

액체 크로마토그래피에 의한 메틸프룩토시드의 분리공정 연구

허 주 형 · *유 인 상 · †김 해 성

명지대학교 공과대학 화학공학과, *경원대학교 공과대학 화학·식품생물공학부

A Study on the Purification Process of Methyl Fructoside by Liquid Chromatography

Joo Hyung Heo, In Sang Yoo*, and Hae Sung Kim †

Department of Chemical Engineering, College of Engineering, Myong Ji University, Yong in, Kyong gi 449-728, Korea

*Division of Chemical and Food Engineering, College of Engineering, KyungWon University, Songnam, Kyong gi 461-701, Korea

ABSTRACT

Methyl fructoside was purified from the aqueous sugar/methyl fructoside solution by liquid chromatography using Amberlite IRA-900, strong anion-exchange resin. The optimum operating conditions, resolution and productivity of methyl fructoside were discussed to evaluate the practical feasibility of the proposed chromatographic separation process of methyl fructoside which is useful as a new starting material for sugar ester synthesis. The linear chromatography model with HETP was well applied to the chromatographic separation process of methyl fructoside and the theoretical solution successfully predicted the elution chromatogram of methyl fructoside and sucrose at different superficial linear velocity of eluent for rectangular feed with different loading volume of packed bed. The optimum operating conditions were found to be 75% with the loading volume of packed bed at 1.13 cm/min of the superficial linear velocity at 60°C, and gave the productivity of methyl fructoside of 7 mg/g-resin/h with the resolution of 1.1.

서 론

아미노산과 지방산 및 당류를 기본단위로 하여 이루어지는 생활성물질(bioactive material)은 구성성분의 특성과 3차원 결합방식에 따라서 다양한 기능성과 고단위의 생리작용을 나타내고 있으며 생화학적 순도의 정밀분리와 고기능성의 보존이라는 관점

에서 새로운 수준의 분리정제법을 필요로 하고 있다(1, 2). 기능성 생체물질을 창출하고자 하는 식품과학, 약리학, 의학 등의 연구분야와 식품공업, 의약품공업, 화장품공업에서는 많은 관심과 함께 연구가 계속되고 있으며 앞으로 보다 더 바람직한 정밀분리공정이 개발되어야 할 것이다(3). 생활성물질의 분리정제공정은 구성성분이 열과 유기용매에 민감하고 3차원적 결합구조를 안정화시키면서 생화학적 순도의 정밀분리가 이루어져야 하므로 종래의 감압증류,

† Corresponding Author

용매추출 및 결정화법보다는 정제도와 생체 적합성이 우수한 액체 크로마토그래피법(liquid chromatography)으로 시행하는 것이 유리하다고 판단된다. 액체 크로마토그래피법은 정제하고자 하는 생활성물질에 대하여 크기, 전하, 흡착성, 친화성에 대응하는 선택성을 가진 고정상 담체를 충전시키고 적합한 이동상 용매로 용출시킬 때 개별성분의 특성에 따라서 용출되는 순서와 시간이 선택적으로 결정된다는 이론에 근거한 분리정제법으로, 당과 배당체로 이루어진 생체 혼합물의 경우와 같이 열 안정성이 낮고 용해도 차이가 작으며 적당한 유기용매를 선정하기가 어렵고 생화학적 순도의 정제도를 요구하는 정밀분리공정에 효과적이다.

알킬배당체(alkyl glycoside)는 그 분자구조가 단순하면서도 다양한 기능성을 지닌 생활성물질로서 석유화학계열의 합성계면활성제보다는 유화력, 분산력, 침투력 및 세척력 등은 다소 떨어지지만 독성과 자극성이 적고 생체적합성이 뛰어나면서 생체조직과 생체물질에 대한 계면활성도가 우수하여 식품과 의약품, 화장품 분야에서 고가의 기능성 specialty chemicals로 그 수요가 증가하고 있다(4). 최근에는 식물체에 존재하는 알킬배당체가 독성물질을 중화할 수 있고 불안정한 생리물질과 방향성분을 안정화시키며 막단백질을 가용화 할 수 있다(5, 6)는 다양한 기능성이 밝혀지면서 범용성 계면활성제로 쓰이는 alkyl polyglucoside보다는 입체광학적 관점에서 생화학적 순도로 정밀분리된 고기능성 배당체의 분리정제에 연구가 집중되고 있다. 알킬글루코시드(alkyl glucoside)는 Fischer(7), Noller와 Rockwell(8), Hess(9) 등에 의하여 화학적으로 합성되고 용매추출과 감압증류 및 결정화법으로 분리정제되어 왔으나 다단계 정제과정을 거쳐야 함으로 수율과 생산성이 낮고 필요한 아노머(anomer)를 얻기 위해서는 별도의 정밀분리기술을 시행하여야 함으로 아직도 실험실 규모의 회분식 정제공정에 머물러 있다. 배당체가 봉산염 수용액으로부터 전기영동법으로 정밀분리될 수 있다는 Foster(10)의 연구결과와 Horvath와 Metzenberg(11)의 이온교환수지법을 기본으로 하여 O'Donnell와 Richards(12)는 이온교환수지에 의한 크로마토그래피법으로 알킬글루코시드를 회분식으로 정제하였고, 오늘날 일련의 결정화와 감압증류 및 이온교환수지 크로마토그래피법으로 이루어진 다단계 정제과정을 거쳐서 고가의 정밀화학제품으로 시판되고 있으나 정제효율과 생산성이 낮아서 정제비용의 비중이 크다는 문제점이 지적되고 있다.

본 연구에서는 효소적으로 합성된 메틸프루토시드(methyl fructoside)와 당의 혼합물로부터 Amberlite IRA-900을 고정상 담체로 하여 당과 배당체를 액체 크로마토그래피법으로 정밀 분리함으로써 메틸프루토시드를 출발물질로 하는 새로운 sugar ester의 합성 공정이 연구개발되도록 하고, 액체 크로마토그래피법에 의한 알킬배당체의 정밀분리기술이 실용화될 수 있도록 최적조업조건과 해상도 및 생산성을 검토하였다.

이론적 고찰

액체 크로마토그래피 이론에 의한 분리정제공정의 해석은 처리규모가 분석규모(analytical scale)에서 생산규모(production scale)로 확대되면서 공정해석 차원에서 scale-up의 중요성이 강조되었고 이론단수에 근거한 linear chromatography model을 중심으로 발전되었다. 크로마토그래피에 관한 이론으로서 Helfferich와 Klein(13), Lapidus와 Amundson(14) 및 Rhee와 Amundson(15) 등에 의하여 발전된 용질이동론은 단탐의 분리효율을 논의하는데 있어서 유용한 개념인 상당높이(equivalent height)를 유속의 함수로 나타낸 Van Deemter(16)의 관계식이 제시되면서 액체 크로마토그래피에 의한 분리공정해석에 효과적으로 적용되었고 scale-up이 용이하도록 하였다. 정밀분리하고자 하는 특정성분이 초기농도 C_0 인 계단함수로 chromatography medium에 유입될 때 선형평형조건과 용질이동론의 일반적인 가정의 성립한다면 출구에서의 농도 분포함수 C_f 는 Lapidus와 Amundson 및 Lightfoot 등(17)에 의하여 다음과 같이 식 (1)로 주어지며, 확산의 영향은 이론단수(number of theoretical plates) N 으로 나타낼 수 있고 V 는 탐에 유입된 급액의 체적, \bar{V} 는 포화체적(saturation volume)이다.

$$\frac{C_f}{C_0} = \frac{I}{2} \left[1 + \operatorname{erf} \left(\frac{V - \bar{V}}{2\sqrt{V\bar{V}/N}} \right) \right] \quad (1)$$

급액이 충격함수로 인입될 때의 출구농도 C_f 는 식 (1)을 미분하여 얻을 수 있는데

$$C_f = C_{max} \exp \left[-\frac{N}{2} \frac{(V - V_E)^2}{V V_E} \right] \quad (2)$$

V 가 V_E 일 때 C_f 는 최대농도 C_{max} 에 도달함을 알 수 있고 V_E 를 용출체적(elution volume)이라고 한다. 따라서 충분히 긴 크로마토그래피 매질에서 특

정성분에 대한 충격응답곡선을 실험적으로 결정하면 그 분포함수는 식 (2)로 주어지고 정규분포(normal distribution)한다. 크로마토그램의 표준편차 σ 는 최대농도의 60%에 해당하는 높이에서 폭을 구하고 1/2을 취하면 실험적으로 측정되고, 이론식 (2)의 표준편차는 V_E/\sqrt{N} 이므로 이론단수 N 과 상당높이 H 는 실험적으로 측정한 용출체적 V_E 와 표준편차 σ 및 탑높이 L 에 의하여 식 (3)으로 결정된다.

$$N = \left(\frac{V_E}{\sigma}\right)^2 = \frac{L}{H} \quad (3)$$

액체 크로마토그래피에 의한 분리공정은 급액(feed solution)과 용출액(eluent solution)이 주기적으로 주입되며 출구에서의 농도분포는 계단응답이 아니라 시점이 서로 다른 두 계단응답의 차로 주어지는데 그 해는 Kurnik 등(18)에 의하여 식 (4)로 유도되었으며, V_E 와 V_f 는 각각 용출체적(elution volume)과 급액체적(feed volume)이라고 한다.

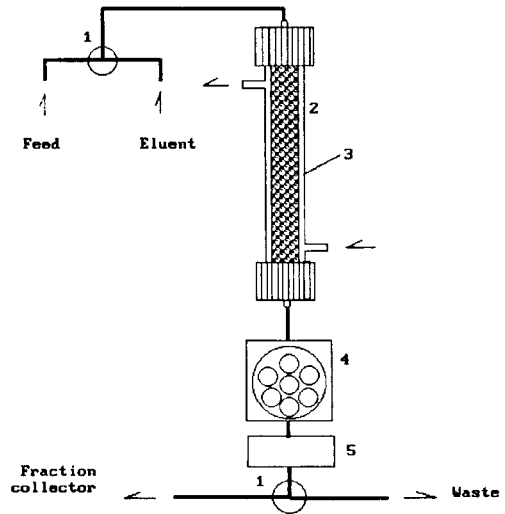
$$\frac{C_f}{C_o} = \frac{1}{2} \left[\operatorname{erf} \left(\frac{V_E - V}{\sqrt{2} V V_E / N} \right) - \operatorname{erf} \left(\frac{V_E - V - V_f}{\sqrt{2} V V_E / N} \right) \right] \quad (4)$$

따라서, 실험적으로 V_E 와 N 을 결정하고 식 (4)를 이용하여 액체 크로마토그래피에 의한 메틸프록토시드와 당의 크로마토그램을 모사하여 정밀분리공정을 해석함으로써 해상도와 생산성의 관점에서 조업조건을 최적화할 수 있다.

실 험

실험 재료

메틸프록토시드는 시판되지 않으므로 히(19)의 방법으로 제조한 후, 본 실험방법에 의해서 분리하여 얻은 분리액을 55°C, 60 mmHg로 증발농축하여 고형분을 얻었으며 HPLC로 분석하여 단일성분의 순수한 메틸프록토시드를 확인한 후 사용하였다. 자당(sucrose, Junsei)과 과당(fructose, Yakuri)은 특급 시약을 사용하였으며 그 이외의 시약은 특급과 HPLC급을 사용하였다. 고정상 담체로는 Amberlite IRA-900(macrorreticular, chloride form, wet mesh : 16~50, moisture content : 58%(w/w), capacity : 4.2meq/g, matrix material : polystyrene, Sigma) 음이온 교환 수지를 사용하였다.



- 1. Three-way cock
- 2. Chromatographic column
- 3. Water jacket
- 4. Microtube pump
- 5. pH meter cell

Fig. 1. Schematic Diagram of Chromatographic Column Set-up.

실험 방법

직경 1.5cm, 길이 25cm인 Fig. 1의 크로마토그래피 칼럼에 Amberlite IRA-900 13.8g을 충전시키고, 메탄올과 증류수로 세정하여 잔류 유기물을 제거한 후 0.1N의 가성소다 수용액으로 작용기를 수산기로 치환시킨다. 주어진 온도로 항온된 칼럼 입구에서 농도가 10g/L인 메틸프록토시드 수용액 2mL와 20g/L인 자당 수용액 10mL를 각각 충격함수로 주입하고 증류수를 이동상으로 하여 공탐유속(superficial linear velocity) 0.283 ~ 1.70cm/min 범위에서 매 5분마다 출구에서 분획하고 HPLC로 분석하여 메틸프록토시드와 자당의 용출 크로마토그램을 얻고 상당높이 H 와 이론단수 N 및 용출체적 V_E 를 구하였다.

메틸프록토시드를 정밀분리하기 위해서는 60°C로 항온한 크로마토그래피 칼럼에 급액농도가 각각 3g/L, 5g/L 및 5g/L인 메틸프록토시드, 자당 및 과당의 수용액을 충전체적의 25%, 50%, 75% 및 100%만큼 사각형 펄스로 주입한 후에 메틸프록토시드와 자당에 대해서는 증류수로 용출시키고 과당에 대해서는 0.1M의 염화나트륨수용액으로 용출시키면서 매 5분마다 출구에서 분획하고 HPLC로 분석하여 각 성분의 용출 크로마토그램을 얻고 메틸프록토시

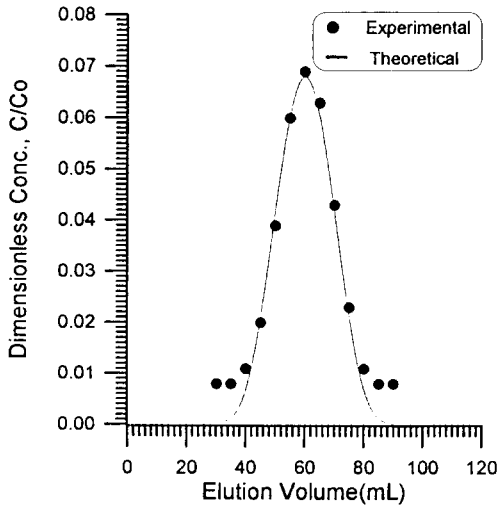


Fig. 2. Elution Chromatogram of Methyl fructoside for Impulse Injection with Eluent of 0.566cm/min at 60°C.

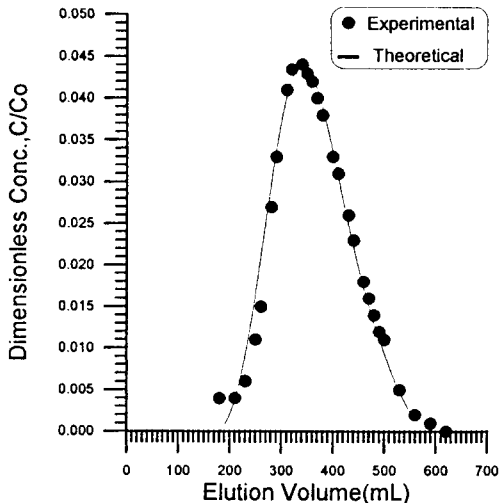


Fig. 3. Elution Chromatogram of Sucrose for Impulse Injection with Eluent of 0.566cm/min at 60°C.

드의 해상도와 평균농도 및 생산성에 관한 자료를 얻었다. 시료는 탄수화물칼럼(carbohydrate column, 4.6×250mm, Waters)에 20 μ L의 시료를 주입하고 아세토니트릴-중류수(75:25(v/v), 1.4mL/min)을 이동상으로 하여 RI 검출기로 측정하는 HPLC(600E pump & controller, R401 RI detec-

Table 1. Dependency of Equivalent Height on Linear Velocity.

Superficial Linear Velocity (cm/min)	Equivalent Height(cm)		
	Methyl Fructoside		Sucrose
	25°C	60°C	60°C
0.283	0.79	0.564	0.641
0.566	1.48	0.558	1.11
0.849	1.84	0.949	1.44
1.13	2.01	1.37	1.69
1.70	2.23	2.06	2.04

tor, M746 integrator, Waters)법으로 분석하였다.

결과 및 고찰

메틸프룩토시드와 자당의 용출 크로마토그래피

Amberlite IRA-900이 충전된 크로마토그래피 칼럼 입구에 농도가 10g/L인 메틸프룩토시드 수용액 2mL와 20g/L인 자당 수용액 10mL를 각각 충격함수로 주입하고 중류수로 용출시키면서 매 5분마다 분획하여 HPLC로 그 농도를 분석해서 Fig. 2, 3의 충격응답곡선을 얻었다. 상당높이는 최대농도의 60%가 되는 높이에서 충격응답곡선의 폭과 용출체적으로부터 도식적인 방법으로 결정하였고 식 (3)으로부터 이론단수를 구하여 식 (4)에 의해 이론해를 구하였다. 그림에서 알 수 있는 바와 같이 용출 크로마토그램과 이론해는 잘 일치하였으며, 각각의 용출 크로마토그램으로부터 온도와 유속변화에 따른 상당높이를 구하여 Table 1에 나타내었다.

일반적으로 상당높이와 유속의 상관관계는 축방향 분산과 세공확산 및 물질전달 저항인자가 고려된 Van Deemter식(16)으로 나타낼 수 있는데, 비교적 균일한 충전물이 반경방향과 축방향으로 고르게 충전되고 이동상이 액체로 확산계수가 기체에 비해 대단히 작은 경우에는 세공확산과 경막확산의 영향이 간단하게 유속의 함수로 표시되며 유속이 낮을수록 상당높이가 감소한다고 한다(20). Table 1에 나타낸 바와 같이 메틸프룩토시드와 자당의 상당높이는 유속이 낮을수록 감소하였으며 가능한 한 낮은 유속으로 용출시키는 것이 이론단수가 증가함을 알 수 있었다. 특히 메틸프룩토시드는 60°C, 0.566cm/min에서 최소의 상당높이값을 나타내었다. 상당높이에 대한 용출온도의 영향은 메틸프룩토시드의 경우 25°C에서보다 60°C에서의 확산계수가 크므로 60°C

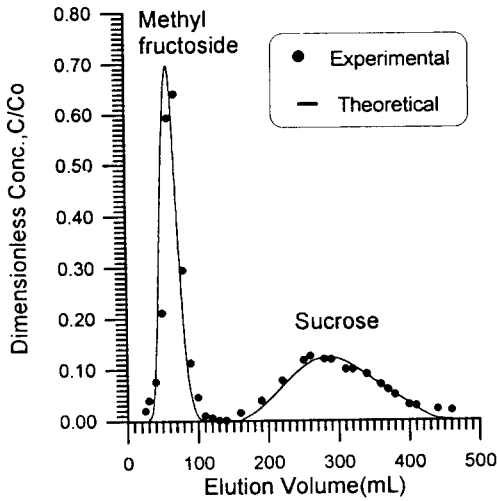


Fig. 4. Elution Chromatogram for Rectangular Feed with Loading Volume of 50% of Packed Bed Volume.

에서의 상당높이가 보다 더 작았으며 온도가 높을수록 유리하다는 것을 알 수 있었다. 따라서 분리공정의 조업온도는 Amberlite IRA-900(OH⁻ form)의 안정성을 고려할 때에 허용할 수 있는 최고온도인 60℃로 하였다.

메틸프룩토시드의 정밀분리

메틸프룩토시드와 자당의 급액농도는 급액체적이 100%일 때 해상도가 1 이상으로 유지되는 최대농도로 예비실험결과 그 최대급액농도는 각각 3g/L와 5g/L임을 알 수 있었다. 60℃로 항온한 크로마토그래피 칼럼에 농도가 각각 3g/L, 5g/L 및 5g/L인 메틸프룩토시드와 자당 및 과당의 수용액을 충전 체적의 25%, 50%, 75% 및 100%만큼 사각형 펄스로 주입한 후에 공탐유속 0.283~1.70cm/min인 증류수로 용출시키고 매 5분마다 분획하여 HPLC로 분석해서 급액체적과 공탐유속에 따른 용출 크로마토그램을 얻었다. 용출순서는 Fig. 4, 5에 나타낸 바와 같이 메틸프룩토시드, 자당 그리고 과당 순이었다. 메틸프룩토시드는 1번 탄소에 메톡시기가 결합되어 있는 비환원당으로 자당과 과당에 비하여 소수성이 크고 친수성인 Amberlite IRA-900의 표면과는 친화력이 약하므로 곧바로 용출하여 용출곡선의 폭이 좁으며 체류시간이 짧았다. 자당은 메틸프룩토시드보다 친화성이 커서 Amberlite IRA-900

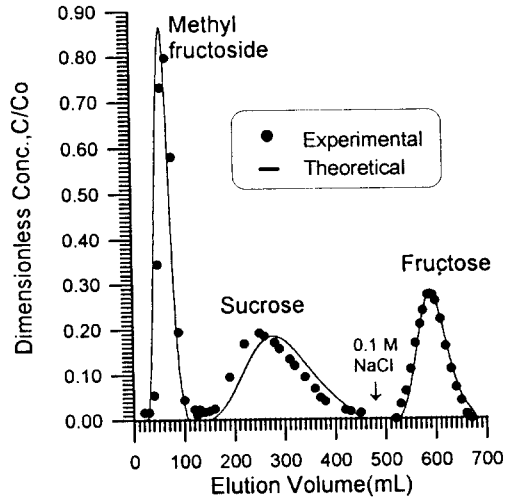


Fig. 5. Elution Chromatogram for Rectangular Feed with Loading Volume of 75% of Packed Bed Volume.

의 세공을 천천히 통과하게 되므로 용출곡선의 폭이 넓고 체류시간이 길었다. 과당은 케톤기를 갖는 환원당으로 음이온교환수지와와의 결합능이 매우 커서 Amberlite IRA-900의 활성점에 강하게 흡착되었고 증류수로서는 용출되지 않았으며 1M의 염화나트륨 수용액으로 용출시켰다. 급액체적과 공탐유속을 조절하여 해상도(resolution)를 1 이상으로 유지하면 메틸프룩토시드의 크로마토그램은 자당과 과당의 크로마토그램과 완전히 분리되었고 메틸프룩토시드만을 정밀분리할 수 있었다.

정밀분리공정의 용출 크로마토그램은 용출체적과 상당높이를 알고 식 (4)를 이용하여 예측할 수 있었고 오차함수의 계산은 Vermeulen 등(21)에 의해 제시된 다음과 같은 근사식을 사용하였다.

$$erf(|a|) = [1 - (1 + 0.2784 * |a|^2 + 0.2314 * |a|^4 + 0.0781 * |a|^6)^{-1}]$$

그림에서 알 수 있는 바와 같이 이론단수 개념에 근거한 크로마토그래피 이론은 메틸프룩토시드의 정밀분리공정을 잘 모사할 수 있었고 이론해와 용출곡선은 전 실험범위에서 근접하였으며 메틸프룩토시드가 자당보다도 더 잘 일치하였다. 이와 같은 연구결과를 토대로 선형 크로마토그래피 이론에 근거한 모델로서 메틸프룩토시드의 정밀분리공정을 모사하여 조업조건을 최적화할 수 있었고 이론적으로 예측가

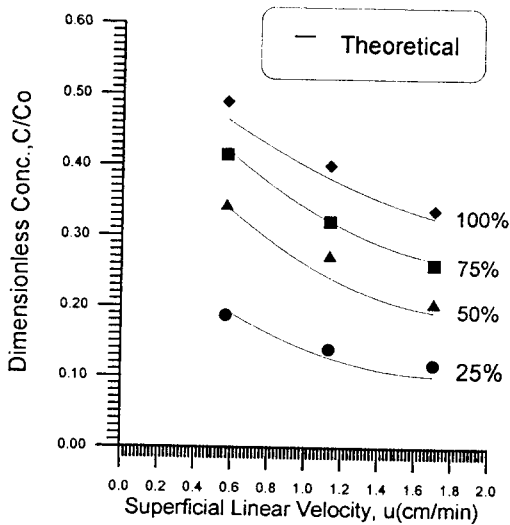


Fig. 6. Dependency of Mean Concentration of Methyl fructoside on Superficial Linear Velocity with Different Loading Volume.

능한 용출시점과 용출중점에서 분획하면 고순도의 메틸프루토시드만을 회수할 수 있었다. 정밀분리하고자 하는 메틸프루토시드는 자당과 과당보다도 먼저 용출되므로 자당과 과당의 용출시간과 상관없이 분리정제할 수 있었으며 크로마토그래피 공정의 순환주기(cycle period)를 단축할 수 있었다.

메틸프루토시드의 평균농도

액체 크로마토그래피에 의한 정밀분리공정에서 회수율과 평균농도는 해상도(resolution) 및 생산성(productivity)과 함께 크로마토그래피 공정의 성능지표로서 해상도가 1 이상이 되면서 평균농도가 높아야 한다. 일반적으로 회수율과 평균농도가 클수록 해상도와 생산성은 감소하므로 최적 운전조건이 검토되어야 한다. 현재 조업되고 있는 대부분의 크로마토그래피 분리공정은 소규모이며 회분식으로 운전되고 있어서 분리공정의 생산성과 회수율이 낮다는 문제점을 지적할 수 있다. 크로마토그래피 분리법의 생산성은 회수되는 성분의 평균농도와 용출시간에 의하여 결정되며 평균농도는 높고 용출시간은 짧아야 한다. Fig. 6에는 회수된 메틸프루토시드의 평균농도와 이론치를 유속과 급액체적의 함수로 나타내었으며 실험치와 이론치는 비교적 잘 일치하였다. 실험으로 얻은 평균농도는 메틸프루토시드의 회수율이 95% 이상이 되도록 분획하여 측정하였고 이론치

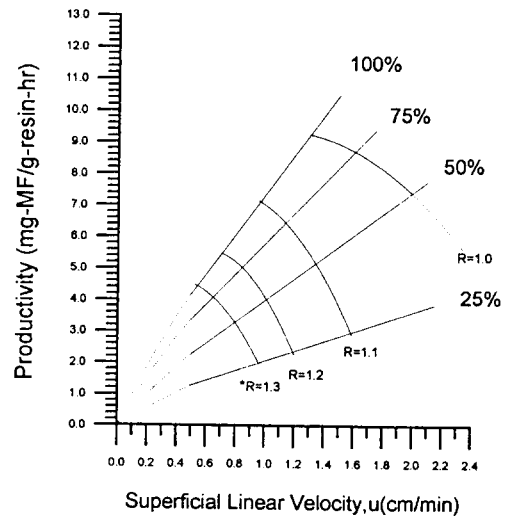


Fig. 7. Dependency of Productivity of Methyl fructoside(MF) on Superficial Linear Velocity of Eluent with Different Loading Volume(*; resolution).

의 평균농도는 식 (4)로 계산한 메틸프루토시드 최대농도의 50%를 취하여 계산하였다. 회수된 메틸프루토시드의 최대평균농도는 이론적 한계치인 초기농도의 50%에 도달하였고, 유속 1.13cm/min에서 급액체적이 충전체적의 75%이면 초기농도의 약 35% 수준이었다. 크로마토그래피 분리공정에서 평균농도가 높으면 회수율이 감소하고 회수율이 높으면 평균농도가 낮았으나, 본 연구에서는 회수율 95% 이상에서도 높은 평균농도를 얻었으며 제시된 분리공정의 우수성을 확인할 수 있었다.

메틸프루토시드의 생산성

크로마토그래피 분리공정의 조업조건은 용출유속과 온도, 시료의 급액농도와 급액체적을 변화시키면서 목표 물질의 해상도가 1 이상일 때 생산성이 최대가 되도록 최적화되어야 한다.

앞서 논의한 메틸프루토시드와 자당의 크로마토그램에 관한 이론해 식 (4)를 활용하여 충전체적을 기준으로 한 급액체적과 공탑유속의 함수로 메틸프루토시드의 생산성과 해상도에 관하여 이론치를 구하여 Fig. 7에 나타내었다. 생산성은 메틸프루토시드의 평균농도를 용출시간과 충전질량으로 나누어 계산하였고 해상도는 메틸프루토시드와 자당의 용출체적의 차를 두 크로마토그램 밑변의 1/2을 합한 값으

로 나누어 계산하였다. 그림에서 알 수 있듯이 분리하고자 하는 메틸프룩토시드의 초기농도가 일정할 때 급액체적과 공탑유속이 증가할수록 생산성은 높아지나 반면에 해상도는 떨어지고 급액체적과 유속이 감소할수록 해상도는 높지만 생산성은 떨어진다. 실제의 정밀분리공정에서는 꼬리끌림(tailing)현상이 나타나므로 해상도는 1 이상 되어야 하며 Fig. 7을 검토한 결과 해상도를 1.1로 하면서 생산성이 최대가 되는 조업조건은 급액체적이 충전체적의 75%, 공탑유속은 1.13cm/min으로 하는 것이 최적조업조건이라 판단되었다. 최적조업조건하에서 Amberlite IRA-900 단위 그램당 단위 시간에 약 7mg의 메틸프룩토시드를 정밀분리할 수 있었다.

요 약

효소적으로 합성된 메틸프룩토시드(methyl fructoside)와 당의 혼합물로부터 Amberlite IRA-900을 고정상 담체로 하여 당과 배당체를 액체 크로마토그래피법으로 정밀 분리함으로써 메틸프룩토시드를 출발물질로 하는 새로운 sugar ester의 합성공정이 연구개발되도록 하고, 액체 크로마토그래피법에 의한 알킬배당체의 정밀 분리기술이 실용화될 수 있도록 최적조업조건과 해상도 및 생산성을 검토하였다.

Amberlite IRA-900을 고정상 담체로 한 메틸프룩토시드의 정밀분리공정은 이론단수의 개념에 근거한 선형 크로마토그래피 모델로 모사할 수 있었으며 메틸프룩토시드와 자당의 용출 크로마토그램을 잘 예측할 수 있었다. 급액농도가 각각 3g/L와 5g/L인 메틸프룩토시드와 자당의 수용액으로부터 메틸프룩토시드를 정밀분리하기 위해서는 급액을 60℃에서 충전체적의 75%까지 주입하고 공탑유속 1.13cm/min의 증류수로 용출시킬 때 해상도 1.1에서 95% 이상의 회수율과 7mg MF/g-resin/h의 생산성을 얻었다.

감 사

본 연구는 보건복지부의 보건의료기술연구비로 이루어졌으며 관계기관에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. C. F. Goochee and T. Monica(1990), *Bio/*

- Technol.*, **8**, 421.
 2. H. Maag(1984), *JAACS*, **61**, 259.
 3. C. C. Akoh(1995), *Food Science and Nutrition*, **35**, 405.
 4. 榊原敏之(1990), *油化學*, **39**, 451.
 5. V. Sluzky, A. M. Klivanov, and R. Langer (1992), *Biotechnol. and Bioeng.*, **40**, 895.
 6. R. R. Wagner and Petri, Jr.(1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 4313.
 7. E. Fisher(1893), *Chem. Ber.*, **26**, 2400.
 8. C. R. Noller and W. C. Rockwell(1938), *J. Am. Chem. Soc.*, **60**, 2076.
 9. Hess and Kurt(1921), *Chem. Ber.*, **54B**, 499.
 10. A. B. Foster(1957), *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 1395.
 11. H. E. Horvath and R. L. Metznerberg(1963), *Biochem. Biophys. Acta.*, **74**, 165.
 12. G. W. O'Donnell and G. N. Richards(1972), *Aust. J. Chem.*, **25**, 907.
 13. F. Helfferich and G. Klein(1970), *Theory of Chromatography*, Marcel-Dekker, N. Y.
 14. L. Lapidus and N. R. Amundson(1952), *J. Phys. Chem.*, **56**, 984.
 15. H. K. Rhee and N. R. Amundson(1972), *Chem. Eng. Sci.*, **27**, 199.
 16. J. J. Van Deemter, F. J. Zuiderweg, and A. Klinkenberg(1956), *Chem. Eng. Sci.*, **5**, 271.
 17. E. N. Lightfoot, R. J. Sanchez-Palma, and D. O. Edwards(1962), *New Chemical Engineering Separation Techniques*, (H. M. Schoen, ed.), p. 9, Interscience Press, N. Y.
 18. R. T. Kurnik, A. W. Yu, G. S. Blank, A. R. Burton, D. Smith, A. M. Athalye, and R. V. Reis(1995), *Biotechnol. and Bioeng.*, **45**, 149.
 19. 허주형, 김해성(1995), *한국생물공학회지*, **10**, 159.
 20. E. Grushka, L. R. Snyder, and J. H. Knox (1975), *J. Chromatogr. Sci.*, **13**, 25.
 21. T. Vermeulen, M. D. LeVan, N. K. Hiester, and G. Klein(1984), *Perry's Chem. Engineers' Handbook*, (R. H. Perry and D. Green, eds), Section 16, McGraw-Hill, N. Y.