Korean Chem. Eng. Res., Vol. 49, No. 4, August, 2011, pp. 480-484

Crude Canola Oil의 효소 탈검과 수용성 탈검에 관한 연구

장명귀*,**, 김덕근*, 박순철*, 이진석*,†, 김승욱**,†

*한국에너지기술연구원 바이오에너지연구센터
305-343 대전시 유성구 장동 71-2
**고려대학교 화공생명공학과
136-713 서울특별시 성북구 안암동 5가
(2010년 12월 2일 접수, 2010년 12월 27일 채택)

A Study of Enzymatic and Water Degumming Using Crude Canola Oil

Myung Gwi Jang*,, Deog Keun Kim*, Soon Chul Park*, Jin Suk Lee*,† and Seung Wook Kim**,†**

**Department of New and Renewable Energy, Korea Institute of Energy Research*
71-2 Jang-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-343, Korea
***Department of Chemical and Biological Engineering, Korea University, 5-ga, Anam-dong, Seongbuk-gu, Seoul 136-713, Korea*
(Received 2 December 2010; accepted 27 December 2010)

요 약

본 연구에서는 원료 유지로 산가 0.68 mgKOH/g, 수분 함량 0.09%, 고형물 함량 0.13%, 인 함량 40 ppm가량의 crude canola oil을 바이오디젤의 원료유로 활용하기 위하여 인 함량을 10 ppm 이하로 낮추는 탈검 공정을 수행하였다. Crude canola oil을 바이오디젤의 원료유로 사용하기 위해 수용성 탈검과 phospholipase A2를 탈검제로 하는 효소 탈검 공정을 비교하는 실험을 수행하였으며, 분석 결과를 바탕으로 바이오디젤의 원료유로써 조건을 만족시키는 탈검 방법을 선정하고 반응 조건을 확립하였다. 수용성 탈검의 경우에는 증류수 사용량 oil 대비 2 wt%, 반응온도 30 ºC, 교반 속도 900 rpm에서 탈검 효율이 다른 조건에 비하여 높았으며, 반응 시간은 30분이 가장 효과적인 것으로 나타났다. Phospholipase A2를 탈검제로 사용하는 효소 탈검의 경우에는 인 함량결과를 보면 모든 조건에서 비슷한 탈검 효율을 나타내었다. 그리하여 산가 분석을 실시한 결과, 효소 투입량 oil 대비 90 ppm, pH 5, 반응 온도 50 ºC에서의 탈검 효율이 다른 조건과 비해 우수하였다. 수용성 탈검과 효소 탈검을 비교해 보면, 효소 탈검이 효율이 높았으나 바이오디젤의 원료유를 생산하는 목적의 경우, 반응시간, 공정의 경제성을 고려할 때 수용성 탈검을 선택하는 것이 유리하다고 판단되었다.

Abstract – In this study, degumming process was carried out for reducing to less than 10 ppm of phosphorus contents and primary properties of crude canola oil including 0.64 mgKOH/g of acid value, 0.09% of water contents, 0.13% of insoluble impurities, and 40 ppm of phosphorus contents. Efficiency of water degumming and enzymatic degumming was compared for the selection of suitable process obtaining feedstock of biodiesel. Degumming method was determined for preparation of raw material of biodiesel, and reaction conditions were also established. The most effective conditions for water degumming were 2% distilled water (w/w oil), 30 ºC of reaction temperature, 900 rpm of agitation speed, and 30 min of reaction time, respectively. In case of enzymatic degumming, optimal conditions were found to be 90 ppm of phospholipase A2 (w/w oil), 50 ºC of reaction temperature at pH 5, respectively. When comparing water degumming with enzymatic degumming, efficiency of enzymatic degumming was better than water degumming. However, water degumming method was much more suitable for the production of biodiesel feedstock considering reaction time and process feasibility.

Key words: Crude Canola Oil, Phospholipid, Water Degumming, Enzymatic Degumming

1. 서 론

지구 온난화가 심각해지고 석유 자원이 고갈됨에 따라 전 세계적으로 수송용 바이오 연료에 대한 관심이 높아지고 있다. 바이오디젤은 환경오염의 개선과 재생가능한 자원으로부터 생산되는 장점을 가지고 있어 새로운 에너지원으로 각광 받고 있다[1-4].

바이오디젤을 생산하는 공정으로는 일반적으로 전이에스테르화 공정이 가장 적합하여 널리 이용되고 있으며, 원료유지로는 대두유, 유채유등 식물성 오일이 사용되고 있다. 식물성 오일을 바이오디젤의 원료유로 사용하기 위해서는 탈검공정을 통하여 인지질을 제거해야만 한다[5].

†To whom correspondence should be addressed.
E-mail: kimsw@korea.ac.kr or bmjslee@kier.re.kr
‡이 논문은 고려대학교 홍석인 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

인지질은 친수성 부분인 머리(phosphate group)와 소수성인 꼬리(2개의 지방산 사슬)를 가지고 있는 이중층 구조를 하고 있다. 인지질의 이러한 특징에 의해 바이오디젤의 분리 공정에서 생성된 FAME (fatty acid methyl ester)층과 글리세롤(glycerol)층의 에멀젼화를 초래하여 생산물의 분리에 부정적인 영향을 끼쳐 생산 수율이 감소하게 된다[6].

따라서 인지질 함량이 높은 오일의 경우(30 ppm이상)에는 탈검을 통하여 먼저 인지질을 제거하고 바이오디젤의 주 공정인 전이에스테르화 공정에서 사용하여야 한다. 보통의 탈검 공정에서는 첫 단계에서 수용성 탈검을 통하여 수용성 인지질을 제거하고, 유기산을 사용하여 비수용성 인지질을 제거하게 된다[6,7]. 유기산을 사용하는 탈검 공정의 경우에는 필연적으로 오염물질이 발생하게 되는데 이에 대한 대안으로 효소 탈검 공정이 점차적으로 그 자리를 대신하고 있다[8,9].

일반적으로 효소 탈검에 사용되는 탈검제에는 phospholipase A1, A2가 있다. 기존의 연구 결과들을 살펴보면, 덴마크의 Novozyme사에서는 phospholipase A1, A2를 이용하여 식물성 오일(유채, 대두콩, 해바라기)로부터 인지질을 제거하는 공정을 개발하여 상용화하고 있는 실정이다[10].

Phospholipase A2(PLA2)는 인지질의 글리세롤의 두 번째에 위치한 탄소 고리로부터 지방산을 분리해 내는 효소로써 구체적인 작용기작은 인지질의 SN_2 아실 결합에 특이적으로 반응하여 유리지방산과 lyso-phospholipid로 가수분해 하는 것이다[11].

유리지방산의 생성은 바이오디젤 공정의 경제성 및 생산성에서 긍정적인 효과를 낼 수 있다. 유리지방산은 바이오디젤 공정의 전처리 단계인 에스테르화 반응에서 바이오디젤로의 전환이 가능하기 때문이다[12].

본 연구에서는 PLA2를 사용한 효소 탈검이 바이오디젤 원료유 확보에 적합한 공정인지 알아보기 위해 반응 온도, 효소 투입량, pH의 조건을 달리하여 실험을 수행하였고 또한, 수용성 탈검에서의 반응 온도, 증류수 투입량, 교반속도를 달리하여 그 효과를 알아보았다. 최종적으로 화학적 탈검 공정의 첫 단계인 수용성 탈검과의 탈검 효율에 관한 비교를 하였다.

2. 실험재료 및 방법

2-1. 실험 재료 및 기구

본 연구에서는 효소 탈검의 원료 유지로 바이오에너지 작물센터(무안, 대한민국)에서 제공 받은 산가 0.68 mgKOH/g, 수분 함량 0.09%, 고형물 함량 0.13%, 인 함량 40 ppm가량의 crude canola oil을 사용하였으며, 탈검제로는 Sigma Aldrich사의 phospoholipase A2와 3차 증류수를 사용하였다. 다른 시약은 모두 GR grade로 구입하여 사용하였다. 탈검 반응에는 반응기 내부의 온도와 반응 물질의 혼합을 일정하게 유지할 수 있는 핫플레이트와 마그네틱바를 사용하였다.

2-2. 증류수를 사용한 crude canola oil의 수용성 탈검

Crude canola oil 100 g을 정량하여 250 ml 삼각플라스크에 넣고, 오일 중탕을 통하여 내부 온도를 50 ºC로 올린 후에, 증류수 2 ml(2 wt%/oil)를 crude canola oil에 첨가하고 교반속도를 600 rpm에 맞춘 후 50 ºC에서 2시간 동안 탈검 반응을 진행하였다.

2-3. Phospholipase A2를 사용한 crdue canola oil의 효소 탈검

Crude canola oil 100 g을 정량하여 250 ml 삼각플라스크에 넣고, 오일 중탕을 통하여 내부 온도를 70 ºC로 올린 후에 1.0 M citrate buffer(pH 5.5)를 2 ml(2 wt%/oil)를 첨가하고 70 ºC에서 마그네틱 바를 이용하여 300 rpm으로 혼합을 하고 5분 동안 교반을 하여 반응기 내부의 pH를 5.0~5.5으로 맞추었다. 완충용액이 첨가된 crude canola oil 혼합물을 상온에서 식힌 후, 증류수 2 ml을 이용하여 phospholipase A2 5 μl(50 ppm/oil)을 희석시켜 crude canola oil 혼합물에 첨가하고 균질기를 이용하여 효소와 oil을 10000 rpm, 1분간 완벽히 혼합 시킨 후, 교반속도를 600 rpm에 맞춘 후 50 ºC에서 2시간 동안 탈검 반응을 진행하였다.

2-4. 오일 물성 분석

2-4-1. 고형물 분석

원료유에 포함된 고형물 함량에 대한 분석은 oil 350 g을 헵탄과 여과막을 이용하여 AOCS Official Method Ca 3a –46에 따라 분석하였고 % 단위로 나타내었다[13].

2-4-2. 인 함량 분석

원료유 및 반응물 중에 포함된 인 함량 분석은 oil 3 g을 산화아연 0.5 g과 반응시켜 용광로를 이용하여 650 ºC에서 3시간 동안 태워 재를 만든 후, AOCS Official Method Ca 12~55에 따라 분석하였고 ppm 단위로 나타내었다[14].

2-4-3. 수분 분석

수분 분석은 Karl-Fisher 적정법[15]에 의해 Mettler Toledo DL31 Titrator를 이용하여 측정하였고 % 단위로 나타내었다.

2-4-4. 산가 분석

Crude canola oil속에 포함되어 있는 유리지방산 함량을 측정하기 위해 적정에 의한 산가분석으로 EN ISO 661(Animal and vegetable fats and oils - Preparation of test sample)의 분석 방법에 의해 측정하였으며 산가와 유리지방산 함량을 결정하는 계산식은 다음과 같다[16,17].

$$\text{A.V.} = \frac{56.11 \times V \times c}{m} \quad (1)$$

V = 사용한 KOH 용액의 부피

c = KOH 용액의 몰 농도

m = 시료의 질량

A.V. : 산가(Acid Value), FFA: 유리지방산(Free fatty acid)

$$\text{FFA}(\%) \cong \frac{1}{2} \times \text{A.V.}$$

3. 결 과

3-1. 증류수 투입량에 따른 수용성 탈검의 영향

증류수 투입량에 따른 수용성 탈검 효율을 알아보기 위하여 증류수의 양을 oil대비 0.5, 1, 2%으로 조절하고 50 ºC, 600 rpm에서 2시간 동안 탈검 반응을 진행하였다. 반응 시작 후, 15분 만에 모든 실험 군에서 인 함량이 5~8 ppm대로 떨어져서 초기 탈검율이 70%를 상위하였다. 120분에서 시료의 인 함량을 측정해본 결과, oil 대비 2%의 증류수를 사용했을 때의 탈검율이 80%로 가장 우수했다. 증류수 투입량에 따른 수용성 탈검의 영향과 그 결과를 Table 1과 Fig. 2에 나타내었다.

Table 1. Phosphorus contents after water degumming of crude canola oil at various conditions

Degumming conditions			Phosphorus contents (ppm)
Amount of water (w/w oil)	Temp. (K)	Agitation speed (rpm)	
0.5%	323	600	11.07
1.0%	323	600	8.14
2.0%	323	600	7.00
2.0%	303	600	4.88
2.0%	323	600	8.63
2.0%	343	600	10.01
2.0%	323	300	9.77
2.0%	323	600	6.68
2.0%	323	900	5.54

3-2. 반응 온도에 따른 수용성 탈검의 영향

반응 온도에 따른 탈검 효율을 알아보기 위하여 반응온도를 30, 50, 70 ºC로 조절하고 증류수 투입량(2 wt%/oil), 600 rpm에서 2시간 동안 탈검 공정을 진행하였다. 인 함량 분석을 해본 결과 반응이 시작되고 15분 만에 모든 실험군에서 인 함량이 5~7 ppm대로 떨어졌다. 120분에서 시료의 인 함량을 측정해본 결과, 30 ºC에서의 탈검율이 85%로 가장 우수했다. 반응온도에 따른 수용성 탈검의 영향을 Table 1과 Fig. 3에 나타내었다.

3-3. 교반 속도에 따른 수용성 탈검의 영향

교반 속도에 따른 탈검 효율을 알아보기 위하여 교반 속도를 300, 600, 900 rpm으로 조절하고 증류수 투입량(2 wt%/oil), 50 ºC에서 2시간 동안 탈검 공정을 진행하였다. 인 함량 분석을 해본 결과 반응이 시작되고 15분 만에 모든 실험군에서 인 함량이 5~8 ppm대로 떨어졌다. 120분에서 시료의 인 함량을 측정해본 결과, 900 rpm에서의 탈검율이 85%로 가장 우수했다. 교반속도에 따른 수용성 탈검의 영향을 Table 1과 Fig. 4에 나타내었다.

3-4. 효소 투입량에 따른 효소 탈검의 영향

Phospholipase A2 투입량에 따른 탈검 효율을 알아보기 위하여 효소 탈검제의 양을 oil대비 30, 60, 90 ppm으로 조절하고 50 ºC, 600 rpm에서 2 시간 동안 탈검 반응을 진행하였다. 반응 시작 후, 15, 30, 45, 60, 120 분에서 시료를 취하고 인 함량과 산가 분석을 해본 결과, 반응이 시작되고 15분 만에 모든 실험군에서 인 함량이 3~4 ppm대로 떨어져서 전체적으로 탈검 효율이 매우 높다는 것을 알아낼 수 있었다. Phospholipase A2를 탈검제로 사용하는 효소 탈검 반응의 경우, 인지질이 가수분해 되면서 유리지방산이 생성되기 때문에 산가 측정을 하여 탈검 효율을 측정할 수 있는데 탈검 반응에 관한 반응기작을 Fig. 1에 나타내었다[18]. 120분에서 시료의 최종산가를 측정

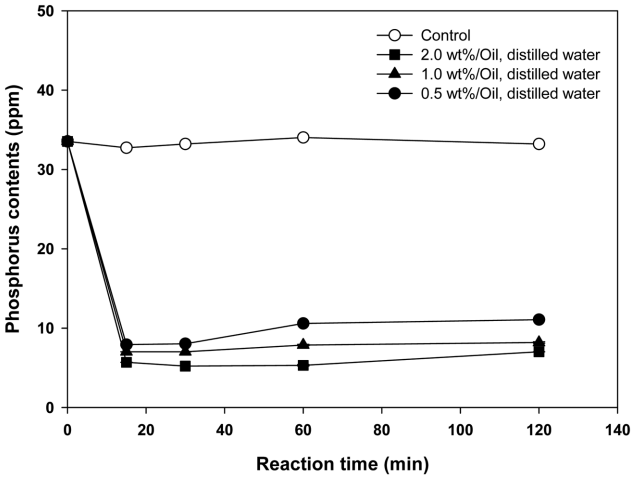

Fig. 2. Effect of the amount of water on water degumming (temperature, 50 ºC; agitation speed, 600 rpm).

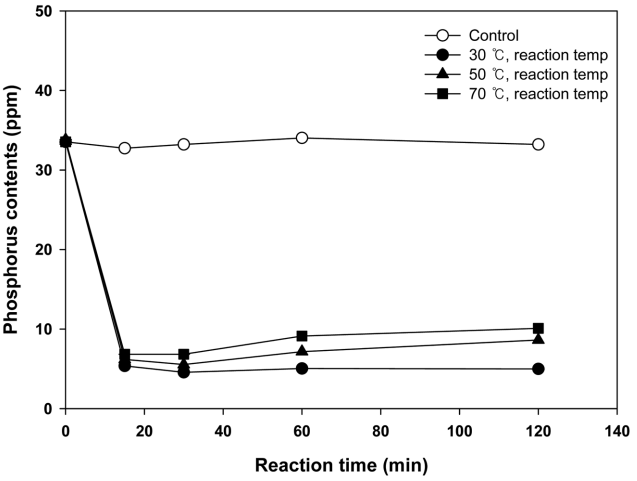

Fig. 3. Effect of reaction temperature on water degumming (amount of water, 2 wt%/oil; agitation speed, 600 rpm).

해본 결과, oil 대비 90 ppm의 효소를 사용했을 때, 산가가 0.64에서 0.97 mgKOH/g로 증가하여 유리지방산의 증가율이 가장 높았다. 효소 투입량에 따른 탈검의 영향과 그 결과를 Table 2와 Fig. 5에 나타내었다.

3-5. 완충용액의 pH에 따른 효소 탈검의 영향

Phospholipase A2는 pH 5~5.5에서 가장 탈검 효율이 높은 효소라고 알려져 있다[3]. 이에 사용하는 완충용액의 pH에 따른 탈검 효율을 알아보기 위하여 1.0 M citrate buffer의 pH를 4, 5, 6으로 조절하고 50 ºC, 600 rpm에서 2시간 동안 탈검 공정을 진행하였다. 인 함량과 산가 분석을 해본 결과, 반응이 시작되고 15분 만에 모든 실험

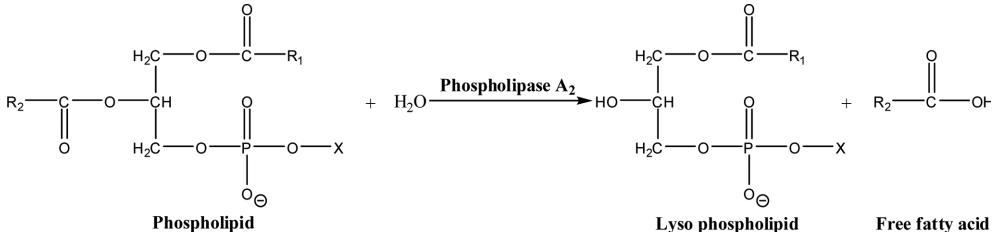

Fig. 1. Mechanism of phospholipid hydrolysis to lyso-phospholipid and free fatty acid.

Table 2. Phosphorus contents and acid value after enzymatic degumming of crude canola oil at various conditions

Deguming conditions			Phosphorus contents (ppm)	Acid value (mgKOH/g)
Amount of enzyme (w/w oil)	pH	Temp. (K)		
30 ppm	5	323	3.75	0.94
60 ppm	5	323	3.58	0.94
90 ppm	5	323	3.75	0.97
50 ppm	4	323	2.61	0.91
50 ppm	5	323	3.09	1.07
50 ppm	6	323	2.61	0.87
50 ppm	5	313	0.98	0.86
50 ppm	5	323	2.93	1.07
50 ppm	5	333	2.77	0.94

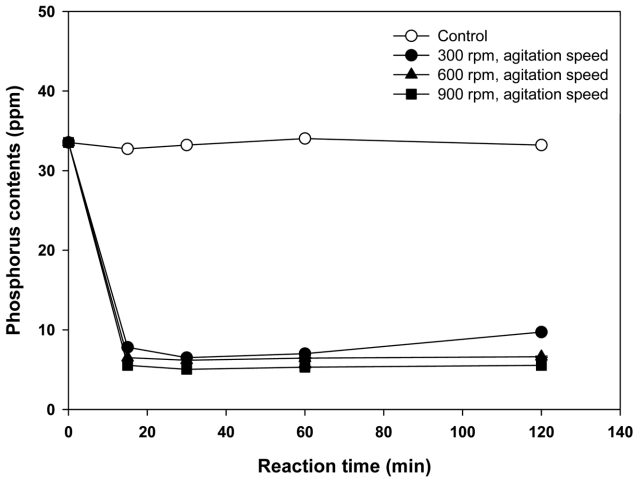

Fig. 4. Effect of Agitation speed on water degumming(amount of water, 2 wt%/oil; temperature, 50 °C).

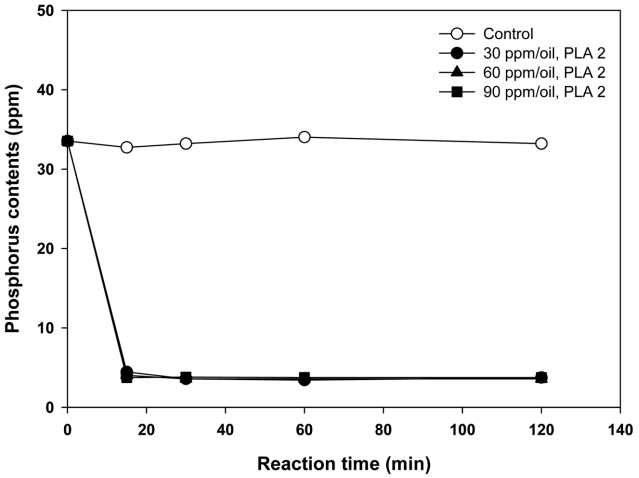

Fig. 5. Effect of the amount of enzyme on enzymatic degumming using phospholipase A2(temperature, 50 °C; agitation speed, 600 rpm; pH 5).

군 에서 인 함량이 2~4 ppm대로 떨어져서 전체적으로 탈검 효율이 매우 높다는 것을 알아낼 수 있었다. 최종적으로 산가 측정을 했을 때, pH 5의 완충용액을 사용 했을 때의 산가가 0.64에서 1.07 mgKOH/g로 증가하여 가장 높은 탈검 효율을 나타냈다. 완충용액의 pH에 따른 탈검의 영향을 Table 2와 Fig. 6에 나타내었다.

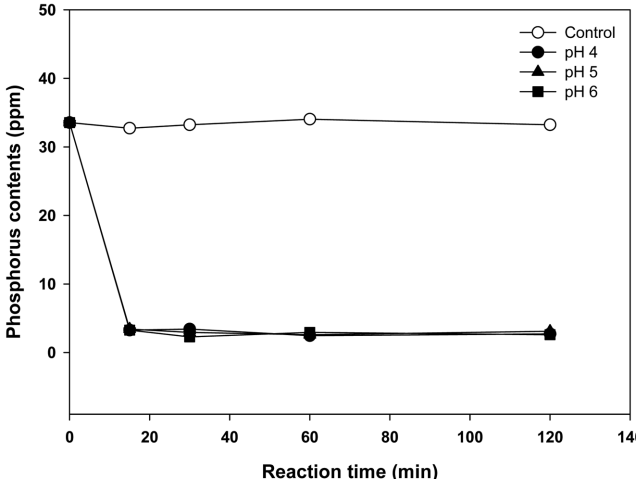

Fig. 6. Effect of pH on enzymatic degumming using phospholipase A2 (amount of enzyme, 50 ppm/oil; temperature, 50 °C; agitation speed, 600 rpm).

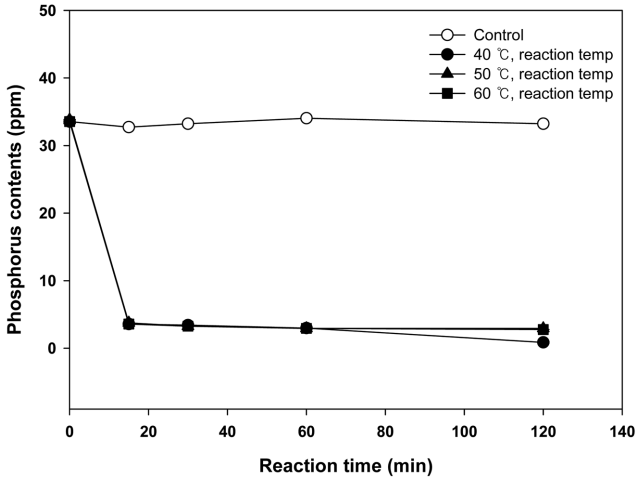

Fig. 7. Effect of reaction temperature on enzymatic degumming using phospholipase A2 (amount of enzyme, 50 ppm/oil; agitation speed, 600 rpm; pH 5).

3-6. 반응 온도에 따른 효소 탈검의 영향

Phospholipase A2를 사용하는 효소탈검 공정에서 반응온도에 따른 탈검 효율을 알아보기 위하여 반응온도를 40, 50, 60 °C으로 조절하고 600 rpm 에서 2시간 동안 탈검 공정을 진행하였다. 인 함량과 산가 분석을 해본 결과 반응이 시작되고 15분 만에 모든 실험군 에서 인 함량이 0~3 ppm대로 떨어져서 전체적으로 탈검 효율이 매우 높다는 것을 알아낼 수 있었다. 최종적으로 산가 측정을 했을 때, 반응 온도가 50 °C일 때의 산가가 0.64에서 1.07 mgKOH/g로 증가하여 가장 높은 탈검 효율을 나타냈다. 반응온도에 따른 탈검의 영향을 Table 2와 Fig. 7에 나타내었다.

4. 고 찰

수용성 탈검의 경우, 증류수 사용량 2 wt%/oil, 반응온도 30 °C, 교반 속도 900 rpm에서의 탈검 효율이 다른 조건에 비하여 우수하였다. 반응 30분 만에 인 함량이 최저로 떨어진 후, 시간이 지날수록 인 함량이 증가하는 경향을 보인다. 이는 반응에 참여하는 물 분자가 인

지질을 분해하는 것이 아니라 인지질의 친수성기에 결합하여 마이셀을 생성하여 인지질을 추출하는 것이기 때문이다[19]. 반응시간이 길어질수록 물 분자가 증발하여 생성됐던 마이셀 구조가 깨지면서 인지질이 oil 내부로 다시 용해되기 때문에 반응시간은 30분으로 하는 것이 적절하다고 판단된다.

효소 탈검의 경우, 인 함량 분석결과를 보면 모든 조건에서 비슷한 탈검 효율을 나타내었다. Phospholipase A2는 인지질을 Lysophospholipid와 유리지방산으로 분해하기 때문에 oil 속의 유리지방산 함량에 의하여 탈검의 효율을 측정 할 수 있다. 따라서, 산가 분석을 실시하여 탈검 효율을 따져본 결과, 효소 투입량 90 ppm/oil, pH 5, 반응 온도 50 ºC에서의 탈검 효율이 다른 조건에 비하여 우수하였다. 효소 탈검 반응에서는 15분 만에 90%의 탈검율을 나타냈고 반응이 진행될수록 탈검율이 증가하였다.

두 가지 공정을 비교해 보면, 효소 탈검이 수용성 탈검에 비하여 우수하다. 하지만, 바이오디젤의 제품규격을 살펴보면 인 함량은 5 ppm 이하로 규정되어 있다[20]. 식용 오일의 생산이 아니라, 바이오디젤의 원료유를 생산하는 목적의 경우에는 반응시간, 공정의 경제성을 고려했을 때 수용성 탈검을 선택하는 것이 유리하다고 판단된다.

5. 결 론

Crude canola oil을 바이오디젤의 원료유로 사용하기 위해 수용성 탈검과 효소 탈검 공정을 비교하는 실험을 수행하고 분석 결과를 바탕으로 공정의 최적조건을 도출해 보았다.

수용성 탈검의 경우에는 증류수 사용량 2 wt%/oil, 반응온도 30 ºC, 교반 속도 900 rpm에서 탈검 효율이 다른 조건에 비하여 우수하였으며 반응시간의 경우 30분을 넘기지 않는 것이 유리하다고 판단되었다. Phospholipase A2를 탈검제로 사용하는 효소 탈검의 경우에는 인 함량결과를 보면 모든 조건에서 비슷한 탈검 효율을 나타내었다. 그리하여 산가 분석을 실시한 결과, 효소 투입량 oil 대비 90 ppm, pH 5, 반응 온도 50 ºC에서의 탈검 효율이 다른 조건에 비하여 우수하였다.

두 가지 공정을 비교해 보면, 바이오디젤의 원료유를 생산하는 목적의 경우에는 반응시간, 공정의 경제성 등을 고려했을 때 수용성 탈검을 선택하는 것이 타당하다고 사료된다.

참고문헌

1. Korbitz, W., "New Trends in Developing Biodiesel World-wide," Conference on Power crops for the Americas, May, Miami, 2002.
2. Kim, H. R., "Biodiesel," *Prospect. Ind. Chem.*, **5**(1), 27-34(2002).
3. Graboski, M. S. and McCormick, R. L., "Combustion of Fat and Vegetable Oil Derived Fuels in Diesel Engines," *Prog. Energy Combust. Sci.*, **24**, 125-164(1998).
4. IEA., "Biofuels for Transport," IEA Bookshop(2004).
5. Carlson, K., "Acid and Alkali Refining of Canola Oil," *INFORM* **4**, 272-281(1993).
6. Denise, J., "Fats refining. In: Oils & Fats Manual," *Karleskind, A., Lavoisier Publishing, Paris (France)*, **2**, 807-895(1996).
7. Dahlke, K., Eichelsbacher, M., EnzyMax® and ALCON®-Lurgi's route to physical refining. In: Emerging Technologies, Current Practices, Quality Control, Technology Transfer, and Environmental Issues. Eds. S. S. Koseoglu, K. C. Rhee, R. F. Wilson, AOCS Press, Champaign IL (USA), 53-59(1998).
8. Čmolik, J. and Pokorný, J., "Physical Refining of Edible Oils," *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **102**, 472-486(2000).
9. Mainda, G., "Degumming of Vegetable Oil by a New Microbial Lipase," *Food Technol. Biotechnol,* **44**(1), 101-104 (2006).
10. Kim, C., "Enzymatic Oil-degumming by a Novel Microbial Phospholipase," *Eur. J. Lipid Sci. Technol,* **103**, 333-340(2001).
11. Edward, A. D., "Diversity of Group Types, Regulation, and Function of Phospholipase A2," *The Journal of Biological Chemisry*, **269**(18), 13057-13060(1994).
12. Kim, D. K., Choi, J. D., Park, J. Y., Lee, J. S., Park, S. B. and Park, S. C., "Optimization of Pre-treatment of Tropical Crop Oil by Sulfuric Acid and Bio-diesel Production," *Korean Chem. Eng. Res. (HWAHAK KONGHAK),* **47**(6), 762-767(2009).
13. AOCS Officical Method Ca 3a-46, "Insoluble Impurity," Official Method and Recommended practices of the AOCS, Fifth Ed. AOCS. Champaign, Illinois(2009).
14. AOCS Officical Method Ca 12-55, "Phosphorus," Official Method and Recommended practices of the AOCS, Fifth Ed. AOCS. Champaign, Illinois(1997a).
15. AOCS Officical Method Ea 8-58, "Moisture, Karl Fischer Volumetric Method," Official Method and Recommended practices of the AOCS, Fifth Ed. AOCS. Champaign, Illinois(2009).
16. AOCS Officical Method Cd 3d-63, "Acid Value," Official Method and Recommended practices of the AOCS, Fifth Ed. AOCS. Champaign, Illinois(2003).
17. Gustone, F. D., "Fatty Acid and Lipid Chemistry," Chapman & Hall, UK, 207(1996).
18. Kudo, I. and Murakami, M., "Phospholipase A_2 Enzymes," *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, **68-69**, 3-58(2002).
19. Seddon, J. M. and Templer, R. H., "Polymorphism of Lipid-Water Systems," from the Handbook of Biological Physics, **1**. R. Lipowsky, and E. Sackmann. (c), Elsevier Science B.V. ISBN 0-444-81975-4(1995).
20. CEN, EN 14214, "Biodiesel Standard"(2003).