



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0111257

(43) 공개일자 2015년10월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12P 7/64 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0124083

(22) 출원일자 2014년09월18일

심사청구일자 2014년09월18일

(30) 우선권주장

1020140034655 2014년03월25일 대한민국(KR)

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김인환

서울특별시 노원구 공릉로58길 176, 102동 1108호

백지연

경기도 성남시 분당구 동판교로 122, 211동 1902호

노다솜

서울특별시 서초구 바우피로 91, 111동 1102호

(74) 대리인

한양특허법인

전체 청구항 수 : 총 9 항

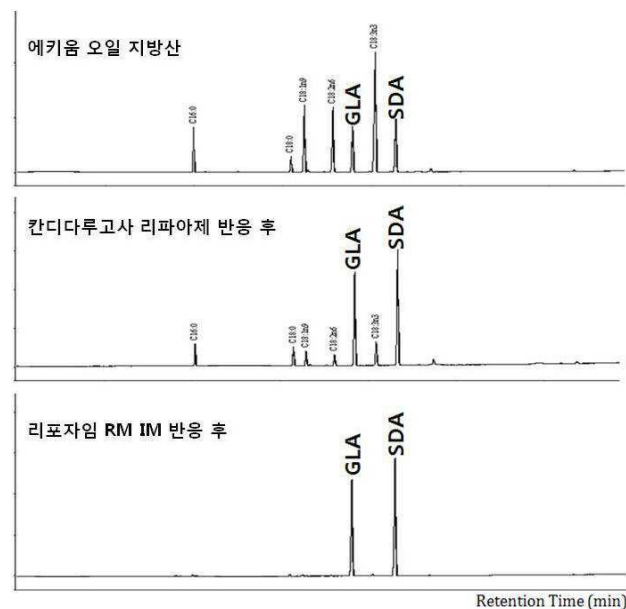
(54) 발명의 명칭 **에키움 오일로부터 농축된 스테아리돈산을 회수하는 방법**

(57) 요약

본 발명은 (1)에키움 오일의 지방산, 라우릴 알코올, 칸디다루고사 리파아제 및 증류수를 혼합하여 1차 에스터화 반응을 시켜, 에스터화 반응 생성물 분획 및 스테아리돈산이 포함된 에키움 오일의 잔류 지방산 분획을 생성하는 단계;

(뒷면에 계속)

대표도 - 도11



- (2)상기 스테아리돈산이 포함된 에키움 오일의 잔류 지방산 분획을 분리하는 단계; 및
- (3)상기 스테아리돈산이 포함된 에키움 오일의 잔류 지방산 분획, 에탄올 및 리포자임 RM IM을 혼합하여 2차 에스터화 반응을 시켜, 에스터화 반응 생성물 분획 및 스테아리돈산이 농축된 에키움 오일의 잔류 지방산 분획을 생성하는 단계;
- (4)상기 스테아리돈산이 농축된 에키움 오일의 잔류 지방산 분획을 분리하는 단계를 포함하는 에키움 오일로부터 스테아리돈산의 회수 방법에 관한 것이다.

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
추	
기 여 율	1/1
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2013.06.01 ~ 2014.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

- (1)에키움 오일의 지방산, 라우릴 알코올, 칸디다루고사 리파아제 및 증류수를 혼합하여 1차 에스터화 반응을 시켜, 에스터화 반응 생성물 분획 및 스테아리돈산이 포함된 에키움 오일의 잔류 지방산 분획을 생성하는 단계;
- (2)상기 스테아리돈산이 포함된 에키움 오일의 잔류 지방산 분획을 분리하는 단계; 및
- (3)상기 스테아리돈산이 포함된 에키움 오일의 잔류 지방산 분획, 에탄올 및 리포자임 RM IM을 혼합하여 2차 에스터화 반응을 시켜, 에스터화 반응 생성물 분획 및 스테아리돈산이 농축된 에키움 오일의 잔류 지방산 분획을 생성하는 단계;
- (4)상기 스테아리돈산이 농축된 에키움 오일의 잔류 지방산 분획을 분리하는 단계를 포함하는 에키움 오일로부터 스테아리돈산의 회수 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 칸디다루고사 리파아제는 에키움 오일의 지방산 100 중량부에 대하여 0.1 내지 3 중량부로 포함되는 것을 특징으로 하는 에키움 오일로부터 스테아리돈산의 회수 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 증류수는 에키움 오일의 지방산 100 중량부에 대하여 0.1 내지 0.25 중량부로 포함되는 것을 특징으로 하는 에키움 오일로부터 스테아리돈산의 회수 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 (1)단계의 반응 온도는 20 내지 50℃인 것을 특징으로 하는 에키움 오일로부터 스테아리돈산의 회수 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 (3)단계의 반응 온도는 10 내지 40℃인 것을 특징으로 하는 에키움 오일로부터 스테아리돈산의 회수 방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 분획용 액체 크로마토그래피를 사용하여, 상기 (4)단계에서 회수된 스테아리돈산이 농축된 에키움 오일의 잔류 지방산 분획으로부터 스테아리돈산을 분획하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 에키움 오일로부터 스테아리돈산의 회수 방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 분획용 액체 크로마토그래피의 이동상은 아세토나이트릴, 메탄올 및 헥산을 포함하는 것을 특징으로 하는 에키움 오일로부터 스테아리돈산의 회수 방법.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 이동상은 추가로 아세트산을 포함하는 것을 특징으로 하는 에키움 오일로부터 스테아리돈산의 회수 방법.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 에키움 오일로부터 스테아리돈산의 회수 방법에 있어서, 감마 리놀렌산이 함께 회수되는 것을 특징으로 하는 에키움 오일로부터 스테아리돈산의 회수 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 에키움 오일로부터 스테아리돈산을 회수하는 방법에 관한 것으로, 보다 자세하게는 효소를 이용하여 에스터화 반응을 진행하는 두 단계를 거쳐 에키움 오일로부터 농축된 스테아리돈산을 회수하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 스테아리돈산(stearidonic acid, SDA)은 이중결합을 4개 가지는 탄소수 18의 불포화 지방산(C18:4, Δ6, 9, 12, 15)으로 체내에서 에이코사펜타엔산 (eicosapentaenoic acid, EPA)과 도코사헥사엔산(docosahexaenoic acid, DHA)이 생성되는 과정의 중간 생성 물질로 알려져 있다. 상기 스테아리돈산은 에이코사펜타엔산이나 도코사헥사엔산과 마찬가지로 건강 증진 효과를 갖고 있으며, 특히 혈관 기능 개선, 세포 보호 및 자가면역 질병의 예방 등의 역할을 하는 물질로 주목 받고 있다.

[0003] 인체 내에서는 Δ6 불포화효소(Δ6-desaturase)에 의해 알파 리놀렌산(α-linolenic acid)이 스테아리돈산으로 전환되고, 상기 스테아리돈산은 연속적인 반응을 통해 에이코사펜타엔산과 도코사헥사엔산으로 전환된다. 하지만 이러한 체내 생합성 과정에서 필요로 하게 되는 Δ6 불포화효소는 체내에서의 양이 매우 한정적이다. 상기 알파 리놀렌산은 식물성 기름을 통해 다량으로 쉽게 얻어질 수 있다는 장점을 갖지만, 체내에서 에이코사펜타엔산으로의 전환 정도는 2 내지 5%에 그친다. 그러나 스테아리돈산을 직접 섭취하였을 경우에는 에이코사펜타엔산으로의 전환율이 20 내지 30%로 나타나 효율적인 불포화 지방산의 섭취를 할 수 있도록 한다. 이러한 이유로 스테아리돈산에 대한 연구는 증가하고 있는 추세이다.

[0004] 상기 스테아리돈산은 자연계의 오메가 3 지방산 중 적은 비율을 차지하고 있으며, 생선 기름 등에 0.5 내지 2% 있으며, 식물성 지방산에는 거의 발견되지 않는 것으로 알려져 있으나, 식물성 기름 중 지치과 식물(*Boraginaceae* family)의 에키움 오일에서 비교적 높은 함량을 갖는다. 따라서, 에키움 오일은 결과적으로 다른 식물에서 볼 수 없는 오메가 3 지방산과 오메가 6 지방산의 비율을 갖고 있다.

[0005] 초임계 추출법, 요소 작물형성법, 저온 결정화법 등을 이용해 동물성 기름 내 불포화 지방산을 농축하는 실험들은 많이 연구되어왔다. 하지만, 효소를 통한 반응으로 불포화 지방산을 농축시키는 것은 안정적인 조건에서 진행된다는 것과 선택성을 갖는다는 것 등에 있어서 앞서 진행되어온 방법들에 대해 큰 강점을 갖는다. 그러나 현재까지 식물성 유래 기름을 이용해 스테아리돈산을 효소 반응을 통해 농축하는 실험은 거의 없는 것으로 알려져 있다. 따라서, 효소를 이용하여 식물성 기름으로부터 스테아리돈산을 농축하는 방법에 관한 연구가 필요한 상황이다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0006] (비특허문헌 0001) Marty, A., Dossat, V., Condoret, J. S., Continuous operation of lipase-catalyzed reactions in nonaqueous solvents: influence of the production of hydrophilic compounds, *Biotechnol. Bioeng.* 1997, 56, 232-237.
- (비특허문헌 0002) Chulalakasanukul, W., Condoret, J., Delorme, P., Willemot, R., Kinetic study of esterification by immobilized lipase in n-hexane, *FEBS Lett.* 1990, 276, 181-184.
- (비특허문헌 0003) Zaks, A., Klivanov, A. M., The effect of water on enzyme action in organic media, *J. Biol. Chem.* 1988, 263, 8017-8021.
- (비특허문헌 0004) Adlercreutz, P., On the importance of the support material for enzymatic synthesis in organic media, *Eur. J. Biochem.* 1991, 199, 609-614.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 에키움 오일로부터 건강 증진 효과를 가지는 스테아리돈산을 농축하여 회수하는 것으로, 효소를 이용하여 보다 안정적이고 선택적으로 스테아리돈산을 농축하여, 농축된 스테아리돈산을 회수하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0008] 또한, 본 발명은 상기 효소를 이용하여 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 내 농축된 스테아리돈산을 분획용 액체 크로마토그래피로 분획하여 고순도의 스테아리돈산을 회수하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기 목적을 달성하기 위하여,
- [0010] 본 발명은 (1)에키움 오일의 지방산, 라우릴 알코올, 칸디다루고사 리파아제 및 증류수를 혼합하여 1차 에스터화 반응을 시켜, 에스터화 반응 생성물 분획 및 스테아리돈산이 포함된 에키움 오일의 잔류 지방산 분획을 생성하는 단계;
- [0011] (2)상기 스테아리돈산이 포함된 에키움 오일의 잔류 지방산 분획을 분리하는 단계; 및
- [0012] (3)상기 스테아리돈산이 포함된 에키움 오일의 잔류 지방산 분획, 에탄올 및 리포자임 RM IM을 혼합하여 2차 에스터화 반응을 시켜, 에스터화 반응 생성물 분획 및 스테아리돈산이 농축된 에키움 오일의 잔류 지방산 분획을 생성하는 단계;
- [0013] (4)상기 스테아리돈산이 농축된 에키움 오일의 잔류 지방산 분획을 분리하는 단계를 포함하는 에키움 오일로부터 스테아리돈산의 회수 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0014] 본 발명의 에키움 오일로부터 스테아리돈산을 회수하는 방법은 효소를 사용한 1차 및 2차 에스터화 반응으로 스테아리돈산을 선택적으로 농축하여 회수할 수 있으며, 안정적인 장점을 지니고 있다.
- [0015] 또한, 본 발명은 상기 효소를 사용하여 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 내 농축된 스테아리돈산을 분획용 액체 크로마토그래피로 분획함으로써, 고순도의 스테아리돈산을 얻을 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 칸디다루고사 리파아제 함량에 따른 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 내 스테아리돈산의 농도를 나타낸 그래프이다.
- 도 2는 칸디다루고사 리파아제 함량에 따른 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 내 스테아리돈산의 회수율을 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 칸디다루고사 리파아제를 사용한 단계에서, 증류수 함량에 따른 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 내 스테아리돈산의 농도를 나타낸 그래프이다.
- 도 4는 칸디다루고사 리파아제를 사용한 단계에서, 증류수 함량에 따른 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 내 스테아리돈산의 회수율을 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 칸디다루고사 리파아제를 사용한 단계에서, 반응 온도에 따른 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 내 스테아리돈산의 농도를 나타낸 그래프이다.
- 도 6은 칸디다루고사 리파아제를 사용한 단계에서, 반응 온도에 따른 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 내 스테아리돈산의 회수율을 나타낸 그래프이다.
- 도 7은 리포자임 RM IM을 사용한 단계에서, 증류수 함량에 따른 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 내 스테아리돈산의 농도를 나타낸 그래프이다.
- 도 8은 리포자임 RM IM을 사용한 단계에서, 증류수 함량에 따른 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 내 스테아리돈산의 회수율을 나타낸 그래프이다.
- 도 9는 리포자임 RM IM을 사용한 단계에서, 반응 온도에 따른 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 내 스테아리돈산

의 농도를 나타낸 그래프이다.

도 10은 리포자임 RM IM을 사용한 단계에서, 반응 온도에 따른 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 내 스테아리돈산의 회수율을 나타낸 그래프이다.

도 11은 에키움 오일의 지방산, 칸디다루고사 리파아제를 사용한 단계 및 리포자임 RM IM을 사용한 단계의 결과를 측정한 크로마토그램이다.

도 12는 스테아리돈산이 농축된 에키움 오일의 잔류 지방산 분획을 semi-분획용 액체 크로마토그래피 컬럼을 이용하여 측정한 그래프이다.

도 13은 스테아리돈산이 농축된 에키움 오일의 잔류 지방산 분획을 분획용 액체 크로마토그래피로 스테아리돈산을 분획한 그래프이다.

도 14는 스테아리돈산이 농축된 에키움 오일의 잔류 지방산 분획을 분획용 액체 크로마토그래피로 감마 리놀렌산을 분획한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 보다 자세히 설명한다.

본 발명은 에키움 오일로부터 농축된 스테아리돈산을 회수하는 방법에 관한 것으로, 하기 단계를 거쳐 스테아리돈산을 농축할 수 있다.

(1)에키움 오일의 지방산, 라우릴 알코올, 칸디다루고사 리파아제 및 증류수를 혼합하여 1차 에스터화 반응을 시켜, 에스터화 반응 생성물 분획 및 스테아리돈산이 포함된 에키움 오일의 잔류 지방산 분획을 생성하는 단계;

(2)상기 스테아리돈산이 포함된 에키움 오일의 잔류 지방산 분획을 분리하는 단계; 및

(3)상기 스테아리돈산이 포함된 에키움 오일의 잔류 지방산 분획, 에탄올 및 리포자임 RM IM을 혼합하여 2차 에스터화 반응을 시켜, 에스터화 반응 생성물 분획 및 스테아리돈산이 농축된 에키움 오일의 잔류 지방산 분획을 생성하는 단계;

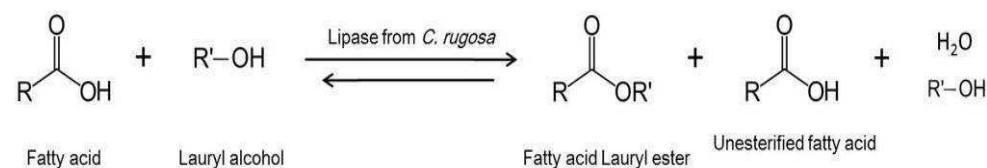
(4)상기 스테아리돈산이 농축된 에키움 오일의 잔류 지방산 분획을 분리하는 단계를 포함하여 에키움 오일로부터 농축된 스테아리돈산을 회수할 수 있다.

본 발명에서 농축하고자 하는 스테아리돈산(stearidonic acid, SDA)은 6, 9, 12 및 15번째 위치에 이중결합을 가지고 있는 탄소수 18개의 지방산(C18:4, Δ6, 9, 12, 15)이다.

상기 (1)단계는 에키움 오일로부터 스테아리돈산이 1차적으로 농축되는 단계이다.

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

[반응식 1]



상기 반응식 1을 보다 자세하게 설명하면, 효소로 작용하는 칸디다루고사 리파아제는 9번째 탄소 위치에서 이중

결합이 시작되는 지방산($\Delta 9$)에 높은 선택성을 가지고 있어 상기 에키움 오일의 지방산 중 9번째 탄소 위치에서 이중결합이 시작되는 지방산($\Delta 9$)은 지방산 라우릴 에스터로 반응이 일어나게 되고, 6번째 탄소 위치에서 이중결합이 시작되는 지방산($\Delta 6$)인 스테아리돈산은 에스터 반응이 일어나지 않아 에키움 오일의 잔류 지방산 분획에 농축된다.

[0029] 상기 (1)단계에서 라우릴 알코올과 에키움 오일의 지방산의 혼합 비율은 0.7 내지 3:1의 몰비이며, 바람직하게는 1:1의 몰비이다. 또한, 상기 (1)단계에서 생성된 스테아리돈산이 포함된 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 내의 스테아리돈산의 농축 정도는 칸디다루고사 리파아제의 함량, 증류수의 함량 및 반응 온도에 영향을 받는다.

[0030] 일반적으로 기질의 양이 고정된 경우에는 효소의 함량이 증가하면 기질이 반응할 수 있는 활성 부위가 많아지기 때문에 반응 속도가 증가하지만, 과량을 사용할 경우 효소가 작용할 수 있는 활성도가 떨어지게 된다. 따라서, 본 발명에서는 상기 칸디다루고사 리파아제가 에키움 오일의 지방산 100 중량부에 대하여 0.1 내지 3 중량부로 포함되는 것이 바람직하다. 상기 칸디다루고사 리파아제가 0.1 중량부 미만으로 포함되면 반응 속도가 증가하지 않으며, 칸디다루고사 리파아제의 함량이 3 중량부를 초과하여 포함되면 효소의 활성도가 감소한다.

[0031] 효소 반응에서 수분의 유무는 효소의 반응 활성도나 특이성에 큰 영향을 미치며, 최소한의 수분이라도 반응에 있어 필요 조건일 수 있다. 하지만 과량의 수분이 첨가되면 효소 자체의 활성도를 낮출 수 있으며, 가수분해 같은 부반응이 일어날 수 있다. 상기 (1)단계에서 증류수를 포함하지 않을 경우, 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 내 스테아리돈산의 회수율은 높지만, 농축은 거의 일어나지 않으므로 본 발명에서 증류수는 에키움 오일의 지방산 100 중량부에 대하여 0.1 내지 0.25 중량부로 포함되는 것이 바람직하다. 또한, 본 발명에서 증류수가 0.25 중량부를 초과하게 되면 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 내 스테아리돈산 농축율에 유의적인 차이가 나타나지 않아 0.1 내지 0.25 중량부를 포함하는 것이 더욱 바람직하다.

[0032] 또한, 반응 온도는 효소 반응에서 반응 속도와 효소의 선택성에 영향을 미치는 중요한 요소이다. 본 발명에서 상기 (1)단계의 반응 온도는 20 내지 50℃인 것이 바람직하다. 온도가 20℃보다 낮으면 24℃의 상대적으로 높은 용해점을 갖는 라우릴 알코올이 반응에 잘 참여할 수 없다. 또한, 온도가 높아질수록 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 내 스테아리돈산의 농축율은 증가하지만, 온도가 30℃를 초과하였을 때는 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 내 스테아리돈산의 농축율은 감소한다. 따라서, 반응온도가 50℃보다 높아지면 효소인 칸디다루고사 리파아제의 변성을 유발하여 불활성화를 촉진시킬 수 있다.

[0033] 상기 (2)단계에서는 상기 (1)단계의 에스터화 반응 후, 에스터화 반응에 참여하지 않은 스테아리돈산이 포함된 에키움 오일의 잔류 지방산 분획을 분리하는 단계이다. 상기 (1)단계의 생성물(지방산 라우릴에스터 및 스테아리돈산이 포함된 에키움 오일의 잔류 지방산 분획)에 n-hexane 및 anhydrous sodium sulfate을 첨가하여 수분을 제거하며, 스테아리돈산이 포함된 에키움 오일의 잔류 지방산 분획을 분리한다. 그 후 증류수로 여러 번 세척 후, 흡습성 물질로 다시 수분을 제거하고, 진공으로 용매를 제거하여 스테아리돈산이 포함된 에키움 오일의 잔류 지방산 분획을 분리한다.

[0034] 상기 (3)단계는 스테아리돈산이 포함된 에키움 오일의 잔류 지방산 분획에 에탄올 및 리포자임 RM IM을 첨가하여 다시 한번 에스터화 반응을 진행하는 단계로, 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 내 스테아리돈산을 한번 더 농축하여, 스테아리돈산이 농축된 에키움 오일의 잔류 지방산 분획을 회수하는 단계이다. 상기 리포자임 RM IM은 에스터화 반응을 촉진시키는 효소이며, 상기 (1)단계에서 반응에 참여하지 않은 포화 지방산 및 완벽히 제거되지 않은 불포화 지방산과 선택적으로 반응하여 스테아리돈산을 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 내에서 한번 더 농축하게 한다.

[0035] 상기 (3)단계에서 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 내의 스테아리돈산의 농축은 반응 온도에 영향을 받는다. 반응 온도는 10 내지 40℃인 것이 바람직하다. 반응 온도가 10℃ 미만이면 스테아리돈산의 농축 속도가 매우 느리며, 40℃를 초과하면 효소 단백질의 비가역적 변성이 일어날 수 있으며, 효소 활성이 낮아지게 된다.

[0036] 또한, 상기 (3)단계에서는 증류수를 첨가하지 않는 것이 바람직하다. 증류수를 첨가하여도 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 내 스테아리돈산의 농축 정도에 유의적인 차이를 보이지 않으며, 증류수를 첨가하지 않을 때가 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 내 스테아리돈산의 가장 높은 농축율을 보인다. 이는 상기 (3)단계의 반응에서 반응 생성물로 수분이 만들어져 반응 시스템에 축적되기 때문이다. 상기 생성된 수분이 리포자임 RM IM의 구조

나 특이성에 영향을 미칠 수 있으므로, 상기 (3)단계에서는 수분을 포함하지 않는 것이 더욱 바람직하다.

[0037] 상기 (4)단계에서는 상기 (3)단계에서 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 내 농축된 스테아리돈산을 회수하는 단계로, 최종적으로 농축된 스테아리돈산을 회수할 수 있다.

[0038] 또한, 본 발명은 상기 (1) 내지 (4)단계를 거쳐 스테아리돈산 뿐만 아니라 감마 리놀렌산($\Delta 6$, GLA)을 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 내 함께 농축할 수 있다. 이는 본 발명의 효소로 사용되는 칸디다루고사 리파아제 및 리포자임 RM IM이 6번째 탄소 위치에서 이중결합이 시작되는 지방산($\Delta 6$)에 약한 반응성을 보이기 때문이다.

[0039] 또한, 본 발명은 상기 (4)단계 후, 분획용 액체 크로마토그래피를 사용하여, 상기 (4)단계에서 회수된 스테아리돈산이 농축된 에키움 오일의 잔류 지방산 분획으로부터 스테아리돈산을 분획하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0040] 상기 분획용 액체 크로마토그래피는 큰 직경을 갖는 컬럼을 사용하므로, 이동상의 속도가 높고, 상대적으로 많은 양의 샘플 분획이 가능하다. 따라서, 고순도의 스테아리돈산을 얻기 위하여 분획용 액체 크로마토그래피를 사용하는 단계를 추가하는 것이 바람직하다.

[0041] 상기 분획용 액체 크로마토그래피의 이동상은 아세토나이트릴, 메탄올 및 헥산을 포함하며, 추가로 아세트산을 포함할 수 있다.

[0042] 상기 추가 단계는 (1) 내지 (4)단계에서 칸디다 루고사 리파아제 및 리포자임 RM IM 효소를 사용하여 회수된 스테아리돈산이 농축된 에키움 오일의 잔류 지방산 분획을 분획용 액체 크로마토그래피로 분획하여 고순도의 스테아리돈산을 얻을 수 있는 단계이다. 상기 칸디다 루고사 리파아제 및 리포자임 RM IM 효소를 사용하여 얻은 스테아리돈산이 농축된 에키움 오일의 잔류 지방산 분획은 스테아리돈산 및 감마 리놀렌산이 높은 함량으로 포함되어 있으므로, 고순도의 스테아리돈산 및 감마 리놀렌산을 보다 용이하게 얻을 수 있다. 따라서, 상기 단계를 추가적으로 수행함으로써, 99% 이상의 스테아리돈산 및 97% 이상의 감마 리놀렌산을 얻을 수 있다.

[0043] 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.

[0044] 제조예 1. 에키움 오일의 지방산 제조

[0045] 에키움 오일 150g에 10M NaOH 용액 150mL과 99% 에탄올 450mL을 넣은 후 교반과 함께 열을 가해주었으며, 끓기 시작하면 30분을 더 반응 시켜 충분히 검화가 될 수 있도록 하였다. 검화 과정이 끝난 반응물을 분액 깔대기에 옮기고, 6 N의 HCl을 첨가하여 검화 되었던 지방산들이 유리 지방산으로 만들어지도록 하였다. 지방산을 포함한 상층부는 *n*-hexane 300mL에 의해 추출하였으며, 그 후 150mL의 증류수로 여러 번 세척하였다. 지방산이 포함되어 있는 *n*-hexane 층은 anhydrous sodium sulfate를 통과시켜 수분을 제거한 후 rotary evaporator에서 용매를 제거하고, 잔류 용매는 40℃에서 질소 flushing을 통해 제거하여 에키움 오일의 지방산을 얻었다.

[0046] <에키움 오일의 지방산으로부터 스테아리돈산 농축 및 회수>

[0047] 실시예 1.

[0048] (1)상기 제조예 1에서 제조한 에키움 오일의 지방산 0.11mol과 라우릴 알코올 0.11mol을 500mL 용량의 water-jacketed glass vessel reactor에 넣고, 수온기를 조절하여 반응기의 온도를 30℃로 설정하였다. 그 후, 반응물에 에키움 오일 지방산 100 중량부 대비 0.25 중량부의 증류수를 첨가하였으며, 효소로 칸디다루고사 리파아제를 에키움 오일 지방산 100 중량부 대비 2 중량부로 첨가하여 에스터화 반응을 진행하였다. 반응이 시작된 시점은 상기 효소가 첨가된 시점이며, 반응물은 400rpm으로 교반하였다.

[0049] (2)상기 반응물 100g을 1L의 *n*-hexane에 녹인 후 anhydrous sodium sulfate를 통과시켜 상기 반응에 사용된 칸

디다루고사 리파아제와 반응물에 함유된 수분을 제거하였다. 그 후 반응물에 0.475M NaOH 용액 200mL와 95% 에탄올 200mL를 첨가하여 2L 분액 깔대기에 옮기고, 라우릴 에스터 분획이 상층부인 *n*-hexane 층에 추출되도록 하였다. 에키움 오일의 잔류 지방산 분획을 포함한 하층부는 새로운 분획 깔대기에서 1L의 *n*-hexane을 이용해 완벽하게 라우릴 에스터를 제거할 수 있도록 하였다. NaOH에 의해 검화되었던 에키움 오일의 잔류 지방산 분획은 20mL의 HCl을 첨가하여 유리 지방산으로 만들었으며, 200mL의 *n*-hexane에 의해 추출하여 20mL의 증류수로 세척하였다. 상기 에키움 오일의 잔류 지방산 분획이 포함되어 있는 *n*-hexane 층은 anhydrous sodium sulfate를 통과시켜 수분을 제거한 후 rotary evaporator에서 용매를 제거하였고, 잔류 용매는 40℃에서 질소 flushing을 통해 제거하여 스테아리돈산이 포함된 에키움 오일의 잔류 지방산 분획을 전체 반응물에서 분리하였다.

(3)상기 스테아리돈산이 포함된 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 0.011mmol과 99.9% 에탄올 0.022mmol을 50mL 용량의 water-jacketed glass vessel reactor에 넣고, 수온기를 조절하여 반응기의 온도를 30℃로 설정하였다. 효소로 리포자임 RM IM을 상기 (2)단계에서 분리한 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 100 중량부에 대하여 2 중량부로 첨가하여 에스터화 반응을 진행하였다. 반응이 시작된 시점은 상기 효소가 첨가된 시점이며, 반응물은 250rpm으로 교반하였으며, 반응 완료 후 에키움 오일 잔류 지방산 분획의 조성을 분석하였다.

실험예 1. 최적 반응조건 측정

상기 실시예 1의 (1) 내지 (3)단계에서 반응 최적 조건을 알아보고자 하였다.

각각의 반응 혼합물 30mg씩을 취하여 적당량의 클로로포름에 녹여 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 락스를 형광발색을 통해 검출하고 각 락스를 긁어내어 14% BF₃ 용액으로 메틸화 시켜 불꽃 이온화 검출기가 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, heptadecaenoic acid을 내부 표준물질로 사용하였다. 분석 결과를 통하여 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 내 스테아리돈산 농도 및 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 내 스테아리돈산 회수율을 하기 수학적 1 및 2으로 계산하였다.

[수학적 1]

$$\text{잔류 지방산 분획 내 스테아리돈산 농도 (wt\%)} = \frac{\text{잔류 지방산 분획 내 스테아리돈산 농도}}{\text{반응물 중 잔류 지방산 분획 무게}} \times 100$$

[수학적 2]

$$\begin{aligned} \text{잔류 지방산 분획 내 스테아리돈산 회수율 (yield, wt \%)} \\ = \frac{\text{잔류 지방산 분획 내 스테아리돈산 무게}}{\text{잔류 지방산 분획 내 스테아리돈산 무게} + \text{에스터 물질 중 스테아리돈산 무게}} \times 100 \end{aligned}$$

본 발명의 방법에서 1차적으로 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 내 스테아리돈산이 농축되는 (1)단계의 1차 에스터화 반응은 효소의 함량, 증류수의 함량 및 반응온도에 따라 영향을 받으므로 에스터화 반응의 최적 조건을 알아보고자 하였다.

1. 효소(칸디다루고사 리파아제)의 함량

최소한의 효소의 함량으로 최대 반응을 할 수 있는 적정 조건을 찾는 것이 매우 중요하다. 본 실험에서는 효소의 함량을 에키움 오일의 지방산 100 중량부에 대하여 각각 0, 0.3, 0.6, 1, 2 및 3 중량부로 하였으며, 그 외의 반응 조건인 반응 온도는 30℃이며, 증류수의 함량은 에키움 오일 지방산 100 중량부에 대하여 0.25 중량부

로 포함하여 효소의 함량에 따른 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 내 스테아리돈산 농축 정도를 관찰하였다.

[0061]

효소의 함량이 0.1 부터 2 중량부까지 증가함에 따라 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 내 스테아리돈산의 농축 정도가 확연히 증가함을 알 수 있었고, 2 중량부 이상일 경우 보다 우수한 효과는 나타나지 않았다. 2 중량부의 효소의 함량에서 88.5%의 상대적으로 높은 수율 하에 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 내 스테아리돈산이 40%로 최대 농축을 보였고, 이는 초기 반응시간 2시간 만에 일어난 결과이다. 또한, 1 중량부로 효소를 포함한 조건에서도 최대 농축 정도를 나타냈으나, 이는 효소를 2 중량부로 포함했을 때 보다 4배 더 긴 8시간의 반응 시간에서 일어난 것이었다. 따라서, 반응 정도와 시간을 고려하였을 때 효소의 함량을 2 중량부로 포함하는 것이 가장 적정한 조건인 것을 알 수 있었다(도 1 및 도 2).

[0062]

2. 증류수의 함량

[0063]

증류수의 함량은 에키움 오일의 지방산 100 중량부에 대하여 각각 0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 및 1 중량부로 하였으며, 그 외의 반응 조건인 반응 온도는 30℃이며, 효소(칸디다루고사 리파아제)의 함량은 에키움 오일 지방산 100 중량부에 대하여 0.3 중량부로 포함하여 증류수 함량에 따른 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 내 스테아리돈산 농축 정도를 관찰하였다.

[0064]

증류수를 포함하지 않았을 때, 스테아리돈산의 회수율은 95%로 다른 조건에서보다 높았지만, 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 내 스테아리돈산의 농축은 거의 이루어지지 않았다. 증류수 0 내지 0.25 중량부를 포함하는 반응 조건에서, 초기 반응시간 6시간 동안에는 증류수의 함량이 많을수록 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 내 스테아리돈산의 농축이 잘 이루어지는 것을 확인할 수 있었으나, 증류수의 함량이 0.25 중량부 이상인 조건에서는 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 내 스테아리돈산의 농축이 더 이상 효과적으로 일어나지 않는 것을 확인할 수 있었다. 스테아리돈산의 회수율은 초기 반응시간 8시간에서 0.1 내지 0.25 중량부까지 모두 유의적인 차이는 나타나지 않았지만, 반응시간 8시간 이후에는 증류수를 0.25 중량부로 포함한 조건에서는 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 내 스테아리돈산 농축 정도가 증류수를 0.1 중량부를 포함한 조건에서의 농축 정도보다 높았다. 따라서, 상대적으로 높은 회수율 및 높은 스테아리돈산 농축 정도를 나타내는 0.25 중량부가 증류수 함량의 최적 조건이라고 볼 수 있다(도 3 및 도 4).

[0065]

3. 반응 온도

[0066]

반응 온도는 20, 30, 40 및 50℃로 하였으며, 효소(칸디다루고사 리파아제)의 함량은 에키움 오일의 지방산 100 중량부에 대하여 0.3 중량부로 포함하였으며, 증류수의 함량은 에키움 오일의 지방산 100 중량부에 대하여 0.25 중량부로 포함하여 반응 온도에 따른 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 내 스테아리돈산 농축 정도를 관찰하였다.

[0067]

초기반응 시간 2시간에서는 온도가 20 에서 30℃로 증가하였을 때 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 내 스테아리돈산의 농축 정도도 증가하였다. 하지만 30℃를 초과하는 온도에서는 스테아리돈산의 농축 정도를 감소시키는 경향을 보였다. 30℃의 온도에서 12시간 반응 후에, 87.4%의 회수율을 갖는 동시에 37.9%의 최대 농축 정도를 보였다. 이는 라우릴 알코올의 용해점과 관련된 것으로, 24℃의 상대적으로 높은 용해점을 갖는 라우릴 알코올은 반응 온도가 20℃ 이하로 내려가게 되면 반응에 잘 참여할 수 없게 된다. 따라서, 30℃의 반응 온도가 본 발명의 (1)단계의 최적의 온도 조건이라고 할 수 있다(도 5 및 도 6).

[0068]

본 발명의 방법에서 2차적으로 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 내 스테아리돈산이 농축되는 (3)단계의 2차 에스터화 반응은 증류수의 함량 및 반응온도에 따라 영향을 받으므로 에스터화 반응의 최적 조건을 알아보하고자 하였다.

[0069]

4. 증류수의 함량

[0070]

증류수의 함량은 본 발명의 실험 방법에서 (2)단계에서 얻어진 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 100 중량부에 대하여 각각 0, 0.2, 0.6, 1 및 3 중량부로 하였으며, 그 외의 반응 조건인 반응 온도는 30℃이며, 효소(리포자임 RM IM)의 함량은 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 100 중량부에 대하여 2 중량부로 포함하여 증류수 함량에

다른 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 내 스테아리돈산 농축 정도를 관찰하였다.

[0071] 리포자임 RM IM을 사용한 효소 반응에서는 증류수 함량이 증가하여도 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 내 스테아리돈산의 농축 정도는 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

[0072] 증류수를 포함하지 않은 반응 조건에서 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 내 스테아리돈산의 농축 정도가 54.1%로 가장 높게 나타났다. 본 단계에서는 반응이 진행됨에 따라 반응 생성물로 수분이 만들어지게 되고 상기 수분이 반응 시스템 내에 축적되어 효소의 구조나 그의 특이성에 영향을 미칠 수 있다.

[0073] 또한, 반응이 진행됨에 따라 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 내 스테아리돈산의 농축이 평형에 이르렀다고 판단되는 시기 이후에 스테아리돈산의 농축 정도가 다소 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 반응 생성물인 수분이, 에스터화 반응의 부반응인 가수분해를 일으킨 것으로 예상된다. 따라서, 이러한 부반응이 일어나는 것을 최소화하고 효소의 활성과 선택성을 효율적으로 하기 위해서는 증류수를 포함하지 않는 것이 최적 조건이라는 것을 알 수 있었다(도 7 및 도 8).

[0074] 5. 반응 온도

[0075] 반응 온도는 10, 20, 30 및 40℃로 하였으며, 증류수는 포함하지 않고, 효소의 함량은 본 발명의 실험 방법에서 (2)단계에서 얻어진 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 100 중량부에 대하여 2 중량부로 포함하여 반응 온도에 따른 스테아리돈산 농축 정도를 관찰하였다.

[0076] 20 내지 40℃의 온도에서, 초기 8 시간 반응까지는 에키움 오일의 잔류지방산 분획 내 스테아리돈산의 농축 정도가 최대치에 도달했으며, 그 이후에는 약간 감소하였다. 10℃의 온도에서는 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 내 스테아리돈산의 농축 속도가 모든 온도 조건 중 가장 느린 것으로 나타났다. 상기 반응 온도 조건 측정 결과, 30℃의 온도 및 8시간의 반응 시간에서 54.1%로 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 내 스테아리돈산의 최대 농축 정도를 얻을 수 있었다. 상기 결과에 따라 리포자임 RM IM을 사용한 반응에서 온도는 30℃가 최적 조건인 것을 알 수 있었다(도 9 및 도 10).

[0077] 실험예 2. 에키움 오일 지방산 조성

[0078] 상기 (1)단계의 최적 조건(칸디다루고사 리파아제 2 중량부, 증류수 0.25 중량부 및 반응온도 30℃) 및 상기 (3)단계의 최적 조건(증류수 0 중량부, 반응온도 30℃)으로 실험을 실시하여 에키움 오일의 지방산의 조성 변화를 알아보았으며, 상기 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0079] 에키움 오일의 지방산 종류	에키움 오일의 지방산 조성	(2)단계 후 지방산 조성	(3)단계 후 지방산 조성
C16:0	6.9±0.3	6.1±0.4	0.4±0.0
C18:0	3.3±0.0	6.5±0.3	0.6±0.0
C18:1(Δ9)	15.3±0.4	5.4±0.0	0.5±0.0
C18:1(Δ7)	0.3±0.2	0.3±0.5	0.0±0.0
C18:2(Δ9,12)	15.0±0.1	3.6±0.1	0.4±0.0
C18:3(Δ6,9,12)	11.2±0.2	30.9±0.1	43.1±1.0
C18:3(Δ9,12,15)	33.6±0.1	7.8±0.1	0.8±0.1
C18:4(Δ6,9,12,15)	14.3±0.3	39.3±0.9	54.1±1.0

[0080] (1)단계에서 사용한 효소인 칸디다루고사 리파아제는 9번째 탄소 위치에서 이중결합을 시작하는 올레산, 리놀렌산 및 알파 리놀렌산(Δ9) 등에 있어서 강한 선택성을 갖는 반면, 6번째 탄소 위치에서 이중결합을 시작하는 감마 리놀렌산(C18:3(Δ6,9,12))이나 스테아리돈산(C18:4(Δ6,9,12, 15))에 있어서는 약한 반응성을 보인다. 따라서, 초기 시료의 함량이 각 11.2%와 14.3%이었던 감마 리놀렌산 및 스테아리돈산은 칸디다루고사 리파아제를 이용한 (1)단계 반응에서 각 30.9% 및 39.3%로 증가하였다. 이는 상기 두 지방산이 다른 지방산들에 비해 반응이 되지 않고 잔류 지방산 쪽에 남아있었기 때문이다.

[0081] 반면, 포화 지방산들의 경우는 (1)단계 반응 시 강하게 반응하지 않아 잔류 지방산에 다소 남아 있는 것을 확인

할 수가 있었다. 따라서, 스테아리돈산의 농도를 더욱 증가시키기 위해서는 남은 포화지방산이나 완벽히 제거되지 않은 불포화 지방산의 함량 감소가 필요하였다.

그에 따라, 상기 (3)단계에서는 포화 지방산에서도 큰 선택성을 보이는 리포자임 RM IM을 효소로 사용하여 에스터화 반응을 시켜, 에키움 오일의 잔류 지방산 분획에서 스테아리돈산을 한번 더 농축시켰다. 상기 리포자임 RM IM은 칸디다루고사 리파아제와 비슷하게 감마 리놀렌산 및 스테아리돈산에 있어서 약한 반응성을 보이기 때문에, (3)단계 반응이 끝난 후 에키움 오일의 잔류 지방산 분획에 남게 되는 지방산의 종류는 대부분이 감마 리놀렌산 및 스테아리돈산임을 확인하였다(도 11).

본 발명에서 사용한 효소는 칸디다루고사 리파아제 및 리포자임 RM IM이며, 상기 두 가지 효소를 통해 스테아리돈산의 농축뿐 아니라 부가적으로 감마 리놀렌산의 농축도 할 수 있었다. 본 발명의 농축 방법 후, 최종적으로 스테아리돈산의 농도는 초기 시료 내 14.3%에서 최고 54.1%까지 증가하였고, 스테아리돈산과 감마 리놀렌산의 합은 25.5%에서 97.2%까지 증가하였다.

실험예 3. 분획용 액체 크로마토그래피를 이용한 스테라리돈산 분획

Athena C18 semi-prep 컬럼(250x10.0 mm i.d.; ANPEL Scientific instrument Co., Ltd, 상해, 중국), 100 μ L 샘플 루프가 장착된 Rheodyne injector 및 photodiode array detector (MD-2018; JASCO, Tokyo, Japan)로 이루어져 있는 분획용 액체 크로마토그래피를 사용하였다.

이동상으로는 아세트나이트릴:메탄올:헥산을 부피비 900:80:15로 혼합한 혼합 용액에 0.2%의 아세트산(acetic acid)을 첨가한 혼합 용액을 사용하였고, 분당 5.0mL 씩 흘려주었다.

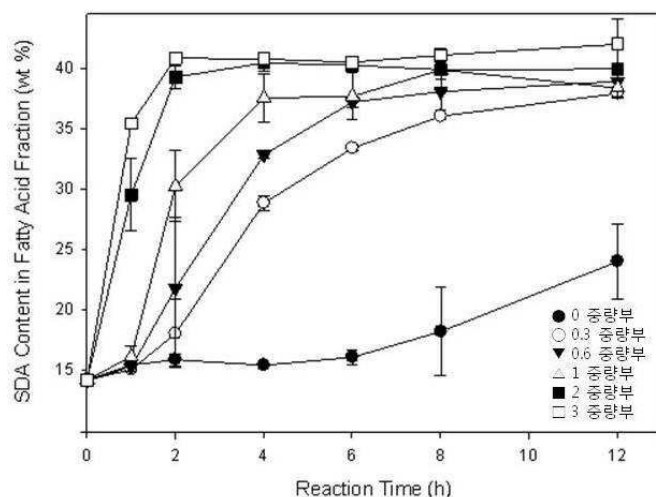
상기 (1)단계의 최적 조건(칸디다루고사 리파아제 2 중량부, 증류수 0.25 중량부 및 반응온도 30℃) 및 상기 (3)단계의 최적 조건(증류수 0 중량부, 반응온도 30℃)으로 스테아리돈산이 농축된 에키움 오일의 잔류 지방산 분획 200mg을 상기 혼합 용액 1mL에 녹인 후, 그 중 50 μ L를 주입하였다. 총 분석 시간은 15분이었고, 208nm에서 관찰하였다.

머무름 시간 4.5분 및 5.5분에서 두 개의 피크(peak)가 확인되었으며, 상기 각각의 피크를 가스 크로마토그래피로 분석한 결과 각각 스테아리돈산(SDA) 및 감마 리놀렌산(GLA)으로 관찰되었다(도 12).

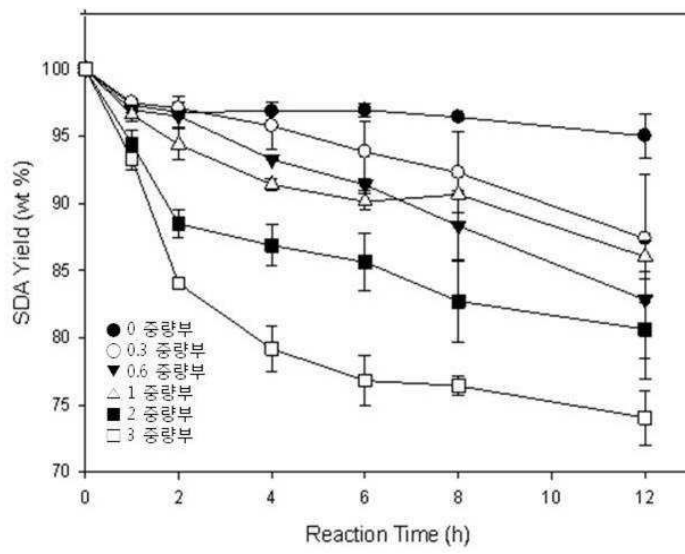
분석 후, 상기 각각의 피크를 분획한 결과, 99% 이상의 순도를 갖는 스테아리돈산(도 13)과 97% 이상의 순도를 갖는 감마 리놀렌산(도 14)을 얻을 수 있었다.

도면

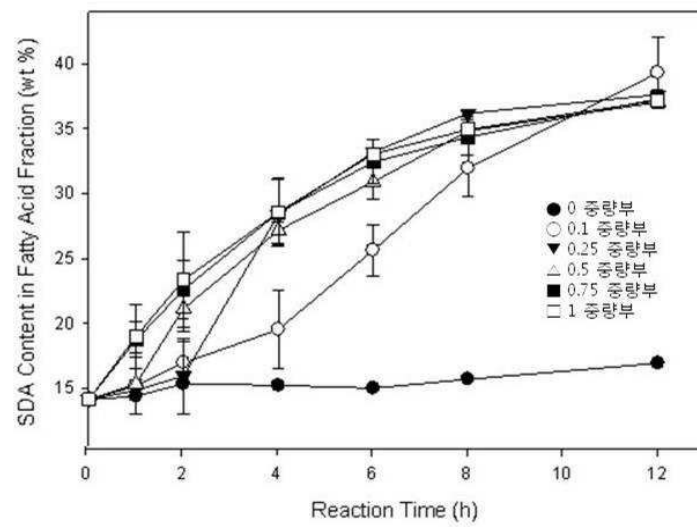
도면1



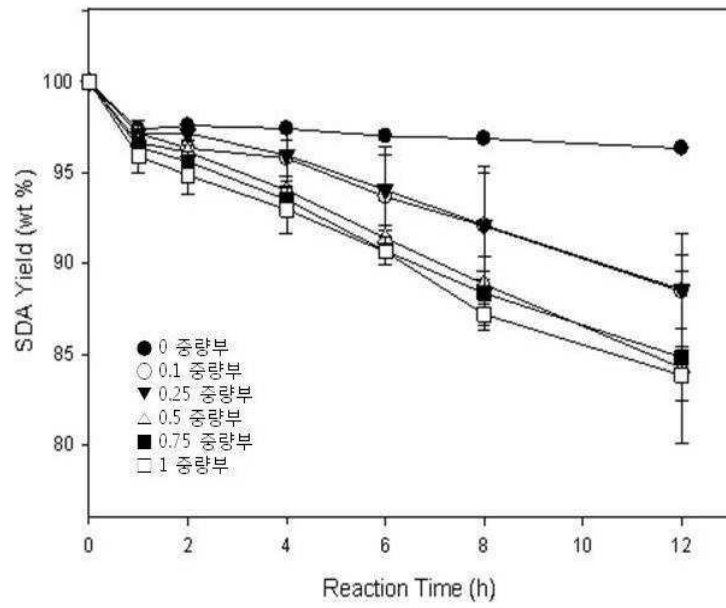
도면2



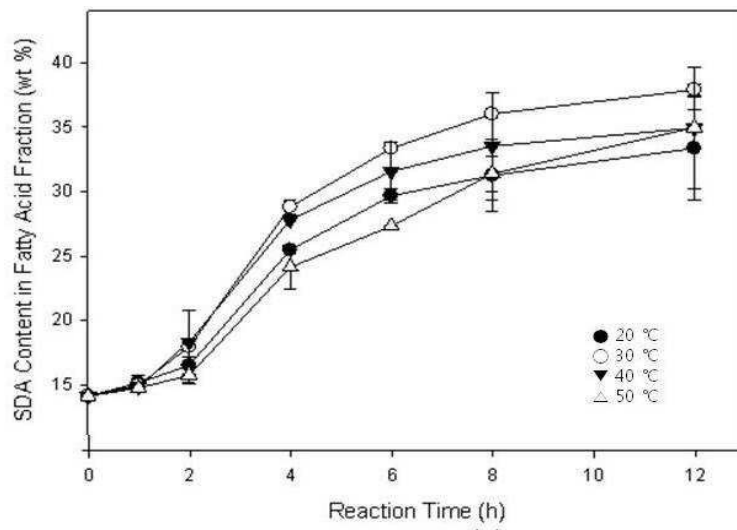
도면3



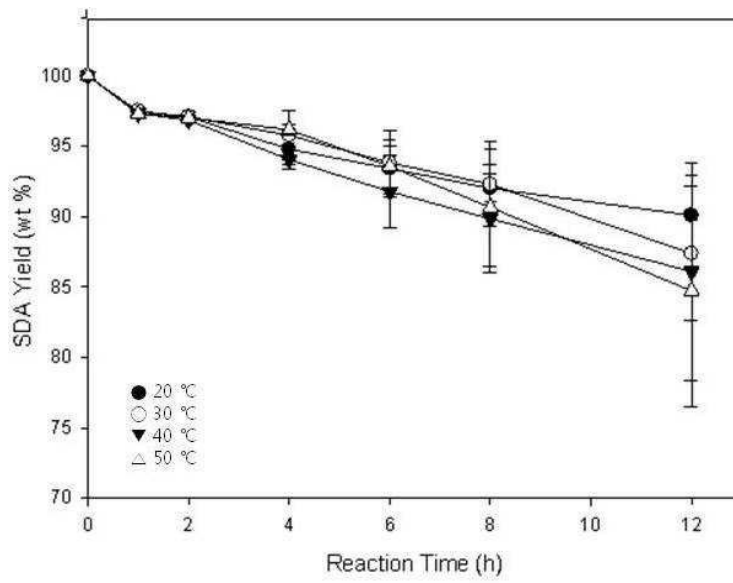
도면4



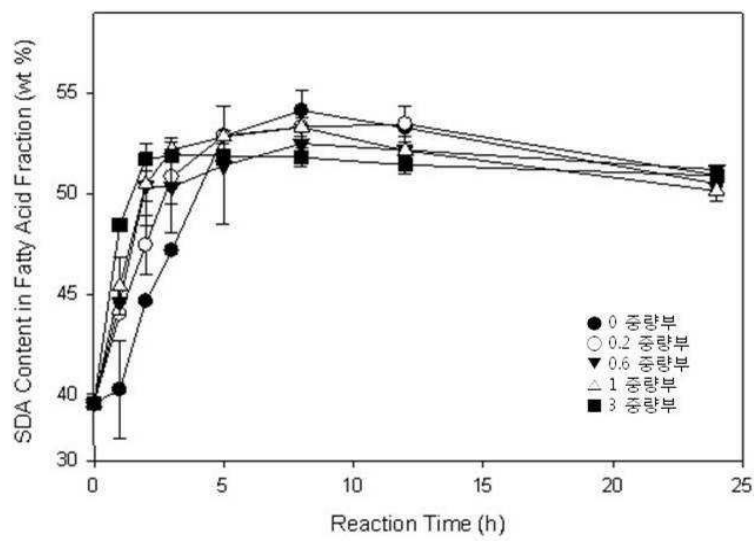
도면5



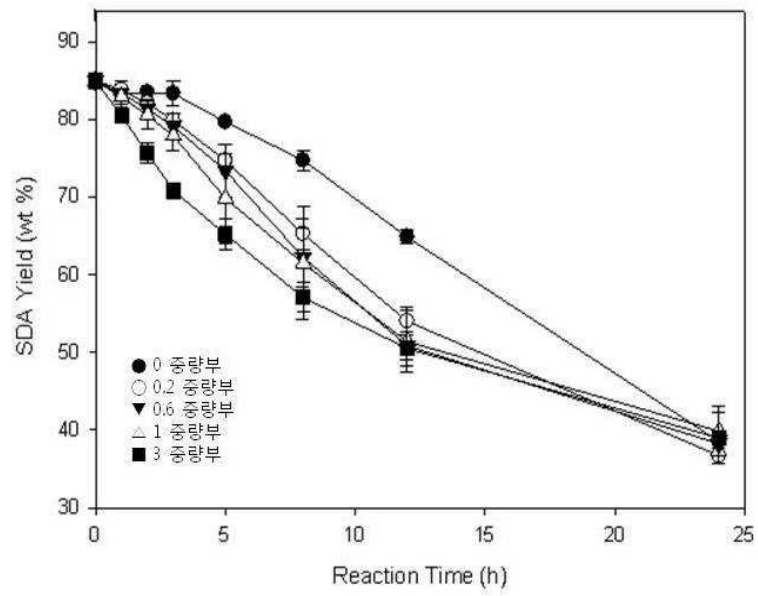
도면6



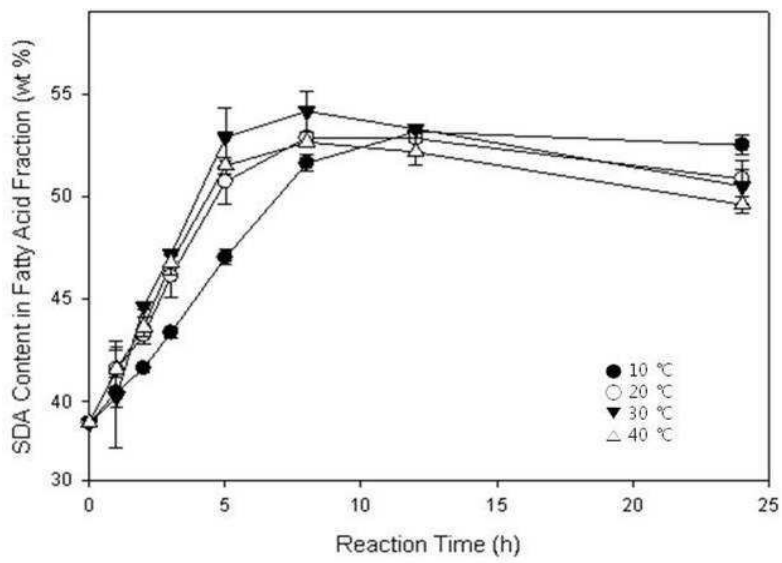
도면7



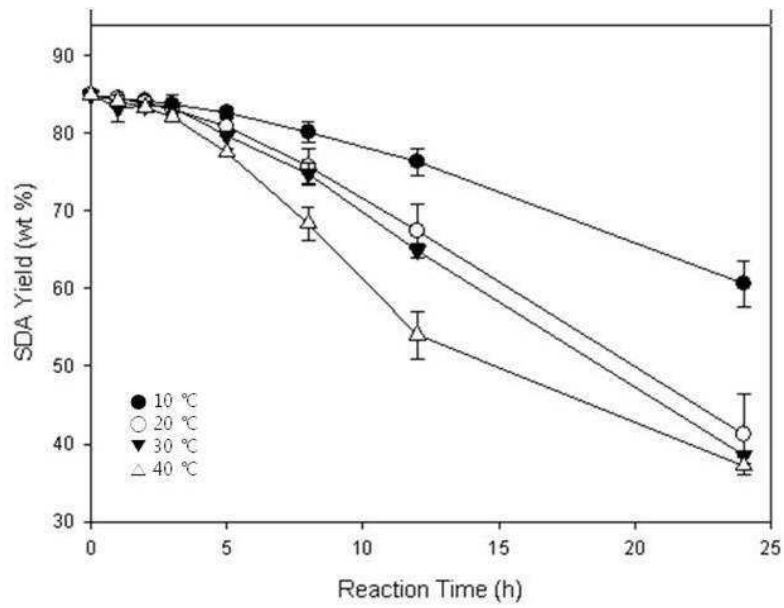
도면8



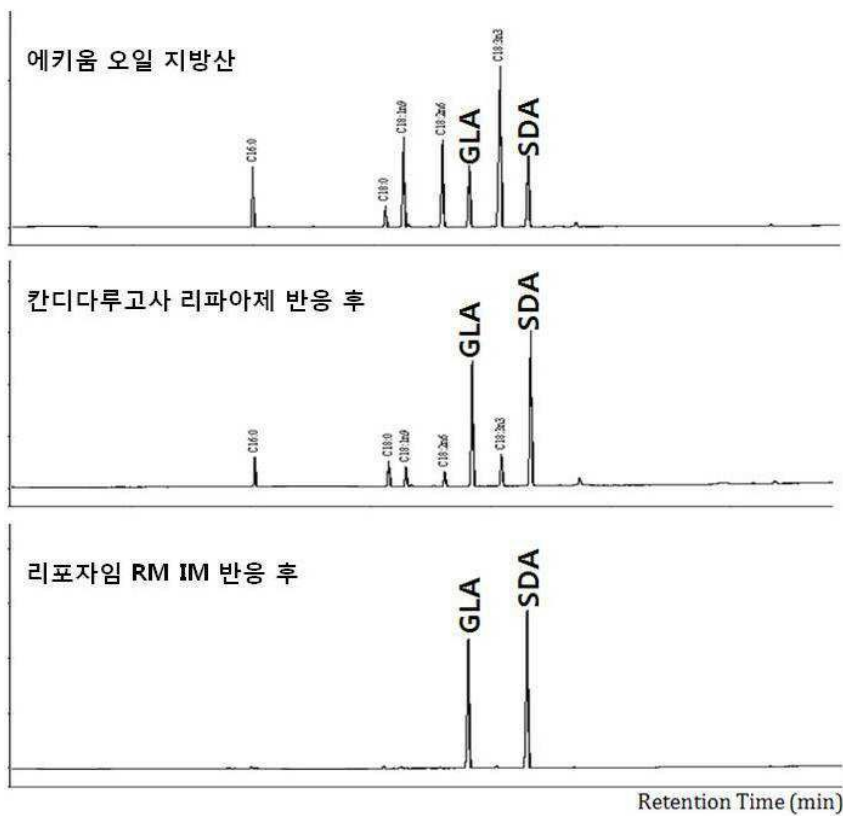
도면9



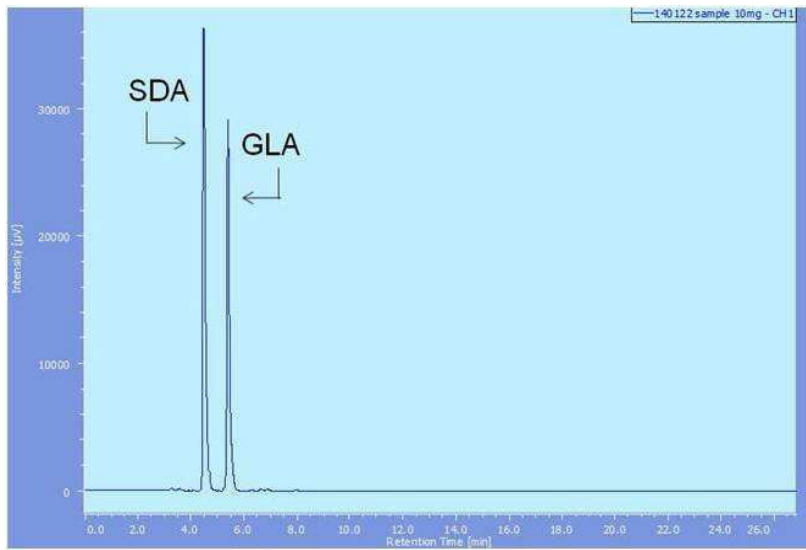
도면10



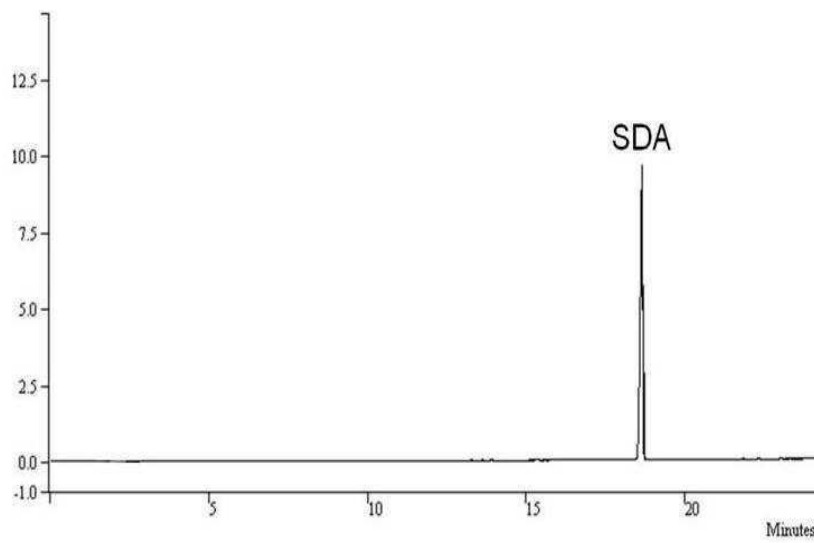
도면11



도면12



도면13



도면14

