



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0111143

(43) 공개일자 2015년10월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12P 7/64 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0034654

(22) 출원일자 2014년03월25일

심사청구일자 2014년03월25일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김인환

서울특별시 노원구 공릉로58길 176, 102동 1108호

노다솜

서울특별시 서초구 바우피로 91, 111동 1102호

(74) 대리인

한양특허법인

전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 잣기름 지방산으로부터 농축된 피놀렌산을 회수하는 방법

(57) 요약

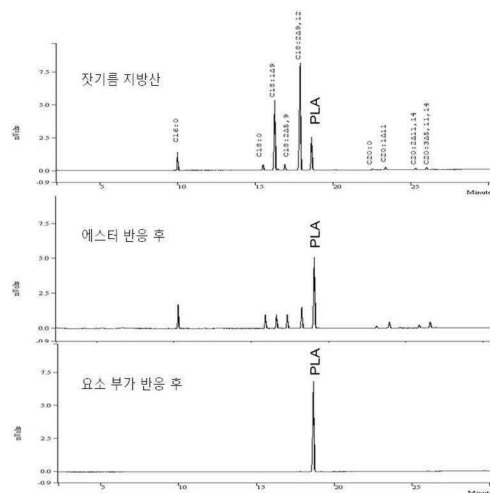
본 발명은 (1)잣기름 지방산, 라우릴 알코올, 칸디다루고사 리파아제 및 증류수를 혼합하여 에스터화 반응을 시켜 피놀렌산이 농축된 잣기름 지방산의 잔류 지방산 분획을 생성하는 단계;

(2)상기 피놀렌산이 농축된 잔류 지방산 분획을 분리하는 단계;

(3)상기 피놀렌산이 농축된 잔류 지방산 분획에 요소를 첨가하여 잔류 지방산 분획으로부터 피놀렌산을 농축하는 단계; 및

(4)상기 농축된 피놀렌산을 추출하는 단계를 포함하는 잣기름 지방산으로부터 피놀렌산의 회수 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도10



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013006050

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 보건과학대학학사지원부

연구사업명 (이공)일반연구자지원-기본연구

연구과제명 선택적 효소 방법을 이용한 식물성 고도불포화 지방산 (피놀레닌산 및 스테아리도닌산)농
축

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2013.06.01 ~ 2014.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

- (1) 잣기름 지방산, 라우릴 알코올, 칸디다루고사 리파아제 및 증류수를 혼합하여 에스터화 반응을 시켜 피놀렌산이 농축된 잣기름 지방산의 잔류 지방산 분획을 생성하는 단계;
- (2) 상기 피놀렌산이 농축된 잔류 지방산 분획을 분리하는 단계;
- (3) 상기 피놀렌산이 농축된 잔류 지방산 분획에 요소를 첨가하여 잔류 지방산 분획으로부터 피놀렌산을 농축하는 단계; 및
- (4) 상기 농축된 피놀렌산을 추출하는 단계를 포함하는 잣기름 지방산으로부터 피놀렌산의 회수 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 칸디다루고사 리파아제는 잣기름 지방산 100 중량부에 대하여 0.01 내지 0.5 중량부로 포함되는 것을 특징으로 하는 잣기름 지방산으로부터 피놀렌산의 회수 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 증류수는 잣기름 지방산 100 중량부에 대하여 1 내지 15 중량부로 포함되는 것을 특징으로 하는 잣기름 지방산으로부터 피놀렌산의 회수 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 (1)단계의 반응 온도는 0 내지 55℃인 것을 특징으로 하는 잣기름 지방산으로부터 피놀렌산의 회수 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 (3)단계의 피놀렌산이 농축된 잔류 지방산 분획 및 요소의 혼합 비율은 1:1 내지 1:5의 중량비인 것을 특징으로 하는 잣기름 지방산으로부터 피놀렌산의 회수 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 잣기름 지방산으로부터 고순도의 피놀렌산을 농축하는 방법에 관한 것으로, 보다 자세하게는 효소를 이용하여 에스터화 반응을 진행하는 단계 및 요소를 첨가하는 단계를 거쳐 잣기름 지방산으로부터 농축된 피놀렌산을 회수하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 잣의 일반적인 조성은 지방질 70%, 단백질 15%, 탄수화물 5% 및 회분 3%의 수준으로 구성되어 있다. 지방질을 다량 함유하고 있으므로, 지금까지 잣에 대한 성분 연구의 대부분은 주성분인 지방질에 관한 것이다.

[0003] 자연계에 존재하는 식물성 유래 지방산들 중 카르복실기로부터 5번째 탄소에 이중결합이 시작되는 올레핀산(Δ 5-올레핀산)은 유일하게 잣에만 함유되어 있다. 한편, 잣기름은 5번째 위치에 이중결합을 가지고 있는 Δ 5-올레핀산(Δ 5-UPIFA, Unsaturated Polyethylene Interrupted Fatty Acid)을 다량으로 포함하고 있으며, Δ 5-올레핀산의 종류 중 가장 많이 함유하고 있는 대표적인 것은 피놀렌산(Pinolenic acid, PLA, 5,9,12-18:3)이며, 그 외에 taxoleic acid(5,9-18:2), ephedrenic acid (5,11-18:2), keteleeronic acid (5,11-20:2) 및 sciadonic acid (5,11,14-20:3) 등이 포함되어 있다. 또한, Pinus koraiensis는 쉽게 얻을 수 있는 잣의 종 중 하나이며, 잣기름 지방산 내 Δ 5-올레핀산이 약 17~18% 함유되어 있으며, 그 중 피놀렌산의 함량은 약 13~15% 정도이다.

[0004] 상기 피놀렌산은 다른 18:3 지방산(탄소수 18개이며, 그 중 3개의 이중결합을 가지는 지방산)과는 달리 건강상

의 효능 및 특성을 가지고 있다. 첫 번째로, 피놀렌산은 apo genes의 발현 정도를 변화시킴으로써 혈중 내 지방 감소 효과를 가진다는 것이 알려져 있다. 두 번째로, 피놀렌산은 간에서 LDL 콜레스테롤의 흡수를 증가시켜 serum LDL 콜레스테롤 함량을 낮춘다고 보고 되었다. 마지막으로, 피놀렌산은 식욕 억제 효과를 가지고 있으며, 인체 내 소장에서 분비되는 식욕 조절 호르몬인 cholecystokinin과 glucagon like peptide-1의 분비를 촉진시켜 식욕 억제 작용을 한다고 밝혀졌다. 따라서, 이러한 장점을 가지는 피놀렌산을 고순도로 얻는 것이 중요한 과제로 남겨 있다.

[0005]

효소를 이용하여 docosahexaenoic acid (DHA), eicosapentaenoic acid (EPA), gamma linolenic acid (GLA) 등의 기능성 고도 불포화지방산을 농축하려는 시도는 많은 연구에서 이루어져 왔다. 많은 연구들에서 생선유 등에서 효소를 이용한 선택적 가수분해 또는 알코올리시스 반응을 통하여 고농도의 불포화지방산을 농축하였다. 다른 방법으로는, 효소를 이용하여 지방산과 다양한 알코올 사이의 선택적 에스터화 반응을 통하여 기능성 지방산을 농축하는 시도도 수행되어 왔다. Shimada et al. (1997)은 *Rhizopus delemar* 효소를 이용하여 라우릴 알코올과 지방산 사이의 반복적인 선택적 에스터화 반응을 통하여 참치유로부터 DHA를 농축하는 연구를 보고한 바 있으며, 이 연구에서 참치유에 23%로 포함되어있던 DHA가 반응 후 89%까지 증가한 결과를 보였다. Hills et al. (1989)는 유채 씨 유래 리파아제를 이용한 부탄올과 선택적 에스터화 반응을 통해 달맞이꽃유로부터 GLA를 9.5%에서 62%까지 농축하는 결과를 얻은 바 있다.

[0006]

본 연구에서는 잣기름에 함유된 건강상의 효능 및 특성을 가지는 피놀렌산을 고농도로 농축하여 수득하는 방법을 알아보하고자 한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007]

(특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2009-0094701호

비특허문헌

[0008]

(비특허문헌 0001) Rakshit, S. K., Vasuhi, R., & Kosugi, Y. (2000). Enrichment of polyunsaturated fatty acids from tuna oil using immobilized *Pseudomonas fluorescens* lipase. *Bioprocess Engineering*, 23(3), 251-255.

(비특허문헌 0002) Shimada, Y., Sugihara, A., Minamigawa, Y., Higashiyama, K., Akimoto, K., Fujikawa, S., Komemushi, S., & Tominaga, Y. (1998). Enzymatic enrichment of arachidonic acid from *Mortierella* single-cell oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(9), 1213-1217.

(비특허문헌 0003) Wanasundara, U., & Shahidi, F. (1998). Lipase-assisted concentration of n-3 polyunsaturated fatty acids in acylglycerols from marine oils. *Journal of the American Oil Chemists's Society*, 75(8), 945-951.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009]

본 발명은 순도 99% 이상의 피놀렌산 농축물을 얻기 위한 것으로, 잣기름 지방산을 에스터화 반응시켜 피놀렌산을 농축하고, 상기 농축된 피놀렌산에 요소를 첨가하여 피놀렌산을 다시 한번 농축하여 99% 이상의 고순도로 농축된 피놀렌산을 회수하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010]

상기 목적을 달성하기 위하여,

[0011]

본 발명은 (1)잣기름 지방산, 라우릴 알코올, 칸디다루고사 리파아제 및 증류수를 혼합하여 에스터화 반응을 시켜 피놀렌산이 농축된 잣기름 지방산의 잔류 지방산 분획을 생성하는 단계;

- [0012] (2)상기 피놀렌산이 농축된 잔류 지방산 분획을 분리하는 단계;
- [0013] (3)상기 피놀렌산이 농축된 잔류 지방산 분획에 요소를 첨가하여 잔류 지방산 분획으로부터 피놀렌산을 농축하는 단계; 및
- [0014] (4)상기 농축된 피놀렌산을 추출하는 단계를 포함하는 잣기름 지방산으로부터 피놀렌산의 회수 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0015] 본 발명은 잣기름 지방산을 에스터화 반응 및 요소 첨가 반응을 실시하여 고순도로 농축된 피놀렌산을 얻을 수 있는 장점을 지니고 있다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 효소 함량에 따른 에스터 전환율을 나타낸 그래프이다.
- 도 2는 효소 함량에 따른 잔류 지방산 분획 내 피놀렌산 농도를 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 효소 함량에 따른 잔류 지방산 분획 내 피놀렌산 회수율을 나타낸 그래프이다.
- 도 4는 증류수 함량에 따른 에스터 전환율을 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 증류수 함량에 따른 잔류 지방산 분획 내 피놀렌산 농도를 나타낸 그래프이다.
- 도 6은 증류수 함량에 따른 잔류 지방산 분획 내 피놀렌산 회수율을 나타낸 그래프이다.
- 도 7은 반응 온도에 따른 에스터 전환율을 나타낸 그래프이다.
- 도 8은 반응 온도에 따른 잔류 지방산 분획 내 피놀렌산 농도를 나타낸 그래프이다.
- 도 9는 반응 온도에 따른 잔류 지방산 분획 내 피놀렌산 회수율을 나타낸 그래프이다.
- 도 10은 잣기름 지방산, 잣기름 지방산의 에스터화 반응 후 및 요소 부가 반응 후의 잣기름 지방산을 측정된 크로마토그램이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.
- [0018] 본 발명은 잣기름 지방산으로부터 피놀렌산을 회수하는 방법에 관한 것으로, 하기 단계를 거쳐 잣기름 지방산으로부터 농축된 피놀렌산을 회수할 수 있다.
- [0019] (1)잣기름 지방산, 라우릴 알코올, 칸디다루고사 리파아제 및 증류수를 혼합하여 에스터화 반응을 시켜 피놀렌산이 농축된 잣기름 지방산의 잔류 지방산 분획을 생성하는 단계;
- [0020] (2) 상기 피놀렌산이 농축된 잔류 지방산 분획을 분리하는 단계;
- [0021] (3) 상기 피놀렌산이 농축된 잔류 지방산 분획에 요소를 첨가하여 잔류 지방산 분획으로부터 피놀렌산을 농축하는 단계; 및
- [0022] (4)상기 농축된 피놀렌산을 추출하는 단계를 포함하여 잣기름 지방산으로부터 농축된 피놀렌산을 회수할 수 있다.
- [0023] 본 발명에서 농축하고자 하는 피놀렌산(Pinoleic acid, PLA)은 5, 9 및 12번째 위치에 이중결합을 가지고 있는 탄소수 18개의 지방산(C18:3, Δ5, 9, 12)이다.
- [0024] 상기 (1)단계는 잣기름 지방산으로부터 피놀렌산이 1차적으로 농축되는 단계이다.
- [0025] 상기 잣기름 지방산에는 탄소수 16 내지 20의 지방산이 포함되어 있으며, 그 중 탄소수 18개인 지방산은 5, 9

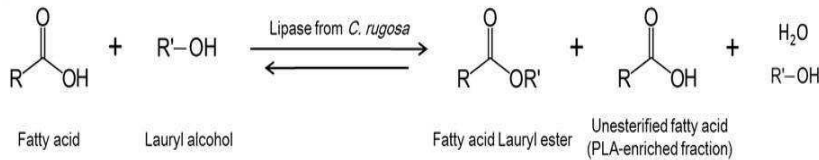
및 11번째의 탄소 위치에서 이중결합이 시작되는 지방산들($\Delta 5$, $\Delta 9$ 및 $\Delta 11$)이며, 특히 9번째 탄소 위치에서 이중결합이 시작되는 지방산($\Delta 9$)을 다량 함유하고 있다.

[0026]

상기 (1)단계에서 칸디다루고사 리파아제는 잣기름 지방산과 라우릴알코올의 에스터화 반응의 효소로 작용한다. 상기 칸디다루고사 리파아제가 효소로 작용함으로써, 잣기름 지방산으로부터 피놀렌산을 보다 효율적으로 농축시킬 수 있다. 상기 (1)단계의 반응을 하기 반응식 1에 나타내었다.

[0027]

[반응식 1]



[0028]

[0029]

상기 반응식 1을 보다 자세하게 설명하면, 효소로 작용하는 칸디다루고사 리파아제는 9번째 탄소 위치에서 이중결합이 시작되는 지방산($\Delta 9$)에 높은 선택성을 가지고 있어 상기 잣기름 지방산 중 9번째 탄소 위치에서 이중결합이 시작되는 지방산($\Delta 9$)은 지방산 라우릴 에스터로 반응이 일어나게 되고, 5번째 탄소 위치에서 이중결합이 시작되는 지방산($\Delta 5$)인 피놀렌산은 에스터 반응이 일어나지 않아 잔류 지방산 분획에 농축된다.

[0030]

상기 (1)단계에서 잔류 지방산 분획내의 피놀렌산의 농축은 칸디다루고사 리파아제의 함량, 증류수의 함량 및 반응온도에 영향을 받는다.

[0031]

상기 칸디다루고사 리파아제는 잣기름 지방산 100 중량부에 대하여 0.01 내지 0.5 중량부로 포함되는 것이 바람직하다. 칸디다루고사 리파아제가 0.01 중량부 미만으로 포함되면 반응 속도가 증가하지 않게 되고, 0.5 중량부를 초과하여 포함되면 반응속도가 너무 빨라져 지방산의 선택성에 역효과가 발생하게 된다.

[0032]

또한, 상기 증류수는 잣기름 지방산 100 중량부에 대하여 1 내지 15 중량부로 포함되는 것이 바람직하다. 수분은 효소의 구조에 유연성을 주는 유연제 역할을 하며, 효소의 구조와 활성을 위해서는 일정량의 수분이 필요하다. 본 발명에서 증류수를 포함하지 않게 되면 효소인 칸디다루고사 리파아제의 함량이 지나치게 많아지게 되며, 증류수가 15 중량부를 초과하여 포함되면 에스터 전환율이 증가하게 된다.

[0033]

또한, 반응 온도는 효소 반응에서 반응 속도와 효소의 선택성에 영향을 미치는 중요한 요소이다. 본 발명에서 상기 (1)단계의 반응 온도는 0 내지 55℃인 것이 바람직하다. 온도가 0℃보다 낮으면 라우릴 알코올의 녹는점이 0℃보다 높아 (1)단계의 반응 혼합물이 고체화되어 반응을 수행할 수 없게 되고, 온도가 높아질수록 반응 속도가 증가하지만 55℃보다 높아지면 효소인 칸디다루고사 리파아제의 변성을 유발하여 불활성화를 촉진시킬 수 있다.

[0034]

상기 (2)단계에서는 상기 (1)단계의 에스터화 반응 후, 에스터화 반응에 참여하지 않은 피놀렌산이 농축된 잔류 지방산 분획을 분리하는 단계이다. 상기 (1)단계의 생성물(지방산 라우릴에스터 및 피놀렌산이 농축된 잔류 지방산 분획)에 n-hexane 및 anhydrous sodium sulfate를 첨가하여 수분을 제거하며, 피놀렌산이 농축된 잔류 지방산 분획을 분리한다. 그 후 증류수로 여러 번 세척 후, 흡습성 물질로 다시 수분을 제거하고, 진공으로 용매를 제거하여 피놀렌산이 농축된 잔류 지방산 분획을 분리한다.

[0035]

상기 (3)단계는 피놀렌산이 농축된 잔류 지방산 분획에 요소를 첨가하여 피놀렌산을 한번 더 농축하여 고순도로 농축시키는 단계이다. 상기 (2)단계에서 분리한 피놀렌산이 농축된 잔류 지방산 분획을 메탄올로 용해시킨 뒤, 요소를 첨가하게 되면, 상기 용해된 요소의 결정화가 일어난다. 이 때 상기 요소는 육각 기둥의 형태로 결정화되면서 내부에 포화 지방산 등의 탄화수소를 포집하며, 이 때 불포화 지방산은 포화 지방산과 같이 직선 구조가 아닌 꺾여있는 구조를 가지므로 육각 기둥 형태의 내부에 포집되지 못하게 된다. 따라서, 상기 (3)단계에서는 잔류 지방산 분획 내의 피놀렌산을 한번 더 농축시킬 수 있다.

[0036]

상기 피놀렌산이 농축된 잔류 지방산 분획 및 요소의 혼합 비율은 1:1 내지 1:5의 중량비이다. 상기 혼합 비율이 1:1 미만일 경우 잔류 지방산 분획 내 피놀렌산의 농축 효율이 우수하지 못하며, 혼합 비율이 1:5를 초과할 경우 잔류 지방산 분획 내 피놀렌산 농축 효율은 우수할지라도 피놀렌산의 회수율이 감소하는 문제점이 발생한다. 따라서, 잔류 지방산 분획 내 피놀렌산의 농도 및 회수율을 고려하였을 때, 피놀렌산이 농축된 잔류 지방산 분획 및 요소의 혼합 비율은 1:3 내지 1:5의 중량비인 것이 가장 바람직하다.

[0037] 상기 (4)단계는 상기 (3)단계에서 농축된 피놀렌산을 추출하는 단계로, 상기 혼합물을 증류한 뒤 방치하여 결정을 제거한 후 여과액을 얻는다. 상기 여과액에 *n*-hexane을 첨가하여 최종적으로 농축된 피놀렌산을 회수할 수 있다.

[0038] 본 발명은 상기 (1) 내지 (4)단계를 거쳐 잣기름 지방산으로부터 피놀렌산을 고순도로 농축할 수 있다.

[0039] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다. 단, 하기의 실시예는 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0040] **제조예 1. 잣기름 지방산 제조**

[0041] 헥산을 이용하여 추출한 잣기름 150g에 10M NaOH 용액 150mL 과 99% 에탄올 450mL을 넣은 후 교반과 함께 열을 가해주었으며, 끓기 시작하면 30분을 더 반응 시켜 충분히 검화 될 수 있도록 하였다. 검화 과정이 끝난 반응물을 분액 깔대기에 옮기고, 6 N 농도의 HCl을 첨가하여 검화 되었던 지방산들이 유리 지방산으로 만들어 지도록 하였다. 지방산을 포함한 상층부는 *n*-hexane 300mL로 추출하였으며, 그 후 150mL의 증류수로 여러 번 세척하였다. 지방산이 포함 되어있는 *n*-hexane 층은 anhydrous sodium sulfate를 통과시켜 수분을 제거한 후 rotary evaporator에서 용매를 제거하고, 잔류 용매는 40 °C에서 질소 flushing을 통해 제거하여 잣기름 지방산을 얻었다. 상기 잣기름 지방산의 함량 및 조성은 하기와 같다.

[0042] *cis*-9,12-octadecadienoic acid(C18:2(Δ9, 12)) : 46 mol%,

[0043] *cis*-9-octadecenoic acid(C18:1(Δ9)) : 27 mol%,

[0044] *cis*-5,9,12-octadecatrienoic acid(C18:3(Δ5, 9, 12)) : 13 mol%,

[0045] octadecanoic acid(C16:0) : 5 mol%,

[0046] hexadecanoic acid(C18:0) : 2 mol%,

[0047] *cis*-5,9-octadecadienoic acid(C18:2(Δ5, 9)) : 2 mol%,

[0048] *cis*-11-docosenoic acid(C20:1(Δ11)) : 1 mol%,

[0049] *cis*-5,11,14-eicosatrienoic acid(C20:3(Δ5, 11, 14)) : 1 mol%

[0050] **<잣기름 지방산으로부터 피놀렌산 농축>**

[0051] **실시예 1 내지 5.**

[0052] (1)상기 제조예 1에서 제조한 잣기름 지방산 30g(110mmol)과 라우릴 알코올 20g(110mmol)을 500mL 용량의 water-jacketed glass vessel reactor에 넣고, 수온기를 조절하여 반응기의 온도를 15°C로 설정하였다. 그 후, 반응물에 잣기름 지방산 100 중량 대비 10 중량부의 증류수를 첨가하였으며, 효소로 칸디다루고사 리파아제를 잣기름 지방산 100 중량 대비 0.1 중량부로 첨가하여 에스터화 반응을 진행하였다. 반응이 시작된 시점은 상기 효소가 첨가된 시점이며, 반응물은 400rpm으로 교반하였다.

[0053] (2)상기 반응물 50g을 500mL의 *n*-hexane에 녹인 후 anhydrous sodium sulfate를 통과시켜 상기 반응에 사용된 칸디다루고사 리파아제와 반응물에 함유된 수분을 제거하였다. 그 후 반응물에 0.475M NaOH 용액 100mL와 95% 에탄올 100mL를 첨가하여 1L 분액 깔대기에 옮기고, 라우릴 에스터 분획이 상층부인 *n*-hexane 층에 추출되도록 하였다. 잔류 지방산 분획을 포함한 하층부는 새로운 분획 깔대기에서 500mL의 *n*-hexane을 이용해 완벽하게 라우릴 에스터를 제거할 수 있도록 하였다. NaOH에 의해 검화되었던 잔류 지방산 분획은 10mL의 HCl을 첨가하여 유리 지방산으로 만들었으며, 100mL의 *n*-hexane에 의해 추출하여 10mL의 증류수로 세척하였다. 상기 잔류 지방산 분획이 포함 되어있는 *n*-hexane 층은 anhydrous sodium sulfate를 통과시켜 수분을 제거한 후 rotary evaporator에서 용매를 제거하였고, 잔류 용매는 40°C에서 질소 flushing을 통해 제거하여 피놀렌산이 농축된 잔류 지방산 분획을 전체 반응물에서 분리하였다.

[0054] (3)에스터화 반응 후 피놀렌산이 농축된 잔류 지방산 분획 6.0g에 메탄올 및 요소를 첨가하였다. 이 때 요소와 메탄올의 비율은 1:3 (w/v)로 고정하였고, 요소와 잔류 지방산 분획의 비율은 1:1 내지 5:1의 중량비(실시에 1 내지 5)로 하여 각각 실험을 진행하였다. 상기 혼합물이 맑아질 때까지 증류하였고, 0 내지 4℃에서 12시간 정도 방치하였다.

[0055] (4)그 후 결정이 생성되었으며, 상기 결정은 진공 펌프 여과를 통하여 제거시켰고, 여과액에는 0.1N HCl(요소:HCl=2:1, w/v)를 첨가하였다. 이 후 상기 여과액을 분별갈대기로 옮긴 후 헥산을 첨가하여 농축된 피놀렌산을 추출하였다. 이렇게 얻어진 헥산 분획은 anhydrous sodium sulphate를 통과시킨 후 rotary evaporator를 이용하여 용매를 제거하여 실시에 1 내지 5의 방법(요소와 지방산의 비율은 1:1 내지 5:1의 중량비)으로 피놀렌산 농축물을 얻었다.

[0056] 실험예 1. 에스터화 반응의 최적 반응조건 측정

[0057] 본 발명의 방법에서 1차적으로 피놀렌산이 농축되는 (1)단계의 에스터화 반응은 효소의 함량, 증류수의 함량 및 반응온도에 따라 영향을 받으므로 에스터화 반응의 최적 조건을 알아보고자 하였다.

[0058] 상기 실시예의 (1)단계의 시료를 일정 시간 간격으로 150 μL 채취하여 600 μL 클로로포름에 녹인 후 0.45 μL GHP Acrodisc syringe filter (Pall Corporation, Port Washington, NY)를 이용하여 여과하였다.

[0059] 상기 각각의 여과액을 150 μL씩을 취하여 TLC 실리카겔 60 F₂₅₄ 판(Merck KGaA, Darmstadt, 독일)에 로딩하고 페트롤륨 에테르, 디에틸 에테르 및 아세트산을 부피비 100:20:1로 혼합한 용매에서 전개시켰다. 지방산과 라우릴 에스터 락을 형광발색을 통해 검출하고 각 락을 긁어내어 14% BF₃ 용액으로 메틸화 시켜 불꽃이온화검출기가 장착된 가스크로마토그래피(Model 3800; Varian Inc, Walnut Creek, CA, 미국)로 분석하였다. 컬럼은 supelcowax 10 fused-silica capillary column (30 m×0.32 mm i.d.; Supelco, Bellefonte, PA, 미국)을 사용하였고 오븐 온도는 180℃에서 1분 동안 유지시키는 것을 시작으로 1.5℃/min로 210℃까지 올라가도록 설정하였다. 운반 기체로는 헬륨을 사용하였고, 기체 유속은 50mL/min으로 하였다. 주입부와 검출기의 온도는 각각 240℃와 250℃로 설정하였다. 시료 화합물의 피크의 정점에서의 유지시간 (retention time)을 표준물질과 비교하여 결과를 분석하였으며, heptadecanoic acid를 내부 표준물질로 사용하였다. 분석 결과를 통하여 에스터 전환율, 잔류 지방산 분획 내 피놀렌산 농도 및 잔류 지방산 분획 내 피놀렌산 회수율을 하기 수학적 1 내지 3으로 계산하였다.

[0060] [수학적 1]

$$\text{에스터 전환율 (mol\%)} = \frac{\text{잔류 지방산의 몰수}}{\text{잔류 지방산의 몰수} + \text{에스터의 몰수}} \times 100$$

[0061]

[0062] [수학적 2]

$$\text{잔류지방산 분획의 피놀렌산 농도 (mol\%)} = \frac{\text{잔류 지방산 부분의 피놀렌산의 몰수}}{\text{전체 잔류 지방산의 몰수}} \times 100$$

[0063]

[0064] [수학적 3]

$$\begin{aligned} \text{잔류지방산 분획의 피놀렌산 회수율 (yield, mol \%)} \\ = \frac{\text{잔류지방산 중 피놀렌산의 몰수}}{\text{잔류지방산 중 피놀렌산의 몰수} + \text{에스터 물질 중 피놀렌산의 몰수}} \times 100 \end{aligned}$$

[0065]

[0066] 1. 효소의 함량

[0067] 효소의 함량은 잣기름 지방산 100 중량부에 대하여 각각 0.01, 0.05, 0.1, 0.25 및 0.5로 하였으며, 그 외의 반응 조건인 반응 온도는 25℃이며, 증류수의 함량은 잣기름 지방산 100 중량부에 대하여 15 중량부로 포함하여 효소 함량에 따른 피놀렌산 농축 정도를 관찰하였다.

[0068] 효소의 함량이 에스터 전환율에 미치는 영향을 보았을 때, 효소의 함량이 증가할수록 초기 반응 속도가 빨라지는 것을 확인할 수 있었다(도 1).

[0069] 또한, 잔류 지방산 분획 내 피놀렌산 농도도 효소의 함량이 0.01에서 0.1 중량부로 증가함에 따라 피놀렌산의 초기 농축 속도가 증가함을 확인할 수 있었다. 하지만 효소의 함량이 0.5 중량부인 실험에서는 가장 빠른 초기 농축 속도를 보였으나, 잔류 지방산 분획 내 최대 피놀렌산의 농도는 다른 효소의 함량에서 보다 낮은 38.0 mol%로 나타났다. 이는 0.5 중량부의 효소의 함량에서 반응속도가 너무 빨라 칸디다루고사 리파아제의 선택성에 역효과를 나타내었기 때문으로 사료된다. 최대 피놀렌산 농도인 40 mol%는 효소의 함량 0.1 중량부와 0.25 중량부에서 얻어졌다. 효소의 함량이 0.1 중량부 보다 높을 경우, 피놀렌산 농도는 최대값에 도달하였다가 반응 시간이 길어짐에 따라 천천히 감소하는 것을 보였다(도 2).

[0070] 효소의 함량이 피놀렌산 회수율에 미치는 영향을 보았을 때, 잔류 지방산 분획 내 피놀렌산의 농도는 효소의 함량 0.1 중량부와 0.25 중량부에서 동일한 최대값을 나타내었지만, 이 때 피놀렌산의 회수율은 효소의 함량이 0.25 중량부보다 0.1 중량부에서 높았다(도 3). 따라서 이를 고려하였을 때 효소의 함량이 0.1 중량부일 때가 최적 조건인 것을 알 수 있었다.

[0071] 2. 증류수의 함량

[0072] 증류수의 함량은 잣기름 지방산 100 중량부에 대하여 각각 0, 1, 5, 10 및 15로 하였으며, 그 외의 반응 조건인 반응 온도는 25℃이며, 효소의 함량은 잣기름 지방산 100 중량부에 대하여 0.1 중량부로 포함하여 증류수 함량에 따른 피놀렌산 농축 정도를 관찰하였다.

[0073] 에스터 전환율의 실험 결과에서, 증류수 함량이 10 중량부까지 증가하였을 때 그에 따라 에스터 전환율이 크게 증가하는 경향을 보였다. 하지만 증류수 함량 10 중량부와 15 중량부를 비교하였을 때, 반응시간 4시간 이후에는 에스터 전환율이 거의 비슷한 값을 나타내었다. 반면에, 증류수 함량을 포함하지 않은 실험(0 중량부)에서는 반응시간이 24시간이 지나도 에스터 전환율이 7.5%에 불과하는 매우 낮은 전환율을 보였다(도 4).

[0074] 또한, 증류수 함량이 0에서 10 중량부로 증가함에 따라 잔류 지방산 분획내 피놀렌산 농도가 급격히 증가함이 확인되었다. 하지만 증류수 함량 10 내지 15 중량부 사이에는 잔류 지방산 분획 내 피놀렌산의 농도 및 잔류 지방산 분획 내 피놀렌산 회수율 모두 큰 차이를 나타내지 않았다(도 5 및 도 6). 증류수 함량 10 중량부 및 15 중량부에서 반응시간 8시간 만에 잔류 지방산 분획 내 피놀렌산의 농도가 41 mol%로 증가하였고, 이 때 피놀렌산의 회수율은 약 78 mol%였다.

[0075] 따라서, 증류수 함량의 최적 조건은 잣기름 지방산 100 중량부에 대하여 10 중량부 또는 15 중량부이며, 보다 바람직하게는 10 중량부인 것을 확인할 수 있었다.

[0076] 3. 반응 온도

[0077] 반응 온도는 0, 15, 25, 35, 45 및 55℃로 하였으며, 효소의 함량은 잣기름 지방산 100 중량부에 대하여 0.1 중량부로 포함하였으며, 증류수의 함량은 잣기름 지방산 100 중량부에 대하여 10 중량부로 포함하여 반응 온도에 따른 피놀렌산 농축 정도를 관찰하였다.

[0078] 에스터 전환율의 실험 결과에서, 반응 온도가 55℃ 에서 35℃로 감소함에 따라 에스터 전환율의 평형 값이 증가하는 것을 확인하였다. 에스터 전환율의 최대 값은 온도마다 달랐으나, 모든 온도 범위에서 반응시간 4시간 이후에는 반응이 평형에 도달하는 양상을 보였다(도 7).

[0079] 이와 대조적으로 잔류 지방산 분획 내 피놀렌산의 농도는 온도가 55℃에서 15℃로 감소함에 따라 급격히 증가하는 것을 보였다. 5℃보다 높은 온도에서는 반응시간이 증가함에 따라 피놀렌산의 농도가 최대값에 도달한 후 그 값에서 반응이 끝날때까지 유지되는 경향을 보였다. 반면 0℃와 5℃에서는 잔류 지방산 분획 내 피놀렌산의 농도가 최대값에 도달한 후 다시 감소하는 경향을 보였다(도 8). 잔류 지방산 분획 내 피놀렌산의 최대 농도는 42.6 mol%로 반응 시간 12시간 이후 5℃ 및 15℃에서 나타났다. 상기 두 온도에서 잔류 지방산 분획 내 피놀렌산 농도가 최대치를 보일 때 잔류 지방산 분획 내 피놀렌산의 회수율은 동일하였다(도 8 및 도 9).

[0080] 따라서, 반응 온도의 최적 조건은 5℃ 또는 15℃이며, 보다 바람직하게는 15℃ 인 것을 확인할 수 있었다.

[0081] **실험예 2. 실시예 1 내지 5의 지방산 조성**

[0082] 상기 실시예 1 내지 5의 방법으로 농축된 피놀렌산의 순도 및 상기 실험 방법의 각 단계별로 갖기름 지방산 내 피놀렌산 함량을 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0083]

지방산	갖기름	에스터화 반응 후 피놀렌산 농축물	요소부가법 이후 피놀렌산 농축 물 (지방산:요소)				
			실시예 1 (1:1) ^e	실시예 2 (1:2)	실시예 3 (1:3)	실시예 4 (1:4)	실시예 5 (1:5)
C16:0	5.3±0.0	8.4±1.5	0.4±0.1			-	-
C18:0	2.3±0.1	7.5±0.3				-	-
C18:1(△9)	27.1±0.1	8.4±0.6	8.9±0.5	0.1±0.1		-	-
C18:1(△11)	0.4±0.0		0.5±0.0			-	-
C18:2(△5,9)	2.2±0.0	8.1±0.4	9.4±0.0	5.0±0.5	0.3±0.4	-	-
C18:2 (△9,12)	46.4±0.1	13.3±0.1	14.1±0.1	10.7±0.6	1.8±0.3	-	-
C18:3 (△5,9,12)	13.3±0.0	43.0±0.7	57.3±0.5	78.4±1.8	94.6±0.7	99.1±0.0	100.0±0.0
C20:0	0.3±0.0	1.3±0.1	2.0±0.1			-	-
C20:1(△11)	1.1±0.0	3.9±0.3	0.5±0.0			-	-
C20:2 (△11,14)	0.6±0.0	2.0±0.0	2.3±0.0	0.3±0.3		-	-
C20:3 (△5,11,14)	1.0±0.0	4.1±0.3	4.7±0.1	5.5±0.0	3.3±0.0	0.9±0.0	-
피놀렌산 회수율	100	77.8±1.2	62.5±1.7	55.2±0.8	38.2±0.1	18.2±0.4	8.0±0.4

[0084] 요소와 잔류 지방산 분획의 혼합비에서 요소의 비율을 1:1에서 5:1로 증가시키에 따라 피놀렌산의 농도는 급격히 증가하였고, 피놀렌산의 회수율은 감소하는 것을 볼 수 있었다. 잔류 지방산 분획과 요소의 비율이 1:1일 때, 피놀렌산의 농도가 에스터화 반응 후 농도인 43 mol%에서 57.3 mol%로 증가하였고, 이 때 회수율은 62.5 mol%였다. 잔류 지방산 분획과 요소의 비율이 1:3일 때, 피놀렌산의 농도가 94.6 mol%로 증가하였고 이 때 회수율은 38.2 mol%였다. 잔류 지방산 분획과 요소의 비율이 1:4 및 1:5일 때, 피놀렌산의 농도는 각각 99.1 mol% 및 100 mol%였고, 이 때 회수율은 18.2 mol% 및 8.0 mol% 였다.

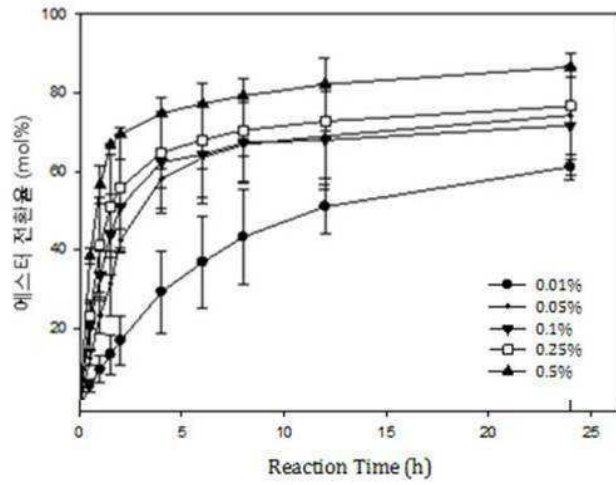
[0085] 따라서, 잔류 지방산 분획과 요소의 혼합비가 1:5 일 때, 순도 100%의 피놀렌산을 얻을 수 있다는 것을 알 수 있었다.

[0086] 또한, 초기의 갖기름 지방산에는 9번째 탄소 위치에서 이중결합이 시작되는 올레산(C18:1△9) 및 리놀레산(C18:2△9,12)이 다량으로 함유되어 있었지만, 에스터화 반응 후 급격히 감소하는 경향을 보였다. 반면에, 5번째 탄소 위치에서 이중결합이 시작되는 지방산(△5)들은 함량이 증가하는 경향을 보였다. 상기 결과를 통하여 칸디다루고사 리파아제가 9번째 탄소 위치에서 이중결합이 시작되는 지방산(△9)에 대하여 높은 선택성을 갖는 것을 확인할 수 있었으며, 이에 따라 5번째 탄소 위치에서 이중결합이 시작되는 지방산(△5)인 피놀렌산의 경우 에스터화 되지 않으므로 잔류 지방산 분획에 농축 될 수 있었다. 상기 잔류 지방산 분획에 요소를 첨가하여 한번 더 농축함으로써 순도 100%인 피놀렌산을 얻을 수 있었다(도 10).

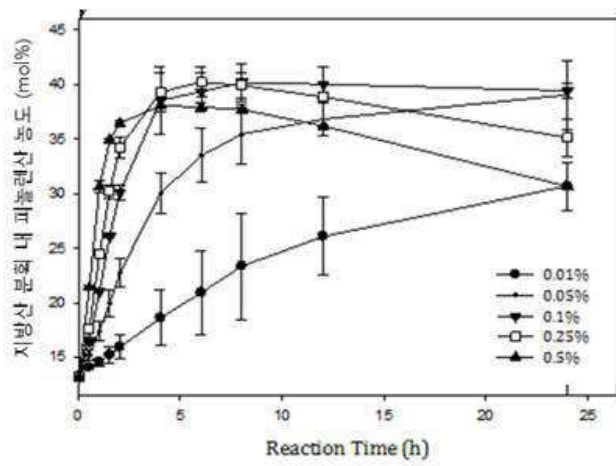
[0087] 따라서, 본 발명에서는 초기 갖기름 지방산 내에 13.3mol%로 함유되었던 피놀렌산을 에스터화 반응에 의해 42.6mol%까지 농축할 수 있으며, 요소를 첨가하여 한번 더 농축을 하여 순도 100%의 피놀렌산을 얻을 수 있었다.

도면

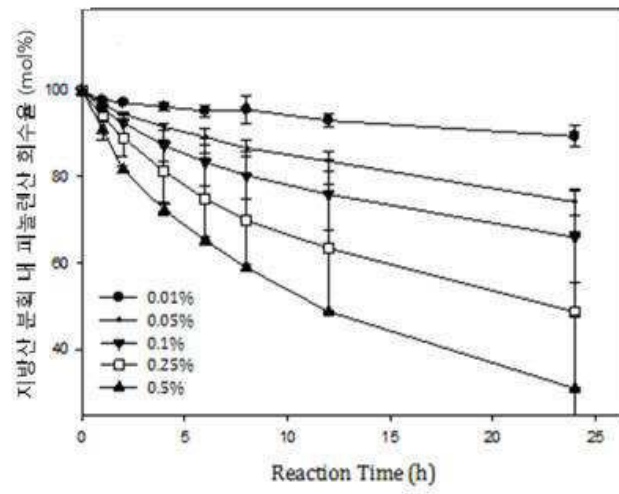
도면1



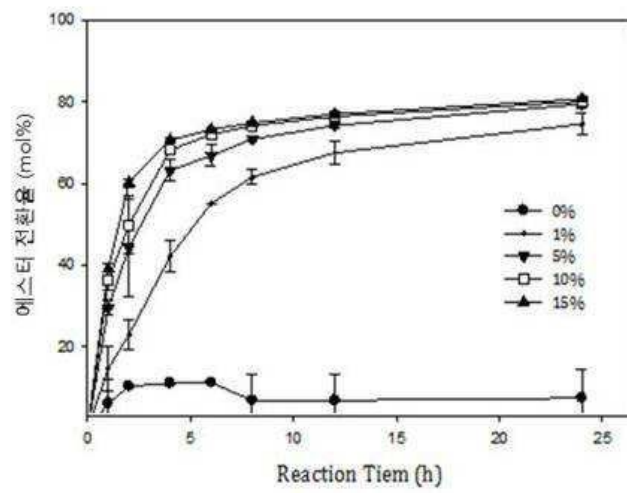
도면2



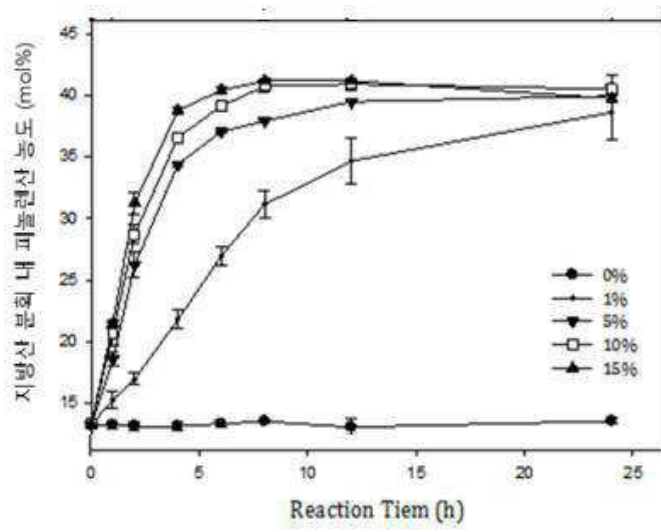
도면3



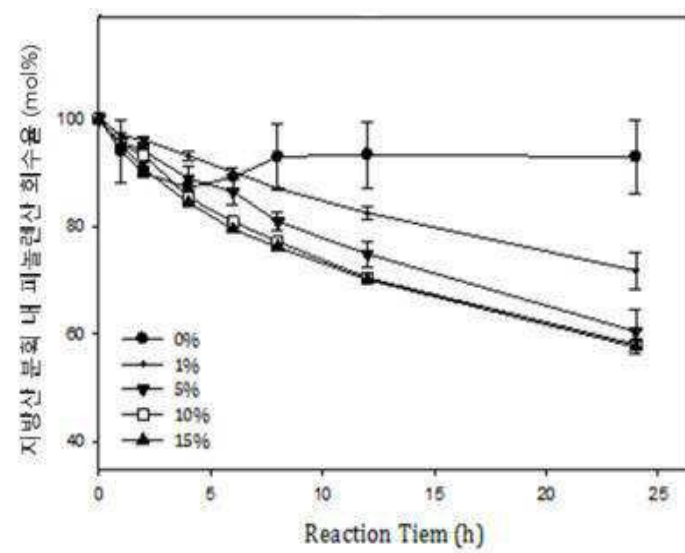
도면4



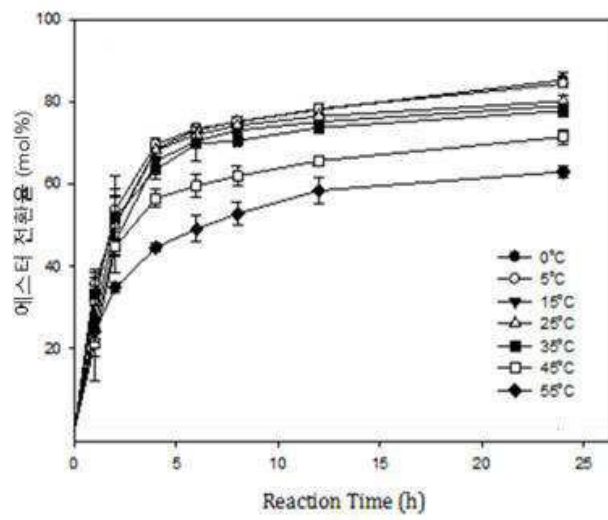
도면5



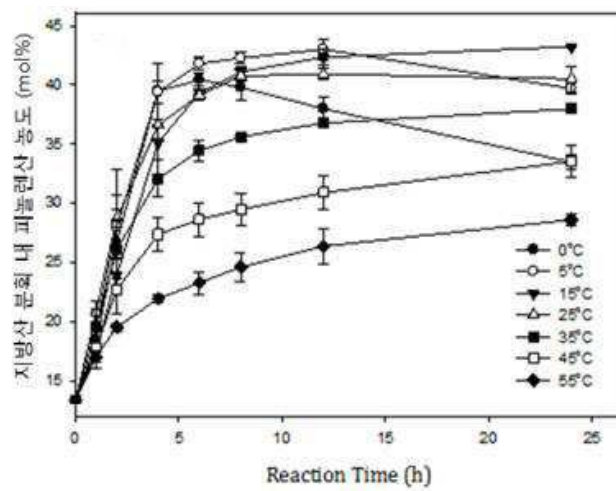
도면6



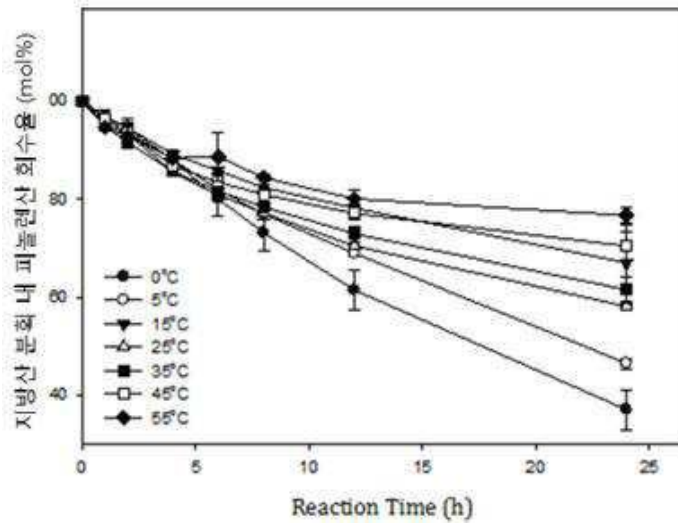
도면7



도면8



도면9



도면10

