



반응표면 분석법을 이용한 계란 난황 레시틴 분리 최적조건

장애라 · 임동균 · 전희준¹ · 조철훈^{2,*} · 김일준³ · 이무하

서울대학교 식품 · 동물생명공학부, ¹롯데중앙연구소,

²충남대학교 동물자원생명과학과, ³농협중앙연구소

Optimum Conditions for the Separation of Lecithin from Egg Yolk by Response Surface Methodology

Aera Jang, Dong-Gyun Lim, Hee-Joon Jeon¹, Cheorun Jo^{2,*}, Il-Joon Kim³, and Mooha Lee

Division of Food and Animal Biotechnology, Seoul National University, Seoul 151-921, Korea

¹Lotte R&D Center, Seoul 150-104, Korea

²Department of Animal Science and Biotechnology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

³National Agricultural Cooperative Federation, Ansong 456-824, Korea

ABSTRACT

The optimum conditions for the extraction of lecithin from egg yolk were determined using response surface methodology (RSM). On the basis of the results of preliminary experiments, the most effective values were selected. The effects of three independent variables, dilution ratio, solvent composition, and extraction temperature on the response of crude egg lecithin (g) were then determined. The optimum conditions for egg lecithin separation obtained using ridge analysis were 6.51, 95.83%, and 40.2°C for the dilution ratio, solvent composition, and extraction temperature, respectively. Using the optimum conditions, 55.04% of crude lecithin in total phospholipid can be obtained from 100 g liquid egg yolk. The experimental values (56.21% crude lecithin in total phospholipid) agreed with the predicted values.

Key words : egg yolk, lecithin, RSM, phospholipid

서 론

신선한 계란의 난황은 고형분이 43.8% 정도인데 고형분 중에는 단백질 34.3%, 지질 55.8, 탄수화물 3.6%, 회분 3.4% 수준으로 구성되어 있다(Palacios and Wang, 2005). 이 중에서 난황지질의 주성분은 중성지질 65%, 인지질 29%, 콜레스테롤 5%로 구성되어 있다. 인지질은 건강식품 보조용이나 리포솜 제조 등 생물학 분야에 이용될 뿐만 아니라 계면활성 작용, 침투작용, 불포화지방산이 높아 혈류관계의 질병 예방용, 또는 피부보습 및 재생기능으로 인하여 화장품의 원료로도 이용이 되는 등 다양한 용도로 활용되고 있다(Nielsen, 2001; Hernandez *et al.*, 2005; Nielsen and Shukla, 2004). 또한 난황 인지질은 레시틴의

화학명인 phosphatidyl choline(PC)이 70-80%, phosphatidyl ethanolamine(PE) 10-15%, lysophosphatidyl choline(LPC) 1-2%, sphingomyelin 13%로 구성되어 있으며, PC 함량에 따라 기능성의 차이를 나타낸다 (Kim *et al.*, 1995). 이와 같이 난황 레시틴은 여러 분야에서 유용한 물질로 이용이 증대되고 있으며, 레시틴 함량이 높을수록 부가차치가 높기 때문에 미국, 일본 등에서는 레시틴 분리, 추출산업이 발달해 있다.

전통적으로 레시틴의 분리, 추출방법은 주로 아세톤 등 유기용매를 이용하고 있으나 최근에는 고순도의 레시틴을 독성이 없는 용매를 사용하여 경제적인 방법으로 분리, 추출하려는데 연구의 초점을 맞추어 왔다(Nielsen, 2001). 식물성 레시틴인 대두 레시틴은 주로 유지정제 과정의 부산물로 얻어지지만 난황레시틴을 정제하는 방법은 난황에 에탄올이나 isopropanol을 사용하여 추출하는 방법이 일반적이다(Hanahan *et al.*, 1951; Kim *et al.*, 1995). 더욱이 에탄올을 이용한 추출은 용매의 독성에 대한 염려 없이 레시틴을 생산할 수 있다는 장점이 있다(Schneider, 1989).

*Corresponding author : Cheorun Jo, Department of Animal Science and Biotechnology, Chungnam National university, Daejeon 305-764, Korea. Tel : 82-42-821-5774, Fax: 82-42-825-9754, E-mail: cheorun@cnu.ac.kr

난황 레시틴을 추출할 때 주로 건조 난황분을 이용하는 데 이는 난황액에서는 인지질과 단백질의 결합이 매우 강하여 핵산 등의 처리에 의한 인지질의 효과적인 추출이 불가능하기 때문이다(Sim, 1994). 그러나 난황분의 이용은 난황의 건조를 위해 열처리나 건조과정을 거쳐 에너지 소모가 크며 이를 통한 변성은 단백질 및 지질의 기능적 특성을 저감시키는 단점이 있다.

지금까지 진행되어온 난황 내 인지질의 분리연구는 대부분 온도, 추출용매 및 시간 등의 요인변수들 중 한 가지를 지정하고 나머지 요인 변수들을 일정하게 변화시켜 하나의 요인에 따른 조건을 확립하는 이른바 one-factor-at-time 방법을 활용하고 있는 실정이다(Gontard, 1992). 그러나 반응표면 분석법은 여러 개의 독립변수가 복합적인 작용을 함으로써 종속변수에 영향을 주는 경우 실험 회수를 최소화하면서 반응의 변화를 폭넓게 평가할 수 있는 통계학적 분석 방법이므로 one-factor-at-time method로 찾아내기 힘든 최적 조건을 찾아낼 수 있다(Cho *et al.*, 2004; Lee, 2004; Lee *et al.*, 2000; Myers, 1971). 따라서 최근 식품산업 분야에서는 반응표면 분석법(RSM; response surface methodology)을 이용하여 제품개발, 공정 개발, 원가절감, 분석방법개발, 품질관리 등의 다양한 효과를 이루고 있다.

따라서 난황 레시틴의 분리과정에 따른 요인별 상호작용에 따른 공정을 최적화하는 예측모델의 개발이 필요하다고 보고 본 연구에서는 건조과정을 거치지 않은 난황액에서 용매의 독성이 없는 에탄올과 여러 조건을 조합하여 난황액내 고순도의 레시틴 분리 추출공정을 단순화하고 최적화 하기위해 실시하였다.

재료 및 방법

계란 및 시약

계란은 서울의 대형마트에서 판매하는 계란을 구입하여 사용하였다. 구입해 온 계란은 당일 할란하여 난황막을 제거한 후 난황만을 별도로 모아 냉동하여(-20°C) 실험에 사용하였다. 인지질 구성 표준물인 phosphatidyl choline, phosphatidyl ethanolamine, sphingomyelin은 Sigma Co.(St Louis, MO USA)의 제품을 이용하였고 모든 용매는 HPLC grade를 이용하여 분석하였다.

실험방법

1) 조인지질 정량 및 인지질 성분 구명

난황액 에탄올 인지질 추출은 Fig. 1에 제시한 바와 같이 진행하였으며 조인지질 함량은 건강기능식품공전(2004)에 제시된 방법에 따라 아세톤 불용물질의 정량에 의해 측정하였고 분리된 인지질의 주요 구성 성분인 phosphatidyl

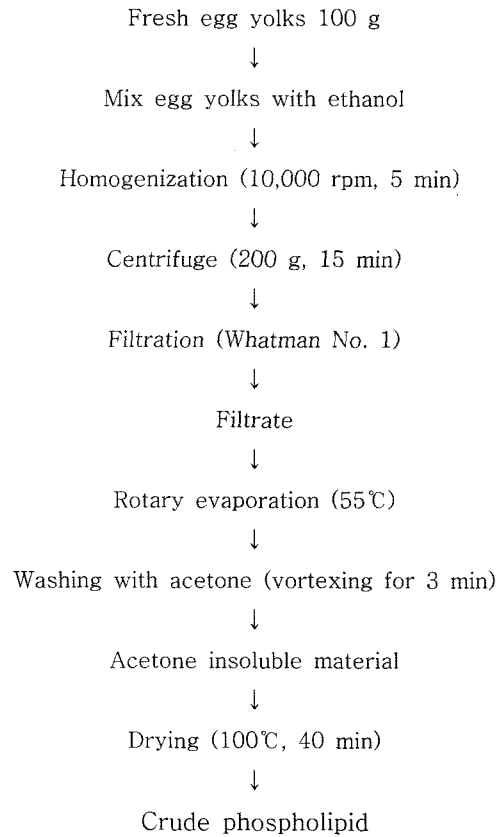


Fig. 1. Extraction of crude phospholipid from liquid egg yolk.

choline, phosphatidyl ethanolamine 및 sphingomyelin은 Table 1의 분석조건으로 HPLC를 이용하여 분리 하였다. 분리 용매는 비율대로 잘 섞은 후 완전 탈기한 후 사용하였고 인지질 시료는 0.45 μ m 필터 처리하여 이용하였다.

2) 균질 방법과 시간에 따른 레시틴 분리

균질 방법상의 차이를 측정하기 위해 균질기(20,000 rpm; Ultra Turrax T25B, IKA, Germany)로 5분, 자석막대를 사용한 교반(VELP, EU) 30분, 초음파(Branson 8210, USA) 30분으로 각각 실온에서(23°C) 난황액에 처리한 후 레시틴 분리정도를 확인하였다.

3) 균질 시간과 아세톤 세척량에 따른 레시틴 분리

난황액의 인지질 추출을 위한 균질시간에 따른 효과를 균질기(Ultra Turrax T25B)를 이용하여 실온에서 20,000 rpm의 속도로 5 min과 10 min의 균질 조건을 통해 비교

Table 1. HPLC condition for lecithin from egg yolk phospholipid

Pump	HP 1100
Column	Zorbax Analytical C ₁₈ (4.6×25 mm×5 μ m)
Solvent	<i>n</i> -hexane/isopropanol/water=6.0/8.0/1.8 (v/v/v)
Flow rate	1 mL/min
Detector	UV Detector (205 nm)

하였다. 또한 인지질내 지방을 제거하기위해 아세톤 첨가량에 따른(50, 100, 150 mL) 인지질 함량과 phosphatidyl choline의 함량을 측정하여 적정 조건을 선정하였다.

4) 반응표면분석기법을 이용한 레시틴 최적 분리조건 선정
난황 레시틴 분리조건에 대한 실험계획은 미리 예비실험을 통하여 추출용매로는 에탄올을 선택하였고 레시틴분리에 가장 영향하는 조건을 선택하여 그 조건을 바탕으로 설립한 중심합성계획(central composite design, CCD)에 따라 독립변수는 용매비율(시료대비 3, 6, 9배), 추출온도(20, 40, 60°C), 에탄올 농도(90, 95, 100%)로 하였으며 각 실험 조건은 -1, 0, 1 으로 부호화하여 설정된 15개 조건에 의해 2회 이상 반복실험을 실시하였다. 또한 이들 독립변수에 의해 영향을 받는 종속변수로는 레시틴의 함유율로 하였으며 각 독립변수의 수준은 Table 2와 같다. 모델식의 예측을 위한 회귀분석은 SAS 프로그램(2000, version 9.12)을 이용하였고 독립변수에 대한 종속변수의 반응표면 상태를 3차원그래프와 등고선 분석으로 실시하였다. 회귀분석결과 임계점이 최대점이거나 최소점이 아니고 안장점일 경우 능선분석을 행하여 최적점을 구하였다(Sung, 1993).

5) 난황 레시틴 지방산 조성

분리된 레시틴을 Folch의 방법(1957)에 따라 지방을 클로로폼 : 메탄올 (2:1)로 추출하여 14% BF₃-메탄올로 메틸 에스테르화하여 핵산에 녹인 후 지방산 조성을 가스크로마토그래프(Hewlett Packard 6890, USA)를 이용하여 불꽃이온 검출기로 검출하였다. 이 때 컬럼은 Supelco wax 10 capillary column(30 m×0.25 mm×0.25 μm)을 이용하였으며, 오븐의 초기 온도는 180°C 이었고 2°C/min의 속도

로 승온 하였으며 최종 온도는 220°C 이었다. 주입구와 검출기의 온도는 각각 250°C와 260°C이었다.

통계처리

균질방법, 균질시간, 아세톤 처리량에 관한 데이터는 Statistical Analysis System(2000, SAS version 9.1) 프로그램을 이용하여 분산분석을 실시하였으며 유의성이 인정되는 경우 Duncan's multiple range test를 이용하여 평균값간의 유의성을 5%이내의 수준에서 조사하였다.

결과 및 고찰

균질 방법에 따른 레시틴 함량

계란 난황액에서 인지질의 추출 전처리 조건을 확립하기위해 균질방법을 달리하여 살펴보았다(Table 3). 균질기를 이용하여 5분간, 자석막대를 이용한 교반 30분, 초음파 30분의 처리 후 인지질 함량은 각각 6.07, 5.63, 5.30%이었고 이들 분리된 인지질의 레시틴의 함량은 각각 56.14, 52.40, 49.15%를 나타내었다($p < 0.001$). 따라서 균질기로 5

Table 3. Phospholipid and lecithin composition of egg yolk after different extraction methods

Treatment	Homogenization for 5 min	Stirring for 30 min	Ultrasonication for 30 min
Yield	6.07±0.222 ^a	5.63±0.085 ^{ab}	5.30±0.234 ^b
Phospholipid	63.52±0.940 ^a	59.21±0.910 ^b	58.54±1.660 ^b
Lecithin ¹⁾	56.14±0.040 ^a	52.40±0.360 ^b	49.15±0.180 ^c

¹⁾Lecithin content is percentage of separated phospholipid.

^{a-c}Means in the same row with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

Table 2. Central composite design arrangement and variables

Treatment No.	Levels for Independent variables			Dependent variables Lecithin(y)	Independent variables		
	X1	X2	X3		Dilution ratio(X1)	Temperature(X2)	% Ethanol(X3)
1	1	1	0	73.25	9	60	95
2	1	-1	0	59.91	9	20	95
3	-1	1	0	47.78	3	60	95
4	-1	-1	0	20.97	3	20	95
5	1	0	1	48.69	9	40	100
6	1	0	-1	56.54	9	40	90
7	-1	0	1	75.80	3	40	100
8	-1	0	-1	5.73	3	40	90
9	0	1	1	84.21	6	60	100
10	0	1	-1	72.53	6	60	90
11	0	-1	1	65.30	6	20	100
12	0	-1	-1	63.10	6	20	90
13	0	0	0	52.21	6	40	95
14	0	0	0	52.21	6	40	95
15	0	0	0	52.21	6	40	95

분간 처리한 방법이 유의적으로 높은 인지질 함량을 보였으며 또한 레시틴의 함량도 56.14%로 가장 높은 조성을 나타내었다. 이는 난황을 20,000 rpm의 속도로 5분간 균질한 방법이 지방과 단백질의 결합을 더 효율적으로 깨어 준 것으로 생각된다. Sim 등(1994)은 100 g의 생 난황액을 400 mL의 95% 에탄올을 첨가하여 자석 교반하여 30 분과 60분 추출 후에 각각 10.92 g과 12.15 g의 조 레시틴을 얻었다고 하였다 (Kim *et al.*, 1995; Sim *et al.*, 1994). 그러나 본 연구에서는 자석교반이나 초음파 처리 방법보다 5분간 균질기를 이용한 방법이 더 높은 레시틴 함량을 보여 이후 이 방법을 선택하여 이용하였다.

균질 시간에 따른 레시틴 함량

레시틴 추출을 위한 균질 방법을 선정한 후 시간에 따른 레시틴 함량의 변화를 살펴보았다(Table 4). 난황액에 5분과 10분의 균질화 후 인지질 함량은 10분 처리후 6.07% → 4.94%으로 오히려 유의적으로 감소하였으며 이에 따라 PC의 함량도 56.14 → 54.21%로 감소하였다($p < 0.001$). 따라서 난황 내 레시틴 분리를 위한 균질시간을 5분으로 선정하였다. Palacios와 Wang(2005)은 난황액 내 인지질이 7.0% 함유되었다고 하여 본 연구결과보다 0.9% 높은 경향을 나타내었는데 Chi와 Lin(2002)은 생 난황에서 인지질은 약 10%를 차지한다고 하고 총 난황 건물에서는 약 22%를 차지한다고 보고 하였다(Palacios and Wang, 2005).

아세톤 세척량에 따른 레시틴 함량

아세톤은 난황 내 인지질 분리시 지방을 제거하기 위해 흔히 쓰인다(AOAC, 1994). Fig. 1의 과정에 따라 아세톤을 50, 100 및 150 mL으로 처리하여 전체 수율, 인지질 및 레시틴의 함량을 살펴본 결과 아세톤 첨가량이 증가할수록 인지질의 수율은 감소했으나 추출된 레시틴의 함량은 오히려 증가하였다(Table 5). Wu와 Wang(2003)도 이 같은 현상을 보고 하였는데 난황 내 수분이 부분적으로 아세톤에 용해되어 아세톤의 극성을 상대적으로 더욱 극성을 띠게 하여 아세톤과 물의 혼합물이 증가되어 인지질의 용해성이 증가되어 전체적인 수율은 감소한 것으로 보고하였다. 따라서 이후 아세톤 처리 함량은 PC의 순도가 증가된 150 mL을 선택하여 이용하였다.

Table 4. Phospholipid and lecithin composition of egg yolk after different homogenization times

Time (min)	5	10
Yield	6.07±0.222 ^a	4.94±0.158 ^b
Phospholipid	63.52±0.690 ^a	61.24±0.240 ^b
Lecithin ¹⁾	56.14±0.040 ^a	54.21±0.105 ^b

¹⁾Lecithin content is percentage of separated phospholipid.

^{a-b}Means in the same row with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

Table 5. Phospholipid and lecithin composition of egg yolk after acetone washing with different volumes

Acetone addition (mL)	50	100	150
Yield	6.73±0.440 ^a	6.07±0.220 ^b	4.91±0.120 ^c
Phospholipid	61.47±0.960 ^b	63.52±0.940 ^a	64.84±0.890 ^a
Lecithin ¹⁾	54.89±0.085 ^c	56.14±0.040 ^b	59.12±0.017 ^a

¹⁾Lecithin content is percentage of separated phospholipid.

^{a-c}Means in the same row with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

반응표면분석법을 이용한 레시틴 분리 최적 조건

위 실험에서 얻어진 난황액 레시틴 분리조건(20,000 rpm에서 5분간 균질, 아세톤 150 mL 첨가)을 기본으로 하여 여러 연구결과에서도 보고된(Kim *et al.*, 1995; Palacio and Wang, 2005) 인지질 추출에 가장 영향을 미치는 추출 온도, 추출용매 첨가비율, 추출용매 회석비를 요인으로 하여 반응표면분석기법으로 배치한 15개 실험 처리구에 대한 난황액 레시틴 분리실험을 실시하였다. 난황액내 인지질 추출 최적화에 세 가지 요인변수인 에탄올 첨가비율(3-6 배, X1), 추출온도(20-60°C, X2), 에탄올 농도(90-100%, X3)에 따른 종속변수(레시틴%, Y)에 대한 반응표면 회귀식은 다음과 같다.

$$Y = 1920.991062 + 146.849912X1 - 3.771257X2 - 49.343757X3 - 1.462981X1^2 - 0.056084X2X1 + 0.028576X2^2 - 1.298733X3X1 + 0.023681X3X2 + 0.305743X3^2$$

이 식을 바탕으로 추출된 레시틴함량에 대한 R²은 0.911이고 유의성은 0.034으로 그 유의성이 인정되었다($p < 0.05$). 또한 난황 레시틴 추출에 대한 에탄올 첨가비율의 F-ratio가 7.68로서 5%의 유의수준으로 통계적 유의차를 보였고 추출온도와 에탄올농도의 F-ratio는 각각 2.75, 6.00을 보였으며 에탄올 농도에서만 5%의 유의성을 나타내었다. 따라서 난황액내 레시틴의 추출은 에탄올의 첨가비율과 농도에 의해 통계적으로 유의적인 영향을 받았으나 추출온도에 따른 영향은 낮은 것으로 판단되었다. 이러한 결과는 Palacios와 Wang(2005)이 열처리가 에탄올을 이용한 인지질의 추출에 불필요하다고 보고한 것과 유사한 것으로 일반적으로 지방을 함유한 물질에 열처리하여 단백질이 변성되면 단백질과 지방의 결합을 절단하여 지방의 추출을 용이하게 하는 것으로 알려져 있으나 에탄올 자체가 강한 극성 용매로 이미 단백질과 지방의 결합을 충분히 절단하였기 때문인 것으로 추정하였다.

처리조건에 따른 예측된 정상점은 최적 분리조건(maximum point)이 나타나지 않고 안장점(saddle point)이 나타나 이에 대한 최적 분리조건을 찾기 위해 능선분석을 실시한 결과 최적의 분리 조건은 난황액 100 g 기준시 에탄올 농도 95.83%, 추출온도는 40.2°C, 에탄올 첨가비율

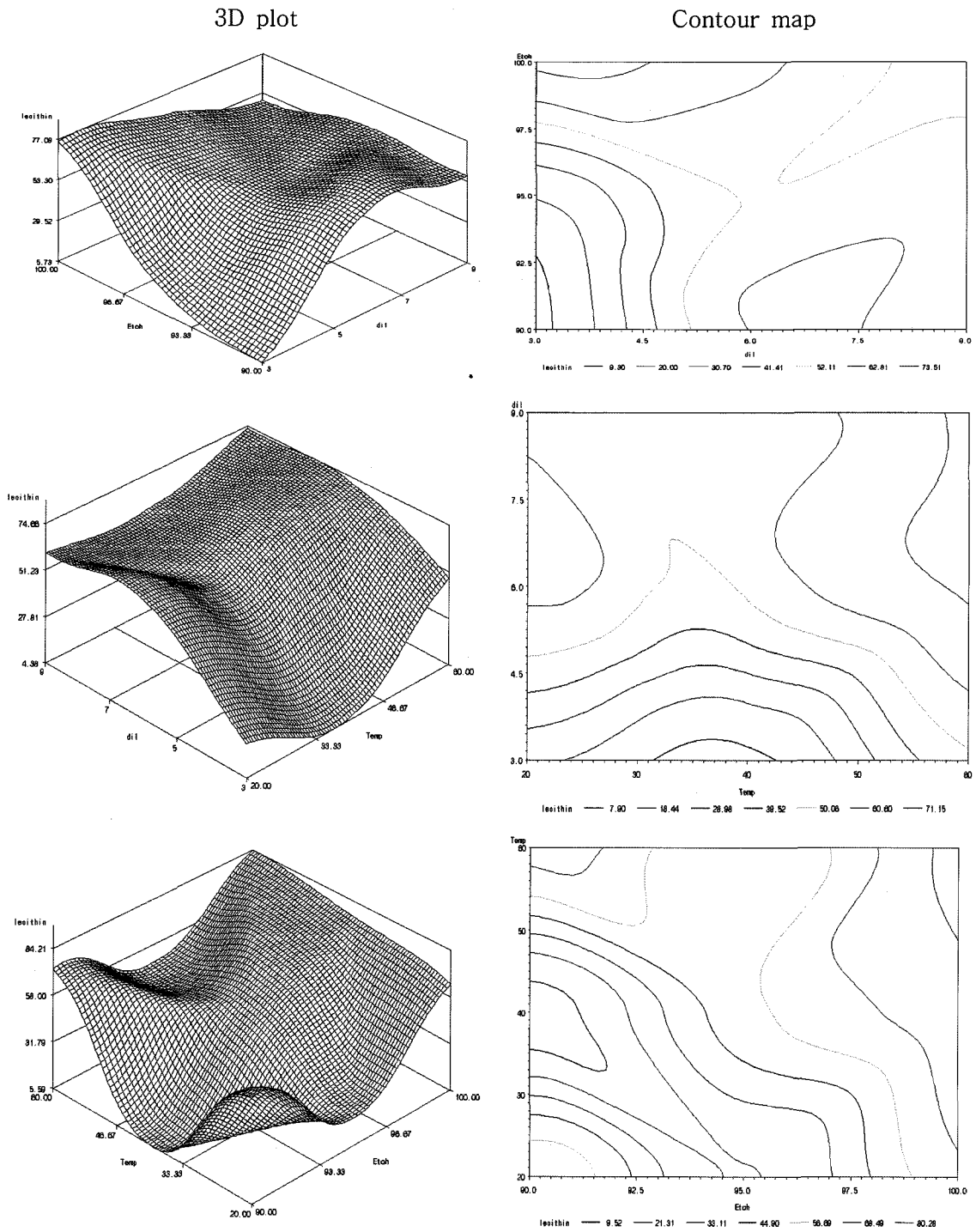


Fig. 2. Response surface 3D plots and their contour maps.

은 6.51배이며 이때의 최대 레시틴 함량비는 55.04%인 것으로 예측되었다. 예측된 최적 조건에서의 추출된 레시틴의 실제 레시틴 측정값은 56.21%을 보여 예측값과 유사한 함량을 보였다. 레시틴 분리를 위한 선정된 최적 조건 중 에탄올 농도 95.83%는 Kim 등(1995)이 난황분에서 85~99.9%의 에탄올 농도로 추출 하였을 때 95%의 농도에서 가장 레시틴함량이 높았다고 보고한 결과와 유사하였으며 또한 15%(v/v) 이상의 수분 함량은 레시틴의 응집현

상을 일으켰다고 했으며 이와는 달리 Palcio와 Wang(2005)은 91% 에탄올로 난황과 에탄올의 함량을 1:5로 하여 분리한 결과 53.3%의 레시틴함량을 얻어내었다고 하였다. 또한 본 연구를 통해 결정된 최적의 난황과 에탄올 비율이 1:6.51배이었고 Kim 등(1995)은 1:10에서 효과적이라고 보고하였으나 본 연구 결과로 설정된 비율이 다소 낮은 용매비율로서 더욱 경제적인 가치가 있을 것으로 판단된다.

Table 6. Fatty acid composition of separated lecithin (unit: %)

Fatty acid	SEL ¹⁾	KPC-50 ²⁾	Egg lecithin ³⁾
Palmitic acid (16:0)	28.73±0.52	32.12±0.32	27-29
Palmitoleic acid (16:1)	1.99±0.12	2.23±0.04	-
Stearic acid (18:0)	17.97±0.22	12.13±0.14	14-17
Oleic acid (18:1)	33.18±1.0	32.53±0.45	35-38
Linoleic acid (18:2)	17.08±0.4	12.34±0.09	15-18
Arachidonic acid (20:4)	-	2.95±0.03	3-5
Others	1.05±0.6	5.70±0.06	-

¹⁾SEL : Separated egg yolk lecithin of this study.

²⁾KPC-50 : Data from Kim *et al.* (1995).

³⁾Data from Schneider (1989).

레시틴의 지방산 조성

일반적으로 레시틴의 지방산 조성은 모유의 것과 유사하므로 유아용 조제분유에 에센스유로 사용되기도 하며 식품용으로는 주로 유화제로 이용되기도 한다(Yoo, 1998; Sim, 1995). 일반적으로 난황에서 분리된 레시틴은 대두레시틴보다 상대적으로 더 높은 포화지방산 함량을 보여 산화안정성이 강한데(Palacios and Wang, 2005) 불포화 지방산에는 ω -6지방산과 ω -3지방산이 각각 5-6 g/100 g과 6-7 g/100 g 포함되어 있다(Nielsen, 2001). 본 연구를 통해 난황액 100 g에서 분리된 조인지질은 9.85 g의 총 수율, 인지질 함량 64.8%이상, 레시틴함량 55.04%를 보였고 분리된 레시틴의 지방산 조성을 Kim 등(1995)이 분리한 레시틴의 지방산 조성과의 비교했을 때 palmitic acid, palmitoleic acid는 보다 다소 낮은 수준을, oleic acid와 linoleic acid는 다소 높은 수준을 나타내었고 특히 stearic acid는 5.84% 높은 값을 보였다(Table 6). 그러나 arachidonic acid는 검출되지 않았다. 이들 범위는 Schneider (1989)가 제시한 계란 레시틴의 지방산 조성비율과 거의 일치하였으나 palmitoleic acid와 arachidonic acid의 비율이 다르게 나타나 이는 이 계란을 산란한 산란계의 사양조건에 따른 차이로 판단된다(Palacio and Wang, 2005).

요 약

난황으로부터 레시틴 고함유 인지질을 회수하기 위하여 전처리, 표면반응분석기법을 실시한 결과 난황 인지질 분리조건(난황액 100g 기준)은 알코올 농도 95.83%, 알코올 첨가량 1: 6.51, 균질온도 40.2°C, 20,000 rpm에서 5분간 균질한 후 원심 분리하여 여과 후 진공농축하고 아세톤 150 mL로 1회 세척하여 분리한 것으로 수율은 인지질 64.8%이상 레시틴 함량 55.04%의 인지질 분리를 위한 공정을 확립하였다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 농업특정연구과제(No.200703010

33003)의 지원으로 수행되어 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

1. AOCS. (1994) Official methods and recommended practices of the american oil chemists' society, 4th ed. Champaign, IL.
2. Chi, Y. and Lin, S. (2002) Research advances in extraction and application of egg-yolk lecithin. *Food Ferment. Ind.* **28**, 50-53.
3. Cho, E. J., Lee, J. H., and Lee, K. T. (2004) Optimization of enzymatic synthesis condition of structured lipids by response surface methodology. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **36**, 531-536.
4. Folch, J., Lees, M., and Sloane-Stanley, G. H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497-509.
5. Gontard, N., Guibert, S., and Cuq, J. L. (1992) Edible wheat gluten films: Influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. *J. Food Sci.* **57**, 190-196.
6. Hanahan, D. J., Turner, M. B., and Jayko, M. E. (1951) The isolation of egg phosphatidyl choline by an adsorption column technic. *J. Biol. Chem.* **192**, 623-628.
7. Hernandez, C. M., Benet, S., and Marvin-Guy, L. F. (2005) Characterization and quantification of proteins in lecithins. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 8607-8613.
8. Kim, Y. S., Yoo, I. J., Jeon, K. H., and Kim, C. J. (1995) Optimal conditions for ethanol extraction of egg lecithin. *Kor. J. Anim. Sci.* **37**, 186-192.
9. Korea Food & Drug Administration. (2004) Health/Functional Food Act. 90-94.
10. Lee, C. (2004) Optimization for extrusion-cooking of rice-ISP-file fish mixture by response surface methodology. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **33**, 1742-1747.
11. Lee, K. D., Lee, J. E., and Kwon, J. H. (2000) Application of response surface methodology to food manufacturing. *Food Sci. Ind.* **33**, 33-45.
12. Myers, R. H. (1971) Response surface methodology. Allyn and Bacon Inc. Boston, USA. p 127-139.
13. Nielsen, H. (2001) In situ solid extraction of phospholipids from heat-coagulated egg yolk by organic solvents. *Lebns.-Wiss.u.-Technol.* **34**, 526-532.
14. Nielsen, H. and Shukla, V. K. S. (2004) In situ solid phase extraction of lipids from spray-dried egg yolk by ethanol with subsequent removal of triacylglycerols by cold temperature crystallization. *Lebns.-Wiss.u.-Technol.* **37**, 613-618.
15. Palacios, L. E. and Wang, T. (2005) Egg-yolk lipid fractionation and lecithin characterization. *JAACS.* **82**, 571-578.
16. SAS Institute (2000) SAS User's guide: Statistics. Version 8.01 edition SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
17. Schneider, M. (1989) Fractionation of lecithin. In *Lecithins : Sources, manufacture & users.* Szuhaj, B. F. (ed.), AOCS, Champaign, ILL. pp 109-130.
18. Sim, J. S. (1994) New extraction and fractionation method for lecithin and neutral oil from egg lecithin. In *Egg uses and*

- Processing Technologies. Sim, J. S. and Nakai, S. (eds.), CAB International. Wallingford, UK. pp. 128-138.
19. Sim, J. S. (1995) Extraction of fresh liquid egg yolk. Canadian patent 1,335,054.
20. Sung, N. K. (1993) SAS/GRAPH - Statistical graphics. Vol. 6, Free Academy, Seoul, Korea.
21. Wu, Y. and Wang, T. (2003) Soybean lecithin fractionation and functionality. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **80**, 319-326.
22. Yoo, I. J. (1998) Development of new technology of value-added egg products. 21th Congress of Korean Society for Food Science of Animal Resources. 9-37.

(2006. 12. 26. 접수/2007. 11. 21. 채택)