



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0161024
(43) 공개일자 2024년11월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 7/6445 (2022.01) A23D 9/00 (2006.01)
C12N 9/18 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 7/6445 (2022.01)
A23D 9/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-0051092
(22) 출원일자 2024년04월17일
심사청구일자 2024년04월17일
(30) 우선권주장
1020230057770 2023년05월03일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
김인환
서울특별시 송파구 올림픽로 135 (잠실동,
리센즈)
박미순
서울특별시 중랑구 중랑역로 164-3 (묵동)
(74) 대리인
특허법인(유)남아이피그룹

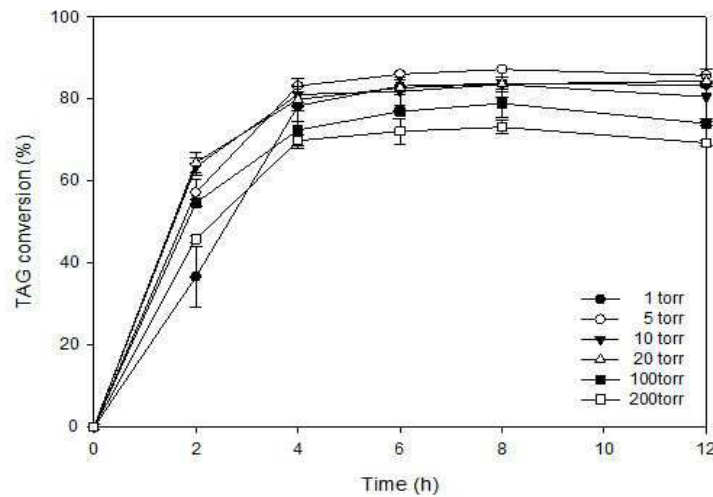
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 세단계 공정으로부터 고순도 오메가-3 지방산을 함유한 트리글리세라이드의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 세단계 공정으로부터 고순도 오메가-3 지방산을 함유한 트리글리세라이드의 제조방법에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명은, (1) 용매 결정화를 통해 지방산 함유 소재로부터 오메가-3 지방산을 1차로 농축하는 단계; (2) 상기 (1)단계에서 농축된 오메가-3 지방산에 효소 촉매의 에탄올 분해를 통해 오메가-3 지방산을 2차로 농축하는 단계; 및 (3) 상기 (2)단계의 2차로 농축된 오메가-3 지방산을 기질로 하여 Lipozyme 435 효소 촉매 에스테르화 반응을 수행하여 오메가-3 지방산을 트리글리세라이드로 전환시키는 단계를 포함하는, 3단계를 통한 고순도 오메가-3 지방산 함유 트리글리세라이드의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 방법을 통해 인체 유용한 고순도의 오메가-3 지방산 함유 트리글리세라이드를 고농축된 형태로 효율적으로 제조할 수 있으며, 이를 다양한 건강증진용 기능성 식품 및 의약품의 제조에 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도10



(52) CPC특허분류
C12N 9/18 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711180999
과제번호	2021R1A2C1003128
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	두 단계 효소반응으로부터 고농도 ω-3 지방산 유지 합성
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

- (1) 용매 결정화를 통해 지방산 함유 소재로부터 오메가-3 지방산을 1차로 농축하는 단계;
- (2) 상기 (1)단계에서 농축된 오메가-3 지방산에 효소 촉매의 에탄올 분해를 통해 오메가-3 지방산을 2차로 농축하는 단계; 및
- (3) 상기 (2)단계의 2차로 농축된 오메가-3 지방산을 기질로 하여 Lipozyme 435 효소 촉매 에스테르화 반응을 수행하여 오메가-3 지방산을 트리글리세라이드로 전환시키는 단계를 포함하는,
- 3단계를 통한 고순도 오메가-3 지방산 함유 트리글리세라이드의 제조방법.

청구항 2

- 제1항에 있어서,
- 상기 지방산 함유 소재는 동물성 오일(animal oil), 식물성 오일(vegetable oil), 미생물성 오일(microbial oil) 또는 조류성 오일(algae oil)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

- 제2항에 있어서,
- 상기 동물성 오일은 어유(fish oil)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

- 제3항에 있어서,
- 상기 어유는 참치유인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

- 제1항에 있어서,
- 상기 용매 결정화는 용매로서 아세토니트릴(acetonitrile)을 사용하고, -30°C 내지 -40°C 온도에서 유리지방산 대 용매를 1:8 내지 1:12의 중량비로 하여 2~4시간 동안 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

- 제1항에 있어서,
- 상기 (1)단계에서 용매 결정화를 수행한 후, 여과지가 부착된 깔대기와 감압펌프를 이용하여 진공하에서 1차로 농축된 오메가-3 지방산을 함유한 액체 분획을 수득하는 과정을 더 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

- 제1항에 있어서,
- 상기 (2) 단계의 효소 촉매의 에탄올 분해는, 상기 (1)단계에서 농축된 오메가-3 지방산 및 에탄올을 1:1~1:2의 몰비로 혼합하고, 20°C ~ 30°C 온도에서 2~6시간 동안 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

- 제1항에 있어서,
- 상기 (2) 단계의 효소는 Lipozyme RM IM(Rhizomucor miehei) 효소이며, (1)단계에서 농축된 오메가-3 지방산의 중량 대비 4~6중량%로 첨가하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

(3) 단계는 상기 (2)단계에서 2차로 농축된 오메가-3 지방산에 글리세롤을 첨가한 혼합물을 기질로 사용하고, Lipozyme 435 효소를 첨가한 후, 60℃~70℃ 온도에서 5~20torr의 진공 하에서 4시간~8시간 동안 에스테르화 반응을 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 기질은 글리세롤 및 2차로 농축된 오메가-3 지방산이 1:2~1:3의 몰비로 혼합되어 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 효소는 기질의 총 중량 대비 10~20중량%로 첨가하는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 세단계 공정으로부터 고순도 오메가-3 지방산을 함유한 트리글리세라이드의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 오메가-3 지방산은 심혈관계 질환, 암 및 뇌졸중을 예방하고, 눈의 건조함을 개선시켜 눈 건강에 도움을 주며 면역력을 증진시키는 활성이 있는 것으로 알려져 있다. 이처럼 오메가-3 지방산에 대한 유용한 생리활성이 밝혀지면서 오메가-3 지방산을 이용한 건강기능식품 및 의약품 등의 다양한 제품 개발이 진행되고 있고 따라서 오메가-3 지방산을 대량 생산할 수 있는 기술의 개발이 요구되고 있다.

[0003] 또한, 지질은 자연계와 인체 내에서 주로 트리글리세라이드 형태로 존재한다. 그래서 트리글리세라이드 형태가 에스테르 형태 보다 우수한 체내 흡수성을 가지고 있고 지방산 형태보다 더 높은 산화안정성을 갖고 있다. 이러한 이유 때문에 트리글리세라이드 형태의 재합성을 진행하는 연구들이 활발히 이루어지고 있으며, 동시에 트리글리세라이드를 대량 생산할 수 있는 기술에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

[0004] 한편, 오메가-3 지방산을 농축하기 위한 방법으로서, 해양유로부터 오메가-3 지방산의 농축을 탄소 사슬의 길이에 따른 분류방법(예컨대, 분자/단형 증류 또는 초임계 유체 추출)과 불포화에 따른 분류(예컨대, 효소적 분리 또는 요소 분획화)를 조합방법으로 수행하고 있으나, 대부분 최초 오일의 양과 비교할 때, 오메가-3 지방산의 농축 효율이 낮다는 문제점이 있으며, 특히 요소 분획화 및 단형 증류방법은 수득율이 저조하다는 문제점이 있다. 또 다른 방법으로는 은 염(silver salt)을 사용하여 혼합물로부터 다중불포화 지방산을 분리하는 연구들이 수행되고 있으나, 이러한 방법 역시 오메가-3 지방산의 농축 효과가 미비하다는 문제점이 있다.

[0005] 그러므로 오메가-3 지방산을 함유한 원료들로부터 기능성 오메가-3 불포화지방산을 고농축시킬 수 있고, 고순도 오메가-3 지방산을 함유한 트리글리세라이드를 대량 생산할 수 있는 효과적인 새로운 기술의 개발이 필요하다.

[0006] 이에 본 발명자들은 비효소적 방법과 효소적 방법을 조합한 세 단계 공정을 이용하여 고순도 오메가-3 지방산을 제조할 수 있는 최적의 제조공정을 확립함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 10-2013-0063732

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이에 본 발명자들은 비효소적 방법과 효소적 방법을 조합한 세 단계 공정을 이용하여 고순도 오메가-3 지방산을 제조할 수 있는 최적의 제조공정을 확립함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0009] 따라서 본 발명의 목적은 (1) 용매 결정화를 통해 지방산 함유 소재로부터 오메가-3 지방산을 1차로 농축하는 단계; (2) 상기 (1)단계에서 농축된 오메가-3 지방산에 효소 촉매의 에탄올 분해를 통해 오메가-3 지방산을 2차로 농축하는 단계; 및 (3) 상기 (2)단계의 2차로 농축된 오메가-3 지방산을 기질로 하여 Lipozyme 435 효소 촉매 에스테르화 반응을 수행하여 오메가-3 지방산을 트리글리세라이드로 전환시키는 단계를 포함하는, 3단계를 통한 고순도 오메가-3 지방산 함유 트리글리세라이드의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 그러므로 본 발명은, (1) 용매 결정화를 통해 지방산 함유 소재로부터 오메가-3 지방산을 1차로 농축하는 단계; (2) 상기 (1)단계에서 농축된 오메가-3 지방산에 효소 촉매의 에탄올 분해를 통해 오메가-3 지방산을 2차로 농축하는 단계; 및 (3) 상기 (2)단계의 2차로 농축된 오메가-3 지방산을 기질로 하여 Lipozyme 435 효소 촉매 에스테르화 반응을 수행하여 오메가-3 지방산을 트리글리세라이드로 전환시키는 단계를 포함하는, 3단계를 통한 고순도 오메가-3 지방산 함유 트리글리세라이드의 제조방법을 제공한다.

[0011] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 지방산 함유 소재는 동물성 오일(animal oil), 식물성 오일(vegetable oil), 미생물성 오일(microbial oil) 또는 조류성 오일(algae oil)일 수 있다.

[0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 동물성 오일은 어유(fish oil)일 수 있다.

[0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 어유는 참치유일 수 있다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 용매 결정화는 용매로서 아세토니트릴(acetonitrile)을 사용하고, -30℃ 내지 -40℃ 온도에서 유리지방산 대 용매를 1:8 내지 1:12의 중량비로 하여 2~4시간 동안 수행하는 것일 수 있다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 (1)단계에서 용매 결정화를 수행한 후, 여과지가 부착된 깔대기와 감압펌프를 이용하여 진공하에서 1차로 농축된 오메가-3 지방산을 함유한 액체 분획을 수득하는 과정을 더 수행하는 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 (2) 단계의 효소 촉매의 에탄올 분해는, 상기 (1)단계에서 농축된 오메가-3 지방산 및 에탄올을 1:1~1:2의 몰비로 혼합하고, 20℃~30℃ 온도에서 2~6시간 동안 수행하는 것일 수 있다.

[0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 (2) 단계의 효소는 Lipozyme RM IM(Rhizomucor miehei) 효소이며, (1)단계에서 농축된 오메가-3 지방산의 중량 대비 4~6중량%로 첨가하는 것일 수 있다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, (3) 단계는 상기 (2)단계에서 2차로 농축된 오메가-3 지방산에 글리세롤을 첨가한 혼합물을 기질로 사용하고, Lipozyme 435 효소를 첨가한 후, 60℃~70℃ 온도에서 5~20torr의 진공 하에서 4시간~8시간 동안 에스테르화 반응을 수행하는 것일 수 있다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 기질은 글리세롤 및 2차로 농축된 오메가-3 지방산이 1:2~1:3의 몰비로 혼합되어 있는 것일 수 있다.

[0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 효소는 기질의 총 중량 대비 10~20중량%로 첨가하는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0021] 본 발명에 따른 방법은 고순도 오메가 3을 매우 높은 효율로 농축 및 제조할 수 있는 효과가 있으므로, 본 발명의 방법은 오메가 3을 포함하는 다양한 건강기능식품 및 의약품의 제조에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 결정화를 한 후 얻은 액체 분획 내 여러 용매에 따른 오메가-3 지방산의 함량 및 회수율 분석 결과로서, 이 실험은 온도 -20℃, 지방산 대 용매 비율 1:10, 결정화 시간 2h의 조건에서 수행하였다.

도 2는 여러 온도에서 acetonitrile을 용매로 하여 결정화한 후 얻은 액체 분획 내 오메가-3 지방산의 함량 및 회수율 분석 결과로서, acetonitrile을 용매로 하여 지방산 대 용매의 비율은 1:10, 시간은 2h의 조건에서 수행되었다.

도 3은 여러 지방산 대 용매의 비율로 결정화 후 얻은 액체 분획의 오메가-3 지방산 함량 및 회수율 분석 결과로서, 온도 -40℃, 결정화 시간 2h의 조건에서 수행되었다.

도 4는 Lipozyme RM IM 촉매 에탄올 분해 후 반응 시간에 따른 지방산 분획 내 오메가-3 지방산의 함량에 대한 온도의 영향을 분석한 결과로서, 반응은 5%의 효소와 1:2 (mol/mol)의 지방산 대 에탄올 비율의 조건에서 수행되었다.

도 5는 Lipozyme RM IM 촉매 에탄올 분해 후 반응 시간에 따른 지방산 분획 내 오메가-3 지방산의 회수율에 대한 온도의 영향에 관한 결과로서, 반응은 5%의 효소와 1:2 (mol/mol)의 지방산 대 에탄올 비율의 조건에서 수행되었다.

도 6은 Lipozyme RM IM 촉매 에탄올 분해 후 반응 시간에 따른 지방산 분획 내 오메가-3 지방산의 함량에 대한 지방산 대 에탄올 몰 비의 영향을 분석한 결과로서, 반응은 20℃의 온도, 5%의 효소의 조건에서 수행되었다.

도 7은 Lipozyme RM IM 촉매 에탄올 분해 후 반응 시간에 따른 지방산 분획 내 오메가-3 지방산의 회수율에 대한 지방산 대 에탄올 몰 비의 영향을 분석한 결과로서, 반응은 20℃의 온도, 5%의 효소의 조건에서 수행되었다.

도 8은 온도 별 반응 시간에 따른 Lipozyme 435 촉매 에스테르화 후 트리글리세라이드로의 전환율을 분석한 결과로서, 반응은 5%의 효소, 5torr의 진공 조건에서 수행되었다.

도 9는 효소량 별 반응 시간에 따른 Lipozyme 435 촉매 에스테르화 후 트리글리세라이드로의 전환율을 분석한 결과로서, 반응은 60℃, 5torr의 진공 조건에서 수행되었다.

도 10은 진공 별 반응 시간에 따른 Lipozyme 435 촉매 에스테르화 후 트리글리세라이드로의 전환율. 반응은 60℃, 효소량 5%의 조건에서 수행되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 본 발명은 세단계 공정으로부터 고순도 오메가-3 지방산을 함유한 트리글리세라이드의 제조방법을 제공함에 특징이 있다.
- [0024] 본 발명에서 제공하는 고순도 오메가-3 지방산을 함유한 트리글리세라이드의 제조방법은, (1) 용매 결정화를 통해 지방산 함유 소재로부터 오메가-3 지방산을 1차로 농축하는 단계; (2) 상기 (1)단계에서 농축된 오메가-3 지방산에 효소 촉매의 에탄올 분해를 통해 오메가-3 지방산을 2차로 농축하는 단계; 및 (3) 상기 (2)단계의 2차로 농축된 오메가-3 지방산을 기질로 하여 Lipozyme 435 효소 촉매 에스테르화 반응을 수행하여 오메가-3 지방산을 트리글리세라이드로 전환시키는 단계를 포함한다.
- [0025] 본 발명에 따른 세단계 공정으로부터 고순도 오메가-3 지방산을 함유한 트리글리세라이드의 제조방법은 비효소적 방법인 용매 결정화 방법과 효소적 방법을 조합하여 최적의 고순도 오메가-3 지방산을 함유한 트리글리세라이드의 제조 조건을 확립한 점에 특징이 있다.
- [0026] 본 발명에 따른 상기 방법에 대한 보다 구체적인 내용은 다음과 같다.
- [0027] 먼저, (1) 용매 결정화를 통해 지방산 함유 소재로부터 오메가-3 지방산을 1차로 농축하는 단계를 수행한다.
- [0028] 본 발명에서는 제1단계로서 용매 결정화를 통해 지방산 함유 소재로부터 오메가-3 지방산을 1차로 농축하였다.
- [0029] 용매 결정화 방법은 비효소적 방법으로서 오메가-3 지방산과 같은 불포화지방산과 포화지방산의 융점이 다른 차이가 있음을 이용한 것이며, 또한 특정 용매에 대한 용해도가 다를 수 있음을 고려하여 이 방법을 특별히 선택하여 사용하였다.
- [0030] 또한, 용매 결정화 방법은 오메가-3 지방산을 농축하기에 간단하고 경제성이 있으며 대량 공정에 용이할 수 있으며, 농축 과정 중 열로 인해 발생하는 지방 산화를 방지할 수 있다.
- [0031] 한편, 용매 결정화 방법은 용매의 종류, 온도, 유리지방산 대 용매의 비율 등 여러 요인이 영향을 줄 수 있으므로, 본 발명에서는 용매 결정화 방법에 작용하는 주요 요인을 분석하고 참치유로부터 오메가-3 지방산을 고농축

할 수 있는 최적의 조건을 실험을 통해 확립하였다.

- [0032] 본 발명에서 상기 지방산 함유 소재는 지방산을 함유하는 소재라면 모두 사용 가능하며, 이에 제한되지는 않으나, 동물성 오일(animal oil), 식물성 오일(vegetable oil), 미생물성 오일(microbial oil) 또는 조류성 오일(algae oil)일 수 있고, 바람직하게는 동물성 오일인 어유일 수 있으며, 더 바람직하게는 참치유일 수 있다.
- [0033] 본 발명의 일실시예에서는 지방산 함유 소재로 참치유를 이용하여 용매 결정화 이전에 참치유를 검화시켜 지방산을 수득하였다.
- [0034] 상기 검화(saponified)는 비누화 반응을 의미하며, 본 발명의 일실시예에서는 참치유에 수산화나트륨 수용액 및 에탄올을 첨가 후, 환류 장치에서 가열 교반하여 검화된 반응물을 수득하였고, 이후 증류수와 n-hexane을 이용하여 검화된 물질이 함유된 층을 분리한 다음, 염산을 첨가하여 검화물로부터 유리 지방산을 수득하였다.
- [0035] 이후 검화된 지방산을 용매 결정화시켜 오메가-3 지방산을 1차로 농축시킨다.
- [0036] 이때 상기 용매 결정화는 용매로서 아세토니트릴(acetonitrile)을 사용하고, -30℃ 내지 -40℃ 온도에서 유리지방산 대 용매를 1:8 내지 1:12의 중량비로 하여 2~4시간 동안 수행할 수 있다.
- [0037] 본 발명자들은 용매 결정화를 통한 오메가-3 지방산 농축의 최적 조건을 규명하기 위해 다양한 용매로서, n-hexane, acetone, acetonitrile, petroleum ether, ethyl alcohol의 서로 다른 종류의 용매를 이용하여 용매 결정화를 수행하였는데, 이 중에서 아세토니트릴(acetonitrile)을 사용한 군이 다른 용매를 사용한 군에 비해 오메가-3 지방산의 농축 효과가 가장 우수한 것으로 나타났다.
- [0038] 또한, 최적의 반응 온도를 확인하기 위해, -10, -20, -30, -40℃의 다른 조건에서 농축 효율을 분석한 결과, -40℃ 보다 낮은 온도에서 수행할 경우에는 아세토니트릴 용매가 얼어버리기 때문에 반응이 진행되지 않는 것으로 나타났고, -30 내지 -40℃의 온도에서 수행할 경우, 오메가-3 지방산의 함량이 다른 온도 조건에 비해 더 높은 것으로 나타났으며, 특히 -40℃의 온도에서는 순수한 오메가-3 지방산이 81.7%로 가장 높은 것으로 나타났다.
- [0039] 또한, 상기 검화 과정으로 수득한 유리지방산 대 용매(아세토니트릴)를 각기 다른 혼합비율(1:4~1:12)의 조건에서 용매 결정화를 수행하였는데, 그 결과, 1:8~1:12의 중량비로 혼합한 혼합비율의 범위가 다른 범위에 비해 다중불포화지방산의 농축 및 회수율이 우수한 것으로 나타났고, 특히 1:8 혼합비율이 가장 적절한 것으로 나타났다.
- [0040] 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 고순도 오메가-3 지방산 함유 트리글리세라이드의 제조를 위한 과정에서, 제1단계인 용매 결정화 단계는 용매로서 아세토니트릴(acetonitrile)을 사용하고, -30℃ 내지 -40℃ 온도에서 유리지방산 대 용매를 1:8 내지 1:12의 중량비로 하여 2~4시간 동안 수행하는 것이 가장 적절함을 알 수 있었다.
- [0041] 또한, 추가로 상기 용매 결정화를 수행한 후, 여과지가 부착된 깔대기와 감압펌프를 이용하여 진공 하에서 1차로 농축된 오메가-3 지방산을 함유한 액체 분획을 수득한다.
- [0042] 다음으로, (2) 단계인 오메가-3 지방산을 2차로 농축하는 단계를 수행할 수 있는데, 상기 (1)단계에서 농축된 오메가-3 지방산에 효소 촉매의 에탄올 분해를 통해 오메가-3 지방산을 2차로 농축하는 과정을 수행한다.
- [0043] 제2단계인 효소 촉매의 에탄올 분해 단계는 제1단계에서 수득한 액체 분획의 오메가-3 지방산을 한번 더 농축하여 고순도의 오메가-3 다중불포화지방산을 얻는 단계로, 효소를 촉매로 사용하면 특정 지방산을 선택적으로 농축할 수 있고 효율적이고 부반응 물질의 형성을 줄일 수 있다.
- [0044] 본 발명에 따른 상기 효소 촉매의 에탄올 분해는, 상기 (1)단계의 용매 결정화로 수득한 액체 분획의 오메가-3 지방산을 기질로 사용하여, (1) 단계의 농축된 오메가-3 지방산 및 에탄올을 1:1~1:2의 물비로 혼합하고, 20℃ ~30℃ 온도에서 2~6시간 동안 반응시켜 수행할 수 있다.
- [0045] 상기 효소 촉매의 에탄올 분해를 통한 오메가-3 지방산의 2차 농축을 수행하는데 있어서, 최적의 조건을 확립하기 위해, 본 발명자들은 상기 (2) 단계를 온도 및 지방산 대 에탄올의 물비의 조건을 각기 달리하여 반응을 시킨 후, 오메가-3의 농축 효율을 분석하였다.
- [0046] 최적의 온도 조건을 규명하기 위해, 10, 20, 30 및 40℃의 각기 다른 온도 조건에서 효소 촉매 에탄올 분해 후, 2차로 농축된 오메가-3 지방산 분획 내의 오메가-3 지방산 함량을 분석한 결과, 20~30℃ 온도로 수행한 군이 다른 온도 범위에서 수행한 군에 비해 오메가-3 지방산이 높은 것으로 나타났고, 특히 20℃의 온도에서 가장 높은

오메가-3 지방산 함량이 확인되었다(93.8%). 한편, 상기 온도 범위를 벗어난 10℃의 경우, 전반적으로 오메가-3 지방산 함량이 낮은 것으로 나타났고, 40℃의 경우에는 반응 시간이 경과될수록 오메가-3 지방산 함량이 오히려 낮아지는 것으로 나타났다.

- [0047] 따라서 제2단계의 효소 촉매 에탄올 분해는 20~30℃의 온도에서 수행하는 것이 적절하고, 보다 바람직하게는 20℃의 온도에서 수행할 수 있다.
- [0048] 또한 (1)단계에서 농축된 오메가-3 지방산 대 에탄올의 최적의 몰비 조건을 확인하기 위한 실험을 수행하였다.
- [0049] 효소 촉매 에탄올 분해과정에서 에탄올을 과량 사용하게 되면 효소의 활성을 억제할 수 있어 오히려 반응이 잘 일어나지 않게 하는 문제가 있고, 반면 에탄올 양이 너무 적으면 역시 충분한 반응이 이루어지지 않는 문제점이 발생한다.
- [0050] 따라서 원활한 반응을 유도하기 위해서는 지방산 대 에탄올의 혼합비율이 중요한 요소가 될 수 있다.
- [0051] 본 발명의 일실시예에서는 이러한 최적 조건을 규명하기 위해, 지방산 대 에탄올을 1:0.7~1:4의 각기 다른 몰비로 하여 반응을 수행하였다.
- [0052] 그 결과, 지방산 대 에탄올의 몰비가 1:1~1:2인 범위에서 오메가-3 지방산 함량이 높은 것으로 나타났고, 가장 효율적인 몰비는 지방산 대 에탄올의 몰비가 1:1인 것으로 나타났다.
- [0053] 또한 본 발명의 효소 촉매의 에탄올 분해에서 사용할 수 있는 효소는 Lipozyme RM IM(Rhizomucor miehei)일 수 있고, 상기 효소는 기질 총 중량 대비 4~6중량%로 첨가하여 반응시킬 수 있다.
- [0054] 바람직하게는 상기 (1)단계에서 농축된 오메가-3 지방산의 중량 대비 5중량%로 Lipozyme RM IM 효소를 첨가하여 반응을 수행할 수 있다.
- [0055] 또한 상기 반응은 2~8시간 동안 수행할 수 있으며, 바람직하게는 2~6시간 동안 수행할 수 있고, 더 바람직하게는 4시간 일 수 있다.
- [0056] 효소 촉매의 에탄올 분해를 통한 오메가-3 지방산의 2차 농축 과정이 완료되면, 다음으로 제3단계인 Lipozyme 435 효소 촉매 에스테르화 반응을 수행한다.
- [0057] 상기 에스테르화 반응은, (2)단계의 2차로 농축된 오메가-3 지방산을 기질로 하여 Lipozyme 435 효소 촉매 에스테르화 반응을 수행하여 오메가-3 지방산을 트리글리세라이드로 전환시킨다.
- [0058] 구체적으로 상기 에스테르화 반응은 상기 (2)단계에서 2차로 농축된 오메가-3 지방산에 글리세롤을 첨가한 혼합물을 기질로 사용하고, Lipozyme 435 효소를 첨가한 후, 60℃~70℃ 온도에서 5~20torr의 진공 하에서 4시간~8시간 동안 반응시키는 과정으로 수행할 수 있다.
- [0059] 에스테르화 반응을 위한 기질은 글리세롤 및 상기 2차로 농축된 오메가-3 지방산의 혼합물을 사용할 수 있고, 이때 글리세롤 및 상기 2차로 농축된 오메가-3 지방산이 1:2~1:3의 몰비로 혼합된 혼합물을 총 기질로 사용할 수 있다.
- [0060] 본 발명의 일실시예에서는 에스테르화 반응의 최적 온도 조건을 확인하기 위해, 에스테르화 반응을 40, 50, 60, 70℃의 각기 다른 온도 조건에서 수행하였고, 각 온도별 에스테르화 반응 후, 트리글리세라이드로의 전환율을 분석한 결과, 60℃~70℃ 온도 범위에서 트리글리세라이드로의 전환율이 높은 것으로 나타났다.
- [0061] 한편, 60℃ 미만의 온도에서는 트리글리세라이드로의 전환율이 낮은 것으로 나타났고, 70℃를 초과한 온도범위에서는 온도 증가에 따른 트리글리세라이드로의 전환율 향상이 나타나지 않았다.
- [0062] 따라서 에스테르화 반응의 적절한 온도 범위는 60℃~70℃ 인 것으로 확인되었고, 가장 효율적인 온도는 60℃인 것으로 확인되었다.
- [0063] 또한, 상기 Lipozyme 435 효소의 첨가량은 총 기질(글리세롤 및 상기 2차로 농축된 오메가-3 지방산의 총 합) 중량 기준 10~20중량%로 첨가하는 것이 오메가-3 지방산의 트리글리세라이드로의 전환에 효과적일 수 있다.
- [0064] 본 발명의 일실시예에서는, 효소의 첨가량에 따른 트리글리세라이드로의 전환율을 분석하였는데, 총 기질 중량 기준 10~20중량%로 첨가하여 반응할 경우, 트리글리세라이드로의 전환율이 우수한 것으로 나타났고, 바람직하게는 15 중량%로 첨가하여 반응할 경우, 가장 효과적인 것으로 나타났다.
- [0065] 효소의 첨가량은 효소 반응에 있어서 중요한 요소로 작용할 수 있다. 효소 첨가량이 너무 적으면 반응 생성물의

생성이 감소되거나 반응 속도의 감소가 초래되는 문제점이 생긴다. 반면 효소 첨가량이 너무 많게 되면 첨가하는 효소량에 따른 더 향상된 효과를 도출하지 않을 수 있어 경제성이 떨어지는 문제점이 발생한다.

- [0066] 따라서 효소 폐기물이 없이 충분한 반응물 및 회수율을 달성하기 위해서는 적절한 효소 첨가량을 확인할 필요가 있다.
- [0067] 이러한 점에서 본 발명에서는 제3단계에서 오메가-3 지방산의 트리글리세라이드로의 효과적인 전환 유도를 위한 최적의 효소 첨가량은 총 기질 중량 기준 10~20중량%이라는 것을 확인하였다.
- [0068] 나아가 본 발명자들은 진공이 반응에 미치는 영향도 분석하였다.
- [0069] 글리세롤과 지방산의 에스테르화 반응으로부터 생성되는 물은 트리글리세라이드의 효율적인 합성을 위해 제거되어야 한다. 본 발명자들은 반응 과정에서 생성되는 물을 제거하기 위해 진공 처리를 하였으며, 이때 최적의 진공 조건을 확립하기 위해, 진공의 조건을 1, 5, 10, 20, 100 및 200 torr로 각기 달리한 후, 효소 촉매 에스테르화 반응 후 트리글리세라이드로의 전환율을 분석하였다.
- [0070] 그 결과, 진공이 200 torr에서 5 torr로 증가한 경우, 전체 반응에 걸쳐 트리글리세라이드 전환이 증가하는 것으로 나타났다. 반면, 진공이 1 torr로 더 증가하면 트리글리세라이드 전환이 감소되는 것으로 나타났고, 12시간 후 5 torr과 20 torr 사이의 트리글리세라이드 전환율에는 큰 차이가 관찰되지 않았다.
- [0071] 따라서 진공 조건은 5 ~ 20 torr의 범위가 적절한 것으로 나타났고, 바람직하게는 20 torr 조건이 가장 경제성이 좋은 최적 조건인 것을 확인할 수 있었다.
- [0072] 이상 본 발명에서 확립한 각 단계별 최적 반응 조건으로 용매 결정화를 통해 오메가-3 지방산을 1차로 농축하고, 효소 촉매의 에탄올 분해를 통해 오메가-3 지방산을 2차로 더 농축한 후, Lipozyme 435 효소 촉매 에스테르화 반응을 수행하는 고순도 오메가-3 지방산 함유 트리글리세라이드의 제조방법은 체내에서 지방산이나 에틸 에스테르보다 흡수율이 더 우수한 고순도 오메가-3 지방산 함유 트리글리세라이드를 매우 높은 함량으로 농축하여 제조할 수 있다.
- [0073] 나아가 본 발명의 방법으로 제조된 고순도 오메가-3 지방산 함유 트리글리세라이드는 다양한 기능성 식품의 제조에 유용하게 활용될 수 있다.
- [0074] 따라서 본 발명은 본 발명의 방법으로 제조된 고순도 오메가-3 지방산 함유 트리글리세라이드를 유효성분으로 포함하는, 오메가-3 지방산 강화 식품을 제공할 수 있다.
- [0075] 상기 오메가-3 지방산 강화 식품은 오메가-3 불포화지방산의 공급을 위한 건강기능식품, 건강보조식품, 오메가-3 보충제, 식품첨가제 등을 모두 포함하는 의미이다.
- [0077] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0079] <실시예 1>

[0080] 3단계 공정을 통한 고순도 오메가-3 지방산 함유 트리글리세라이드의 제조

- [0081] 본 발명자들은 고순도 오메가-3 지방산 함유 트리글리세라이드를 효율적으로 제조할 수 있는 최적의 제조방법을 확립하기 위하여, 제1단계로 비효소적 방법인 용매 결정화를 수행하였고, 그 다음의 제2단계로 Lipozyme RM IM 효소 촉매를 이용한 에탄올화 반응을 통한 오메가-3 지방산의 농축을 수행하였으며, 마지막 제3단계로 Lipozyme 435 효소 촉매를 이용한 에스테르화 반응으로 농축된 오메가-3 지방산의 트리글리세라이드로의 전환을 수행하였으며, 각 단계별 최적의 반응 조건을 확립하기 위한 실험을 아래와 같이 수행하였다.

[0083] <1-1> 제1단계; 비효소적 방법인 용매 결정화를 이용한 오메가-3 지방산의 농축

[0084] (1) 재료준비

- [0085] 참치유는 광진테크 (Seoul, Republic of Korea)에서 지원받은 것으로 사용하였다. 자력 교반기가 부착된 저온

항은 수조 (PSL-2000)는 선일아이라 (Japan)에서 구입하여 사용하였다. Acetonitrile, acetone, n-hexane은 대정화금 (Seoul, Republic of Korea)에서 구입하여 사용하였다. 본 실험에 사용된 다른 모든 시약은 달리 명시되지 않는 한 등급은 특급 이상인 것을 사용하였다.

(2) 검화를 통한 참치유로부터 지방산의 제조

참치유 200g에 수산화나트륨 40g이 들어있는 증류수 150mL와 에탄올 (94.5%, 250mL)을 첨가하였다. 이 혼합물은 환류하며 700rpm으로 30분 동안 가열 교반하였다. 이후 상온에서 냉각한 후 분액깔때기로 옮겼다. 그 후 물 300mL와 n-hexane 650mL을 넣어 검화물과 불검화물을 분리하였다. 불검화물이 모인 n-hexane 층은 제거하였고, 검화물이 모인 물 층은 진한 염산을 첨가하여 산성화하였다. 이후 생성된 하층은 제거하였고, 지방산이 포함된 상층은 n-hexane 650mL로 추출하여 300mL의 증류수로 중성화를 2회 반복 실시하였다. 최종적으로 pH 종이를 이용하여 잔존 염산이 제거된 것을 확인하였다. 그리고 무수황산나트륨을 이용하여 남아있는 수분을 제거하였다. 이후 회전 진공농축기(N-N series, EYELA, Japan)를 통해 진공 하에서 남아있는 용매를 제거하였다. 추가적으로 잔존하는 용매는 70℃에서 질소를 이용하여 제거하였고 효과적인 용매 제거를 위해 질소 주입은 비교적 높은 기류 속도로 20분 동안 주입하였다. 정제된 지방산을 얻기 위하여 220~250℃, 0.4torr에서 증류 실험을 수행하였다.

(3) 용매 결정화를 이용한 오메가-3 지방산 농축

상기 (2)의 증류과정 후, 참치유 유래 지방산 10g을 주어진 용매(유리지방산 대 용매 비율 1:4 ~ 1:12, w/v)와 혼합하고 완전히 용해하였다. 그런 다음 정해진 온도(-10, -20, -30, -40℃)에서 자력 교반기가 부착된 저온 항온 수조(PSL-2000)에서 2시간 동안 결정화 하였다. 그 후 8um 여과지가 부착된 부후너 깔때기와 감압펌프를 연결하여 진공에서 액체 분획과 고체 분획을 분리하였다. 액체 분획과 고체 분획을 여과하기 전에 부후너 깔때기에 있는 여과지는 미리 냉각된 동일한 종류의 용매로 흡착하였다. 각 분획에 남아있는 용매는 각 용매의 끓는점 이상의 온도에서 회전 진공농축기로 제거하고, 추가적으로 잔류 용매를 질소를 이용하여 제거한 후 정밀하게 칭량하였다. 각각의 액체 및 고체 분획의 지방산 조성을 가스 크로마토그래피로 분석하였다.

(4) 지방산 조성 분석 및 회수율 계산

냉각 후 얻은 액체 분획과 고체 분획의 지방산 조성을 분석하기 위해 각각 30mg씩 취하였다. 이는 BF3 메탄올을 촉매로 하는 유도체화 반응을 통하여 지방산 메틸 에스터로 유도체화 되었다. 지방산 메틸 에스터는 Supelcowax 10 컬럼 (30 m × 0.25 mm 내경.; Supelco, Bellefonte, PA, USA) 과 화염 이온화 검출기 (FID)가 장착된 가스 크로마토그래피(model 3800; Varian Inc., Palo Alto, CA, USA)를 통해 분석되었다. 분석 조건은 다음과 같다. 컬럼을 초기 180℃에서 1분간 유지한 후, 230℃까지 1.5℃/min의 속도로 상승하여 10분간 유지하였다. 그 후 마지막으로 240℃에서 5℃/min의 속도로 상승하여 3분간 유지하였다. 캐리어 가스는 헬륨이었고, 총 가스 유량은 30mL/min이었다. Injector 및 detector의 온도는 각각 240, 250℃로 설정하였다.

용매 결정화를 통해 얻은 오메가-3 지방산 농축물의 회수율은 아래의 식을 따라 구하였다.

$$\text{회수율(\%)} = \frac{(A \times B)}{(A \times B) + (C \times D)} \times 100$$

A: 액체 분획의 무게

B: 액체 분획의 오메가-3 지방산 함량

C: 고체 분획의 무게

D: 고체 분획의 오메가-3 지방산 함량

(5) 통계 분석

- [0103] 각각의 반응 조건 별 유의적 차이를 알아보기 위해 IBM SPSS Statistics 26 프로그램을 사용하였다. 분석은 분산 분석(ANOVA)을 통해 95%의 신뢰구간에서 Duncan으로 유의성을 검증하였다. 모든 실험은 최소한 세 번 이상 반복적으로 수행되었으며, 모든 표의 결과는 평균 값 $\pm$ 표준 편차로 표시하였다. 모든 그림에 표시된 오차 막대는 서로 다른 실험 간의 표준 편차를 나타낸다.
- [0105] (6) 결과 분석
- [0106] 본 발명자들은 용매 결정화를 이용한 오메가-3 지방산의 농축 과정에 있어서, 용매 종류, 온도, 유리지방산 대 용매비율이 미치는 영향을 분석하였고, 최적의 반응 조건을 확인하였다. 구체적인 결과내용은 다음과 같다.
- [0108] (i) 용매 종류에 의한 효과 확인
- [0109] 하기 표 1에서 보는 바와 같이 오메가-3 지방산은 참치유에 풍부한 다중불포화지방산으로 전체 지방산의 22%를 차지한다. 참치유에는 약 30%의 오메가-3 지방산이 존재한다(표 1). 참치유 지방산 용액을 저온에서 보관할 경우, 융점이 높고 용매에 대한 용해도가 낮은 포화지방산과 단일불포화지방산은 대부분 결정화된다. 이와 반대로 오메가-3 지방산은 액체 분획에 잔류한다. 이로 인해 오메가-3 지방산은 용매 결정화 후 액체 분획에 농축되어 있다.
- [0110] 본 실험에서는 n-hexane, acetone, acetonitrile, petroleum ether 및 ethyl alcohol을 포함한 5가지 용매가 오메가-3 지방산 농축에 미치는 영향을 조사하였다. 즉, 참치유 유래 지방산 10g과 각 용매 100mL를 혼합하여 -20℃에서 2시간 동안 용매 결정화를 수행하였다.
- [0112] 그 결과, Acetonitrile을 용매로 사용한 경우, 액체 분획에 오메가-3 지방산이 67.5% 농축되었으며, 이러한 농축 효과는 다른 용매들에 비해 가장 높은 것으로 나타났다. 오메가-3 지방산의 회수율은 acetone을 사용하는 것이 acetonitrile보다 높은 것으로 나타났다(도 1). 하지만 acetonitrile의 농축율은 다른 4가지 용매에 비해 상당히 높았고, 나머지 4가지 용매의 오메가-3 지방산 농도는 모두 현저히 낮았다. 오메가-3 지방산이 갖는 이중 결합은 다른 포화 지방산이나 단쇄 불포화 지방산보다 오메가-3 지방산이 극성을 띄게 하기 때문에 용매 중 극성도가 높은 acetonitrile을 이용할 경우, 쉽게 용해될 수 있다. 따라서 용매들 중에서는 acetonitrile을 선택하여 사용하는 것에 가장 효과적임을 알 수 있었다.

표 1

결정화를 통해 얻은 용매 별 액체 분획의 지방산 조성

Fatty acids	Tuna oil	Solvents				
	fatty acid ^b	Acetonitrile	Acetone	<i>n</i> -Hexane	Ethanol	Petroleum ether
C14:0	3.8	0.9 ± 0.1 ^g	3.8 ± 0.2 ^{hi}	3.4 ± 0.7 ^{hi}	4.1 ± 0.3 ^j	2.9 ± 0.4 ^h
C16:0	27.2	0.2 ± 0.0 ^g	4.0 ± 0.4 ^h	6.4 ± 1.0 ^h	18.2 ± 2.5 ^j	5.9 ± 1.5 ^h
C16:1(Δ9)	4.9	6.9 ± 0.2 ^g	5.1 ± 2.7 ^g	8.4 ± 1.9 ^g	5.8 ± 0.3 ^g	8.0 ± 1.1 ^g
C18:0	7.2	0.1 ± 0.0 ^g	1.0 ± 0.1 ^g	2.3 ± 0.3 ^h	4.5 ± 0.8 ^j	2.3 ± 0.4 ^h
C18:1(Δ9)	17.2	9.8 ± 0.6 ^g	26.0 ± 0.8 ^h	26.7 ± 3.0 ^h	20.1 ± 1.0 ^{gh}	15.2 ± 10.7 ^{gh}
C18:1(Δ11)	2.6	2.8 ± 0.0 ^g	3.9 ± 0.1 ^{gh}	4.6 ± 1.4 ^h	3.0 ± 0.1 ^g	4.3 ± 0.5 ^h
C18:2(Δ9,12)	1.4	2.3 ± 0.0 ^h	2.0 ± 0.1 ^h	2.1 ± 0.1 ^h	1.6 ± 0.1 ^g	2.3 ± 0.3 ^h
C18:3(Δ9,12,15)	0.1	0.1 ± 0.0 ^g	0.1 ± 0.0 ^g	0.1 ± 0.1 ^g	0.1 ± 0.0 ^g	0.2 ± 0.0 ^g
SDA ^c	0.8	1.8 ± 0.1 ⁱ	1.2 ± 0.1 ^{gh}	1.1 ± 0.2 ^{gh}	1.0 ± 0.1 ^g	1.3 ± 0.2 ^h
C20:1(Δ11)	1.5	1.1 ± 0.0 ^g	2.2 ± 0.0 ^{hi}	2.5 ± 0.5 ^j	1.7 ± 0.1 ^h	2.5 ± 0.2 ^j
C20:4(Δ5,8,11,14)	2.0	4.2 ± 0.0 ^j	3.0 ± 0.1 ^h	2.7 ± 0.3 ^{gh}	2.3 ± 0.1 ^g	3.3 ± 0.4 ^h
C20:4(Δ8,11,14,17)	0.5	1.0 ± 0.0 ^h	0.7 ± 0.0 ^g	0.7 ± 0.1 ^g	0.6 ± 0.0 ^g	0.8 ± 0.1 ^g
EPA ^d	6.5	14.6 ± 0.1 ^g	9.8 ± 0.3 ^h	8.6 ± 1.5 ^h	7.8 ± 0.5 ^h	10.7 ± 1.3 ^h
DPA(Δ4,7,10,13,16)	1.4	3.0 ± 0.0 ^g	2.2 ± 0.0 ^h	1.9 ± 0.3 ^{gh}	1.7 ± 0.1 ^g	2.4 ± 0.2 ^h
DPA(Δ7,10,13,16,19)	0.9	1.8 ± 0.0 ^g	1.3 ± 0.0 ^h	1.1 ± 0.2 ^{gh}	1.0 ± 0.0 ^g	1.4 ± 0.2 ^h
DHA ^e	22.0	49.2 ± 0.9 ^h	33.6 ± 0.7 ^g	27.5 ± 6.3 ^g	26.4 ± 1.4 ^g	36.5 ± 3.9 ^g
ω-3 PUFA ^f	30.2	67.5 ± 1.0 ^j	45.9 ± 0.9 ^{gh}	38.4 ± 8.1 ^g	36.3 ± 1.9 ^g	49.9 ± 5.6 ^h

[0113]

[0115]

a 본 실험은 온도 -20℃, 지방산 대 용매 비율 1:10, 결정화 시간 2h의 조건에서 수행되었다.

[0116]

b 참치유의 검화를 통해 얻어진 지방산

[0117]

c SDA; Stearidonic acid (6Z,9Z,12Z,15Z)

[0118]

d EPA; Eicosapentaenoic acid (5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)

[0119]

e DHA; Docosahexaenoic acid (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)

[0120]

f ω-3 PUFA는 SDA, EPA, DPA(Δ7,10,13,16,19), 그리고 DHA를 포함한다.

[0122]

(ii) 온도에 대한 효과 확인

[0123]

결정화에서 온도는 지방산에 대한 용매의 용해도에 영향을 미치며 이에 따라 고융점 지방산과 저융점 지방산이 분리되기 때문에 중요한 요소라 할 수 있다. 용매 결정화에 가장 적합한 온도를 확인하기 위해, 유리 지방산과 acetonitrile을 1:10으로 혼합한 용액을 -10, -20, -30, -40℃에서 2시간 동안 결정화 하였다. 한편, -40℃보다 더 낮은 -45℃에서 용매 결정화 반응을 수행한 경우, acetonitrile의 융점인 -45.7℃와 가깝기 때문에 용매가 얼어 액체와 고체 분획을 분리할 수 없다.

[0124]

액체 분획 내 오메가-3 지방산의 함량과 회수율에 대한 온도가 미치는 영향을 조사하였고, 표 2에는 다양한 온도에서 결정화를 거친 후 얻은 액체 분획의 지방산 조성을 나타내었다. 이 실험에서 용매, 유리지방산 대 용매 비율 및 시간은 각각 acetonitrile, 1:10 및 2시간으로 수행하였다.

[0126] 그 결과, 오메가-3 지방산의 함량은 온도가 낮아질수록 증가하여 -40℃에서 가장 높은 81.7%인 것으로 나타났다. 오메가-3 지방산의 회수율은 -30℃까지는 증가하였지만 -40℃에서는 오히려 감소하는 것으로 나타났다(도 2).

[0127] 따라서 오메가-3 지방산의 함량이 가장 높은 -40℃가 용매 결정화 방법에 있어서 가장 최적의 온도인 것을 알 수 있었다.

표 2

온도 별 결정화^a 한 뒤 얻은 액체 분획의 지방산 조성(wt%)

Fatty acids	Tuna oil fatty acid ^b	Temperatures (°C)			
		-10	-20	-30	-40
C14:0	3.8	2.0 ± 0.1 ⁱ	0.9 ± 0.1 ⁱ	0.5 ± 0.1 ^h	0.2 ± 0.0 ^g
C16:0	27.2	0.5 ± 0.0 ⁱ	0.2 ± 0.0 ^h	0.2 ± 0.0 ^g	0.1 ± 0.0 ^g
C16:1(Δ9)	4.9	7.9 ± 0.4 ⁱ	6.9 ± 0.2 ⁱ	5.4 ± 0.6 ^h	3.1 ± 0.2 ^g
C18:0	7.2	0.2 ± 0.0 ^g	0.1 ± 0.0 ^g	0.1 ± 0.0 ^g	0.1 ± 0.0 ^g
C18:1(Δ9)	17.2	21.7 ± 0.9 ⁱ	9.8 ± 0.6 ⁱ	5.4 ± 1.0 ^h	2.3 ± 0.1 ^g
C18:1(Δ11)	2.6	3.2 ± 0.1 ⁱ	2.8 ± 0.0 ⁱ	1.8 ± 0.2 ^h	0.8 ± 0.0 ^g
C18:2(Δ9,12)	1.4	1.9 ± 0.4 ^g	2.3 ± 0.0 ^g	2.2 ± 0.1 ^g	1.8 ± 0.1 ^g
C18:3(Δ9,12,15)	0.1	0.1 ± 0.1 ^g	0.1 ± 0.0 ^g	0.0 ± 0.0 ^g	0.0 ± 0.0 ^g
SDA ^c	0.8	1.6 ± 0.0 ^g	1.8 ± 0.1 ^h	2.1 ± 0.1 ⁱ	2.3 ± 0.1 ⁱ
C20:1(Δ11)	1.5	1.3 ± 0.1 ⁱ	1.1 ± 0.0 ⁱ	0.5 ± 0.1 ^h	0.2 ± 0.0 ^g
C20:4(Δ5,8,11,14)	2.0	3.5 ± 0.1 ^g	4.2 ± 0.0 ^h	4.6 ± 0.1 ⁱ	5.0 ± 0.0 ⁱ
C20:4(Δ8,11,14,17)	0.5	0.8 ± 0.0 ^g	1.0 ± 0.0 ^h	1.0 ± 0.0 ^h	1.1 ± 0.0 ⁱ
EPA ^d	6.5	12.1 ± 0.3 ^g	14.6 ± 0.1 ^h	16.4 ± 0.3 ⁱ	17.9 ± 0.1 ⁱ
DPA(Δ4,7,10,13,16)	1.4	2.4 ± 0.1 ^g	3.0 ± 0.0 ^h	3.3 ± 0.1 ⁱ	3.6 ± 0.0 ⁱ
DPA(Δ7,10,13,16,19)	0.9	1.4 ± 0.0 ^g	1.8 ± 0.0 ^h	2.0 ± 0.1 ⁱ	2.1 ± 0.0 ⁱ
DHA ^e	22.0	39.6 ± 1.4 ^g	49.2 ± 0.9 ^h	54.6 ± 1.6 ⁱ	59.5 ± 0.6 ⁱ
ω-3 PUFA ^f	30.2	54.7 ± 1.8 ^g	67.5 ± 1.0 ^h	75.0 ± 1.9 ⁱ	81.7 ± 0.5 ⁱ

[0128]

[0129] a 본 실험은 지방산 대 acetonitrile의 비율은 1:10, 결정화 시간은 2h의 조건에서 수행하였다.

[0130] b 참치유의 검화를 통해 얻어진 지방산

[0131] c SDA; Stearidonic acid (6Z,9Z,12Z,15Z)

[0132] d EPA; Eicosapentaenoic acid (5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)

[0133] e DHA; Docosahexaenoic acid (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)

[0134] f ω-3 PUFA는 SDA, EPA, DPA(Δ7,10,13,16,19), 그리고 DHA를 포함한다.

[0136] (iii) 유리지방산 대 용매 비율에 대한 효과 분석

[0137] 용매 결정화에서 유리지방산 대 용매의 비율 역시 중요하게 작용하는 요인 중 하나이다. 따라서 오메가-3 지방산의 함량과 회수율에 대한 유리지방산 대 용매 비율이 미치는 영향을 조사하였다. 용매로는 이전 과정에서 가장 결과가 좋았던 acetonitrile을 사용하였고, 유리지방산 대 acetonitrile 비율은 1:4 부터 1:12 까지 다양한 비율을 대상으로 조사하였다. 여러 유리지방산 대 용매의 비율로 혼합한 용액을 -40℃에서 2 시간 동안 acetonitrile로 결정화 하여 얻은 액체 분획의 지방산 조성을 분석하였고, 이를 표 3에 나타냈다.

표 3

지방산 대 용매의 비율에 따라 결정화^a 후 얻은 액체 분획의 지방산 조성 (wt%)

Fatty acids	Tuna oil fatty acid ^b	Oil to solvent ratios (w/v)				
		1:4	1:6	1:8	1:10	1:12
C14:0	3.8	0.1 ± 0.0 ^g	0.2 ± 0.0 ^g	0.2 ± 0.0 ^g	0.2 ± 0.0 ^h	0.2 ± 0.0 ^j
C16:0	27.2	0.1 ± 0.0 ^g	0.1 ± 0.0 ^g	0.1 ± 0.0 ^g	0.1 ± 0.0 ^g	0.1 ± 0.1 ^g
C16:1(Δ9)	4.9	1.8 ± 0.2 ^g	2.1 ± 0.1 ^{gh}	2.4 ± 0.3 ^h	3.1 ± 0.2 ⁱ	3.7 ± 0.1 ^j
C18:0	7.2	0.1 ± 0.1 ^g	0.2 ± 0.1 ^g	0.1 ± 0.0 ^g	0.1 ± 0.0 ^g	0.2 ± 0.0 ^g
C18:1(Δ9)	17.2	1.7 ± 0.3 ^g	2.0 ± 0.2 ^{gh}	2.0 ± 0.2 ^{gh}	2.3 ± 0.1 ^h	2.8 ± 0.1 ⁱ
C18:1(Δ11)	2.6	0.5 ± 0.1 ^g	0.6 ± 0.0 ^g	0.7 ± 0.1 ^g	0.8 ± 0.0 ^h	0.9 ± 0.1 ⁱ
C18:2(Δ9,12)	1.4	1.1 ± 0.1 ^g	1.4 ± 0.1 ^h	1.6 ± 0.1 ⁱ	1.8 ± 0.1 ^j	2.1 ± 0.1 ^j
C18:3(Δ9,12,15)	0.1	0.0 ± 0.0 ^g	0.0 ± 0.0 ^g	0.0 ± 0.0 ^g	0.0 ± 0.0 ^g	0.0 ± 0.0 ^g
SDA ^c	0.8	2.2 ± 0.1 ^g	2.2 ± 0.1 ^g	2.2 ± 0.1 ^g	2.3 ± 0.1 ^g	2.4 ± 0.1 ^g
C20:1(Δ11)	1.5	0.1 ± 0.0 ^g	0.2 ± 0.0 ^{gh}	0.2 ± 0.0 ^{gh}	0.2 ± 0.0 ^h	0.3 ± 0.0 ^j
C20:4(Δ5,8,11,14)	2.0	4.1 ± 0.1 ^g	4.5 ± 0.1 ^h	4.8 ± 0.1 ⁱ	5.0 ± 0.0 ^j	5.2 ± 0.0 ^j
C20:4(Δ8,11,14,17)	0.5	0.9 ± 0.0 ^g	1.0 ± 0.0 ^h	1.0 ± 0.0 ^j	1.1 ± 0.0 ^j	1.1 ± 0.0 ^j
EPA ^d	6.5	18.2 ± 0.2 ^g	17.9 ± 0.4 ^g	18.1 ± 0.2 ^g	17.9 ± 0.1 ^g	17.8 ± 0.3 ^g
DPA(Δ4,7,10,13,16)	1.4	3.1 ± 0.0 ^g	3.4 ± 0.1 ^h	3.5 ± 0.0 ^j	3.6 ± 0.0 ^j	3.7 ± 0.0 ^j
DPA(Δ7,10,13,16,19)	0.9	1.9 ± 0.0 ^g	2.0 ± 0.0 ^h	2.1 ± 0.0 ^j	2.1 ± 0.0 ^j	2.2 ± 0.1 ^j
DHA ^e	22.0	63.9 ± 1.0 ^j	62.4 ± 0.5 ^j	61.1 ± 0.8 ^j	59.5 ± 0.6 ^h	57.5 ± 0.2 ^g
ω-3 PUFA ^f	30.2	86.3 ± 0.8 ^j	84.5 ± 0.6 ^j	83.5 ± 0.7 ^j	81.7 ± 0.5 ^h	79.8 ± 0.5 ^g

[0138]

[0140] a 본 실험은 온도 -40℃, 결정화 시간 2시간의 조건에서 수행하였다.

[0141] b 참치유의 검화를 통해 얻어진 지방산

[0142] c SDA; Stearidonic acid (6Z,9Z,12Z,15Z)

[0143] d EPA; Eicosapentaenoic acid (5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)

[0144] e DHA; Docosahexaenoic acid (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)

[0145] f ω-3 PUFA는 SDA, EPA, DPA(Δ7,10,13,16,19), 그리고 DHA를 포함한다.

[0147] 분석 결과, 오메가-3 지방산의 함량은 유리지방산 대 용매의 비율이 1:4일 때 가장 높았으며, 1:12일 때 가장 낮은 것으로 나타났다. 그 중에서도 1:6과 1:8은 통계적으로 유의미한 차이가 없었는데, 이는 1:4와도 아주 적은 차이를 보였다. 오메가-3 지방산의 회수율은 1:4일 때 가장 낮고, 용매의 양이 증가할수록 증가하였다(도 3). 그러나 유리지방산 대 용매의 비율이 1:8부터 1:12까지는 통계적으로 유의미한 차이가 없었다.

[0148] 따라서 오메가-3 지방산의 함량과 회수율을 모두 고려할 경우, 유리지방산 대 용매의 비율은 1:8로 수행하는 것이 최적의 조건임을 알 수 있었다.

[0149]

[0150] <1-2> 제2단계; Lipozyme RM IM 촉매의 에탄올 분해를 통한 오메가-3 지방산의 농축

[0151] (1) 재료준비

[0152] 참치유는 광진테크 (Seoul, Republic of Korea)에서 지원받았다. Rhizomucor miehei에서 유래한 고정화 효소인 Lipozyme RM IM은 Novozyme(Seoul, Republic of Korea)에서 구입하여 사용하였다. 이 실험에 사용된 다른 모든

시약은 달리 명시되지 않는 한 등급은 특급 이상인 것을 사용하였다.

[0154] (2) 제1단계의 용매 결정화로부터 얻은 액체 분획과 에탄올을 이용한 에탄올 분해

[0155] 효소 촉매를 이용한 에탄올 분해는 상기 제1단계의 용매 결정화를 통해 얻은 액체 분획을 기질로 사용하였다. 에탄올 분해는 반응 온도 조절을 위해 워터 자켓 유리 반응조(내경 3.5cm, 높이 8 cm)에서 수행하였다. 액체 분획과 에탄올을 용기에 첨가하고 300rpm으로 교반하였다. 또한, 순환식 항온 수조를 사용하여 원하는 온도로 예열하였다. 반응은 Lipozyme RM IM(전체 기질 전체 중량의 5%) 효소를 첨가하며 시작하였다. 반응 혼합물 200 μ L를 적절한 시간 간격으로 취하여 산가를 측정하였다. 또한 반응 혼합물 200 μ L를 적절한 시간 간격으로 취하여 클로로포름(500 μ L)에 혼합한 후 박층크로마토그래피(Thin layer chromatography) 및 가스크로마토그래피 분석을 실시하였다.

[0157] (3) 지방산 조성 분석 및 회수율 계산

[0158] 반응 후 시료에 잔류하는 지방산의 양을 얻기 위하여 산가를 측정하였다. 에탄올(99%)과 ethyl ether를 1:1로 혼합한 혼합용액 50 mL에 시료 0.1 g을 용해하였다. 그런 다음 에탄올에 1% 페놀프탈레인 용액을 지시약으로 추가하였다. 그 후, 에탄올에 0.1N KOH 용액으로 적정하여 산가를 구하였다.

[0159] 각 시간별 샘플의 지방산 조성을 분석하기 위해 각각 30mg씩 취하였다. 이는 BF3 메탄올을 촉매로 하는 유도체화 반응을 통하여 지방산 메틸 에스터로 유도체화 되었다. 지방산 메틸 에스터는 Supelcowax 10 컬럼 (30 m $\times$ 0.25 mm 내경.; Supelco, Bellefonte, PA, USA) 과 화염 이온화 검출기 (FID)가 장착된 가스 크로마토그래피 (model 3800; Varian Inc., Palo Alto, CA, USA)를 통해 분석되었다. 분석 조건은 다음과 같았다. 컬럼을 초기 180 $^{\circ}$ C에서 1분간 유지한 후, 230 $^{\circ}$ C까지 1.5 $^{\circ}$ C/min의 속도로 상승하여 10분간 유지하였다. 그 후 마지막으로 240 $^{\circ}$ C에서 5 $^{\circ}$ C/min의 속도로 상승하여 3분간 유지하였다. 캐리어 가스는 헬륨이었고, 총 가스 유량은 30mL/min이었다. Injector 및 detector의 온도는 각각 240, 250 $^{\circ}$ C로 설정되었다.

[0160] Lipozyme RM IM 촉매 에탄올 분해를 통해 얻은 오메가-3 지방산의 농축물의 회수율은 아래의 식을 따라 구하였다.

$$\text{회수율 (\%)} = \frac{A \times B}{C \times D} \times F$$

[0161] A: 반응 후 샘플에 남아있는 지방산의 양

[0162] B: 반응 후 지방산 분획 내 오메가-3 지방산의 함량

[0163] C: 반응 전 샘플의 지방산 양

[0164] D: 반응 전 지방산 분획 내 오메가-3 지방산의 함량

[0165] F: 용매 결정화 하였을 때 최적 조건에서 액체 분획의 회수율

[0166] 또한 상기 실험에 따른 통계분석은 앞서 1단계의 통계분석과 동일하게 수행하였다.

[0168] (4) 결과 분석

[0170] (i) 온도에 의한 효과 분석

[0171] 효소 반응에서 온도는 중요한 변수 중 하나이다. 반응 온도가 증가하면 기질에 대한 에탄올의 용해도가 증가하고 용액의 점도가 감소한다. 이는 효소가 기질에 쉽게 접근하도록 함으로써 반응 속도를 증가시킨다. 그러나 너무 높은 온도는 효소 단백질의 변성과 효소의 활성 감소를 초래할 수 있다. 따라서 효소의 활성을 최대화하기 위한 온도 설정이 중요하며, 효소 활성의 최적 온도는 효소의 유래, 화학적 특성, 용매 및 반응 매질의 pH 등에 따라 차이가 있다.

- [0173] 따라서 본 발명자들을 온도가 Lipozyme RM IM 촉매 에스테르화를 통해 얻은 에스터화 되지 않은 분획의 오메가-3 지방산 함량 및 회수율에 미치는 영향을 분석하였는데, 테스트한 온도 범위는 10~40℃에서 수행하였고, 지방산 대 에탄올의 물 비, 교반 속도 및 효소량을 각각 1:2, 300 rpm 및 5% (전체 기질 중량 대비)로 일정하게 유지한 상태로 수행하였다.
- [0175] 그 결과, 반응 시작 후 4시간 동안, 온도가 증가함에 따라, 반응 속도도 꾸준히 증가하였다(도 4). 그러나 반응 시작 후 4시간에는 40℃에서의 오메가-3 함량이 감소하였으며, 8시간에서는 오메가-3 지방산의 함량은 20℃에서 가장 높았지만 30℃와 큰 차이가 없었다. 오메가-3 지방산의 최대 함량은 20℃에서 8시간에 93.8%였으며, 10℃에서는 전반적으로 오메가-3 지방산의 함량이 가장 낮았다. 오메가-3 지방산의 회수율은 함량이 가장 높은 20~30℃의 8시간 중 20℃에서 가장 높았으며, 초기 참치유 유래 지방산으로부터 약 39%의 회수율을 달성하였다(도 5).
- [0176] 온도는 지방산의 산화와 효소의 잔류 활성에 영향을 미친다. 따라서 본 실험에서 Lipozyme RM IM 효소 촉매 반응의 온도는 오메가-3 지방산의 함량과 회수율에 영향을 미치지 않는 경우 가능한 한 낮게 유지되어야 한다. 따라서 오메가-3 지방산의 함량과 회수율, 생성물의 산화, 효소의 잔류 활성 등의 모든 요인을 고려하면, 최적의 온도는 20℃로 선정하여 수행하는 것이 가장 바람직하다는 것을 알 수 있었다.
- [0178] (ii) 지방산 대 에탄올의 물 비에 대한 효과 분석
- [0179] 에탄올을 과량으로 사용하면 효소의 억제제로 작용하여 반응이 잘 일어나지 않게 되며, 이와 반대로 에탄올의 양이 적으면 반응이 충분히 일어나지 못한다. 따라서 본 발명자들은 기질의 물 비가 오메가-3 지방산의 농축에 미치는 영향을 조사하였고, 이때 지방산 대 에탄올의 물 비율의 범위는 1:0.7 ~ 1:4에서 실험을 수행하였다. 또한 나머지 반응 조건인 온도, 효소량 및 교반 속도는 각각 20℃, 5% (전체 기질 중량 대비) 및 300 rpm을 유지하였다.
- [0181] 분석 결과, 반응 시작 후 4시간 동안, 물 비 (지방산 대 에탄올)는 1:4에서 1:1로 감소함에 따라 반응 속도가 크게 증가하였다(도 6). 그러나 2 시간에서 물 비 1:0.7의 경우, 오메가-3 지방산의 함량이 더 이상 증가하지 않았다. 오메가-3 지방산의 함량은 4시간 후 1:1로 평형을 이루었고 최대 함량은 92.5%였다. 한편, 물 비 1:2에서의 오메가-3 지방산 함량은 꾸준히 증가하였으며, 8h 후에 약 93%의 최대 오메가-3 지방산의 함량을 얻었다. 오메가-3 지방산의 함량이 최대인 조건에서의 회수율은 1:1의 4시간이 1:2의 8시간 보다 높았다(도 7).
- [0182] 따라서 오메가-3 지방산의 농축의 생산성을 고려했을 때 최적 물비는 1:1(지방산 대 에탄올)인 것을 알 수 있었고, 또한 최적 조건에서 생산한 오메가-3 지방산이 농축된 지방산을 다음 단계의 기질로 사용하였으며, 각 단계 별 함량은 하기 표 4에 나타낸 바와 같다.

표 4

참치유로부터 만든 지방산과 농축물의 지방산 조성

Fatty acids	Tuna oil fatty acid ^a	Enrichment 1 ^b	Enrichment 2 ^c
C14:0	3.8	0.2	0.0
C16:0	27.2	0.1	0.0
C16:1(Δ9)	4.9	2.4	0.3
C18:0	7.2	0.1	0.0
C18:1(Δ9)	17.2	2.0	0.2
C18:1(Δ11)	2.6	0.7	0.0
C18:2(Δ9,12)	1.4	1.6	0.2
C18:3(Δ9,12,15)	0.1	0.0	0.0
SDA ^d	0.8	2.2	2.7
C20:1(Δ11)	1.5	0.2	0.0
C20:4(Δ5,8,11,14)	2.0	4.8	1.1
C20:4(Δ8,11,14,17)	0.5	1.0	0.7
EPA ^e	6.5	18.1	4.3
DPA(Δ4,7,10,13,16)	1.4	3.5	4.8
DPA(Δ7,10,13,16,19)	0.9	2.1	0.3
DHA ^f	22.0	61.1	85.2
ω-3 PUFA ^g	30.2	83.5	92.5

[0183]

[0185]

a 참치유의 검화를 통해 얻은 지방산

[0186]

b 용매 결정화 후 오메가-3 지방산이 농축된 지방산. 용매 결정화는 온도 -40℃, 지방산 대 acetonitrile의 비율은 1:8, 결정화 시간은 2h의 조건에서 실시하였다.

[0187]

c 용매 결정화 및 Lipozyme RM IM 촉매 에탄올 분해 후 오메가-3 지방산이 농축된 지방산. 용매 결정화는 온도 -40℃, 지방산 대 acetonitrile의 비율은 1:8, 결정화 시간은 2h의 조건에서 실시하였다. Lipozyme RM IM 촉매 에탄올 분해는 20℃에서 5%의 효소, 지방산 대 에탄올 비율 1:1(mol/mol)의 조건에서 수행하였다.

[0188]

d SDA; Stearidonic acid (6Z,9Z,12Z,15Z)

[0189]

e EPA; Eicosapentaenoic acid (5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)

[0190]

f DHA; Docosahexaenoic acid (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)

[0191]

g ω-3 PUFA는 SDA, EPA, DPA(Δ7,10,13,16,19), 그리고 DHA를 포함한다.

[0193]

<1-3> 제3단계; Lipozyme 435 효소 촉매 에스테르화에 의한 오메가-3 지방산이 농축된 트리글리세라이드의 합성

[0194]

(1) 재료준비

[0195]

Lipozyme 435는 Novozymes(한국, 서울)에서 구매하여 사용하였고, 본 실험에 사용한 다른 모든 시약은 달리 명시되지 않는 한 등급은 특급 이상인 것을 사용하였다.

[0197]

(2) 고농축 오메가-3 지방산의 분리

[0198]

트리글리세라이드 합성 시 필요한 기질을 만들기 위해 효소 촉매 에탄올 분해를 대량으로 진행하였다. 최적조건

에서 진행한 반응과 동일한 오메가-3 지방산의 농도를 가진 산물을 얻기 위해 교반 속도를 400rpm, 6h 동안 반응이 수행되었다. 이외의 조건 및 방법은 상기 제2단계의 결정화로부터 얻은 액체 분획과 에탄올을 이용한 에탄올 분해 과정과 동일하게 수행하였다.

[0199] 대량의 반응이 끝난 후, 오메가-3 지방산이 농축된 지방산이 들어있는 생성물(40g)을 100rpm으로 스테어링하며 수산화나트륨(2.62g)이 들어있는 증류수(349mL)와 n-Hexane 698mL을 첨가하였다. 그리고 NaCl 5mL를 첨가하였다. 그 후 250mL 원심분리 용기에 동일한 무게로 나눠 담았다. 이 혼합물은 30분 동안 25℃에서 10000rpm으로 원심 분리 하였다. 이후 분별 깔때기로 옮겨져 층을 명확하게 분리하였다. 그런 뒤, 하층을 다른 분별 깔때기로 옮기고 HCl(15.8mL)를 첨가하여 산성화하였다. 이후 생성된 하층은 제거하였고, 지방산이 포함된 상층은 n-Hexane(218mL)로 추출하여 증류수(2 × 65.4mL)로 중성화하였다. 그리고 무수황산나트륨을 거쳐 남아있는 수분을 제거하였다. 이후 회전식 농축기를 통해 진공에서 남아있는 용매를 제거하였다. 이러한 과정을 거쳐 생성된 오메가-3 지방산이 농축된 지방산은 가스 크로마토그래피를 이용해 오메가-3 지방산의 함량을 분석한 후 사용되었다.

[0201] (3) 오메가-3 지방산이 농축된 지방산의 효소 촉매 에스테르화를 통한 오메가-3 지방산의 트리글리세라이드로의 전환

[0202] 오메가-3 지방산이 농축된 트리글리세라이드를 합성하기 위한 효소 촉매 에스테르화는 상기 제2단계의 오메가-3 지방산이 농축된 지방산을 분리하여 기질로 사용하였다. 에스테르화는 온도 조절을 위하여 물 순환 자켓이 있는 반응기(내경, 3.5 cm; 높이, 8cm)에서 수행되었다. 이 용기에는 오메가-3 지방산이 농축된 지방산과 글리세롤을 첨가하고 300rpm으로 교반하였다. 또한, 씨클레이터를 이용하여 원하는 온도로 예열하였다. 반응은 최대 진공(0.8torr~2torr)에서 5분간 두어 기질 속에 존재하는 수분을 제거한 후 Lipozyme 435 효소를 첨가하며 시작하였다. 진공은 micrometering valve(Swagelok, Solon, OH, USA)를 이용해 조절하였고 진공 게이지 (Teledyne, Thousand Oaks, CA, USA)를 사용하여 모니터링하였다. 반응 도중 정해진 시간에 반응물 중 150 μL를 주기적으로 취하였다. 이후 박층 크로마토그래피와 가스 크로마토그래피 분석을 위하여 회수한 샘플 중 효소를 제외한 약 45mg을 따로 보관하였다.

[0204] (4) 트리글리세라이드로의 전환율 분석

[0205] 약 45mg의 샘플을 클로로포름에 용해하여 TLC silica gel 60 F254 plates (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)에 로딩하였다. 이는 petroleum ether/diethyl ether/acetic acid(80:20:0.5, v/v/v)을 이동상으로 하는 챔버에서 전개하여 분리하였다. 그 후 UV light using 2,7-dichlorofluorescein in methanol 용액으로 자외선(354nm)에서 검출하였다. 트리글리세라이드에 해당되는 밴드는 긁어낸 후 내부 표준물질인 heptadecanoic acid(C17:0)과 함께 14% BF₃ 메탄올을 촉매로 하는 유도체화 반응을 통하여 지방산 메틸 에스테르로 유도체화 되었다. 또한, MG, DG, FA에 해당하는 밴드는 함께 긁어낸 후 트리글리세라이드와 동일하게 처리하였다.

[0206] 지방산 메틸 에스테르는 Supelcowax 10 컬럼 (30 m × 0.25 mm 내경.; Supelco, Bellefonte, PA, USA) 과 화염 이온화 검출기 (FID)가 장착된 가스 크로마토그래피(model 3800; Varian Inc., Palo Alto, CA, USA)를 통해 분석되었다. 분석 조건은 다음과 같았다. 컬럼을 초기 180℃에서 1분간 유지한 후, 230℃까지 1.5℃/min의 속도로 상승하여 10분간 유지하였다. 그 후 마지막으로 240℃에서 5℃/min의 속도로 상승하여 3분간 유지하였다. 캐리어 가스는 헬륨이었고, 총 가스 유량은 30mL/min이었다. Injector 및 detector의 온도는 각각 240, 250℃로 설정되었다.

[0207] 오메가-3 지방산이 농축된 트리글리세라이드의 전환율은 다음과 같이 계산되었다.

$$\text{트리글리세라이드 전환율 (\%)} = \frac{A}{A+B} \times 100$$

[0208]

[0209] A: TAG fraction의 전체 양 (mg)

[0210] B: MAG, DAG, FA fraction의 전체 양 (mg)

[0212] 상기 방법으로 얻어진 결과의 통계분석은 앞서 기술된 통계분석과 동일하게 진행하였다.

[0214] (5) 결과

[0215] (i) 온도에 의한 효과 분석

[0216] 온도는 효소의 선택성과 활성에 영향을 미치기 때문에 효소 반응에서 매우 중요하다. 일반적으로 온도가 상승할수록 반응이 가속화되지만 온도가 과도하게 올라갈수록 효소의 단백질을 변성시킬 수 있다.

[0217] 반응 시간에 따라 오메가-3 지방산 함량이 85%인 오메가-3 지방산 농축물과 글리세롤의 Lipozyme 435 촉매 에스테르화를 통한 트리글리세라이드 합성에 대한 온도의 영향을 탐색하였다. 수행 조건은 온도 범위는 40℃에서 70℃ 사이로 하였고, 기질(글리세롤 대 지방산)의 몰 비, 효소량(기질 총 중량 대비) 및 진공은 각각 1:3, 5%, 5 torr로 일정하게 유지하면서 수행하였다.

[0219] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, 전체 반응 온도 중 40℃에서 가장 낮은 트리글리세라이드로의 전환이 관찰되었다. 반응의 첫 6시간 동안, 온도가 40℃에서 70℃로 증가했을 때 트리글리세라이드 전환이 크게 증가하였다. 그러나 반응 시간을 더 늘렸을 때 60~70℃ 사이에서는 큰 차이가 없었다. 최대 트리글리세라이드의 전환율인 82%는 12시간 후에 60℃와 70℃에서 얻어졌다. 효소 반응의 온도는 효소 단백질의 공정 비용과 효소의 단백질 변성에 상당한 영향을 미칠 수 있는데, 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 60℃가 최적 온도임을 알 수 있었다.

[0221] (ii) 효소 첨가량에 의한 효과 분석

[0222] 효소 첨가량은 공정에서 사용되는 비용에 영향을 미치기 때문에 인해 효소 반응에서 중요한 변수이다. 경제성을 고려할 때 효소의 양은 최소화되어야 한다. 그러나 너무 적은 양의 효소는 생성물의 회수율과 초기 반응 속도의 감소를 초래한다. 따라서, 효소 폐기물 없이 충분한 회수율을 달성하기 위해서는 최적화된 효소량을 사용해야 한다. 반응 시간 별 순도 85%의 오메가-3 지방산이 농축된 지방산과 글리세롤의 Lipozyme 435 효소 촉매 에스테르화를 통한 트리글리세라이드 합성에 대하여 효소량의 영향을 조사하였으며, 이때 효소량의 범위는 5%와 20% 사이의 범위로 실험을 수행하였고, 이때 기질의 몰 비(글리세롤 대 지방산), 온도 및 진공은 각각 1:3, 60° C, 5 torr로 일정하게 유지되도록 하였다.

[0224] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, 반응 초기 단계에서는 효소량이 5%에서 20%로 증가함에 따라 반응 속도가 현저하게 증가하였다. 4시간에서 트리글리세라이드로의 전환은 15%와 20% 사이에 유의미한 차이가 없었다. 그러나 트리글리세라이드 전환은 4시간 후 효소량 15%에서 꾸준히 증가한 반면, 효소량 20%에서는 서서히 감소하였다. 트리글리세라이드로의 최대 전환은 반응 8시간 후 효소량 15%에서 87%였다.

[0225] 따라서 본 발명자들은 농축된 오메가-3 지방산을 트리글리세라이드로 전환할 때, 전환이 최대인 시점에 도달하는 시간을 고려하여 최적의 효소 첨가량은 15%인 것을 알 수 있었다.

[0227] (iii) 진공의 영향 분석

[0228] 리파아제 촉매 반응은 반응 시스템의 물의 양에 매우 민감하다. 글리세롤 1몰과 지방산 3몰을 에스테르화하여 트리글리세라이드를 합성하였을 때 물 3몰이 생성된다. 글리세롤과 지방산의 반응으로 생성된 물이 제거되지 않으면 평형 위치가 가수분해 방향으로 이동할 수 있다. 따라서 글리세롤과 지방산의 에스테르화로부터 생성된 물은 트리글리세라이드를 효율적으로 합성하기 위해 제거되어야 한다. 본 연구에서는 반응 중에 형성된 물을 제거하기 위해 진공을 사용하였다.

[0229] 순도 85%의 오메가-3 지방산 농축 지방산과 글리세롤의 Lipozyme 435 촉매 에스테르화를 통한 트리글리세라이드 합성에 진공이 미치는 영향을 조사하였다.

[0231] 그 결과, 도 10에 나타난 것과 같이, 200 torr에서 트리글리세라이드 전환이 가장 낮았다. 진공이 200 torr에서 5 torr로 증가한 경우, 전체 반응에 걸쳐 트리글리세라이드 전환이 증가하였다. 그러나 진공이 1 torr로 더 증가하면 트리글리세라이드 전환이 감소하였다. 6시간 후 5 torr에서 약 84%의 최대 전환율을 나타냈지만 12시간 후 5 torr과 20 torr 사이의 트리글리세라이드 전환율에는 큰 차이가 관찰되지 않았다. 따라서 경제성을 고려하여 20 torr의 진공 조건이 최적의 조건임을 알 수 있었다.

[0233] (iv) 오메가-3 지방산이 풍부한 트리글리세라이드의 지방산 조성 분석

[0234] 리파아제는 탄소 사슬 길이, 이중 결합의 구성 및 위치, 및 아실 공급원의 특성에 따라 지방산에 대해 하나 이상의 선택성을 가질 수 있다.

[0235] Lipozyme 435 촉매 에스테르화에 의해 합성된 오메가-3 지방산이 농축된 트리글리세라이드의 지방산 조성을 시간에 따라 분석하였고, 이를 표 5에 나타내었다.

표 5

Lipozyme 435 촉매 에스테르화를 통해 오메가-3가 농축된 지방산과 글리세롤로 합성된

오메가-3 지방산이 농축된 트리글리세라이드의 반응 시간 별 지방산 조성(wt%)

Fatty acids	ω -3 PUFA-enriched fatty acid ^a	Time (h)				
		2	4	6	8	12
C14:0	0.0	0.1 ± 0.0 ^f	0.1 ± 0.0 ^f	0.1 ± 0.0 ^f	0.1 ± 0.0 ^f	0.1 ± 0.0 ^f
C16:0	0.0	0.1 ± 0.0 ^f	0.1 ± 0.0 ^f	0.1 ± 0.0 ^f	0.1 ± 0.0 ^f	0.1 ± 0.0 ^f
C16:1(Δ 9)	0.7	0.9 ± 0.0 ^g	0.9 ± 0.0 ^g	0.8 ± 0.0 ^g	0.9 ± 0.0 ^g	0.9 ± 0.0 ^f
C18:0	0.0	0.1 ± 0.0 ^f	0.1 ± 0.0 ^f	0.1 ± 0.0 ^f	0.1 ± 0.0 ^f	0.1 ± 0.0 ^f
C18:1(Δ 9)	0.4	0.7 ± 0.0 ^g	0.6 ± 0.0 ^g	0.6 ± 0.0 ^f	0.6 ± 0.0 ^f	0.6 ± 0.0 ^f
C18:1(Δ 11)	0.0	0.2 ± 0.0 ^g	0.2 ± 0.0 ^f	0.2 ± 0.0 ^f	0.2 ± 0.0 ^f	0.2 ± 0.0 ^f
C18:2(Δ 9,12)	0.4	0.6 ± 0.0 ^g	0.6 ± 0.0 ^f	0.6 ± 0.0 ^g	0.6 ± 0.0 ^g	0.6 ± 0.0 ^g
C18:3(Δ 9,12,15)	0.0	0.0 ± 0.0 ^f	0.0 ± 0.0 ^f	0.0 ± 0.0 ^f	0.0 ± 0.0 ^f	0.0 ± 0.0 ^f
SDA ^b	2.4	3.0 ± 0.0 ^{gh}	2.8 ± 0.2 ^{gh}	2.6 ± 0.0 ^g	3.1 ± 0.2 ^h	2.5 ± 0.0 ^f
C20:1(Δ 11)	0.0	0.0 ± 0.0 ^f	0.1 ± 0.0 ^f	0.1 ± 0.0 ^f	0.0 ± 0.0 ^f	0.0 ± 0.0 ^f
C20:4(Δ 5,8,11,14)	1.2	1.7 ± 0.0 ^h	1.5 ± 0.0 ^g	1.5 ± 0.0 ^f	1.5 ± 0.0 ^f	1.5 ± 0.0 ^f
C20:4(Δ 8,11,14,17)	0.4	0.6 ± 0.0 ^g	0.6 ± 0.0 ^f	0.5 ± 0.0 ^f	0.5 ± 0.0 ^f	0.5 ± 0.0 ^f
EPA ^c	3.7	4.7 ± 0.0 ^h	4.3 ± 0.1 ^g	4.2 ± 0.0 ^f	4.5 ± 0.1 ^g	4.1 ± 0.0 ^f
DPA(Δ 4,7,10,13,16)	5.3	5.8 ± 0.0 ^f	5.9 ± 0.1 ^{gh}	6.1 ± 0.0 ^{gh}	5.9 ± 0.0 ^g	6.1 ± 0.0 ^h
DPA(Δ 7,10,13,16,19)	0.4	0.6 ± 0.0 ^g	0.5 ± 0.0 ^f	0.5 ± 0.0 ^f	0.5 ± 0.0 ^f	0.5 ± 0.0 ^f
DHA ^d	85.0	80.8 ± 0.0 ^f	81.8 ± 0.2 ^{gh}	82.1 ± 0.2 ^{gh}	81.6 ± 0.2 ^g	82.2 ± 0.0 ^h
ω -3 PUFA ^e	91.5	89.1 ± 0.0 ^f	89.4 ± 0.1 ^g	89.3 ± 0.1 ^g	89.6 ± 0.0 ^g	89.3 ± 0.0 ^g

[0236]

[0237] a 용매 결정화 및 Lipozyme RM IM 촉매 에탄올 분해의 대용량 실험 후 오메가-3 지방산이 풍부한 지방산

[0238] b SDA; Stearidonic acid (6Z,9Z,12Z,15Z)

[0239] c EPA; Eicosapentaenoic acid (5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)

[0240] d DHA; Docosahexaenoic acid (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)

[0241] e ω -3 PUFA는 SDA, EPA, DPA(Δ 7,10,13,16,19), 그리고 DHA를 포함한다.

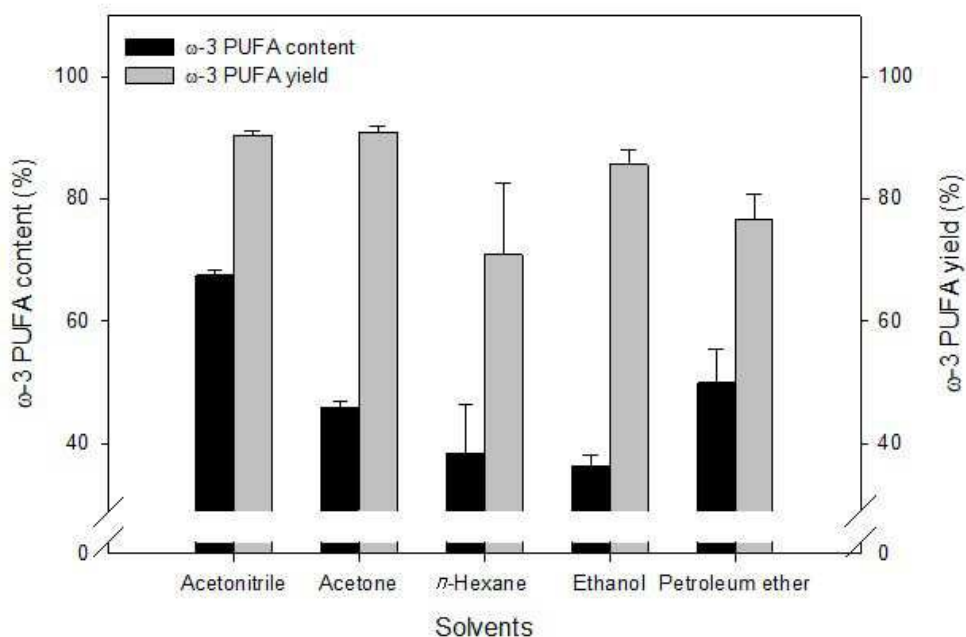
[0243] 상기 표 5에 나타난 바와 같이, 트리글리세라이드의 오메가-3 지방산 함량은 기질로 사용된 오메가-3 지방산이 농축된 지방산보다 약 2% 낮았다. 그러나 합성된 트리글리세라이드와 기질로 사용된 오메가-3가 농축된 트리글리세라이드 사이의 지방산 조성 차이는 매우 적었다. 오메가-3 지방산의 함량이 8 시간에 가장 높았으나, 4 시간 이후에는 통계적으로 차이가 없었다. 오메가-3 지방산의 함량이 가장 높은 8 시간에서 SDA와 EPA, DPA는 반응 후 함량이 증가하였다. 하지만 DHA는 약 3.5% 감소하였다.

[0245] 이상의 결과를 통해, 본 발명자들은 오메가-3 지방산이 농축된 트리글리세라이드는 상기 본 발명에 따른 3단계 과정을 통해 효과적으로 수득할 수 있는 것을 알 수 있었다. 특히 용매 결정화를 통해 오메가-3 지방산을 농축하는데 있어서 최적 조건은 용매, 온도, 유리지방산 대 용매 비율이 각각 acetonitrile, -40°C , 1:8 (w/v)인 것을 알 수 있었다. 이러한 조건에서 오메가-3 지방산은 액체 분획에 83.5%의 높은 함량으로 초기 참치유 지방산 대비 약 2.7배 이상 증가된 함량인 것을 확인할 수 있었고, 78.9%의 회수율을 달성하였다. 또한 본 발명에 따른 Lipozyme RM IM 촉매 에탄올화의 제2단계에서는 제1단계에서 수득한 액체 분획의 오메가-3 지방산을 더 농축할 수 있었으며, 이때의 최적 반응 조건은 온도, 물 비가 각각 20°C , 1:1인 것을 알 수 있었다. 이 조건 하에서는 에스테르화 되지 않은 지방산 분획에 약 92.5%의 오메가-3 지방산이 농축되어 있음을 확인할 수 있었다. 다음으로, 제3단계에서는 용매 결정화와 Lipozyme RM IM 효소 촉매 에탄올화에 의해 만들어진 농축된 오메가-3 지방산과 글리세롤을 기질로 하여 Lipozyme 435 촉매 에스테르화를 통해 트리글리세라이드로 합성되어지는데, 본 발명의 조건으로 수행할 경우, 약 84%의 트리글리세라이드로의 높은 전환율을 달성할 수 있음을 알 수 있었다.

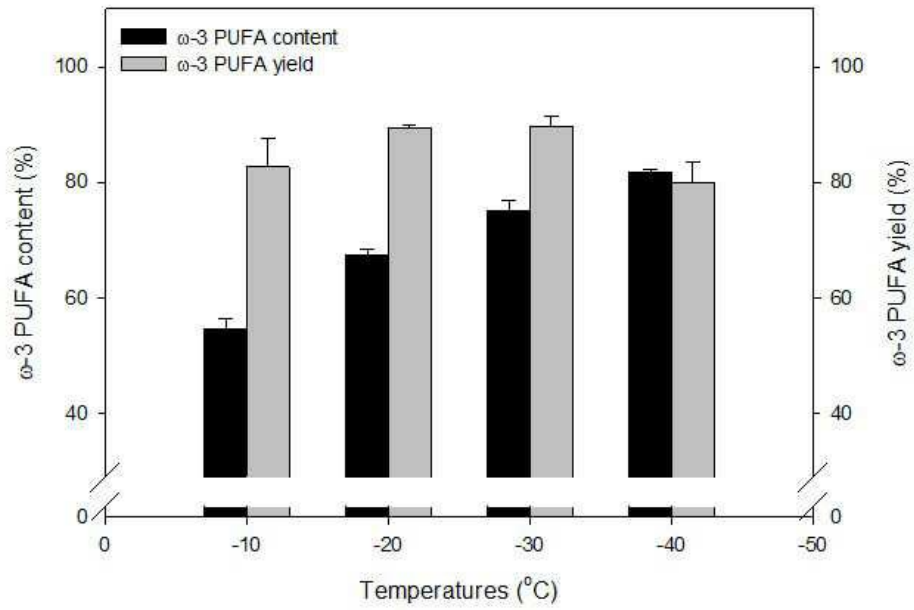
[0247] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

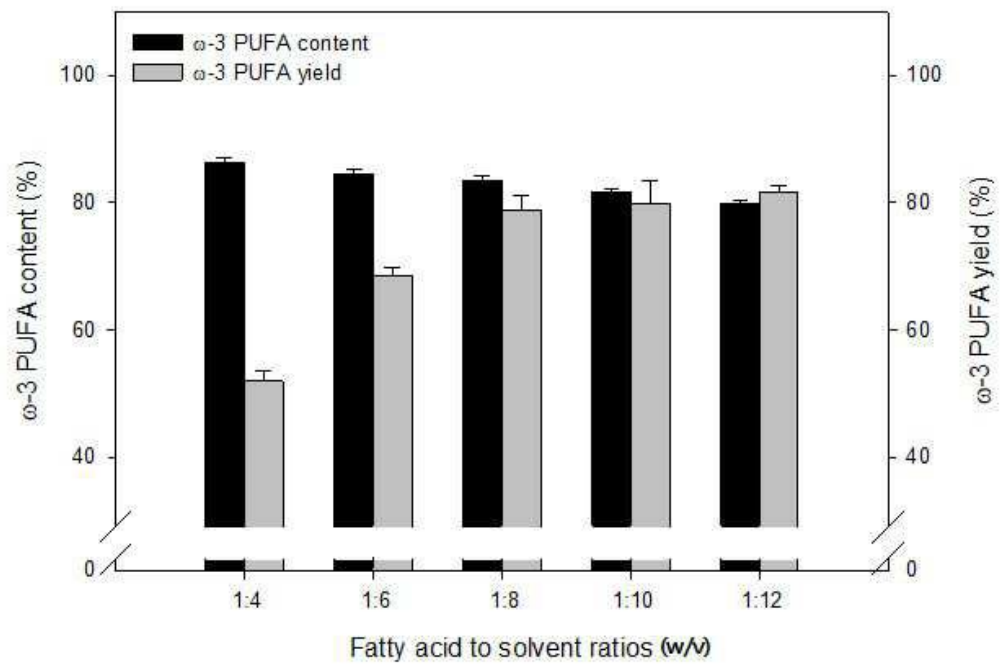
도면1



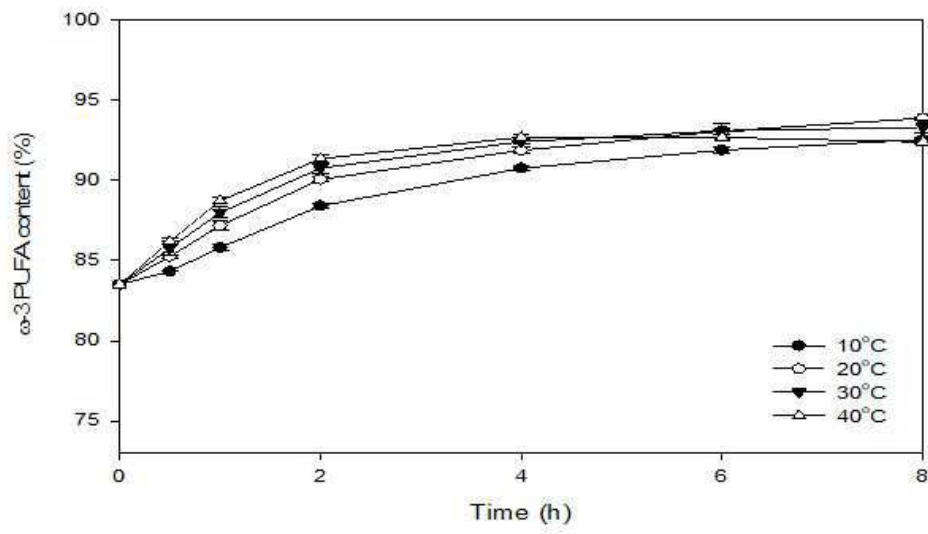
도면2



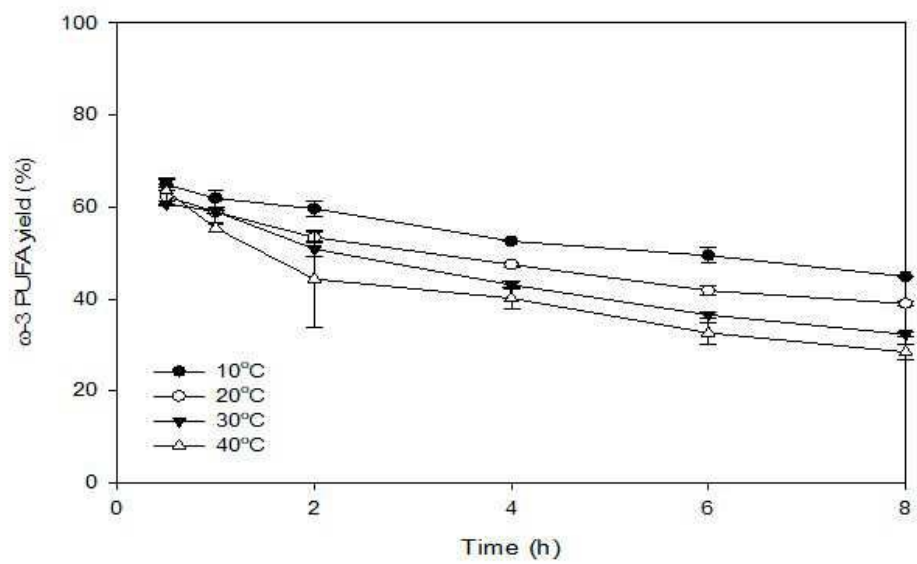
도면3



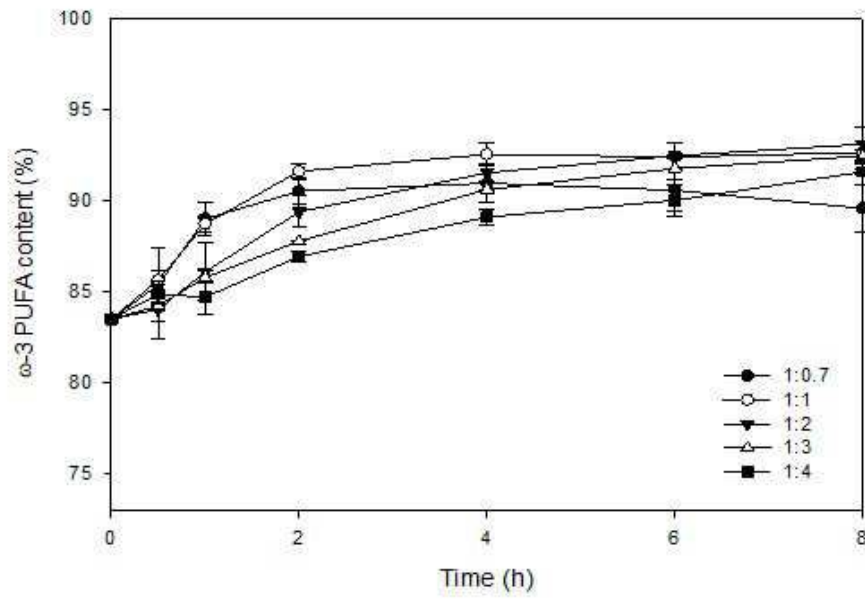
도면4



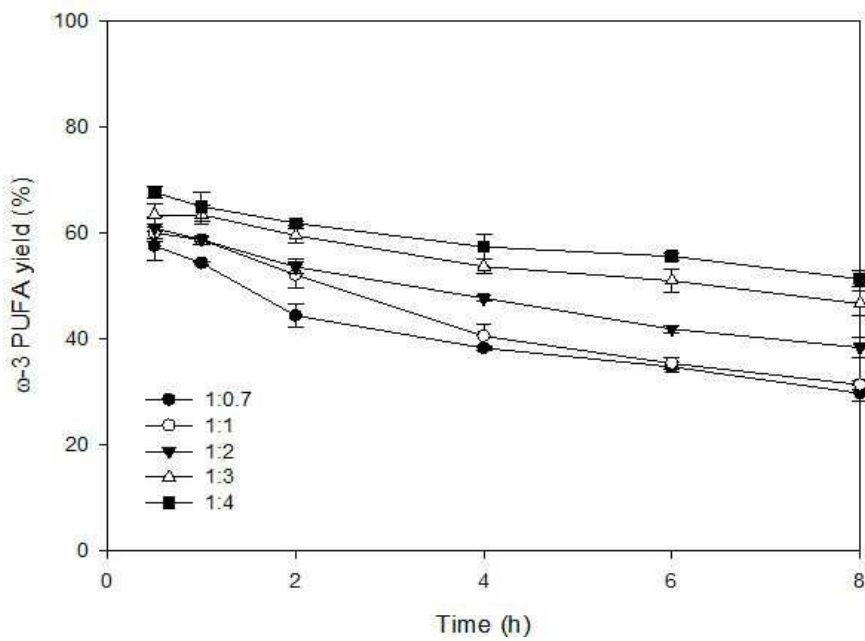
도면5



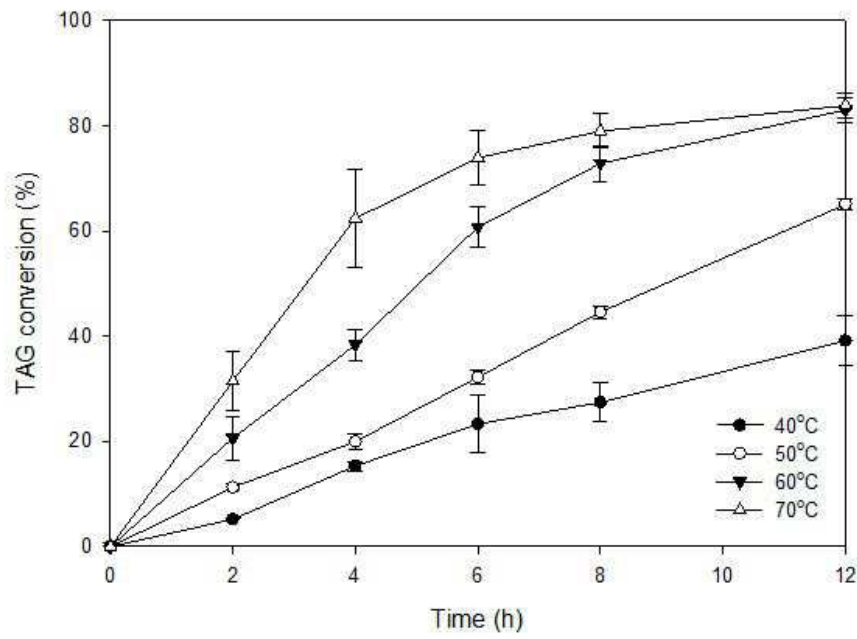
도면6



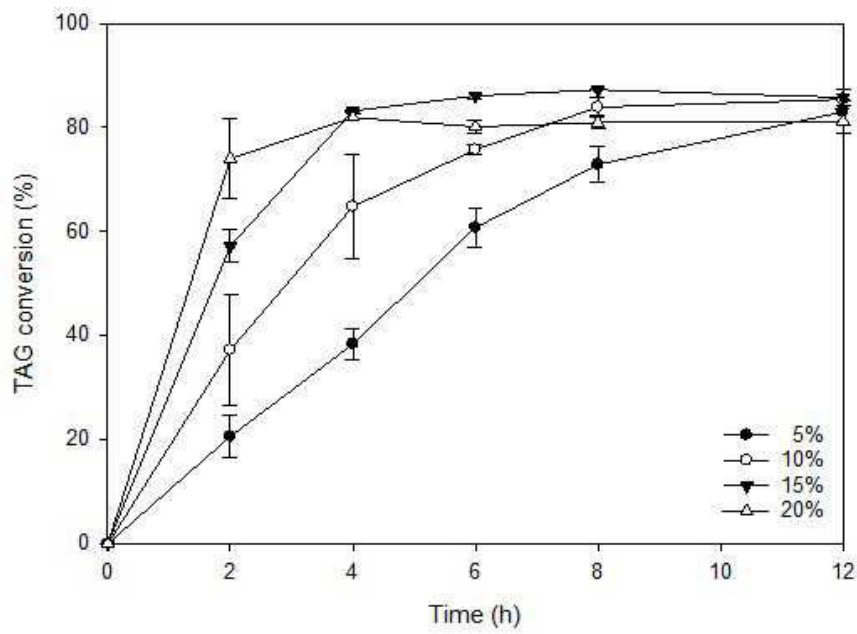
도면7



도면8



도면9



도면10

