서는 난황액으로부터 콜레스테롤을 효과적으로 제거하기 위하여 식용유지에 의한 방법과 초임계유체추출법을 함께 적용하여 효과적으로 난황액으로부터 콜레스테롤을 제거하는 방안을 강구하고자 시도한 결과와 저콜레스테롤 난황을 이용한 가공식품의 생산방안을 확립하고자 시험한 결과를 정리하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 재료

본 시험에 공시한 계란은 K축산 위생란을 사용하였으며 할란후 난황을 300 μ m의 sieve를 통과시켜 난황막 및 알끈을 제거한 후 공시하였다. 본 시험에 사용된 난황액의 수분함량은 47.5%이었다.

2. 난황의 대두유 혼합처리

난황에 일정량의 물과 함께 미세한 분산상을 만들기 위하여 가온한 대두유를 첨가하여 8,000rpm(IKA-Labortechnik, ultra-turrax T25, Germany)으로 교반하였다. 이를 일정 시간 분액여두에 방치하여 난황층과 기름층을 분리한 후 난황층에 함유된 콜레스테롤 함량 및 고형분 함량을 측정하였다.

3. 초임계이산화탄소에 의한 난황액으로부터 콜레스테롤 추출

초임계이산화탄소에 의한 난황액중 콜레스테롤 분리를 위하여 본 실험에서 사용한 초임계유체추출장치는 당 연구원에서 제작된 것이며 최대압력이 6,000psi까지 사용 가능한 연속유동형으로 개략도는 fig. 1과 같다. 먼저 추출조(EV)에 난황액 20ml를 주입하였다. 탄산가스는 실린더(TK)로부터 check valve(CV)를 거쳐 고압 피스톤펌프(HPP)에 의해 가압되었다. 이 때 탄산가스 주입부의 공동화현상을 방지하기 위하여 -20 $^{\circ}$ C 냉각조(HE)를 설치하여 이산화탄소의 기화를 방지하였다. 가압된 이산화탄소는 역압조절기

(BPR)에 의하여 압력이 조절되었고 압력계(P)에 의해 압력이 측정되었고 추출조로 이송되었다. 추출조의 내용적은 300ml이고, 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. 이 때 통과되는 탄산가스의 유량은 rotameter(R)에 의하여 측정되었고 적산부피는 totalizer(FT)에 의하여 측정되어진 후 대기 중으로 방출되었다.

실험변수로 추출압력은 3,000~5,000psi, 추출시간은 0.5~4시간, 추출온도는 35~55℃ 등 이었으며 보조용매의 사용여부, 농도 그리고 시료의 전처리 유무 등에 따라 난황액중의 콜레스테롤 함량 변화 정도와 증량감소율 등을 측정하였다.

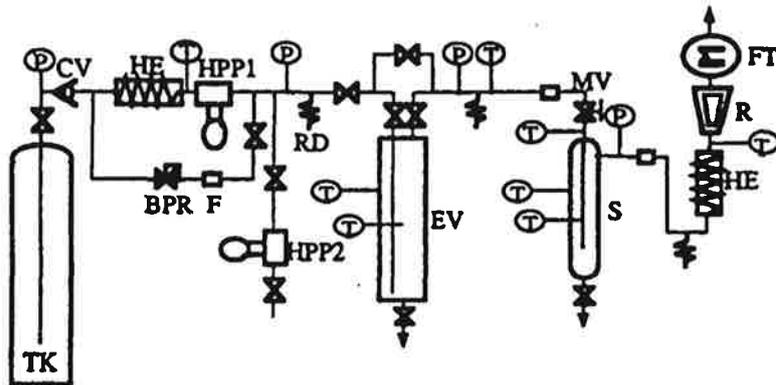


Fig. 1. Flow diagram of supercritical fluid extraction system.

(BPR : back pressure regulator, CV : check valve, EV : extraction vessel, F : filter, FT : flow totalizer, HE : heat exchanger, HPP : high pressure pump, MV : meter valve, P : pressure gauge, R : rotameter, S : separator, T : temperature indicator, TK : carbon dioxide tank)

4. 시료의 콜레스테롤 정량

난황 및 전처리된 시료의 콜레스테롤 정량은 Boehringer Mannheim kit(Cat. No. 139050, Germany) 를 사용하였다.

5. 색도 측정

추출잔류물의 색깔은 색도계(color and color difference meter, model TC-1, Tokyo Denshoku Co., LTD, Japan) 로 측정하여 L(명도), a(적색도), b(황색도)값으로 나타내었다.

6. 지방산 분석

추출잔유물의 지방산 조성은 GC(Hewlett-Packard 5890 series II)에 의하여 분석하였으며, column은 DMTM-Wax capillary(30m×0.25mm i.d.; Supelco, Inc., Bellefonte, PA, USA)를 사용하였고, 온도는 200℃를 유지하였다. 검출기는 FID를 사용하였고, 주입구 및 검출기의 온도는 250, 300℃로 유지하였다. 운반기체로서 질소가스는 split ratio를 1 : 100으로 주입하였다.

7. 아미노산 분석

아미노산 분석은 난황 시료 1g을 6N HCL로 산가수분해한 다음 PITC(Phenyliso-thiocyanate)유도체 시약으로 반응시켜 적절히 회석한 다음 HPLC(Waters P/N 07370)에 주입하여 정량하였다(A. A, handbook, 1997).

8. 점도

250ml용 비이커에 5,000rpm으로 균질된 시료를 200ml씩 준비하여 상온(25℃)에서 5시간 유지시킨 후 Brookfield-Viscometer(Model LV, Brookfield Engineering Lab., U. S. A)의 3번 LV spindle을 이용하여

12rpm에서 수치가 안정될 때까지 약 5분간씩 3회 반복 측정하였다. 측정된 값은 다음과 같이 계산하였다.

$$\begin{aligned} \text{점도(centipoise, mPa.s)} &= \text{value of dial reading} \times 100(\text{factor}) \\ \text{centipoise}/100 &= \text{ps(poise)} \end{aligned}$$

9. 콜레스테롤 분해산물 측정

콜레스테롤 분해산물을 측정하기 위하여 실리카겔이 도포된 plate(Merck사 제품)을 이용하여 thin-layer chromatography를 실시하였다. 전개 용매는 chloroform과 diethyl ether의 6 : 4 혼합 용매를 사용하였으며, 2, 7'-dichlorofluorescein을 분무하여 254nm의 UV light 아래에서 확인하였다.

10. 통계분석

평균값 및 표준오차의 산출은 3반복한 실험 데이터를 SAS program을 사용하여 얻어졌으며 Duncan의 다중검정방법으로 5% 수준에서 유의성을 검정하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 초임계이산화탄소에 의한 난황액으로부터 콜레스테롤 제거

본 연구는 계란의 기능적, 관능적 성질에 영향을 미치는 극성지질(인지질)은 추출되지 않고 콜레스테롤만 선택적으로 제거하기 위하여 난황액을 초임계이산화탄소를 이용하여 35~55℃, 3,000~5,000psi, 0.5~4시간의 운전 조건을 적용하였다. 본 실험에 사용한 난황액은 K축산에서 생산된 일반란을 원료로 하였으며 수분함량은 47.5%이었다. 난황액을 초임계이산화탄소

로 온도, 압력, 시간을 달리하여 추출한 후 추출잔류물의 콜레스테롤 함량을 측정된 결과 table 1에 나타낸 바와 같다.

추출온도 40℃에서 3,000~5,000psi의 추출압력으로 난황액으로부터 콜레스테롤의 제거를 시도한 바 3,000psi에서의 6.7%에서 추출압력이 증가할수록 콜레스테롤 제거율이 증가하여 5,000psi에서는 최대 11.1% 까지 제거할 수 있었으나 그 이상은 제거할 수 없었으며 응고현상이 전처리구에서 일어났다. 이는 추출압력의 증가에 따라 이산화탄소의 밀도가 증가했기 때문이며 이산화탄소에 의해 pH가 낮아졌기 때문에 응고현상이 일어난 것으로 사료된다.

Table 1. Effect of supercritical carbon dioxide extraction of liquid egg yolk at various pressure on cholesterol removal and weight loss.

Pressure(p.s.i.)	Cholesterol removal(%)	Weight loss(%)
3,000	6.7 ^d	3.2 ^d
3,500	8.2 ^c	4.3 ^c
4,000	10.0 ^b	4.9 ^b
4,500	10.8 ^{ab}	5.2 ^b
5,000	11.1 ^a	6.0 ^a

^{a, b, c, d} : Means with the same letter at the same column are not significantly different(p<0.05)

Treatment conditions ; Extraction time : 1 hr, Extraction temperature : 40℃

Bulley와 Labay(1991)도 난황분을 40℃에서 추출압력을 150, 200, 360bar로 증가시켰을 때 난황분의 용해도가 360bar에서 급격히 증가하였으며 동일 압력에서 온도를 변화시켰을 때보다는 동일 온도에서 압력을 변화시켰을 때 난황분의 용해도가 급격히 증가하였다고 보고하였다. 콜레스테롤 제거율도 207, 276, 345bar에서 각각 13.2, 25.4, 28.5%로 동일온도에서 추출압력의 증가에 따라 콜레스테롤 제거율은 증가하였는데 이는 추출압력의 증가에 따라 이산화탄소의 밀도가 증가하기 때문이다. Froning et al.(1990)도 45℃에서 추출압력을 238과 306bar로 달리하여 난황분을 추출하였을 때 추출잔류물중의 지방은 7.58, 20.69% 감소하였으며, 콜레스테롤은 28.0과 65.5% 감소하였다고 보고하였다. 한편 압력을 207bar에서 276bar로 증가시켰을 때 콜레스테롤이 12.2% 더 제거된 반면 276bar에서 345bar로 압력을 증가시켜도 콜레스테롤이 3.1% 밖에 더 이상 제거되지 않아 추출온도와 압력 조건은 40℃/274bar로 하였다. Zeidler et al.(1994)도 순수 콜레스테롤의 초임제이산화탄소에 대한 용해도가 172bar에서는 급격히 증가하였으나 241bar 이상에서는 증가폭이 적었다고 보고하였다.

추출온도와 압력이 40℃/4,000psi에서 추출시간은 0.5~4시간으로 달리하여 난황액을 추출하였을 때 난황액 중 콜레스테롤 제거율은 추출시간이 경과할수록 높아져서 30분간의 추출에 의해서는 8.0%이었으나 4시간 추출까지 상승하여 11.2%의 콜레스테롤 제거율을 나타내었다. 즉, 동일온도와 압력하에서 추출시간이 증가함에 따라 콜레스테롤 제거율은 증가하였다. 이는 추출시간에 따라 이산화탄소의 소비량이 증가함으로 초임제이산화탄소의 용해능력 증가에 기인한다고 보인다.

추출압력 4,000psi에서 추출온도를 35, 40, 45, 50, 55℃로 달리하여 2시간 동안 난황액을 추출하였을 때 콜레스테롤의 제거율은 각각 11.1, 11.0, 10.8, 9.7, 7.8%이었다(Table 3). 동일압력, 동일시간에 추출온도의 감소에 따라 난황분의 추출수율은 증가하였는데 이는 추출온도의 감소에 따라 이산화탄소의 밀도가 증가하기 때문이다. Bulley와 Labay(1991)도 난황분을

360bar에서 추출온도를 75℃에서 55℃로 저하시켰을 때 난황분의 용해도가 1.45배 증가하였다고 보고한 바 있다.

난황분에서 콜레스테롤의 제거시험은 제 5, 6, 7장에서 나타낸 바와 같이 비교적 손쉽게 이루어져 50℃의 온도하에서 5,000psi의 압력으로 2시간 만에 90% 이상의 콜레스테롤을 제거할 수 있었다. 그러나 난황액으로부터의 콜레스테롤 제거는 table 3에 나타낸 바와 같이 11.0%에서 머물렀다.

따라서 난황액으로부터 콜레스테롤의 제거효율을 높이기 위하여 난황액에 식용유를 첨가한 후 초임계추출을 시도하였다. 그 결과 table 4에 나타낸 바와 같이 콜레스테롤의 제거수율은 2배 이상 높일 수 있었다. 추출압력 3,000psi에서 30%까지의 콜레스테롤을 제거할 수 있었고 추출압력이 증가함에 따라서 제거율도 높아져 5,000psi에서는 42.5%까지 제거율이 향상되었다. 이때 사용된 원료는 난황액과 대두유를 1 : 2로 혼합한 것이었다.

Table 2. Effect of supercritical carbon dioxide extraction of liquid egg yolk at various time on cholesterol removal and weight loss.

Extraction time(hr.)	Cholesterol removal(%)	Weight loss(%)
0.5 (30min)	0.8 ^b	0.5 ^b
1	10.5 ^a	5.2 ^a
2	10.9 ^a	5.1 ^a
3	10.8 ^a	5.9 ^a
4	11.2 ^a	5.6 ^a

^{a b} : Means with the same letter at the same column are not significantly different(p<0.05)

Treatment conditions ; extraction pressure : 4,000 psi, extraction temperature : 40℃

Table 3. Effect of supercritical carbon dioxide extraction of liquid egg yolk at various temperature on cholesterol removal and weight loss.

Extraction temperature(°C)	Cholesterol removal(%)	Weight loss(%)
35	11.1 ^a	5.1 ^a
40	11.0 ^a	5.3 ^a
45	10.8 ^{ab}	5.1 ^a
50	9.7 ^b	4.8 ^b
55	7.8 ^c	4.1 ^c

^{a, b, c} : Means with the same letter at the same column are not significantly different(p<0.05)

Treatment conditions ; extraction pressure : 4,000 psi, extraction time : 2 hr.

Table 4. Effect of pressure on cholesterol removal and weight loss of soybean oil added liquid egg yolk by supercritical carbon dioxide extraction.

Pressure(p.s.i.)	Cholesterol removal(%)	Weight loss(%)
3,000	30.1 ^c	14.5 ^b
3,500	40.3 ^b	19.8 ^a
4,000	42.7 ^a	20.2 ^a
4,500	43.0 ^a	21.3 ^a
5,000	42.5 ^a	20.9 ^a

^{a, b, c} : Means with the same letter at the same column are not significantly different(p<0.05)

Treatment conditions ; yolk to oil ratio = 1 : 2, extraction time : 1hr.,
extraction temperature : 40°C

대두유를 혼합한 난황액을 추출압력 4,000psi, 추출온도 40℃의 조건에서 추출시간에 따른 콜레스테롤 제거율을 조사한 결과 table 5에서 나타난 바와 같이 30분에서 시작하여 4시간까지 추출시간이 증가할수록 제거율이 높아졌으며 2시간의 추출로서 50.6%의 콜레스테롤을 제거할 수 있었다. 즉, 추출시간에 따른 난황액으로부터의 콜레스테롤 제거율의 변화는 추출시간 30분에서 2시간까지는 직선적으로 증가하였으나 2시간 이상의 추출시간에서는 그 증가율이 미미하였다. 따라서 적절한 추출시간은 2시간으로 사료된다.

Table 5. Effect of extraction time on cholesterol removal and weight loss of soybean oil added liquid egg yolk by supercritical carbon dioxide extraction.

Extraction time(hr.)	Cholesterol removal(%)	Weight loss(%)
0.5 (30min)	36.3 ^c	17.9 ^c
1	42.5 ^b	22.7 ^b
2	50.6 ^a	26.8 ^a
3	51.2 ^a	28.3 ^a
4	50.9 ^a	27.2 ^a

a, b, c: Means with the same letter at the same column are not significantly different(p<0.05).

Treatment conditions ; yolk to oil ratio=1 : 2, extraction pressure : 4,000psi, extraction temperature : 40℃

난황액과 대두유를 1 : 2로 혼합한 유화물을 추출압력 4,000psi, 추출시간 2시간의 조건에서 온도조건별로 콜레스테롤의 제거율을 조사한 결과 table 6에서 나타낸 바와 같이 35℃에서 가장 높은 제거율을 나타내어 52%이었으며 온도가 증가함에 따라서 낮은 제거율을 나타내어 55℃에서는

46.3%의 콜레스테롤 제거율을 나타내었다. 이것은 온도가 낮아짐에 따라 탄산가스의 밀도가 높아져 콜레스테롤의 용해도가 증가하기 때문인 것으로 사료된다.

Table 6. Effect of temperature on cholesterol removal and weight loss(%) of soybean oil added liquid egg yolk by supercritical carbon dioxide extraction.

Extraction temperature(°C)	Cholesterol removal(%)	Weight loss(%)
35	52.0 ^a	27.2 ^a
40	51.4 ^a	28.1 ^a
45	48.2 ^{ab}	25.3 ^b
50	46.7 ^b	20.7 ^c
55	46.3 ^b	20.9 ^c

^{a, b, c} : Means with the same letter at the same column are not significantly different($p < 0.05$)

Treatment conditions ; yolk to oil ratio = 1 : 2, extraction pressure : 4,000 psi extraction time : 2 hr.

SFE장치를 이용하여 이산화탄소를 단일 용매로 사용할 때에 비하여 ethanol 등 부용매를 사용할 때 콜레스테롤의 제거효율을 높일 수 있다는 연구결과가 제 7 장에서 증명된 바 본 시험에서 대두유와 혼합된 난황액에 대하여 co-solvent의 적용 시험을 실시한 결과 그 결과는 table 7에 나타난 바와 같다.

Co-solvent를 사용하지 않았을 때에 비하여 5% ethanol을 적용하였을 때 58.1%로 6%의 제거효율이 개선되었으며 5% methanol을 적용하였을 때에는 59.8%로 7.8%의 제거효율이 개선되었다(table 7). 10%의 ethanol과 methanol을 적용하였을 때에는 각각 57.6%, 59.5%의 콜레스테롤 제거율을 나타내어 ethanol에 비하여 methanol의 사용이 더욱 효과적인 것으로 나타

났다. 그러나 식용의 문제점 등을 고려할 때 ethanol 5%를 사용함이 좋을 것으로 사료된다.

이상의 시험결과로 미루어 난황에 식용유를 첨가하여 초임계유체추출을 실시할 경우에는 난황만으로 추출할 경우에 비하여 약 5배의 추출효과를 얻을 수 있었으며, co-solvent와 식용유 등을 함께 적용하여 초임계추출함이 가장 효과적인 방법이라 할 수 있겠다.

2. 식물성유지에 의해 콜레스테롤 저하된 난황액의 초임계추출에 의한 콜레스테롤 제거

한편 식용유와 증류수로 난황액내의 콜레스테롤을 1차 제거한 난황액을 이용하여 초임계유체를 적용하여 콜레스테롤을 제거할 경우 그 제거효율을 알아보고자 시험을 실시한 바 있으며 그 결과를 table 8에 나타낸 바와 같다.

Table 7. Effect of co-solvent on cholesterol removal and weight loss of soybean oil added liquid egg yolk by supercritical carbon dioxide extraction.

Co-solvent (%)	Cholesterol removal(%)	Weight loss(%)
0	52.0 ^b	25.9 ^b
5% ethanol	58.1 ^a	28.7 ^a
10% ethanol	57.6 ^a	27.2 ^a
5% methanol	59.8 ^a	28.5 ^a
10% methanol	59.5 ^a	27.8 ^a

^{a, b} : Means with the same letter at the same column are not significantly different(p<0.05)

Treatment conditions ; yolk to oil ratio = 1 : 2, extraction time : 2 hr.

extraction temperature : 35°C, extraction pressure : 4,000 psi

Table 8. Effect of pressure on cholesterol removal and weight loss of oil treated liquid egg yolk* by supercritical carbon dioxide extraction with co-solvent**.

Pressure(p.s.i.)	Cholesterol removal(%)	Weight loss(%)
3,000	70.1 ^d	30.4 ^b
3,500	79.4 ^c	32.6 ^a
4,000	81.6 ^b	32.0 ^a
4,500	85.4 ^a	32.5 ^a
5,000	86.5 ^a	33.8 ^a

^{a, b, c, d} : Means with the same letter at the same column are not significantly different($p < 0.05$)

* Oil treated egg yolk is 61% cholesterol reduced by soybean oil and distilled water treatment(soybean oil : yolk : D.W. = 2 : 1 : 0.4).

** co-solvent ; 5% ethanol

*** SFE conditions ; extraction time : 2 hr, extraction temperature : 35°C

대두유와 증류수를 난황액에 대해 각각 2배, 0.4배 첨가하여 난황의 유화를 불안정하게 한 후 원심분리하여 난황으로부터 콜레스테롤을 제거한 시료(콜레스테롤 제거율 61%)를 이용하여 5%의 ethanol을 co-solvent로 사용하고 추출온도 35°C, 추출시간 2시간의 조건에서 추출압력에 따른 콜레스테롤 제거율을 검토한 결과 table 8에 나타난 바와 같다. 3,000psi의 조건에서는 원료 난황액 대비 70%의 콜레스테롤이 제거되었으며 추출압력이 높아짐에 따라 콜레스테롤 제거율이 높아져 4,500psi의 조건에서 85.4%의 콜레스테롤 제거율을 나타내었다. 콜레스테롤이 61% 제거된 난황액을 이

용하여 추출압력 4,500psi, 추출온도 35℃의 조건에서 co-solvent로서 5%의 ethanol을 적용하였을 때 추출시간에 따른 콜레스테롤 제거율을 측정한 결과 table 9에 나타낸 바와 같다. 30분간의 추출에서 75.2%의 콜레스테롤추출율을 나타내었으나 시간에 따라 제거율이 증가하여 2시간 이후에는 85% 이상의 제거율을 나타내었다.

추출압력 4,500psi, 추출시간 3시간의 조건에서 추출온도별 전처리전 난황액의 추출온도별 콜레스테롤 제거율을 조사한 결과 table 10에 나타낸 바와 같다. 40℃에서의 콜레스테롤 제거율이 85.1%이었으나 50℃ 이상의 온도 조건하에서는 78.4%로 콜레스테롤 제거율이 떨어졌으며 35℃의 조건하에서는 86.5%의 가장 높은 콜레스테롤 제거율을 나타내었다.

이상의 결과로 대두유와 SFE의 혼합적용에 의해서 난황액중의 콜레스테롤을 85% 이상 제거할 수 있는 공정이 확립되었으며 대두유의 첨가에 의해서 난황액의 변성현상도 현저히 방지되었다.

Table 9. Effect of extraction time on cholesterol removal and weight loss of oil treated liquid egg yolk* by supercritical carbon dioxide extraction with co-solvent**.

Extraction time(hr.)	Cholesterol removal(%)	Weight loss(%)
0.5 (30 min)	75.2 ^c	31.2 ^b
1	80.0 ^b	30.9 ^b
2	85.4 ^a	32.5 ^a
3	86.5 ^a	33.8 ^a
4	86.2 ^a	32.7 ^a

^{a, b, c} : Means with the same letter at the same column are not significantly different(p<0.05)

* Oil treated egg yolk is 61% cholesterol reduced by soybean oil and distilled water treatment(soybean oil : yolk : D.W. = 2 : 1 : 0.4).

** Co-solvent ; 5% ethanol

*** SFE conditions ; extraction temperature : 35℃, extraction pressure : 4500 psi

Table 10. Effect of extraction temperature on cholesterol removal and weight loss of oil treated liquid egg yolk* by supercritical carbon dioxide extraction with co-solvent**.

Extraction temperature(°C)	Cholesterol removal(%)	Weight loss(%)
35	86.5 ^a	33.8 ^a
40	85.1 ^{ab}	33.2 ^a
45	82.9 ^b	31.5 ^{ab}
50	78.4 ^c	30.2 ^b
55	76.5 ^c	30.6 ^b

a, b, c: Means with the same letter at the same column are not significantly different(p<0.05).

* Oil treated egg yolk is 61% cholesterol reduced by soybean oil and distilled water treatment(soybean oil : yolk : D.W. = 2 : 1 : 0.4).

** Co-solvent ; 5% ethanol

*** SFE conditions ; extraction pressure : 4,500 psi, extraction time : 3 hr.

3. 식물성유지와 초임계유체처리에 의해 생산된 저콜레스테롤 난황의 품질 특성

식물성유지인 대두유 처리와 초임계유체추출법의 병용처리에 의해 생산된 난황액(콜레스테롤 제거율 : 86%)과 원료 난황액의 가공적성과 관능적 품질을 비교 검사한 결과는 table 11에 나타낸 바와 같다.

유화특성을 검토하기 위하여 유화력과 유화안정성을 시험한 결과 유화력은 신선란이 16.7ml로서 콜레스테롤이 86% 제거된 난황액에 비하여 다소 높았으나 통계적인 유의성이 없었으므로 콜레스테롤의 제거에 의해 유화력의 변화는 없는 것으로 평가할 수 있었다. 또한 유화안정도에 있어서도 콜레스테롤 제거 전, 후 변화가 일어나지 않는 것으로 나타났다.

거품특성은 거품형성능과 거품안정성으로 평가했으며 거품형성능에 있어서 신선란과 저콜레스테롤 계란이 각각 2.3 및 2.0으로서 제거 전, 후 그 차이가 인정되지 않았으나 거품안정성에 있어서는 신선란의 경우 15.4%, 저콜레스테롤 난황액의 경우 19.5%로 다소 떨어지는 것으로 나타났다.

Table 11. Comparison test of functional properties of cholesterol reduced liquid egg yolk by hurdle technique¹⁾.

Functional properties	Raw egg yolk ²⁾	CHL reduced egg yolk ³⁾
Emulsion properties		
- Emulsion capacity ⁴⁾	16.7 ^a	16.0 ^b
- Emulsion stability ⁵⁾	0 ^a	0 ^a
Foam properties		
- Foam capacity ⁶⁾	2.3 ^a	2.0 ^a
- Foam stability ⁷⁾	15.4 ^b	19.5 ^a
Apparent viscosity (CP)	35,600 ^a	28,000 ^b
Hunter color value		
- L (lightness)	79.01 ^b	84.21 ^a
- a (redness)	3.03 ^a	2.65 ^b
- b (yellowness)	34.84 ^a	31.76 ^b

^{a, b} : Means with the same letter at the same row are not significantly different ($p < 0.05$).

¹⁾ Supercritical carbon dioxide extraction with co-solvent system was used consequently to reduce cholesterol from cholesterol reduced liquid egg yolk treated by soybean oil and distilled water.

²⁾ Diluted to 1 : 3 = yolk : D.W.

³⁾ Diluted to 1 : 3 = yolk : D.W., 86% cholesterol removed egg yolk

⁴⁾ Expressed with consumed soybean oil (ml) to emulsifying 1 gram of diluted egg yolk

⁵⁾ Released oil amount (%) from egg yolk emulsion

⁶⁾ Foamed yolk volume / initial egg yolk volume

⁷⁾ Released water amount (%) from foamed egg yolk

점도에 있어서도 저콜레스테롤 난황이 신선란에 비해서 다소 낮은 결과를 나타내었다. 관능적 품질 중 중요한 특성인 색택을 객관적으로 평가하기 위하여 Hunter color value를 측정된 결과 명도 “L” 값이 콜레스테롤 제거 후 높아 졌으며 적색도와 황색도인 “a” 값과 “b” 값이 다소 낮아졌다. 그 이유는 콜레스테롤 제거과정에서 난황색의 원인물질인 지용성 성분의 xanthophyll이 콜레스테롤 제거와 함께 유실됨으로서 L value가 높아지고 a, b value가 낮아지는 결과를 나타내어 전체적으로 난황색인 황색이 감소되고 밝아지는 경향으로 변한 것으로 사료된다.

Table 12. Comparison of fatty acid profiles(%) of cholesterol reduced liquid egg yolk by hurdle technique¹⁾ and raw egg yolk.

Fatty acids	Raw egg yolk ²⁾	CHL reduced egg yolk ³⁾	Fatty acid change
C16:0	25.1 ^a	25.0 ^a	○
C16:1	3.7 ^a	2.2 ^b	-
C18:0	8.8 ^a	8.9 ^a	○
C18:1	43.5 ^a	39.4 ^b	-
C18:2	13.3 ^b	17.2 ^a	+
C18:3	0.4 ^b	2.3 ^a	+

^{a, b} : Means with the same letter at the same row are not significantly different($p < 0.05$).

¹⁾ Supercritical carbon dioxide extraction with co-solvent system was used consequently to reduce cholesterol from cholesterol reduced liquid egg yolk treated by soybean oil and distilled water.

²⁾ Diluted to 1 : 3 = yolk : D.W.

³⁾ Diluted to 1 : 3 = yolk : D.W., 86% cholesterol removed egg yolk

식물성 유지인 대두유의 처리와 초임계유체추출의 병용 처리에 의해 생산된 난황액의 지방산 조성과 아미노산 조성을 비교한 결과를 table 12와 13에 나타내었다.

Table 12에서 나타난 바와 같이 원료 난황의 주요 지방산은 올레산과 팔미트산으로서 각각 43.5% 및 25.1%의 조성을 나타내었으며 리놀레산과 스테아르산의 비율도 높아 13.3% 및 8.8%의 비율을 차지하였다. 그러나 콜레스테롤이 제거된 난황의 지방산은 리놀레산(18:2)과 리놀렌산(18:3)의 비율이 각각 17.2% 및 2.3%로서 원료 난황의 13.3%, 0.4%에 비해서 각각 4~2%씩 증가하였다. 그리고 올레산(18:1)과 팔미트레산(16:1)의 함량은 각각 39.4%와 2.2%로 원료 난황의 그것에 비해 각각 4~1%씩 감소된 현상을 나타내었다.

이러한 원인은 대두유를 혼합하여 난황액을 전처리하는 과정에서 대두유의 주성분인 리놀레산이 난황액에 혼입된 것으로 보이며 리놀레산도 대두유에는 난황에 비해 상대적으로 높은 7~8% 정도 함유되어 있기 때문에 난황의 지방산 조성에 영향을 미친 것으로 사료된다.

한편 Hung 등(1995)은 초임계추출시 난황의 지방산은 포화지방산인 팔미트산(16:0)과 스테아르산(18:0)의 함량이 증가하고 팔미트레산(16:1)과 올레산(18:1)의 함량이 상대적으로 감소한다고 한 바 있으나 본 연구 결과에서는 팔미트레산과 올레산은 감소했으나 팔미트산과 스테아르산은 증가하지 않은 것으로 나타났다. 이것은 대두유가 난황액의 지방성분과 교체되지 않고 대두유가 일부 혼입되었을 가능성을 시사해 주는 분석 결과이다.

콜레스테롤이 제거된 난황과 원료 난황의 아미노산 조성을 분석한 결과 table 13에 나타난 바와 같다. 원료 난황을 구성하고 있는 주요 아미노산은 글루탐산, 아스파르트산 및 로이신으로 나타났으며 콜레스테롤이 제거된 난황액의 아미노산에서도 주요 아미노산은 원료 난황과 동일하게 글루탐산, 아스파르트산 및 로이신으로 분석되었다.

Table 13. Comparison of amino acid composition of cholesterol reduced liquid egg yolk by hurdle technique¹⁾ and raw egg yolk.

Amino acid	Composition (mg a.a/g N)	
	Raw egg yolk ²⁾	CHL reduced egg yolk ³⁾
Ile	310	330
Leu	536	540
Lys	457	439
Met	162	170
Cys	132	130
Phe	261	270
Tyr	256	250
Thr	300	310
Val	360	350
His	150	140
Arg	440	437
Ala	310	312
Asp	579	569
Glu	720	718
Gly	180	190
Pro	240	220
Ser	460	456
Total	5,853 ^a	5,831 ^a

^a : Means with the same letter at the same row are not significantly different(p<0.05)

¹⁾ Supercritical carbon dioxide extraction with co-solvent system was used consequently to reduce cholesterol from cholesterol reduced liquid egg yolk treated by soybean oil and distilled water.

²⁾ Diluted to 1 : 3 = yolk : D.W.

³⁾ Diluted to 1 : 3 = yolk : D.W., 86% cholesterol removed egg yolk

또한 원료 난황의 제한아미노산으로는 히스티딘과 시스틴, 메티오닌으로 나타났으며 콜레스테롤이 제거된 난황의 경우에도 제한 아미노산은 이와 동일한 종류인 것으로 나타났다. 그 밖의 종류별 함량에 있어서도 원료 난황의 아미노산 조성과 콜레스테롤이 제거된 난황의 아미노산 조성에는 서로 차이가 없는 것으로 나타났다. 난황인 질소단위그램에 대한 아미노산의 양은 원료 난황의 경우에는 5,853mg으로 나타났으며 콜레스테롤 제거된 난황의 경우에는 5,831mg으로 나타나 단백질 중 아미노산의 양도 큰 변화가 없는 것으로 나타났다.

4. 콜레스테롤 분해효소를 이용하여 생산된 저콜레스테롤 계란의 품질 특성

콜레스테롤 분해효소 6종류(cholesterol oxidase from *Pseudomonas fluorescens*, *Cellulomonas species*, *Brevibacterium species*, *Norcadia erythropolis*, *Streptomyces species*, *Schizophyllum commune*)에 대해서 난황액의 콜레스테롤 분해능을 실험한 결과 *Pseudomonas fluorescens*로부터 분리된 cholesterol oxidase가 난황액 20%용액에서 38℃의 온도에서 난황 cholesterol μ M당 0.5 unit를 적용하였을 때 24시간 만에 84%의 콜레스테롤 제거율을 나타낸 바 있어 가장 효율이 높은 것으로 나타난 바 있다.

따라서 cholesterol oxidase Pf(*Pseudomonas fluorescens*)를 이용하여 콜레스테롤이 제거된 난황액의 품질특성을 조사한 결과를 요약하면 다음과 같다.

유화특성과 거품특성, 점도 및 색도를 측정된 결과 table 14에 나타난 바와 같다. 유화특성에 있어서는 유화력과 유화안정도 공히 cholesterol oxidase Pf처리한 것이 원료 난황과 큰 차이가 없는 것으로 나타났으며 거품특성에 있어서도 기포력과 기포안정성에 있어서는 원료 난황의 유화력이 1.8배를 나타내었으며 콜레스테롤 제거된 난황의 유화력도 1.6배를 나타내

Table 14. Comparison test of functional properties raw egg yolk and of cholesterol reduced liquid egg yolk¹⁾ cholesterol oxidase from *Pseudomonas fluorescens*

Functional properties	Raw egg yolk ²⁾	CHL reduced egg yolk ¹⁾
Emulsion properties		
- Emulsion capacity ³⁾	13.5 ^a	13.3 ^a
- Emulsion stability ⁴⁾	0 ^a	0 ^a
Foam properties		
- Foam capacity ⁵⁾	1.8 ^a	1.6 ^a
- Foam stability ⁶⁾	17.5 ^a	16.2 ^a
Apparent viscosity (CP)	28,000 ^a	25,400 ^b
Hunter color value		
- L (lightness)	75.26 ^b	75.01 ^b
- a (redness)	3.24 ^a	3.16 ^a
- b (yellowness)	33.54 ^a	33.29 ^a

^{a, b} : Means with the same letter at the same row are not significantly different(p<0.05)

¹⁾ Diluted to 20% and reacted by cholesterol oxidase(84% cholesterol reduced)

²⁾ Diluted to 20%

³⁾ Expressed with consumed soybean oil(ml) to emulsifying 1 gram of diluted egg yolk

⁴⁾ Released oil amount(%) from egg yolk emulsion

⁵⁾ Foamed yolk volume / initial egg yolk volume

⁶⁾ Released water amount(%) from foamed egg yolk

있으나 서로 유의차가 인정되지 않았다. 유화 안정도에 있어서도 각각 17.5, 16.2%를 나타내어 평균간에 유의차가 인정되지 않았다. 겉보기 점도에 있어서는 효소처리된 난황의 점도가 원료 난황의 점도에 비해서 낮게 나타났다($P < 0.05$).

난황의 색깔에 있어서는 Hunter color value를 측정한 결과 L, a, b치에 있어서 공히 원료 난황과 콜레스테롤제거 난황이 서로 차이가 없는 것으로 나타났다. 따라서 콜레스테롤 분해효소에 의해 콜레스테롤이 제거된 난황은 점도를 제외하고는 기능성에 있어서 큰 차이가 없는 것으로 나타나 난황으로부터 콜레스테롤 제거에 효과적인 방법인 것으로 평가되었다.

Table 15. Comparison of major fatty acid profiles(%) of raw egg yolk and cholesterol reduced liquid egg yolk by cholesterol oxidase¹⁾.

Fatty acids	Raw egg yolk	CHL reduced egg yolk	Fatty acid change
C16:0	25.1 ^a	26.4 ^b	+
C16:1	3.7 ^a	3.8 ^a	○
C18:0	8.8 ^b	10.0 ^a	+
C18:1	43.5 ^a	42.1 ^b	-
C18:2	13.3 ^a	11.8 ^b	-
C18:3	0.4 ^b	0.5 ^b	○

^{a, b} : Means with the same letter at the same row are not significantly different($p < 0.05$)

¹⁾ Cholesterol oxidase from *Pseudomonas fluorescens*

효소에 의해 콜레스테롤이 저하된 난황의 지방산 조성의 변화를 살펴보기 위하여 시험한 결과 table 15에 나타난 바와 같이 팔미트레산(16:1)과

리놀렌산(18:3)은 분해효소의 처리 영향을 받지 않았으나 올레산(18:1)과 리놀레산(18:2)의 경우에는 그 함량이 1% 가량 낮아지는 경향을 나타내었다. 반면 팔미트산(16:0)과 스테아르산(18:0)은 오히려 그 함량이 높아지는 경향을 나타내었다. 따라서 콜레스테롤 분해효소에 의하여 난황으로부터 콜레스테롤을 제거할 경우 지방산 조성에 다소 변화가 있는 것으로 나타났으며 이러한 지방산의 변화가 지방성분과 관련된 기타 기능적 특성에 어떠한 영향을 미치는지 추가적인 연구가 요망된다.

콜레스테롤 분해효소에 의해 콜레스테롤이 저하된 난황의 아미노산 조성을 검토한 결과는 table 16에 나타난 바와 같다.

효소처리된 난황의 주요 아미노산은 글루탐산, 아스파르트산, 로이신이었으며 이것은 원료 난황의 주요 아미노산과 일치하였다. 효소처리된 난황의 제한 아미노산은 히스티딘, 시스틴 및 메티오닌이었으며 이 경우도 원료 난황의 제한 아미노산과 일치하였다. 난황의 단위 질소량에 대한 아미노산의 량에 있어서도 효소처리 이후 변화가 인정되지 않아 콜레스테롤 분해효소가 난황 단백질의 아미노산 조성에 큰 변화를 미치지 않는 것으로 나타났다.

결론적으로 콜레스테롤 분해효소 처리에 의해 생산된 난황은 점도를 제외한 기능특성에 있어서 큰 변화가 없었으며 아미노산 조성에 있어서도 큰 변화가 없었으나 지방산 조성에 있어서는 올레산과 리놀레산이 다소 낮아지는 경향을 나타낸 반면 팔미트산과 스테아르산은 다소 함량이 높아지는 변화를 나타내었다.

콜레스테롤 분해효소에 의해서 난황으로부터 콜레스테롤을 제거할 경우 콜레스테롤 분해산물의 생성 여부를 검토하기 위하여 5-cholesten-3-one, 4-cholesten-3-one 및 7-ketocholesterol의 standard를 구입하여 thin-layer chromatography로서 전개한 결과 4-cholesten-3-one의 Rf영역에서 일부 검출되었으며 기타 물질의 Rf영역에서는 관련되는 물질이 검출되지 않았다. Aihara 등(1988)에 의한 4-cholesten-3-one은 즉시 비스테로이성 물질로 전환되기

때문에 문제가 되지 않는다고 보고한 바 있다.

Table 16. Comparison of amino acid composition of raw egg yolk and cholesterol reduced liquid egg yolk by cholesterol oxidase¹⁾.

Amino acid	Composition (mg a.a/g N)	
	Raw egg yolk ²⁾	CHL reduced egg yolk ³⁾
Ile	310	290
Leu	536	520
Lys	457	468
Met	162	156
Cys	132	120
Phe	261	270
Tyr	256	260
Thr	300	296
Val	360	352
His	150	143
Arg	440	429
Ala	310	320
Asp	579	590
Glu	720	712
Gly	180	183
Pro	240	230
Ser	460	448
Total	5,853 ^a	5,787 ^a

^a : Means with the same letter at the same row are not significantly different(p<0.05)

¹⁾ Cholesterol oxidase from *Pseudomonas fluorescens*

5. 저콜레스테롤계란을 이용한 계란가공제품의 생산공정 개발

초임계유체추출법과 식물성유지, co-solvent의 병용처리법으로 콜레스테롤의 86%가 제거된 난황액의 이용도를 높이고자 유산균을 함유하는 계란발효음료를 개발하는데 목표를 두고 그 생산공정을 연구한 바 주요 결과는 다음과 같다.

콜레스테롤이 제거된 난황액은 고형분 12.5%의 것으로서 여기에 난백액을 적정량 첨가하여 고형분을 맞추어 시험에 공시하였다. 혼합된 액란은 균질기를 이용하여 10,000rpm의 속도로 1~10분간 균질하여 여과하고 증류수를 혼합하여 원하는 고형분으로 조절하였다. 우선 적절한 가열살균조건을 설정하기 위하여 12%의 고형분을 갖도록 전란액을 조제하고 여기에 유산발효를 돕기 위해 lactose와 sucrose를 회석전란액에 대하여 6% 첨가하였으며 table 17에서와 같이 각 조건별로 가열살균 후 *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium longum*, *Streptococcus thermophilus*의 혼합균주를 초기 유산균수가 10^6 이상 되도록 0.02%를 첨가하여 37℃에서 24시간 배양하면서 전란액의 pH를 측정하여 발효의 진행 여부를 관찰하였다.

Table 17에 나타낸 바와 같이 65~120℃까지 가열살균 온도를 변화시키면서 30분간 살균한 후 37℃에서 배양하면서 24시간 동안 pH의 변화를 관찰한 바 65℃에서 30분간의 살균 조건에서는 pH가 떨어지긴 하였으나 24시간 경과 후에도 4.9를 나타내었다. 그리고 75℃ 이상의 가열살균 조건의 경우에는 65℃ 보다 낮은 pH를 나타내긴 하였으나 4.5 이상으로서 유산균발효음료의 생산시 병원성 미생물이 억제되는 목표 pH인 4.5 미만에 도달하지 못하였다. 이러한 이유는 65℃ 이하의 조건에서는 계란의 난백에 존재하는 여러 가지 종류의 항미생물 효소 및 단백질 중 내열성 효소를 적절히 불활성화 시키지 못한 것으로 추정된다. 또한 75℃ 이상의 살균 조건에서도 계란의 pH가 4.5 미만으로 떨어지지 않았으므로 이는 난백의 농도가 너무 높을 경우 높은 점도로 인해서 유산균의 생육에 저해를받는 것으로 판단되어 점도를 낮추기 위하여 고형분의 함량을 회석하여 그 영향을 보고자 하

였으며 그 결과는 table 18에 나타낸 바와 같다.

Table 17. Changes of pH in low cholesterol liquid egg with different pasteurization temperature during incubation time.

Pasteurization temperature(°C)	Incubation time(hr.)			
	0	6	16	24
65	7.8 ^a	5.9 ^a	5.0 ^a	4.9 ^a
75	7.7 ^a	5.7 ^b	4.8 ^b	4.5 ^b
85	7.7 ^a	5.6 ^b	4.7 ^b	4.6 ^b
95	7.7 ^a	5.5 ^b	4.7 ^b	4.6 ^b
120	7.6 ^a	5.6 ^b	4.8 ^b	4.5 ^b

* Means of same supercripts within each column are not significantly different(p<0.05)

** Solid egg content : 12%, amount of sugars : 6%

Table 18. Changes of pH in low cholesterol liquid egg with different solid egg content during incubation time.

Solid egg content(%)	Incubation time(hr.)			
	0	6	16	24
12	7.6 ^a	5.4 ^a	4.9 ^a	4.5 ^a
10	7.6 ^a	4.9 ^b	4.4 ^b	4.2 ^b
8	7.7 ^a	5.0 ^b	4.2 ^c	4.1 ^b
6	7.7 ^a	5.1 ^b	4.2 ^c	4.0 ^b
4	7.7 ^a	5.0 ^b	4.2 ^c	4.0 ^b

* Means of same supercripts within each column are not significantly different(p<0.05)

** pasteurization temperature ; 90°C, 30 min, amount of sugars : 6%

시험에 사용한 전란액의 고형분은 12%이었으나 이를 희석하여 4%까지 단계적으로 시험한 결과 10% 이하의 전란액 고형분의 조건에서 비로소 16시간의 배양에 의해 pH4.4 이하로 떨어졌다. 전란액의 고형분을 10%로 조정하고 90℃에서 30분간 살균 처리할 경우의 당의 적정 첨가량을 결정하기 위하여 시험을 실시하였다. 당은 예비 실험을 통해서 lactose와 sucrose를 1 : 1 혼합하여 사용할 경우 기호성이 우수하여 lactose와 sucrose를 1 : 1로 혼합한 것을 희석 전란액에 대해 0~8%까지 첨가하면서 발효 특성을 관찰한 결과 table 19에 나타낸 바와 같다. 당을 전혀 첨가하지 않을 경우 유산균을 접종하였으나 발효가 전혀 일어나지 않아 24시간 경과 후에도 pH 7.8로서 큰 변화가 없었으며 2% 첨가하였을 경우 24시간 경과 후 pH 4.7로서 충분한 pH의 강하가 이루어지지 못하였다. 당의 첨가량이 4% 이상일 경우 비로소 24시간 배양후 pH 4.3이하로 떨어졌으며 4% 첨가의 경우에는 16시간 배양시 pH 4.5이었으므로 16시간 배양으로 완료할 경우에는 6% 이상의 당을 첨가하는 것이 안전할 것으로 사료된다. 스타터컬처는 대개 10^6 이상의 초기 세균수가 되도록 첨가하면 되지만 본 시험에서는 스타터컬처의 첨가량에 따른 발효 특성을 살펴봄으로서 스타터컬처의 과다한 사용을 지양할 수 있겠다는 판단하에 스타터컬처의 첨가량에 따른 배양중 pH변화를 관찰하였는 바 그 결과는 table 20에 나타낸 바와 같다. 본 시험의 초기에는 0.02%를 사용하였으나 table 20에 나타난 바와 같이 0.002%의 첨가에 의해서도 16시간만에 4.3 이하로 떨어지는 결과를 나타내었다. 따라서 0.01% 정도의 첨가량에 의해서도 유산발효를 성공적으로 이룰 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 실험실적인 조건과 현장에서의 조건이 다를 수 있기 때문에 유산균 스타터컬처의 사용량은 신중히 결정해야 될 것으로 판단된다. 다만 배양시간은 24시간 배양의 경우 pH의 강하가 4.0 미만의 수준으로 떨어져 관능적 특성이 저하될 뿐 아니라 제품의 저장성 측면에서도 발효시간은 16시간 정도가 적절할 것으로 사료된다.

Table 19. Changes of pH in low cholesterol liquid egg with different amount of sugars during incubation time.

Amount of sugars(%)	Incubation time(hr.)			
	0	6	16	24
0	7.6 ^a	7.7 ^a	7.6 ^a	7.8 ^a
2	7.8 ^a	5.5 ^b	5.0 ^b	4.7 ^b
4	7.7 ^a	4.9 ^c	4.5 ^c	4.3 ^c
6	7.7 ^a	4.8 ^c	4.3 ^c	3.9 ^d
8	7.8 ^a	4.8 ^c	4.2 ^c	3.8 ^d

* Means of same superscripts within each column are not significantly different(p<0.05)

** Solid egg content : 10%, pasteurization temp : 90°C, 30min

Table 20. Changes of pH in low cholesterol liquid egg with different starter culture amount during incubation time.

Starter culture(%)	Incubation time(hr.)			
	0	6	16	24
0.002	7.6 ^a	4.6 ^b	4.3 ^a	3.9 ^a
0.01	7.6 ^a	4.7 ^a	4.2 ^a	3.9 ^a
0.02	7.6 ^a	4.5 ^c	4.1 ^b	3.8 ^a
0.05	7.6 ^a	4.5 ^c	4.3 ^a	3.7 ^b
0.1	7.6 ^a	4.6 ^b	4.1 ^b	3.8 ^b

^{a b} : Means of same superscripts with in each column are not significantly different(p < 0.05)

** Solid egg content : 10%, amount of sugars : 6%, pasteurization temp. 90°C, 30min

여 백

제 9 장 Hurdle기법에 의한 저콜레스테롤 난황액의 생산 및 품질평가

제 1 절 서 설

난황은 약 50%가 고형물로서 단백질 16%, 지질 32%, 미네랄 2%, 탄수화물 1%로 구성되어 있다. 난황지질의 주요 성분은 트리글리세라이드, 인지질과 콜레스테롤이며 이 중 콜레스테롤은 난황 중의 1.6%로서 난황을 통한 콜레스테롤 섭취가 혈중 콜레스테롤을 높이며 심장질환 및 동맥경화를 일으킬 수 있는 요인이 될 수 있다는 소비자들의 부정적인 인식 때문에 특히 북미지역에서는 지난 수년간 계란의 소비량이 감소하고 있는 실정이며 이러한 추세를 극복하기 위한 일환으로 콜레스테롤 함량을 낮추려는 시도가 이루어지고 있다.

난황 중의 콜레스테롤을 제거하기 위한 기술적인 방법에는 계란에 물리, 화학적 처리를 실시하여 콜레스테롤을 저하시키는 방법으로 흡착제나 효소를 이용하거나 또는 초임계추출법 또는 용매추출법이 있고 식물성유지를 이용하여 난황의 콜레스테롤을 제거하는 방법 등이 있다. 그런데 물리, 화학적 방법은 계란의 극성 지질인 인지질도 제거하며, 단백질을 변성시키므로써 계란의 기능적, 관능적 성질을 저해하는 문제점이 있다. 따라서 계란중의 콜레스테롤만 선택적으로 제거하면서 나머지 성분이 유지되어 기능성과 관능적 성질을 변화시키지 않는 기술 개발이 시급한데, 이 때 고려할 사항으로 계란중의 protein fragmentation과 oligomerization에 관여하는 효소의 열변성 온도는 중성과 알칼리성 pH에서 lysozyme은 약 75℃이고, ribonuclease는 약 60℃이므로(Arntfield 등, 1992) 단백질 변성을 방지하기 위해서는 가능한 낮은 온도에서 가공하여야 한다.

따라서 본장에서는 난황으로부터 콜레스테롤을 제거함에 있어서 비교적 낮은 온도의 처리조건이면서 콜레스테롤을 효과적으로 제거하기 위하여 두 가지 이상의 콜레스테롤 제거방법을 적용하는 hurdle technique을 적용하였으며 이에 의해서 생산된 저콜레스테롤 난황에 대해 가공적성 등 품질평가를 실시하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 재료

본 시험에 공시한 계란은 K축산 위생란을 사용하였으며 할란후 난황을 300 μ m의 sieve를 통과시켜 난황막 및 알끈을 제거한 후 공시하였다. 본 시험에 사용된 난황액의 수분함량은 47.5%이었다.

2. β -cyclodextrin에 의한 난황액의 전처리

제 1 장의 실험결과에 따라 난황을 3배량의 증류수로 희석함과 동시에 β -cyclodextrin(셀덱스 B-100, 일본식품화학)의 몰비가 난황 콜레스테롤에 대해서 1 : 3이 되도록 첨가하여 35 $^{\circ}$ C에서 15분간 교반 후 5 $^{\circ}$ C까지 냉각하였다. 냉각된 혼합물은 2,000 \times G로 원심분리하여 β -CD \cdot cholesterol complex를 제거하고 잔존물을 시료로 공시하였다. 공시된 시료의 콜레스테롤 제거율은 75.0%이었으며 pH는 6.42, 잔존고형분은 68.2% 수준이었다.

3. 전처리된 난황액의 콜레스테롤 제거시험

β -cyclodextrin에 의하여 콜레스테롤이 조절된 난황액에 대해서 대두유를 이용한 추가적인 콜레스테롤 제거시험을 실시하기 위하여 이것의 pH를 1N KOH를 사용하여 pH 7, 8, 9로 조정후 난황액의 중량에 대하여 2배량의 대두유를 첨가하여 8,000rpm의 속도로 15분간 균질하여 일정시간 방치 후 원심분리함으로써 콜레스테롤을 제거하였다.

또한 β -cyclodextrin에 의해 콜레스테롤이 조절된 난황액에 대해 콜레스테롤 분해효소 *Norcadia erythropolis*(Ne), *Celluromonas species*(Cs), *Pseudomonas fluorescens*(Ps) 및 *Bribibacterium species*(Bs)의 4종류를 이용하였으며 0.1M potassium phosphate buffer(KPB), pH 7.0로서 0.2g/ml의 난황액을 만들어 효소를 적용하여 시험하였다. 각 효소의 최적 pH는 Ne가 7.0, Bs가 7.0, Cs와 Pf가 7.5이었으므로 pH조정은 따로 하지 않았다.

한편 β -cyclodextrin에 의해 콜레스테롤이 조절된 난황액에 대해 초임계 이산화탄소를 이용하여 35~55°C, 3,000~5,000psi, 0.5~4시간의 운전조건의 범위에서 초임계추출에 의한 콜레스테롤의 제거효과를 검토하였다.

4. 시료의 콜레스테롤 정량

난황 및 전처리된 시료의 콜레스테롤 정량은 Boehringer Mannheim kit(Cat. No. 139050, Germany) 를 사용하였다.

5. 색도 측정

추출잔류물의 색깔은 색도계(color and color difference meter, model TC-1, Tokyo Denshoku Co., LTD, Japan) 로 측정하여 L(명도), a(적색도), b(황색도)값으로 나타내었다.

6. 지방산 분석

추출잔유물의 지방산 조성은 GC(Hewlett-Packard 5890 series II)에 의하여 분석하였으며, column은 DMTM-Wax capillary(30m×0.25mm i.d.; Supelco, Inc., Bellefonte, PA, USA)를 사용하였고, 온도는 200°C를 유지하였다. 검출기는 FID를 사용하였고, 주입구 및 검출기의 온도는 250, 300°C로 유지하였다. 운반기체로서 질소가스는 split ratio를 1 : 100으로 주입하였다.

7. 점도

250ml용 비이커에 5,000rpm으로 균질된 시료를 200ml씩 준비하여 상온 (25℃)에서 5시간 유지시킨 후 Brookfield-Viscometer(Model LV, Brookfield Engineering Lab., U. S. A)의 3번 LV spindle을 이용하여 12rpm에서 수치가 안정될 때까지 약 5분간씩 3회 반복 측정하였다. 측정된 값은 다음과 같이 계산하였다.

$$\begin{aligned} \text{점도(centipoise, mPa.s)} &= \text{value of dial reading} \times 100(\text{factor}) \\ \text{centipoise}/100 &= \text{ps(poise)} \end{aligned}$$

8. 통계분석

평균값 및 표준오차의 산출은 3반복한 실험 데이터를 SAS program을 사용하여 얻어졌으며 Duncan의 다중검정방법으로 5% 수준에서 유의성을 검정하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 흡착제와 식물성유지 처리에 의한 난황콜레스테롤의 제거

흡착제에 의해 콜레스테롤을 제거하는 기본원리는 콜레스테롤과 구조가 유사한 물질을 이용하여 콜레스테롤과 선택적으로 결합시켜 난용성의 복합체를 형성시킨 후 원심분리 등을 통하여 분리 해내는 것이다. 또한 식물성유지에 의하여 콜레스테롤을 저하하는 방법은 난황의 유화상태를 물리, 화학적으로 불안정하게 만들어준 후 콜레스테롤이 없는 식물성유지를 첨가하여 난황의 콜레스테롤을 식물성유지 쪽으로 이동시킨 후 난황층과 기름층을 분리하는 방법이다. 전자와 후자의 방법에 의해 이미 본 연구에서는 난황으로부터 콜레스테롤을 일정 수준 분리하는데 성공하였으나 전자의 경우 흡착제의 첨가량이 많아질 경우 콜레스테롤의 제거율은 높아지나 점도가

높아져서 난황의 손실량이 커지거나 흡착제의 사용량에 따른 생산비용 증가 등이 문제점이 될 수 있었다. 한편 식물성유지 단독처리에 의해서도 콜레스테롤의 제거효율은 85% 이상 올릴 수 있었으나 대두유와 증류수의 사용량이 과다해 질 경우 최종제품인 저콜레스테롤계란의 사용범위가 한정될 수 있는 문제가 존재하였다. 따라서 본 연구에서는 흡착제와 식물성유지를 병용처리 함으로써 콜레스테롤 제거효율을 높이면서 수율과 품질을 향상시키기 위한 콜레스테롤 제거공정의 개발을 시도하였다. 흡착제로 사용할 수 있는 물질은 β -cyclodextrin, saponin, digitonin 및 silica gel 등이 있으나 본 시험에서는 가장 효과가 뛰어난 것으로 조사된 β -cyclodextrin을 사용하였다.

전분에 *Bacillus*속의 미생물이 생산하는 효소를 작용시켜 생산되는 β -cyclodextrin은 7개의 glucose 분자가 β -1, 4 glucosidic linkage로 환상의 구조를 이루는 물질로, 분자 내에서 여러 유기물을 포집하는 특성을 보유한다. 이 특성 중의 하나로 β -cyclodextrin(β -CD)은 난황중의 oil-water interface에 분포된 콜레스테롤과 결합하여 난용성의 복합체를 형성하는 특징을 가지고 있다. 난황으로부터 콜레스테롤을 제거하기 위한 최적 조건은 제 1 장의 연구결과에 의하면 난황과 β -CD를 반응시켜 β -CD-cholesterol complex를 제거하기 위한 최적 원심력, 온도, 교반시간은 각각 2,000g, 35°C, 15분이었으며 난황과 증류수의 최적 희석 비율은 1 : 3임을 확인할 수 있었다.

위의 최적 조건과 더불어 β -CD와 난황 중의 콜레스테롤의 물비가 3 : 1일 때 콜레스테롤의 제거율은 75.0%이었으며 잔존고형성분은 68.2%를 나타내었다. 그리고 β -CD와 콜레스테롤의 물비가 5 : 1일 때 콜레스테롤 제거율은 88.9%이었으며 잔존고형성분은 64.6%를 나타내었다. β -CD와 콜레스테롤의 물비를 6 : 1로 하였을 때는 콜레스테롤 제거율이 95.9%을 나타내었고 잔존고형성분은 56.9%로서 첨가 β -CD의 양이 많으면 많을수록 콜레스테롤 제거 효과는 상승되지만 난황의 유효 성분이 많이 유실됨을 알

수 있었다. 따라서 난황의 유효성분을 소실하지 않으면서 β -CD와 콜레스테롤의 몰비가 3 : 1일 때 콜레스테롤의 제거율이 75%로 비교적 높으므로 이러한 처리조건과 식물성유지의 처리조건을 병용함으로써 난황의 콜레스테롤을 효율적으로 제거코자 시험한 결과 다음과 같이 나타났다.

대두유를 난황액에 2배 첨가하여 난황중의 콜레스테롤을 제거하기 위하여 시험을 실시한 결과 Table 1에서와 같이 나타났다. β -cyclodextrin에 의해서 콜레스테롤이 제거된 난황액은 pH 6.42이었으며 이것의 pH를 1N KOH를 사용하여 pH 7, 8, 9로 조정한 후 대두유를 첨가하여 8,000rpm의 속도로 15분간 균질하여 일정시간 방치후 원심분리함으로써 콜레스테롤이 제거된 난황액을 얻었다. 콜레스테롤의 제거율은 pH가 증가함에 따라서 증가하여 pH를 조정하지 않았을 경우에는 85.3% 까지 콜레스테롤을 제거할 수 있었으며 pH 9에서의 제거율이 가장 높아 92%를 나타내었다. 고형분 잔존량은 대두유의 처리에 의해서 약 2-3% 정도 줄어드는 경향이었지만 pH의 변화에 따라서는 큰 변화가 나타나지 않았으며 단지 pH9일 경우 고형분 잔존량이 63.4%로 다소 낮은 경향을 나타내었다.

Table 1. Effect of pH and soybean oil application on cholesterol reduction and solid residue of decholesterolized liquid egg yolk with β -cyclodextrin.

Consecutive treatment	pH	Cholesterol reduction(%)	Solid residue(%)
β -cyclodextrin application	6.42	75.0 ^c	68.2 ^a
Soybean oil application*	6.42	85.3 ^b	65.7 ^{ab}
	7	87.2 ^b	64.6 ^{ab}
	8	89.6 ^{ab}	65.0 ^{ab}
	9	92.0 ^a	63.4 ^b

* added amount of soybean oil = 2 times of liquid egg yolk

^{a-c} : Means with the same letter in the same column are not significantly different ($p < 0.05$)

일반적으로 대두유의 첨가량은 난황의 콜레스테롤 제거율에 영향을 미치는 것으로 나타나 있으므로 β -cyclodextrin 처리에 의해서 콜레스테롤이 조절된 난황의 경우에도 대두유의 첨가량에 따라 그 제거율이 달라질 것으로 예측되어 시험을 실시하였으며 그 결과 Table 2에서와 같이 나타났다. 즉, 대두유의 첨가량이 증가함에 따라서 콜레스테롤 제거율이 증가하였으며 고형분의 잔존량에는 큰 변화가 없었다. 대두유를 난황액에 대해 3배 첨가할 경우 최고 95.4%의 콜레스테롤을 제거할 수 있었으며 대두유를 1:1 첨가하였을 경우에도 87.2%의 콜레스테롤 제거율을 나타내어 대두유 단독처리의 경우에 비해서 콜레스테롤의 제거율이 현저히 개선된 것으로 나타났다.

Table 2. Effect of soybean oil ratio to liquid yolk on cholesterol reduction and solid residue of decholesterolized egg yolk with β -cyclodextrin.

Soybean oil ratio to egg yolk*	Cholesterol reduction(%)	Solid residue(%)
1	87.2 ^d	64.7 ^a
2	92.0 ^c	63.4 ^b
2.5	93.2 ^b	63.0 ^b
3	95.4 ^a	63.1 ^b

* pH adjusted at 9 with 1N KOH

^{a-d} : Means with the same letter in the same column are not significantly different (p < 0.05)

2. 흡착제와 콜레스테롤 분해효소 처리에 의한 난황콜레스테롤의 제거
미생물이 생산하는 콜레스테롤 분해효소(COD)를 이용하여 콜레스테롤을 중간대사물로 분해시켜 콜레스테롤의 함량을 낮춰주는 방법은 경제적이

며 풍미에도 영향을 적게 주는 바람직한 방법으로 알려져 있다. 본 연구에서는 Ne (*Norcadia erythropolis*), Cs (*Celluromonas species*), Pf (*Pseudomonase fluorescens*) 및 Bs (*Bribibacterium species*) 네 종류의 콜레스테롤 분해효소(COD)를 사용하여 난황의 콜레스테롤을 제거하는데 있어 각 효소의 최적조건을 규명한 바 있다. 38℃에서 각 효소의 난황 콜레스테롤 제거능력은 Bs COD가 24시간 incubation하였을 때 12.06%로 가장 낮았고, Pf, Cs 와 Ne COD는 각각 84.25, 80.38 그리고 66.12%로서 Pf가 가장 콜레스테롤 제거 능력이 좋았으며 콜레스테롤 제거 능력별 효소의 순서는 Pf > Cs > Ne > Bs과 같았다.

이러한 콜레스테롤 분해효소의 효과를 보다 극대화하기 위하여 β -cyclodextrin으로 난황의 콜레스테롤을 1차 처리하여 75%의 콜레스테롤이 제거된 난황액에 콜레스테롤 분해효소를 적용하여 38℃의 반응조건에서 콜레스테롤 제거시험을 실시한 결과 Table 3에서와 같이 나타났다. 효소의 적용시 반응시간에 따른 각 효소별 콜레스테롤 제거율을 검토한 결과 Pf COD가 가장 높은 효과를 나타내어 반응 8시간 만에 95.8%의 콜레스테롤 제거효과를 나타내었으며 반응 24시간 이후에는 98.3%의 콜레스테롤 제거율을 나타내었다. 그러나 Ne COD의 경우에는 반응24시간이 경과한 후에도 79.2%의 낮은 콜레스테롤 제거율을 나타내었다. 그 밖의 효소인 Bs COD 및 Cs COD의 경우에는 반응 24시간 경과 후 각각 90% 이상의 콜레스테롤 제거율을 나타내었으나 Pf COD의 경우에 비해서는 낮은 효과를 나타내었다. 보다 낮은 온도에서 콜레스테롤 분해효소의 적용효과를 검토하기 위하여 4℃의 반응조건에서 시험한 결과 Table 4에서 나타난 바와 같이 Pf COD의 경우 24시간의 반응시간 경과 후에도 85.2%로서 38℃의 경우에 비해 낮게 나타나 효소의 작용 효율은 온도에 크게 좌우됨을 분명히 보여주었다. 결국 콜레스테롤 분해효소를 β -cyclodextrin과 병행하여

사용할 경우에는 Pf COD를 이용하여 적절한 조건으로 난황액에 적용할 경우 95% 이상 난황 콜레스테롤을 효과적으로 제거할 수 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 한가지의 제거방법이나 기술을 단독으로 사용하는 것에 비하여 두가지 이상의 제거기술을 동시에 적용함으로써 훨씬 효과적으로 콜레스테롤을 제거할 수 있는 방안이 될 수 있음을 제시해 주는 결과로 평가된다. 특히 콜레스테롤 분해효소의 사용으로 난황을 처리할 경우 비교적 그 처리방법이 간편하여 산업적으로 적용시 그 실용화 가능성이 높을 것으로 사료된다.

Table 3. Effect of reaction time and various cholesterol oxidases(COD) on cholesterol reduction of egg yolk decholesterolized with β -cyclodextrin at 38°C.

Reaction time(hr.)	COD from different microbial origin			
	Pf*	Cs*	Bs*	Ne*
0	75.0 ^f	75.0 ^f	75.0 ^f	75.0 ^p
2	87.3 ^e	83.7 ^e	80.4 ^e	78.3 ^a
4	90.6 ^d	85.5 ^d	82.3 ^d	78.3 ^a
8	95.8 ^c	90.6 ^c	84.6 ^c	78.1 ^a
10	97.2 ^b	93.3 ^b	89.2 ^b	78.1 ^a
24	98.3 ^a	95.1 ^a	91.1 ^a	79.2 ^a

* Pf(*Pseudomonas fluorescens*), Cs(*Cellulomonas species*),

Bs(*Brevibacterium species*), Ne(*Norcadia erythropolis*)

^{a-f} : Means with the same letter in the same column are not significantly different (p < 0.05)

Table 4. Effect of reaction time and various cholesterol oxidases(COD) on cholesterol reduction of egg yolk decholesterolized with β -cyclodextrin at 4°C.

Reaction time(hr.)	COD from different microbial origin			
	Pf*	Cs*	Bs*	Ne*
0	75.0 ^e	75.0 ^f	75.0 ^f	75.0 ^b
2	80.5 ^d	78.1 ^c	77.2 ^c	76.3 ^a
4	82.8 ^c	78.7 ^c	77.5 ^c	76.2 ^a
8	83.1 ^b	79.4 ^b	78.6 ^b	76.2 ^a
10	83.2 ^b	80.6 ^a	78.6 ^b	76.4 ^a
24	85.4 ^a	80.7 ^a	79.0 ^a	76.5 ^a

* Pf(*Pseudomonas fluorescens*), Cs(*Cellulomonas species*),

Bs(*Brevibacterium species*), Ne(*Norcadia erythropolis*)

^{a-f} : Means with the same letter in the same column are not significantly different ($p < 0.05$)

3. 흡착제와 초임계유체추출에 의한 난황콜레스테롤의 제거

초임계유체는 식품으로부터 콜레스테롤을 선택적으로 추출하는데 이용되어 왔다. 그런데 초임계유체는 온도가 낮을수록 밀도가 높아 추출에 용이하므로 초임계이산화탄소를 이용하여 계란중의 단백질 변성에 관여하는 효소의 열변성 온도보다 저온에서 가공할 경우 단백질 변성을 방지할 수 있으며 고품질의 저콜레스테롤 계란제품을 생산할 수 있게 된다. 그러나 초임계유체 단독으로는 난황액으로부터의 콜레스테롤 제거율이 낮아 10-50%에 불과하다. 따라서 β -cyclodextrin을 이용하여 난황으로부터 콜레스테롤을 75% 제거한 후 부가적으로 초임계유체추출을 적용하여 난황으로부터 콜레스테롤의 효과적인 제거를 시도하였다.

Leiner(1986)는 난황분을 40°C/300bar에서 초임계이산화탄소로 추출하였

는데 추출물은 triglyceride, free fatty acids, waxes, 콜레스테롤을 함유하고 있는 반면 인지질은 추출잔류물에 남아 있었고, 단백질도 변성되지 않았다고 보고하였다. Froning 등(1994)도 난황분을 40~50°C, 163~374bar에서 추출하였는데 이산화탄소의 밀도가 높은 추출조건에서 비극성인 triglyceride는 초임계이산화탄소에 많이 용해되지만 극성인 인지질은 용해되지 않아 추출잔류물에 농축되었다고 보고하였다. 인지질은 계란의 바람직한 성질인 emulsion 특성과 밀접한 관련이 있으므로 추출잔류물에 농축되어지는 것은 계란의 기능적 성질을 유지하는데 필수적이다. 또한 계란으로부터 콜레스테롤을 추출할 때 시료로서 전란이나 난황액보다는 수분이 적은 난황분이 유리한데 Novak et al.(1991)은 난황분을 40°C/276 bar, 난황액을 35°C/241bar에서 추출하였을 때 콜레스테롤 제거율은 각각 78.34%로서 난황액 추출은 비효율적이며 추출과정 중 난황액 일부가 응고되었다고 보고하였다.

Table 5. Effect of pressure on cholesterol reduction and weight loss of β -cyclodextrin treated liquid yolk* by supercritical carbon dioxide extraction with co-solvent**.

Pressure(p.s.i.)	Cholesterol reduction(%)	Weight loss(%)
3,000	78.2 ^d	31.3 ^c
3,500	85.2 ^c	33.2 ^b
4,000	88.0 ^b	33.9 ^b
4,500	90.7 ^a	34.6 ^a
5,000	92.4 ^a	35.2 ^a

a, b, c : Means with the same letter at the same column are not significantly different(p<0.05)

* β -cyclodextrin treated egg yolk is 75% cholesterol reduced one

** Co-solvent : 5% ethanol

*** SFE conditions : extraction time 2hrs., extraction temp. 35°C

본 연구는 계란의 기능적, 관능적 성질에 영향을 미치는 극성지질(인지질)은 추출되지 않고 콜레스테롤만 선택적으로 제거하기 위하여 β -cyclodextrin을 이용하여 난황으로부터 콜레스테롤을 75% 제거한 난황액을 초임계이산화탄소를 이용하여 35~55℃, 3,000~5,000psi, 0.5~4시간의 운전 조건을 적용하였다. 난황액의 초임계추출시 추출압력에 의한 영향을 검토한 결과 Table 5에서 나타난 바와 같이 추출압력이 높을수록 콜레스테롤의 제거율이 높아 5,000psi의 조건에서 92.4%의 난황 콜레스테롤을 제거할 수 있었다. 이때의 중량감소율은 35.2%로서 비교적 낮은 편이었다.

Table 6. Effect of extraction time on cholesterol reduction and weight loss of β -cyclodextrin treated liquid yolk* by supercritical carbon dioxide extraction with co-solvent**.

Extraction time(hr.)	Cholesterol removal(%)	Weight loss(%)
0.5 (30min)	80.8 ^d	32.0 ^b
1	86.3 ^c	33.1 ^b
2	90.7 ^b	34.6 ^a
3	91.2 ^b	34.9 ^a
4	92.5 ^a	35.0 ^a

^{a, b, c} : Means with the same letter at the same column are not significantly different(p<0.05)

* β -cyclodextrin treated egg yolk is 75% cholesterol reduced one

** Co-solvent : 5% ethanol

*** SFE conditions : extraction pressure 4,500psi, extraction temp. 35℃

Bulley와 Labay(1991)도 난황분을 40℃에서 추출압력을 150, 200, 360bar로 증가시켰을 때 난황분의 용해도가 360bar에서 급격히 증가하였으며 동일 압력에서 온도를 변화시켰을 때보다는 동일 온도에서 압력을 변화

시켰을 때 난황분의 용해도가 급격히 증가하였다고 보고하였다. 콜레스테롤 제거율도 207, 276, 345bar에서 각각 13.2, 25.4, 28.5%로 동일온도에서 추출압력의 증가에 따라 콜레스테롤 제거율은 증가하였는데 이는 추출압력의 증가에 따라 이산화탄소의 밀도가 증가하기 때문이라고 설명한 바 있다. 추출시간의 영향을 검토한 결과 추출시간이 증가할수록 제거효율이 높았으나 2시간이상 추출할 경우 미미한 증가율을 나타내었다. 추출 4시간 경과 시 92.5%의 제거율로 최고치를 나타내었다(Table 6). 추출온도를 달리하여 난황액으로부터 콜레스테롤을 제거하기 위한 시험결과 Table 7에서 나타난 바와 같이 추출온도가 낮을수록 제거율이 향상되었으며 중량감소율도 높았다. 즉, 35℃에서 추출할 경우 91.2%의 콜레스테롤 추출율을 나타내어 가장 좋은 결과를 보였다.

Table 7. Effect of extraction temperature cholesterol reduction and weight loss of β -cyclodextrin treated liquid yolk* by supercritical carbon dioxide extraction with co-solvent**.

Extraction temperature(℃)	Cholesterol removal(%)	Weight loss(%)
35	91.2 ^a	34.9 ^a
40	90.4 ^b	33.5 ^b
45	88.5 ^b	33.2 ^b
50	86.2 ^c	31.9 ^c
55	83.0 ^d	31.8 ^c

^{a, b, c} : Means with the same letter at the same column are not significantly different(p<0.05)

* β -cyclodextrin treated egg yolk in 75% cholesterol reduced one.

** Co-solvent : 5% ethanol

*** SFE conditions : extraction pressure 4,500psi, extraction time 3hr.

4. 저콜레스테롤계란의 품질 특성

식물성유지인 대두유처리와 β -cyclodextrin의 병용처리에 의해 생산된 저콜레스테롤 난황액(콜레스테롤 제거율 : 95.4%)과 원료 난황액의 가공적성과 관능적 품질을 비교 검사한 결과는 Table 8에 나타난 바와 같다. 유화특성을 검토하기 위하여 유화력과 유화안정성을 시험한 결과 유화력은 신선란의 16.7ml에 비해서 콜레스테롤이 95.4% 제거된 난황액이 15.5로서 다소 낮았으나 유화안정도에 있어서는 콜레스테롤 제거 전, 후 변화가 일어나지 않는 것으로 나타났다. 거품특성은 거품형성능과 거품안정성으로 평가했으며 거품형성능에 있어서 신선란과 저콜레스테롤 계란이 각각 2.3 및 2.1으로서 제거 전, 후 그 차이가 인정되지 않았으며 거품안정성에 있어서는 신선란의 경우 15.4%, 저콜레스테롤 난황액의 경우 20.3%로 다소 떨어진 것으로 나타났다. 점도에 있어서도 저콜레스테롤 난황이 신선란에 비해서 다소 낮은 결과를 나타내었다. 색도의 변화는 저콜레스테롤 난황이 신선란에 비해서 L(명도)값이 증가하였고 a(적색도)값과 b(황색도)값은 저하하였다. 이것은 난황으로부터 콜레스테롤 제거시 xanthophyll 색소가 함께 제거되었기 때문에 L값은 증가하였고 a값과 b값은 저하한 결과로 사료된다.

콜레스테롤 분해효소(Pf COD)와 β -cyclodextrin의 병용처리에 의해 생산된 저콜레스테롤 난황액(콜레스테롤 제거율 : 95.8%)과 원료 난황액의 가공적성과 관능적 품질을 비교 검사한 결과는 Table 9에 나타난 바와 같다. 유화특성을 검토하기 위하여 유화력과 유화안정성을 시험한 결과 유화력은 신선란의 16.7ml에 비해서 콜레스테롤이 95.8% 제거된 난황액이 14.2로서 다소 낮았으나 유화안정도에 있어서는 콜레스테롤 제거 전, 후 변화가 일어나지 않는 것으로 나타났다. 거품특성은 거품형성능과 거품안정성으로 평가했으며 거품형성능에 있어서 신선란과 저콜레스테롤 계란이 각각 2.3 및 2.0으로서 제거 전, 후 그 차이가 인정되지 않았으며 거품안정성에 있어서는 신선란의 경우 15.4%, 저콜레스테롤 난황액의 경우 19.9%로 다소 떨

Table 8. Comparison test of functional properties of cholesterol reduced liquid egg yolk by hurdle technique¹⁾.

Functional properties	Raw egg yolk ²⁾	CHL reduced egg yolk ³⁾
Emulsion properties		
- Emulsion capacity ⁴⁾	16.7 ^a	15.5 ^b
- Emulsion stability ⁵⁾	0 ^a	0 ^a
Foam properties		
- Foam capacity ⁶⁾	2.3 ^a	2.1 ^a
- Foam stability ⁷⁾	15.4 ^b	20.3 ^a
Apparent viscosity (CP)	35,600 ^a	31,000 ^b
Hunter color value		
- L (lightness)	79.01 ^b	83.42 ^a
- a (redness)	3.03 ^a	2.72 ^b
- b (yellowness)	34.84 ^a	30.66 ^b

^{a, b} : Means with the same letter at the same row are not significantly different($p < 0.05$).

¹⁾ Soybean oil application method was used consequently to reduce cholesterol from cholesterol reduced yolk treated by β -cyclodextrin

²⁾ Diluted to 1 : 3 = yolk : D.W.

³⁾ Diluted to 1 : 3 = yolk : D.W., 95.4% cholesterol removed egg yolk

⁴⁾ Expressed with consumed soybean oil(ml) to emulsifying 1 gram of diluted egg yolk

⁵⁾ Released oil amount(%) from egg yolk emulsion

⁶⁾ Foamed yolk volume / initial egg yolk volume

⁷⁾ Released water amount(%) from foamed egg yolk

Table 9. Comparison test of functional properties of cholesterol reduced liquid egg yolk by hurdle technique¹⁾.

Functional properties	Raw egg yolk ²⁾	CHL reduced egg yolk ³⁾
Emulsion properties		
- Emulsion capacity ⁴⁾	16.7 ^a	14.2 ^b
- Emulsion stability ⁵⁾	0 ^a	0 ^a
Foam properties		
- Foam capacity ⁶⁾	2.3 ^a	2.0 ^a
- Foam stability ⁷⁾	15.4 ^b	19.9 ^a
Apparent viscosity (CP)	35,600 ^a	26,500 ^b
Hunter color value		
- L (lightness)	79.01 ^b	85.63 ^a
- a (redness)	3.03 ^a	2.64 ^b
- b (yellowness)	34.84 ^a	31.72 ^b

^{a, b} : Means with the same letter at the same row are not significantly different($p < 0.05$).

¹⁾ CHL oxidase application method was used consequently to reduce cholesterol from cholesterol reduced yolk treated by β -cyclodextrin

²⁾ Diluted to 1 : 3 = yolk : D.W.

³⁾ Diluted to 1 : 3 = yolk : D.W., 95.8% cholesterol removed egg yolk

⁴⁾ Expressed with consumed soybean oil(ml) to emulsifying 1 gram of diluted egg yolk

⁵⁾ Released oil amount(%) from egg yolk emulsion

⁶⁾ Foamed yolk volume / initial egg yolk volume

⁷⁾ Released water amount(%) from foamed egg yolk

어진 것으로 나타났다. 점도에 있어서도 저콜레스테롤 난황이 신선란에 비해서 다소 낮은 결과를 나타내었다. 색도의 변화는 저콜레스테롤 난황이 신선란에 비해서 L(명도)값이 증가하였고 a(적색도)값과 b(황색도)값은 저하하였다.

초임계유체추출법과 β -cyclodextrin의 병용처리에 의해 생산된 저콜레스테롤 난황액(콜레스테롤 제거율 : 92.5%)과 원료 난황액의 가공적성과 관능적 품질을 비교 검사한 결과는 Table 10에 나타난 바와 같다. 유화특성을 검토하기 위하여 유화력과 유화안정성을 시험한 결과 유화력은 신선란의 16.7ml에 비해서 콜레스테롤이 92.5% 제거된 난황액이 16.2로서 다소 낮았으나 유의차는 인정되지 않았으며 유화안정도에 있어서는 콜레스테롤 제거 전, 후 변화가 일어나지 않는 것으로 나타났다. 거품특성은 거품형성능과 거품안정성으로 평가했으며 거품형성능에 있어서 신선란과 저콜레스테롤 계란이 각각 2.3 및 2.1으로서 제거 전, 후 그 차이가 인정되지 않았으며 거품안정성에 있어서는 신선란의 경우 15.4%, 저콜레스테롤 난황액의 경우 18.5%로 다소 떨어진 것으로 나타났다. 점도에 있어서도 저콜레스테롤 난황이 신선란에 비해서 다소 낮은 결과를 나타내었다. 색도의 변화는 저콜레스테롤 난황이 신선란에 비해서 L(명도)값이 증가하였고 a(적색도)값과 b(황색도)값은 저하하였다.

식물성유지인 대두유처리와 β -cyclodextrin의 병용처리에 의해 생산된 저콜레스테롤 난황액(콜레스테롤 제거율 : 95.4%)과 원료 난황액의 지방산 조성의 변화를 알아본 결과 Table 11에 나타난 바와 같이 포화지방산인 C16:0과 C18:0은 큰 변화가 없었으며 C 16:1과 C18:1은 감소하였으며 C18:2와 C18:3은 다소 증가하였다. 이것은 대두유의 주성분인 리놀레산이 공정 중에 난황액으로 유입된 것으로 사료된다.

Table 10. Comparison test of functional properties of cholesterol reduced liquid egg yolk by hurdle technique¹⁾.

Functional properties	Raw egg yolk ²⁾	CHL reduced egg yolk ³⁾
Emulsion properties		
- Emulsion capacity ⁴⁾	16.7 ^a	16.2 ^a
- Emulsion stability ⁵⁾	0 ^a	0 ^a
Foam properties		
- Foam capacity ⁶⁾	2.3 ^a	2.1 ^a
- Foam stability ⁷⁾	15.4 ^b	18.5 ^a
Apparent viscosity (CP)	35,600 ^a	32,600 ^b
Hunter color value		
- L (lightness)	79.01 ^b	82.76 ^a
- a (redness)	3.03 ^a	2.43 ^b
- b (yellowness)	34.84 ^a	30.42 ^b

^{a, b} : Means with the same letter at the same row are not significantly different ($p < 0.05$).

¹⁾ Supercritical carbon dioxide extraction was used consequently to reduce cholesterol from cholesterol reduced yolk treated by β -cyclodextrin

²⁾ Diluted to 1 : 3 = yolk : D.W.

³⁾ Diluted to 1 : 3 = yolk : D.W., 92.5% cholesterol removed egg yolk

⁴⁾ Expressed with consumed soybean oil (ml) to emulsifying 1 gram of diluted egg yolk

⁵⁾ Released oil amount (%) from egg yolk emulsion

⁶⁾ Foamed yolk volume / initial egg yolk volume

⁷⁾ Released water amount (%) from foamed egg yolk

Table 11. Comparison of fatty acid profiles(%) of cholesterol reduced liquid egg yolk by hurdle technique¹⁾ and raw egg yolk.

Fatty acids	Raw egg yolk ²⁾	CHL reduced egg yolk ³⁾	Fatty acid change
C16:0	25.1 ^a	25.2 ^a	○
C16:1	3.7 ^a	2.9 ^b	-
C18:0	8.8 ^a	8.8 ^a	○
C18:1	43.5 ^a	39.1 ^b	-
C18:2	13.3 ^b	16.8 ^a	+
C18:3	0.4 ^b	2.2 ^a	+

^{a, b} : Means with the same letter at the same row are not significantly different($p < 0.05$).

¹⁾ Soybean oil application method was used consequently to reduce cholesterol from cholesterol reduced yolk treated by β -cyclodextrin

²⁾ Diluted to 1 : 3 = yolk : D.W.

³⁾ Diluted to 1 : 3 = yolk : D.W., 95.4% cholesterol removed egg yolk

콜레스테롤 분해효소(Pf COD)와 β -cyclodextrin의 병용처리에 의해 생산된 저콜레스테롤 난황액(콜레스테롤 제거율 : 95.8%)과 원료난황액의 지방산 조성의 변화를 조사한 결과 Table 12에 나타난 바와 같이 포화지방산인 C16:0이 다소 감소하였으며 C18:1은 다소 증가하였다. 그 밖의 지방산은 큰 변화가 없는 것으로 조사되었다.

초임계유체추출법과 β -cyclodextrin의 병용처리에 의해 생산된 저콜레스테롤 난황액(콜레스테롤 제거율 : 92.5%)과 원료 난황액의 지방산 조성의 변화를 알아본 결과 Table 13에 나타난 바와 같이 포화지방산인 C16:0과 C18:0은 큰 변화가 없었으며 C16:1과 C18:1은 감소하였으며 C18:2와 C18:3은 다소 증가하였다.

Table 12. Comparison of fatty acid profiles(%) of cholesterol reduced liquid egg yolk by hurdle technique¹⁾ and raw egg yolk.

Fatty acids	Raw egg yolk ²⁾	CHL reduced egg yolk ³⁾	Fatty acid change
C16:0	25.1 ^a	24.9 ^b	-
C16:1	3.7 ^a	3.3 ^a	○
C18:0	8.8 ^a	8.4 ^a	○
C18:1	43.5 ^a	44.7 ^b	+
C18:2	13.3 ^b	13.1 ^b	○
C18:3	0.4 ^b	0.6 ^b	○

^{a, b} : Means with the same letter at the same row are not significantly different(p<0.05).

¹⁾ CHL oxidase application method was used consequently to reduce cholesterol from cholesterol reduced yolk treated by β -cyclodextrin

²⁾ Diluted to 1 : 3 = yolk : D.W.

³⁾ Diluted to 1 : 3 = yolk : D.W., 95.8% cholesterol removed egg yolk

Table 13. Comparison of fatty acid profiles(%) of cholesterol reduced liquid egg yolk by hurdle technique¹⁾ and raw egg yolk.

Fatty acids	Raw egg yolk ²⁾	CHL reduced egg yolk ³⁾	Fatty acid change
C16:0	25.1 ^a	28.8 ^b	+
C16:1	3.7 ^a	1.3 ^b	-
C18:0	8.8 ^a	15.0 ^b	+
C18:1	43.5 ^a	35.7 ^b	-
C18:2	13.3 ^b	13.4 ^b	○
C18:3	0.4 ^b	0.4 ^b	○

^{a, b} : Means with the same letter at the same row are not significantly different($p < 0.05$).

¹⁾ Supercritical carbon dioxide extraction was used consequently to reduce cholesterol from cholesterol reduced yolk treated by β -cyclodextrin

²⁾ Diluted to 1 : 3 = yolk : D.W.

³⁾ Diluted to 1 : 3 = yolk : D.W., 92.5% cholesterol removed egg yolk

여 백

제 10 장 난황의 콜레스테롤 제거에 사용한 β -cyclodextrin의 재활용

제 1 절 서 설

계란으로부터 콜레스테롤을 저하시키려는 노력은 여러 방법에 의해 시도되고 있는데 그 중 β -cyclodextrin에 의한 방법은 식품의 안정성 면이나 효율면에서 우수한 것으로 알려져 있다¹⁾. β -cyclodextrin은 흡착제의 일종으로 전분에 Bacillus 속의 미생물이 생산하는 효소를 작용시켜 생산되며 7개의 포도당 분자가 고리처럼 연결되어 분자내공의 친수성기와 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 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.

제 2 절 재료 및 방법

1. 시험재료

본 시험에 사용된 계란은 (주)D축산에서 구입한 특란으로 산란 후 48시간 이내의 것으로 공시하였으며 β -cyclodextrin은 日本食品化工株式會社の 제품(B-37D5, 食品添加物)을 사용하였다.

2. 시료의 제조

난황과 난백을 분리하고 다시 난황을 300 μ m의 sieve를 통과시켜 난황막 및 알끈을 제거한 후 지 등¹⁾의 방법에 의하여 난황을 3배량의 증류수로 희석함과 동시에 β -cyclodextrin의 최종농도가 2%(W/V)가 되도록 첨가하여 35 $^{\circ}$ C에서 80rpm의 속도로 30분간 교반 후 5 $^{\circ}$ C까지 냉각하였다. 이것을 2000g에서 15분간 원심분리(Hanil union 5 KR)하여 이때 생긴 침전물을 동결건조시켜 시료로 사용하였다.

3. 시험방법

가. 용매선정 시험

β -cyclodextrin complex 5g을 butanol, chloroform, ether, hexane 등의 비극성용매와 methanol, 2-propanol 등의 극성용매 30ml에 넣어 혼합하고 50 $^{\circ}$ 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 : 2⁵⁾로 혼합하여 시험을 실시하였다.

나. β -cyclodextrin complex로부터 콜레스테롤의 제거조건 검토시험

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

다. 재활용된 β -cyclodextrin의 콜레스테롤 제거효율 검토

사용하지 않은 β -cyclodextrin과 재활용된 β -cyclodextrin 및 이들의 1 : 1 혼합 β -cyclodextrin을 지 등¹⁾의 방법에 의하여 난황을 3배량의 증류수로 희석한 것에 최종농도가 2%(W/V)가 되도록 첨가하여 50 $^{\circ}$ C에서 30분간 교반 후 5 $^{\circ}$ C까지 냉각하고 이것을 2000g에서 15분간 원심분리(Hanil union 5 KR)한 후 상층액의 잔존 콜레스테롤 함량을 측정하였다.

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

제 3 절 결과 및 고찰

1. 용매선정 시험

가. 단일용매의 콜레스테롤 제거효율 비교

β -cyclodextrin complex에서 콜레스테롤을 분리하기 위해 우선 각 용매의 콜레스테롤의 제거효율을 검토하였다(Table 2, Fig. 1). 그 결과 butanol과 methanol의 콜레스테롤 제거율이 각각 91.6%와 89.6%로 높게 나타났으며 hexane이 49.1%로 가장 낮은 제거율을 보였다. Butanol은 콜레스테롤 제거효율은 높으나 가격이 상대적으로 비싸며⁶⁾ 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.

Table 2. Relative removal of cholesterol from β -cyclodextrin complex with various solvents

Solvents	Cholesterol reduction(%)	Price(won/ ℓ) ²⁾
Hexane	49.1 \pm 4.9 ^{a1)}	1667
2-propanol	63.4 \pm 12.6 ^{bc}	1667
Ether	66.6 \pm 2.1 ^b	3889
Chloroform	67.0 \pm 10.2 ^b	2880
Butanol	89.6 \pm 9.1 ^a	2150
Methanol	91.6 \pm 4.7 ^a	1000

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

²⁾ The information on commodity price(1999, 1)

Treatment condition : β -cyclodextrin : solvent = 1 : 6,
mixing temp. 50°C, mixing time 120min

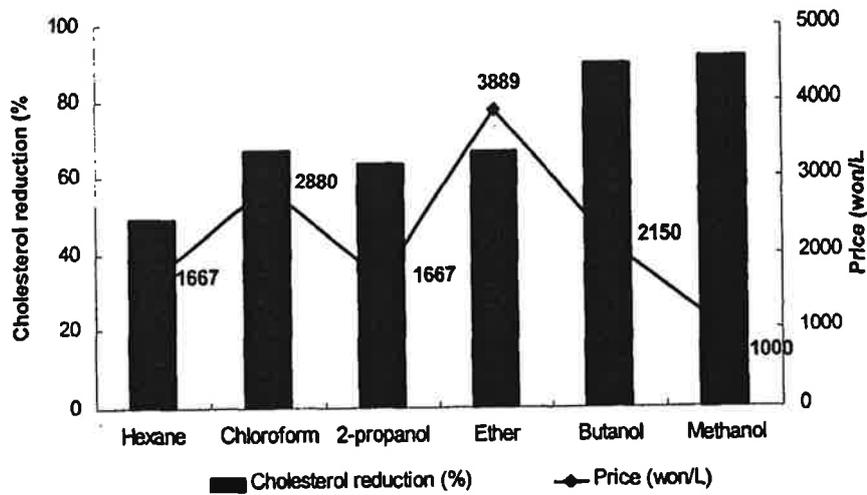


Fig. 1. Relative removal of cholesterol from β -cyclodextrin complex with various solvents

(Price : The information on commodity price, 1999. 1)

나. 혼합용매의 콜레스테롤 제거효율 비교

β -cyclodextrin에 흡착되어 있는 지용성 분자인 콜레스테롤을 분리하기 위해서는 수용성 용매를 사용해야 분리가 용이하다는 보고⁷⁾에 따라 극성, 비극성 용매의 적절한 비율이 콜레스테롤 제거에 미치는 영향이 클 것으로 생각되어 극성용매와 비극성 용매를 혼합하여 4가지의 다른 혼합용매를 만들어 각 용매의 콜레스테롤의 제거효율을 검토하였다(Fig.2, Table 3). 그 결과 chloroform과 methanol의 혼합용매는 90% 이상의 콜레스테롤 제거효과를 나타내어 72.7%의 hexane과 2-propanol의 3 : 2 혼합용매 보다 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.

Table 3. Relative removal of cholesterol from β -cyclodextrin complex with various mixing solvents

Solvents	Cholesterol reduction(%)	Price(won/ ℓ)
Chloroform : Methanol = 1 : 1	98.3 ± 0.8 ¹⁾	1940
Chloroform : Methanol = 1 : 2	93.0 ± 1.4 ^a	1626
Chloroform : Methanol = 2 : 1	98.5 ± 0.7 ^a	2253
Hexane : 2-propanol = 3 : 2	72.2 ± 5.0 ^b	1667

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

²⁾ The information on commodity price(1999, 1)

Treatment condition : β -cyclodextrin : solvent = 1 : 6,
mixing temp. 50°C, mixing time 120min

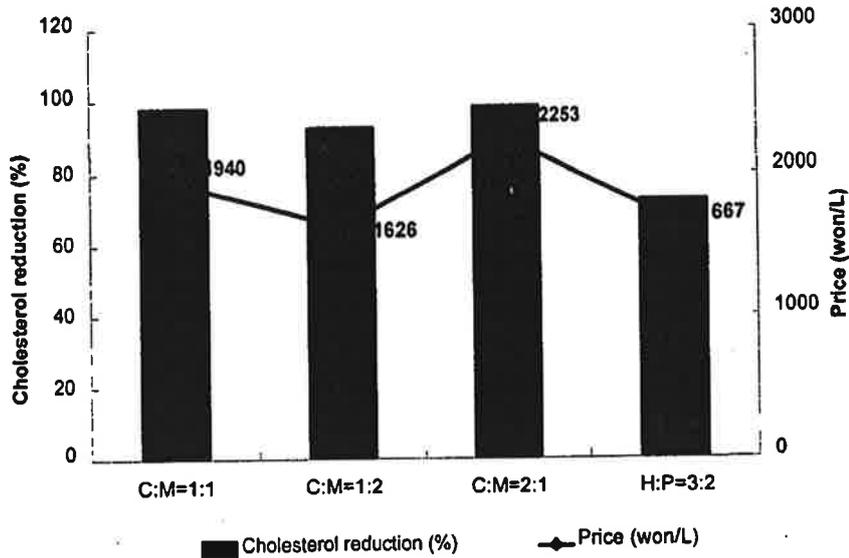


Fig. 2. Relative removal of cholesterol from β -cyclodextrin complex with various mixing solvents

(C : chloroform, M : methanol, H :hexane, P : 2-propanol)

2. β -cyclodextrin complex로부터 콜레스테롤의 제거조건 검토시험

가. β -cyclodextrin complex와 용매의 혼합 비율

β -cyclodextrin complex와 용매의 적합한 비율을 찾아내기 위하여 6가지의 혼합비율에 따른 콜레스테롤 제거효과를 table 4에 나타내었다. 이때 콜레스테롤 제거에 사용된 용매는 chloroform과 methanol을 1 : 1로 혼합한 것이며 교반온도는 50℃, 교반시간은 2시간이었다. 그 결과 β -cyclodextrin complex와 용매의 비율이 4 : 1 이상인 경우에 99% 이상이 제거되었으며 용매의 비율이 그 이상 증가하여도 유의적인 차이는 나타나지 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 : 1 이 적절하다는 Keen⁸⁾의 보고와 비슷한 경향을 보

이고 있으나 동물성 유지로부터 콜레스테롤을 분리해내는 데는 8~10배의 용매가 바람직하다는 海野⁹⁾의 보고보다는 적은양의 용매로 대부분의 콜레스테롤을 분리해 낼 수 있었다.

Table 4. Effect of solvent ratio to β -cyclodextrin complex on removal of cholesterol from β -cyclodextrin complex

Ratio(v/w) Solvent : β -CD complex	Cholesterol reduction(%)
2 : 1	95.9 \pm 0.8 ^{b1)}
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⁾ Means in the same row with same superscripts are not significantly different(p<0.05)

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

나. 교반시간

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 5에 나타난 바와 같이 2시간 교반한 경우에 99%의 가장 높은 콜레스테롤 제거율을 나타냈으나 교반시간 1시간 이상에서는 유의적인 차이를 보이지 않았으며 30분의 교반으로는 β -cyclodextrin complex로부터 콜레스테롤이 충분히 제거되지 않아 교반시

간은 1시간 이상이 적합할 것으로 생각되었다. 이 결과는 교반시간이 120분 ~ 240분이 가장 바람직하다는 海野⁹⁾의 보고와 비슷한 경향을 나타내었다.

Table 5. Effect of mixing time on removal of cholesterol from β -cyclodextrin complex

Mixing time (min)	Cholesterol reduction(%)
10	96.0 \pm 0.3 ^{b1)}
30	96.5 \pm 0.9 ^b
60	98.7 \pm 0.1 ^a
120	99.0 \pm 0.2 ^a
180	98.9 \pm 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

다. 교반온도

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 6에 나타난 바와 같이 60°C에서 99.6%의 콜레스테롤 제거율을 보였으며 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 Keen⁸⁾과 海野⁹⁾은 40 ~ 45°C의 온도가 콜레스테롤의 분리에 가장 바람직하다는 보고와 Pagington⁷⁾은 콜레스테롤이 복합체의 내부

물질인 경우에는 60℃ 이상으로 교반하는 것은 콜레스테롤의 분리에 적합하지 않다는 보고와 비교해 볼 때 50℃의 교반온도가 콜레스테롤의 제거에 적합하다고 생각되었다.

Table 6. Effect of mixing temperature on removal of cholesterol from β -cyclodextrin complex

Mixing temperature (°C)	Cholesterol reduction(%)
30	94.4 ± 1.2 ^{b1)}
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

3. 재활용된 β -cyclodextrin의 콜레스테롤 제거효율 검토

앞의 최적조건에 의해 재활용된 β -cyclodextrin을 이용하여 계란의 콜레스테롤제거 효과를 검토한 결과를 table 7에 나타내었다. 그 결과 사용하지 않은 β -cyclodextrin만을 사용하여 계란의 콜레스테롤을 제거하였을 경우에는 61.1%의 제거효율을 나타내었으나 재활용된 β -cyclodextrin을 사용하였을 때는 15.1%의 낮은 제거효율을 나타내었다. 그러나 사용하지 않은 β -cyclodextrin과 재활용된 β -cyclodextrin를 1 : 1로 혼합하여 사용하였을 때는 49.7%의 콜레스테롤 제거효율을 나타내어 사용하지 않은 β -cyclodextrin만을 사용했을 때의 제거효율을 100%로 할 때 이에 대해 81%의 제거효과를 나타내었다.

Table 7. 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 \pm 3.9 ^a	100
New β -CD : used β -CD = 1 : 1	49.7 \pm 7.2 ^b	81.1
Used β -cyclodextrin	15.1 \pm 1.1 ^c	24.7

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

제 4 절 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 G. H. Sloan-staanley. 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. 한국물가협회. 물가정보. 1991. 1
7. Pagationton, J. S. β -cyclodextrin. *Perfumer and flavorist.* 11. February/March.

8. 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)
9. 海野, 工藥, Recovery of cholesterol used in foods. Japan patent. 平-278181
10. Oakenfull, D. G., Sidhu, G. S. and Rooney, M. L. Cholesterol reduction. Australia patent. WO 91/11114(1991)
11. Oakenfull, D. G., Sidhu, G. S. and Rooney, M. L. Cholesterol removal. Australia patent. WO 91/16824(1991)
12. 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)

여 백

제 11 장 저콜레스테롤 난황 생산시 생성되는 부산물로부터 콜레스테롤의 분리 정제

제 1 절 서 설

콜레스테롤($C_{27}H_{46}O$)은 4개의 고리로 된 cyclopentanoperhydrophenanthrenegor 을 갖는 스테로이드계 화합물로서 고등동물의 조직과 세포에서 세포막 및 신경세포 보호막 구성성분과 담즙산 및 호르몬의 생성 원료로서 존재하는 생명유지 물질이다^(1, 2).

콜레스테롤은 digitonin^(2, 3), saponin⁽⁴⁾ 및 β -cyclodextrin(β -CD)⁽⁵⁻⁷⁾ 등과 결합하여 침전물을 형성하며 물에는 거의 녹지 않고 hexane, chloroform 등의 일부 유기용매에 용해되며 검화되지 않는 등의 성질이 있으므로⁽⁷⁻⁹⁾, 이러한 흡착 및 침전성과 비검화 특성은 콜레스테롤의 분리, 정제, 분석 및 제거를 위한 여러 연구에서 적용되고 있다. 콜레스테롤에 관한 연구가 활발해짐에 따라 상품화된 콜레스테롤이 의학, 생화학 및 이화학적 연구를 비롯한 여러 목적으로 다양하게 사용되고 있다.

계란은 한 개당 평균 272mg 정도의 비교적 많은 콜레스테롤을 함유하므로 콜레스테롤 추출을 위해 효과적으로 이용되었다. 반면, 콜레스테롤이 건강상의 문제를 일으킬 수 있다는 인식으로 인해 식품으로서의 계란 가공품 생산시 식물성유지추출⁽¹⁰⁾, 초임계유체추출⁽¹¹⁾ 및 β -CD 흡착작용⁽⁵⁾ 등 다양한 방법을 적용하여 제품 중의 콜레스테롤을 저하시키기 위한 연구가 진행되었다.

본 연구에서는 저콜레스테롤 계란 생산시의 부산물인 콜레스테롤을 간편하고, 경제적으로 정제할 수 있는 방법을 검토하였다. 브롬화하여 콜레스테롤을 침전시킨 후 탈브롬화하고 순화하는 방법으로 정제한 연구보고^(12, 13)가 있으나, 보다 효율적인 방법을 모색하기 위해 β -cyclodextrin에 의한

흡착법과 potassium hydroxide 등에 의한 검화법을 응용하여 콜레스테롤을 함유하는 부산물로부터 고순도 콜레스테롤의 회수를 시도하고 난황분의 콜레스테롤 정제에 검화법을 적용하여 비교하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 저콜레스테롤 난황의 부산물로부터 콜레스테롤 회수

지 등⁽⁵⁾과 Smith 등⁽⁶⁾이 제시한 방법으로 저콜레스테롤 난황을 제조하였으며 이로부터 생성되는 부산물을 시료로 하였다. 난황과 콜레스테롤의 3배 몰에 해당하는 β -CD를 첨가하여 80rpm의 속도로 교반하며 35℃에서 30분간 반응시킨 후 냉각하여 원심분리하고, 침전된 β -CD : 콜레스테롤 복합체 잔류물을 회수하여 동결건조하여 710 μ m sieve를 통과시켜 일정한 입자크기의 분말로 제조하였다. 건조된 복합체에 6배(v/w)의 chloroform을 첨가하여 100rpm의 속도로 교반하며 50℃에서 120분간 반응시켜, Na₂SO₄와 함께 여과한 후 40℃에서 농축하여 회수한 콜레스테롤 함유물을 냉동보관하며 콜레스테롤 정제용 시료로 사용하였다.

2. β -CD 흡착법을 이용한 콜레스테롤 정제

추출된 시료 콜레스테롤은 지 등⁽⁵⁾과 Smith 등⁽⁶⁾의 방법을 변형하여 Fig. 1에 제시한 방법으로 정제하였다. 시료와 콜레스테롤의 1몰 혹은 2몰 배의 β -CD를 첨가한 3배(v/w)의 용매와 혼합하여 80rpm의 속도로 교반하며 35℃에서 30분간 반응시킨 후 냉각하여 원심분리하여 침전된 복합체를 얻었다. 이를 6배(v/w)의 chloroform과 함께 120분간, 100rpm의 속도로 교반하며 50℃에서 가열한 후 Na₂SO₄와 함께 여과하고 40℃에서 농축하여 콜레스테롤을 회수하였다.

콜레스테롤 및 β -CD를 모두 용해시키기 위한 적절한 용해 용매를 선

정하기 위해 Nagatomo⁽¹⁴⁾의 방법에서 사용한 용매들 즉, methanol, ethanol, acetone, 2-propanol 및 propanol을 증류수와 1 : 1의 비로 혼합한 용매 및 증류수를 준비하여 콜레스테롤 정제시험을 하였다. 결정된 적절한 정제 조건으로 β -CD 흡착 과정을 반복하여 콜레스테롤 순도를 측정하여 정제 효과를 알아보았다.

3. 검화법을 이용한 콜레스테롤 정제

추출된 시료 콜레스테롤을 Fig. 2에 나타낸 바와 같이 Fenton 등⁽⁸⁾의 방법을 변형하여 정제하였다. 시료에 검화 용액(95% ethanol : 33% KOH=94 : 6)을 첨가하여 60°C로 가열하고 콜레스테롤 등의 비검화 물질은 유기용매로 용해하여 검화층과 분리한 후 농축하여 정제하였다. 비검화물질, 즉 콜레스테롤의 추출용매로 ether⁽¹³⁾, chloroform⁽¹⁵⁾ 및 hexane⁽⁸⁾을 사용하여 정제 효과를 비교하였고, 시료량과 검화용액의 적정 비율을 선택하기 위해 용액의 양을 시료량에 대해 40~80배(v/w)로 변화시켰다. 보다 순도 높은 콜레스테롤 생산을 위해 위에서 결정된 최적 조건으로 반복적인 정제를 실시하여 콜레스테롤의 순도를 측정하였다.

4. 난황분의 검화정제

난황분의 콜레스테롤은 Fig. 2에 나타낸 바와 같이 Fenton 등⁽⁸⁾의 방법을 변형하여 검화법으로 3차례 반복 정제하여 부산물인 β -CD와 콜레스테롤 복합체로부터의 콜레스테롤 정제효율과 비교하였다.

5. 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℃에서 1시간 incubation하여 405nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

6. 통계분석

평균값 및 표준오차의 산출은 SAS program⁽¹⁶⁾을 사용하여 얻어졌으며 Duncan의 다중 검정방법⁽¹⁷⁾으로 5%수준에서 유의성 검정하였다.

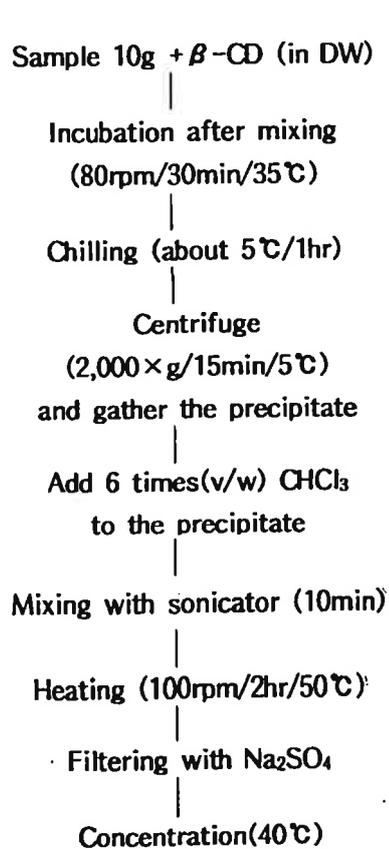


Fig. 1. Procedure of purification with β -cyclodextrin.

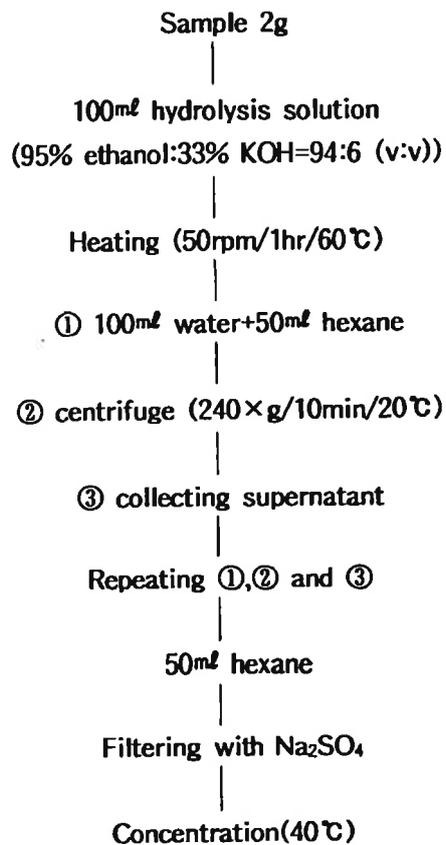


Fig. 2. Procedure of purification with saponification.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 저콜레스테롤 난황의 부산물로부터 콜레스테롤의 회수

Table 1에 나타낸 바와 같이 저콜레스테롤 난황액 생산시의 부산물인 β -CD와 콜레스테롤 복합체를 동결 건조한 결과 1,068.7mg/100g의 콜레스테롤을 함유하는 복합체분말을 얻었다. 이 복합체를 chloroform으로 추출한 후 농축하여 콜레스테롤 농도 3,069mg/100g인 물질 27.41%를 얻었으며 이를 콜레스테롤의 분리, 정제용 시료로 사용하였다.

Table 1. Cholesterol concentration of by-product and extracted cholesterol samples

	Egg yolk	β -cyclodextrin:cholesterol complex (by-product)	Extracted cholesterol samples
Cholesterol concentration (mg/100g)	1,496.5 \pm 92.3	1,068.7 \pm 105.3	3,069.6 \pm 221.3

2. β -CD 흡착법을 이용한 콜레스테롤 정제

β -CD 흡착법에 의한 콜레스테롤 정제 결과는 Table 2에 나타내었다. β -CD 및 시료 콜레스테롤 용해 용매의 선택시험에서 ethanol과 증류수 1 : 1 혼합용매 처리구에서 순도 5.82%로 비교적 높은 정제효과를 나타냈고, 기타 처리구에서는 순도 2.67~3.58%로 시료로부터 정제되지 않았다. Nagatomo⁽¹⁴⁾의 연구에서 methanol, ethanol, acetone, 2-propanol 및

propanol을 증류수와 1 : 1의 비로 혼합한 용매 및 증류수로의 β -CD 용해도는 25℃에서 증류수가 1.85%로 가장 높았으며, methanol과 acetone을 증류수와 1 : 1로 혼합한 용매가 0.3%로 가장 낮게 나타난 것으로 보고하였다. 여러 연구^(5, 15)에서 콜레스테롤을 분리할 때, β -CD 용해 용매로 증류수를 사용하였으나 본 연구에서는 콜레스테롤과 β -CD를 모두 효과적으로 용해시켜 정제할 수 있는 조건을 선택하기 위하여, Nagatomo⁽¹⁴⁾가 제시한 다양한 용매로 정제한 결과 β -CD에 대한 용해도와 정제된 콜레스테롤의 순도 사이에는 상관관계가 없는 것으로 나타났다.

비교적 효과적인 정제가 이루어진 ethanol과 증류수의 1 : 1 혼합용매 처리조건으로 β -CD 흡착 과정을 반복한 결과는 Table 3에 나타내었다. 콜레스테롤 정제를 1회~3회 반복하여도 순도의 변화는 3.06~3.14%로 유의차($p < 0.05$)가 없었으며, 콜레스테롤 수율(cholesterol yield)과 제품 수율(product yield)이 각각 34.17~23.70%과 37.00~25.04%로 유의적($p < 0.05$)으로 감소하는 것으로 나타났다. Nagatomo⁽¹⁴⁾는 β -CD($C_5H_{10}O_5$)가 α -1,4-glucoside 결합에 의해 연결된 원형의 비환원성 올리고당으로서 고리형 구조내에 들어갈 수 있는 작은 직경을 갖는 소수성 물질을 포섭하여 침전하는 성질이 있다고 하였으며, 지 등⁽⁵⁾의 연구에서 β -CD를 사용하여 콜레스테롤을 제거할 때 제거율이 높아짐에 따라 고형분의 손실도 많아지는 결과를 제시하였다. 본 연구에서도 반복 정제시 제품 수율이 감소하여도 순도는 변화가 없는 것으로 나타나 β -CD가 콜레스테롤에 대해 선택적이지 않으며 정제를 위해 부적합하다고 사료되었다.

Table 2. Effect of solvents for purification of cholesterol with β -cyclodextrin from the by-product containing egg cholesterol

Solvents (Water:Solvent)	Purity (%)	Cholesterol yield (%)	Product yield (%)
DW	2.67 \pm 0.08 ^{d1)}	66.90 \pm 2.50 ^a	70.85 \pm 0.84 ^a
Methanol:DW(50:50)	3.58 \pm 0.13 ^b	2.32 \pm 0.06 ^d	1.84 \pm 0.11 ^e
Ethanol:DW(50:50)	5.82 \pm 0.14 ^a	46.19 \pm 0.30 ^b	22.41 \pm 0.63 ^c
Acetone:DW(50:50)	3.25 \pm 0.11 ^c	35.40 \pm 0.38 ^c	30.74 \pm 1.10 ^b
2-Propanol:DW(50:50)	3.55 \pm 0.05 ^b	2.09 \pm 0.10 ^d	1.66 \pm 0.07 ^e
Propanol:DW(50:50)	2.82 \pm 0.18 ^d	3.45 \pm 0.14 ^d	3.46 \pm 0.08 ^d

¹⁾ Values with same superscripts in the same column are not significantly different ($p < 0.05$)

Operating conditions : mixing speed 80rpm, mixing time 30min., mixing temp. 35°C, β -cyclodextrin:cholesterol extract=1M:1M, solvent:cholesterol extract=4:1(v:w)

Table 3. Effect of adsorption with β -cyclodextrin for purification of cholesterol from by-product containing egg cholesterol

No. of repetition for purification	Purity (%)	Cholesterol yield (%)	Product yield (%)
1st	3.06±0.06 ^{a1)}	34.17±2.39 ^a	37.00±1.81 ^a
2nd	3.22±0.34 ^a	29.58±3.16 ^b	30.46±1.05 ^b
3rd	3.14±0.58 ^a	23.70±4.35 ^c	25.04±0.71 ^c

¹⁾ Values with same superscripts in the same column are not significantly different ($p < 0.05$)

Operating conditions : mixing speed 80rpm, mixing time 30min., mixing temp. 35°C, β -cyclodextrin:cholesterol extract=2M:1M, ethanol:cholesterol extract=4:1(v:w)

3. 검화법을 이용한 콜레스테롤 정제

검화법을 적용하여 콜레스테롤 정제 시험을 한 결과는 Table 4와 Table 5에 나타내었다. 비검화물 추출용매로 hexane과 chloroform을 사용했을 때 순도는 각각 38.89% 와 2.27% 로 측정되었으며 ether는 검화 용매층과 혼합되어 층분리에 의한 비검화 물질의 회수가 불가능하였다(Table 4). Hexane으로의 추출이 가장 효율적이었으며, chloroform은 콜레스테롤 외에도 기타의 소수성 물질을 함께 추출하여 시료보다도 낮은 순도를 나타내었다. 시료에 대해 60배(v/w)의 검화용매를 사용할 때 비교적 양호한 결과를 보여, 순도는 35.74%, 콜레스테롤 수율은 33.21%로 나타났다(Table 5).

Table 4. Effect of solvent on purification of cholesterol by saponification from by-product containing egg cholesterol

Solvents	Purity (%)	Cholesterol yield (%)	Product yield (%)
Hexane	38.89 ± 1.21 ^{a1)}	65.38 ± 2.30 ^a	5.57 ± 0.02 ^b
Chloroform	2.27 ± 0.06 ^b	65.52 ± 1.13 ^a	95.62 ± 3.95 ^a
Ether	- ²⁾	-	-

¹⁾Values with same superscripts in the same column are not significantly different ($p < 0.05$)

²⁾not determined

Operating conditions : mixing speed 50rpm, heating time 1hr., heating temp. 60°C, hydrolysis solution:sample=50:1(v:w)

결정된 방법으로 반복적인 검화를 실시한 결과, 4회 반복추출시 순도는 95.74%, 수율은 30.80%인 콜레스테롤을 얻었다(Fig. 3). 5회 반복추출시의 콜레스테롤 순도는 94.8%, 수율은 30.80%로 4회 추출시의 콜레스테롤과 유의차($p < 0.05$)가 없는 것으로 나타나 4회의 반복적인 검화가 효과적인 것으로 사료되었다.

검화법⁷⁾으로 난황분의 콜레스테롤을 정제한 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 1차 검화하여 순도 53.44%의 콜레스테롤을 얻었으며 난황분을 반복적으로 3차례 정제한 결과 순도는 97.83%로 유의적($p < 0.05$)으로 개선되었으나 수율은 1.46%로 낮게 나타났다. 저콜레스테롤 난황액의 부산물 시료인 β -CD과 콜레스테롤의 복합체에 기인한 추출물은 대부분이 콜레스테롤 등의 지용성 물질이므로 난황분으로부터의 콜레스테롤 수율보다 높게 나타났다.

이화학 분야의 다양한 연구를 위해 시판되고 있는 콜레스테롤은 난유(egg oil), 돼지의 간(porcine liver) 및 소의 척추(bovine spinal cord) 등에서 추출된 것으로 순도 95~99%인 제품인 것⁽¹⁸⁾을 고려할 때 저콜레스테롤 계란제품 생산시의 부산물로부터 콜레스테롤을 분리, 정제하여 상품화를 위한 본 연구는 부가가치 향상에 기여할 수 있으리라 사료되었다.

Table 5. Effect of hydrolysis solution ratio to sample on purification of cholesterol from the by-product containing egg cholesterol

Solution ratio(v/w) solution : sample	Purity (%)	Cholesterol yield (%)	Product yield (%)
40 : 1	17.92±0.55 ^{dl)}	62.03±11.93 ^a	11.53±2.59 ^a
50 : 1	28.12±0.54 ^c	49.00± 6.49 ^b	4.26±0.36 ^b
60 : 1	35.74±0.15 ^a	48.50± 2.03 ^b	4.30±0.39 ^b
70 : 1	28.47±0.11 ^c	40.57± 4.81 ^c	4.46±0.21 ^b
80 : 1	29.68±0.32 ^b	41.39± 6.61 ^c	4.20±0.42 ^b

^{h)}Values with same superscripts in the same column are not significantly different (p<0.05)

Operating conditions : mixing speed 50rpm, heating time 1hr., heating temp. 60°C, extracting solvent was hexane

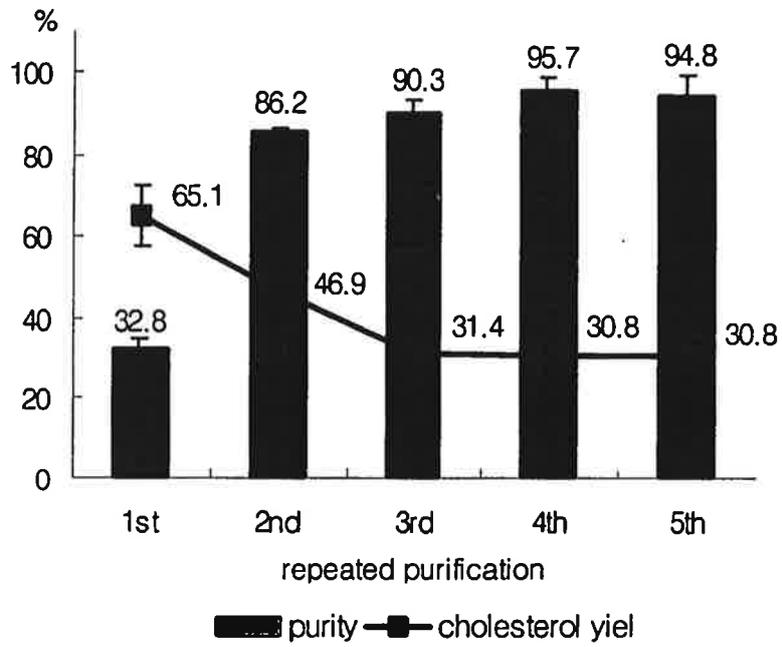


Fig. 3. Effect of repeated saponification on purification of cholesterol from the by-product containing egg cholesterol.

1st, 2nd, 3rd, 4th and 5th : repetition number for purification.

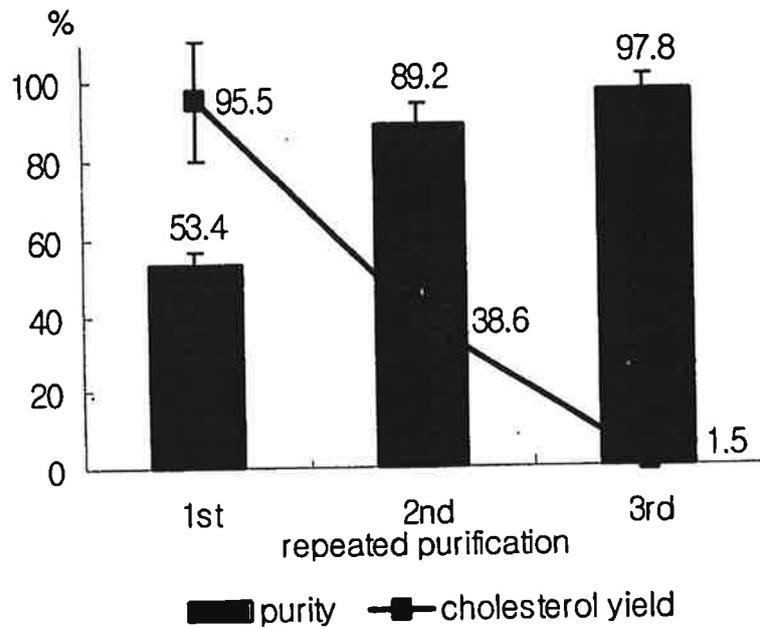


Fig. 4. Effect of repeated saponification on purification of cholesterol from egg-powder.

1st, 2nd, 3rd, 4th and 5th : repetition number for purification.

제 4 절 참고문헌

1. 한영근 : 콜레스테롤 이야기. 삼성기획, p. 9 (1995).
2. 菅野道廣, 今泉勝己 : 콜레스테롤. 신광출판사, p. 17 (1990).
3. Micich, T. J. : Behavior of polymer-supported digitonin with cholesterol in the absence and presence of butter oil. *J. Agri. Food Chem.*, 38, 1839 (1990).
4. Ricomini, M., Wick, C., Peterson, A., Jimenez-Flores, R. and Richardson, T. : Cholesterol removal from cream and anhydrous butter fat using saponins. *J. Dairy Sci.*, 73, 107 (1990).
5. 지중룡, 유익종, 박우문, 전기홍, 김천제, 임상빈 : β -cyclodextrin을 이용한 난황의 콜레스테롤 제거. 한국축산학회지, 39(5), 599 (1997).
6. Smith, D. M., Awad, A. C., Bennink, M. R. and Gill, J. L. : Cholesterol reduction in liquid egg yolk using β -CD. *J. Food Sci.*, 60(4), 691 (1995)
7. Oakenfull, D. G., Sidhu, G. S., and Rooney, M. L. : Cholesterol reduction. *Australia Patent WO 91/11114* (1994)
8. Fenton, M. and Sim, J. S. : Determination of egg yolk cholesterol content by on-column capillary gas chromatography. *J. Chromatography*, 540. (1/2) 323 (1991).
9. Paraskevopoulou, A. and Kiosseoglou, V. : Cholesterol and other liquid from egg yolk using organic solvents. *J. Food Sci.*, 59(4), 766 (1994)
10. Bracco, U. and Viret, J. L. : Decholesterization of egg yolk. *U. S. Patent 4,333,959*. (1982).
11. 임상빈, 좌미경, 고영환, 유익종 : 초임계 이산화탄소에 의한 난황분의 추출. 한국식품영양과학회지, 26(5), 860 (1997).

12. Schoenheimer, Rudolf. : The presence of cholesterol in the feces. *J. Biol. Chem.*, 105, 355. (1934).
13. AOAC. Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists. chapter 34, p. 3 (1990).
14. Nagatomo, S. : Cyclodextrins-expanding the development of their functions and applications. *Chemical Economy & Engineering Review*, 17(190), 28 (1985)
15. Keen, A. R., Ward, D. D., and Hobman, P. G. : 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 (1988).
16. SAS/STAT. user's guide. Release 6.03 edition SAS institute Inc., Cary. NC.. USA. (1988).
17. Duncan, D. B. : Multiple range and multiple tests biometrics. 11(1) 1955.
18. Ali, S., Mahmood, I., Khalid, Q. : An improved method for the extraction of cholesterol and phospholipids from the bovine spinal cord. *Prep. Biochem.*, 8(2-3), 113. (1978)

부 록 1
(초임계추출장치 및 제품관련 사진)

여 백

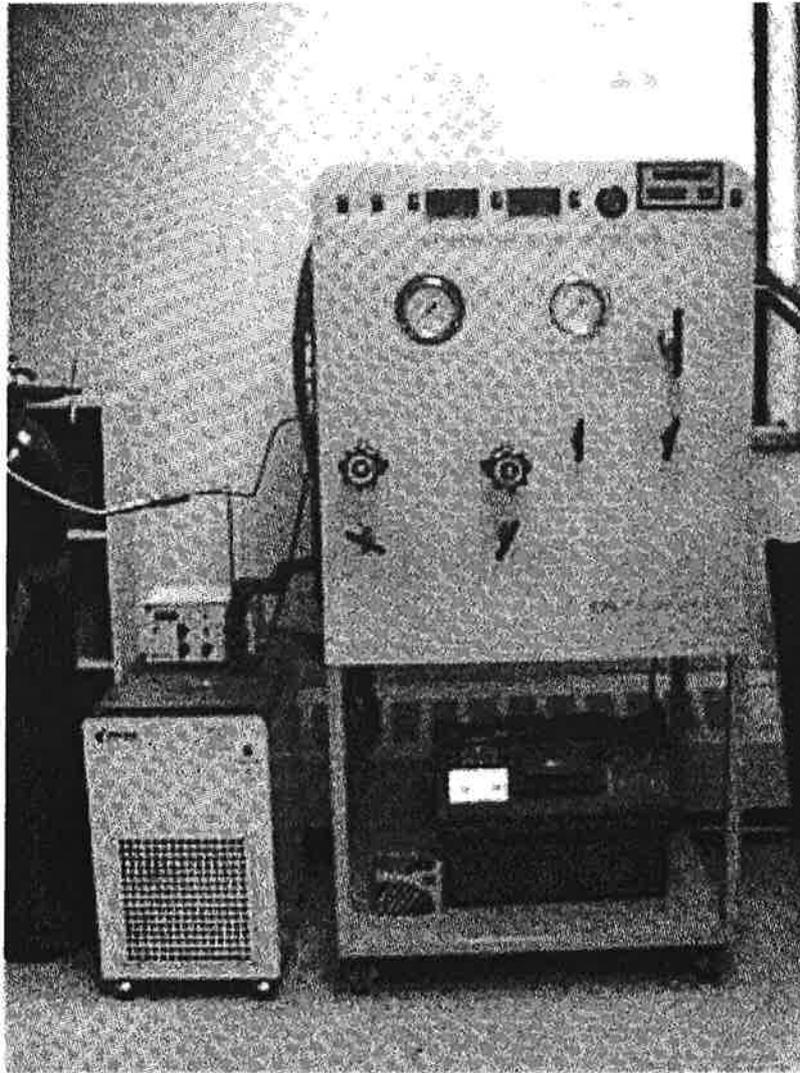


그림 1. 저콜레스테롤 계란제품의 생산을 위한 초임계유체추출장치
(당원제작)

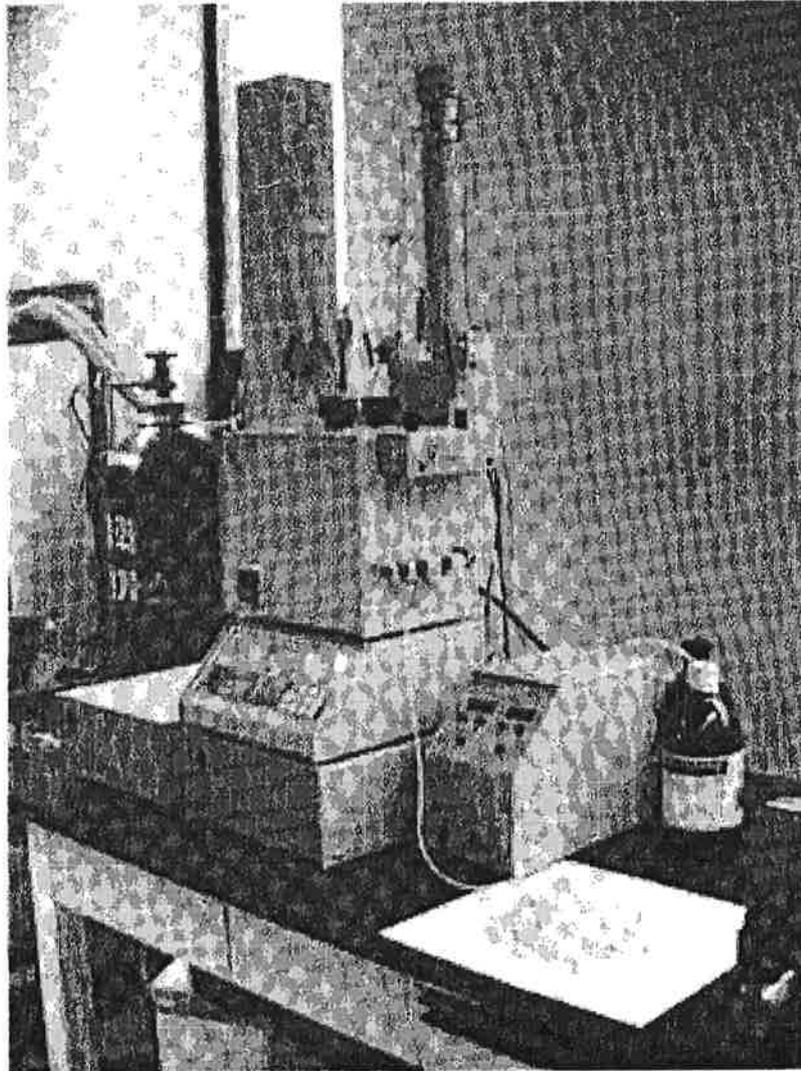


그림 2. 저콜레스테롤 계란제품의 생산을 위한 초임계유체추출장치
(Isco Co. 제작)

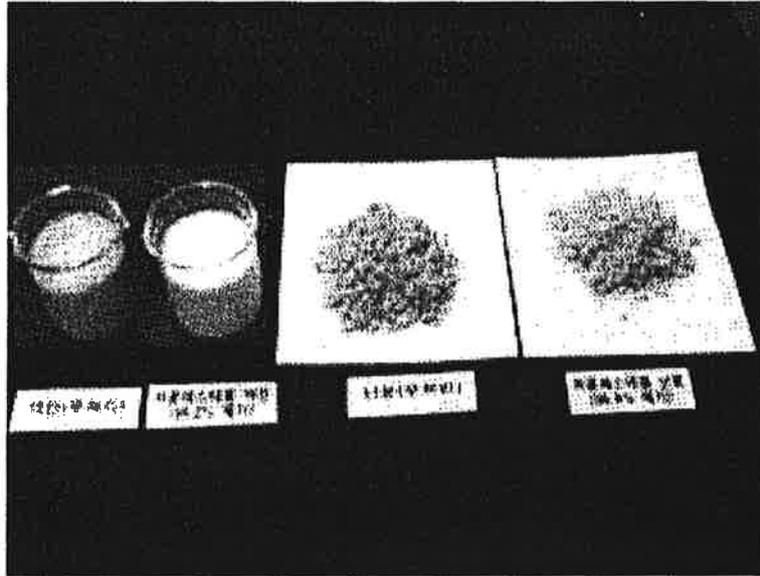


그림 3. 저콜레스테롤 액란 및 난분



그림 4. 저콜레스테롤 계란 가공제품(계란발효음료)

여 백

부 록 2
(발명특허출원서)

여 백

【요약서】

【요약】

본 발명은 식용유지인 대두유를 사용하여 난황으로부터 콜레스테롤을 제거하는데 있어서 난황액의 pH를 변화시켜 콜레스테롤 제거효율을 높이기 위하여 적절한 난황의 pH 조정에 따른 콜레스테롤 제거방법에 관한 것으로서, 대두유와 증류수를 난황에 첨가하여 혼합한 후 난황 콜레스테롤을 기름층으로 이동시켜 분리함으로써 난황으로부터 콜레스테롤을 제거하는 공정 중 콜레스테롤 제거효율을 높이기 위하여 난황의 pH를 조정하는 데에 있어서 pH 조정제로서는 1N NaOH 또는 1N KOH를 사용하고 난황의 pH는 9로 조정하며 대두유 : 난황 : 증류수의 비는 3 : 1 : 0.8로 함으로서 난황중의 많은 양의 콜레스테롤이 기름층으로 옮겨가게 됨으로서 콜레스테롤 제거효율을 증진시킬 수 있는 장점이 있는 것이다.

1. 제목 : 난황의 pH 조정에 따른 콜레스테롤 제거방법

2. 발명의 상세한 설명

본 발명은 식용유지인 대두유를 사용하여 난황으로부터 콜레스테롤을 제거하는데 있어서 난황액의 pH를 변화시켜 콜레스테롤 제거효율을 높이기 위하여 적절한 난황의 pH와 pH 조정제의 사용방법에 관한 것이다.

난황은 약 50%가 고형물로서 단백질 16%, 지질 32%, 미네랄 2%, 탄수화물 1%로 구성되어 있다. 난황지질의 주요 성분은 트리글리세라이드, 인지질과 콜레스테롤이며 이 중 콜레스테롤은 난황 중의 1.6%로서(한석현, 1996) 난황을 통한 콜레스테롤 섭취가 혈중 콜레스테롤을 높이며 심장질환 및 동맥경화를 일으킬 수 있는 요인이 될 수 있다는 소비자들의 부정적인 인식 때문에 지난 수년간 계란의 소비량은 감소하고 있는 실정이며 이러한 추세를 극복하기 위한 일환으로 콜레스테롤 함량을 낮추려는 시도가 이루어지고 있다.

난황 중의 콜레스테롤을 제거하기 위한 기술적인 방법에는 크게 두 가지가 있는데 사양시에 사료의 조성을 변화시켜 준다든지, 콜레스테롤의 흡수, 배설 및 합성과정을 저해시키는 약을 닭에게 투여한다든지 혹은 닭의 품종이나 종류를 유전적으로 취사선택하거나 닭의 산란주기, 나이, 계란의 크기 등을 조절함으로써 저콜레스테롤계란을 생산하는 사양학적인 방법과 계란에 기술적으로 물리, 화학적 처리를 실시하여 콜레스테롤을 저하시키는 방법으로 흡착제나 효소를 이용하거나 초임계추출법 또는 용매추출법이 있고 식물성유지를 이용하여 난황의 콜레스테롤을 제거하는 방법 등이 있다. 이들 방법은 각기 장, 단점이 있으나 무엇보다도 제거효과측면에서 사

양학적인 방법은 20% 이상 콜레스테롤을 제거하기 힘들며 물리, 화학적인 방법으로서는만이 70% 이상의 콜레스테롤 제거효과를 거둘 수 있어 이에 대한 연구가 많이 진행되고 있다.

물리, 화학적인 방법 중 난황 중의 콜레스테롤을 제거하기 위하여 식물성유지를 사용하는 방법은 유화방지제로서 일정량의 물을 첨가함과 동시에 가온한 식물성유지를 첨가하여 빠른 속도로 교반하면 유화상태가 불안정화되어 원심분리 등과 같은 방법을 사용하면 난황층과 기름층으로 분리되는데 이 과정에서 난황중의 콜레스테롤이 기름층으로 이동하게 됨으로서 콜레스테롤을 제거할 수 있는 방법이다. 사용할 수 있는 식물성유로는 옥수수유, 잇꽃유, 대두유, 참깨유, 해바라기씨유, 면실유, 쌀겨유, 포도씨유, 호박씨유, 낙화생유 등 매우 다양하며 콜레스테롤이 없고 상온에서 액상이며 식용 가능한 것이어야 한다.

식물성유지를 이용하여 난황으로부터 콜레스테롤을 제거하기 위한 기존의 시도로는 Bracco 등이 1982년에 난황에 hydrochloric acid를 첨가하여 pH를 6.68에서 5.65로 낮추고 유지올 첨가하여 교반하면 난황과 기름의 혼합물은 가온과 교반을 거치면서 유화안정성이 깨지고 점도가 낮아지는데 이 혼합물이 난황층과 기름층으로 분리되는 과정에서 난황 중의 콜레스테롤이 기름층으로 전이되기 쉬운 상태로됨으로서 79.84%의 콜레스테롤을 제거한 바 있다. 또한 Conte 등은 1992년 해바라기씨유를 사용하여 난황에 sodium chloride 20%와 50%의 물을 첨가하고 30분간 교반함으로써 87%의 콜레스테롤을 제거한 바 있으며 이는 난황에 식물성유지를 첨가하기 전에 산이나 염을 첨가하여 난황의 pH를 낮추면 난황의 불안정화뿐만 아니라 점도를 낮추기 때문에 콜레스테롤 추출이 용이해진다고 하였다. 한편 Lombardo 등은 1994년 대두유를 사용하여 10%의 염과 물을 첨가하여 81.4%의 콜레스테롤을 제거하였으며 유화형성 전에 산이나 염을 물과 함께 첨가하면 이 혼합물은 산을 포함하게 되고, 산이나 염은 빠르게 기름방울입자를 작게하여

유화가 불안정화되어 콜레스테롤이 쉽게 분리될 수 상태가 되어 사용하는 기름의 양을 줄이면서 콜레스테롤 제거효과를 높일 수 있다고 하였다.

이상과 같이 식물성유지를 이용하여 난황으로부터 콜레스테롤을 분리하기 위한 공정에는 대부분 산이나 염을 첨가하여 난황의 pH를 산성으로 조절하여 그 효율을 향상시키고자 하였다. 그러나 본 발명에서는 대두유를 사용하여 난황 중의 콜레스테롤을 제거하기 위한 공정의 효과를 향상시키기 위하여 pH 조정제로서 1N NaOH 또는 1N KOH를 사용하여 난황의 pH를 알칼리 영역으로 조정하고 염을 전혀 사용하지 않은 상태에서 60℃로 가온한 대두유를 난황중량의 2~4배 첨가하여 교반하면 효과적으로 유화안정성을 약화시켜 난황층을 기름층으로부터 용이하게 분리시킬수 있어 난황중의 많은 양의 콜레스테롤이 기름층으로 옮겨가게 됨으로서 콜레스테롤 제거효율을 증진시킬 수 있는 방법을 개발한 바 그 결과를 상세히 설명하면 다음과 같다.

우선 pH 조정제의 사용방법에 있어서 난황중량에 대하여 대두유 : 난황 : 증류수의 비가 2 : 1 : 0.4가 되도록 1N NaOH를 첨가하여 난황액의 pH를 7~10으로 조정하고 나머지 양은 증류수로 보정하였다. 대두유를 첨가하여 균질한 후 방치하여 난황층과 기름층의 분리를 유도하여 난황층의 콜레스테롤 함량을 분석하여 콜레스테롤 제거율을 검토하였다. 그 결과 표 1에 나타난 바와 같이 난황의 pH 상승은 콜레스테롤 제거율을 높이는 효과를 나타내어 콜레스테롤 제거율은 pH 9에서 74%로서 높게 나타났고, 이때의 1N NaOH 소모량은 pH 6.34인 난황 20g에 대하여 1.25ml이었다. pH 10 이상에서는 콜레스테롤 제거율이 감소하였고 잔존고형분은 pH 9 이상에서 감소하였다. 또한 pH 조정제로서 1N KOH를 사용하고 난황의 pH가 콜레스테롤 제거효율에 미치는 영향을 알아보려고 난황중량에 대하여 대두유 : 난황 : 증류수의 비가 2 : 1 : 0.4가 되도록 1N KOH를 첨가하여 난황액의 pH를 7~10으로 조정하고 나머지는 증류수로 보정하였다. 대두유를 첨가하여 균질한 후 방치하여 난황층과 기름층의 분리를 유도하여 콜레스

테롤 함량을 분석한 결과 표 2에 나타난 바와 같이 난황의 pH가 증가함에 따라 콜레스테롤 제거율도 증가하였으며 pH 9에서 높게 나타났다. 이 때의 1N KOH 소모량은 pH 6.34인 난황 20g에 대하여 1.38ml이었다. pH 10 이상에서는 콜레스테롤 제거율이 감소하였고 잔존고형분은 pH 증가에 따라 차이가 없었다. 난황액의 pH가 9일 때의 콜레스테롤 제거율이 86.76%, 잔존고형분은 64.46%로서 1N KOH를 사용하여 난황의 pH를 알칼리 영역으로 상승시켜도 콜레스테롤 제거율을 높이는 효과를 나타내었다.

표 1. pH 조정제로서 1N NaOH를 사용하였을 때 난황의 pH가 콜레스테롤 제거율에 미치는 영향.

pH	1N NaOH 소모량(ml)	콜레스테롤 제거율(%)	잔존고형분 (%)
대조구(6.34)	0 ^c	61.15±0.55 ^c	66.48±0.11 ^b
7	0.44±0 ^d	71.33±0.32 ^b	68.39±0.06 ^a
8	0.70±0 ^c	70.45±1.05 ^b	68.32±0.04 ^a
9	1.25±0 ^b	74.00±2.05 ^a	57.94±0.15 ^c
10	2.00±0 ^a	71.10±0.50 ^b	53.27±0.32 ^d

^{a~e} : 동일 열에서 같은 문자는 평균값의 유의적인 차이가 없음을 의미함(P < 0.05)

표 2. pH 조정제로서 1N KOH를 사용하였을 때 난황의 pH가 콜레스테롤 제거율에 미치는 영향.

pH	1N KOH 소모량 (ml)	콜레스테롤 제거율(%)	잔존고형분 (%)
대조구(6.34)	0 ^c	61.15±0.55 ^d	66.48±0.11 ^{ab}
7	0.50±0 ^d	70.30±1.00 ^c	65.58±0.67 ^{ab}
8	0.95±0 ^c	80.06±0.70 ^b	67.69±3.17 ^a
9	1.38±0 ^b	86.76±1.67 ^a	64.46±0.09 ^{ab}
10	2.20±0 ^a	77.10±2.10 ^b	61.27±0.17 ^b

^{a-c} : 동일 열에서 같은 문자는 평균값의 유의적인 차이가 없음을 의미함(P < 0.05)

난황의 pH를 알칼리로 상승시키고 대두유와 증류수의 첨가비율이 콜레스테롤 제거율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 pH 조정제로서 1N NaOH를 사용하고 난황액의 pH를 9로 조정한 후 난황중량에 대하여 대두유를 2~4배 첨가하고, 증류수를 0.4~0.8배 첨가하여 교반한 후, 난황층과 기름층의 분리를 유도하여 콜레스테롤 제거율을 알아본 결과 표 3에 나타난 바와 같다. 난황에 대하여 대두유와 증류수의 혼합비율을 높이면 콜레스테롤 제거율도 증가하여 난황중량에 대하여 대두유 : 난황 : 증류수의 비가 3 : 1 : 0.8이었을 때 콜레스테롤 제거율이 84.38%로서 높게 나타났다. 4배의 대두유를 첨가하면 잔존고형분의 함량은 증가하나 콜레스테롤 제거율은 증가하지 않았으며 콜레스테롤 제거에 효과적인 대두유 : 난황 : 증류수의 비는 3 : 1 : 0.8이었다.

표 3. pH 조정제로서 1N NaOH를 사용하고 난황의 pH가 9일 때 대두유와 증류수의 첨가비율이 콜레스테롤 제거율에 미치는 영향.

대두유 : 난황 : 증류수 (W/W/W)	콜레스테롤 제거율 (%)	잔존고형성분 (%)
2 : 1 : 0.8	76.68±1.74 ^{bc}	65.09±2.26 ^{bc}
2 : 1 : 0.6	75.02±1.51 ^d	62.00±1.47 ^c
2 : 1 : 0.4	77.56±1.33 ^{cd}	63.84±1.37 ^{bc}
3 : 1 : 0.8	84.38±0.17 ^a	69.02±1.57 ^{ab}
3 : 1 : 0.6	81.65±0.67 ^{bcd}	68.56±0.01 ^{db}
3 : 1 : 0.4	78.38±1.17 ^{ab}	67.42±0.34 ^{db}
4 : 1 : 0.8	79.42±0.61 ^{bc}	68.26±1.77 ^{ac}
4 : 1 : 0.6	80.40±0.95 ^{bc}	70.45±0.77 ^{ab}
4 : 1 : 0.4	79.62±1.48 ^{bc}	72.18±1.72 ^a

^{a-d} : 동일 열에서 같은 문자는 평균값의 유의적인 차이가 없음을 의미함(P < 0.05)

또한 pH 조정제로서 1N KOH를 사용하고 난황액의 pH를 9로 조정하여 대두유와 증류수의 첨가비율에 따른 콜레스테롤 제거율을 알아보고자 난황중량에 대하여 대두유를 2~4배 첨가하고 증류수를 0.4~0.8배 첨가하여 교반한 후 난황층과 기름층의 분리를 유도한 결과 표 4에서 나타낸 바와 같이 대두유와 증류수의 첨가비율을 증가시키면 콜레스테롤 제거효율을 높이는 효과를 나타내었다. 대두유 : 난황 : 증류수의 비율이 3 : 1 : 0.8이었을 때의 콜레스테롤 제거율이 87.99%로 높았고, 대두유의 첨가비율이 증가할수록 잔존고형분 함량은 증가하였으나 4배 이상의 대두유 첨가는 콜레스테롤 제거율을 높이는 효과가 없었다.

결과적으로 pH 조정제로서는 1N KOH를 사용하고 난황의 pH는 9로 조정하며, 대두유와 증류수의 첨가비율은 대두유 : 난황 : 증류수가 3 : 1 : 0.8일 때 난황의 콜레스테롤 제거율이 87.99%로서 가장 높았다.

표 4. pH 조정제로서 1N KOH를 사용하고 난황의 pH가 9일 때 대두유와 증류수의 첨가비율이 콜레스테롤 제거율에 미치는 영향.

대두유 : 난황 : 증류수 (W/W/W)	콜레스테롤 제거율 (%)	잔존고형분 (%)
2 : 1 : 0.8	82.50±0.00 ^{ab}	65.09±2.26 ^f
2 : 1 : 0.6	78.00±3.51 ^b	64.44±0.19 ^g
2 : 1 : 0.4	84.38±1.11 ^{ab}	68.32±0.01 ^e
3 : 1 : 0.8	87.99±0.16 ^a	76.33±0.09 ^c
3 : 1 : 0.6	85.86±1.17 ^a	75.02±0.05 ^d
3 : 1 : 0.4	81.00±1.18 ^{ab}	75.69±0.02 ^d
4 : 1 : 0.8	81.23±4.35 ^{ab}	79.70±0.05 ^b
4 : 1 : 0.6	84.89±0.59 ^{ab}	76.51±0.01 ^c
4 : 1 : 0.4	84.34±1.48 ^{ab}	80.67±0.01 ^a

^{a-g} : 동일 열에서 같은 문자는 평균값의 유의적인 차이가 없음을 의미함(P < 0.05)

3. 실시예

실시예 1) pH 조정제로서 1N NaOH를 사용하여 난황의 pH를 조정하기 위하여 pH가 6.34인 난황 20g에 1N NaOH 1.25ml를 조금씩 첨가하여 pH meter(Digital pH meter, Orion Research Inc., USA, model 520A)로 측정하면서 난황의 pH를 9로 조정하고 나머지는 난황중량에 대하여 증류수의 비가 0.4가 되도록 증류수 6.75ml를 첨가하여 보정한 후 60℃로 가온한 대두유 40g를 첨가하여 대두유 : 난황 : 증류수의 비가 2 : 1 : 0.4가 되도록 한 후 8,000rpm(IKA-Labortechnik, ultra-turrax, Germany)으로 15분간 교반하였다. 이 혼합물을 분액여두에 붓고 방치하여 아래의 난황층과 위의 기름층으로 분리시키고 난황층을 회수함으로써 난황콜레스테롤의 74%를 제거할 수 있었다.

(난황 중의 콜레스테롤 함량측정 : 콜레스테롤정량 kit [Boehringer Mannheim, Germany] 를 사용하여 측정)

실시예 2) pH 조정제로서 1N KOH를 사용하고 pH를 조정하기 위하여 pH가 6.34인 난황 20g에 1N KOH 1.38ml를 조금씩 첨가하여 pH meter(Digital pH meter, Orion Research Inc., USA, model 520A)로 측정하면서 난황의 pH를 9로 조정하고 나머지는 난황중량에 대하여 증류수의 비가 0.4가 되도록 7.62ml를 첨가하여 보정한 후 60℃로 가온한 대두유 40g를 첨가하여 대두유 : 난황 : 증류수의 비가 2 : 1 : 0.4가 되도록 한 후 8,000rpm(IKA-Labortechnik, ultra-turrax, Germany)으로 15분간 교반하였다. 이를 분액여두에서 방치하여 아래의 난황층과 기름층으로 분리시킨 후 난황층을 회수함으로써 난황콜레스테롤의 86.76%를 제거할 수 있었다.

실시예 3) pH 조정제로서 1N NaOH 1.25ml를 첨가하여 pH 6.34인 20g의 난황을 pH 9로 조정하고, 대두유 : 난황 : 증류수의 비가 3 : 1 : 0.8이 되도록 14.75ml의 증류수를 첨가하여 보정한 후 60℃로 가온한 대두유 60g를 첨가하여 8,000rpm(IKA-Labortechnik, ultra-turrax, Germany)으로 15분간 교반하였다. 이 혼합물을 분액여두에 붓고 방치하여 아래의 난황층과 위의 기름층으로 분리시킨 후 난황층을 회수함으로써 난황콜레스테롤의 84.38%를 제거할 수 있었다.

실시예 4) pH 조정제로서 1N KOH 1.38ml를 첨가하여 pH 6.34인 난황 20g을 pH 9로 조정하고, 대두유 : 난황 : 증류수의 비가 3 : 1 : 0.8이 되도록 증류수 14.62ml를 첨가하여 보정한 후 60℃로 가온한 대두유 60g를 첨가하여 8,000rpm(IKA-Labortechnik, ultra-turrax, Germany)으로 15분간 교반하였다. 이 혼합물을 분액여두에 붓고 방치하여 아래의 난황층과 위의 기

층으로 분리시킨 후 난황층을 회수함으로써 난황콜레스테롤의 88.0%를 제거할 수 있었다.

4. 특허청구의 범위

대두유와 증류수를 난황에 첨가하여 혼합한 후 난황 콜레스테롤을 기름층으로 이동시켜 분리함으로써 난황으로부터 콜레스테롤을 제거하는 공정 중 콜레스테롤 제거효율을 높이기 위하여 난황의 pH를 조정하는 데에 있어서 pH 조정제로서는 1N NaOH 또는 1N KOH를 사용하고 난황의 pH는 9로 조정하며 대두유 : 난황 : 증류수의 비는 3 : 1 : 0.8로 하는 것을 특징으로 하는 난황으로부터 콜레스테롤의 제거방법.