

## 초임계 이산화탄소에서 밀배아유의 효소적 에탄올화 반응 특성

백성신 · 권경태 · 정고운 · 안항민 · 심정은 · 강희문 · 전병수<sup>†</sup>

부경대학교 식품공학과  
608-737 부산시 남구 대연 3동 595-1  
(2009년 6월 8일 접수, 2009년 8월 18일 채택)

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

Sung-Sin Back, Kyung-Tae Kwon, Go-Woon Jung, Hyaung-Min Ahn, Jeong-Eun Sim, Hee-Moon Kang and Byung-Soo Chun<sup>†</sup>

Faculty of Food Science and Biotechnology, Pukyong National University, 595-1 Deayon-3 dong, Nam-gu, Busan 608-737, Korea  
(Received 8 June 2009; accepted 18 August 2009)

#### 요 약

이번 연구에서는 밀배아유의 기능성 향상을 위해 고정화 효소를 이용한 밀배아유의 효소적 에탄올 반응을 수행했고, 효소적 에탄올 반응의 비가압조건과 가압조건을 중점적으로 비교 분석했다. 비가압조건 효소적 에탄올 반응 수행은 밀배아유와 99.9% 에탄올 혼합물에 두 가지 고정화 효소인 Lipozyme TL-IM과 Lipozyme RM-IM를 1~5 w%(밀배아 기준 무게비)로 25 ml 플라스크에 shaking machine 상에서 40~70 °C, 120 rpm 조건으로 실험을 수행했다. 가압조건상에서의 효소적 에탄올 반응 조건은 고정화 효소 2 w%, 반응 시간 24시간, 반응 온도 40~60 °C 및 반응 압력 75, 100, 150, 200 bar으로 수행했다. 실험으로부터 회수된 sample은 트리글리세라이드의 분해 정도를 살펴보기 위해 모노-, 디-, 트리글리세라이드를 HPLC를 이용하여 분석했다. 밀배아유의 전반적인 전환율은 반응온도와 고정화 효소의 농도에 따라 증가했고, 최적 반응 조건은 가압조건 50 °C, 100 bar이었다.

**Abstract** – Enzymatic ethanolysis of wheat germ oil with immobilized lipase was investigated for enhancing the function of wheat germ oil. 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 99.90% ethanol using 1~5 wt% immobilized lipase as Lipozyme TL-IM and Lipozyme RM-IM and the reaction mixtures were incubated at 40~70 °C with 120 rpm shaking. In pressurized system, the enzymatic ethanolysis was carried out at various condition; immobilized lipase concentration(2 wt%), reaction time(24 h), 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 relied on the reaction temperature and the concentration of immobilized lipase. The optimum condition of enzymatic ethanolysis in non-pressurized and pressurized systems was at 50 °C and 100 bar.

Key words: Wheat Germ Oil, Supercritical Carbon Dioxide, Immobilized Lipase, Enzymatic Ethanolysis, Monoglyceride, Diglyceride, Triglyceride, HPLC

#### 1. 서 론

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[1].

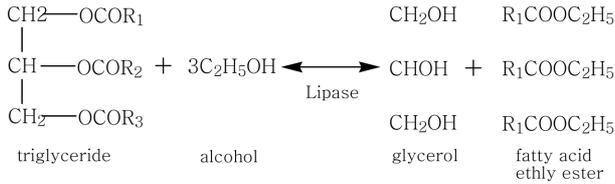
밀배아의 일반적인 성분으로는 수분 9.20%, 회분 4.10%, 지방 9.70%, 단백질 27.90%이고, 그 외에 섬유소 2.10%와 소량의 무기질을 포함하고 있으며, 비타민 E가 12.70% 함유되어 있다[2]. 밀배아와 같은 이러한 기능성 식품소재의 개발이 최근 급속히 진행되고 있으며 특히 생체 내에서 기능적 특성을 가지는 유지류를 생산하기 위하여 일반적인 유지로부터 제조된 유지(structured lipid)는 기술과 고기능성 유화제에 대한 관심이 고조되면서 유화제 시장의 품질개량 및 새로운 기능성이 포함된 제품생산을 위한 연구가 활발히 진행되고 있으며[3], 체중개선 기능성 유지로 이용될 수 있는 diglyceride(DG) 함유 유지가 화학적 합성을 통해 생산되어

<sup>†</sup>To whom correspondence should be addressed.

E-mail: bschun@pknu.ac.kr

<sup>‡</sup>이 논문은 부산대학교 박상욱 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

시판되고 있다[4,5]. DG와 monoglyceride(MG)는 글리세롤 한 분자에 각각 2와 1개의 지방산이 결합되어 있는 형태로 triglyceride (TG)보다 친수성을 가지고 있어 식품의 유향제 및 계면활성제 등으로 사용되고 있다[6]. 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[7,8] 이러한 DG 및 MG 함유 유지를 생성하기 위해서 다양한 화학적 및 생물학적 에스테르 교환반응이 시도되고 있다[9].



일반적으로 DG, MG는 220 °C 이상의 높은 온도와 금속 촉매 또는 알칼리 촉매를 이용한 조건에서 식용 유지를 과량의 글리세롤과 반응시켜 화학적 에스테르교환 반응(transesterification)에 의해 생산된다[10]. 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[11,12]. 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[10,13]. 또한 기존의 반응 및 추출에 사용되는 유기용매가 인체에 미치는 해독성과 다단계의 분리공정에 의한 생성물질의 변성 및 수율저하 등 많은 문제점이 제기되고 있다[12]. 따라서 가능한 한 단일공정으로서 의약품 및 생리활성 물질의 활성도에 영향이 없는 완벽한 잔여유기용매 제거공정의 개발이나 유기용매의 사용자체를 배제한 새로운 분리기술의 개발이 요구되고 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 유체로서 기존의 액체 반응매질에 비하여 높은 내부 물질전달 속도, 반응선택성과 생성물분리의 용이함, 생 활성 물질 등에 적합한 조작조건(CO<sub>2</sub>의 경우 31 °C, 73 bar), 생성물 내 잔여용매의 완전제거 등의 장점을 가져 1980년대 중반 이후 초임계 유체의 가능성을 검토하기 위하여 초임계 유체 내에서의 가수분해반응, 산화반응, 알코올 분해반응, 트랜스에스테르화반응 등에 관한 연구가 진행되고 있다[14-18].

따라서 본 연구에서는 독특한 물성 가진 초임계 이산화탄소를 반응매질로 사용하고 고정화 효소와 반응물질의 농도변화에 따른 밀배아유의 에스테르화 반응의 최적조건을 도출하고자 한다.

## 2. 실험

### 2-1. 재료

실험에 사용된 밀배아유는 wheat germ oil(Sigma, USA)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 99.99%를 사용하였으며 TG, DG, MG의 정성분석을 위하여 표준물질 Mono- Di- and Triglyceride Mix(Supelco, USA)을 구입하여 사용하였다. 이동상으로 사용한 헥산, 이소프로판올, 메탄올은 B&J사의 순도 99.99%를 이용하였으며 Whatman사의 nylon membrane filter(pore size=0.2 μm)로 여과하여 사용하였다.

### 2-2. 실험방법

2-2-1. 비용매상(solvent-free)에서 고정화 효소를 이용한 밀배아유의 효소적 에탄올화 반응

본 실험에서 사용된 식물성 기름인 밀배아유의 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(1~5배수), 온도

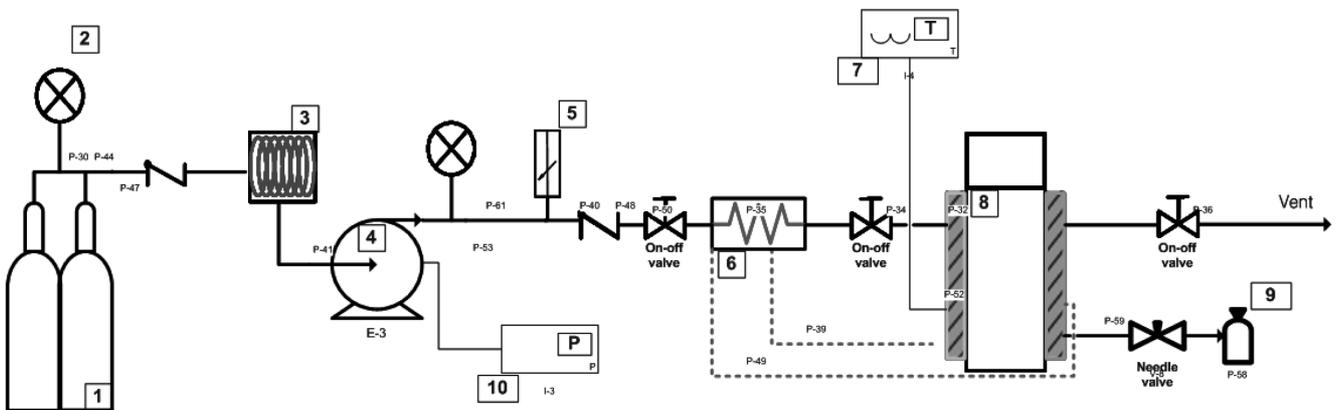


Fig. 1. Schematic diagram of the apparatus for enzymatic ethanolysis in supercritical carbon dioxide.

- 1. CO<sub>2</sub> tank
- 2. Pressure gauge
- 3. Cooling bath
- 4. Main pump
- 5. Safety valve
- 6. Heat exchanger
- 7. Electric thermometer
- 8. Reactor
- 9. Sample collector
- 10. Pump controller

(40~70 °C), 효소량(1~5% w/w), 반응시간(1~24시간)을 변화시켜 에탄올화 반응을 수행하였다. 밀배아유의 분자량은 GC(Hewlett Packard 5890II) 분석을 통해 얻어진 지방산 분석 결과로부터 863.3 g/mol로 하였다. 비용매상(solvent-free)에서의 모든 실험은 25 ml의 삼각플라스크에 밀배아유와 효소 및 에탄올의 주입 후 shaking incubator에서 120 rpm의 속도로 반응하였다. 반응이 완료된 반응물은 효소분리를 위하여 filtration 후 sampling하였다.

2-2-2. 초임계 이산화탄소 상에서 밀배아유의 효소적 에탄올화 반응  
본 실험에서 사용된 실험 장치는 Fig. 1과 같다. 탱크로부터 나온 이산화탄소는 냉각기를 통해 액화되며 액화된 유체는 고압펌프(Thar Design, USA)를 통해 반응기로 유입되었다. 반응은 비용매상(solvent-free)에서의 실험조건과 동일하게 수행되었으며 압력은 75, 100, 150, 200 bar 조건에서 수행하였다. 반응기는 스테인리스-316으로 제작되었고 내부부피 55 ml(내경 2.5 cm, 높이 11.2 cm)이며 반응기 상, 하부는 강화유리로 설계되어 내부를 볼 수 있게 하였다. 반응기 내의 압력은 고압밸브를 사용하여 조절하였으며, 반응기 내부는 magnetic stirring bar로 교반하였다. 반응기 내부의 온도는 K-type 온도계를 통해 측정하였고 온도제어장치(FLUKE, USA)를 사용하여 제어하였다. 반응 후 샘플은 filtration 후 -15 °C 냉동고에 보관하였다.

2-2-3. Adsorption Chromatography를 이용한 유지의 정성분석  
본 실험은 HPLC분석에 필요한 TG, DG, MG의 구간을 설정하는데 선행되어야 하는 실험이며 AOCS(Cd 11c-93; D. Firestone, 1997) 분석방법을 참고하여 실행되었다. 실험에 사용된 컬럼은 내경 2 cm, 높이 10.50 cm이며 펌프는 Lab Alliance사의 seriesII를 이용하였다. 시료는 밀배아유 5 g을 Lipozyme TL-IM 0.10 g을 이용하여 60 °C, 120 rpm에서 17시간 동안 반응한 것을 사용하였다. 컬럼에 silica gel을 충전하기 위해 10 g의 silica gel을 20 ml의 petroleum ether에 넣어 현탁액을 만들고 컬럼에 주입 후 petroleum ether가 모두 흘러내릴 수 있도록 하였다. 다음 시료 0.30 g을 chloroform 1 ml에 녹인 후 컬럼 상단에 주입하였다. 이동상의 유량은 2 ml/min으로 설정하였으며 용매 조건은 Table 1과 같다. 이후 컬럼을 통과한 용매를 분별 분취하고 분취한 용매는 농축기를 이용해 농축하였다. 시료는 0.05 g을 2-propanol: hexane 5:4(v/v) 1ml에 녹여 PTFE syringe filter(25 mm, 0.2 µm, Whatman, USA)를 이용하여 여과시킨 후 HPLC로 분석하였다.

#### 2-2-4. HPLC를 이용한 정성분석

TG, DG, MG의 정성·정량 분석을 위하여 HPLC(Waters, Waters 600E, USA)를 사용하였으며 column은 Atlantis® dC18 5 µ(4.6×150 mm, Waters, USA)를 사용하였다. 검출기는 UV Detector(Waters 484, USA)를 사용하였으며 HPLC의 분석 조건은 Holcapek 등[19]

**Table 1. Operation condition of Adsorption Chromatography with Silica gel column for analysing lipid mixture**

|              |  |
|--------------|--|
| Instrument   | : EYELA DC-1200                                  |
| Control pump | : Lab Alliance Model series II                   |
| Column       | : 2 cm×10.5 cm (Lab Alliance)                    |
| Sample       | : 1 g of lipid mixture/30 ml of chloroform       |
| Condition    | : solvent flow rate : 2.0 ml/min                 |
|              | Fraction I 10% diethyl ether in petroleum ether  |
|              | Fraction II 25% diethyl ether in petroleum ether |
|              | Fraction III 100% diethyl ether                  |

**Table 2. Operation condition of HPLC with UV detector (at 205 nm)**

|                  |   |          |                              |
|------------------|---|----------|------------------------------|
| Instrument       | : Waters 600E                           |          |                              |
| Column           | : Atlantis® dC18 5 µ 4.6×15 cm (Waters) |          |                              |
| Column temp      | : Room temp                             |          |                              |
| Injection volume | : 20 µl                                 |          |                              |
| Detector         | : UV Detector (Waters)                  |          |                              |
| Condition        | : flow rate : 1.0 ml/min                |          |                              |
|                  | time                                    | methanol | isopropane-hexane (5:4, v/v) |
|                  | 0                                       | 100      | 0                            |
|                  | 15                                      | 50       | 50                           |
|                  | 25                                      | 50       | 50                           |
|                  | 30                                      | 100      | 0                            |

을 참조하였으며 Table 2에 나타내었다. 컬럼 온도는 40 °C로 설정하였고 methanol(용매A)과 2-propanol : hexane(5:4, v/v)(용매B)을 이동상으로 사용했으며 유속은 1 ml/min이었다. 시료 주입 후 15분 동안 용매A와 B를 0:100에서 50:50(v/v)로 변화시켰고 15분에서 25분까지 유지시켰다. 25분부터 5분간 용매 A와 B를 0: 100(v/v)으로 변화시켰으며 총 진행시간은 30분이었다. 각각의 시료 30 µL를 용매A 1 mL에 희석하고 PTFE syringe filter를 이용하여 여과시킨 후 20 µl 주입하여 분석하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3-1. 밀배아유의 정성분석

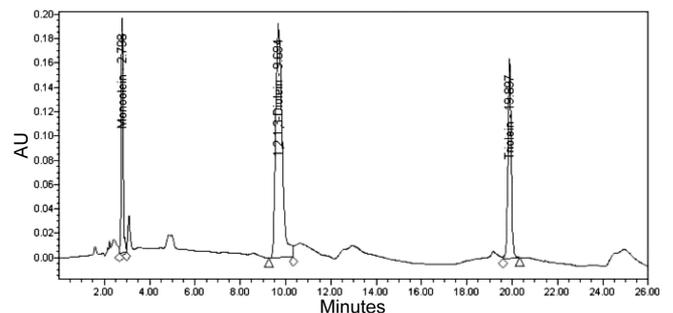
실리카겔 컬럼을 이용한 Mono-Di-and Triglyceride Mix의 HPLC 분석결과를 Fig. 2에 나타내었다. 그 결과 Monoolein 2.7 min, Diolein 9.7 min, Triolein 19.9 min의 retention time(RT)을 가졌으며 다음과 같은 결과는 분취하여 나온 시료들의 구간을 정하는데 중요한 지표가 되었다. 10분 이전의 RT 값을 가지는 피크는 소량의 MG, DG, ester 등으로 사료된다. 분석결과 각각의 RT 값은 MG 2~3분, DG 6~11분, TG 16~26분으로 설정하였으며 Fig. 3에 나타내었다.

반응 전, 후 밀배아유의 chromatogram은 Fig. 4에 나타내었다. 반응 후 TG의 함량은 감소했으며 MG, DG, ester의 함량은 현저하게 증가했다. 모든 반응에서의 결과는 전체 w%로 환산하여 분석하였다.

### 3-2. 비용매상(solvent-free)에서 밀배아유의 효소적 에탄올 반응 특성

#### 3-2-1. 에탄올의 영향

밀배아유와 에탄올의 몰 함량에 따른 영향은 Fig. 5에 나타내었다. Lipozyme TM-IM을 사용한 경우 에탄올 몰 함량 1배수에서



**Fig. 2. Retention times of lipid standards in HPLC-UV (at 205 nm).**

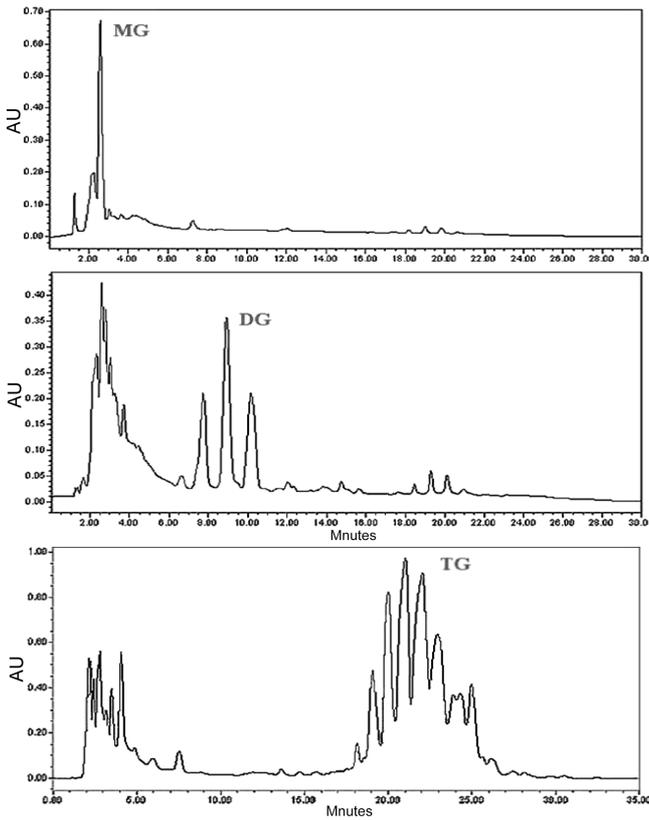


Fig. 3. HPLC-analysis of lipid mixture separated by Adsorption Chromatography.

MG는 0.44에서 9.84%, DG는 12.55에서 30.63%로 증가하였고 TG는 87.00에서 59.52%로 감소하여 최대 전환율을 나타내었으며 기질인 에탄올이 증가함에 따라 반응함량은 감소하였다. Lipozyme RM-IM에서도 마찬가지로 1배수에서 전환율이 최대였으며 MG는 0.44에서 9.23%, DG는 12.55에서 19.35%로 증가하였고 TG는 87에서 71.42% 감소하였다. 이상의 결과에서 알 수 있듯이 Lipozyme TL-IM과 Lipozyme RM-IM 모두 몰 함량 1배수에서 최대 전환율을 보였으며 Lipozyme RM-IM은 에탄올 함량이 증가함에 따라 반응이 급격히 감소하였다. 이러한 현상은 효소가 에탄올의 영향을

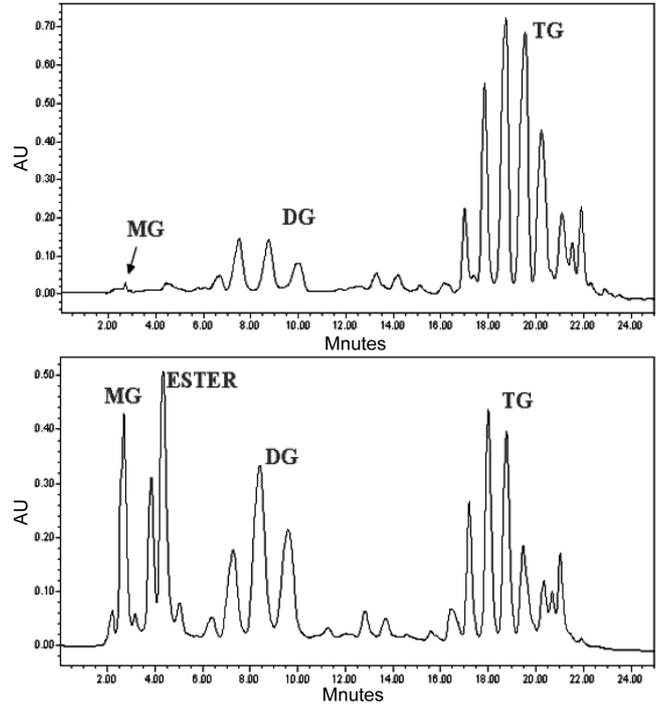


Fig. 4. Characteristic of enzymatic ethanolysis at T=60 °C, 120 rpm, 2 w% of Lipozyme TL-IM, 24 h.

받아 불활성화(dead-end inhibition)됨에 따라 반응성이 저해되는 것으로 보이며 Shimada 등[20]의 결과와 유사하였다.

3-2-2. 반응 온도의 영향

Fig. 6는 고정화 효소와 온도에 따른 TG, DG, MG의 생성량을 나타내었다. Lipozyme TL-IM를 이용한 반응에서 40 °C의 경우 MG 8.31%, DG 29.43%, 50 °C에서 MG 9.84%, DG 30.63%로 나타났으며 60 °C에서 MG 9.43% DG 34.92%, 70 °C에서 MG 9.32%, DG 33.83%였다. 이와 같은 결과는 40부터 60 °C까지 TG의 전환율이 계속 증가하여 60 °C에서 최대 전환율을 나타내었고 70 °C에서 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 경향은 60 °C까지는 온도에 따른 반응성이 증가하지만 70 °C 이상에서는 효소의 활성이 저해된 것으로 보이며, Lipozyme TL-IM이 Lipozyme RM-IM보다

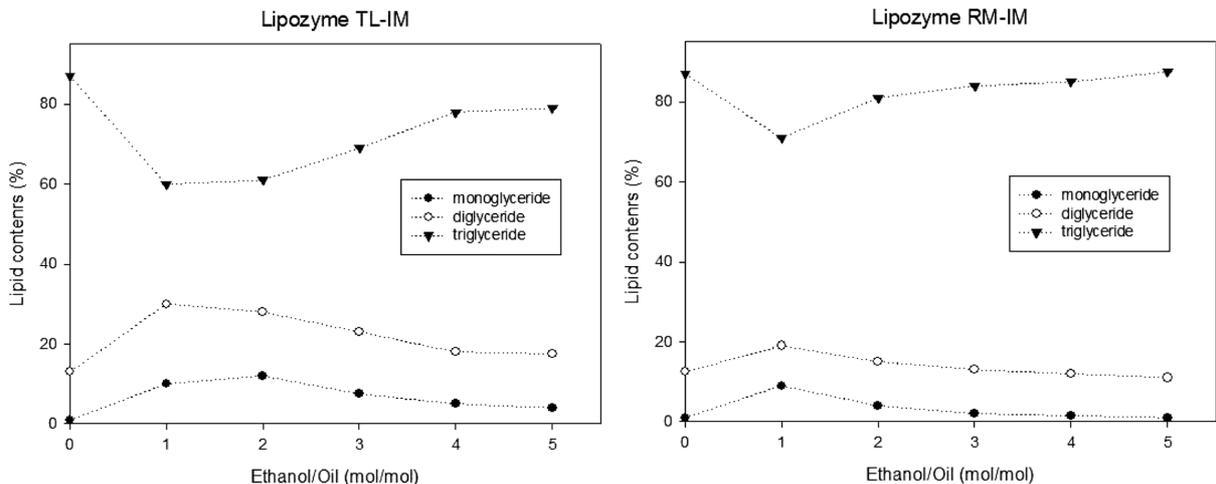


Fig. 5. Effect of ethanol mole ratio to wheat germ oil in conventional solvent-free system at T=60 °C, 120 rpm, 2 w% of lipase, 2 h.

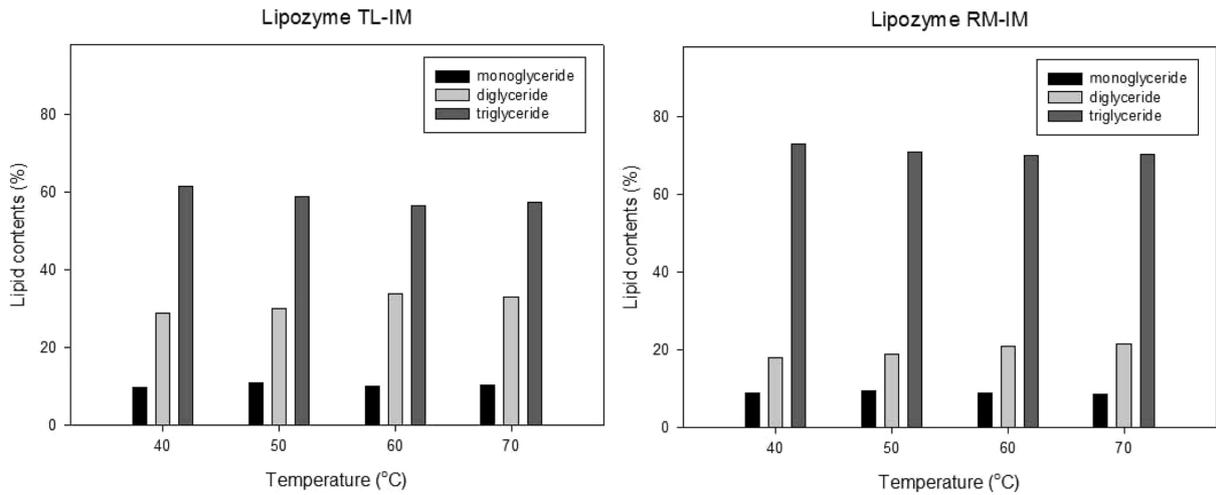


Fig. 6. Effect of temperature on enzymatic ethanolysis (ethanol mole ratio=1.0, 120 rpm, 2 h).

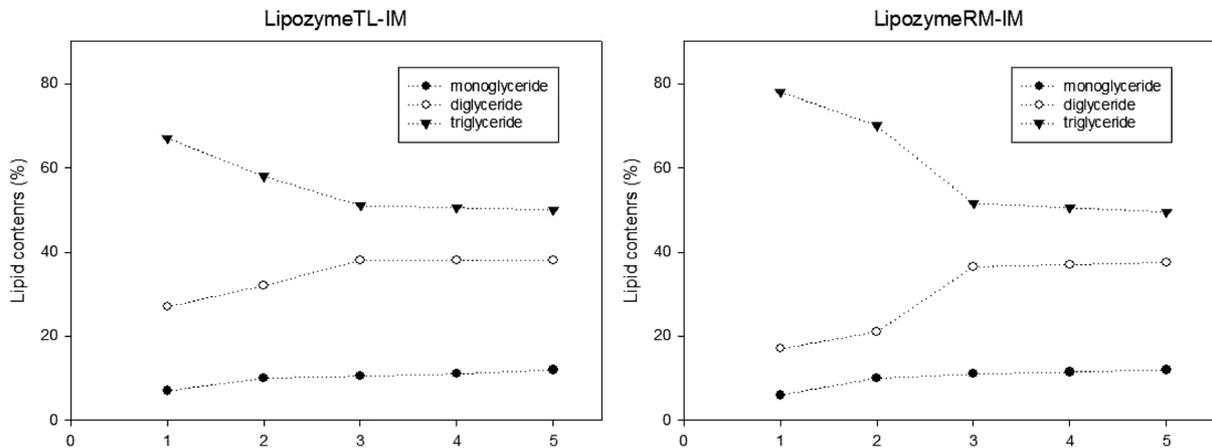


Fig. 7. Characteristics of enzyme load on ethanolysis in conventional solvent-free system at  $T=60^{\circ}\text{C}$ , 120 rpm, ethanol mole ratio=1.0, 2 h.

높은 전환율을 보였다.

### 3-2-3. 효소 사용량 및 반응 시간의 영향

효소 사용량에 따른 TG, DG, MG의 함량을 나타낸 그림은 Fig. 7에 나타내었다. Lipozyme TL-IM과 Lipozyme RM-IM 모두 효소 사용량이 3% 이상까지는 전환율이 증가했으나 그 이후 전환율은 거의 변화가 없었다. 이러한 결과는 효소적 에탄올화 반응시 효소 사용량을 3% 이상 첨가하더라도 MG나 DG의 수율에는 큰 영향을 주지 않는 것을 확인할 수 있었다.

Fig. 8은 반응시간에 따른 TG, DG, MG의 함량을 나타낸 그림이다. Lipozyme TL-IM을 사용한 반응에서는 24시간 동안 계속적으로 증가하여 MG 13.30%, DG 36.42%, TG 50.30%로 전환되었다. Lipozyme RM-IM을 사용한 반응에서는 12시간까지 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% 전환되었다. 이러한 결과는 Lipozyme TL-IM은 24시간 동안 반응을 진행하더라도 역반응이 거의 일어나지 않았지만 Lipozyme RM-IM은 12시간 이후 역반응이 진행되는 것으로 사료된다.

### 3-2-4. 초임계 이산화탄소를 이용한 효소적 에탄올화 반응

초임계 이산화탄소를 이용한 효소적 에탄올화 반응에서 온도와

압력의 영향은 Fig. 9에 나타내었다. 비용매상에서의 실험결과와는 다르게 반응 온도가  $50^{\circ}\text{C}$ 일 때 MG와 DG의 생성량이 최대였으며  $60^{\circ}\text{C}$ 에서 감소하였다. 이와 같은 결과는 초임계 이산화탄소에서는 증가된 열에 대한 안정성을 보이게 되며 이는 보통  $45\sim 50^{\circ}\text{C}$ 에서 가장 높은 효소의 활성도를 나타내는 Zaks과 Klivabov[21], Kamat 등[22]의 결과와 유사하였다. 반응 압력에 대한 영향은 압력이 100 bar일 때 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 77~85 bar의 압력 범위에서 초임계 이산화탄소가 효소의 표면에 흡착되어 효소의 활성이 증가되었다는 Yutaka[23]의 연구결과와 유사했다. 그리고 압력조건 100 bar 이상의 조건에서 MG와 DG의 생성량이 감소하는 경향은 특정 고압의 범위에서 초임계 이산화탄소가 효소 표면에 흡착되어 효소의 구성을 변화시켜 활성화를 저하시킨 것으로 사료된다[24]. 또한 Zeljko과 Maja[25]의 보고와 같이 초임계 이산화탄소에서 물의 용해력이 보통 75 bar보다 120~150 bar에서 약 2~3배 증가하게 되며 증가된 용해력이 효소 주변에 필수적인 물 분자를 탈수시켜 활성을 저하시킨 것도

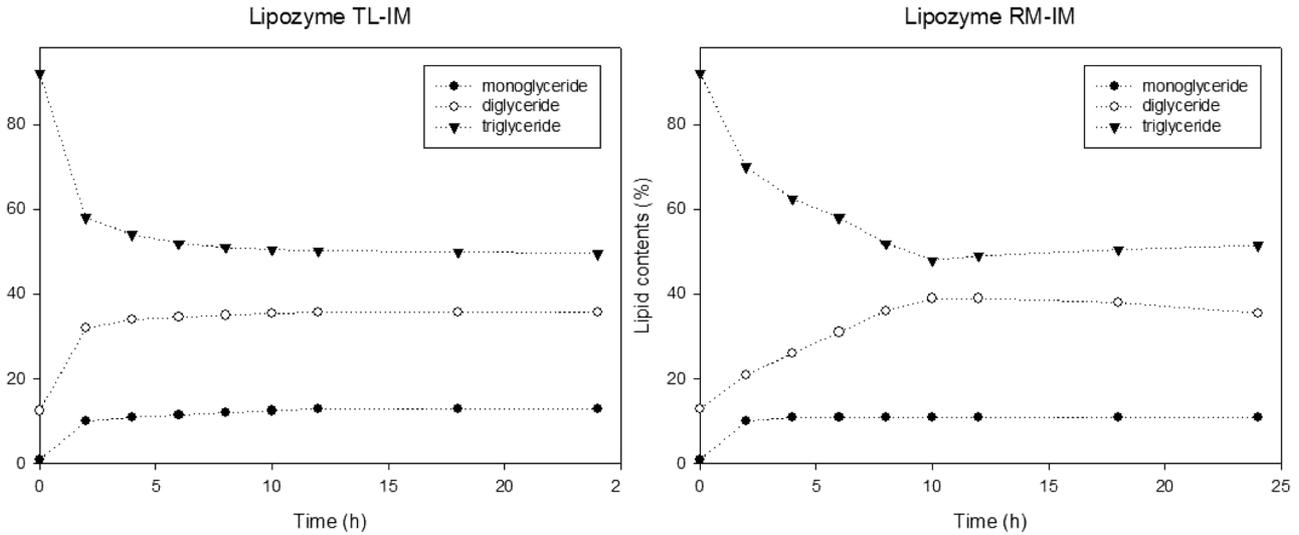


Fig. 8. Characteristic of enzymatic ethanolysis in conventional solvent-free system at T=60 °C, 120 rpm, 2 w% of lipase, ethanol mole ratio=1.0.

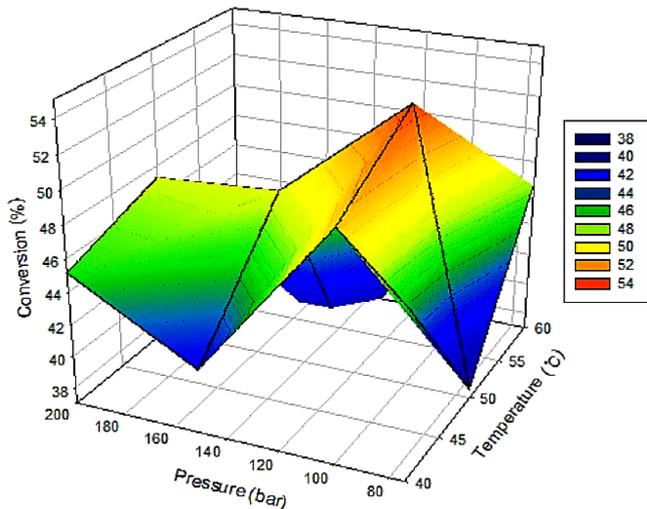


Fig. 9. Characteristic of enzymatic ethanolysis in supercritical carbon dioxide system at 120 rpm, 2 w% of lipase, ethanol mole ratio=1.0.

한 원인으로 보인다.

Fig. 10은 반응시간에 따른 MG, DG의 함량은 12시간 동안 계속적으로 증가하여 MG 13.63%, DG 37.20%로 최대를 나타내었으며 이러한 결과는 비용매상에서 24시간 동안 반응시킨 결과보다 높은 수치였다. MG의 함량은 24시간 동안 계속적으로 증가해 13.99%를 나타내었고 DG는 12시간 이후 감소하여 24시간에는 35.38%를 나타내었다. 이러한 결과는 비용매상에서의 효소적 에탄올화 반응과 비교하여 높은 수율을 나타내는 것으로 초임계 이산화탄소를 매질로 이용 시 Lee 등[26]의 전분 가수분해 반응의 결과와 마찬가지로 유지의 에탄올화 반응 역시 높은 반응성을 나타냄을 알 수 있었다.

#### 4. 결 론

본 연구에서는 밀배아유와 고정화 효소를 비용매상 및 초임계

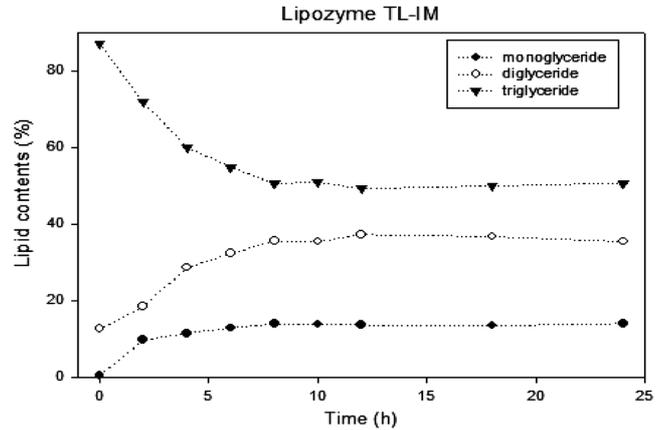


Fig. 10. Enzymatic ethanolysis using Lipozyme TL-IM in supercritical carbon dioxide system.

이산화탄소를 이용하여 에탄올화 반응시키고 반응에서 전환된 TG와 생성된 MG, DG의 함량을 분석하였다. 이때 영향을 주는 주요 실험변수로 물 함량, 반응온도, 효소 사용량, 반응시간, 효소종류 등을 변화시켜 보다 안정적이고 효율적인 최적의 반응 조건을 고찰하였다.

비용매상에서는 물 함량 1배수(밀배아 5 g, ETOH 0.33 ml)에서 MG, DG의 생성 효율이 가장 높았으며 Lipozyme RM-IM은 2배수에서 현저히 감소하였고, 온도의 영향은 60 °C에서 MG 9.43% DG 34.92%로 최대 생성량을 나타내었고 70 °C에서는 생성량이 감소하였다. 또한 효소 사용량에 따른 영향은 3%까지는 전환율이 증가했으나 그 이후 전환율은 거의 변화가 없었으며, 반응 시간의 영향은 Lipozyme TL-IM을 사용한 반응에서는 24시간 동안 계속적으로 증가하였으며 Lipozyme RM-IM을 사용한 반응에서는 12시간까지 계속적으로 증가하다가 이후에는 전환율이 조금씩 감소하였다.

비용매상에서 밀배아유와 고정화 효소를 이용한 에탄올화 반응에서는 효소의 종류에 따른 영향은 Lipozyme RM-IM보다 Lipozyme TL-IM을 사용한 반응에서 MG와 DG의 생성량이 더 높았으며, 최

적 조건은 물 함량 1배수, 반응온도 60 °C, 반응시간 24시간으로 나타났다.

초임계 이산화탄소를 이용한 에탄올화 반응에서는 온도의 영향은 반응 온도가 50 °C일 때 MG와 DG의 생성량이 최대였으며 60 °C에서 감소하였고, 압력의 영향은 반응 압력이 100 bar일 때 MG와 DG의 생성량이 최대였으며 100 bar 이상의 압력 조건에서는 MG와 DG의 생성량이 감소하는 경향이 나타났으며, 반응 시간의 영향은 MG와 DG의 함량은 12시간에서 생성량이 최대가 되었으며 비용매상에서 24시간 동안 반응시킨 결과보다 높은 값을 나타내었으며, 초임계 이산화탄소를 이용한 효소반응의 최적 조건은 반응온도 50 °C, 반응압력 100 bar, 반응시간 12시간으로 나타났다.

따라서 본 연구에서는 초임계 이산화탄소를 이용한 효소반응에서 비용매상에서의 반응보다 빠른 시간과 높은 수율을 얻을 수 있음을 제시하였고, 밀배아유를 이용한 효소반응에서는 Lipozyme RM-IM 보다 Lipozyme TL-IM이 더욱 효과적인 효소임을 알 수 있었으나, 초임계 이산화탄소를 이용한 효소반응에서 200 bar 이상의 압력과 60 °C 이상의 온도 그리고 물 함량의 변화 등 본 연구에서 수행하지 못한 조건에서의 향후 연구가 이어질 필요성이 요구된다.

## 감 사

본 연구는 산업자원부와 한국산업기술재단의 지역혁신 인력양성 사업 및 중소기업청의 산학연 공동기술개발 컨소시엄사업 연구비 지원으로 수행된 연구결과이며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Sauer, D. B., "Storage of Cereal Grains and Their Products," *American Association of Cereal Chemists, inc.*, 14-22(1992).
- Rural development administration national rural living science institute., Food composition table., 20-21, 434-435, 532-533, 582(1996).
- Dliveira, J. and Vladimir, O., "Enzymatic Alcoholysis of Palm Kernel Oil in n-hexane and SCO<sub>2</sub>," *J. Supercrit. Fluids.*, **19**, 141(2001).
- Lee, J. S., Jang, Y. and Yang, T. H., "Low-calorie Structured Lipids Synthesis by Enzymatic Transesterification," *Ministry of Agriculture and Forestry*, Seoul, Korea(1999).
- Akoh, C. C., Food Liquids. Chemistry, Nutrition. and Biochemistry. *M. Dekker Inc.*, New York, USA(2002).
- Maki, K. C., Davidson, M. H., Tsushima, R., Matsuo, N., Tokimitsu, I., Umporowicz, D. N., Dicklin, M. R., Foster, G. S., Ingram, K. A., Anderson, B. D., Forst, S. D. and Bell, M., "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(2002).
- Watanabe, T., Sugiura, M., Sato, M., Yamada, N. and Nakanishi, K., "Diacylglycerol Production in a Packed Bed Bioreactor," *Process Bio-chem.*, **40**, 637-643(2005).
- Park, R. K. and Lee, K. T., "Synthesis and Characterization of Mono- and Diacylglycerol Enriched Functional Oil by Enzymatic Glycerolysis of Corn Oil," *Korean. Food Sci. Technol.*, **36**, 211-216(2004).
- Rosu, R., Yasui, M., Iwasaki, Y. and Yamane, T., "Enzymatic Synthesis of Symmetrical 1,3-Diacylglycerols by Direct Esterification of Glycerol in Solvent-Free System," *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **76**, 839-843(1999).
- Kang, S. T. and Yamane, T., "Effect of Temperature on Diacylglycerol Production by Enzymatic Solid-Phase Glycerolysis of Hydrogenated Beef Tallow," *Korean J. Food Sci. Technol.*, **26**, 567-572(1994).
- Kwon, S. J., Han, J. J. and Rhee, J. S., "Production and in Situ Separation of Mono- or Diacylglycerol Catalyzed by Lipase in n-hexane," *Enzyme Microb. Technol.*, **17**, 700-704(1995).
- Yang, B., Harper, W. J., Parkin, K. L. and Chen, J., "Screening off Commercial Lipases for Production of Mono- and Diacylglycerols from Butter Oil by Enzymic Glycerolysis," *Dairy J.*, **4**, 1-13(1994).
- Rosu, R., Uozaki, Y., Iwasaki, Y. and Yamane, T., "Repeated Use of Immobilized Lipase for Monoacylglycerol Production by Solid-Phase Glycerolysis of Olive Oil," *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **74**, 445-450(1997).
- Randolph, T. W., Blanch, H. W., Prausnitz, J. M. and Wilke, C. R., "Enzymatic Catalysis in a Supercritical Fluid," *Biotechnol. Lett.*, **7**, 325(1985).
- Hammond, D. A., Karel, M., Klibanov, A. M. and Krukoni, V. J., "Enzymatic Reactions in Supercritical Gases," *J. Appl. Biochem. Biotechnol.*, **11**, 393(1985).
- Nakamura, K., Chi, Y. M., Tamada, Y. and Yano, T., "Lipase Activity and Stability in Supercritical Carbon Dioxide," *Chem. Eng. Commun.*, **45**, 207(1986).
- Van, E., A. M. N., Dejong, J. P. L., Doddema, H. J. and Lindelbom, "Enzymatic Transesterification in Supercritical Carbon Dioxide," D. R., in Perrut, M(ed.), *Proc. Int. Symp. Supercritical Fluids.*, **2**, 933(1988).
- Pasta, P., Mazzola, G., Carrea, G. and Riva, S., "Subtilisin-catalyzed Transesterification in Supercritical Carbon Dioxide," *Biotechnol. Lett.*, **9**, 643(1989).
- Holcapek, M., Janadera, P., Fischer, J. and Prokes, B., "Analytical Monitoring of Production of Biodiesel by High-performance Liquid Chromatography with Various Detection Methods," *J. Chromatogr. A.*, **858**, 13-31(1999).
- Shimada, Y., Watanabe, Y., Sugihara, A. and Tominaga Y., "Enzymatic Alcoholysis for Biodiesel Fuel Production and Application of the Reaction to Oil Processing," *J. Mol. Catal. B. Enzym.*, **17**, 133(2002).
- Zaks, A. and Klivabov, A. M., "Enzymatic Catalysis in Organic Media at 100 °C," *Science.*, **224**, 1249(1984).
- Kamat, S. V., Beckman, E. J. and Russell, A. J., "Enzyme Activity in Supercritical Fluids," *Biotechnology.*, **15**, 41(1995).
- Yutaka, I., Norio, S., Masahiko, A. and Harvy, W. B., *The Journal of Physical Chemistry.*, **99**, 8941(1995).
- King, J. W., Eissler, R. L. and Friendrich, J. P., "In Supercritical Fluid Extraction and Chromatography," *ACS Symp. Ser.*, **366**, 63-88(1988).
- Zeljko, K. and Maja, H., "Compressed Gases as Alternative Enzymatic-Reaction Solvent a Shot Review," *J. Supercrit. Fluids.*, **23** (2001).
- Lee, H. S., Ryu, Y. W. and Kim, C., "Hydrolysis of Starch in Supercritical Carbon Dioxide," *Annals of the Research Center for New Bio-Materials in Agriculture*, **4**, 66-73(1995).