(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0036397
(43) 공개일자 2014년03월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C11C 3/04 (2006.01) *C12P 7/64* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0101572
(22) 출원일자 2012년09월13일
심사청구일자 2012년09월13일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울시 성북구 안암로 145 (안암동)
(72) 발명자
김인환
서울 노원구 공릉로58길 176, 102동 1108호 (하계동, 우방아파트)
노다솜
서울 서초구 바우뫼로 91, 111동 1102호 (양재동, 우성아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
한양특허법인

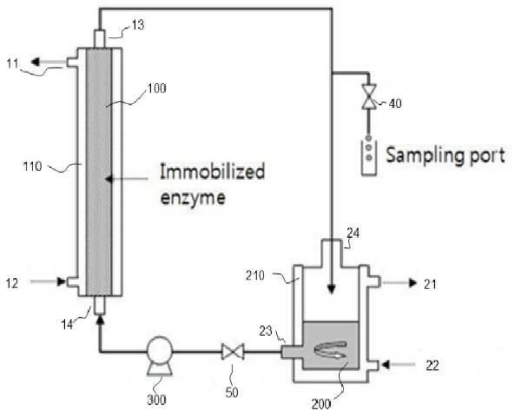
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **재순환식 연속 반응기에서 리파아제를 이용한 식물성오일로부터의 고농도 에루신산 에틸 에스터 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 재순환식 연속반응기(Recirculated Packed Bed Reactor)에서 리파아제를 촉매로 이용하여 에타놀리시스(ethanolosis)를 통하여 식물성오일로부터 회수율이 높은 고농도 에루신산 에틸 에스터를 제조하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

홍승인

서울특별시 성북구 동선동5가 146-17 베스트빌 302호

조정정

서울특별시 성북구 정릉3동 고려대학교 보건과학대학 호림관 304호

특허청구의 범위

청구항 1

재순환식 연속반응기에서 칸디다 안타르크티카(*Candida antarctica*) 유래의 리파아제를 촉매로 이용하여 식물성오일에 에탄올을 첨가하는 에타놀리시스(ethanolysis) 반응을 통해 에루신산 에틸 에스터를 농축하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 에루신산 에틸 에스터의 제조 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 식물성오일은 유채씨유 및 크램베유로부터 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 또는 2종인 것을 특징으로 하는 에루신산 에틸 에스터를 제조하는 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 에타놀리시스(ethanolysis) 반응은 35 내지 55℃의 반응 온도에서 수행되는 것을 특징으로 하는 에루신산 에틸 에스터의 제조방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 에타놀리시스(ethanolysis) 반응은 40 내지 50℃의 반응 온도에서 수행되는 것을 특징으로 하는, 에루신산 에틸 에스터의 제조방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 에타놀리시스(ethanolysis) 반응은 식물성오일과 에탄올의 몰 비율이 1: 60 ~ 1:100인 것을 특징으로 하는 에루신산 에틸 에스터를 제조하는 방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 에타놀리시스 반응의 머무름 시간은 3 내지 5분인 것을 특징으로 하며, 가장 좋게는 4분인 것을 특징으로 하는, 에루신산 에틸 에스터의 제조방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 칸디다 안타르크티카(*Candida antarctica*) 유래의 리파아제는 식물성오일과 에탄올의 총중량 100 중량부에 대해 건조 중량으로 2 내지 10 중량부로 포함되는 것을 특징으로 하는, 에루신산 에틸 에스터의 제조방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 재순환식 연속반응기는 반응기, 저장조, 반응기 워터자켓, 저장조 워터자켓, 순환기 및 정량펌프를 포함하며,

상기 재순환식 연속반응기를 이용하여 에루신산 에틸 에스터의 제조방법은

(a) 반응기 워터자켓 및 저장조 워터자켓은 각각의 물 순환기 (water circulator)와 연결하여 반응기 및 저장조의 반응온도를 조절할 수 있도록 하였으며, 반응을 시작하기 전에 반응기와 저장조는 물 순환기를 이용하여 반응온도로 예열하는 단계;

(b) 칸디다 안타르크티카(*Candida antarctica*) 유래의 리파아제를 상기 반응기에 투입하는 단계;

(c) 기질로 사용되는 식물성 오일과 에탄올을 1:60 내지 1:100의 몰 비율로 저장조 (reservoir)에 투입하는 단계;

(d) 상기 기질이 저장조의 유출부로부터 정량펌프 (metering pump)를 통하여 상향식으로 반응기의 유입부로 주입되는 단계;

(e) 상기 반응기 내에서 기질과 리파아제가 머무름 시간 동안 반응하는 단계;

(f) 상기 (e) 반응 후, 반응물이 반응기 유출부로부터 저장조 유입부를 통하여 저장조 내로 유입되는 단계;

(g) 상기 저장조에 유입된 반응물 및 기질 간의 혼합을 위하여 300 내지 500 rpm으로 교반시키는 단계; 및

(h) 상기 반응 혼합물을 이용하여 (d) 내지 (g) 단계를 반복하는 단계를 포함는 것을 특징으로 하는, 에루신산 에틸 에스터의 제조방법.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 제조되는 에루신산 에틸 에스터은 지방산 에틸 에스터 중 에루신산 에틸 에스터의 농도가 70% 이상이고, 지방산 에틸 에스터의 형태로 회수된 에루신산의 비율이 60% 이상인 것을 특징으로 하는, 에루신산 에틸 에스터의 제조 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 재순환식 연속반응기 (Recirculated Packed Bed Reactor)에서 리파아제를 촉매로 이용하여 에타놀리시스 (ethanolysis) 방법으로 지방산 에틸 에스터를 제조하는 방법과 이 반응 장치와 리파아제의 특이성을 이용하여 식물성오일로부터 고농도 (70% 이상) 에루신산 에틸 에스터의 제조에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 에루신산 (cis-13-docosenoic acid, erucic acid)은 유채씨, 월플라워, 겨자씨, 크램베(crambe) 씨 등 십자화과 식물에 저장된 트리아실글리세롤 (TAG) 안에서 발견되는 지방산이며 특히 크램베씨와 유채씨에 많이 존재한다. 에루신산은 플라스틱수지의 첨가제나 생분해성 윤활유 등에 유용하게 사용되어 왔다. 또한 에루신산은 동물실험을 통해 심장병을 일으키는 생리활성을 방해한다고 보고된 바 있으며, 부신백질이영양증 (adrenoleukodystrophy, ALD)이라는 유전적 장애 증상의 치료에 효과가 있는 것으로 연구되었다. 에루신산은 극도 경화 과정을 통해 베헤닌산으로 전환하기에 용이하며, 베헤닌산으로 전환하였을 때 활용성도 높다. 베헤닌산과 중쇄 지방산으로 구성된 카프레닌(Caprenin)이라고 불리는 재구성 지질 (structure lipid)은 소화과정 중 불완전한 흡수로 인해 원래 TAG의 반정도의 칼로리를 지니므로 저열량 유지로 활용 될 수 있다. TAG의 *sn*-1,3 위치에 베헤닌산이, *sn*-2위치에 올레인산이 결합된 BOB (B:베헤닌산, O:올레인산) 형태의 재구성 지질은 초콜릿 제조 공정에서 블루밍 방지제 (anti-blooming agent)로 사용된다.

[0003] 에루신산과 같이 산업적으로 혹은 영양학적으로 가치 있는 지방산의 경우 고농도로 농축시킴으로써 활용성을 높일 수 있다.

[0004] 일반적으로 크램베유(Crambe oil)에 함유되어 있는 에루신산의 함량은 63.4 중량%이며, 에루신산은 크램베유 트리아실글리세롤(TAG)의 *sn*-1,3 위치에 대부분 결합되어 있다. 최근 지방산을 농축시키는 반응으로 화학적인 반응 보다는 효소를 이용한 반응이 널리 사용되고 있다. 효소를 사용한 반응은 효소가 갖는 위치 또는 지방산 특이성을 이용하여 2-모노아실글리세롤(2-MAG)이나 고순도의 EPA, DHA, GLA 등 다가 불포화 지방산과 같은 부가가치 높은 제품을 생산하기 위하여 활용되고 있다. 그러나, 효소를 사용하여 지방산을 농축시키는 반응은 효소가 갖는 위치 또는 지방산 특이성, 유지의 종류, 반응 조건 등에 따라 다양한 요소가 반응에 영향을 끼치며, 이는 반응 결과에 큰 차이를 가져올 수 있다.

[0005] 이에, 본 발명자는 크램베유에 함유되어 있는 에루신산의 대부분이 트리아실글리세롤(TAG)의 *sn*-1,3 위치에 결합되어 있으므로 위치 특이성을 가지는 리파아제를 이용하여 크램베유과 에탄올의 에타놀리시스 반응을 통하여 에루신산을 농축하였다.

[0006] 에루신산 농축을 위한 에타놀리시스 반응은 산업화에 용이한 재순환식 연속반응기 (recirculated packed bed reactor, RPBR)에서 시행하였다. 종래에 사용되어진 회분식 반응의 경우 고정화 효소를 사용하여도 교반 동안의 마찰로 인하여 실제 재사용이 불가능하며, 반응 후에 결과물에서 효소를 분리하는 과정이 필요하다. 또한 회분식 반응은 연속식 반응에 비하여 공정의 효율성이 떨어지는 단점이 있다. 그러나 연속식 반응기의 경우 기질들이 잘 혼합되어 있는 경우에 사용이 가능하다는 제한 점이 있다. 연속식 반응기에서 기질들이 실질적으로 반응하는 시간은 머무름 시간뿐이기 때문에 충분한 반응이 이루어지지 못한다. 트리아실글리세롤 형태의 유지와 에

탄올을 혼합하여 반응시키는 에타놀리시스 반응의 경우에는 두 기질이 혼합될 수 있는 비율이 낮아 연속식 반응기로 사용하기에 어려움이 있다. 따라서 재순환식 연속반응기를 사용함으로써 연속식 반응기의 단점을 보완하고자 하였다. 재순환식 연속반응기의 경우 효소관을 통하여 반응된 물질이 기질과 다시 혼합되고 혼합된 반응물이 효소관을 통과하는 과정을 반복함으로써 재순환식 연속반응기에서는 실제 기질과 효소가 반응하는 시간이 머무름 시간보다 길어져서 잘 혼합되지 않던 기질들 간에 충분한 반응이 이루어질 수 있는 장점이 있다.

[0007] 이에 본 연구에서는 재순환식 연속반응기에서 에타놀리시스를 행하여 효소 반응기에 기질이 머무는 시간(머무름 시간)과 온도, 기질의 몰 비율과 같은 변수들에서 효율적으로 에루신산 에틸 에스터를 농축하기 위한 최적의 반응 조건을 찾아 본 발명을 완성시켰다.

[0008] 반응 조건을 찾아 본 발명을 완성시켰다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) KR 0808806 B

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 식물성오일의 유형이 주로 트리아실글리세롤 형태이므로 에탄올과 혼합이 잘 이루어지지 않아 일반 연속식 반응장치를 이용하였을 때, 충분한 반응이 이루어지지 않는다는 점이 문제를 해결하는데 목적이 있다.

[0011] 또한, 본 발명은 식물성오일의 트리아실글리세롤에 에루신산은 주로 *sn*-1,3위치에 결합되어 있으므로 위치 특이성을 갖는 효소를 활용하는 것으로, 효소를 이용한 에타놀리시스 (ethanolysis) 반응을 산업화에 용이한 재순환식 연속 반응장치로 식물성오일에서 에루신산 에틸 에스터를 농축하는 방법을 제공하는데 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명은 일반 연속식 반응장치를 재순환식 연속반응기로 대체하여 트리아실글리세롤와 에탄올의 반응이 충분히 이루어질 수 있도록 장치에 의한 문제점을 해결하였고, 트리아실글리세롤의 *sn*-1,3위치에 주로 결합되어 있는 에루신산을 농축하기 위하여 칸디다 안타르크티카 (*Candida antarctica*) 유래의 리파아제가 기질의 영향에 의하여 갖는 위치 특이성을 이용하여 상기의 문제를 해결하였다.

발명의 효과

[0013] 본 발명의 고농도의 에루신산 에틸 에스터의 제조방법에 따르면, 칸디다 안타르크티카에서 유래된 리파아제의 위치 특이성에 의하여 짧은 반응시간에도 합성된 지방산 에틸 에스터 중의 높은 농도(약 70% 이상)의 에루신산 에틸 에스터를 얻을 수 있었고, 재순환식 연속반응기를 이용하여 보다 작업의 효율성을 높일 수 있었다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 에타놀리시스 반응에 사용된 재순환식 연속반응기 (Recirculated Packed Bed Reactor, RPBR)를 나타낸 그림이다.

도 2는 실시예 1 내지 3 및 비교예 1 내지 2의 에타놀리시스 반응에서 반응온도에 따라 얻어진 지방산 에틸 에스터 내 에루신산 에틸 에스터의 농도 및 지방산 에틸 에스터로 회수된 에루신산의 비율에 대한 실험 결과를 나타낸 그래프이다.

도 3는 실시예 4 내지 6 및 비교예 3 내지 4의 에타놀리시스 반응에서 기질 간의 몰비율에 따라 얻어진 지방산 에틸 에스터 내 에루신산 에틸 에스터의 농도 및 지방산 에틸 에스터로 회수된 에루신산의 비율에 대한 실험 결과를 나타낸 그래프이다.

도 4는 실시예 7 내지 10 및 비교예 5의 에타놀리시스 반응에서 머무름 시간에 따라 얻어진 지방산 에틸 에스터 내 에루신산 에틸 에스터의 농도 및 지방산 에틸 에스터로 회수된 에루신산의 비율에 대한 실험 결과를 나타

낸 그래프이다.

도 5는 실시예 7 내지 10 및 비교예 5의 머무름 시간에 따른 에타놀리시스 반응 생성물인 지방산 에틸 에스터 내 에루신산 에틸 에스터의 농도와 지방산 에틸 에스터로 회수된 에루신산의 비율 간의 관계를 나타낸 실험결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하, 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다.

[0016] 본 발명은 재순환식 연속반응기에서 칸디다 안타르크티카 유래의 리파아제를 촉매로 이용하여 식물성오일에 에탄올을 첨가하여 에타놀리시스 반응을 통하여 에루신산 에틸 에스터를 농축하는 단계를 포함하는 것으로, 식물성오일로부터 에루신산을 지방산 에틸 에스터 형태로 고농도 농축물을 제조하는 에루신산 에틸 에스터의 제조방법에 관한 것이다.

[0017] 본 발명에서 사용되는 칸디다 안타르크티카 유래의 리파아제는 기질의 형태 및 조성에 따라 트리아실글리세롤의 *sn*-1,3 위치에 있는 지방산과 선택적으로 반응할 수 있는 가능성을 가지고 있으며, 상기 고정화된 효소는 수차례 반복 사용이 가능하다.

[0018] 상기 식물성 오일은 고 에루신산을 포함하는 유채씨유 및 크램베유를 사용하는 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 크렘베유를 사용할 수 있다.

[0019] 본 발명에 따라 식물성오일에서 제조된 고농도 에루신산 에틸 에스터는 지방산 에틸 에스터 중 에루신산 에틸 에스터의 농도가 70% 이상인 것과 함께 지방산 에틸 에스터의 형태로 회수된 에루신산의 비율이 60% 이상인 것을 의미하며, 보다 바람직하게는 에루신산 에틸 에스터의 농도가 70% 이상이면서 지방산 에틸 에스터의 형태로 회수된 에루신산의 비율이 75% 이상인 결과물을 의미한다.

[0020] 본 발명에서 이용되는 에탄올은 순도 99.9%로 수분함량이 낮은 에탄올이면 어느 것이나 바람직하다.

[0021] 본 발명은 재순환식 연속반응기에서 칸디다 안타르크티카 (*Candida antarctia*) 유래의 리파아제를 촉매로 허용하여 식물성오일과 에탄올을 에타놀리시스 반응하여 고농도의 에루신산 에틸 에스터를 제조하는 방법으로, 본 발명과 이 효소를 이용한 반응은 효소의 공급원과 고정화와 같은 효소의 특성과 기질의 온도에 대한 안정성 및 운동성, 그 외에 반응 매체로 사용되는 용매, 반응물의 pH 등에 영향을 받을 수 있으므로, 사용되는 효소의 종류, 특성 및 기질의 종류, 용매의 종류 등에 따라 우수한 효율을 가지는 적합한 반응 조건은 차이가 있으며, 이러한 최적 조건을 찾는 것은 에루신산과 같이 산업적, 영양학적으로 가치가 있는 지방산을 효율적으로 농축하여 그 활용성을 높이는데 중요하다.

[0022] 본 발명의 에타놀리시스 반응은 35 ℃ 내지 55 ℃의 조건에서 수행하는 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 40 ℃ 내지 50 ℃에서 수행할 수 있으며, 45 ℃에서 수행하는 것이 가장 바람직하다. 반응온도가 55 ℃를 초과하는 경우, 효소의 활성 반감기가 단축되거나, 효소 단백질의 변성을 유도함으로써 효소 활성을 저해시킬 수 있으며, 35 ℃ 미만인 경우, 에루신산 에틸 에스터의 회수율이 감소하며, 효소의 활성이 낮아진다.

[0023] 또한, 본 발명의 에타놀리시스 반응은 기질로서 식물성오일을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 고 에루신산 유채씨유 및 크램베유를 사용가능하며, 보다 바람직하게는 크램베유를 본 발명의 기질로 사용할 수 있다. 상기 식물성오일과 에탄올의 몰 비율이 1:60 내지 1:100인 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 1:60인 것이다. 상기

크램베유와 에탄올의 몰 비율이 1:60 미만일 경우에는 지방산 에틸 에스터의 형태로 회수되는 에루신산의 비율이 감소하며, 1:100을 초과할 경우에는 과량의 에탄올에 의하여 효소의 활성이 저해될 문제점이 있을 수 있으며, 반응 잔류물의 감소, 기질의 비용절감, 후공정 간소화를 위하여 에탄올 용매의 용량을 제한하고자 1:60의 몰 비율을 사용하는 것이 바람직하다.

[0024] 본 발명에서 "머무름 시간"은 혼합된 기질이 효소관을 통과하는 시간으로서 실제 반응이 일어나는 시간을 의미한다. 따라서 재순환 연속반응기를 이용하는 본 발명에서의 머무름 시간은 반응기 내에 효소가 차지하고 남은 부피와 반응기에 기질 혼합물이 이동하는 속도를 조절하여 설정할 수 있다.

[0025] 본 발명은 상기 식물성오일과 에탄올의 혼합물이, 칸디다 안타르크티카 유래의 리파아제를 재순환식 연속반응기 내에 머무름 반응이 일어나는 상기 에타놀리시스 반응의 머무름 시간은 1 내지 6분인 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 3 내지 5분이며, 가장 바람직하게는 4분이다.

[0026] 재순환식 연속반응기를 이용하는 반응에서 머무름 시간이 6분을 초과하면 혼합된 기질이 효소관까지 이동하는 중에 분리되어 효소관 내에서 기질이 완전하게 혼합되지 않고 특히 에타놀리시스의 경우 분리된 에탄올이 고정화 효소의 친수성 부분과 결합하여 효소의 활성을 떨어뜨릴 수 있다. 반면 머무름 시간이 1분 미만이면 기질 혼합물이 흐름 속도에 의한 압력으로 고정화 효소에 물리적 손상이 발생할 수 있다. 따라서, 재순환식 연속반응기를 이용한 본 발명에서 머무름 시간의 설정이 반응 결과에 중요한 영향을 준다.

[0027] 상기 칸디다 안타르크티카 유래의 리파아제의 필요량은 식물성오일과 에탄올의 중량의 합 100 중량부에 대하여 건조 중량으로 2 내지 10 중량부, 보다 바람직하게는 4 내지 7 중량부로 포함될 수 있다. 상기 효소의 함량이 2 중량부 미만이면 반응속도가 늦어지며, 10 중량부를 초과하면 경제성이 감소하는 문제가 있다.

[0028] 상기와 같이 재순환식 연속반응기에서 칸디다 안타르크티카 유래의 리파아제를 촉매로 이용하여 크램베유와 에탄올을 1:60 내지 1:100의 몰 비율로 35 내지 55 ℃에서, 머무름 시간 1 내지 6분의 조건에서 에타놀리시스 반응을 수행함으로써, 에루신산 에틸 에스터의 농도가 70%이상이면서 지방산 에틸 에스로의 형태로 회수된 에루신산의 비율이 60% 이상인 농축물을 얻을 수 있다.

[0029] 본 발명에서 에타놀리시스 반응은 도 1에 나타낸 바와 같은 재순환식 연속반응기에서 시행되는 것이 바람직하다.

[0030] 상기 재순환 연속반응기는 효소(리파아제)가 들어가는 반응기; 상기 반응기의 반응물 유입부 및 유출부에 효소의 방출을 막기 위해 구비된 스테인레스 스틸망; 상기 반응기 외벽 둘러싸는 반응기 워터자켓; 상기 반응기 워터자켓과 연결되는 순환기; 상기 반응기와 연결되며, 기질이 들어가는 저장조; 상기 저장조 외벽을 둘러싸는 저장조 워터자켓; 및 상기 저장조 유출부과 반응기의 유입부 사이에 위치하여 저장조의 기질을 주입시키는 정량펌프를 구비하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않고 당업계에서 사용되는 통상적인 재순환식 연속반응기이면 사용 가능하다.

[0031] 본 발명의 재순환식 연속반응기에서의 에타놀리시스 반응은 보다 상세하게는,

[0032] (a) 반응기 워터자켓 및 저장조 워터자켓은 각각의 물 순환기 (water circulator)와 연결하여 반응기 및 저장조의 반응온도를 조절할 수 있도록 하였으며, 반응을 시작하기 전에 반응기와 저장조는 물 순환기를 이용하여 반응온도로 예열하는 단계;

[0033] (b) 상기 칸디다 안타르크티카(*Candida antarctica*) 유래의 리파아제를 상기 반응기에 투입하는 단계;

[0034] (c) 기질로 사용되는 식물성 오일과 에탄올을 1:60 내지 1:100의 몰 비율로 저장조 (reservoir)에 투입하는 단계;

[0035] (d) 상기 기질이 저장조의 유출부로부터 정량펌프 (metering pump)를 통하여 상향식으로 반응기의 유입부로 주

입되는 단계;

[0036] (e) 상기 반응기 내에서 기질과 리파아제가 머무름 시간 동안 반응하는 단계;

[0037] (f) 상기 (e) 반응 후, 반응물이 반응기 유출부로부터 저장조 유입부를 통하여 저장조 내로 유입되는 단계;

[0038] (g) 상기 저장조에 유입된 반응물 및 기질 간의 혼합을 위하여 300 내지 500 rpm으로 교반시키는 단계; 및

[0039] (h) 상기 반응 혼합물을 이용하여 (d) 내지 (g) 단계를 반복하는 단계를 포함할 수 있다.

[0040]

[0041] 상기 머무름 시간은 반응기에 효소가 채우고 남은 공간의 부피를 측정하고, 정량펌프를 이용하여 반응기로 기질이 주입되는 속도를 조절함으로써 반응기에 반응물이 효소와 접촉하는 시간으로 설정할 수 있다.

[0042] 또한, 일정 시간 간격으로 반응된 물질과 반응되지 않은 물질이 혼합된 상태 ('반응 혼합물' 이라 칭함)의 저장조 내의 시료를 채취하고 이 때의 시간 간격을 반응시간이라 한다.

[0043] 본 발명에서 반응 시간은 50분 내지 120분인 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 60분 내지 120분이고, 가장 바람직하게는 80분 내지 100분이다. 반응 시간이 너무 짧으면 에루신산이 지방산 에틸 에스터로 회수되는 양이 감소하며, 120분 이상의 긴 반응 시간에서는 에루신산 에틸 에스터의 농도가 낮아져서 농축의 의미가 없다.

[0044] 반응 시간이 상기 범위일 때 에루신산 에틸 에스터의 농도도 높이면서 지방산 에틸 에스터의 형태로 회수되는 에루신산의 비율도 높일 수 있는 효율적인 농축이 가능하다.

[0045] 또한, 본 발명은 본 발명의 고농도 에루신산 에틸 에스터의 제조방법에 의하여 제조되는 에루신산 에틸 에스터 농축물을 제공한다.

[0046] 본 발명에서 "에루신산 에틸 에스터 농축물"은 재순환식 연속반응기에서 칸디다 안타르크티카 유래의 리파아제를 이용하여 크램베유:에탄올의 몰 비율 1:60 내지 1:100, 반응온도 35 내지 55 ℃, 머무름 시간 3분 내지 5분의 조건에서 크램베유의 에타놀리시스 반응 50 내지 120분 후 얻어진 생성물을 의미한다.

[0047] 결론적으로 최대의 에루신산 에틸 에스터를 농축시킬 수 있었던 본 발명의 반응 조건은 재순환식 연속반응기를 이용하여 몰 비율은 1:60 (크램베유:에탄올), 반응 온도는 45 ℃, 머무름 시간은 4분의 조건에서 반응 시간 90분일 때이다.

[0048] 상기 에루신산 에틸 에스터 형태의 에루신산은 지방산의 형태에 비하여 산화 안정성이 우수하며, 아실글리세롤류에 비하여 기타 가공제품에 응용하기에 용이하다. 고농도의 에루신산 에틸 에스터의 경우 아실글리세롤류와 비점의 차이에 의하여 증류방법으로 쉽게 분리될 수 있다.

[0049] 이하, 본 발명을 하기의 실시예 및 실험예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 다만, 하기의 실시예 및 실험예는 본 발명의 예시로써, 본 발명의 권리범위가 이에 의하여 한정되지 않는다.

[0050] **참조예 1. 크램베유 (crambe oil)의 지방산 조성 분석**

[0051] **(1) 재료**

[0052] 본 실시예에서 사용한 크램베유 (crambe oil)는 Technology Crops International (Kensington, PE, 캐나다)로부터 제공 받았으며, 리파아제는 칸디다 안타르크티카 (*Candida antarctica*)에서 유래된 고정화 효소인 Novozym 435 (Novo Nordisk Bioindustry Ltd. 한국)을 이용하였다. 에탄올 (순도 99.9%)을 비롯한 실험에 사용된 모든 시약은 분석용으로 제조된 시약을 사용하였다.

[0053] **(2) *sn*-2 위치의 지방산 조성 분석**

[0054] 크램베유 트리아실글리세롤의 *sn*-2 위치에 지방산 조성을 분석하였다. 트리아실글리세롤 5 mg에 1M Tris buffer (pH 7.6) 2mL, 0.05% 담즙염 0.5 mL, 2.2% $CaCl_2$ 0.2 mL, 췌장 리파아제 3 mg을 넣고 섞어 주었다. 37℃ 수조에서 2분간 방치한 후 꺼내 볼텍싱하고, 디에틸에테르로 추출한 후 무수황산나트륨으로 수분을 제거해 주었다. 추출한 반응물을 TLC plate (실리카겔 G, Alltech Assocciates, Inc., Deerfield, IL, 미국)에 로딩한 후 부피비 50:50:1의 헥산/디에틸에테르/아세트산 (hexane/diethyl ether/ acetic acid)인 전개조에 넣고 분리시켰다. 2-모노아실글리세롤 (2-MAG)부분의 띠를 긁어 디에틸에테르로 추출한 후 메틸에스터화시켜 GC로 분석하여 *sn*-2위치의 지방산 조성을 확인하였다. *sn*-1,3 위치의 지방산 조성은 *sn*-2의 지방산 조성으로부터 하기 수학식 1을 이용하여 계산하였다.

[0055] <수학식 1>

[0056] $$sn1,3\text{위치의 지방산조성}(mol\%) = ((\text{총 지방산조성}(mol\%) - sn2\text{위치의 지방산조성}(mol\%)) \times \frac{3}{2}$$

[0057] 그 결과를 표 1에 기재하였다.

표 1

[0058]

지방산		TAG[b]	TAG내 위치	
			sn-2	*sn*-1,3
팔미트산 (palmitic acid)	16:0	1.8	0.5	2.3
팔미톨레산 (palmitoleic acid)	16:1(n-7)	0.2	0.5	0.1
스테아르산 (Stearicacid)	18:0	0.7	0.2	0.9
올레산 (oleic acid)	18:1(n-9)	15.4	54.0	_
리놀레산 (linolenic acid)	18:2(n-6)	8.2	29.8	_
알파-리놀렌산 (alpha-linolenic acid)	18:3(n-3)	2.2	9.5	_
아라키드산 (Arachidic acid)	20:0	0.9	0.4	1.1
에이코센산 (Eicosenoic acid)	20:1(n-9)	1.9	0.5	2.6
베헨산 (Behenic acid)	22:0	2.4	1.2	2.9
에루신산 (Erucic acid)	22:1(n-9)	63.4	3.3	98.7
리그노세르산 (Lignoceric acid)	24:0	1.1	0.0	1.5
네르본산 (nervonic acid)	24:1(n-9)	1.7	0.1	2.4

[a]모든 결과는 두 번 반복실험하여 그 평균값을 사용하였다.

[b]TAG= 크램베유의 트리아실글리세롤

[0059] 본 연구에서 사용한 원료인 크램베유의 지방산 조성을 표 1에 나타내었다. 상기 표 1에 나타낸 바와 같이 크램베유의 트리아실글리세롤에 결합되어 있는 주요 지방산은 올레인산 (C18:1, n-9, 15.4 wt%), 리놀렌산 (C18:2, n-6, 8.2 wt%), 에루신산(C22:1, n-9, 63.4 wt%) 이었다. 에루신산의 98% 이상이 트리아실글리세롤의 *sn*-1,3 위치에 결합되어 있었으나, 올레인산과 리놀렌산의 대부분은 *sn*-2 위치에 결합되어 있었다. 이러한 결과는 종래

의 크램베유(crambe oil)을 분석한 다른 연구들과도 일치하였다.

[0060] **실시예 1 내지 7 및 비교예 1 내지 8: 크램베유의 에루신산 에틸 에스터 농축**

[0061] 하기 표 2 내지 4에 기재된 반응 온도, 유지 및 에탄올의 몰 비율 및 머무름 시간을 반응 조건으로 하여, 하기 실험방법 대로 크램베유로부터 에루신산 에틸 에스터를 농축하였다.

[0062] **(1) 에루신산 에틸 에스터의 농축 실험방법**

[0063] 본 발명에서 에타놀리시스 반응은 도 1에서와 같은 재순환식 연속반응기 (recirculating packed bed reactor)에서 시행되었다. 효소가 들어가는 반응기는 유리 재질의 길이 300mm, 내경 10mm인 컬럼 형태로 되어 있으며, 반응기 외벽을 워터자켓으로 만들어 순환기(circuator)와 연결하여 반응 온도를 조절할 수 있도록 하였다. 고정화된 칸디다 안타르크티카(*Candida antarctica*) 유래의 리파아제(Novozym 435)는 건조시켜 5g을 반응기에 넣어 사용하였으며, 반응기 입구에는 효소가 빠져 나오지 않도록 스테인레스 스틸 망 (50mesh)을 장착하였다. 기질로 사용된 크램베유(crambe oil)와 에탄올은 무게를 총 100g으로 하여 각각의 몰 비율을 조절하였고 기질은 높이 270mm, 내경 120mm인 유리 재질의 워터자켓이 장착된 저장조(reservoir)에 넣었다. 반응을 시작하기 전에 반응기와 저장조(reservoir)는 water circulator(Model CW-05G, JeioTech)를 이용하여 반응시키고자 하는 각각 반응 온도로 예열시켰다. 저장조에 있는 반응물은 400rpm으로 교반시켜 기질과 반응을 거친 물질들이 잘 혼합되어 정량펌프(Model QG 150, Syosset, NY, 미국)를 통하여 상향식(upward type)으로 반응기로 주입되도록 하였다. 컬럼에 효소가 채우고 남은 공간의 부피를 측정하고, 정량펌프(metering pump)를 이용하여 반응기로 기질이 주입되는 속도를 조절함으로써 반응기에 반응물이 효소와 접촉하는 머무름 시간을 설정하였다. 일정 시간 간격으로 반응된 물질과 반응되지 않은 물질이 혼합된 상태의 저장조 내의 시료를 채취하고, 이때의 시간 간격을 반응시간이라 한다. 에루신산 에틸 에스터의 농축을 위한 최적의 조건을 찾기 위하여 반응시간은 360분 동안 실시하였다.

[0064] **실험예 1. 반응온도 조절에 따른 크램베유의 에루신산 에틸 에스터 농축 효율 실험 (실시예 1 내지 3 및 비교예 1 내지 2)**

[0065] **(1) 실험 방법**

[0066] 크램베유로부터 고농도 에루신산을 위한 최적의 온도 조건을 찾기 위하여, 각각 하기 표 2에 기재된 반응 온도, 유지 및 에탄올의 몰 비율, 머무름 시간 및 반응시간을 반응 조건으로 하여 상기 에루신산 에틸 에스터의 농축 실험방법으로 시행하였다.

표 2

[0067]

	반응 온도 (℃)	몰비율 (크램베유: 에탄올)	머무름 시간	반응시간
실시예 1	35	1:60	4 분	90 분
실시예 2	45	1:60	4 분	90 분
실시예 3	55	1:60	4 분	90 분
비교예 1	15	1:60	4 분	90 분
비교예 2	25	1:60	4 분	90 분

[0068] **(2) 분석 방법**

[0069] 상기 실시예 1 내지 3 및 비교예 1 내지 2로부터 얻은 각각의 반응 혼합물(반응된 물질과 반응되지 않은 물질이 혼합된 상태)은 일정한 반응시간에 저장조(reservoir)에서 120㎕씩 시료를 채취하였다. 채취한 시료는 880mL의 클로로포름에 녹인 후 불꽃이온화검출기가 장착된 가스크로마토그래피(Model 3800; Varian, Palo Alto, CA, 미국)에서 분석하여 합성된 지방산 에틸에스터와 잔류하는 트리아실글리세롤을 비롯한 부산물인 모노아실글리세롤이나 디아실글리세롤의 조성을 확인하였다. 컬럼은 DB-1ht column (15 m × 0.25 mm i.d.; J&W Scientific,

Folsom, CA, 미국)을 사용하였고 오븐 온도는 150 ℃에서 1분 동안 유지시키는 것을 시작으로 10 ℃ min^{-1}로 365 ℃까지 올려서 20분 동안 머무르도록 설정하였다. 운반 기체로는 헬륨이 사용되었고, 기체 유속은 50 mL min^{-1}으로 하였다. 주입부와 검출기의 온도는 각각 375 ℃와 380 ℃로 하였다. 분석 결과를 통하여 지방산 에틸 에스터 부분의 에루신산 농도와 회수율을 계산하였다.

[0070] <수학식 2>

[0071]
$$\text{에루신산 에틸 에스터의 농도} = \frac{\text{에루신산 에틸 에스터의 함량}}{\text{지방산 에틸 에스터의 함량}} \times 100$$

[0072] <수학식 3>

[0073]
$$\text{에루신산 에틸 에스터의 회수율 (yield)} = \frac{\text{에틸 에스터화된 에루신산 함량}}{\text{크램베유내의 에루신산의 함량}} \times 100$$

[0074] **(3) 분석결과**

[0075] 본 발명의 효소를 이용한 반응의 최적온도의 설정은 효소의 공급원과 고정화와 같은 효소의 특성과 기질의 온도에 대한 안정성 및 운동성, 그 외에 반응 매체로 사용되는 용매, 반응물의 pH 등에 의하여 영향을 받을 수 있다.

[0076] 본 발명의 온도 효과를 알아보기 위한 실험은 실시예 1 내지 3 및 비교예 1 내지 2에 나타낸 바와 같이 크램베유와 에탄올의 몰 비율을 1:60으로 혼합하여 4분의 머무름 시간에서 90분의 반응 시간 동안 수행하였고, 온도 범위는 15 ~ 55 ℃에서 실시하였다.

[0077] 그 결과를 상기 (2) 분석 방법을 이용하여, 에타놀리시스 반응을 통하여 생성되는 지방산 에틸 에스터 내에 에루신산 에틸 에스터의 농도 (에루신산 에틸 에스터의 농도)와 지방산 에틸 에스터의 형태로 회수되는 에루신산의 비율 (에루신산 에틸 에스터의 회수율)을 확인함으로써 최적 온도 조건을 설정하였으며, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0078] 도 2는 실시예 1 내지 3 및 비교예 1 내지 2의 실험한 각 온도 별 지방산 에틸 에스터 내에서 에루신산 에틸 에스터의 농도와 지방산 에틸 에스터의 형태로 회수된 에루신산의 비율을 나타낸 값이다. 반응 시간 90분 동안에 에루신산 에틸 에스터의 농도는 온도에 따른 유의적 차이를 보이지 않고 약 79%를 나타내었다. 반면 지방산 에틸 에스터로 회수된 에루신산의 비율은 15 ℃에서 45 ℃까지는 온도가 증가하면서 회수율도 함께 증가하였으나 55 ℃에서는 회수율이 감소하는 경향을 보였다.

[0079] 반응온도가 높아지면서 에루신산 에틸 에스터의 농도가 감소하거나 에틸 에스터 형태로 회수된 에루신산의 양이 증가하는 것은 높은 반응 온도는 기질 혼합물의 점도를 낮춰주어, 반응물과 생성물의 효소 표면이나 내부로의 이동 효율성이 높아지게 되므로 반응 속도가 빨라진 것으로 분석된다. 반면 온도가 높아지게 되면 효소의 활성의 반감기가 단축되는 단점이 있으며, 지나치게 높은 반응온도는 효소 단백질의 변성을 유도함으로써 활성을 저해하기도 한다. 따라서 상기 실험 결과, 에루신산을 농축하면서 많은 양을 회수하기 위한 재순환식 연속반응기에서 시행된 에타놀리시스 반응에서의 바람직한 온도는 35 ℃ ~ 55 ℃이며, 최적온도는 45 ℃인 것으로 나타났다.

[0080] **실험예 2. 기질의 몰 비율 조절에 따른 크램베유의 에루신산 에틸 에스터 농축 효율 실험(실시예 4 내지 6 및 비교예 3 내지 4)**

[0081] **(1) 실험 방법**

[0082] 크램베유로부터 고농도 에루신산을 위한 최적의 기질의 몰비율 조건을 찾기 위하여, 각각 하기 표 3에 기재된 반응 온도, 유지 및 에탄올의 몰 비율, 머무름 시간 및 반응 시간을 반응 조건으로 하여 상기 에루신산 에틸 에

스터의 농축 실험방법으로 시행하였다.

표 3

[0083]

	반응 온도 (℃)	몰비율 (크램베유: 에탄올)	머무름 시간	반응시간
실시예 4	45	1:60	4 분	90 분
실시예 5	45	1:80	4 분	90 분
실시예 6	45	1:100	4 분	90 분
비교예 3	45	1:20	4 분	90 분
비교예 4	45	1:40	4 분	90 분

[0084] **(2) 분석 방법**

[0085] 분석 방법은 실시예 4 내지 6 및 비교예 3 내지 4를 분석한 것 이외에는 실험예 1의 분석방법과 동일한 방법으로 실시하였다.

[0086] **(3) 분석 결과**

[0087] 상기 실시예 4 내지 6 및 비교예 3 내지 4의 에타놀리시스 반응을 통하여 생성된 지방산 에틸 에스터 안의 에루신산의 농도와 에루신산의 회수율에 대한 몰 비율의 효과에 대한 결과를 도 3에 나타내었다. 크램베유와 에탄올 사이의 몰 비율은 1:20부터 1:100까지 연구되었고 이 연구를 위하여 반응온도는 45 ℃, 재순환식 연속반응기 안에서 기질의 머무름 시간은 4분으로 반응시간은 90분으로 고정하여 실험을 진행하였고 도 3에 이에 대한 결과를 제시하였다.

[0088] 도 3에서 보여주는 에루신산 에틸 에스터의 농도는 약 80%가 유지되어 크램베유와 에탄올 간의 몰 비율의 변화에 의한 차이를 보이지 않았다. 반면 에틸 에스터화 되어 회수된 에루신산은 크램베유와 에탄올의 몰 비율이 1:20부터 1:60까지 에탄올의 몰비율이 증가함에 따라 에루신산 회수율이 증가하는 결과를 보인 반면, 몰 비율 1:60부터 1:100까지 에서는 에탄올의 몰비율의 증가에 따른 에루신산 회수율의 차이는 거의 없었다. 에탄올의 함량이 증가할수록 에틸 에스터화된 에루신산의 양이 증가하는 경향은 에루신산이 크램베유 TAG의 *sn*-1,3 위치에 주로 결합되어 있으며, 고정화된 리파아제인 Novozym 435가 과량의 에탄올이 존재할 때 *sn*-1,3 위치 특이성이 강하게 적용하는 효소의 특성이 드러난 것으로 판단된다. 따라서, 몰 비율 1:60부터 1:100까지의 조건에서 반응한 실시예 4 내지 실시예 6에서 에루신산의 농도와 회수율 모두 높은 효과적인 결과를 얻을 수 있었다.

[0089] **실험예 3. 머무름 시간 조절에 따른 크램베유의 에루신산 에틸 에스터 농축 효율 실험(실시예 7 및 비교예 5 내지 8)**

[0090] **(1) 실험 방법**

[0091] 크램베유로부터 고농도 에루신산을 위한 최적의 머무름 시간을 찾기 위하여, 각각 하기 표 4에 기재된 반응 온도, 유지 및 에탄올의 몰 비율, 머무름 시간 및 반응 시간을 반응 조건으로 하여 상기 에루신산 에틸 에스터의 농축 실험방법로 시행하였다.

표 4

[0092]

	반응 온도 (℃)	몰비율 (크램베유: 에탄올)	머무름 시간	반응시간
실시예 7	45	1:60	4 분	90 분
비교예 5	45	1:60	1 분	90 분
비교예 6	45	1:60	2 분	90 분
비교예 7	45	1:60	6 분	90 분
비교예 8	45	1:60	8 분	90 분

[0093] **(2) 분석 방법**

[0094] 분석 방법은 실시예 7 및 비교예 5 내지 8을 분석한 것 이외에는 실험예 1의 분석방법과 동일한 방법으로 실시하였다.

[0095] **(3) 분석 결과**

[0096] 본 발명에서 "머무름 시간"은 기질의 혼합물이 효소가 들어있는 반응기 안에 머물러 실질적으로 반응이 일어나는 시간을 의미한다. 따라서 머무름 시간은 반응기 내에 효소가 차지하고 남은 부피와 반응기에 기질 혼합물이 이동하는 속도를 조절하여 설정하였다.

[0097] 머무름 시간에 따른 에루신산 에틸 에스터의 농도와 에틸 에스터 형태로 회수된 에루신산의 양을 도 4에 나타내었다. 이 연구는 45 ℃의 반응온도와 1:60 (crambe oil: 에탄올)의 몰 비율에서 1에서 8분까지의 변화된 머무름 시간에서 수행되었다.

[0098] 에루신산 에틸 에스터의 농도의 경우 반응시간 90분 동안에는 머무름 시간에 관계없이 약 80%를 유지하였다. 반면 지방산 에틸 에스터의 형태로 회수된 에루신산의 경우에는 머무름 시간이 4분 (실시예 7)인 경우에만 60% 이상의 높은 회수율을 얻을 수 있었다.

[0099] 에루신산 에틸 에스터를 농축하기 위한 최적조건을 명확히 선정하기 위하여 에루신산 에틸 에스터의 농도에 대한 에루신산 에틸 에스터의 회수율의 관계를 도 5에 나타내었다. 도 5에 나타난 바와 같이 실시예 7은 에루신산의 농도 및 에루신산 회수율에서 모두 우수한 효율을 보이는 것으로 나타났다.

[0100] 따라서, 본 발명은 재순환식 연속반응기에서 칸디다 안타르크티카(*Candida antarctica*) 유래의 리파아제를 촉매로 이용하여 크램베유와 에탄올을 1: 60 ~1: 100의 몰비로 35 ~ 55℃에서, 머무름 시간 4분의 조건에서 에타놀리시스(ethanolysis) 반응을 수행함으로써, 60% 이상의 에루신산이 회수되면서 약 80%의 고농도 에루신산 에틸 에스터를 제조하였다.

[0101] **실험예 4. 에루신산 에틸 에스터 농축물 분석**

[0102] 상기 에루신산 에틸 에스터의 농축 실험방법에서 몰 비율을 1:60(크램베유:에탄올), 반응 온도는 45℃, 머무름 시간은 4분의 조건에서 에타놀리시스 반응 90분 후 얻은 에루신산 에틸 에스터의 농축물을 분석 결과를 하기 표 5에 나타내었다.

표 5

[0103]

지방산		TAG[b]	에루신산 에틸 에스터 농축물[c]
팔미트산 (palmitic acid)	16:0	1.8	2.6
팔미톨레산 (palmitoleic acid)	16:1(n-7)	0.2	0.1
스테아르산 (Stearicacid)	18:0	0.7	0.9
올레산 (oleic acid)	18:1(n-9)	15.4	2.3
리놀레산 (linolenic acid)	18:2(n-6)	8.2	1.5
알파-리놀렌산 (alpha-linolenic acid)	18:3(n-3)	2.2	2.3
아라키드산 (Arachidic acid)	20:0	0.9	1.2

에이코센산 (Eicosenoic acid)	20:1(n-9)	1.9	2.9
베헨산 (Behenic acid)	22:0	2.4	2.9
에루신산 (Erucic acid)	22:1(n-9)	63.4	79.3
리그노세르산 (Lignoceric acid)	24:0	1.1	0.8
네르본산 (nervonic acid)	24:1(n-9)	1.7	1.6

[a]모든 결과는 두 번 반복실험하여 그 평균값을 사용하였다.

[b]TAG= 크램베유의 트리아실글리세롤

[c]에루신산 에틸 에스터 농축물은 리파아제를 이용한 크램베유의 에타놀리시스 반응 90분 후 얻어진 생성물을 의미하며, 이 때 몰 비율은 1:60(크램베유:에탄올), 반응 온도는 45℃, 머무름 시간은 4분이었다.

[0104] 표 5에 제시된 에루신산 에틸 에스터 농축물에서 약 80%의 농도를 갖는 에루신산 에틸 에스터를 얻은 것으로 보아 Novozym 435의 *sn*-1,3 위치 특이성이 효과적으로 작용한 것을 확인할 수 있었다.

부호의 설명

[0105] 100 : 반응기

110 : 반응기 워터자켓

11 : 물 유출부

12 ; 물 유입부

13 : 반응기 유출부

14 : 반응기 유입부

200 : 저장조

210 : 저장조 워터자켓

21 ; 물 유출부

22 : 물 유입부

23 : 저장조 유출부

24 : 저장조 유입부

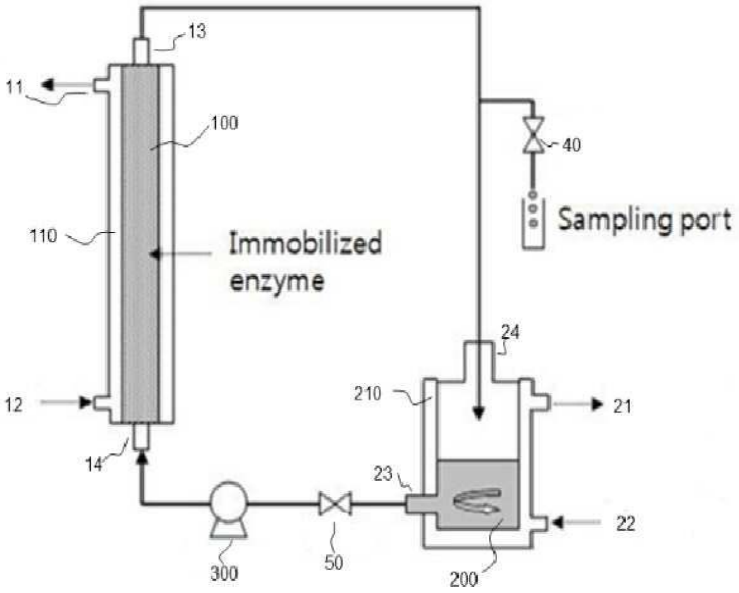
300 : 정량펌프

40: 밸브

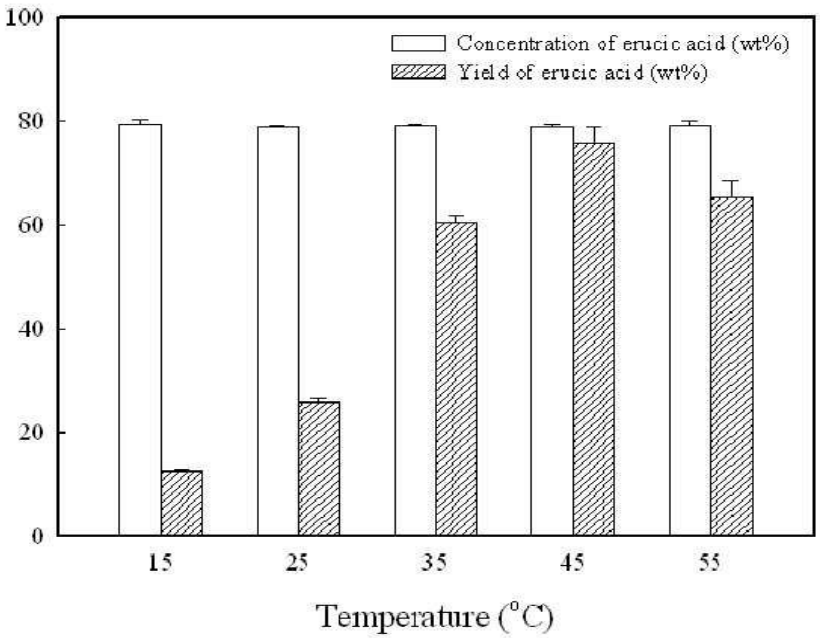
50 : 밸브

도면

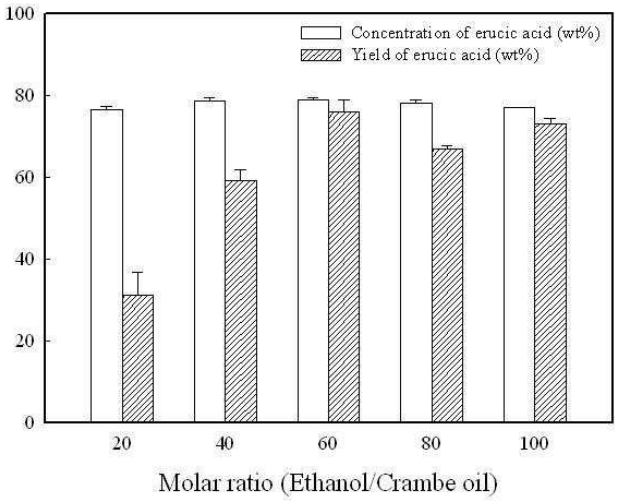
도면1


13
11
100
40
Sampling port
110
Immobilized
enzyme
24
210
21
12
14
23
22
300
50
200

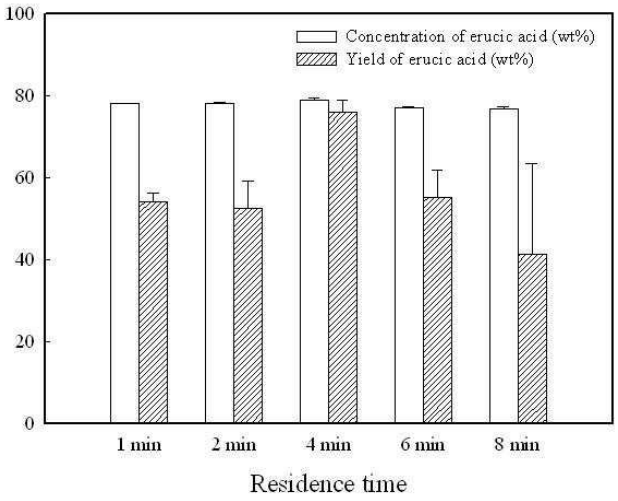
도면2


100
80
60
40
20
0
Concentration of erucic acid (wt%)
Yield of erucic acid (wt%)
15
25
35
45
55
Temperature (°C)

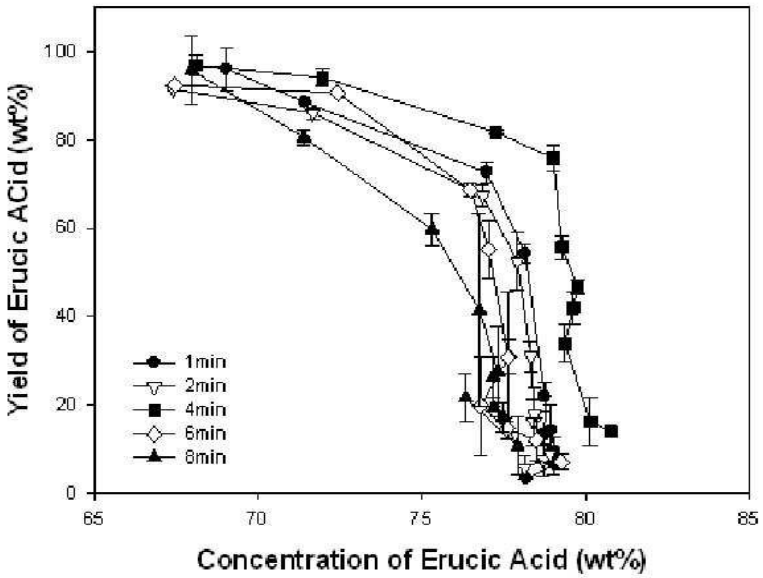
도면3


Concentration of erucic acid (wt%)
Yield of erucic acid (wt%)
100
80
60
40
20
0
20
40
60
80
100
Molar ratio (Ethanol/Crambe oil)

도면4


Concentration of erucic acid (wt%)
Yield of erucic acid (wt%)
100
80
60
40
20
0
1 min
2 min
4 min
6 min
8 min
Residence time

도면5


Yield of Erucic ACid (wt%)
Concentration of Erucic Acid (wt%)
1min
2min
4min
6min
8min
0
20
40
60
80
100
65
70
75
80
85