

저콜레스테롤 난황 제조시 생성되는 부산물로부터 콜레스테롤의 분리 정제

유익종 · 조혜연 · 박우문 · 전기홍 · 최성유
한국식품개발연구원

Separation and Purification of Cholesterol from By-product of Low Cholesterol Egg Yolk

Ick-Jong Yoo, Hye-Yeon Jo, Woo-Mun Park, Kee-Hong Jeon and Sung-Yu Choi

Korea Food Research Institute

Abstract

β -cyclodextrin adsorption and saponification methods were applied to isolate and purify cholesterol from the by-product of the low-cholesterol egg yolk product. The by-product was prepared from processing low-cholesterol egg yolk followed by extracting with chloroform to remove β -cyclodextrin and concentrated to 3,069 mg% cholesterol. When β -cyclodextrin method between two purification methods was applied, 50% ethanol as a solvent showed higher cholesterol concentration of 5.82% rather than the other solvents. Repeated purification of 3 times could not improve the cholesterol concentration significantly ($p < 0.05$). In case of purification using saponification method, hexane as a solvent for extraction of unsaponified materials was more efficient to increase cholesterol concentration than chloroform and ether, 60 times (v/w) saponification solution (95% ethanol:33% KOH = 94:6) of sample weight was most effective to increase the cholesterol concentration of 35.7%. Repeated purification process by saponification method could increase cholesterol concentration to 95.7% by 4 times repetition.

Key words : egg yolk, cholesterol, purification, β -cyclodextrin, saponification.

서 론

콜레스테롤($C_{27}H_{46}O$)은 4개의 고리로 된 cyclopentanoperhydrophenanthrene를 갖는 스테로이드계 화합물로서 고등동물의 세포막과 신경 세포 보호막 구성성분이며 담즙산 및 호르몬의 생성 원료로 사용되는 생명유지 물질이다^(1,2).

콜레스테롤은 digitonin^(2,3), saponin⁽⁴⁾ 및 β -cyclodextrin⁽⁵⁻⁷⁾ 등과 결합하여 침전물을 형성하며 물에는 거의 녹지 않고 hexane, chloroform 등의 일부 유기용매에 용해되며 검화되지 않는 성질이 있다⁽⁷⁻⁹⁾. 이러한 흡착·침전성과 비검화 특성은 콜레스테롤의 분리, 정제, 분

석 및 제거를 위한 여러 연구에서 적용되고 있으며, 이렇게 콜레스테롤에 관한 연구가 활발해짐에 따라 상용화된 콜레스테롤이 의학, 생화학 및 이화학적 연구를 비롯한 여러 목적으로 다양하게 사용되고 있다.

계란은 한 개당 평균 272mg 정도의 비교적 많은 콜레스테롤을 함유하고 있어 콜레스테롤 추출에 효과적으로 이용되어 왔다. 반면, 콜레스테롤이 건강상의 문제를 일으킬 수 있다는 인식으로 인해 계란 가공품 생산시 식물성 유지⁽¹⁰⁾, 초임계 유체⁽¹¹⁾ 및 β -cyclodextrin 흡착 작용⁽⁵⁾ 등 다양한 방법을 적용하여 제품 중의 콜레스테롤을 저하시키기 위한 연구가 진행되었다.

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

Corresponding author : Ick-Jong Yoo, Korea Food Research Institute, San 46-1, Baekhyun-dong, Bundang-ku, Sungnam-si, Kyonggi-do 463-420, Korea.

를화하여 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.

재료 및 방법

저콜레스테롤 난황의 부산물로부터 콜레스테롤 회수

지 등⁽⁵⁾과 Smith 등⁽⁶⁾이 제시한 방법을 적용하여 저콜레스테롤 난황액을 제조하였으며 이로부터 생성되는 부산물로부터 콜레스테롤을 추출하여 시료로 사용하였다. 난황 콜레스테롤의 3배 물에 해당하는 β -cyclodextrin을 첨가하여 35°C에서 30분간 80rpm의 속도로 교반한 후 5°C에서 약 1시간 동안 냉각하여 원심분리하였다. 침전된 β -cyclodextrin과 콜레스테롤 복합체 잔류물을 회수하여 동결건조하여 710 μ m sieve를 통과시켜 일정한 입자크기의 분말로 제조하였다. 건조된 복합체에 6배의 chloroform을 첨가하여 50°C에서 120분간 100rpm의 속도로 교반하여 Na_2SO_4 를 사용하여 여과한 후 evaporator로 chloroform을 제거하였다. 저콜레스테롤 난황의 부산물로부터 β -cyclodextrin이 제거된 콜레스테롤 추출물을 냉동보관하며 정제용 시료로 사용하였다.

β -cyclodextrin 흡착법을 이용한 콜레스테롤 정제

콜레스테롤 정제용 시료는 지 등⁽⁵⁾과 Smith 등⁽⁶⁾의 방법을 변형하여 Fig. 1에 제시한 방법으로 정제하였다. 시료 콜레스테롤의 1몰 혹은 2몰배의 β -cyclodextrin을 첨가한 3배(v/w)의 용매와 혼합하여 35°C에서 30분간 80rpm의 속도로 교반한 후 냉각하여 원심분리하여 침전된 복합체를 얻었다. 이를 6배(v/w)의 chloroform과 함께 120분간, 50°C에서 100rpm의 속도로 교반한 후 Na_2SO_4 를 사용해 여과하고 40°C에서 농축하여 콜레스테롤을 회수하였다.

콜레스테롤 및 β -cyclodextrin을 모두 용해해 시키기에 적합한 용매를 선정하기 위해

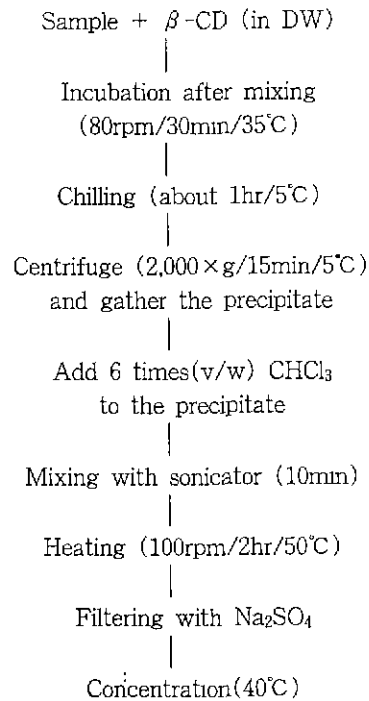


Fig. 1. Procedure of purification with β -cyclodextrin.

Nagatomo⁽¹⁴⁾의 방법에서 사용한 용매들 즉, methanol, ethanol, acetone, 2-propanol 및 propanol의 50% 혼합용매 및 100% 증류수를 처리구로 하여 시험하였다. 또한 결정된 적절한 정제 조건으로 β -cyclodextrin 흡착 과정을 반복하여 콜레스테롤 농도를 측정함으로써 정제효과를 알아보았다.

검화법을 이용한 콜레스테롤 정제

추출된 콜레스테롤 시료를 Fig. 2에 나타난 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 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 농

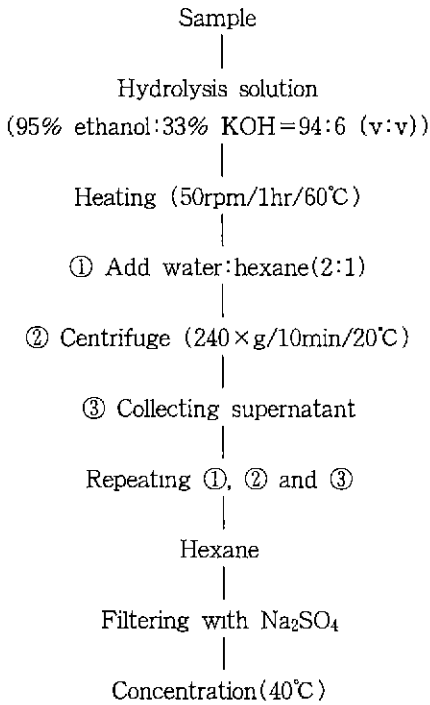


Fig. 2. Procedure of purification with saponification.

도를 측정함으로써 정제효과를 알아보았다.

난황분의 검화정제

난황분의 콜레스테롤을 Fig. 2에 나타난 바와 같이 Fenton 등⁽⁸⁾의 방법을 변형한 검화법으로 3차례 반복 정제하여 β -cyclodextrin과 콜레스테롤의 복합체로부터 콜레스테롤을 정제

할 때의 정제효율과 비교하였다.

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°C에서 1시간 incubation하여 405nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

통계분석

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

결과 및 고찰

저콜레스테롤 난황의 부산물로부터 콜레스테롤의 회수

Table 1에 나타난 바와 같이 저콜레스테롤 난황액 제조시의 부산물인 β -cyclodextrin과 콜레스테롤 복합체를 동결건조한 결과 1,068.7 mg/100g의 콜레스테롤을 함유하는 β -cyclodextrin 복합체 분말을 얻었다. 이 복합체로부

Table 1. 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.

터 β -cyclodextrin을 제거하고, 복합체 무게의 27.41%에 해당하는 콜레스테롤 농도 3,069.6 mg/100g의 콜레스테롤 함유물을 얻었으며, 이를 콜레스테롤의 분리·정제용 시료로 사용하였다.

β -cyclodextrin 흡착법을 이용한 콜레스테롤 정제

β -cyclodextrin 흡착법에 의한 콜레스테롤 정제 결과는 Table 2에 나타내었다. β -cyclodextrin 및 시료 콜레스테롤 용해 용매의 선택 시험에서 50% ethanol 처리구의 경우 농도 5.82%로 유의적($p < 0.05$)으로 높은 정제효과를 나타냈고, 기타 처리구간에도 유의차($p < 0.05$)는

있으나 농도 2.67~3.58%로 정제효과가 낮았다.

Ricomini⁽⁵⁾ 등과 Keen 등⁽¹⁵⁾의 연구에서는 콜레스테롤을 분리할 때 β -cyclodextrin용해 용매로써 증류수를 사용하였고, Nagatomo⁽¹⁴⁾의 연구에서는 증류수외에도 50%인 methanol, ethanol, acetone, 2-propanol 및 propanol 각각의 용매를 용해 용매로 제시하였다. 그러나 본 연구에서 콜레스테롤과 β -cyclodextrin을 모두 효과적으로 용해시켜 정제할 수 있는 조건을 선택하기 위해, Nagatomo⁽¹⁴⁾가 제시한 용매들로 콜레스테롤을 정제한 결과 50% ethanol 처리구에서 농도 5.82%로 상대적으로 높은 정제효과를 나타냈고 증류수 처리구에서 2.67%로 낮은 정제효과를 나타냈다. Nagatomo⁽¹⁴⁾는

Table 2. Effect of solvents for purification¹⁾ of cholesterol with β -cyclodextrin from the β -cyclodextrin free by-product²⁾

Solvents	Cholesterol concentration (%)	Cholesterol yield (%)	Product yield (%)
Water	2.67 ± 0.08 ^{ab3)}	66.90 ± 2.50 ^a	70.85 ± 0.84 ^a
50% methanol	3.58 ± 0.13 ^b	2.32 ± 0.06 ^d	1.84 ± 0.11 ^e
50% ethanol	5.82 ± 0.14 ^a	46.19 ± 0.30 ^b	22.41 ± 0.63 ^c
50% acetone	3.25 ± 0.11 ^c	35.40 ± 0.38 ^c	30.74 ± 1.10 ^b
50% 2-propanol	3.55 ± 0.05 ^b	2.09 ± 0.10 ^d	1.66 ± 0.07 ^e
50% propanol	2.82 ± 0.18 ^d	3.45 ± 0.14 ^d	3.46 ± 0.08 ^d

¹⁾ Experiment conditions : mixing speed 80rpm, mixing time 30min., mixing temp. 35°C, β -cyclodextrin:cholesterol=1:1(M:M), solvent: β -cyclodextrin free by-product=4:1(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).

Table 3. Effect of adsorption with β -cyclodextrin for purification¹⁾ of cholesterol from the β -cyclodextrin free by-product²⁾

No. of repetition for purification	Cholesterol concentration (%)	Cholesterol yield (%)	Product yield (%)
1st	5.82 ± 0.14 ^{a3)}	46.19 ± 0.30 ^a	22.41 ± 0.63 ^a
2nd	5.92 ± 0.34 ^a	29.58 ± 3.16 ^b	20.46 ± 1.05 ^b
3rd	5.90 ± 0.58 ^a	23.70 ± 4.35 ^c	18.04 ± 0.71 ^c

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

β -cyclodextrin 용해도가 25°C에서 50% 2-propane이 2.6으로 가장 높았고 증류수가 1.85, 50% ethanol이 1.3, propanol이 1.1 그리고 50% methanol과 50% acetone이 가장 낮은 용해도 0.3으로 제시하였다. 본 연구에서 각 용매의 정제효과를 비교해 본 결과 β -cyclodextrin에 대한 용해도가 높은 용매가 반드시 콜레스테롤 정제에 효과적이지는 않은 것으로 나타났다.

비교적 효과적인 정제가 이루어진 50% ethanol 처리로 β -cyclodextrin 흡착 과정을 반복한 결과를 Table 3에 나타내었다. β -cyclodextrin에 대한 콜레스테롤 정제 과정을 1회~3회 반복하여도 정제효과는 유의차($p < 0.05$)가 없었으며, 콜레스테롤 수율(cholesterol yield)과 제품 수율(product yield)이 각각 46.19~23.70%와 22.41~18.04%로 유의적($p < 0.05$)인 감소를 보였다. Nagatomo⁽¹⁴⁾는 β -cyclodextrin($C_5H_{10}O_5$)이 α -1,4-glucoside 결합에 의해 연결된 원형의 바환원성 올리고당으로서 고리형 구조내에 들어갈 수 있는 작은 직경을 갖는 소수성 물질을 결합하여 침전하는 성질이 있다고 하였으며, 지 등⁽⁵⁾의 연구에서 β -cyclodextrin을 사용하여 콜레스테롤을 제거할 때 제거율이 높아짐에 따라 고형분의 손실도 많아지는 결과를 제시하였다. 이들 연구 결과와 같이 본 연구에서도 반복 정제시 제품 수율이 감소하여도 농도는 변화가 없는 것으로 나타나 β -cyclodextrin이 콜레스테롤에 대해 선택적이지 않아 콜레스테롤 정제에는 부적합하다고 사료되었다.

검화법을 이용한 콜레스테롤 정제

검화법을 적용하여 콜레스테롤 정제 시험을 한 결과는 Table 4와 Table 5에 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 4). Hexane을 사용한 추출이 가장 효율적이었으며, chloroform은 콜레스테롤 외에도 기타의 소수성 물질을 함께 추출하여 시료보다도 낮은 농도를 나타내었다. 시료에 대한 검화 용매의 비가 1 : 60(v : v)일 때 유의적($p < 0.05$)으로 양호한 결과를 보여 농도 35.74%로 나타났으며, 콜레스테롤 수율은 48.50%로 나타났다(Table 5). 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. 3). 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.

초기시료가 난황분일 때와 저콜레스테롤 난황의 부산물인 β -cyclodextrin과 콜레스테롤의 복합체일 때를 비교하기 위하여 검화법⁽⁷⁾으로 난황분의 콜레스테롤을 정제한 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 1차 정제하여 농도 53.4%의 콜레스테롤을 얻었으며 난황분을 반복적으로

Table 4. 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	N.D ⁴⁾	N.D	N.D

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 5. 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 = 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).

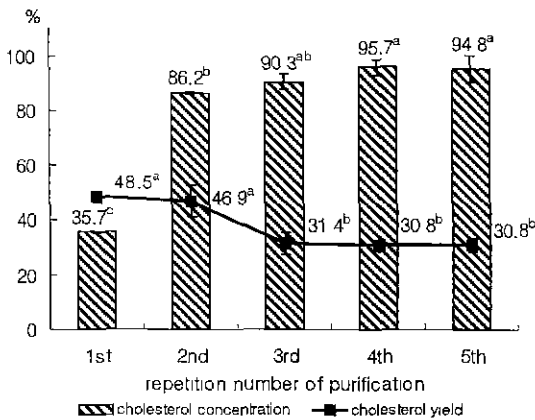


Fig. 3. Effect of repeated saponification on purification of cholesterol from the β -cyclodextrin free by-product¹⁾.

^{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.

3차례 정제한 결과 97.8%의 콜레스테롤을 얻을 수 있어서 저콜레스테롤 난황 부산물을 시료로 사용하였을 때의 90.3%에 비해서 높은 순도를 나타냈다. 한편 수율면에서는 저콜레스테롤 난황 부산물을 원료로 3회 정제시 31.4%로 난황분을 원료로 사용하였을 경우 1.5%에 비해서 높게 나타났다. 이러한 결과는 저콜레스테롤 난황액의 부산물 시료인 β -cyclodextrin

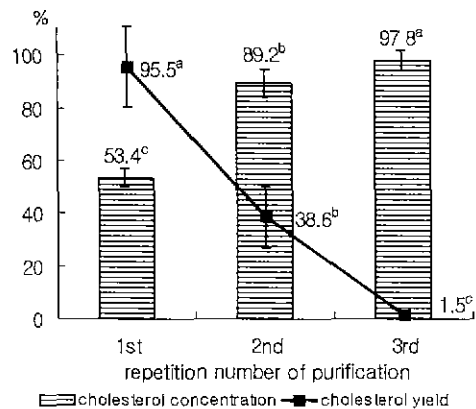


Fig. 4. Effect of repeated saponification on purification of cholesterol from egg yolk-powder.

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

과 콜레스테롤 복합체로부터의 추출물은 대부분이 콜레스테롤 등의 지용성 물질이므로 난황분으로부터 콜레스테롤을 추출한 경우보다 높게 나타난 것으로 판단되었다.

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

요 약

저콜레스테롤 난황액 제조시 생산된 부산물 중의 콜레스테롤을 β -cyclodextrin을 이용한 흡착법 및 검화법을 응용하여 분리 정제하였다. 저콜레스테롤 난황액 생산시 침전되는 β -cyclodextrin과 콜레스테롤 복합체를 chloroform으로 추출하여 β -cyclodextrin을 제거한 후 농축한 것을 초기시료로 사용하였으며, 이 시료의 콜레스테롤 농도는 3,069 mg%이었다. β -cyclodextrin 흡착법으로 cholesterol 정제를 위하여 50% ethanol을 사용하였을 때 콜레스테롤 함량 5.82%의 물질을 얻었으나 반복적으로 3회 정제한 결과 콜레스테롤의 농도가 유의적으로 높아지지 않았다($p < 0.05$). 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 콜레스테롤 농도 35.7%로 가장 높은 결과를 나타냈다. 반복적인 검화 정제에 의해서 콜레스테롤 농도가 점차 높아졌으며 4회의 반복정제 결과 95.7% 농도의 콜레스테롤을 얻을 수 있었다.

참고문헌

1. 한영근 : 콜레스테롤 이야기. 삼성기획, p. 9 (1995).
2. 菅野道廣, 今泉脛己 : 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, 유익중, 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, 유익중 : 초임계 이산화탄소에 의한 난황분의 추출. 한국식품영양과학회지, 26(5), 860 (1997).
12. Schoenheimer, R. : 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. and Khalid, Q. : An improved method for the extraction of cholesterol and phospholipids from the bovine spinal cord. *Prep. Biochem.*, 8(2-3),

113. (1978)

(2000년 1월 21일 접수)