

초임계 CO₂와 에탄올 혼합물에 의한 대두인지질의 선택적 추출

이미진[†] · 전영수* · 정노희** · 장부식

*씨엔에이 바이오텍(주), 충북대학교 약학대학 약학과

**충북대학교 공과대학 공업화학과

(2010년 5월 13일 접수 ; 2010년 9월 14일 채택)

Selective Extraction of Phospholipids from Soybeans with Mixture of Supercritical Carbondioxide and Ethanol

Mi-Jin Lee[†] · Young-Soo Jeon* · Noh-Hee Jeong** · Bu-shik Jeang*

*CNA Biotech, Co., Ltd.

College of Pharmacy, Chungbuk Nat'l, Univ. Cheongju 361-763, Korea

Dept. Industrial Eng. Chem., Chungbuk Univ. Cheongju 361-763, Korea

(Received May 13, 2010 ; Accepted September 14, 2010)

Abstract : Supercritical carbondioxide is very effective in removing oils from a variety of seed matrices, devoid of any appreciable amount of phospholipid content. However, the limited solubility of phosphalipids in supercritical carbondioxide leaves behind a potentially valuable by-product in spent seed matrix. Any phospholipid extraction process from the spent matrix must maintain the structure and the quality of phospholipids and must be compatible with the end use of the seed protein meal an animal feed or for human consumption. An initial supercritical carbondioxide extraction of soybean flakes was performed at 32 MPa and 80°C to extract the oils, leaving the phospholipids in the deflatted soybean flakes, A second step was performed on the defatted soybean flake using $X_{eth}=0.10$, Varying the pressure from 175 MPa to 70.6 MPa and temperature from 60°C to 80°C. For all supercritical carbon dioxide/ethanol mixture extractions, a fraction rich in phospholipids was obtained. The fractions extracted from defatted soybean flakes were dried and them redissolved in chloroform before HPLC-ELSD analysis. Quantitative and qualitative analysis of phospholipids on soybean seeds, defatted soybean flake, and different extracted phospholipid fractions was carried out, to ascertain the effect of extraction pressure and temperature.

Keywords : Selective Extraction, Phospholipids, Soybeans, Supercritical

[†]주저자 (E-mail : shuduc@hanmail.net)

1. 서론

인지질은 양친매성을 갖는 천연계면활성제로 합성계면활성제에 비하여 인체에 대한 유해성이 매우 적고 환경친화적인 물질로서 공업적으로 매우 광범위하게 활용할 수 있는 극성지질이다[1]. 레시틴과 phosphatidylcholine(PC)은 종종 혼돈되어 사용된다. 더욱이 레시틴은 복합물, 인지질들(PLs)의 천연 혼합물, 조식물성오일의 증류수세척에 의하여 얻어진 수화된 점성물을 분리 건조시켜 얻는다[2]. 따라서 레시틴은 트리글리세라이드, 안료, 탄수화물, 스테롤, 세레부로사이드, 그와 다른 성분들이 하나 이상의 PLs를 포함하는 분획에 함유된 여러 인지질 혼합물의 다양한 부류로서 기술되어있다[3]. 인지질에 대한 보다 진보된 연구는 National Center for Agricultural Research에서 여러 종류의 탈지 종자류를 초임계 탄산가스(sc-CO₂)로 추출함으로써 매우 효율적 추출방법임을 보여주고 있다[4, 5] 이러한 sc-CO₂를 사용한 추출 방법은 연속적으로 대두오일의 진추출로 탈지 점성물을 얻는 것이 매우 용이하게 되었다[6]. 더욱이 sc-CO₂추출에서 PLs의 제한된 가용성물은 종자매트릭스에서 부산물로서 잠재적인 가치성을 갖게 된다. 그러므로 인지질 회수 제조공정은 동물사료로서 종자단백질이나 밀(고기)를 얻는데 적합하고 또한 인체용의 사용 목적에도 적합하다. 순수한 CO₂는 인지질 일부분을 가용시키는데는 효과적이 아니므로 인지질의 가용성을 향상시키기 위하여 적당한 용매의 선택은 열역학적 견지뿐만 아니라 식품안정성에도 중요하다. 예를 들어 미국 Generally Recogmigid As Safe'(GRAS)규격에 부합되는 보조용매로서 에탄올이 PLs를 분획시키는데 유용하게 사용하였다[7].

초임계탈수법(SFE)공정 중 카놀라 종자(canola seed)에서 인지질을 추출하는데는 Temelli공정[8]이 유용하였다. 그리고 고압 상평형 데이터는 sc-CO₂/에탄올 혼합비율의 다양함을 보여준다[9]. 탈지대두박에서 PLs의 추출과 분획에 있어 sc-CO₂/에탄올 혼합용매가 매우 효율적이라는 것은 이미 밝혀졌다[10, 11]. 이에 대한 최초의 연구는 sc-CO₂에서 에탄올 5%는 PLs추출에 충분치 않은 적은 양이지만 10%정도의 에탄올을 몰 분획(X_{eth})에 사용함으로써 PLs의 전체량은 증가되었음이 조사되었으

며, 결과적으로 추출에서 phosphatidylcholine(PC)와 phosphatidylethanolamine(PE)의 상대적량은 에탄올 10% 이상의 양을 사용함으로써 다양하게 얻어질 수 있다. 즉, sc-CO₂ 추출시 압력과 온도의 다양한 작업 조건에 의하여 얻어지는 생성물의 함량이 다양하게 얻어지므로 추출과 분획에 있어 여러 파라미터들의 영향에 대해서는 지속적으로 연구되어야 한다.

레시틴의 성분들의 개개의 성질은 알려져 있지 않기 때문에 넓은 의미의 정량적인 연구는 쉬운 일이 아니다. 인지질의 다양한 분획물들을 얻기 위한 연구의 기대 효과는 인지질 정제기술의 발전을 이룩하는데 있으며, 개개의 인지질들의 상대적 알코올 용해도에 기초를 둔 보고도 있다[12]. 더욱이 레시틴을 포함하는 PC에 대한 물리적 특성은 화장품, 의약품 및 식품공업 등 여러 산업분야에서 더욱 응용성을 증가시키고 있다[13].

본 연구에서는 sc-CO₂/에탄올(10%몰 분획) 혼합 용매를 사용하여 탈지대두박에 함유되어 있는 PLs를 가능한 한 완전 추출하기 위하여 초임계유체를 사용하여 종자매트릭스에서 오일의 완전제거와 인지질 분획 등 인지질 생산에 필요한 공정조건을 확립시키고, 이에 압력과 온도를 변화시키면서 PLs를 분획시켜 PC와 PE의 용해도 데이터를 얻는데 그 목적이 있고, 그리고 우선적으로 PC가 풍부한 인지질 분획물을 얻는 것을 목표로 한다.

2. 실험방법

대두종자는 CNA Biotech.사에서 공급되었고 이의 기름함량은 20.8 wt%이고 수분함량은 11.5%였다. 대두박은 Fig. 1과 같은 제조공정을 거쳐 진행되었다.

첫 번째 sc-CO₂ 추출공정은 Muller SFE pilot plant (Muller Extract company GMBH, Coburg, Germany)를 사용하여 온도는 80℃이고 압력은 32MPa에서 초임계 추출하였다. 시판 대두박편(soybean flaker) 600g을 1L용 추출용기(nominal vessel)에 넣고 수분 11.5%를 포함하는 추출물 140g을 압력 10MPa 감압 하에 분리하면, 전체 유지함량 1.8wt%, 수분함량 8.5wt% 탈지시킨 잔유물(DSF) 446.8g 이 추출기에 남는다. Table 1은 첫 단계 추출공정에 얻

은 질량 수치이다. 다음 단계의 sc-CO₂ / 에탄올 혼합용매의 추출은 두 개의 100DX 수동펌프가 있는 Isco SFX 3560 Extractor (Isco, Inc., Lincoln, NE, USA)의 초임계추출기를 사용하였다.

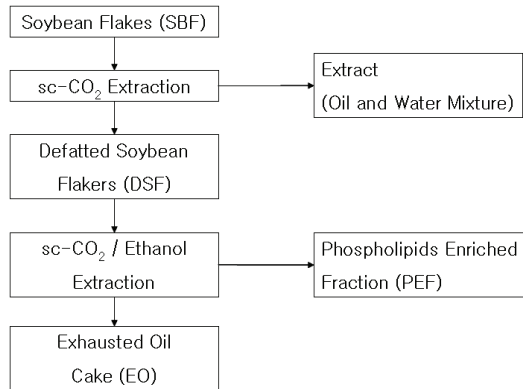


Fig. 1. Flow chart for extraction process of soybean flakes.

sc-CO₂/에탄올 혼합용매 밀도치(P)는 SF-Solver 소프트웨어[14]를 사용하여 산출하였고 Pöhler 및 Kiran [15]에 의한 실험실적 데이터에 따른 것이 매우 좋은 결과를 가져왔다. 이 추출과정은 4.5g 의 DSF 시료를 가지고 30 분 동안 추출하였고, 각 추출은 3번 반복 시행하였다. CO₂와 에탄올 두 개의 수동펌프들은 4°C로 온도를 조절하였고 유속은 sc-CO₂와 에탄올 혼합몰비(X_{ethanol} = 0.10)에서 2ml/min 유속인 것을 택하였다.

PLs은 Bollmann의 추출혼합용매 (benzene:ethanol:petroleum ether (1:1:1, v/v/v))를 사용하여 다섯 홀드에서 SBF 및 DSF로부터 추출되었다[16,17]. 이를 건조시켜 chloroform으로 재용해시켰다. 기본적인 PLs들은 달걀노른자 위에 추출한 L-α-phosphatidyl choline(PC), L-α-phosphatidyl ethanol amine(PE), L-α-phosphatidic acid sodium salt(PA) 및 대두박에서 추출한 L-α-phosphatidyl inositol sodium salt(PI) 등이 Sigma제에 있다. HPLC급과 RPE급 분석용매

Table 1. Mass Balance Flow Sheet(g) of Extraction Carbon dioxide Net Extraction

	In				Out			
	Wet M	Dry M	Water	Oil	Wet M	Dry M	Water	Oil
SEF	600	523.8	69	124.8				
Extract					138.5	119.5	19.0	119.5
DSF					445.1	408.2	36.5	8.9
Total	600	523.8	69	124.8	583.6	528.1	55.5	128.4
Δ (Out-in)					-16.4	+4.3	-13.5	+3.6

Table 2. Extraction Condition

P(MPa)	70	70	70	40	40	40	25	25	25	15	15	15
T(°C)	80	70	60	80	70	60	80	70	60	80	70	60
P ^a (g/ml)	0.95	0.97	0.99	0.85	0.89	0.91	0.75	0.80	0.83	0.65	0.71	0.75

P^a=sc-CO₂/ethanol mixture density, calculated by using SF-Solver [14]

이 추출은 X_{ethanol} = 0.10 사용하고 15~70 MPa 넓은 압력 60~80°C 온도 범위에서 초임계 유체 추출하였다. P-T 효율적 조합은 Table 2에 일괄 표시하였다.

들은 모두 BDH(Sigma제)를 사용하였고, 잔여 건조물과 조 유지는 AOCS-분석방법[18]에 따라 SBF 및 DSF에서 추출된 시료에 대하여 이루어졌다.

인지질 분석은 Varian 2020 gradient programmer을 사용하였고, 두 개의 Varian 2010 pump.(Varian, USA)가 사용되었다. 그리고 분석 조작 과정은 Becart 등[19]의 분석방법에 따라 다음과 같이 진행하였다. 일반상 실리카칼럼 μ Porasil (3.9mm i.d*300mm)(Waters, Milfold, MA, USA) utilizing a Hamilton silica precolumn (Hamilton, Reno, NV, USA) 사용하였다. 이동상은 다음과 같은 두 조성물들이다.

(A) Chloroform:methanol:water:30% ammonium hydroxide (60:34:5.5:0.5, w/w ratio)

(B) chloroform:methanol:30% ammonium hydroxide (80:19.5:0.5, w/w ratio)

HPLC 유속은 1ml/min이고, 이동은 14분에 0%A에서 100%A이고, 23분에 100%A 평균치이고, 29분에 0%A 평균치이다. 이는 주입전 5분 동안 평형이 이루어졌고, PLs의 10에서 25 μ g이 포함하는 10 μ l 시료를 칼럼에 주입하였다. 정량적인 분석은 고순도 기본이 다양한데서 인지질에 대하여 진행되었다. 인지질의 각각에 대하여 1내지 10 μ g 범위의 검량선이 각각 작성되었다. An Alltech Varex MKIII ELSD(Alltech Associates, Inc., Deerfield, IL., USA)는 HPLC 전개를 추적하는데 사용되었다. 에어유속은 3.5ml/min 디텍터는 80 $^{\circ}$ C로 맞추어 중립에 조절되도록 하였다. 모든 디텍터들에 시그널 산출은 Variam DMS 654 를 사용하여 분석하였

고, 통계학적 분석은 Statgraphics 소프트웨어 (Statgraphics Manual, 1992)를 사용하여 분리 분석하였다.

3. 실험결과 및 고찰

SBF와 DSF에서 Bollmann 시약을 가지고 초입계 추출된 PLs의 량과 백분율에 대한 것은 Table 3에 일괄 나타내었고, Table 4는 X_{etkanol}=10%에서 압력 변화시켜 80 $^{\circ}$ C에서 SBF 초입계유체 추출된 PLs 량과 백분율을 산출하여 나타낸 것이고 모든 데이터는 DSF 1g을 기본으로 하였다.

Table 3의 결과에서 다음과 같은 사실이 고려될 수 있다. 우선은 SBF와 DSF에서 초입계 추출에서 나타난 PLs를 비교하면 순수한 CO₂을 가지고 우선 첫 번째 SFE에서 PLs가 추출되지 않을 가능성을 보여주며, PLs는 압력 70MPa에서 많은 양이 추출된다. 이는 Bollmann시약을 사용하여 추출한 결과, DSF에서 전량이 74.8%였다.

그 이하의 압력에서는 인지질이 충분히 얻어지지 아니하였다. 예를 들어 PC, PE, PI 및 PA의 상대적 백분율이 Bollmann시약을 사용하여 얻어진 것과 같다. 그리고 초입계 추출 압력의 감소는 추출된 PLs 량을 감소시키지만 각 인지질의 상대적 백분율은 변화하였다. 특히 25MPa

Table 3. PLs treated by Five-Fold Extraction with Bollmann Reagent from SBF and DSF

Sample	Phospholipid	mg/g DSF	%
SBF	PC	6.20	65.6
	PE	2.51	26.6
	PI	0.68	7.2
	PA	0.18	0.6
	Total	9.56	100
DSF	PC	6.19	64.7
	PE	2.34	24.5
	PI	0.87	9.3
	PA	0.29	1.5
	Total	9.69	100

Table 4. PLs Extracted from DSF at 80°C in Different Pressures Using X_{ethanol}=10%

P and P ^a	PLs	mg PLs/g DSF	%
70 MPa 0.95 g/ml	PC	4.97	68.8
	PE	1.81	25.1
	PI	0.28	3.7
	PA	0.16	2.4
	Total	7.22	100
40 MPa 0.85 g/ml	PC	2.96	73.5
	PE	0.83	20.7
	PI	0.09	1.8
	PA	0.14	3.5
	Total	4.02	100
25 MPa 0.75 g/ml	PC	2.50	77.6
	PE	0.61	18.6
	PI	0.09	2.8
	PA	0.03	1.0
	Total	3.23	100
15 MPa 0.65 g/ml	PC	0.02	20.7
	PE	0.04	44.0
	PI	0.04	35.3
	PA	0.00	0.0
	Total	0.10	100

에서 PC는 추출된 전 PLs의 77.6%이고 이때 Bollmann 시약은 64.7%였다. 더욱이 PI는 Bollmann시약이 sc-CO₂/에탄올 혼합용매보다 많이 추출되었다. 최대 추출수율은 70MPa에서 0.28mgPI/gDSF)이고 Bollmann시약을 사용하여 추출된 것은 0.90mgPI/gDSF였다. PA는 70MPa에서 40MPa 압력 하에서 0.16에서 0.14mgPA/gDSF이 추출되었다. 보다 낮은 압력에서는 PA가 추출되지 않았고, 15MPa에서는 PLs의 특이할만한 양이 추출되지 않았다.

Table 5는 80, 70 및 60°C 등 다른 온도에서 70, 40 및 2.5MPa 다른 압력에서 DSF로부터 추출된 PLs량을 나타낸 것이다. 15MPa에서는 PLs는 어느 온도에서도 추출되지 아니하여 이 데이터는 생략하였고 모든 데이터는 DSF 1g으로 고정하였다. 이 결과 70MPa에서 온도가 80, 70 및 60°C로 감소함에 따라 PLs량은 증가하였다. 70°C에서 PLs량은 Bollmann시약이 사용되었을 때 더욱 많은 양이 추출되었다. 예를 들어 Table 3에서 보는 바와 같이 9.65mgPLs/gDSF

에 비하여 10.77mgPLs/gDSF로 증가하였고 60°C에서는 8.20mgPLs/gDSF이 추출되었다. PC가 풍부한 것은 70에서 60°C사이에서 얻어진 것이다. PC가 가장 많이 추출된 것은 압력 40MPa와 온도 70°C에서 3.14mgPLs/gDSF로 2.63mg는 PC로 상대적 백분율은 80.5%이다.

4. 결론

초임계 유체추출에 있어 sc-CO₂/에탄올 (X_{ethanol}=10%)혼합용매를 사용하여 DSF시료에서 PLs를 완전하게 추출할 수 있는 가능성을 보여주었고 그리고 대두콩에서 오일제거와 인지질 분획물을 얻는 이중 제조과정을 진행시키는 가능성을 확인하였다.

이것은 시료인 대두에서 전 PLs 약 50% 정도 얻는 hexane의 경우와 비교하여 매우 효과적이다. 한편 PLs의 유효한 부분은 hexane을 이용한 추출공정에서 얻을 수 있다.

Table 5. Extracted PLs from DSF at Different Pressure and Temperature Using $X_{\text{ethanol}}=10\%$

T and P ^a at 70MPa	PLs	mgPL/g DSF	%	T and P ^a at 40MPa	PLs	mgPL/g DSF	%	T and P ^a at 25MPa	PLs	mgPL/g DSF	%
80°C 0.95g/ml	PE	1.81	25.1	80°C 0.85g/ml	PE	0.84	20.8	80°C 0.75g/ml	PE	0.60	18.5
	PC	4.97	68.8		PC	2.95	73.4		PC	2.51	77.7
	PI	0.26	3.6		PI	0.07	1.8		PI	0.09	2.8
	PA	0.18	2.5		PA	0.16	4.0		PA	0.03	1.0
	Total	7.22	100		Total	4.02	100		Total	3.22	100
70°C 0.97g/ml	PE	2.15	20.0	70°C 0.88g/ml	PE	0.55	17.4	70°C 0.80g/ml	PE	0.17	18.1
	PC	8.20	76.2		PC	2.53	80.5		PC	0.78	81.9
	PI	0.19	1.8		PI	0.04	1.2		PI	0.00	0.0
	PA	0.23	2.0		PA	0.03	0.9		PA	0.00	0.0
	Total	10.77	100		Total	3.14	100		Total	0.95	100
60°C 0.99g/ml	PE	1.80	22.0	60°C 0.91g/ml	PE	0.67	19.9	60°C 0.84g/ml	PE	0.14	20.5
	PC	6.22	75.9		PC	2.60	77.7		PC	0.56	79.5
	PI	0.14	1.7		PI	0.06	1.7		PI	0.00	0.0
	PA	0.03	0.4		PA	0.02	0.7		PA	0.00	0.0
	Total	8.20	100		Total	3.35	100		Total	0.70	100

p^a= SC-CO₂/ethanol mixture density, calculated by using 'SF-SolverTM'[15].

더욱이 sc-CO₂/에탄올 혼합물에서 압력과 온도의 변화에 따라 때로는 PC가 풍부한 PLs를 얻었다. 이들 결과들로 보아 PL추출 시 70MPa와 80°C에서 X_{ethanol} 변화시켜 PC가 풍부한 PLF를 얻는 수율을 개선시킬 수 있고, DSF로부터 PLs 분획추출율을 향상시키는데 매우 유효한 참고자료로 기대된다.

참고문헌

1. Chessy, J.P., Kramer, W.H, Plant sources of lecithin, in; B.F. Szuhaj(Ed.) Lecithin; Sources, Manufacture and Uses, *American Oil Chemists Society, Champaign, IL, USA* pp 16~31 (1987)
2. Schofield, C.R., Occurrence Structure, Composition, in; B.F. Szuhaj, G.R.List (Eds.) "Lecithins", *American Oil Chemists Society, Champaign, IL., USA* pp 1~20 (1985)
3. Flider, F.J., The manufacture of soybean lecithin, in; B.F. Szuhaj, G.R.List(Eds.) "Lecithins", *American Oil Chemists Society, Champaign, IL., USA* pp 21~37 (1985)
4. Snyder J.M., Friedrich, J.P. and D.D. Christianson, Effect of moisture and particle size on the extractability of oils from seeds with supercritical CO₂, *J. Amer. Oil chem. Soc.*, **61**(12), 1851 (1984)
5. List, G.R, Friedrich, J.P. and J.W. King, Supercritical CO₂ Extraction and Processing of Oilseeds 95, *Oil Mill Gazetteer* **6**, 28 (1989)

6. List, G.R., King, J.W., Johnson, J.H., Warmer, K., and T.L. Mounts, Supercritical CO₂ degumming and physical refining of soybean oil, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **70**(5), 473 (1993)
7. Prorise, W.E., Commercial lecithin products: food use of soybean lecithin, in: Szuhaj, B.F. and G.R. List(Eds.) *Lecithins, American Oil Chemists, Society, Champaign, IL., USA* pp 163~182 (1985)
8. Temelli, F., Extraction of triglycerides and phospholipids from canola seed with supercritical CO₂ and ethanol, *J. Food Sci.*, **57**(2), 440 (1992)
9. Kobe, K.A., and R.E. Lynn, The critical properties of elements and compounds *Chem. Rev.*, **52**, 117 (1953)
10. Montanari, L., King, J.W., List, G.R. and K.A. Rennick, Selective extraction and fractionation of natural phospholipid mixture by supercritical CO₂ and co-solvent mixtures, in: *Proc. 3rd Int. Symp. on Supercritical Fluids, Strasbourg, France*, 17~19 October Vol. 2 pp. 497~504 (1994)
11. Montanari, L., King, J.W., List, G.R. and K.A. Rennick, Selective extraction of phospholipid mixtures by supercritical CO₂ and co-solvents, *J. Food Sci.*, **61**(6), 1230 (1996)
12. Strucelj, D., Mokrovcak, Z., Rade, D., and M. Stastny Alcohol fraction of soybean phospholipids, in: Ceve, G., and F. Paltauf (Eds), *Phospholipids: Characterization, Metabolism, and Novel Biological Application*, AOCS press, Champaign, IL., USA, pp 348~356
13. Juneja, L.R., Yamane, T., and S. Shimiz, Enzymatic method of increasing phosphatidylcholine content of lecithin, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **66**(5), 714 (1989)
14. SF-Solver, Utility Program Pressure/Density/Temperature Relationship, Version 2.5.1., Isco, Inc., Limcoln, NE, USA, 1991
15. Pöhler, H., and E. Kiran, Volumetric Properties of carbon-dioxide+ethanol at high pressures, *J. Chem. Eng. Data.*, **42**(2), 384 (1997)
16. Bollmann, H., US Patent, 1,464,557 (1923)
17. Wittcoff, H., "Phosphatides" Reimhold, New York pp. 486~487 (1951)
18. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist's Society, Method BC 2~49 or BC 3~49, *American Oil Chemist's Society, Champaign, IL., USA* 3rd ed., 1998
19. Becart, J., Chevalier, C., and J.P. Biesse, Quantitative analysis of phospholipids by HPLC with a light scattering evaporating detector-application to raw materials for cosmetic use, *J. High Res. Chromatogr.*, **13**(2) 126 (1990)