



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

초임계 이산화탄소를 이용한 밀배아 oil의
효소적 에탄올화 반응 특성



釜慶大學校 大學院

食 品 工 學 科

白 成 新

工學碩士學位論文

초임계 이산화탄소를 이용한 밀배아 oil의 효소적 에탄올화 반응 특성

指導教授 全 炳 秀

이 論文을 工學碩士 學位論文으로 提出함

2008年 2月

釜慶大學校 大學院

食 品 工 學 科

白 成 新

白成新의 工學碩士 學位論文을 認准함

2008年 2月



主 審 農學博士 안 동 현 ㉠

委 員 農學博士 김 선 봉 ㉠

委 員 工學博士 전 병 수 ㉠

목 차

Abstract

서	론	1
---	---	---

이	론	5
---	---	---

1. 초임계 유체 기술 (Supercritical fluid technology)	5
---	---

1.1 상평형	5
---------	---

1.2 초임계 유체의 물성	8
----------------	---

1.3 초임계 유체에 사용되는 용매	9
---------------------	---

1.4 초임계 유체의 장점과 응용분야	11
----------------------	----

2. 중성 지방질의 구성	13
---------------	----

3. Lipases	15
------------	----

재료 및 방법	17
---------	----

1. 재료 및 시약	17
------------	----

2. 실험방법	17
---------	----

2.1 밀배아유의 지방산 분석	17
------------------	----

2.2 상압에서 고정화 효소 (Lipozyme TL-IM, Lipozyme RM-IM)를 이용한 밀배아유의 효소적 에탄올화 반응	19
---	----

2.3 초임계 이산화탄소를 이용한 밀배아유의 효소적 에탄올화 반응	19
--------------------------------------	----

2.4 Monoglycerides, Diglycerides, Triglycerides 의 분석	22
--	----

2.4.1 실리카겔 컬럼을 이용한 Monoglycerides, Diglycerides, Triglycerides 의 정성분석	22
---	----

2.4.2 Thin Layer Chromatography(TLC)에 의한 정성 분석	22
--	----

2.4.3 HPLC를 이용한 정성분석	24
결과 및 고찰	27
1. 밀배아유의 지방산 조성	27
2. Monoglycerides, Diglycerides, Triglycerides 의 분석결과	27
2.1 Thin Layer Chromatography(TLC)에 의한 정성 분석	27
2.2 실리카겔 컬럼을 이용한 Monoglycerides, Diglycerides, Triglycerides의 정성분석	27
2.3 HPLC를 이용한 정성 분석	28
3. 상압에서의 효소적 에탄올화 반응	38
3.1 몰 함량에 따른 영향	38
3.2 반응 온도의 영향	38
3.3 효소 사용량에 따른 영향	38
3.4 반응 시간에 따른 영향	39
4. 초임계 이산화탄소를 이용한 효소적 에탄올화 반응	48
4.1 반응온도의 영향	48
4.2 반응압력에 따른 영향	48
4.3 반응 시간에 따른 영향	48
결론	52
참 고 문 헌	54
감사의 글	61

Characteristics of Wheat Germ Oil during Enzymatic Ethanolysis in Supercritical Carbon Dioxide

Back-Sung Sin

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

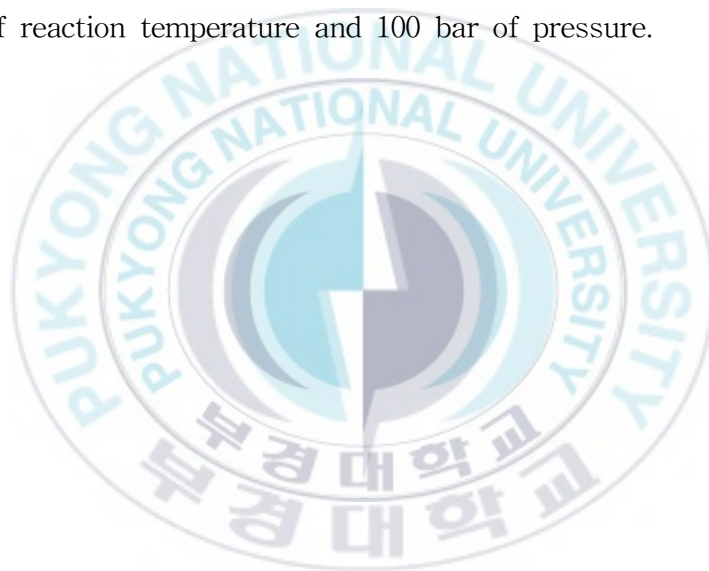
Abstract

Enzymatic ethanolysis of wheat germ oil with immobilized lipase was investigated for enhancing the function of wheat germ oil. As an alternative to chemical hydrolysis, which is difficult to control, the biochemical ethanolysis by lipase is uncomplicated to carry out. Lipases are highly versatile and efficient bio-catalysts for these esterification reactions. With better reaction technologies, the by-products recovered from food processing can be turned into valuable products or at least converted into useful sources. It is possible to convert lipid to monoglyceride and diglyceride by enzymatic ethanolysis. Monoglyceride and diglyceride are widely used as emulsifiers in the food and medical supplies industry.

Ethanolysis reactions were carried out in two different systems; non-pressurized and pressurized system. In non-pressurized system, the enzymatic ethanolysis was carried out in an erlenmeyer flask (25 ml) containing a mixture of wheat germ oil and 99.9% ethanol using 1-5 w% immobilized lipase as Lipozyme TL-IM and Lipozyme RM-IM (based on w/w wheat germ

oil). The reaction mixtures were incubated at 40–70°C and shaken at 120 rpm. In pressurized system, the enzymatic ethanolysis was carried out at various condition; immobilized lipase concentration (2 w%), reaction time (24 hours), reaction temperature (40 – 60°C) and reaction pressure (75, 100, 150, 200 bars). The samples obtained from each fraction were analyzed by HPLC for analysing contents of monoglyceride, diglyceride, and triglyceride.

The conversion of wheat germ oil increased with the reaction temperature and with the concentration of immobilized lipase. The optimum condition of enzymatic ethanolysis in non-pressurized and pressurized system was at 50°C of reaction temperature and 100 bar of pressure.



서론

밀배아는 소맥의 제분과정에서 부산물로 얻어지는 것으로 밀을 채로 쳐서 배유부분을 제외한 나머지 부분이며, 현재 우리나라에서는 가공 생산되는 배아는 거의 전량이 사료로 이용되고 있다. 배아는 밀의 제분단계에서 순수의 배아만을 분리할 수 있으며, 밀알의 2~3%를 차지하고 발아하는 부위로서 지방이 상당량 함유되어 있다(D.B. Sauer, 1992). 밀배아에 대한 연구로는 Ivanova *et al.*, (1975)의 wheat germ의 안정성 및 소맥배아유의 산화안정성(표, 1991)에 관한 연구 등이 있고, 일본에서는 소맥 배아유를 생산하여 품질표시 및 규격기준을 제정하여 여러 용도의 특수한 기능성 식품 자원으로 활용하고 있다. 밀배아의 일반적인 성분으로는 수분 9.2%, 회분 4.1%, 지방 9.7%, 단백질 27.9%이고, 그 외에 섬유소 2.1%와 소량의 무기질을 포함하고 있으며, 비타민 E가 12.7%함유 되어있다. 그러므로 밀배아는 일반성분과 비교하여 단백질과 비타민 E를 많이 함유하고 있다(농촌진흥청, 1996). 비타민 E는 밀배아 속에 함유되어 있는 성분으로 식물 중에서 가장 많은 천연비타민 E 복합체가 이상적인 상태로 함유되어 있으며, 노화예방이나 미용 등에 그 기능성이 있는 건강식품으로 알려져 있다. 비타민 E는 사람을 포함한 고등동물에 필수적인 영양소로 푸른잎 채소, 해조류, 식물성기름, 잡곡류, 패류, 어류, 배아 등에 많이 함유되어 있으며, 여러 이성질체중 α -토코페롤이 체내에서 가장 생물학적 활성이 높은 것으로 알려졌으며, 생체막조직에서 인지질의 천연항산화제로서 역할을 하여 체내대사를 정상으로 유지하는데 큰 기능을 하는 것으로 보고되고 있다(Olcott *et al.*, 1947).

밀배아와 같은 이러한 기능성 식품소재의 개발이 최근 급속히 진행되고 있으며 특히 생체 내에서 기능적 특성을 가지는 유지류를 생산하기 위하여 일반적인 유지로부터 재조합된 유지(structured lipid)(Dliveira *et al.*, 2001)는 기술과 고기능성 유화제에 대한 관심이 고조되면서 유화제 시장의 품질개량 및 새로운 기능성

이 포함된 제품생산을 위한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 체중개선 기능성 유지로 이용될 수 있는 diglyceride(DG) 함유 유지가 화학적 합성을 통해 생산되어 시판되고 있다(Lee *et al.*, 1999; Akoh, 2002). 실제로 일본 Kao사의 Econa cooking oil 및 미국 ADM사의 Ecova cooking oil 등의 DG 함유 유지가 생산, 시판되었다(Kwon *et al.*, 1995). Diglyceride와 monoglyceride(MG)는 글리세롤 한 분자에 각각 2와 1개의 지방산이 결합되어 있는 형태로 triglyceride(TG)보다 친수성을 가지고 있어 식품의 유화제 및 계면활성제 등으로 사용되고 있다(Maki *et al.*, 2002). 또한 DG는 TG와 다른 대사 경로를 통하여 간에서 TG보다 빠르게 β -산화 과정을 거쳐 에너지원으로 사용됨에 따라, 혈중지질의 수치를 높이지 않으며 체중 개선 및 비만 예방 등과 같은 생리효과가 있는 것으로 보고되고 있으며(Watanabe *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2004), 이러한 DG 및 MG 함유 유지를 생성하기 위해서 다양한 화학적 및 생물학적 에스테르 교환반응이 시도되고 있다(Watanabe *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2004; Rosu *et al.*, 1999). 일반적으로 DG, MG는 220°C 이상의 높은 온도와 금속 촉매 또는 알칼리 촉매를 이용한 조건에서 식용유지를 과량의 글리세롤과 반응시켜 화학적 esterification에 의해 생산된다(Kang *et al.*, 1994). 하지만 화학적 방법에 의한 생성물은 고온의 반응과정과 높은 수율의 DG, MG 혼합물을 얻기 위한 여러 번의 분자증류과정에 의해서 생성 과정 중 많은 에너지가 소비되며 불포화 지방산들에 의한 중합체 생성 및 색상이 변색되고 이취를 내는 단점을 지니게 된다(Kwon *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1994). 위와 같은 화학적 합성의 단점을 보완하기 위하여 효소반응을 통한 DG, MG 합성 방법이 최근 대두되고 있다. 효소적 반응에 의한 DG, MG 합성 방법들은 화학적 방법보다 낮은 온도 상태에서 비교적 높은 수율의 생산물을 얻을 수 있어 정제 비용 및 에너지 소비를 줄일 수 있으며, 더욱이 위치, 기질, 구조 선택성인 효소들을 이용하여 합성하고자 하는 유용 물질을 선택적, 효율적으로 생산 가능하다(Kang *et al.*, 1994; Rosu *et al.*, 1997).

또한 기존의 반응 및 추출에 사용되는 유기용매가 인체에 미치는 해독성과 다단계의 분리공정에 의한 생성물질의 변성 및 수율저하 등 많은 문제점이 제기되

고 있다(Yang *et al.*, 1994). 따라서 가능한 한 단일공정으로서 의약품 및 생리활성 물질의 활성도에 영향이 없는 완벽한 잔여유기용매 제거공정의 개발이나 유기용매의 사용자체를 배제한 새로운 분리기술의 개발이 요구되고 있다. 한편 식품, 화장품 및 의약품분야에서 우수한 계면활성제로 이용되고 있으나 기존의 화학적 에스테르화 반응으로는 합성하기가 매우 어려운 monoolein을 효소의 위치특이성(regioselectivity)과 입체특이성(stereoselectivity)을 이용하여 합성하고자 하는 연구가 수행되고 있으나(Streenivasan *et al.*, 1978) 수용상 반응계는 친수성 기질의 용해도는 높으나 가수분해가 우세하여 생성물의 수율과 농도가 낮은 반면에, 유기상 반응계는 생성물의 수율과 농도는 높일 수 있으나 효소활성의 안정성과 친수성 기질의 용해도가 낮고 기질과 효소가 균일상으로 존재할 수 없다는 문제점이 지적되고 있다. 최근 이상의 문제점을 상당부분 해결 또는 보완 가능한 공정으로 초임계 유체를 반응매질인 동시에 무독성 분리공정 용매로 이용하는 초임계 효소반응계가 많은 각광을 받고 있다.

초임계 유체(Supercritical Fluid : SCF)란 순수 유체의 임계점(critical point) 이상의 온도와 압력 하에서 존재하는 유체로써 기존의 액체 반응매질에 비하여 높은 내부 물질전달 속도, 반응선택성과 생성물분리의 용이함, 생활성물질 등에 적합한 조작조건(CO_2 의 경우 31°C , 73bar), 생성물 내 잔여용매의 완전제거 등의 장점을 가져 1980년대 중반이후 초임계 유체의 가능성을 검토하기 위하여 초임계 유체 내에서의 가수분해반응(Randolph *et al.*, 1985), 산화반응(Hammond *et al.*, 1985; Nakamura *et al.*, 1986), 알코올 분해반응(Van *et al.*, 1988), 트랜스에스테르화반응(Pasta *et al.*, 1989), 등에 관한 연구가 진행되었으며 초임계 이산화탄소로 전처리된 lipase를 비롯한 α -Amylase, Glucoamylase, β -Galactosidase 및 Catalase 등과 같은 효소의 활성도가 측정되어 졌다(Taniguchi *et al.*, 1987). 이 결과 초임계 유체에서 초기 효소의 활성도가 지속적으로 유지되었으며 수용상이나 유기상에 비교하여 반응속도가 수배이상 증가되었다. 또한 입체 특이성이나 위치특이성이 조작조건에 따라 우수함이 입증되었으며 전처리 된 효소들도 95% 이상의 활성도를 유지하였다. 특히 리포자임(Lipozyme)은 초임계 이산화탄소에서 매우 안

정된 활성도를 나타내어 50℃, 150 MPa에서 5일후 초기 값의 96%를 유지하였으며 수차에 걸친 가압과 감압 과정에서도 활성도가 유지됨이 알려져 있다(Dumont *et al.*, 1992). 또한 고압에서의 효소반응(Dumont *et al.*, 1992; Bernard *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 1994)을 비롯해 Nakamura *et al.*(1986)은 초임계 유체 하에서 효소반응의 가능성을 제시하였다. 또한 Taniguchi *et al.*(1987)은 여러 가지 효소들에 대해 초임계 조건하에서 90% 이상 활성이 유지된다고 보고하였으며 Lee *et al.*(1995)은 초임계 이산화탄소를 이용한 전분의 효소 가수분해에 대한 연구에서 상압에 비하여 더 짧은 반응시간에 전분을 가수분해 시킬 수 있다는 결과를 보고하였다.

이와 같이 우수한 반응매질 및 분리용매의 특성을 가진 초임계 유체를 이용하여 밀배아유와 고정화 효소를 상압 및 초임계 이산화탄소 상에서의 에스테르화반응을 통하여 보다 안정적이고 효율적인 최적의 반응 조건을 확립하고자 하였다.



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 분리효과를 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 용매력이 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 이산화탄소의 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 용매효과를 크게 얻을 수 있지만 압력의 상한선은 적용하는 물질에 따라 제한을 받는다.

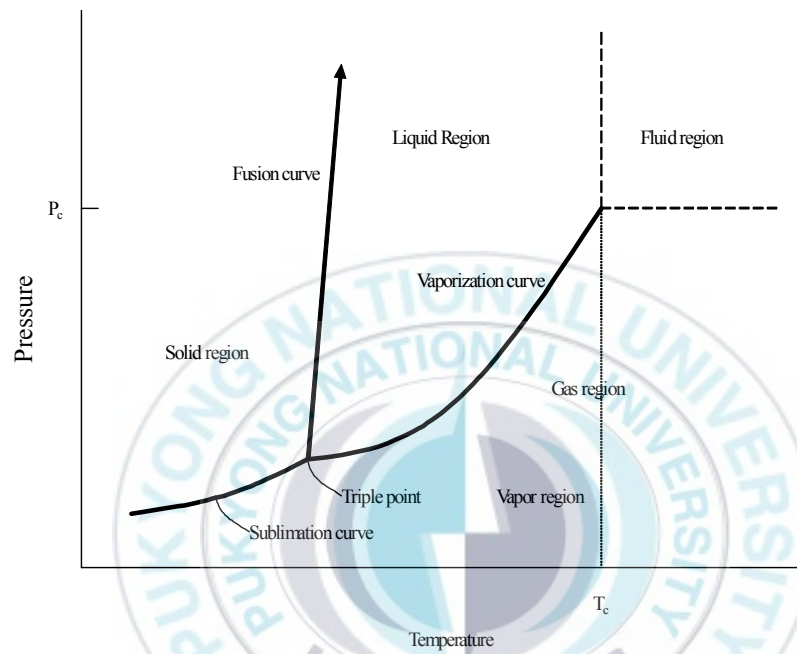


Fig. 1. Schematic phase diagram for CO₂.

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 물성 변화에 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 휘발성분과의 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 증가되는 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 _c (°C)	P _c (MPa)	ρ _c (g/cm ³)
CO ₂	-78.5	31.3	7.38	0.448
NH ₃	-33.4	132.3	11.27	0.240
H ₂ 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 Azeotrop 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
Pharmacy	Fat refining(deacidification)
	Reduction of alcohol in beverages
	Alkaloids
Recycling of Residue	Sterines
	Antibiotics
Residue	Used oils
	Polymer wastes

2. 중성 지방질의 구성

중성지방질은 글리세롤 분자 1개에 지방산 분자가 결합하고 물 분자가 빠져 나온 에스테르(ester) 결합을 하고 있는 글리세리드를 말하며, 글리세롤 분자 1개는 최대3개의 지방산 분자와 결합 할 수 있다. 이때 결합되는 지방산 분자의 숫자에 따라 글리세리드는 모노글리세리드(monoglyceride), 디글리세리드(diglyceride) 및 트리글리세리드(triglyceride)로 구분되어 진다. 또한 같은 모양의 지방산이 결합한 것을 단순 글리세리드(simple glyceride), 다른 모양의 지방산이 결합된 것을 혼합 글리세리드(complex glyceride)라 하며 식용유지는 대부분이 혼합 트리글리세리드로 되어있다. Fig. 2에 각 종류에 따른 글리세리드의 구조를 나타내었다.



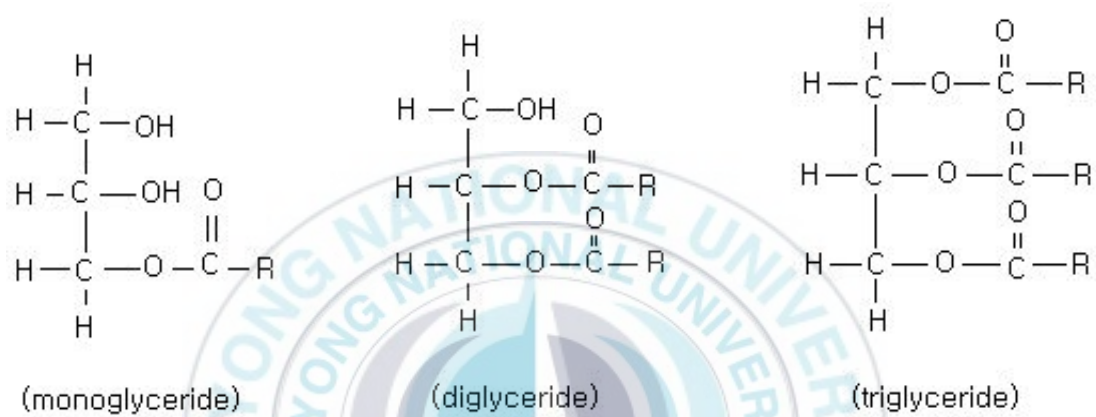


Fig. 2. Structure models of glycerides.

3. Lipases

Lipase는 1849년부터 알려져 온 효소로서(Daeseok *et al.*, 1998), 지질과 무의 현탁액의 상태에서 triglyceride의 ester 결합을 가수분해하여 glycerol과 지방산을 생성하는 효소를 총칭한다(Park *et al.*, 2004). 이효소는 동물의 체액에서 처음으로 발견된 이래, 동물의 폐, 신장, 부신, 지방 조직, 태반 등과 밀이나 아주까리, 콩 등의 식물종자 내에 존재함이 밝혀졌으며, 곰팡이, 효모, 세균 등에 존재하는 미생물 lipase도 발견되어져 생물계 전반에 lipase가 널리 분포되어 있음이 확인되었다(Lee *et al.*, 1993). Lipase는 화학적으로 제조된 라세미 에스터화 입체 선택적 가수분해 반응이나 유기용매 상에서 입체 선택적 에스터화 반응에 사용된다(Hong *et al.*, 2002). 본 실험에 사용된 Lipozyme TL-IM은 *Thermomyces lanuginosus*로부터 유래한 lipase를 silica에 고정화 시켰으며 Lipozyme RM-IM은 *Rhizo-mucor miehei*로부터 유래한 lipase를 macroporous anion exchange resin에 고정화 시킨 상업용 lipase 이다. 이 두 가지의 lipase는 TG 분자의 sn-1과 3의 위치에 특이적으로 작용하여 TG의 ester 결합을 글리세롤과 지방산으로 가수분해한 후 다시 역으로 esterification하는 작용을 가진다(Lee *et al.*, 1996). Fig. 3은 고정화 효소와 에탄올을 사용한 TG의 효소적 에탄올화 반응을 나타낸 것이다.

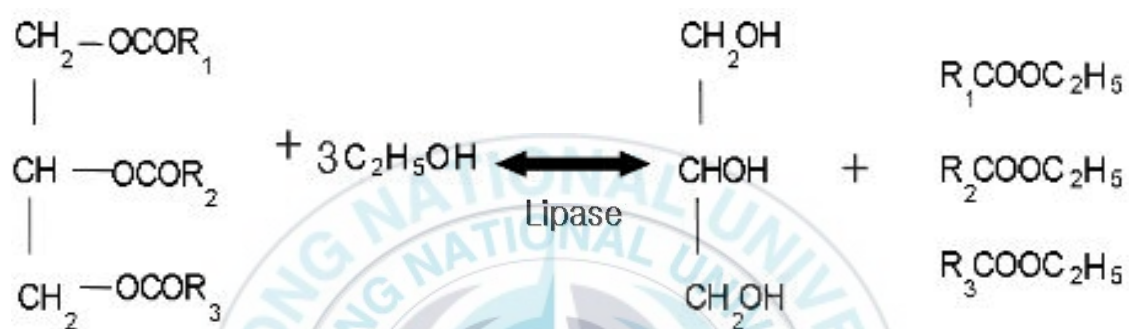


Fig. 3. Enzymatic ethanolysis of triacylglycerol by immobilized lipase.

재료 및 방법

1. 재료 및 시약

실험에 사용된 밀배아 oil은 Wheat germ oil (Sigma, U.S.A) 을 사용하였으며 고정화 효소(Lipozyme TL-IM, Lipozyme RM-IM)는 Novo Nordisk Biochem. North American Inc.(Franklinton, NC, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 또한 실험에 사용된 에틸알코올은 B&J사의 순도 99.9%를 사용하였으며 TG, DG, MG의 정성분석을 위하여 표준물질 Mono- Di- and Triglyceride Mix(Supelco, USA)를 구입하여 정제 없이 바로 사용하였다. 이동상으로 사용한 헥산, 이소프로판올, 메탄올은 B&J사의 순도 99.9%를 이용하였으며 Whatman사의 nylon membrane filter(pore size=0.2 μm)로 여과하여 사용하였다. TLC는 MACHEREY-NAGEL사의 ALUGRAM[®] SIL G/UV₂₅₄ 를 plate로 사용하였고 실험에 사용된 시약은 B&J사의 순도 99.9%를 사용하였다.

2. 실험방법

2.1 밀배아 유의 지방산 분석

실험에 앞서 원료의 지방산 함량을 알아보기 위하여 지방산 분석을 실시하였다. 시료는 AOAC법에 의해 0.2 g을 환류 냉각관이 장착된 둥근 바닥 플라스크에 칭량한 후 0.5 N NaOH in methanol을 6 ml 가하여 100℃에서 10분간 중탕한다. 10% BF₃ in methanol(Fluka Co.) 7 ml를 가하고 잘 흔들어준 후 5분간 방치한다. 6 ml의 hexane(Fisher scientific Co.)을 가하여 2분간 방치 후 이 액을 분액여두에 옮긴다. 포화 NaCl용액 2 ml를 가하여 30초간 혼합 후 방치한다. 윗층을 분리하여 놓아둔다. 아래층은 hexane으로 추출해낸 다음 윗층과 합하여 물을 첨가하여 혼합한 후 물을 제거하며 anhydrous sodium sulfate로 아주 소량 남아 있을 물을 완전히 제거한다. 1 μl 를 sandwich 기법으로 Table. 3과 같은 조건으로 Gas-Chromatography (Hewlett Packard 5890II)에 주입하여 분석하였으며, Gas-Chromatography에 의해 측정되어진 원시료의 지방산 조성은 표준물질(lipid standard : fatty acid methyl estermixture ; Sigma, 189-19)과 비교 분석하였다.

Table 3. Analytical condition of GC/FID

Model	Hewlett-Packard 5890
Column	HP-INNOWAX (30 m×0.32 mm×0.5 μ m)
Carrier gas & Flow rate	N ₂ 0.1 ml/min
Injector temperature	230℃
Detector temperature	260℃
Air/H ₂	9/1
Oven Temperature	150℃ → 2℃/min → 240℃ (15 min)

2.2 상압에서 고정화 효소 (Lipozyme TL-IM, Lipozyme RM-IM)를 이용한

밀배아유의 효소적 에탄올화 반응

본 실험에서 사용된 식물성 오일인 밀배아유와 에탄올의 에탄올화 반응을 고정화 효소(Lipozyme TL-IM, Lipozyme RM-IM)를 사용하여 시험하였으며, 밀배아유의 에탄올화 반응을 위하여 shaking incubator(HB-201SF:Hanbaek Scientific Co)를 사용하였다. 실험은 반응에 영향을 미칠 수 있는 에탄올과 밀배아유의 몰비(1배수-5배수), 온도(40℃-70℃), 효소의 사용량(1%-5% w/w), 반응시간(1시간-24시간)을 변화시켜 에탄올화 반응을 수행하였다. 밀배아유의 분자량은 트리글리세라이드의 분자량에 기초하여 863.3 g/mol로 하였고, 에탄올의 분자량은 46 g/mol, 밀배아유의 밀도는 0.922 g/ml, 에탄올의 밀도는 0.773 g/ml로 계산하였다. 본 실험에서 사용된 밀배아유와 에탄올의 사용량에 대한 몰비는 1:1에서 5 g의 밀배아 유에 0.33 ml의 에탄올로 하였다. 상압에서의 모든 실험은 25 ml의 삼각플라스크에 밀배아 유를 넣고 설정된 반응기에서 120 rpm의 속도로 반응하였다. 반응이 완료된 반응물은 효소와 이물질을 제거하여 시료를 획득하였다. 본 연구에서 얻어진 시료는 -15℃ 냉동고에 보관하면서 분석에 사용하였다.

2.3 초임계 이산화탄소를 이용한 밀배아유의 효소적 에탄올화 반응

본 실험에서 사용된 실험 장치는 Fig. 4와 같다. 탱크로부터 나온 이산화탄소는 냉각기를 통해 액화되며 액화된 유체는 펌프(High pressure p-serise pump, Thar, USA)를 통해 반응기로 유입된다. 반응기 내의 압력조절은 원하는 압력을 펌프에 입력하고 입력된 압력은 펌프에서 자동으로 유지시킬 수 있었다. 반응은 상압에서의 실험과 동일하게 수행 되었으며 압력은 75, 100, 150, 200 bar로 실험 하였다. 반응기는 스테인레스강(SS-316)으로 제작되었고 내부부피 55 ml(내경 2.5 cm, 높이 11.2 cm)이며 반응기 상, 하부는 강화유리로 설계되어 내부를 볼 수 있게 하였다. 밸브는 Hoke사, 피팅은 Swegelok사 제품을 사용하였으며 반응기 내부에는 magnetic stirring bar로 교반하였다. 온도는 water bath(Dongwon scientific system, KOREA)로 조절하였으며 온도측정은 FLUKE 52(FLUKE, USA)로 계속적

으로 측정하였다. 반응 후 샘플은 -15°C 냉동고에 보관하면서 분석에 사용하였다.



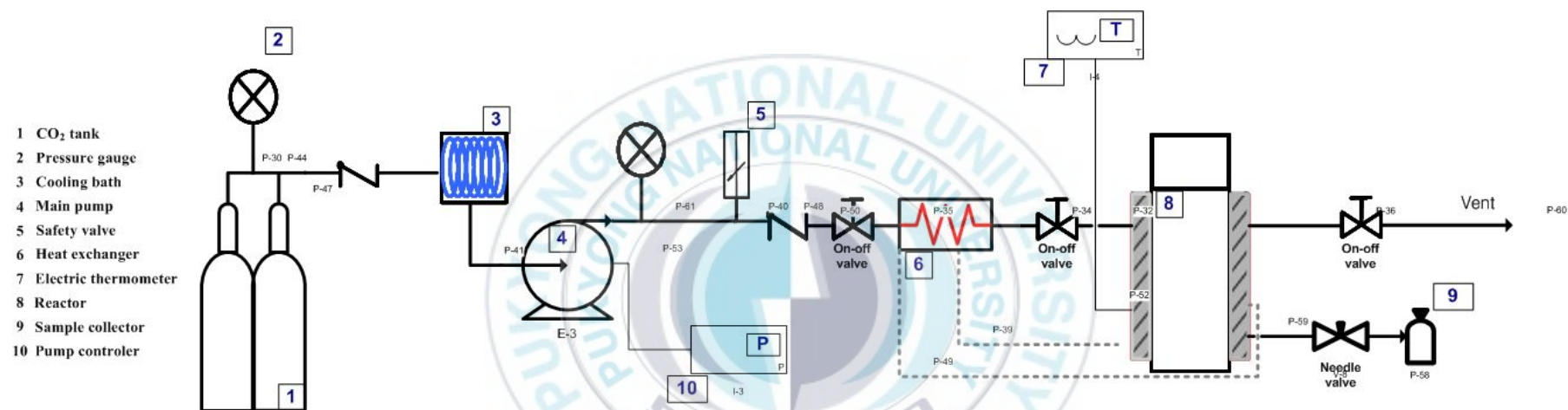


Fig. 4. Flow diagram of supercritical fluid process.

2.4 Monoglycerides, Diglycerides, Triglycerides 의 분석

2.4.1 실리카겔 컬럼을 이용한 Monoglycerides, Diglycerides, Triglycerides의 정성분석

본 실험은 HPLC분석에 필요한 DG, MG, TG의 구간을 설정하는데 선행되어야 하는 실험이며 AOCS(1997) 분석방법을 참고하여 실행되었다. 실험에 사용된 컬럼은 내경 2 cm, 높이 10.5 cm 였으며 펌프는 Lab Alliance사의 series II를 이용하였다. 시료는 밀배아 유 5 g과 Lipozyme TL-IM 0.1 g을 이용하여 60℃, 120 rpm에서 17시간 동안 에탄올화 반응시켰다. 먼저 컬럼에 silica gel을 충전하기 위해 10 g의 silica gel을 20 ml의 petroleum ether에 넣어 현탁액을 만들고 컬럼에 주입한다. 주입 후 petroleum ether가 모두 흘러내릴 수 있도록 한다. 그 후 시료 0.3 g을 정확히 달아 chloroform 1 ml에 녹여 컬럼 상단에 주입한다. 펌프를 이용하여 용매를 흘려주는데 이때 유량은 2 ml/min 으로 설정하였으며 용매 조건은 Table. 4와 같다. 컬럼을 통과한 용매를 fraction별로 분취하고 분취한 용매는 농축기를 이용해 농축한다. 시료 0.05 g을 2-propanol : hexane 5:4(v/v) 1 ml에 녹여 TLC 분석을 했으며 시료 30 μ l를 취해 TLC와 같은 용매에 녹여 HPLC로 분석하였다.

2.4.2 Thin Layer Chromatography(TLC)에 의한 정성 분석

본 연구는 DG, MG, TG의 대략적인 성분을 관찰하기 위해 필요하며 실험 방법은 다음과 같다. 먼저 시료 0.05 g을 2-propanol : hexane 5:4(v/v) 1 ml에 녹여 1 μ l씩 취하여 silica gel TLC plate에 점적하고 전개용매 cyclohexane : ethyl acetate (3 : 2 v/v, lower layer) 하층으로 전개시켰다. 전개를 마친 TLC plate는 상온에서 건조 시킨 후 Iodine vapor 포화 탱크에 넣어 분리된 중성지질인 DG, MG, TG의 spot을 확인 할 수 있었다.

Table 4. Silica gel column chromatography of solvent condition

Fraction	solvent (v/v)
I (triglyceride)	10% diethyl ether in petroleum ether 100 ml
II (diglyceride)	25% diethyl ether in petroleum ether 100 ml
III (monoglyceride)	100% diethyl ether 100 ml

2.4.3 HPLC를 이용한 정성분석

MG, DG, TG의 정성 분석을 위하여 HPLC(Waters, Waters 600E, USA)를 사용하였으며 column은 Atlantis[®] dC18 5 μ (4.6 $\times$ 150 mm, Waters, USA)를 사용하였다. 검출기는 UV Dectector(Waters 484, USA)를 사용하였으며 HPLC의 분석 조건(Holcapek *et al.*, 1999)은 Table. 5에 나타내었다. column 온도는 40°C로 설정하였고 gradient를 사용했으며 Table. 6에 나타내었다. 분석 조건을 살펴보면 methanol(용매A)과 2-proparol : hexane(5:4(v/v))(용매B)을 이동상으로 사용했으며 유속은 1 ml/min 이었다. 시료 주입 후 15분 동안 용매A와 B를 0대100에서 50대50(curve 6)부피비로 변화시켰고 15분에서 25분 까지 유지시켰다. 25분부터 5분간 용매 A와 B를 0대 100(curve 6)으로 변화 시켰으며 총 진행시간은 30분이었다. 각각의 시료 30 μ L를 용매A 1 ml에 희석하고 PTFE syringe filter(25 mm, 0.2 μ m, Whatman, USA)를 이용하여 여과시킨 후 HPLC에 20 μ l 주입하여 분석하였다.

Table 5. HPLC conditions for the detection of tri, di, monoglyceride

Instrument	:	Waters 600E
Column	:	Atlantis® dC18 5 μ (4.6 $\times$ 150 mm, Waters, USA)
Column temp.	:	Room temp
Detector	:	Waters 484 UV Dectector
Wavelength	:	205 nm
Injection volumn	:	20 μ L
Flow rate	:	1.0 ml/min
Moble phase	:	MeOH Hexane : Isopropanol (4:5)(v/v)

Table 6. HPLC conditions for the detection of tri, di, monoglyceride

time	flow	2-propanol:hexane (5 : 4 v/v)	methanol	curve
0	1.00		100	6
15	1.00	50	50	6
25	1.00	50	50	6
30	1.00		100	6

결과 및 고찰

1. 밀배아유의 지방산 조성

실험에 사용된 원료는 Wheat germ oil (Sigma, U.S.A)을 사용했으며 지방산의 조성은 Table. 7에 나타내었다. Table에 나타난 것과 같이 불포화 지방산인 linolelaidic acid는 전체 지방산의 47% 가량 차지하고 있었으며 linolenic acid는 8%가 함유되어 있었다. 포화지방산인 Palmitic acid도 18%함유 되어 있었으며 이 밖에도 Oleic acid 16%가 함유되어 있었다.

2. Monoglycerides, Diglycerides, Triglycerides 의 분석결과

2.1 Thin Layer Chromatography(TLC)에 의한 정성 분석

TLC 결과는 Fig. 5에 나타내었다. TLC 실험은 비교적 간단하면서 빠른 시간 내에 지질의 성분을 알 수 있게 해주며 한 번에 많은 샘플을 분석할 수 있어 HPLC로 분석하기 전에 실험을 수행 하였다. 각 flaction 마다 50 ml씩 따로 분취한 2개의 샘플을 만들었으며 flaction I (triglyceride)은 A와 B, flaction II (diglyceride)은 C와 D, flaction III(monoglyceride)은 E와 F 이다. 각각의 시료마다 분리된 것을 확인 할 수 있었으며 정확한 함량측정을 위하여 HPLC를 이용해 분석했다.

2.2 실리카겔 컬럼을 이용한 Monoglycerides, Diglycerides, Triglycerides의 정성분석

Mono- Di- and Triglyceride Mix의 분석결과를 Fig. 6에 나타내었다. 그 결과 Monoolein 2.708, 1,2 1,3-Diolein 9.684, Triolein 19.897의 retention time을 가졌으며 다음과 같은 결과는 분취 하여 나온 시료들의 구간을 정하는데 중요한 지표가 되었다. Flaction I 의 분석결과는 Fig. 7, Fig. 8에 나타내었다. Fig. 7은 최초 50 ml를 분취하여 얻은 시료의 결과이며 Fig. 8은 나머지 50 ml의 분석

결과이다. 그리고 10분 이전에 나온 피크는 소량의 MG, DG, ester 등으로 사료되어 지며 TG의 구간은 16분부터 26분까지로 설정하였다. fig. 9는 flactionII의 결과이며 DG의 구간은 6분부터 11분까지로 설정하였다. flactionIII의 결과는 fig. 10에 나타내었으며 MG의 구간은 2분부터 3분까지 설정하였다.

2.3 HPLC를 이용한 정성 분석

반응전, 후의 밀배아유의 chromatogram은 fig. 11 와 fig. 12에 나타내었다. 반응후 TG의 함량은 감소했으며 MG, DG, ester의 함량은 현저하게 증가했다. 모든 반응에서의 결과는 전체 %로 환산하여 측정 하였다.



Table 7. Fatty acid composition(%) of wheat germ oil

Compounds	Composition(%)
Palmitic acid (C16:0)	18.426
Heptadecanoic acid (C17:1 ; cis-10)	6.980
Stearic acid (C18:0)	1.155
Oleic acid (C18:1)	16.383
Linolelaidic acid (C18:2n6t)	47.053
Linolenic acid	8.186
Cis-11-eicosenoic(C20:1)	1.817
Total	100.00

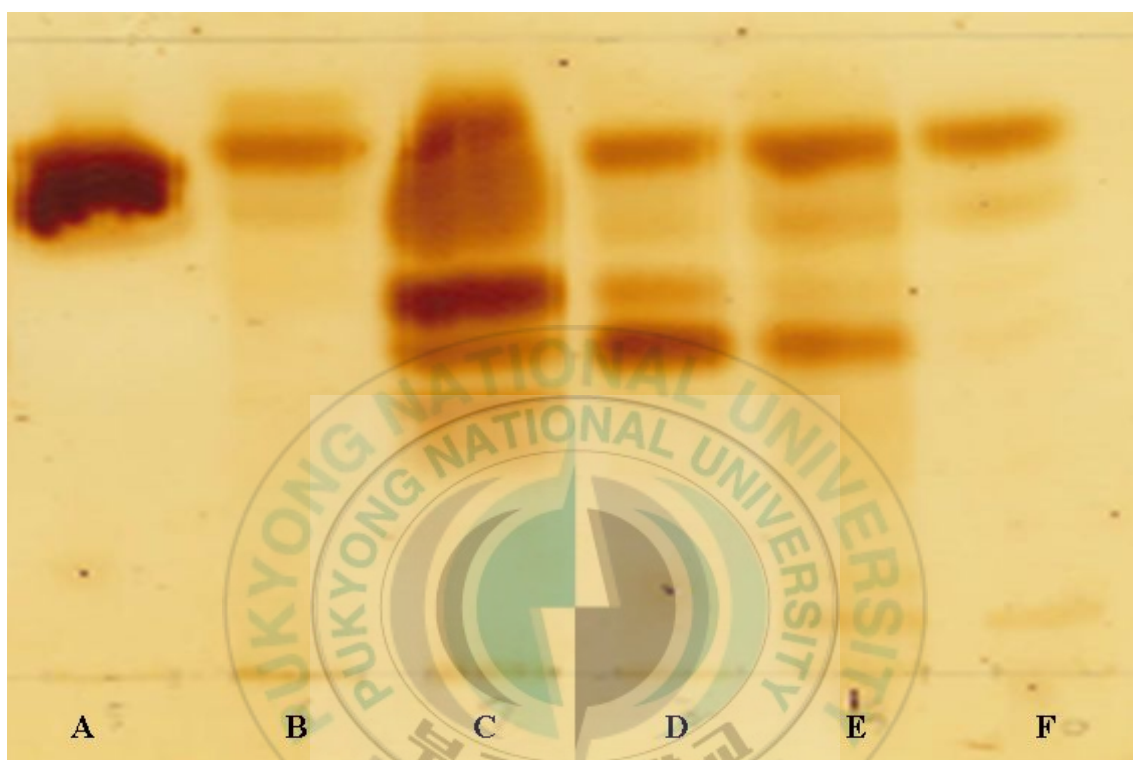


Fig. 5. Thin Layer Chromatography. (A: Flaction I 50 ml, B: Flaction I 50 ml, C: FlactionII 50 ml, D: FlactionII 50 ml E: FlactionIII 50 ml F: FlactionIII 50 ml)

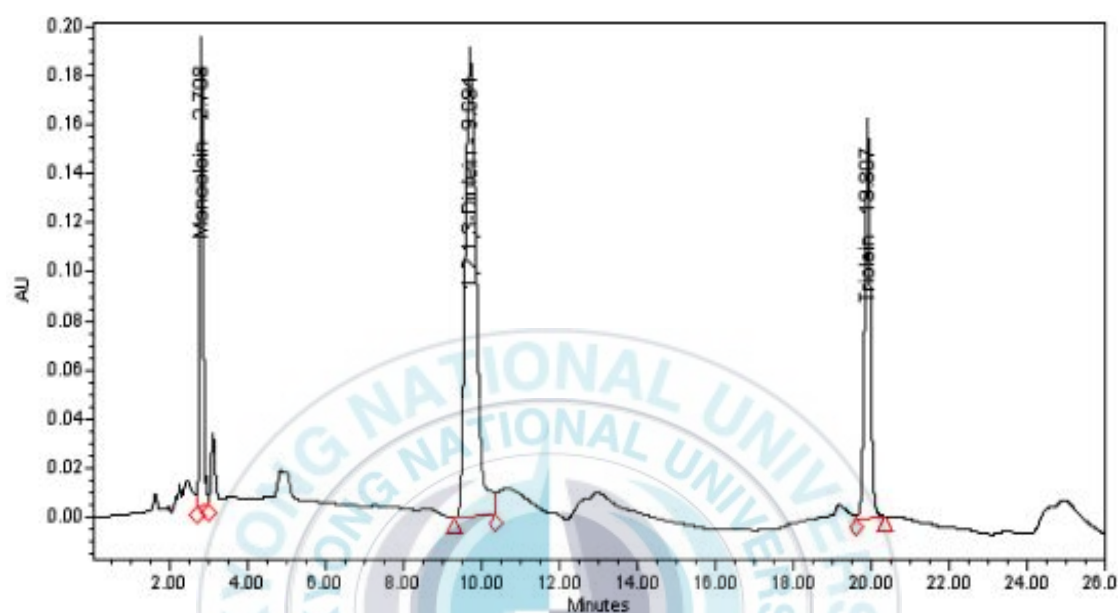


Fig. 6. HPLC separation of Mono- Di- and Triglyceride Mix. HPLC method(see table.5), UV detection at 205 nm, flow-rate 1 ml/min, injection volume 20 μ l.

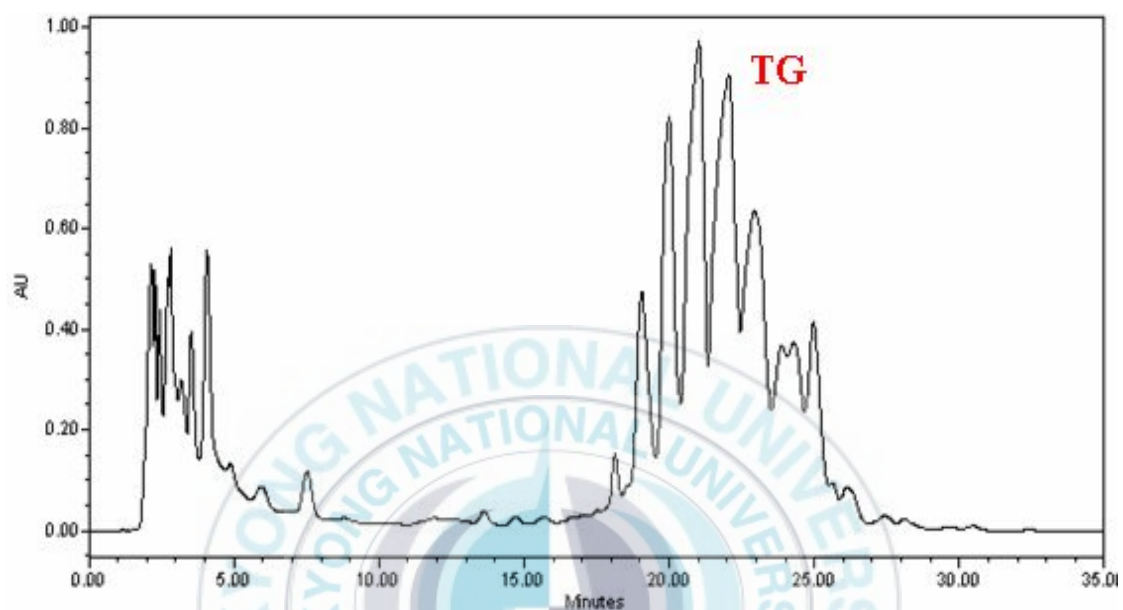


Fig. 7. HPLC separation of a flaction I (triglyceride). HPLC method(see table.5) UV detection at 205 nm, flow-rate 1 ml/min, injection volume 20 μ l.

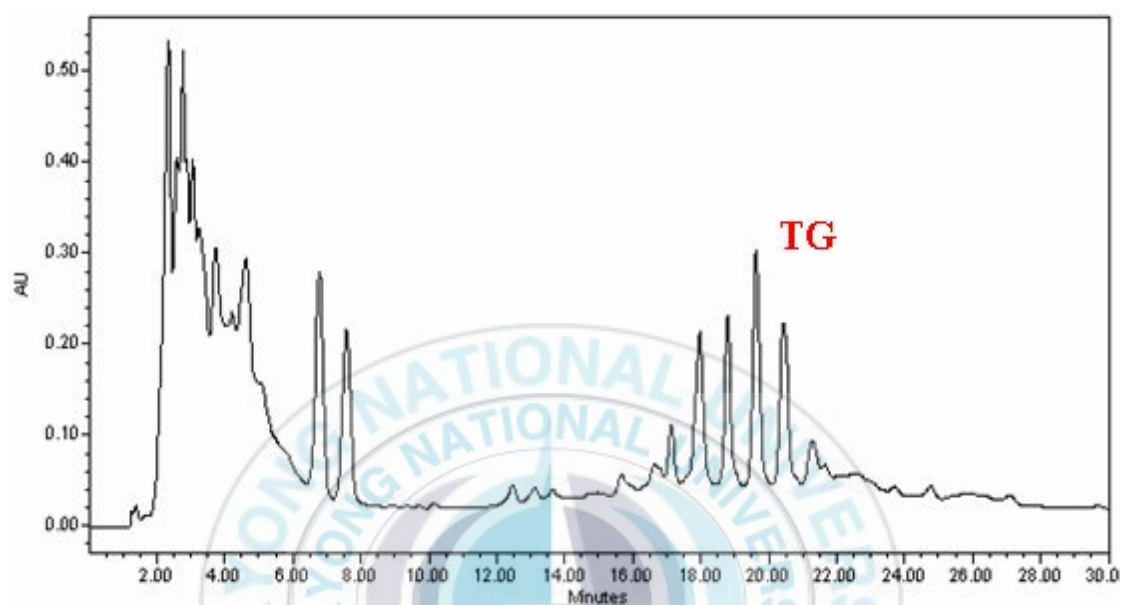


Fig. 8. HPLC separation of a flaction I (triglyceride). HPLC method(see table.5), UV detection at 205 nm, flow-rate 1 ml/min, injection volume 20 μ l.

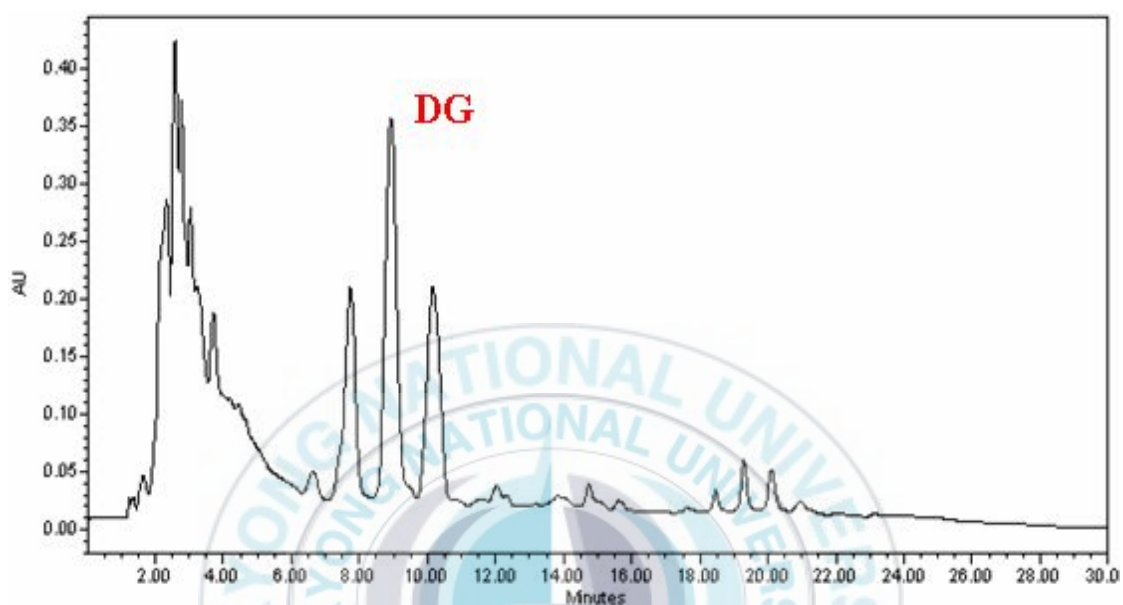


Fig. 9. HPLC separation of a flaction II (diglyceride). HPLC method(see table.5), UV detection at 205 nm, flow-rate 1 ml/min, injection volume 20 μ l.

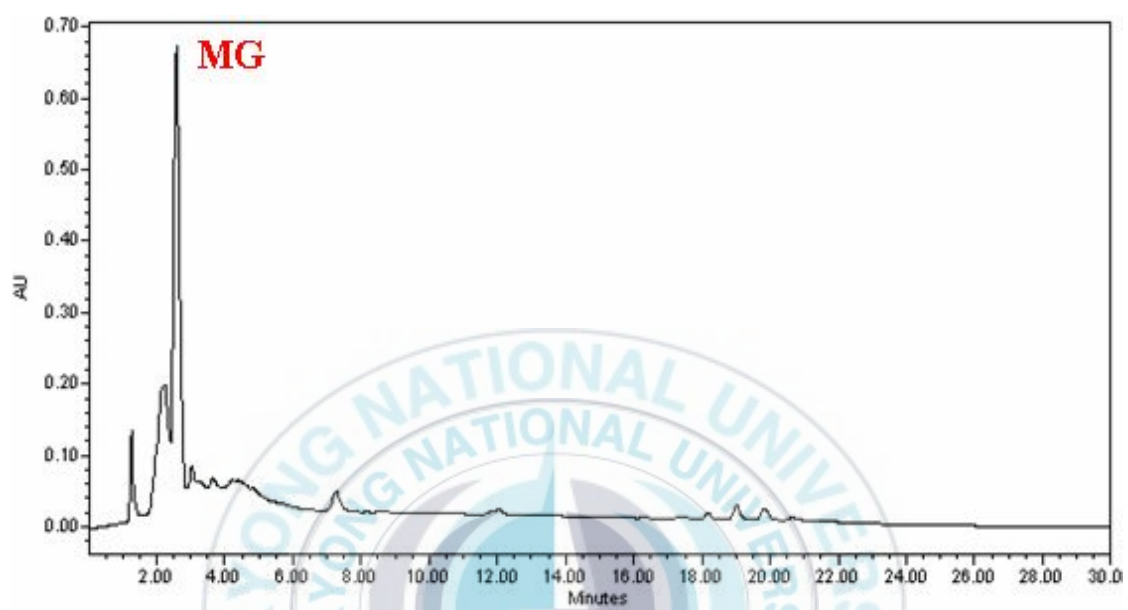


Fig. 10. HPLC separation of a flactionIII(monoglyceride). HPLC method(see table.5), UV detection at 205 nm, flow-rate 1 ml/min, injection volume 20 μ l.

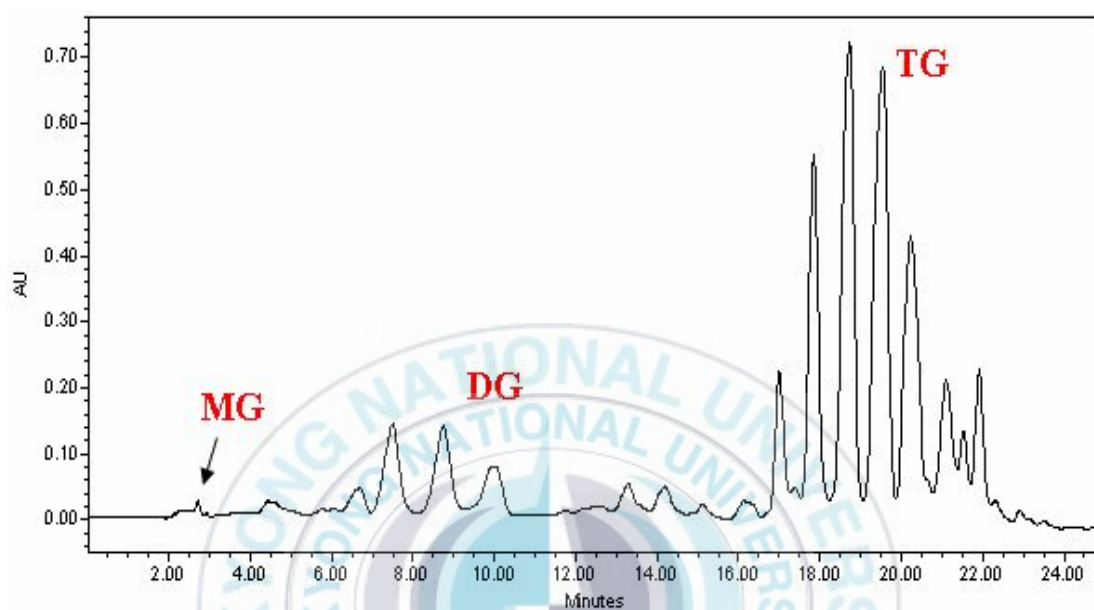


Fig. 11. HPLC separation of wheat germ oil. HPLC method(see table.5), UV detection at 205 nm, flow-rate 1 ml/min, injection volume 20 μ l.

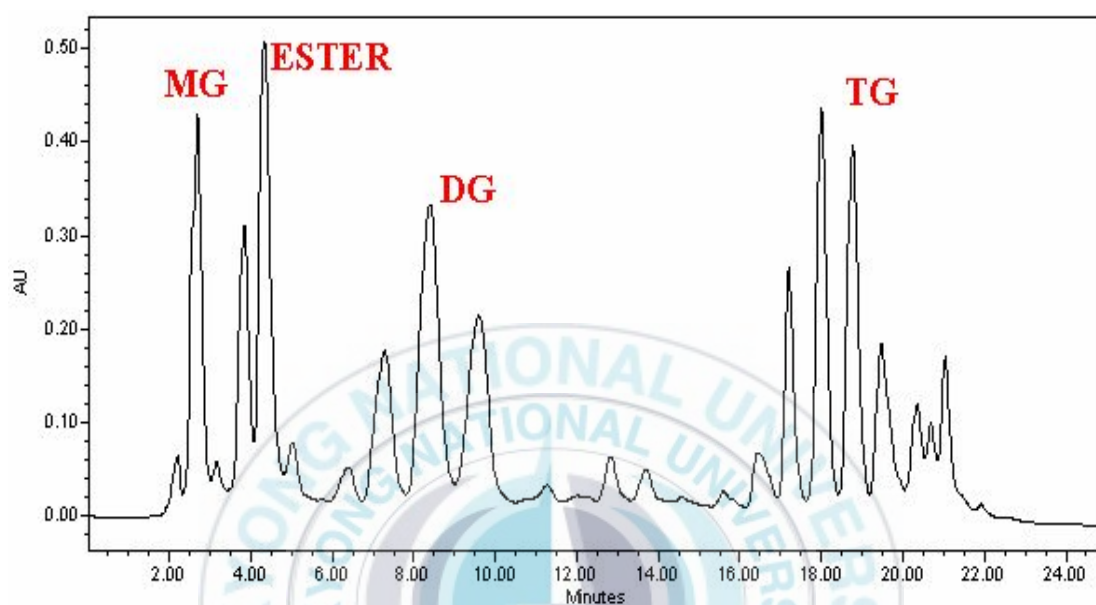


Fig. 12. HPLC separation of wheat germ oil/ethanol, 2%(w/w wheat germ oil) immobilized lipase(TL-IM), shaken at 60°C, 120 rpm for 24h. HPLC method(see table.5), UV detection at 205 nm, flow-rate 1 ml/min, injection volume 20 μ l.

3. 상압에서의 효소적 에탄올화 반응

3.1 물 함량의 영향

밀배아와 에탄올의 물 함량에 따른 영향은 Fig. 13 Fig. 14에 나타내었다. Lipozyme TM-IM을 사용한 경우 에탄올 물 함량 1배수에서 MG는 0.44%에서 9.84%, DG는 12.55%에서 30.63%로 증가하였고 TG는 87%에서 59.52% 감소하여 전환율이 최대였다. Lipozyme RM-IM에서도 마찬가지로 1배수에서 전환율이 최대였으며 MG는 0.44%에서 9.23%, DG는 12.55%에서 19.35%로 증가하였고 TG는 87%에서 71.42% 감소하였다. 이상의 결과에서 알 수 있듯이 Lipozyme TL-IM과 Lipozyme RM-IM 모두 물 함량 1배수에서 최대 전환율을 보였으나 Lipozyme TM-IM을 사용한 경우 물 함량 2배수 또한 상대적으로 전환량이 높았다. 하지만 Lipozyme RM-IM은 2배수 이상부터 전환량이 현저히 감소되었다. 이러한 결과는 효소의 활성이 에탄올에 영향을 받아 저해되는 것으로 보이며 이러한 경향은 Yuji(2002)의 연구와 일치하였다.

3.2 반응 온도의 영향

Fig. 15, fig 16은 온도에 따른 MG, DG, TG의 함량을 나타낸 그림이다. 40℃에서는 MG 8.31%, DG 29.43%, 50℃에서는 MG 9.84%, DG 30.63%로 나타났다. 60℃에서는 MG 9.43% DG 34.92%, 70℃에서는 MG 9.32%, DG 33.83%였다. 이와 같은 결과는 40℃부터 60℃까지 TG의 전환율이 계속 증가하여 60℃에서 최대 전환율을 나타내었고 70℃에서 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 60℃까지는 효소의 활성이 높아지다가 70℃이상에서는 저해 된다는 것을 알 수 있게 해주었으며 Lipozyme TL-IM이 Lipozyme RM-IM보다 전환율이 높은 경향을 보였다.

3.3 효소 사용량의 영향

효소 사용량에 따른 MG, DG, TG의 함량을 나타낸 그림은 fig. 17, fig. 18에 나타내었다. Lipozyme TL-IM과 Lipozyme RM-IM 모두 효소 사용량이 3% 이

상까지는 전환율이 증가 했으나 그 이후 전환율은 거의 변화가 없었다. 이러한 결과는 효소적 에탄올화 반응시 효소 사용량을 3% 이상 첨가 하더라도 MG나 DG의 수율에는 큰 영향을 주지 않는 것을 확인할 수 있었다.

3.4 반응 시간의 영향

Fig. 19, fig. 20은 반응시간에 따른 MG, DG, TG의 함량을 나타낸 그림이다. Lipozyme TL-IM을 사용한 반응에서는 24시간 동안 계속적으로 증가하여 MG 13.30%, DG 36.42%, TG 50.3%로 전환되었다. Lipozyme RM-IM을 사용한 반응에서는 12시간 까지 계속적으로 증가하여 MG 10.87%, DG 39.62%, TG 49.51%로 전환되었으나 이후에는 전환율이 조금씩 감소하여 24시간 후에는 MG 10.79%, DG 35.69%, TG 53.52% 전환 되었다. 이러한 결과는 Lipozyme TL-IM은 24시간 동안 반응을 진행하더라도 역반응이 거의 일어나지 않았지만 Lipozyme RM-IM은 12시간 이후 역반응이 진행되는 것으로 사료된다.

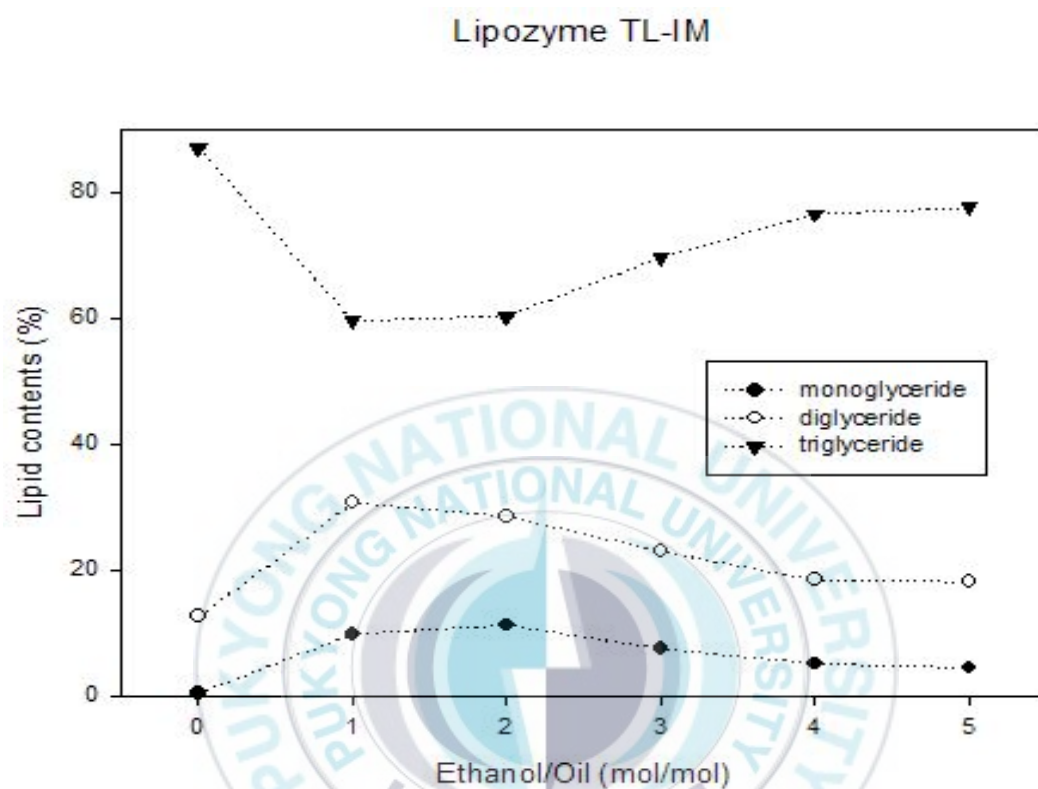


Fig. 13. Effect of ethanol content on ethanolytic of wheat germ oil in solvent-free system using immobilized lipase.

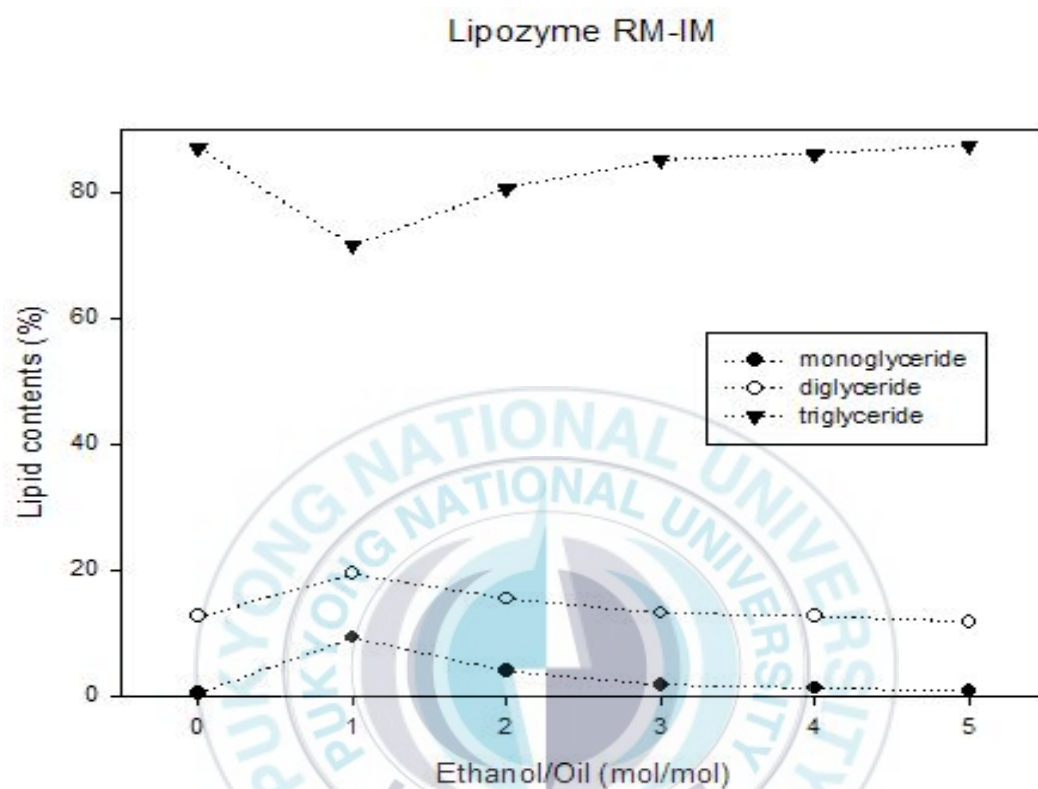


Fig. 14. Effect of ethanol content on ethanolysis of wheat germ oil in solvent-free system using immobilized lipase.

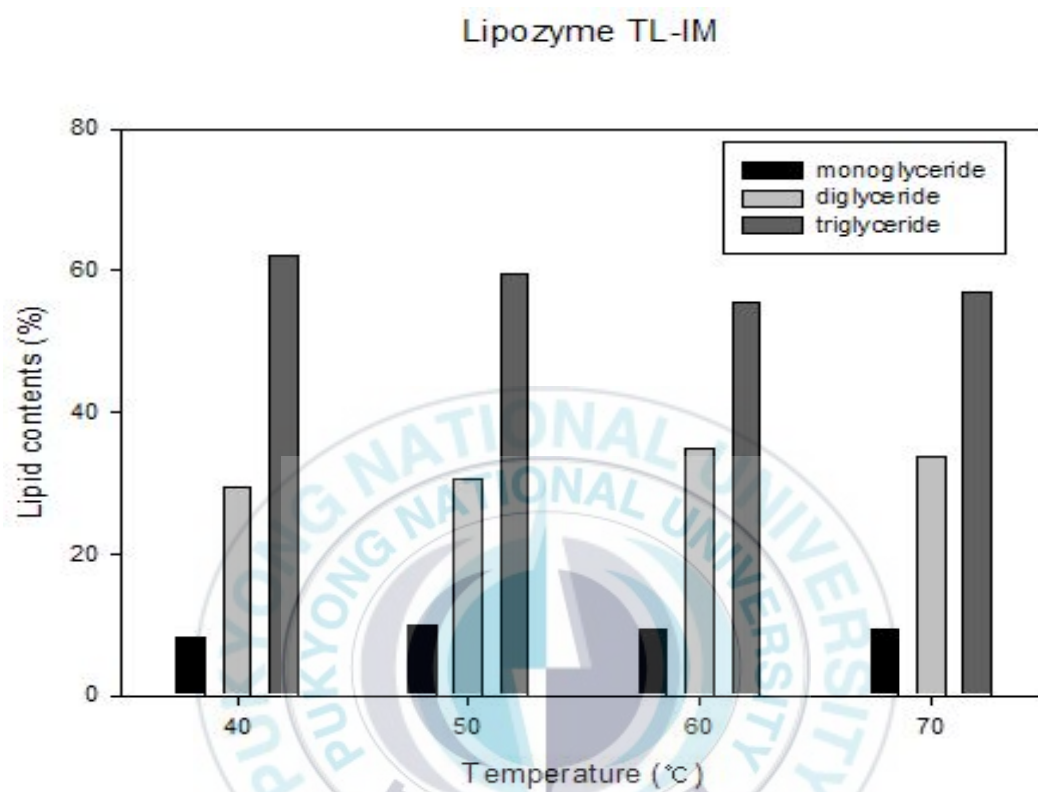


Fig. 15. Influence of temperature on the ethanolysis of wheat germ oil in solvent-free system using immobilized lipase(TL-IM) at a molar ratio ethanol/wheat germ oil of 1:1, reaction time 2h.

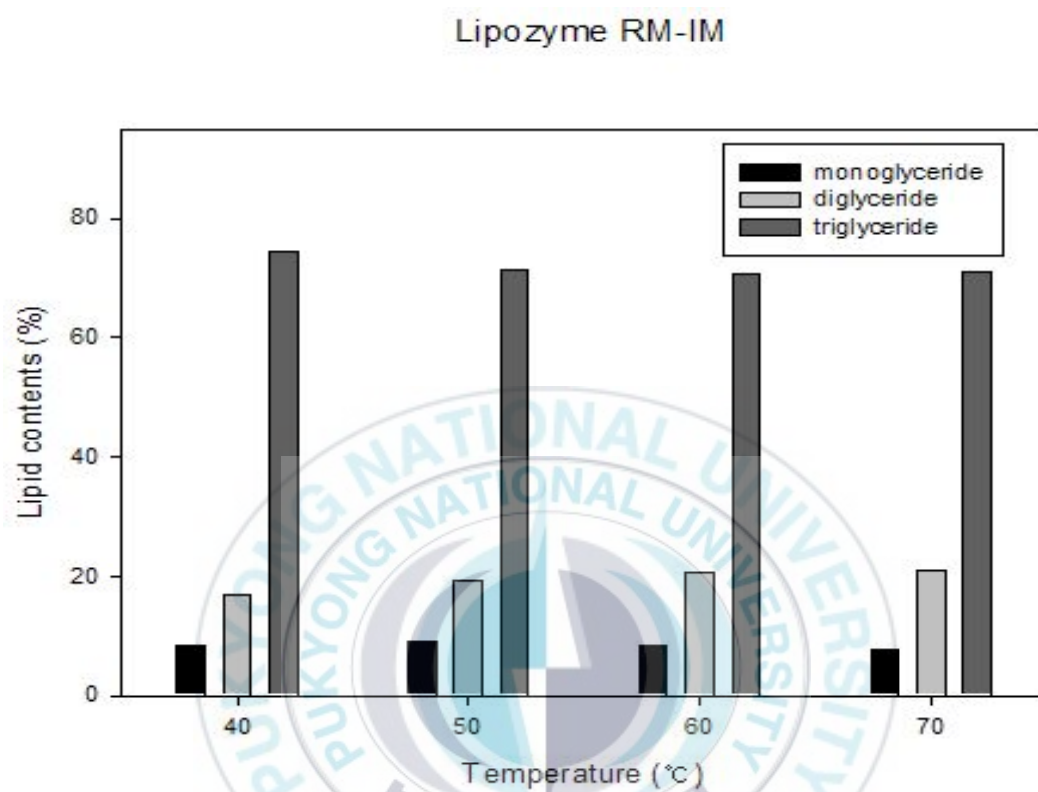


Fig. 16. Influence of temperature on the ethanolysis of wheat germ oil in solvent-free system using immobilized lipase(RM-IM) at a molar ratio ethanol/wheat germ oil of 1:1, reaction time 2h.

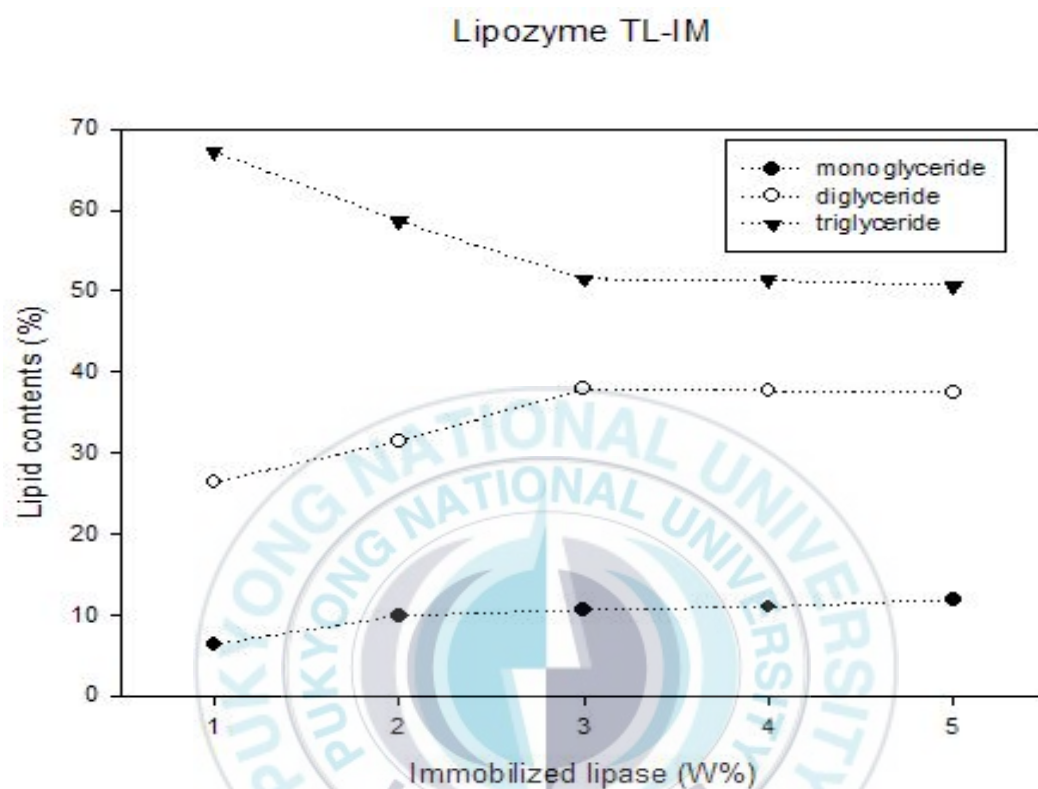


Fig. 17. Effect of the immobilized lipase content on ethanolysis of wheat germ oil in solvent-free system.

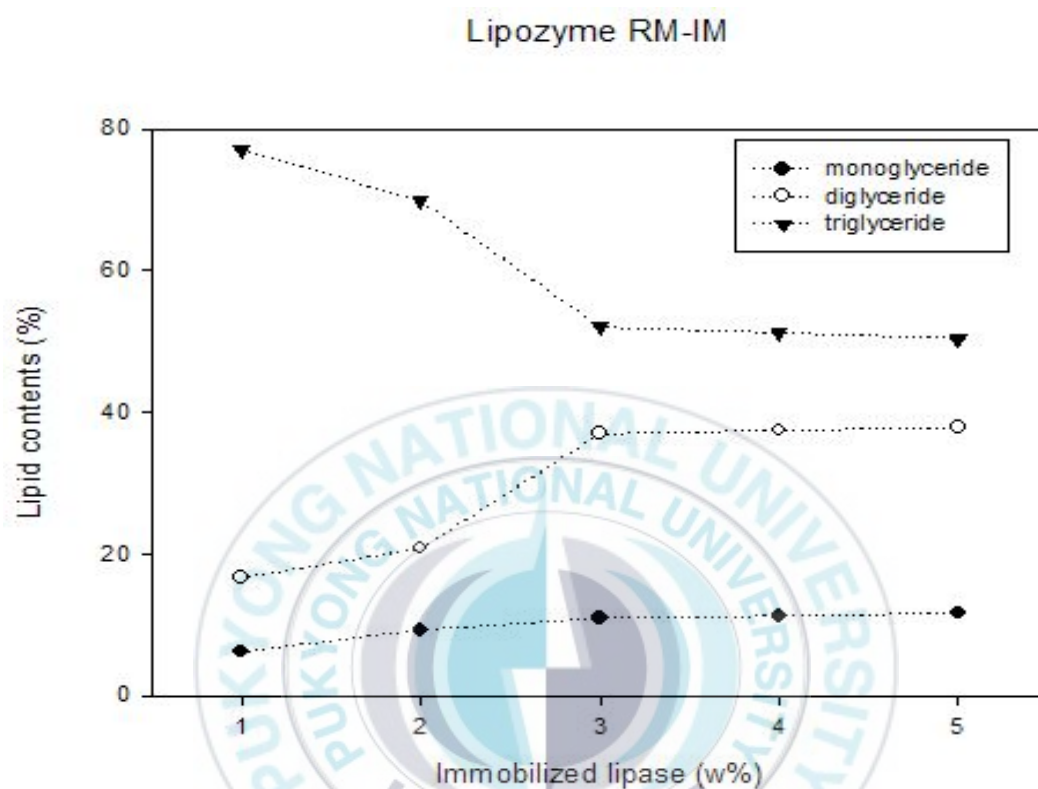


Fig. 18. Effect of the immobilized lipase content on ethanolysis of wheat germ oil in solvent-free system.

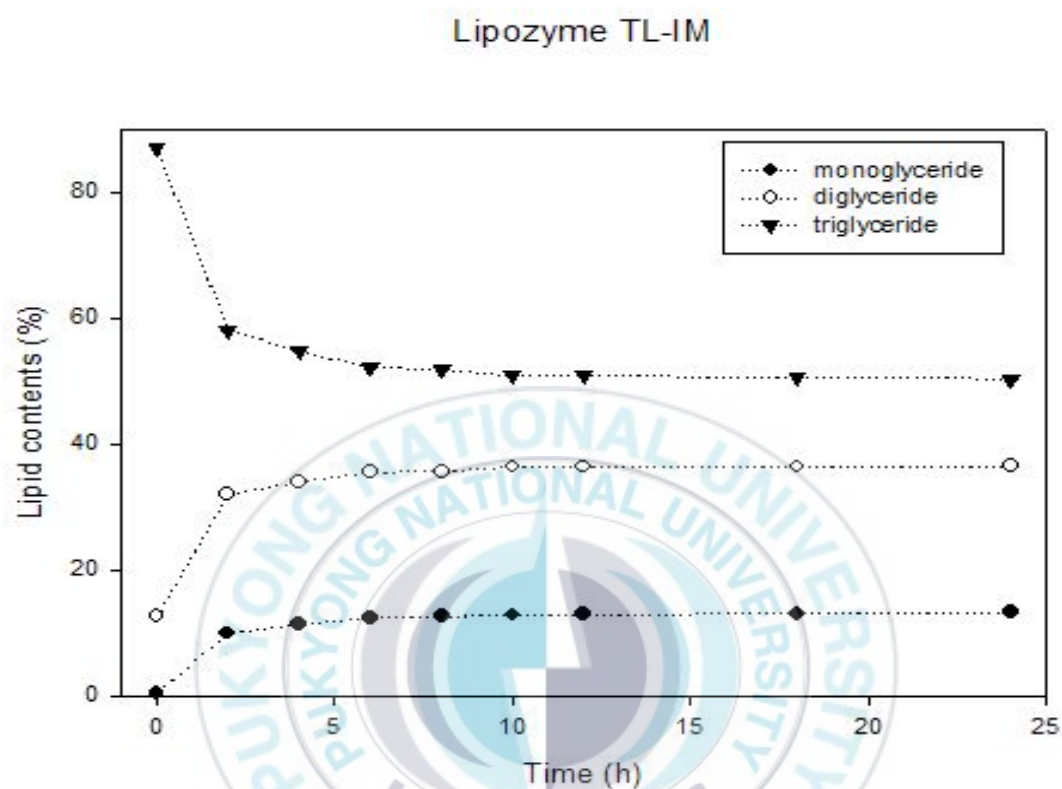


Fig. 19. Time course of the ethanolsis reaction of wheat germ oil in solvent-free system using immobilized lipase.

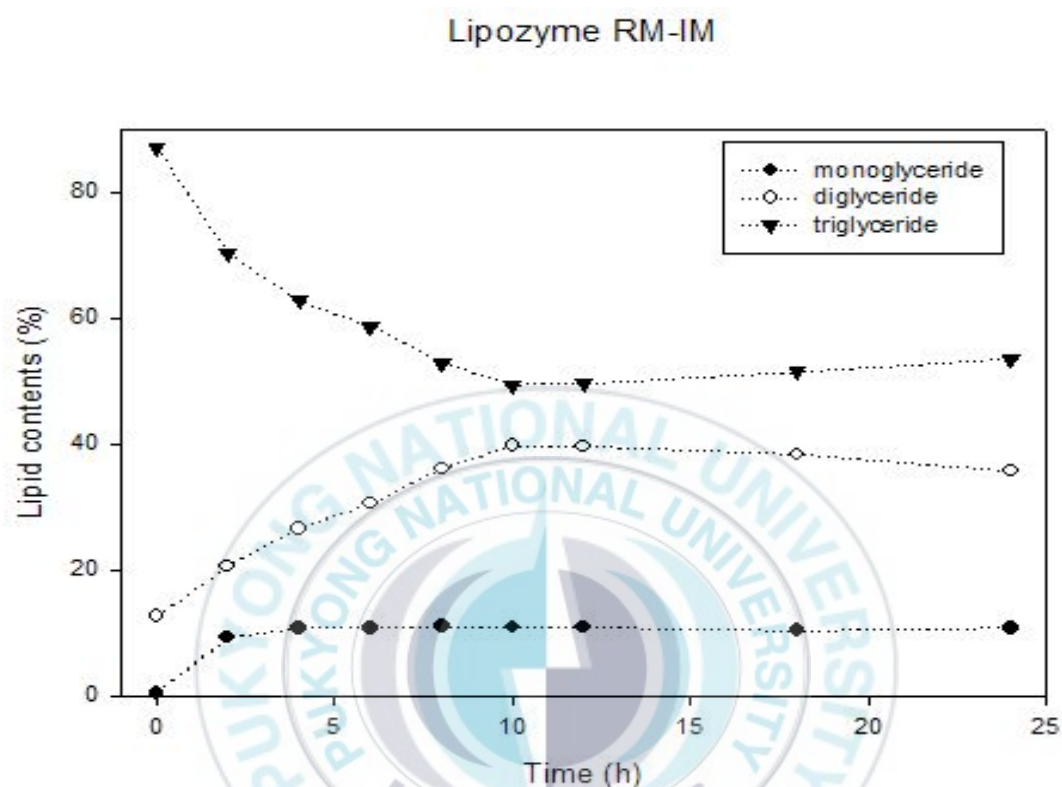


Fig. 20. Time course of the ethanolysis reaction of wheat germ oil in solvent-free system using immobilized lipase.

4. 초임계 이산화탄소를 이용한 효소적 에탄올화 반응

4.1 반응 온도의 영향

초임계 이산화탄소를 이용한 효소적 에탄올화 반응에서 온도의 영향은 Fig. 21에 나타내었다. 상압에서의 실험결과와는 다르게 반응 온도가 50℃일때 MG와 DG의 생성량이 최대였으며 60℃에서 감소하였다. 이와 같은 결과는 초임계 이산화탄소에서는 물에서 보다 증가된 열에 대한 안정성을 보이게 되며(Zaks *et al.*, 1984) 온도의존성에 대한 많은 학자들의 종합적인 연구결과를 살펴보면 보통 45-50℃에서 가장 높은 효소의 활성도를 나타내었다(Kamat *et al.*, 1995)는 연구결과와 유사하였다.

4.2 반응 압력의 영향

Fig. 21은 반응 압력에 대한 영향을 나타내었다. 반응 압력이 100 bar 일때 MG와 DG의 생성량이 최대였으며 100 bar 이상의 압력 조건에서는 MG와 DG의 생성량이 감소하는 경향이 나타났다. 임계압력을 넘어서면서 반응성이 향상된 것은 압력 증가로 인해 기질에 대한 효소의 침투가 용이해지고 기질의 용해도가 증가하여 효소와 기질 간에 유효 접촉 면적의 증가로 해석된다. 이러한 결과는 7.7-8.5MPa의 압력 범위에서 초임계 이산화탄소가 효소의 표면에 흡착되어 효소의 활성이 증가 되었다는 Yutaka (1995)의 연구결과와 유사했다. 그리고 압력조건 100bar 이상의 조건에서 MG와 DG의 생성량이 감소하는 경향은 특정 고압의 범위에서 초임계 이산화탄소가 효소 표면에 흡착되어 효소의 구성을 변화시켜 활성화를 저하시킨 것으로 사료된다(King *et al.*, 1988). 또한 초임계 이산화탄소에서 물의 용해력이 보통 7.5 MPa 보다 12-15 MPa에서 약 2-3배 증가하게 되며 증가된 용해력이 효소 주변에 필수적인 물 분자를 탈수 시켜 활성을 저하시킨 것(Zeljko *et al.*, 2001)도 한 원인으로 보인다.

4.3 반응 시간의 영향

Fig. 22는 반응시간에 따른 MG, DG, TG의 함량을 나타낸 그림이다. MG,

DG의 함량은 12시간동안 계속적으로 증가하여 MG 13.63%, DG 37.20%로 최대를 나타내었으며 이러한 결과는 상압에서 24시간동안 반응 시킨 결과 보다 높은 수치였다. MG의 함량은 24시간 동안 계속적으로 증가해 13.99%를 나타내었고 DG는 12시간 이후 역반응이 진행 되어 24시간 에는 35.38%를 나타내었다. 이와 같은 결과로 초임계 이산화탄소를 이용한 효소적 에탄올화 반응은 상압에 비해 짧은 시간에 높은 수율을 보였으며 이와 같은 결과는 초임계 이산화탄소를 이용한 전분의 효소 가수분해에 대한 연구에서 상압에 비하여 더 짧은 반응시간에 전분을 가수분해 시킬 수 있다는 Lee *et al.*(1995)의 결과와 유사하였다.



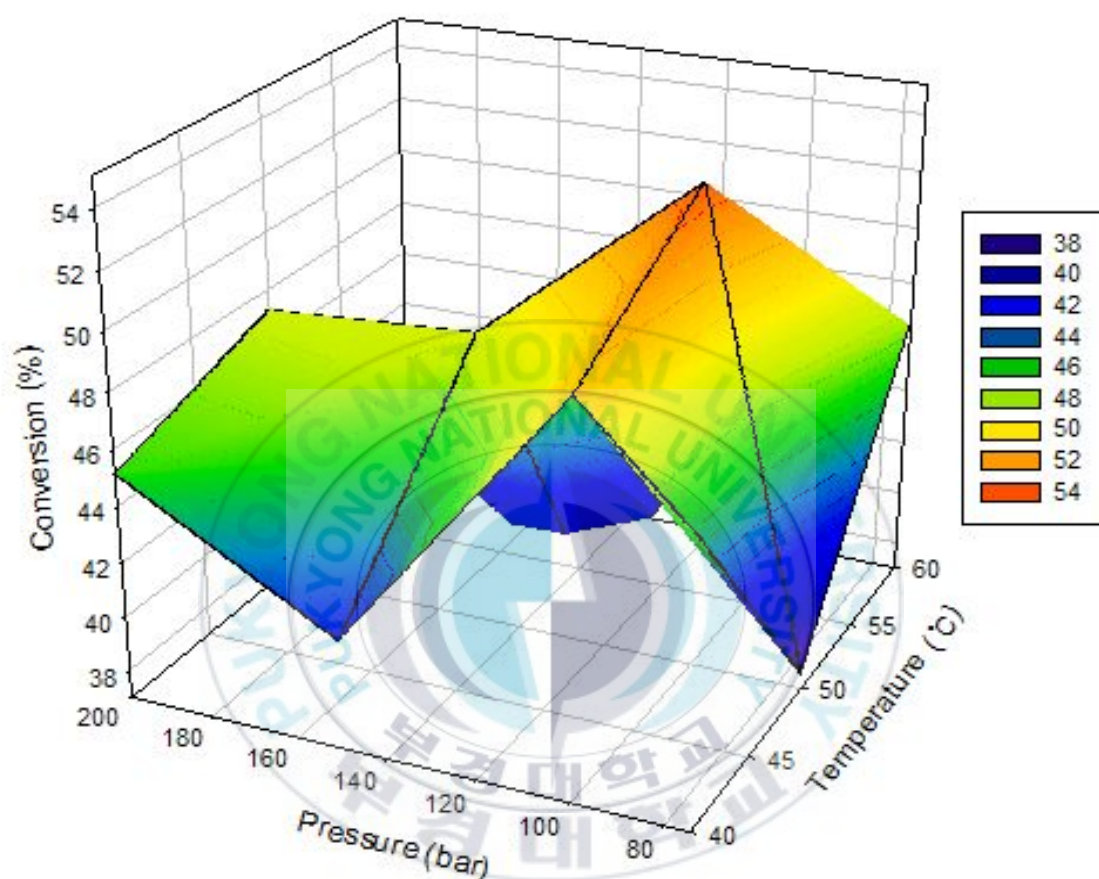


Fig. 21. Temperature and pressure course of the ethanolysis reaction of wheat germ oil in supercritical carbon dioxide system using immobilized lipase.

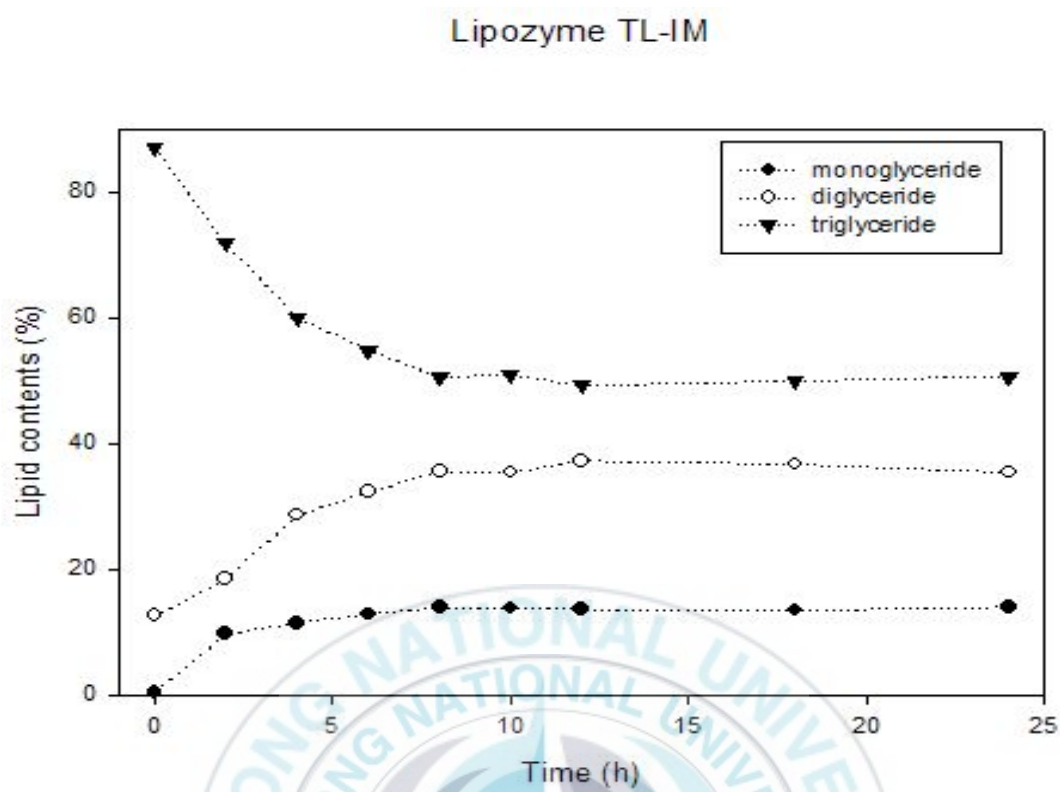


Fig. 22. Time course of the ethanolysis reaction of wheat germ oil in supercritical carbon dioxide system using immobilized lipase.

결 론

본 연구에서는 밀배아유와 고정화 효소를 상압 및 초임계 이산화탄소를 이용하여 에탄올화 반응 시키고 반응에서 전환된 TG와 생성된 MG, DG의 함량을 분석하였다. 이때 영향을 주는 주요 실험변수로 물 함량, 반응온도, 효소 사용량, 반응 시간, 효소종류 등을 변화 시켜 보다 안정적이고 효율적인 최적의 반응 조건을 고찰하였다. 또한 초임계 이산화탄소를 이용한 효소반응에서 반응온도, 반응압력, 반응시간 등을 변화시켜 상압에서의 결과와 비교분석 하였으며 결론은 다음과 같다.

1. 상압 에서는 물 함량 1배수(밀배아 5 g, ETOH 0.33 ml)에서 MG, DG의 생성 효율이 가장 높았으며 Lipozyme RM-IM은 2배수에서 현저히 감소하였다.
2. 온도의 영향은 60℃에서 MG 9.43% DG 34.92%로 최대 생성량을 나타내었고 70℃에서는 생성량이 감소하였다.
3. 효소 사용량에 따른 영향은 3%까지는 전환율이 증가 했으나 그 이후 전환율은 거의 변화가 없었다.
4. 반응 시간의 영향은 Lipozyme TL-IM을 사용한 반응에서는 24시간 동안 계속적으로 증가하였으며 Lipozyme RM-IM을 사용한 반응에서는 12시간 까지 계속적으로 증가하다가 이후에는 전환율이 조금씩 감소하였다.
5. 상압에서 밀배아유와 고정화 효소를 이용한 에탄올화 반응 시 효소의 종류에 따른 영향은 Lipozyme RM-IM보다 Lipozyme TL-IM을 사용한

반응에서 MG와 DG의 생성량이 더 높았다.

6. 상압에서의 최적 조건은 물 함량 1배수, 반응온도 60℃, 반응시간 24시간으로 나타났다.
7. 초임계 이산화탄소를 이용한 에탄올화 반응 시 온도의 영향은 반응 온도가 50℃일때 MG와 DG의 생성량이 최대였으며 60℃에서 감소하였다.
8. 초임계 이산화탄소를 이용한 에탄올화 반응 시 압력의 영향은 반응 압력이 100 bar 일때 MG와 DG의 생성량이 최대였으며 100 bar 이상의 압력 조건에서는 MG와 DG의 생성량이 감소하는 경향이 나타났다.
9. 초임계 이산화탄소를 이용한 에탄올화 반응 시 반응 시간의 영향은 MG와 DG의 함량은 12시간에서 생성량이 최대가 되었으며 상압에서 24시간동안 반응 시킨 결과 보다 높은 수치였다.
10. 초임계 이산화탄소를 이용한 효소반응의 최적 조건은 반응온도 50℃, 반응압력 100 bar, 반응시간 12시간으로 나타났다.

본 연구는 초임계 이산화탄소를 이용한 효소반응에서 상압에서의 반응보다 빠른 시간과 높은 수율을 얻을 수 있음을 제시하였고, 밀배아 유를 이용한 효소반응에서는 Lipozyme RM-IM보다 Lipozyme TL-IM이 더욱 효과적인 효소임을 알 수 있었다. 또한 초임계 이산화탄소를 이용한 효소반응에서 200 bar 이상의 압력과 60℃이상의 온도 그리고 물 함량의 변화 등 본 연구에서 수행하지 못한 조건에서의 향후 연구가 필요할 것으로 보인다.

참 고 문 헌

- Akof CC. 2002. *Food Liquids*. Chemistry, Nutrition, and Biochemistry. M. Dekker Inc., New York, NY, USA.
- AOCS. 1997. *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society*. 5th ed. Cd 11c-93. American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, USA.
- Bernard, P., D. Barth and R. M. Nicoud. 1994. Enzymatic synthesis of glycerides: A comparison between supercritical and liquid operations. *Proceeding of 3rd International Symposium on supercritical Fluids*. October 17-19. Strasbourg, France.
- Chrastil J. 1982. Solubility of Solid and Liquid Supercritical Carbon Dioxide. *J. Phys. Chem.*, 34, 3016.
- D.B. Sauer. 1992. Storage of cereal grains and their products. *American Association of Cereal Chemists, inc*. P14-22.
- De Filippi, R.P. and Vivian E. 1982. *Process for Separating Organic Liquid Solutes from their Solvent Mixtures*. 4349415 U.S. Patent.
- Dliveira, J., Vladimir Oliveira. 2001. Enztmatic alcoholysis of palm kernel oil in *n*-hexane and SCCO₂. *Journal of Supercritical fluids.*, 19, 141.
- Dumont, T., D. Barth, C. Corbier, G. Branlant and M. Perrut. 1992.

Enzymatic reaction kinetics: comparison in an organic solvent and in Supercritical Carbon Dioxide. *Biotechnol. Bioeng.*, 39, 329-338.

E. Jugermann., Swern. 1996. *Bailey's Industrial oil and Products*. Vol. 1, 675, New York, U.S.A.

Hammond, D. A., Karel, M., Klibanov, A. M. and Krukonis, V. J. 1985. *J. Appl. Biochem. Biotechnol.*, 11, 393.

Han D.S, Kwon D.Y, and Rhee J.S. 1998. Lipase-Catalyzed Reactions for Fats and Oils in Non-Polar Solvent., *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 16(3), 250-285.

Holcapek, M., Janadera, P, Fischer, J, Prokes, B. 1999. Analytical monitoring of production of biodiesel by high-performance liquid chromatography with various detection methods. *Journal of chromatography A.*, 858 13-31.

Hong J.K, Kim K.J, So W.W, Moon S.J, and Lee Y.T. 2002. Optical Resolution of Racemic Ibuprofen by *Candida Rugosa* Lipase Catalyzed esterification., *Korea J. Biotechnol. Bioeng.*, 17(6), 543-548.

Ivannova, B. and Popov, A. 1975. Stabilization of wheat germ. *Khran. Promo.*, 24 : 30.

Kamat, S. V., Beckman, E. J. and Russell A. J. 1995. Enzyme activity in supercritical fluids. *Biotechnology*, 15, 41.

- Kang ST, Yamane T. 1994. Effect of temoerature on diacylglycerol production by enzymatic solid-phase glycerolysis of hydrogenated beef tallow. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 26: 567-572.
- King, J. W., Eissler, R. L. and Friendrich, J.P. 1988. In Supercritical Fluid Extraction and Chromatography, *ACS Symp. Ser.*, 366, 63-88.
- Kwon SJ, Han JJ, Rhee JS. 1995. Production and *in situ* separation of mono- or diacylglycerol catalyzed by lipasein *n*-hexane. *Enzyme Microb. Technol.*, 17: 700-704.
- Lee J. M, Kim R. S, Kim B.O, Park Y.D, and Jin I.N. 1993. Isolation of a *Pseudomonas aeruginosa* Stain Producing an Extracellular Alkaline Lipase Catabolitely Regulated by Glucose, and Purification of the Lipase. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 21, 161-168.
- Lee JS, Jang Y, Yang TH. 1999. *Low-calorie Structured Lipids Synthesis by Enzymatic Transestrification*. Ministry of Agriculture and Forestry, Seoul, Korea.
- Lee KT, Akoh CC. 1996. Immobilized lipase-catalyzed production of structured lipids with eicosapentaenoic acid at specific positions. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73: 611-615.
- Lee, H. S., Y. W. Ryu and C. Kim. 1995. Hydrolysis of starch in supercritical carbon dioxide. *Annals of the Research Center for New Bio-Materials in Agriculture*, 4, 66-73.

Maki KC, Davidson MH, Tsushima R, Matsuo N, Tokimitsu I, Umporowicz DN, Dicklin MR, Foster GS, Ingram KA, Anderson BD, Forst SD, Bell M. 2002. Consumption of diacylglycerol oil as part of a reduced-energy diet enhances loss of body weight and fat in comparison with consumption of a triacylglycerol control oil. *Am. J. Clin. Nutr.* 76: 1230-1236.

Nakamura, K. 1994. Biological application of supercritical fluid: A comparison between supercritical and liquid operation. Proceeding of *3rd International Symposium on supercritical Fluids.*, October 17-19. Strasbourg, France.

Nakamura, K., Chi, Y. M., Tamada, Y. and Yano, T. 1986. *Chem. Eng. Commun.*, 45, 207.

Nakamura, K., Y. M. Chi, Y. Yamada and T. Yano. 1986. Lipase activity and stability in supercritical carbon dioxide. *Chem. Eng. Commun.*, 45, 207-210.

Olcott, H.S., Emerson, D.H. 1947. *J. Am. Cham. Sco.*, 591008.

Park M.H, Ryu H.J, and Oh K.K. 2004. Isolation of Lipase producing yeast and optimization of cultivation condition. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 19(2), 148-153.

Park RK., Lee KT. 2004. Synthesis and characterization of mono- and diacylglycerol enriched functional oil by enzymatic glycerolysis of

- corn oil. *Korean. Food Sci. Technol.*, 36: 211-216.
- Pasta, P., Mazzola, G., Carrea, G. and Riva, S. 1989. *Biotechnol. Lett.*, 9, 643.
- Randolph, T. W., Blanch, H. W., Prausnitz, J. M. and Wilke, C. R. 1985. *Biotechnol. Lett.*, 7, 325.
- Rosu R, Uozaki Y, Iwasaki Y, Yamane T. 1997. Repeated use of immobilized lipase for monoacylglycerol production by solid-phase glycerolysis of olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74: 445-450.
- Rosu R, Yasui M, Iwasaki Y, Yamane T. 1999. Enzymatic synthesis of symmetrical 1,3-dieacylglycerols by direct esterification of glycerol in solvent-free system. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 76: 839-843.
- Streenivasan, B. (1978), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 55, 796.
- Taniguchi, K., M. Kamihira and T. Kobayashi. 1987. Effect of treatment with supercritical carbon dioxide on enzymatic activity. *Agric. Biol. Chem.*, 51(2), 593-594.
- Taniguchi, M., Kamehara, M. and Kobayashi, T. 1987. *Agric. Biol. Chem.*, 51, 593.
- Van Eijs, A. M. N., Dejong, J. P. L., Doddema, H. J. and Lindebom, D. R. 1988. *Proc. Int. Symp. Supercritical Fluids.*, 2 (Perrut, M. ed), 933.

- Watanabe T, Sugiura M, Sato M, Yamada N, Nakanishi K. 2005. Diacylglycerol production in a packed bed bioreactor. *Process Bio-chem.*, 40: 637-643.
- Yang B, Harper WJ, Parkin KL, Chen J. 1994. Screening off commercial lipases for production of mono- and diacylglycerols from butter oil by enzymic glycerolysis. *Dairy J.*, 4: 1-13.
- Y. Shimada, Y. Watanabe, A. Sugihara, Y. Tominaga, J. Mol. Catal. B: Enzym. 2002, 17, 133
- Yutaka Ikusima., Norio Saito., Masahiko Arai and Harvy W. Blanch. 1995. *The Journal of Physical Chemistry*, 99, 8941.
- Zaks, A. and Klivabov, A.M. 1984. Enzymatic catalysis in organic media at 100°C, *Science.*, 224, 1249.
- Zeljko Knes, Maja Habulin. 2001. Compressed gases as alternative enzymatic-reaction solvent a shot review. *The journal of Supercritical Fluids.*, 23.
- Zheng, Y., H. M. Lim, J. Wen, N. Cao, N. Yu and G. T. Tsao. 1995. Supercritical Carbon Dioxide Explosion as a Pretreatment for Cellulose Hydrolysis. *Biotechnol. Lett.*, 17(8), 845-850.
- 농촌진흥청 농촌생활연구소 : 식품성분표. p.20-21, 434-435, 532-533, 582(1996)

표영희 : 소맥배아유의 산화안정성. 대한가정학회지, 28(4), p.37~43(1991)



감사의 글

먼저 28년의 삶 동안 제게 많은 힘과 용기를 주신 아버지와 언제나 가족을 위해 노력하시는 어머니, 항상 제 뒤에서 말없이 저를 도와주는 누나와 매형 그리고 형님과 형수에게 먼저 고마움을 전합니다.

석사과정동안 많은 지도와 관심을 가져주신 지도교수 전병수 교수님께 깊이 감사드립니다. 또한, 바쁘신 와중에도 귀중한 시간을 내주시어 논문에 대한 충고를 해주신 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.

항상 실험실의 형으로 많은 도움을 주신 현석이형과 상규형에게 감사의 마음을 전하며 후배로서 그리고 친구로서 많은 도움을 준 명균이 에게도 감사의 마음을 전합니다. 아울러 항상 큰형님처럼 때론 삼촌처럼 자상하게 대해주셨던 한정호 박사님, 강길윤 박사님, 강희문 소장님, 언련이 누나에게 감사의 말씀을 드립니다.

석사 2년 동안 많은 도움을 아끼지 않으셨던 부산 식약청에 김우성 연구관님, 김형수 선생님, 정서정 선생님, 신승정 선생님께 감사드립니다.

그리고 같이 생활하면서 대학원 생활을 아름다운 추억으로 만들어준 병욱이, 지연이, 민경이, 언미, 태석이, 형구, 현태, 주연이, 영란이, 영제, 그리고 군에 있는 현민이, 준호, 준구 에게 앞으로 밝은 미래가 오기를 바랍니다.

이밖에도 저를 아는 모든 분들께 이제까지의 제 삶에 영향을 준 것에 대해서 깊은 감사의 마음을 전하며, 항상 건강하시고 웃음을 잃지 않으시길 바랍니다.

다시 한 번 이제까지의 제 삶에 저의 정신적 지주이신 아버지와 어머니, 또한 누나와 매형에게 머리 숙여 감사의 마음을 전하며 이 글을 마칩니다.

2008년 2월

백 성 신