



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

工學碩士學位論文

아임계 및 초임계 수 가수분해를 이용한  
미역으로부터 해조 단당류 및 아미노산 회수



工學碩士學位論文

아임계 및 초임계 수 가수분해를 이용한  
미역으로부터 해조 단당류 및 아미노산 회수

指導教授 全炳秀

이 論文을 工學碩士學位論文으로 提出함

2009年 2月

釜慶大學 敎大學院

食品工學科

盧 明 均

# 盧明均의 工學碩士 學位論文을 認准함

2009年 2月



主 審 農學博士 안 동 현 (인)

委 員 農學博士 김 선 봉 (인)

委 員 工學博士 전 병 수 (인)

# 목 차

Abstract .....	4
서 론 .....	6
이 론 .....	9
1. 초임계 유체 기술 (Supercritical fluid technology) .....	9
1.1 상평형 .....	10
1.2 초임계 유체의 물성 .....	12
1.3 초임계 유체에 사용되는 용매 .....	14
1.4 초임계 유체의 장점과 응용분야 .....	16
2. 미역의 알긴산으로부터 단당류 생산 경로 .....	18
3. 미역의 단백질로부터 아미노산 생산 경로 .....	20
재료 및 방법 .....	22
1. 재료 및 시약 .....	22
2. 실험방법 .....	22
2.1 미역의 일반성분 분석 .....	22
2.2 초임계 이산화탄소를 이용한 미역의 이취성분 제거 .....	22

2.3 초임계 수를 이용한 미역으로부터 단당류 회수 .....	28
2.3.1 미역의 초임계수 산화를 이용한 당화반응 .....	28
2.3.2 생성물의 단당류 농도 분석 및 수율 비교 .....	30
2.3.3 아임계 및 초임계 수 가수분해 물질의 항산화 능 .....	32
2.4 아임계 수를 이용한 미역으로부터 아미노산 회수 .....	33
2.4.1 미역의 산 가수분해 .....	33
2.4.2 미역의 아임계수 산화를 이용한 가수분해 .....	33
2.4.3 미역의 아임계 수 가수분해물의 아미노산 분석 .....	34
<b>결과 및 고찰</b> .....	<b>36</b>
1. 일반성분의 분석 .....	36
2. 미역의 이취성분의 동정 .....	37
3. 미역의 초임계수 산화를 이용한 당화반응 .....	41
3.1 Mannose의 검량선 .....	41
3.2 온도와 압력에 따른 단당류 생성수율의 변화 .....	44
3.3 회분식과 연속식 공정에 따른 단당류 생성수율의 비교 .....	46
3.4 아임계 및 초임계 수 가수분해 물질의 항산화 능 .....	47
4. 미역의 아임계수 산화를 이용한 가수분해 .....	49
4.1 초임계 이산화탄소 처리가 미역의 가수분해에 미치는 영향 .....	49
4.2 미역의 아임계 수 가수분해에 미치는 온도의 영향 .....	51
4.3 미역의 아임계 수 가수분해에 미치는 촉매의 영향 .....	53
4.4 산 가수분해 및 아임계 수 가수분해를 비교 .....	58

4.5 회분식과 연속식 공정에 따른 아미노산 생성수율의 비교 ..... 62

결론 및 요약 ..... 64

참 고 문 헌 ..... 67

감사의 글 ..... 71



Recovery of Monosaccharide and Amino acid from  
Brown seaweed (*Undaria pinnatifida*)  
by Sub- and Supercritical Water Hydrolysis

Myong-Kyun Roh

*Department of Food Science and Technology, Graduate School,  
Pukyong National University*

*Abstract*

The objective of this research were to produce monosaccharide and amino acids from freezing-dried brown seaweed (*Undaria pinnatifida*) powder by sub- and supercritical water hydrolysis and to characterize the products. The hydrolysis was carried out in a batch type reactor consisting of 4.6 cm inside diameter and 200 cm<sup>3</sup> vessel made of Hastelloy276. The reactor used in this study equipped a temperature controller and achieved heat quickly and was not quenched rapidly. Brown seaweed powder and 100 mL of 1 % acetic acid in distilled water were charged into the reactor at a ratio of 1:100(w/v). A stir inside the reactor was continuously moving at 100 rpm. The applied temperature and pressure ranges were 180 ~ 374°C and 8.82~221bar, respectively for 1

hour. Qualitative and quantitative analysis of products were performed by HPLC-RID. The hydrolysis product of brown seaweed was mannose. The efficiency of the reaction was increased with the temperature and pressure by inorganic catalyst. The efficiency of the reaction was checked by measuring reducing sugar, monosaccharide. The maximum yields of mannose (488 mg/1 g sample) was produced at high temperature and pressure (374°C, 221 bar) with 1% acetic acid.

The total amino acid content was found to be significantly higher in brown seaweed hydrolyzed by low temperature and pressure comparing to high temperature and pressure. The amounts of low molecular weight amino acids (glycine, alanine, serine etc) were higher than that of high molecular weight amino acids. The amount of amino acid produced by subcritical hydrolysis of brown seaweed was increased with the addition of acetic acid. The amino acids were decomposed at high temperature and pressure. The maximum yields of amino acids (290.84  $\mu\text{g/mL}$ ) were produced at low temperature and pressure (220°C, 22 bar) with acid catalyst.

## 서 론

미역은 갈조류에 속하는 해조류로서 한국, 일본, 중국 등 극동 아시아 지역에 분포하고, 이를 식용하는 나라는 한국과 일본에 국한되어 있다. 연간 우리나라에서 생산되는 미역은 총 해조류 생산량의 43.5%를 차지할 만큼 그 비중이 크다. 미역을 구성 하는 성분 중 수분을 제외하면 단백질, 탄수화물, 무기질이 주성분인데, 이 중 단백질의 아미노산 조성은 콩, 어육 단백질과 유사하여 영양적으로 우수하며, 무기질은 칼슘, 마그네슘, 유황, 요오드, 철 등이 풍부히 함유되어 있고, 비타민 A 함량은 5550 IU로서 다른 식품 재료에 비해 많이 함유 되어있는 것이 특징이다(Kim *et al.*, 1990). 미역에 함유된 탄수화물은 주로 점질성 다당류인 alginic acid, fucoidan, mannit 가 전체 다당류의 60%이상을 차지하고, 인체의 소화 기관내에서는 소화되지 않기 때문에 칼로리가 적은 식품의 중요한 소재이다(Kuda *et al.*, 2005). 특히 미역의 alginic acid는 산성 복합 다당류로서 여러 가지 생리활성 기능을 가지고 있다. 즉, 중금속 배출작용, 장벽을 자극하기 때문에 정상작용이 탁월하여 대장암의 발생 억제 및 배변촉진 작용, 혈 중 콜레스테롤의 상승 억제작용, 혈당 상승 억제 및 인슐린 절약 효과, 식용색소 및 계면활성제 등의 독성 방지효과 등의 기능 특성이 보고되고 있다(Chandini *et al.*, 2008).

한편, 알긴산은 갈조류의 세포막 또는 세포간 물질을 구성하는 주성분으로  $\beta$ -D-mannuronic acid(M)와  $\alpha$ -L-guluronic acid(G)가  $\alpha$ -1, 4 결합 또는  $\beta$ -1, 4 결합한 hetero형 다당류로 알려져 있고 알긴산, 한천 및 카라기난과 같은 해조 유래 다당은 식품, 화장품, 도료 등의 공업용 첨가제로 매우 다양하게 이용되고 있다(Draget *et al.*, 1994).

최근에는 해조 단당과 해조 올리고당에서 유래하는 다양한 생리 활성이 밝혀지면서 새로운 고부가가치적 이용 방안에 대한 연구가 행해지고 있다. 단당류 및 올리고당의 제조는 효소에 의한 분해나 합성, 산 분해에 의해 가능한데, 현재까지 개발되어 산업적으로 생산되는 올리고당은 주로 육상 식물 유래의 당질을 기질로 하여 효소적 방법으로 만들어지고 있다. 효소적 방법에 의한 올리고당의 제조는 특정 올리고당을 생산할 수 있는 효소의 확보가 가장 중요한 요소이며, 비용도 많이 드는 단점을 가지고 있다. 산 분해법은 비교적 처리 방법이 쉽지만 특정 올리고당의 생산이 어렵고, 저분자 당질이 많이 생성된다는 단점을 가지고 있다. 이처럼 현재까지 이루어진 국내외 연구들은 해조류로부터 미리 추출된 다당을 사용하거나 시판 다당 및 효소를 이용하여 가수분해 특성을 밝힌 것이 대부분이었다.

또한, 해조류의 효과적인 가수분해를 위해서는 보다 효율적인 처리 공정이 절실히 요구된다. 이러한 처리 공정중의 하나가 아임계 및 초임계 수를 이용하여 미역을 가수분해하여 단당류 및 아미노산을 회수하는 공정이다. 아임계 및 초임계 수는 반응매체로서의 매력적인 물성으로 인해 최근 많은 과학자들로부터 주목 받아오고 있다. 초임계 수는 일반적인 온도, 압력에서의 물과는 전혀 다른 특성을 가지고 있다. 예를 들어, 실온 및 대기압에서의 물은 유전상수가 80, 물의 이온농도의 합인 이온적(평형상수,  $K_w$ )은  $1 \times 10^{-14}$  이다. 유전상수는 반응매체로서 반응물에 대한 물의 친화력으로 표현되어진다. 이 값은 온도와 압력의 변화에 의해 구현이 가능하며, 다양한 화합물과의 반응성에 큰 영향을 미친다. 또한 물의 이온적은 가수분해반응을 촉진시키는 반응인자로 온도와 압력의 변화에 의해 제어 가능하다. 다시 말해서 높은 이온적은 가수분해반응을 보다 촉진시키는 역

할을 하게 된다. 이러한 특성으로 아임계 및 초임계 수산화 반응은 광범위한 분야에 사용되어져 왔다. Phenol, pyridine 및 methanol의 산화 (Martino *et al.*, 1999; Anitescu *et al.*, 1999)에 사용되어져 왔으며 폐수처리 (Goto *et al.*, 1997) 및 독성 유기물질의 분해(Shaw *et al.*, 1991) 등에도 응용되어져 왔다. 또한 최근에는 현사시 나무와 표고버섯 골목의 가수분해로서 바이오매스 적용에도 응용되고 있다(Choi *et al.*, 2006; Koo *et al.*, 2006).

아임계 및 초임계 수 처리 공정의 실용화에 있어서 반응에 영향을 미치는 다양한 반응인자에 관한 정보는 공정과정에서 중요한 요소로 부각되어진다. 특히 온도와 압력 그리고 반응시간이 아임계 및 초임계 수 반응에 있어서 제일 중요한 요소로 보고되고 있으나, 실제 공정의 설계를 위해서는 다양한 조작모드 (operating mode)에 있어서 각 반응에 따르는 생성물 조성 및 수율에 관한 상호 관련성이 검토되어야 한다.

따라서 본 연구는 해조류 자체를 직접 시료로 사용하여 조직이 단단하여 이용률이 낮은 해조류의 조직을 가수분해 시키고 유용성분을 효율적으로 회수하기 위하여 회분식 반응모드에서 아임계 및 초임계 수를 이용하여 해조 단당류 및 아미노산 가수분해 특성을 파악하고 반응온도 및 압력 그리고 시간의 효과에 대한 검토를 수행하였다.

# 이 론

## 1. 초임계 유체 기술(Supercritical fluid technology)

균질의 유체들은 보통 액체와 기체, 두 가지로 구분된다. 그렇지만 이러한 구분이 항상 명확하지만은 않다. 왜냐하면 임계점(critical point)에서는 두상의 구분이 어렵기 때문이다. 그렇다면 초임계 유체 기술(Supercritical fluid technology)은 임계점 근처의 온도와 압력에서 존재하는 초임계 유체 중에 비휘발성의 고체가 증기압으로부터 계산된 예측보다 훨씬 높은 비이상적으로 용해되는 현상을 이용하는 최근의 새로운 물질분리 기술을 말한다.

증류나 추출은 일반적으로 화학 공정에서 광범위하게 응용되고 있는 물질 분리 방법이다. 증류에 의한 분리법이 성분들의 증기압 차이를 이용하는 반면, 추출에 의한 분리법은 성분들과 추출용매의 상호작용을 결정하는 물성치들의 특성 차이를 이용하고 있다. 초임계 유체 추출법은 이러한 증류법이나 추출법에 의한 분리 효과를 모두 이용하고 있으며, 추출 원리는 기본적인 상평형관계와 임계점 근방에서 열역학적 물성 및 점도와 확산계수 등의 transport property 변화를 고찰함으로써 이해할 수 있다.

이와 같이 이산화탄소에 대한 압력 및 온도 변화에 따른 유체의 상 거동을 이산화탄소의 임계점( $T_c=31^\circ\text{C}$ ,  $P_c=7.38\text{ MPa}$ )보다 높은 영역에서 초임계 이산화탄소를 사용한 반응이 이루어진다. 이 영역에서는 온도와 압력의 변화에 따라 유체의 밀도가 크게 변하는 영역이므로 반응 조건에 따라 용질의 용매에 대한 용해력이 크게 달라진다.

## 1.1 상평형

초임계 유체를 이용한 분리 조작은 반응 용매의 임계온도와 임계압력 이상에서 이루어지며 밀도도 임계밀도 근처로 유지되어야 휘발성이 낮은 성분을 추출할 수 있는 기능을 갖게 된다. 이러한 조건들을 만족치 않는 초임계 유체는 용매력이 급격히 떨어져 정상적인 반응성능을 상실하게 된다. 가장 이상적인 초임계 유체로는 무독성 무공해물질인 탄산가스가 이용되고 있다. 그리고 초임계 유체 추출은 임계점 이상에서 수행되어야 한다. 초임계 유체의 용매력은 일정 온도에서는 밀도에 따라 증가하고, 일정 밀도에서는 온도에 따라 증가한다는 일반원칙이 많은 실험들에 의해 입증되었다.

Fig. 1에는 초임계 유체 추출의 상평형 개략도를 나타내었다. 임계점에서는 액체와 기체간의 경계가 없어지고 임계점 이상의 온도와 압력에서는 기체, 액체의 구분을 할 수 없어 초임계 유체라고 칭하며, Fig. 1에서 초임계 영역을 표시했듯이 초임계 유체는 온도가 상승함에 따라 기체에 가까워지고, 반면에 압력이 증가함에 따라 밀도가 커지면서 액체에 가까운 성질을 갖는다. 일반적으로 초임계 유체를 이용한 추출은 임계온도보다 약간 높은 온도에서 고압으로 수행함으로써 선택적인 용매 효과를 크게 얻을 수 있지만 압력의 상한선은 적용하는 물질에 따라 제한을 받는다.

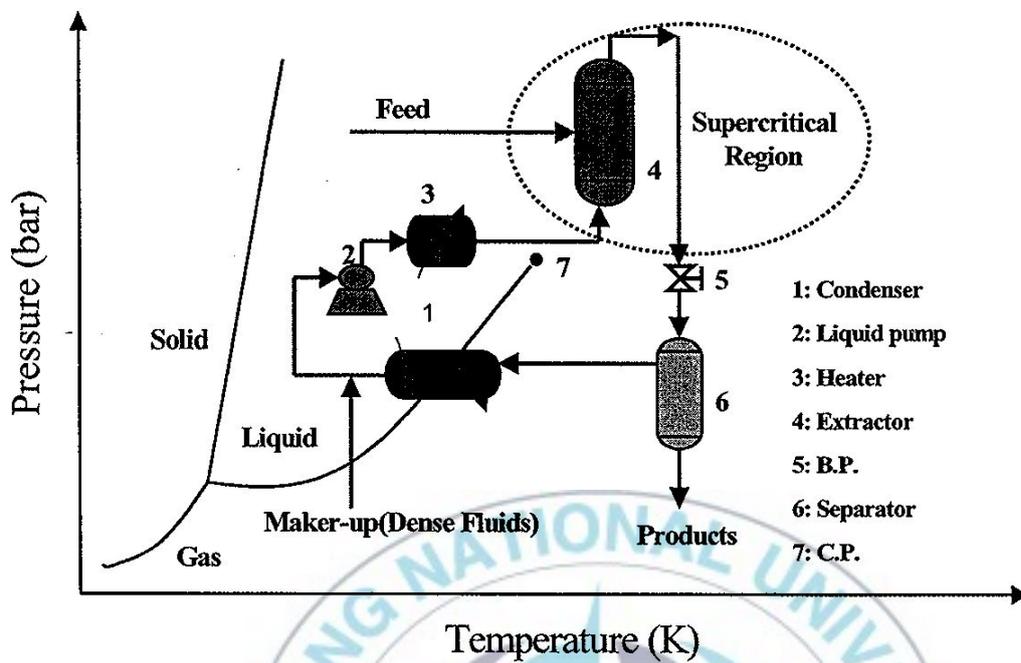


Fig. 1. A schematic diagram of supercritical fluid extraction (SFE).

## 1.2 초임계 유체의 물성

초임계 유체의 임계점 근방에서 물성변화는 사용되는 기체의 분자 특성에 관계없이 대등한 현상을 나타내므로, 대표적인 예로 탄산가스에 대해 살펴보고자 한다. 초임계 유체로 이용되는 탄산가스 중에 포함된 미량의 비휘발성 성분은 물성변화에 거의 영향이 없으므로, 순수 탄산가스의 물성치를 이용하여 점도 (Viscosity), 확산계수(Diffusion coefficient), 유전율 (Dielectric constant)을 추정한다. 초임계 유체를 이용하려면 초임계 유체의 성질과 분리하려는 난 휘발성 분과의 관계를 잘 알아야 하며 그 관계를 아래와 같이 정리하였다.

- 1) 초임계 유체의 임계온도가 추출 온도에 가까울수록 난 휘발성분의 물질을 잘 용해한다.
- 2) 대략 비슷한 임계온도를 갖는 기체라도 난 휘발성의 물질을 용해하는 정도가 서로 다르다.
- 3) 초임계 유체의 용해능력은 그 기체가 액상의 난 휘발성 물질에 많이 용해될수록 크다.
- 4) 온도가 일정할 때 기체의 용해능력은 압력이 증가함에 따라 일반적으로 지수함수 관계로 증가한다.
- 5) 난 휘발성 물질에 대한 초임계 유체의 용해능력은 높은 압력일 때에 액체 상태일 때보다 클 수 있다.
- 6) 초임계 유체에 물질이 녹는 정도는 그 기체의 밀도에 따른다. 압력이 일정할 때 온도가 증가함에 따라 기체의 밀도는 작아지고 용해할 물질에 대한

용해력도 감소한다. 한편, 온도가 상승함에 따라 용해할 물질의 증기압이 커지기 때문에, 온도가 상승할 때에 어떤 것이 더 큰 영향을 미치느냐에 따라 용해도는 증가하기도 하고 감소하기도 한다. 그러나 온도 증가에 따른 가용력의 감소는 그리 큰 것이 아니기 때문에 온도를 상승시켜 용매를 쉽게 회수하여 다시 연속적으로 공급할 수 있다.

- 7) 초임계 유체는 화학적으로는 상이하지만 비슷한 휘발도를 갖는 혼합물에서 어떤 특정성분을 선택적으로 분리할 수 있다.

따라서 초임계 유체 추출은 비교적 낮은 점도와 액상에서의 확산계수보다 높은 상태에서 수행되어야 물질 전달 효과가 향상되고 결과적으로 반응 성능이 증가하게 된다.



### 1.3 초임계 유체에 사용되는 용매

분자의 크기 및 극성이 다른 초임계 유체추출 용매들은 Table. 1에 정리하였다. 이들 중 대부분의 추출용매는 값싸고 쉽게 얻을 수 있다. 고체용질에 따라 순수한 단일용매보다는 두 가지 용매가 혼합된 것을 사용함으로써 용해도 증가된다는 사실이 실험적으로 밝혀졌다. 초임계 유체 용매의 고체 용질에 대한 용매력을 예측할 수 있는 기본 이론은 아직 존재하지 않으나, 분자의 크기나 물리적 및 화학적 성질이 다른 다양한 종류의 비휘발성 물질들을 시험한 후에 다음과 같은 일반 원칙을 제시하였다.

- 1) 탄화수소 물질이나 ester, ether, lactone, epoxide 등의 비교적 극성이 없는 친유성 유기화합물은 7~10 MPa의 압력 범위 내에서 초임계 유체에 의한 추출이 가능하다.
- 2) -OH 기나 -COOH기 등의 극성이 강한 기를 갖는 물질에 대한 추출은 더욱 어렵다. 한 개의 carboxyl그룹과 hydroxyl그룹을 갖는 벤젠 유도체의 추출은 가능하나 1개의 carboxyl그룹과 셋 이상의 hydroxyl 그룹을 갖는 유기화합물의 추출은 일반적으로 거의 불가능하다.
- 3) Sugar나 아미노산 등의 극성 물질들은 41 MPa까지의 압력 범위 내에서는 거의 추출되지 않는다.

Table 1. Supercritical solvents and their basic constants

Solvents	B.P.(°C)	Critical data		
		T <sub>c</sub> (°C)	P <sub>c</sub> (MPa)	ρ <sub>c</sub> (g/cm <sup>3</sup> )
CO <sub>2</sub>	-78.5	31.3	7.38	0.448
NH <sub>3</sub>	-33.4	132.3	11.27	0.240
H <sub>2</sub> O	100.0	374.4	22.97	0.344
Methanol	64.7	240.5	7.99	0.272
Ethanol	78.4	243.4	6.38	0.276
Isopropanol	82.5	235.3	4.76	0.273
Ethylene	-103.8	9.3	4.98	0.217
Propylene	-47.8	91.9	4.62	0.232
Ethane	-88.0	32.4	4.89	0.203
n-Propane	-44.5	96.8	4.25	0.220
n-Butane	-0.5	152.0	3.80	0.228
n-Pentane	36.3	196.6	3.37	0.232
n-Hexane	69.0	234.2	2.30	0.234
2,3-Dimethylbutane	58.0	226.8	3.14	0.241
Benzene	80.1	288.9	4.89	0.302
Toluene	110.7	318.6	4.11	0.292
Dichlorodifluoromethane	-29.8	111.7	3.99	0.558
Dichlorofluoromethane	8.9	178.5	5.16	0.522
Trichlorofluoromethane	23.7	196.6	4.22	0.554

#### 1.4 초임계 유체의 장점과 응용분야

초임계 유체 기술은 휘발도가 높은 액체에 적용하여 Azeotrope mixture를 분리하거나 hydrocarbon에서 특정성분을 추출하기도 하지만, 초임계 유체 기술의 근본적인 장점은 액체 용매보다 적은 용매 능력 때문에 적절한 온도와 압력을 사용하여 적은 휘발도를 갖는 물질은 선별적으로 분리할 수 있다는 것이다. 새로운 분리 기술로써 각광을 받는 초임계 유체 기술은 고비점 물질들이 비교적 낮은 온도에서 가스화 되어 초임계 상태의 혼합기체로부터 추출 용매와 추출된 용질의 분리조작이 간단하고 초임계 유체공정이 비교적 낮은 온도에서 수행되기 때문에 열 변성 물질 추출시 매우 유용하다 (Chrastil *et al.*, 1982; De *et al.*, 1982). 에너지나 장치비의 소모가 큰 증류나 추출과 같은 분리 조작이 필요치 않다. 식품 및 의약품에 응용 시 추출 용매로써 탄산가스와 같은 비독성 물질을 이용하므로 최종 제품에 인체에 해로운 불순물이 없다. 사용되는 추출 용매들은 일반적으로 저장에 용이하고 값싸게 구입할 수 있다. 초임계 유체 추출 및 분리 공정이 수행된 후에 이용된 탄산가스는 쉽게 recycle 된다는 장점이 있다.

최근 10여 년간에 걸쳐 초임계 유체 기술에 관한 관심이 높아지고 연구도 경쟁적으로 활발해짐에 따라 이 기술의 응용 분야도 계속 확대되었다. 초임계 유체 기술은 고도의 물질분리기술로서 의약, 식품, 향료 등과 같은 정밀화학공업, 석유화학, 에너지 산업등 응용 범위가 넓을 뿐 아니라 화학반응매체, 고분자 물질의 정제, 초임계 유체 크로마토그래피 등으로 응용 분야가 날로 확대되고 있다. Table. 2에는 초임계 유체를 사용한 공정을 응용한 분야를 나타내었다.

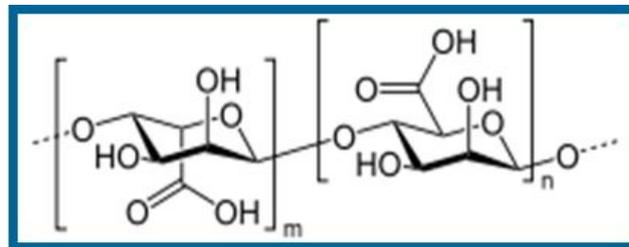
Table 2. Application areas for supercritical fluid extraction

Chemical and Food Industries	Fractionation polymer
	Porous polymer
	Swell polymers
	Chemical fiber
	Chemicals from coals, metals isotopes, alcohol
	Spice extracts
	Lecithin
	Fat free proteins
	Vegetable fats and oils
	Animal fats
	Aromas and essences(Coffee, tea, hops)
	Natural coloring substances(Paprika)
	Aroma transfer
	Catalyst treatment
	Active-carbon treatment
Fat refining(deacidification)	
Reduction of alcohol in beverages	
Pharmacy	Alkaloids
	Sterines
	Antibiotics
Recycling of	Used oils
Residue	Polymer wastes

## 2. 미역의 알긴산으로부터 단당류 생산 경로

미역의 주요 구성 성분인 알긴산은 갈조류(褐藻類)의 세포막을 구성하는 다당류로 해초산이라고도 한다. 알긴산은 2종의 우론산의 중합체로 우론산의 카르복시기로 인해 산의 성질을 나타낸다. 그 구조는 만누론산과 L-글루론산이  $\beta$ -1, 4결합으로 수백 개가 연결된 것이다. Fig. 2에 알긴산의 구조 및 초임계수가수분해를 통해 광학이성질체인 D와 L형의 Mannose로 분해되는 경로를 나타내었다.





Alginic acid

Sub- and Supercritical Water

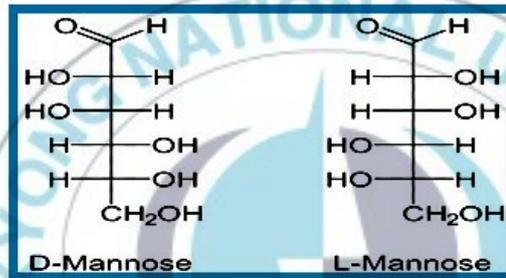


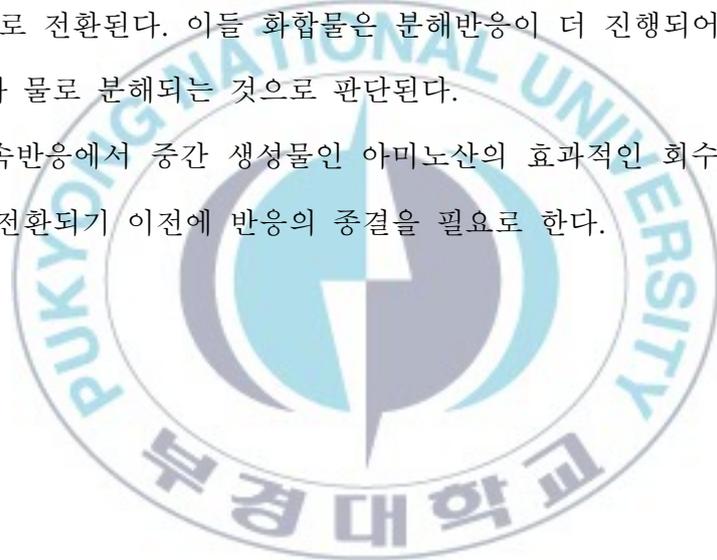
Fig. 2. Production process of mannose from *Undaria pinnatifida* by sub- and supercritical water hydrolysis.

### 3. 미역의 단백질로부터 아미노산 생산 경로

미역에 존재하는 단백질로부터 가수분해를 통해 생성되는 아미노산의 조성은 동물성 아미노산과 거의 유사하며 영양소적 가치가 풍부한 해조자원으로서 효율적으로 활용될 수 있다. Fig. 3에 아임계 수 가수분해를 이용하여 미역으로부터 아미노산 생성 경로를 나타내었다.

아임계 수 가수분해반응에 의한 아미노산의 생성 및 분해의 예상경로를 Fig. 11에 나타내었다. 미역에 함유된 단백질은 가수분해반응에 의해 아미노산을 생성하며, 생성된 아미노산은 온도 및 반응시간의 증가와 더불어 분해하여 유기산 및 다른 화합물로 전환된다. 이들 화합물은 분해반응이 더 진행되어 최종생성물인 휘발성 탄소나 물로 분해되는 것으로 판단된다.

이러한 연속반응에서 중간 생성물인 아미노산의 효과적인 회수를 위해서는 다른 생성물로 전환되기 이전에 반응의 종결을 필요로 한다.



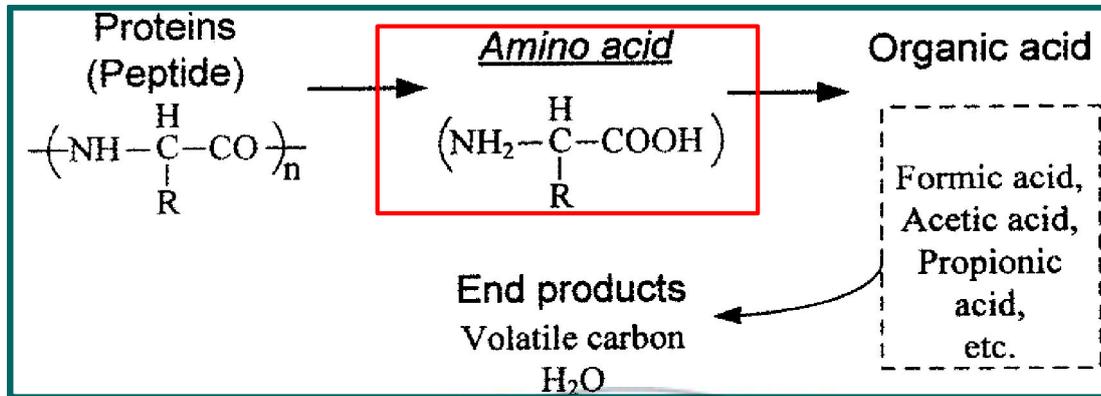
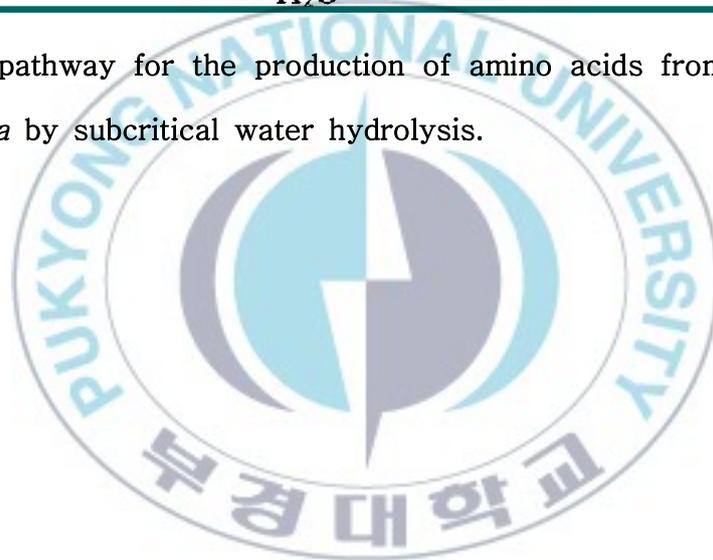


Fig. 3. Reaction pathway for the production of amino acids from *Undaria pinnatifida* by subcritical water hydrolysis.



## 재료 및 방법

### 1. 재료 및 시약

실험에 사용된 해조류는 미역(*Undaria pinnatifida*) 이었고, 부산시 기장군 소재인 (주)청호씨푸드로부터 수확 후 수세된 미역을 제공 받아 동결 건조 후 700  $\mu\text{m}$  로 분쇄하여  $-20^{\circ}\text{C}$  암소에서 보관하며 사용하였다. 이산화탄소는 식품용 순도 99.9 % 를 사용하였으며, 표준시약으로는 Mannose, 99.9% (SAMCHUN, Korea)를 사용하였고, 그 외 분석 및 보조용매로 사용된 시약은 특급 시약이었다. 미역의 초임계 이산화탄소 처리에 사용된 솜은 의약품 탈지면을 사용하였다.

### 2. 실험방법

#### 2.1. 미역의 일반성분 분석

일반성분 측정은 AOAC (2000) 법에 준하여 측정하였다. 즉, 수분은 상압가열건조법, 조단백질은 Kjeldahl법, 조지방은 Soxhlet법 및 조회분은 건식회화법으로 측정하였다.

#### 2.2 초임계 이산화탄소를 이용한 미역의 이취성분 제거

초임계 이산화탄소를 이용한 미역의 이취 성분을 제거하기 위한 실험 방

법은 포화 압력 상태인 이산화탄소가 cylinder로부터 냉각기(-20℃)를 통과하여 이산화탄소 내에 존재하는 기포가 제거된 후 고압 metering pump에 의해 일정한 유량으로 유입되어 system내의 설정 압력까지 수행되어 졌다. 고압 펌프로부터 반응기에 유입되기 전에 추출 용매로 작용하는 이산화탄소는 설정된 추출 온도에 따라 항온조에 의해 예열되어진다. 반응기 내의 온도는 thermocouple에 의해 감지되어 추출 온도를 조절하게 되며 반응기 외부에 heating jacket을 설치하여 반응기 내부의 온도를 일정하게 유지시켰다. System 내의 전체 압력은 2개의 metering valve를 부착시켜 순간 압력변화로 인한 system 내의 추출 조건 변화를 방지하였다. 고압 pump와 압력 조절기 앞에 7 micron filter 를 설치하여 추출이 진행되는 동안 용매 이산화탄소와 시료의 입자에 의한 system의 흐름이 중단되는 것을 방지시켰으며 safety valve를 부착시켜 system내의 excess pressure를 제거하였다. 또한 실험 종료 후 system내의 고압으로 인한 압력의 역류로 고압펌프의 손상을 방지하기 위하여 고압 펌프 출구에 check valve를 설치하였다. 초임계 이산화탄소는 반응기 내의 시료로부터 휘발성성분을 분리하여 낮은 압력 상태로 분리조 내에 유입되어 이산화탄소와 용제를 쉽게 분리시키게 하였다. 이때 추출공정 동안 사용된 CO<sub>2</sub>의 양은 CO<sub>2</sub>가 gas meter를 통과함으로써 측정되며 gas meter통과 후 대기로 방출된다. 미역으로부터 이취성분을 제거하기 위한 초임계 이산화탄소 추출 장치는 Fig. 4에 나타내었다.

초임계 이산화탄소를 이용하여 미역의 이취성분을 제거한 추출잔여물에 대한 휘발성 성분의 분석은 Gas-chromatography (Shimatsu Co. model No. : GC-17A)를 이용하여 mass detector (Shimatsu Co. model NO. : QP5050A)로 동정하였다. 분석하고자하는 휘발성성분들의 함량이 매우 낮으며 악취를 유발하는 성분들의 경우 역치가 ppb 단위로 매우 낮아 분석에 사용된 시료는

canister system을 이용하여 시료의 headspace를 1L 농축 injection 하였으며, 모든 시료에서 동일한 온도와 동일한 시간으로 시료를 sampling 하였다. GC-MSD와 Canister System의 분석조건은 Table 3과 Table 4에 각각 나타내었다. 본 실험에서 사용된 Canister System의 1차 트랩과 2차 트랩의 온도는 모두 액체질소를 이용  $-185^{\circ}\text{C}$ 로 하여 시료를 농축하였다. 그리고 시료가 흐르는 모든 구간은 모두  $200^{\circ}\text{C}$ 로 설정하여 휘발성 유기화합물이나 악취물질이 부착되지 않도록 고려하였다. 휘발성 성분의 동정은 GCQ library search system(NIST Mass Spectra Data Base)에 의한 검색, Willey/ NBS Registry of Mass Spectra Data, Eight Peak Index of Mass Spectra에 의한 문헌의 질량분석 데이터 검색으로 물질을 추정 하였으며, 유사성 80%이하와 신빙성이 낮은 peak에 대해서는 미지의 물질로 분류하였다.



- 1: CO<sub>2</sub> tank
- 2: Pressure gauge
- 3: Cooling bath
- 4: Safety valve
- 5: Main Pump
- 6: Temperature indicator
- 7: Pressure indicator
- 8: Extractor 1
- 9: Extractor 2
- 10: Heat exchanger
- 11: BPR
- 12: Separator
- 13: Sample collector
- 14: Cold trap
- 15: Gas flow meter
- 16: Co-solvent delivery pump
- 17: Gas Chromatography

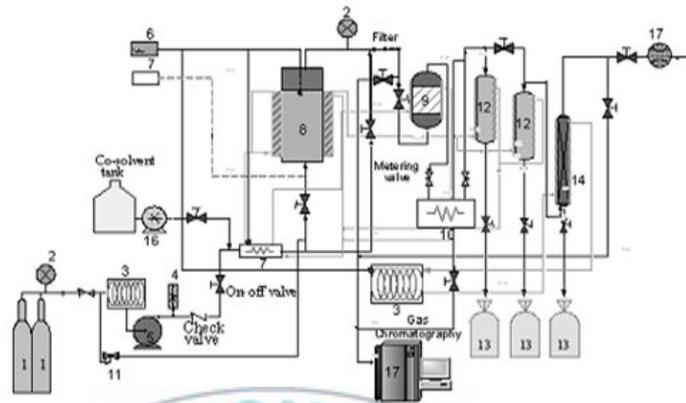


Fig. 4. A schematic diagram of supercritical CO<sub>2</sub> extraction.

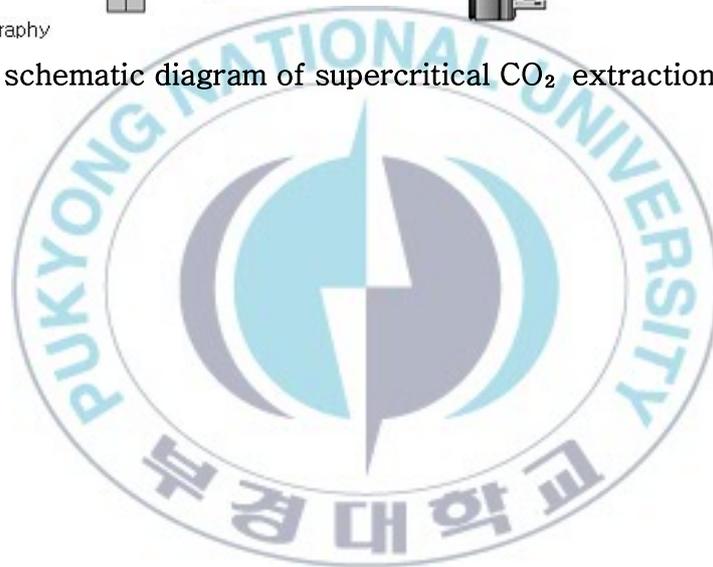


Table 3. Analytical condition of gas chromatography & mass detector

Gas Chromatography	
Model	Shimadzu GC-17A
Control Mode	Splitless
Injection Temp.	250°C
Interface Temp.	250°C
Carrier Gas / Flow	He, 1 mL/min constant flow
Oven Temp.	35°C (10min)-8°C/min→120°C (10min)-12°C/min→180°C
Column	AT-1 (Alltech), Non-polar 100% Dimethyl Siloxane (60 m × 0.32 mm × 1 μm)
Mass detector	
Model	GCMC - QP5050A
Acquisition mode	Scan
Interface temp.	250°C
Ionization energy	70 eV
Mass range	35 ~ 350 M/Z

Table 4. Analytical conditions of canister system

Canister system	
	AUTOCan
Model	Autosampler/Concentrator, Tekmar. Co.
GC start option	End of desorb
GC cycle time	40 min
Cryo	On
Line temp.	200 °C
Valve temp.	200 °C
MCS line temp.	70 °C
Trap standby temp.	100 °C
Cryo standby temp.	200 °C
MFC standby flow	100
Dry purge time	0.5 min
Dry purge temp.	-50 °C
Dry purge flow	5
Desorb preheat temp.	270 °C
Trap desorb time	4 min
Trap desorb temp.	270 °C
Cryo cool temp.	-185 °C
Cryo inject time	1 min
Cryoi inject temp.	200 °C
Trap bake time	10 min
Trap bake temp.	270 °C
MCS bake temp.	270 °C
MCS cool	70 °C

## 2.3 초임계 수를 이용한 미역으로부터 단당류 회수

### 2.3.1 미역의 초임계수 산화를 이용한 당화반응

미역의 가수분해에 사용된 초임계 수 가수분해 장치의 공정도는 Fig. 5에 나타내었다. 가수분해 실험은 내산화성 내열 합금인 하스텔로이 특수강으로 제작된 200 mL 부피의 고온, 고압용 반응기와 용액을 혼합하기 위한 마그네틱 교반기가 부착되어 있는 회분식 장치로 수행되었다.

미역 분말 1 g 과 증류수 100 mL (W/V, 1:100)으로 시료를 준비하고 반응기에 주입하였다. 전열기로서 가열하여 실험온도 (180℃ ~ 374℃)가 정상상태에 도달하면 1분 동안 가수분해 시켰다. 충분히 방냉 후 반응물을 회수하여 분석을 행하였다.



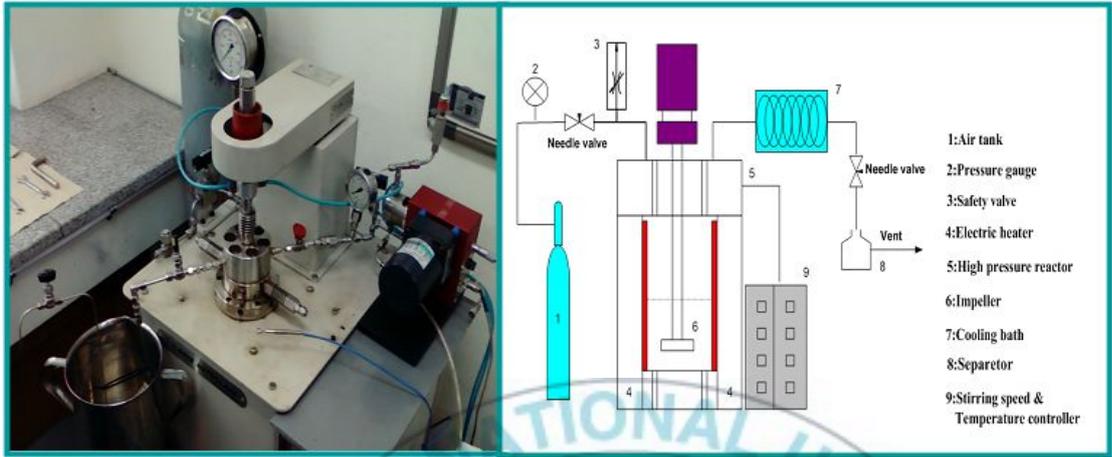
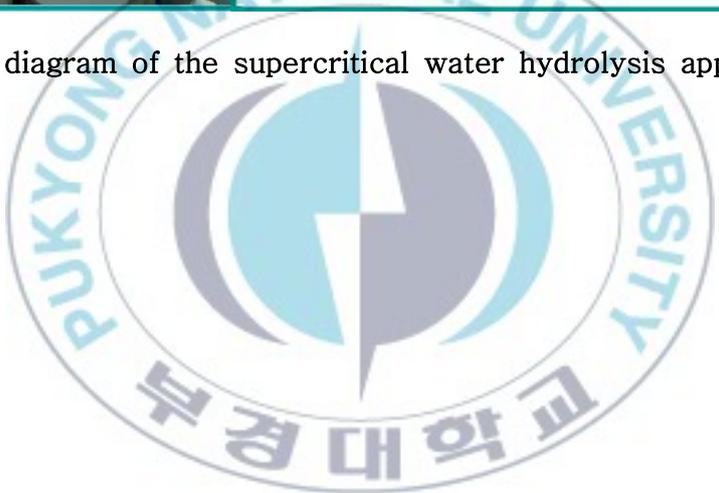


Fig. 5. Schematic diagram of the supercritical water hydrolysis apparatus.



### 2.3.2 생성물의 단당류 농도 분석 및 수율 비교

초임계 수 가수분해를 이용하여 미역으로부터 회수한 생성물의 단당류 (Mannose)의 정성 및 정량분석을 위해 HPLC-RID를 사용하였다. Guillou *et al.* (1993)의 방법을 응용하여 Table 5와 같은 조건에서 분석을 실시하였다. Column은 Carbohydrate Column and NH<sub>2</sub> Column (4.6 mm X 250 mm)을 사용하여 상온에서 실시하였고, 검출은 Refractive Index detector로 575 nm에서 측정하였다. 시료의 1회 주입량은 20 µL 이었고, 용출용매는 Acetonitrile : Deionized Water = 75:25 (v/v)로 하였다(Table 2). 표준용액은 표품 Mannose, 99.9% (SAMCHUN, Korea)를 Water : ACN (1:1, v/v)에 녹여 HPLC mobile phase로 희석, 100, 500 그리고 1000 ppm의 용액을 조제하여 검량곡선 ( $Y=4E-05x + 0.0019$ ,  $r^2=0.9999$ )을 얻은 후 함량계산에 사용하였다.

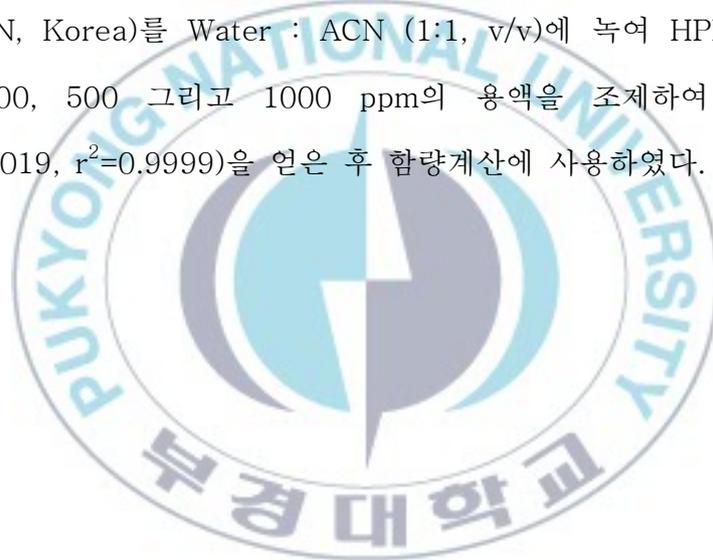
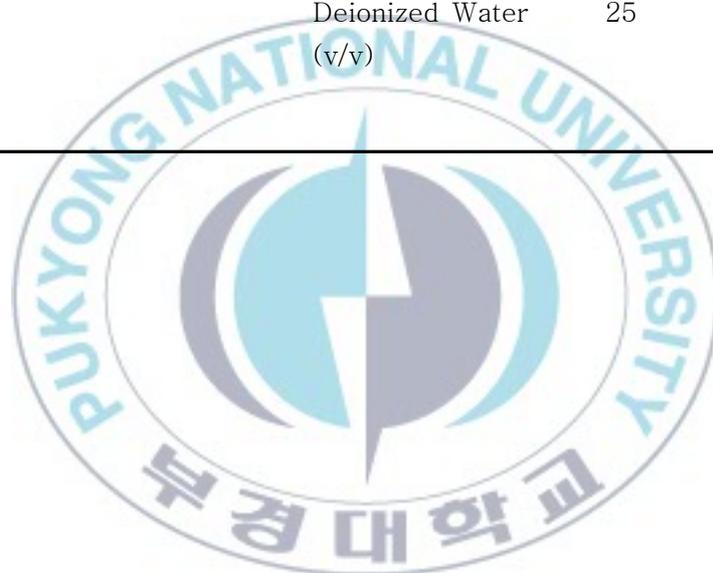


Table 5. HPLC conditions for the detection of mannose

---

Instrument	:	Hewlett Packard(USA), Model 1100series
Column	:	Carbohydrate Column and NH2 Column (4.6mm X 250mm)
Column temp.	:	Room temp.
Detector	:	Refractive Index Dectector
Wavelength	:	575 nm
Injection volumn	:	20 $\mu$ L
Flow rate	:	1.0 mL/min
Moble phase	:	
		Acetonitrile 75
		Deionized Water 25
		(v/v)

---



### 2.3.3 아임계 및 초임계 수 가수분해 물질의 항산화 능

해조류 내 기능성 물질(폴리페놀류)에 의한 산화억제효과 (TBARS로 검정) 1 M phosphate buffer (pH 6.5) 8 mL 에 tween-20 50 mL 를 넣고 해조류 추출물 0.25 mL를 첨가한 후 KOH 2~3조각을 넣고 pH를 6.5로 조절한 oil emulsion을 조제한다. 이 oil emulsion 0.5 mL 에 추출물 0.1 mL와 50 mM FeCl<sub>2</sub> 0.1 mL를 첨가하여 용액의 부피를 1 mL 로 한다. 이렇게 한 다음 37℃ 에서 1시간 동안 반응시켜 얻은 반응 용액에 7.2% BHT 50 uL 와 TBA/TCA용액 2 mL를 각각 첨가 한 다음 100℃에서 15분간 가열하고 냉각한다. 이 반응액을 4℃에서 3000 rpm으로 10분간 원심분리 시킨 후 상정액을 531 nm에서 흡광도를 측정하여 최종 TBARS의 계산은 시료 L당 malonaldehyde양 (mg)으로 계산한다.

Free radical 소거능(실험적); 생성물의 전자공여능은 DPPH (1,1-diphenyl-picrylhydrazyl)의 환원성을 이용하여 UV/Vis spectrophptometer로 측정한다. 즉 시료 1 mL 에 0.2 mM DPPH (methanol에 용해) 1 mL 를 가하여 vortex로 혼합한 다음 실온에서 30분간 방치 후 대조구에 대한 흡광도의 감소비율로서 전자공여능을 나타냈다.

$$\text{전자공여능(\%)} = \left( \frac{\text{시료첨가시의 흡광도}}{1 - \text{공시험 흡광도}} \right) \times 100$$

## 2.4. 아임계 수를 이용한 미역으로부터 아미노산 회수

### 2.4.1 미역의 산 가수분해

아임계 수 산화 반응과 산 가수분해 효과를 비교하기 위하여, 초산을 사용하여 반응용액의 pH를 조정하였다. 구체적으로, 1 ~ 5%의 초산 수용액을, 60°C에서 1시간 동안 가수분해 반응 시킨 다음, 반응을 중지시키기 위하여 50 mM NaOH를 첨가하여 pH를 중성화 시킨 후에 아미노산 분석기를 이용하여 생성물의 아미노산 농도를 측정하였다.

### 2.4.2 미역의 아임계수 산화를 이용한 가수분해

미역의 아임계 수 가수분해에 사용된 초임계 수 가수분해 장치는 미역의 당화 반응에 사용된 장치와 동일하며 공정도는 Fig. 5에 나타내었다. 가수분해 실험은 미역 분말 1 g 과 증류수 100 mL (W/V, 1:100)으로 시료를 준비하고 반응기에 주입하였다. 촉매는 1% 초산 함유물을 사용하였다. 미역의 가수분해 반응은 전열기로서 가열하여 실험온도 (200°C ~ 260°C)가 정상상태에 도달하면 1분 동안 가수분해 시켰다. 충분히 방냉 후 반응물을 회수하여 아미노산 분석기를 사용하여 분석을 행하였다.

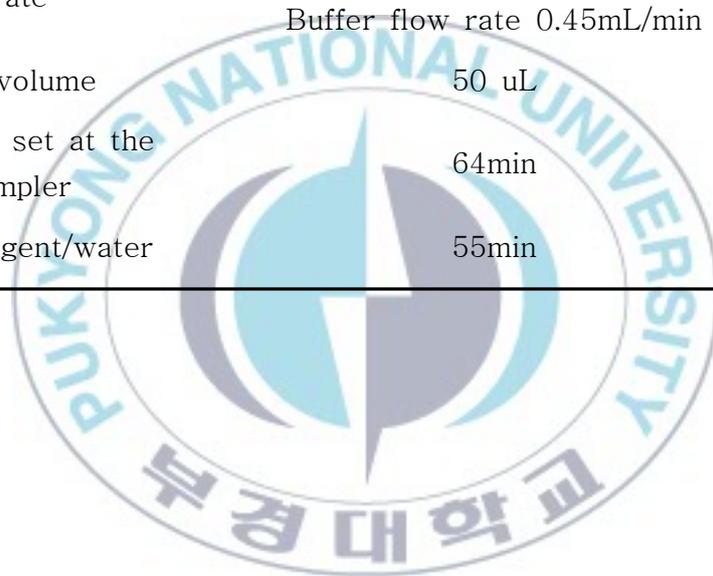
### 2.4.3 미역의 아임계 수 가수분해물의 유리 아미노산 분석

가수분해 반응 생성물 중 5 g을 취해 에탄올 30 mL 를 첨가하여 4℃에서 24시간 방치한 후 homogenize하고 15분간 원심분리 한다. 원심분리 한 후 다시 70%에탄올 30 mL 를 첨가한 후 다시 homogenize하여 분리하는 과정을 두 번 더 반복, 실시한 후 40℃이하에서 농축시킨다. 농축된 시료를 3차 증류수에 녹여 정용하고 sulphosalicylic acid 1 g 을 넣고 잘 혼합한 후 암실에서 1시간 방치한다. 다시 15분간 원심분리하고 상층액 2.5 mL 를 취하여 filtering하여 분석한다.

분석은 아미노산을 양이온 교환 칼럼으로 분리한 후 ninhydrin 시약과 120℃에서 반응시켜 UV/VIS Detector로 검출하며 ninhydrin법에서는 570 nm와 440 nm의 두 파장을 이용하였다(Sabina *et al.*, 1999). Prolin 및 Hydroxy proline은 ninhydrin과 반응 후 황색을 내기 때문에 440 nm에서 검출을 하며 그 외의 아미노산은 ninhydrin과 반응 후 자주색을 내기 때문에 570 nm에서 검출하였다. 분석 조건은 Table 6에 나타내었다.

Table 6. Operating condition of amino acid analyser for analysis of free amino acids

Item	Operating condition
Instrument	Sykam amino acid analyzer S433
Column and Dimension	Column size 4 x 150mm, Resin Li+ form
Mobile phase	A : 35% Acetonitrile with 0.1% acetic acid B : 65% Acetonitrile with 0.1% acetic acid
Detector	UV detector(440nm, 570nm)
Flow rate	Reagent flow rate 0.25mL/min Buffer flow rate 0.45mL/min
Injection volume	50 uL
Analysis time set at the auto sampler	64min
Switching reagent/water	55min



## 결과 및 고찰

### 1. 일반성분의 분석

동결 건조된 미역의 일반 성분 분석 결과는 Table 7에 나타내었다. 미역의 일반성분 조성은 조지방 4.9%, 조단백 20.1%, 수분 1.14%, 회분 13.5% 등으로 나타났으며, 미역의 전당은 60.36%로서 초임계 수 산화를 이용한 단당류 생산에 필요한 많은 양의 기질을 함유하고 있었다. 또한, 일반성분에서 측정된 미역의 전당을 기준으로 초임계 수 당화 반응의 단당류 생성 수율을 계산하였다.



Table 7. Proximate composition of *Undaria pinnatifida*

Freezing dry basis (%)	
Composition	Component(%)
Moisture	1.14
Crude protein	20.1
Crude lipid	4.9
Ash	13.5
Total sugar <sup>a</sup>	60.36

<sup>a</sup> 100-(moisture + crude protein + crude lipid + ash)



## 2. 미역의 이취성분의 동정

미역 원시료와 초임계 이산화탄소 처리 시료의 분석에는 앞서 설명한 cannister system을 이용하여 1 L의 head-space를 포집 후 GC-MSD를 사용하여 분석하였다. 분석 결과는 Fig. 6에 분석물질의 chromatogram을 나타내었으며, Table 8에 동정된 물질을 그리고 Table 6에 특징적인 냄새를 나타내는 물질들을 나타내었다. 해조류의 불쾌치에 크게 관여하는 것으로 보이는 Propanal(CAS)Propion aldehyde, n-Hexanal., 및 Isovaler aldehyde 등이 검출되었으며, 불포화지방산의 함유가 높은 미역과 같은 해조류에 있어서는 이들 고도불포화지방산의 자동산화에 의하여 지방취등의 이취를 유발하는 성분들이 증가하게 되고 이로 인하여 비린내와 같은 불쾌치 및 이취를 유발 하는 것으로 생각된다.

초임계 이산화탄소를 이용한 미역의 이취 성분의 제거에는 50℃, 200bar의 조건에서 원시료의 면적대비 36.73%의 감소율을 나타내어 미역의 이취 성분제거에 가장 효과적인 것으로 나타났다.

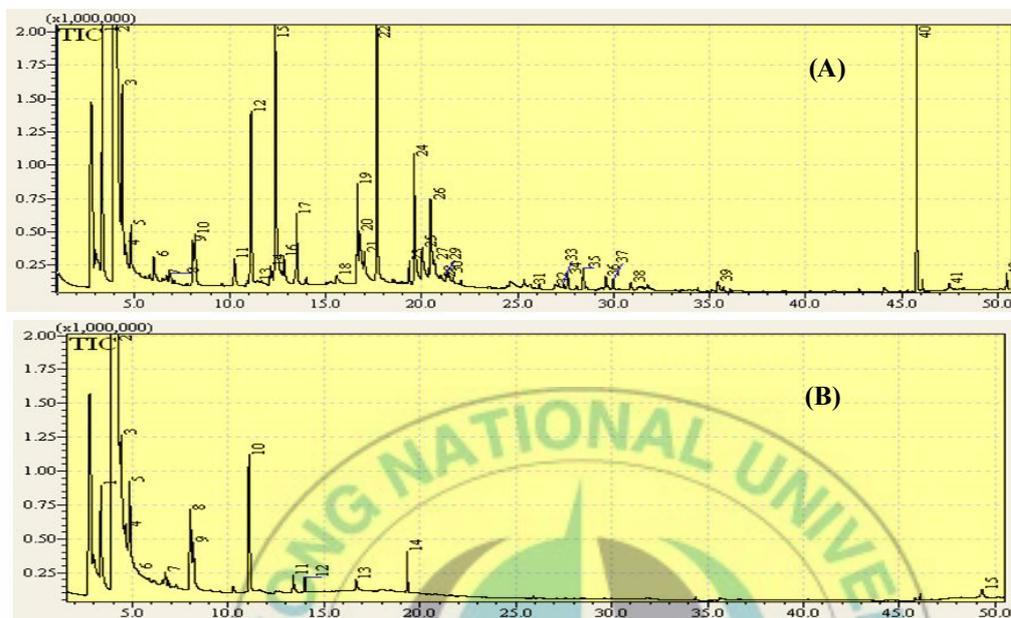


Fig. 6. Chromatogram of volatile compounds from *Undaria pinnatifida*.

Table 8. Volatile compounds identified in *Undaria pinnatifida* by determined GC/MS

NAME	R.T (min)	Area(%)	
		Untreated Brown Seaweed	Treated Brown Seaweed
Ethanol(CAS)Ethyl alcohol	3.91	74.96	86.60
Propanal(CAS)Propion aldehyde	4.39	0.87	0.53
1-Propanol(CAS)Propanol	6.03	0.15	0.33
Butanal(CAS)n-Butanal	6.87	0.03	2.09
Isovaler aldehyde	10.24	0.20	-
2-Ethylfuran	13.49	0.68	0.09
trans-2-Pentenal	15.56	0.07	-
Methyl-Benzene(CAS)Toluene	16.64	0.70	0.41
cis-2-Penten-1-ol	16.74	0.50	-
n-Hexanal	17.65	1.04	-
(E)-2-Hexenal	19.60	0.49	0.89
n-Hexanol	20.45	0.69	-
1,2-dimethyl-Benzene	20.66	0.09	-
Styrene\$\$Ethenyl-Benzene	21.32	0.04	-
n-Heptanal	21.48	0.02	-
2,2,5-trimethyl-Hexane	29.97	0.11	-
Decanal	35.43	0.03	-
Penta decane	45.78	1.04	-
Diethyl Phthalate	47.46	0.11	-

### 3. 미역의 초임계수 산화를 이용한 당화반응

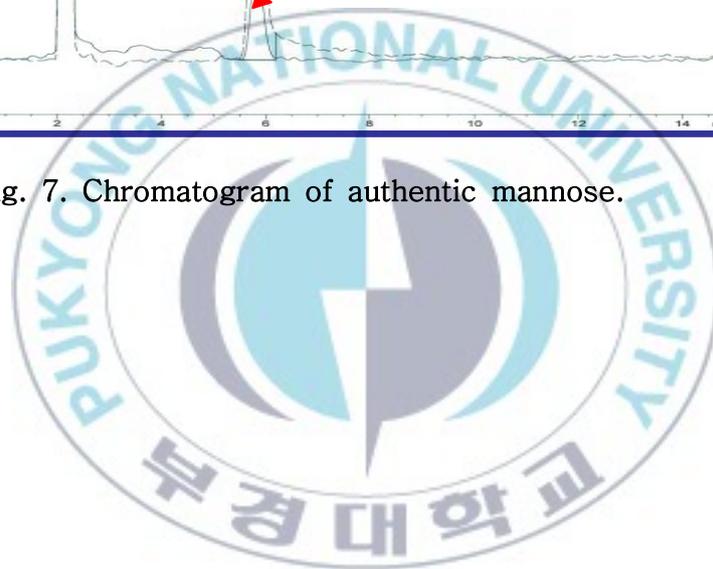
#### 3.1 Mannose의 검량선

초임계 수 가수분해를 이용하여 미역으로부터 회수한 생성물의 단당류의 정성 및 정량분석을 위해 HPLC-RID를 사용하였다. 표준용액은 표품 Mannose, 99.9% (SAMCHUN, Korea)를 Water : ACN (1:1, v/v)에 녹여 HPLC mobile phase로 희석, 100, 500 그리고 1000 ppm의 용액을 조제하여 검량곡선 ( $Y=4E-05x + 0.0019$ ,  $r^2=0.9999$ )을 얻은 후 함량계산에 사용하였다. 초임계 수 당화 생성물의 HPLC 분석 결과 생성된 단당류는 mannose 였으며, 생성물로부터 검출된 Mannose의 크로마토그램과 검량선을 각각 Fig. 7과 Fig. 8에 나타내었다.





Fig. 7. Chromatogram of authentic mannose.



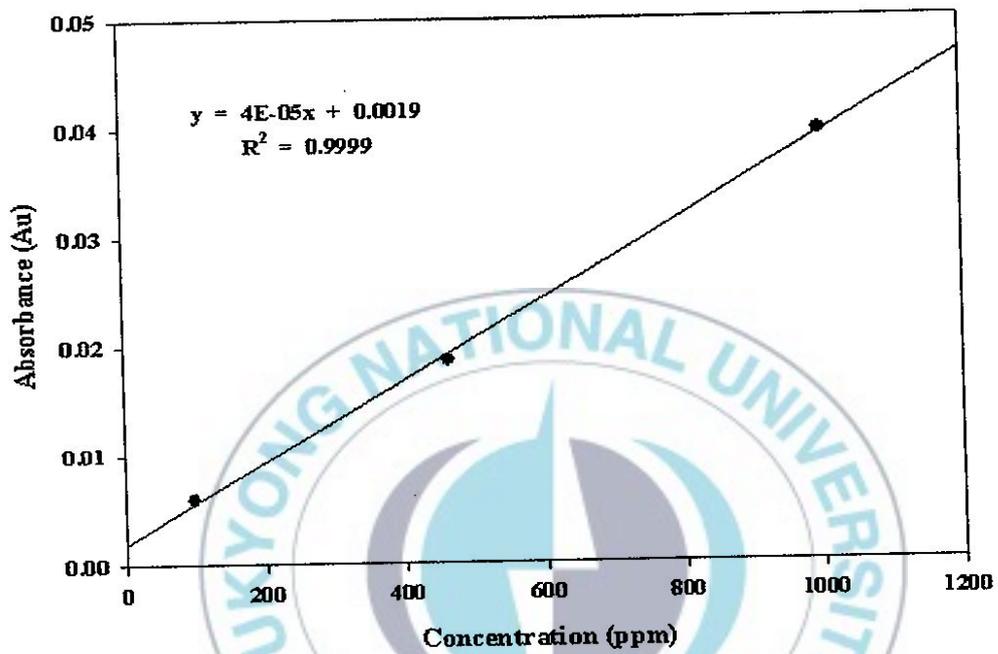


Fig. 8. Calibration curve of mannose.

### 3.2 온도와 압력에 따른 단당류 생성수율의 변화

Table 9와 Fig. 9는 미역의 초임계 수 산화를 이용하여 가수분해를 한 결과이다. 온도와 압력 범위를 각각 180 ~ 374°C, 8.8 ~ 221.1 bar로 설정하여 가수분해 한 후에 HPLC를 이용하여 생성물의 Mannose의 함량을 측정하였다.

Table 9는 Mannose의 함량을 측정한 결과이며, Fig. 9는 미역의 전당을 기준으로 하여 초임계 수 가수분해 조건별 미역의 만노오스 생성 수율의 변화를 나타낸 결과이다.

결과에서 보는바와 같이 아임계 수 영역인 180°C, 8.8 bar부터 초임계 수 영역인 374°C, 221.1 bar로 반응이 진행될수록 mannose 생성 수율은 급속한 증가를 나타내며 초임계 수 반응 조건에서 점점 둔화하는 것을 알 수 있다. 이것은 낮은 점도와 높은 확산계수에서 기인하는 초임계 수의 독특한 물성인 높은 용해력과 물질전달능에 의해 나타난 결과로 사료된다.

또한, 초임계 수 산화의 특징은 높은 물질전달능에 의한 산소와 기질의 활발한 접촉에 있다. 다시 말해 초임계 수 영역의 반응으로 넘어갈수록 기질의 가수분해는 아임계 수 영역의 반응보다 급속하게 진행된다고 볼 수 있다.

한편, 260°C부터 320°C 까지의 가수분해 반응에서 급격한 분해능을 보이는 것은 물의 물성 변화가 급격하게 일어나는 영역에서 기인하는 결과로 판단된다.

이러한 결과를 토대로 초임계 수 산화를 이용한 미역의 당화반응은 알긴산으로부터 단당류인 mannose 생성의 가능성을 보여 주며 물의 임계점(374°C, 221.1 bar)인 초임계 영역에서 반응 종료의 징후가 나타나지 않았으므로, 임계점 이상의 반응 조건

에서 미역의 당화 반응 연구가 더 진행될 필요가 있다고 사료된다.

Table 9. mannose content of products

Temperature (°C)	Pressure (bar)	mg/1g sample
180	8.8	28.97
200	14.3	39.83
220	22.1	69.41
240	32.2	117.09
260	45.7	190.73
280	62.6	267.99
300	83.7	355.52
320	108.5	432.17
340	142.4	464.77
360	183.1	479.86



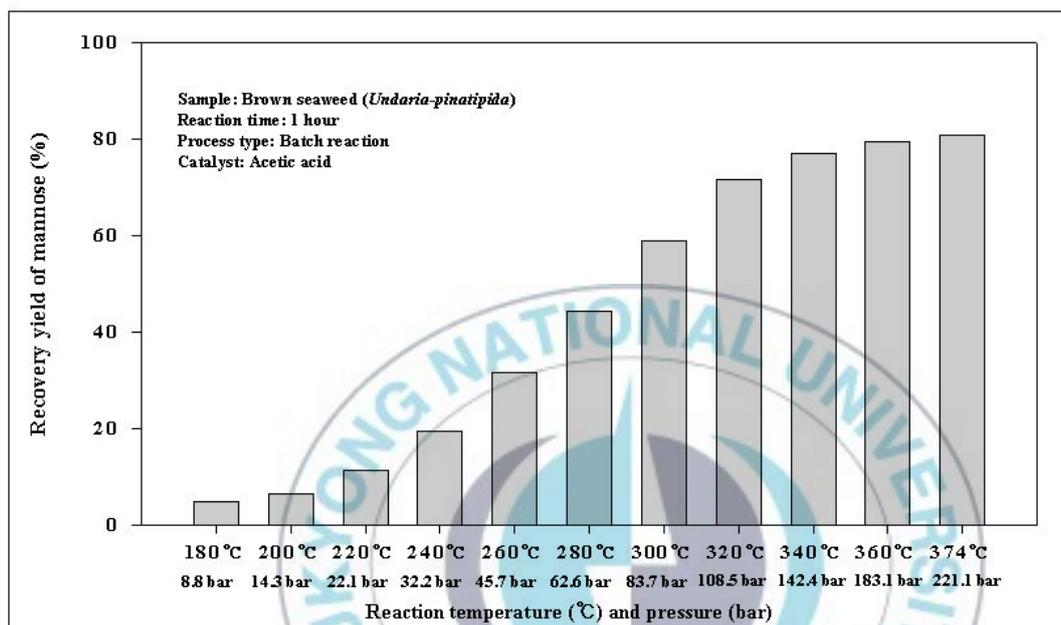


Fig. 9. Recovery yield of mannose from *Undaria pinatifida* by sub- and supercritical water hydrolysis.

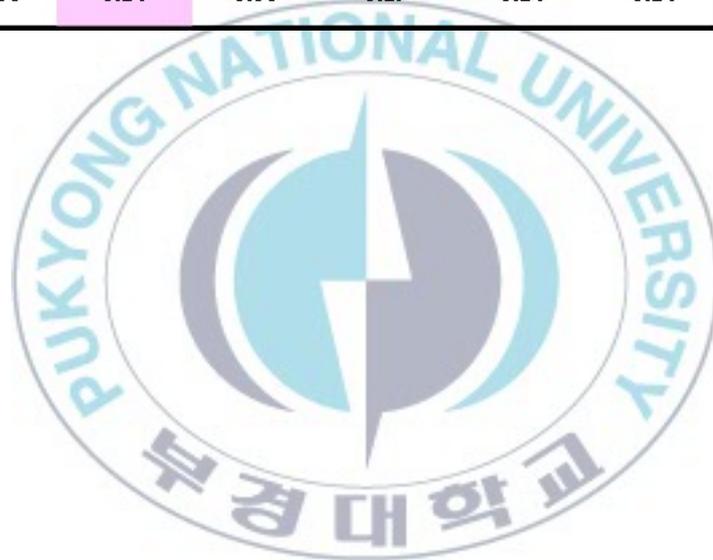
### 3.4 아임계 및 초임계 수 가수분해 물질의 항산화 능

다음은 아임계 및 초임계 수 가수분해물질의 황산화성을 확인 하기 위해 ascorbic acid 의 DPPH 라디칼 소거능과 비교하여 나타낸 결과이다. 280 ℃, 63 bar의 조건에서 생성된 가수분해물의 라디칼소거능이  $94.41 \pm 0.14$ 로서 ascorbic acid 의  $95.62 \pm 0.00$ 에 가장 근접한 결과를 나타내었으며, 미역의 아임계 및 초임계 수 가수분해물질의 항산화 능을 확인할 수 있었다.



Table 10. Comparison of radical scavenging effect between mannose and Ascorbic acid.

temp (°C)	240	280	300	320	340	360	Ascorbic acid
pressure (bar)	32	63	84	109	142	183	
Radical scavenging effect(%)	93.75±0.50	94.41±0.14	93.96±0.00	92.56±0.19	92.56±0.14	93.63±0.14	95.62±0.00

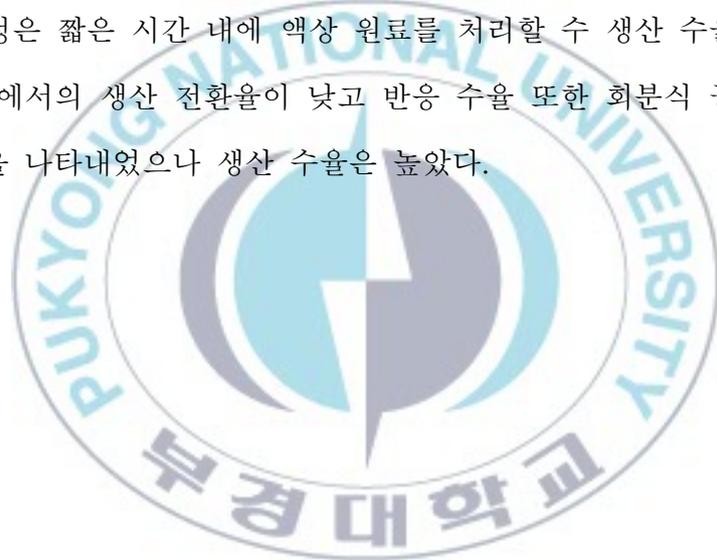


### 3.3 회분식과 연속식 공정에 따른 단당류 생성수율의 비교

다음은 초임계 수 가수분해 회분식과 연속식 공정의 효율성을 알아보기 위하여 해조류인 미역을 회분식 및 연속식 공정에서 가수분해하였고 반응생성물을 분석을 통해 결과를 도출하였으며, 공정 수율 및 효율성을 비교하여 Fig. 10에 나타내었다.

회분식 공정은 고체상 원료를 처리할 수 있으며 생산 전환율이 높으나 처리 시간이 길며 생산 수율이 낮으며 원료 처리량의 한계성을 가진다.

연속식 공정은 짧은 시간 내에 액상 원료를 처리할 수 생산 수율이 높으나 같은 반응 조건에서의 생산 전환율이 낮고 반응 수율 또한 회분식 공정 대비 70%의 반응 수율을 나타내었으나 생산 수율은 높았다.



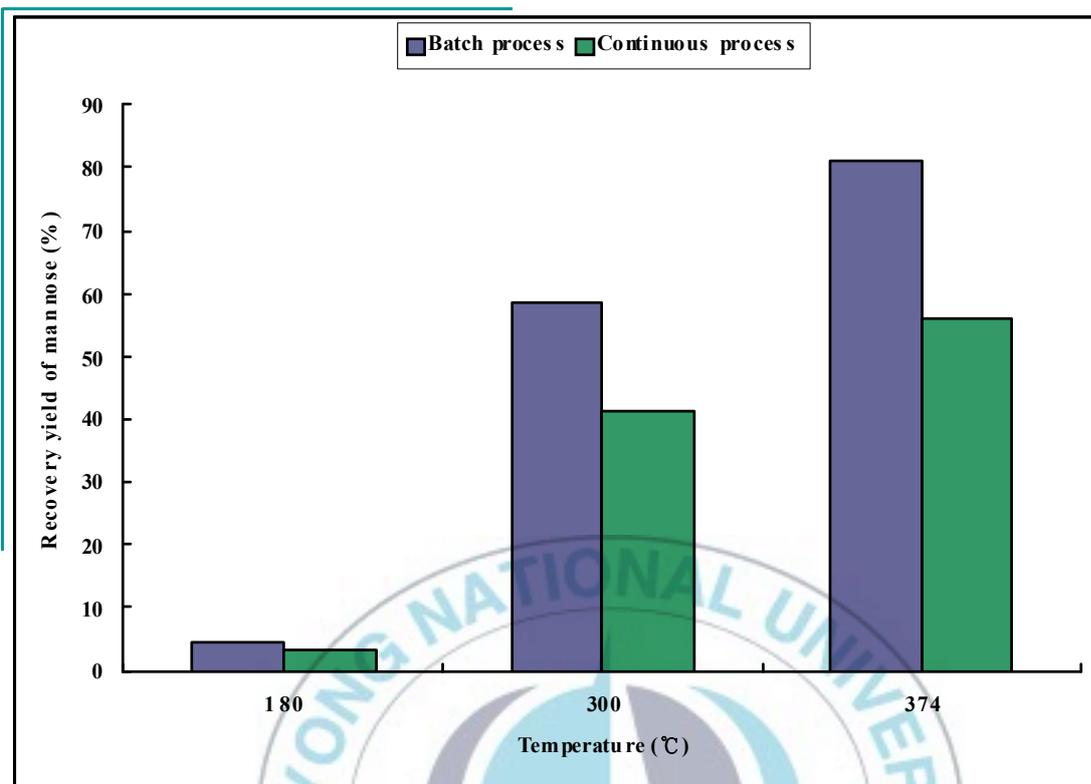


Fig. 10. Comparison of batch and continuous process for production of mannose from *Undaria pinnatipida* by sub- and supercritical water hydrolysis

## 4. 미역의 아임계수 산화를 이용한 가수분해

### 4.1 초임계 이산화탄소 처리가 미역의 가수분해에 미치는 영향

본 실험은 미역의 이취성분을 제거한 시료와 원시료를 아임계 수 가수분해 시 초임계 이산화탄소 처리가 미치는 영향을 알아보기 위해 수행하였다. Fig. 10은 1% 초산을 반응 촉매로 사용하여 반응 온도 200 ~ 260℃, 반응 압력 14.3 bar ~ 45.7 bar 범위에서 아임계 수 가수분해를 이용하여 미역으로부터 아미노산 생산 수율을 나타낸 결과이다.

두 기질 모두 200 ~ 220℃ 반응조건까지 아미노산 생성 수율의 증가를 보였으며, 220 ~ 260℃ 반응조건까지는 지속적인 감소를 보이는 유사한 경향을 나타내었다. 두 기질의 아미노산 생성 수율의 차이는 크지 않았지만 초임계 이산화탄소가 처리된 시료가 원시료에 비해 낮은 수율을 보였다.

이것은 초임계 이산화탄소를 이용한 미역의 이취성분 제거 시 사용된 보조 용매인 ethanol에 의해 미역의 단백질 함량이 감소 된 것으로 사료된다.

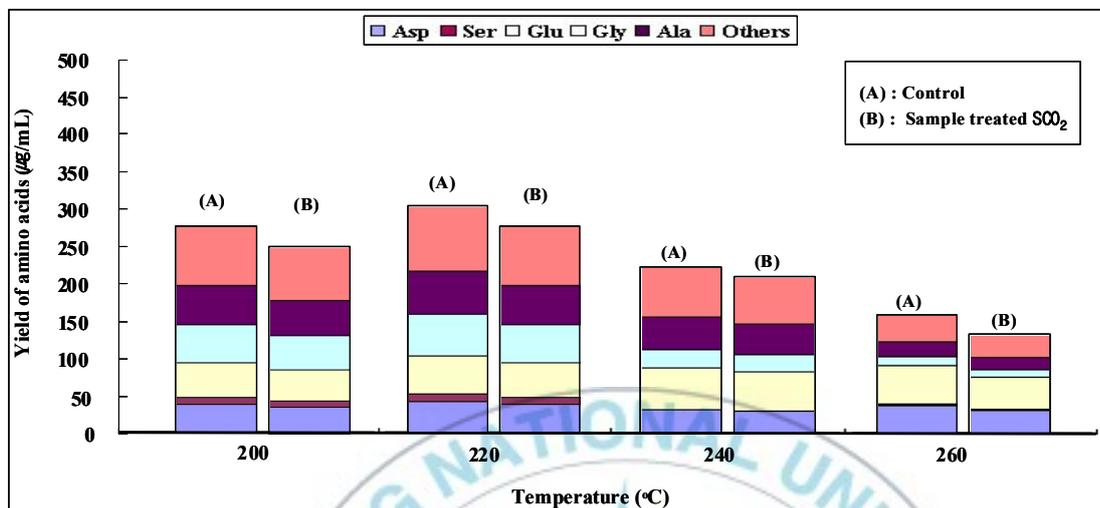


Fig. 11. Comparison of maximum yield and composition of amino acids in non-SCO<sub>2</sub> treated sample and after-SCO<sub>2</sub> treated sample from *Undaria-pinnatifida* by subcritical water hydrolysis.

#### 4.2 미역의 아임계 수 가수분해에 미치는 온도의 영향

Fig. 11은 비 촉매적 미역의 아임계 수 가수분해 반응에서 온도 변화에 따른 아미노산 농도를 분석한 크로마토그램이다. 결과에서 반응 온도가 증가함에 따라 생성되는 아미노산 수율은 감소하였다.

이것은 반응 온도가 증가함에 따른 반응용매인 물의 용해력과 물질전달능력이 증가함에 따라 기질과 산소의 접촉을 활발하게 하여 기질의 산화를 촉진시키는 것으로 사료되며, 또한 아임계 수 가수분해를 이용하여 단백질로부터 아미노산 생성시 반응이 종료 되지 않고 생성된 아미노산은 아임계 수에 의해 지속적으로 산화되어 유기산으로 전환된 것으로 판단된다.

아임계 수 가수분해반응에 의한 아미노산의 생성 및 분해의 예상경로를 Fig. 11에 나타내었다. 미역에 함유된 단백질은 가수분해반응에 의해 아미노산을 생성하며, 생성된 아미노산은 온도 및 반응시간의 증가와 더불어 분해하여 유기산 및 다른 화합물로 전환된다. 이들 화합물은 분해반응이 더 진행되어 최종생성물인 휘발성 탄소나 물로 분해되는 것으로 판단된다.

이러한 연속반응에서 중간 생성물인 아미노산의 효과적인 회수를 위해서는 다른 생성물로 전환되기 이전에 반응의 종결을 필요로 한다.

따라서 반응 종료 후 이러한 부가 반응을 방지하기 위해 반응 온도의 제어가 필수적이라고 볼 수 있으며 아임계 수 가수분해 반응 시 아미노산의 최적 생성 수율을 위하여 더욱 세부적인 반응 온도에 대한 검토가 필요하다고 판단된다.

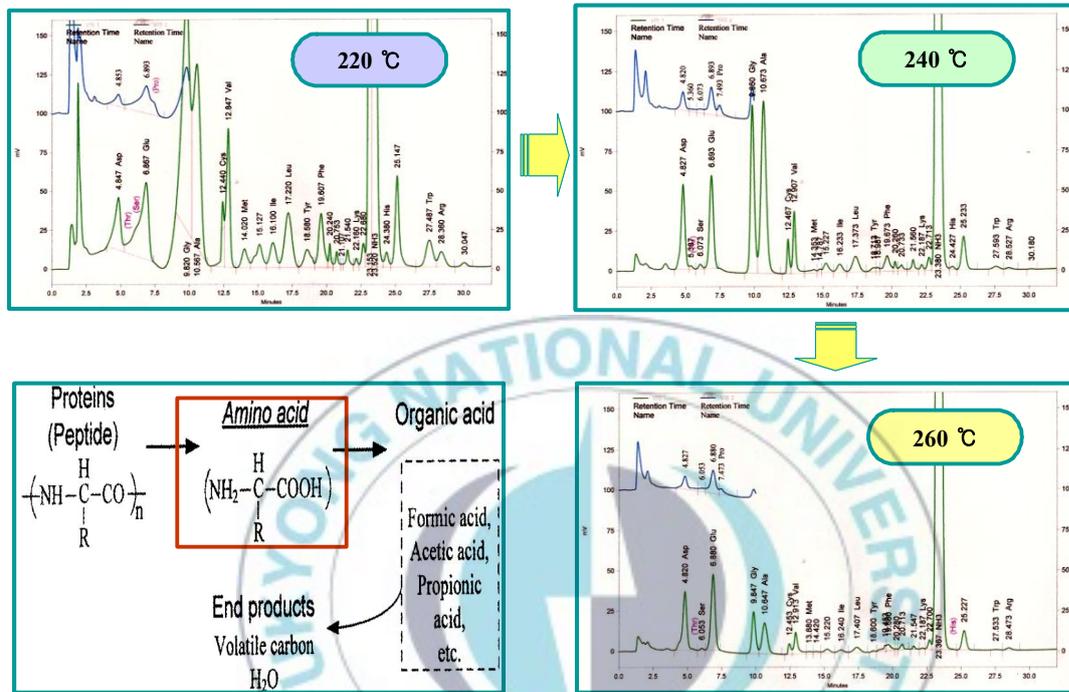


Fig. 12. Effect of temperature on reaction pathway for the production of amino acids from *Undaria pinnatifida*.

#### 4.3 미역의 아임계 수 가수분해에 미치는 촉매의 영향

미역의 아임계 수 가수분해 반응 시 촉매의 영향을 고려하여 촉매적 아임계 수 가수분해와 비촉매적 아임계 수 가수분해를 수행하였다. 일반적으로 가수분해 반응시 촉매의 존재는 반응 속도와 반응 생성율을 높여 결과적으로 반응 효율성을 높여 준다. 아임계 수 가수분해 역시 촉매적 가수분해 반응이 비촉매적 가수분해 반응에 비해 반응 온도가 낮아지며 아미노산 생성 수율 또한 높아져서 보다 효율적으로 가수분해 반응을 이끄는 것으로 나타났으며, 이것은 촉매로 사용된 초산이 아임계 수 산화에서 발생하는 산소의 산화를 활성화 시키기 때문인 것으로 사료된다.



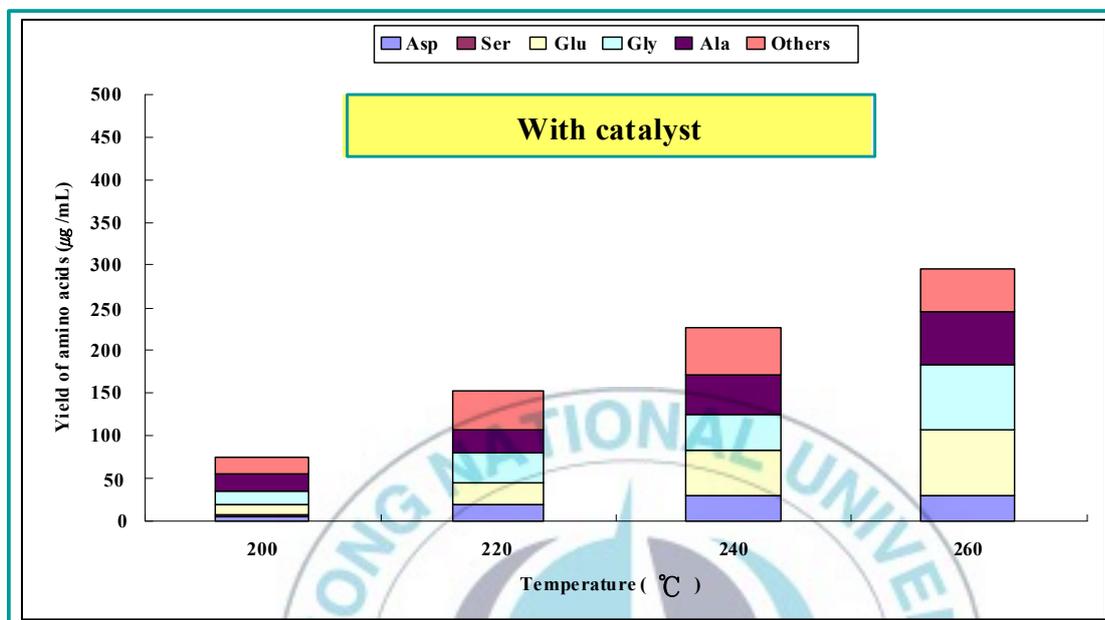


Fig. 13. Amino acids yield with catalyst from *Undaria pinnatifida* by subcritical water hydrolysis in batch process.

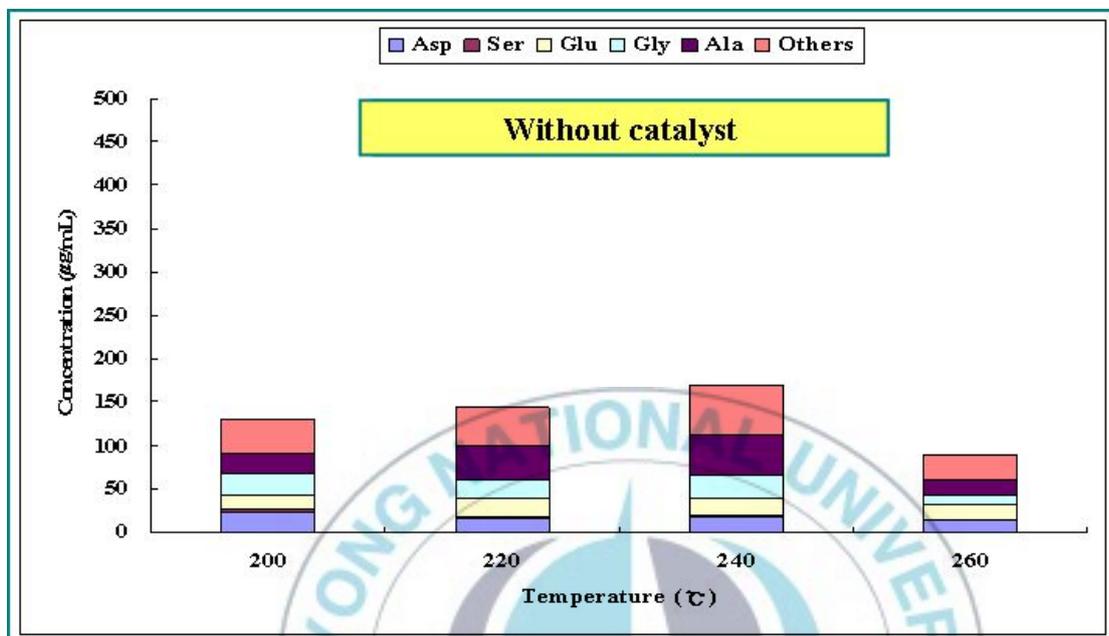


Fig. 14. Amino acids yield without catalyst from *Undaria pinatifida* by subcritical water hydrolysis in batch process.

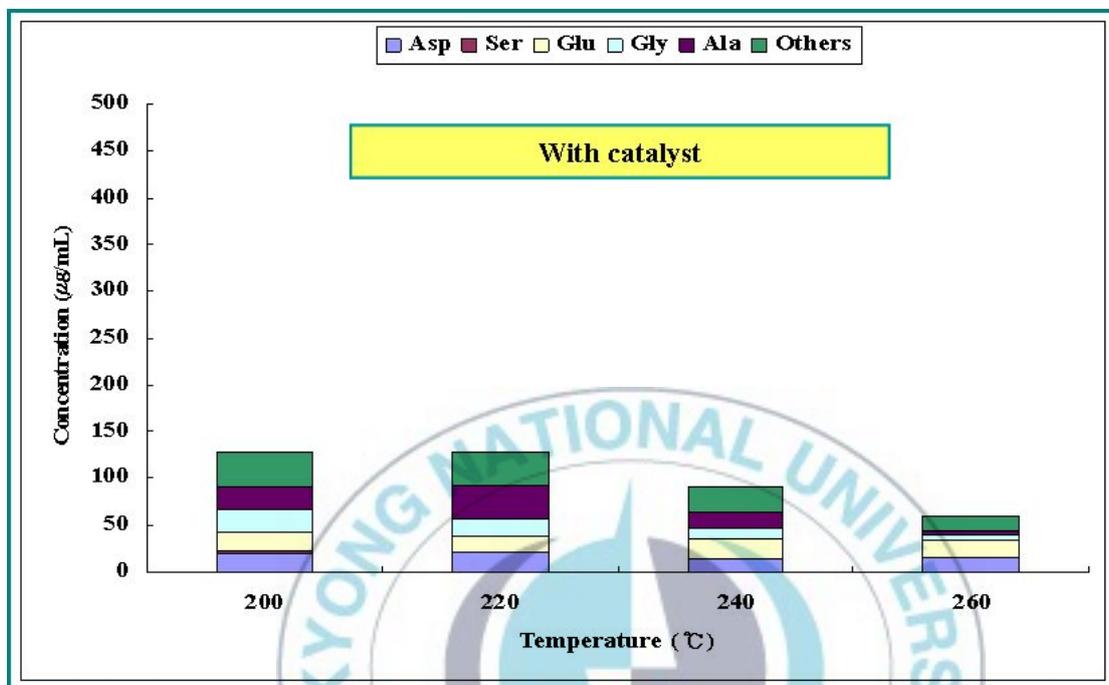


Fig. 15. Amino acids yield with catalyst from *Undaria pinnatifida* by subcritical water hydrolysis in continuous process.

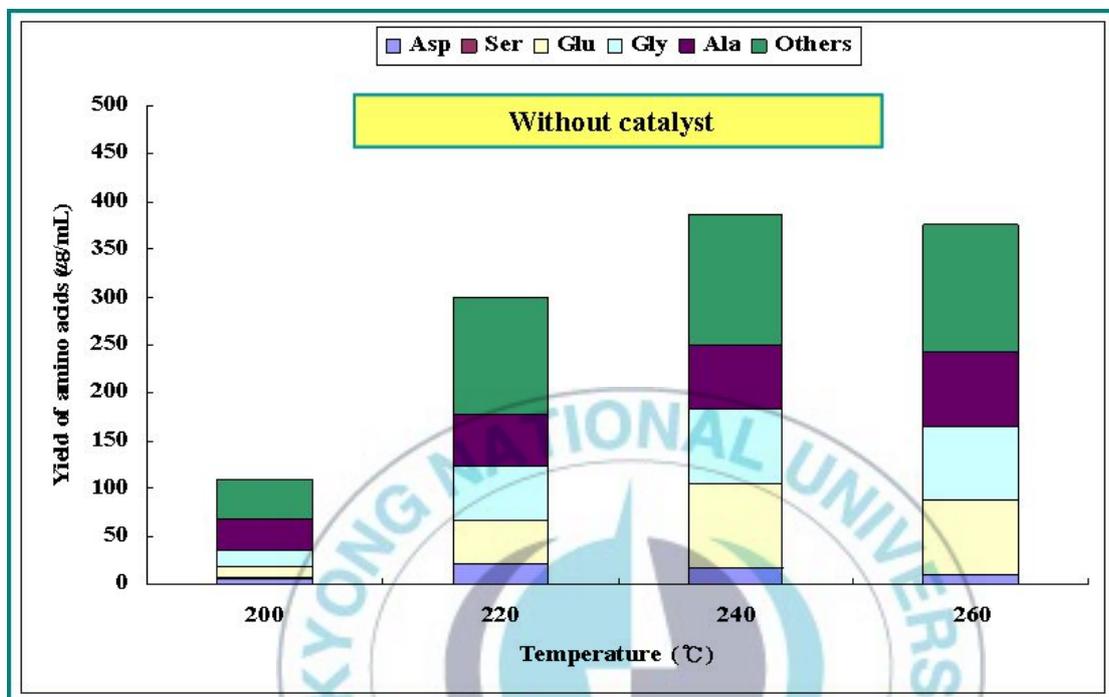


Fig. 16. Amino acids yield without catalyst from *Undaria pinnatifida* by subcritical water hydrolysis in continuous process.

#### 4.4 산 가수분해 및 아임계 수 가수분해능 비교

산 가수분해와 비촉매적 아임계 수 가수분해 그리고 촉매적 아임계 수 가수분해를 이용하여 미역으로부터 아미노산 생성시 회수율을 비교해 보았다 (Fig. 12). 산을 이용하여 미역을 가수분해하였을 경우 아미노산 생성 수율은  $25.32 \mu\text{g/mL}$  로 가장 낮은 수율을 나타내었으며 촉매적 아임계수 반응시 아미노산 생성 수율이  $290.84 \mu\text{g/mL}$  로 산가수분해 반응에 비해 약 10배 가량 높은 생성 수율을 나타내었다.

한편, 비촉매적 아임계 수 반응 역시 아미노산 생성 수율이  $148.95 \mu\text{g/mL}$ 로 산가수분해 반응보다 약 6배 가량 높은 생성 수율을 나타내었으며, 촉매적 가수분해 반응시 보다 약 1/2배 가량 낮은 생성 수율을 나타내었다.

결과적으로 아임계 수를 이용한 미역의 가수분해 반응이 기존의 산 가수분해 보다 반응성이 훨씬 크며, 반응 시간을 크게 단축하여 효율적인 아미노산 생성을 가능하게 함을 확인 할 수 있었다.

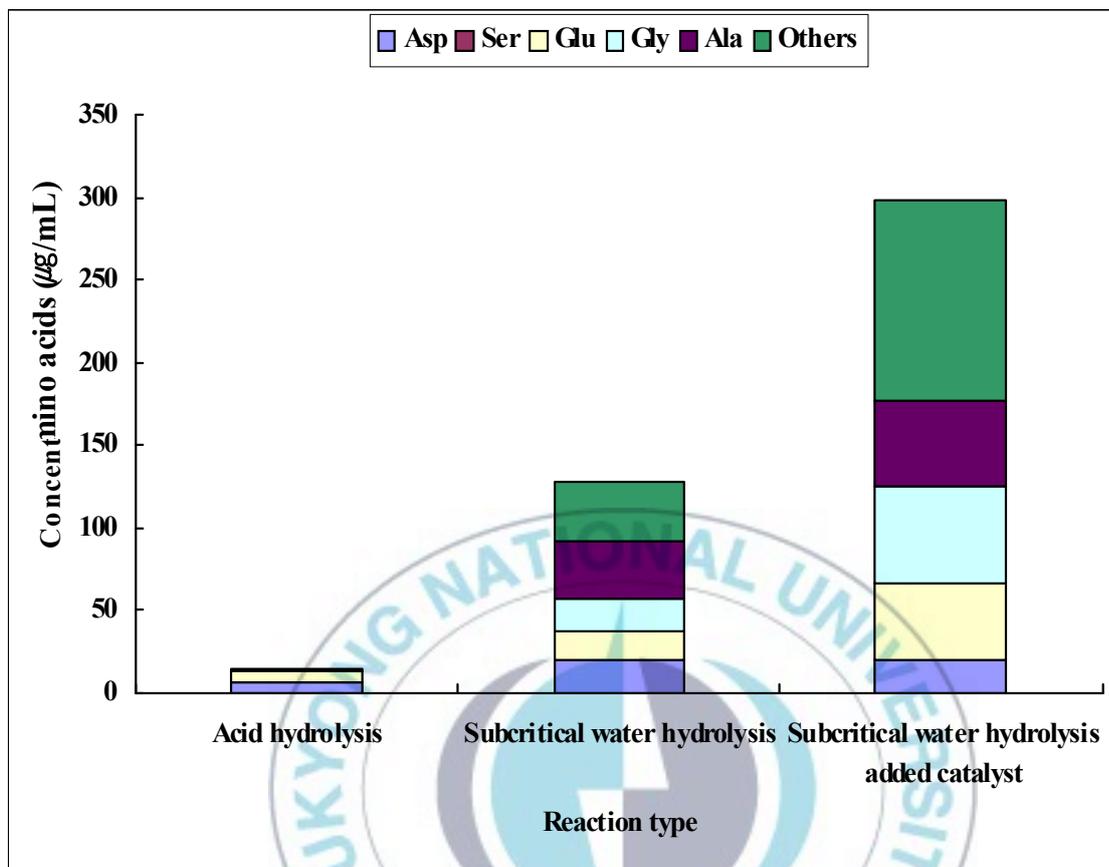


Fig. 17. Comparison of amino acids yield from *Undaria pinnatifida*.

#### 4.5 회분식과 연속식 공정에 따른 아미노산 생성수율의 비교

회분식과 연속식 공정에서 아임계 수 가수분해를 이용하여 미역으로부터 생성된 아미노산의 생성수율을 비교하여 Fig. 14에 나타내었다. 회분식 및 연속식 실험결과 얻어진 아미노산의 조성은 생성된 아미노산의 조성과 확연히 차가움을 알 수 있었다.

회분식 반응조작에서는 Gly, Ala 과 같은 저분자량의 아미노산이 지배적이었으며 연속식 반응조작에서는 Ser, Asp 과 같은 고분자량의 아미노산의 생성이 촉진되었다. 이 결과는 앞에서 언급한 바와 같이 생성된 아미노산이 더욱이 분해하여 유기산이나 다른 휘발성 물질로 전환되기 이전에 반응영역으로부터 연속적으로 제거되어진다는 것을 입증하고 있다.

Gly 은 회분식 반응조작에 비해 연속식 반응조작에서 다소 증가하고 있으나 Ala 의 경우 반대로 감소하고 있음을 보여주고 있다. 이는 회분식 반응기의 경우 설정온도에 도달하는데 온도의 전이효과를 필요로 하며 이 상태가 반응에 영향을 미친 것으로 판단되며 또한 각 아미노산의 분해온도의 차이에 기인하는 것으로 사료된다.

상술한 바와 같이 온도의 아미노산은 생성 및 분해의 연속반응을 수반함과 동시에 온도의 전이효과에도 큰 영향을 받는 것으로 판단된다. 이와 관련해 저분자 및 고분자량의 특정 아미노산의 수율을 향상시키기 위해서는 각 아미노산의 분해온도 및 반응시간에 대한 보다 정확한 검토가 필요할 것으로 사료된다.

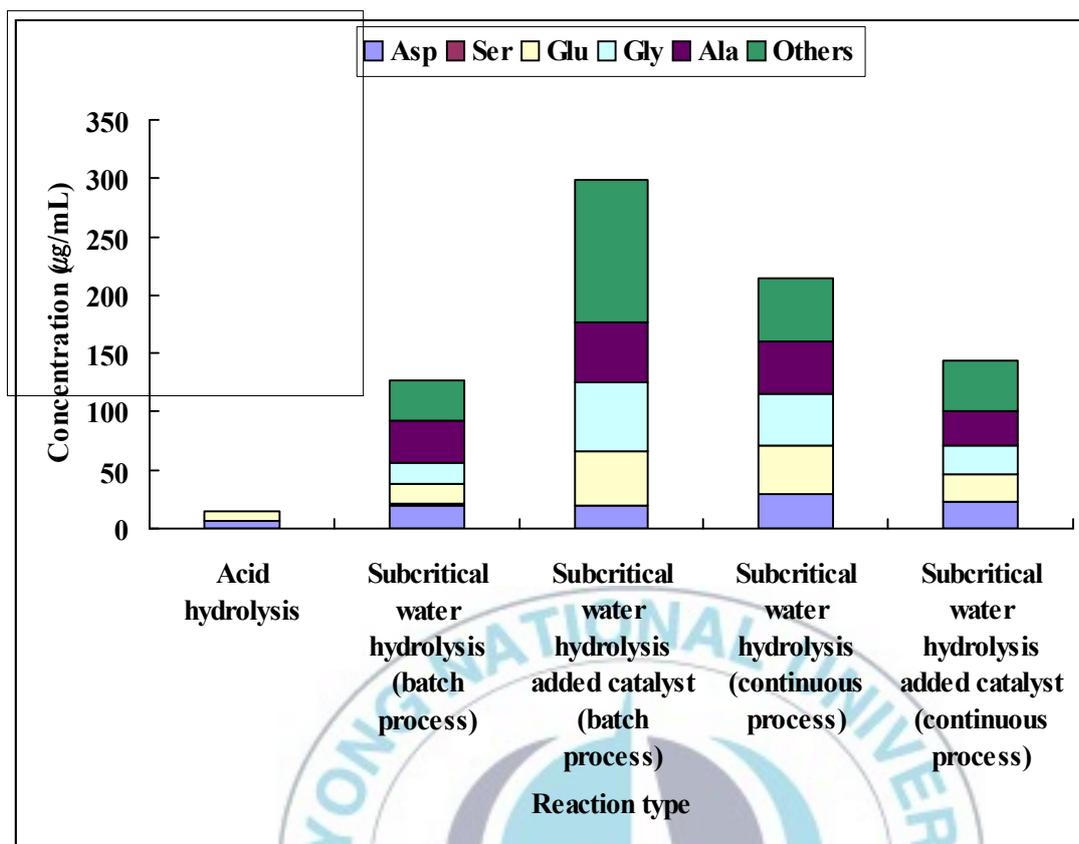


Fig. 18. Comparison of batch and continuous process for production of amino acids from *Undaria pinnatipida* by subcritical water hydrolysis

## 결론 및 요약

본 연구에서는 아임계 및 초임계 수 산화를 이용하여 미역을 가수분해 시키고 생성된 Mannose와 아미노산은 각각 HPLC-RID와 Amino acid analyzer를 이용하여 정성 및 정량 분석을 수행하였다. 미역의 아임계 및 초임계 수 가수분해에 영향을 주는 주요 실험변수로는 반응온도, 반응압력, 촉매, 기질의 초임계 이산화탄소 처리 등을 변화 시켜 보다 안정적이고 효율적인 최적의 mannose 및 아미노산 생산 조건을 고찰하였으며 결론은 다음과 같다.

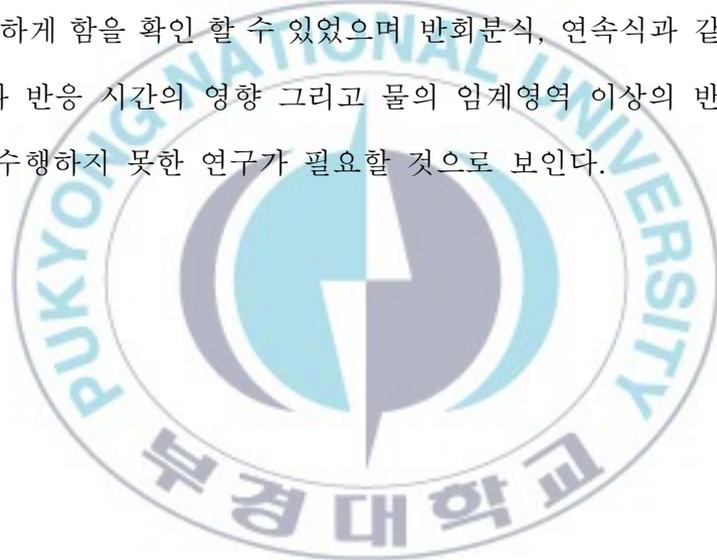
1. 미역의 주요 성분인 알긴산은 가수분해 되어 광학 이성질체인 D-Mannose 와 L-Mannose 로 분해되며 이러한 단당류는 중화과정 및 발효과정을 거쳐 바이오 에탄올 생산의 자원으로 사용될 수 있으며, 미역 단백질의 아미노산 조성은 동물성 단백질의 아미노산 조성과 거의 유사하며 영양적 가치도 뛰어나 바이오식품 소재로서 활용도가 매우 높다.
2. 미역으로부터 생산된 mannose 의 최고 생산수율은 347°C, 221 bar 에서 488 mg/1g sample 이었고 반응용매인 물의 아임계 수 영역부터 초임계 수 영역으로 진행 될수록 급격한 증가율을 나타내었으며 물의 임계점 부근에 이르면서 정점 둔화하였다. 하지만 반응 종료가 나타나지 않았으므로, 임계점 이상의 반응 조건에서 미역의 당화 반응 연구가 더 진행될 필요가 있다고 사료된다.

3. 미역의 이취성분을 제거한 시료와 원시료를 아임계 수 가수분해 시 두 기질 모두 200 ~ 220℃ 반응조건까지 아미노산 생성 수율의 증가를 보였으며, 220 ~ 260℃ 반응조건까지는 지속적인 감소를 보이는 유사한 경향을 나타내었다. 두 기질의 아미노산 생성 수율의 차이는 크지 않았지만 초임계 이산화탄소가 처리된 시료가 원시료에 비해 낮은 수율을 보였다. 이것은 초임계 이산화탄소를 이용한 미역의 이취성분 제거 시 사용된 보조용매인 ethanol 에 의해 미역의 단백질 함량이 감소된 것으로 사료된다.

4. 비 촉매적 미역의 아임계 수 가수분해 반응에서 온도 변화에 따른 아미노산 농도는 반응 온도가 증가함에 따라 감소하였다. 이것은 반응 온도가 증가함에 따른 반응용매인 물의 용매력과 물질전달능력이 증가함에 따라 기질과 산소의 접촉을 활발하게 하여 기질의 산화를 촉진시키는 것으로 사료되며, 또한 아임계 수 가수분해를 이용하여 단백질로부터 아미노산 생성시 반응이 종료되지 않고 생성된 아미노산은 아임계 수에 의해 지속적으로 산화되어 유기산으로 전환된 것으로 판단된다. 따라서 반응 종료 후 이러한 부가 반응을 방지하기 위해 반응 온도의 제어가 필수적이라고 볼 수 있으며 아임계 수 가수분해 반응시 아미노산의 최적 생성 수율을 위하여 더욱 세부적인 반응 온도에 대한 검토가 필요하다고 판단된다.

5. 산을 이용하여 미역을 가수분해하였을 경우 아미노산 생성 수율은 25.32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  로 가장 낮은 수율을 나타내었으며 촉매적 아임계수 반응 시 아미노산 생성 수율이 290.84  $\mu\text{g}/\text{mL}$  로 나타났으며, 비촉매적 아임계수 반응 역시 아미노산 생성 수율이 148.95  $\mu\text{g}/\text{mL}$  로 산가수분해 반응보다 높은 생성 수율을 나타내었다.

결과적으로 아임계 및 초임계 수 산화 공정은 미역의 당화반응과 미역단백질로부터 아미노산 회수에 적합한 친환경 공정으로서 미역의 가수분해 반응이 기존의 가수분해 공정보다 반응성이 우수하며, 반응 시간을 단축하여 효율적인 단당류 및 아미노산 생성을 가능하게 함을 확인 할 수 있었으며 반회분식, 연속식과 같은 공정에서의 적용 가능성과 반응 시간의 영향 그리고 물의 임계영역 이상의 반응 효율등 향후 본 연구에서 수행하지 못한 연구가 필요할 것으로 보인다.



## 참 고 문 헌

- 김길환, 1990, 미역의 수용 확대를 위한 종합적 가공 기술 개발, 한국식품개발연구원보고서, p.9-58.
- 김길환, 김창식. 1983. 미역김의 제조와 이화학적 특성에 관한 연구 -제 2보 : 미역김의 조성. Korean J. Food Sci. Technol. Vol 15, No. 3, 277-281.
- 오창경, 오명철, 김성홍, 임상빈, 김수현. 1998. 미역과 다시마 에탄올 추출물의 항돌연변이 및 항균효과. J. Korean Fish. Soc. 31(1), 90-94.
- 한봉호, 배태진, 김병삼. 1984. 염장미역의 가공 및 저장조건과 chlorophyll의 안정성. Korean J. Food Sci. Technol. Vol. 16, No. 1, 107-113.
- 최희숙, 김상순, 김종균, 김우정. 1992. 미역 추출액의 품질 특성에 미치는 온도의 영향. Korean J. Food Sci. Technol. Vol 24, No 4, 382-386.
- Kuda, T., Tsunekawa, M., Goto, H., & Araki, Y. (2005). Antioxidant properties of four edible algae harvested in the Noto Peninsula, Japan. Journal of Food Composition and Analysis, 18(7), 625-633.
- Chandini, S. K., Ganesan, P., & Bhaskar, N. (2008). In vitro antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. Food Chemistry, 107(2), 707-713.
- Draget, K. I., Bræk, G. S., & Smidsrød, O. (1994). Alginic acid gels: the effect of alginate chemical composition and molecular weight. Carbohydrate Polymers, 25(1), 31-38.
- Anitescu, G., Zang, and L. L. Tavlarides, 1999, A kinetic study of

- methanol oxidation in supercritical water. *Ind. Eng. Chem. Res.* 38, 2231-2237.
- Brunner, G. 1988. Extraction of caffeine from with supercritical CO<sub>2</sub>, Proc. Int. Symp. on Supercritical Fluids, 2, 691.
- Choi, J. W., Lim, H. J., Han, K. S., and Choi, D. H., 2006, Thermo-chemical Conversion of poplar Wood to Monomeric Sugars by Supercritical Water Treatment, *Mokchae Konghak*, 34(6), 44-50.
- Goto, M., T. Nada, S. Kawajiri, and A. Kodama, 1997, Decomposition of municipal sludge by supercritical water oxidation, *J. Chem. Eng. Japan* 30, 813-818.
- Kang, K. Y., and Chun, B. S., 2003. Production Behavior of Amino acid from High temperature and High Pressure Water Reaction of Fish Entrails. *Korean J. Biotechnol. Bioeng*, 18(6), 495-499.
- Koo, B. W., Lee, J. W., Choi, J. W., Choi, D. H., and Choi, I. G, 2006, Supercritical Water Hydrolysis of Waste Logs after Oak Mushroom Production, *Mokchae Konghak*, 34(6), 81-95
- Martino, J. C. and P. E. Savage, 1999. Oxidation and thermolysis of methoxy-, nitro-, and hydroxy-substituted phenols in supercritical water, *Ind. Eng. Chem. Res.* 38. 1784-1791.
- Xian ZHU, Chao ZHU, Liang ZHAO, Hongbin CHENG, Amino Acids Production from Fish Proteins Hydrolysis in Subcritical Water, *Chinese Journal of Chemical Engineering*, Volume 16, Issue 3, June

2008, Pages 456-460

Issara Sereewatthanawut, Surawit Prapintip, Katemanee Watchiraruji, Motonobu Goto, Mitsuru Sasaki, Artiwan Shotipruk, Extraction of protein and amino acids from deoiled rice bran by subcritical water hydrolysis, *Bioresource Technology*, Volume 99, Issue 3, February 2008, Pages 555-561

R. W. Shaw, T. B. Brill, A. A. Clifford, C. A. Eckert and E. U. Franck, Supercritical water a medium for chemistry. *Chem. Eng. News*, 12, 26 (1991).

Sabina, P., M. Kjill, and O. Kjetill. 1999. Quantitative determination of chitosan by ninhydrin. *Carbohydr. Polyme.* 38:115-122.

Friedrich, J. P., G. R. List, and A. J. Heakin (1982) Petroleum-free extraction of oil from soybeans with supercritical CO<sub>2</sub>. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 59: 288-292.

Perakis, C., V. Louli, and K. Magoulas (2005) Supercritical fluid extraction of black pepper oil. *Journal of Food Engineering*, 71: 386-393.

Macias-Sanchez M. D., C. Mantell, M. Rodriguez, E. M. de la Ossa, L. M. Lubian, and O. Montero (2007) Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Synechococcus* sp. *J. of Supercritical Fluids*. 39: 323-329.

Chrastil, J. (1982) Solubility of solids and liquids in supercritical gases. *J. Phys. Chem.* 86: 3016-3021.

Schlesier, K., M. Harwat, V. Bohm, and R. Bitsch (2002) Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. Free Radical Research. 36: 177-187.



## 감사의 글

먼저 석사과정동안 새로운 학문을 할 수 있도록 많은 지도와 관심을 가져 주시고 끝마칠 수 있도록 끝까지 든든한 버팀목이 되어 주신 전 병수 교수님께 감사의 마음을 전하고 싶습니다. 또한, 바쁘신 와중에도 귀중한 시간을 내주시어 논문에 대한 충고를 해 주신 김선봉 교수님, 안동현 교수님께도 감사드립니다.

그밖에도 지난 2년간의 석사시절동안 많은 가르침을 주신 식품공학과 이근태 교수님, 조영제 교수님, 이양봉 교수님, 양지영 교수님, 김영목 교수님께 감사의 마음을 전합니다.

실험을 할 때나 논문을 쓸 때 곁에서 많은 아이디어와 조언을 주신 한정호, 강길운 박사님과 현덕, 현석, 상규, 호 형 그리고 실험실 인원들에게 감사의 마음을 전합니다.

그리고, 기쁨과 슬픔을 같이 나누며 많은 힘이 되어 주었던 친구 재현, 상윤, 성신 그리고 후배들 특히 병욱, 선애 에게 고마움을 전합니다.

타향에서 고생하며 공부하면서도 언제나 도움과 격려를 해 준 박사과정 Salim 과 Abdel 에게도 고마움을 전합니다.

끝으로 힘들 때 마다 언제나 큰 힘과 희망이 되어준 존경하는 부모님, 동생 대균이 그리고 나 때문에 고생 많이 한 혜진이 에게 깊은 감사의 마음을 전합니다.

2009년 2월

盧明均