

工學碩士 學位論文

초임계 이산화탄소를 이용한 돼지채장의 지질추출
및 α -Amylase 활성 측정에 관한 연구

指導教授 全 炳 秀



2002年 2月

釜慶大學校 大學院

食 品 工 學 科

權 赫 秀

權赫秀의 工學碩士 學位論文을 認准함

2001年 12月 26日

主 審 農學博士 양 지 영



委 員 工學博士 안 동 현



委 員 工學博士 전 병 수



목 차

Abstract	1
서 론	3
재료 및 방법	8
1. 재료 및 시약	8
2. 실험방법	8
2.1. 초임계 이산화탄소 추출장치	8
2.2. 초임계 이산화탄소 추출장치를 이용한 추출방법	9
2.3. 돼지 채장의 일반성분 분석	10
2.4. 초임계 CO ₂ 추출 후 추출물의 분석	13
2.4.1. 지방산 분석	13
2.4.2. Cholesterol의 함량분석	13
2.4.3. α -Amylase 활성측정	16
2.4.4. 효소 역가 측정	16
2.5. 초임계 CO ₂ 에 의한 돼지 채장내의 지질 제거 실험	18
2.5.1. 동결 건조된 채장 원료로부터 지질제거	18
2.5.2. 초임계 이산화탄소와 보조용매를 사용한 지질제거 실험	18
결과 및 고찰	21

1. 초임계 CO ₂ 에 의한 지질 제거 효율	21
1.1. 온도변화에 따른 추출효율	21
1.2. 압력변화에 따른 추출효율	21
1.3. 유량변화에 따른 추출효율	22
1.4. 시료입자에 따른 추출효율	22
2. 초임계 CO ₂ 에 의해 추출된 추출물의 효소 활성 측정	27
2.1. 초임계 CO ₂ 에 의한 효소 활성 측정	27
2.1.1. 온도 변화에 따른 효소 활성	27
2.2.2. 압력 변화에 따른 효소 활성	27
2.2. 초임계 CO ₂ 에와 보조용매에 의한 효소 활성 측정	30
2.2.1. 보조용매 Ethanol에 의한 효소 활성	30
2.2.2. 보조용매 Hexane에 의한 효소 활성	30
2.2.3. 시료 입자 크기 변화에 따른 효소활성	30
3. 초임계 CO ₂ 에 의해 추출된 추출물의 성분분석	35
3.1. 지방산 분석	35
3.2. 콜레스테롤 분석	35
3.3. 돼지채지방의 효소 역가 비교	35
4. 초임계 CO ₂ 추출 후 추출 물질의 효소 역가 측정	39
결론 및 요약	43
참 고 문 헌	45

The Study of Hog Pancreas Lipids Extraction by Supercritical CO₂ and α -Amylase Activity

Hyuk-Soo Kwon

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

Abstract

Generally pancreas consist of lipid, water, protein and digestion enzyme complex such as protease, lipase, amylase. The sample used in this work was frozenly dried and treated by a semi-batch flow type. In order to develop a supercritical fluid extraction process to remove lipid from the pancreas, experiments were conducted at various operating conditions pressure range 10~19 MPa, temperature range 25~40℃, particle size 0.25~1.0 mm, flow rate 20~80 ml/min. The highest extraction efficiency was pressure of 17 MPa, temperature of 35℃, particle size of 0.25 mm and flow rate of 40 ml/min. The enzyme activity of the pancreas produced by this work showed high value

compared with raw pancreas frozen dried.

The activity of the enzyme was determined after removing lipid in sample using by SC-CO₂ and co-solvent. Ethanol and hexane were used as a co-solvent, respectively. When the ethanol was used, the lipid was removed in 40 min. However, when the hexane was used as a co-solvent, it was removed in 90 min. Therefore, the ethanol was more desirable than the hexane as a co-solvent because of higher extraction efficiency.

The activity of sample remained after extraction (pressure of 17 MPa and temperature of 40°C) without using a co-solvent was 32,691 FIP. Its activity was as high as 7987 FIP than the raw sample (24,704 FIP). When the ethanol was used as a co-solvent, the activity of sample was rapidly decreased. However, in the case of hexane, the activity of sample was 39,106 FIP at flow rate of 3 ml/min.

FIP is enzyme activity and 1 FIP is determined by hydrolyzing substrate of equivalent weight of 1 μ in 1 minute. Although extract efficiency of lipid by ethanol was higher than hexane due to extracting lipid as well as some protein, an activity of enzyme was lower because parts of protein remained was removed together lipid by ethanol as a co-solvent. Therefore, hexane was more desirable than ethanol as a co-solvent. After Supercritical Fluid Extraction, activity of amylase, protease and lipase in residual was 1.6 times higher than that of frozen dried pancreas.

서 론

동물 도축장에서 배출되는 돼지 췌장에는 소화효소(아밀라제, 리파아제, 프로테아제)가 다량 함유되어 있으므로 최대한 효소의 활성을 떨어뜨리지 않기 위해 신속하게 1차 수거하여 동결건조 한 후 분쇄기로 일정 크기의 입자로 분쇄한다. 분쇄된 건조 췌장은 초임계 추출 공정에서 여러 가지 실험조건에 의해 처리되어 가장 수율이 뛰어나고 효소의 활성이 높은 실험 조건에서 생산된다. 여기서 생산된 원료는 소화효소제인 판크레이틴의 주요성분으로 작용되어 고부가가치의 약품으로 생산되어 제공된다.

생리 활성 단백질의 하나인 효소는 단백질과 다른 물질과의 복합체로 특이한 화학구조로 구성되어 있으며, 생물체 내에서 다양한 생화학반응을 유발 및 촉진시키는 촉매작용을 한다. 효소가 촉매로서의 기능적 역할은 효소 단백질의 구조에 의존하며, 주변 환경으로 인한 단백질의 변성은 구조의 변화를 초래하여 효소의 기능을 상실한다. 효소의 함량은 동, 식물의 종류와 생육과 배양조건에 따라 매우 다르다. 따라서 효소의 함량이 많은 종류의 물질을 선택하여 정제하는 것이 바람직하다. 특히 동물췌장(Animal Pancreas)에는 소화 효소제인 α -아밀라아제, 프로테아제, 리파아제의 함량이 풍부하여 소화 효소관련 의약품 원료로 적합하다. 국내 의약품 규격에 의거한 소화효소 원료인 판크레이틴은 카제인(Casein)을 분해시키는 프로테아제(protease, 1,267 FIP/g), 전분을 분해시키는 알파-아밀리아제(α -Amylase, 24,000 FIP/g), 지방산을 분해시키는 리파아제(Lipase, 30,667 FIP/g)가 주요 성분으로 구성되어 있다. 여기서 FIP는 1분 동안에 1마이크로 당량을 특정 물질을 분해시키는데 필요한 효소의 양을 1 FIP 효소 역가 단위를 뜻한다. 현재 전량 수입되고 있는 원료의 효소 소화력은 α -Amylase(27,160 FIP/g), Lipase(31,370 FIP/g), Protease(1,630 FIP/g) 이상을 나타내고 있으며(김 등, 1996 ; 하 등, 1998), 매년 이 원료를 사용하는 의약품의 종류와 사용량이 증가 추세에 있다. 판크레이틴은 돼지의 췌장으로부터 추출, 정제한 효소로 부형제를 첨가해서 만든 것으로 전

분소화력, 단백소화력 및 지방소화력을 가지고 있는 복합소화효소(Adachi M 등, 1998)이다. 이 효소는 사람의 소화효소와 아주 유사한 성질을 가지고 있으며, 체외로부터 섭취한 음식물 중에는 3대 영양소(탄수화물, 단백질, 지방), 비타민, 염류 등이 포함되어 있다. 이러한 영양소의 대부분은 그대로 체내에 흡수되는 것이 아니라 소화관을 통과하는 사이에 소화효소에 의해 분해되고 흡수 가능한 형태로 바뀌게 된다. 췌장소화효소의 최적 pH는 전분소화력은 8부근에서, 단백소화력은 7~9부근, 지방소화력은 7부근이다(Jacobs H 등, 1997). 돼지췌장에는 소화 효소제인 α -아밀라아제(Uchiyama K 등, 1995), 프로테아제(Suh, M 등, 1973), 리파아제(Kwak 등, 1990)의 함량이 풍부하여 소화 효소관련 의약품 원료로 적합하다. 최근 의약품 원료로 사용되고 있는 소화 효소는 전량 수입에 의존하고 있고, 그 수요가 매년 증가 추세에 있으며 사용되는 용도가 다양하다. 그러나 분리 및 정제 과정에서 불순물 혼입과 산화, 현원에 의한 효소의 불활성은 효소의 불안정성과 효소의 역가 상승을 억제시키므로 동물체장으로부터 효소의 분리 및 정제 공정 기술이 중요하다(Kwon and Jang 등, 1991). 일반적으로 알려진 열수 추출법(Kim 등, 1990 ; Paradossi G 등, 1999)과 중성염 추출법은 용매의 회수에 대한 어려움이 따른다는 단점과 그 외의 다른 용매 추출법 또한 순도 및 용매회수를 높이기 어렵다. 따라서 초임계 유체를 사용한 분리 기술이 최근 새로운 분리공정기술로 이 분야에 대한 연구가 기초과학적인 연구의 측면과 산업적 응용 면에서 매우 중요한 분야로 이에 관한 연구가 매년 증가 추세에 있다.

초임계 유체의 추출에 대한 연구는 1960년대 초기부터 독일소재의 Max Planck Institute를 중심으로 시작되어, 1970년대부터 연구가 활발하게 진행되었다. 초임계 유체는 기존의 재래식 분리공정에 비해 많은 장점을 가지고 있어 화학적 구조의 변화 없이 기체와 액체의 특성을 공유하면서 뛰어난 용매력을 제공할 뿐만 아니라 온도와 압력을 적당히 조절함으로써 상변화 없이 물리·화학적 특성(밀도, 확산계수, 점도)을 연속적으로 조절이 가능한 유체라고 볼 수 있어(McHugh, M.A. 등, 1986 ; Paulaitis, M.E. 등, 1982) 이와 같은 유체를 사용한 특정 물질의 분리, 정제 및 추출공정, 고분자 물질의

처리기술 등의 관련 산업분야에서 관심을 갖게 되었고(Kwiakowski, J. 등, 1984), 최근에는 화학, 의약품, 식품, 생화학 분야 등에서 널리 이용되어지고 있어(McHugh, M.A 등, 1994 ; Brunner, G. 등, 1988 ; King, M.B 등, 1993 ; Palmer, M.V. 등, 1995) 그 응용범위가 점차 확대되어 일부는 시용 공정이 확립된 상태에 이르렀다. 특히 천연물에서 유기용매를 이용한 재래식 추출공정은 고온에 의해 유효성분의 분해 및 파괴 등이 문제가 되고, 적절한 유기 용매의 선택, 유기용매의 잔존, 용매의 제거 및 낮은 분리효과 등의 어려움이 있는 반면에 초임계 유체 추출은 임계점 이상의 영역에서 다양한 조업조작이 가능하며, 확산계수가 높고, 점도가 낮아 빠른 추출효과와 상분리가 가능하여 열에 민감한 물질에 유용하다(Chrastil, J. 등, 1982 ; De Filippi, R. P. 등, 1982). 또한 초임계 유체 추출은 압력 또는 온도 변화에 의하여 밀도가 크게 변하여(Chrastil J. 등, 1982 ; Arne Staby and Horgen Mollerup, 1993) 용질의 추출 효율 및 성분이 다르기 때문에 중소형 plant의 간단한 공정과 처리량이 작은 특수한 유지 등의 물질을 선택적으로 분리할 수 있기 때문에 새로운 분리공정으로써 최근 몇 년간 전 세계적으로 연구가 활발히 이루어지고 있다. 그러나 현재까지 여러 분야에서 초임계 유체를 이용한 많은 연구가 진행되어 왔지만 물리적 현상의 이해 부족으로 추출과정에 대한 전달 mechanism을 규명하지는 못했으며, 초임계 추출에 대한 추출속도에 대한 고찰 및 추출 속도에 영향을 미치는 연구(Chun, B. S. 등, 1995a ; Chun, B. S. 등 1995b) 자료가 부족하다. 국내 기술 현황을 살펴보면 1980년대 중반 초임계 이산화탄소(Supercritical Carbon Dioxide)를 사용한 추출 공법이 처음으로 국내에 소개되어 주로 화학공학분야의 연구자들이 깊은 관심을 가졌다. 고압에서 수행되는 이 추출 공정은 기존의 유기용매 추출법에서 야기되는 문제점들을 극복할 수 있는 장점을 보유하고 있음에도 불구하고 값비싼 장치 설비비의 단점으로 인하여 지속적인 연구 수행에 어려움을 가져왔다. 초임계 추출 기술을 이용하여 천연물질로부터 Essential Oil, Flavor 등(G. Della Porta, R. Taddo, E. D'Urso and E.Reverchon 등, 1998)을 추출한 결과가 일부 대기업과 대학의 공동 연구를 통하여 발표되었다. 1990년대에 국가 경제성장과 더불어 국내의 공학도

들이 이미 이 분야의 기술이 축적된 북미, 유럽, 일본, 호주 등의 선진국에 진출하여 여러 분야(화학공업, 식품공업, 의약품공업, 환경공업 등)에 대한 지식과 정보를 습득하여 현재 국내에서 활발한 연구를 진행하고 있으나, 산업화하기 위해서는 추출조건과 추출물질의 구조 및 형상에 따라 다양한 설계가 요구되므로 응용분야에 대한 연구가 요구된다. 최근 여러 분야에 대한 기초 연구 결과들이 도출 및 산업체로부터 독창성 있는 신제품 개발에 대한 논의가 있음에도 불구하고 현재 국내 산업분야에 상업화가 된 것은 없다. 국외 기술 현황을 보면 가압 가스를 사용하여 혼합물질로부터 특정성분 분리 공정의 적용 분야는 주로 화학공업, 식품공업, 의약품공업, 향료공업, 환경공업 등으로 지금까지 많은 특허가 출원되었으나, 그 중 최초 상업화에 큰 성과를 이룬 것은 Kurt Zosel 등에 의해 개발된 Green Coffee로부터 Caffein을 제거한 기술(Kurt Zosel 등, 1974)로 최근 국내 시장에도 무카페인 커피가 대부분의 시장을 점유하고 있다. 미국에서의 가압 가스를 이용한 응용 분야는 대부분 화학공업, 식품공업 분야로 알콜 농축, 천연물질로부터 Essential Oils 추출에 대한 기술이 개발되어 왔다. 최근 독일에서는 가압 가스를 사용하여 천연물질에 존재하는 생리활성 물질, 기능성 물질 추출과 의약품 정제 공정에 적용되어 상업화에 성공을 거두었다. 또한 프랑스에서는 초임계 이산화탄소를 사용하여 천연 물질로부터 자연 향기성분을 추출하여 화장품 산업 발전에 크게 기여하고 있다. 그 외의 선진국(영국, 호주, 일본, 이탈리아 등)에서도 가압 가스를 사용한 분리 공정 기술에 대한 활발한 연구와 결과가 도출되고 있다. 매년 ISASF(International Society for the Advanced of Supercritical Fluids)에 의해 개최되는 초임계 국제학술회의는 300여 편의 새로운 논문이 발표되어 이론과 기술에 대한 활발한 정보가 교환되어 오고 있다. 본 연구에서는 전량 폐기되고 있는 식품 부산물인 돼지 채장을 이용하여 지질 추출 및 효소활성을 높일 수 있어 의약품 원료로의 활용이 가능하며, 의약품 원료 수입 대체 효과가 있으며 무엇보다도 폐기물의 재활용에 의한 환경 보존 효과가 큰 점을 감안하여 초임계 이산화탄소와 보조용매를 사용하여 돼지채장에 존재하는 지질 및 콜레스테롤을 추출하고 효소활성을 높이는데 있어서 추출 속도에 영

향을 주는 인지들을 변화시켜 고찰하고 추출된 물질의 지방산 분석 및 추출 후 추진물의 α -amylase 활성을 측정하여 고순도 효소의 생산에 관한 기초자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료 및 시약

본 과제에서 사용한 돼지채장 원료는 2000년 4월 부산광역시 시하구 소재 (주)비이넥스에서 제공받아 동결 건조시킨 후 Size 별로 파쇄를 한 후 냉·암소에서 보관하여 추출용 시료로 사용하였다. 주 용매인 이산화탄소는 순도 99% 이상의 식품용인 것을 사용하였으며, 보조용매로는 95% Ethanol과 N-Hexane을 사용하였다. 그 외의 분석 및 전처리 시 사용된 시약은 분석용 1급 시약을 사용하였다. 추출물의 지방산 분석은 lipid standard(fatty acid methyl ester mixture : Sigma, 189-19)를 사용하여 비교하였으며, 콜레스테롤 분석은 cholesterol standard (cholesterol, standard for chromatography 99% in purity : Sigma Chem. Co., USA)를 사용하여 분석하였다.

2. 실험방법

2.1. 초임계 이산화탄소 추출장치

초임계 이산화탄소를 사용하여 동결 건조하여 분쇄된 시료로부터 지질 및 콜레스테롤 추출에 대한 흐름 공정은 다음과 같다. 반응기는 내경 2.9cm, 150ml 용량인 고압용 stainless steel을 사용하였고, 흐름 line은 1/4"와 1/8"의 stainless steel pipe(316ss)를 사용하였다. 액체 이산화탄소로부터 용매를 초임계 압력으로 변환시키는 고압펌프는 51.4MPa의 용량을 가진 Milton Roy Pump는 반응기로 유입되는 이산화탄소의 유량을

정량적으로 pumping하였고, 고압 상태로 반응기에 들어가고 나오는 초임계 이산화탄소의 온도는 digital temperature measuring(Wavetek사, model No : 461-112020)에 의해 측정되었으며, 반응기의 압력은 정확도가 높은 Heise Gauge($\pm 0.14\text{MPa}$)에 의해 측정되었다. 보조용매 pump는 Solvent Delivery Pump(Young-lin scientific Co., model No : 930)을 사용하였다. System 내의 압력은 2개의 Back pressure regulator로 조절하였고, 반응기 내의 미세한 압력은 metering valve와 needle valve로 조절하였다. 반응기 내에 충전된 시료로부터 지질을 수반하여 반응기로부터 나오는 초임계 이산화탄소의 흐름공정은 초임계 이산화탄소와 지질을 분리하는 separator, 압력을 조절하는 metering valve와 needle valve로부터 나오는 유체의 큰 압력 변화로부터 발생하는 열을 제거하기 위한 열교환기, 반응기에 유입되는 초임계 이산화탄소의 사용량을 측정하는 flow meter(Sinagawa사, model No : DC-2A)로 구성되어있다.

2.2 초임계 이산화탄소 추출장치를 이용한 추출방법

본 실험에 사용된 초임계 추출 장치는 Fig. 1에 나타내었다. 장치 운전 방법은 포화압력 상태인 이산화탄소가 cylinder로부터 냉각기(-20°C)를 통과하여 이산화탄소 내에 존재하는 기포가 제거된 후 고압 metering pump에 의해 일정한 유량으로 유입되어 system내의 설정 압력까지 수행되어진다. 고압펌프로부터 반응기에 유입되기 전에 추출 용매로 작용하는 이산화탄소는 설정된 추출 온도에 따라 항온수조에 의해 예열되어진 후 반응기 내의 온도는 thermocouple에 의해 감지되어 추출온도를 결정하였다. System 내의 전체 압력은 2개의 압력 조절기를 부착시켜 순간 압력변화로 인한 system내의 추출 조건 변화를 방지하였으며, 고압 pump와 압력 조절기 앞에 7micron filter를 설치하여 추출이 진행되는 동안 용매 이산화탄소와 고체 시료 입자에 의한 system의 흐름이 중단되는 것을 방지하였고, safety value를 부착시켜 system내의 excess pressure를 제거하였다. 또한 실험 종료 후 system내의 고압으로 인한 압력의 역류로 인한 고압펌프

의 손상을 방지하기 위하여 고압펌프 출구에 check value를 설치하였다. 초임계 이산화탄소는 반응기 내의 시료로부터 지질을 추출하여 낮은 압력 상태로 분리기내에 유입되어 용제와 용매가 쉽게 분리되었으며 이때 이산화탄소는 압력 팽창으로 용매력을 소실하여 포화압력보다 낮은 상태로 응축기를 통과하면서 액체상태의 이산화탄소가 되어 압축펌프로 유입되어 재사용 되어진다.

2.3. 돼지 채장의 일반성분 분석

시료의 일반성분의 분석을 위하여 수분은 상압가열법, 지방은 개량 Soxhlet 법, 단백질은 Micro kjeldahl 법으로 측정한 결과를 Table 1에 나타내었다. 동결 건조된 돼지채장내의 초기 수분함량은 1g씩 각각 5개의 페트리 디쉬에 넣어 105℃ 항온건조기에서 4시간 방치한 후 돼지 채장의 무게를 칭량 하였고, 초임계 이산화탄소로 추출된 원료의 수분 함량은 적외선 수분함량 측정기로 측정하였다. 동결 건조된 돼지채장내의 초기 지질함량과 초임계 이산화탄소 추출 후의 원료의 지질 함량은 용매 노르말 헥산을 사용하여 속실텟 장치로 18시간 동안 지질을 추출하여 측정하였다. 동결건조 후 돼지 채장내의 초기 수분함량은 약 5 wt%, 초임계 추출 후에는 약 2 wt%의 수분 함량을 나타내었다. 동결건조 후 돼지 채장내의 초기 지질함량은 약 32~38 wt%, 초임계 추출 후에는 3 wt% 범위였다. 노르말 헥산으로 동결 건조된 돼지채장내의 콜레스테롤 함량을 추출한 것과 초임계 이산화탄소에 의해 추출된 콜레스테롤 함량을 비교하였고, 분석은 GC로 하였다.

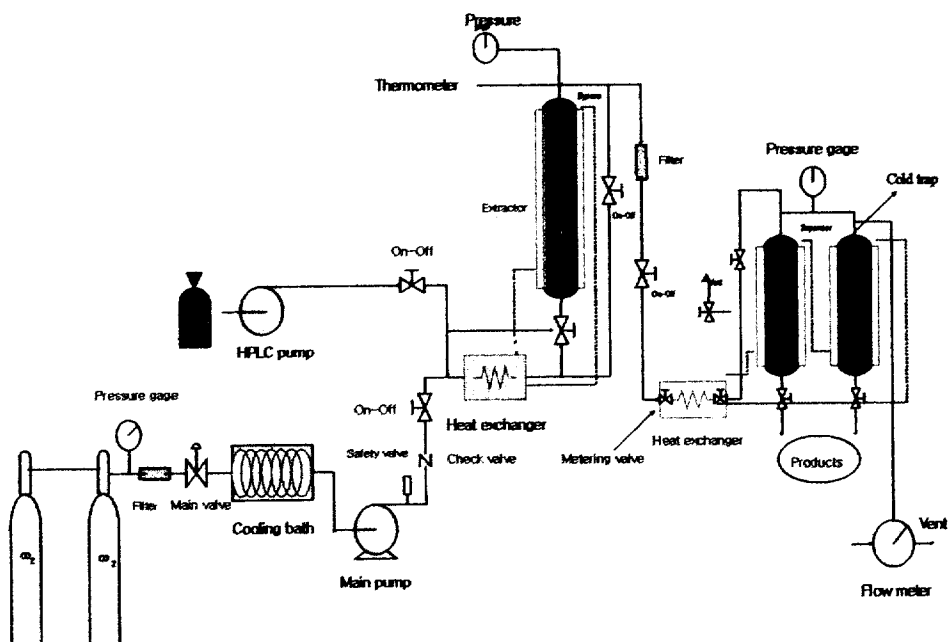


Fig. 1. Schematic diagram of supercritical fluid process.

Table 1. An ingredients analysis of Hog pancreas

Moisture content(%)			Lipid content(%)		Protein content(%)	
before frozen dried	after frozen dried	after SFE	before SFE	after SFE	before SFE	after SFE
73	5	2	32~38	3	52	70

※ SFE : Supercritical fluid extraction

2.4. 초임계 CO₂ 추출 후 추출물의 분석

2.4.1. 지방산 분석

AOAC법에 의해 추출된 시료에 0.2g을 환류냉각관이 장착된 둥근 플라스크에 칭량한 후 0.5N NaOH in methanol을 6ml 가하여 100℃에서 중탕한다. 10분 후 10% BF₃ in methanol(Fluka Co.) 7ml를 가한다. 5분 후 6ml의 N-Hexane을 가하여 2분간 방치 후 이 액을 분액여두에 옮긴 후 포화 NaCl 용액 2ml를 가하여 30초간 흔든 후 방치한다. 상층액을 분리하여 놓아두고, 하층액은 N-Hexane으로 추출해 낸 다음 상층액과 합하여 물로 씻어낸 다음 물을 제거한 후 anhydrous sodium sulfate로 물을 확실히 제거한 후 1μl를 Table 2와 같은 조건으로 gas chromatography(Hewlett Packard 5890 II)에 주입하여 표준물질(lipid standard : fatty acid ester mixture : Sigma, 189-19)의 peak와 비교하여 지방산 조성을 분석하였다.

2.4.2. Cholesterol의 함량분석

지방산 분석의 경우와 같이 추출된 시료 0.2g을 methyl ester화시킨 후 1μl를 Table 3과 같은 조건으로 gas chromatography(Hewlett Packard 5890 II)에 주입하여 표준물질(Cholesterol : Aldrich, 36, 279-4)과 내부표준물질(5α-cholestane : Sigma, 481-21-0)의 peak와 비교하여 cholesterol을 분석하였다.

Table 2. Operation condition of gas chromatography for analysing the fatty acid composition of total lipid in pancreas.

Item	Operation condition
Instrument	Hewlett Packard 5890 II
Column	HP-Innowax (fused crosslinked polyethylene glycol capillary column, 30 x 0.32mm L.D., 0.15 μ m film thickness, Hewlett Packard)
Carrier gas	N ₂ 1mL/min
Split ratio	64 : 1
<Temperature>	
Detector (FID)	300°C
Injector	250°C
<Oven temp. profile>	
150°C, hold 10min ; increase 3°C/min to 201°C, hold 12min ; increase 3°C/min to 201°C, hold 15min	

Table 3. Operation condition of gas chromatography for analysing the cholesterol in pancreas

Item	Operation condition
Instrument	Hewlett Packard 5890 II
Column	Ultra-1(crosslinlinked methyl siloxane, 25m×0.2mm I.D., 0.33 μ m film thickness, Hewlett Packard)
Carrier gas	N ₂ 2ml/min
Split ratio	30:1
<Temperature>	
Detector(FID)	300℃
Injector	250℃
<Oven temperature profile>	
160℃, hold 1min ; increase 20℃/min to 200℃, hold 1min ; increase 10℃/min to 300℃, hold 5min	

2.4.3. α -Amylase의 활성측정

α -Amylase의 활성을 측정하기 위해 E. P.(유럽약전)법과 K. T.(한국약전)법에 의해 실험을 행한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 실험에 사용된 시약은 가용성 전분(기질로 사용)과 1/15M 인산염 완충액(pH 6.8), 0.2M 인산염 완충액(pH 6.8), 0.2M 염화나트륨, 1N 염산액, 0.1N 요오드액, 0.1N 수산화나트륨용액, 20% 황산액, 그리고 0.1N 치오황산나트륨(적정액)이 사용되었다. 검액 시험은 항상 교반하면서 행하였다. 먼저 기질로 사용되는 가용성전분용액 25ml에 0.2M 인산염 완충액(pH 6.8) 10ml와 0.2M 염화나트륨 1ml를 첨가하여 고무마개를 막고, 25℃로 유지하였다. 그 후 검액 1ml를 온도 유지하여 첨가하여 교반을 10min 하였다. 그리고 반응을 정지시켜 1N 염산액 2ml를 가하였다. 0.1N 요오드액 10ml와 0.1N 수산화나트륨용액 45ml를 첨가하여 암소에서 15분간 방치시킨다. 이 후 20% 황산액 4ml를 가하고 0.1N 치오황산나트륨 용액으로 적정하였다.

2.4.4. 효소 역가 측정

실험조건 압력 13.6 MPa, 온도 40℃, 입자크기 0.71mm의 시료에서 보조용매를 처음 20분간은 Hexane을 5ml/min 첨가하여 지질을 제거한 후 이후부터는 Ethanol을 7 ml/min 첨가하여 지질 이외 기타 잔존하는 성분들을 추출한 후 그 추출물의 효소 역가를 측정한 결과 3.027의 FIP로 낮은 값을 나타내었다. 그리고, 실험조건을 압력 17 MPa, 온도 40℃, 입자크기 0.71mm의 시료에서 보조용매를 처음 20분간은 Hexane을 10ml/min 첨가하여 지질을 제거한 후 이후부터는 Ethanol을 10 ml/min 첨가하여 지질 이외 기타 잔존하는 성분들을 추출한 다음 그 추출물의 효소 역가를 측정한 결과는 11.375 FIP의 값을 나타내었다.

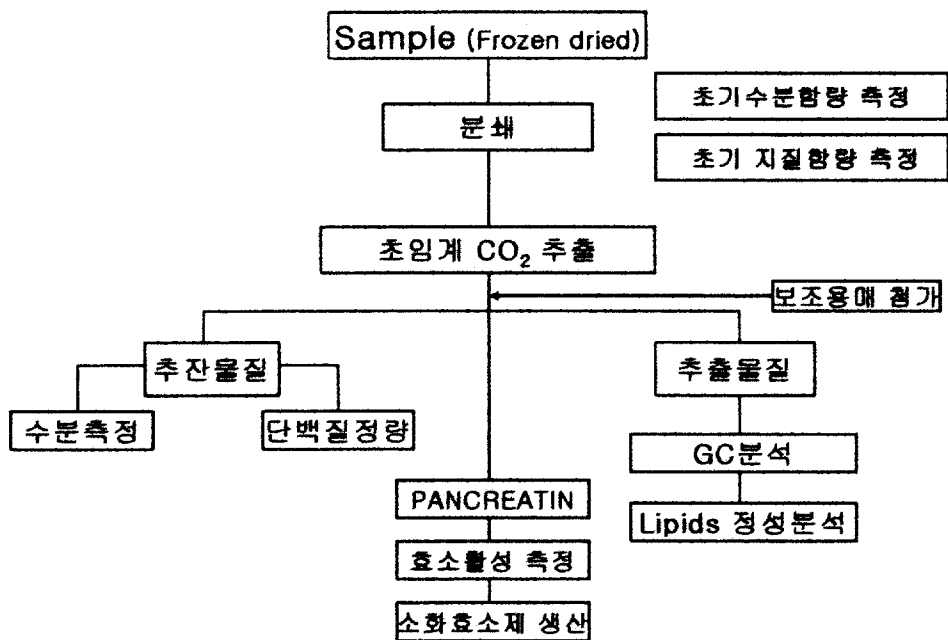


Fig. 2. Schematic diagram of Experiment.

2.5. 초임계 CO₂에 의한 돼지 채장내의 지질 제거 실험

2.5.1. 동결 건조된 채장 원료로부터 지질제거

본 실험에 따른 이산화탄소의 유속은 33.8 ml/min, 시료입자크기 0.71mm의 지질을 추출하지 않은 동결 건조된 채장 원료 40g를 사용하였으며 압력과 온도는 각각 17 MPa 과 40℃로 하여 120분간 추출 실험을 행한 결과이다(Fig. 3). 초기 지질이 18%로 많은 양을 차지하고 있어 시간이 지남에 따라 지질의 추출량이 점점 증가함을 알 수 있었다.

2.5.2. 초임계 CO₂와 보조용매를 사용한 지질제거 실험

본 실험에서는 이산화탄소의 유속을 26.8 ml/min, 시료입자크기를 0.71mm의 동결 건조된 채장 원료 40g를 사용하였으며 압력과 온도를 17 MPa, 40℃에서 Ethanol과 Hexane의 유량을 5 ml/min으로 90분간 실험을 행한 결과이다(Fig. 4) 앞의 결과에서 주 용매를 이산화탄소만 사용한 것과 비교해 보면 보조용매 Ethanol을 사용하였을 때 추출 시간이 2배정도 감소함을 알 수 있었다. 이 결과로 알 수 있는 것은 보조용매로 사용된 Ethanol에 의해 초임계 유체의 밀도가 변화하여 추출상의 용질분자가 용매 분자와 작용을 하여 용해도를 증가시킨 결과라 할 수 있다. 그리고 같은 시료에 보조용매를 주입한 결과와 비교해 보면 Ethanol을 사용했을 때에는 추출시간이 40분 경에 대부분의 지질이 추출되었지만, Hexane을 보조용매로 사용한 경우는 추출시간과 추출량이 비례적으로 증가되었으며 추출시간 90분에 대부분의 지질이 추출되는 것을 알 수 있었다. 이로 보아 Ethanol이 보조용매로 Hexane 보다 더 적합함을 알 수 있었다.

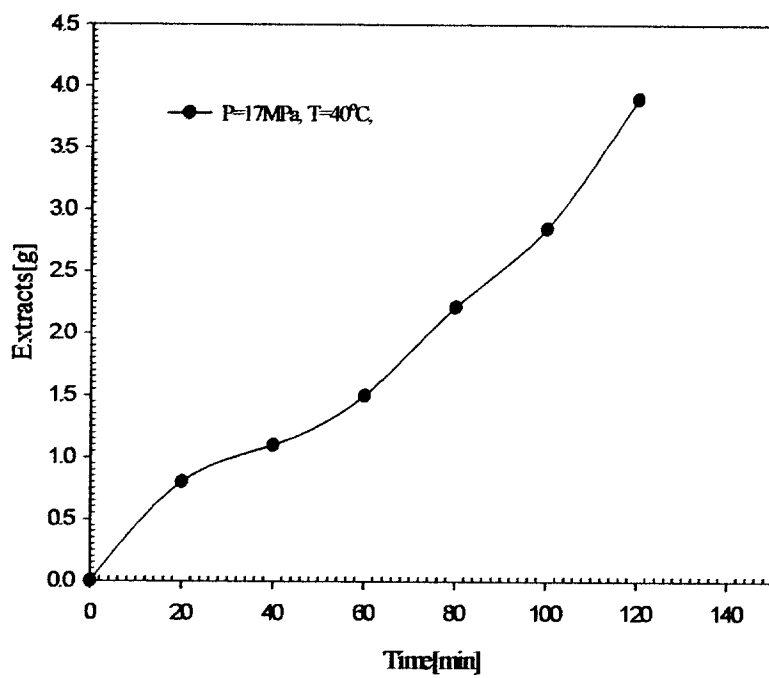


Fig 3. Extraction efficiency of raw material.

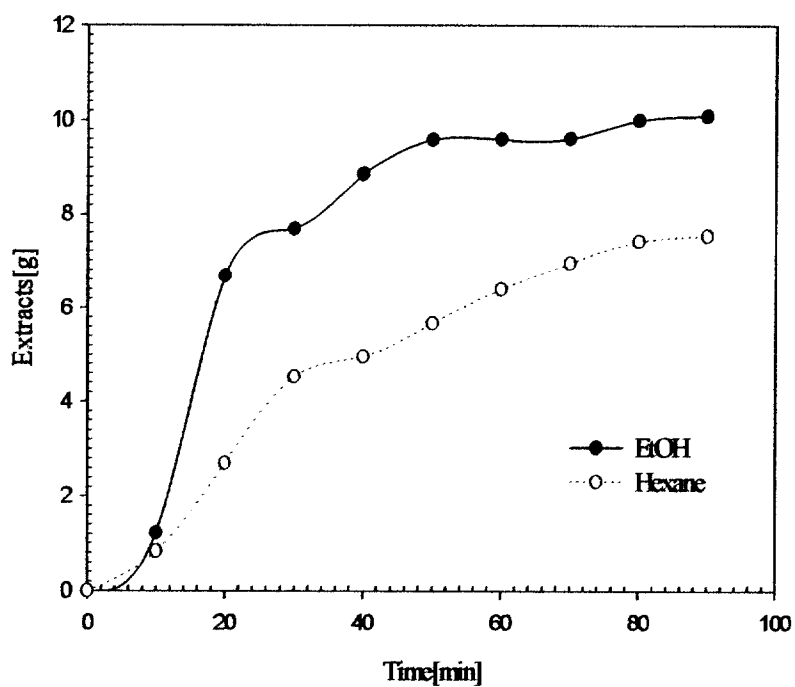


Fig 4. Extraction efficiency of raw material with entrainer.

결과 및 고찰

1. 초임계 CO₂에 의한 지질 제거 효율

1.1. 온도 변화에 따른 추출 효율

유량 15 ml/min, 시료 입자 크기 0.71mm의 시료 40g에서 90분간 추출한 결과로 온도에 따른 지질 추출효율을 나타낸 것이다(Fig. 5). 온도와 압력이 높아질수록 지질 효율이 증가함을 알 수 있고, 17 MPa, 35℃에서 약 70%의 가장 높은 추출효율을 보임을 알 수 있다. 또한 40℃에서는 추출효율이 떨어짐을 알 수 있다. 이는 압력이 일정할 때 온도가 증가함에 따라 초임계 이산화탄소의 밀도가 작아져 용질인 지질에 대한 용해력도 감소하기 때문이다.

1.2 압력 변화에 따른 추출 효율

일정한 온도 35℃에서 유량 15 ml/min, 시료 입자 크기 0.71mm의 시료 40g를 사용하여 90분간 압력에 따른 지질 추출 효율의 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 압력 17 MPa까지는 지질추출 효율이 증가하다가 19 MPa에서는 감소하는 retrograde현상이 나타났다. 이것은 온도가 일정한 상태에서 초임계 이산화탄소의 용해능력은 압력이 증가함에 일반적으로 증가하지만 원료 내에 존재하는 지질이 표면에서 거리가 먼 입자의 중심부 근에 존재하는 용질에 접근할 경우 전달속도에 큰 영향을 미치는 확산계수 및 점도의 성질이 높은 밀도를 지닌 용매에서는 침투력이 작기 때문에 지질 추출 효율이 상대적으로 낮아진다.

1.3. 유량 변화에 따른 추출 효율

일정한 온도 35℃에서 시료 입자 크기 0.35mm의 시료 40g를 사용하여 90분간 유량에 따른 지질 추출 효율의 결과를 Fig. 7에 나타낸 것으로 유량이 증가할수록 지질의 추출효율이 증가함을 알 수 있었다. 압력 17 MPa에서는 유량 약 40 ml/min에서 지질이 95% 이상의 추출 효율을 보였으나, 10.2 MPa의 경우에는 약 80 ml/min에서 약 95%의 추출효율을 보였다.

1.4. 시료 입자에 따른 추출 효율

시료에 대한 입자 크기의 범위는 0.35mm, 0.48mm, 0.71mm, 1mm로 변화시켰고, 유량 15ml/min에서 90분간 추출했다. 초임계를 추출하기 전에 압편 또는 분쇄하여 표면적을 넓혀주면 초임계 이산화탄소와의 접촉면적이 넓어지고, 동시에 세포막을 파괴함으로써 추출속도를 증가시킬 수 있다. Fig. 8의 결과로 추정할 수 있듯이 추출효율은 압력 13.6 MPa와 17 MPa 둘 다에서 입자 크기가 작을수록 추출효율이 높음을 알 수 있었다. 이는 작은 입자에서 침투력이 우수하고 용매력이 크기 때문으로 생각되어진다.

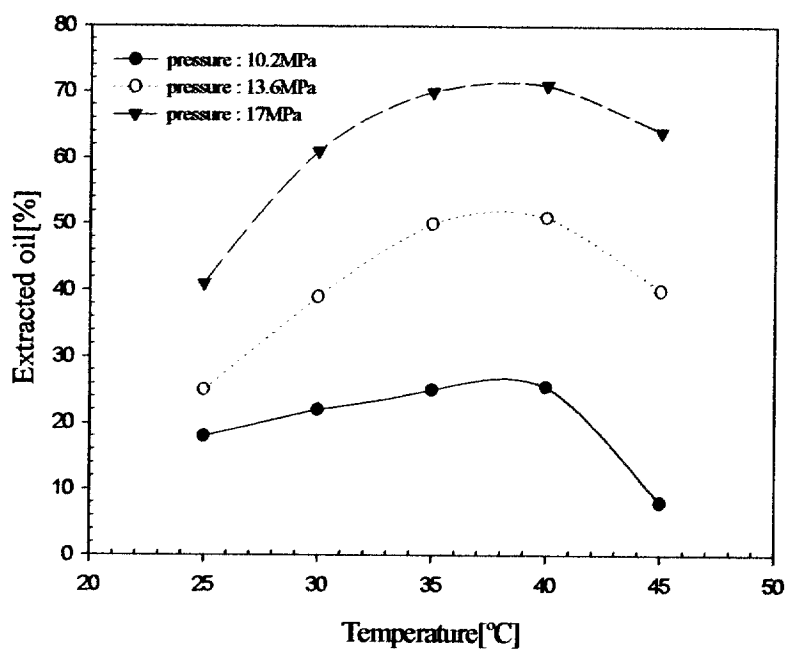


Fig. 5. Effect of extraction temperature change on the extracted oil amount after SFE(extract time : 90min, size : 0.71mm, sample : raw material(40g).

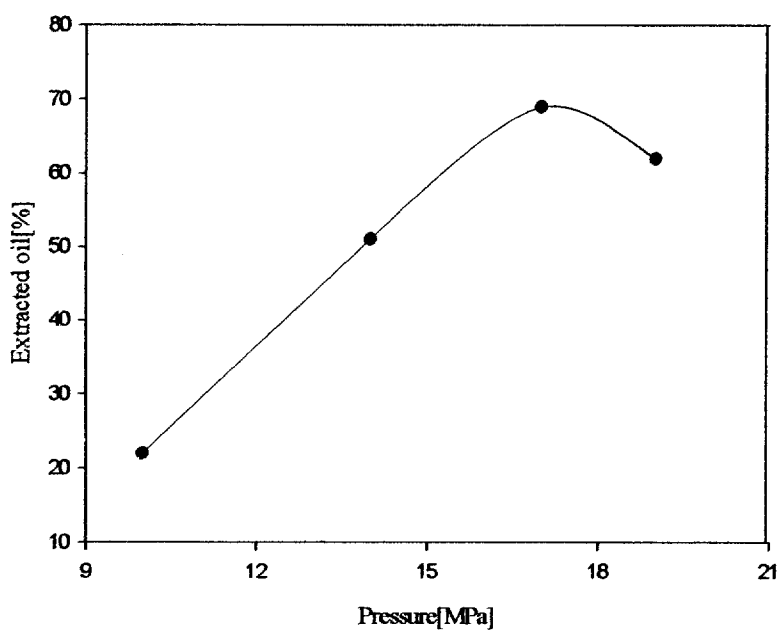


Fig. 6. Effect of extraction pressure change on the extracted oil amount after SFE(extract time : 90min, temperature : 35°C, sample : raw material).

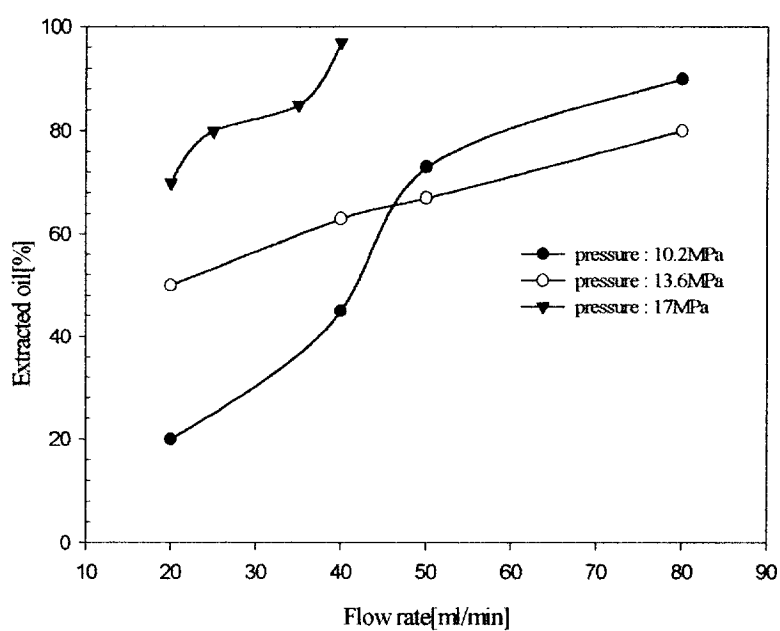


Fig. 7. Effect of extraction flow rate change on the extracted oil amount after SFE (temperature : 35°C, extract time : 90min, size : 0.35mm).

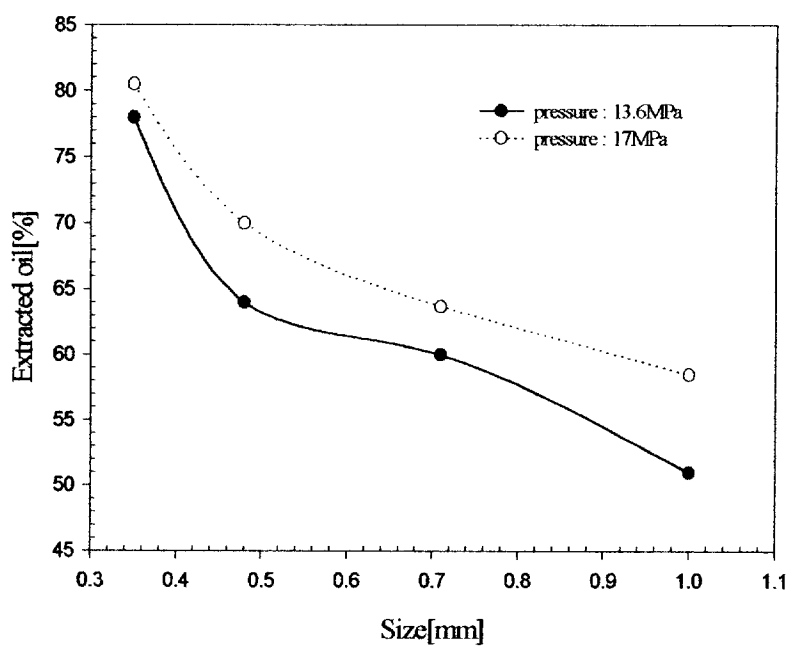


Fig. 8. Effect of extraction size change on the extracted oil amount after SFE(extract time : 90min, temperature : 35°C, sample : raw material.

2. 초임계 CO₂에 의해 추출된 추진물의 효소 활성 측정

2.1. 초임계 CO₂에 의한 효소 활성 측정

2.1.1. 온도 변화에 따른 효소 활성

Fig. 9는 온도에 따른 효소 역가를 나타낸 그림으로서 유량 15ml/min, 압력 17 MPa, 시료 입자 크기 0.71mm의 시료 40g에서 60분간 추출한 결과를 나타낸 것이다. 온도가 증가함에 따라 효소의 역가가 증가함을 알 수 있고, 17 MPa, 40℃에서 약 38000 FIP의 가장 높은 추출효율을 보임을 알 수 있다. 또한 45℃에서는 효소 역가가 떨어짐을 알 수 있는데 이는 압력이 일정할 때 온도가 증가함에 따라 초임계 이산화탄소의 밀도가 작아져 용질인 지질에 대한 용해력이 감소하기 때문이다.

2.1.2. 압력 변화에 따른 효소 활성

일정한 온도 40℃에서 유량 15 ml/min, 시료 입자 크기 0.71mm의 시료 40g를 사용하여 60분간 압력에 따른 효소 역가를 측정한 결과를 Fig. 10에 나타낸 것이다. 17 MPa 압력까지는 효소 역가는 계속적으로 증가하다가 19 MPa에서는 감소하는 현상이 나타났는데 이것은 온도가 일정한 상태에서 초임계 이산화탄소의 용해능력은 압력이 증가함에 일반적으로 증가하지만 원료 내에 존재하는 지질이 표면에서 거리가 먼 입자의 중심부근에 존재하는 용질에 접근할 경우 전달속도에 큰 영향을 미치는 확산계수 및 점도의 성질이 높은 밀도를 지닌 용매에서는 침투력이 작기 때문에 지질 추출 효율이 상대적으로 낮아짐에 따라서 효소의 역가도 낮아지기 때문이다.

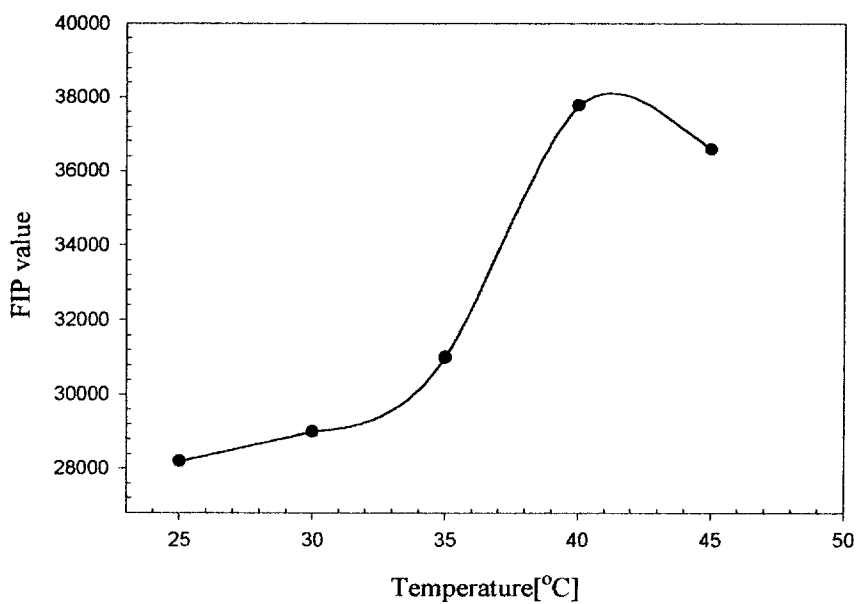


Fig. 9. Effect of extraction temperature change on the FIP value after SFE (extraction time : 60min, sample : solvent extracted material, pressure : 17MPa, size : 0.71mm).

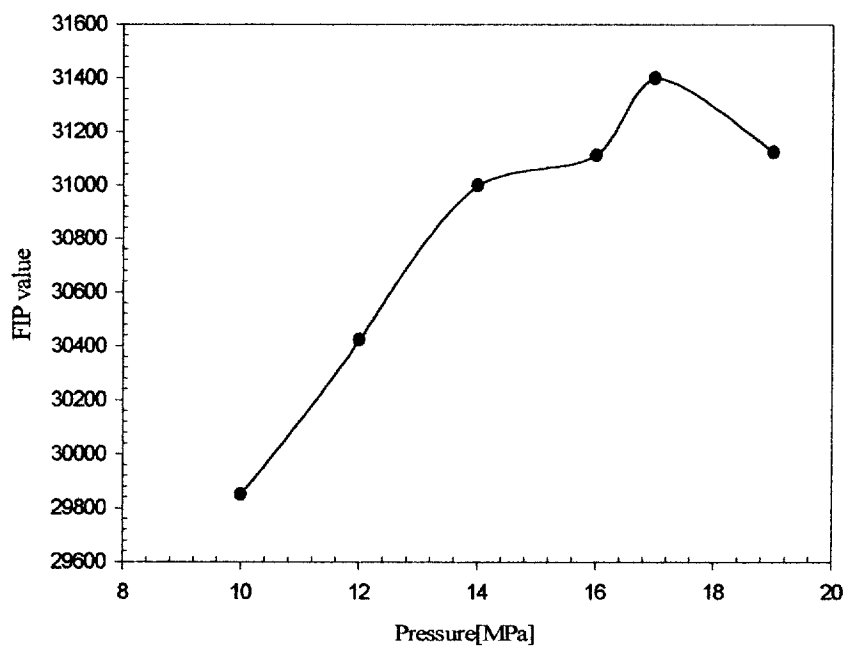


Fig. 10. Effect of extraction pressure change on the FIP value after SFE
(extraction time : 60min, sample : solvent extracted material, temperature : 40°C).

2.2. 초임계 CO₂에와 보조용매에 의한 효소 활성 측정

2.2.1. 보조용매 Ethanol에 의한 효소 활성

일정한 온도 40℃에서 유량 20 ml/min, 압력 17 MPa, 시료 입자 크기 0.71mm의 시료 40g를 사용하여 보조용매인 Ethanol의 첨가량을 변화시켜 90분간 효소 역가를 측정 한 실험 결과이다(Fig. 11). 그림에서 알 수 있듯이 Ethanol의 첨가량이 증가할수록 효소의 역가가 낮아지는 것을 알 수 있다. 이는 Ethanol의 경우 양극성용매로서 지질뿐만 아니라 일부의 단백질까지 추출됨으로 인해 추출효율은 높았지만 일부의 단백질까지 제거되면서 단백질 내에 존재하는 효소를 실험 시킴으로 인해 효소의 역가가 낮아짐을 알 수 있었다.

2.2.2. 보조용매 Hexane에 의한 효소 활성

일정한 온도 40℃에서 압력 17MPa, 시료 입자 크기 0.35mm의 시료 40g를 사용하여 90분간 보조용매인 Hexane의 첨가량을 변화시켜 Hexane의 유량 변화에 따른 효소의 역가를 측정한 결과를 나타낸 것이다(Fig. 12). 앞의 Ethanol을 보조용매로 한 그림과 마찬가지로 보조용매인 Hexane의 첨가량이 증가할수록 효소의 역가가 낮아짐을 알 수 있었다.

2.2.3. 시료 입자 크기 변화에 따른 효소활성

압력 17 MPa, 온도 40℃, 유량 20 ml/min의 시료 40g를 90분간 실험한 결과를 시료

의 입자 크기 범위는 0.35mm, 0.48mm, 0.71mm, 1mm로 변화시켜 90분간 보조용매 Hexane을 5 ml/min 사용하여 효소의 역가를 측정한 결과이다(Fig. 13). 위의 결과에서 보아 알 수 있듯이 시료 입자의 크기가 커질수록 효소의 역가는 낮아지는 것을 알 수 있었다. 앞의 결과에서 보아 알 수 있듯이 추출효율은 압력 17 MPa에서 입자 크기가 작을수록 추출효율이 높음을 알 수 있었다. 보조용매로 Hexane을 첨가하였을 때는 용질의 극성분자에 대해 작용을 하지 않고 지질만 제거함으로써 작은 입자에서 침투력이 우수하고 용매력이 크기 때문으로 생각되어진다.

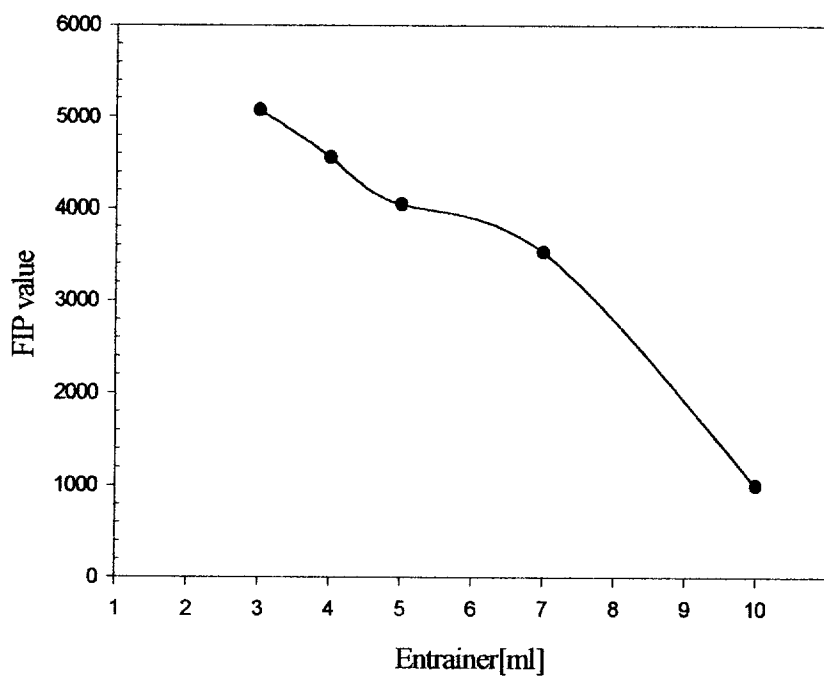


Fig. 11. Effect of extraction entrainer amount change on the FIP value after SFE (extraction time : 90min, sample : raw material, pressure : 17MPa, temperature : 40°C).

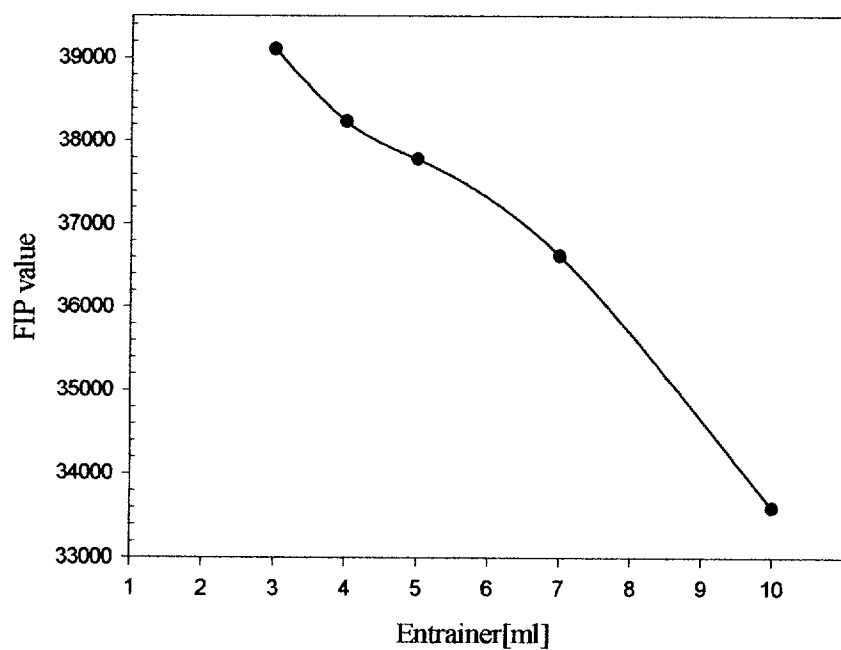


Fig. 12. Effect of extraction entrainer amount change on the FIP value after SFE (extraction time : 90min, sample : raw material, size : 0.35mm, temperature : 40°C, pressure : 17MPa).

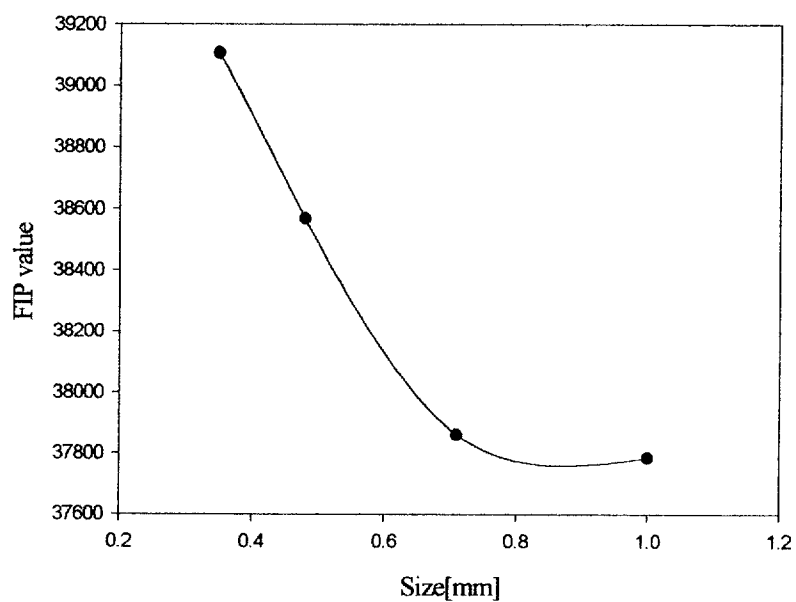


Fig. 13. Effect of extraction size change on the FIP value after SFE (extraction time 90min, sample : raw material, temperature : 40°C, pressure : 17MPa).

3. 초임계 CO₂에 의해 추출된 추출물의 성분분석

3.1. 지방산 분석

초임계 이산화탄소를 이용해 동결 건조된 채장으로부터 추출된 지방산을 가스 크로마토그래피로 분석한 결과를 돼지 육으로부터 추출된 지방산을 비교 분석하여 Table 4에 나타낸 것으로 채장과 돼지 육 둘 다 불포화 지방산인 Oleic acid와 Linoleic acid의 함량이 높았다.

3.2. 콜레스테롤 분석

채장내의 콜레스테롤 초기 함량을 측정하기 위하여 용매로 노르말 헥산을 사용한 것과 압력과 온도를 변화시켜 초임계 이산화탄소를 용매로 하여 추출한 콜레스테롤 함량을 비교한 결과를 Table 5에 나타내었다. 노르말 헥산을 용매로 하여 추출한 콜레스테롤 함량보다 초임계 이산화탄소를 용매로 하여 추출한 것이 콜레스테롤 함량이 더 높았고, 압력 17 MPa에서 온도가 증가할수록 콜레스테롤의 함량이 감소함을 알 수 있었다.

3.3. 돼지 채장의 효소 역가 비교

초임계 이산화탄소로 추출 후 추출물에 존재하는 채장내의 주요 소화효소인 아밀라아제, 프로테아제, 리파제의 활성을 측정하여 수입원료와 비교한 결과를 Table 6에 나타내었다. 본 연구에서 얻은 원료가 수입된 pancreatin보다 약 1.6배 이상의 높은 역가를 보였다.

Table 4. Fatty acids extracted from pancreas and meat

Fatty acid	Pancreas SC-CO ₂ (%)	Meat ¹⁾ Meat (%)
Lauric (12:0)	nd	0.1
Myristic(14:0)	nd	2.0
Myristoleic(14:1)	1.61	nd
Pentadecanoic (15:0)	nd	0.3
Palmitic(16:0)	nd	20.7
Palmitoleic(16:1)	26.78	nd
Heptadecanoic(17:0)	1.35	nd
cis-10-Heptadecenoic(17:1)	0.32	nd
Stearic(18:0)	0.20	5.2
Oleic(18:1)	16.69	43.0
Elaidic(18:1)	33.23	nd
Linoleic(18:2)	17.58	20.1
Linolenic(18:3)	0.81	0.4
Arachidic(20:0)	0.18	nd
cis-11-Eicosenoic(20:1)	0.60	nd
cis-11,14-Eicosadienoic(20:1)	0.45	nd

※nd - not detected

¹⁾ 이성갑외 4명, 최신 축산식품가공학, 세진출판사, p 241(1995)

Table 5. Cholesterol content extracted from pancreas

Component [mg/g]	Organic solvent extracted (N-Hexane)	Supercritical fluid extracted		
		25℃	35℃	40℃
Cholesterol	2.1	3.1	2.5	2.2

※Pressure : 17 MPa

Table 6. Comparison of enzyme activity in pancreatin between this work and imported samples

Contained enzyme of 1g pancreatin	Domestic medical supplies standard (sample 1g)	Enzyme content of studied pancreatin (sample 1g)	Enzyme content of frozen dried pancreatin (sample 1g)	Enzyme content of imported pancreatin (sample 1g)
Amylase	24,000 FIP이상	47,333	24,704	27,160
Lipase	30,667 FIP이상	76,905	31,370	31,370
Protease	1,267 FIP이상	3,652	1,630	1,630

4. 초임계 CO₂ 추출 후 추출물질의 효소 역가 측정

(가) Standard : 시중에 시판하고 있는 ○○회사의 소화제의 효소 역가를 측정 한 결과 약 27,027 FIP의 값을 나타내었다.

(나) 원시료 : 원료 자체의 효소 역가를 측정결과 약 24,704 FIP의 값을 나타내었다.

(나) 동결 건조된 채장 원료

동결 건조된 채장 원료를 시료로 한 효소 역가 결과로는 Table 7을 보아 알 수 있듯이 압력 17 MPa, 온도 40℃ 에서 약 32,691 FIP의 값이 나타났으며, 여기에 보조용매로 Ethanol과 Hexane을 첨가하여 실험을 행하였다. 먼저 같은 조건에서 Ethanol을 3, 4, 5, 7, 10ml 첨가하였을 때는 효소의 역가가 32,691 FIP에 비해 많이 낮아짐을 알 수 있었고, Hexane을 3, 5, 7ml 첨가하였을 때는 Ethanol을 첨가한 것과는 달리 처음 값인 32,691 FIP보다 더 높은 값을 나타내었다. 최고의 높은 값은 압력 17 MPa, 온도 40℃ , 그리고 보조용매로 Hexane을 3ml 첨가한 실험조건에서 39,106 FIP의 높은 값을 나타내었다.

(나) 유기용매로 지질 제거한 시료

유기용매로 지질을 제거한 시료의 효소 활성을 측정한 결과는 밑의 Table 8를 보아 알 수 있듯이 압력 13.6 MPa, 온도 35℃ 에서 31,000 FIP의 값을 나타내었으며, 여기에 보조용매로 Ethanol을 처리한 시료의 결과는 효소의 역가가 거의 없음을 알 수 있었다. 그리고 압력 17 MPa, 온도 40℃ 에서는 약 28,000 FIP의 값이 나타났으며 온도 35℃ 에서는 31,500 FIP의 값으로 가장 높게 나타났다.

(㉞) 한외 여과한 시료

한외 여과법을 이용하여 액상의 효소 역가를 측정한 결과 막분리 재순환 시스템에서 투과압력이 증가하여 전단(shear)이 증가하는 경향이 생겨 결과적으로 효소 역가가 감소하는 결과를 나타내었다.

(㉟) 원심 분리한 시료

추진물을 원심분리 후 효소 역가 측정 결과 약 440 FIP으로 거의 활성이 없었다. 이는 효소가 실온에서 활성을 띤 후 실활되어 역가가 적게 나타났다.

Table 7. Pressure and variety co-solvent of enzyme activity by frozen dried pancreas [Temperature ; 40°C, Pressure ; 17 MPa]

Entrainer	Flow Rate [ml/min]	Particle Size [mm]	Amylase Activity [FIP]
non entrainer		0.6	32,691
Hexane	5		37,786
	3	0.35	39,106
	3	0.48	37,861
	7	0.35	36,625
	7	0.48	36,625
Hexane+Ethanol	5		5,076
	5		7,150
Ethanol	3		4,561
	4		4,048
	5		7,150
	7		1,003
	10		5,076

Table 8. Pressure and temperature and co-solvent of enzyme activity by organic solvent with removed lipid sample

Entrainer	Pressure [MPa]	Temperature [°C]	Flow Rate [ml/min]	Amylase Activity [FIP]
Non Entrainer	13.6	35	-	31,000
	17	35	-	31,400
	17	40	-	28,000
Ethanol	13.6	35	3	nd
	17	35	5	2,000
	17	40	5	850
Hexane	17	40	5	29,260

※nd- not detected

결론 및 요약

돼지 채장에는 소화 효소제인 α -아밀라아제, 프로테아제, 리파아제의 함량이 풍부하여 소화 효소관련 의약품 원료로 적합하다. 최근 의약품 원료로 사용되고 있는 소화 효소는 전량 수입에 의존하고 있으나 그 수요가 매년 증가 추세에 있으며, 사용되는 용도가 다양하다. 그러나 분리 및 정제 과정에서 불순물 혼입과 산화, 환원에 의한 효소의 불활성은 효소의 불안정성과 효소의 역가 상승을 억제시키므로 새로운 효소 분리 및 정제 공정 기술이 요구되므로 본 연구에서는 초임계 이산화탄소를 추출 용매로 하여 동결 건조된 채장 원료에 존재하는 지질을 효소의 변성 및 구조의 파괴 없이 추출 분리하여 고 순도 소화효소제를 분리하는 연구에서 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 초임계 이산화탄소에 의한 동결 건조된 채장내의 지질 추출속도는 추출온도, 추출압력, 초임계 이산화탄소의 유량, 원료의 입자크기에 의존하였다.
2. 초임계 추출 조건을 살펴보면 압력 17 MPa, 온도 40℃, 입자크기 0.25mm, 이산화탄소 유량 40 ml/min 일 때 가장 추출효율이 높음을 알 수 있었다.
3. 추출 후 원료내의 지질함량은 3 wt%이내로 90% 이상의 회수율을 보였으며, 추출 평형은 충전된 원료의 양에 대한 초임계 이산화탄소의 유량에 비례하여 추출 시간의 조절이 가능하였다.
4. 보조용매를 사용 할 경우 사용하지 않았을 때 보다 추출시간은 약 3배 이상

단축되었으나, 사용된 보조용매가 효소의 활성에 영향을 미치므로 보조용매의 선택이 매우 중요하였다.

5. 보조용매의 유량은 초임계 이산화탄소 유량의 2 v/v% 이내가 지질제거 효율이 좋았으며 보조용매의 회수는 분리조의 알맞은 설계로 쉽게 회수되었다.

6. 채장 원료의 전처리 조건에 따라 초기 지질함량의 차이를 나타내었으며, 효소의 활성도 약간의 차이를 보였다.

7. 초임계 이산화탄소와 보조용매에 의해 추출된 돼지채장의 α -amylase의 활성 측정 결과 원료인 동결 건조된 돼지채장에 비해 약 1.6배 이상의 높은 효소 활성을 나타내었다.

8. 원료로부터 추출된 추출물질의 분석결과 10여종의 지방산 성분 중 Elaidic(18:1), Palmitoleic(16:1), Linoleic(18:2) acid가 주요 구성 성분임을 알 수 있었다.

9. 원료로부터 추출된 추출물질의 콜레스테롤 함량을 분석한 결과 용매추출(노르말 헥산)을 한 경우는 약 2.1 mg/g, 초임계 이산화탄소를 용매로 추출하였을 때에는 약 2.2~3.1 mg/g정도 함유되어 있었다.

참고문헌

Arne Staby and Horgen Mollerup. 1993. Solubility of fish oil fatty acid ethylesters in sub and supercritical carbon dioxide. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 70(6), 583 ~ 588.

Adachi M, Shibata K, Shioi A, Harada M, Katoh S. 1998. Selective separation of trypsin from pancreatin using bioaffinity in reverse micellar system composed of a nonionic surfactant. *Biotechnology & Bioengineering*, Vol. 58. No. 6.

Jacobs H, Eerlingen R. C, Spaepen H, Grobet P. J, Delcour J. A. 1997. Impact of annealing on the susceptibility of wheat, potato and pea starches to hydrolysis with pancreatin. *Carbohydrate research*, Vol. 305. No. 2.

Uchiyama K, Ohtani T, Morimoto M, Shioya S, Suga K, Harashima S, Oshima Y. 1995. Optimization of Rice Alpha-Amylase Production Using Temperature-sensitive Mutants of *Saccharomyces Cerevisiae* for the Pho Regulatory System. *Biotechnology Progress*, Vol. 11 No. 5.

Suh, M. J. 1973. Effects of Condiments upon enzyme Activity (1) - Effects of condiments upon Proteinase Activity of Pancreatin. *Korean J. Nutr.* Vol. 6, No. 4, 293 ~ 298.

Kwak, H. S., Jeon, L. J and Park, J. N. 1990. Effects of Food Grade Porcine Pancreatic Lipase on the Production of Short-Chain Fatty Acids and its Contribution. *Korean J. Food Sci. Technol.* Vol. 22. No. 3, 248 ~ 254.

Kwak, H. S., Jeon, L. J and Chung, B. S. 1990. Effect of Food Grade Porcine Pancreatic Lipase on Neutral Volatile Compound Profiles in Cheddar Cheese. *Korean J. Food Sci. Technol.* Vol. 22. No. 2, 206~214.

Kwon, M. K., Jang, E. G and Kwak, H. S. 1991. Effect of commercial food grade porcine pancreatic lipase on physical and sensory characteristics in Cheddar cheese during ripening periods. *Korean J. Dairy Sci.* 13(3) : 197~205.

Kim, D. S., Lee, Y. C., Koo, J. K and Kim Y. M. 1990. Preparation of the Hydrolyzate Using Crab Byproduct after Water Extraction. *J. Korean Fish. Soc.* Vol. 23, No. 2, 77~86.

Paradossi G, Cavalieri F, Pizzoferrato L, Liquori A. M. 1999. Physicochemical study on the Polysaccharide Ulvan from hot water extraction of the Macroalga Ulva. *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 25 No. 4, 309~315.

Chrastil J. 1982. Solubility of Solid and Liquid Supercritical Carbon Dioxide. *J. Phys. Chem.*, 34, 3016.

Arne Staby and Horgen Mollerup. 1993. Solubility of fish oil fatty acid ethylesters in sub and supercritical carbon dioxide. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 70(6), 583~588.

Chami, J. H. 1987. Studies in the extraction of water, lipids and other components from natural and synthetic products using compressed carbon dioxide. Ph. D thesis, University of Birmingham.

Chrastil J. 1982. Solubility of Solid and Liquid in Supercritical Carbon Dioxide. *J. Phys. Chem.*, 34, 3016~3021.

Borch-Jensen. C., A. Staby and J. Mollerup. 1994. Partition coefficients of triglycerides and fatty acid ethyl esters from fish oils in supercritical fluids. Proceedings of the 3rd International Symposium on Supercritical Fluids, France, 2, 299~304.

Casrera, A. 1994. Production of low-fat and low-cholesterol foodstuffs or biological products by supercritical CO₂ extraction : processes and applications. In : Rizvi, S. S. H.(ED), Supercritical Fluid Processing of Food and Biomaterials, Glasgow : Chapman & Hall, 187~201.

Brunetti, L., A. Daghetta, E. Fedeli, I. Kikic and L. Zanderighi. 1989. Deacidification of olive oils by supercritical carbon dioxide. *Journal of the American Oil Chemical Society*, 66, 209~217.

Chun, B. S. and G.T. Wilkinson. 1995a. Interfacial Tension in High Pressure Carbon Dioxide Mixtures. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 34, 4371.

Chun, B. S., H. G. Lee, J. K. Cheon, and G. T. Wilkinson. 1995b. Mass transfer in a Countercurrent Spray Column at Supercritical Conditions. *Korean J. of Chem. Eng.*, 13(3), 234.

Dekker, M. et. al. 1989. Analytical biochemistry. 178, 217~226.

Goklen, K. E. and T. A. Hatton., 1987. Sep. Sci. Technol. 22, 831.

Imai, M. and S. Furusaki, 1987. Kagaku Kogaku Ronbunshu, 13, 355-362.

Kuboi, R., Y. Mori, and I. Komasaawa. 1989. Kagaku Kogaku Ronbunshu, 15, 669.

Bligh, E. and W. Dyer. 1959. Rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal Biochemistry Physiology*, 37. 911~917.

G. Della Porta, R. Taddo, E. D'Urso and E. Reverchon. 1998. Isolation of clove bud and star anise Essential oil by Supercritical CO₂ extraction. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 31, 454~460.

Bartle, K. D., A. A. Clifford, S. B. Howthorne, J. J. Langenfeld, D. J. Miller and R. A. Robinson. 1990. Model for dynamic extraction using a supercritical fluid. *Journal of the Supercritical fluids*, 3, 143~149.

Borch-Jensen. C., A. Staby and J. Mollerup. 1994. Partition coefficients of triglycerides and fatty acid ethyl esters from fish oils in supercritical fluids. Proceedings of the 3rd International Symposium on Supercritical Fluids, France, 2, 299~304.

Brunetti, L., A. Daghetta, E. Fedeli, I. Kikic and L. Zanderighi. 1989. Deacidification of olive oils by supercritical carbon dioxide. *Journal of the American Oil Chemical Society*, 66, 209~217.

Casrera, A. 1994. Production of low-fat and low-cholesterol foodstuffs or biological products by supercritical CO₂ extraction : processes and applications. In : Rizvi, S.S.H.(ED), *Supercritical Fluid Processing of Food and Biomaterials*, Glasgow: Chapman & Hall, 187~201.

Chami, J. H. 1987. Studies in the extraction of water, lipids and other components from natural and synthetic products using compressed carbon dioxide. Ph. D thesis, University of Birmingham.

Chrastil J. 1982. Solubility of Solid and Liquid in Supercritical Carbon Dioxide. *J. Phys.Chem.*, 34, 3016~3021.

Cocero, M. J. and L. Calvo. 1996. Supercritical fluid extraction of sunflower seed oil with CO₂-ethanol mixtures. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73, 1573~1578.

De Filippi, R. P. and E. Vivian. 1982. "Process for Separating Organic Liquid Solutes from their Solvent Mixtures". 4349415 U. S. Patent.

Feral Temelli. 1992. Extraction of triglycerides and phospholipids from canola with supercritical carbon dioxide and ethanol. *J. food Sci.*, 57, 440~457.

Feral Temelli, Eileen Le Blanc and Long fa. 1995. Supercritical CO₂ extraction of oil from atlantic mackerel (*scomber scombrus*) and protein. *Functionality Journal of food science*, 60 (4), 703~706.

Fujimoto, K., Y. Endo, S. Y. Cho, R. Watabe, Y. Suzuki, M. Konno, K. Shoji, K. Arai and S. Satio. 1989. Chemical characterization of sardineme at power produced by dehydrtionwith high osmotic pressure resine and defatting with high pressure carbon dioxide. *J. food Sci.*, 54, 265~268.

Hammam, H., I. Soderberg and B. Sivik. 1991. Physical properties of butter oil fractions obationed by supercritical carbon dioxide extraction. *Food Science and technology*, 10, 374~378.

Hardardottir, I. and J. E. Kinsella. 1988. Extraction of lipid and cholesterol from fish muscle with supercritical fluids. *J. Food Sci.*, 53, 1656~1661.

Kang, S. S., B. J. Kim and B. S. Chun. 1999. Recovery of High Unsaturated Fatty Acid from Squid Processing Wastes using Supercritical Carbon Dioxide Extraction Method. *J. Korean Fish. Soc.* 32, 217~222.

Krukonis, V. J. 1989. Supercritical Fluid processing of fish oils : Extraction of polychlorinated biphenyl. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 66, 818~821.

Liang, J. H. and A. Yeh. 1991. Process conditions for separating fatty acid esters by supercritical CO₂. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 68, 687~693.

Lin, C. S. and J. Zayas. 1987. Protein solubility emulsifying stability and capacity of two defatted corn germ proteins. *J. food Sci.*, 52. 1615~1619.

List, G. R. and J. P. Friedrich. 1995. Processing characteristics and oxidative stability of soybean oil extracted with supercritical carbon dioxide at 50°C and 8000psi. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 62, 82~84.

Mercedes Esquivel M., M. Narcisa Bandarra, M. Isabel fontan. Gabriela Bernardo-gil, Irineu Batista, M. leonor Nunes and Jose Aempis. 1997. Supercritical carbon dioxide extraction of sardine *Sardina pilchardus* oil, Lebensm.-Wiss. u-Tecnol., 30, 715~720.

Nilsson, W. B., E. J. Gauglitz, J. K. Hudson, V. F. Stout and J. Spinelli. 1988. Fractionation of menhaden oil Ethyl esters using supercritical fluid CO₂. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 65, 109~172.

Nurhan Turgut Dunford and Feral Temlli. 1997. Extraction conditions and moisture content of canola flakes as related to lipid composition of supercritical CO₂ extracts. *Journal of Food Science*, 62(1), 155-159.

Palmer, M. V. and S. S. T. Ting. 1995. Applications for supercritical fluid technology in food processing. *Food Chem*, 52, 345.

Paulaitis, M. E., V. J. Krukonis, R. T. Krunik and R. C. Reid. 1982. Supercritical fluid extraction. *Rev. Chem. Engr.*, 1(2), 179.

Staby, A. and J. Mollerup. 1993. Solubility of fish oil fatty acid ethyl esters in sub and supercritical carbon dioxide. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 70, 583~588.

Yeh, A., J. H. Liang and L. S. Hwang. 1991. Separation of fatty acid esters from cholesterol in esterified natural and synthetic mixtures by supercritical carbon dioxide. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 67, 224~229.

Zosel, K. 1978. Separation with supercritical gases: practical applications. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 17, 702~709.

Yeo, S. D., Lim, G. B., Debenedetti, P. G., Bernstein, H. 1993. Formation of microparticulate protein powders using a supercritical fluid antisolvent. *Biotechnol. Bioeng.* 43, 341~346.

Winters, M. A., Knuston, B. L., Debenedetti, P. G., Sparks, H. G., Przybycien, T. M., Stevenson, C. L., Prestrelski, S. J. 1996. Precipitation of protein in supercritical Carbon Dioxide. *J. of Pharmac. Sci.* 85, 586.

Luca Benedetti, Alberto Bertucco, and Paolo Pallado. 1997. Production of Micronic Particles of Biocompatible Polymer Using Supercritical Carbon Dioxide. *Biotechnology and Bioengineering.* 53, 232~237.

Palmer, M. V and S. S. T. Ting. 1995. Applications for supercritical fluid technology in food processing. *Food Chem.*, 52, 345.

Rana, T., Bustami and Hak-Kim Chan. 2000. Generation of Protein Microparticles Using High Pressure Modified Carbon Dioxide. Proceedings of the International Symposium on Supercritical Fluids(5th ed.). 22 ~33.

Bartle, K. D., A. A. Clifford, S. B. Howthorne, J. J. Langenfeld, D. J. Miller and R. A. Robinson. 1990. Model for dynamic extraction using a supercritical fluid. *Journal of the Supercritical fluids*, 3, 143 ~149.

Luisi, P. L., F. Henninger, M. Joppish, A. Dossean and G. Casnati 1977. Solubilization and spectroscopic properties of α -chymotrypsin in cyclohexane, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74, 1384 ~1389.

Neves, G. B. M.; Socantaype. F. H.; Mohamed, R. S. 1996. Proceedings of the International Solvent Extraction Conference. Melbourne. Australia. vol. 2. 999.

Neves, G. B. 1996. "Removal of Cholesterol and Fractionation of Butter oil with Supercritical CO₂" Masters Thesis, UNICAMP.

Socantaype. F. V. 1996. "Removal of Cholesterol and Fractionation of Butter oil with Supercritical Ethane" .Masters Thesis, UNICAMP.

이윤용, 홍원희. 1985. 초임계 유체를 이용한 분리법. 화학공업과 기술, 3권, 59~70.

이윤용, 이흔. 1983. 초임계 기체 추출법. 화학공업과 기술, 1권 1~114.

임상빈, 리즈비. 1993. 초임계 이산화탄소를 이용한 유지방 중의 콜레스테롤 흡착. 제주대학논문집(자연), 36, 329.

노민정, 유기풍. 1992. 초임계 유체 기술을 이용한 특정물질의 제조공정. *Chemical Industry and Technology*, 10(2), 89~101.

효소공학 1996년 1월 10일 김 찬조외 7名, 선진문화사. 497~499.

개정 효소공학 1998년 2월 25일 하 덕모 신광출판사. 294~295.