

효소를 이용한 식용유지의 탈검 공정

Enzymatic degumming of edible fats and oils

윤석후^{1*}

Suk Hoo Yoon^{1*}

¹우석대학교 식품생명공학과

¹Department of Food Science and Biotechnology, Woosuk University

Abstract

To obtain an edible grade oil from crude oil extracted from oil-bearing materials, it is generally necessary to carry out a refining process composed with degumming, deacidification, bleaching, and deodorization, to remove undesirable matters which affect the quality and shelf life of oils. The main purpose of degumming is to remove gum material mainly consisted with phospholipids. Phospholipases convert nonhydratable phospholipids into their hydratable forms which can be removed by centrifugation. In comparison with conventional water and acid degumming processes, enzymatic degumming can result the lower phosphatide content in oil than

conventional processes. The enzymatic degumming can be conducted with the reduced amount of acid, and contributes to generate less amount of wastewater, decrease of operating cost, and increase oil recovery yield. The phospholipases used in enzymatic degumming process are phospholipase A1, A2, B, and C.

Keywords: crude oil, oil refining, degumming, phospholipid, phospholipase

서론

유량증자에서 압착이나 용매 추출로 얻은 원유

* Corresponding author: Suk Hoo Yoon,
Department of Food Science and Biotechnology, Woosuk University, Samnye, Jeonbuk 55338, Korea
Tel: 미표기
Fax: 미표기
E-mail: sukhooyoon@gmail.com / shooyoon@woosuk.ac.kr
Received April 26, 2018; revised May 29, 2018; accepted May 31, 2018



표 1. 수화 탈검 후 회수된 레시틴의 조성

인지지방질(%)	콩기름	해바라기기름	유채기름
PC	32	34	37
PE	23	17	20
PI	21	30	22
PA	8	6	8
기타	15	13	13

(또는 조유)에서 식용에 적합한 유지를 얻으려면 탈검, 탈산, 탈색, 탈취 등과 같은 일련의 정제 공정이 필요하다. 정제 공정의 목적은 식용유지의 품질(맛, 냄새, 외관 등) 및 저장성에 영향을 미치는 바람직하지 않은 물질을 제거하는 것이다. 원유에는 다양한 물질로 이루어진 검물질이 함유되어 있다. 예로서 검물질에 존재하는 질소와 당은 원래 원유 내에 있던 단백질과 당지방질(glycolipids)이 분해되어 생성된 것이다. 검물질의 주성분은 인지지방질(phospholipid, 또는 포스파타이드, phosphatide)이지만 기름과 탈지박 입자도 포함되어 있다. 이들은 유지가 수분을 흡수하여 생성된 수화 인지지방질이 비유용성으로 변할 때 같이 혼입된 것이다. 따라서 유지를 저장하기 전에 검물질을 수화시켜 수화된 검물질을 제거하면 원유 저장 시 검물질의 침전을 방지할 수 있는데 이러한 공정을 수화 탈검(water degumming)이라고 한다(Segers, 1990).

전통적인 유지의 탈검 공정은 수화 탈검인데 이 공정에서 얻어지는 인지지방질은 상업용 레시틴의 제조에 사용된다. 레시틴의 화학명은포스파티딜콜린(phosphatidylcholine, PC)이지만 상업적으로 사용되는 레시틴이란 명칭은 포스파타이드 전체를 의미한다. 또한 수화 탈검 공정 중에는 당과 같은 친수성 물질도 제거된다. 수화 탈검으로 얻어진 상업용 레시틴의 조성은 원유 내 포스파타이드의 조성과는 다르지만, PC 이외에도 포스파티딜에탄올아민(phosphatidylethanolamine, PE), 포스파

표 2. 레시틴과 유지의 지방산 조성

지방산 (%)	콩기름		해바라기기름		유채기름	
	레시틴	유지	레시틴	유지	레시틴	유지
16:0	16	11	11	7	7	4
18:0	4	4	4	5	1	2
18:1	17	23	18	29	56	61
18:2	55	54	63	58	25	22
18:3	7	8	0	0	6	10
기타	1	0	1	1	5	1

티딜이노시톨(phosphatidylinositol, PI), 포스파티드산(phosphatidic acid, PA) 등을 포함하고 있다(표1) (Racicot and Handel, 1983; Nieuwenhuyzen and Tomás, 2008).

포스파타이드는 지방산 조성이나 광학적 성질이 다른 여러 이성질체의 혼합물인데 원유 내의 지방산 조성과 상업용 레시틴의 지방산 조성은 다르다. 포스파타이드의 지방산 조성은 포스파타이드가 존재하는 유지의 지방산 조성을 반영하지만, 일반적으로 원유보다 높은 팔미트산 함량과 낮은 올레산 함량을 갖는 경향이 있다(표 2) (Gunstone and Harwood, 2007). 유지에 존재하는 포스파타이드의 양은 일반적으로 인 함량을 이용하여 계산할 수 있는데 전환 계수는 약 25-26이다. 즉 200 ppm의 인을 함유하는 유지는 약 0.5%(중량)의 포스파타이드를 함유하는 것이다(Pardun, 1981).

유지의 탈검 공정에는 수화 탈검 이외에도 산 탈검, 슈퍼 탈검, 건식 탈검 등이 있다. 물을 사용하는 공정은 탈검 중에 많은 양의 원유가 손실되고, 탈산 공정에서 다량의 알칼리 용액을 사용하게 되어, 이로 인해서 다량의 폐수가 발생하는 단점이 있다. 이러한 단점들을 극복하기 위하여 물리적 정제(physical refining) 공정이 개발되었는데 물리적 공정에는 낮은 인 함량을 갖는 탐검유만이 사용되어야 하므로 이를 생산하기 위하여 효소를 이용한 탈검 공정이 개발되었다(Kim et al., 1985; Türkay and Şahin-Yeşilçubuk, 2017).

포스파타이드의수화성

원유 내 포스파타이드의 전하는 pH에 따라 변하게 되는데 전하의 변화가 포스파타이드의친수성을 결정하게 된다(표 3). 따라서 원유의 탈검 정도는 포스파타이드의친수성에 따라 달라지게 된다(표 4) (Sen Gupta, 1986). PI는 이노시톨 부위에 5개의 자유 하이드록실기를 가지고 있어 친수성이 매우 높으므로 수화 탈검 중에 제거되어 탈검유에서 PI 함량은 상당히 낮아지게 된다(그림 1). PC도 콜린 부위의 트리메틸아미노 그룹이 존재하여 모든 pH 범위에서 친수성을 가지므로 수화 탈검 공정 중에 대부분 제거된다. PE는 pH에 따라 전하가 변하여 친수성이 달라지므로 수화 탈검 중에 완전히 수화되지 않아 탈검유에는PE가 일부 포함되어 있을 수 있다. PA는 포스페이트 부위에 있는 수산기는 해리되지 않으므로 수화되기 어려우므로 탈검 후에도 유지 내에 잔류하게 된다. 더구나 PA의 칼슘염은인산염의 2개의 수산기가 염을 형성하기 때문에 모든 pH 범위에서 비수용성이 되어 수화 탈검 후에도 PA 염은 유지 내에 그대로 남아있게 된다(Abramson et al., 1964). 유지 내 비수용성 포스파타이드(Nonhydratable Phosphatides, NHP)의 주성분은 PA의 칼슘염이다. 화학적 정제 공정에서 PA 염은 알칼리 탈산 정제 과정에서 알칼리로 인하여 전하를 띄게 되어 수화가 가능하게 되므로 알

칼리 탈산 정제 과정 중에 제거된다. 그러나 알칼리를 사용하지 않은 물리적 정제 공정에서는 이들이 제거되지 않으므로 다른 방법으로 이들을 제거하여야 한다.

원유에 존재하는 PA는 PC, PE 및 PI와 같은 인지지방질이 포스포라이페이스(phospholipase, PLase) D에 의해 가수분해 되어 생성되었을 가능성이 높다(그림 1). PLase A1 및 A2는 지방산과 글리세롤 사이의 에스테르 결합 중 하나를 가수 분해함으로써 리소인지지방질(lysophospholipid, LPL)을 형성한다. LPL의 남아 있는 지방산 1개는 위치특이성이 없는 PLase B에 의해서 가수분해 된다. PLase C는 PC와 PE와는 반응하지만 PA와 PI와는 반응하지 않는다(Hitchman, 2009). LPL의 유리 하이드록실 그룹은 원래의 지방산 에스테르보다는 더 친수성이지만, 원래의 인지지방질이비수용성이라면 완전히 수용성이 되지 않는다. NHP에는 리소포스파티드산(lysophosphatidic acid)과 리소포스파티딜에탄올아민(lysophosphatidylethanolamine)이 존재하기도 한다(Dijkstra and Van Opstal, 1989; Clausen, 2001).

부분 아실글리세롤의 경우 1,3-다이아실글리세롤(diacylglycerol, DAG)은 1,2-DAG보다 구조적으로 더 안정하다. 또한 1- 혹은 3-모노아실글리세롤(monoacylglycerol, MAG)(α -MAG)은 2-MAG(β -MAG)보다 안정하다. 따라서 1-아실LPL은 2-아실

표 3. pH에 따른 인지지방질의 전하 변화

pH	PC	PE	PI	PA	Ca-PA
2	+	+	0	0	0
3	(+)	(+)	(0)	(0)	0
4	(±)	(±)	(-)	(-)	0
5-7	±	±	-	-	0
8-9	±	±	-	(-2)	0
>10	±	-	-	-2	0

표 4. 인지지방질의 상대적 수화 속도

인지지방질	상대적 수화 속도
PC	100
PI	44
PI (Ca염)	24
PE	16
PE (Ca염)	0.9
PA	8.5
PA (Ca염)	0.6

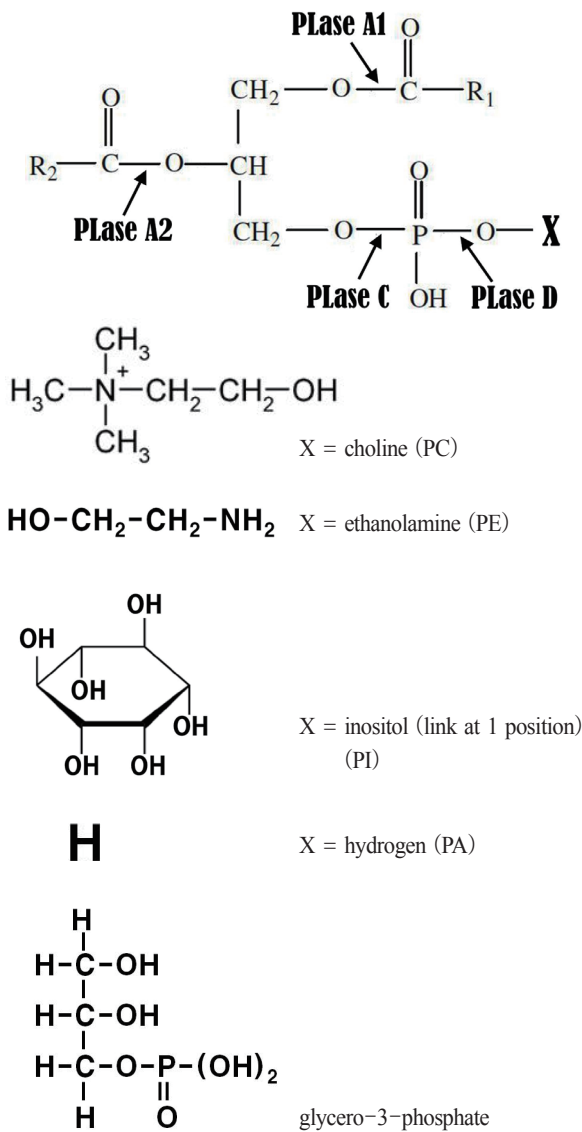


그림 1. 인지지방질의 구조와 포스포라이페이스의 활성

LPL보다 안정하며, PLase A1에 의해 생성된 2-아실LPL은 1-아실LPL로 이성화 될 것으로 예상된다. 이들은 다시 PLase A1의 가수분해작용에 의하여 글리세로포스페이트로 변하게 되는데, 실제로 PLase A1으로 처리된 유지의 수용액 층에서 글리세로포스페이트가 관찰되었고 농도는 LPL의 농도

와 유사하였다. 그러나 PLase A2를 사용하면 PLase A1을 사용했을 때보다 수용액 층에서 LPL의 농도가 낮아진다(Clausen, 2001; Yang, 2008).

수화 탈검과 화학적 탈검 공정에서 유지의 손실과 효소적 탈검 공정

수화 탈검 중 원유에 80-85℃의 물 적정량을 첨가하여 약 20분 동안 서서히 교반하여 포스파타이드를 수화시키면 수화 가능 인지지방질(hydratable phospholipids, HP)이 기름과 물의 계면에서 덩어리를 형성하게 되는데 여기에는 유지와 NHP가 일부 포함되어 있다. 이를 검(gum) 또는 젖은 검(wet gum)이라고 한다.

생산 공정에서는 원유의 실제 인지지방질 함량은 알기가 어려우므로 유지의 인 함량이 대신 사용된다. 인 함량은 일반적으로 ICP나 NMR을 이용하여 구하고 여기에 인 원자를 포함하는 인지지방질 분자량의 가정된 비율과 유지 내의 존재하는 각각의 인지지방질의 추정 분자량에 기초하여 구해진 일정 계수(23-31.5, 대부분 25)를 곱하여 인지지방질의 함량을 구한다. 수화 탈검유의 인 함량은 80-130ppm 정도이다. 유지 내 인지지방질의 함량을 구하는 다른 방법은 아세톤 불용성물질(acetone-insoluble, AI)의 함량을 구하는 것이다. AI는 인지지방질, LPL, 당지방질 및 기타 극성 화합물 등을 포함하며, 트리아실글리세롤(triacylglycerol, TAG), DAG 및 지방산은 포함되지 않는다. 검의 AI 함량은 62-70% 정도인데, 이는 유지 함량이 30-38%이나 됨을 나타낸다(Schofield, 1981).

수화 탈검 공정은 시료 종류와 전처리, 추출 조건, 인을 함유한 비유용성물질의 양 등에 따라 운전 조건이 달라진다. 산업적 탈검 공정에서 유지의 손실은 불가피하지만, 물의 투여량, 유지 및 물의 온도, 수화 시간, 원심 분리 등과 같은 공정 변수를 최적

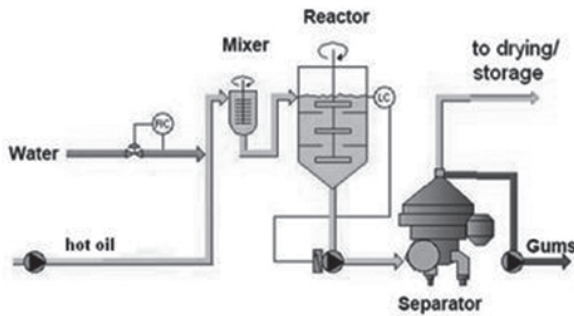


그림 2. 수화탈검공정

화함으로써 유지의 손실을 줄일 수 있다(그림 2).

유지를 물리적으로 탈산하려면 인지지방질을 철저히 제거(인 함량 3 ppm 이하)하여야 한다. 산 탈검 공정에 이은 알칼리 탈산 공정으로 NHP도 수화시켜 제거할 수 있지만 이러한 방법으로 인 함량이 낮은 탈검유를 얻으려면 유지의 대량 손실을 감수하여야만 한다. 화학적 탈검유에는 대개 20 ppm 미만의 인이 존재하며, 이렇게 얻어진 검물질의 AI 함량은 50-60% 정도인데, 이 사실은 나머지 40-50%에는 중성지방질, 지방산 및 기타 지방질이 포함되어 있음을 의미한다(Anderson, 2005).

화학적 탈검에서 발생하는 유지의 손실량은 제거되는 인지지방질의 양과 유화되어 손실되는 유지는 양으로 구성된다. 유지의 손실을 줄이는 유일한 방법은 인지지방질 자체의 유화 특성을 변화시킴으로써 가능한데 이점이 바로 효소적 탈검 공정의 특징이라고 할 수 있다. 식물성 유지의 탈검 공정에서 효소를 사용하면 탈검 과정에서 손실되는 유지의 양을 현저히 줄일 수 있다. 그러나 효소적 탈검에는 기존의 탈검 공정(수화/산 탈검, 알칼리 정제)에 비하여 효소 사용, 추가 설비, 추가 에너지(전력 및 열) 사용에 따른 비용이 발생할 수 있다. 현재 유지공장의 자동화된 추출 및 정제 설비는 효소적 공정을 제어하는데 유리하여 효소적 공정의 채택을 용이하게 할 수 있다(De Greyt, 2013; Cowan, 2013).

근래 들어 식물성 유지의 가격은 상승하고 있으며 탈지박보다 경제성이 높아지고 있는 실정이다. 대부분의 탈검 공정에서는 식품이나 사료 등급의 레시틴을 생산하지 않으므로 검물질은 일반적으로 탈지박에 포함되므로 추가적인 유지의 회수량은 계산하기가 상대적으로 간단하다. 효소적 탈검 공정의 주요 변수는 효소의 비용과 효율인데, 효소 탈검 공정의 경제성을 계산할 수 있는 전체 프로세스 성능에 대한 신뢰할 수 있고 독립적인 데이터만 충분하다면 사용은 급격히 늘어날 것이다(Galhardo and Dayton, 2018).

실험실 규모와 파이롯트 공장 규모에서 PLase A1, A2, B, C를 사용하여 다양한 원유의 효소적 탈검을 수행한 예는 많이 보고되었다(Lamas et al., 2014; Mukherjee et al., 2013; Manjula et al., 2010). 예로써 동백기름 원유를 유전자 조작된 *Bacillus cereus*로부터 얻은 PLase C를 사용하여 탈검한 결과 인함량이 15.14 ppm인 유지를 98.2% 회수하였다. Lecitase Ultra와 동시에 사용할 경우 유지 회수율의 증가는 없으나 인함량을 6.84 ppm로 낮출 수 있었다(Jiang et al., 2015). 그러나 본 논문에서는 공장 규모의 효소적 탈검 공정만을 취급하기로 한다.

포스포라이페이스를 이용한 인지지방질의 유화 능력 감소

인지지방질의 유화능력을 감소시키는 한 가지 방법은 인지지방질 내의 극성 부분과 비극성 부분을 절단하는 것인데, PLase는 이 반응을 수행하는 효과적인 방법이다. 효소적 반응은 화학 공정과 비교하여 선택적이어서 원하지 않는 부산물의 형성을 크게 줄이거나 없앨 수 있다. 효소적 탈검은 원유나 수화 탈검된 유지 모두에게 사용할 수 있는데, 이 공정의 조건은 사용되는 효소의 활성을 최적화하도록 설계되어 있다.

산 및 알칼리 물질은 인지질의 수화성을 변화시

키고 기름과 물 혼합물의 pH를 조절하여 효소의 성능을 최적화시키는 이중의 역할을 한다. 효소적 탈검의 목적이 HP만을 제거하기 위한 것이라면 산 및 알칼리 물질의 사용을 생략할 수도 있다. 효소적 탈검 공정을 위해서는 추출된 원유를 효소 반응 최적 온도인 40-70℃로 냉각하여야 한다. 냉각은 반응에 필요한 안정한 에멀전을 형성하며 다음 단계에서 알칼리를 첨가할 때 불필요한 비누화를 방지할 수 있다. 알칼리는 물의 pH를 조절하여 효소 반응에 최적합한 pH를 유지할 수 있도록 한다. 냉각된 유지에 인지지방 함량의 2배가 되는 물을 첨가하고 일반적으로 유지 중량의 30~200 ppm이 되는 효소를 투여한다.

전단력이 높은 믹서를 사용하면 효소가 녹아 있는 수용액과 지방질과 물 사이의 계면에 존재하는 수화된 인지지방질과의 안정된 유화액을 만들 수 있으며, 교반을 계속하면 인지지방질의 반응이 종료될 때까지 유화 상태를 지속할 수 있다. 반응이 완료되면 인지지방질은 LPL, DAG, 포스포릴에스터 등으로 전환된다. 그 후 기름과 물의 혼합물을 75-85℃로 가열하여 자동 세척 원심분리기에서 기름과 물을 분리한다. 현재 상업적으로 이용이 가능한 여러 가지 PLase는 선택성, 사용량, 가격 등에서 서로 다른 경제적 이점을 제공한다 (표 5)(AB Enzymes, 2004;

Maria et al., 2007; DSM, 2011; Yang et al., 2006; Mueller et al., 2009).

효소적 탈검 공정의 변천

1993년 독일의 Röhm사(나중에 Lurgi사로 됨)는 세계 최초로 효소를 이용한 식용유지의 탈검 공정인 EnzyMax 공정을 개발하였다(그림 3) (Aalrust et al., 1993). 이 공정에는 돼지 췌장에서 얻은 PLase A2가 사용되었는데 이 효소를 매우 강한 유화제인 sodium citrate와 sodium dodecyl sulfate를 이용하여 수용액에 용해시켰다. 내열성이 좋은 효소 용액을 50-75℃로 예열된 기름에 첨가하여 유화액을 만든

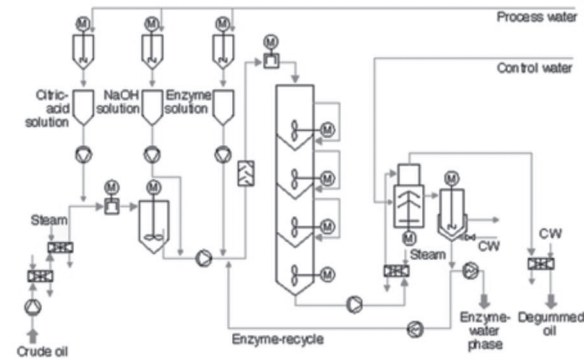


그림 3. EnzyMax탈검공정

표 5. 공업적탈검용포스포라이페이스

제조사	상품명	활성	기원	개발연도
AB Enzymes	Rohalase MPL	PLase A2	<i>Trichoderma reesei</i>	2004
Novozymes	Lecitase Novo	PLase A1	<i>Fusarium oxysporum</i>	2006
Novozymes	Lecitase Ultra	PLase A1	<i>Thermomyces lanuginosa</i> <i>Fusarium oxysporum</i>	2006
Danisco	Lysomax	PLase A2	<i>Streptomyces violaceoruber</i>	2007
Novozymes	Lecitase 10L	PLase A2	<i>Prcine pancreas</i>	2007
Verenium	Purifine PLC	PLase C	<i>Pichia pastoris</i>	2009
DSM	Gumzyme	PLase A2	<i>Aspergillus niger</i>	2011
Novozymes	QuaraLowP	PLase A1	<i>Talaromyces leycettanus</i>	2018

후 3-4 시간 동안 반응시키고 원심분리기를 사용하여 기름을 분리하였다. 공정 후 인의 함량은 3 ppm 정도가 되었는데, 인 함량이 높은 유지는 원료로 사용하지 않았고, 유지 내에 NHP가 많으면서 인 함량은 250 ppm 이하인 경우에만 원료로 사용하였다. 당시에는 상업적으로 이용이 불가능하였던 PLase C나 D의 사용은 고려하지 않았으며, 고가의 제한된 양의 효소만을 사용할 수밖에 없었기 때문에 검물질의 재활용도 제안되었으나 경제성이 입증되지는 않았다. 공정 전체의 반응 조건과 분리 후에 회수되는 검물질에 관한 구체적인 자료가 없어 산업적으로 경제성을 평가하기에는 어려운 공정이다.

이후 Dahlke는 EnzyMax 공정을 상세히 공개하였는데 NHP 제거만을 목적으로 PLase A2를 사용하였다. 효소 반응 결과 생산된 LPL은 유지에 불용성이라 수용액상에서 제거되고 생성된 유리지방산은 유지에 남아있게 된다. 반응 탱크를 여섯 구획으로 나누고 교반을 계속해줌으로써 반응 시간이 단축될 가능성을 줄였다. 이 공정으로 반응 전 인함량 65 ppm인 콩기름과 반응 전 인함량 100-200 ppm인 유채기름의 인함량을 10 ppm 이하로 낮춘 유지를 하루 500톤 생산하였다고 보고하였는데 효소의 재활용에 대한 자료는 보고되지 않았다(Dahlke, 1997; Dahlke, 1998).

Clausen 등은 2000년에 *Fusarium oxysporum*을 이

용하여 PLase A1(Lecitase Novo)를 대량으로 싼 값에 생산할 수 있는 발효 기술을 개발하였다. 이로 인하여 효소의 재활용은 더 이상 신경 쓸 필요가 없어져 최적의 공정 제어가 가능하여졌다(Clausen et al., 2000a; Clausen et al., 2000b).

Münch는 2001년에 췌장 PLase A2인 Lecitase 10L과 검물질과 효소를 재활용하는 공정을 5년간 운용하였으며, 효소의 재활용 없이 Lecitase Novo를 이용한 공정을 1년 동안 운용하여 두 가지 운용 결과를 보고하였다. 두 효소 모두 초기 인함량이 100-280 ppm인 유채기름의 인함량을 10 ppm 미만으로 감소시킬 수 있었다. Lecitase Novo로 3 시간 동안 반응시키면 모든 인지지방질을 리소 형태로 완전히 전환할 수 있었으나 유지 수율에 대한 자료는 보고되지 않았다(Münch, 2001).

Yang 등은 2006년에 *Thermomyces lanuginosea*, *Fusarium oxysporum*에서 얻은 새로운 PLase A1인 Lecitase Ultra의 사용에 대한 최적화 실험을 보고하였다(Yang, 2006). 유채기름을 Dahlke가 제안한 것과 매우 유사한 공정으로 처리하였는데 인함량의 감소를 위하여 공정을 최적화하였으나 유지 수율을 최적화하지는 않았다(Dahlke, 1997; Dahlke, 1998). 공장 규모에서 120.5 ppm의 인을 함유한 유채기름을 탈검하기 위하여 유지의 유량, 구연산의 농도, 유량, 체류시간, 반응액의 pH를 4.6-5.1로 유지하

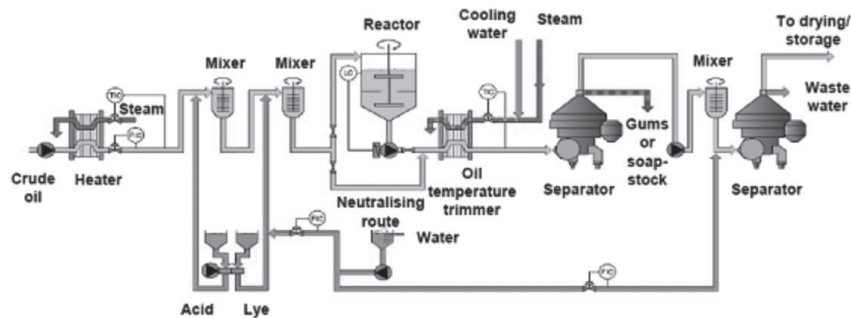


그림 4. 산탈검 후 알칼리처리와 수세공정



기 위한 알칼리 용액의 양, 유지 유량의 40 ppm에 해당하는 효소 용액의 양, 반응 온도와 시간 등을 실험한 결과를 제공하였다. 탈검유는 이후 탈색과 물리적 정제 공정으로 보내진다. 그러나 공정에서 얻어지는 검물질의 유지 함량이나 인지지방질의 반응 프로파일, 유지 수율 등은 보고되지 않았다(그림 4). Sampaio 등도 콩기름과 유채기름 원유를 탈검하기 위하여 이 효소를 사용하여 탈검 효율과 유지의 회수율을 비교하였다(Sampaio et al., 2015).

Chakrabarti 등은 2009년에 쌀겨기름을 산으로 전처리하고 알칼리로 완충액으로 만든 후 Lecitase Novo를 최대 110분의 반응한 결과를 발표하였다. 원심 분리로 얻은 탈검유를 2-4%의 탈색토와 0-1%의 활성탄으로 탈색한 후, 탈납을 거쳐 1-3 ppm의 인함량을 갖는 유지를 얻었다. 원심분리 후의 인함량은 보고되지 않았으나 검물질 내의 인지지방질의 조성, 물리적 정제 공정으로 얻어진 추가 수율을 기존 공정과 비교하였다. 탈백 후 다소 높은 인함량과 검물질이 30-40%의 유지를 함유하여 효소 반응이 완전히 종료되지 않았음을 시사하였다(Chakrabarti et al., 2009).

Dayton 등(Bunge사)은 2010년에 다운스트림 공정 장비, 특히 열교환기 및 원심분리기 디스크에 칼슘 및 마그네슘 구연산염이 침착되는 것을 예방하기 위한 방법으로 효소 반응 후 수용액의 pH를 낮추기 위하여 구연산 등의 산 용액을 첨가하였다. 이 방법이 효소의 활성이나 유지의 수율을 개선시키지는 않았으나, 세척을 위하여 공정을 중단할 필요가 없어졌으므로 공정을 지속적으로 실행할 수 있었다(Dayton et al., 2010).

Gramatikova 등은 2011년에 베레눔사(Verenium)가 개발한 PLase C 효소인 Purifine을 이용하는 공정을 개발하였다. 이 공정은 pH 완충액을 사용하지 않고 물을 사용하여 2 시간 동안 반응시켜 콩기름 원유 인지지방질의 70%를 차지하고 있는 PC와 PE를

가수분해하였는데, 공장 규모에서의 유지 수율은 제공되지 않았다(Gramatikova et al., 2011).

Dayton과 Galhardo(Bunge사)는 2008년에 탈검 공정에서 인지지방질을 완전한 분해하기 위하여 PLase C와 PLase A를 조합하여 사용하였다. 반응 조건이 두 효소 반응에 최적이지 아니었음에도 불구하고 두 효소의 상승효과가 발견되었다. 반응 시간은 30분-1시간으로 크게 감소되었으나 공장 규모에서 유지의 수율은 보고되지 않았다(Dayton and Galhardo, 2008). PLase C는 DAG를 분해하고 유지 수율을 상당히 증가시킬 수 있으나 현재 상용이 가능한 PLase C는 모든 인지질과 반응하지 않는다는 단점이 있다. 그러므로 유지의 공장 규모의 효소적 탈검 공정에서는 PLase C와 PLase A를 복합적으로 사용하여 수율을 높이고 DAG를 경제적으로 생산하고 있다.

Novozymes 회사는 완전한 효소적 탈검을 위하여 새로운 PLase A를 개발하려는 연구를 계속해서 진행하여 왔는데 2016년 6월부터 시작한 공장 규모의 시험 운전을 거쳐 11월에 Novozymes QuaraLowP 라는 이름으로 새로운 제품을 시장에 출시하였다(Nielsen, 2018).

효소적 탈검 공정의 효율 측정과 유지 회수율

효소적 탈검 공정은 기존의 탈검 공정과 비교할 때 검물질의 물리적 특성을 크게 변화시킨다. 가수분해된 검물질은 점도가 낮고 밀도가 높은 액상이며 유화된 유지를 적게 함유하고 따뜻한 물에 매우 잘 용해된다. 효소적 탈검과 수화 탈검의 효율을 비교하는 데는 주로 세 가지 방법이 사용된다(Galhardo and Dayton, 2012).

- 1) 반응 생성물의 분석 - 공정 운영 시 필수적인 분석이다. Purifine PLase C를 사용할 때는 생성된 DAG를 HPLC로 측정하고, 원유 및 탈검유

의인산에스테르 함량은 ^{31}P -NMR로 측정한다. Lecitase Ultra PLase A를 사용 시에서는 유리 지방산을 측정하며 LPL 함량을 ^{31}P -NMR로 측정한다. ^{31}P -NMR분석은 특수한 실험실에서만 가능하지만 효소의 성능을 명확하게 분석할 수 있는 장점이 있다. 효소 공급업체는 이 분석에 대하여 분석 방법, 권장 분석 실험실, 시료 채취 빈도와 기간 등을 연구하여 알려 주는 것이 바람직하다.

- 2) 질량 유량계를 이용한 원유와 반응 생성물인 검물질의 물질 수지 - 공정 최적화를 위하여 매일 할 수 있는 쉬운 방법이다. 반응이 끝난 검물질 내의 건물량과 질량 유량계를 이용한 물질 수지는 수율과 손실의 지속적인 자료를 제공할 수 있다. 이것은 회수되는 검물질의 총량을 감소시키는 효소의 성능을 입증하는 간접적인 방법이기도 하다.
- 3) 재고 손실 - 정확한 방법은 아니지만 추출이나 정제 공장에서는 시간 경과에 따른 지방질의 물질 수지를 알 수 있다.

상업적으로 사용이 가능한 여러 가지 효소를 사용하여 다양한 조건에서 탈검 실험을 수행한 결과 효소적 탈검으로 인한 유지의 손실은 원유의 인지방질의 양에 비례하지 않는다는 것으로 나타났다. 실제로 유지의 손실은 원유에 존재하는 인지방질의 초기 함량보다 낮게 나타나는데 특히 PLase C를

사용하는 경우에 낮게 나타났다. 일반적인 수화 방법으로 탈검된 유지는 항상 인지방질 함량의 몇 배에 해당되는 유지의 손실을 발생시키는 것으로 보인다. 따라서 효소적 탈검을 마치고 원심분리를 하기 전의 인지방질의 구성을 보면 유지의 손실을 줄일 수 있는 성분의 변화를 알 수 있다. 효소를 사용하면 인지방질의 질량을 크게 줄일 수 있는데, 이 점이 바로 부산물인 검물질의 낮아진 유효성과 함께 유지의 회수율을 증가시킬 수 있는 근거가 된다 (표 6)(Galhardo and Dayton, 2012).

공장 규모에서 Lecitase Ultra PLase A1의 이용

Novozymes사가 개발한 Lecitase Ultra PLase A1은 기름 매트릭스 내에서 pH 4.5의 최적 조건을 갖는다. 이 효소는 PC, PI, PE, PA 등과 같은 모든 인지방질과 반응하지만 종류에 따라 반응 시간은 달라진다. PA의 Ca, Mg, Fe 염과의 반응은 매우 느려 4-6 시간이 소요된다(그림 5).

공정이 pH 4.5 또는 그 이하에서 운전되므로 장비는 스테인리스스틸로 제작하는 것이 바람직하다. 칼슘 구연산염과 같은 칼슘 염 침전물이 가열기와

표 6. 탈검방법에 따른 유지의 예상 회수율 (공기름 1,000 kg 기준)

탈검방법	회수된 유지량 (kg)	유지 손실량 (%)
수화 + 화학	942.7	5.73
수화 + 반물리적	944.3	5.57
수화 + 산	945.9	5.41
수화 + 효소	948.2	5.18
효소	952.1	4.79

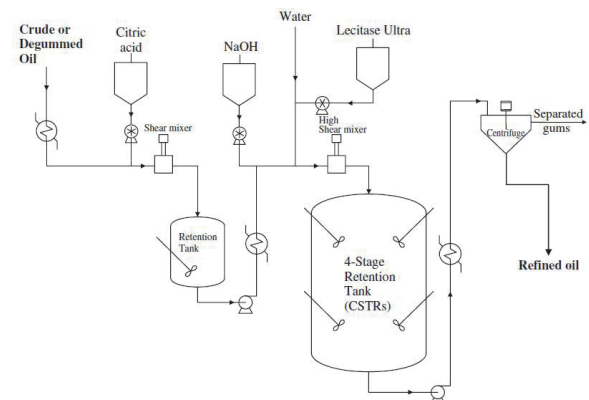


그림 5. Lecitase Ultra를 이용한 효소적 탈검공정

원심분리기에 침착될 수 있으나 pH를 더 낮추면 이 문제는 해결될 수 있다.

Lecitase Ultra로 얻은 유지는 수세를 하지 않더라도 10 ppm 미만(보통은 5 ppm 미만)의 적은 인만을 함유하고 있어 물리적 정제 공정에 바로 사용할 수 있다. HPLC 분석 결과에 의하면 생성된 유리지방산의 반 정도는 유지에 남아 있고 나머지 반 정도는 검물질과 함께 손실되는 것으로 보인다.

PLase A는 인지지방질을 LPL로 대부분 분해하지만 불완전한 반응으로 인하여 검물질에서 PA와 PE가 발견되거나 탈검유에서 PA가 발견되기도 한다. 이 방법으로 회수된 검물질의 유지 함량은 약 15% 정도로 낮은 편이다. 만일 유지 함량이 높다면 유지의 점도 변화와 밀도에 맞추어 원심분리 조건을 다시 조절하여야 하는데 이 경우 유지의 상당 부분은 반응 생성물인 유리지방산이다. 검물질에서 유지의 함량이 감소된 것은 분자량이 작은 LPL이 생성되었고 AI 함량이 60-65%로 줄어들었기 때문이다. 수화 탈검한 유지의 AI 함량은 62-70% 정도이다. 회수된 검물질은 점성이 매우 낮으며 열은 황색을 띠며 반응한 검물질의 양이 현저히 줄어들게 된다(Chakrabarti, 2009).

공장 규모에서 PurifinePLase C의 이용

Verenium사가 개발한 PurifinePLase C의 최적 pH는 5.5-8이므로 이를 맞추기 위하여 공정 중에 pH 완충액으로 구연산과 가성 소다(caustic soda)를 사용하기도 한다. 최대 반응 시간은 2시간 정도인데 PC와 PE에만 선택적으로 작용한다. 만일 pH 완충액을 사용하지 않는다면 설비는 탄소강으로 제조할 수도 있다.

이 공정으로 얻은 탈검유의 인함량은 50-100 ppm 정도인데 잔류 임 함량은 원유에 있던 PA 함량과 금속 함량과 관계가 있다. 탈검유의 유리지방

산 함량은 증가하지 않는데 이는 소수성 반응의 생성물이 DAG이기 때문이다. DAG의 생산 가능량은 원유의 PC와 PE 함량을 이용하여 계산할 수 있다. 만일 원유가 2%의 인지지방질을 함유하고 있다면 실제 공정에서는 DAG의 최대 생산량은 0.89%가 된다.

원심분리기에서 분리되는 침전물은 콜린과에탄올아민의포스포릴에스터와 반응하지 않은 PE와 PI 그리고 유지가 주요 성분이다. PA와 PE의 금속염이 주성분인 NHP은 유지 속에 남아 있으므로 탈검 중에 유지의 손실을 유발하지는 않는다. 검물질에 남아 있는 유화능은 잔류하는 PI 때문인데, 반응하지 않은 PC가 들어있는 유지와 비교하면 유화능은 감소한 것으로 나타났다. 결과적으로 반응 후 검물질의 유지 함량은 10-20%로 축소되었다. 검물질에 유지 함량이 높다면 효소의 반응 조건과 원심분리 조건을 최적화하여야 한다.

반응 후 검물질의 양은 수화 탈검한검물질 양의 약 1/3 정도가 되는데, 이는 인지지방질의 대부분이 DAG로 방출되고 나머지 인지지방질은 낮은 유화 특성을 갖기 때문이다. 이 공정에서 생산되는 검물질은 수화 탈검에서 얻어지는 검물질의 AI 함량보다 높은 70-75%의 AI를 함유하는데 독특하게도 액상으로 존재한다.

PurifinePLase C 반응 전에 산 처리를 하면 수세 후 탈검유의인함량은 10 ppm 미만이 되는데, 원유의 PA 함량이 낮으면 더 낮아질 수 있다. 반응된 검물질의 유지 함량은 pH 완충액을 사용하지 않았을 때보다 높아지는데 이는 모든 PA와 PI가 효소에 의해서 가수분해 되지 않고 바로 수화되어 제거되기 때문이다. 그러나 PE와의 반응을 향상시키면 검물질의 AI 함량은 65-70%로 감소되고 유지 함량은 20% 이상이 된다. 탈검유의 인함량을 낮추기 위하여 수세를 하면 잔류 인지지방질과 유화된 유지로 인하여 0.2-0.3%의 유지 손실이 추가로 발생한다. 이

공정의 장점은 알칼리 정제를 대체하여 탈색과 물리적 정제에 적합한 탈검유를 생산할 수 있다는 것이다. 수세 방식 대신에 실리카를 이용하는 여과방식도 사용될 수 있다.

공장 규모에서 PurifinePLase C와 Lecitase Ultra PLase A의 조합적 이용

PLase A와 PLase C를 조합하여 사용하면 원유에 존재하는 모든 인지방질을 분해할 수 있는데 NHP 함량과 관계없이 PLase C의 효율을 최대화하면서 물리적 정제에 적합한 탈검유를 생산할 수 있는데 이는 두 효소 기능의 상승효과에 기인한다 (Gramatikova et al., 2011). PLase C의 존재는 어느 단일 효소의 농도에 관계없이 효소 각각의 반응 속도를 현저히 증가시키는데, 모든 인지방질을 30분 이내에 가수분해 시킬 수 있다. 반응 조건은 두 효소를 동시에 첨가하고 반응시키는 것만을 제외하고는 PLase A의 단독 반응 조건과 동일한데, 반응 후 검물질의 유지 함량은 10% 미만이었으며 AI 함량은 70-75% 정도였다(그림 6).

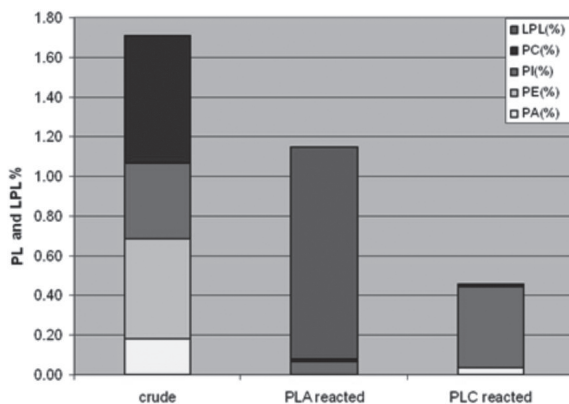


그림 6. 콩기름 원유와 PLase A와 C로 처리한 탈검유의 인지방질 조성

공장 규모에서 QuaraLowP의 이용

효소적 탈검에서 가장 중요한 변수는 온도와 pH이다. 효소적 탈검 공정의 반응 온도는 전통적으로 효소의 열 안정성이 유지되는 50-55℃이었다. 공정 중에 산 킬레이트, 효소 반응, 분리에 적당한 온도를 맞추기 위하여 유지를 가열하거나 냉각시키는 단계가 필요하다. pH를 조절하기 위해서는 통상적으로 알칼리를 첨가하는데 이 때 원심분리 효율에 영향을 끼치는 비누성분이 소량 형성되는 것은 피할 수 없다.

Novozymes사는 2016년에 고온성 미생물인 *Talaromyces leycettanus*로부터 탈검용 새로운 PLase A1인 QuaraLowP를 개발하였다. 이 효소의 열변성 온도는 Lecitase Ultra보다 17℃가 높고, 70℃에서도 완전한 활성을 보이며, pH 3-7에서 안정적이며 pH 4에서 높은 활성을 갖는다. 높아진 열안정성과 낮은 pH에서의 활성으로 인하여 공정은 더욱 간단해졌고 제어가 용이해졌다(그림 7). 이 공정에서는 산 처리 후에 온도를 조절하는 단계가 필요 없어졌으나, 최적의 원심분리와 효소의 비활성화를 위해서는 온도를 85℃로 유지하여야 한다. 또한 pH를 조절하기 위하여 알칼리를 첨가할 필요가 없다. 반응

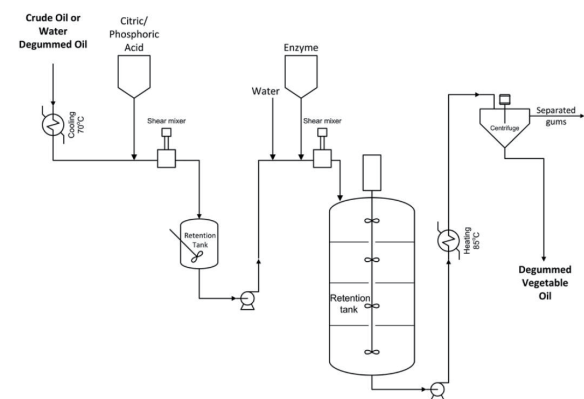


그림 7. QuaraLowP를 이용한 효소적 탈검공정

표 7. 효소 종류에 따른 콩기름 원유의 초기 탈검속도*

효소명	PC	PE	PI	PA
Lecitasew Ultra	3.25±0.02	3.50±0.12	0.06±0.03	2.50±0.14
QuaraLowP	12.30±0.02	9.85±0.17	1.04±0.10	2.04±0.08

*반응온도 40℃. 반응활성 ppm P/min/ppm enzyme protein.
P는 ³¹P-NMR로 측정.

물의 낮은 pH는 열교환기와 원심분리기의 파울링을 감소시키는데 높은 pH에서 효소 탈검을 수행하는 경우에는 탈검 후에 산을 첨가함으로써 파울링을 예방할 수 있다(Nielsen, 2018).

QuaraLowP를 이용하면 유지의 수율을 상당히 높일 수 있다 QuaraLowP로 70℃에서 처리하면 Lecitase Ultra로 55℃에서 처리할 때보다 유지 수율을 0.8% 더 높일 수 있다. 이는 반응 중에 일어나는 유리지방산의 생성 속도에 차이가 있기 때문이다. 유지의 유리지방산 함량은 일반적으로 QuaraLowP의 경우에 0.3%가 높는데 이는 인지방질이 보다 효율적으로 가수분해 되기 때문이다(표 7). 이 데이터는 두 효소를 40℃에서 반응시켜 얻었는데 두 효소를 최적 온도인 55℃(Lecitase Ultra)와 70℃(QuaraLowP)에서 반응시키면 두 효소의 반응 속도는 크게 증가할 것으로 예상된다. 또한 QuaraLowP는 LPL을 가수분해하여 지방산을 생성하기도 한다.

콩기름 원유에 30 ppm의 Lecitase Ultra를 사용하고 1단계 원심분리하면인함량은 20 ppm 이하가 되는데, 효소 반응은 각각 4개의 구획이 있는 3개의 CSTR 반응기에서 5시간 동안 이루어진다. QuaraLowP를 70℃, pH 4에서 10-40 ppm 첨가하고 유리지방산 함량, ICP에 의한 인함량, 원심분리 시험, 유량계에 의한 수율 등과 NMR로 인지지방질의 변환을 분석하였다. 공장에서는 효소량 10 ppm을 투여하기 위해서 낮은 속도를 내는 새로운 펌프를

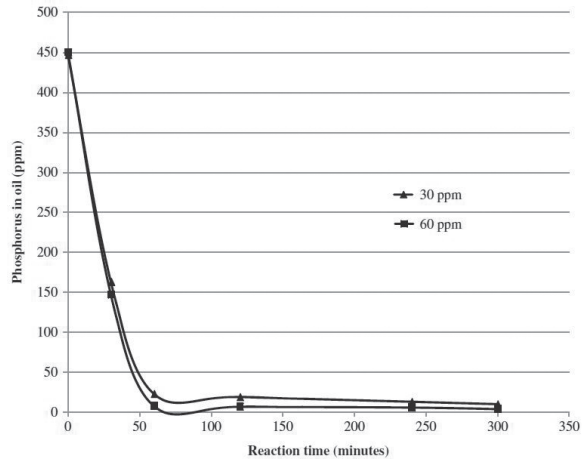


그림 8. 반응시간과 Lecitase Ultra 투여량이 탈검유의 잔류 인 함량에 미치는 영향

사용하는 것보다는 효소의 조성을 조절하여 기존에 사용하였던 30 ppm 투여용 펌프를 사용하는 것이 경제적이었다(그림 8).

QuaraLowP는 Lecitase Ultra보다 많은 유리지방산을 생성하는 것으로 나타났다. QuaraLowP를 사용하여 얻은 검물질은 점도가 낮아져 원심분리에도 유리하였다. 예전에는 효율적인 분리를 위하여 검물질의 수분 함량을 낮추는 것이 필요하였는데 새로운 공정에서는 물 사용량이 2.5%에서 2.2%로 감소하였기 때문이다. 새로운 공정으로 유리지방산 수율은 0.3%, 유지 수율은 0.4% 증가하였는데, 이는 예전 공정과 비교할 때 유리지방산은 75%, 유지는 25%가 증가되었음을 의미한다. 유리지방산은 LPL로부터 생성되는데, 반응 초기에는 인지방질이 리소인지질로 바뀌고 반응 후기에는 LPL이 가수분해 되어 유리지방산이 생성된다(그림 9).

QuaraLowP는 낮은 pH에서 반응하기 때문에 유지 회수율 증가 이외에도 여러 가지 이점을 제공한다. 알칼리 투여가 필요 없어져 비누가 형성되지 않으므로 펌프와 배관의 청소관리 비용을 절약할 수 있다. 또한 pH가 낮아지면 원심분리기와 열

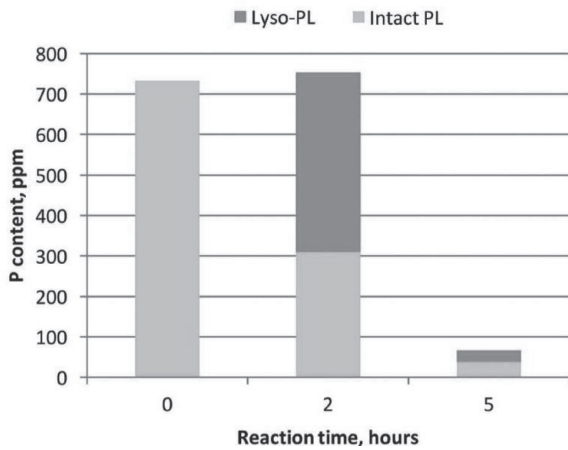


그림 9. 콩기름 원유와 효소적 탈검유의 인지지방질 조성 (QuaraLowP 20 ppm로 처리 후 ³¹P-NMR로 분석)

교환기에도 침전물이 감소되어 설비의 오염이 줄어들어 더욱 오래 사용 가능(약 2.5개월) 동안 원심분리기를 청소할 필요가 없어진다. 공장에서는 공정 제어를 위하여 간단한 분석이 필요한데, 효소의 반응을 제어하기 위한 유리지방산 분석, 원심분리 성능을 확인하기 위한 원심분리 시험, 인함량을 측정하기 위한 ICP등이 필요하다(Galhardo, 2009; Dayton et al., 2010).

참고문헌

Aalrust E, Beyer W, Ottofrickenstein H, Penk G, Plainer H, Reiner R. Enzymatic treatment of edible oils, Röhm GmbH and Metallgesellschaft AG, US Patent 5,264,367 (1993)

AB Enzymes Technical Data Sheet.Rohalase MPL (2004)

Abramson MB, Katzman R, Wilson CE, Gregor HP. Ionic properties of aqueous dispersions of phosphatidic acid. *J. Biol. Chem.* 239: 4066-4072 (1964)

Anderson D.A primer on oils processing technology. In: *Bailey's Industrial Oils & Fats*, 6th ed. vol. 5, Edible oil and fat products: Processing technologies, pp. 1-56, ed. Shahidi F, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA (2005)

Chakrabarti PP, Rao BVSK, Roy SK, Bethala L, Narayana, PRK, Vemulapalli V, Chelimi K, Karthika G, Kale V, Prasad RBN. Process for the pre-treatment of vegetable oils for physical refining, US Patent 7,494,676 (2009)

Clausen IG, Patkar SA, Borch K, Barfoed M, Clausen K, Fuglsang

CC, Dybdal L, Halkier T. Novo Nordisk A/S, Method for reducing phosphorus content of edible oils, US Patent 6,103,505 (2000)

Clausen IG, Patkar SA, Borch K, Barfoed M, Clausen K, Fuglsang CC, Dybdal L, Halkier T. Novo Nordisk A/S, Method for reducing phosphorus content of edible oils, US Patent 6,143,545 (2000)

Clausen K. Enzymatic oil-degumming by a novel microbial phospholipase. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 103: 333-340 (2001)

Cowan D. *Enzyme Processing*. 2nd ed. by Hamm W, Hamilton RJ, Calliauw G. pp. 197-221. John Wiley & Sons, Chichester, West Sussex, UK (2013)

Dahlke K. An enzymatic process for the physical refining of seed oils. *Chem. Eng. Technol.* 21: 278-281 (1998)

Dahlke K. The enzymatic degumming - EnzyMax. *Oléagineux Corps Gras Lipides/OCL*, 4,55-57 (1997)

Dayton CLG, Galhardo F. Bunge Foods Corporation, Enzymatic degumming utilizing a mixture of PLA and PLC phospholipases, US Patent Application Publication 2008/ 0182322 (2008)

Dayton CLG, Staller K, Berkshire TL. Bunge Oils, Inc., Process for improving enzymatic degumming of vegetable oils and reducing fouling of downstream process equipment, US Patent 7,713,727 (2010)

De Greyt W. Edible Oil Refining: Current and Future Technologies. in *Edible Oil Processing*. 2nd ed. by Hamm W, Hamilton RJ, Calliauw G. pp. 127-151. John Wiley & Sons, Chichester, West Sussex, UK (2013)

Dijkstra AJ, Van Opstal M. The total degumming process. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 66: 1002-1009 (1989)

Dijkstra AJ. Edible oil processing: Introduction to degumming. AOCs Library, <http://lipidlibrary.aocs.org/index.cfm>. accessed in April 2018 (2011)

DSM.Technical Data Sheet.GumZyme (2011)

Galhardo F, Dayton C, Enzymatic Degumming. AOCs Library, <http://lipidlibrary.aocs.org/index.cfm>. accessed on April 2018 (2012)

Galhardo F. Enzymatic degumming - Recent developments. Paper presented at the AOCs Centenary Meeting & Expo, Orlando, p. 120 (2009)

Gramatikova S, Hazlewood G, Lam D, Barton NR, Sturgis BG, Robertson DE, Li J, Kreps J, Fielding R, Brown RC, Vasavada A, Tan X, Badillo A, Van Hoek WP, Janssen G, Isaac C. Burk MJ. Verenum Corporation, Phospholipases, nucleic acids encoding them and methods for making and using them, US Patent 7,977,080 (2011)

Gunstone FD, Harwood JL. Occurrence and characterisation of oils and fats. In: *The Lipid Handbook* (3rd edition), pp.37-142 eds. Gunstone D, Harwood, JL, Dijkstra AJ. Taylor & Francis Group, LLC, Boca Raton, FL, USA (2007)

Hitchman T. Purifine PLC: industrial application in oil degumming



- and refining. *Oil Mill Gazetteer*, 115: 2–4 (2009)
- Jiang X, Chang M, Jin Q, Wang X. Optimization of the degumming process for camellia oil by the use of phospholipase C in pilot-scale system. *J. Food Sci. Technol.* 52: 3634–3644 (2015)
- Kim SK, Yoon SH, Kim CJ, HS Cheigh. Effect of oxalic and phosphoric acid on degumming of rice bran oil. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 17: 128–130 (1985)
- Lamas D, Crapiste GH, Constenla DT. Changes in quality and composition of sunflower oil during enzymatic degumming process. *LWT–Food Sci. Technol.* 58: 71–76 (2014)
- Manjula S, Jose A, Divakar S, Subramanian R. Degumming rice bran oil using phospholipase A1. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 113: 658–664 (2010)
- Maria L, Vind J, Oxenbøll KM, Svendsen A, Patkar SA. Phospholipases and their industrial application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: 290–300 (2007)
- Mueller U, Pascal G, Olempska-Beer Z, Leblanc JC, Meyland I. Phospholipase-C expressed in *Pichia pastoris*. In: Safety Evaluation of Certain Food Additives, pp. 107–116. Sixty-ninth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Geneva, Switzerland (2009)
- Mukherjee AK, Mondal K, Akhan M, Biswas S. Effects of phospholipase A2 degumming on palm oil components. *Int. J. Agricul. Food Sci.* 3: 69–71 (2013)
- Münch EW. Practical experience of enzymatic degumming. In: Proceedings of the World Conference on Oilseed Processing and Utilization, pp. 17–20, ed. Wilson RF, AOCS Press, Champaign, IL, USA (2001)
- Nielsen PM. From laboratory to full-scale degumming: a new efficient phospholipase A. *inform.* 29(1): 18–21 (2018)
- Nieuwenhuyzen WV, Tomás MC. Update on vegetable lecithin and phospholipid technologies. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 110: 472–486 (2008)
- Pardun, H. Neuberechnung der zur Bestimmung des Phosphatidgehalts benötigten Umrechnungsfaktoren. *FetteSeifenAnstrichm.*, 83, 240–242 (1981)
- Racicot LD, Handel AP. Degumming of soybean oil: Quantitative analysis of phospholipids in crude and degummed oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 60: 1098–1101 (1983)
- Sampaio KA, Zyaykina N, Wozniak B, Tsukamoto J, De Greyt, W, Stevens C. Enzymatic degumming: Degumming efficiency versus yield increase. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 117: 81–86 (2015)
- Schofield CR. Composition of Soybean Lecithin. *J. Am. Oil Chem Soc.* 58: 889–892 (1981)
- Segers JC. Degumming – Theory and practice. In: *Edible Fats and Oils Processing: Basic Principles and Modern Practices*, pp. 88–93, ed. Erickson DR, AOCS, Champaign, IL, USA (1990)
- Sen Gupta AK, Micellar structures and their implication in the chemistry and technology of fats and other lipids. *FetteSeifenAnstrichm.*, 88: 79–86 (1986)
- Türkay S, Şahin-Yeşilçubuk N, Processing and modification technologies for edible oils and fats, in "Food Lipids – Chemistry, Nutrition, and Biotechnology" 4th ed. by C. Akoh, Chap. 10, pp. 297–326, CRC Press, Boca Raton FL, USA (2017)
- Yang B, Wang YH, Yang JG. Optimization of enzymatic degumming process for rapeseed oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 83: 653–658 (2006)
- Yang B, Zhou R, Yang JG, Wang YH, Wang WF. Insight into the enzymatic degumming process of soybean oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 85: 421–425 (2008)