

초임계 이산화탄소와 보조용매를 이용한 돼지췌장 지질제거에 의한 판크레아틴의 생산

권혁수 · 박선영 · † 전병수
부경대학교 식품생명공학부
(접수 : 2003. 5. 21. 게재승인 : 2003. 8. 27.)

Pancreatin Production by Removal of Lipid from Hog Pancreas using Supercritical Carbon Dioxide with Entrainer

Hyuk-Soo Kwon, Sun-Young Park, and Byung-Soo Chun†
† Faculty of Food Science & Biotechnology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea
(Received : 2003. 5. 21. Accepted : 2003. 8. 27.)

The study of pancreatin extraction was investigated by supercritical fluid process. Using supercritical carbon dioxide extraction with entrainer the purification of pancreatin was possible to remove lipids from Hog pancreas. To observe the optimum conditions different experimental variables were changed as pressure, temperature, flow rate of solvent and 0.25 mm of sample size were evaluated for effective removal of lipids. Ethanol and n-hexane were used as an entrainer with 5 mL/min. Increasing pressure at constant temperature the efficiency of the lipid removal in Hog pancreas was improved and the protein was concentrated without denaturalization, compared that of the control Hog pancreas. The most efficient conditions of lipid elimination were 17 MPa of pressure and 35°C of temperature and 0.25 mm of sample size.

Key Words : Pancreas, pancreatin, supercritical carbon dioxide

서 론

판크레아틴은 돼지의 췌장으로부터 추출, 정제한 효소로 부형제를 첨가해서 만든 것으로 전분소화력, 단백소화력 및 지방소화력을 가지고 있는 복합 소화효소이다(1). 이 효소는 사람의 소화효소와 아주 유사한 성질을 가지고 있다. 체외로부터 섭취한 음식물 중에는 3대 영양소 (탄수화물, 단백질, 지방), 비타민, 염류 등이 포함되어 있는데, 이러한 영양소의 대부분은 그대로 체내에 흡수되는 것이 아니라 소화관을 통과하는 사이에 소화효소에 의해 분해되고 흡수 가능한 형태로 바뀌게 된다. 우리나라 사람들의 식생활이 점점 서구형으로 변해감에 따라 아밀라아제, 프로테아제, 리파아제를 포함한 종합 소화효소를 필요로 하게 되었다. 췌장 소화효소의

최적 pH는 전분소화력이 8정도이며, 단백소화력이 7~9정도, 지방소화력이 7정도이다(2).

돼지췌장에는 소화 효소인 α -아밀라아제(3), 프로테아제(4), 리파아제(5, 6)의 함량이 풍부하여 소화 효소관련 의약품 원료로 적합하다. 최근 의약품 원료로 사용되고 있는 소화 효소는 전량 수입에 의존하고 있고, 그 수요가 매년 증가 추세에 있으며 사용되는 용도가 다양하다. 그러나 분리 및 정제 과정에서 불순물 혼입과 산화·환원에 의한 효소의 불활성은 효소의 불안정성과 효소의 역가 상승을 억제시키므로 동물 췌장으로부터 효소의 분리 및 정제 공정 기술이 중요하다(7). 일반적으로 알려진 열수 추출법(8, 9)은 용매의 회수에 대한 어려움이 따른다는 단점과 그 외의 다른 용매 추출법 또한 순도 및 용매회수를 높이기 어렵다. 따라서 초임계 유체를 사용한 분리 기술이 최근 새로운 분리 공정기술로 이 분야에 대한 연구가 기초 과학적인 연구의 측면과 산업적 응용 면에서 매우 중요한 분야로 이에 관한 연구가 매년 증가 추세에 있다.

초임계 유체 (supercritical fluids)를 이용한 기술은 최근 20여년간 미국, 일본 및 독일 등 선진 외국의 화학산업 분야에

† Corresponding Author : Faculty of Food Science & Biotechnology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea
Tel : +82-51-620-6428 Fax : +82-51-622-9248
E-mail : bschun@pknu.ac.kr

서 새로운 관심을 모으고 있는 신분리 기술의 하나라 할 수 있다. 초임계 상태란 유체의 고유 임계점 이상의 압력과 온도에서 기체상과 유사한 확산계수, 점도 등의 전달 물성을 갖고 액체상과 비슷한 밀도를 갖도록 조절시켜 놓은 양면성 상태하의 유체를 말한다(10,11).

유체가 초임계 상태에 있을 때, 다수의 혼합물 중 특정 성분에 대하여 선택적인 분리능력을 나타내는 등의 특이한 열역학적 거동들은 이미 100여 년 전부터 관찰·연구되어온 분야이다. 반면에 초임계 현상을 실제 혼합물의 분리 문제에 적용하는 연구는 미진한 상태에 있었다. 그러나 1970년대에 접어들면서 중화학 산업이 부딪치게 된 몇 가지의 사안들 - 에너지 가격의 급격한 상승, 환경오염 문제, 화학 제조산업의 패턴 변화에 따라 재래 분리공정으로는 효과적인 분리나 정제가 어려운 신물질의 창출 등 - 에 힘입어 중·정밀화학, 식품, 의약 그리고 에너지 산업 등에서 실로 다양한 응용가능성을 지닌 대체 신 공정으로 대두되기 시작하였다(12-14).

초임계 유체를 이용한 생물분리공정은 천연 물질로부터 유용한 성분을 선택적으로 추출함으로써 기존의 재래식 추출 방법에서 야기되는 문제점을 해결할 수 있으며, 또한 혼합물 중의 특성성분을 선택적으로 분리할 수 있다. 본 연구에서는 돼지 췌장에 존재하는 지질을 초임계 유체를 이용하여 제거한 후 유용성분인 소화효소 단백질을 효과적으로 정제할 수 있는 최적조건을 검토하여 식품 및 의약품 공업에 응용하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 돼지췌장 원료는 (주)바이넥스에서 제공받아 동결건조 시킨 후 분쇄기로 마쇄한 후 시료 조건별 입자크기에 맞게 체로 친 후 밀봉하여 냉장 보관하여 실험에 사용하였다. 주 용매인 이산화탄소 (부산 수영동 소재, 성우가스)는 순도 99% 이상인 것을 사용하였으며, 보조용매로는

99% ethanol (Hayman, Co., England)과 n-hexane (Hayman, Co., England)을 사용하였다. 그 외의 분석 및 전처리 시 사용된 시약 (Junsei Co., Japan)은 분석용 1급 시약을 사용하였다.

실험장치 및 방법

Fig. 1은 본 실험에 사용된 초임계 추출장치로서 추출탑은 내경 9.5 cm, 500 ml 용량인 고압용 Stainless steel을 사용하였고, 흐름 line은 1/4", 1/16"의 stainless steel pipe (ss-316)를 사용하였다. 액체 이산화탄소를 초임계 압력으로 변환시키는 고압펌프는 250 kgf/cm²의 용량을 가진 고압펌프 (Milton Roy Co., MD93(112)FD352, USA)이며, 추출탑으로 유입되는 이산화탄소의 유량을 정량적으로 pumping 하였고, 유입되는 가스의 온도와 압력은 digital measuring sensor에 의해 측정되었다. 보조용매를 정량적으로 주입시킬 수 있는 보조용매 펌프는 HPLC용 펌프 (Young-lin Instrument Co. Ltd., M930)를 사용하였다. 추출장치 내의 압력은 metering valve와 back pressure regulator로 조절하였다. 본 연구에 사용된 초임계 이산화탄소 추출의 단위공정은 추출탑에 충전된 원료로부터 초임계 이산화탄소와 추출물을 분리하는 Separator, 유체의 큰 압력 변화로부터 발생하는 열을 조절하기 위한 열교환기, 추출탑에 유입되는 초임계 이산화탄소의 사용량을 측정하는 flow meter (Sinagawa DC-2, Japan)로 구성되어 있다.

포화 압력 상태인 이산화탄소가 저장탱크로부터 냉각기 (-10℃)를 통과하여 이산화탄소의 기포가 제거된 후 고압 metering pump에 의해 일정한 유량으로 유입되며, 시스템 내의 설정 압력까지 수행되어진다. 고압펌프로부터 추출탑에 유입되기 전에 추출 용매인 CO₂와 보조용매 펌프로부터 유입되는 에탄올은 설정된 추출온도에 따라 항온조에 의해 예열되어진 후 추출탑 내의 온도는 thermocouple에 의해 감지되어 추출온도를 결정하였다. 장치 내의 전체 압력은 2개의 압력조절기를 부착시켜 순간 압력 변화로 인한 추출 조건 변화를 방지하였으며, 고압 펌프와 압력 조절기 앞에 micron

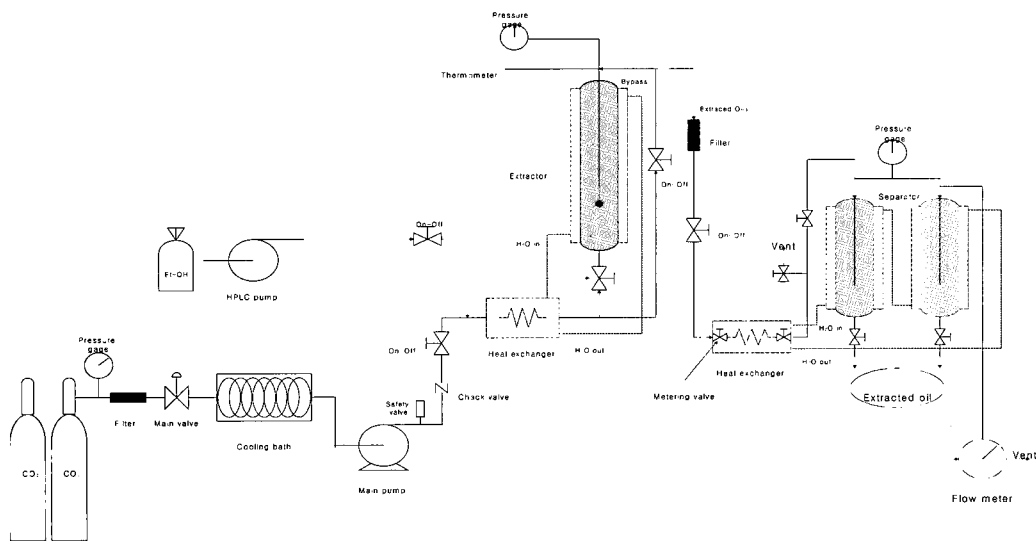


Figure 1. Schematic diagram of supercritical fluid process.

filter를 부착하여 추출이 진행되는 동안 용매 CO₂와 고체시료의 입자에 의한 시스템의 흐름이 중단되는 것을 방지하였고, safety valve를 부착하여 장치 내의 고압의 역류현상으로 인한 압력의 역류로 고압펌프의 손상을 방지하기 위하여 출구에 check valve를 설치하였다. 초임계 이산화탄소는 추출탑 내의 시료로부터 고미성분을 추출한 후 낮은 압력 상태인 분리기에 유입되어 용질과 용매가 쉽게 분리되었으며, 이때 CO₂는 flow meter에 의해 사용된 CO₂ 양이 측정된 후 대기로 방출시켰다.

본 실험에서는 동결 건조한 채장 원료 30 g를 사용하였으며 보조용매인 ethanol과 n-hexane을 첨가하지 않거나 분당 5 mL을 첨가하여 90분간 실험을 행하였다.

일반성분 분석

돼지 채장의 초기 수분함량, 동결건조 후의 수분함량, 초임계 이산화탄소로 지질을 추출하고 난 후의 수분함량의 측정은 각각 적외선 수분함량 측정기 (Kett, FD-600-2, Japan)를 이용하였다. 또한 돼지채장의 지질함량은 속실텐 장치 (Dong-won, EAM-9202, Ltd.)로 18시간동안 지질을 추출하여 그 함량을 측정하였다. 단백질 함량은 kjeldahl 질소정량법을 이용하며 초기 함량과 실험 후의 함량을 각각 측정하였다.

결과 및 고찰

수분, 지질 및 단백질 함량

동결 건조한 돼지 채장의 일반성분과 초임계 이산화탄소에 의해 지질을 제거한 후의 돼지채장의 일반성분을 비교하여 Table 1에 나타내었다. 동결 건조한 돼지채장의 초기 수분함량은 약 5% (w/w)였고, 초임계 공정 후에는 약 3% (w/w)로 약간 감소하였으며, 초기 지질함량은 약 32~38% (w/w)였으나, 초임계 이산화탄소와 보조용매를 처리한 후 시료내의 지질 함량은 3% (w/w) 이내로 많은 양의 지질이 제거된 것을 확인할 수 있었다. 최종 생산물의 효소활성을 측정할 경우 높은 활성이 예상되며, 이것은 초임계 이산화탄소가 시료 내의 지질을 추출할 동안 시료 내의 효소와 어떠한 화학적 변화를 초래하지 않는 불활성 용매로 존재한 것으로 알려져 있다(18-21). 그러나 실제로 지질을 제거한 판크레아제를 의약품 판크레아틴 제제로 사용하기 위해 1% 미만으로 생산할 경우 효소의 활성이 더욱 증가할 것이다. 본 연구에서 도출된 결과에 의하면 추출 압력, 온도, 원료 입자의 크기, 초임계 이산화탄소의 유량 및 보조용매의 변화에 따라 효과적인 지질제거가 예측된다.

Table 1. Comparison of Hog pancreas composition before and after SC-CO₂

Water (%)		Lipid(%)		Protein (%)	
Before SC-CO ₂	After SC-CO ₂	Before SC-CO ₂	After SC-CO ₂	Before SC-CO ₂	After SC-CO ₂
5	2	32~38	3	52	70

입자크기의 영향

Fig. 2는 시료 입자 크기 변화에 따른 지질의 제거 효율을 나타내었다. 동결건조한 돼지채장을 분쇄하여 입자의 크기를 0.35 mm, 0.48 mm, 0.71 mm, 1.0 mm로 변화시켰고, 유량 15 mL/min, 추출온도 35°C, 추출시간 90분으로 하여 13.6 MPa, 17 MPa의 두 압력 조건에서 실험한 결과를 각각 나타내었다. 그림에서 나타난 바와 같이 시료입자의 크기가 작을수록 돼지채장으로부터 제거된 지질의 양이 높은 것으로 나타났다. 이것은 시료를 분쇄하여 표면적을 넓혀주면 초임계 이산화탄소와의 접촉면적이 넓어지고, 동시에 세포막을 파괴함으로써 제거 속도를 증가시킬 수 있다. 즉 작은 입자에서는 입자들 사이로 초임계 이산화탄소의 침투가 용이하고 반응기 내부에 충전된 시료의 공간이 형성되어 용매가 쉽게 그 공간으로 통과함으로써 충분한 접촉시간을 유지하지 못하여 용질의 추출효율을 감소시키는 터널현상을 방지하므로 추출속도를 증가시킬 수 있다.

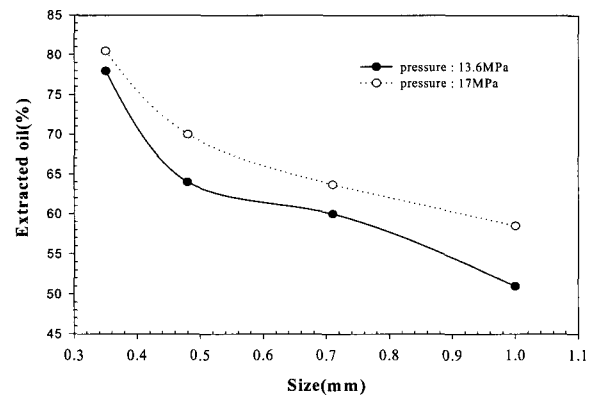


Figure 2. Effect of particle size change on the lipid extraction from Hog Pancreas using SC-CO₂ (flow rate : 15 mL/min, temperature : 35°C, extraction time : 90 min).

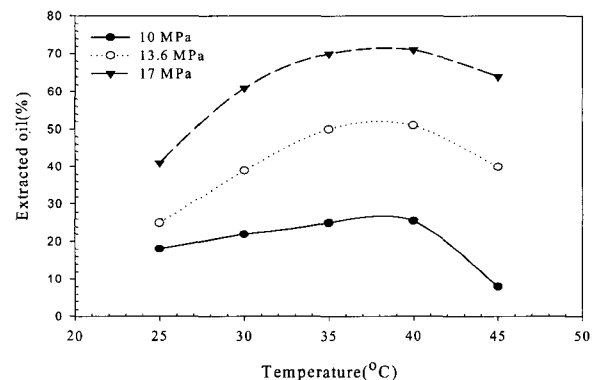


Figure 3. Effect of temperature change on the lipid extraction from Hog pancreas using SC-CO₂ (flow rate : 15 mL/min, particle size : 0.71 mm, extraction time : 90 min).

온도의 영향

Fig. 3은 온도에 따른 지질 제거효율을 나타낸 것으로서 유량 15 mL/min, 시료 입자 크기 0.71 mm, 90분간 추출한

결과를 나타낸 것이다. 각각의 압력조건에서 온도가 증가할수록 제거된 지질의 양이 증가함을 알 수 있고, 35°C, 17 MPa에서 돼지 췌장의 지질의 70%가 제거되어 가장 높은 제거 효율을 나타내었다. 또한 같은 압력, 40°C 이상의 조건에서는 제거 효율이 점차 감소하는 경향을 나타내었는데, 이는 압력이 일정할 때 온도가 증가함에 따라 초임계 이산화탄소의 밀도가 작아져 지질에 대한 용해성이 감소하기 때문인 것으로 판단된다.

압력의 영향

Fig. 4는 초임계 이산화탄소의 압력에 대한 돼지췌장으로부터의 지질 제거 효율을 나타낸 것이다. 일정 온도 35°C에서 유량 15 mL/min, 시료 입자 크기 0.71 mm의 시료 30 g를 사용하여 90분간 실험한 결과, 반응기 내부의 압력이 증가할수록 제거된 지질의 함량이 증가하다가, 17 MPa 이상의 압력에서는 제거 효율이 감소하는 경향을 나타내었다. 이것은 온도가 일정한 상태에서 초임계 이산화탄소의 용해력은 압력이 증가함에 따라 일반적으로 증가하지만 원료 내에 존재하는 지질의 표면에서 거리가 먼 용질에 접근할 경우 전달속도에 큰 영향을 미치는 확산계수, 점도, 밀도의 물성에 크게 의존한다. 밀도가 큰 용매는 시료내부에 대한 용매의 침투력이 작기 때문에 지질 제거 효율이 상대적으로 낮아진다.

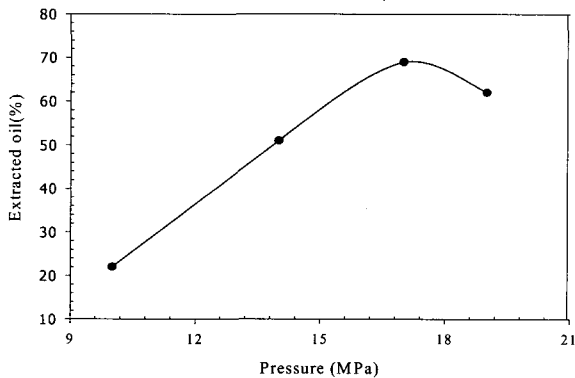


Figure 4. Effect of pressure change on the lipid extraction from Hog pancreas using SC-CO₂ (flow rate : 15 mL/min, particle size : 0.71 mm, temperature : 35°C, extraction time : 90 min).

보조용매의 영향

Fig. 5는 입자 크기 0.71 mm인 시료 30 g을 17 MPa, 40°C, 초임계 이산화탄소의 유량 15 mL/min의 조건에서 보조용매인 ethanol을 첨가한 경우와 그렇지 않은 경우를 비교하여 나타낸 그림이다. 보조용매를 넣지 않은 경우와 보조용매를 첨가하여 실험한 경우를 비교하였을 때 제거된 지질의 양이 5배정도 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이것은 초임계 이산화탄소는 시료 내에 존재하는 비극성 물질만을 선택적으로 이끌어내는 반면에 보조용매인 ethanol은 극성과 중성지질까지 모두 제거하기 때문인 것으로 사료된다. 또한 ethanol과 n-hexane의 다른 보조용매를 사용하여 실험한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 그림에서 알 수 있듯이 보조용매로 n-hexane을 사용했을 때보다 ethanol을 사용하였을 경우 원료

인 돼지췌장으로부터 제거된 지질의 함량이 더 높았고, 이는 ethanol이 n-hexane보다 원료 속의 지질을 보다 효과적으로 제거할 수 있다는 것을 보여준다.

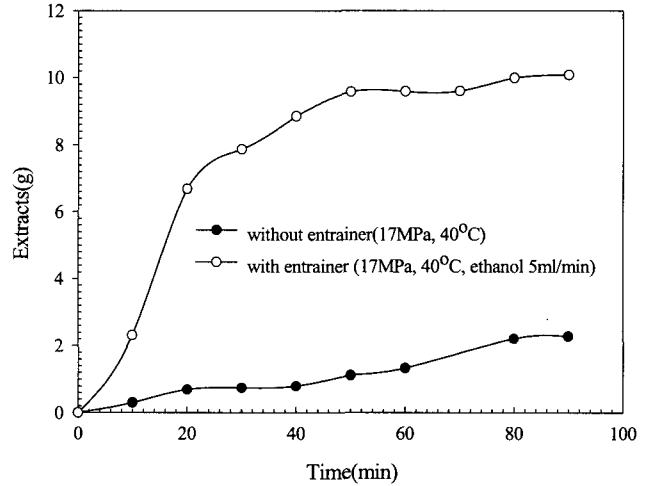


Figure 5. Effect of entrainer on the lipid extraction from Hog pancreas using SC-CO₂ (flow rate : 15 mL/min, particle size : 0.71 mm).

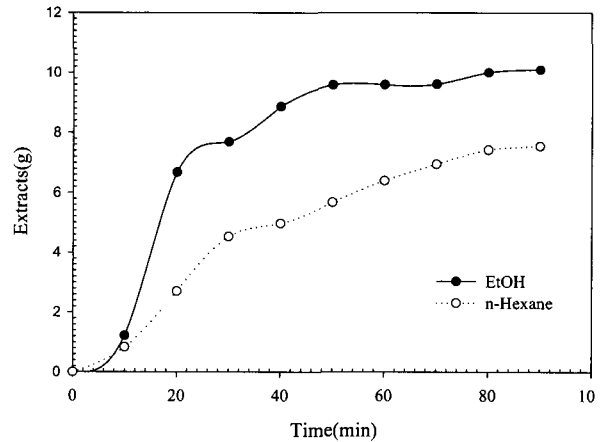


Figure 6. Effect of different entrainer on the lipid extraction from Hog pancreas using SC-CO₂ (pressure : 17 MPa, temperature : 35°C, particle size : 0.71 mm), extraction time : 90 min).

유량 변화에 따른 영향

Fig. 7은 초임계 이산화탄소의 유량을 변화시켰을 때에 원료 내의 지질의 제거효율을 나타낸 것이다. 일정 온도 35°C에서, 입자 크기 0.71 mm의 시료 30 g을 사용하여 90분간 유량에 따른 지질 제거 효율의 결과, 유량이 증가할수록 지질의 제거 효율이 증가함을 알 수 있었다. 17 MPa의 압력에서는 유량 약 40 mL/min에서 95% 이상의 지질 제거 효율을 보였으나, 10 MPa의 경우에는 약 80 mL/min에서 약 95%의 제거 효율을 보였다.

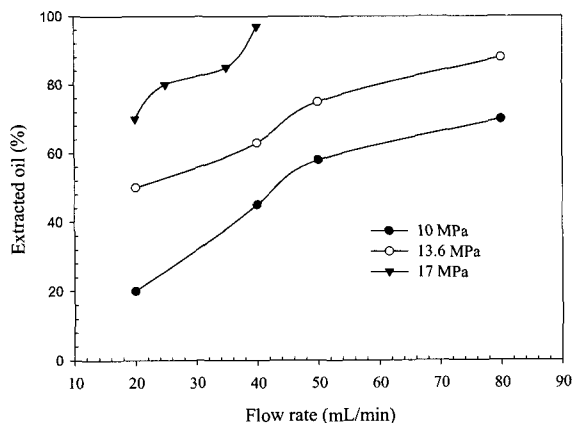


Figure 7. Effect of flow rate change on the lipid extraction from Hog pancreas using SC-CO₂ (temperature : 35°C, particle size : 0.71mm, extraction time : 90 min).

요약

본 연구에서는 초임계 이산화탄소와 보조용매를 사용하여 동결 건조된 돼지 췌장에 존재하는 지질을 단백질 효소의 변성 및 구조의 파괴 없이 제거함으로써 고순도 소화효소제를 분리하고자 하였고, 동결 건조된 돼지 췌장 내의 지질 제거 효율은 온도, 압력, 초임계 이산화탄소의 유량, 원료의 입자크기에 의존하였다. 추출온도와 압력이 높은 상태에서 높은 지질 제거효율이 예상되나 45°C 이상의 온도에서는 효소의 활성에 영향을 미치므로 추출온도 선택이 요구되었다. 또한 한정된 온도 범위 내에서 지질제거 효율을 크게 하기 위하여 용매의 이동특성을 최대로 증가시키기 위한 최적 압력이 요구되었다. 초임계 이산화탄소를 이용하여 지질을 분리한 후 원료내의 지질함량은 3% (w/w) 이내로 90% 이상의 제거율을 보였으며, 보조용매를 사용했을 경우 사용하지 않았을 때 보다 추출시간은 약 3 배 이상 단축되었으나, 사용된 보조용매가 효소의 활성에 영향을 미치므로 보조용매의 선택이 매우 중요하다는 것을 제시하고자 한다.

감사

본 연구는 2002년도 BB21 Project 연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

REFERENCES

- Adachi, M., K. Shibata, I. A. Shio, M. Harada, and S. Katoh (1998), Selective separation of trypsin from pancreatin using bioaffinity in reverse micellar system composed of a nonionic surfactant, *Biotechnol. Bioeng.* **58**, 649-653.
- Kwak, H. S., L. J. Jeon, and J. N. Park (1990), Effects of food grade porcine pancreatic lipase on the production of short-chain

- fatty acids and its contribution, *Kor. J. Food Sci. Technol.* **22**, 248-254.
- Uchiyama, K., T. Ohtani, M. Morimoto, S. Shioya, K. Suga, S. Harashima, Y. Oshima (1995), Optimization of rice alpha-amylase production using temperature-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae* for the regulatory system, *Biotechnol. Prog.* **11**, 213-217.
- Suh, M. J. (1973), Effects of condiments upon enzyme activity (1)- effects of condiments upon proteinase activity of pancreatin, *Kor. J. Nutr.* **6**, 293-298.
- Kwon, M. K., E. G. Jang, and H. S. Kwak (1991), Effect of commercial food grade porcine pancreatic lipase on physical and sensory characteristics in cheddar cheese during ripening periods, *Kor. J. Dairy Sci.* **13**, 197-205.
- Kwak, H. S., L. J. Jeon, and B. S. Chung (1990), Effect of food grade porcine pancreatic lipase on neutral volatile compound profiles in cheddar cheese, *Kor. J. Food Sci. Technol.* **22**, 206-214.
- Nurhan, T. D. and T. Feral (1997), Extraction conditions and moisture content of conola flakes as related to lipid composition of supercritical CO₂ extracts, *J. Food Science* **62**, 155-159.
- Kim, D. S., Y. C. Lee, J. K. Koo, and Y. M. Kim (1990), Preparation of the hydrolyzate using crab byproduct after water extraction, *J. Kor. Fish. Soc.* **23**, 77-86.
- Paradossi, G., F. Cavalieri, L. Pizzoferrato, and A. M. Liquori (1999), Physicochemical study on the polysaccharide ulvan from hot water extraction of the macroalga ulva, *Int. J. Biolog. Macromolecules* **25**, 309-315.
- Palmer, M. V. and S. S. T. Ting (1995), Applications for supercritical fluid technology in food processing, *Food Chem.* **52**, 345-350.
- Staby, A. and H. Molleru (1993), Solubility of fish oil fatty acid ethylesters in sub and supercritical carbon dioxide, *J. American Oil Chemists Soc.* **70**, 583-588.
- Brunner, G. (1988), Extraction of caffeine from with supercritical CO₂, *Proc. Int. Symp. on supercritical fluids* **2**, 691.
- King, M. B. and T. R. Bott (1993), Extraction of natural products using near-critical solvent, Glasgow, Univ. of Birmingham.
- McHugh, M. A. and V. J. Krukons (1994), Supercritical fluid extraction (principles and practice), 2nd ed., Butterworth-Heinemann.
- Rizvi, S. S., R. R. Chao, and Y. J. Liaw (1988), Concentration of omega-3-fatty acids from fish oil using supercritical carbon dioxide, *Supercritical fluid extraction and chromatography*.
- Chrastil, J. (1982), Solubility of solid and liquid in supercritical carbon dioxide, *J. Phys. Chem.* **34**, 3016-3021.
- Brunetti, L., A. Daghetta, E. Fedeli, I. Kikic, and L. Zanderighi (1989), Deacidification of olive oils by supercritical carbon dioxide, *J. American Oil Chemical Society* **66**, 209-217.
- Bartle, K. D., A. A. Clifford, S. B. Howthorne, J. J. Langenfeld, D. J. Miller, and R. A. Robinson (1990), Model for dynamic extraction using a supercritical fluid, *J. Supercritical fluids* **3**, 143-149.
- Habulin, M., M. Primozić, and Z. Knez (2003), Enzymatic hydrolysis of sunflower oil in SC CO₂, 6th International symposium on supercritical fluids 2003, France, 1-6.
- Mesiano, A. J., E. J. Beckman, and A. J. Russell (1999), *Chem. Rev.* **99**, 623-633.
- Kamat, S., G. Critchley, E. J. Beckman, and A. J. Russell (1995), *Biotech. Bioeng.* **46**, 610-620.