

저콜레스테롤 계란제품의 생산기술과 부산물의 재활용

유 익 종 / 한국식품개발연구원



약 력

- 1980. 2. 건국대학교 축산가공학과 졸업
- 1982. 2. 서울대학교 대학원 축산학 전공(농학석사)
- 1985. 필리핀국립대학교 대학원 축산학 전공(석사)
- 1988. 2. 서울대학교 대학원 축산학 전공(농학박사)
- 1980.~1988. 농수산물유통공사 종합식품연구소 연구원
- 1988.~ 현재 한국식품개발연구원
- 1998.~2000. 성균관대학교 생명자원과학부 초빙 부교수
- 2000.~ 현재 한림대학교 식품영양학과 겸임 부교수

저콜레스테롤 계란제품의 생산기술과 부산물의 재활용

Production Technology of Low-cholesterol Egg Products and Recycling of By-Products

ICK-JONG YOO

KOREA FOOD RESEARCH INSTITUTE

한국식품개발연구원 책임연구원 유익종 박사

ABSTRACT

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 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 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 saponification method with extracting solvent of hexane showed that cholesterol concentration was 28.1 %. The quantity of hydrolysis solution(95 % ethanol : 33 % KOH = 94 : 6) was varied from 40 to 80 times of sample weights and the cholesterol concentration of 35.7 % was the highest result in the 60 times(v/w) hydrolysis solution. Cholesterol concentration of 35.7 % was recovered at the first trial with saponification method, but it could be improved up to 95.7 % after 4 times repetitive purification.

(**Key words** : egg yolk, low cholesterol, purification, SFE, saponification)

서론

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 한 개에 함유되어 있는 콜레스테롤

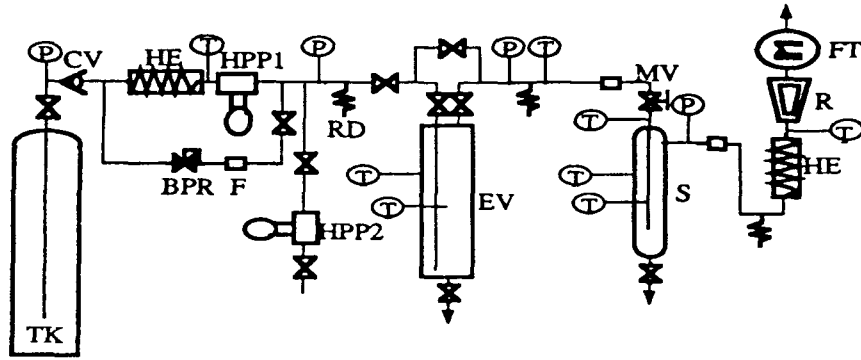


Fig. 1. Flow diagram of supercritical fluid extraction system.

(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)

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 연구 결과(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 난 가공업계는 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 처리를 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 조절하므로써 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 실

시하여 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 장단점이 있으나 무엇보다도 운영측면에서 관리비가 저렴하며 공정이 간편할 뿐만 아니라 콜레스테롤의 제거효율이 70 % 이상에 달하여 선진 외국에서도 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 점들이 보완된 경제적인 공정의 개발은 소비자들에게 계란의 소비를 기피하게 만드는 주요 요인을 제거하여 새로운 수요창출에 크게 기여할 것으로 예측된다.

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

난황을 3배의 증류수로 희석하고, 동시에 β -cyclodextrin(셀덱스 B-100, 일본식품화학)의 물비가 난황 콜

레스테롤에 대해서 1 : 3 이 되도록 첨가하여 35 °C에서 15분간 교반 후 5 °C까지 냉각하였다. 냉각된 혼합물은 2,000×G로 원심 분리하여 β-CD·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 조정한 후 난황액의 중량에 대하여 2배량의 대두유를 첨가하여 8,000 rpm의 속도로 15분간 균질하여 일정시간 방치 후 원심분리함으로써 콜레스테롤을 제거하였다.

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

초임계 이산화탄소에 의한 난황액중 콜레스테롤 분리를 위하여 본 실험에서 사용한 초임계 유체추출장치는 당 연구원에서 제작된 것이며 최대압력이 6,000 psi까지 사용 가능한 연속유동형으로 개략도는 Fig. 1과 같다. 먼저 추출조(EV)에 난황액 20 ml를 주입하였다. 탄산가스는 실린더(TK)로부터 check valve(CV)를 거쳐 고압 피스톤 펌프(HPP)에 의해 가압되었다. 이 때 탄산가스 주입부의 공동화현상을 방지하기 위하여 -20 °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 300 ml이고, 온도는 비례온도조절기에 의하여 조절되었으며 열전쌍온도계(T)에 의하여 측정되었다. 이와 같이 하여 일정 압력과 온도에서 정상상태로 유지된 후 추출조 출구로 나가는 고압의 혼합물은 가운뎃 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 3,000~5,000 psi, 추출시간은 0.5~4시간, 추출온도는 35~55 °C 등이었으며 보조용매의 사용여부, 농도 그리고 시료의 전처리 유무 등에 따라 난황액 중의 콜레스테롤 함량 변화 정도와 중량감소율 등을 측정하였다.

4. 저콜레스테롤 난황의 부산물로부터 콜레스테롤 회수

지 등(1997)과 Smith 등(1995)이 제시한 방법을 적

용하여 저콜레스테롤 난황액을 제조하였으며 이로부터 생성되는 부산물로부터 콜레스테롤을 추출하여 시료로 사용하였다. 난황 콜레스테롤의 3배 몰에 해당하는 β-cyclodextrin을 첨가하여 35 °C에서 30분간 80 rpm의 속도로 교반한 후 5 °C에서 약 1시간 동안 냉각하여 원심 분리하였다. 침전된 β-cyclodextrin과 콜레스테롤 복합체 잔류물을 회수하여 동결건조하여 710 μm sieve를 통과시켜 일정한 입자크기의 분말로 제조하였다. 건조된 복합체에 6배의 chloroform을 첨가하여 50 °C에서 120분간 100 rpm의 속도로 교반하여 Na₂SO₄를 사용하여 여과한 후 evaporator로 chloroform을 제거하였다. 저콜레스테롤 난황의 부산물로부터 β-cyclodextrin이 제거된 콜레스테롤 추출물을 냉동보관하며 정제용 시료로 사용하였다.

5. 검화법을 이용한 콜레스테롤 정제

추출된 콜레스테롤 시료는 Fenton 등(1991)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(AOAC, 1990), chloroform(Keen, 1988) 및 hexane(Fenton 등, 1991)을 사용하여 정제효과를 비교하였고, 시료량과 검화용액의 적정 비율을 선택하기 위해 용액의 양을 시료량에 대해 40~80배(v/w)로 변화시켰다. 보다 순도 높은 콜레스테롤 생산을 위해 최적 조건으로 검화과정을 반복하여 콜레스테롤의 농도를 측정하므로써 정제효과를 알아보았다.

6. 시료의 콜레스테롤 정량

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

7. 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.

8. 지방산 분석

추출잔류물의 지방산 조성은 GC(Hewlett-Packard 5890 series II)에 의하여 분석하였으며, column은 DMTM-Wax capillary(30m×0.25 mm 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.

9. 점도

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

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

10. 통계분석

평균값 및 표준오차의 산출은 SAS program(Stephenie, 1985)을 사용하여 얻어졌으며 Duncan의 다중 검정방법(1955)으로 5 %수준에서 유의성 검정하였다.

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 저콜레스테롤 계란의 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 보인다. 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 난황과 β -CD를 반응시켜 β -CD·cholesterol complex를 제거하기 위한 최적 원심력, 온도, 교반시간은 각각 2,000 g, 35 °C, 15분이었으며 난황과 증류수의 최적 희석 비율은 1 : 3임을 확인할 수 있었다.

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

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
	6.42	85.3 ^b	65.7 ^{ab}
Soybean oil application	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)

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 8,000 rpm의 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. 고흥분 잔존량은 대두유의 처리에 의해서 약 2~3 % 정도 줄어드는 경향이었지만 pH의 변화에 따라서는 큰 변화가 나타나지 않았으며 단지 pH 9일 경우 고흥분 잔존량이 63.4 %로 다소 낮은 경향을 나타내었다. 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 고흥분의 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.

2. 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 초임계 유체추출을 적용하여 난황으로부터 콜레스테롤의 효과적인 제거를 시도하였다.

Leiner(1986)는 난황분을 40 °C/300 bar에서 초임계 이산화탄소로 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, 163~374 bar에서 추출하였는데 이산화탄소의 밀도가 높은 추출조건에서 비극성인 triglyceride는 초임계이산화탄소에 많이 용해되지만 극성인 인지질은 용해 되지 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 난황액 보다는 수분이 적은 난황분이 유리한데 Novak et al.(1991)은 난황분을 40 °C/276 bar, 난황액을 35 °C/241 bar에서 추출하였을 때 콜레스테롤 제거율은 각각 78.34 %로서 난황액 추출은 비효율적이며 추출공정 중 난황액 일부가 응고되었다고 보고하였다.

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 초임계 이산화탄소를 이용하여 35~55 °C, 3,000~5,000 psi, 0.5~4시간의 운전 조건을 적용하였다. 난황액의 초임계추출시 추출압력에 의한 영향을 검토한 결과 Table 3에서 나타난 바와 같이 추출압력이 높을수록 콜레스테롤의 제거율이 높아 5,000 psi의 조건에서 92.4 %의 난황 콜레스테롤을 제거할 수 있었다. 이때의 중량감소율은 35.2 %로서 비교적 낮은 편이었다.

Bulley와 Labay(1991)도 난황분을 40 °C에서 추출압력을 150, 200, 360 bar로 증가시켰을 때 난황분의 용해도가 360 bar에서 급격히 증가하였으며 동일 압력에서

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 ^a	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)

Table 3. 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 pressure 4,500psi, extraction temp. 35°C

온도를 변화시켰을 때보다는 동일 온도에서 압력을 변화시켰을 때 난황분의 용해도가 급격히 증가하였다고 보고하였다. 콜레스테롤 제거율도 207, 276, 345 bar에서 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 4). 추출온도를 달리하여 난황액으로부터 콜레스테롤을 제거하기 위한 시험결과 Table 5에서 나타난 바와 같이 추출온도가 낮을수록 제거율이 향상되었으며 중량감소율도 높았다. 즉, 35 °C에서 추출할 경우 91.2 %의 콜레스테롤 추출율을 나타내어 가장 좋은 결과를 보였다.

3. 저콜레스테롤 계란의 품질 특성

식물성유지인 대두유치리와 β -cyclodextrin의 병용처리에 의해 생산된 저콜레스테롤 난황액(콜레스테롤 제거율 : 95.4 %)과 원료 난황액의 가공적성과 관능적 품질을 비교 검사한 결과는 Table 6에 나타난 바와 같다. 유화특성을 검토하기 위하여 유화력과 유화안정성을 시험한 결과 유화력은 신선란의 16.7 ml에 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 제거 xanthophyll 색소가 함께 제거되었기 때문에 L값은 증가하였고 a값과 b값은 저하한 결과로 사료된다.

초임계유체추출법과 β -cyclodextrin의 병용처리에 의해 생산된 저콜레스테롤 난황액(콜레스테롤 제거율 : 92.5 %)과 원료 난황액의 가공적성과 관능적 품질을 비교 검사한 결과는 Table 7에 나타난 바와 같다. 유화특성을 검토하기 위하여 유화력과 유화안정성을 시험한 결과 유화력은 신선란의 16.7 ml에 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 2.1로서 제거 전, 후 그 차이가 인정되지 않았으며 거품안정성에 있어서는 신선란의 경우 15.4 %, 저콜레스테롤 난

Table 4. 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 time 2 hrs., extraction temp. 35 °C

Table 5. 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(°C)	Cholesterol removal(%)	Weight loss(%)
35	91.2 ^d	34.9 ^b
40	90.4 ^c	33.5 ^b
45	88.5 ^b	33.2 ^a
50	86.2 ^b	31.9 ^a
55	83.0 ^a	31.8 ^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 4,500 psi, extraction time 3 hr.

황액의 경우 18.5 %로 다소 떨어진 것으로 나타났다. 점도에 있어서도 저콜레스테롤 난황액이 신선란에 비해서 다소 낮은 결과를 나타내었다. 색도의 변화는 저콜레스테롤 난황액이 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 8에 나타난 바와 같이 포화지방산인 C16:0과 C18:0은 큰 변화가 없었으며 C16:1과 C18:1은 감소하였으며 C18:2와 C18:3은 다소 증가하였다. 이것은 대두유의 성분인 리놀레인산이 공정 중에 난황액으로 유입된 것으로 사료된다.

초임계유체추출법과 β -cyclodextrin의 병용처리에 의해 생산된 저콜레스테롤 난황액(콜레스테롤 제거율 : 92.5

%)과 원료 난황액의 지방산 조성의 변화를 알아본 결과 Table 9에 나타난 바와 같이 포화지방산인 C16:0과 C18:0은 큰 변화가 없었으며 C16:1과 C18:1은 감소하였으며 C18:2와 C18:3은 다소 증가하였다.

4. 저콜레스테롤 난황생산시 생성되는 부산물로부터 콜레스테롤의 분리정제

콜레스테롤($C_{27}H_{46}O$)은 4개의 고리 cyclopentanoperhydrophenanthrene를 갖는 스테로이드계 화합물로서 고등동물의 세포막과 신경세포 보호막 구성성분이며 담즙산 및 호르몬의 생성 원료로 사용되는 생명유지 물질이다(한영근, 1995 ; 菅野道黄과 今泉騰己, 1990).

Oakenfull 등(1997)과 Paraskevopoulou와 kiosseoglou(1994)는 콜레스테롤은 물에는 거의 녹지 않고 hexane, chloroform 등의 일부 유기용매에 용해되며 검화되

Table 6. 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 7. 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 8. 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

Table 9. 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

지 않는 성질이 있다고 보고하였다.

이러한 흡착·침전성과 비검화 특성은 콜레스테롤의 분리, 정제, 분석 및 제거를 위한 여러 연구에서 적용되고 있으며, 이렇게 콜레스테롤에 관한 연구가 활발해짐에 따라 상품화된 콜레스테롤이 의학, 생화학 및 이화학적 연구를 비롯한 여러 목적으로 다양하게 사용되고 있다.

본 연구에서는 저콜레스테롤 계란 생산시 부산물로 생성되는 콜레스테롤을 간편하고, 경제적으로 정제할 수 있는 방법을 검토하였다.

Table 10에 나타낸 바와 같이 저콜레스테롤 난황액 제조시의 부산물인 β -cyclodextrin과 콜레스테롤 복합체를 동결건조한 결과 1,068.7 mg%의 콜레스테롤을 함유하는 β -cyclodextrin 복합체 분말을 얻었다. 이 복합체로부터

β -cyclodextrin을 제거하고, 복합체 무게의 27.41 %에 해당하는 콜레스테롤 농도 3,069.6 mg%의 콜레스테롤 함유물을 얻었으며, 이를 콜레스테롤의 분리, 정제용 시료로 사용하였다.

검화법을 적용하여 콜레스테롤 정제 시험을 한 결과는 Table 11과 Table 12에 나타낸 바와 같았다. 비검화물 추출용매로 hexane과 chloroform을 사용했을 경우 농도는 각각 28.12 %와 2.27 %로 나타나 유의적($p < 0.05$)으로 높은 정제효과를 나타냈으며, ether는 검화 용매층과 혼합되어 층이 분리되지 않아 비검화 물질의 회수가 불가능하였다(Table 11). Hexane을 사용한 추출이 가장 효율적이었으며, chloroform은 콜레스테롤 외에도 기타의 소수성 물질을 함께 추출하여 시료보다도 낮은 농도를 나

Table 10. Cholesterol concentration of the by-product¹⁾ and β -cyclodextrin free by-product²⁾

Samples	Cholesterol concentration(mg%)	Relative weight ratio
Egg yolk	1,496.5 ± 92.3 ³⁾	-
By-product ¹⁾	1,068.7 ± 105.3	100
β -cyclodextrin free by-product ²⁾	3,069.6 ± 221.3	27.41 ± 1.04

¹⁾ The by-product was produced from the low cholesterol egg yolk and composed of β -cyclodextrin, cholesterol and other egg components

²⁾ The β -cyclodextrin free by-product was produced through extraction of the by-product with chloroform

³⁾ All values are mean ± standard deviation of three replicates

Table 11. Effect of solvent on purification¹⁾ of cholesterol by saponification from the β -cyclodextrin free by-product²⁾

Solvents	Cholesterol concentration(%)	Cholesterol yield(%)	Product yield(%)
Hexane	28.12 ± 0.54 ^{a3)}	49.00 ± 6.49 ^b	4.26 ± 0.36 ^b
Chloroform	2.27 ± 0.06 ^b	65.52 ± 1.13 ^a	95.62 ± 3.95 ^a
Ether	- ⁴⁾	-	-

¹⁾ Experiment conditions : mixing speed 50rpm, heating time 1hr., heating temp. 60°C, hydrolysis solution: β -cyclodextrin free by-product = 50:1 (v:w)

²⁾ The β -cyclodextrin free by-product was produced through extraction of the by-product with chloroform

³⁾ Values with same superscripts in the same column are not significantly different ($p < 0.05$), (n=3)

⁴⁾ Not determined

Table 12. Effect of hydrolysis solution ratio to sample on purification¹⁾ of cholesterol from the β -cyclodextrin free by-product²⁾

Solution ratio Solution : Sample(v:w)	Cholesterol concentration(%)	Cholesterol yield(%)	Product yield(%)
40 : 1	17.92 ± 0.55 ^{d3)}	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

¹⁾ Experiment conditions : mixing speed 50rpm, heating time 1hr., heating temp. 60°C, extracting solvent was hexane, ²⁾ The β -cyclodextrin free by-product was produced through extraction of the by-product with chloroform

³⁾ Values with same superscripts in the same column are not significantly different ($p < 0.05$), (n=3)

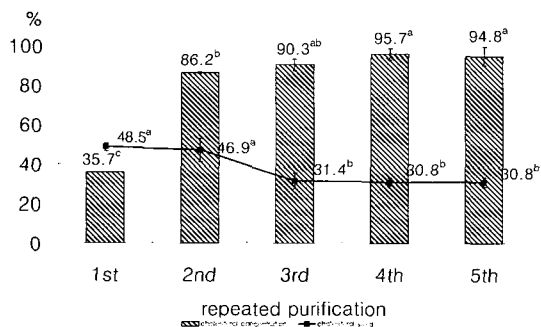


Fig. 2. Effect of repeated saponification on purification of cholesterol from the β -cyclodextrin free by-product¹⁾.

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

^{a,b,c} Superscripts which have different letters are significantly different ($p < 0.05$), ($n = 3$)

¹⁾The β -cyclodextrin free by-product was produced through extraction of the by-product with chloroform

타내었다. 시료에 대한 검화 용매의 비가 1 : 60 (w : v) 일때 유의적 ($p < 0.05$)으로 양호한 결과를 보여 농도 35.74 %로 나타났으며, 콜레스테롤 수율은 48.50 %로 나타났다 (Table 12). 시료에 대한 60배 (v/w)의 검화용매로 검화하고 Hexane으로 비검화물질을 추출하는 방법으로 반복적인 검화를 실시한 결과, 4회 반복추출시 농도는 95.7 %, 수율이 30.8 %인 콜레스테롤을 얻었다 (Fig. 2). 5회 반복추출시의 콜레스테롤 농도는 94.8 %, 수율이 30.8 %로 4회 추출시의 콜레스테롤과 유의차 ($p < 0.05$)가 없는 것으로 나타나 4회의 반복적인 검화가 효과적인 것으로 사료되었다.

적 요

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 초임계 이산화탄소를 이용하여 콜레스테롤을 추출한 결과 4,500 psi, 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 겉보기 점도도 함께 낮아졌다. 저콜레스테롤 난황의 색깔은 L value가 높아져서 대조구에 비해서 밝은 빛을 띠었고 a value 와 b value는 낮아진 결과를 나타내었다. β -cyclodextrin과 SFE처리에 의해 생산된 난황의 지방산 조성은 C16:0과 C18:0 등 포화지방산이 다소 증가하였고 C16:1과 C18:1 등 단일불포화지방산이 감소하는 경향을 나타내었다.

저콜레스테롤 난황액 제조시 생산된 부산물 중의 콜레스테롤을 검화법을 응용하여 분리, 정제하였다. 저콜레스테롤 난황액 생산시 침전되는 β -cyclodextrin과 콜레스테롤 복합체를 chloroform으로 추출하여 β -cyclodextrin을 제거한 것을 초기시료로 사용하였으며 이 시료의 콜레스테롤 농도는 3,069.6 mg%이었다. 검화법을 이용한 정제시 콜레스테롤 등 비검화물질의 추출을 위해 용매로 hexane을 사용하였을 때 chloroform과 ether 등의 용매에 비해 cholesterol 농도가 높았으며 검화 용액(95 % ethanol : 33 % KOH=94 : 6)은 시료 무게의 60배 (v/w)로 적용하였을 때가 처리구에서 콜레스테롤 농도 35.7 %로 가장 높은 결과를 나타냈다. 반복적인 검화 정제에 의해서 콜레스테롤 농도가 점차 높아졌으며 4회의 반복정제 결과 농도는 95.7 %인 콜레스테롤을 얻을 수 있었다.

인용 문헌

1. Ali S, Mahmood I and Khalid Q 1978 An improved method for the extraction of cholesterol and phospholipids from the bovine spinal cord Prep. Bicchem. 8:113.
2. A.O.A.C 1991 Official method of analytical, 15th edition. Association of official analytical chemist, Washington, D.C.
3. Bogin E 1991 Low cholesterol eggs. Proceeding of the 4th European symposium on the quality of eggs products. 97.
4. Bracco U and Viret JL 1982 Decholesterization of egg yolk. U.S. Patent 4,333, 959.
5. Bringe NA and Cheng J 1995 Low fat, low-

- cholesterol egg yolk in food applications. *Food Technology* 5:94-106.
6. Chung SL and Ferrier LK 1991 Partial lipid extraction of egg yolk powder : The effects on emulsifying properties and soluble protein fraction. *J. Food Sci.* 56:1255.
 7. Chung SL and Ferrier LK 1992 pH and sodium chloride effects on emulsifying properties of egg yolk phospholipids. *J. Food Sci.* 57:40.
 8. Conte JJA, Johnson BR, Hsieh RJ and Ko SS 1992 Method for removing cholesterol from eggs. U.S. Patent 5,091,203.
 9. Duncan DB 1995 Multifactor range and F test, *Biometrics*, 11, 1.
 10. Fenton M and Sim JS 1991 Determination of egg yolk cholesterol content by on-column capillary gas chromatography, *J. of Chromatography* 540:323-329.
 11. Folch J, Lees M and Sloan S 1958 A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissue. *J. Bio. Chem* 226:447-509.
 12. Froning GW, Wehling RL, Cuppett SL, Pierce MM, Niemann L and Siekman DK 1990 Extraction of cholesterol and other lipid from dried egg yolk using supercritical carbon dioxide. *J. of Food Science* 55(1), 95-98.
 13. Hardarottir I and Kinsella JE 1988 Extraction of lipid and cholesterol from fish muscle with supercritical fluids. *J. of Food Sci.* 53:1656-1658.
 14. Keen AR, Ward DD, and Hobman PG 1988 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.
 15. Kijowski M and Lombardo SP 1994 Extraction of cholesterol from egg yolk. Japanese Patent 6,504, 655.
 16. Lippel K, Tyroler HA and Eder H 1981 Relationship of hypertriglyceridemia to atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 1:406.
 17. Lombardo SP and Kijowski M 1994 Reduction of cholesterol in egg yolk by the addition of either acid or both salt and acid. U.S. Patent 5,312,640 (1994).
 18. Mark AM and Krukonis VJ 1993 *Supercritical fluid extraction*, Butterworth Publication.
 19. Micich TJ 1990 Behavior of polymer-supported digitonin with cholesterol in the absence and presence of butter oil. *J. Agri. Food Chem.* 38:1839.
 20. Morison MR and Smith LM 1964 Preparation of fatty acid methylesters and dimethylacetals from liquid boron fluoride methanol. *J. Lipid Res.* 5:600-608.
 21. Nagatomo S 1985 Cyclodextrins-expanding the development of their functions and applications. *Chemical Economy & Engineering Review*, 17:28.
 22. Oakenfull DG, Sidhu GS and Rooney ML 1994 Cholesterol reduction. Australia Patent WO 91/11114.
 23. Paraskevopoulou A and Kiosseoglou V 1994 Cholesterol and other lipid from egg yolk using organic solvents. *J. Food Sci.* 59:766.
 24. Ricomini 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.
 25. Rizvi SSH, Benado AL, Zollweg JA and Daniels JA 1986 *Supercritical fluid extraction: fundamental principles and modeling methods*. *Food Technology*. 40:55-65.
 26. Rossi ME Spedicato and Schiraldi A 1990 Improvement of supercritical CO₂ extraction of egg lipids by means of ethanolic entrainer. *Ital. J. Food Sci.* 4:249-255.
 27. Schoenheimer R 1934 The presence of cholesterol in the feces. *J. Biol. Chem* 105:355.
 28. Smith DM, Awad AC, Bennink MR and Gill JL 1995 Cholesterol reduction in liquid egg yolk using β -CD. *J. Food Sci.* 60:691.
 29. Stephenie PJ 1985 *SAS/SAT™ Guide for personal computers*, Version 6 Edition, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA : 58.
 30. Stouffer SC and Majeres LJ 1994 Method for extracting cholesterol from egg yolk. U.S. Patent 5,316,780.
 31. Warren MW and Ball HRJR. 1991 Lipid composition and supercritical carbon dioxide reduced cholesterol dried egg yolk^{1,2,3}.

- Poultry Science. 70:1991-1997.
32. Yano N, Fukinbara I, Yoshida K and Wakuyama Y 1980 Decholesterolized and de-fatted egg powder and method producing same. U.S. Patent 4,234,619.
 33. Zeidler G, Pasin G and King A 1994 Removing cholesterol from liquid egg yolk by carbon dioxied-supercritical fluid extraction, Egg uses and processing technologies, New Development, CAB International 115-126.
 34. 유익중 지중룡 김현수 박우문 전기홍 1997 대두유를 이용한 난황의 콜레스테롤 제거. 한국축산식품학회지 17:6.
 35. 이복희 유익중 강통삼 1993 계란콜레스테롤 함량 조절 기술에 관한 고찰. 한국가금학회지 20:217.
 36. 임상빈 좌미경 고영환 유익중 1997 초임계 이산화탄소에 의한 난황분의 추출. 한국식품영양과학회지 26:860.
 37. 지중룡 유익중 박우문 전기홍 김천제 임상빈 1997 β -cyclodextrin을 이용한 난황의 콜레스테롤 제거. 한국축산학회지 39:599.
 38. 한병석 김공한 정인석 1998 초임계 이산화탄소를 이용한 홍화로부터 황색소 추출. 한국농화학회지. 41:363-366.
 39. 한석현 1996 계란의 과학과 그 이용. 선진문화사. 79-91.
 40. 한영근 1995 콜레스테롤 이야기. 삼성기획. 23-27.
 41. 菅野道廣, 今泉脛己 1990 콜레스테롤. 신광출판사. 17.