한국생물공학회지 제16권 제1호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 16, No. 1, 76-81(2001)

Pd 촉매를 이용한 혈청 콜레스테롤 저하제 Stigmastanol의 합성

김 의 용
서울시립대학교 화학공학과
(접수 : 2001. 1. 30., 게재승인 : 2001. 2. 15.)

Synthesis of Stigmastanol as a Serum Cholesterol-lowering Substance Using Pd Catalyst

Eui Yong Kim
Department of Chemical Engineering, University of Seoul, Seoul 130-743, Korea
(Received : 2001. 1. 30., Accepted : 2001. 2. 15.)

Stigmastanol, a functional agent of cholesterol-lowering in humans, was synthesized from stigmasterol. To investigate the usability as a raw material, the contents of sterol in vegetable oils and extract of soybean chaff were analyzed. The total sterol contents showed high values of 213.7 and 209.8 mg/100g in corn and soybean oils respectively. The extract of soybean chaff has played a good role as a raw material with high sterol contents.

The kinetics of hydrogenation of stigmasterol was studied using a 5% Pd/AC catalyst in the temperature range of 30 ~ 60 ℃. Increasing temperature showed a prominent decrease in conversion. The optimum temperature was 40 ℃ for high yield of stigmastanol. The effects of H_2 pressure, agitation speed, catalyst loading, and stigmasterol concentration on reaction rate profile were also examined. From the power law model analysis using the initial rates of reaction, the reaction order was calculated as 0.705 for stigmasterol concentration and 0.147 for hydrogen pressure.

Key Words : cholesterol, phytosterol, stigmastanol, palladium catalyst

서 론

최근 산업의 발달과 소득의 증대로 인하여 식생활이 서구화되면서 콜레스테롤(cholesterol)의 함유량이 높은 음식물의 섭취가 증가하고 있는 추세이다(1). 콜레스테롤은 세포막을 구성하는 스테로이드계 호르몬과 담즙산의 전구체가 되며, 세포막을 재생하거나 비타민 D를 생합성 하는데 사용된다. 뇌, 근육, 신경 조직 등의 필수 구성성분이지만 혈관 벽에 고농도로 존재할 경우 동맥경화, 고혈압, 뇌출혈, 심장마비 등을 일으키는 주 원인이 된다(2). 이러한 유해성 때문에 인체 내 콜레스테롤의 축적을 저하시키기 위해 콜레스테롤과 구조적으로 매우 유사하며 식물체 내에 존재하는 식물성 스테롤(phytosterol)에 대한 연구가 이루어지고 있다. 식물성 스테롤은 인체 내에서 생합성 되지 않으며 고농도로 함유되어 있는 옥수수, 대두, 참깨, 현미를 통해 체내로 흡수된다(3). 식물성 스테롤로는 campesterol, β-sitosterol, stigmasterol 등이 있는데, 이들은 이중결합 고리를 가지고 있으며 장 내에서 콜레스테롤의 흡수를 선별적으로 저해하는 효능이 있음이 확인되었다(3,4). 장에서 campesterol은 흡수가 잘 되며, stigmasterol은 소량 흡수되지만 이들이 장 벽면에 부착되어 있는 동안 콜레스테롤의 인체 내 흡수는 저해된다. 그러나 이중결합 고리가 없는 stigmastanol의 경우는 장 벽면을 통해 인체로 흡수가 되지 않고 남아 있기 때문에 콜레스테롤의 장 내 흡수를 효과적으로 막을 수 있다는 특징이 있다. Heinemann 등(5)의 보고에 의하면 β-sitosterol은 50%의 콜레스테롤 흡수 저해율을 보인 반면 동일 농도의 stigmastanol은 85%로 높은 저해율을 보였다. 따라서 stigmastanol과 같은 유사 유도체 물질은 앞으로 부가가치가 높은 콜레스테롤 흡수 저해 의약품이나 샐러드 드레싱에서 아이스크림에 이르는 다양한 기능성 식품소재로 개발될 수 있을 것으로 예상되며, 이와 관련된 연구들이 많이 진행되고 있다(6-9). Stigmasterol을 stigmastanol로 전환시키기 위해서는 일반적으로 촉매하에서 수소첨가 반응을 시켜 이중 결합의 불포화 고리를 단일결합으로 변환시켜야 하는데, 이는 스테롤의 산화안정성, 열 안정성 등을 향상시킨다(10). 이를 위해 고온하에서 Ni 담지촉매를 사용하여 수소첨가 반응을 시키게 되지만, Pd의 담지촉매를 사용하면 상온, 상압에서도 수소첨가 반응을 시킬 수 있는 가능성이 있음이 최초로 확인된 바 있다(11).

따라서 본 연구에서는 담체인 활성탄에 Pd를 5% 담지시킨

†Corresponding Author : Department of Chemical Engineering, University of Seoul, Seoul 130-743, Korea
Tel : +82-2-2210-2530, Fax : +82-2-2216-0570
E-mail : eykim@uos.ac.kr

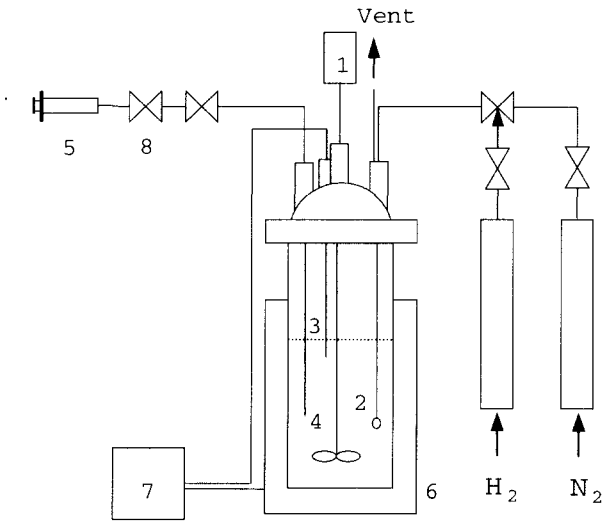


Figure 1. Hydrogenation reaction apparatus.(1. Agitator, 2. Gas inlet, 3. Thermocouple, 4. Sample outlet 5. Sampler, 6. Stainless steel reactor with heating band (ID : 4.5 cm, OD : 5 cm), 7. Temperature control apparatus, 8. Needle valve)

상용 촉매를 사용하여 stigmasterol로부터 stigmastanol 생성을 위한 수소첨가 반응조건을 검토하였다. 이를 위해 우선 우리의 생활주변에서 쉽게 접하는 7종의 식물성 유지와 대두박 추출잔사물에 함유된 phytosterol의 함량을 분석하여 자연계로부터 원료물질인 stigmasterol의 회수 가능성을 조사하였으며, 수소첨가 반응 시 반응온도와 압력, 교반속도, 촉매의 부하농도, 원료물질의 농도에 따른 특성을 검토하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서 사용된 식물성 유지류는 Sigma사(St. Louis, MO)에서 구입하였고, 대두박 추출잔사물은 동국제약으로부터 공급받아 시료로 사용하였다. 분석 표준물질은 Sigma사의 5α-cholestane, β-sitosterol, stigmasterol, stigmastanol을 사용하였다. 촉매로는 Aldrich 사(Milwaukee. WI)의 상업용 촉매인 Pd/AC (Palladium, 5 wt% on activated carbon)을 사용하였다.

비누화 반응

식물성 유지 7종과 대두박 추출잔사물 속에 포함되어 있는 sterol과 stanol은 시료분석을 위해 Fenton법(12)으로 비누화 반응을 시켰는데 그 절차는 다음과 같다. Ethanol과 1N KOH 혼합용액 30 mL에 시료 3 g을 가하고 85℃에서 1시간 동안 비누화 반응을 실시하였다. 그 후 10% NaCl 용액 100 mL를 가한 후 n-hexane으로 추출하여 농축시켰으며, 농축된 시료에 chloroform을 가하여 GC 분석을 위한 시료로 사용하였다.

수소첨가반응

수소첨가반응을 위해 Figure 1과 같은 고압반응기를 제작하여 사용하였다. 최적 반응조건을 찾기 위해 온도, 수소압력, 촉매량 등을 변화시켜 수소첨가 반응을 실시하였다. 반응을 위한 원료물질은 Sigma사의 stigmasterol로 일정농도 chloroform에 용해시켜 수소첨가 반응을 수행하였는데 반응절차는 다음과 같다. 일정온도로 맞추어진 반응기에 50 mL의 반응물과 0.1%(w/v)의 촉매를 가한 후 공기를 제거하기 위해 N_2를 흘려주었다. 그 후 반응기 내부를 수소로 일정압력 되도록 채웠다. 교반이 시작되는 순간을 반응이 시작되는 시점으로 보았으며, 일정시간 간격으로 시료를 채취하였다. 채취된 시료는 여과를 통해 촉매를 제거한 후, GC로 분석하였다. 특별한 언급이 없는 한 반응시간은 30분으로 하였으며, 데이터의 재현성 검증을 위해 동일조건에서 실험을 3회 이상 실시하여 평균값을 이용하였다.

분석방법

시료는 GC(Young-Lin 600D)를 사용하여 정성분석 하였다. 내부표준물질(5α-cholestane)과 표준물질을 이용하여 Fenton 등의 방법(13)으로 내부표준물질에 대한 스테롤과 스탄올의 면적 비와 중량 비로부터 전환상수(conversion factor; K)를 구하였으며, 분석의 재현성을 위해 동시에 표준시료를 분석한 후 머무름 시간(retention time; RT)의 평균과 변이계수(coefficient of variation; CV)를 계산하여 비교하였다.

GC의 분석조건은 다음과 같다. HP-1 column(crosslinked methyl siloxane gum, 30 m×0.25 mm×0.25 μm film thickness), Injection temp. 290℃, Detector temp. 290℃, Column Temp 160℃ 1 min → 5℃/min → 300℃. 10 min, N_2 carrier gas. Detecter는 FID를 사용하였다.

데이터의 계산

반응속도는 초기 속도법에 의해 stigmasterol의 분해속도로 나타냈다. 이를 위해 반응이 시작된 직후 2분 간격으로 5회 시료를 채취하여 분석한 후 데이터 외삽법을 이용하였다. 전화율은 반응을 위해 공급된 초기 stigmasterol의 농도 중 반응에 의해 소모된 stigmasterol의 농도 비로 정의하였으며, stigmastanol의 선택도는 반응에 의해 소모된 stigmasterol의 농도 중 생성된 stigmastanol의 농도 비로 정의하였다. Stigmastanol의 수율은 공급된 초기 stigmasterol의 농도 중 생성된 stigmastanol의 농도 비로 정의하여, 전화율과 선택도의 곱으로 계산되었다.

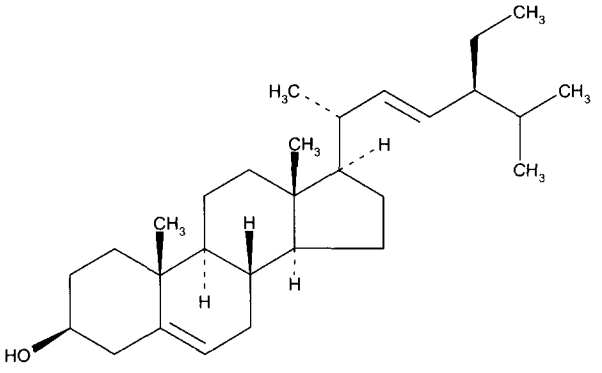
결과 및 고찰

시료중 sterol의 조성분석

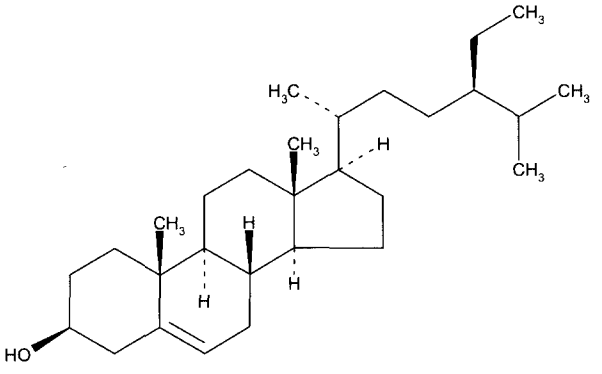
식물성 유지 7종과 동국제약으로부터 공급받은 대두박 추출잔사물에 함유되어 있는 sterol의 조성비와 총 함량을 분석한 결과를 Table 1에 나타내었다. 식물성 유지 7종 중 전체 sterol의 함량은 corn oil이 가장 높았으며 soybean oil, cotton oil, safflower oil, sunflower oil 등의 순으로 높은 것으로 조사되었다. Corn oil, soybean oil, cotton oil, safflower oil, sunflower oil의 경우 sterol 중에서도 β-sitosterol의 함량이 가장 높았으나, peanut oil과 olive oil의 경우는 stigmastanol의 함량이 가장 높았다. *Stigmastanol* 제조를 위한 원료물질로는 2곳에 이중결합을 가진 stigmasterol과 1곳에 이중결합을 가진 β-sitosterol이 모두 가능한데(Figure 2) 이들 2종류 물질의 농도 함량으로 보면 soybean oil, corn oil, cotton oil이

Table 1. Sterol contents of vegetable oils

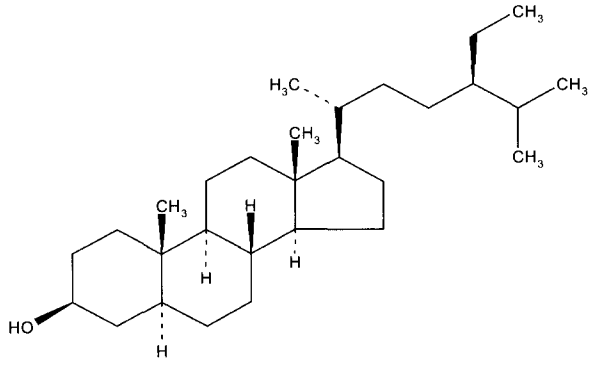
	Campesterol (mg/100 g)	Stigmasterol (mg/100 g)	β-Sitosterol (mg/100 g)	Stigmastanol (mg/100 g)	Total sterols (mg/100 g)
Corn oil	65.2	21.2	115.3	12.0	213.7
Soybean oil	47.5	36.9	105.1	20.3	209.8
Cotton oil	22.9	10.9	115.4	6.5	155.7
Safflower oil	39.8	21.4	59.2	24.6	145.0
Sunflower oil	13.0	8.6	46.4	0	68.0
Peanut oil	12.6	7.1	14.3	39.1	73.1
Olive oil	8.9	7.3	15.7	39.1	71.0
대두박 추출잔사물	287.3	174.2	432.7	83.6	974.2



(a) stigmasterol



(b) β-sitosterol



(c) stigmastanol

Figure 2. Chemical structure of the major sterols.

각각 142.0, 136.5, 126.3 mg/100 g의 순으로 높게 나타나 stigmastanol 생성을 위한 적절한 원료물질인 것으로 조사되었다. 그러나 peanut oil, olive oil은 21.4, 23.0 mg/100 g으로

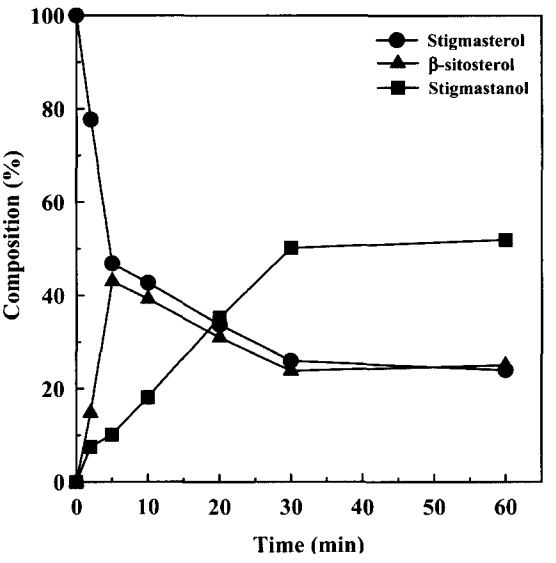


Figure 3. The changes in concentrations of stigmasterol, β-sitosterol and stigmastanol.

함량이 낮았다.

대두박 추출잔사물에 포함되어있는 sterol의 총 함량은 식물성 유지 중 함량이 가장 높은 corn oil 보다 약 4.6배 높은 것으로 조사되었다. 대두박 추출잔사물은 대두를 이용한 유지 제조공정의 최종단계에서 잔류하는 유취 성분을 제거하고 미량으로 존재하는 유리지방산의 함량을 줄이기 위해 탈취하는 과정 중에 나오는 부산물로 특이한 냄새를 지닌 점성이 높은 반 고상의 액체물질이다. 대두박 추출잔사물에서도 corn oil에서와 같이 β-sitosterol의 함량이 가장 높았으며 다음으로 campesterol, stigmasterol, stigmasterol의 순으로 조성이 높은 것으로 조사되었다. 한편 stigmasterol과 β-sitosterol의 전체 함량은 606.9 mg/100 g으로 식물성 유지보다 약 4.3배 높았다.

이상의 결과를 볼 때 stigmastanol의 제조원료로 식물성 유지보다 대두박 추출잔사물을 활용하는 것이 바람직하며, 식물성 유지 중에서는 soybean oil, corn oil, cotton oil이 바람직한 것으로 판단되었다. 이들은 모두 포화 및 불포화 지방산을 고농도로 함유하고 있어 수소화 반응을 위해서는 결정화와 같은 별도의 sterol 회수공정(14, 15)이 필요하다.

Stigmasterol의 수소첨가 반응조건

Stigmasterol을 반응물로 하여 40℃ 일정조건하에서 수소첨가 반응을 시킨 결과를 Figure 3에 나타내었다. 반응이 진행

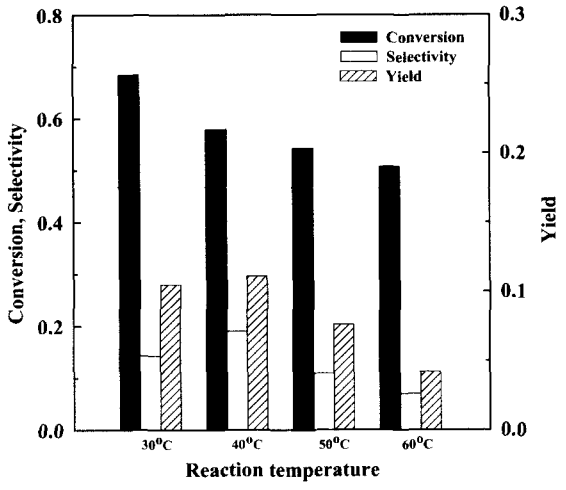


Figure 4. The changes in conversion of stigmasterol, selectivity and yield of stigmastanol with reaction temperature. (Reaction conditions : C_{ST}, 4.8×10^{-3} g mol/L; P_{H2}, 100 psi; agitation speed, 300 rpm; catalyst loading, 0.1 g/L; reaction time, 30 min.)

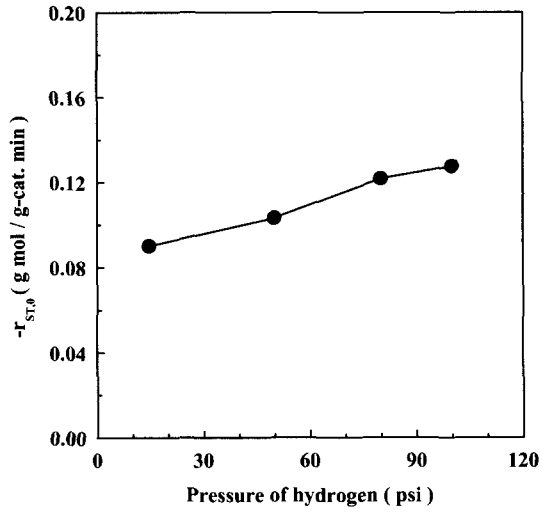


Figure 5. Effect of partial pressure of H_2 on the initial rates of reaction. (Reaction conditions : C_{ST}, 4.8×10^{-3} g mol/L; agitation speed, 300 rpm; catalyst loading, 0.1 g/L; temp., 40℃)

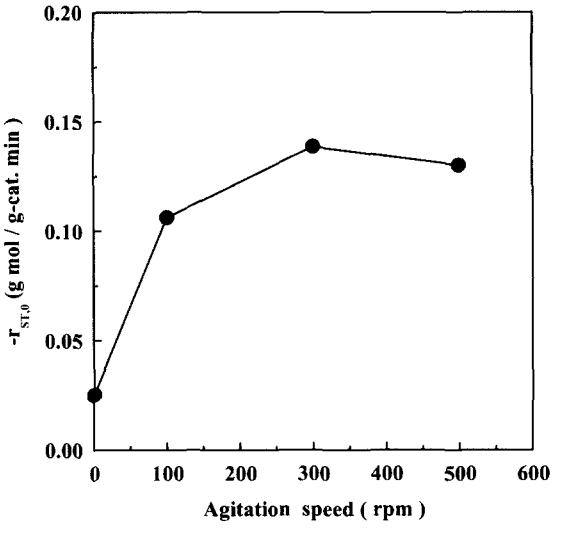


Figure 6. Effect of agitation speed on the initial rates of reaction. (Reaction conditions : C_{ST}, 4.8×10^{-3} g mol/L; P_{H2}, 100 psi; catalyst loading, 0.1 g/L; temp., 40℃)

됨에 따라 반응시작 5분 이내에 stigmasterol의 농도는 급격히 저하되면서 반응 부산물인 β-sitosterol의 농도는 급격히 증가되어 최대값을 나타냈으며 목적산물인 stigmastanol은 소량 생성되었다. 그 이후 β-sitosterol의 농도는 점차 감소되면서 stigmastanol의 농도가 증가하였으며 반응은 30분 이후 평형상태에 도달되었다. 30℃ - 60℃ 의 온도범위에서도 같은 결과를 보였다(데이타 생략). 이로부터 stigmasterol의 수소첨가 반응은 β-sitosterol을 통해 stigmastanol로 전환되는 연속반응임을 알 수 있었다. 결국 stigmasterol은 C_{22}의 불포화 이중결합이 단일결합으로 되어 β-sitosterol로 일차 전환된 후, 재차 수소첨가에 의해 C_5의 이중결합이 열리면서 stigmastanol(일명, β-sitostanol)로 전환되는 것으로 추정되었다. 불포화 지방산의 수소첨가 반응에서도 이와 유사한 결과를 보이는데, 3개의 이중결합을 가진 linolenic acid를 수소첨가 반응시키면 특정위치의 이중결합 부위에 수소가 선별적으로 첨가되어 2개의 이중결합을 가진 linoleic acid가 생성된 후 최종적으로 포화 지방산인 stearic acid가 생성되는 결과를 나타낸다(16,17). 따라서 stigmastanol의 수율을 높이기 위해서는 stigmasterol의 전화율이 높은 조건하에서 동시에 stigmastanol의 선택도를 높일 수 있는 조건을 찾아야 한다.

Figure 4는 반응온도에 따른 stigmasterol의 전화율, stigmastanol의 선택도 및 수율을 나타낸 결과로 반응 종결시간은 30분으로 하였다. 반응온도가 30℃로부터 60℃까지 높아짐에 따라 stigmasterol의 전화율은 0.68로부터 점차 감소되어 0.50까지 떨어졌다. 이는 온도증가에 따라 액상에 대한 수소의 용해도는 높아지지만(18), 온도가 40℃ 이상 높아지게 되면 chloroform에 용해된 반응물이 고상인 촉매의 내부표면으로 확산 전달되기 어렵기 때문인 것으로 추정된다. 결국 stigmastanol의 선택도는 40℃에서 최대값 0.19를 나타낸 이 후 온도증가에 따라 감소하였다. 전화율과 선택도를 고려하여 stigmastanol의 수율을 계산한 결과 Figure 4에서와 같이 40℃에서 0.12로 최대가 되어 반응 최적온도는 40℃인 것으로 조사되었다.

다음은 반응온도, 교반속도, 촉매농도를 각각 40℃, 500 rpm, 0.1%로 고정시킨 후 수소의 절대압을 변화시키면서 초기 반응속도의 변화를 조사하였다. Figure 5에서 나타난바와 같이 수소의 압력이 증가함에 따라 반응속도가 증가하였다. 수소압력이 높아지면서 반응속도가 증대되는 것으로 보아 수소의 압력증대가 수소의 액상 용해도에 영향을 주었기 때문으로 판단되었다. 일반적으로 불포화 지방산의 수소첨가는 니켈촉매하에서 반응기내로 수소를 버블링시켜 반응을 시키게 되는데 이를 위해서는 120℃ ~ 250℃의 고온반응을 시켜야 한다(19,20). 그러나 수소가 100 psi로 가압된 상태에서 이와같이 수소첨가 반응을 시킴으로 반응속도가 0.08 gmol/g-cat. min에서 0.125 gmol/g-cat. min로 약 56% 증대되었다. 유지에서 수소의 용해도는 압력증가와 선형적인 관계가 있음은 이미 밝혀져 있다(18).

Figure 6은 일정한 압력, 온도, 촉매농도 하에서 교반속도

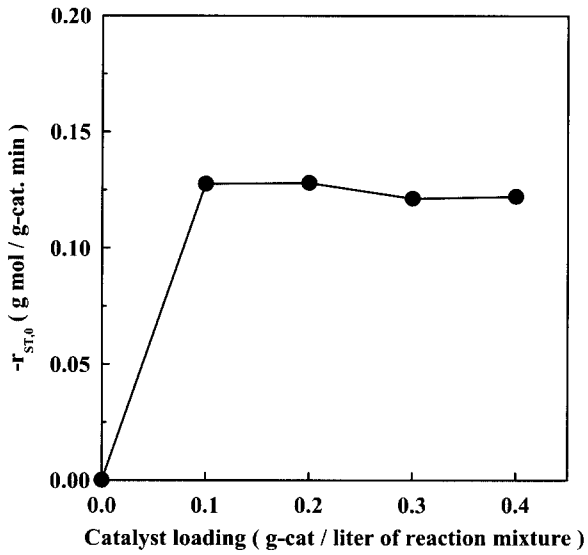


Figure 7. Effect of catalyst loading on the initial rates of reaction. (Reaction coditions : C_{ST}, 4.8×10^{-3} g mol/L; P_{H2}, 100 psi; agitation speed, 300 rpm; temp., 40℃.)

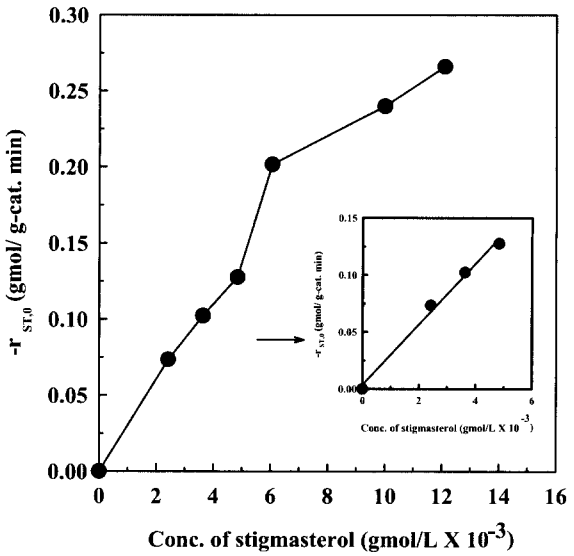


Figure 8. Effect of reactant concentration on the initial rates of reaction. (Reaction conditions : P_{H2}, 100 psi; agitation speed, 300 rpm; catalyst, 0.1 g/L; temp., 40℃.)

가 반응속도에 미치는 영향을 조사하였다. 반응물을 교반시키지 않았을 경우 0.025 gmol/g-cat min 이었던 반응속도가 교반속도가 증가함에 따라 증가하여 300 rpm에서 0.14 gmol/g-cat min로 최대로 된 후 일정하게 유지되었다. 결국 반응기내에서 교반속도를 300 rpm 이상으로 증가시키면 액상에 존재하는 수소버블의 크기를 작게 하여 수소기체의 기-액간 접촉계면적을 넓혀주는 효과가 있었기 때문에 이상과 같은 결과를 얻게 되었던 것으로 판단되었다.

다음은 반응온도, 압력, 교반속도를 각각 40℃, 100 psi, 300 rpm으로 고정시키고 촉매농도를 0-0.4 w/v%까지 변화시켜 반응속도에 미치는 영향을 조사하여 Figure 7에 나타내었다. 촉매가 없을 때는 반응이 전혀 일어나지 않았으며 0.1 (w/v)% 이상에서는 비슷한 반응속도를 나타냈다. 따라서 0.1 (w/v)% 이상의 고농도로 촉매를 사용하는 경우 촉매농도는 반응속도에 영향을 주는 율속인자가 아님을 알 수 있었다. Soybean oil의 경우 Ni 촉매의 경우 0.1 (w/v)% , Cu 촉매의 경우 0.3 (w/v)% 농도로 수소첨가 반응을 시키는 것으로 보고되어 있다(20).

수소첨가 반응시 stigmasterol의 농도증가는 반응유체의 점성을 변화시켜 기체 반응물인 수소의 용해도를 낮추게 되고 이들은 다시 반응속도에 영향을 주게 된다. 이러한 영향 때문에 대부분의 수소첨가반응에서는 반응물의 초기농도를 최대한 희석시켜 반응물의 농도에 영향을 받지 않을 범위에서 반응을 수행한다(21). 다음은 stigmasterol의 농도가 반응속도에 미치는 영향을 살펴보았는데 그 결과는 Figure 8과 같다. 반응물의 농도가 점차 증가되어 $6.0\ gmol/L\times10^{-3}$ 의 범위에서는 반응물의 농도증가에 따라 반응속도가 선형적으로 증가하였으나 그 이상의 농도에서는 비선형적인 관계를 나타냈다. 이는 stigmasterol의 농도증가가 수소의 용해도를 감소시켜, 반응을 위한 수소의 농도가 제한되었기 때문으로 판단되었다.

이상에서 얻은 모든 실험결과를 토대로 다음과 같은 power law model을 이용하여 반응속도의 농도 의존성을 계산하였다.

Table 2. Estimated orders of the hydrogenation reaction.

Reaction temperature	Reaction order	
	m	n
30 ℃	0.707	0.151
40 ℃	0.703	0.153
50 ℃	0.695	0.145
60 ℃	0.684	0.141
Average	0.705	0.147

$$-r_{ST,0} = k \times C^{m}_{ST,0} \times P^{n}_{H2,0} \quad (1)$$

$$\ln(-r_{ST,0}) = \ln k + m \ln C_{ST,} + n \ln P_{H2,0} \quad (2)$$

여기서 $-r_{ST,0}$는 stigmasterol의 초기 분해속도, $C_{ST,0}$와 $P_{H2,0}$는 stigmasterol과 수소의 초기농도와 압력을 나타낸다. 반응속도는 외삽법에 의한 초기속도를 이용하였으며 stigmasterol과 수소에 대한 반응 차수 n과 m은 온도별로 ln $(-r_{ST,0})$와 ln $C_{ST,0}$ 또는 ln $P_{H2,0}$를 선형적으로 도식하여 구하였는데 그 결과를 Table 2에 나타내었다. 온도에 따라 반응차수에 약간의 오차는 있으나, 수소와 stigmasterol에 대해 각각 평균 0.147, 0.705차를 보여 반응속도는 수소보다는 stigmasterol의 농도에 대해 더 민감하였다.

요 약

콜레스테롤의 인체 흡수를 저해하는 기능성 물질인 stigmastanol을 stigmasterol로부터 합성하였다. 원료물질로 사용 가능성을 보기 위해 식물성유지와 대두박 추출잔사물에 있는 스테롤의 함량을 분석하였다. 식물성 유지 중에서는 corn oil과 soybean oil이 213.7, 209.8 mg/100 g으로 스테롤의 함량이 높았으며, 대두박 추출잔사물은 스테롤 함량이 높은 좋은 원료물질이었

다. 30 ~ 60℃에서 5% Pd/AC 촉매를 이용하여 stigmasterol의 수소첨가반응 속도론을 조사하였다. 온도증가에 따라 전화율이 감소하였으며, stigmastanol의 수율면에서 40℃가 최적의 온도였다. 반응속도에 대한 수소압력, 교반속도, 촉매 부하농도, stigmasterol 농도의 영향도 관찰하였다. 초기 반응속도를 이용한 power law model 분석결과 반응차수는 stigmasterol 농도에 0.705, 수소압력에 0.147 로 계산되었다.

감사의 글

본 논문은 1999년도 서울시립대학교 학술연구조성비(과제명: 콜레스테롤 저하 기능성소재 개발)에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Choi, Y. S., I. S. Kwak, J. A. Lee, and S. Y. Lee (1999), Annual Changes in Cholesterol Intake and Serum Cholesterol Level of Korean from 1962 to 1995 Year, *J. Korean. Soc Food Sci. Nutrition* **28**, 484-491.
2. McGandy, R. B., D. M. Hegsted, and F. J. Stare (1967), Dietary Fats, Carbohydrates and Atherogenetic Vascular Disease, *New Eng. J. Med.* **277**, 186-209.
3. Gurr, M. (1996), Plant Sterols in the Diet, *Lipid Technol.* **8**, 114-117.
4. Ling, W. H. and P. J. H. Jones (1995), Minireview Dietary Phytosterols : A Review of Metabolism, Benefits and Side Effects, *Life Sci.* **57**, 195-206.
5. Heinemann, T., G. A. Kullak-Ublick, B. Pietruck B, and von Bergmann K (1991), Mechanisms of Action of Plant Sterols on Inhibition of Cholesterol Absorption. Comparison of Sitosterol and Sitostanol, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **40**, 59-63.
6. Deuke, M. A. (1995), Lake of Efficiency of Low-dose Sitostanol Therapy as an Adjunct to a Cholesterol-lowering Diet in Men with Moderate Hypercholesterolemic, *Am. J. Clin. Nutr.* **61**, 392-396.
7. Miettinen, T. A. and H. T. Vanhanen (1992), Dietary Sitostanol Related to Absorption, Synthesis and Serum Level of Cholesterol in Different Apolipoprotein, E. Phenotypes, *Atherosclesis* **105**, 217-226.
8. Miettinen, T. A., P. Puska, H. Gylling, H. T. Vanhanen, and E. Vartiainein (1995), Reduction of Serum Cholesterol with Sitostanol-ester Margarine in a Mildly Hypercholesterolemic Population, *New Eng. J. Med.* **333**, 1308-1312.
9. Vanhanen, H. T. and T. A. Miettinen (1992), Effect of Unsaturated and Saturated Dietary Plant Sterols on Their Serum Contents. *Clin. Chem. Acta.* **205**, 97-107.
10. Evans, C. D., G. R. List, and J. C. Cowan (1972), Room Ordor Evaluation of Oils and Cooking Fats, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **49**, 578-582.
11. In, M. J., D. C. Kim, H. J. Chae, M. H. Kim, B. S. Im, and E. Y. Kim (1999), Analysis of Sterols and Its Hydrogenation to Stanols in Vegetable Oils for the Development of Cholesterol Absorption-lowering Neutraceutical, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **28**, 980-983.
12. Fenton, M. (1992), Chromatographic Separation of Cholesterol in Foods, *J. Chromatogr.* **624**, 369-388.
13. Fenton, M. and J. S. Sim (1991), Determination of Egg Yolk Cholesterol Content by On-column Capillary Gas Chromatography, *J. Chromatogr.* **540**, 323-329.
14. Sohn, J. D. (1995), Separation Process of Tocopherol Concentrate and Sterols from Soy-bean Oil Deodorizer Distillate, M. S. Thesis, Dept. of Chemical Engineering, University of Seoul, Seoul.
15. Kircher, H. W. and F. U. Rosenstein (1973), Purification of Campesterol and Preparation of 7-Dehydrocampesterol, 7-Campestenol and Campestanol, *Lipids* **9**, 333-337.
16. Bernardini, E. (1983), Hygrogenation, In *Vegetable Oils and Fats Processing Vol. 2*, E. Bernardini Ed., p297, Fialla, Rome.
17. Coenen, J. W. E. (1976), Hydrogenation of Edible Oils, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **53**, 382-388.
18. Wisniak, J. and S. Stein (1974), Hydrogen Solubility in Jojoba Oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **51**, 482-485.
19. Lawson, H. W. (1985), Processing Technology, In *Standards for Fats and Oils Vol. 5*, H. W. Lawson Ed., p37, AVI, Connecticut.
20. Schmidt, H. J. (1970), Hydrogenation of Triglycerides Containing Linolenic Acids: II. Continuous Hydrogenation of Vegetable Oils, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **47**, 134-136.
21. Drozdowski, B. and M. Zajac (1977), Effect of Concentration of Some Nickel Catalyst Poisons in Oil on the Course of Hydrogenation, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **54**, 595-599.