

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2024-0043414
(43) 공개일자 2024년04월03일(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C11C 1/10 (2006.01) C11C 1/00 (2006.01)
C11C 3/10 (2006.01)(52) CPC특허분류
C11C 1/103 (2013.01)
C11C 1/007 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0122482

(22) 출원일자 2022년09월27일

심사청구일자 2022년09월27일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김인환

서울특별시 송파구 올림픽로 135 (잠실동, 리센즈)

강지인

서울특별시 동작구 성대로 186 (상도동, 금강그린빌)

(74) 대리인

특허법인(유)남아이피그룹, 특허법인 남앤남

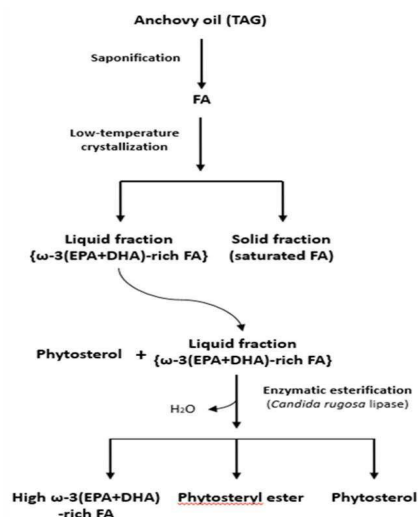
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 저온결정법과 에스테르 반응을 이용한 오메가 - 3 불포화지방산의 효율적인 농축방법

(57) 요약

본 발명은 저온결정법과 에스테르 반응을 이용한 오메가-3 불포화지방산의 효율적인 농축방법에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명은 (1) 다중불포화지방산을 함유한 소재를 검화(saponified)시켜 지방산을 수득하는 단계; (2) 상기 (1) 단계에서 수득한 검화된 지방산을 저온 결정화 반응시켜 오메가-3 다중불포화지방산이 1차 농축된 액체 분획물을 수득하는 단계; 및 (3) 상기 (2) 단계의 액체 분획물에 파이토스테롤(phytosterol) 및 리파아제를 첨가하고 에스테르 반응을 수행하여 2차 농축된 오메가-3 불포화지방산을 수득하는 단계를 포함하는 저온 결정화 반응과 에스테르 반응을 이용하여 고농축된 오메가-3 불포화지방산을 생산하는 방법 및 상기 방법으로 수득한 고농축 오메가-3 불포화지방산을 유효성분으로 포함하는, 오메가-3 불포화지방산 강화 식품에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류
C11C 3/10 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711161144
과제번호	2021R1A2C1003128
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	두 단계 효소반응으로부터 고농도 ω-3 지방산 유지 합성
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2024.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

- (1) 다중불포화지방산을 함유한 소재를 검화(saponified)시켜 지방산을 수득하는 단계;
- (2) 상기 (1) 단계에서 수득한 검화된 지방산을 저온 결정화 반응시켜 오메가-3 다중불포화지방산이 1차 농축된 액체 분획물을 수득하는 단계; 및
- (3) 상기 (2) 단계의 액체 분획물에 파이토스테롤(phytosterol) 및 리파아제를 첨가하고 에스테르 반응을 수행하여 2차 농축된 오메가-3 불포화지방산을 수득하는 단계를 포함하는,
- 저온 결정화 반응과 에스테르 반응을 이용하여 고농축된 오메가-3 불포화지방산을 생산하는 방법.

청구항 2

- 제1항에 있어서,
- 상기 (1) 단계의 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

- 제1항에 있어서,
- 상기 어유는 멸치유인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

- 제1항에 있어서,
- 상기 (2) 단계의 저온 결정화 반응은, 검화된 지방산 대 용매를 1:2~1:20의 혼합비율(w/v)로 혼합하고 -10℃ ~ -40℃의 온도에서 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

- 제5항에 있어서,
- 상기 용매는 n-헥산(n-hexane), 아세톤(acetone), 아세토니트릴(acetonitrile), 에틸 알콜(ethyl alcohol) 또는 석유 에테르(petroleum ether)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

- 제1항에 있어서,
- 상기 (3) 단계의 에스테르 반응은,
- 파이토스테롤 대 액체 분획물에 함유된 지방산의 몰비율이 3:1이고,
- 리파아제 효소를 상기 파이토스테롤 및 액체 분획물에 함유된 지방산의 총 기질의 중량 10 중량%를 사용하며,
- 30℃~40℃의 온도에서 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 에스테르 반응은 사이클로헥산(cyclohexane) 용매를 4mL/g~6mL/g의 양으로 사용하여 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 리파아제는 Lipozyme RMIM(*Rhizomucor miehei*), Novozyme 435(*Candida antartica*), Lipozyme TLIM(*Thermomyces lanuginosus*) 및 칸디다 루고사(*Candida rugosa*) 리파아제로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 고농축된 오메가-3 불포화지방산은 DHA(DocosaHexaenoic Acid), EPA(EiocosaPentaenoic Acid), DPA(DocosaPentaenoic Acid) 또는 SDA(Stearidonic acid, C18:4)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 (3) 단계의 에스테르 반응은 오메가-3 불포화지방산의 농축과 동시에 파이토스테릴 에스터(phytosteryl ester)를 합성하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 방법으로 수득한 고농축 오메가-3 불포화지방산을 유효성분으로 포함하는, 오메가-3 불포화지방산 강화 식품.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 고농축 오메가-3 불포화지방산은 DHA(DocosaHexaenoic Acid), EPA(EiocosaPentaenoic Acid), DPA(DocosaPentaenoic Acid) 또는 SDA (Stearidonic acid, C18:4)인 것을 특징으로 하는 식품.

청구항 14

제12항에 있어서,

상기 식품에는 파이토스테릴 에스터(phytosteryl ester)를 포함하고 있는 것을 특징으로 하는 식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 저온결정법과 에스테르 반응의 결합을 통한 오메가-3 불포화지방산의 효율적인 농축방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 오메가-3 불포화 지방산(ω -3 unsaturated fatty acid)은 오메가-3 고도 불포화 지방산(ω -3 poly unsaturated fatty acid)라고도 불리우며, 대표적으로는 도코사헥사엔산(Docosahexaenoic acid, DHA), 에이코사펜타엔산(Eicosapentaenoic acid, EPA), 아라키돈산(Arachidonic acid, ARA), 도코사펜타엔산(Docosapentaenoic acid, DPA), 스테아리도닌산(Stearidonic acid, C18:4, SDA), 및 α -리놀렌산 등이 알려져 있다.

[0003] 이러한 오메가-3 지방산은 인간의 간, 세포막, 혈관 및 심장과 같은 다양한 부위에서 작용하는 것으로 알려져 있으며, 리포단백질 대사, 항-염증, 항-산화, 항-혈전증, 및 플라크 안정화에 대한 효과 등이 보고된 바 있다.

- [0004] 오메가-3 지방산에 해당되는 도코사헥사엔산 및 에이코사펜타엔산은 체내에서 합성되지 않는 필수 지방산의 일종으로서, 주로 식품을 통해서 섭취하여야 한다.
- [0005] 도코사헥사엔산은 인간이나 동물의 망막, 정액 및 두뇌조직에 풍부하게 존재하며, 특히 두뇌 지방의 60%를 구성하고 있는 필수 지방산이다. 도코사헥사엔산은 아라키돈산(arachidonic acid, ARA)과 함께 유아의 두뇌, 눈, 신경체계의 건강한 발달을 위해 중요한 것으로 알려져 있다. 또한 최근에는 암부터 관절염에 걸친 수많은 질병과 심혈관 질환 및 정신적인 장애의 예방과 치료에 효과가 있음이 보고되고 있다. 이러한 도코사헥사엔산을 포함한 오메가-3 불포화 지방산의 주요 공급원은 청어, 연어, 다랑어 등의 생선에서 추출한 어유(漁油)이다. 그러나 지속적인 어유 공급의 어려움과 어유의 중금속 및 유기화학 물질에 의한 오염이 문제되어, 미생물 배양에 의한 도코사헥사엔산을 포함한 오메가-3 불포화 지방산의 제조방법에 대한 연구가 진행되고 있다.
- [0006] 또한, 에이코사펜타엔산은 프로스타글란딘(혈소판의 응집을 억제함), 트롬복산, 류코트라이엔과 같은 에이코사노이드들의 전구체로 작용하는 고도불포화 지방산으로, 이코사펜타엔산(icosapentaenoic acid)이라고도 하며, 관용명은 팀노돈산(timnodonic acid)이다. 화학 구조에서 에이코사펜타엔산은 20개의 탄소로 구성된 사슬에 5개의 시스 이중 결합을 가지고 있는 카복실산으로 첫 번째 이중 결합은 메틸 말단인 오메가 말단에서부터 세 번째 탄소에 위치한다. 에이코사펜타엔산이 갖는 기능성에 대해서는 관절에 염증을 일으키는 물질의 생성을 방해하여 증세를 완화하므로 만성 류마티스 관절염에 치료에 효과가 있음이 연구된 바 있다.
- [0007] 이처럼 오메가-3 불포화지방산에 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.
- [0008] 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.
- [0009] 그러므로 오메가-3 불포화지방산을 함유한 원료들로부터 기능성 오메가-3 불포화지방산을 고농축시킬 수 있는 효과적인 새로운 방법의 개발이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) 1. 한국공개특허 특2002-0042432
(특허문헌 0002) 2. 한국등록특허 10-1815110

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 이에 본 발명자들은 저온 결정법과 리파아제 효소를 이용한 효소 촉매적 에스테르 반응의 2가지 반응을 조합하여 기능성 지방산인 오메가-3 불포화지방산을 고농축시킬 수 있는 최적의 반응 조건을 확립하였고, 이러한 반응 조건을 수행할 경우, 고농축된 오메가-3 불포화지방산을 생산할 수 있을 뿐만 아니라 동시에 기능성 소재인 파이토스테릴 에스테르도 생산할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0012] 따라서 본 발명의 목적은 저온 결정화 반응과 에스테르 반응을 이용하여 고농축된 오메가-3 불포화지방산을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적은 상기 본 발명의 방법으로 수득한 고농축 오메가-3 불포화지방산을 유효성분으로 포함하는, 오메가-3 불포화지방산 강화 식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 그러므로 본 발명은, (1) 다중불포화지방산을 함유한 소재를 검화(saponified)시켜 지방산을 수득하는 단계; (2) 상기 (1) 단계에서 수득한 검화된 지방산을 저온 결정화 반응시켜 오메가-3 다중불포화지방산이 1차 농축된 액체 분획물을 수득하는 단계; 및 (3) 상기 (2) 단계의 액체 분획물에 파이토스테롤(phytosterol) 및 리파아제를 첨가하고 에스테르 반응을 수행하여 2차 농축된 오메가-3 불포화지방산을 수득하는 단계를 포함하는, 저온 결정화 반응과 에스테르 반응을 이용하여 고농축된 오메가-3 불포화지방산을 생산하는 방법을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 (1) 단계의 소재는 동물성 오일(animal oil), 식물성 오일(vegetable oil), 미생물성 오일(microbial oil) 또는 조류성 오일(algae oil)일 수 있다.
- [0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 동물성 오일은 어유(fish oil)일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 어유는 멸치유일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 (2) 단계의 저온 결정화 반응은, 검화된 지방산 대 용매를 1:2~1:20의 혼합 비율(w/v)로 혼합하고 -10℃ ~ -40℃의 온도에서 수행하는 것일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 용매는 n-헥산(n-hexane), 아세톤(acetone), 아세토니트릴(acetonitrile), 에틸 알콜(ethyl alcohol) 또는 석유 에테르(petroleum ether)일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 (3) 단계의 에스테르 반응은, 파이토스테롤 대 액체 분획물에 함유된 지방산의 몰비율이 3:1이고, 리파아제 효소를 상기 파이토스테롤 및 액체 분획물에 함유된 지방산의 총 기질의 중량 10 중량%를 사용하며, 30℃~40℃의 온도에서 수행하는 것일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 에스테르 반응은 사이클로헥산(cyclohexane) 용매를 4mL/g~6mL/g의 양으로 사용하여 수행하는 것일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 리파아제는 Lipozyme RMIM(*Rhizomucor miehei*), Novozyme 435(*Candida antarctica*), Lipozyme TLIM(*Thermomyces lanuginosus*) 및 칸디다 루고사(*Candida rugosa*) 리파아제로 이루어진 군 중에서 선택되는 것일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 고농축된 오메가-3 불포화지방산은 DHA(DocosaHexaenoic Acid), EPA(Eiocosapentaenoic Acid), DPA(DocosaPentaenoic Acid) 또는 스테아리도닌산(Stearidonic acid, C18:4)일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 (3) 단계의 에스테르 반응은 오메가-3 불포화지방산의 농축과 동시에 파이토스테릴 에스터(phytosteryl ester)를 합성하는 것일 수 있다.
- [0025] 또한 본 발명은 본 발명의 방법으로 수득한 고농축 오메가-3 불포화지방산을 유효성분으로 포함하는, 오메가-3 불포화지방산 강화 식품을 제공한다.
- [0026] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 고농축 오메가-3 불포화지방산은 DHA(DocosaHexaenoic Acid), EPA(Eiocosapentaenoic Acid), DPA(DocosaPentaenoic Acid) 또는 스테아리도닌산(Stearidonic acid, C18:4)일 수 있다.
- [0027] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 식품에는 파이토스테릴 에스터(phytosteryl ester)를 포함하고 있는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0028] 본 발명에서 규명한 저온 결정화 반응과 에스테르 반응을 이용하여 고농축된 오메가-3 불포화지방산을 생산하는 방법은 기능성 오메가-3 지방산, 즉 기능성 다중불포화지방산을 90% 이상의 함량으로 고 농축시킬 수 있고 동시에 파이토스테릴 에스터를 합성할 수 있을 뿐만 아니라, 종래 지방산 농축에 사용되는 요소부가 단계를 수행하지 않기 때문에 요소부가로 인해 생성되는 유해물질의 위험성도 해소시킬 수 있다. 본 발명의 방법으로 생산되는 고농축 오메가-3 불포화지방산은 오메가-3 불포화지방산이 강화된 기능성 식품의 제조에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0029] 도 1은 본 발명에 따른 저온 결정법과 효소 에스테르 반응을 통한 오메가-3 불포화지방산을 농축하는 과정을 모

식도로 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 일실시예에서 저온 결정화 반응의 최적 용매 선별을 위해, 각기 다른 용매를 이용하여 멸치유 유래 유리 지방산에 대한 저온 결정화를 수행한 후(-20℃, 1:10의 유리지방산 대 용매 비율, 2시간 수행), 수득한 액체 분획 내의 EPA(eicosapentaenoic acid)의 농축율 및 회수율을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 일실시예에서 효소 촉매를 이용한 에스테르 반응의 최적 물비를 확인한 결과를 나타낸 것으로, 파이토스테롤 대 지방산(멸치유 유래 지방산)의 각 물비에 대한 에스테르 전환율(a), EPA 함량(농축율)(b) 및 EPA 회수율(c)을 확인한 결과를 나타낸 것이며, 상기 에스테르 반응은 cyclohexane 용매를 이용하여, 40℃의 온도에서 효소량은 10%(총 기질 중량 기준) 및 용매량은 20mL(5mL/g)으로 12시간 동안 300rpm의 교반 속도로 수행하였다.

도 4는 본 발명의 일실시예에서 효소 촉매를 이용한 에스테르 반응의 최적 온도조건을 확인한 결과를 나타낸 것으로, 각기 다른 온도에서의 에스테르 반응에 따른 에스테르 전환율(a), EPA 함량(농축율)(b) 및 EPA 회수율(c)을 확인한 결과를 나타낸 것이며, 상기 에스테르 반응은 cyclohexane 용매를 이용하여, 40℃의 온도에서 효소량은 10%(총 기질 중량 기준) 및 용매량은 20mL(5mL/g)으로 12시간 동안 300rpm의 교반 속도로 수행하였다.

도 5는 본 발명의 일실시예에서 효소 촉매를 이용한 에스테르 반응의 최적 효소량 조건을 확인한 결과를 나타낸 것으로, 각기 다른 효소량으로 에스테르 반응을 수행한 후, 에스테르 전환율(a), EPA 함량(농축율)(b) 및 EPA 회수율(c)을 확인한 결과를 나타낸 것이며, 상기 에스테르 반응은 cyclohexane 용매를 이용하고, 40℃의 온도, 파이토스테롤 대 지방산의 3:1 물비, 20mL(5mL/g)의 용매 양으로 12시간 동안 300rpm의 교반 속도로 수행하였다.

도 6은 본 발명의 일실시예에서 효소 촉매를 이용한 에스테르 반응의 최적 용매량 조건을 확인한 결과를 나타낸 것으로, 각기 다른 용매량으로 에스테르 반응을 수행한 후, 에스테르 전환율(a), EPA 함량(농축율)(b) 및 EPA 회수율(c)을 확인한 결과를 나타낸 것이며, 상기 에스테르 반응은 cyclohexane 용매를 이용하고, 40℃의 온도, 파이토스테롤 대 지방산의 3:1 물비로 12시간 동안 300rpm의 교반 속도로 수행하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0030] 본 발명은 오메가-3 불포화지방산의 농축 효율을 효과적으로 증진시킬 수 있는 방법을 규명한 것으로, 구체적으로 본 발명은 저온 결정화 반응과 에스테르 반응을 이용하여 고농축된 오메가-3 불포화지방산을 생산하는 최적의 방법을 제공함에 특징이 있다.
- [0031] 본 발명에 따른 고농축된 오메가-3 불포화지방산을 생산하는 방법은, (1) 다중불포화지방산을 함유한 소재를 검화(saponified)시켜 지방산을 수득하는 단계; (2) 상기 (1) 단계에서 수득한 검화된 지방산을 저온 결정화 반응시켜 오메가-3 다중불포화지방산이 1차 농축된 액체 분획물을 수득하는 단계; 및 (3) 상기 (2) 단계의 액체 분획물에 파이토스테롤(phytosterol) 및 리파아제를 첨가하고 에스테르 반응을 수행하여 2차 농축된 오메가-3 불포화지방산을 수득하는 단계를 포함한다.
- [0032] 본 발명에 따른 저온 결정화 반응과 에스테르 반응을 이용하여 고농축된 오메가-3 불포화지방산을 생산하는 방법을 상세히 설명하면 다음과 같다.
- [0033] 먼저, (1) 다중불포화지방산을 함유한 소재를 검화(saponified)시켜 지방산을 수득한다.
- [0034] 여기서 상기 소재는 다중불포화지방산을 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 있다.
- [0035] 본 발명의 일실시예에서는 상기 동물성 오일(animal oil)에 속하는 어유 중에서 멸치유를 사용하였다.
- [0036] 상기 검화(saponified)는 비누화 반응을 의미하며, 본 발명의 일실시예에서는 멸치유에 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.
- [0037] 다음으로, (2) 검화된 지방산을 저온 결정화 반응시켜 오메가-3 다중불포화지방산이 1차 농축된 액체 분획물을 수득한다.
- [0038] 즉, 상기 (1) 단계를 통해 오일 함유 소재로부터 검화과정을 거쳐 수득한 지방산은 저온 결정화 반응을 통해 오

메가-3 다중불포화지방산을 1차 농축시킨다.

- [0039] 본 발명자들은 오메가-3 다중불포화지방산의 농축 효율을 증진시킬 수 있는 최적의 조건을 확립하기 위한 실험을 수행하였고, 그 결과, 검화된 지방산 대 용매를 1:2~1:20의 혼합비율(w/v)로 혼합하고 -10℃ ~ -40℃의 온도에서 수행할 경우, 오메가-3 다중불포화지방산의 농축을 효과적으로 향상시킬 수 있음을 확인하였다.
- [0040] 또한 본 발명의 일실시예에서, 상기 검화과정을 통해 수득한 지방산으로부터 오메가-3 다중불포화지방산의 농축을 위해, 1차 과정으로 저온 결정화 반응을 수행하였고, 이때 최적의 용매 종류를 선별하기 위해 n-hexane, acetone, acetonitrile, petroleum ether, ethyl alcohol의 서로 다른 종류의 용매를 이용하여 저온 결정화 반응을 수행하였다.
- [0041] 그 결과, 상기 기술된 종류의 용매들은 모두 사용할 수 있는 것으로 나타났으며, 특히 동일조건에서 아세토니트릴(acetonitrile) 용매가 다른 종류의 용매에 비해 오메가-3 불포화지방산의 농축율이 가장 우수한 것으로 나타났는데, 다른 종류의 용매에 비해 아세토니트릴을 사용한 군이 거의 2배의 증가된 농축 효과를 보였다.
- [0042] 또한, 최적의 반응온도를 확인하기 위해 저온 결정화를 -10, -20, -30, -40, -60 및 -80℃의 다른 조건에서 수행하였는데, -40℃ 보다 낮은 온도에서 수행할 경우에는 아세토니트릴 용매가 얼어버리기 때문에 반응이 진행되지 않는 것으로 나타났고, -10 내지 -40℃의 온도에서 수행할 경우, EPA, DPA 및 DHA의 다중불포화지방산의 함량이 저온 결정을 수행하지 않은 군에 비해 효과적으로 증진됨을 확인할 수 있었으며, 특히 -40℃의 온도에서 수행하는 경우가 농축율 및 회수율의 향상에 가장 효과적인 것으로 나타났다.
- [0043] 또한, 용매의 최적 첨가량에 대한 실험을 수행하였는데, 검화 과정으로 수득한 유리지방산 대 용매를 각기 다른 혼합비율(1:2~1:20)의 조건에서 저온 결정화를 수행하였다. 그 결과, 1:10~1:20 혼합비율(w/v) 범위가 다른 혼합비율 범위에 비해 다중불포화지방산의 농축율 및 회수율이 우수한 것으로 나타났고, 특히 1:15 혼합비율이 가장 적절한 것으로 나타났다.
- [0044] 본 발명에서 규명한 저온 결정화 반응의 최적 조건인 유리 지방산 대 아세토니트릴 용매를 1:15(w/v) 혼합비율로 하여 -40℃ 온도에서 저온 결정화 반응을 수행할 경우, 주요 오메가-3 불포화지방산인 EPA, DPA 및 DHA의 함이 저온 결정화 반응 전 24.27%에서 저온 결정화에 의해 71.49%로 현저하게 증가하는 것으로 나타났다.
- [0045] 다음으로, 상기 저온 결정화 단계가 완료되면, (3) 에스테르 반응을 수행하여 2차 농축된 오메가-3 불포화지방산을 수득한다.
- [0046] 상기 에스테르 반응은 저온 결정화 반응으로 수득한 오메가-3 다중불포화지방산이 1차 농축된 액체 분획물에 파이토스테롤(phytosterol) 및 리파아제를 첨가하고 에스테르 반응을 수행함으로써 진행된다.
- [0047] 바람직하게 상기 에스테르 반응은, 파이토스테롤 대 액체 분획물에 함유된 지방산의 몰비율을 3:1로 하고, 리파아제 효소를 상기 파이토스테롤 및 액체 분획물에 함유된 지방산의 총 기질의 중량 기준 10 중량%로 하여, 30℃ ~40℃의 온도에서 수행한다.
- [0048] 본 발명자들은 최적의 에스테르 반응 조건을 규명하기 위해, 용매 선별 과정을 수행한 결과, 사이클로헥산(cyclohexane) 용매를 사용하는 것이 가장 효과적임을 확인하였다.
- [0049] 또한 파이토스테롤의 최적 첨가량을 확인하기 위해 파이토스테롤 대 지방산(상기 1차 농축된 액체 분획물에 함유된 지방산)의 몰비율을 1:1 내지 4:1로 각기 달리하여 에스테르 반응을 수행한 결과, 오메가-3 다중불포화지방산의 농축율 및 회수율이 3:1인 경우, 가장 높은 것으로 나타났다.
- [0050] 또한, 본 발명의 에스테르 반응에 사용한 효소는 상업용으로 시판되는 리파아제 효소라면 모두 사용할 수 있고, 이에 제한되지는 않으나 상기 효소는 Lipozyme RMIM(*Rhizomucor miehei*), Novozyme 435(*Candida antartica*), Lipozyme TLIM(*Thermomyces lanuginosus*) 및 칸디다 루고사(*Candida rugosa*) 유래의 리파아제로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 사용할 수 있다. 바람직하게는 본 발명의 일실시예에서 사용한 칸디다 루고사(*Candida rugosa*) 유래의 Lipase OF(Meito사)를 사용할 수 있다.
- [0051] 상기 효소의 첨가량은 총 기질(파이토스테롤 및 1차 농축된 액체 분획물에 함유된 지방산의 총 합) 중량 기준 10 중량%로 첨가하는 것이 가장 효과적으로 파이토스테롤의 파이토스테릴 에스터(phytosteryl ester)로의 전환, 오메가-3 다중불포화지방산의 농축 및 회수할 수 있는 것으로 나타났다.
- [0052] 또한, 최적 반응 온도 조건을 규명하기 위해, 30~60℃의 다양한 온도에서 에스테르 반응을 수행하였는데, 그 결과 30~40℃ 온도, 바람직하게는 40℃의 온도에서 수행하는 것이 효소적 에스테르화를 통한 오메가-3 다중불포

화지방산의 농축 및 회수에 가장 효과적이라는 것을 확인할 수 있었다.

- [0053] 나아가 사이클로헥산(cyclohexane) 용매의 최적 첨가량에 대한 분석도 수행하였는데, 그 결과 4mL/g~6mL/g의 양으로 사용하는 것이 적합한 것으로 나타났고, 바람직하게는 4mL/g의 용매량을 사용하는 것이 가장 효과적인 것으로 나타났다.
- [0054] 본 발명에 따른 효소 촉매적 에스테르 반응은 오메가-3 다중불포화지방산의 2차 농축과 동시에 파이토스테릴의 파이토스테릴 에스터(phytosteryl ester)로의 전환을 통해 산업적으로 더 활용도가 높은 파이토스테릴 에스터를 용이하게 합성할 수 있는 특징이 있다.
- [0055] 파이토스테롤은 탄소 사슬이 결합되어 있는 고리형 구조를 가진 식물성 화합물로, 고리형 구조 내 이중결합의 유무에 따라 스테롤과 스타놀로 나뉜다. 파이토스테롤로 베타시토스테롤 (β -sistosterol) 캄페스테롤(campesterol), 스티그마스테롤(stigmasterol)이 대표적이며, 파이토스테롤은 콜레스테롤과 구조적 유사성을 갖기 때문에 체내 콜레스테롤의 흡수를 저해하여 혈중 콜레스테롤 수치를 낮추는 효과를 갖는다고 알려져 있다. 그러나 유리 형태의 파이토스테롤은 물과 기름에서 낮은 용해도와 높은 융점을 가지기 때문에 식품에 적용하기가 쉽지 않다는 문제점이 있다. 또한 물에 대한 낮은 용해도 때문에 파이토스테롤은 체내에서의 낮은 반응성을 나타내므로 효과를 나타낼 수 있기 위해서는 과량을 섭취하여야만 하는 문제점이 있다.
- [0056] 한편, 유리 형태의 파이토스테롤과는 달리 파이토스테릴 에스터(phytosteryl ester)는 기름에 대한 높은 용해도를 나타내므로 유지 성분의 식품에의 적용이 용이하다. 이 때문에 산업계에서는 화학적 촉매를 통한 파이토스테릴 에스터의 합성 방법 연구가 진행되고 있다. 하지만 화학적 방법은 높은 에너지를 요구한다는 점과 3,5-다이엔 스테로이드 유도체 등의 부산물을 생성시킬 수 있다는 점에서 단점을 갖는다. 따라서 파이토스테릴 에스터의 합성 방법으로 효소적 방법이 높지 않은 온도에서 적은 부산물을 생성하기 때문에 더 유리하다.
- [0057] 이러한 점에서 본 발명에 따른 저온 결정화 반응과 에스테르 반응을 이용하여 고농축된 오메가-3 불포화지방산을 생산하는 방법은 오메가-3 불포화지방산의 농축을 및 회수율을 향상시킬 수 있을 뿐만 아니라, 파이토스테롤의 파이토스테릴 에스터의 전환율을 향상시켜 파이토스테릴 에스터의 동시 생산도 가능하다는 효과가 있다.
- [0058] 이상, 본 발명에서 확립한 각 단계별 최적 반응 조건으로 저온 결정화 반응을 수행하고, 이후 에스테르 반응을 수행할 경우, SDA, EPA, DPA 및 DHA를 포함한 오메가-3 불포화지방산을 93.25%의 높은 함량으로 수득할 수 있다. 한편, 저온 결정화 반응만을 수행하는 경우에는 상기 오메가-3 불포화지방산을 80.89%의 함량으로 수득할 수 있으며, 에스테르 반응만을 수행하는 경우에는 상기 오메가-3 불포화지방산을 77.49%의 함량으로 수득할 수 있는 것으로 나타났다.
- [0059] 이러한 결과들을 종합해 볼 때, 본 발명에서 규명한 저온 결정화 반응과 에스테르 반응을 이용하여 고농축된 오메가-3 불포화지방산을 생산하는 방법은 기능성 오메가-3 지방산, 즉 기능성 다중불포화지방산을 90% 이상의 함량으로 고농축시킬 수 있으며, 동시에 파이토스테릴 에스터도 수득할 수 있을 뿐만 아니라, 종래 지방산 농축과정에 사용되는 요소부가 단계를 수행하지 않기 때문에 요소부가로 인해 생성되는 유해물질의 위험성도 해소시킬 수 있다.
- [0060] 나아가 상기 방법으로 생산된 고농축 오메가-3 불포화지방산은 다양한 기능성 식품에 활용될 수 있다.
- [0061] 따라서 본 발명은 본 발명의 방법으로 수득한 고농축 오메가-3 불포화지방산을 유효성분으로 포함하는, 오메가-3 불포화지방산 강화 식품을 제공할 수 있다.
- [0062] 상기 식품에 함유된 오메가-3 불포화지방산은 DHA(DocosaHexaenoic Acid), EPA(EiocosaPentaenoic Acid), DPA(DocosaPentaenoic Acid) 및/또는 SDA(Stearidonic acid, C18:4)를 포함할 수 있으며, 상기 식품에서는 추가적으로 파이토스테릴 에스터(phytosteryl ester)를 포함할 수 있다.
- [0063] 상기 오메가-3 불포화지방산 강화 식품은 오메가-3 불포화지방산의 공급을 위한 건강기능식품, 건강보조식품, 오메가-3 보충제, 식품첨가제 등을 모두 포함하는 의미이다.
- [0065] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<재료 및 실험방법>**(1) 재료**

멸치유는 광진테크(Seoul, Republic of Korea)로부터 수득한 것을 사용하였다. 자력 교반기가 부착된 저온 항온 수조(PSL-2000)는 선일아일라(Japan)에서 구입하여 사용하였다. Acetonitrile, acetone 및 n-hexane은 대정화금(Seoul, Republic of Korea)에서 구입하여 사용하였으며, 베타시토스테롤 (콩 유래, $\geq 70\%$)은 시그마 알드리치 코리아 (Seoul, Republic of Korea)에서 구입하여 사용하였다. 이외 본 실험에서 사용한 다른 모든 시약은 달리 명시되지 않는 한 등급은 특급 이상의 것을 사용하였다.

<실시예 1>**저온 결정 및 효소 촉매 에스테르 반응의 결합에 의한 오메가 3 지방산의 효율적인 고농축 조건 확립**

고도불포화 지방산인 오메가-3 지방산을 효과적으로 고농축된 상태로 수득할 수 있는 방법을 확립하기 위해, 저온 결정 방법 및 효소 촉매 에스테르 반응의 2단계 반응을 결합한 최적의 오메가-3 불포화지방산 고농축 방법을 하기와 같은 실험을 통해 확립하였고, 본 발명에 따른 오메가-3 불포화지방산 고농축 과정의 모식도는 도 1에 나타내었다.

<1-1> 최적의 저온 결정화 반응조건 확립

본 발명자들은 저온 결정 방법 및 효소 촉매 에스테르 반응을 결합한 2단계 반응을 통한 오메가-3 불포화지방산의 최적의 고농축 조건을 규명하기 위해, 먼저 저온 결정 방법의 최적 조건을 확인하기 위한 실험을 다음과 같이 진행하였다.

(1) 검화를 통한 멸치유로부터 지방산의 제조

멸치유 200g을 수산화나트륨 30% 수용액 150mL, 99% 에탄올 250mL와 함께 2L 둥근 플라스크에 넣고 환류장치에서 300rpm으로 30분 동안 가열 교반하였다. 검화된 반응물을 2L 분액깔때기로, 300mL의 증류수와 650mL의 n-hexane를 첨가하고 격렬하게 혼합하였다. 분리된 두 층으로부터 검화된 물질이 함유된 하층부를 분리하여 새로운 2L 분액깔때기로 옮겼다. 분리된 물층에 180mL의 진한염산(약 12N)을 첨가하여 검화된 비누 부분을 유리지방산으로 전환시켰다. 분리된 두 층으로부터 유리 지방산이 함유된 상층부를 분리하기 위하여 하층부를 제거한 후 지방산이 함유된 상층부에 300mL의 증류수와 650mL의 n-hexane를 넣고 격렬하게 혼합한 후 수분 증인 하층부를 제거하였다. 잔존 염산을 제거하는 과정으로 상층부에 300mL의 증류수를 넣는 과정을 3회 반복 실시하였다. 최종으로 pH 종이를 이용해 잔존 염산이 제거된 것을 확인하였다.

이후 유리지방산이 함유된 n-hexane내 수분 및 불순물 제거를 위해 무수황산나트륨을 통과시킨 후 회전진공농축기(N-N series, EYELA, Japan)를 이용하여 n-hexane을 제거하였다. 추가적으로 잔존 n-hexane은 70℃에서 질소를 이용하여 잔존 용매를 제거하였으며 효과적인 용매 제거를 위하여 질소 주입은 비교적 높은 기류 속도로 20분 동안 주입하였다. 정제된 지방산을 얻기 위하여 210℃ 및 0.1 torr에서 분자증류를 진행하여 멸치유로부터 검화된 지방산을 수득하였다.

(2) 저온결정화 반응을 이용한 오메가-3 불포화지방산 농축

상기 (1) 단계에서 검화과정을 통해 수득한 멸치유 유래 유리지방산 10g을 각 용매(n-hexane, acetone, acetonitrile, petroleum ether, ethyl alcohol)와 혼합하되, 이때 멸치유 유리지방산 대 용매 비율을 달리하여(1:2 ~ 1:20 비율, w/v) 혼합하고 완전히 용해될 때까지 볼텍스에서 교반하였다. 그런 다음, 혼합물을 -10℃, -20℃, -30℃ 및 -40℃의 다른 온도조건으로 자력 교반기가 부착된 저온 항온 수조 (PSL-2000)에서 2시간 동안 결정화시켰다. 이후, 미리 냉각된 부후너 깔때기에서 8 μ m 여과지를 통해 즉각적인 진공 여과에 의해 액체 분획이 고체 분획으로부터 분리되도록 하였다. 진공 여과 전에 부후너 깔때기의 여과지를 미리 냉각된 동종 용매로 흡착시켰다. 각 분획은 회전진공농축기로 용매를 제거하고 추가적으로 용매 잔류물을 질소를 이용하여 제거한 후 정밀하게 칭량하였다. 모든 저온 결정화 반응은 3회 반복 실험하였고, 각각의 액체 및 고체 분획의 지방산

조성을 가스 크로마토그래피(Gas Chromatography)로 분석하였다.

[0085] (3) 지방산 조성 분석 및 회수율 분석

[0086] 상기 (2) 단계까지 수행하여 수득한 지방산의 조성 및 회수율은 다음과 같이 분석하였다.

[0087] 30mg의 지방산은 BF_3 메탄올을 촉매로 한 유도체화 반응을 통하여 지방산 메틸 에스테르로 유도체화 시킨 후 n-hexane(1mL)으로 추출했다. 분석을 위해 Supelcowax10 컬럼(30m x 0.25mm 내경.; Supelco, Bellefonte, PA, USA)과 화염 이온화 검출기(FID)가 장착된 가스크로마토그래피(model 3800; Varian, Palo Alto, CA, USA)를 사용하였고, 분석 조건은 다음과 같다. 컬럼을 초기 180℃에서 1 분 동안 유지하고 1.5℃/min의 속도로 230℃까지 상승한 후 10 분 동안 유지하였다. 컬럼 온도는 230℃에서 10 분 동안 유지시켰고, 캐리어가스는 헬륨을 사용하였으며, 컬럼 유속은 1.0 mL/min이 되도록 하였다. Split ratio는 1:50, Injector 및 detector 온도는 각각 240℃ 및 250℃로 설정하였다.

[0088] 또한 본 발명에서 수행한 저온 결정화에 의한 농축지방산의 회수율은 다음 식으로 계산하였다:

[0089] 회수율(wt%)= $[a/(a+b)] \times 100$

[0090] a: 액체 분획에서 지방산의 무게

[0091] b: 고체 분획에서 지방산의 무게

[0093] 또한, 통계분석은 IBM SPSS 26 프로그램 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA)를 이용하여 수행하였으며, 분산분석(ANOVA)을 통해 95%의 신뢰구간에서 Turkey's test와 t-test로 유의성을 검증하였다. 모든 실험은 3회 반복실험으로 진행하였다. 모든 표의 결과는 평균값 $\pm$ 표준편차로 표시하였다.

[0095] (4) 결과

[0096] 본 발명자들은 상기 기술된 방법으로 수득한 멸치유 유래 고도불포화 지방산의 농축을 및 회수율을 분석하여, 고도불포화 지방산을 효과적으로 농축하기 위한 최적의 저온 결정방법의 조건을 규명하였다.

[0097] 먼저, 검화 과정을 통해 수득한 멸치유의 유리지방산을 분석한 결과, 하기 표 1에 나타낸 바와 같이, 에이코사펜타엔산는 멸치유 중 가장 풍부한 다중불포화지방산으로 전체 지방산의 17.21%를 차지하는 것으로 나타났고, 포화지방산과 단일불포화지방산의 함량은 각각 45.46%와 24.11%인 것으로 나타났다.

표 1

멸치유 지방산의 조성

Fatty acids	Composition (wt%)
14:0	12.93 ± 0.2
16:0	26.89 ± 0.2
16:1n-7	10.37 ± 0.1
18:0	5.64 ± 0.0
18:1n-9	9.34 ± 0.1
18:1n-7	3.48 ± 0.1
18:2n-6	1.20 ± 0.0
18:3n-3	0.83 ± 0.0
18:4n-3	2.46 ± 0.0
20:1n-9	0.92 ± 0.0
20:4n-6	1.04 ± 0.1
20:4n-3	0.63 ± 0.0
20:5n-3	17.21 ± 0.2
22:5n-3	1.42 ± 0.0
22:6n-3	5.64 ± 0.1

[0098]

[0099]

또한, 저온 결정 시, 오메가 3 지방산의 농축율에 미치는 용매의 영향을 확인하기 위해, 멸치유 유래 지방산 10g과 각 용매 100mL를 -20℃에서 2시간 동안 결정화 반응을 수행한 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, acetonitrile을 용매로 사용한 경우, 액체 분획에서 에이코사펜타엔산(EPA) 함량이 38.31%로서 다른 용매에 비해 월등히 높은 것으로 나타났다. 한편, Acetone 용매 사용 시, 회수율은 acetonitrile 보다 높게 나타났으나, acetonitrile 용매 사용에 따른 농축율이 다른 종류의 용매에 비해 현저히 높았으며, 다른 용매 사용 시, EPA의 농도는 모두 22% 정도인 것으로 확인되었다.

[0100]

이러한 결과를 통해 본 발명자들은 멸치유의 지방산으로부터 에이코사펜타엔산 및 도코사헥사엔산과 같은 다중 불포화지방산을 효과적으로 농축시켜 수득하기 위해 acetonitrile의 용매를 사용하는 것이 가장 효과적이라는 것을 알 수 있었다.

[0101]

[0102]

또한 본 발명자들은 저온 결정방법에 있어서, 최적의 온도 조건을 분석하였는데, 특정 온도에서 녹는점과 용해도의 차이에 따라 고융점 지방산과 저융점 지방산이 분리되기 때문에 온도는 유지의 결정화에 중요한 요소 중 하나이다.

[0103]

최적의 온도 조건 확인을 위해, 멸치유 유래 유리지방산과 acetonitrile 용매를 1:10으로 혼합한 용액을 -10, -20, -30, -40, -60 및 -80℃에서 각각 2시간 동안 저온 결정화를 수행하였다.

표 2

다른 온도 조건에서의 저온 결정화 후, 액체 분획 내의 지방산 조성분석(%)

Fatty acids	Anchovy oil	-40 ℃	-30 ℃	-20 ℃	-10 ℃
C14:0	12.93	0.43 ± 0.1	0.75 ± 0.1	1.32 ± 0.2	2.62 ± 0.4
C16:0	26.89	0.86 ± 0.5	0.00 ± 0.0	0.33 ± 0.0	0.62 ± 0.0
C16:1n7	10.37	5.52 ± 0.1	11.64 ± 1.4	15.63 ± 1.9	16.62 ± 0.1
C18:0	5.64	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0
C18:1n9	9.34	2.62 ± 0.6	3.85 ± 0.5	8.74 ± 0.5	13.58 ± 2.1
C18:1n7	3.48	1.04 ± 0.0	2.28 ± 0.2	3.97 ± 0.3	4.75 ± 0.7
C18:2n6	1.20	2.29 ± 0.5	2.00 ± 0.1	2.00 ± 0.1	1.96 ± 0.1
C18:3n3	0.83	1.50 ± 0.0	1.78 ± 0.1	1.55 ± 0.1	1.42 ± 0.1
C18:4n3	2.46	6.96 ± 0.1	7.01 ± 0.5	4.99 ± 0.0	4.28 ± 1.0
C20:1n9	0.92	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.79 ± 0.0	1.12 ± 0.3
C20:4n6	1.04	2.68 ± 0.0	2.47 ± 0.1	2.16 ± 0.0	1.97 ± 0.1
C20:4n3	0.63	1.65 ± 0.1	1.55 ± 0.1	1.40 ± 0.1	1.25 ± 0.0
EPA	17.21	51.11 ± 0.7	46.90 ± 0.8	38.31 ± 1.6	33.31 ± 2.7
DPA	1.42	4.99 ± 0.2	4.32 ± 0.4	4.20 ± 0.2	3.92 ± 0.3
DHA	5.64	18.37 ± 0.7	15.47 ± 1.4	14.64 ± 1.2	12.63 ± 0.6
EPA & DHA	22.85	69.48 ± 1.4	62.37 ± 2.2	52.94 ± 2.9	45.93 ± 2.2
EPA yield		79.83 ± 0.5	83.78 ± 0.1	82.43 ± 1.7	85.20 ± 0.6
DHA yield		77.07 ± 0.2	79.02 ± 0.9	79.83 ± 2.8	82.35 ± 0.5
EPA & DHA yield		79.08 ± 0.4	82.55 ± 0.1	81.70 ± 2.0	84.40 ± 0.4

그 결과, 상기 표 2에 나타난 바와 같이, EPA, DPA 및 DHA 등의 다중불포화지방산은 -40℃의 온도에서 저온 결정을 수행한 경우, 가장 높은 함량을 보이는 것으로 나타났다. 한편, -60 및 -80℃에서 저온 결정을 수행한 경우에는 용매인 acetonitrile(융점 -45.7℃)가 너무 빨리 얼어버리는 문제가 생겨 저온 결정 반응이 이루어지지 않는 것으로 나타났다.

이러한 결과를 통해 본 발명자들은 멸치유의 지방산으로부터 에이코사펜타엔산 및 도코사헥사엔산과 같은 다중 불포화지방산을 효과적으로 농축시켜 수득하기 위한 최적의 저온 결정화 온도는 -40℃인 것을 알 수 있었다.

나아가 본 발명자들은 저온 결정화 방법에 있어서, 멸치유 유래 유리지방산 대 acetonitrile 용매에 대한 최적의 혼합비율을 확인하기 위해, 에이코사펜타엔산의 농축율과 회수율에 대한 유리지방산 대 acetonitrile 비율(1:2~1:20 비율)의 영향을 조사하였다. 각기 다른 비율 조건으로 -40℃에서 2시간 동안 결정화하여 얻은 액체 분획의 지방산 조성을 분석하였다.

표 3

다양한 유리지방산 acetonitrile 비율(w/v)에서 저온 결정화 후 액체 분획의

지방산 조성분석(%)

Fatty acids	Anchovy oil	1:2	1:5	1:10	1:15	1:20
C14:0	12.93	0.31±0.0	0.47±0.2	0.60±0.0	0.48±0.1	0.67±0.2
C16:0	26.89	0.00±0.0	0.00±0.0	0.24±0.1	0.00±0.0	0.00±0.0
C16:1n7	10.37	5.67±1.1	7.04±2.7	6.81±0.4	7.37±0.5	8.59±1.1
C18:0	5.64	0.00±0.0	0.00±0.0	0.00±0.0	0.00±0.0	0.00±0.0
C18:1n9	9.34	2.41±1.3	2.04±0.8	1.98±0.1	2.23±0.2	2.97±0.2
C18:1n7	3.48	1.33±0.6	1.27±0.5	1.25±0.1	1.38±0.1	1.79±0.2
C18:2n6	1.20	1.15±0.3	1.46±0.4	1.76±0.1	1.98±0.1	2.15±0.1
C18:3n3	0.83	1.28±0.0	1.60±0.3	1.78±0.1	1.92±0.1	1.97±0.1
C18:4n3	2.46	8.62±1.8	9.68±0.8	8.43±0.3	8.33±0.3	7.99±0.9
C20:1n9	0.92	0.17±0.2	0.00±0.0	0.16±0.0	0.06±0.1	0.14±0.1
C20:4n6	1.04	2.34±0.3	2.61±0.2	3.01±0.0	2.99±0.1	3.02±0.2
C20:4n3	0.63	1.27±0.1	1.47±0.0	1.72±0.0	1.75±0.0	1.77±0.1
EPA	17.21	55.69±3.6	54.68±2.7	53.73±0.3	53.11±0.6	50.82±0.6
DPA	1.42	2.97±0.5	3.32±0.5	3.60±0.1	3.65±0.1	3.87±0.9
DHA	5.64	16.81±0.8	14.39±2.6	14.92±0.6	14.73±0.5	14.25±1.4
EPA & DHA	22.85	72.49±2.7	69.07±5.2	68.66±0.8	67.84±0.8	65.07±1.6
EPA yield		19.84±6.8	57.54±4.4	79.15±3.4	85.89±1.0	88.14±1.4
DHA yield		19.29±6.8	51.61±1.0	76.89±3.6	83.48±0.9	86.12±0.2
EPA & DHA yield		19.71±6.8	56.22±3.2	78.65±3.4	85.35±0.9	87.71±1.1

[0109]

[0110]

그 결과, 상기 표 3에 나타낸 바와 같이, 고도불포화 지방산의 농축율과 회수율은 1:2, 1:5, 1:10 비율에서 보다 1:15 및 1:20의 비율로 사용한 군에서 더 증가된 것으로 나타났다. 구체적으로, 1:2와 1:5의 농축율은 다른 실험군과 유사하게 나타났으나, 회수율이 모두 60% 미만이어서 이 보다 높은 값을 나타내는 1:10, 1:15, 1:20에 대한 농축율과 회수율을 통계적으로 ANOVA를 사용하여 분석하였다.

[0111]

1:10과 1:15의 에이코사펜타엔산 농축율은 53.73% 및 53.11%로 나타나 $p>0.05$ 로 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 그러나 1:10과 1:15의 79.15%와 85.89%의 회수율을 비교할 때 $p<0.05$ 로 유의적인 차이가 있었다. 따라서 이러한 결과를 볼 때, 농축율 및 회수율 모두를 고려할 때, 최적의 유리지방산 대 용매의 혼합비율은 1:15임을 알 수 있었다. 나아가 1:15와 1:20의 에이코사펜타엔산 농축율을 비교하였을 때 53.11%와 50.82%의 값은 $p<0.05$ 로 유의적인 차이를 보였으나, 회수율 비교에서는 1:15와 1:20의 값이 85.89%와 88.14%로 나타났고 이러한 값은 $p>0.05$ 로 유의적인 차이가 없었다.

[0112]

따라서 이러한 결과를 통해 저온 결정화 방법에 있어서, 멸치유 유래 유리지방산 대 acetonitrile 용매의 최적 혼합 비율은 1:15임을 알 수 있었다.

[0114]

이상의 실험을 통해 본 발명자들은 멸치유의 유리지방산으로부터 고농축된 오메가-3 불포화지방산을 효과적으로 수득하기 위한 최적의 저온 결정반응 조건은 -40°C 의 온도에서 acetonitrile 용매를 사용하며, 유리지방산 대 acetonitrile 용매를 1:15(w/v)의 비율 조건이라는 것을 알 수 있었고, 이러한 조건에서 EPA 및 DHA의 농축율은 22.85 wt%에서 67.84 wt%로 증가한 것으로 나타났고, EPA 및 DHA의 회수율(yield)은 85.35 wt%의 높은 회수율을 보였으며, EPA, DPA 및 DHA 함량의 합은 초기 지방산의 24.27%에서 저온 결정화 후 71.49%까지 증가하는 것으로 나타났다.

[0116]

<1-2> 효소 촉매 에스테르 반응의 최적 조건 확립

[0117] 다음으로, 효소 촉매 에스테르 반응의 최적 조건을 규명하기 위해 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[0119] (1) 검화를 통한 멸치유로부터 지방산의 제조

[0120] 상기 <1-1>의 멸치유로부터 검화 과정을 통해 지방산을 제조하는 방법과 동일한 방법으로 수행하였다.

[0122] (2) 멸치유 지방산과 파이토스테롤을 이용한 에스테르 반응으로 오메가-3 불포화지방산의 농축

[0123] 상기 (1) 단계에서 수득한 멸치유 유래 유리지방산을 파이토스테롤과 함께 효소 촉매 에스테르 반응을 회분식 반응기 시스템에서 수행하였다. 지방산과 파이토스테롤을 포함한 4g의 총 기질을 다양한 몰비율로 50mL 워터 자켓 유리반응조에 넣고 용매로서 cyclohexane을 첨가하였다. 이어서, 반응 혼합물을 순환식 항온수조를 사용하여 원하는 온도로 맞춰준 뒤 300rpm의 속도로 교반하였다. 반응은 캔디다 루고사 효소 첨가로 시작하였다. 적절한 시간 간격으로 반응 혼합물에서 샘플(100 μ L)을 회수하고 클로로포름에 용해시켰다. 이후 0.45 μ m 마이크로필터(Pall Corporation, Port Washington, NY, USA)를 통해 여과하여 효소를 완전히 제거했다. 추가적으로 잔존 cyclohexane과 클로로포름의 혼합 용매를 70°C에서 질소를 이용하여 잔존 용매를 제거하였으며 효과적인 용매 제거를 위하여 질소 주입은 비교적 높은 기류 속도로 20분 동안 주입하였다. 용매가 없는 샘플은 클로로포름으로 희석하였고, 샘플을 박층 크로마토그래피(TLC) 및 가스 크로마토그래피(GC)로 분석하였다.

[0125] (3) 생성물 분석

[0126] 생성물의 분석은 다음과 같은 방법으로 수행하였는데, 잔류 지방산의 에이코사펜타엔산 함량을 측정하기 위해 클로로포름에 용해된 30mg의 샘플을 박층 크로마토그래피(TLC) 실리카겔 60 F254 플레이트(Merck KGaA, Darmstadt, Germany)에 로딩하였다. 이때 사용한 전개용매는 petroleum ether : diethyl ether : acetic acid(80:20:0.5, 부피비)가 혼합된 용매를 사용하였고, 전개 후 2,7-dichlorofluorescein 용액(0.2% in 95% methanol)을 분무하여 자외선을 통하여 확인하였다. 유리 지방산, 파이토스테롤, 파이토스테릴 에스터 각각의 분획에 해당하는 밴드를 TLC판에서 회수하고 각 분리된 분획은 BF₃ 메탄올을 촉매로 한 유도체화 반응을 통하여 지방산 메틸 에스터로 유도체화 시킨 후 n-hexane(1mL)으로 추출하였다. 분석을 위해 Supelcowax10 컬럼(30m x 0.25mm 내경.; Supelco, Bellefonte, PA, USA)과 화염 이온화 검출기(FID)가 장착된 가스 크로마토그래피(model 3800; Varian, Palo Alto, CA, USA)를 사용하였고, 분석 조건은, 컬럼을 초기 180°C에서 1 분 동안 유지하고 2°C/min의 속도로 230°C까지 상승한 후 20 분 동안 유지하였다. 캐리어 가스는 헬륨을 사용하였고, 컬럼 유속은 1.0 mL/min으로 하였으며, Split ratio는 1:50, injector 및 detector 온도는 각각 240°C 및 250°C로 설정하여 수행하였다. 유도체화된 지방산들은 표준 지방산의 머무름 시간과 비교하여 식별하였다.

[0127] 반응물 내 파이토스테릴 에스터 전환율 분석은 DB-1HT 컬럼 (15m x 0.25mm 내경.; J&W Scientific, Folsom, CA, USA)과 화염 이온화 검출기 (FID)가 장착된 가스 크로마토그래피(model 3800; Varian, Palo Alto, CA, USA)를 사용하였으며, 분석 조건으로, 컬럼을 초기 120°C에서 3 분 동안 유지하고 25°C/min의 속도로 370°C까지 상승한 후 3 분 동안 유지하였다. 캐리어 가스는 헬륨이었고 컬럼 유속은 1.5 mL/min이다. Split ratio는 1:50, injector 및 detector 온도는 380°C 설정하였다. 가스 크로마토그래피 분석결과로부터 얻은 전환율 (wt%)은 지방산 (a), 파이토스테롤, 파이토스테릴 에스터 (b)의 면적으로부터 아래와 같은 함수식에 대입하여 계산하였다.

$$\text{전환율 (wt \%)} = \frac{a}{a+b} \times 100$$

[0128]

[0129] 또한 잔류 지방산의 에이코사펜타엔산(EPA)의 회수율 (wt%)은 초기 멸치유의 EPA 함량 (c), 잔류지방산의 EPA 함량 (d), 에스터 전환율 (d)로부터 아래와 같은 함수식에 대입하여 계산하였다.

$$\text{EP 회수율 (wt \%)} = \frac{d(1 - \frac{e}{100})}{c} \times 100$$

[0130]

- [0132] (4) 결과
- [0133] 본 발명자들은 에스테르 반응을 통한 오메가-3 불포화지방산의 수득에 있어서, 최적의 에스테르 반응 조건을 확인하기 위한 실험을 앞서 기술된 방법으로 수행하였다.
- [0134] 먼저, 오메가-3 불포화지방산의 함량, 회수율 및 파이토스테롤의 파이토스테릴 에스테르로의 전환율에 기질의 물비율이 미치는 영향을 분석하였으며, 이때 용매, 온도, 효소 로딩 및 용매의 양은 각각 cyclohexane, 40℃, 10%(총 기질인 피토스테롤 및 지방산을 합한 중량 기준) 및 20mL(5mL/g)으로 하여 분석하였다.
- [0135] 파이토스테릴 대 지방산을 1:1~4:1의 다양한 물비에서 수행한 결과, 물비율이 1:1에서 3:1로 증가함에 따라 최대 함량과 전환율이 모두 증가하는 것으로 나타났고, 물비율이 더 높을수록 초기 반응 속도가 더 빠른 것으로 확인되었다(도 3a). 또한 물비율 3:1에서 에이코사펜타엔산의 최대 함량은 61% 이상인 것으로 나타난 반면, 물비율 4:1에서는 12h에서의 최대 함량 값이 3:1의 8h에서 보다 낮게 나타났다(도 3b). 또한 물비율 3:1에서 얻은 에이코사펜타엔산 회수율은 가장 높은 에이코사펜타엔산 함량에서 4:1에서 얻은 것보다 높은 것으로 나타났다(도 3c).
- [0136] 또한, 3:1 물비율인 경우, 파이토스테릴의 파이토스테릴 에스테르로의 전환율도 높은 것으로 나타났다.
- [0137] 결과적으로, 본 발명자들은 이러한 실험결과를 통해 최적의 파이토스테롤 대 지방산의 물비율은 3:1인 것을 알 수 있었다.
- [0139] 또한, 본 발명자들은 최적의 반응온도 조건을 확인하기 위한 분석을 수행하였다.
- [0140] 반응온도는 효소의 선택성과 활성에 영향을 미치기 때문에 효소반응에서 매우 중요한 요소이다. 또한, 파이토스테롤의 높은 융점 때문에 반응 온도는 용해도에 상당한 영향을 미치고 반응 속도를 변화시킬 수 있으므로, 본 발명자들은 전환율(파이토스테릴의 파이토스테릴 에스테르로의 전환율), 오메가-3 불포화지방산 함량 및 회수율에 온도가 미치는 영향을 반응 시간에 따른 활성비교로 나타내었다. 여기서 온도는 30℃ ~ 60℃의 온도 범위에서 수행되었으며 용매, 물비율, 효소량 및 용매의 양은 각각 cyclohexane, 3:1 (파이토스테롤 대 지방산), 10%(총 기질 중량 기준) 및 20mL(5mL/g)으로 수행하였다.
- [0141] 분석 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 온도가 30℃에서 50℃로 증가할 때 전환율이 현저하게 증가한 반면, 60℃에서의 전환율은 오히려 50℃에서의 전환율보다 낮았다(도 4a). 또한, 에이코사펜타엔산 함량의 반응 속도는 30~40℃ 사이의 반응 온도가 높을수록 꾸준히 증가하였다. 그러나 반응 12시간 후 에이코사펜타엔산 함량은 40, 50, 60℃에서 유의미적 차이가 없었다(도 4b). 또한 40℃에서 얻은 에이코사펜타엔산 회수율은 50℃ 및 60℃보다 높은 것으로 나타났다(도 4c).
- [0142] 따라서 효소적 에스테르화를 통한 오메가-3의 농축 및 파이토스테릴 에스테르의 합성에 가장 효율적인 최적은 온도는 40℃임을 알 수 있었다.
- [0144] 다음으로, 최적의 효소량을 확인하였는데, 효소의 활성부위는 효소 반응 수행에 영향을 미치는 가장 중요한 요소 중 하나이며 효소량과 비례한다. 그러나, 과량의 효소는 효소의 선택성에 악영향을 미칠 수 있고 경제적으로도 비효율적일 수 있으므로 본 발명자들은 효소 촉매를 이용한 에스테르 반응에서의 최적 효소량을 규명하기 위해 5%~ 15% 범위의 효소량을 사용하였고, 용매, 물비율, 온도 및 용매량은 각각 cyclohexane, 3:1 (파이토스테롤 대 지방산), 40℃ 및 20mL(5mL/g)에서 수행하였다. 또한, 효소로는 캔디다 루고사 효소를 사용하였다.
- [0145] 분석 결과, 전환율, 에이코사펜타엔산 함량 및 회수율에 효소량이 미치는 영향을 도 5에 반응 시간에 따른 활성비교로 나타내었는데, 반응 속도는 8시간까지 5%에서 15%로 효소량이 많을수록 꾸준히 증가하는 것으로 나타났고, 반면 8시간 후에는 10% 및 15%에서 거의 유사한 수준을 보였다(도 5a). 에이코사펜타엔산의 농축 함량은 반응 12시간에서 10% 효소량을 사용한 군이 15% 효소량을 사용한 군보다 높게 나타났다(도 5b).
- [0146] 따라서 이러한 결과를 토대로 볼 때, 효소량은 10% 로 사용하는 것이 가장 최적의 조건임을 알 수 있었다.
- [0148] 나아가 본 발명자들은 용매량의 최적 조건을 확인하기 위한 과정도 수행하였다. 효소 촉매 에스테르 반응은 유기 용매에서 수행되며, 반응물의 용해도를 향상시킬 뿐만 아니라 역반응을 가능하게 하고 종종 2개의 상 평형

시스템 중 유기 상에서 생성물을 쉽게 회수할 수 있다. 파이토스테롤을 기질로 사용하는 경우 파이토스테롤의 용점이 높기 때문에 용매에서 반응하는 것이 특히 중요하다.

[0149] 이에 본 발명자들은 오메가-3 불포화지방산의 함량과 파이토스테릴 에스터의 합성에 용매량이 미치는 영향을 확인하기 위해 3mL/g에서 6mL/g 용매량 범위에서 분석을 수행하였다. 또한, 용매, 몰비율, 온도 및 효소량은 각각 cyclohexane, 3:1 (파이토스테롤 대 지방산), 40℃ 및 10%(총 기질 기준) 조건에서 수행하였다.

[0150] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 효소 반응에서 용매의 양은 4mL/g에서 6mL/g까지 비슷한 결과를 보여 통계적으로 차이가 나지 않았다(도 6a). 그러나 3mL/g과 4mL/g 사이에는 에이코사펜타엔산 함량과 회수율에 상당한 차이가 있는 것으로 나타났다. 3mL/g 또는 4mL/g과 같은 적은 양의 용매는 반응 초기에 파이토스테롤이 잘 녹지 않았으나 반응 개시 2시간 이내에 파이토스테릴 에스터가 생성되어 모든 기질이 혼합되는 것으로 나타났다. 또한, 에이코사펜타엔산의 농축 함량은 4mL/g 용매량을 사용한 군이 가장 높은 것으로 나타났다(도 6b).

[0151] 따라서 이러한 결과를 통해 효소 촉매 에스테르 반응에서 최적의 용매량은 4mL/g임을 알 수 있었다.

[0153] 이상의 실험을 통해 본 발명자들은 멸치유의 유리지방산으로부터 고농축된 오메가-3 불포화지방산을 효과적으로 수득하기 위한 최적의 효소 촉매 에스테르 반응조건은 몰비율, 온도, 효소량 및 용매량의 조건이 각각 3:1(파이토스테롤 대 지방산), 40℃, 10%(기질 총 중량 기준), 4mL/g인 것을 확인할 수 있었다.

[0154] 또한 최적 조건에서 에스테르화되지 않은 지방산의 에이코사펜타엔산 함량은 초기 지방산의 20%에서 6시간의 반응 시간 후 46%까지 크게 증가했다. 도코사펜타엔산과 도코사헥사엔산은 두 다중불포화지방산의 함량이 에이코사펜타엔산보다 훨씬 낮음에도 불구하고 유사한 경향으로 에스테르화되지 않은 지방산 분획에서 농축되었다. 그 결과 에이코사펜타엔산, 도코사펜타엔산 및 도코사헥사엔산 함량의 합은 캔디다 루고사 효소 촉매 에스테르 반응 후 초기 지방산의 24%에서 에스테르화되지 않은 지방산 분획의 65%까지 증가하였다. 또한 지용성 식품에 기능성 성분으로 응용되고 있는 파이토스테릴 에스테르는 본 발명에서 규명한 최적 조건에서 효소적 에스테르화 반응을 통해 오메가-3 불포화지방산의 농축과 함께 동시에 합성할 수 있는 것으로 나타났다.

[0156] <1-3> 저온 결정 및 효소 촉매 에스테르 반응의 2단계 과정을 통한 오메가-3 불포화지방산 농축효과 분석

[0157] 상기 실시예 <1-1> 및 <1-2>를 통해 규명한 저온 결정의 최적 조건 및 효소 촉매 에스테르 반응의 최적 조건을 조합한 2단계 과정을 모두 수행할 경우, 오메가-3 불포화지방산의 농축 효과를 분석하였다. 또한 비교군으로 저온 결정법만 수행하여 오메가-3 불포화지방산을 농축한 경우와 효소 촉매 에스테르 반응만 수행하여 오메가-3 불포화지방산을 농축한 경우를 함께 비교하였다.

[0158] 구체적으로 상기 2단계 과정을 조합한 실험은, 먼저 <1-1>에서 규명한 저온 결정 최적 조건에 따라 검화과정을 통해 수득한 멸치유 유래 유리지방산을 대상으로 용매로는 acetonitrile을 사용하고, -40℃의 온도에서 1:15의 지방산 대 acetonitrile 비율로 저온 결정을 수행하여 멸치유 지방산으로부터 오메가-3 불포화지방산을 함유한 액상 분획을 수득하였다. 이후, 상기 저온 결정으로 수득한 농축된 지방산을 파이토스테롤을 기질로 사용하여 상기 <2-2>에서 규명한 최적의 에스테르 반응 조건인, cyclohexane의 용매를 이용하고, 지방산 대 파이토스테롤의 몰비율을 3:1로 하여, 40℃에서 10%의 효소량(총 기질 중량 기준) 및 16mL(4mL/g)의 용매량으로 효소 촉매 에스테르 반응을 수행하였다.

[0159] 이후, 2단계 반응까지 완료된 최종 산물인 농축된 지방산의 조성을 분석하였다.

표 4

지방산	원치유 (wt%)	저온결정 (wt%)	에스테르 반응 (wt%)	저온결정 & 에스테르 반응 결합 (wt%)
C14:0	12.93	0.44	4.41	0.00
C16:0	26.89	0.15	4.92	0.00
C16:1n7	10.37	7.88	2.01	0.52
C18:0	5.64	0.00	3.03	0.00
C18:1n9	9.34	2.09	1.43	0.00
C18:1n7	3.48	1.40	0.62	0.34
C18:2n6	1.20	1.97	0.34	0.00
C18:3n3	0.83	0.48	0.39	0.65
C18:4n3	2.46	7.96	10.12	11.26
C20:1n9	0.92	0.13	1.18	0.00
C20:4n6	1.04	2.85	2.78	3.32
C20:4n3	0.63	1.70	1.38	1.92
C20:5n3 (EPA)	17.21	53.97	46.96	60.13
C22:5 (DPA)	1.42	3.78	3.44	4.00
C22:6n3 (DHA)	5.64	15.18	16.97	17.86

[0160]

[0161]

그 결과, 상기 표 4에 나타난 바와 같이, 저온결정 과정만을 수행한 경우 및 에스테르 반응만을 수행한 경우에 비해, 이들 과정을 결합하여 수행한 경우, 에이코사펜타엔산(EPA)은 약 60.13%로 고농축되는 것으로 나타났고, 도코사헥사엔산(DHA)은 17.86%까지 농축되는 것으로 나타났으며, 기능성 오메가-3의 불포화지방산인 SDA, EPA, DPA 및 DHA를 합한 함량이 93.25%로 나타나 매우 높은 농도로 고농축된 오메가-3 불포화지방산을 얻을 수 있다는 것을 알 수 있었고, 포화지방산 및 단일불포화지방산은 거의 제거된다는 것을 알 수 있었다.

[0162]

한편, 저온 결정만을 수행한 경우에는 SDA, EPA, DPA 및 DHA의 함량이 총 80.89%인 것으로 나타났고, 에스테르 반응만을 수행한 경우에는 SDA, EPA, DPA 및 DHA의 함량이 총 77.49%인 것으로 나타났으며, 이들 과정을 단일로 수행한 경우에는 포화지방산 및 단일불포화지방산이 제거 되지 않고 다수 포함되어 있는 것으로 나타났다.

[0163]

뿐만 아니라, 본 발명에서 규명한 최적 반응 조건으로 저온결정 및 에스테르 반응을 결합하여 수행한 경우, 기능성 오메가-3을 효과적으로 농축시킬 수 있을 뿐만 아니라 동시에 기능성 식품 소재에 유용하게 사용할 수 있는 형태인 피토스테릴 에스테르의 합성도 가능한 것을 확인할 수 있었다.

[0164]

[0165]

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.

부호의 설명

[0166]

CRL : Candida rugosa lipase 캔디다 루고사 효소

DPA : docosapentaenoic acid 도코사펜타엔산

DHA : docosahexaenoic acid 도코사헥사엔산

EPA : eicosapentaenoic acid 에이코사펜타엔산

FAME : fatty acid methyl ester 지방산 메틸 에스터

FFA : free fatty acid 유리 지방산

GC : gas chromatography 가스 크로마토그래피

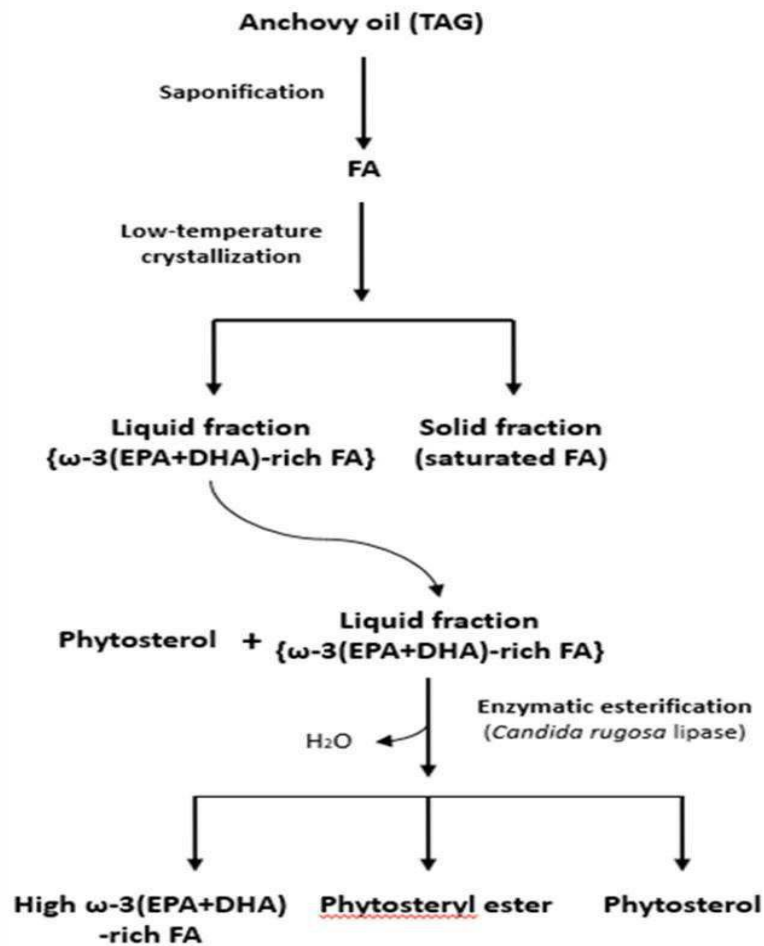
SDA : stearidonic acid 스테아리돈산

PUFA : polyunsaturated fatty acid 다중불포화지방산

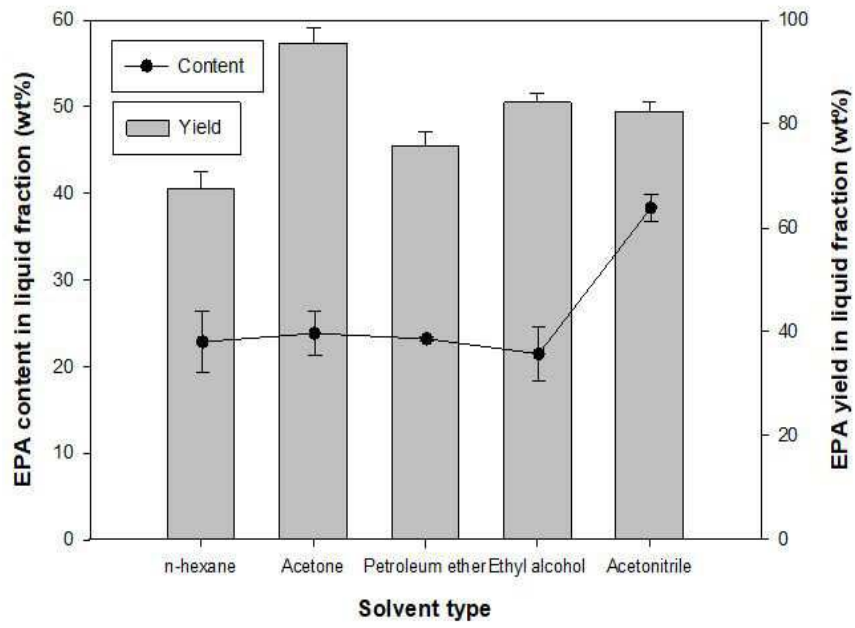
TLC : thin layer chromatography 박층 크로마토그래피

도면

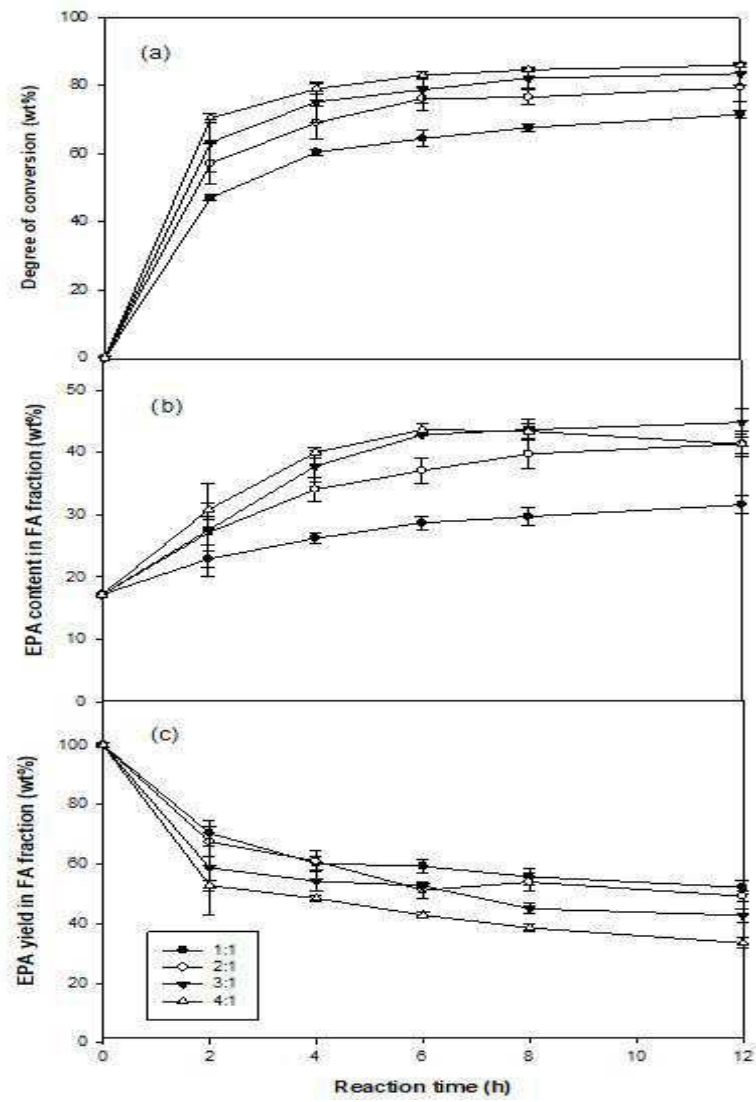
도면1



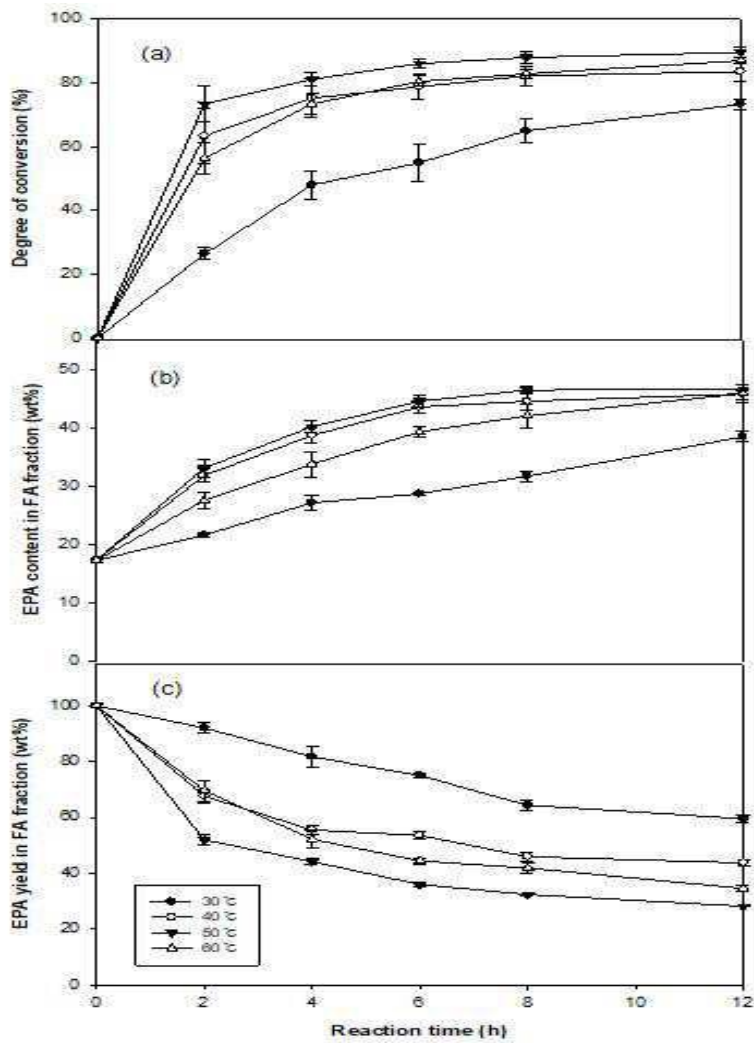
도면2



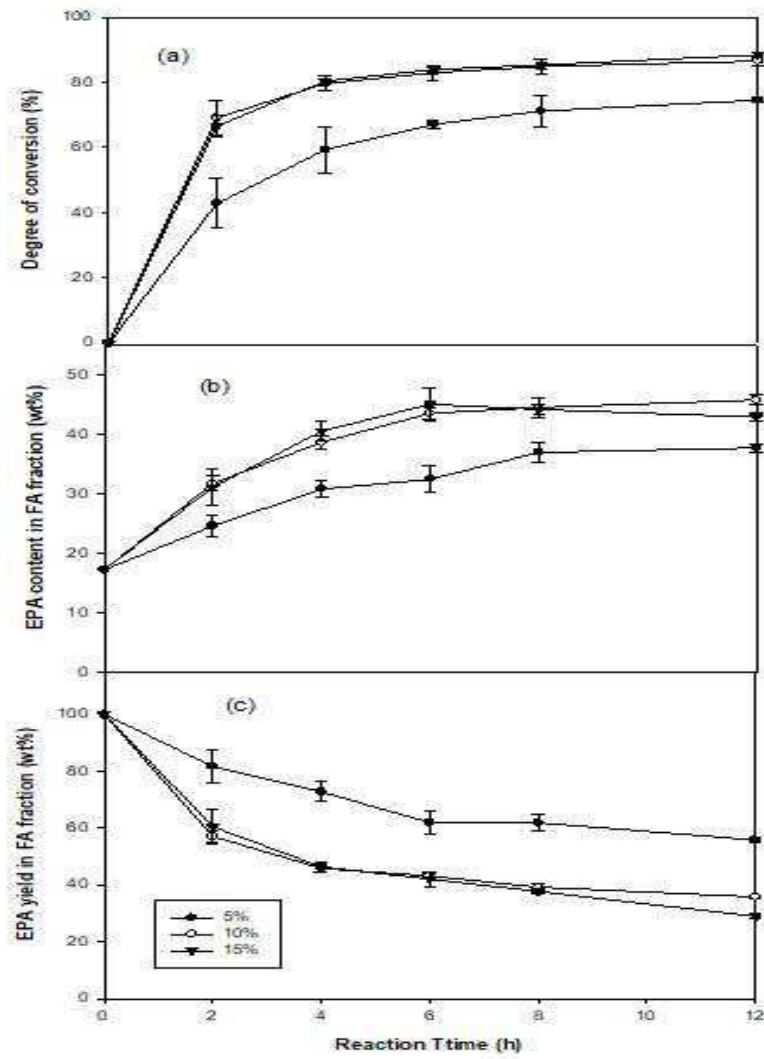
도면3



도면4



도면5



도면6

