

발간등록번호

11-1543000-000822-01

기능성 인지질의 효소적 합성과 식품 소재화 연구  
(Enzymatic Synthesis of Functional Phospholipids  
and Their Food Application)

연구기관  
고려대학교

농림수산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “기능성 인지질의 효소적 합성과 식품 소재화 연구에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2015 년 3 월 14 일

주관연구기관명 : 고려대학교

주관연구책임자 : 김 인 환

세부연구책임자 : 김 인 환

연 구 원 : 조 정 정

연 구 원 : 노 다 슝

연 구 원 : 김 민 영

연 구 원 : 백 지 연

연 구 원 : 최 나 경

협동연구기관명 : 중앙대학교

협동연구책임자 : 김 병 희

협동연구기관명 : (주) 일신웰스

협동연구책임자 : 이 은 현

# 요 약 문

## I. 제 목

기능성 인지질의 효소적 합성과 식품 소재화 연구에 관한 연구

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

인지질은 자연계에 존재하는 천연 유화제로서 인을 포함하는 복합지질이다. 인산기와 지방산을 가짐으로써 양친매성을 띠고 있으므로 계면활성제 및 유화제로서 활용이 가능하다. 인지질의 종류가 크게 포스파티딜콜린(phosphatidyl choline: 이하 PC), 포스파티딘산(phosphatidic acid: 이하 PA), 포스파티딜에탄올아민(phosphatidylethanolamine: 이하 PE), 포스파티딜세린(phosphatidylserine: 이하 PS)으로 4가지 종류가 있고, 생리적 기능성에서 약간의 차이를 보이나, 대체로 콜레스테롤 조절, 혈액 순환 개선 및 두뇌 영양 공급 등의 기능성을 갖는 것으로 알려져 있다.

이러한 기능성을 갖는 인지질이 유용한 지방산들과 결합하여 재구성 인지질을 합성함으로써 인지질의 생리적인 기능성을 향상시킬 뿐만 아니라 다양한 범위의 유화 능력을 갖는 인지질로 합성이 가능하다. 그 중에서도, 효소를 이용하여 합성하는 방법은 안전하고 친환경적인 방법이고, 효소를 이용한 반응은 화학적인 다른 방법들에 비하여 낮은 온도에서도 반응이 가능하며, 효소가 가지고 있는 특이성에 의하여 부산물의 생성이 적은 장점이 있다.

리소포스파티딜콜린(lysophosphatidyl choline: 이하 LPC)은 수중유적형 시스템에서 효과적인 유화제이며 글리세로포스포콜린(Glycerolphosphorylcholine: 이하 GPC)은 알츠하이머를 포함한 치매를 앓는 환자들을 위한 인지기능 개선제로 사용할 수 있다. 또한 LPC와 GPC를 합성 기질로 지방산을 결합시켜 구조 PC를 생산할 수 있다.

이에 본 연구에서는 첫 번째로 포스포리파아제 A1(phospholipase A1: 이하 PLA1)을 고정화시키고 이를 이용하여, 인지질과 지방산을 교환 에스테르화 반응을 시켜 재구성 인지질을 합성하여, 에스테르화 반응 시 진공 시스템을 이용하여 원하는 지방산의 함량을 높은 재구성 인지질의 수율을 향상시킬 수 있음을 확인하고자 한다. 두 번째로, 대두 PC를 PLA1 촉매 하에 가수분해하여 PC와 GPC를 생산하고 반응표면분석법을 이용하여 반응 조건을 최적화하고자 하였다. 세 번째로 당 과제를 통해 도출되는 효소적 개질을 거친 대두분말 PC와 LPC를 시판되고 있는 제품과 비교하여 개발 시제품의 레시틴 사용 분야에 대한 적용 가능성을 확인하고

자 한다. 특히 기존 화학적 합성 유화제를 배제하고 레시틴 단독 유화 제품에 적용하여 식품 가공분야에 우선 적용한다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

#### 1. 연구개발의 최종목표

기능성 PC와 LPC (GPC로부터 생산되는 기능성 LPC 포함)를 효소반응에 의해 효율적으로 합성하는 방법과 합성된 PC와 LPC를 선택적으로 분리 정제할 수 있는 방법을 찾고 이들을 기능성 식품소재로 이용할 수 있는 제품을 개발하는 것이 최종 목표이다.

#### 2. 연구개발의 주요내용

- (1) 건강기능 식품소재로 활용 가능한 PC와 LPC를 생산하고자 한다 (DHA-PC, DHA-LPC).
- (2) PC와 LPC를 이용하여 다양한 유화범위를 갖는 인지질을 생산하여 유화제로서의 기능성을 높인다 (MCFA-PC, LPC, MCFA-LPC).
- (3) 효소를 이용하여 기능성 PC와 LPC를 생산하는 방법을 산업화하기 위한 방안을 모색한다.
- (4) 기능성 PC와 LPC의 활용 방안을 모색하고 기능성을 평가한다.

#### 3. 연구개발의 범위

##### 가. 회분식 반응을 이용한 기능성 PC의 합성 및 정제 방법 확립

- (1) 기능성 지방산을 함유한 기능성 PC 합성
  - (가) 에스테르 교환반응을 위한 효소 고정화 조건 확립
  - (나) PC와 *n*-3 PUFA의 에스테르 교환반응을 이용한 방법
  - (다) PC와 DHA (또는 MCFA)의 에스테르 교환반응을 이용한 방법
- (2) 효율적인 합성을 위한 효소적 방법의 최적화
  - (가) 부산물로 생성된 수분을 진공으로 제거해 줌으로써 PC 농축

##### 나. 연속식 반응을 이용한 기능성 PC의 합성 및 정제 방법 확립

- (1) 연속식 반응 시스템(Packed bed reactor)에서 *n*-3 지방산 함유 기능성 PC 합성
  - (가) 연속식 반응 시스템 구축
  - (나) PC와 *n*-3 PUFA를 기질로 하는 효소반응
- (2) 생산된 *n*-3 지방산 함유 기능성 PC의 농축 공정 확립
  - (가) 초임계 이산화탄소를 이용한 기능성 PC의 농축
  - (나) Liquid-liquid fractionation을 이용한 기능성 PC의 농축



다. Bulk-scale에서 기능성 PC의 합성 및 정제 방법 확립

- (1) Bulk scale 연속식 반응 시스템에서의 기능성 PC 합성 및 수득을 향상 최적화
  - (가) Bulk scale에서 회분식 및 연속식 반응 시스템에서 PC와  $n-3$  PUFA를 기질로 하는 효소반응 최적화
  - (나) Bulk scale에서 진공 반응을 이용한  $n-3$  PUFA 함유 기능성 PC 최적 조건 확인
- (2) Bulk scale에서 기능성 PC의 분리 정제 방법의 최적화
  - (가) Bulk scale에서 초임계 이산화탄소 및 countercurrent liquid/liquid 분리 조건 최적화

라. 기능성 LPC의 합성 및 정제 방법 확립

- (1) PC로부터 LPC 생산
  - (가) PC의 가수분해를 통하여 지방산 하나를 제거하는 방법
- (2) 효율적인 합성을 위한 효소적 방법의 최적화
  - (가) 효소를 촉매로 이용하는 방법

마.  $sn-1$ -LPC의 합성 및 정제 방법 확립

- (1)  $sn-1$ -LPC의 생산
  - (가) 가수분해에 의한 PC의 지방산 한 개를 제거하는 방법
  - (나) 효소를 촉매로 이용하는 방법
  - (다) 회분식 반응 시스템을 이용하는 방법
- (2)  $sn-1$ -LPC의 분리정제
  - (가) 용매-용매 추출을 이용하는 방법
  - (나) 초임계 추출을 이용하는 방법

바. 기능성 LPC의 bulk-scale 생산 공정 확립

- (1) 효소촉매 가수분해반응의 다양한 반응변수의 최적조건 확립
- (2) Small-scale 효소촉매 에스터화 반응의 다양한 반응변수의 최적조건 확립
  - (가) Bulk-scale 회분식 효소반응 시스템을 이용한 PC의 가수분해에 의한 GPC 생산의 최적화
  - (나) Bulk-scale 진공 효소반응 시스템을 이용한 GPC와 DHA (또는 MCFA)로부터 LPC의 생산 최적화

사. 기능성 PC와 LPC의 최적 활용 제품 개발

- (1) 대두 PC 및 LPC 관련 제품 조사
- (2) 시판 대두 PC 및 LPC의 유효특성 실험

- (가) 본 연구에서 합성하는 기능성 PC 및 LPC의 특성과 비교하기 위한 기초 자료 조사
- (3) 본 연구에서 합성하는 기능성 PC와 LPC의 시제품 적용 평가

아. 효소적 방법으로 생산된 인지질의 적용 특성 평가

- (1) 기능성 PC와 sn-1-LPC의 기본 분석
- (2) 기능성 PC 및 sn-1-LPC와 시판 soybean lecithin의 유화안정성 비교실험

자. 기능성 PC 및 LPC 유화 특성 연구

- (1) 기능성 PC 및 LPC 적용 제품의 Bulk-Scale 생산 체계 구축
  - (가) 기능성PC와 LPC 적용화 실험
  - (나) 기능성PC와 LPC와 시판 대두레시틴의 유화안정성 비교 실험

## IV. 연구개발결과

본 연구에서는 1) 기능성 포스파티딜콜린의 합성 및 농축, 정제 방법 개발, 2) 기능성 리소포스파티딜콜린의 합성 및 정제 방법 개발, 3) 기능성 포스파티딜콜린 및 리소포스파티딜콜린의 최적 활용 제품 개발을 수행하였다.

첫 번째로, 기능성 포스파티딜콜린의 합성 및 농축, 정제 방법 개발을 위하여 *Thermomyces lanuginosus* 또는 *Fusariumoxysporum* 으로부터 유래된 포스포리파아제 A1 (PLA1)을 효소로 고정체를 이용하여 고정화시키고, 인지질로 포스파티딜콜린 (phosphatidyl choline) 및 지방산으로 *n*-3 PUFA를 기질로 사용하여 산가수분해 반응 및 에스테르 교환반응을 통해 원하는 지방산의 함량을 높인 재구성 인지질을 합성하는 방법을 최적화하였다. 반응산물의 정제를 위한 초임계추출법과 liquid-liquid fractionation을 최적화하였다. 기질로 사용된 *n*-3 PUFA의 DHA 함량은 약 70% 이었다. 먼저, PLA1 효소의 최적 고정체로 Lewatit VP OC 1600을 선정하였고, 산가수분해 반응의 최적조건은 몰비율 1:8 (인지질:지방산), 온도 55℃, 효소량 20%(기질량 대비), 수분함량 1.0%(기질량 대비)이었다. 그 결과, *n*-3 PUFA의 최적 결합물로 57.4 몰%을 얻었고, 그 때의 인지질 수율은 16.7 몰%이었다. 인지질의 수율을 높이기 위한 에스테르 교환반응의 최적조건은 몰비율 1:8 (인지질:지방산), 온도 55℃, 수분함량 1.0%(기질량 대비) 이었다. 그 결과 최대 인지질 수율은 56 몰%이었다. 지방산을 제거를 위한 초임계 이산화탄소 추출의 최적 조건으로 추출 압력 6000psi, 온도 45℃가 선정되었다. 초임계 추출이 끝난 후 추출되지 않고 남은 시료에서 인지질의 함량이 산가수분해 반응 후 함량 11.3 중량%에서 36.4 중량%로 증가하였다. 초임계 추출이 끝난 시료에서 잔류 지방산 및 리소포스파티딜콜린을 제거하기 위하여 liquid-liquid fractionation을 실시한 결과, 디클로로메탄이 최적 용매로 선정되었고, 10mL 디클로로메탄에 대하여 25mL 증류수를 사용하는 것이 적합하다는 것이 확인되었다. 최종적으로 얻어진 PC 농축물에서 PC의 함량은 72.6 중량%이었고, 이는 초

임계 추출 후 36.5 중량%와 비교하여 약 2배, 산가수분해 반응 후 11.3 중량%와 비교하여 약 7배 가량 농축된 값이었다.

두 번째로, 기능성 리소포스파티딜콜린의 합성 및 정제 방법 개발을 위하여 대두 포스파티딜콜린을 포스포리파제 A1 촉매 하에 가수분해하여 리소포스파티딜콜린과 글리세로포스포콜린을 생산하고 반응표면분석법을 이용하여 반응 조건을 최적화하고자 하였다. 회분식반응기에서 생성되는 리소포스파티딜콜린과 글리세로포스포콜린 함량의 모델을 설립하기 위해서 온도, 반응시간, 수분함량, 효소량의 영향을 조사하였다. 아실기 이동을 억제하고 리소포스파티딜콜린의 함량을 최대로 하는 최적조건은 온도 60°C, 반응시간 3시간, 수분함량 10%(기질량 대비), 효소량 1%(기질량 대비)이었다. 리소포스파티딜콜린은 기존의 포스파티딜콜린보다 전체 불포화지방산 함량이 높고 주로 리놀레산(78mol%)으로 구성되어 있었다. 포스파티딜콜린을 완전히 가수분해하여 글리세로포스포콜린의 함량을 최대로 하는 최적조건은 온도 50°C, 반응시간 30시간, 수분함량 69%(기질량 대비), 효소량 13%(기질량 대비)이었다.

세 번째로, 개발한 기능성 포스파티딜콜린 및 기능성 리소포스파티딜콜린의 제품 개발을 위하여 시판 대두레시틴 적용 분야에 각각의 개질된 레시틴이 사용되고 있는바 당 과제를 통해 도출되는 효소적 개질을 거친 대두분말 PC의 적용 가능한 분야에 대한 가능성을 확인하였다. 이에 기존 화학적 합성 유화제를 배제하고 레시틴 단독 유화 제품에 적용하여 식품 가공분야에 우선 적용한다. 대두레시틴과 대두분말 PC의 순도 차이 이외 일반 분석에는 큰 차이가 없었다. 초기 표면장력 저하는 대두레시틴에 비해 대두분말 PC가 우수하였다. 더불어 유화 후 초기 표면장력은 각 시판 대두레시틴 제품의 투입농도와 비례한다는 사실을 확인하였다. Turbiscan 시험기를 이용하여 제조된 유화물을 상온(25도)에서 3일간 보관하면서 경과시간에 따른 유화 및 분산안정성에 대한 실험을 진행한 결과, 대두레시틴을 이용한 유화물이 대두분말 PC에 비하여 유화 안정성이 우수함을 확인하였으며, 이는 대두유를 O/W형으로 유화함에 있어 계면활성제로 이용한 대두레시틴과 대두분말 PC의 분자량에 대한 영향으로 추정된다. 대두분말 PC와 대두레시틴의 각 동일 조건에서의 평균입도 변화에 있어 대두분말 PC는 입도의 평균 직경이 크게 증가하였지만, 대두레시틴은 큰 변화가 없는 것으로 보아, 대두레시틴의 유화안정성이 대두분말 PC에 비해 크게 양호한 상태임을 확인하였다. 시판중인 미국 Cargil社 Lyso-대두레시틴(EMULTOP IP)과 비교시 유사한 유화안정성과 유화특성을 확보한 LPC의 유화특성을 확인하였다. 특히, 표면장력 저하능력 평가에서 동일 표면장력 저하에 필요한 요구 농도가 시판 Lyso-대두레시틴 대비 1/100, 기능성 PC 대비 1/500의 매우 적은 투입 농도에서도 동일한 LPC의 표면저하능력을 확인할 수 있었다. Turbiscan을 사용하여 60도 온도 조건에서의 분산안정성 평가에 있어서 초기 안정성은 시판 Lyso-대두레시틴이 기능성 PC 및 LPC에 비해 우수하였으나 2일 이상 분산안정성은 기능성 PC가 보다 우수하였다. 시판 Lyso-대두레시틴의 평균 입도 반지름은 16.98um, 기능성 PC의 평균 입도 반지름은 28.64um, LPC의 평균 입도 반지름은 14.0um로 LPC의 평균 입도 반지름이 가장 안정적이었으나 평균 입도 분포 폭은 시판 Lyso-대두레시틴 > LPC > 기능성 PC로 확인되었다. Bulk-Scale에서 Acetone

Insoluble 함량 95.5%이고 Lyso-Form 20% 이상이며 잔류 산가가 40 이하인 상품성 높은 시제품을 생산 확인하였다. 식품분야 중 초코렛 점도 저하 용도로 사용 시 기존 화학합성품인 PGPR 대비 동등 이상의 Viscosity Modification 효과를 확인 하였다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

### 1. 논문 및 학술발표 실적

구분	논문명	잡지 또는 학회명
논문 (SCI)	Immobilized phospholipase A1-catalyzed modification of phosphatidylcholine with <i>n</i> -3 polyunsaturated fatty acid (Accepted)	Food chemistry
논문 (SCI)	Modeling and Optimization of Phospholipase A1-Catalyzed Hydrolysis of Phosphatidylcholine Using Response Surface Methodology for Lysophosphatidylcholine Production (In press)	Biotechnology Progress
학술대회 (국외)	Optimization of Phospholipase A1 Catalyzed Hydrolysis of Phosphatidylcholine for Producing Lysophosphatidylcholine by Response Surface Methodology	104th AOCS annual meeting (2013)
학술대회 (국외)	Enzymatic Modification of Phosphatidylcholine with <i>n</i> -3 Polyunsaturated Fatty Acid using Immobilized Phospholipase A1	104th AOCS annual meeting (2013)
학술대회 (국외)	Immobilized phospholipase A1-catalyzed modification	1st Asian Conference on Oleo Science
학술대회 (국외)	Phospholipase A1-Catalyzed Production of Lysophosphatidylcholine and Glycerolphosphorylcholine from Soy Phosphatidylcholine	10th International Symposium on Biocatalysis and Agricultural Biotechnology
학술대회 (국내)	Modeling and Optimization of Phospholipase A1-Catalyzed Production of Soy sn-1-Lysophosphatidylcholine by Response Surface Methodology	2013년도 한국식품영양과학회
학술대회 (국내)	Modeling and Optimization of Phospholipase A1-Catalyzed Hydrolysis of Soy Phosphatidylcholine Using Response Surface Methodology for L-Alpha-Glycerolphosphorylcholine Production	2014년도 한국식품영양과학회

2. 특허 실적

출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2013	재구성 인지질의 합성 방법	김인환 외 3인	대한민국	10-2013-0099146

3. 연구성과 활용

(단위 : 건수)

구분	기술실시(이전)
활용건수	1

4. 연구인력 활용 및 양성 성과

총인원	대상 (학위별, 취득자)		성별	
	박사	석사	남	여
6	1	5	1	5

5. 연구개발결과의 활용방안 및 기대성과

가. 활용방안

- (1) 기능성 PC 또는 PC로부터 생산된 LPC 또는 GPC로부터 생산된 기능성 LPC는 기능성 식품으로서 의미가 있다.
- (2) 기능성 PC 또는 PC로부터 생산된 LPC 또는 GPC로부터 생산된 기능성 LPC는 양매성에 의하여 화장품이나 식품의 유화제로서 활용 가치가 있다.
- (3) 본 연구에서 재료로서의 PC와 LPC외에도 산업적으로 활용방안까지 모색하고자 하므로 중소기업의 산업 발전에 기여할 수 있다.

나. 기대성과

- (1) 유지의 탈검 과정에서 버려지는 인지질을 고부가가치 상품으로 활용할 수 있다.
- (2) 본 연구의 결과물로서 얻어지는 기능성 인지질은 생리적 기능성은 물론 넓은 유화범위를 갖는 유화제로서 활용가치가 높다.
- (3) 자연친화적인 원료와 생산 방법을 산업화 시킴으로써 현시대의 경향성에 부합된다.
- (4) 본 연구는 효소를 이용하여 합성된 기능성 인지질은 건강기능식품 및 식품첨가물로 등재될 수 있으며, 이를 활용한 고부가가치 산업으로 발전 가능성이 있다.
- (5) 특정 원료에서 생산되는 기능성 인지질의 공급량을 증가시키고 유화범위를 확대하여 활용성을 넓힘으로써 인지질의 시장성을 확대시킬 수 있다.

# SUMMARY

## I. Title

Enzymatic Synthesis of Functional Phospholipids and Their Food Application

## II. The purpose and necessity of research and development

Phospholipids (PLs) are major constituents of cell membranes and play crucial roles in the biochemistry and physiology of the cell. PLs have been widely used in food, pharmaceutical, and cosmetic products as highly efficient emulsifiers. *n-3* polyunsaturated fatty acid (*n-3* PUFA), especially eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), have received significant scientific attention because of their health benefits, which include improvement of immune function and prevention of heart disease and cancer. Although PLs containing *n-3* PUFA is available in fish and marine products, refinement procedures, including laborious extraction and separation, are required for it to be used industrially. Thus, enzymatic modification using inexpensive plant lecithin. (PC, phosphatidylcholine) and a rich *n-3* PUFA source might be an effective method for obtaining *n-3* PUFA-enriched PLs. Replacement of fatty acid residues present in a native PL by fatty acids with beneficial physiological effects can lead to tailored PLs that offer intriguing marketing opportunities for manufacturers of nutraceuticals. Lysophosphatidylcholine (LPC) and glycerylphosphorylcholine (GPC) are derivatives of phosphatidylcholine (PC) in which either one and both of two acyl chains are removed, respectively. LPC is an effective emulsifier in oil-in-water emulsion system. GPC may have potential for the treatment of Alzheimer's disease and dementia. Both can also be used as substrates for synthesizing structured PC with a desired fatty acid profile. The first goal of this study was to develop enrichment process of *n-3* PUFA into modified PC using immobilized phospholipase

A<sub>1</sub>. The second goal of this study was to model the phospholipase A<sub>1</sub>-catalyzed partial and complete hydrolysis of PC from soybean in hexane for the production of LPC and GPC. The third goal of this study was to apply production of emulsion foods using modified PC and LPC.

### III. Scope and content of this study

#### 1. The purpose of this study

The purposes of this study were the development of the production processes of functional PC and LPC via an enzymatic reaction, refining of the modified PC and LPC, and application of the product in a functional food area.

#### 2. The main contents of this study

- (1) Production of functional PC & LPC used for functional food materials (e.g. *n*-3 PUFA enriched-PC, *n*-3 PUFA enriched-LPC).
- (2) Possibility to use as an emulsifier with various range with PC & LPC (e.g. MCFA-PC, MCFA-LPC).
- (3) Development of the production of functional PC & LPC via the industrial scale enzymatic process
- (4) Application of functional PC & LPC products.

#### 3. The range of this study

##### 가. Production of functional PC containing with *n*-3 PUFA in a batch reaction system

- (1) Immobilization of enzyme
  - (가) Enzyme screening
  - (나) Carrier screening
  - (다) Immobilization of enzyme
  - (라) Activity test for immobilized enzyme
- (2) Synthesis of functional PC containing with *n*-3 PUFA
  - (가) Batch reaction system
  - (나) Synthesis of PC via an acidolysis reaction
  - (다) Enrichment of PC via a vacuum reaction
- (3) Modification of PC
  - (가) Modification of PC with DHA

(나) Modification of PC with MDFA

㉔. Production of functional PC containing with *n*-3 PUFA in a packed bed reactor (continuous reaction system)

(1) Synthesis of PC containing *n*-3 PUFA via an acidolysis in a packed bed reactor

(가) Packed-bed reactor (Continuous reaction system)

(나) Synthesis of PC via an acidolysis reaction

(다) Enrichment of PC via a vacuum reaction

(2) Refining of modified PC containing *n*-3 PUFA

(가) Removal of free fatty acid using super critical carbon dioxide

(나) Removal of residual free fatty acid and LPC via liquid-liquid fractionation

㉕. Synthesis of functional PC containing with *n*-3 PUFA in a bulk-scale reaction system

(1) Synthesis of PC containing *n*-3 PUFA via a bulk-scale reaction system

(가) Synthesis of PC containing *n*-3 PUFA via a bulk-scale acidolysis reaction

(나) Enrichment of modified PC via a bulk-scale vacuum reaction

(2) Refining of modified PC in a bulk-scale system

(가) Removal of residual free fatty acid via a bulk-scale super critical carbon dioxide

(나) Removal of residual free fatty acid and LPC via a bulk-scale liquid-liquid fractionation

㉖. Synthesis of functional LPC & Refining process

(1) Synthesis of functional LPC from PC via a hydrolysis of PC

(2) Optimization of the synthesis of functional LPC via an enzymatic reaction

㉗. Synthesis of *sn*-1 LPC & Refining process

(1) Synthesis of *sn*-1 LPC

(가) Enzymatic reaction

(나) Batch type reaction

(2) Refining of *sn*-1 LPC

(가) Refining of *sn*-1 LPC via a liquid-liquid extraction

(나) Refining of *sn*-1 LPC via a supercritical carbon dioxide

㉘. Synthesis of functional L- $\alpha$ -GPC & Refining process

(1) Synthesis of functional L- $\alpha$ -GPC



- (2) Refining of functional L- $\alpha$ -GPC
- (3) Optimization of the production of functional L- $\alpha$ -GPC in a bulk-scale reaction system
- (4) Refining of modified LPC
  - (가) Refining of modified LPC via a liquid-liquid extraction
  - (나) Refining of modified LPC via silica column chromatography

#### 4. Application of the functional PC & LPC

- (1) Investigation of commercial soybean PC & LPC
- (2) Investigation of developed functional PC & LPC
- (3) Test for the application of the developed functional PC & LPC

## IV. Results

Modification of phosphatidylcholine(PC) with *n*-3 polyunsaturated fatty acid (*n*-3 PUFA) in a batch reaction system and a packed bed reactor system (PBR) using immobilized phospholipase A1(PLA1). Fatty acid composition of PC from soybean was investigated. *n*-3 PUFA in PC was not detected. For the modification of PC, the immobilization of phospholipaseA<sub>1</sub> was carried out, and Lewatit VP OC 1600 was selected as a carrier for preparation of immobilized PLA1, which was used for modification of PC by acidolysis and re-esterification. Effect of several parameters such as temperature, enzyme loading, water content, and vacuum time in batch reaction system was investigated. Optimal conditions for modification of PC with *n*-3 PUFA in a batch reaction system were molar ratio of 1:8 (PC to *n*-3 PUFA), temperature of 55°C, enzyme loading of 20wt% (wt% on substrate weight), and water content of 1.0wt% (wt% on substrate weight), respectively. The highest incorporation (57.4 mol%) of *n*-3 PUFA into PC was obtained at 24 h and the yield of PC was 16.7 mol%. The yield of PC increased significantly by application of vacuum, even though a slight decrease of *n*-3 PUFA incorporation was observed. The same type of experiments in a packed bed reactor system (PBR) was investigated. Effect of several parameters such as molar ratio (PC to *n*-3 PUFA), temperature, water content, and

residence time in reactor was investigated. Optimal conditions for modified of PC with *n-3* PUFA in PBR system were molar ratio of 1:8 (PC to *n-3* PUFA), temperature of 55°C, water content of 1.0 wt% (wt% on substrate weight), and 120 min of residence time, respectively. Consequently, PC from soybean was successfully modified by incorporation of residues of *n-3* PUFA derived from fish oil using immobilized PLA1. In addition, supercritical carbon dioxide extraction and liquid-liquid fractionation were performed for the separation of modified PC from reaction mixture. The recovery of PC ca. 20 wt% was obtained after the separation process. Moreover, PBR system was more effective than a batch reaction system when saving energy, and industrial aspect were considered.

LPC and GPC were produced from PC by PLA1-catalyzed hydrolysis in a solvent system. The reactions were performed in a stirred batch reactor using a commercial fungal phospholipase A1 (Lecitase Ultra) as the biocatalyst. The effects of temperature, reaction time, water content, and enzyme loading on LPC and GPC content in the reaction products were elucidated using the models established. Optimal conditions for maximizing the LPC content while suppressing acyl migration, which causes GPC formation, were as follows: temperature, 60 °C; reaction time, 3 h; water content, 10% of PC; and enzyme loading, 1% of PC. The products obtained under these conditions contained 9.5% PC, 90.5% LPC, and no GPC. LPC had a higher total unsaturated fatty acid content than original PC had and was mainly composed of linoleic acid (78.0 mol% of the total fatty acids). While, optimal conditions to completely hydrolyze PC to GPC were: temperature, 50 °C; reaction time, 30 h; water content, 69% of PC; and enzyme loading, 13% of PC. Because a considerable amount of free fatty acids, which were released from PC by Lecitase Ultra, remained in the reaction products, further investigations on the removal of free fatty acids are required for the development of possible industrial applications of LPC and GPC.

# CONTENTS

Chapter 1. Outline of Research and Development .....	24
Chapter 2. Current state of domestic and foreign technical development .....	26
Chapter 3. Procedure and results of research and development .....	28
Paragraph 1. Production of functional PC containing with <i>n-3</i> PUFA .....	28
1. Synthesis of functional PC containing with <i>n-3</i> PUFA in a batch reaction system .....	28
가. Material & Method .....	28
(1) Experimental design .....	28
(2) Materials .....	29
(3) Synthesis of PC via an acidolysis reaction .....	31
(4) Enrichment of PC via a vacuum reaction .....	32
(5) Analysis .....	32
나. Result & Discussion .....	33
(1) Immobilization of enzyme .....	33
(2) Modification of PC with DHA .....	39
(3) Modification of PC with MCFA .....	47
다. Summary .....	53
2. Synthesis of functional PC containing with <i>n-3</i> PUFA in a packed bed reactor (continuous reaction system) .....	54
가. Material & Method .....	54
(1) Experimental design .....	54

(2) Materials .....	55
(3) Protocols for synthesis of PC containing <i>n-3</i> PUFA .....	58
(4) Protocols for refining of modified PC .....	60
(5) Analysis .....	63
나. Result & Discussion .....	64
(1) Synthesis of PC containing <i>n-3</i> PUFA via an acidolysis in a packed bed reactor .....	64
(2) Refining of modified PC .....	74
(3) Removal of residual free fatty acid and LPC via liquid-liquid fractionation .....	78
다. Summary .....	81
3. Synthesis of functional PC containing with <i>n-3</i> PUFA in a bulk-scale reaction system .....	82
가. Material & Method .....	83
(1) Experimental design .....	82
(2) Materials .....	83
(3) Protocols for the synthesis of PC containing <i>n-3</i> PUFA in a bulk-scale batch reactor .....	86
(4) Synthesis of PC containing <i>n-3</i> PUFA via a bulk-scale acidolysis reaction .....	86
(5) Enrichment of modified PC via a bulk-scale vacuum reaction .....	88
(6) Refining of modified PC in a bulk-scale system .....	89
(7) Analysis .....	92
나. Result & Discussion .....	93
(1) Immobilization of enzyme in a bulk-scale system .....	93
(2) Synthesis of PC containing <i>n-3</i> PUFA via an acidolysis reaction & Enrichment of modified PC in a bulk-scale batch type reaction system .....	95
(3) Synthesis of PC containing <i>n-3</i> PUFA via an acidolysis in a bulk-scale continuous reaction system .....	100
(4) Refining of modified PC in a bulk-scale super critical carbon dioxide .....	102

(5) Removal of residual free fatty acid and LPC via a bulk-scale liquid-liquid fractionation .....	104
다. Summary .....	105
Paragraph 2. Production of functional PC containing with <i>n-3</i> PUFA .....	106
1. Synthesis of functional LPC & Refining process .....	106
가. Material & Method .....	106
(1) Reaction scheme .....	106
(2) Materials .....	106
(3) Prameters .....	106
나. Result & Discussion .....	107
(1) Screening of enzyme .....	107
(2) Effect fo parameters .....	109
2. Synthesis of <i>sn-1</i> LPC & Refining process .....	116
가. Material & Method .....	116
(1) Experimental design .....	116
(2) Materials .....	117
(3) Enzymatic reaction .....	117
(4) Removal of enzyme from the product .....	117
(5) Analysis .....	118
나. Result & Discussion .....	120
(1) Refining of <i>sn-1</i> LPC .....	119
(2) RSM .....	120
(3) Effect of parameters .....	126
(4) Model validation .....	130
(5) Optimization of the reaction .....	132

(6) Analysis of products	130
(7) Refining of <i>sn</i> -1 LPC	136
다. Summary	139
3. Synthesis of functional L- $\alpha$ -GPC & Refining process	140
가. Material & Method	140
(1) Experimental design	140
(2) Materials	141
(3) Extraction of PC via an enzymatic reaction	141
(4) Removal of enzyme from the product	141
(5) Anyalsis	141
(6) Refining of modified LPC	143
나. Result & Discussion	144
(1) Analysis of the product using liquid chromatography	144
(2) Model fitting	146
(3) Model validation	152
(4) Effects of reaction parameters	154
(5) Optimization of reaction parameters	157
(6) Characterization of reaction products	158
Paragraph 3. Application of functional PC & LPC	162
1. Development of the product using functional PC & LPC	172
가. Material & Method	172
(1) Experimental design	172
(2) Materials	172
(3) Analysis	173

(4) Production of the emulsion to measure the surface tension, stability of storage, and particle size .....	174
나. Result & Discussion .....	176
(1) Comparison of the commercial soybean lecithin products .....	176
(2) Characteristics of functional PC & LPC compared to the commercial lyso soybean lecithin .....	185
(3) Comparison of commercial non-GMO lecithin and functional LPC .....	198
다. Summary .....	208
Chapter 4. Achievement of purpose and contribution of related field .....	210
Chapter 5. Application plan and results of research .....	212
Chapter 6. Information of scientific technology corrected from other countries .....	223
Chapter 7. Status of research facilities·equipment .....	225
Chapter 8. References .....	230

# 목 차

제 1 장 연구개발 과제의 개요	24
제 2 장 국내외 기술개발 현황	26
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	28
제1절 기능성 PC의 효소적 합성 방법 개발	28
1. 회분식 반응을 이용한 기능성 PC의 합성 방법 확립	28
가. 재료 및 방법	28
(1) 실험의 구도	28
(2) 재료	29
(3) Acidolysis 반응	31
(4) 진공 반응	31
(5) 분석	32
나. 결과 및 고찰	32
(1) 효소 선정 및 고정화 효소 준비	33
(2) DHA 함유 PC 합성	39
(3) MCFA 함유 PC 합성	37
다. 요약	53
2. 연속식 반응을 이용한 기능성 PC의 합성 및 분리 방법 확립	54
가. 재료 및 방법	54
(1) 실험의 구도	54



(2) 재료	55
(3) Acidolysis를 통한 기능성 PC의 합성	58
(4) Acidolysis 반응 생성물에서 PC 분리 농축	60
(5) 분석	62
나. 결과 및 고찰	63
(1) 연속식 반응기에서 Acidolysis를 통한 DHA 함유 기능성 PC의 합성	63
(2) Acidolysis 반응 생성물로부터 기능성 PC의 분리 및 농축	70
(3) Liquid-liquid fractionation을 이용한 지방산 및 LPC의 제거	77
다. 요약	80
3. Bulk-scale에서 기능성 PC의 합성 및 분리 방법 확립	81
가. 재료 및 방법	82
(1) 실험의 구도	82
(2) 재료	82
(3) Bulk-scale 회분식 반응기에서 Acidolysis를 통한 기능성 PC의 합성	86
(4) Bulk-scale 연속식 반응기에서 acidolysis를 통한 기능성 PC의 합성	86
(5) 진공반응	86
(6) Acidolysis 반응 생성물에서 PC 분리 농축	89
(7) 분석	92
나. 결과 및 고찰	92
(1) Bulk-scale에서 고정화 효소 제작	93
(2) Bulk-scale 회분식 반응기에서 acidolysis를 통한 <i>n-3</i> PUFA 함유 기능성 PC의 합성 및 진공 반응을 통한 PC 수율 증대	95
(3) Bulk-scale 연속식 반응기에서 acidolysis를 통한 <i>n-3</i> PUFA 함유 기능성 PC의 합성	100
(4) Bulk-scale에서 초임계 이산화탄소를 이용한 acidolysis 반응 물로부터 기능성 PC의 분리 및 농축	102
(5) 초임계 이산화탄소를 이용하여 분리되는 PC 분획 및 liquid-liquid fractionation을 이용한 지방산 및 LPC의 제거	104

다. 요약 .....	105
제 2 절 기능성 LPC의 효소적 합성 방법 개발 .....	106
1. 기능성 LPC의 합성 및 정제 방법 확립 .....	106
가. 재료 및 방법 .....	106
(1) 반응 기작 .....	106
(2) 재료 .....	106
(3) 효소 반응 parameters .....	106
나. 결과 및 고찰 .....	107
(1) 효소선별 .....	107
(2) Parameters별 합성 효과 .....	109
2. <i>sn</i> -1 LPC의 합성 및 정제 방법 확립 .....	116
가. 재료 및 방법 .....	116
(1) 실험의 구도 .....	116
(2) 재료 .....	117
(3) 효소반응 .....	117
(4) 반응산물로부터 효소의 제거 .....	117
(5) 분석 .....	118
(6) <i>sn</i> -1 LPC의 분리정제 .....	118
나. 결과 및 고찰 .....	120
(1) 모델 적합성 검증 .....	120
(2) 반응인자의 영향 .....	126
(3) 모델 타당성 검증 .....	129
(4) 최적 반응조건의 확립 .....	130
(5) 반응산물의 조성분석 .....	131

(6) <i>sm</i> -1 LPC의 분리정제 .....	136
다. 요약 .....	139
3. 기능성 L- $\alpha$ -GPC의 합성 및 정제 방법 확립 .....	140
가. 재료 및 방법 .....	140
(1) 실험의 구도 .....	140
(2) 재료 .....	141
(3) 효소반응을 통한 PC 추출 .....	141
(4) 반응산물로부터 효소의 제거 .....	141
(5) 분석 .....	141
(6) 반응산물의 정제 합성 효과 .....	143
나. 결과 및 고찰 .....	144
(1) LC를 이용한 반응산물의 분석 .....	144
(2) 모델 적합성 검증 .....	146
(3) 모델 타당성 검증 .....	152
(4) 반응인자의 영향 .....	154
(5) 최적 반응조건의 확립 .....	157
(6) 반응산물의 정제 .....	158
제 3 절 기능성 PC와 LPC의 최적 활용 제품 개발 .....	162
1. 대두레시틴 관련 제품 시장 조사 .....	162
2. 기능성 PC와 LPC의 최적 활용 제품 개발 .....	172
가. 재료 및 방법 .....	172
(1) 실험의 구도 .....	172
(2) 재료 .....	172
(3) 분석 .....	173

(4) 측정 조건	175
나. 결과 및 고찰	175
(1) 시판 대두레시틴 제품별 비교	176
(2) 시판 Lyso대두레시틴 대비 기능성 PC 및 LPC 유화 특성 연구	185
(3) 상용 non-GMO 레시틴과 기능성 LPC 비교 연구	198
다. 요약	208
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	210
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	212
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	223
제 7 장 연구시설·장비 현황	225
제 8 장 참고문헌	230

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

인지질은 자연계에 존재하는 천연 유화제로서 인을 포함하는 복합지질이다. 인산기와 지방산을 가짐으로써 양친매성을 띠고 있으므로 계면활성제 및 유화제로서 활용이 가능하다. 인지질의 종류가 크게 포스파티딜콜린(phosphatidyl choline: 이하 PC), 포스파티딘산(phosphatidic acid: 이하 PA), 포스파티딜에탄올아민(phosphatidylethanolamine: 이하 PE), 포스파티딜세린(phosphatidylserine: 이하 PS)으로 4가지 종류가 있고, 생리적 기능성에서 약간의 차이를 보이나, 대체로 콜레스테롤 조절, 혈액 순환 개선 및 두뇌 영양 공급 등의 기능성을 갖는 것으로 알려져 있다.

식품으로부터 많이 구할 수 있으면서 널리 사용되는 가장 대표적인 인지질은 레시틴으로 주로 포스파티딜콜린으로 이루어진 물질이다. 이는 탈검 공정(Degumming)의 결과 얻어진 검질을 원료로 하여 정제한 것이다. 이전에는 레시틴은 계란의 난황으로부터 추출되었으므로 귀한 제품이었으나, 현재에는 대두에서도 대량 제조가 가능하기 때문에 저렴한 가격으로 광범위하게 사용되고 있다. 대두 레시틴은 식품에 사용해서 우수한 유화제 일뿐만 아니라 영양학적으로도 가치가 높다. 현재 대량으로 생산되는 레시틴은 대두에서 얻어지며, 그 외에 옥수수 등의 스크(scum)에도 인지질이 포함되어 있다.

이러한 기능성을 갖는 인지질이 유용한 지방산들과 결합하여 재구성 인지질을 합성함으로써 인지질의 생리적인 기능성을 향상시킬 뿐만 아니라 다양한 범위의 유화 능력을 갖는 인지질로 합성이 가능하다. 그 중에서도, 효소를 이용하여 합성하는 방법은 안전하고 친환경적인 방법이고, 효소를 이용한 반응은 화학적인 다른 방법들에 비하여 낮은 온도에서도 반응이 가능하며, 효소가 가지고 있는 특이성에 의하여 부산물의 생성이 적은 장점이 있다. 하지만 효소 자체로 사용할 경우에 경제적인 측면이나 효소 여과의 문제 등의 공정상에서도 효율적이지 않기 때문에 효소의 고정화 과정이 필수적으로 수반된다. 이에 따라, 효소를 고정화시키는 방법은 공유 결합, 이온 결합, 물리적 흡착, 캡슐 형성, 포괄법 등이 있으나 리파아제(lipase)의 고정화에 주로 사용되는 방법은 극성 고정체에 의한 이온 결합 방법과 비극성 고정체(다공성 폴리머)에 의한 흡착방법이 사용된다. 효소의 고정화는 고정체는 물론이고 고정화하는 방법에 의하여 효소의 활성이 크게 변화하게 된다.

리소포스파티딜콜린(lysophosphatidyl choline: 이하 LPC)은 수중유적형 시스템에서 효과적인 유화제이며 글리세로포스포콜린(Glycerolphosphorylcholine: 이하 GPC)은 알츠하이머를 포함한 치매를 앓는 환자들을 위한 인지능 개선제로 사용할 수 있다. 또한 LPC와 GPC를 합성 기질로 지방산을 결합시켜 구조 PC를 생산할 수 있다.

인지질의 기능성과 활용성이 알려지면서 고부가가치 산업으로 주목받고 있다. 유지의 정제 부산물인 인지질을 기능성 인지질로 전환하여 생리적인 건강기능향상 뿐만 아니라 유화제로서의 고부가가치 상품으로 활용할 수 있다. 특별히 DHA와 같은 기능성 지방산과 결합된 인지질의 경우, 특정 원료로 공급될 수 있다.

이에 본 연구에서는 첫 번째로 포스포리파아제 A1(phospholipase A1: 이하 PLA1)을 고정화시키고 이를 이용하여, 인지질과 지방산을 교환 에스테르화 반응을 시켜 재구성 인지질을 합성하여, 에스테르화 반응 시 진공 시스템을 이용하여 원하는 지방산의 함량을 높인 재구성 인지질의 수율을 향상시킬 수 있음을 확인하고자 한다. 두 번째로, 대두 PC를 PLA1 촉매 하에 가수분해하여 LPC와 GPC를 생산하고 반응표면분석법을 이용하여 반응 조건을 최적화하고자 하였다. 세 번째로 당 과제를 통해 도출되는 효소적 개질을 거친 대두분말 PC와 LPC를 시판되고 있는 제품과 비교하여 개발 시제품의 레시틴 사용 분야에 대한 적용 가능성을 확인하고자 한다. 특히 기존 화학적 합성 유화제를 배제하고 레시틴 단독 유화 제품에 적용하여 식품 가공 분야에 우선 적용한다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

현재까지 PC와 LPC의 합성방법에 관해 개발된 기술현황은 다음과 같다.

### 1. 화학적 방법

가. Bibak and Hajdu (2003)와 Rosseto 등 (2004)은 lysophosphatidic acids와 lysophosphatidyl -choline을 stereospecific synthesis를 효과적인 방법으로 소개된 LPC를 합성하는 방법으로 fluorenylmethylcarbonate와 tetrahydropyranyl ether 또는 p-nitrophenyl -D-glycerate의 화학적 기능성에 의해 합성하는 방법을 보고하였다.

나. D'Arrigo 등 (2007)은 장쇄 지방산과 단쇄 지방산을 glycerophosphocholine (GPC)에 두 단계의 반응을 거쳐 선택적으로 합성시키는 방법을 연구하였다. 첫 번째 단계는 1-acyl-2-lyso-glycerophosphocholine을 만들기 위하여 2-propanol에서 cyclic stannylene derivative로 변형시킨 GPC와 C2에서 C16의 fatty acid chloride를 사용하였다. 두 번째 acylation은 methylene chloride에서 fatty acid anhydride를 이용하여 성공적으로 1(2)-short-2(1)-long-diacyl- glycerophosphocholine을 생산할 수 있었다.

다. Patel 등 (1979)이 소개하는 바는 촉매제로써 4-pyrrolidinopyridine을 사용하였고 fatty acid anhydride를 benzene-dimethylsulfoxide (DMSO)를 40-42℃에서 2-5시간 동안 사용했다.

### 2. 효소적 방법

가. GPC (glycerol-sn-3-phosphocholine) 또는 LPC (lysophosphatidylcholine)에서 재구성 PC로 합성 기술

(1) Cossignani 등 (2008)은 GPC에서부터 두 단계에 거쳐 재구성 PC를 합성하였다. Novozym 435를 이용하여 sn-1 위치에 지방산을 결합시킨 후 phospholipase A2를 이용하여 남은 sn-2 위치에 지방산을 결합시킴으로써 PC를 완성시켰다.

(2) Yamamoto 등 (2006)은 porcine pancreatic phospholipase A2를 이용하여 LPC와 conjugated linoleic acid (CLA)를 결합하여 PC를 합성하였다.

나. Phospholipid (PL)에서 재구성 PL로 합성 기술

(1) Adlercreutz and Wehtje (2004)는 sn-1에 decanoic acid와 sn-2에 hexanoic acid를 포함한 PC를 합성하기 위하여 phospholipase A2를 이용하여 egg yolk PC를 1-acyl lysophosphatidylcholine (LPC)로 hydrolysis하였고, sn-2 위치에 hexanoic acid로 PC를 만들기 위하여 PLA2에 의해 촉매된 hexanoic acid와 1-acyl LPC를 esterification 하였다.

(2) Vikbjerg 등 (2006)은 soybean phosphatidylcholine (PC)와 caprylic acid 사이에 Lipozyme RM IM을 이용한 transesterification시킴으로써 sn-2 위치에 18%가 전환된 재구성 PC를 합성하였다.

(3) Vikbjerg 등 (2007)은 phospholipase A2를 이용하여 PL의 sn-2 위치에 acidolysis 반응

을 이용하여 재구성 인지질을 만들었다.

(4) Hossen과 Hernandez (2005)는 phospholipase A2와 Novozym 435, Lipozyme RM IM, Lipozyme TL IM의 효소를 이용하여 PL과 CLA를 반응시켜 재구성 PL를 합성한 결과 Lipozyme RM IM과 Lipozyme TL IM이 효과적이었다.

(5) Kim 등 (2010)은 immobilized phospholipase A1을 이용하여 soybean PC에  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids (PUFA)로 acidolysis하여 재구성 PC를 합성하였다. 이 과정에서 수분함량 조절이 초과되면 LPC가 증가한다는 것을 확인하였다.

(6) Garcia 등 (2008)은 immobilized phospholipase A1을 이용하여 lecithin에  $\omega$ -3 PUFA를 결합시키고자 하여 기질들의 몰비율, 반응온도 및 pH를 조절하여 적합한 조건을 찾고자 하였다.

(7) Kim 등 (2007)은 phospholipase A1을 이용하여 PC에  $\omega$ -3 PUFA를 transesterification 시킴으로써 재구성 PC를 합성하였다. 그 방법으로 진공 시스템을 이용하였으며, 진공 시스템에서의 오랜 반응은  $\omega$ -3 PUFA의 결합을 감소시킨다는 사실을 확인하였다.

다. 기타

(1) 크릴의 경우 고농도의 인지질을 함유하고 있으며,  $\omega$ -3 지방산이 풍부하여 크릴에서  $\omega$ -3 지방산을 함유한 인지질을 추출하는 연구가 이루어지고 있다.

(2) 출발 원료를 장쇄 지방산을 구성요소로 포함하는 지질을 생산하는 지질 생산균 (모르티에렐라 속, 코니디오보러스 속 등)으로 하고, 균체로부터 트리글리세리드를 포함하는 유지를 추출한 후의 탈지균체로부터 인지질을 추출한다.

(3) 산란용 가금류에  $\omega$ -3 및  $\omega$ -6 계열의 고도불포화지방산 또는 그 유도체를 함유한 사료로 사육함으로써  $\omega$ -3 계열의 EPA, DHA 또는  $\omega$ -6 계열의 아라키돈산이 결합된 인지질을 함유하는 난황유 및 난황 유래 레시틴을 제조한다.

기존 기술의 내용은 천연원료로부터 단순 추출 공정에 대한 최적화된 내용이거나 추출 이후 여러 유기 용매 사용조건에서의 화학적 또는 생물학적 합성 공정에 대한 연구이었지만, 본 과제를 통해 유기용매 등 화학약품을 사용하지 않거나 또는 사용 수준을 최소화한 연구뿐만 아니라 친환경적이고 에너지 Cost를 절감할 수 있는 생물전환공정을 이용한 기능성 인지질 생산 공정에 대한 연구결과를 찾을 수 있었다. 더불어 기존 연구방향은 회분식 반응이 대부분이었지만 본 연구과제를 통해 산업적으로 연속생산이 가능한 체계화된 Continuous Column 반응에 대한 기초적인 연구 결과를 도출할 수 있었다.

현재 판매되고 있는 인지질 추출 제품을 포함하는 경쟁 제품 대비 본 과제 결과물의 경쟁성은 첫째, 저렴한 원료로부터 고부가가치 인지질 제품을 생산할 수 있다는 점과 둘째, 다양한 유화 특성을 나타낼 수 있는 천연 유화제로서의 인지질 제품을 생산할 수 있고, 셋째 친환경적인 합성 및 분리 정제 방법을 적용함으로써 저비용이면서 환경 친화적인 공정 제공이 가능해졌다.



## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1절. 기능성 PC의 효소적 합성 방법 개발

#### 1. 기능성 PC의 합성 및 정제 방법 확립

DHA (Docosahexaenoic acid) 및 MCFA (Medium chain fatty acid; Capric acid)를 함유한 기능성 PC (Phosphatidyl choline) 합성

##### 가. 재료 및 방법

###### (1) 실험의 구도

본 연구에서는 기능성 PC를 합성하기 위하여 크게 세 단계를 거쳤다. 첫 번째는 기능성 PC 합성에 적합한 효소를 선정하고 두 번째로는 선정된 리파아제 용액을 고정화 리파아제로 만드는 연구를 하였으며, 세번째는 PC와 지방산 (DHA와 MCFA)를 acidolysis반응을 통하여 기능성 PC를 합성하였다. 그러나 acidolysis반응에 의하여 총 PC의 양이 감소하여 대기압에서의 acidolysis반응 후 진공 시스템을 이용하여 재합성하는 과정을 거쳐 높은 수율의 기능성 PC를 생산할 수 있었다 (Figure 1).

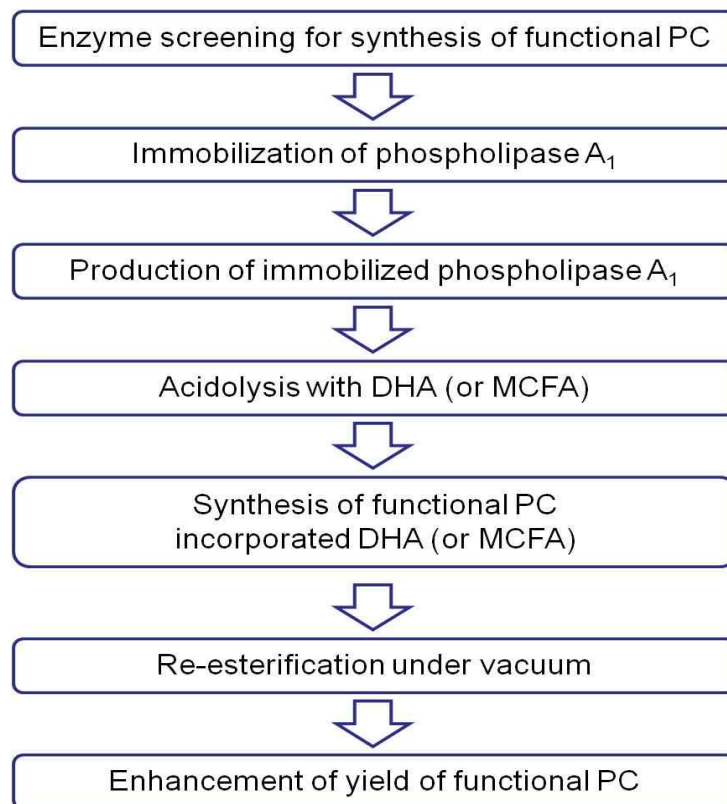


Figure 1. Production of functional PCA by enzymatic reaction

## (2) 재료

### (가) 기질

- ① PC (granualated phosphatidyl choline, 순도 95% 이상, from soybean)는 Avanti Polar-Lipids, Inc. (Alabaster, Al, USA)에서 구입하였다.
- ② 지방산 에틸 에스터 (73% DHA (22:6), 15% EPA (20:5), 6% DPA (22:5), 2% eicosenoic acid (C20:1), 2% vaccenic acid (18:1n7), 2% others from tuna oil)는 (주) 일신웰스에서 제공하였다. 지방산 제조 방법은 지방산 에틸 에스터 100 g을 1 L 둥근 바닥 플라스크에 넣고 95% 에탄올 300 mL과 40% NaOH 용액 100 mL를 넣고 30분 동안 reflux heating시켰다. 2 L 분액깔때기에 반응액을 넣고 conc. HCl 120 mL와 증류수 200 mL을 넣어 충분히 흔들여 준 후 아래층을 제거하고 윗 층만을 취하여 다시 분액깔때기에 넣고 헥산 500 mL과 증류수 200 mL을 넣어 흔들여 주고 아래층을 제거하고 위층을 취하였다. 지방산이 녹아 있는 헥산층은 증류수 100 mL로 세 번 세척해 주고 감압 증류기로 1차 헥산을 제거하고 질소를 불어 잔류 헥산이 없도록 한 후 효소 반응에 사용하였다.
- ③ MCFA (Carpic acid (C10:0), 순도 99.8%)는 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

### (나) 효소

#### ① 효소 종류

고정화에 사용된 Phospholipase A<sub>1</sub> (Lecitase<sup>®</sup> Ultra)는 *Thermomyces lanuginosus/Fusarium oxysporum*에서 유래된 액상효소로서 Novo Nordisk Bioindustry Ltd. (Seoul, Korea)에서 구입하였다. 그 외 Novozym 435 (from *Candida antarctica*), Lipozyme RM IM (from *Rhizomucor miehei*), Lipozyme TL IM (from *Thermomyces lanuginosus*)의 고정화된 효소는 Novo Nordisk Bioindustry, Ltd. (Seoul, Korea)에서 구입하였다. Lipase G (from *Penicillium camemberii*) Lipase PS (from *Burkholderia cepacia*), Lipase AK (from *Pseudomonas fluorescens*)는 Amano Enzymes Inc. (Japan)에서 구입한 분말형 효소이며, Lipase OF (from *Candida rugosa*)는 Meito (Japan)에서 구입한 분말형 효소이다.

#### ② 효소 고정화

효소의 고정체를 크게 극성 고정체와 비극성 고정체로 구분하여 고정화 효소를 제조하였다 (Figure 2). 극성 고정체로는 Duolite A568 (Rohm and Haas France S.A.S., France), Amberlite XAD 7HP (Sigma Aldrich, Korea), Celite 545(Sigma Aldrich, Korea), Dowex 50w x8 (Sigma Aldrich, Korea) 가 사용되었고, 비극성 고정체로는 Lewatit VP OC 1600 (Novo Nordis Bioindustry Ltd. Korea), Accrurel MP 1000 (Membrana GmbH Accrurel system, Germany), Amberlite XAD4 (Sigma Aldrich, Korea), Octyl silica (Sigma Aldrich,

Korea) 가 사용되었다.

비극성 고정체를 이용한 고정화 방법은 비극성 고정체를 95% 에탄올에 3시간 동안 침지시켜 팽윤시킨 후에 phosphate 완충용액 (pH 7.5)으로 에탄올을 제거하고 팽윤된 고정체에 완충용액이 채워지도록 하였다. Phospholipase A<sub>1</sub> 용액의 농도가 70%가 되도록 phosphate 완충용액을 이용하여 희석시켰다. 고정체 무게 1 g에 희석된 Phospholipase A<sub>1</sub> 용액 10 mL을 50 mL 삼각 플라스크에 넣고 30°C에서 250 rpm으로 16시간 동안 water bath shaker에서 섞어주면서 고정화를 실시 하였다. 그리고 고정체 무게 1 g을 기준으로 phosphate 완충용액 40 mL을 이용하여 세척해주었다. 고정화된 phospholipase A1은 상온에서 24 시간 동안 건조된 후 진공 건조기에서 24시간 건조시켰다. 반응 전까지는 냉장보관하였고, 반응을 위하여 수분활성도 0.64인 밀폐된 용기에 보관하였다.

극성 고정체를 이용한 고정화 방법은 비극성 고정체의 방법과 유사하나 고정체의 팽윤과정이 제외된다.

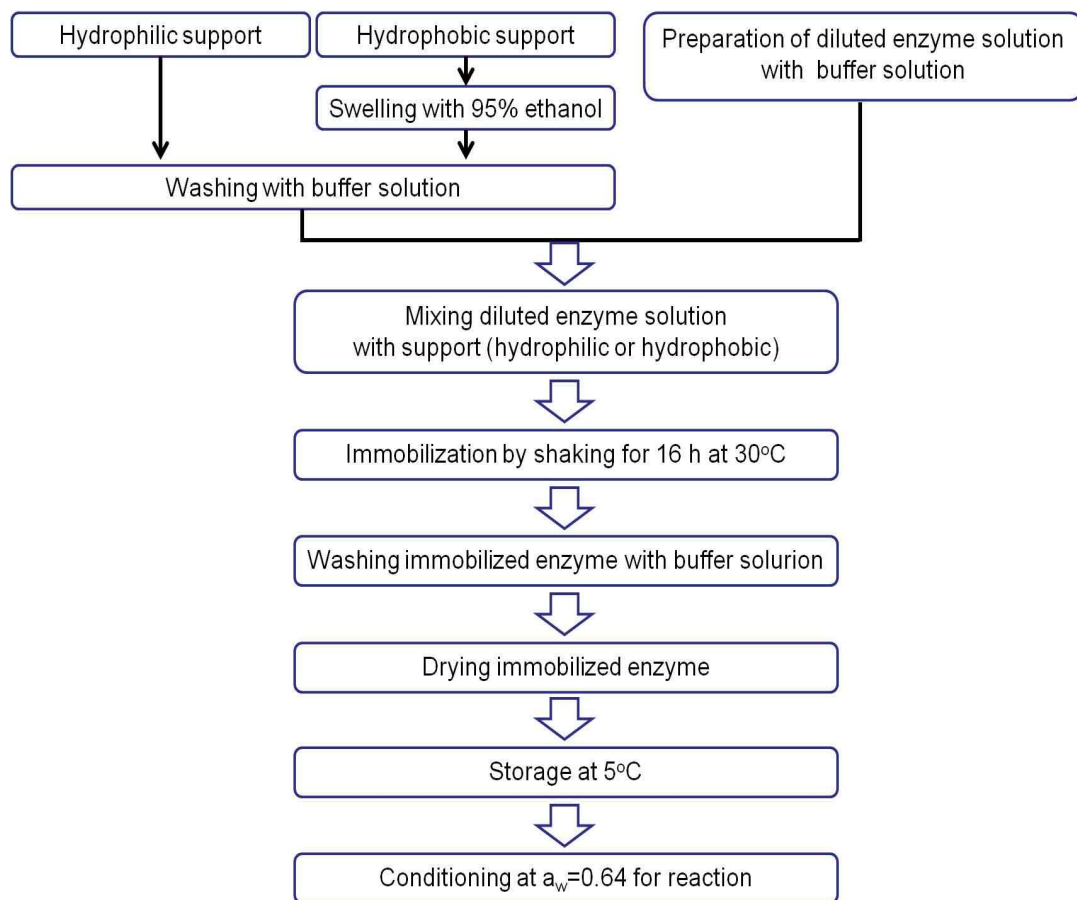


Figure 2. Protocol for preparation of immobilized enzyme

### ③ 효소의 고정화도 측정 (단백질 정량-Lowry법)

효소의 고정화도를 측정하기 위하여 초기 phospholipase A<sub>1</sub> 용액의 단백질을 정량한다. Phospholipase A<sub>1</sub>을 고정화 시킨 후에 완충용액에 남아 있는 단백질량과 세척 후 완충용액으로 빠져나온 단백질량을 합하여 정량한다. Lowry법에 사용된 시약 A는 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 g

과 0.1 N NaOH 0.4 g을 증류수 100 mL에 섞어서 만든다. 시약 B1은 1% CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0.5 g을 증류수 50 mL에 섞어서 만든다. 시약 B2는 2% NaK tartrate · 4H<sub>2</sub>O를 증류수 50 mL에 넣어 제조한다. 시약 A, B1, B2의 형태로 보관 후 사용하기 직전에 각각 100 : 1 : 1의 부피비율로 섞어 시약 C를 만들어 사용한다. 시료 200 uL에 1 mL의 시약 C를 섞어 vortexing 후 10분 동안 방치한 후 Folin 시약 50 uL를 넣어 vortexing 후 30분 동안 방치하여 발색 (과란색)시켰다. 발색된 시료는 750 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{고정화된 효소량 (mg/g)} = \text{고정화된 효소량 (g/g)} = \frac{W1 - W2}{W3 + (W1 - W2)}$$

W1: phospholipase A<sub>1</sub> 원액의 단백질량 (mg)

W2: 고정화 후 완충용액에 남아 있는 단백질량 (mg)

W3: 고정체 무게 (g)

### (3) Acidolysis 반응

PC와 target 지방산 (DHA or Capric acid)을 50°C에서 각각 녹여 일정한 몰 비율로 섞어서 시료를 만들고 Karl fisher를 통하여 수분함량을 측정하였다. 기질 혼합물 3 g을 반응기에 넣고 효소 일정량 (기질 혼합물의 양을 기초로 하여 계산된 양)을 넣어 250 rpm에서 교반시켜 일정 시간 동안 반응시킨 후 시료를 취하였다. 반응온도는 반응기의 water-jacket과 연결된 water circulator의 온도를 조절하여 설정하였다 (Figure 3).



Figure 3. Water jacketed batch reactor for enzymatic reaction.

#### (4) 진공 반응

기능성 PC 수율 증대를 위하여 에스테르화 반응 후 5 torr의 진공에서 교반과 함께 계속 반응 시키면서 일정한 반응 시간 후에 시료를 취하였다 (Figure 4).



Figure 4. Water jacketed vacuum reactor for enzymatic reaction

#### (5) 분석

(가) TLC를 이용한 PC에 함유된 기능성지방산 함량 및 수율 분석

반응물 50 mg을 chloroform 150 uL에 녹인 후 TLC plate (silica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck, Germany)에 loading시키고 chloroform/ methanol/ acetic acid/ water (75:40:8:3, by vol)의 용액으로 전개시켰다. Plate에 분리된 PC와 LPC를 scrap한 후에 내부표준물질 (C17:0) 1 mg을 넣고 BF<sub>3</sub> (14% Boron fluoride in methanol)를 이용하는 방법으로 methylation시켜 GC 분석용 시료를 만들었다.

(나) GC-FID 분석조건

GC (gas chromatograph, Buruker cp-3800, USA)에 Superlcowax<sup>TM</sup> 10 (30 m × 0.25 mm, 0.25 um, Supelco, USA) 컬럼을 장착하였으며, 컬럼 오븐 온도는 180°C에서 1분간 정치하고 230°C까지 1.5°C/min으로 승온 시킨 후 5분 동안 정치시켰다. 주입부의 온도는 240°C이며 불꽃 이온화 검출기의 온도는 250°C로 설정하였다. 이동상 가스는 헬륨을 1.5 mL/min으로 흘려주면서 50:1의 split ratio에서 분석하였다.

(다) 계산방법

$$PC\ yield(mol\%) = \frac{\text{반응 후 PC의 양}(mol)}{\text{반응 전 PC의 양}(mol)} \times 100$$

$$\text{Incorporation of DHA (or MCFA) (mol\%)} = \frac{\text{PC와 결합된 DHA (or MCFA)의 양 (mol)}}{\text{PC와 결합된 총 지방산의 양 (mol)}} \times 100$$

## 나. 결과 및 고찰

### (1). 효소 선정 및 고정화 효소 준비

#### (가) 효소 선정 (Enzyme screening)

본 연구는 PC와 기능성 지방산을 이용한 acidolysis 반응으로 기능성 PC를 합성하고자 하였다. 효소 선정을 위한 실험은 DHA의 22개의 긴 탄소수와 6개의 이중결합에 의한 복잡한 구조로 반응성이 용이하지 않을 것으로 판단하여, 탄소수 18개에 이중결합 2개인 conjugated linoleic acid (CLA)를 이용하여 평가하였다. 효소 선정을 위하여 사용된 CLA는 9*c*,11*t*-CLA와 10*t*,12*c*-CLA가 75%를 차지하는 지방산으로서 효소 선정 이외의 실험에서는 DHA (or capric acid)를 기질로 이용하여 실험을 진행하였다. 본 실험은 target 지방산을 PC에 효율적으로 결합시키는데 있어서 가장 활성도가 높은 효소를 선정하기 위해 수행한 실험이며, 이 결과는 Figure 5에 제시하였다. 사용된 효소들은 Lipase OF (from *Candida rugosa*), Lipase AK (from *Pseudomonas fluorescens*), Lipase PS (from *Burkholderia cepacia*), Lipase G (from *Penicillium camemberti*), Phospholipase A<sub>1</sub> (from *Thermomyces lanuginosus*/*Fusarium oxysporum*), Lipozyme TL IM (from *Thermomyces lanuginosus*), Lipozyme RM IM (from *Rhizomucor miehei*), Novozym 435 (from *Candida antarctica*) 8가지이었다. 기질 총 3 g은 PC와 CLA를 1:8의 몰비율로 혼합한 것을 사용하였으며, 50°C의 shaker에서 250 rpm으로 교반하면서 24시간 동안 반응시켰다. 효소는 기질의 무게를 기준으로 3%의 양을 사용하였다. 효소들 중 Novozym 435, Lipozyme RM IM과 Lipozyme TL IM은 고정화 효소이며, Lipase OF, Lipase AK, Lipase PS, Lipase G는 분말 효소이었다. Phospholipase A<sub>1</sub>은 액상 효소이므로, Duolite A568이라는 고정체를 이용하여 고정화시킨 후 고정화된 효소의 형태로 무게를 측정하여 반응시켰다.

반응 결과는 Figure 6에서 보는 바와 같이 고정화된 phospholipase A<sub>1</sub>이 PC에 CLA를 최대로 결합시키는 것으로 확인되었다.

따라서 본 연구를 위하여 phospholipase A<sub>1</sub>을 효소 촉매로 선정 하였으며, 본 실험에 앞서 phospholipase A<sub>1</sub>의 효율적인 고정화 조건에 관한 실험을 행하였다.

Figure 5. Enzyme screening for acidolysis of PC.

(나) 효소 고정화

Phospholipase A<sub>1</sub>의 고정화를 위하여 Duolite A568의 고정체를 비롯한 다양한 고정체들을 비교하여 Duolite A568의 사용이 적합한지를 확인하였다. 고정체 외에 필요한 고정화 조건으로 pH와, 고정체와 phospholipase A<sub>1</sub> 액상효소의 적합한 비율에 대하여 조사하였으며, 조건의 적합성은 고정체에 결합된 단백질 (효소)의 양과 PC에 DHA가 결합되는 비율을 측정하여 판단하였다.

① 고정체 선정

효소를 고정화 시키는 방법은 공유결합, 이온결합, 물리적 흡착, 캡슐형성, 포괄법 등이 있으나 lipase의 고정화에 주로 사용되는 방법은 극성 고정체에 의한 이온결합 방법과 비극성 고정체 (다공성 폴리머)에 의한 흡착방법이 사용된다. 본 연구에서는 널리 사용되는 고정체 8가지를 이용하여 효소를 고정화시키는 정도와 고정화된 효소의 활성을 비교하였다. 사용된 극성 고정체는 Dowex 50w x8, Amberlite XAD 7HP, Duolite A568, Celite 545이였으며, 비극성 고정체는 Lewatit VP OC 1600, Octyl silica, Accrarel MP 1000, Amberlite XAD4이였다.

그 결과는 Figure 6에 나타내었으며, PC의 acidolysis를 연구 목적으로 하는 본 연구에서 phospholipase A<sub>1</sub>은 고정체의 종류에 의하여 효소의 고정화도와 활성의 차이가 크게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 고정체에 고정화된 단백질 (효소)의 양을 비교하였을 때, 비극성 고정

체 중 Lewatit VP OC 1600와 극성 고정체 중 Amberlite XAD 7HP와 Duolite A568이 높은 효율을 보여주었다. 그러나 PC에 DHA를 결합시키는 반응성을 비교하였을 때는 Amberlite XAD 7HP와 Duolite A568의 고정체에서 높은 활성을 보여주었다. 결과를 제시하지는 않았으나, 뒤에 연구될 진공반응의 효과를 고려하여 Duolite A568가 효율적인 고정체인 것으로 판단되었다.

Figure 6. Effect of support on protein content in support and incorporation of DHA into PC.

② pH 선정 효과



효소를 고정화시킬 때 pH에 따라 Duolite A568 고정체에 고정화되는 정도와 PC에 DHA를 결합시키기 위하여 나타내는 활성에 대하여 조사한 결과를 Figure 7에 제시하였다. 고정체에 고정화된 단백질 (효소)의 양은 pH가 높을수록 많아져서 pH 6.5에서 pH 8.5까지 고정화된 단백질의 양이 증가하여 pH 8.5에서 가장 많은 양의 효소가 고정화된 것으로 나타났다. 그러나 PC에 결합된 DHA의 양을 확인한 결과 pH 8.5에서 가장 반응성이 낮은 것으로 나타났다. 따라서 phospholipase A<sub>1</sub>는 pH 7.5에서 고정화시키는 것이 가장 효율적인 것으로 확인되었다.

Figure 7. Effect of pH on protein content in support and incorporation of DHA into PC.

### ③ Phospholipase A<sub>1</sub> 용액의 양

Duolite A568 고정체에 최대 결합할 수 있는 phospholipase A<sub>1</sub> 용액의 양에 대하여 조사한 결과를 Figure 8에 제시하였다. 고정체 1 g을 기준으로 10 mL의 효소 희석액을 혼합하여 반응

시켰다. 효소 희석액은 phospholipase A<sub>1</sub> 용액을 pH 7.5인 phosphate 완충용액으로 일정 비율 희석시켜 제조하였으며, 그 희석비율은 10과 30, 50, 70, 90%로 하였다.

Figure 8의 결과에서 보는 바와 같이 phospholipase A<sub>1</sub> 용액의 농도가 높아질수록 고정체에 고정화되는 단백질 (효소)의 양이 증가하였다. Phospholipase A<sub>1</sub> 용액의 농도가 10에서 50%로 증가하였을 때는 고정화된 단백질의 양이 21에서 125 mg/g까지 증가하였으나, 50에서 90%까지 범위에서는 125에서 147 mg/g만 증가하여 phospholipase A<sub>1</sub> 용액이 50% 이상일 때는 효소의 증가량에 비하여 고정화되는 단백질의 양의 증가율이 감소한 것을 확인할 수 있었다.

PC에 DHA를 결합시키는 반응성의 측면에서는 phospholipase A<sub>1</sub> 용액의 농도가 50%이상일 때 10 mol%이상으로 PC에 결합된 DHA의 양 많아지는 것을 보여주었으나, 50에서 90%로 효소액의 농도 증가에서는 PC에 결합된 DHA의 양이 오히려 감소하는 경향을 보였다. 그러나 효소액이 70과 90%로 희석된 경우에는 보관 중에 활성이 변하는 일이 없었으나, 50%로 희석하여 고정화시킨 효소의 경우 보관하는 시간이 길어지면서 활성이 감소되는 것을 확인하였다.

따라서 phospholipase A<sub>1</sub> 용액은 pH 7.5 완충용액으로 70%로 희석하여 고정화시키는 것이 가장 효율적인 것으로 판단되었다.

Figure 8. Effect of enzyme solution content on protein content in support and incorporation of DHA into PC.

## (2) DHA 함유 PC 합성

DHA가 결합된 PC를 합성하기 위하여 Duolite A568 고정체에 pH 7.5의 완충용액에 효소용액을 70%로 희석시켜 고정화시킨 phospholipase A<sub>1</sub> 고정화 효소를 촉매로 이용하였다. 그 외에 수분함량, 반응온도, 효소량의 변수에서 DHA가 결합된 PC를 합성하기에 적합한 조건을 찾고, 대기압에서 가수분해된 PC를 진공 조건을 추가하여 에스테르화 반응을 촉진시킴으로써 PC의 효율을 높일 수 있는 연구를 진행하였다.

### (가) 수분함량에 의한 합성 효과

DHA를 결합시킨 PC를 합성하기 위하여 다양한 수분함량에서 실험한 결과를 Figure 9에 제시하였다. 이 실험은 대기압에서 PC와 DHA (72%의 DHA를 함유한 지방산)을 1:8의 몰비율로 혼합한 기질에 고정화시킨 phospholipase A<sub>1</sub>을 기질중량 대비 10%를 가하여 55°C에서 250 rpm으로 교반시키면서 반응시켜 반응시간에 따라 PC의 수율과 PC에 결합된 DHA의 함량을 측정하였다.

PC의 수율은 초기 3시간의 반응 동안 가수분해에 의하여 급격히 감소하였고 그 이후에도 꾸준히 감소하는 경향을 보였다. 반응 3시간 후에 PC의 수율은 수분함량이 증가할수록 감소하였고, 반응 24시간 후에 PC의 수율은 수분함량이 0.2%일 때 36 mol%이었고, 0.6%의 수분함량에서는 30 mol%, 0.8% 이상의 수분함량에서는 25 mol%의 PC 수율을 나타내었다.

PC에 결합된 DHA의 함량은 반응시간이 길어질수록 증가하는 경향을 보여주었다. 반응 초기에 DHA의 결합속도는 수분함량이 증가할수록 빠르게 나타났으며, 반응 9시간 이후 0.8% 이상의 수분함량일 때 반응시간의 증가와 함께 PC에 결합된 DHA의 함량이 꾸준히 증가하기는 하지만 수분함량에 따라 PC에 결합된 DHA의 함량이 변화되지는 않았다. 결국 24시간 후에는 0.8% 이상의 수분함량일 때 PC에 결합된 DHA의 함량이 28 mol%로 가장 높은 값을 나타내었다.

따라서 9시간 이후의 PC의 수율 변화 및 PC에 결합된 DHA의 함량 변화를 보았을 때 0.8%에서 1.0%의 수분함량이 가장 적합한 것으로 판단되며, 이후 실험은 필요 이상의 수분은 불필요한 가수분해반응을 일으킬 수 있는 요인이 되고 이로부터 수율의 감소를 초래할 우려가 있기 때문에 0.8%이 최적 수분함량인 것으로 판단하였다. 이후 실험에서는 기질 내 수분함량을 0.8%로 유지하였다.

Figure 9. Effect of water content on PC yield and incorporation of DHA into PC as a function of reaction time. This experiments were conducted at 55°C using PC and DHA of 1:8 (molar ratio) and 10% (based on total substrates) phospholipase A<sub>1</sub>, immobilized by Duolite A568 by stirring of 250 rpm under atmospheric pressure.

(나) 반응온도에 의한 합성 효과

DHA가 결합된 PC를 합성하기 위한 반응온도에 관한 실험 결과는 Figure 10에 제시하였다. 이 실험은 1:8의 몰비율로 혼합시킨 PC와 DHA 함유 지방산을 고정화된 phospholipase A<sub>1</sub>과 섞어 35와 45, 55, 65°C의 다양한 온도에서 반응을 실시하였다. 고정화된 효소의 양은 총 기질의 양을 기준으로 10%를 사용하였으며, 수분함량은 0.8%로 하고 대기압상태에서 250 rpm으로 교반시키면서 반응시켰다.

그 결과 온도가 증가할수록 PC 수율이 더 많이 감소하는 경향을 보였으며, 55와 65°C에서 PC의 수율변화는 유사한 경향을 보여주었다. PC에 결합된 DHA의 함량은 PC의 수율과 반대로 반응온도가 높을수록 증가하는 경향을 보였으며, 55와 65°C는 PC의 수율변화에서와 마찬가지로 PC에 결합된 DHA의 함량 변화에서도 유사한 경향을 보여주었다. 45°C에서의 반응도 반응 12시간까지 관찰한 결과에서는 PC에 결합된 DHA의 함량이 55나 65°C에 비하여 작지만 24시간의 반응에서는 28 mol%로 45와 55, 65°C의 결과가 유사하게 나타났다. 후에 진공반응 시 대기압에서의 반응시간을 줄일 것을 고려하여 55°C를 적정 반응온도로 선정하였다.

Figure 10. Effect of temperature on PC yield and incorporation of DHA into PC as a function of reaction time. This experiments were conducted at water content of 0.8% using PC and DHA of 1:8 (molar ratio) and 10% (based on total substrates) phospholipase A<sub>1</sub>, immobilized by Duolite A568 by stirring of 250 rpm under atmospheric pressure.

(다) 효소량에 의한 합성 효과

DHA가 결합된 PC를 합성하기 위하여 효소량에 대한 효과를 실시 하였고 그 결과를 Figure 11에 제시하였다. 이 실험은 1:8의 몰비율로 혼합시킨 PC와 DHA 함유 지방산을 고정화된 phospholipase A<sub>1</sub>과 섞어 55°C의 온도에서 반응하였다. 고정화된 효소의 양은 총 기질의 양을 기준으로 2.5, 5, 10, 20%로 설정하였으며, 수분함량은 0.8%로 고정 하였으며 대기압상태에서 250 rpm으로 교반시키면서 반응시켰다.

그 결과 PC의 수율과 PC에 결합된 DHA의 함량 모두 효소량에 따라 큰 차이를 나타내었다. 효소량이 증가하면서 PC의 수율도 크게 감소하고 PC에 결합된 DHA의 함량도 크게 증가하였다. 특히 PC에 결합된 DHA의 함량 변화는 5와 10%에서 큰 차이를 나타내었다. 효소량을 20%까지 증가시켰을 때는 효소량의 증가에 비하여 PC에 결합된 DHA의 함량의 증가가 크지 않았고, 효소량이 많아지면서 반응물과 효소 간의 엉김이 심하여 손실되는 반응물의 양이 많았기 때문에 20%의 효소량은 적합하지 않다고 판단하였다.

따라서 고정화된 phospholipase A<sub>1</sub>은 기질의 양을 기준으로 10%의 양을 사용하여 반응시키는 것이 적합한 것으로 판단하였다.



Figure 11. Effect of enzyme loading on PC yield and incorporation of DHA into PC as a function of reaction time. This experiments were conducted at water content of 0.8% and 55°C using PC and DHA of 1:8 (molar ratio) and phospholipase A<sub>1</sub>, immobilized by Duolite A568 by stirring of 250 rpm under atmospheric pressure.

(라) 진공에 의한 재합성 효과

DHA가 결합된 PC를 합성하기 위하여 PC와 DHA를 1:8의 몰비율로 혼합하여 반응을 시켰을 때 효소는 phospholipase A<sub>1</sub> 효소가 적합한 것으로 조사되었고, phospholipase A<sub>1</sub>은 Duolite A568을 pH 7.5에서 고정화 시켰을 때 가장 효율적이었으며 고정화된 효소는 기질의 총 질량을 기준으로 10%를 사용하는 것이 효율적이었다. 반응온도는 55°C와 수분함량 0.8%의 조건에서 24시간 동안 반응시켰을 때 PC의 수율은 23 mol%이고 PC에 결합된 DHA의 함량은 28 mol%이었다.

이 반응은 대기압상태에서 생성되는 수분에 대한 어떠한 조치 없이 이루어진 반응으로써 대기압에서 일정시간 반응된 후에 진공장치를 사용하면 생성된 수분을 제거하여 더 높은 PC 수율을 얻을 수 있을 것으로 판단되었다. 따라서 그 결과를 기록한 Figure 11에 의하여 PC의 수율이 6시간의 반응 후에 30 mol%이었으며, 이후에는 PC의 감소율이 급격히 감소된 것을 확인할 수 있었다. 따라서 6 시간까지 대기압에서 반응시킨 후 5 torr의 진공상태를 만들어 생성되었을 수분을 제거해 줌으로써 PC의 재합성이 일어날 수 있도록 유도 하였다. 그 결과 Figure 12에서 보는 바와 같이 PC에 결합된 DHA의 함량의 변화는 거의 없으나 PC 수율은 10%가량 증가될 수 있는 것으로 확인되었다. 본 실험의 결과와 본 연구팀에서 기존에 발표된 연구결과를 비교하여 보면 PC에 결합된 DHA 함량의 변화를 초래하지 않으면서 수율을 증대 시킬 수 있는 획기적인 결과라고 할 수 있다.

Figure 12. PC yield and incorporation of DHA into PC on as a function of the added reaction time by addition of vacuum of 5 torr after acidolysis of 6 h under atmospheric condition. The initial sample for vacuum test was prepared at water content of 0.8% and 55°C using PC and DHA of 1:8 (molar ratio) and 10% (based on total substrates) phospholipase A<sub>1</sub>, immobilized by Duolite A568 by stirring of 250 rpm under atmospheric pressure for 6 h.

### (3) MCFA (Medium Chain Fatty Acid) 함유 PC 합성

MCFA가 결합된 PC는 탄소수가 많은 지방산과 결합된 PC에 비하여 극성이 높은 유화력을 갖게 될 것이므로 새로운 기능성 PC로서의 활용가치가 있다. 따라서 MCFA를 결합한 PC를 합성하기 위한 최적 조건에 관한 연구를 실시하였다. MCFA로서 사용된 capric acid (C10:0)는 DHA (C22:6)에 비하여 탄소수가 짧고 이중결합이 없기 때문에 DHA와는 다른 반응 조건들이 요구될 수 있다. 효소는 DHA를 결합한 PC 합성에 사용되었던 효소와 동일한 Duolite A568에 고정화된 phospholipase A<sub>1</sub>을 사용하였으며, 기질 (PC와 capric acid) 간의 몰비율을 비롯한 수분함량과 반응온도에서 최적 조건을 찾기 위한 연구가 이루어졌다.

#### (가) 기질 몰비율에 의한 합성 효과

PC와 capric acid의 몰비율의 차이에 따른 capric acid가 결합된 PC의 합성 효율을 확인한 결과는 Figure 13와 같다. 이 실험은 고정화된 phospholipase A<sub>1</sub>을 총 기질량 대비 5%의 양으로 사용하여 55°C에서 0.8%의 수분함량으로 대기압에서 250 rpm으로 반응물을 교반을 실시하였다.

그 결과 PC 수율은 capric acid의 함량이 증가하면서 감소하고 PC에 결합된 capric acid의 함량은 증가하였다. PC 수율이 가장 높게 나타난 PC와 capric acid의 몰비율은 1:4이었으며, 1:6에서 1:10의 몰비율 사이에서는 PC의 감소율의 차이는 있으나 최종 PC의 수율은 58 mol% 정도로 유사한 값을 나타내었다. 반면 PC에 결합된 capric acid의 함량은 몰비율에 따른 증가량이 유의적으로 차이를 보였으며, 1:8의 몰비율 조건에서 capric acid가 PC에 가장 많이 결합된 것으로 확인되었다.

반응 시간에 따른 PC 수율의 감소와 PC에 결합되는 capric acid의 함량이 증가한다는 경향은 PC와 DHA를 반응시켰을 때와 동일하나, 최적 조건에서 DHA와 반응시킨 PC의 수율은 24 시간의 반응 후 23 mol%이었고, PC에 결합된 DHA의 함량은 28 mol%이었던 것에 비하여 같은 몰비율 조건 (1:8)에서 capric acid와의 반응은 PC의 수율이 58 mol%이며 결합된 capric acid의 함량은 35 mol%로 DHA를 결합한 PC의 수율보다 35 mol%가량 높았으며, target 지방산인 capric acid의 결합율도 DHA에 비하여 7 mol% 가량 더 높게 나타났다.

따라서, PC와 capric acid 반응의 최적 몰비율 조건은 1:8인 것으로 확인되었다.

Figure 13. Effect of molar ratio of PC and capric acid on PC yield and incorporation of capric acid into PC as a function of reaction time. This experiments were conducted at water content of 0.8% and 55°C using PC and capric acid and 5% (based on total substrates) phospholipase A<sub>1</sub>, immobilized by Duolite A568 by stirring of 250 rpm under atmospheric pressure.

(나) 수분함량에 의한 합성 효과

PC와 capric acid의 acidolysis를 위한 수분조건에 대한 실험 결과를 Figure 14에 제시하였다. 이 실험은 PC와 capric acid를 몰비율 1:8로 혼합한 기질에 고정화된 phospholipase A<sub>1</sub>을 총 기질량 대비 5%의 양으로 함께 넣어 반응시켰다. 반응온도는 55°C인 대기압에서 250 rpm으로 교반시키면서 반응시켰다.

그 결과 수분함량이 높을수록 PC의 수율은 감소하였고, PC에 결합된 capric acid의 함량은 증가하였다. PC의 수율은 반응 3시간 후에 수분함량에 따른 차이가 크게 나타났고, 1.4와 2.0%의 수분함량에서는 반응 6시간 이후에 PC의 변화량이 유사하게 나타났다. PC에 결합된 capric acid의 함량은 0.06%의 수분함량일 때 가장 낮았고 1.2% 이상에서는 합성되는 속도의 차이는 있었으나 24시간 이후에는 40 mol%정도로 유사한 결과를 보여주었다.

따라서 최적의 수분함량 조건은 1.2%인 것으로 판단하였다.

Figure 14. Effect of water content on PC yield and incorporation of capric acid into PC as a function of reaction time. This experiments were conducted at 55°C using PC and capric acid of 1:8 (molar ratio) and 5% (based on total substrates) phospholipase A<sub>1</sub>, immobilized by Duolite A568 by stirring of 250 rpm under atmospheric pressure.

(다) 온도에 의한 합성 효과

PC와 capric acid의 acidolysis를 위한 온도조건에 대한 실험 결과를 Figure 15에 나타내었다. 이 실험은 PC와 capric acid를 몰비율 1:8로 혼합한 기질에 고정화된 phospholipase A<sub>1</sub>을 총 기질량 대비 5%로 하여 함께 넣어 반응시켰다. 수분함량은 1.2%로 유지하고 대기압에서 250 rpm으로 교반시키면서 반응시켰다.

그 결과 반응온도에 따라 PC의 양의 변화는 반응 초기에는 차이를 보였지만 반응 9시간부터는 변화량이 유사하게 나타났다. 반면 PC에 결합되는 capric acid의 양은 온도가 증가할수록 증가하였지만 55와 65°C에서 가장 많은 양의 capric acid가 PC에 결합되면서 차이는 나타나지 않았다.

따라서 capric acid가 결합된 PC를 합성하기 위한 최적의 온도는 55°C인 것으로 확인되었다.



Figure 15. Effect of temperature on PC yield and incorporation of capric acid into PC as a function of reaction time. This experiments were conducted at water content of 1.2% using PC and capric acid of 1:8 (molar ratio) and 5% (based on total substrates) phospholipase A<sub>1</sub>, immobilized by Duolite A568 by stirring of 250 rpm under atmospheric pressure.

(라) 진공에 의한 재합성 효과

DHA가 결합된 PC의 합성에서와 마찬가지로 진공반응을 하기에 앞서 대기압에서 capric acid와 PC를 acidolysis시키는 반응을 시켰다. 이 때 실험 조건은 PC와 capric acid를 1:8의 몰 비율로 혼합하여 사용하였고 고정화된 phospholipase A<sub>1</sub>는 총 기질량을 기준으로 5%로 하여 사용하였다. 반응온도는 55°C와 수분함량 1.2%의 조건에서 24시간 동안 반응시켰을 때 PC의 수율은 43 mol%이고 PC에 결합된 DHA의 함량은 40 mol%이었다.

대기압에서의 acidolysis된 반응물에 5 torr의 진공으로 수분을 제거하였을 때의 결과를 Figure 16에 제시하였다. 진공 후 24시간의 반응에서 PC의 수율이 53 mol%이었으며, 72 시간 동안 진공 반응으로 60 mol%까지 수율을 올릴 수 있었다. PC에 결합된 capric acid의 양도 진공 반응 72시간 이후에 47 mol%까지 증가하였다.

Capric acid를 결합시킨 PC의 합성에서 적용한 진공반응은 PC에 결합된 capric acid의 양 뿐만 아니라 PC의 수율의 증가에도 영향을 주어 DHA를 결합시킨 PC의 합성에 적용시킨 진공반응보다 효율적인 것으로 나타났다.

Figure 16. PC yield and incorporation of capric acid into PC on as a function of the added reaction time by addition of vacuum of 5 torr after acidolysis of 24 h under atmospheric condition. The initial sample for vacuum test was prepared at water content of 1.2% and 55°C using PC and DHA of 1:8 (molar ratio) and 5% (based on total substrates) phospholipase A<sub>1</sub>, immobilized by Duolite A568 by stirring of 250 rpm under atmospheric pressure for 24 h.

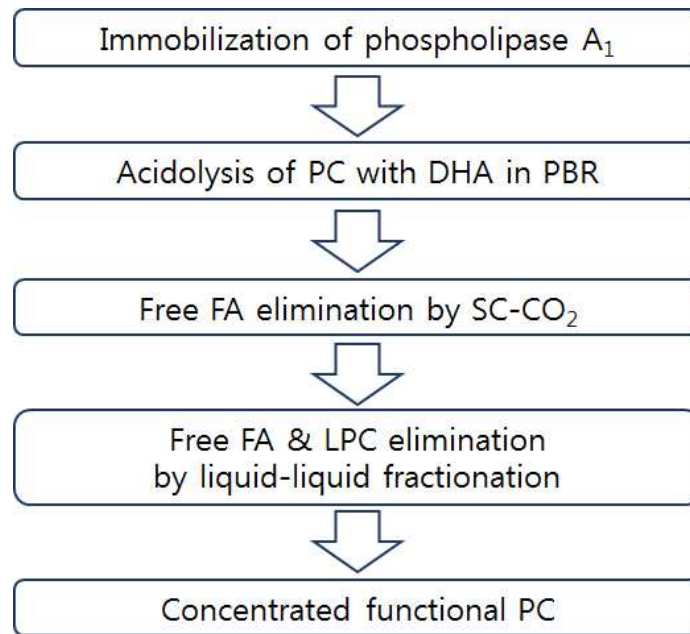
## 2. 연속식 반응을 이용한 기능성 PC의 합성 및 농축 방법 확립

### 가. 재료 및 방법

#### (1) 실험의 구도

본 연구에서는 본 연구에서 고정화한 phospholipase A<sub>1</sub> (from *Thermomyces lanuginosus*/*Fusarium oxysporum*) 고정화 효소를 이용한 PC와 *n-3* PUFA의 acidolysis 반응을 통해 기능성 PC를 합성하고, 반응 생성물에서 잔류 지방산 및 LPC를 제거하여 기능성 PC를 분리 농축하였다. 이는 크게 세 단계로 이루어졌다. 첫 번째는 acidolysis 반응을 통하여 연속식 반응기인 PBR system에서 기능성 PC를 합성하고, 두 번째로 초임계 이산화 탄소 추출법을 이용한 반응 생성물에서 잔류 유리지방산을 1차 제거한 후, 세 번째로 liquid-liquid fractionation 법을 이용한 잔류 유리지방산 및 LPC를 제거하여 기능성 PC를 농축하였다

(Figure 17). 본 연구에서 지칭하는 *n-3* PUFA란 DHA (22:6), EPA (20:5), DPA (22:5)을 말한다.



FA: fatty acid; LPC: lysophosphatidylcholine; PC: phosphatidylcholine; SC-CO<sub>2</sub>: supercritical carbon dioxide

Figure 17. Production and concentration of functional PC

(2) 재료

(가) 기질

- ① PC (granulated phosphatidyl choline, 순도 95% 이상, from soybean)는 Avanti Polar-Lipids, Inc. (Alabaster, Al, USA)에서 구입하였다.
- ② 지방산 에틸 에스터는 (주) 일신웰스에서 제공하였다. 지방산 에틸 에스터의 지방산 조성은 Table 1.에 나타내었다. 지방산 제조 방법은 지방산 에틸 에스터 100 g을 1 L 둥근 바닥 플라스크에 넣고 95% 에탄올 300 mL과 40% NaOH 용액 100 mL을 넣고 30분 동안 reflux시켰다. 2 L 분액깔때기에 반응액을 넣고 conc. HCl 120 mL과 증류수 200 mL을 넣어 충분히 흔들어 준 후 아래층은 버리고 윗 층만을 취하여 다시 분액깔때기에 넣고 헥산 500 mL과 증류수 200 mL을 넣어 흔들어 주고 아래층은 버리고 위층을 취한다. 지방산이 녹아 있는 헥산층은 증류수 100 mL로 세 번 세척해 주고 감압 증류기로 1차 헥산을 제거하고 질소를 불어 잔류 헥산이 없도록 한 후 효소 반응에 사용하였다.

Table 1. Fatty acid composition (mol%) of initial phosphatidylcholine (PC) and *n-3* PUFA enriched-fatty acid ethyl ester for acidolysis.

	<i>n-3</i> PUFA <sup>a</sup> enriched-fatty acid ethyl ester	PC <sup>b</sup>
C16:0	0.3	13.0
C16:1n-7	0.3	0.0
C18:0	0.8	3.4
C18:1n-9	2.1	10.3
C18:1n-7	0.7	1.5
C18:2n-6	0.2	65.6
C18:3n-3	0.9	6.3
C20:0	1.7	0.0
C20:1n-9	0.3	0.0
C20:2	0.4	0.0
C20:3n-6	1.4	0.0
C20:4n-6	0.8	0.0
C20:5(EPA)	14.7	0.0
C22:1	1.7	0.0
C22:5(DPA)	3.3	0.0
C22:6(DHA)	70.4	0.0

(나) 효소

① 효소 종류

고정화에도 사용된 Phospholipase A<sub>1</sub> (Lecitase<sup>®</sup> Ultra)는 *Thermomyces lanuginosus*/*Fusarium oxysporum*에서 유래된 액상효소로서 Novo Nordisk Bioindustry Ltd. (Seoul, Korea)에서 구입하였다.

② 효소 고정화

Lewatit VP OC 1600를 95% 에탄올에 3시간 동안 침지시켜 팽윤시킨 후에 phosphate 완충용액 (pH 7.5)으로 에탄올을 제거하고 팽윤된 고정체에 완충용액이 채워지도록 하였다. Phospholipase A<sub>1</sub> 용액의 농도가 70%가 되도록 phosphate 완충용액을 이용하여 희석시켰다. 고정체 무게 1 g에된 Phospholipase A<sub>1</sub> 용액 10 mL을 30°C에서 250 rpm으로 16시간 동안 섞어주었다. 그리고 고정체 무게 1 g을 기준으로 phosphate 완충용액 40 mL을 이용하여 세척해주었다. 고정화된 phospholipase A<sub>1</sub>은 상온에서 24 시간 동안 건조된 후 진공

건조기에서 24시간 건조시켰다. 반응 전까지는 냉장보관하였고, 반응을 위하여 수분활성도 0.64인 밀폐된 용기에 보관하였다. 이상의 모든 과정은 아래 Figure 18.와 같았다.

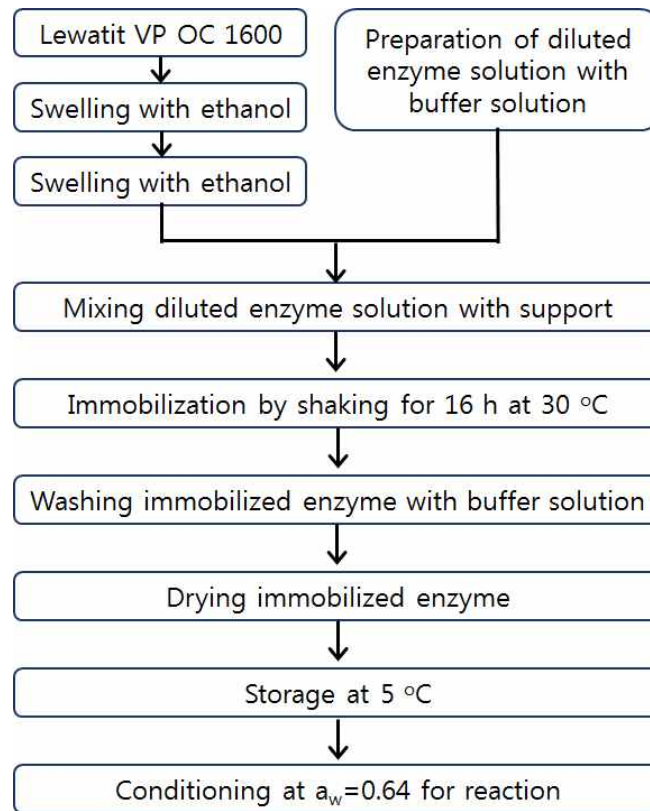


Figure 18. Protocol for preparation of immobilized enzyme

### ③ 효소의 고정화도 측정 (단백질 정량-Lowry법)

효소의 고정화도를 측정하기 위하여 초기 phospholipase A<sub>1</sub> 용액의 단백질을 정량한다. Phospholipase A<sub>1</sub>을 고정화 시킨 후에 완충용액에 남아 있는 단백질량과 세척 후 완충용액으로 빠져나온 단백질량을 합하여 정량한다. Lowry법에 사용된 시약 A는 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 g 과 0.1 N NaOH 0.4 g을 증류수 100 mL에 섞어서 만든다. 시약 B1은 1% CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0.5 g을 증류수 50 mL에 섞어서 만든다. 시약 B2는 2% NaK tartrate · 4H<sub>2</sub>O를 증류수 50 mL에 넣어 제조한다. 시약 A, B1, B2의 형태로 보관 후 사용하기 직전에 각각 100 : 1 : 1의 부피비율로 섞어 시약 C를 만들어 사용한다. 시료 200 uL에 1 mL의 시약 C를 섞어 vortexing 후 10분 동안 방치한 후 Folin 시약 50 uL를 넣어 vortexing 후 30분 동안 방치하여 발색 (파란색)시켰다. 발색된 시료는 750 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{고정화된 효소량 (mg/g)} = \text{고정화된 효소량 (g/g)} = \frac{W1 - W2}{W3 + (W1 - W2)}$$

W1: phospholipase A<sub>1</sub> 원액의 단백질량 (mg)

W2: 고정화 후 완충용액에 남아 있는 단백질량 (mg)

W3: 고정체 무게 (g)

### (3) Acidolysis를 통한 기능성 PC의 합성

#### (가) 연속식 반응기 (Packed bed reactor, PBR)

연속식 반응기는 기질을 반응기로 주입해주는 syringe와 pump, 실제적으로 반응이 일어나는 부분인 packed bed reactor (PBR), 반응 후 생성물이 나오는 부분으로 구성되어있다 (Figure 19). PBR에는 고정화 효소가 채워져 있고, syringe에 있던 기질이 pump에 맞춰진 속도에 따라 PBR로 주입되어 그 안에 효소와 반응한 후 그 생성물이 다시 같은 속도로 나와 모이게 된다. 본 연구에서 제작한 PBR은 stainless steel 재질로 외부에 water bath로 반응 시 온도를 유지할 수 있도록 되어있다. PBR의 내경은 0.475 cm, 길이는 5.1 cm이며, 이 PBR에 채워지는 효소의 양은 약 0.35g였다. Void volume이란, PBR에 효소가 차지하는 공간 이외에 공간을 말하며, 이는 다시 말해 기질이 채워지는 부피를 의미한다. 이 PBR에 본 실험에서 쓰인 효소와 기질을 넣고 측정한 void volume은 1.29 mL였다. Residence time 이란 기질이 PBR에 머무는 시간을 의미하며, 다음과 같이 계산된다.

$$\text{Residence time (min)} = \frac{\text{void volume (ml)}}{\text{flow rate of substrate mixture (ml/min)}}$$

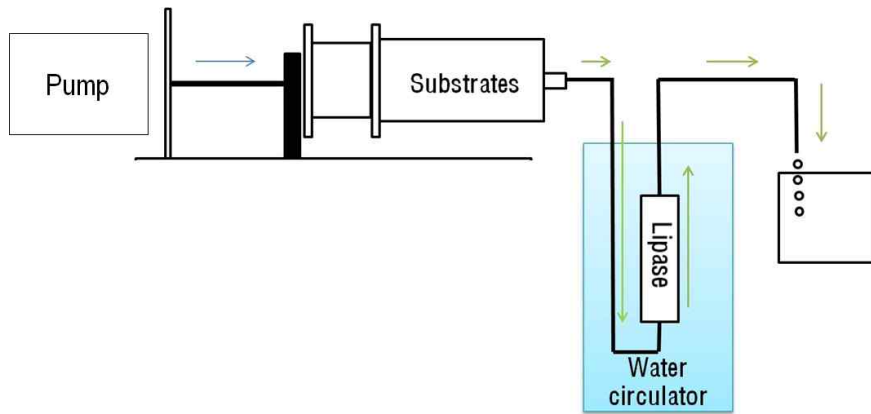


Figure 19. Diagram for packed bed reactor

#### (나) Acidolysis 반응

PC와 target 지방산 (*n*-3 PUFA)을 50°C에서 각각 녹여 일정한 몰 비율로 섞어서 시료를 만들고 Karl fisher 수분 측정기를 통하여 수분함량을 측정하였다. 조사된 몰비율의 범위는 1:6-1:12 (PC:지방산) 이었다. 기질 혼합물 30 g을 syringe에 넣고 0.35g의 고정화 효소를

PBR에 채운 후 반응을 진행하였다 (Figure 20). PBR은 water bath를 이용하여 원하는 온도로 유지 되었으며, 조사된 온도의 범위는 35-65°C였다. 반응전 시료와 효소의 안정화를 위하여 residence time을 3분의 속도로 하여 약 30분간 반응기 void volumn을 기준으로 10배의 void volumn에 해당 하는 기질 12.9 mL을 통과시켜 기질과 효소를 안정화 시킨 후 residence time별 반응 실험을 실시하였다. 각 residence time 별 시료 채취는 해당 residence time에서 최소 2배의 void volumn에 해당하는 시료를 통과 시켜 해당 조건에서 안정화 된 시료를 채취 하였다. 조사된 residence time은 15, 30, 60, 120, 240, 360분 이었다. Residence time의 조절은 앞에서 기술한 바와 같이 pump의 속도로 조절 되었다. 분석한 시료의 PC와 LPC에 결합된 *n-3* PUFA의 함량 및 PC와 LPC의 수율은 다음을 통해 계산되었다.

$$n-3 \text{ PUFA} = \text{DHA} + \text{EPA} + \text{DPA}$$

$$PC \text{ yield}(\text{mol}\%) = \frac{\text{반응 후 } PC \text{의 양}(\text{mol})}{\text{반응 전 } PC \text{의 양}(\text{mol})} \times 100$$

$$\text{Incorporation of } n-3 \text{ PUFA into PC}(\text{mol}\%) = \frac{PC \text{에 결합된 } n-3 \text{ PUFA 의 양}(\text{mol})}{PC \text{에 결합된 총 지방산의 양}(\text{mol})} \times 100$$

$$LPC \text{ yield}(\text{mol}\%) = \frac{\text{반응 후 } LPC \text{의 양}(\text{mol})}{\text{반응 전 } LPC \text{의 양}(\text{mol})} \times 100$$

$$\text{Incorporation of } n-3 \text{ PUFA into LPC}(\text{mol}\%) = \frac{LPC \text{에 결합된 } n-3 \text{ PUFA 의 양}(\text{mol})}{LPC \text{에 결합된 총 지방산의 양}(\text{mol})} \times 100$$



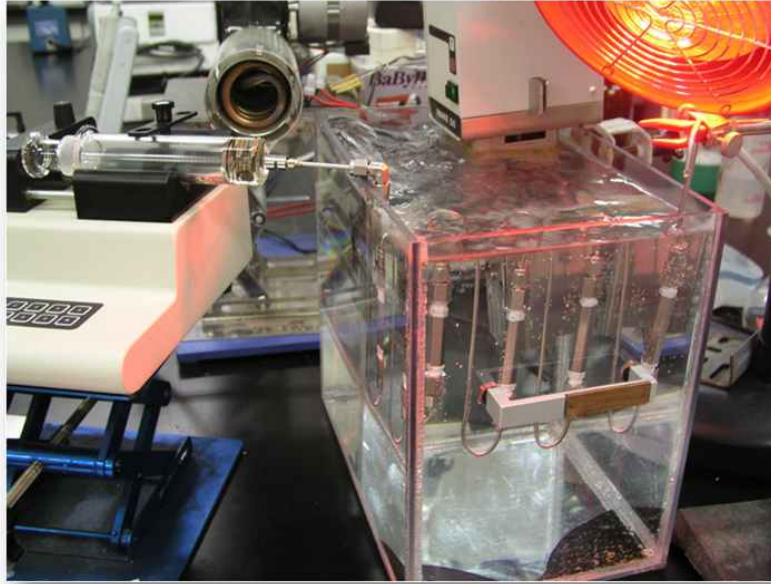
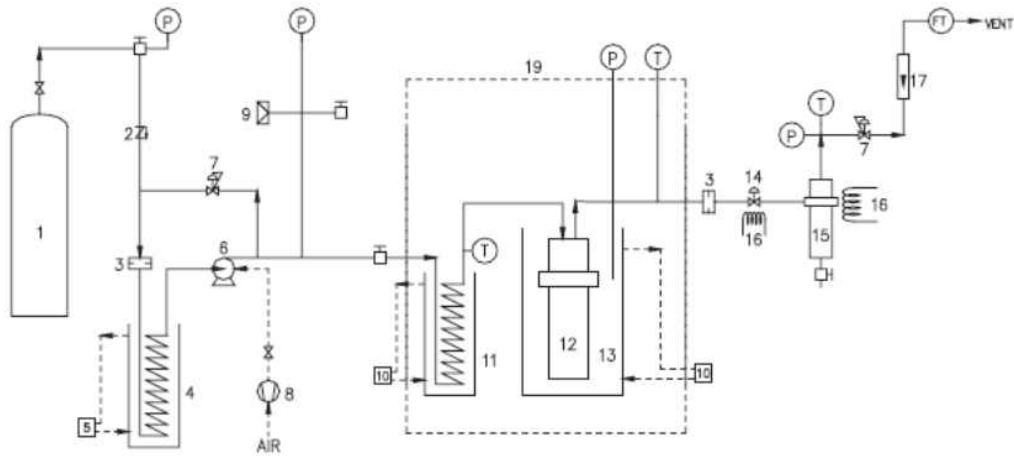


Figure 20. Packed bed reactor used for acidolysis of PC with DHA

(4). Acidolysis 반응 생성물에서 PC 분리 농축

(가) 초임계 이산화탄소를 이용한 반응 생성물로부터 유리지방산 제거

Acidolysis반응이 끝난 반응 생성물은 초임계 이산화탄소를 이용하여 유리지방산이 추출 제거되었다. 이에 사용된 초임계 장치의 모식도는 Figure 21.에 나타내었다. 반응 생성물 10g을 초임계 추출기 (12)인 water jacketed high pressure vessel (HIP, Erie, PA, USA)에 넣었다. 추출기의 온도는 원하는 온도로 water circulator (10)를 이용하여 맞춰졌다. 조사된 추출 온도는 35, 45, 55°C 였다. 액체 이산화탄소(1)는 미리 저온 냉각기 (5)를 통해 저온으로 맞추어진 코일 (4)을 통과하여 액체 펌프 (Haskel, Burbank, CA, USA) (6)를 통해 추출기로 들어갔다. 액체 이산화탄소의 압력은 액체 펌프로 조절되었다. 조사된 압력은 2000, 4000, 6000 psi 였다. 추출물은 이어서 콜렉터인 separator vessel (15)로 모아졌다. 이산화탄소의 정확한 flow는 flowmeter (Fischer and Porter, Warminster, PA, USA) (17)로 측정되어 2mL로 일정하게 유지되었다. 추출은 흘려준 모든 조건에서 이산화탄소의 양 (450 L)을 일정하게 하여 6시간동안 진행되었고, 추출이 끝난 후 추출기와 콜렉터에 있는 시료의 조성이 분석되어졌다. 추출기에 남은 시료 내의 PC, LPC, FA의 조성은 무게 기준 백분율로 표현하기로 한다. 실제 실험에 사용한 초임계 반응기를 Figure 22-23에 나타내었다.



- |                            |                       |                    |
|----------------------------|-----------------------|--------------------|
| 1-CO <sub>2</sub> cylinder | 8-air compressor      | 15-separator       |
| 2-check valve              | 9-rupture             | 16-electric heater |
| 3-filter                   | 10-heating circulator | 17-flow meter      |
| 4-subcooler                | 11-preheate           | 18-flow totalizer  |
| 5-refrigerated circulator  | 12-liquid extractor   | 19-air bath        |
| 6-liquid pump              | 13-heating jacket     | P-pressure gauge   |
| 7-back pressure regulator  | 14-metering valve     | T-thermocouple     |

Figure 21. Diagram for supercritical carbon dioxide extraction



Figure 22. Supercritical carbon dioxide system for fatty acid extraction

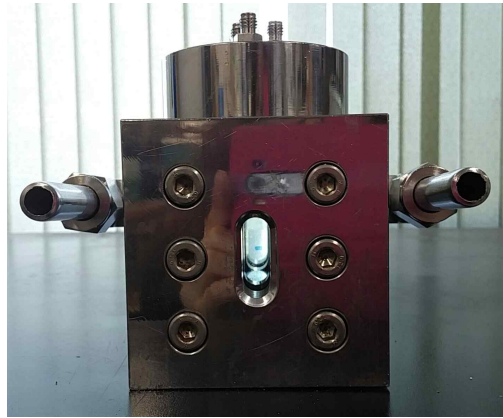
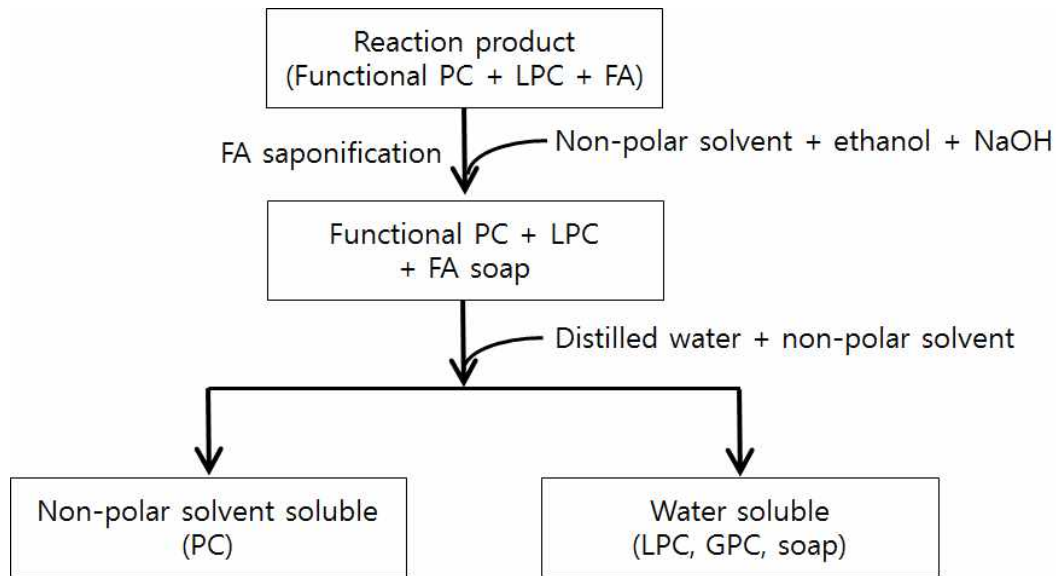


Figure 23. Water jacketed high pressure vessel

(나) Liquid-liquid fractionation을 통한 잔류 유리지방산 및 LPC 제거

초임계 추출이 끝난 후 추출기에 남은 시료는 liquid-liquid fractionation을 통해 다시 한번 유리지방산과 LPC가 제거되었다 (Figure 24). 이를 위해 우선 잔류 유리지방산의 부분적 비누화 과정을 거쳤다. 초임계 추출이 끝난 약 0.5g의 시료를 삼각 플라스크에 넣고, 비극성 용매와 에탄올을 2:1 (v/v)로 섞은 용매를 10mL 넣어 완전히 녹여주었다. 조사된 비극성 용매는 디에틸에테르, 클로로포름, 헥산, 디클로로메탄, 총 4종류 였다. 이 삼각 플라스크에 지시약 0.1% phenolphthalein in 99% 에탄올 용액을 0.2 mL 넣어 주고 magnetic bar를 넣고 stirrer로 약 250rpm으로 섞어주었다. 유리지방산의 비누화를 위해 0.1N NaOH in 70% 에탄올 용액을 뷰렛을 이용하여 한 방울씩 천천히 떨어뜨려 종말점까지 적정하여 주었다. 적정이 끝난 시료는 100mL 짜리 separate funnel로 옮겨졌다. 이에 앞서 사용했던 비극성 용매 10mL와 증류수를 일정량 넣고 층을 분리시킨 후 비극성 용매층을 둥근 플라스크에 모아 vacuum evaporator를 이용하여 용매를 제거하였다. 이렇게 하여 얻어진 시료의 조성이 분석되었다. 이 때 liquid-liquid fractionation 이후 PC의 수율은 다음과 같은 방법으로 계산되었다.

$$PC\ yield(wt\%) = \frac{fractionation\ 후\ PC\ 의\ 양\ (g)}{fractionation\ 전\ 시료\ 내\ PC\ 의\ 양\ (g)} \times 100$$



FA: fatty acid; GPC: glycerophosphatidylcholine; LPC: lysophosphatidylcholine; PC: phosphatidylcholine

Figure 24. Separation of PC from acidolysis reaction product by liquid-liquid fractionation

(5) 분석

(가) TLC를 이용한 PC 분석

반응물 50 mg을 chloroform 150 uL에 녹인 후 TLC plate (silica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck, Germany)에 loading시키고 chloroform/ methanol/ acetic acid/ water (75:40:8:3, by vol)의 용액으로 전개시켰다. Plate에 분리된 PC와 LPC를 scrap한 후에 내부표준물질 (C17:0) 1 mg을 넣고 BF<sub>3</sub> (14% Boron fluoride in methanol)를 이용하는 방법으로 methylation시켜 GC 분석용 시료를 만들었다.

(나) GC-FID 분석조건

GC (gas chromatograph, Buruker cp-3800, USA)에 Supercowax<sup>TM</sup> 10 (30 m × 0.25 mm, 0.25 um, Supelco, USA) 컬럼을 장착하였으며, 컬럼 오븐 온도는 180°C에서 1분간 정치하고 230°C까지 1.5°C/min으로 승온 시킨 후 5분 동안 정치시켰다. 주입부의 온도는 240°C이며 불꽃 이온화 검출기의 온도는 250°C로 설정하였다. 이동상 가스는 헬륨을 1.5 mL/min으로 흘려주면서 50:1의 split ratio에서 분석하였다.

(다) 계산방법

$$PC\ yield(mol\%) = \frac{\text{반응 후 } PC\ \text{의 양}(mol)}{\text{반응 전 } PC\ \text{의 양}(mol)} \times 100$$

$$Incorporation\ of\ n-3\ PUFA\ into\ PC(mol\%) = \frac{PC\ \text{에}\ \text{결합된}\ n-3\ PUFA\ \text{의}\ \text{양}(mol)}{PC\ \text{에}\ \text{결합된}\ \text{총}\ \text{지방산의}\ \text{양}(mol)} \times 100$$

$$LPC\ yield(mol\%) = \frac{\text{반응 후 LPC의 양}(mol)}{\text{반응 전 LPC의 양}(mol)} \times 100$$

$$\text{Incorporation of } n-3\ PUFA\ \text{into}\ LPC(mol\%) = \frac{LPC\ \text{에}\ \text{결합된}\ n-3\ PUFA\ \text{의}\ \text{양}(mol)}{LPC\ \text{에}\ \text{결합된}\ \text{총}\ \text{지방산의}\ \text{양}(mol)} \times 100$$

## 나. 결과 및 고찰

### (1). 연속식 반응기에서 Acidolysis를 통한 DHA 함유 기능성 PC의 합성

DHA가 결합된 PC를 합성하기 위하여 고정체로 Lewatit VP OC 1600을 이용하여 pH 7.5의 완충용액에 70%로 희석시켜 고정화시킨 phospholipase A<sub>1</sub>을 촉매로 이용하였다. 연속식 반응기에 채워지는 효소량은 0.35g으로 고정하여 residence time을 변화시켜 반응을 진행하였다. 0.35g의 효소가 채워진 반응기의 기질에 대한 void volume은 측정 결과 1.29mL였다. 반응 시작 후 기질이 효소의 공극에 충분히 채워질 수 있도록 residence time 3분으로 약 10배치 흘러 총 12.9mL flush out 시켜준 후, residence time을 15, 30, 60, 120, 240, 360 분으로 바꿔주며 시료를 채취하였다. 각각의 residence time에서 반응하고 나오는 기질이 그 residence time에서 반응한 기질만 나오도록 residence time을 바꾼 후 2배치 흘린 후 시료를 채취하였다. 연속식 반응기와 1차년도에 수행했던 회분식 반응기에서 그 최적조건이 상이하므로, DHA가 결합된 PC를 합성하기에 최적의 조건을 찾기 위해 수분함량, 반응온도, 기질간의 (지방산과 PC) 몰비율의 영향이 조사되었다.

#### (가) 수분함량에 의한 영향

DHA를 결합시킨 PC를 합성하기 위한 최적 수분함량을 조사하기 위해 총 기질 무게 기준 0.07-4.0% (w/w) 범위의 수분함량에서 실험이 수행되었다. 이 때 나머지 실험조건은 압력은 대기압, 기질간의 몰비율은 1:8 (PC:지방산), 온도는 55°C로 고정되어 실험이 진행되었다. Residence time 별로 시료를 채취하여 PC와 LPC에 결합된 *n-3* PUFA의 함량과 PC와 LPC의 수율을 측정하였다.

PC에 결합된 *n-3* PUFA의 함량의 경우, 4.0% (w/w)를 제외한 조사된 모든 수분함량에서 residence time이 길어짐에 따라 전반적으로 PC에 결합된 *n-3* PUFA의 함량이 증가함을 볼 수 있었다 (Figure 25). 반면 수분함량 4.0% (w/w)에서는 residence time이 120분까지 증가하는 동안에는 PC에 결합된 *n-3* PUFA의 함량이 증가하였으나, 120분 이후에는 감소하는 양상을 보였다. 한편, 수분함량이 0.07%에서 1.0% (w/w)까지 증가함에 따라 *n-3* PUFA가 PC에 결합되는 초기 속도가 급격히 증가함을 볼 수 있었다. 하지만 1.0% (w/w)보다 더 큰 수분함량에서는 1.0%와 비교하여 초기 속도의 유의적인 차이를 보이지 않았다. 또한, 최대 PC에 결합된 *n-3* PUFA의 함량은 수분 1.0% (w/w)에서 확인 되었으며, residence time 360분에서 28.6% (mol/mol)를 나타내었다. 이는 수분함량 0.07% (w/w)가 residence time 360분에서 단지 15.0% (w/w)였음과 비교하여 볼 때, 수분함량에 따라 PC에 결합되는 *n-3* PUFA의 함량이 크

게 영향을 받음을 알 수 있다.

PC의 수율의 경우, 조사된 모든 수분함에서, residence time이 길어짐에 따라 전반적으로 PC의 수율이 감소하는 경향을 나타내었다 (Figure 26). 수분함량이 증가함에 따라 PC의 수율은 감소함을 보였는데, PC에 결합된 *n*-3 PUFA의 함량이 모든 residence time에서 가장 낮았던 0.07% (w/w)의 경우에 PC의 수율이 가장 높았다. 수분 2.0% 와 4.0% (w/w)의 경우 PC의 수율이 가장 낮았으며, 이 두 조건간의 차이는 미미했다. PC에 결합된 *n*-3 PUFA의 최대 함량을 보였던 수분함량 1.0% (w/w)에서의 PC 수율은 두 번째로 높은 PC에 결합된 *n*-3 PUFA의 함량을 보였던 수분 2.0% (w/w)와 비교하여 볼 때, 더 높음을 확인할 수 있었다. 특히 수분 2.0% (w/w)가 최고 PC에 결합된 *n*-3 PUFA의 함량을 보인 120분의 PC수율이 25.3% (mol/mol)임에 반해, PC에 결합된 *n*-3 PUFA의 함량이 이를 능가한 수분 1.0% (w/w)의 residence time 240분에서의 PC 수율은 33.2% (mol/mol)로 월등히 높게 나타났다.

LPC에 결합된 *n*-3 PUFA의 함량의 경우, 전반적으로 조사된 모든 수분함량에서 residence time이 증가할수록 그 함량이 증가하거나, 또는 증가하다가 평형을 이루는 양상을 보였다 (Figure 27). 수분함량이 0.07%에서 1.0% (w/w)로 증가함에 따라 LPC에 결합된 *n*-3 PUFA의 함량이 증가하는 경향을 보였다. 반면 수분함량이 1.0% (w/w)에서 더 증가하였을 때 수분 2.0% (w/w)의 residence time 360분을 제외한 나머지에서 LPC에 결합된 *n*-3 PUFA의 함량이 감소하는 추세를 보였고, 수분함량 4.0% (w/w)에서 가장 낮은 값을 보였다.

LPC의 수율의 경우, 수분함량에 따라 그 양상에 유의적인 차이를 보였다 (Figure 28). 수분함량이 0.07에서 1.0% (w/w)까지 증가함에 따라 LPC의 수율이 증가하였고, 각각의 양상 역시 꾸준히 증가함을 보였다. 반면 수분 함량 2.0% 와 4.0% (w/w)에서는 짧은 residence time에서 급격히 LPC의 수율이 증가한 후 residence time 30분에서 최대치를 나타낸 후 다시 급격히 감소하여 어느 지점에서 평형을 이루는 양상을 보였다. 이로부터 어느 정도의 수분은 PC를 가수분해시켜 LPC를 생성토록 하지만, 지나치게 과량의 수분은 이렇게 생성된 LPC가 다시 가수분해 되어 GPC로 전환 되는 반응을 촉진한다고 예측할 수 있었다.

전반적으로 어느 정도의 수분은 PC와 *n*-3 PUFA의 Acidolysis반응에 긍정적인 영향을 미쳐, PC에 결합된 *n*-3 PUFA의 함량을 증가시키지만 과량의 수분은 PC의 지나친 가수분해를 촉진시켜, PC수율에 바람직하지 않은 결과를 보여주었다. 따라서 본 연구에서는 수분함량 1.0% (w/w)를 최적 수분함량으로 설정하였다.

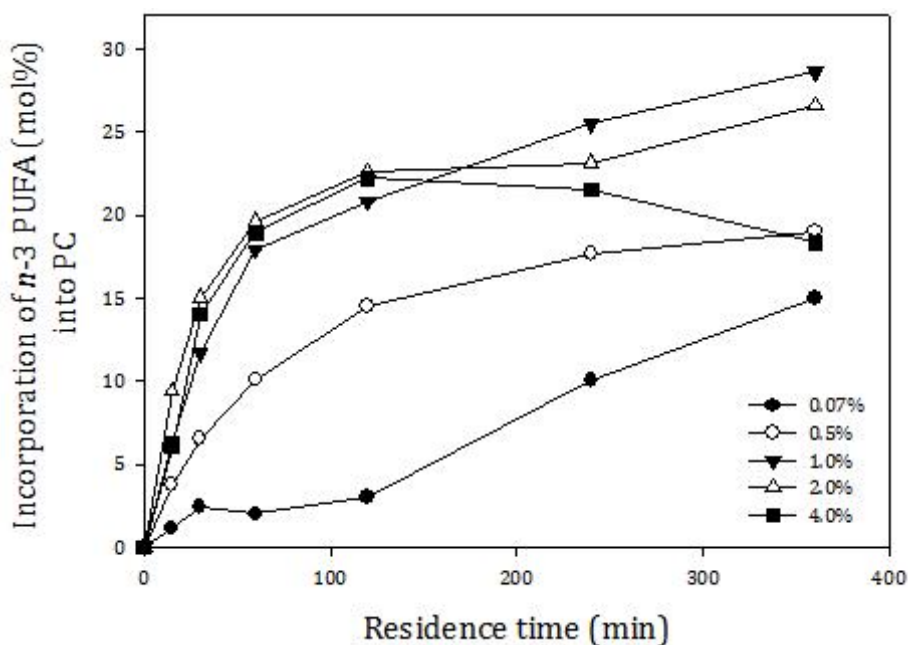


Figure 25. Effect of water content on incorporation of *n*-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) into phosphatidylcholine (PC) (mol%) as a function of residence time. This experiments were conducted at 55°C and the molar ratio of 1:8 (PC:fatty acid) using immobilized phospholipase A<sub>1</sub> under atmospheric pressure.

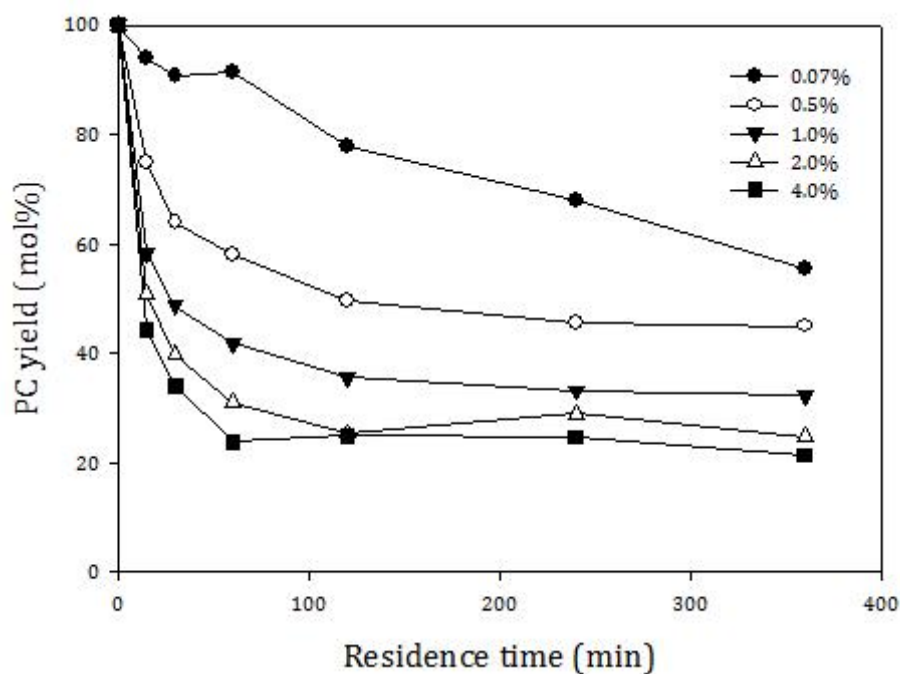


Figure 26. Effect of water content on yield of phosphatidylcholine (PC) (mol%) as a function of residence time. This experiments were conducted at 55°C and the molar ratio of 1:8 (PC:fatty acid) using immobilized phospholipase A<sub>1</sub> under atmospheric pressure.



Figure 27. Effect of water content on incorporation of *n*-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) into lysophosphatidylcholine (LPC) (mol%) as a function of residence time. This experiments were conducted at 55°C and the molar ratio of 1:8 (PC:fatty acid) using immobilized phospholipase A<sub>1</sub> under atmospheric pressure.

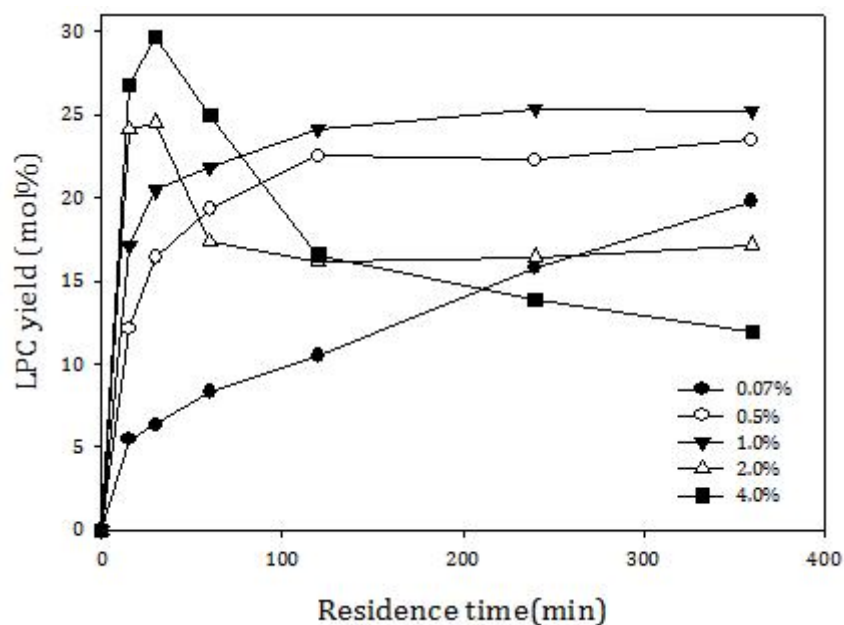


Figure 28. Effect of water content on yield of lysophosphatidylcholine (LPC) (mol%) as a function of residence time. This experiments were conducted at 55°C and the molar ratio of 1:8 (PC:fatty acid) using immobilized phospholipase A<sub>1</sub> under atmospheric pressure.



(나) 반응온도에 의한 영향

DHA를 결합시킨 PC를 합성하기 위한 최적 온도를 조사하기 위해 온도의 범위는 35-65°C로 설정되었다. 이 때 나머지 실험조건은 대기압에서 수분함량 1.0% 기질간의 몰비율 1:8 (PC:지방산), 고정되어 실험이 진행되었다. Residence time 별로 시료를 채취하여 PC와 LPC에 결합된 *n*-3 PUFA의 함량과 PC와 LPC의 수율을 측정하였다.

PC에 결합된 *n*-3 PUFA의 함량의 경우, 조사된 모든 온도 범위에서 residence time이 증가함에 따라 PC에 결합된 *n*-3 PUFA의 함량도 증가하는 양상을 보였다 (Figure 29). 반응 온도가 35°C에서 55°C로 증가하자 PC에 결합된 *n*-3 PUFA의 함량이 급격히 증가하였으나, 온도가 55°C에서 65°C로 증가하자 PC에 결합된 *n*-3 PUFA의 함량이 감소하는 경향을 나타냈다.

PC의 수율의 경우, 모든 온도 범위에서 residence time이 증가함에 따라 초기 반응에서는 PC의 수율이 급격히 감소하다가 일정 residence time 이후에서는 평형을 이루는 양상을 보였다 (Figure 30). PC에 결합된 *n*-3 PUFA의 함량과는 반대로, 온도가 증가함에 따라 PC의 수율은 감소하였는데, residence time 120분 이후에서는 45°C-65°C 사이에 유의적인 차이를 보이지 않았다.

LPC에 결합된 *n*-3 PUFA의 함량의 경우, 35°C와 45°C에서는 residence time이 증가할수록 LPC에 결합된 *n*-3 PUFA의 함량이 계속하여 증가하였으나, 55°C와 65°C의 경우 LPC에 결합된 *n*-3 PUFA의 함량이 증가하다가 일정 residence time 이후에는 감소하였다 (Figure 31). LPC에 결합된 *n*-3 PUFA의 함량이 증가하는 초기 속도는 35°C와 55°C로 온도가 증가함에 따라 빨라졌으나, 55°C와 65°C 사이에는 별 차이가 없었다. 최대 LPC에 결합된 *n*-3 PUFA의 함량은 45°C, residence time 360분에서 얻어졌다.

LPC의 수율의 경우, 조사된 모든 온도 범위에서 residence time이 증가함에 따라 LPC의 수율이 증가하다가 평형을 이루는 양상을 나타냈다 (Figure 32). 온도가 35°C에서 55°C로 증가함에 따라 LPC의 수율이 증가하는 속도도 빨라졌으나, residence time 360분에서 모든 온도에서의 LPC의 수율이 거의 같아짐을 확인할 수 있었다.

따라서, 온도의 증가는 PC와 *n*-3 PUFA의 acidolysis 반응을 용이하게 하지만, 너무 높은 온도에서는 오히려 바람직하지 않은 영향을 미친다는 것을 볼 수 있었다. 이는 본 연구에서의 acidolysis의 반응이 효소 반응인 점을 생각해 볼 때, 과도하게 높은 온도는 효소의 활성을 저해하기 때문에 얻어진 결과라고 추론된다. 따라서 PC에 결합된 *n*-3 PUFA와 PC의 수율을 함께 고려하여, 55°C를 최적 온도로 선정하였다.

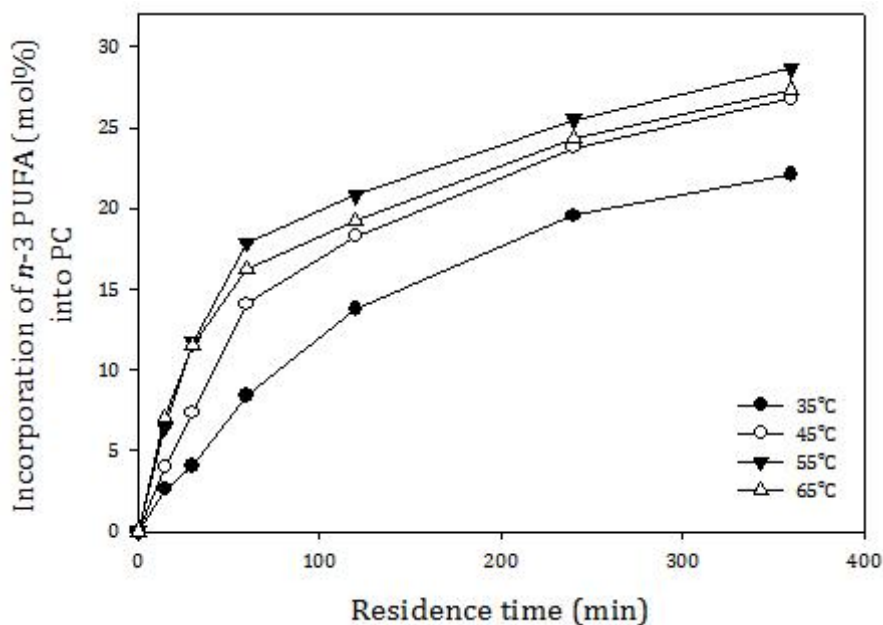


Figure 29. Effect of temperature on incorporation of *n*-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) into phosphatidylcholine PC (mol%) as a function of residence time. This experiments were conducted at 1.0% water content, and the molar ratio of 1:8 (PC:fatty acid) using immobilized phospholipase A<sub>1</sub> under atmospheric pressure.

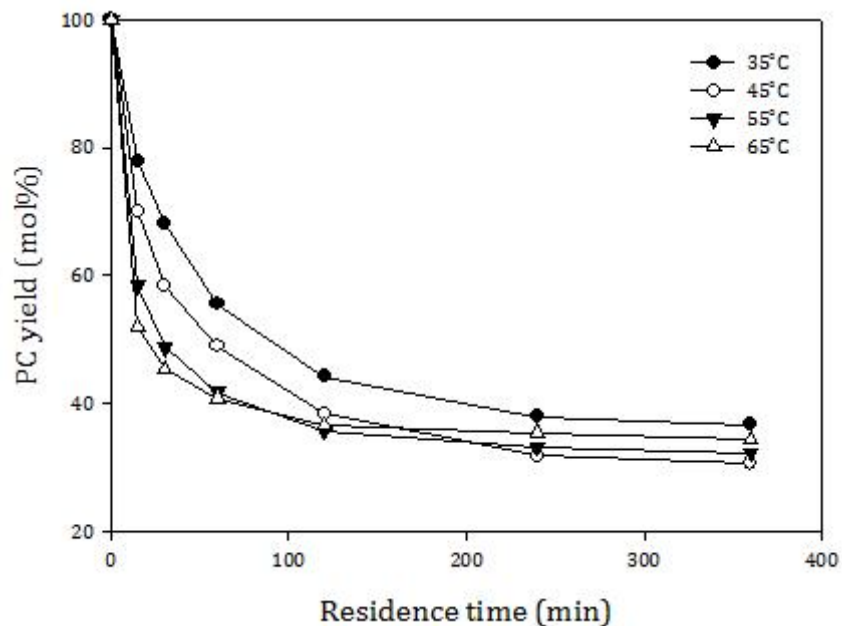


Figure 30. Effect of temperature on yield of phosphatidylcholine (PC) (mol%) as a function of residence time. This experiments were conducted at 1.0% water content, and the molar ratio of 1:8 (PC:fatty acid) using immobilized phospholipase A<sub>1</sub> under atmospheric pressure.

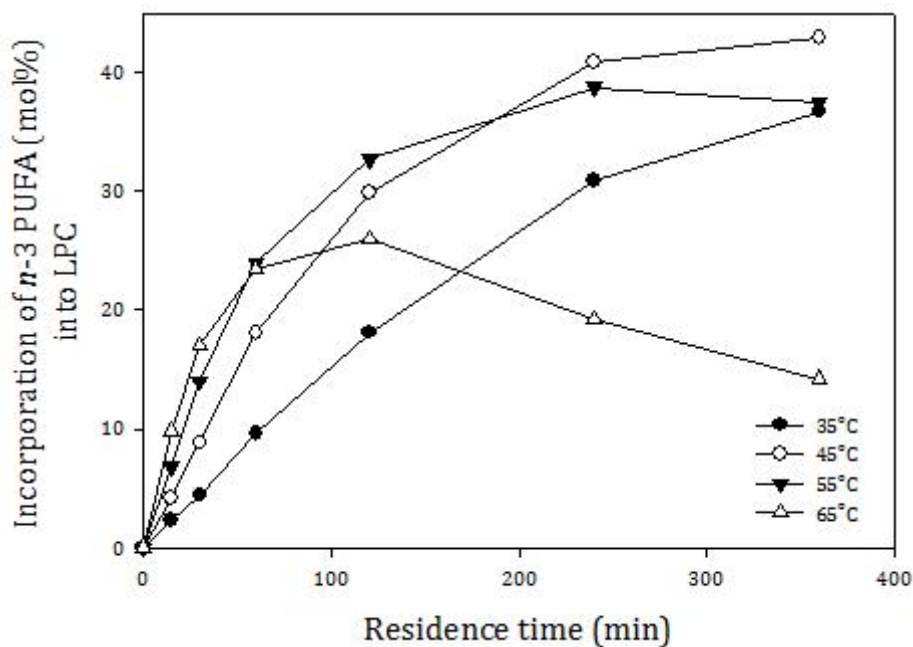


Figure 31. Effect of temperature on incorporation of *n*-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) into lysophosphatidylcholine LPC (mol%) as a function of residence time. This experiments were conducted at 1.0% water content, and the molar ratio of 1:8 (PC:fatty acid) using immobilized phospholipase A<sub>1</sub> under atmospheric pressure.

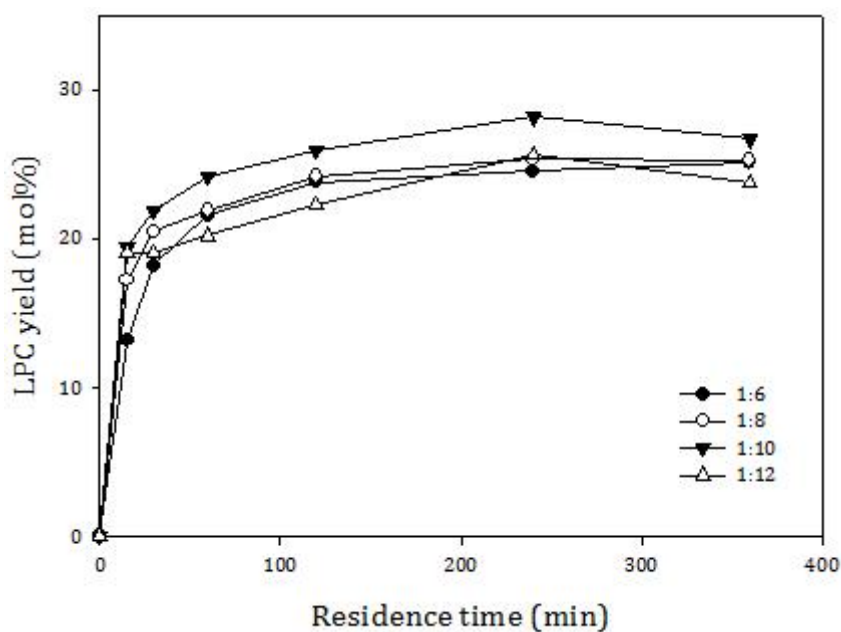


Figure 32. Effect of temperature on yield of lysophosphatidylcholine (LPC) (mol%) as a function of residence time. This experiments were conducted at 1.0% water content, and the molar ratio of 1:8 (PC:fatty acid) using immobilized phospholipase A<sub>1</sub> under atmospheric pressure.

(다) 기질간의 몰비율에 의한 영향

*n*-3 PUFA를 결합시킨 PC를 합성하기 위한 실험 중 최적 기질 몰비율 조사를 위해 1:6-1:8 (PC:지방산)의 범위에서 실험이 수행되었다. 이 때 나머지 실험조건은 대기압 상태에서 온도 55°C, 수분 1.0% (w/w)로 고정되어 실험이 진행되었다. Residence time 별로 시료를 채취하여 PC와 LPC에 결합된 *n*-3 PUFA의 함량과 PC와 LPC의 수율을 측정하였다.

PC에 결합된 *n*-3 PUFA의 함량의 경우, 조사된 모든 몰비율에서 residence time의 증가에 따라 PC에 결합된 *n*-3 PUFA의 함량도 증가하거나 증가하다가 평형을 이루는 양상을 나타내었다 (Figure 33). 몰비율이 증가함에 따라 PC에 결합된 *n*-3 PUFA의 함량이 증가하였다. 하지만 residence time 360분에서는 몰비율 1:6에서는 PC에 결합된 *n*-3 PUFA의 함량이 약 24.0% (mol/mol)였던 반면, 1:8과 1:10에서는 약 29.0% (mol/mol)로 둘 사이에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 몰비율 1:12의 경우 33.0% (mol/mol)로 가장 높은 값을 나타냈다.

PC의 수율의 경우 조사된 모든 몰비율에서 residence time이 증가함에 따라 수율이 초기에 급격히 감소한 이후 평형을 이뤘다 (Figure 34). 또한 몰비율이 증가함에 따라 PC의 수율은 감소하는 경향을 나타냈다.

LPC에 결합된 *n*-3 PUFA의 함량의 경우, 조사된 모든 몰비율에서 residence time이 증가함에 따라 LPC에 결합된 *n*-3 PUFA의 함량이 증가하다가 평형을 이루는 양상을 나타내었다 (Figure 35). 또한 몰비율의 증가에 따라 LPC에 결합된 *n*-3 PUFA의 함량이 증가하였다.

LPC의 수율의 경우, 1:10을 제외한 조사된 모든 몰비율에서 각각의 LPC 수율에 유의적인 차이를 보여주지 않았다 (Figure 36). 몰비율 1:10의 경우 다른 몰비율에서 보다 LPC의 수율이 전반적으로 약간 높았으나 역시 유의적인 차이는 나타내지 않았다.

전반적으로, PC와 지방산의 몰비율의 증가는 PC와 *n*-3 PUFA의 acidolysis 반응에 긍정적인 영향을 끼침을 알 수 있었다. 하지만, PC와 지방산의 acidolysis 반응에서 1몰의 PC에는 2몰의 지방산이 결합되므로, 이론적으로 모든 기질이 반응하여 생성물을 만든다고 가정할 때, PC와 지방산의 acidolysis 반응은 1:2의 몰비율에서 가장 경제적이다. 따라서 PC:지방산의 몰비율을 증가시킬수록 과량의 지방산이 남게 되어 비경제적일 뿐 아니라 반응 후 생성물에서 기능성 PC의 분리하는 과정에도 좋지 않다. 본 연구에서 몰비율의 최적 조건을 선정할 때에도 PC에 결합된 *n*-3 PUFA 함량과 PC의 수율 뿐만 아니라, 경제성 및 반응 후 PC의 분리 공정의 용이성도 고려하였다. 따라서 몰비율 1:8 (PC:지방산)의 경우, residence time 360분에서 PC에 결합된 *n*-3 PUFA의 함량도 높았고, PC의 수율 역시 좋았으므로, 1:8 (PC:지방산)을 최적 몰비율로 선정하였다.

최적조건에서 Acidolysis 반응 생성물의 PC, LPC, 지방산 내의 지방산 조성을 Table 2.에 제시하였다. 이 acidolysis 반응 생성물의 PC, LPC, 지방산 사이의 조성은 PC의 경우 9.5% (w/w), LPC의 경우 5.3% (w/w), 지방산의 경우 69% (w/w) 였다.

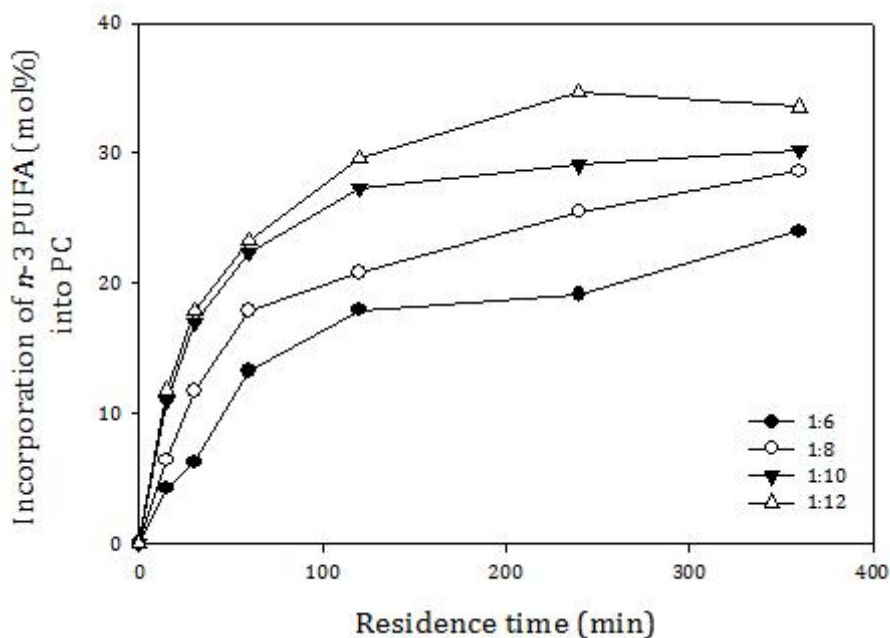


Figure 33. Effect of molar ratio of PC to fatty acid on incorporation of *n*-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) into phosphatidylcholine (PC) (mol%) as a function of residence time. This experiments were conducted at 55°C and 1.0% water content using immobilized phospholipse A<sub>1</sub> under atmospheric pressure.

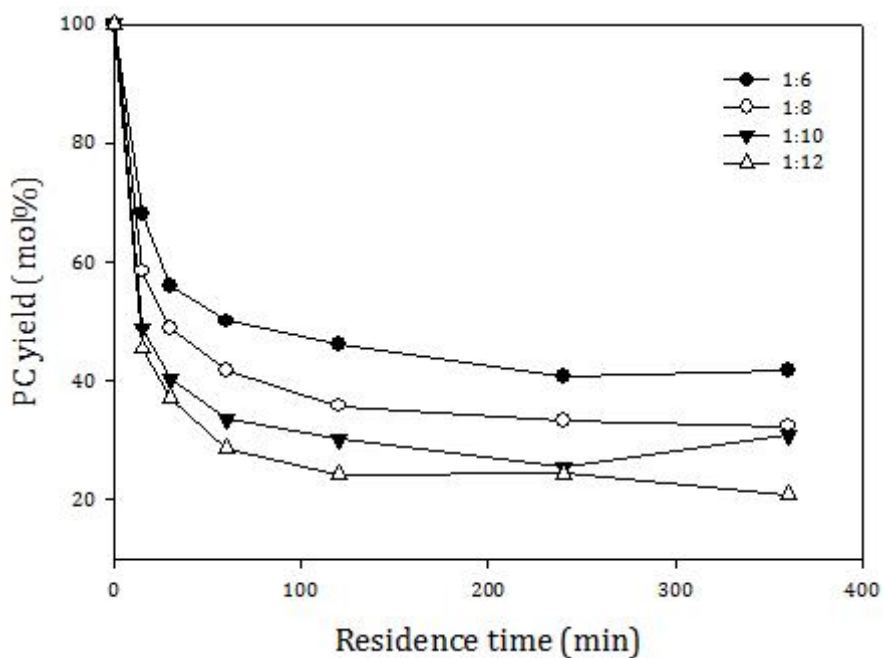


Figure 34. Effect of molar ratio of PC to fatty acid on yield of phosphatidylcholine (PC) (mol%) as a function of residence time. This experiments were conducted at 55°C and 1.0% water content using immobilized phospholipse A<sub>1</sub> under atmospheric pressure.

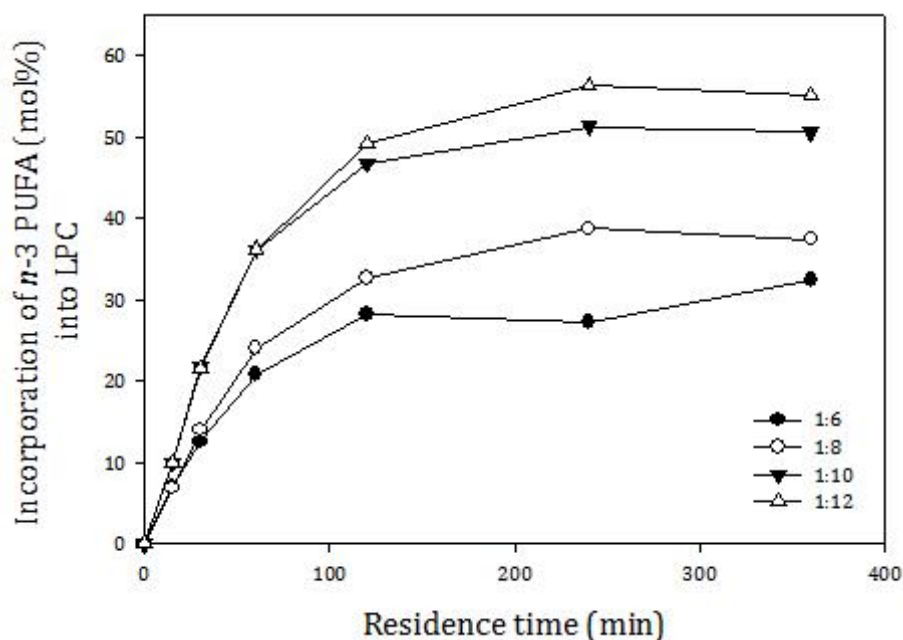


Figure 35. Effect of molar ratio of PC to fatty acid on incorporation of *n*-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) into lysophosphatidylcholine (LPC) (mol%) as a function of residence time. This experiments were conducted at 55°C and 1.0% water content using immobilized phospholipse A<sub>1</sub> under atmospheric pressure.

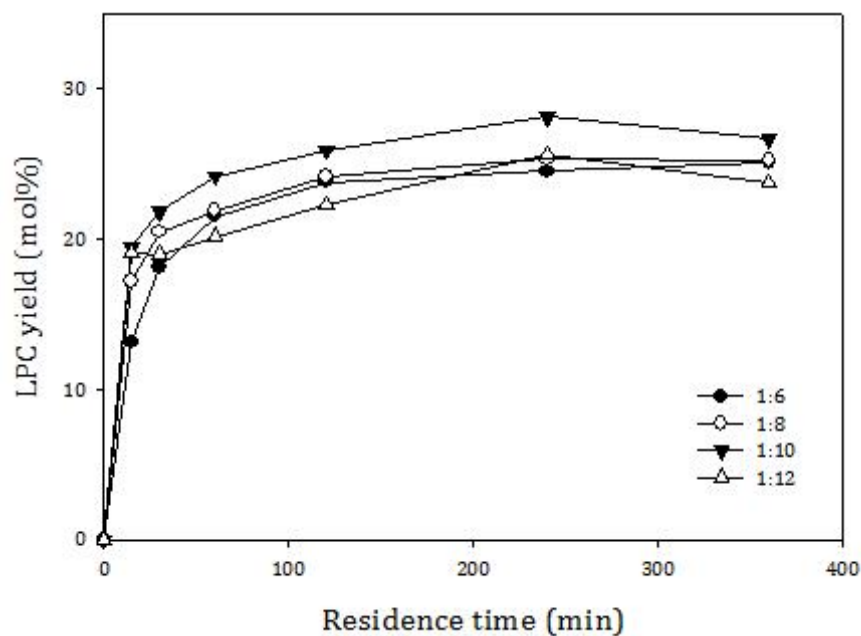


Figure 36. Effect of molar ratio of PC to fatty acid on yield of lysophosphatidylcholine (LPC) (mol%) as a function of residence time. This experiments were conducted at 55°C and 1.0% water content using immobilized phospholipse A<sub>1</sub> under atmospheric pressure.

Table 2. Fatty acid composition (mol%) of phosphatidylcholine (PC) and Lysophosphatidylcholine (LPC) after acidolysis of PC and fatty acid at residence time of 360 min, water content of 1.0% (w/w), 55°C, and molar ratio of 1:8 (PC:fatty acid).

	PC	LPC
C16:0	4.6	5.1
C16:1n-7	0.0	0.4
C18:0	1.5	1.9
C18:1n-9	9.3	8.3
C18:1n-7	1.0	1.2
C18:2n-6	47.7	36.7
C18:3n-3	4.3	3.3
C20:0	0.6	0.9
C20:1n-9	1.0	1.5
C20:2	0.0	0.4
C20:3n-6	0.7	1.1
C20:4n-6	0.0	0.5
C20:5(EPA)	7.1	10.3
C22:1	0.8	1.3
C22:5(DPA)	6.4	2.4
C22:6(DHA)	15.1	24.8

(2) Acidolysis 반응 생성물로부터 기능성 PC의 분리 및 농축

최적조건 (수분함량1.0% (w/w), 온도 55°C, 몰비율 1:8 (PC:지방산))에서 행해진 acidolysis 반응 생성물에서 기능성 PC의 분리 및 농축이 두 단계로 시도되었다. 기능성 PC의 농축 방법으로 초임계 이산화탄소 추출법을 이용한 지방산 제거와 Liquid-liquid fractionation을 이용한 지방산 및 LPC의 제거가 수행되었다.

(가) 초임계 이산화탄소 추출법을 이용한 지방산 제거

초임계 이산화탄소를 이용하여 acidolysis 반응 생성물로부터 지방산을 추출하여 제거하기 위한 최적 조건 선정을 위하여 추출 압력과 온도의 영향이 조사되었다. 조사된 압력은 2000,

4000, 6000 psi 였고, 각각의 압력에서 조사된 온도는 35, 45, 55°C였다. 각각의 압력과 온도에서 초임계 이산화탄소 추출 시 사용된 시료는 10g이었고, 총 추출에 사용하는 이산화탄소 양을 450L로 고정하였는데, 이 때 걸린 시간은 6시간이었다. 추출이 끝난 후, 추출되어 나온 시료의 양과, 추출기에 남은 시료의 조성이 분석되었다. 그 결과, 지방산은 초임계 이산화탄소로 추출되어 나왔고, 추출기에 남은 시료에 기능성 PC가 농축되는 것이 확인되었다.

#### ① 추출 압력에 의한 영향

초임계 이산화탄소 추출법을 통한 지방산 제거에 대한 추출 압력의 영향을 알아보기 위하여 2000, 4000, 6000psi에서 추출이 끝나고 추출기에 남은 시료의 조성을 분석하여 Figure 37-39.에 제시하였다. 조사된 모든 온도에서 압력이 2000psi에서 6000psi로 증가함에 따라 추출기에 남은 시료의 조성 중 PC의 함량이 증가하였다. 조사된 모든 추출 온도 범위에서 2000psi의 경우 추출 후 추출기에 남은 시료 중 PC의 함량이 약 14.5-16.9% (w/w) 였던 반면, 6000psi에서 추출한 경우 추출기에 남은 시료 중 PC의 함량이 약 35.1-38.6% (w/w)으로 월등히 높았다. 추출 후 추출기에 남은 시료의 조성 중 LPC의 함량 역시 PC의 함량과 마찬가지로 조사된 모든 온도 범위에서 압력의 증가에 따라 그 함량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 2000psi의 경우 추출 후 추출기에 남은 시료 중 LPC의 함량이 약 8.1-9.6% (w/w) 이었으나, 6000psi에서 추출한 경우 추출기에 남은 시료 중 LPC의 함량이 약 18.8-21.2% (w/w) 였다. 추출 후 추출기에 남은 시료의 조성 중 지방산의 함량은 압력이 증가함에 따라 감소하였는데, 2000psi의 경우 추출 후 추출기에 남은 시료 중 지방산의 함량이 약 73.4-77.6% (w/w) 이었으나, 6000psi에서 추출한 경우 추출기에 남은 시료 중 지방산의 함량이 약 40.2-46.2% (w/w)로 줄어드는 것이 확인되었다.

각 조건에서 시료 (10g)의 추출이 끝나고 추출되어 남은 시료의 양 (g)을 Table 3.에 나타내었다. 조사된 모든 온도 범위에서 압력이 증가함에 따라 추출되어 나온 시료의 양이 증가함을 알 수 있었다. 2000psi의 경우 총 시료 무게 10g 중 추출되어 나온 시료의 양이 약 0.9-2.3g에 불과하였으나, 6000psi의 경우 총 시료 무게 10g 중 추출되어 나온 시료의 양이 약 6.4-6.6% (w/w)로 증가하였다.

전반적으로 조사된 모든 온도 범위에서 추출 압력이 증가함에 따라 추출되어 나온 시료의 양이 증가하였고, 추출 후 추출기에 남은 시료의 조성 중 PC와 LPC의 함량이 증가하였다. 반면 추출기에 남은 시료의 조성 중 지방산의 함량은 압력이 증가함에 따라 감소하였다. 이는 일정 온도에서 압력이 증가함에 따라 초임계 유체의 밀도가 증가하면서 초임계 유체의 지방산에 대한 용해도가 증가하였음을 의미한다. 따라서 추출 후 추출기에 남은 시료 중 PC가 가장 많이 농축된 6000psi를 최적 압력으로 선정하였다.



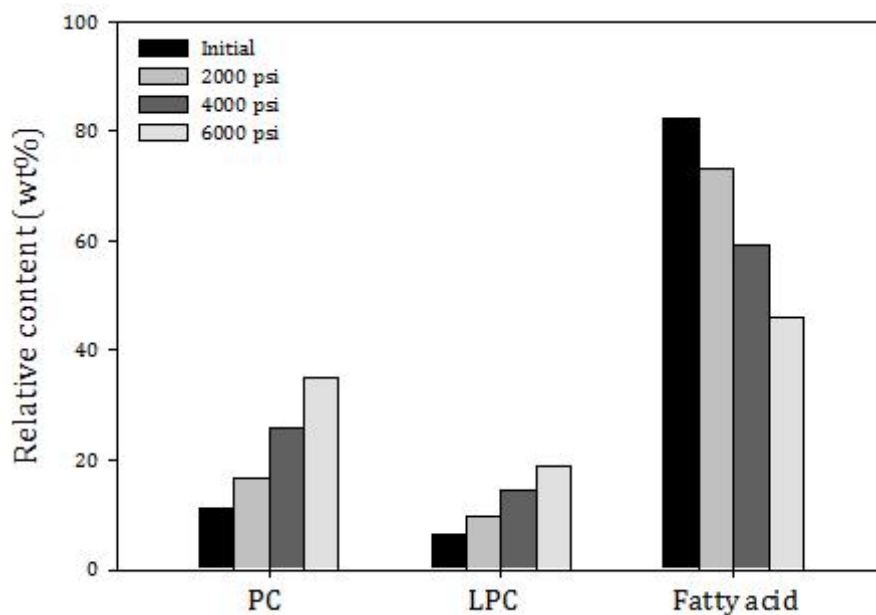


Figure 37. Effect of pressure on the relative content (wt%) of phosphatidylcholine (PC), lysophosphatidylcholine (LPC), fatty acid in the residue after 6 h of supercritical carbon dioxide extraction at 35°C.

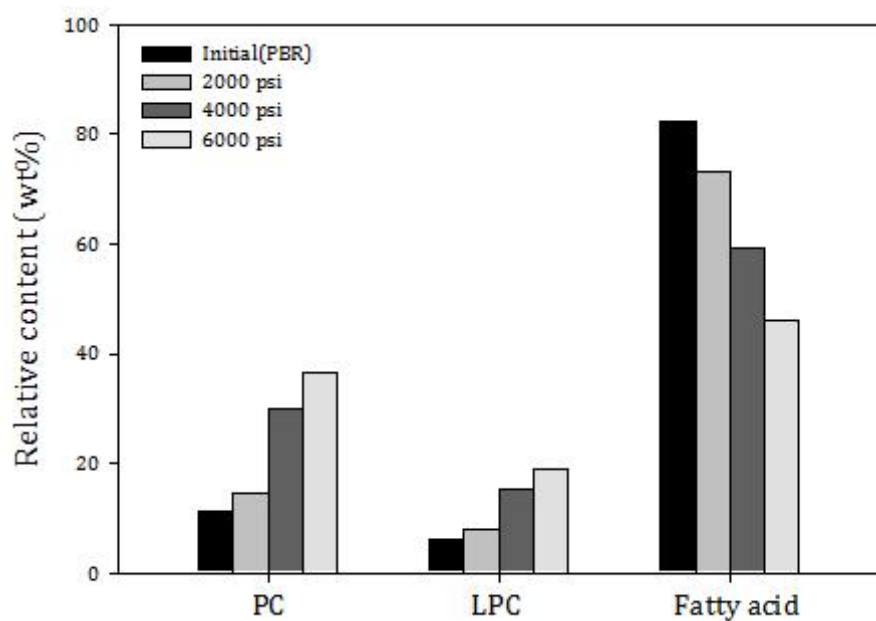


Figure 38. Effect of pressure on the relative content (wt%) of phosphatidylcholine (PC), lysophosphatidylcholine (LPC), fatty acid in the residue after 6 h of supercritical carbon dioxide extraction at 45°C.

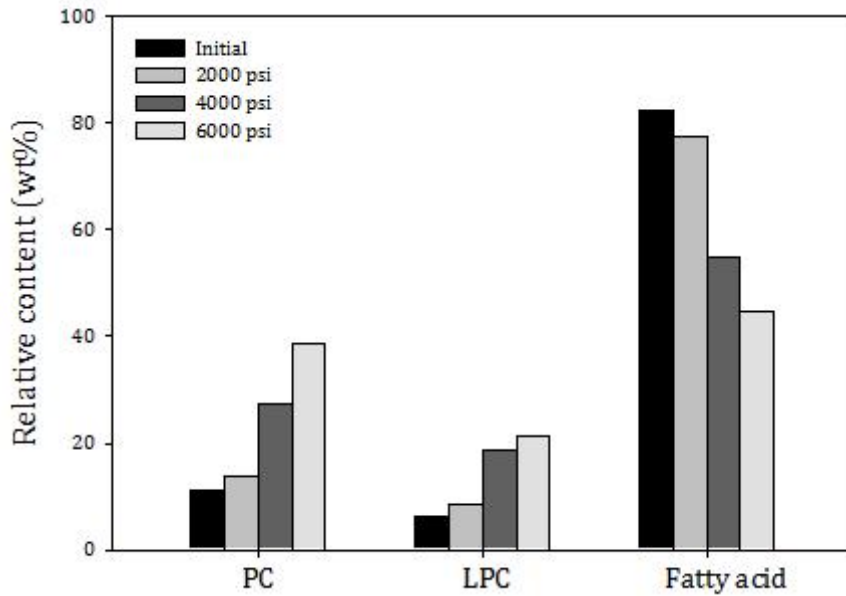


Figure 39. Effect of pressure on the relative content (wt%) of phosphatidylcholine (PC), lysophosphatidylcholine (LPC), fatty acid in the residue after 6 h of supercritical carbon dioxide extraction at 55°C.

Table 3. The amount of sample (g) extracted after 6 h of supercritical carbon dioxide extraction from 10g of acidolysis reaction product.

	2000psi	4000psi	6000psi
35°C	2.3	6.3	6.6
45°C	1.8	5.9	6.5
55°C	0.9	5.5	6.4

### ② 추출 온도에 의한 영향

초임계 이산화탄소 추출법을 통한 지방산 제거에 대한 추출 압력의 영향을 알아보기 위하여 2000, 4000, 6000psi에서 추출이 끝나고 추출기에 남은 시료의 조성을 분석하여 Table 4.에 제시하였다. 일정 압력에서, 온도가 증가함에 따라 추출기에 남은 시료의 조성 중 PC의 양은 압력에 따라 그 양상에 차이를 보였다. 2000psi의 경우 온도가 증가할수록 추출기에 남은 시료 중 PC의 함량이 감소하는 것이 확인되었으나, 6000psi의 경우 이와 반대로 온도가 증가함에 따라 PC의 함량이 증가하였다. 반면 4000psi의 경우 온도가 45°C일 때 추출기에 남은 시료 중 PC의 함량이 가장 높았다. LPC의 경우 2000psi에서는 35°C에서 45°C로 온도가 증가하자 그 함량이 감소하였으나, 45°C와 55°C 사이에는 차이를 나타내지 않았다. 4000psi에서는 35°C에서 가장 낮은 함량을 나타내고 온도가 증가함에 따라 그 함량도 순차적으로 증가하였고, 6000psi

에서는 35°C와 45°C 사이에 유의적인 차이를 보이지 않았으나 온도가 45°C에서 55°C로 증가하자 그 함량이 증가하는 것이 확인되었다. 지방산의 경우, 2000psi에서는 온도가 증가함에 따라 그 함량 역시 증가하였으나, 4000psi와 6000psi에서는 온도의 증가에 따라 그 함량이 감소하였다. 앞에서 선정된 최적 압력 6000psi에서 온도가 55°C일 때 PC의 함량이 가장 높았지만 LPC의 함량은 45°C일 때 55°C보다 월등히 낮았다. 따라서 다음 단계에서 LPC의 제거가 지방산의 제거보다 더 어려울 것으로 사료되었기 때문에, PC의 함량도 높고 LPC의 함량은 낮았던 45°C를 최적 온도로 선정하였다. 따라서 이 최적조건에서 추출한 결과, 추출되어 나온 시료의 양은 총 10g중 6.5g이었고, 이 때 추출기에 남은 시료에서 PC의 함량은 처음 11.3% (w/w)에서 36.4% (w/w)로 약 3배 이상 증가하였다. LPC의 조성은 처음 6.3% (w/w)에서 추출 후 남은 시료에 18.9% (w/w)로 증가하였으나, 지방산의 경우는 처음 82.4% (w/w)에서 추출 후 남은 시료에 44.7% (w/w)로 감소하여 처음에 비해 약 절반정도 잔류하는 것을 확인 할 수 있었다.

Table 4. Relative content (wt%) of phosphatidylcholine (PC), lysophosphatidylcholine (LPC) and fatty acid in the reaction product after acidolysis and in the residue after 6 h of supercritical carbon dioxide extraction.

	initial	35°C			45°C			55°C		
		2000psi	4000psi	6000psi	2000psi	4000psi	6000psi	2000psi	4000psi	6000psi
PC	11.3	16.9	26.0	35.1	14.5	29.9	36.4	13.8	27.5	38.6
LPC	6.3	9.6	14.6	18.8	8.1	15.1	18.9	8.5	18.9	21.2
FA	82.4	73.4	59.4	46.2	77.4	54.9	44.7	77.6	53.6	40.2
total	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

### (3). Liquid-liquid fractionation을 이용한 지방산 및 LPC의 제거

Acidolysis 반응 생성물에서 초임계 이산화탄소 추출을 통해 지방산이 제거된 시료에서 liquid-liquid fractionation을 통해 다시 한번 잔류하고 있는 지방산과 LPC가 제거하였다. 초임계 추출이 끝난 시료의 조성은 PC, 36.4% (w/w), LPC, 18.9% (w/w), 지방산, 44.7% (w/w)였다. 이 시료를 NaOH와 반응시켜 그 안에 잔류하는 지방산을 부분적으로 비누화 시킨 후, 여기에 비극성 용매와 증류수를 넣어, 이 둘의 극성도 차이에 의해 시료 안에 있는 지방산과 LPC는 증류수층으로, 극성도가 상대적으로 낮은 PC는 비극성 용매층으로 분리하는 원리를 통해 PC를 다시 한번 농축하였다. Liquid-liquid fractionation의 최적 조건을 찾아가 위하여 이에 사용되는 비극성 용매로써 적합한 용매가 선정되었다. 또한, 선정된 용매와 증류수로 fractionation하는 데에 적합한 용매에 대한 증류수의 양도 조사되었다.

#### (가) 용매의 선정

Liquid-liquid fractionation에서 두 용매의 극성도 차이에 의해 물질을 분리하는 방법이기 때문에 어떤 용매를 사용하는가에 따라 그 결과가 매우 상이할 수 있다. 본 연구에서 초임계 추

출이 끝난 시료에는 PC, LPC, 지방산, 소량의 GPC가 존재하는데, 이 중 PC와 비슷한 극성도를 갖는 지방산을 먼저 NaOH와 반응시켜 부분적으로 비누화 시켰다. 지방산의 비누화는 산가 측정 방법과 동일한 방법으로 AOCS Cd 3a-63에 따라 행해졌다. 원래 AOCS 법에 따르면, 용매로 디에틸에테르와 에탄올이 사용되는데, 이 때 디에틸에테르의 역할은 비누화 반응에는 참여하지 않고, 지용성물질을 녹이는 용매로써의 작용만 한다. 에탄올의 경우, NaOH와 지방산을 반응시킬 때, 수용액 상태인 NaOH와 디에틸에테르에 녹아있는 지방산이 반응 할 수 있도록, 물과 에테르를 섞어 하나의 phase로 만들어주는 역할을 한다. 이 때 사용하는 NaOH 역시 같은 이유로, 단순한 수용액 상태가 아닌, 70% 에탄올과 30% 증류수를 섞은 용매에 0.1N의 농도로 맞춘 용액을 사용한다. 그런데 본 연구에서는 차후에 증류수와 함께 넣고 fractionation 하는 데에 가장 적합한 조건을 찾기 위하여, 비누화에 사용되는 디에틸에테르를 대체할 수 있는 여러 가지 비극성 용매를 사용하여 그 효과를 비교해 보았다. 이에 조사된 용매로, 헥산, 클로로포름, 디에틸에테르, 디클로로메탄이 사용되었다. 용매 이외에 나머지 조건은 처음 비누화에 사용하는 비극성용매와 에탄올의 양은 이 둘은 2:1로 섞은 용액을 10mL를 사용하였고, 비누화할 때 사용하는 NaOH는 0.1N NaOH in 70% ethanol/distilled water (v/v)를 고정하여 사용하였다. 부분적 비누화가 끝난 후 시료를 fractionation 할 때, 10mL의 동일한 비극성 용매와 25mL의 고정된 양의 증류수를 넣고 fractionation 시켰다.

Table 5.는 사용한 비극성 용매에 따른 liquid-liquid fractionation 후 시료의 PC, LPC, 지방산 조성 및 PC의 수율을 나타낸 것이다. PC 함량의 경우, 디클로로메탄을 사용한 경우 72.7% (w/w)로 가장 높았으며, 그 다음으로 디에틸에테르, 클로로포름, 헥산 순이었다. LPC의 경우, 디에틸에테르를 사용한 경우 5.4% (w/w)로 가장 낮았으나, 디클로로메탄을 사용한 경우도 5.7% (w/w)로 디에틸에테르와 큰차이를 보이지 않았다. 헥산의 경우 7.2% (w/w)로 가장 높은 LPC 함량을 나타냈다. 유리지방산 함량의 경우, 디클로로메탄을 사용한 경우에 21.7% (w/w)로 가장 낮았고, 그 다음 디에틸에테르, 클로로포름, 헥산 순으로 증가하였다. 대체적으로 조성에 있어서는 디클로로메탄과 디에틸에테르가 비슷한 경향을 보였는데, 이는 이 둘이 유사한 극성도를 갖기 때문일 것으로 추정된다.

PC의 수율의 경우 디클로로메탄을 사용한 경우에 21.5% (w/w)로 가장 높게 나타났고 그 뒤를 이어 클로로포름을 사용하였을 때 16.8% (w/w), 디에틸에테르를 사용할 때 13.4% (w/w)였다. 전반적으로 비극성 용매로 디클로로메탄을 사용한 경우 PC의 함량 뿐 아니라, PC의 수율 역시 가장 높았으므로, 디클로로메탄을 최적 용매로 선정하였다.

Table 5. Relative composition (wt%) of phosphatidylcholine (PC), lysophosphatidylcholine (LPC) and FA in the PC enrichment and yield of PC (wt%) after supercritical carbon dioxide extraction and liquid-liquid fractionation with various solvent and distilled water.

	After	After liquid-liquid fractionation			
	SC-CO <sub>2</sub>	<i>n</i> -Hexane	Chloroform	Diethyl ether	Dichloromethane
PC	36.4	53.1	64.4	67.2	72.7
LPC	18.9	7.2	6.6	5.4	5.7
FA	44.7	39.6	29.9	24.0	21.7
Yield of PC	100.0	0.2	16.8	13.4	21.5

(나) Fractionation에서 사용하는 증류수의 양의 영향

초임계 추출이 끝난 시료에서 지방산의 부분적 비누화를 시킨 후 디클로로메탄과 증류수를 이용하여 fractionation을 하는 과정에서 첨가하는 두 용매의 양은 에멀전 형성에 큰 영향을 주어 PC의 수율 및 함량에 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다. 또한 앞에서 행한 부분적 비누화 과정에서 첨가하였던 에탄올과 시료 내의 인지질들이 모두 유화력을 갖기 때문에 fractionation에서 각 용매의 양은 결과에 영향을 미친다. 따라서 이에 사용하는 가장 적합한 두 용매의 비율을 알아보기 위하여, 일정량의 디클로로메탄에 대하여 증류수의 양을 변화시켜 보았다. 이 때 조사된 증류수의 양의 범위는 5-35mL였다.

Fractionation에 사용된 증류수가 5mL에서 25mL로 증가함에 따라 PC의 함량이 52.9% (w/w)에서 72.7%(w/w)까지 증가하였다. 반면 증류수의 양을 25mL에서 35mL로 증가하자 PC의 함량이 다시 감소하는 것으로 나타났다 (Table 6). LPC의 함량의 경우 증류수의 양을 5mL에서 25mL로 증가시키기에 따라 그 함량이 14.65% (w/w)에서 5.7% (w/w)로 감소하였다. 하지만 증류수 양을 25mL에서 35mL로 증가시키자 다시 그 함량이 증가하였다. 유리지방산의 경우에도 LPC 함량과 동일한 양상을 보였는데, 증류수를 25mL 사용하였을 때 가장 적은 함량을 보였다.

PC의 수율의 경우 증류수를 15mL 사용하였을 때 22.8% (w/w)로 가장 높은 결과를 냈지만, 증류수를 25mL 사용하였을 때에도 21.5% (w/w)로 유의적인 차이를 보이지 않았다. 증류수를 5mL 사용하였을 때와 35mL 사용하였을 때에는 PC의 수율이 약간 더 감소하였으나 그 값이 약 19.4-19.5% (w/w)로 15mL나 25mL의 증류수를 사용하였을 때와 유의적인 차이는 보이지 않았다. 과량의 증류수를 사용하였을 경우 fractionation 시 에멀전이 잘 형성되는 단점이 있었지만, 증가된 증류수는 앞서 행한 부분적 비누화 과정에서 첨가된 에탄올을 증류수 층으로 더 많이 섞이게 하기 때문에, 시료 내의 LPC를 증류수층에 더 많이 포집시켜 디클로로메탄층 내 PC의 함량을 증가시키는 역할을 한다고 추론된다.

전반적으로 증류수를 25mL 사용하였을 때 마지막 농축물 내 PC의 함량과 수율이 모두 높았으므로, fractionation에 적합한 증류수의 양을 25mL로 선정하였다. 이 때 fractionation이 끝난 후 얻어진 농축물에서 PC의 함량은 초임계 추출이 끝났을 때의 함량 36.4% (w/w)에서 72.7% (w/w)로 약 2배 가량 증가하였으며, acidolysis 반응 생성물과 비교하였을 때는 11.3% (w/w)에서 72.7% (w/w)로 약 6-7배 가량 증가하였다. 유리지방산 함량의 경우, 초임계 추출이 끝났

을 때의 함량 44.7% (w/w)에서 21.7% (w/w)로 절반으로 감소하였으며, acidolysis 반응 생성물과 비교하였을 때는 82.4% (w/w)에서 21.7% (w/w)로 1/4 정도로 감소하였다. LPC 함량의 경우 초임계 추출이 끝났을 때의 함량 18.9% (w/w)과 비교하여 5.7% (w/w)로 감소하였으며, acidolysis 반응 생성물과 비교하였을 때는 6.3% (w/w)에서 5.7% (w/w)로 감소하였다.

Table 6. Relative composition (wt%) of phosphatidylcholine (PC), lysophosphatidylcholine (LPC) and FA in the PC enrichment and yield of PC (wt%) after supercritical carbondioxide extration and liquid-liquid fractionation with dichloromethane and various amount of distilled water.

	After	After liquid-liquid fractionation			
	SC-CO <sub>2</sub>	D.W. 5mL	D.W. 15mL	D.W. 25mL	D.W. 35mL
PC	36.4	52.9	55.0	72.7	60.5
LPC	18.9	14.6	13.9	5.7	13.8
FA	44.7	32.5	31.1	21.7	25.7
Yield of PC	100.0	19.5	22.8	21.5	19.4

#### 다. 요약

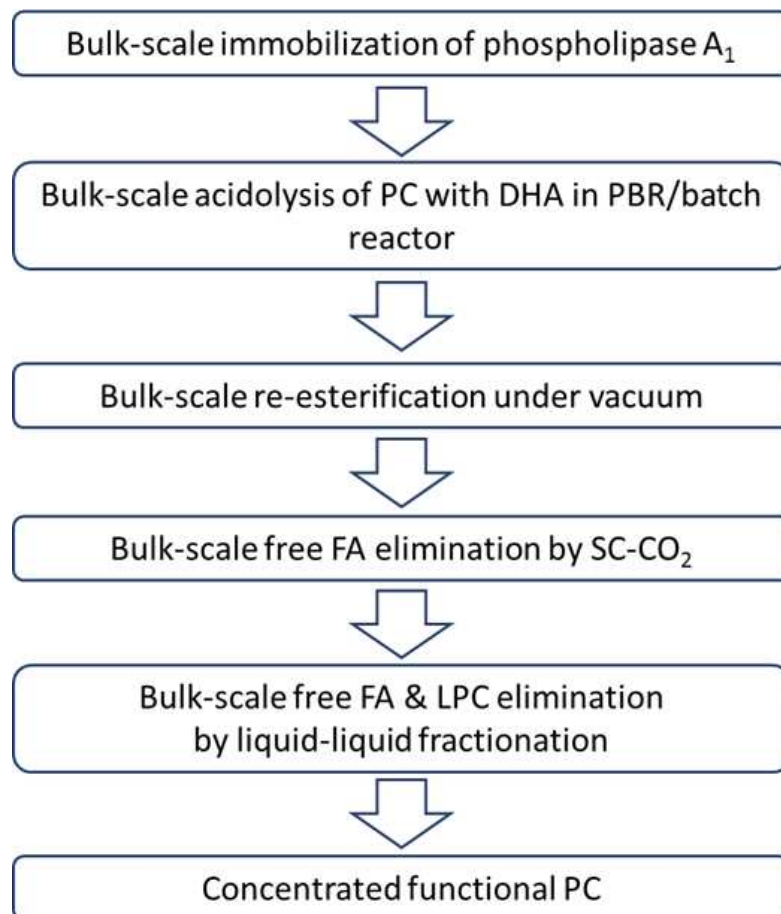
본 연구에서는 연속식 효소반응 시스템을 이용하여 acidolysis를 통하여 원료 PC로부터 *n*-3 PUFA가 결합된 PC를 생산하고, 반응 생성물로부터 잔류 LPC와 유리지방산을 제거함으로써 생성물 내 PC를 농축시켜 그 함량을 높이는 방법을 모색하고자 하였다. 이를 위해 먼저 phospholipase A<sub>1</sub>을 1차년도에 선정된 최적 방법으로 고정화하고, 이 효소를 이용하여 연속식 반응기에서 acidolysis 반응을 수행하였다. 그 결과 최적 수분함량은 1.0% (w/w), 최적 반응 온도는 55°C, 최적 몰비율은 1:8 (PC:지방산)로 선정되었다. 최적조건에서 residence time 360분에 생산된 반응산물의 *n*-3 PUFA가 결합된 PC의 함량은 28.6% (mol/mol), 이 때 PC의 수율은 32.2% (mol/mol)였다. 이 반응산물 내의 PC의 함량은 9.5% (w/w)였다. 이 반응산물에서 PC의 함량을 높이기 위해, 초임계 이산화탄소를 이용하여 지방산을 제거하였다. 이를 위한 최적 조건으로 추출 압력 6000psi, 온도 45°C가 선정되었다. 초임계 추출이 끝난 후 추출되지 않고 남은 시료에서 PC의 함량은 acidolysis 반응 후 함량 11.3% (w/w)에서 36.4% (w/w)로 증가한 것이 확인되었다. 초임계 추출이 끝난 시료에서 잔류 지방산 및 LPC를 제거하기 위하여 liquid-liquid fractionation을 실시한 결과, 디클로로메탄이 최적 용매로 선정되었고, 10mL 디클로로메탄에 대하여 25mL 증류수를 사용하는 것이 적합하다는 것이 확인되었다. 최종적으로 얻어진 PC 농축물에서 PC의 함량은 72.6% (w/w)였고, 이는 초임계 추출 후 36.5% (w/w)와 비교하여 약 2배, acidolysis 반응 후 11.3% (w/w)과 비교하여 약 7배가량 농축된 값이었다.

### 3. Bulk-scale에서 기능성 PC의 합성 및 정제 방법 확립

#### 가. 재료 및 방법

##### (1) 실험의 구도

본 연구에서는 본 연구에서 고정화한 phospholipase A<sub>1</sub> (from *Thermomyces lanuginosus*/*Fusarium oxysporum*) 고정화 효소를 이용하여 PC와 *n*-3 PUFA의 acidolysis 반응을 수행하고 이를 통해 기능성 PC를 합성하였다. 1, 2차년도에 수행하였던 최적 효소 반응을 bulk-scale 반응에 적용하여 기능성 PC의 대량 생산 가능성을 모색하였다. 또한 반응 생성물에서 잔류 지방산 및 LPC를 제거하여 기능성 PC를 분리 농축하였다. 전체 공정은 총 네 단계로 나뉜다. 첫 번째는 acidolysis 반응을 통하여 연속식 반응기인 PBR system 및 회분식 반응기에서 기능성 PC를 합성하고, 두 번째로 2차 진공 반응을 통하여 PC의 수율을 높인 후 세 번째로 초임계 이산화탄소 추출법을 이용한 반응 생성물에서 잔류 유리지방산을 1차 제거한 후, 네 번째로 liquid-liquid fractionation 법을 이용한 잔류 유리지방산 및 LPC를 분리하여 기능성 PC를 농축하였다 (Figure 40). 본 연구에서 지칭하는 *n*-3 PUFA란 DHA (22:6), EPA (20:5), DPA (22:5)의 총 합량을 의미한다.



FA: fatty acid; LPC: lysophosphatidylcholine; PC: phosphatidylcholine; SC-CO<sub>2</sub>: supercritical

carbon dioxide

Figure 40. Bulk-scale production and concentration of functional PC

(2) 재료

(가) 기질

- ① PC (granulated phosphatidylcholine, 순도 95% 이상, from soybean)는 Avanti Polar-Lipids, Inc. (Alabaster, Al, USA)에서 구입하였다.
- ② 지방산 에틸 에스터는 (주) 일신웰스에서 제공하였다. 지방산 에틸 에스터의 지방산 조성은 Table 7에 나타내었다. 이 지방산 에틸 에스터는 (주) 일신웰스에서 국내산 참치유로부터 박막증류를 통해 오메가 3 지방산을 농축시켜 제조하였다. 지방산 제조 방법은 지방산 에틸 에스터 100 g을 1 L 둥근 바닥 플라스크에 넣고 95% 에탄올 300 mL과 40% NaOH 용액 100 mL을 넣고 30분 동안 reflux시켰다. 2 L 분액깔때기에 반응액을 넣고 conc. HCl 120 mL과 증류수 200 mL을 넣어 충분히 흔들어 준 후 아래층은 버리고 윗층만을 취하여 다시 분액깔때기에 넣고 헥산 500 mL과 증류수 200 mL을 넣어 흔들어 주고 아래층은 버리고 위층을 취한다. 지방산이 녹아 있는 헥산층은 증류수 100 mL로 세 번 세척해 주고 감압 증류기로 1차 헥산을 제거하고 질소를 불어 잔류 헥산이 없도록 한 후 효소반응에 사용하였다.



Table 7. Fatty acid composition (mol%) of initial phosphatidylcholine (PC) and *n*-3 PUFA enriched-fatty acid ethyl ester for acidolysis.

	<i>n</i> -3 PUFA enriched-fatty acid ethyl ester	PC <sup>b</sup>
C16:0	0.3	13.0
C16:1 <sub>n-7</sub>	0.3	0.0
C18:0	0.8	3.4
C18:1 <sub>n-9</sub>	2.1	10.3
C18:1 <sub>n-7</sub>	0.7	1.5
C18:2 <sub>n-6</sub>	0.2	65.6
C18:3 <sub>n-3</sub>	0.9	6.3
C20:0	1.7	0.0
C20:1 <sub>n-9</sub>	0.3	0.0
C20:2	0.4	0.0
C20:3 <sub>n-6</sub>	1.4	0.0
C20:4 <sub>n-6</sub>	0.8	0.0
C20:5(EPA)	14.7	0.0
C22:1	1.7	0.0
C22:5(DPA)	3.3	0.0
C22:6(DHA)	70.4	0.0

(나) 효소

① 효소 종류

고정화에도 사용된 phospholipase A<sub>1</sub> (Lecitase<sup>®</sup> Ultra)는 *Thermomyces lanuginosus*/*Fusarium oxysporum*에서 유래된 액상효소로서 Novo Nordisk Bioindustry Ltd. (Seoul, Korea)에서 구입하였다.

② 효소 고정화

Lewatit VP OC 1600를 95% 에탄올에 3시간 동안 침지시켜 팽윤시킨 후에 phosphate 완충용액 (pH 7.5)으로 에탄올을 제거하고 팽윤된 고정체에 완충용액이 채워지도록 하였다. phospholipase A<sub>1</sub> 용액의 농도가 70%가 되도록 phosphate 완충용액을 이용하여 희석시켰다. 고정체 무게 1g에 phospholipase A<sub>1</sub> 용액 10 mL를 가한 후 30°C에서 250 rpm으로 16 시간 동안 섞어주었다. 그리고 고정체 무게 1 g을 기준으로 phosphate 완충용액 40 mL을 이용하여 세척해주었다. 고정화된 phospholipase A<sub>1</sub>은 상온에서 24 시간 동안 건조된 후

진공 건조기에서 24시간 건조시켰다. 반응 전까지는 냉장 보관하였고, 반응을 위하여 수분 활성도 0.64인 밀폐된 용기에 보관하였다. 이상의 모든 과정은 아래 Figure 41와 같았다.

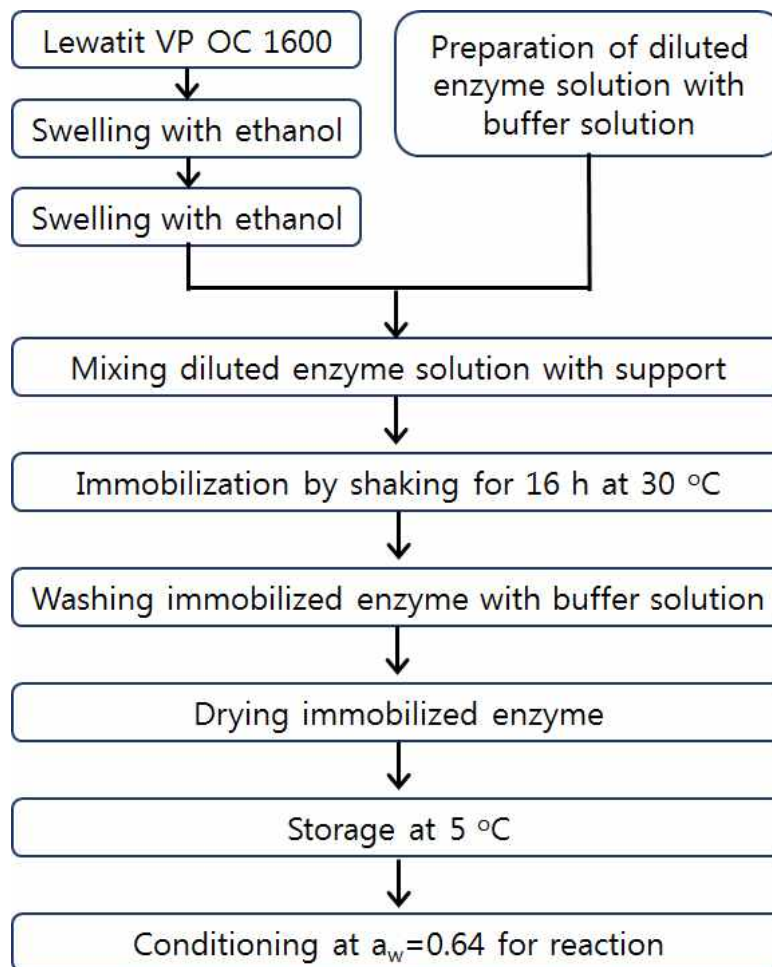


Figure 41. Protocol for preparation of immobilized enzyme

### ③ 효소의 고정화도 측정 (단백질 정량-Lowry법)

효소의 고정화도를 측정하기 위하여 초기 phospholipase A<sub>1</sub> 용액의 단백질을 정량한다. phospholipase A<sub>1</sub>을 고정화 시킨 후에 완충용액에 남아 있는 단백질량과 세척 후 완충용액으로 빠져나온 단백질량을 합하여 정량하였다. Lowry법에 사용된 시약 A는 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 g과 0.1 N NaOH 0.4 g을 증류수 100 mL에 섞어서 제조하였다. 시약 B1은 1% CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0.5 g을 증류수 50 mL에 섞어서 만든다. 시약 B2는 2% NaK tartrate · 4H<sub>2</sub>O를 증류수 50 mL에 넣어 제조하였다. 시약 A, B1, B2의 형태로 보관 후 사용하기 직전에 각각 100 : 1 : 1의 부피비율로 섞어 시약 C를 만들어 사용하였다. 시료 200 uL에 1 mL의 시약 C를 섞어 vortexing 후 10분 동안 방치한 후 Folin 시약 50 uL를 넣어 vortexing 후 30분 동안 방치하여 발색 (파란색)시켰다. 발색된 시료는 750 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{고정화된 효소량 (mg/g)} = \frac{W1 - W2}{W3 + (W1 - W2)}$$

W1: phospholipase A<sub>1</sub> 원액의 단백질량 (mg)

W2: 고정화 후 완충용액에 남아 있는 단백질량 (mg)

W3: 고정체 무게 (g)

(3) Bulk-scale 회분식 반응기에서 Acidolysis를 통한 기능성 PC의 합성

(가) Bulk-scale 회분식 반응기

대량 회분식 반응기는 100 mL 유리 반응기가 사용되었고, 반응기는 water jacket이 장착되어 water circulator를 연결하여 반응 온도를 일정하게 유지시킬 수 있도록 하였다 (Figure 42). 반응물 양에 따라 교반은 stirring bar를 사용하거나 대량교반기를 이용하였다.



Figure 42. Bulk-scale batch mode reactor used for acidolysis reaction of PC with DHA

(나) Bulk-scale 회분식 반응기에서 acidolysis 반응

PC와 *n*-3 PUFA 함유 지방산을 일정한 물 비율로 섞은 후 50°C에서 각각 녹여 시료를 만들고 Karl fisher를 통하여 두 반응물 mixture에 수분함량을 측정하였다. 기질 혼합물 총 20g을 대량 회분식 반응기에 넣고 반응을 진행하였다. 반응 조건은 1차년도에 선택한 최적 조건과 동일하였다. 효소량은 기질 혼합물 무게 기준 20% (4g)이었고, 반응 온도는 55°C, 기질 간 몰비율은 1:8 (PC:지방산)이었다. 초기 수분함량은 기질 무게 기준 1.0% (0.2g)으로 맞추어 반응시켰다.

(4) Bulk-scale 연속식 반응기(packed bed reactor, PBR)에서 Acidolysis를 통한 기능성 PC의 합성

(가) 연속식 반응기 (Packed bed reactor, PBR)

연속식 반응기는 기질을 반응기로 주입해주는 syringe와 pump, 실제적으로 반응이 일어나는 부분인 packed bed reactor (PBR), 반응 후 생성물이 나오는 부분으로 구성되어있다. PBR에는 고정화 효소가 채워져 있고, reservoir에 있던 기질이 pump에 맞춰진 속도에 따라 PBR로 주입되어 그 안에 효소와 반응한 후 그 생성물이 다시 같은 속도로 나와 모이게 된다 (Figure 43). 본 연구에서 자체 제작한 bulk-scale PBR은 유리 재질로 외부에 water jacket이 장착되어있어 반응 시 일정 온도를 유지할 수 있도록 되어있다. PBR의 내경은 1 cm, 길이는 30 cm이며, 이 PBR에 채워지는 고정화 효소의 양은 약 5g였다. PBR의 양 끝은 스테인레스 스틸 제질의 50 mesh의 sieve가 장착되어있어 효소는 밖으로 나오지 못하고 기질만 통과할 수 있도록 되어있다. 반응기질이 PBR을 통과하기 전에는 내경 12cm, 높이 27cm인 유리 reservoir에 보관되어 PBR에 들어가기 전까지 250rpm으로 교반되어진다. Void volume이란, PBR에 효소가 차지하는 공간 이외에 공간 즉 기질이 채워지는 부피를 의미한다. 이 PBR에 본 실험에서 쓰인 효소와 기질을 넣고 측정한 void volume은 22.399 mL이었다. Residence time이란 기질이 PBR에 머무는 시간 즉 효소와 기질이 접촉하는 시간을 의미하며 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Residence time (min)} = \frac{\text{void volume (ml)}}{\text{flow rate of substrate mixture (ml/min)}}$$

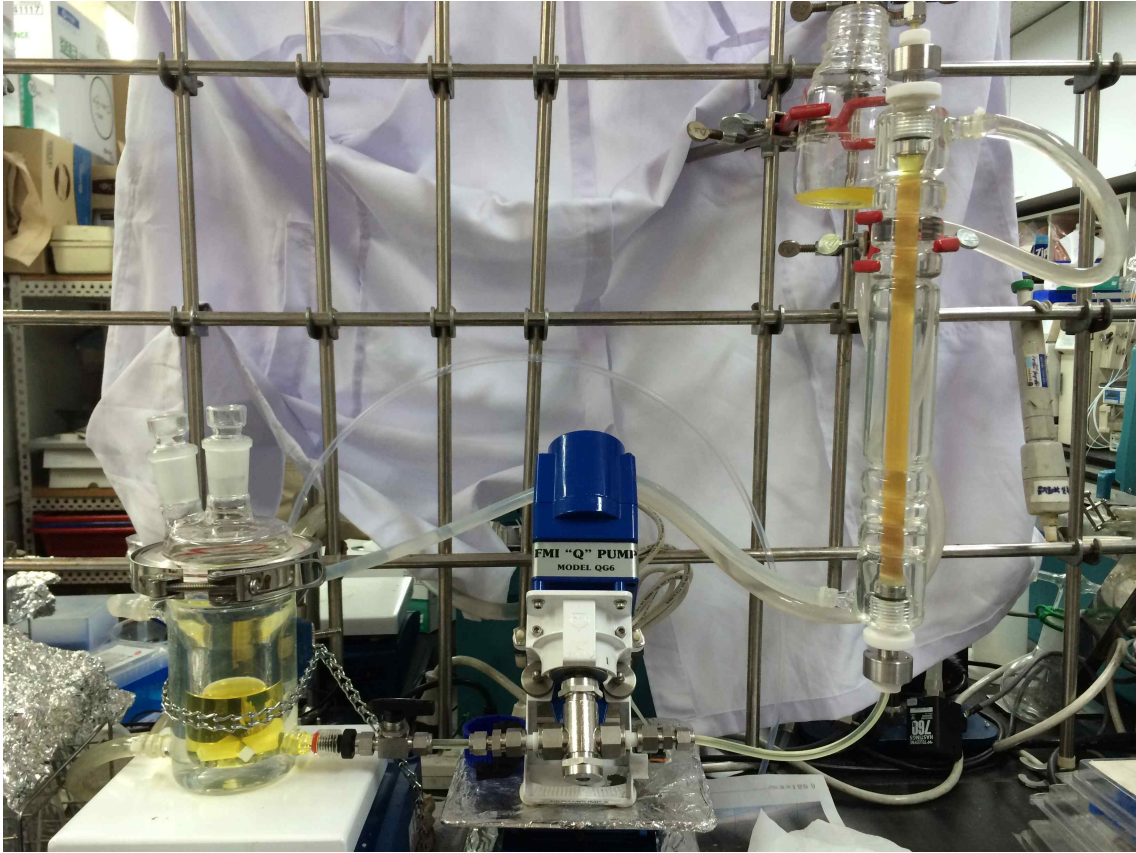


Figure 43. Packed bed reactor used for acidolysis reaction of PC with DHA

(나) Acidolysis 반응

PC와 target 지방산 ( $n-3$  PUFA)을  $50^{\circ}\text{C}$ 에서 지방산과 PC의 몰 비율 1:8로 혼합하여 시료를 만들고 Karl fisher 수분 측정기를 통하여 수분함량을 측정하여 초기 수분함량을 기질 무게 기준 1.0%로 맞췄다. 기질 혼합물 100 g을 syringe에 채우고 5g의 고정화 효소가 채워진 PBR을 통과시켜 반응을 진행하였다. PBR은 water jacket를 이용하여 원하는 온도로 유지 되었으며, 조사된 온도  $55^{\circ}\text{C}$ 이었다. 반응 전 시료와 효소의 안정화를 위하여 residence time을 3분의 속도로 하여 약 6분간 반응기 void volume을 기준으로 3배의 void volume에 해당 하는 기질을 통과시켜 기질과 효소를 안정화 시킨 후 residence time 120min에서 2배의 void volume에 해당하는 시료를 통과 시킨 후 residence time 120분에서 반응된 시료를 채취 하였다. Residence time의 조절은 앞에서 기술한 바와 같이 pump의 속도로 조절하였다. 분석한 시료의 PC와 LPC에 결합된  $n-3$  PUFA의 함량 및 PC와 LPC의 수율은 다음을 통해 계산되었다.

$$n-3 \text{ PUFA} = \text{DHA} + \text{EPA} + \text{DPA}$$

$$PC \text{ yield}(\text{mol}\%) = \frac{\text{반응 후 PC의 양}(\text{mol})}{\text{반응 전 PC의 양}(\text{mol})} \times 100$$

$$\text{Incorporation of } n-3 \text{ PUFA into PC (mol\%)} = \frac{\text{PC에 결합된 } n-3 \text{ PUFA의 양 (mol)}}{\text{PC에 결합된 총 지방산의 양 (mol)}} \times 100$$

$$\text{LPC yield (mol\%)} = \frac{\text{반응 후 LPC의 양 (mol)}}{\text{반응 전 LPC의 양 (mol)}} \times 100$$

$$\text{Incorporation of } n-3 \text{ PUFA into LPC (mol\%)} = \frac{\text{LPC에 결합된 } n-3 \text{ PUFA의 양 (mol)}}{\text{LPC에 결합된 총 지방산의 양 (mol)}} \times 100$$

(5). 진공 반응

기능성 PC 수율 증대를 위하여 대기압에서 acidolysis 3시간 후 5 torr의 진공을 걸어주어 교반과 함께 계속 반응시켰다. 일정한 반응 시간 후에 시료를 취하였다 (Figure 44).



Figure 44. Water jacketed batch reactor for enzymatic reaction under vacuum.

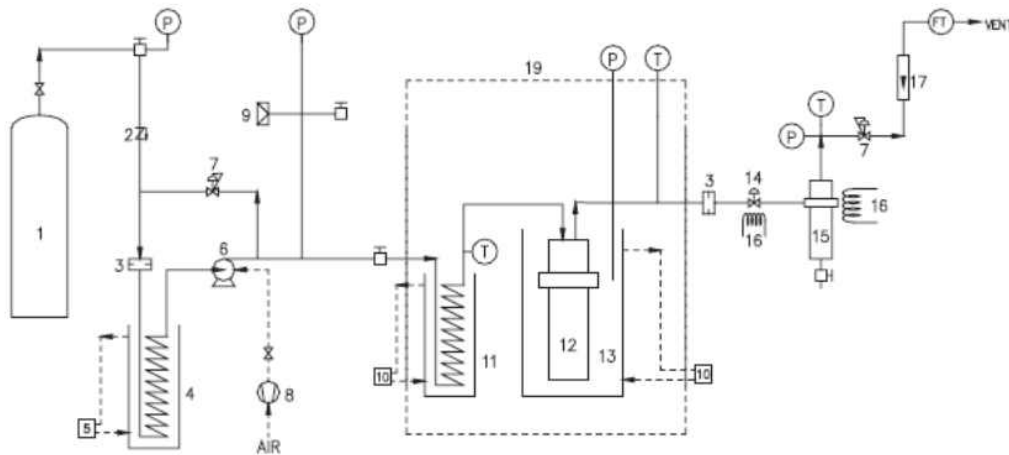
(6) Acidolysis 반응 생성물에서 PC 분리 농축

(가) Bulk-scale 초임계 이산화탄소 추출기를 이용한 반응 생성물로부터 유리지방산 제거

Acidolysis반응이 끝난 반응 생성물은 초임계 이산화탄소를 이용하여 유리지방산이 추출 제거되었다. 이에 사용된 초임계 장치의 모식도는 Figure 45에 나타내었다. 반응 생성물 100g을 초임계 추출기 (12)인 water jacketed high pressure vessel (HIP, Erie, PA, USA)에 넣었다. 추출기의 온도는 원하는 온도로 water circulator (10)를 이용하여 맞춰졌다. 조사된 추출 온도는 35, 45, 55°C이었다. 이산화탄소(1)는 미리 저온 냉각기 (5)를 통해 저온으로 맞추어진 코일 (4)을 통과하여 액체 펌프 (Haskel, Burbank, CA, USA) (6)를 통해 추출기를



통과 하였다. 초임계이산화탄소의 압력은 펌프로 조절되었다. 추출 압력은 6000 psi였고, 추출 온도는 55°C였다. 추출물은 이어서 콜렉터인 separator vessel (15)로 모아졌다. 이산화탄소의 정확한 flow는 flowmeter (Fischer and Porter, Warminster, PA, USA) (17)로 측정되어 2 mL로 일정하게 유지되었다. 추출은 흘려준 모든 조건에서 이산화탄소의 양 (450 L)을 일정하게 하여 6시간동안 진행되었고, 추출이 끝난 후 추출기와 콜렉터에 있는 시료의 조성이 분석되어졌다. 추출기에 남은 시료 내의 PC, LPC, FA의 조성은 무게 기준 백분율로 표현하기로 한다. 실제 실험에 사용한 초임계 반응기를 Figures 46-47에 나타내었다.



- |                            |                       |                    |
|----------------------------|-----------------------|--------------------|
| 1-CO <sub>2</sub> cylinder | 8-air compressor      | 15-separator       |
| 2-check valve              | 9-rupture             | 16-electric heater |
| 3-filter                   | 10-heating circulator | 17-flow meter      |
| 4-subcooler                | 11-preheate           | 18-flow totalizer  |
| 5-refrigerated circulator  | 12-liquid extractor   | 19-air bath        |
| 6-liquid pump              | 13-heating jacket     | P-pressure gauge   |
| 7-back pressure regulator  | 14-metering valve     | T-thermocouple     |

Figure 45. Diagram for supercritical carbon dioxide extraction



Figure 46. Supercritical carbon dioxide system for fatty acid extraction



Figure 47. Water jacketed high pressure vessel

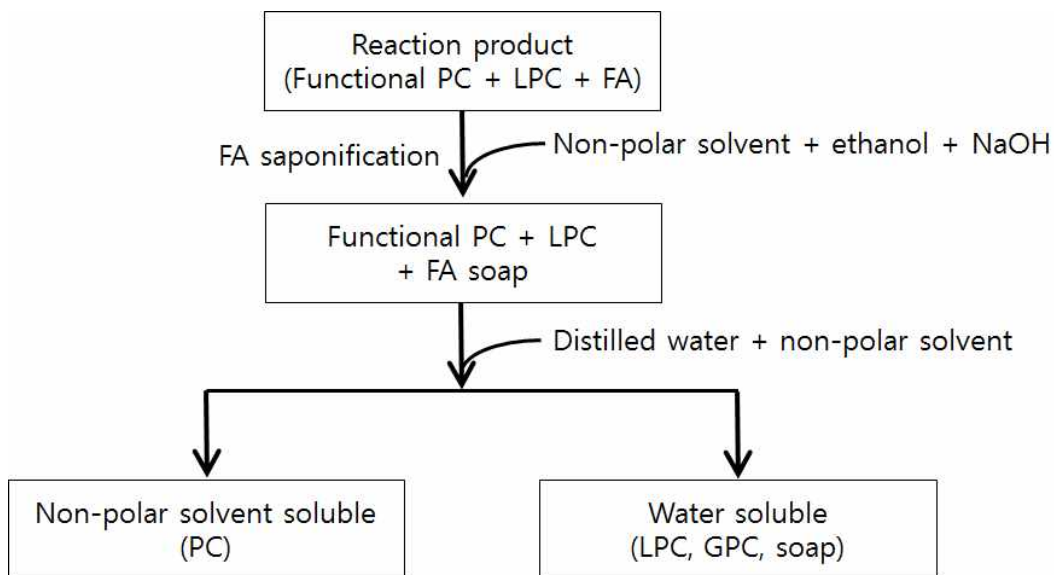
(나) Liquid-liquid fractionation을 통한 잔류 유리지방산 및 LPC 제거

초임계 추출이 끝난 후 추출기에 남은 1차 PC 농축시료는 liquid-liquid fractionation을 통해 다시 한 번 유리지방산과 LPC가 제거되었다 (Figure 48). 이를 위해 우선 잔류 유리지방산의 부분적 비누화 과정을 거쳤다. 초임계 추출이 끝난 약 5g의 시료를 삼각 플라스크에 넣고, 비극성 용매와 에탄올을 2:1 (v/v)로 섞은 용매를 100 mL 넣어 완전히 녹였다. 사용된 비극성 용매는 디클로로메탄이었다. 이 삼각 플라스크에 지시약 0.1% phenolphthalein in



99% 에탄올 용액을 0.2 mL 넣어 주고 magnetic bar를 넣고 stirrer로 약 250rpm으로 섞어 주었다. 유리지방산의 비누화를 위해 1N NaOH in 70% 에탄올 용액을 뷰렛을 이용하여 한 방울씩 천천히 떨어뜨려 종말점까지 적정하였다. 적정이 끝난 시료는 1L 짜리 separate funnel로 옮겼다. 이에 앞서 사용했던 디클로로메탄 100mL와 증류수 150mL를 넣고 층을 분리시킨 후 비극성 용매 층을 둥근 플라스크에 모아 vacuum evaporator를 이용하여 용매를 제거하였다. 이렇게 하여 얻어진 시료의 조성이 분석되었다. 이 때 liquid-liquid fractionation 이후 PC의 수율은 다음과 같은 방법으로 계산되었다.

$$PC\ yield(wt\%) = \frac{fractionation\ 후\ PC\ 의\ 양\ (g)}{fractionation\ 전\ 시료\ 내\ PC\ 의\ 양\ (g)} \times 100$$



FA: fatty acid; GPC: glycerophosphatidylcholine; LPC: lysophosphatidylcholine; PC: phosphatidylcholine

Figure 48. Separation of PC from acidolysis reaction product by liquid-liquid fractionation

(7) 분석

(가) TLC를 이용한 PC 분석

반응물 50 mg을 chloroform 150 uL에 녹인 후 TLC plate (silica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck, Germany)에 loading시키고 chloroform/ methanol/ acetic acid/ water (75:40:8:3, by vol)의 용액으로 전개시켰다. Plate에 분리된 PC와 LPC를 scrap한 후에 내부표준물질 (C17:0) 1 mg을 넣고 BF<sub>3</sub> (14% Boron fluoride in methanol)를 이용하는 방법으로 methylation시켜

GC 분석용 시료를 만들었다.

(나) GC-FID 분석조건

GC (gas chromatograph, Buruker cp-3800, USA)에 Superlcowax<sup>TM</sup> 10 (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm, Supelco, USA) 컬럼을 장착하였으며, 컬럼 오븐 온도는 180°C에서 1분간 정치하고 230°C까지 1.5°C/min으로 승온시킨 후 5분 동안 정치시켰다. 주입부의 온도는 240°C이며 불꽃 이온화 검출기의 온도는 250°C로 설정하였다. 이동상 가스는 헬륨을 1.5 mL/min으로 흘려주면서 50:1의 split ratio에서 분석하였다.

(다) 계산방법

$$PC\ yield(mol\%) = \frac{\text{반응 후 } PC\ \text{의 양 (mol)}}{\text{반응 전 } PC\ \text{의 양 (mol)}} \times 100$$

$$\text{Incorporation of } n-3\ PUFA\ \text{into } PC(mol\%) = \frac{PC\ \text{에 결합된 } n-3\ PUFA\ \text{의 양 (mol)}}{PC\ \text{에 결합된 총 지방산의 양 (mol)}} \times 100$$

$$LPC\ yield(mol\%) = \frac{\text{반응 후 } LPC\ \text{의 양 (mol)}}{\text{반응 전 } LPC\ \text{의 양 (mol)}} \times 100$$

$$\text{Incorporation of } n-3\ PUFA\ \text{into } LPC(mol\%) = \frac{LPC\ \text{에 결합된 } n-3\ PUFA\ \text{의 양 (mol)}}{LPC\ \text{에 결합된 총 지방산의 양 (mol)}} \times 100$$

나. 결과 및 고찰

(1) Bulk-scale에서 고정화 효소 제작

*n*-3 PUFA 함유 PC의 합성을 위해 사용된 효소는 phospholipase A1을 자체 고정화 한 효소로써, bulk-scale에서 고정화 조건은 1차년도에 선택된 최적조건과 동일하게 하였다. 고정화에 사용된 완충용액의 pH는 7.5였고, 완충용액에 phospholipase A1 (액상) 효소를 70%로 희석시킨 용액에, 최적 고정체로 선정된 Lewatit VP OC 1600을 사용하여 고정화 하였다. 자세한 고정화 방법은 다.절에 자세히 기록하였다. 대량 반응을 위해서는 고정화 효소의 제작 역시 bulk-scale로 해야하므로, 1차년도에 lab-scale에서 선택한 효소 고정화 최적조건이 bulk-scale로 고정화 할 때에도 잘 맞아 떨어지는지 확인하는 실험을 수행하였다. 1차년도 lab-scale로 효소를 고정화 할 때에는 10g 고정체를 사용하였던 것에 비해, 대량으로 고정화 할 때에는 고정체 40g을 사용하여, 실험실 규모에서 4배가량 규모를 키워 고정화 효소를 제작하였다.

완성된 고정화 효소의 단백질 fixation level (%)과 고정화 효소 내 단백질양 (mg/g)을 측정하여 1차년도 결과와 비교한 결과를 Table 8에 나타내었다. 그 결과 fixation level의 경우 약간의 차이는 있었으나 lab-scale과 bulk-scale 결과에서 거의 비슷한 값을 보였으며, 고정화 효소 내 단백질 양의 경우에는 lab-scale과 비교하였을 때 bulk-scale에서 제작한 고정화 효소의 경우 더 낮은 값을 보였다.

고정화 효소의 활성을 알아보기 위하여 고정화 효소를 이용하여 acidolysis를 시행한 후 그

결과를 lab-scale 효소를 이용하여 반응 시켰을 때 결과와 비교하여 보았다 (Table 9-12). 반응은 온도 55°C, 기질간의 몰비율 1:8 (PC:FA), 수분함량 1.0% (w/w), 효소량 20%(w/w)에서 시행하였다.

PC에 결합된 *n*-3 PUFA 함량의 경우, 조사된 반응시간 내에서 lab-scale로 제작한 효소를 이용하였을 때와 bulk-scale로 제작한 효소를 이용하였을 때의 비슷한 값을 나타내었다. lab-scale 효소를 이용하였을 경우 PC에 결합된 *n*-3 PUFA 함량이 3시간째에 약 35% (mol/mol)에서 24시간째에 51%로 증가하는 경향을 보였는데, bulk-scale 효소를 이용하였을 경우 PC에 결합된 *n*-3 PUFA 함량이 3시간째에 약 33% (mol/mol)에서 24시간째에 55% (mol/mol)로 증가하여 lab-scale과 거의 비슷한 경향을 보였다.

PC 수율의 경우도, lab-scale 효소와 bulk-scale 효소가 거의 비슷한 결과를 보였는데, lab-scale 효소를 이용하였을 경우 PC 수율이 3시간째에 17% (mol/mol)에서 12시간째에 14% (mol/mol)로 감소하였다가 24시간째에 약간 증가하여 16% (mol/mol)를 나타내었는데, bulk-scale 효소를 이용하였을 경우 PC 수율이 3시간째에 20% (mol/mol)에서 12시간째에 16% (mol/mol)로 감소하다가 24시간째에 더 감소하여 15% (mol/mol)를 나타내었다.

LPC에 결합된 *n*-3 PUFA 함량의 경우, 반응시간이 3시간에서 24시간으로 증가함에 따라 lab-scale 효소를 이용하였을 때와 bulk-scale 효소를 이용하였을 때 둘 다에서 서서히 증가하는 경향을 보였고, 그 값도 둘에서 큰 차이를 보이지 않았다.

LPC 수율의 경우, 반응시간이 3시간에서 24시간으로 증가함에 따라 lab-scale 효소를 이용하였을 때와 bulk-scale 효소를 이용하였을 때 둘 다 시간이 지남에 따라 서서히 증가하는 경향을 보였다.

따라서 bulk-scale로 제작된 효소가 lab-scale로 제작된 효소와 거의 비슷한 특성과 활성을 보이는 것으로 판단되어, 다음 bulk-scale batch mode 반응 및 PBR 반응에 반응 매개 효소로 써 사용되었다.

Table 8. Comparison of fixation level (%) and protein amount in the immobilized PLA1 (mg/g) after lab-scale and bulk-scale enzyme immobilization

Immobilized PLA1 production	Fixation (%)	Protein in immobilized PLA1 (mg/g)
Lab-scale	79.51	170.25
Bulk-scale	75.23	157.15

Table 9. *n*-3 PUFA incorporation in PC after acidolysis reaction using immobilized PLA1 produced in lab-scale and bulk-scale

Immobilized PLA1 production	Reaction time (h)				
	3	6	9	12	24
Lab-scale	35.12	45.01	50.93	54.41	51.37
Bulk-scale	33.27	40.28	46.89	48.01	55.39

Table 10. The yield of PC after acidolysis reaction using immobilized PLA1 produced in lab-scale and bulk-scale

Immobilized PLA1 production	Reaction time (h)				
	3	6	9	12	24
Lab-scale	17.04	13.88	12.93	13.69	16.68
Bulk-scale	19.67	16.45	15.36	16.04	14.86

Table 11. *n*-3 PUFA incorporation in LPC after acidolysis reaction using immobilized PLA1 produced in lab-scale and bulk-scale

Immobilized PLA1 production	Reaction time (h)				
	3	6	9	12	24
Lab-scale	57.69	57.64	57.80	64.30	65.25
Bulk-scale	53.02	50.32	54.45	53.07	60.37

Table 11. The yield of LPC after acidolysis reaction using immobilized PLA1 produced in lab-scale and bulk-scale

Immobilized PLA1 production	Reaction time (h)				
	3	6	9	12	24
Lab-scale	25.38	29.48	29.95	30.71	29.79
Bulk-scale	23.34	24.69	26.78	27.21	27.89

(2) Bulk-scale 회분식 반응기에서 acidolysis를 통한 *n*-3 PUFA 함유 기능성 PC의 합성 및 진공 반응을 통한 PC 수율 증대

*n*-3 PUFA가 결합된 PC를 합성하기 위해 1차년도에 수행하였던 회분식 acidolysis 반응을 bulk-scale로 반응 규모를 증가시켜 시행하였다. 1차년도 lab-scale 회분식 반응은 총 기질량이 3g이었던 것에 비하여 bulk-scale 회분식 반응은 총 기질량을 20g으로 증가시켜 반응하였다. 이 때 반응 조건은 1차년도에 선택된 최적조건과 동일한 조건으로, 반응온도 55°C, 기질간의 몰비율 1:8 (PC:FA), 수분함량 1.0% (w/w), 효소량 20% (w/w)에서 반응을 실시하였다. 또한 PC 수율을 향상시키기 위하여 반응시간 3시간까지는 대기압에서 반응을 진행하다가 3시간 이후에 진공을 걸어주어 진공상태에서 반응을 진행하였다. 실험 결과의 비교를 위해 PC에 결합된 *n*-3 PUFA 함량 및 PC의 수율, LPC에 결합된 *n*-3 PUFA 함량, LPC의 수율을 반응시간에 따라 조사하여 그래프로 나타내었다 (Figure 49-52).

PC에 결합된 *n*-3 PUFA 함량의 경우 lab-scale과 bulk-scale 반응 모두에서 3시간동안 대기압에서 반응하였을 때 급격히 증가하였다가, 반응시간 3시간 이후 진공을 걸어줌에 따라 약간 감소하는 결과를 보여주었다. lab-scale과 bulk-scale 사이 값의 차이는 거의 보이지 않았다. lab-scale과 bulk-scale 둘 다에서 대기압에서 반응 3시간 쯤에 PC에 결합된 *n*-3 PUFA 함량이 약 34-35% (mol/mol)였고, 반응시간 3시간 이후 진공을 걸어 준 후 반응시간 99시간 쯤에는 PC에 결합된 *n*-3 PUFA 함량이 약간 감소하여 약 29-33% (mol/mol) 정도였다.

PC 수율의 경우, lab-scale과 bulk-scale 모두에서 대기압에서 반응 3시간 까지 PC 수율이 급격하게 감소하여 반응시간 3시간쯤에 약 17-20% (mol/mol) 정도였으나 3시간쯤에 진공을 걸어주자 PC 수율이 급격히 증가하여 반응시간 99시간쯤에는 lab-scale과 bulk-scale 둘 다에서 PC 수율이 약 62-65% (mol/mol)로 증가하였다.

LPC에 결합된 *n*-3 PUFA 함량의 경우, lab-scale과 bulk-scale 반응에서 각 시간 별로 그 값이 약간의 차이를 보였지만, 두 경우 모두 대기압에서 반응 3시간동안 급격히 LPC에 결합된 *n*-3 PUFA 함량이 증가하다가 반응시간 3시간 이후 진공을 걸어주자 그 값이 약간 감소하는 경향을 나타내어 비슷한 양상을 보여주었다.

LPC 수율의 경우에서도, lab-scale과 bulk-scale에서 각 반응시간에서 그 값이 약간의 차이는 있었으나, 대체적으로 반응시간 3시간까지 급격히 LPC 수율이 증가하다가 진공을 걸어주자 서서히 감소하는 양상을 보였다.

진공을 걸어 주었을 때 반응에서 생성되는 수분이 제거되는 효과가 있어 PC의 수율이 증가하게 되고, 반대로 PC가 분해되어 생기는 LPC의 양은 대기압에서의 반응이 진행됨에 따라 그 양이 증가하다가 진공을 걸어줌에 따라 LPC의 수율은 감소하는 양상을 보인다. PC에 결합된 *n*-3 PUFA 함량의 경우, 진공을 걸어주었을 때 *n*-3 PUFA를 함유하지 않은 LPC로부터 *n*-3 PUFA가 아닌 지방산과 결합하여 합성되는 PC의 영향 때문에 PC에 결합된 *n*-3 PUFA 함량이 약간 감소하게 된다.

종합하여볼 때, bulk-scale batch reactor에서 acidolysis 반응을 수행할 때 lab-scale에서 반

응을 수행하였을 때와 최적조건에서 거의 같은 결과를 얻을 수 있는 것으로 판단되었다.

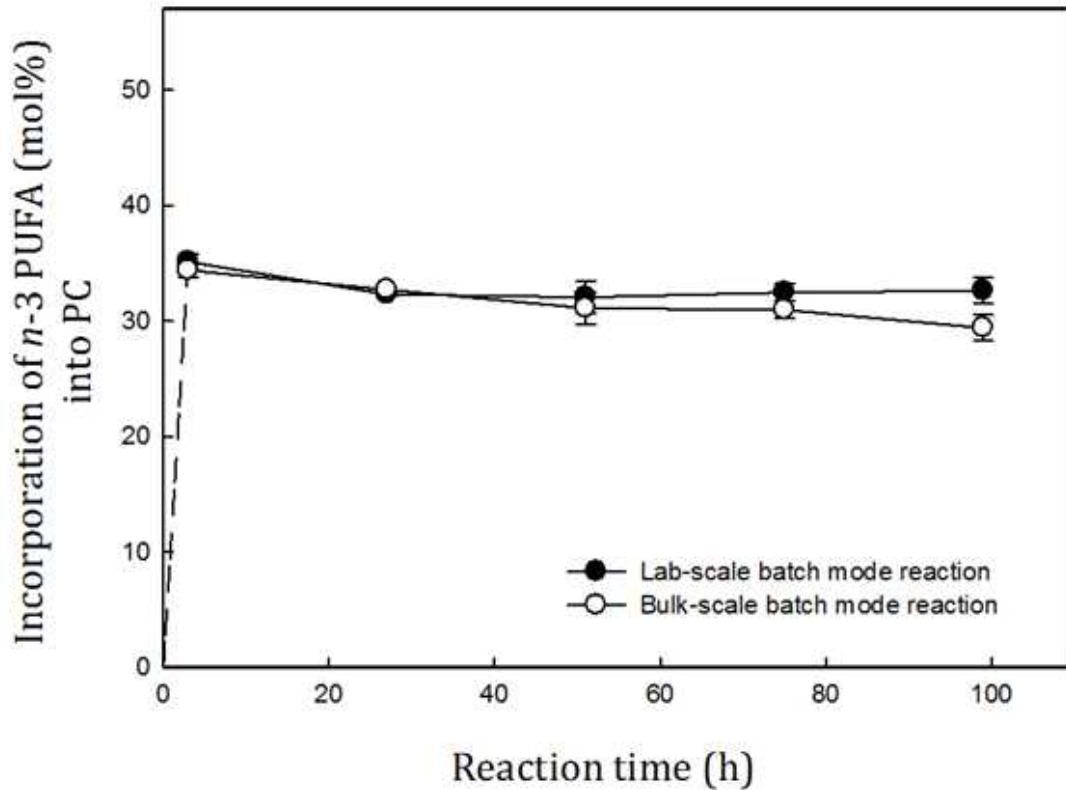


Figure 49. Incorporation of *n-3* polyunsaturated fatty acid (PUFA) into PC (mol%) in a bulk-scale batch mode acydolysis reaction as a function of residence time. The first 3 hours of reaction was carried out under atmospheric condition at the temperature of 55°C, the molar ratio of 1:8 (PC:FA), the enzyme loading of 20% (based on the substrate weight) and the water content of 1.0% (based on the substrate weight). At the reaction time of 3 hours vacuum was applied.

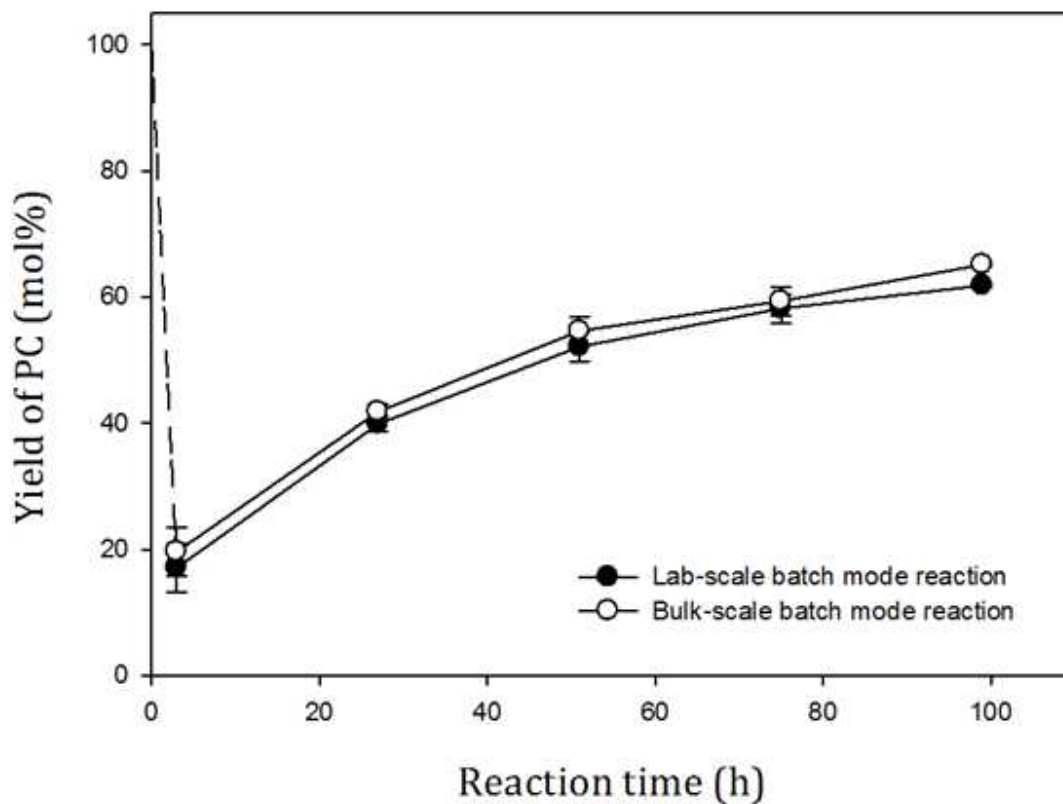


Figure 50. Yield of PC (mol%) in a bulk-scale batch mode acydolysis reaction as a function of residence time. The first 3 hours of reaction was carried out under atmospheric condition at the temperature of 55°C, the molar ratio of 1:8 (PC:FA), the enzyme loading of 20% (based on the substrate weight) and the water content of 1.0% (based on the substrate weight). At the reaction time of 3 hours vacuum was applied.

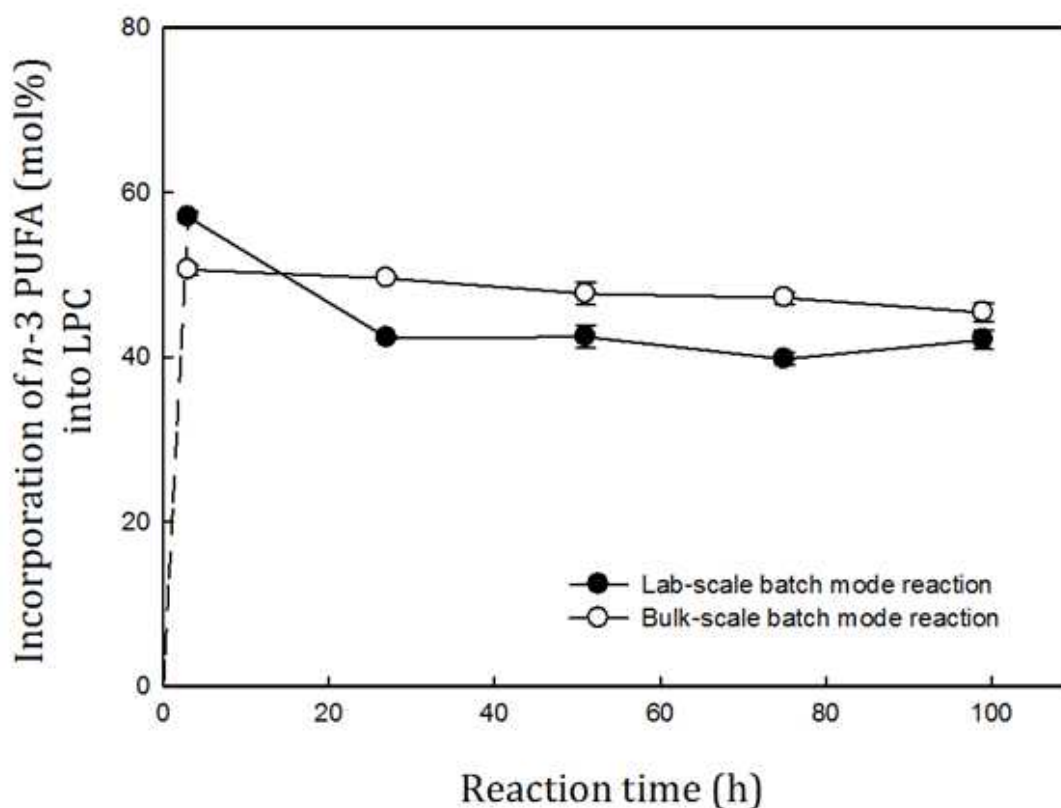


Figure 51. Incorporation of *n-3* polyunsaturated fatty acid (PUFA) into LPC (mol%) in a bulk-scale batch mode acydolysis reaction as a function of residence time. The first 3 hours of reaction was carried out under atmospheric condition at the temperature of 55°C, the molar ratio of 1:8 (PC:FA), the enzyme loading of 20% (based on the substrate weight) and the water content of 1.0% (based on the substrate weight). At the reaction time of 3 hours vacuum was applied.



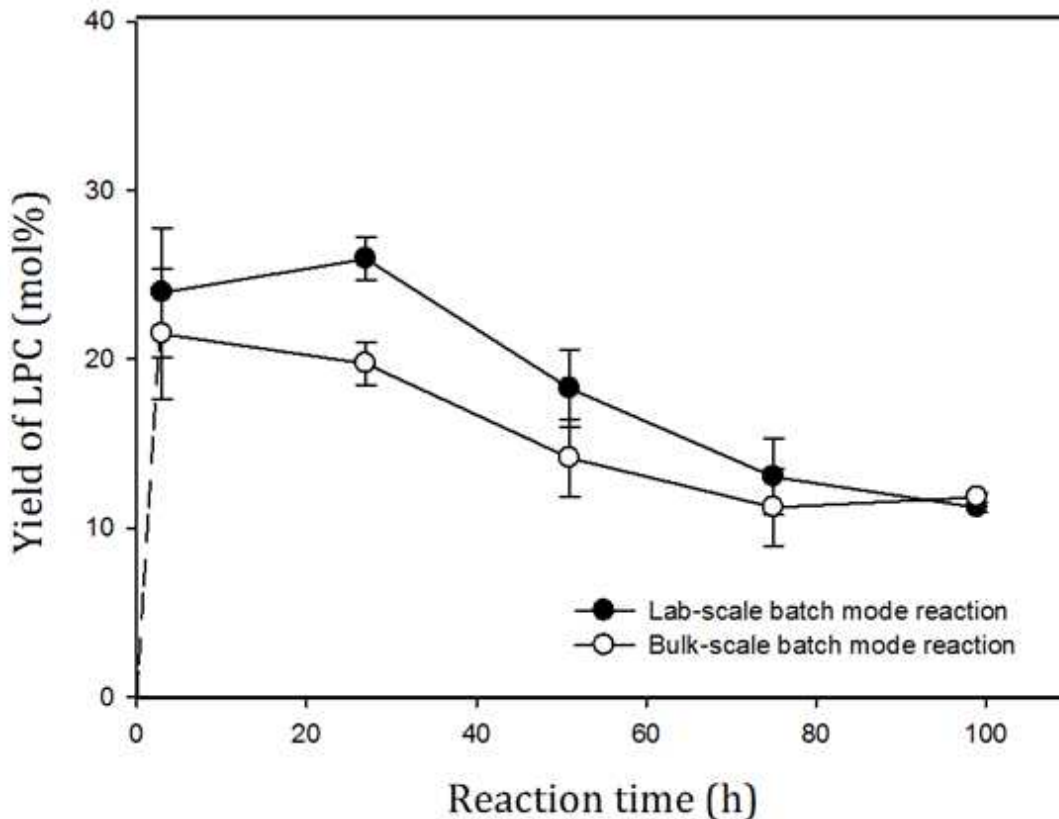


Figure 52. Yield of LPC (mol%) in a bulk-scale batch mode acydlolysis reaction as a function of residence time. The first 3 hours of reaction was carried out under atmospheric condition at the temperature of 55°C, the molar ratio of 1:8 (PC:FA), the enzyme loading of 20% (based on the substrate weight) and the water content of 1.0% (based on the substrate weight). At the reaction time of 3 hours vacuum was applied.

### (3) Bulk-scale 연속식 반응기 (PBR)에서 acidolysis를 통한 *n*-3 PUFA 함유 기능성 PC의 합성

*n*-3 PUFA가 결합된 PC를 합성하기 위해 2차년도에 수행하였던 연속식 acidolysis 반응을 bulk-scale로 반응 규모를 증가시켜 시행하였다. 2차년도 lab-scale 연속식 반응은 PBR 반응기 안에 기질의 void volume이 1.568mL이었던 것에 비하여 bulk-scale 연속식 반응은 void volume을 22.399mL로 증가시켜 반응하였다. 이 때 PBR 안에 채워지는 효소량은 lab-scale의 경우 0.35g이었고, bulk-scale의 경우 5g이었다. 반응 조건은 2차년도에 선택된 최적조건과 동일한 조건으로, 반응온도 55°C, 기질간의 몰비율 1:8 (PC:FA), 수분함량 1.0% (w/w)에서 반응을 실시하였다. Residence time역시 2차년도에 최적으로 선택된 120분으로 고정하여 실험하였다. 실험 결과의 비교를 위해 PC에 결합된 *n*-3 PUFA 함량 및 PC의 수율, LPC에 결합된 *n*-3 PUFA 함량, LPC의 수율을 조사하여 그래프로 나타내었다 (Figure 53-54).

PC에 결합된  $n-3$  PUFA 함량의 경우 bulk-scale PBR에서 반응을 시켰을 때 residence time 120분에서 약 20% (mol/mol)로 lab-scale PBR의 결과 (21%, mol/mol)과 거의 차이를 보이지 않았다. LPC에 결합된  $n-3$  PUFA 함량의 경우 bulk-scale PBR에서 반응을 시켰을 때 34% (mol/mol)로 lab-scale에서 얻어진 결과 (33%, mol/mol)과 거의 차이가 없었다.

PC 수율의 경우 역시, bulk-scale PBR의 결과와 lab-scale PBR의 결과가 각각 33%와 36% (mol/mol)로 약간의 차이만을 보였고, LPC 수율의 경우에도 bulk-scale PBR의 결과가 23% (mol/mol), lab-scale PBR의 결과가 24% (mol/mol)로 거의 차이를 보이지 않았다.

종합하여볼 때, bulk-scale PBR에서 acidolysis 반응을 수행할 때 lab-scale에서 반응을 수행하였을 때와 최적조건에서 거의 같은 결과를 얻을 수 있는 것으로 판단되었다.

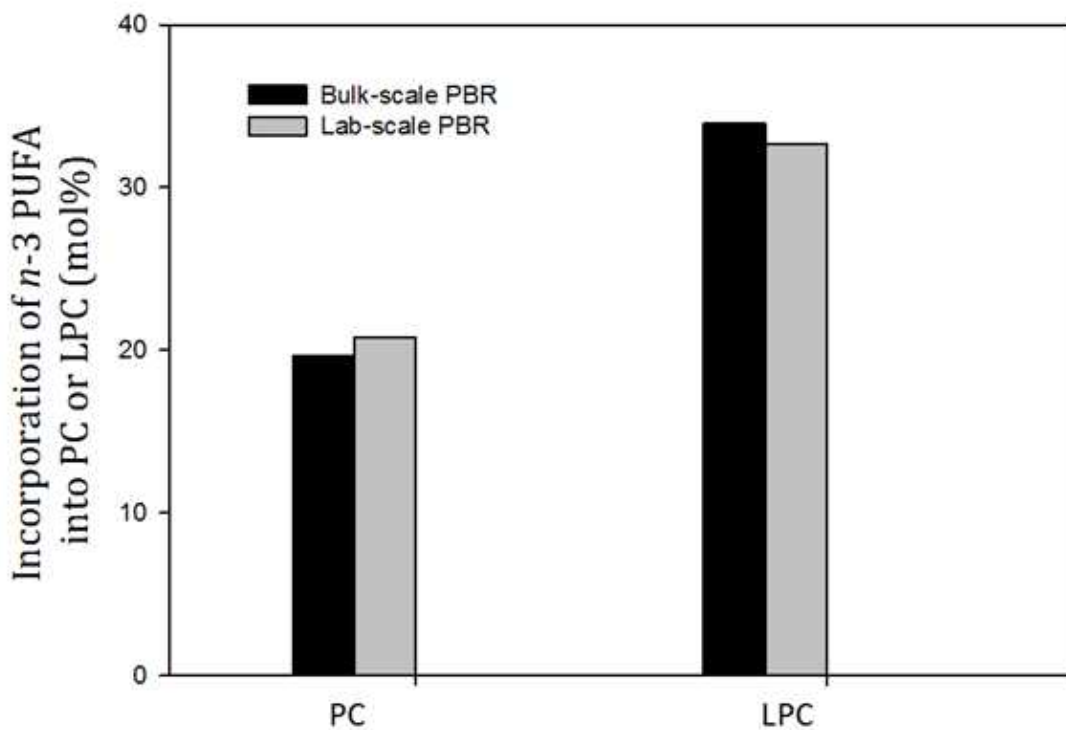


Figure 53. Incorporation of  $n-3$  polyunsaturated fatty acid (PUFA) into PC and LPC (mol%) from the acidolysis in a bulk-scale PBR as a function of residence time. The reaction was carried out at the temperature of 55°C, the molar ratio of 1:8 (PC:FA) and the water content of 1.0% (based on the substrate weight).

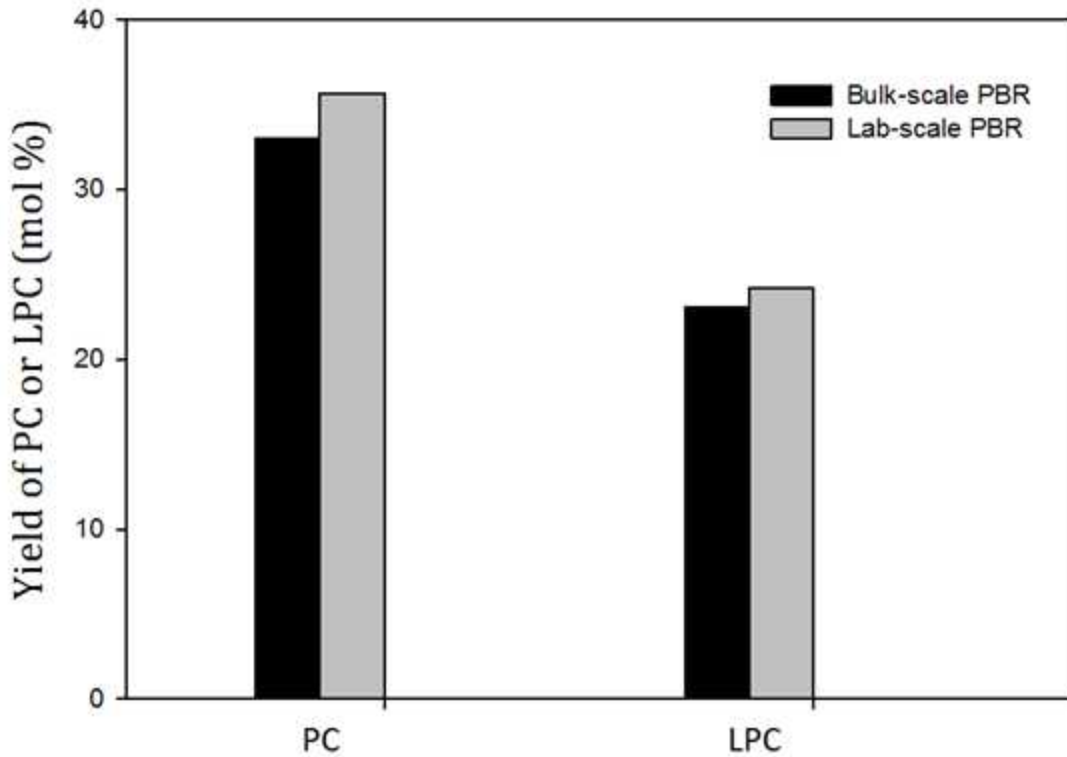


Figure 54. Yield of PC and LPC (mol%) from the acidolysis in a bulk-scale PBR as a function of residence time. The first 3 hours of reaction was carried out at the temperature of 55°C, the molar ratio of 1:8 (PC:FA) and the water content of 1.0% (based on the substrate weight).

(4) Bulk-scale에서 초임계 이산화탄소를 이용한 acidolysis 반응물로부터 기능성 PC의 분리 및 농축

Bulk-scale PBR에서 반응한 반응 생성물에서 기능성 PC의 분리 농축이 초임계이산화탄소를 이용하여 bulk-scale로 시도되었다. Lab-scale 초임계 이산화탄소를 이용한 지방산 추출의 경우 반응물 10g 기준으로 실험이 행해졌지만, bulk-scale 초임계 이산화탄소를 이용한 지방산 추출의 경우 반응물 100g 기준으로 실험이 수행되었다. Lab-scale과 bulk-scale에서의 결과를 비교하기 위하여 초임계 이산화탄소 추출 후 추출기 안에 추출되지 않고 남은 분획과 추출되어 나온 분획 각각 내의 PC, LPC, 지방산 조성을 조사하였고, 각 분획의 무게도 조사되었다 (Table 12, 13).

실험 결과, 추출되지 않고 남은 분획 내 PC, LPC, 지방산의 조성은 lab-scale 초임계 이산화탄소 추출 후 결과와 bulk-scale 초임계 이산화탄소 추출 후 결과에 큰 차이를 보이지 않았다. Lab-scale 초임계 이산화탄소 추출의 경우 추출되지 않고 남은 분획 내 PC의 함량이 initial (acidolysis 반응 생성물)과 비교하여 12 wt%에서 29 wt%로 증가하였고, 지방산 함량은

initial에 비해 80 wt%에서 36 wt%로 감소하였다. Bulk-scale 초임계 이산화탄소 추출의 경우 PC의 함량이 initial 12 wt%에서 43 wt%로 증가하였으며, 지방산 함량은 initial에 비해 80 wt%에서 36 wt%로 감소하였다.

추출되어 나온 분획의 경우 lab-scale 초임계 이산화탄소 추출과 bulk-scale 초임계 이산화탄소 추출 둘 다에서 그 조성이 100% 지방산이었음을 분석을 통해 확인하였다. 초임계 추출 후 추출되어 나온 분획과 추출되지 않고 남은 분획의 무게를 Table 13에 표시하였다. Lab-scale 초임계 이산화탄소 추출의 경우 PC가 농축되는 추출되지 않고 남은 분획의 무게가 처음 시료 무게 대비 약 37 wt%였음에 비해 bulk-scale 초임계 이산화탄소 추출의 경우 추출되지 않고 남은 분획의 무게가 처음 시료 무게 대비 약 29 wt%로 나타나 bulk-scale의 경우 lab-scale 보다 PC 농축 분획의 수율이 약간 낮은 것으로 나타났다.

전반적으로 볼 때, lab-scale과 bulk-scale의 결과가 거의 비슷한 것으로 보여져, bulk-scale 초임계 이산화탄소를 이용한 지방산 추출의 활용 가능성을 가늠할 수 있었다.

Table 12. Composition (wt%) of lipid classes in the reaction mixture after acidolysis reaction, and the residual fractions after lab-scale and bulk-scale supercritical carbon dioxide extraction

	Initial (Acidolysis reaction product)	Lab-scale SC-CO <sub>2</sub>	Bulk-scale SC-CO <sub>2</sub>
PC (wt%)	12.03	38.59	43.30
LPC (wt%)	7.80	21.18	20.66
FA (wt%)	80.16	40.23	36.05

Table 13. The weights of residual fraction and extracted fraction after lab-scale and bulk-scale supercritical carbon dioxide extraction

	Residual fraction (PC enriched)	Extracted fraction	Total
Lab-scale SC-CO <sub>2</sub> (g)	3.74	6.36	10
Bulk-scale SC-CO <sub>2</sub> (g)	29.07	70.93	100

(5) 초임계 이산화탄소를 이용하여 분리되는 PC 분획 및 Liquid-liquid fractionation을 이용한 지방산 및 LPC의 제거

초임계 추출이 끝난 후에 얻어진 PC 농축 분획이 liquid-liquid fractionation을 이용하여 bulk-scale로 시도되었다. Lab-scale liquid-liquid fractionation을 이용한 지방산 및 LPC 분리의 경우 반응물 0.5g 기준으로 실험이 행해졌지만, bulk-scale liquid-liquid fractionation을 이용한 지방산 및 LPC 분리의 경우 반응물 5g 기준으로 실험이 수행되었다. 이때 실험조건은 2차년도에 선정된 디클로로메탄을 사용하였다. Lab-scale과 bulk-scale에서의 결과를 비교하기 위하여 liquid-liquid fractionation 후 PC, LPC, 지방산 조성 및 PC의 수율을 조사하였다(Table 14).

실험 결과, 디클로로메탄내의 PC, LPC, 지방산의 조성은 lab-scale liquid-liquid fractionation 후 결과와 bulk-scale liquid-liquid fractionation 후 결과에 큰 차이를 보이지 않았다. Lab-scale liquid-liquid fractionation의 경우 디클로로메탄내 PC의 함량이 initial (초임계 추출 되지 않은 분획)과 비교하여 36 wt%에서 72 wt%까지 증가하였고, 지방산 함량은 initial에 비해 44 wt%에서 21 wt%까지 감소하였고, LPC 함량은 initial에 비해 18 wt%에서 5 wt%까지 감소하였다. Bulk-scale liquid-liquid fractionation의 경우 PC의 함량이 initial 36 wt%에서 68 wt%까지 증가하였으며, 지방산 함량은 initial에 비해 44 wt%에서 24 wt%까지 감소하였고, LPC 함량은 initial에 비해 18 wt%에서 6 wt%까지 감소하였다. Lab-scale liquid-liquid fractionation의 경우 PC의 수율은 21wt%였음에 비해 bulk-scale liquid-liquid fractionation의 경우 20 wt%로 나타나 bulk-scale의 경우 lab-scale 보다 PC 농축 분획의 수율이 약간 낮은 것으로 나타났다.

전반적으로 볼 때, lab-scale과 bulk-scale의 결과가 거의 비슷한 것으로 보여져, bulk-scale liquid-liquid fractionation을 이용한 지방산 및 LPC의 제거의 활용 가능성을 가늠할 수 있었다.

Table 14. Composition (wt%) of lipid classes in the reaction mixture after supercritical carbondioxide extraction, and the residual fractions after lab-scale and bulk-scale liquid-liquid fractionation.

	After	After liquid-liquid fractionation	
	SC-CO <sub>2</sub>	Lab-scale	Bulk-scale
PC	36.4	72.7	68.7
LPC	18.9	5.7	6.8
FA	44.7	21.7	24.5
Yield of PC	100.0	21.5	20.3

## 다. 요약

본 연구에서는  $n-3$  PUFA가 결합된 기능성 PC(Phosphatidyl choline)를 공장화 생산하기 위해 bulk-scale에서 실험을 지도하였다. 이를 위해 먼저 phospholipase A<sub>1</sub>을 1차년도에 선정한 최적 방법으로 고정화하였다. 이 효소를 이용하여 2차년도에 선정한 최적 조건으로, bulk-scale에서 회분식 및 연속식 반응 시스템인 Packed bed reactor (PBR)을 이용하여  $n-3$  지방산을 함유한 기능성 PC 합성하는 효소반응을 수행하였다. 그 결과 기질내 최적 수분함량은 1.0% (w/w), 최적 반응 온도는 55°C, 최적 기질의 물 비율은 1:8 (PC:지방산)로 선정되었다. 최적조건에서 residence time 120분에 생산된 반응산물의  $n-3$  PUFA가 결합된 PC의 함량은 20% (mol/mol), 이 때 PC의 수율은 33% (mol/mol)였다. 이 반응산물 내의 PC의 함량은 12% (w/w)였다. 이 반응산물에서 PC의 함량을 높이기 위해, Bulk scale에서 초임계 이산화탄소 이용하여 지방산을 제거하였다. 이를 위한 최적 조건으로 추출 압력 6000psi, 온도 45°C가 선정되었다. 초임계 추출이 끝난 후 추출되지 않고 남은 시료에서 PC의 함량은 acidolysis 반응 후 함량 12% (w/w)에서 43.3% (w/w)로 증가한 것이 확인되었다. 초임계 추출이 끝난 시료에서 잔류 지방산 및 LPC를 제거하기 위하여 liquid-liquid fractionation을 실시한 결과, PC 농축물에서 PC의 함량은 68.7% (w/w)이었고, 이는 초임계 추출 후 43.3% (w/w)와 비교하여 약 1.6배, acidolysis 반응 후 12% (w/w)과 비교하여 약 6배가량 농축된 값이었다. 종합하여볼 때, 최적조건에서 lab-scale과 bulk-scale의 결과가 거의 비슷한 것으로 보여져, bulk-scale에서  $n-3$  PUFA가 결합된 기능성 PC를 공장화 생산의 활용 가능성을 보일 수 있었다.

## 제 2절. 기능성 LPC의 효소적 합성 방법 개발

### 1 기능성 LPC의 합성 및 정제 방법 확립

#### 가. 재료 및 방법

##### (1) 반응 기작

Phosphatidylcholine (PC)의 가수분해를 통하여 LPC를 생산한다 (Figure 55.). 효소가 촉매가 되어 본 반응이 이루어지도록 한다.

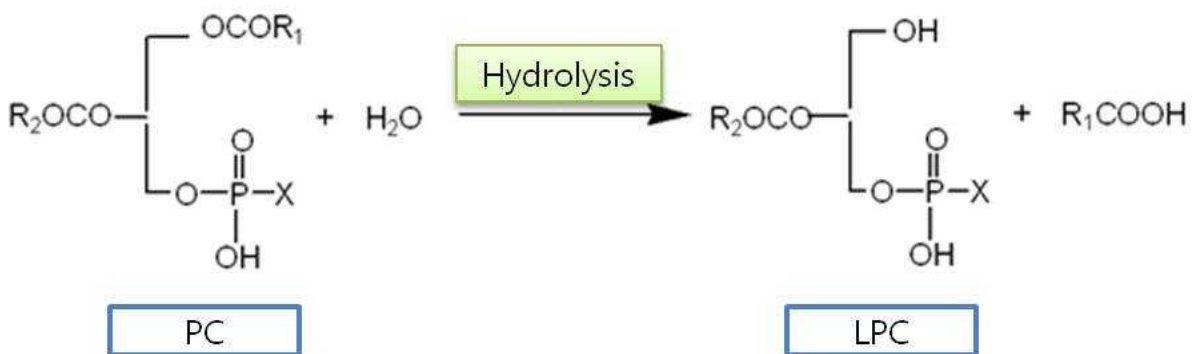


Figure 55. Scheme of synthesis of LPC from PC via enzymatic reaction

##### (2) 재료

###### (가) 기질

본 연구에서는 phosphatidylcholine (PC)를 phospholipase 또는 lipase 촉매 하에 가수분해하여 lysophosphatidylcholine (LPC)를 생산하였다. 본 연구에서는 대두(soybean)에서 유래한 PC(순도 95%)를 Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL, USA)에서 구입하여 사용하였다.

###### (나) 효소반응기

평면 바닥 (flat-bottom)과 water jacket을 가진 glass vessel (8cm × 3.5cm i.d.)을 사용하였다. 반응기 내부의 온도는 water jacket을 circulator (모델명 : AAA57001, Jeio Tech., Daejeon, Korea)에 연결하여 조절하였다.

###### (다) 반응매질

PC 가수분해반응의 매질로서 헥산(*n*-hexane)을 사용하였다. PC 1g 당 4mL의 헥산을 가하였다.

##### (3) 효소 반응 parameters

(가) 효소 : Novozyme사, Amano사 및 Meito사로부터 생산되는 상업용 phospholipase와 lipase 12종의 PC에 대한 가수분해능을 평가하여 LPC 생산에 적합한 효소를 선별하였다(Table 15).

- (나) 반응시간 : 효소를 반응촉매로 이용한 PC의 가수분해 시, LPC가 먼저 생성이 되고 LPC의 가수분해가 더 진행이 되었을 때 부산물로서 glycerylphosphatidylcholine (GPC)가 만들어지게 된다. 본 연구에서는 PC를 24시간 동안 가수분해하면서 LPC의 생성량을 최대로 하면서 동시에 GPC의 생성을 가능한 한 억제할 수 있는 최적 반응시간을 조사하였다.
- (다) 온도 : Phospholipase A<sub>1</sub>을 촉매로 한 가수분해 반응에서 최적온도로 알려진 50°C를 포함하여 40-60°C에서 최적온도를 결정하였다.
- (라) 기질의 수분함량 : PC의 가수분해를 위해서 필요한 물을 PC 무게의 5-30% 수준으로 첨가하였다.
- (마) 효소량 : PC 무게의 5-20% 수준으로 첨가하였다.

Table 15 Commercial enzymes used as biocatalysts for hydrolyzing phosphatidylcholine

Product name	Origin	Form	Manufacturer
<i>Phospholipase</i>			
Lecitase <sup>®</sup> ultra	<i>Thermomyces lanuginosus</i> / <i>Fusarium oxysporum</i>	Liquid	Novozyme
Lecitase <sup>®</sup> 10L	<i>Porcine pancreas</i>	Liquid	Novozyme
<i>Lipase</i>			
Lipozyme <sup>®</sup> RM IM	<i>Rhizomucor miehei</i>	Immobilized	Novozyme
Novozym 435	<i>Candida antarctica</i>	Immobilized	Novozyme
Lipozyme <sup>®</sup> TL IM	<i>Rhizomucor miehei</i>	Immobilized	Novozyme
Lipase-OF	<i>Candida rugosa</i>	Powder	Meito
Lipase AS	<i>Aspergillus niger</i>	Powder	Amano
Lipase M	<i>Mucor javanicus</i>	Powder	Amano
Lipase AK	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Powder	Amano
Lipase AYS	<i>Candida rugosa</i>	Powder	Amano
Lipase PS	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Powder	Amano
Lipase G	<i>Penicillium camembertii</i>	Powder	Amano

## 나. 결과 및 고찰

### (1) 효소선별

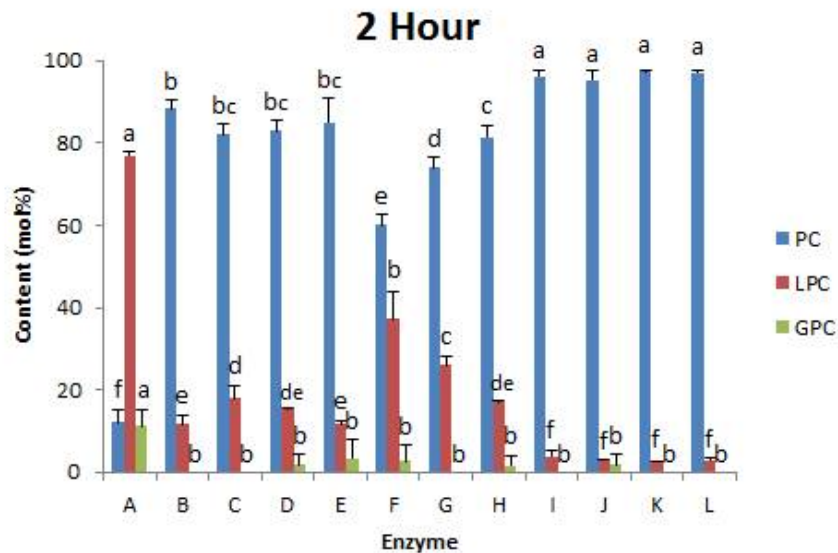
PC를 비롯한 인지질(phospholipids)은 phospholipase 뿐만 아니라 트리아실글리세롤(triacylglycerols)을 가수분해하는 효소인 lipase도 인지질에 대한 가수분해능이 있다는 것이 잘 알려져 있다. 본 연구는 PC를 효소를 이용한 가수분해 방법으로 LPC를 생산하고자 하였으므로 적합한 촉매 효소를 선별하기 위하여 2종의 상업용 phospholipase 외에도 10종의 상업용 lipase의 PC에 대한 가수분해능을 평가하였다. 이를 위해 PC를 각각 2시간 및 4시간 동안 가수분해를 한 후 반응산물에 존재하는 PC, LPC 및 GPC의 함량을 분석하였다(Figure 56).



본 실험에서 사용된 효소량은 Lecitase<sup>®</sup> 10L을 제외한 나머지 11종은 기질인 PC량의 10%로 동일하였다. 이에 비해서 Lecitase<sup>®</sup> 10L의 양은 다른 효소의 첨가량의 4.6%이었는데 이는 이 제품의 효소 농도가 2.5 v/w%이었기 때문이다.

PC를 2시간 동안 가수분해하였을 때 12종의 효소 중 phospholipase A<sub>1</sub>의 활성을 나타내는 Lecitase<sup>®</sup> ultra의 가수분해활성이 가장 높았다. Lecitase<sup>®</sup> ultra의 가수분해물의 LPC 함량은 76.8 mol%로 다른 11종의 효소 가수분해물의 LPC 함량(2.7~37.3 mol%)에 비해 유의적으로 ( $p < 0.05$ ) 높았다. 이 때 함께 생성되는 GPC의 함량은 11.1 mol%로 나타났다. 이에 반해 phospholipase A<sub>2</sub>의 활성을 나타내는 Lecitase<sup>®</sup> 10L의 PC 가수분해물의 LPC 함량은 11.6 mol%로 매우 낮았다. Lipozyme<sup>®</sup> RM IM, Novozym 435, Lipozyme<sup>®</sup> TL IM은 고정화 lipase로 이들의 LPC 생성량은 11.7~18.0 mol%이었다. Powder 상태로 시판되고 있는 7종의 lipase의 가수분해물의 LPC 함량은 2.7~37.3 mol%로 효소의 종류에 따라 가수분해능의 차이가 큰 것으로 판단되었다. PC를 4시간 가수분해하였을 경우에도 Lecitase<sup>®</sup> ultra(74.4 mol%)의 가수분해물의 LPC 함량이 Novozym 435(62.1 mol%)를 제외한 나머지 10종의 효소의 LPC 생성량(2.2~61.9 mol%)에 비해 유의적으로( $p < 0.05$ ) 높았다. 이 때 GPC 생성량은 7.9 mol%이었다.

따라서 12종의 효소의 PC에 대한 가수분해능을 조사한 결과, Lecitase<sup>®</sup> ultra의 LPC 생성량이 가장 높은 것으로 평가되었기 때문에 본 연구에서는 LPC 생산에 가장 적합한 효소로 선별하였고 이 효소의 가수분해반응의 최적조건을 이어서 확립하였다.



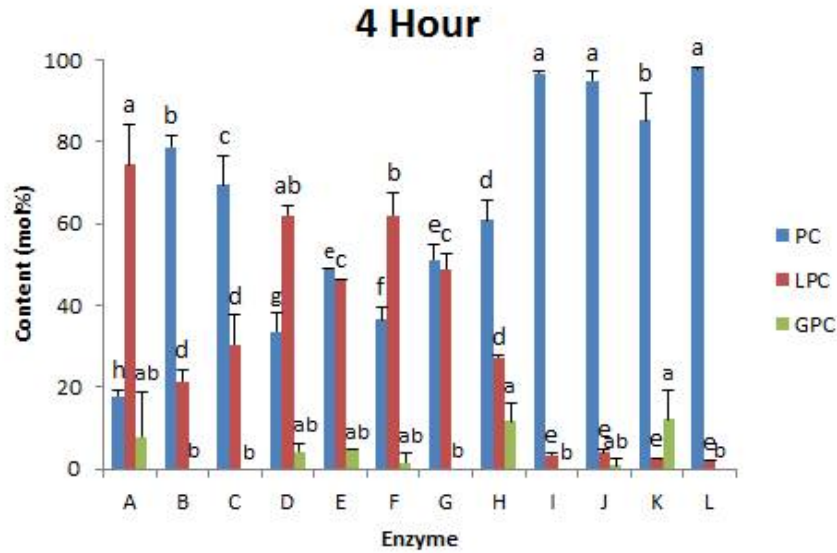


Figure 56. Phosphatidylcholine (PC), lysophosphatidylcholine (LPC) and glycerylphosphatidyl choline (GPC) contents of products obtained after 2 and 4 hours of PC hydrolysis mediated by various enzymes. Enzymes : A, Lecitase<sup>®</sup> ultra (from *Thermomyces lanuginosus/Fusarium oxysporum*); B, Lecitase<sup>®</sup> 10L (Porcine pancreas); C, Lipozyme<sup>®</sup> RM IM (from *Rhizomucor miehei*); D, Novozym 435 (from *Candida antarctica*); E, Lipozyme<sup>®</sup> TL IM (from *Rhizomucor miehei*); F, Lipase-OF (from *Candida rugosa*); G, Lipase AS (from *Aspergillus niger*); H, Lipase M (from *Mucor javanicus*); I, Lipase AK (from *Pseudomonas fluorescens*); J, Lipase AYS (from *Candida rugosa*); K, Lipase PS (from *Pseudomonas cepacia*); L, Lipase G (from *Penicillium camerberti*). Reaction parameter setup: Temperature, 50°C; PC amount, 5.0 g; water content, 0.5 g (10% of the total weight of PC); and enzyme amount, 0.5 g (10% of the total weight of PC).

## (2) Parameters별 합성 효과

### (가) 반응시간

PC의 가수분해에 의한 LPC 생산에 가장 적합한 효소로 선별된 Lecitase<sup>®</sup> ultra의 최적 반응조건을 확립하기 위하여 먼저 24시간 동안 PC를 가수분해하면서 반응시간에 따른 반응산물 내 PC, LPC 및 GPC의 함량의 변화를 조사하였다(Figure 57). 그 결과, 첫 2시간 동안 LPC의 생성량은 76.8 mol%로 급격하게 증가하였고 PC 함량은 12.1 mol%로 감소하였다. 이때 GPC 생성량은 1시간과 2시간 경과 후 각각 9.2 mol%, 11.1 mol%로 나타났다. 반응시간이 4시간으로 증가하였을 때 LPC와 GPC 함량은 각각 74.4 mol%, 7.9 mol%로 2시간 때의 생성량과 차이가 없었으며 PC 함량(17.7 mol%) 역시 큰 변화가 없었다. 반응이 8시간 경과했을 때에는 LPC 함량은 63.7 mol%로 감소하였고 대신 GPC 함량은 17.8 mol%로 증가하였

으며 8시간 이후에는 반응시간이 증가함에 따라 LPC 함량은 계속 감소하였고 이에 비례하여 GPC의 생성량은 증가하여 24시간 반응에서는 GPC 함량(55.5 mol%)이 LPC 함량(27.6 mol%)의 약 2배에 이르는 반응산물을 얻었다. 한편 PC 함량은 8시간 이후에는 16.9~23.6 mol%로 초기 2시간 반응과 유사한 수준을 유지하였다. 이러한 결과는 PC의 가수분해는 2시간 반응 이후에는 더 이상 일어나지 않고 그 이후에는 반응시간이 길어짐에 따라 LPC가 가수분해되어 GPC가 생성되는 것으로 추정된다. Lecitase<sup>®</sup> ultra는 phospholipase A<sub>1</sub>의 일종으로 PC의 *sn*-1 위치에 존재하는 지방산만을 선택적으로 가수분해하는 위치 특이성 (regiospecificity)을 갖고 있다. 따라서 이 PC가 Lecitase<sup>®</sup> ultra에 의해 가수분해되었을 때 *sn*-1-LPC가 주로 생성되고 *sn*-1-LPC에 잔존하는 *sn*-2 위치의 지방산은 Lecitase<sup>®</sup> ultra에 의해 분해가 되지 않는다. 그러나 *sn*-1-LPC는 아실기 이동현상(acyl migration)에 의해 구조 이성질체인 *sn*-2-LPC로 전환이 될 수 있고 *sn*-2-LPC는 Lecitase<sup>®</sup> ultra에 의해 다시 가수분해되어 GPC가 생성될 수 있다. 따라서 본 연구의 반응조건 하에서는 초기 2시간 내에 *sn*-1-LPC의 이성질화 반응이 일어나고 2시간 이후에는 PC 대신 LPC의 가수분해가 촉진되는 것으로 판단된다. 본 연구에서는 GPC의 생성을 억제하면서 LPC를 최대한 많이 생산할 수 있는 반응조건을 확립하는 것을 목표로 하고 있다. 따라서 최적 반응시간은 2시간으로 결정하였다.

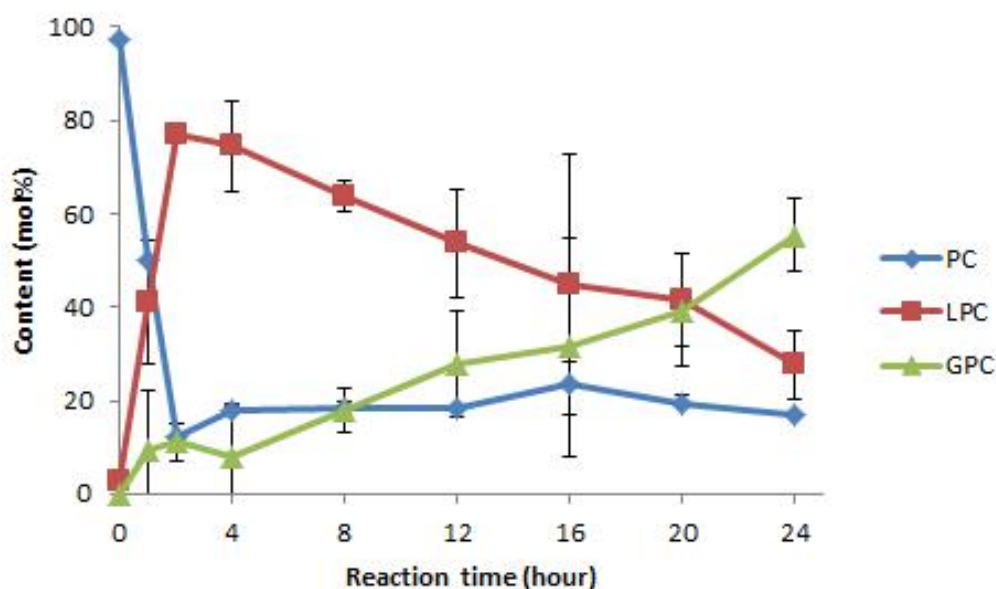
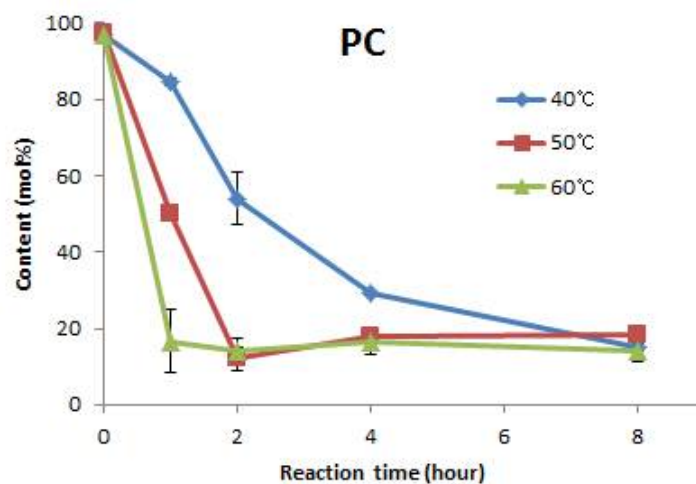


Figure 57. Phosphatidylcholine (PC), lysophosphatidylcholine (LPC) and glycerylphosphatidyl choline (GPC) contents of products obtained by Lecitase<sup>®</sup> ultra-catalyzed hydrolysis of PC as a function of reaction time. Reaction parameter setup: Temperature, 50°C; PC amount, 5.0 g; water content, 0.5 g (10% of the total weight of PC); and enzyme amount, 0.5 g (10% of the total weight of PC).

(나) 온도

Lecitase<sup>®</sup> ultra를 촉매로 한 PC의 가수분해 반응에서 최적온도를 결정하기 위해서 온도(40, 50, 60°C)에 따른 반응산물 내 PC, LPC 및 GPC의 함량을 비교하였다(Figure 58). 조사한 반응시간은 1, 2, 4, 8시간이었다. 40°C에서는 PC 함량이 1시간부터 8시간까지 지속적으로 감소한 반면에 50°C에서는 2시간까지 급격하게 감소한 후 4시간과 8시간에서는 2시간과 유사한 PC 함량을 나타내었으며 60°C에서는 1시간부터 PC 함량이 최저를 나타낸 후 8시간까지 비슷한 수준을 유지하였다. 따라서 온도가 증가함에 따라 PC의 가수분해 속도가 증가하는 것으로 판단된다. LPC의 생성량은 전반적으로 40°C에서 가장 낮게 나타났다. 50°C와 60°C에서의 LPC 함량의 변화를 비교해 보면 1시간에서는 60°C에서의 LPC 생성량이 다소 많았으나 2시간에서 50°C와 60°C 모두 최대 함량에 도달하였고 서로 간에는 유의적인 차이가 없었다. GPC 함량은 조사한 반응시간의 범위 내에서는 온도에 따른 유의적인 차이가 없었다. 따라서 60°C에서 Lecitase<sup>®</sup> ultra의 가수분해능이 가장 높게 나타나고 LPC 생성량도 가장 많은 것으로 평가되었다. 50°C의 경우 비록 1시간 반응에서는 Lecitase<sup>®</sup> ultra의 활성이 떨어지는 것으로 평가되었으나 2시간에서는 60°C와 유사한 수준의 PC, LPC, GPC 함량을 나타내었다. 또한 본 연구의 궁극적인 목표인 기능성 LPC 소재의 산업화를 위해서는 경제적인 반응조건을 확립할 필요가 있기 때문에 50°C를 최적 온도로 결정하였다.



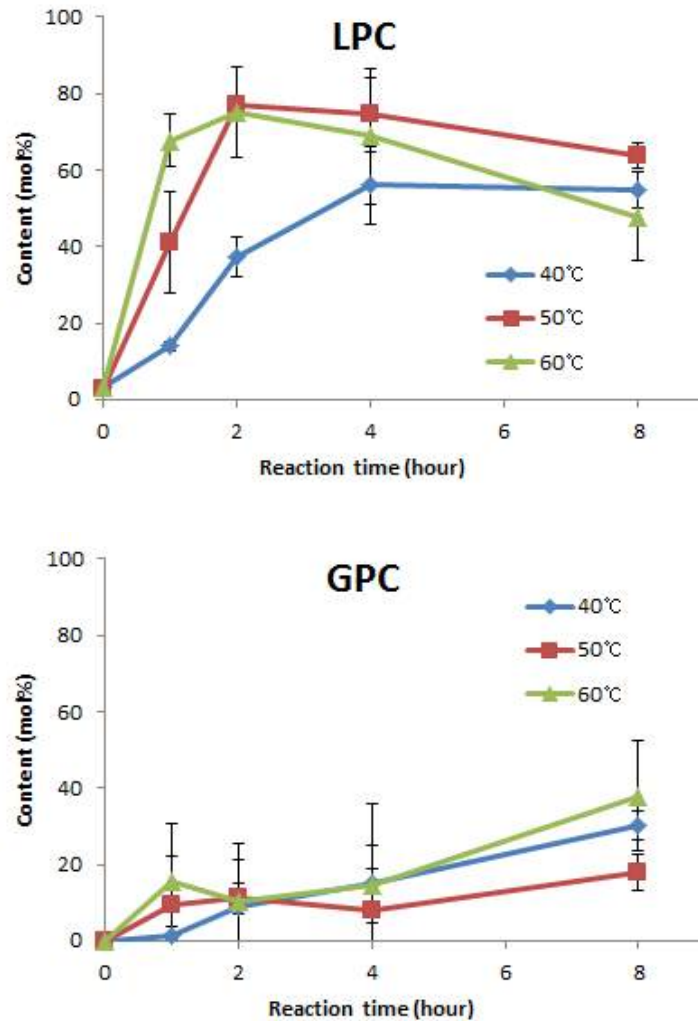


Figure 58. Effect of temperature on the phosphatidylcholine (PC), lysophosphatidylcholine (LPC) and glycerylphosphatidyl choline (GPC) contents of products obtained by Lecitase<sup>®</sup> ultra-catalyzed hydrolysis of PC. Reaction parameter setup: PC amount, 5.0 g; water content, 0.5 g (10% of the total weight of PC); and enzyme amount, 0.5 g (10% of the total weight of PC).

(다) 기질의 수분함량

Lecitase<sup>®</sup> ultra를 촉매로 한 PC의 가수분해 반응에 필요한 물의 최적 첨가량을 결정하기 위해 기질의 수분함량(PC 무게 대비 5, 10, 15, 20, 25, 30%)에 따른 반응산물 내 PC, LPC 및 GPC의 함량을 분석하였다(Figure 59). 조사한 반응시간은 1, 2, 4, 8시간이었다. PC 함량은 5%의 수분함량에서 전반적으로 가장 낮게 나타났다. 반면에 수분함량이 10% 이상일 때는 반응시간 별로 PC 함량 간에 서로 유의적인 차이가 없었다. 마찬가지로 LPC 함량은 1~4시간의 반응에서 수분함량이 5%일 때 가장 낮았으며 10~30% 수분함량에서는 서로 비슷한 양의 LPC가 생성되었다. GPC 함량은 전반적으로 수분함량 간에 큰 차이가 없었다. 따라서 본 연구에서는 기질량 대비 10%를 최적 수분함량으로 결정하였다.

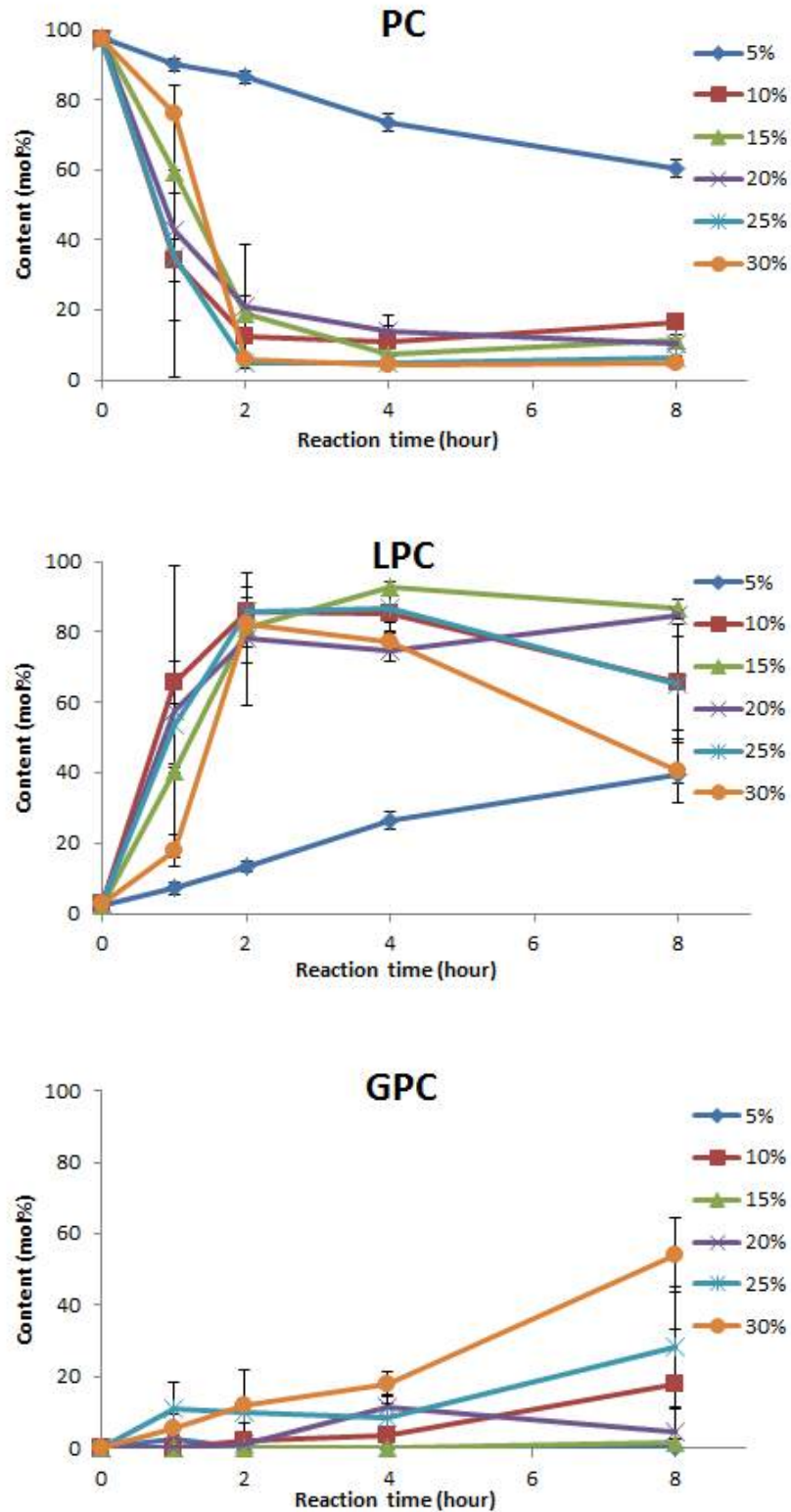


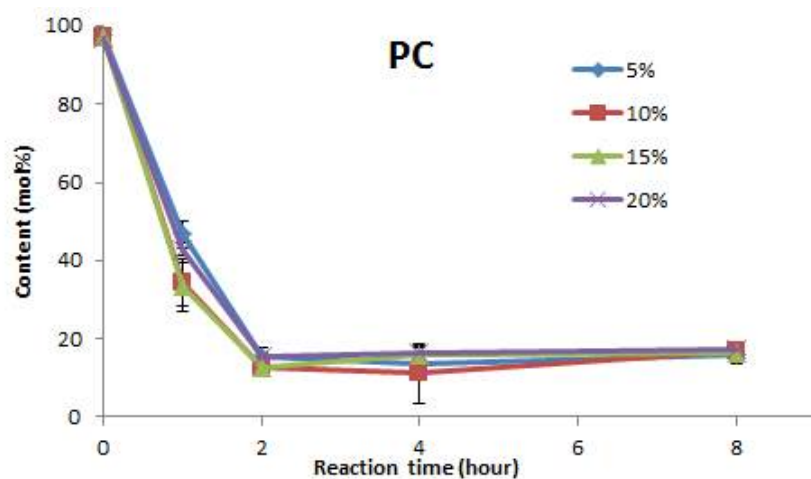
Figure 59. Effect of water content on the phosphatidylcholine (PC), lysophosphatidylcholine (LPC) and glycerylphosphatidyl choline (GPC) contents of products obtained by Lecitase<sup>®</sup> ultra-catalyzed hydrolysis of PC. Reaction parameter



setup: Temperature, 50°C; PC amount, 5.0 g; and enzyme amount, 0.5 g (10% of the total weight of PC).

(라) 효소량

기능성 LPC 소재의 산업화를 위해서는 경제적인 반응조건을 확립해야 하며 이를 위해서는 효소의 사용량을 가능한 줄이는 것이 필요하다. 따라서 Lecitase<sup>®</sup> ultra를 촉매로 한 PC의 가수분해 반응에서 최적 효소량을 결정하기 위해 효소량(PC 무게 대비 5, 10, 15, 20%)에 따른 반응산물 내 PC, LPC 및 GPC의 함량을 비교하였다(Figure 60). 조사한 반응시간은 1, 2, 4, 8 시간이었다. PC 함량은 조사한 효소량 모두에서 PC 함량 간에 유의적인 차이가 없었다. LPC 함량은 1시간과 2시간에서는 효소량 간에 서로 유의적인 차이가 없었으나 4시간에서는 15%와 20%의 LPC 함량이 5%와 10%보다 유의적으로( $p < 0.05$ ) 낮았다. 그러나 8시간에서는 다시 효소량 간에 LPC 함량은 서로 유의적인 차이가 없었다. 이러한 결과는 효소량이 증가함에 따라 LPC의 가수분해가 일어나는 시점이 빨라지기 때문에 나타나는 것으로 판단된다. GPC 생성량은 4시간 이후에서 5%와 10%에 비해서 15%와 20%에서 상대적으로 높았으나 유의적인 차이는 아니었다. 결과적으로 기질량 대비 5% 수준으로 Lecitase<sup>®</sup> ultra를 사용하여도 효율적인 LPC 생산이 가능할 것으로 평가되었다.



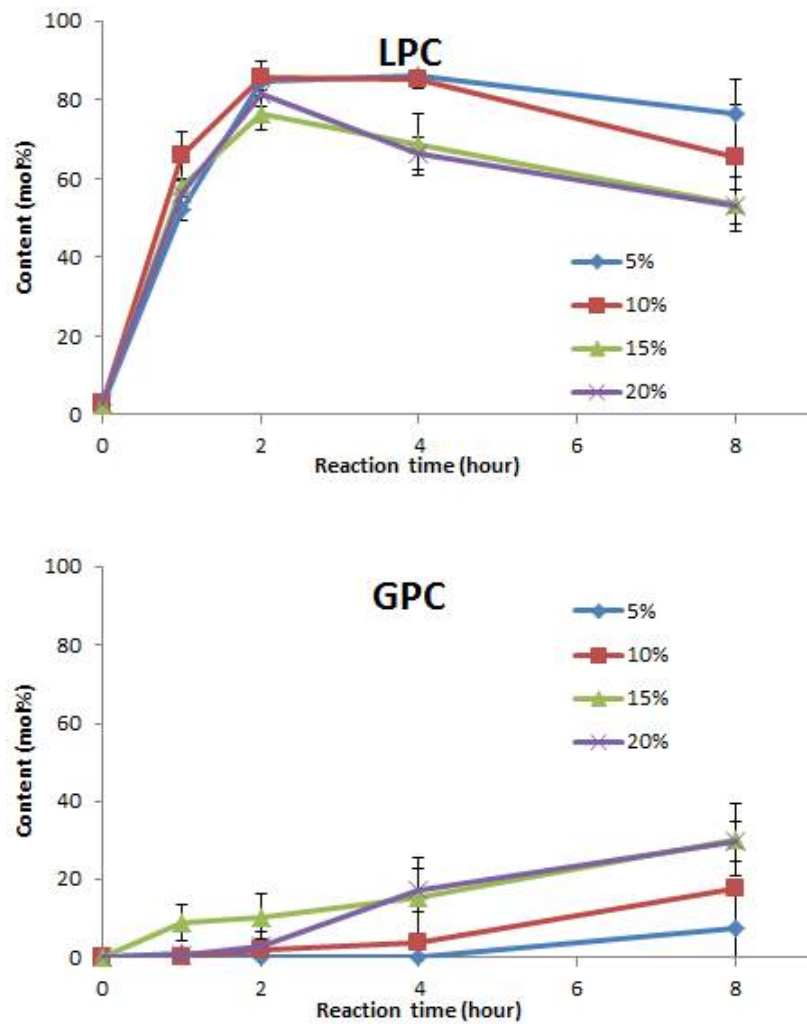


Figure 60. Effect of enzyme amount on the phosphatidylcholine (PC), lysophosphatidylcholine (LPC) and glycerylphosphatidyl choline (GPC) contents of products obtained by Lecitase<sup>®</sup> ultra-catalyzed hydrolysis of PC. Reaction parameter setup: Temperature, 50°C; PC amount, 5.0 g; and water content, 0.5 g (10% of the total weight of PC).



## 2. *sn*-1-LPC의 합성 및 정제 방법 확립

### 가. 재료 및 방법

#### (1) 실험의 구도

##### (가) *sn*-1-LPC의 합성 원리(Figure 61)

Soy PC의 *sn*-1 지방산을 가수분해하여 *sn*-1-LPC를 합성한다. 가수분해 반응의 촉매제로 *sn*-1 위치 특이성을 나타내는 phospholipase A<sub>1</sub> (PLA<sub>1</sub>)을 사용한다. 헥산(*n*-hexane)을 반응 매질로 사용한다.

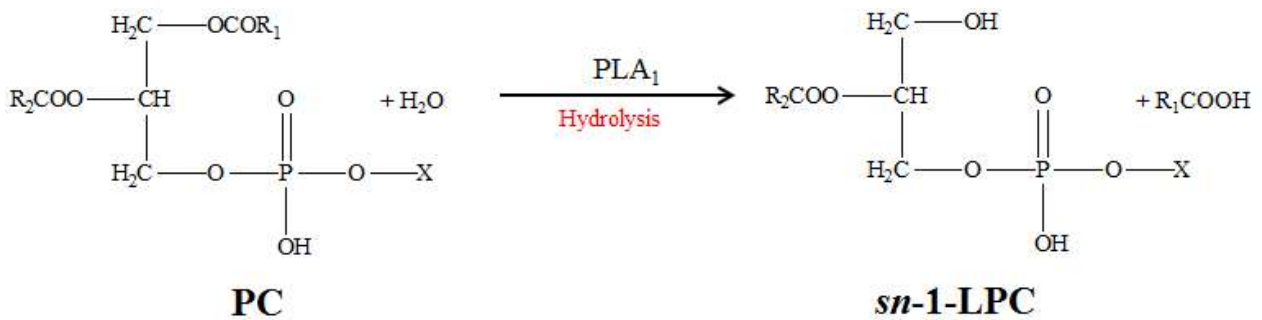


Figure 61. Phospholipase A<sub>1</sub> (PLA<sub>1</sub>)-catalyzed hydrolysis of phosphatidylcholine (PC) for producing *sn*-1-lysophosphatidylcholine (LPC)

##### (나) *sn*-1-LPC 합성을 위한 최적 반응조건 확립의 필요성(Figure 62)

PLA<sub>1</sub>을 이용하여 PC를 가수분해 시 부반응(side reaction)으로 아실기 이동(acyl migration)이 일어난다. 아실기 이동은 *sn*-2 위치의 아실기가 *sn*-1 위치로 이동하는 현상이다. 아실기 이동현상은 *sn*-1-LPC의 합성 과정에서 *sn*-2-LPC가 함께 생성되는 원인이 된다. *sn*-2-LPC는 PLA<sub>1</sub>에 의해 가수분해 되어 glycerophosphatidylcholine (GPC)을 생성한다. 결과적으로 PLA<sub>1</sub> 촉매 가수분해반응 중 아실기 이동현상이 많이 일어나면 부산물로서 GPC의 생성량이 증가한다. GPC 생성량의 증가는 *sn*-1-LPC의 순도와 수율을 감소시키며 *sn*-1-LPC의 정제를 어렵게 하는 원인이 된다. 아실기 이동현상은 온도, 반응시간, 기질의 수분함량 등에 의해 영향을 받는다. 따라서 아실기 이동현상을 최소화시킬 수 있는 최적 반응조건 확립이 필요하다.

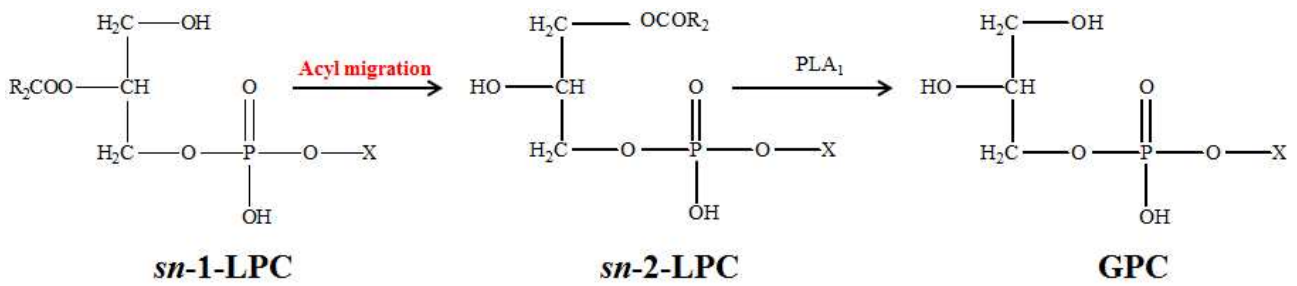


Figure 62. A side reaction called acyl migration occurs during Phospholipase A<sub>1</sub> (PLA<sub>1</sub>)-catalyzed hydrolysis of phosphatidylcholine (PC)

(다) *sn*-1-LPC의 분리정제 방법 확립의 필요성

PLA<sub>1</sub>을 반응촉매로 이용한 soy PC의 가수분해 시 반응산물 내에 분해되지 않은 PC와 유리된 지방산이 *sn*-1-LPC와 혼재되어 있다. 유리지방산(free fatty acids, FFA)은 반응산물의 산화안정성과 극성도를 감소시키며 이는 *sn*-1-LPC의 저장성 및 유향 특성 등의 제품 적용성에 영향을 미치므로 *sn*-1-LPC의 분리정제가 필요하다. 일반적으로 LPC는 PC 또는 FFA에 비해 극성도가 높다. 따라서 극성도가 서로 다른 두 가지 용매를 이용하여 분획하는 용매-용매 추출법(liquid-liquid extraction) 또는 비극성의 초임계 유체를 활용한 초임계 추출법(supercritical fluid extraction)을 이용하여 반응산물 내의 *sn*-1-LPC를 PC와 FFA로부터 분리하는 것이 가능할 것으로 예상된다.

(2) 재료

(가) 기질

- ① 본 반응의 기질로 사용된 PC (granulated phosphatidylcholine, 순도 >95%, from soybean)는 Avanti Polar-Lipids, Inc. (Alabaster, AL, USA)에서 구입하였다.
- ② PLA<sub>1</sub> (Lecitase<sup>®</sup> Ultra)은 *Thermomyces lanuginosus*/*Fusarium oxysporum*에서 유래된 액상효소로서 Novo Nordisk Bioindustry Ltd. (Franklinton, NC, USA)에서 구입하였으며 본 반응의 촉매제로 이용하였다.
- ③ 회분식 효소반응기 : 평면 바닥(flat-bottom)과 water jacket을 가진 glass vessel (8cm × 3.5cm i.d.)을 사용하였다. 반응기 내부의 온도는 water jacket을 circulator (모델명: AAA57001, Jeio Tech., Daejeon, Korea)에 연결하여 조절하였다. 효소반응의 스케일업(scale-up) 실험에는 평면 바닥과 water jacket을 가진 glass vessel (11cm × 10cm i.d.)을 사용하였다.

(3) 효소반응

PLA<sub>1</sub>을 반응촉매로 이용한 PC의 가수분해 시, *sn*-1-LPC가 먼저 생성이 되고 *sn*-1-LPC의 가수분해가 더 진행이 되었을 때 아실기 이동현상이 일어나 부산물로서 GPC가 만들어지게 된다. 본 연구에서는 PC를 가수분해하여 *sn*-1-LPC의 생성량을 최대로 하면서 동시에 GPC의 생성을 가능한 한 억제할 수 있는 최적 반응조건을 조사하였다. PC 4g을 반응기질로 이용한

small-scale 반응에서 최적 반응조건을 확립하였다. 확립된 최적 반응조건에서 PC 40g을 반응 기질로 이용한 larger scale 반응을 실시하여 *sn*-1-LPC의 생성량과 GPC의 생성 유무를 조사하였다. 반응매질인 헥산의 양은 small-scale 반응에서 16mL, larger scale 반응에서는 160mL 이었다.

#### (4) 반응산물로부터 효소의 제거

반응산물의 조성분석을 위하여 small-scale 또는 larger scale로 생산한 반응산물 0.18g을 취하여 2mL methanol:chloroform (1:1, v/v)에 용해한 후 0.45 $\mu$ m GH Polypro syringe filter (13mm)로 여과하여 PLA<sub>1</sub>을 제거하였다. 본 2세부과제의 LPC 정제실험과 3세부과제의 LPC 유효특성 확인실험에는 larger scale로 생산한 반응산물을 사용하였다. 이를 위해 larger scale로 생산된 반응산물을 800mL methanol:chloroform (1:1, v/v)에 용해한 후 0.45 $\mu$ m GH Polypro syringe filter (47mm)로 여과하여 PLA<sub>1</sub>을 제거하였다.

#### (5) 분석

##### (가) 반응산물의 조성분석

① 유리지방산 함량 : 반응산물의 유리지방산 함량은 AOCS official method Ca 5a-40에 따라 분석하였다.

② Thin layer chromatography (TLC) 및 gas chromatography-flame ionization detector (GC-FID) 분석

TLC 분석 시, 효소를 제거한 반응산물을 chloroform 250 $\mu$ L에 녹인 후 TLC plate (silica gel 60 F254, Merck, Germany)에 loading한 후 클로로포름/메탄올/아세트산/물(75:40:8:3, v/v/v/v)을 이용하여 전개하였다. Plate에서 분리된 PC, *sn*-1-LPC, GPC 및 FFA 밴드 중 PC와 *sn*-1-LPC를 scrap하여 회수한 후 내부표준물질 (C11:0) 2mg을 넣고 14% Boron fluoride in methanol을 이용하여 methylation시키고 GC-FID 시스템을 이용하여 지방산 조성을 분석하였다.

GC-FID 분석 시, Agilent technologies 7890A gas chromatograph (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, USA)와 Supelco사 SP-2560(100m  $\times$  0.25mm, film thickness 0.2 $\mu$ m) capillary column을 사용하였으며 분석조건은 injector 온도 225 $^{\circ}$ C (split 50:1), 오븐온도는 100 $^{\circ}$ C에서 4분 정지, 분당 3 $^{\circ}$ C의 속도로 240 $^{\circ}$ C까지 상승 후 17분 정지, FID 온도는 285 $^{\circ}$ C, 이동상은 헬륨(1mL/min)이었다.

PC와 *sn*-1-LPC의 지방산 조성으로부터 반응산물의 PC, *sn*-1-LPC 및 GPC의 함량을 mol%로 계산하였다.

③ High performance liquid chromatography-evaporative light scattering detector (HPLC-ELSD) 분석

HPLC-ELSD 분석에 사용한 시료는 효소를 제거한 반응산물을 96% 메탄올에 1mg/mL로 용해 후 0.45 $\mu$ m GH Polypro syringe filter (47mm)로 여과하여 준비하였다. HPLC-ELSD의 이동상으로는 100% 메탄올 (A)과 water (B)의 gradient system을 사용하였다. Gradient

는 A의 비율 96-93% (0-15분), 93% (15-25분), 93-96% (25-30분), 96% (30-35분)로 순차적으로 조절하였다. Lichrosorb<sup>®</sup> Si 60 (5 $\mu$ m, 250 × 4.0mm) 컬럼을 이용하였으며 컬럼의 온도는 35°C로 유지하였다. 시료 주입량은 20 $\mu$ L, 이동상의 유속은 1mL/min이었다. ELSD의 drift tube 온도는 60°C였으며 질소는 1.5L/min의 유속으로 공급하였다. 반응산물의 PC, *sn*-1-LPC 및 GPC의 함량은 mol% 또는 wt%로 계산하였다.

(나) 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)

RSM은 복수의 변수(독립변수) 작용으로 반응(종속변수)이 복합적으로 나타나는 문제를 분석하는 방법으로 반응량이 최적화될 수 있는 독립변수의 조합을 찾는 데 유용한 통계기법이다. RSM은 회귀 분석법(regression analysis)의 일종으로 인과 관계가 있는 두 변수(즉, 독립변수와 종속변수) 사이에서 한 변수가 다른 변수에 미치는 영향력을 알아보기 위해 사용한다. 특히 1개의 종속변수와 2개 이상의 독립변수 사이의 인과 관계를 규명하는데 사용하는 다중(multiple) 회귀 분석의 일종이다. RSM은 stat-Ease의 design expert 8.0 (Minneapolis, MN, USA)을 이용하여 실시하였다. RSM의 원리를 이용하여 *sn*-1-LPC의 생성량을 최대로 증가시키고 GPC의 생성을 최소화할 수 있는 최적 반응조건을 설정하였다. 중심합성계획법 중 축점(star point)이 면에 있는 면 중심 설계 즉, central composite face-centered (CCF) design을 이용하여 실험을 설계하였다. *sn*-1-LPC의 최적 합성조건 설정을 위한 독립변수(independent variables)는 온도(40-60°C), 반응시간(1-7h), 기질의 수분함량(10-30%) 및 효소량(1-7%)이었으며 종속변수(dependent variables)는 반응산물의 *sn*-1-LPC 함량(mol%)과 GPC 함량(mol%)이었다. 각 독립변수의 실험범위를 +1, 0, -1의 3단계로 부호화하고 요인점(factorial point) 16개, 축점 8개, 중심점(center point) 3개를 포함한 27개의 조건을 설정한 후 각각의 조건에서 효소반응을 실시하였다. 위의 4개의 반응조건이 *sn*-1-LPC 함량과 GPC 함량에 미치는 영향을 예측하는 2차 다항 회귀모형(second-order regression model)은 아래의 식과 같다.

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^4 b_i X_i + \sum_{i=1}^4 b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^4 b_{ij} X_i X_j$$

Y는 종속변수, 즉 *sn*-1-LPC 함량과 GPC 함량이고,  $X_i$ 는 독립변수로, 온도, 반응시간, 기질의 수분함량 및 효소량이었다.

(6) *sn*-1-LPC의 분리정제

(가) 용매-용매 추출법(liquid-liquid extraction)

PLA<sub>1</sub>을 반응축매로 이용한 soy PC의 가수분해 시 반응산물 내에 PC, GPC와 FFA가 *sn*-1-LPC와 혼재되어 있다. 극성도가 서로 다른 두 가지 용매를 반응산물에 가하고 분별깔대기를 이용하여 일정시간 동안 층 분리하여 *sn*-1-LPC, PC, GPC 및 FFA를 분획하고자 하였다. 본 연구에서는 두 가지 서로 다른 조합의 용매를 사용하였다. 50% 에탄올/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(3:1, v/v): *sn*-1-LPC는 50% 에탄올 층으로, PC와 FFA는 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 층으로 분획될 것으로 예상하

였다. 물/헥산(1:1, v/v): *sn*-1-LPC는 물 층으로, PC와 FFA는 헥산 층으로 분획될 것으로 예상하였다.

(나) 초임계 추출법(supercritical fluid extraction)

본 연구에서는 초임계 이산화탄소(supercritical carbon dioxide)를 이용하여 반응산물로부터 *sn*-1-LPC와 PC를 선택적으로 분리하고자 하였다. 본 연구에서 사용한 초임계 추출장치 (Figure 63)



Figure 63. Supercritical carbon dioxide extraction system used in the present study.

(다) 분리조건

- ① 시료량: 약 18g
- ② 압력변화: 1,550-5,000psi
- ③ 온도: 50°C

나. 결과 및 고찰

(1) 모델 적합성 검증(model fitting)

PLA<sub>1</sub>을 생체촉매로 이용하여 PC의 가수분해 시, 반응조건에 따른 *sn*-1-LPC와 GPC의 생성량의 변화를 통계적으로 모델링하고 확립된 모델식을 이용하여 *sn*-1-LPC의 생성량을 최대로 증가시키고 GPC의 생성을 최대로 억제하는 최적 반응조건을 설정하기 위하여 반응표면분석법을 이용하였다. 반응표면분석을 위한 중심합성계획법 중 central composite face-centered (CCF) design을 이용하여 실험을 설계하였다. 반응온도(Te), 반응시간(RT), 기질의 수분함량(WC) 및 효소량(En)의 네 개의 반응조건을 독립변수로 사용하여 -1, 0, 1로 부호화하였고 PC를 PLA<sub>1</sub>으로 가수분해하여 생성되는 *sn*-1-LPC 함량과 GPC 함량을 종속변수로 하여 생성 모델에 적용하였다. 독립변수의 범위로 반응온도는 40-60°C, 반응시간은 1-7시간, 기질의 수분함량은 10-30%, 효소량은 기질량의 1-7%이었으며 이상의 범위는 1차년도 연구결과를 바탕으로 결정하였다.

본 연구에서 이용한 CCF design에 따라 요인점(factorial point) 16개, 축점(star point) 8개,

중심점(center point) 3개를 포함한 27개의 조건을 설정하여 2회 반복 실험하였다. 설정된 27개의 반응조건과 각 조건에서의 반응산물의 *sn*-1-LPC 함량과 GPC 함량은 Table 16에 나타내었다. 반응산물의 *sn*-1-LPC 함량의 범위는 3.6-94.4mol%이고 GPC 함량의 범위는 0-36.0mol%이었다. *sn*-1-LPC 함량은 온도가 증가함에 따라 대체로 증가하는 경향을 나타내었는데 이러한 결과는 PLA<sub>1</sub>의 활성도가 온도에 의해 직접적으로 영향을 받는다는 사실에 기인하기도 하지만 그 보다는 온도에 따른 PC의 물리적 상태가 더 직접적인 요인으로 작용한 것으로 판단되었다. 즉, 반응시간 초기에는 PC와 효소의 혼합물의 점성이 높고 서로 뭉쳐있는 상태로 존재하여 PC와 효소가 충분히 혼합이 되지 않는 현상이 나타났는데 반응이 진행됨에 따라 *sn*-1-LPC이 생성량이 증가하면서 이러한 현상은 점차 사라졌다. PC와 효소가 충분히 혼합되지 않는 현상이 지속되는 시간은 반응계의 온도가 높을수록 PC와 효소의 혼합물의 점성이 감소하여 PC와 효소의 혼합이 보다 용이해지기 때문이다. 한편 반응시간이 길어짐에 따라 *sn*-1-LPC 함량은 일정수준까지 증가하다가 다시 감소하였으며 *sn*-1-LPC 함량이 감소하는 시점부터 대신 GPC 생성량이 증가하는 경향이 나타났다. 이는 생성된 *sn*-1-LPC에서 아실기 이동이 일어나 *sn*-2-LPC가 만들어지고 *sn*-1 위치의 아실기가 PLA<sub>1</sub>에 의해 분해되기 때문인 것으로 판단되었다.

Table 16. Central composite face-centered design arrangement and responses for the phospholipase A<sub>1</sub>-catalyzed hydrolysis of phosphatidylcholine for producing *sn*-1-lysophosphatidylcholine

Exp. no.	Factor				Response	
	Te (°C)	RT (h)	WC (%)	En (%)	<i>sn</i> -1-LPC content (mol%)	GPC content (mol%)
1	40	1	10	1	3.6 ± 1.2 <sup>a</sup>	
2	60	1	10	1	18.0 ± 10.8	
3	40	7	10	1	42.0 ± 1.2	
4	60	7	10	1	83.5 ± 1.0	0.6 ± 0.8
5	40	1	30	1	3.6 ± 0.8	
6	60	1	30	1	71.9 ± 20.6	16.0 ± 20.3
7	40	7	30	1	85.4 ± 2.8	7.3 ± 4.7
8	60	7	30	1	75.3 ± 15.4	20.7 ± 16.5
9	40	1	10	7	9.6 ± 6.0	0.8 ± 1.1
10	60	1	10	7	56.5 ± 14.3	
11	40	7	10	7	85.6 ± 1.3	1.1 ± 1.5
12	60	7	10	7	68.2 ± 3.3	16.5 ± 2.5
13	40	1	30	7	6.0 ± 1.4	
14	60	1	30	7	94.4 ± 2.8	
15	40	7	30	7	76.8 ± 18.1	2.0 ± 2.8
16	60	7	30	7	59.5 ± 16.2	36.0 ± 17.4
17	40	4	20	4	36.6 ± 9.1	
18	60	4	20	4	88.2 ± 4.2	6.6 ± 5.5
19	50	1	20	4	19.3 ± 5.1	
20	50	7	20	4	84.9 ± 8.1	9.8 ± 8.2
21	50	4	10	4	84.6 ± 3.4	2.4 ± 3.4
22	50	4	30	4	74.8 ± 0.6	20.7 ± 0.1
23	50	4	20	1	86.7 ± 4.0	8.0 ± 3.3
24	50	4	20	7	93.6 ± 1.5	
25	50	4	20	4	84.1 ± 6.9	9.7 ± 5.4
26	50	4	20	4	92.0 ± 0.8	2.5 ± 0.5
27	50	4	20	4	94.0 ± 0.4	

<sup>a</sup> Mean ± standard deviation (*n*=2)

Abbreviations: Te, temperature; RT, reaction time; WC, water content (of the total weight of PC); En, enzyme loading (of the total weight of PC); *sn*-1-LPC, *sn*-1-lysophosphatidylcholine; and GPC, glycerophosphatidylcholine.

위의 반응표면 분석 결과를 바탕으로 얻어진 반응온도(Te), 반응시간(RT), 기질의 수분함량(WC) 및 효소량(En)에 따른 반응산물의 *sn*-1-LPC 함량과 GPC 함량의 2차 다항 회귀모형의 적합성(goodness-of-fit)을 평가하기 위하여 분산분석(Analysis of Variance, ANOVA)을 실시하였다(Table 17). *sn*-1-LPC 함량의 회귀모형은 1% 유의수준에서 통계적으로 유의하였다. 또한 이 모델식의 적합결여(lack of fit)의 *p*-value는 0.0814이었다. 적합결여 검정은 선형 회귀모형이 타당한지, 즉 독립변수 *X*와 종속변수 *Y* 사이의 함수관계를 단순 회귀모형으로 표현하는 것이 적절한지를 검정하는 통계기법이다. 따라서 상기 네 개의 반응인자와 *sn*-1-LPC 함량의 관계를 나타낸 회귀모형은 5% 유의수준에서 적합한 것으로 평가되었다. GPC 함량에 대한 회귀모형 또한 *sn*-1-LPC 함량에 대한 회귀모형과 마찬가지로 1% 유의수준에서 통계적으로 의미가 있었고 5% 유의수준에서 적합결여가 없음(*p*-value = 0.5084)을 확인하였다.

Table 17. ANOVA table

Variable	df	SS	MS	<i>F</i> -value	<i>p</i> -value
<i>sn</i> -1-LPC content					
Corrected total	26	26606.71			
Model	4	20062.44	5015.61	16.86	<0.0001
Residual	22	6544.27	297.47		
Lack of fit	20	6488.93	324.45	11.73	0.0814
Pure error	2	55.34	27.67		
GPC content					
Corrected total	26	2095.95			
Model	5	1391.65	278.33	8.30	0.0002
Residual	21	704.30	33.54		
Lack of fit	19	653.57	34.40	1.36	0.5084
Pure error	2	50.73	25.37		

Abbreviations: df, degree of freedom; SS, sum of squares; MS, mean square; *sn*-1-LPC, *sn*-1-lysophosphatidylcholine; and GPC, glycerophosphatidylcholine.



*sn*-1-LPC 함량과 GPC 함량의 2차 다항 회귀모형의 적합성을 평가하기 위한 또 다른 지표로 모델식의 결정계수(coefficients of determination)를 산출하였다. 결정계수는 추정된 회귀모형이 주어진 자료에 적합한 정도를 나타낸다. 결정계수를 구하기 위해 Table 17의 27개의 반응조건에서 얻어진 반응산물의 *sn*-1-LPC 함량과 회귀모형식을 이용하여 예측된 *sn*-1-LPC 함량 간의 parity plot과 반응산물의 GPC 함량과 회귀모형식을 이용하여 예측된 GPC 함량 간의 parity plot을 이용하였다(Figure 64). 결정계수  $R^2$ 은 총 변량 중 회귀모형으로 설명 가능한 변량의 비율을 나타내는 값으로  $R^2$ 의 값이 1에 가까울수록 회귀모형의 설명력이 높음을 의미한다. *sn*-1-LPC 함량에 대한 회귀모형의  $R^2$  값은 0.7540, GPC 함량에 대한 회귀모형의  $R^2$  값은 0.6640으로 나타나 *sn*-1-LPC 함량에 대한 회귀모형의 설명력이 GPC 함량에 대한 회귀모형의 설명력 보다 높았다.  $R^2$  값은 모형에 사용되는 독립변수가 늘어날수록 증가하기 때문에 독립변수의 개수가 서로 다른 모형의 설명력을 비교할 때는 조정 결정계수(adjusted  $R^2$ )를 사용한다. Adjusted  $R^2$  값은 *sn*-1-LPC 함량에 대한 회귀모형에서 0.7093, GPC 함량에 대한 회귀모형에서 0.5840으로 나타나 역시 전자의 설명력이 보다 큼을 알 수 있었다.  $R^2$ 과 Adjusted  $R^2$ 은 회귀모형이 회귀모형의 도출에 사용된 데이터에 얼마나 잘 맞는지(설명하는지)를 보여주는 지표로 모형의 예측력을 정확하게 평가하기에는 한계점을 갖고 있다. 이와 달리 예측 결정계수(predicted  $R^2$ )는  $Q^2$ 이라고도 표시하는데 회귀모형이 새로운 관찰에 대한 반응을 얼마나 잘 예측하는 지를 나타내는 지표로 모형의 실제 적합성을 평가하는 데 보다 더 유용할 수 있는 결정계수이다. *sn*-1-LPC 함량에 대한 회귀모형의  $Q^2$  값은 0.6071, GPC 함량에 대한 회귀모형의  $Q^2$  값은 0.3704로 나타나 *sn*-1-LPC 함량에 대한 회귀모형의 예측력이 GPC 함량에 대한 회귀모형의 예측력 보다 우수하였다. 결론적으로 세 종류의 결정계수 값 모두 GPC 함량에 대한 회귀모형에 비해 *sn*-1-LPC 함량에 대한 회귀모형에서 모두 높게 나타나 *sn*-1-LPC 함량에 대한 회귀모형의 적합성이 상대적으로 우수한 것으로 평가되었다.

이상 본 연구에서 도출된 *sn*-1-LPC 함량과 GPC 함량에 대한 각 회귀모형의 적합성을 분산분석의 적합결여 검정과 결정계수를 이용하여 평가한 결과 두 개의 모형 모두 양호한 적합성을 보이는 것으로 판단되었다.

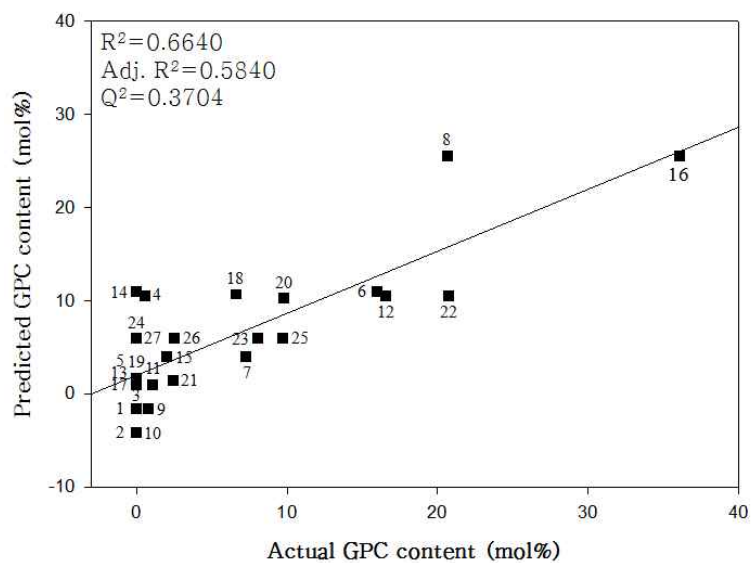
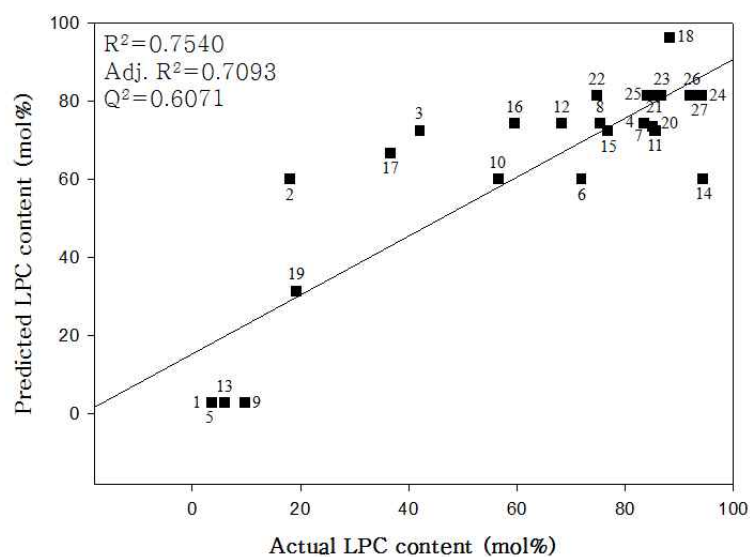


Figure 64. Parity plot showing relationships between observed values and values predicted by the regression models. Numbers inside the graph represent experimental numbers shown in Table 17.

## (2) 반응인자의 영향(effects of reaction parameters)

앞서 *sn*-1-LPC 함량과 GPC 함량에 대한 회귀모형의 도출 시 사용된 독립변수들은 후진제거법(backward elimination method)을 이용하여 선택하였다(Table 18). 후진제거법은 모든 설명변수를 고려한 모형에서 유의하지 않은 설명변수를 하나씩 제거하는 방법이다. 즉 본 연구에서 PC의 가수분해 산물의 *sn*-1-LPC 함량과 GPC 함량에 영향을 미치는 반응인자로 고려된 반응온도(Te), 반응시간(RT), 기질의 수분함량(WC) 및 효소량(En)의 일차항(linear term)과 이들 인자의 제곱인 이차항(quadratic term), 그리고 이들 인자간의 교차항(interaction term)을 모두 설명변수로 모형에 삽입한 후 가장 유의하지 않은 설명변수를 제외해가면서 최종적으로 모형에는 유의한 설명변수만을 남김으로써 *sn*-1-LPC 함량과 GPC 함량에 대한 회귀모형을 각각 도출하였다. 각각의 회귀모형에서 최종적으로 선택된 독립변수의 계수(coefficients)의 절대값은 종속변수에 미치는 상대적인 영향력을 의미한다.

*sn*-1-LPC 함량에 유의적인 영향을 미치는 반응인자는 온도(Te)와 반응시간(RT)이었으며 기질의 수분함량(WC)과 효소량(En)의 유의적인 영향은 없었다. 특히 반응시간은 *sn*-1-LPC 함량에 대해 가장 큰 설명력을 가지고 있는 변수로 판단되었다. 즉 반응시간의 일차항(21.03)은 온도의 일차항(14.80) 보다 큰 계수 값을 가지고 있으며 반응시간의 이차항과 반응시간과 온도와의 교차항 모두 10% 수준에서 유의한 설명력을 나타내었다. 특히 반응시간의 일차항은 양의 계수 값을 가지고 있는 데 비해 반응시간의 이차항(-29.16)은 음의 계수 값을 가지고 있었다. 이러한 결과는 반응시간이 증가함에 따라 *sn*-1-LPC 함량이 증가하다가 일정 시간에서 최대값에 도달한 후 다시 그 함량이 감소하는 경향을 나타내는 것을 의미한다. 온도의 경우 양의 계수 값을 가지고 있는 일차항만 존재하고 이차항은 없었다. 이러한 결과는 본 연구에서 조사한 온도범위(40-60°C)에서는 온도가 증가함에 따라 *sn*-1-LPC 함량이 지속적으로 증가하는 경향이 존재함을 의미한다. 이러한 경향은 네 개의 반응인자 중 세 개를 부호값(coded value)이 0인 조건, 즉 중심값으로 고정하고 나머지 한 개의 반응인자의 변화에 따른 *sn*-1-LPC 함량을 예측한 Figure 65에서도 확인할 수 있었다.

온도와 반응시간은 *sn*-1-LPC 함량뿐만 아니라 GPC 함량에도 유의적인 미치는 반응인자로 나타났다. 기질의 수분함량의 경우 *sn*-1-LPC 함량의 경우와 달리 GPC 함량에는 유의적인 영향을 나타내었다. 효소량은 *sn*-1-LPC 함량의 경우와 마찬가지로 GPC 함량에도 유의적인 영향이 없었다. 온도, 반응시간, 기질의 수분함량의 일차항은 각각 4.73, 4.29, 4.52의 양의 계수 값을 가지고 있는데 반해 이들의 유의적인 이차항은 존재하지 않았다. 온도와 반응시간 또는 수분함량 간의 교차항은 10% 수준에서 유의하였으며 모두 3.01의 양의 계수 값을 나타내었다. 이러한 결과는 본 연구에서 조사한 온도(40-60°C), 반응시간(1-7h), 기질의 수분함량(10-30%)의 범위에서는 각 변수의 값이 증가함에 따라 GPC 함량이 지속적으로 증가하는 경향이 존재함을 의미한다. 이러한 경향은 네 개의 반응인자 중 세 개를 중심값으로 고정하고 나머지 한 개의 반응인자의 변화에 따른 GPC 함량을 예측한 Figure 65에서도 확인할 수 있었다.

Table 18. Significant ( $p < 0.1$ ) regression coefficients of the quadratic polynomial models for the phospholipase A<sub>1</sub>-catalyzed hydrolysis of phosphatidylcholine for producing *sn*-1-lysophosphatidylcholine

Effect	<i>sn</i> -1-LPC content (mol%)		GPC content (mol%)	
	coefficient	<i>p</i> -value	coefficient	<i>p</i> -value
Intercept	81.61	<0.0001	5.95	0.0002
Linear				
Te	14.80	0.0014	4.73	0.0023
RT	21.03	<0.0001	4.29	0.0049
WC			4.52	0.0033
Quadratic				
RT*RT	-29.16	0.0004		
Interaction				
Te*RT	-13.82	0.0041	3.01	0.0501
Te*WC			3.01	0.0502

Abbreviations: Te, temperature; RT, reaction time; WC, water content (of the total weight of PC); *sn*-1-LPC, *sn*-1-lysophosphatidylcholine; and GPC, glycerophosphatidylcholine.

Figure 65는 온도, 반응시간, 기질의 수분함량, 효소량 각각의 반응인자가 *sn*-1-LPC 함량과 GPC 함량에 미치는 영향을 비교하여 나타내고 있다. 온도가 증가할수록 *sn*-1-LPC 함량과 GPC 함량이 모두 증가하였는데 *sn*-1-LPC 함량의 증가폭이 GPC 함량의 증가량에 비해 상대적으로 컸다. 따라서 *sn*-1-LPC 함량을 최대로 증가시키는 동시에 GPC 함량을 최소화하기 위해서는 GPC의 생성이 다소 증가하더라도 상대적으로 고온에서 반응을 하는 것이 바람직한 것으로 생각되었다. 반응시간의 경우 *sn*-1-LPC 함량은 일정시간까지는 증가하다가 감소하는 반면에 GPC 함량은 시간이 지날수록 계속 증가하는 경향을 나타내었다. 따라서 *sn*-1-LPC의 생성량을 최대로 증가시키고 GPC의 생성을 최소화시키기 위해서 GPC의 생성이 시작되는 시간 전까지만 반응을 진행하는 것이 필요한 것으로 판단되었다. 기질의 수분함량과 *sn*-1-LPC 함량 간에는 인과관계가 없었으나 수분함량이 증가할수록 GPC 함량은 증가하였다. 따라서 *sn*-1-LPC의 생성량을 최대로 증가시키고 GPC의 생성을 최소화시키기 위해서는 기질의 수분 함량은 가능한 낮출 필요가 있는 것으로 판단되었다. 효소량은 *sn*-1-LPC 함량과 GPC 함량에 모두 유의적인 영향을 미치지 않았다.

결론적으로 *sn*-1-LPC의 생성량을 최대로 증가시키고 GPC의 생성을 최소화시키기 위해서는 상대적으로 높은 온도에서 기질의 수분 함량을 최소로 유지하면서 GPC가 생성되기 전의 일정한 시간까지만 반응을 진행하고 이 때 효소는 경제적인 측면에서 최소량을 사용하는 것이 바람직한 것으로 판단되었다.

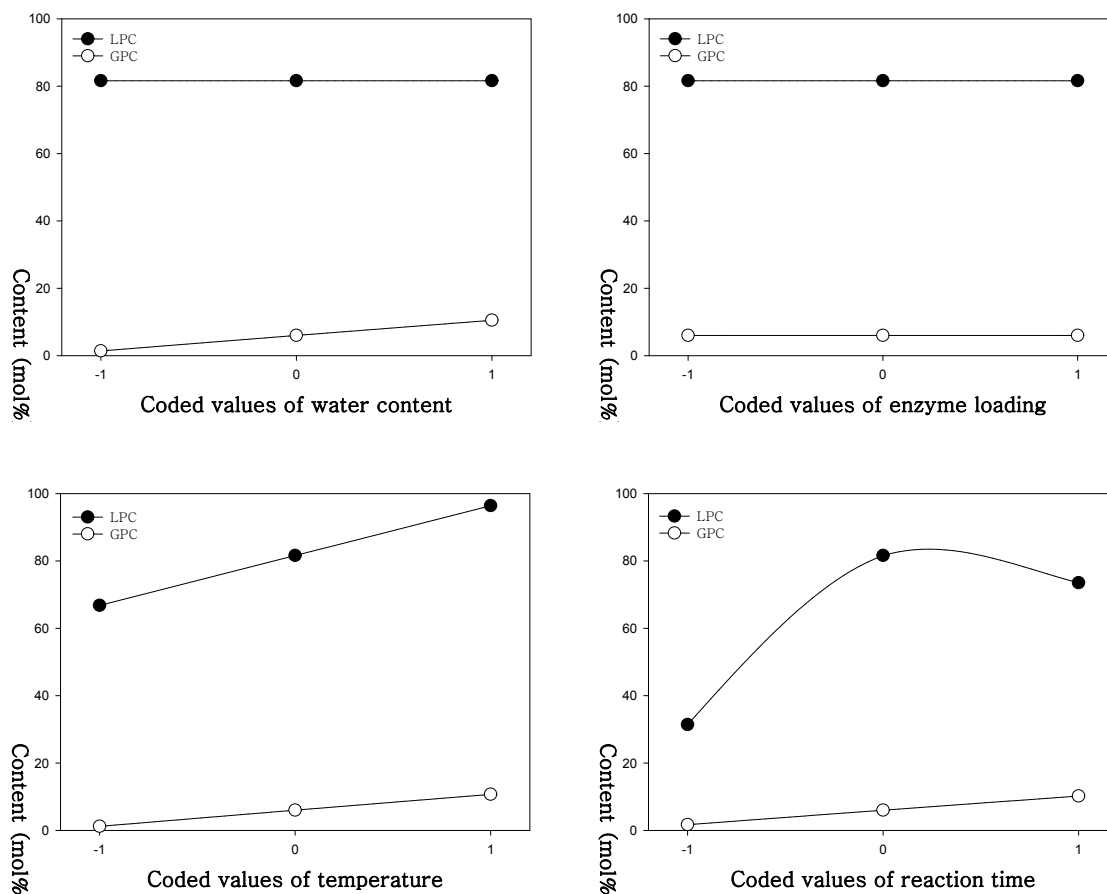


Figure 65. Prediction plots for response variables by the effects of reaction parameters. The coded values of all reaction parameters were zero except those of a reaction parameter represented on  $X$ -axis. Abbreviations: *sn*-1-LPC, *sn*-1-lysophosphatidylcholine and GPC, glycerophosphatidylcholine.

### (3) 모델 타당성 검증(model validation)

실제의 현상과 통계모델의 사이에는 “이상화, 단순화에 의한 오차”가 포함되어 있다. 이 오차를 구하기 위해서는 모형에 의해 예측되는 값과 실제의 실험결과를 비교 검토할 필요가 있다. 본 연구에서 도출된 *sn*-1-LPC 함량과 GPC 함량에 대한 회귀모형의 타당성(유효성)을 검증하기 위해 독립변수의 주어진 범위에서 Table 17의 27개 반응조건을 제외한 8개의 반응조건을 추가적으로 설정하고 이들 조건에서 얻은 반응산물의 *sn*-1-LPC 함량과 GPC 함량을 회귀모형식을 이용하여 예측한 *sn*-1-LPC 함량 및 GPC 함량과 각각 서로 비교하였다(Table 19). *sn*-1-LPC 함량에 대한 회귀모형의 예측 오차(prediction error)는 최소 1.9%, 최대 69.9%이었고 GPC 함량에 대한 회귀모형의 경우 예측 오차는 18.9-116.8%의 범위에 있었다. 그 결과 1번 조건(온도 44°C, 반응시간 1h, 기질의 수분함량 11%, 효소량 2%)과 2번 조건(온도 42°C, 반응시간 2h, 기질의 수분함량 21%, 효소량 5%)에서 얻은 반응산물의 *sn*-1-LPC 함량과 5번 조건(온도 53°C, 반응시간 5h, 기질의 수분함량 17%, 효소량 4%)에서 획득한 반응산물의 GPC 함량의 예측오차는 69.9-116.8%로 다른 조건에서의 예측오차에 비해 크게 나타났다. 이들 세 가지 반응조건에서 예측 오차가 비교적 컸던 이유는 예측값이 다른 조건에서의 예측값보다 상대적으로 작았기 때문인 것으로 생각된다. 그러나 예측값과 실측값 간의 절대오차는 1번 조건에서 5.8mol%(*sn*-1-LPC 함량), 2번 조건에서 14.7mol%(*sn*-1-LPC 함량), 그리고 5번 조건에서 4.1mol%(GPC 함량)로 작았다. 이들 세 가지 반응조건을 제외한 다른 조건들에서의 *sn*-1-LPC 함량 및 GPC 함량의 예측 오차는 모두 50% 이하로 비교적 낮게 나타났다. 특히 본 연구에서 목표로 하는 *sn*-1-LPC의 생성량을 최대한 증가시키면서 GPC의 생성량을 최대한 억제하는 반응조건과 유사한 6번 조건(온도 60°C, 반응시간 3h, 기질의 수분함량 10%, 효소량 1%)에서 얻은 반응산물의 *sn*-1-LPC 함량과 GPC 함량의 예측오차는 각각 6.2%와 18.9%로 매우 높은 정확도를 나타내었다. 따라서 본 연구에서 도출된 *sn*-1-LPC 함량과 GPC 함량에 대한 회귀모형은 타당성을 가지고 있는 것으로 평가되었다.

Table 19. Observed values and values predicted by the regression models for the responses in eight additional experimental sets

Exp. no.	Factor				Response					
	Te (°C)	RT (h)	WC (%)	En (%)	<i>sn</i> -1-LPC content (mol%)			GPC content (mol%)		
					Observed	Predicted	%PE	Observed	Predicted	%PE
1	44	1	11	2	8.4 ± 1.5 <sup>a</sup>	14.2	69.9			
2	42	2	21	5	20.7 ± 4.9	35.4	71.4		1.1	
3	49	2	17	3	42.4 ± 0.6	52.2	23.2		1.6	
4	51	3	18	4	87.7 ± 7.3	73.3	16.5		3.9	
5	53	5	17	4	90.2 ± 4.4	88.4	1.9	3.4 ± 4.6	7.5	116.8
6	60	3	10	1	85.5 ± 4.6	90.8	6.2	0.9 ± 1.3	0.7	18.9
7	58	5	27	7	68.5 ± 12.0	93.5	36.6	25.0 ± 14.1	16.8	32.7
8	58	7	27	7	54.6 ± 9.5	74.3	35.9	38.3 ± 12.8	21.3	44.4

<sup>a</sup> Mean ± standard deviation (*n*=2)

Abbreviations: Te, temperature; RT, reaction time; WC, water content; En, enzyme loading; *sn*-1-LPC, *sn*-1-lysophosphatidylcholine; GPC, glycerophosphatidylcholine; and %PE, percentage prediction error.

#### (4) 최적 반응조건의 확립(optimization of reaction conditions)

*sn*-1-LPC 함량과 GPC 함량에 대한 회귀모형을 이용하여 반응산물의 *sn*-1-LPC 함량을 가능한 증가시키면서 동시에 GPC 함량을 가능한 낮출 수 있는 최적 조건을 확립하였다. 최적 조건의 선정이 필요한 반응인자는 *sn*-1-LPC 함량과 GPC 함량에 대한 회귀모형의 설명변수로 선택된 온도, 반응시간, 기질의 수분함량이었다. *sn*-1-LPC의 생성량을 최대로 증가시키고 GPC의 생성을 최소화시키기 위해서는 *sn*-1-LPC 함량과 GPC 함량에 대한 양(+)의 인과관계가 있고 *sn*-1-LPC 함량에 대한 영향력이 GPC 함량에 대한 영향력보다 상대적으로 큰 온도를 최대한 증가시키고 *sn*-1-LPC 함량에는 영향이 없지만 GPC 생성과 양(+)의 인과관계가 있는 기질의 수분함량을 최대한 낮추면서 GPC가 생성되기 전의 일정한 시간까지만 반응을 진행하는 것이 필요하다. 한편 효소량의 경우 이들 회귀모형의 설명변수로 선정이 되지 않았지만 경제적인 측면에서 본 연구에서 조사한 범위 중 최소값을 선택하는 것이 바람직한 것으로 생각되었다. 이러한 측면들을 고려하여 선정된 최적 반응조건은 반응온도 60°C, 반응시간 3시간, 기질의 수분함량 10%, 효소량 1%이었다(Table 20). 확립된 최적조건에서 회귀모형으로 예측된 *sn*-1-LPC 함량은 90.8mol%, GPC 함량은 0.7mol%이었으며 실제 반응산물의 *sn*-1-LPC 함량과 GPC 함량은 각각 85.5mol%와 0.9mol%이었다. 따라서 *sn*-1-LPC 함량과 GPC 함량의 예측 오차는 각각 6.2%와 18.9%로 매우 낮은 값을 보였다. 예측값과 실측값 간의 절대오차 역시 *sn*-1-LPC 함량의 경우 5.3mol%, GPC 함량의 경우 0.2mol%로 매우 낮았다. 본 연구에서는

glass vessel (8cm × 3.5cm i.d.)에서 PC 4g을 기질로 이용하여 효소반응의 모델링과 반응조건의 최적화 실험을 실시하였다. 효소반응 시스템의 스케일업(scale-up) 기술 개발의 일환으로 용량이 더 큰 glass vessel (11cm × 10cm i.d.)을 반응기로 이용하고 기질량을 10배 증가시킨 후 확립된 최적 조건에서 효소반응을 실시하였다. 다음 동일한 최적 반응조건에서 small-scale (즉, PC 4g을 기질로 이용)로 제조한 반응산물과 larger scale(즉, PC 40g을 기질로 이용)로 생산한 반응산물의 *sn*-1-LPC 함량과 GPC 함량을 서로 비교하였다. larger scale로 얻은 반응산물의 *sn*-1-LPC 함량은 83.7mol%이었고 GPC는 생성되지 않았다. 따라서 두 반응산물의 *sn*-1-LPC 함량 간의 상대표준편차(relative standard deviation)는 1.5%로 매우 높은 정밀도를 나타내었다. GPC 함량의 경우 상대표준편차(relative standard deviation)가 141.4%로 컸으나 두 측정값 간의 절대차는 0.9mol%로 매우 작았고 표준편차 값 역시 0.6mol%로 매우 작았다. 따라서 본 연구에서는 10배 수준까지 성공적으로 효소반응의 스케일업을 달성하였다.

Table 20. Selected optimal conditions and responses for the phospholipase A<sub>1</sub>-catalyzed hydrolysis of phosphatidylcholine for producing *sn*-1-lysophosphatidylcholine

Scale	Factor				Response					
	Te (°C)	RT (h)	WC (%)	En (%)	<i>sn</i> -1-LPC content (mol%)			GPC content (mol%)		
					Observed	Predicted	%PE	Observed	Predicted	%PE
Small <sup>a</sup>	60	3	10	1	85.5 ± 4.6 <sup>c</sup>	90.8	6.2	0.9 ± 1.3	0.7	18.9
Large <sup>b</sup>	60	3	10	1	83.7 ± 3.7	90.8	8.4		0.7	
%RSD					1.5			141.4		

Performed at levels of reaction factors that are optimal for maximizing *sn*-1-LPC contents while minimizing GPC contents.

<sup>a</sup> Performed with 4g of PC

<sup>b</sup> Performed with 40g of PC

<sup>c</sup> Mean ± standard deviation (*n*=2)

Abbreviations: Te, temperature; RT, reaction time; WC, water content; En, enzyme loading; *sn*-1-LPC, *sn*-1-lysophosphatidylcholine; GPC, glycerophosphatidylcholine; %PE, percentage prediction error; and %RSD, relative standard deviation.

#### (5) 반응산물의 조성분석

##### (가) 유리지방산(free fatty acids, FFA) 함량

PC의 가수분해에 의한 *sn*-1-LPC의 생산 시 반응산물에는 FFA가 함께 잔존하게 되며 가수분해 되는 PC의 양에 비례하여 FFA의 생성량도 증가하게 된다. 최적 반응조건의 확립과 반응의 스케일업 실험에서 small-scale로 제조한 반응산물과 larger scale로 생산한 반응산물의 조



성을 FFA를 포함한 경우와 제외한 경우로 나누어 w/w%를 단위로 하여 분석하였다(Table 21). FFA를 제외했을 때 small-scale로 얻은 반응산물의 *sn*-1-LPC 함량과 GPC 함량은 각각 81.6w/w%와 1.1w/w%이었고 larger scale로 획득한 반응산물의 *sn*-1-LPC 함량은 77.5w/w%이었으며 GPC는 존재하지 않았다. 한편 이들 small-scale로 얻은 반응산물과 larger scale로 생산된 반응산물에는 가수분해 되지 않은 PC가 남아있었으며 그 함량은 각각 17.3w/w%와 22.5w/w%이었다. FFA를 포함한 경우의 반응산물의 조성을 보면 small-scale로 얻은 반응산물과 larger scale로 획득한 반응산물의 FFA 함량은 각각 29.9w/w%와 27.8w/w%이었다. 따라서 본 연구에서는 용매-용매 추출법(liquid-liquid extraction)과 초임계 추출법(supercritical fluid extraction)을 사용하여 반응산물로부터 이들 FFA를 제거하는 방법을 확립하고자 하였다. 한편 small-scale로 얻은 반응산물의 *sn*-1-LPC 함량과 GPC 함량은 각각 57.2w/w%와 0.8w/w%이었고 larger scale로 획득한 반응산물의 *sn*-1-LPC 함량은 55.9w/w%이었으며 GPC는 존재하지 않았다. 그리고 이들 small-scale로 얻은 반응산물과 larger scale로 생산된 반응산물의 PC 함량은 각각 12.1w/w%와 16.3w/w%이었다.

Table 21. Chemical compositions of the reaction products obtained by phospholipase A<sub>1</sub>-catalyzed hydrolysis of phosphatidylcholine under the optimal conditions

	<i>Excluding FFA</i> (w/w%)			<i>Including FFA</i> (w/w%)		
	small-scale <sup>a</sup>	larger scale <sup>b</sup>	%RSD	small-scale	larger scale	%RSD
PC	17.3 ± 2.0 <sup>c</sup>	22.5 ± 4.8	18.5	12.1 ± 1.3	16.3 ± 3.8	20.9
<i>sn</i> -1-LPC	81.6 ± 3.5	77.5 ± 4.8	3.6	57.2 ± 3.0	55.9 ± 2.5	1.6
GPC	1.1 ± 1.5			0.8 ± 1.1		
FFA				29.9 ± 0.6	27.8 ± 1.2	5.1

Performed at levels of reaction factors that are optimal for maximizing *sn*-1-LPC contents while minimizing GPC contents.

<sup>a</sup> Performed with 4g

<sup>b</sup> Performed with 40g of PC

<sup>c</sup> Mean ± standard deviation (*n*=2)

(나) TLC와 GC-FID 병용 분석 결과와 HPLC-ELSD 분석 결과의 비교

*sn*-1-LPC 함량과 GPC 함량에 대한 회귀모형을 이용하여 반응산물의 *sn*-1-LPC 함량을 가능한 증가시키면서 동시에 GPC 함량을 가능한 낮출 수 있는 최적 조건을 확립하였고 확립된 최적 조건을 바탕으로 10배 수준까지 성공적으로 효소반응의 스케일업을 달성하였다. 최적 조건에서 10배 수준으로 스케일업하여 생산한 반응산물의 PC, *sn*-1-LPC 및 GPC 함량을 HPLC-ELSD를 이용하여 분석 후 TLC와 GC-FID를 병용하여 분석한 결과와 비교하였다. 회귀모형을 도출하기 위해 사용된 Table 17의 27개의 반응조건 중에서 16번 조건에서 생산된 반응산물을 HPLC-ELSD로 분석하여 얻은 크로마토그램을 Figure 66에 나타내었다. 이 반응산물

의 *sn*-1-LPC 함량과 GPC 함량은 TLC와 GC-FID를 병용하여 분석한 결과 각각 59.5mol%와 36.0mol%이었다. PC의 머무름 시간(retention time)은 5-6분, *sn*-1-LPC의 머무름 시간은 6.5-9분, GPC의 머무름 시간은 12.5-16분로 확인되었다. 이를 바탕으로 하여 최적조건에서 larger scale로 생산한 반응산물의 조성을 HPLC-ELSD로 분석하였다(Figure 67). 그 결과 이 반응산물에서는 PC와 *sn*-1-LPC의 피크만 나타났고 GPC는 검출되지 않았다. 이 반응산물의 PC 함량과 *sn*-1-LPC 함량은 각각 9.5mol%와 90.5mol%로 나타났다. 이 함량값은 TLC와 GC-FID 병용 분석에 의해 얻은 함량값인 PC 16.3mol%와 *sn*-1-LPC 83.7mol%와 유사하였다 (Table 22). 따라서 TLC와 GC-FID 병용법과 HPLC-ELSD법 모두 본 연구에서 생산한 PC 가수분해물의 조성을 결정하는 데 있어서 적합한 분석법인 것으로 평가되었다.

Table 22. Comparison of the PC, *sn*-1-LPC, and GPC content values of the reaction products (obtained under optimal reaction conditions) determined by LC-ELSD with the values determined by a combination of TLC and GC-FID

	Content (mol%)		
	PC	<i>sn</i> -1-LPC	GPC
Determined by a combination of TLC and GC-FID	16.3 ± 3.7	83.7 ± 3.7	
Determined by HPLC-ELSD	9.5	90.5	

Abbreviations: PC, phosphatidylcholine; *sn*-1-LPC, *sn*-1-lysophosphatidylcholine; GPC, glycerophosphatidylcholine; TLC, thin-layer chromatography; GC-FID, gas chromatography-flame ionization detector; HPLC-ELSD, high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detector.

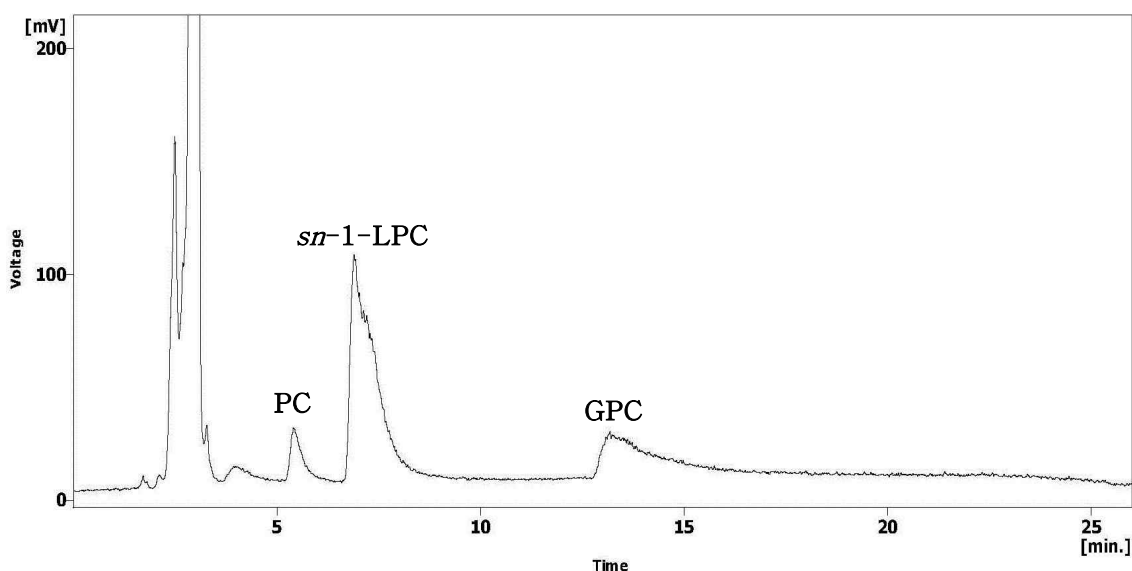


Figure 66. HPLC-ELSD chromatogram of the reaction products obtained by phospholipase

A<sub>1</sub>-catalyzed hydrolysis of phosphatidylcholine (4g) under the conditions from Exp. no. 16 in Table 17.

Abbreviations: HPLC-ELSD, high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detector; PC, phosphatidylcholine; *sn*-1-LPC, *sn*-1-lysophosphatidylcholine; and GPC, glycerophosphatidylcholine.

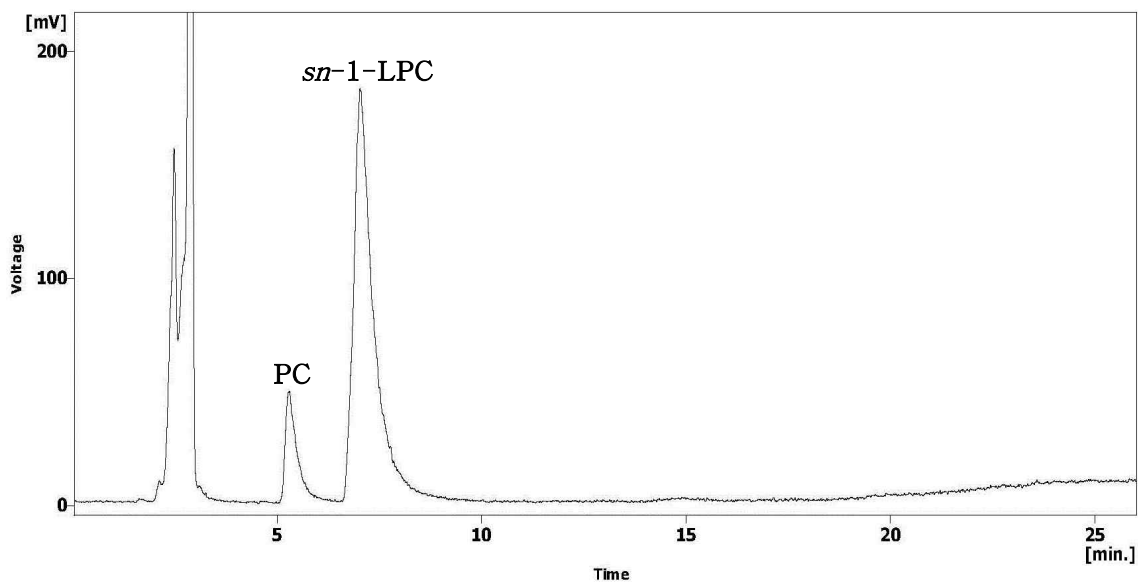


Figure 67. HPLC-ELSD chromatogram of the reaction products obtained by phospholipase A<sub>1</sub>-catalyzed hydrolysis of phosphatidylcholine (40g) under the optimal conditions. Abbreviations: HPLC-ELSD, high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detector; PC, phosphatidylcholine; and *sn*-1-LPC, *sn*-1-lysophosphatidylcholine.

(다) 지방산 조성

Soy PC는 포화지방산이 *sn*-2 위치보다 *sn*-1 위치에 더 많이 존재하고 *sn*-2 지방산은 주로 불포화지방산으로 구성되어 있는 인지질이다. 따라서 PLA<sub>1</sub>을 생체촉매로 이용하여 soy PC를 가수분해하면 *sn*-1 위치의 포화지방산이 유리되면서 PC 보다 불포화도가 높은 *sn*-1-LPC가 만들어질 것으로 예상된다. 이를 확인하기 위하여 최적조건에서 생산한 반응산물로부터 분리한 *sn*-1-LPC의 지방산 조성을 분석하고 그 결과를 기질로 사용된 PC의 지방산 조성과의 비교하였다(Table 23). *sn*-1-LPC의 총 불포화지방산 함량은 97.6mol%로 PC의 81.3mol% 보다 높았다. PC의 주요 지방산은 linoleic acid (62.6mol%)와 palmitic acid (15.1mol%), oleic acid (11.0mol%)의 순이었다. 이에 비해 최적 반응조건에서 생산한 *sn*-1-LPC는 주로 linoleic acid (78.0mol%)로 구성되어 있었으며 oleic acid (12.5mol%)와 linolenic acid (6.4mol%)의 순으로 함유되어 있었다. 특히 *sn*-1-LPC의 palmitic acid 함량은 2.2mol%로 PC의 palmitic acid 함량보다 크게 낮았다. 이러한 결과는 PC의 가수분해 과정에서 대부분의 palmitic acid가 제거되기 때문인 것으로 판단되었다. 결과적으로 PLA<sub>1</sub>에 의한 soy PC의 가수분해 시 원래의 PC 보다 불포화도가 높은 *sn*-1-LPC가 만들어지는 것을 확인하였다.

Table 23. Fatty acid composition of *sn*-1-lysophosphatidylcholine from the reaction products obtained by phospholipase A<sub>1</sub>-catalyzed hydrolysis of phosphatidylcholine under the optimal conditions (mol%)

Fatty acids	PC (mol%)	<i>sn</i> -1-LPC (mol%)
14:0	0.1 ± 0.0 <sup>a</sup>	
16:0	15.1 ± 0.1	2.2 ± 0.0
16:1 <i>n</i> -7	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0
18:0	3.5 ± 0.0	0.2 ± 0.0
18:1 <i>n</i> -9	11.0 ± 0.0	12.5 ± 0.1
18:1 <i>n</i> -7	1.7 ± 0.0	0.5 ± 0.0
18:2 <i>n</i> -6	62.6 ± 0.1	78.0 ± 0.0
18:3 <i>n</i> -3	5.8 ± 0.0	6.4 ± 0.0
20:1	0.1 ± 0.0	
Total SFA	18.7 ± 0.1	2.4 ± 0.0
Total USFA	81.3 ± 0.1	97.6 ± 0.0

<sup>a</sup> Mean ± standard deviation (*n*=2)

Abbreviations: PC, phosphatidylcholine *sn*-1-LPC, *sn*-1-lysophosphatidylcholine SFA, saturated fatty acids; and USFA, unsaturated fatty acids.

(6) *sn*-1-LPC의 분리정제

(가) 용매-용매 추출법(liquid-liquid extraction)

PLA<sub>1</sub>을 반응축매로 이용한 soy PC의 가수분해 시 반응산물 내에 소량의 PC와 GPC 및 다량의 FFA가 *sn*-1-LPC와 혼재되어 있다. 극성도가 서로 다른 두 가지 용매를 반응산물에 가하고 분별깔대기를 이용하여 일정시간 동안 층 분리하여 반응산물의 *sn*-1-LPC, PC, GPC 및 FFA를 분획하고자 하였다.

수용성 에탄올과 디클로로메탄(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)을 사용하여 분리정제 실험을 하였다. 이 때 *sn*-1-LPC는 수용성 에탄올 층으로, PC와 FFA는 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 층으로 분획될 것으로 예상되었다. 수용성 에탄올의 농도는 0%, 30%, 50%, 70%이었으며 에탄올의 농도가 높을수록 층 분리되는 시간은 짧으나 에탄올 층의 양이 줄어들면서 수율이 감소하였다(Figure 68). 따라서 수용성 에탄올 층의 수율과 층 분리 시간을 고려하여 50% 에탄올을 최적용매로 선정하였다.



Figure 68. Aqueous ethanol/dichloromethane extraction of *sn*-1 lysophosphatidylcholine from reaction products. The concentrations of aqueous ethanol were 0, 30, 50, and 70%.

50% 에탄올/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(3:1, v/v)을 사용하여 최적 반응조건에서 생산한 반응산물을 분획한 결과는 Table 24에 나타내었다. 50% 에탄올 분획물의 수율은 14.0%이었다. 50% 에탄올 분획물의 PC 함량은 2.4w/w% 나타나 대부분의 PC가 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 층으로 이행되어 제거되는 것이 확인되었다. *sn*-1-LPC 함량은 50% 에탄올 분획물이 56.0w/w%로 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획물의 47.1w/w%에 비해 증가하였다. 하지만 GPC와 FFA의 함량은 원 반응산물의 30.7w/w%에서 41.6w/w%로 오히려 증가하는 문제가 발생하였다. FFA는 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 층으로 주로 이행되고 대부분의 GPC는 50% 에탄올 층에 잔존하는 현상은 TLC를 통하여 확인하였다(Figure 69). 이러한 결과는 GPC가 PC와 FFA 뿐만 아니라 *sn*-1-LPC 보다도 높은 극성도를 가지고 있기 때문에 나타난 것으로 생각된다. 따라서 50% 에탄올과 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>를 추출용매로 이용하는 *sn*-1-LPC의 분리정제는 50% 에탄올 분획물에 GPC가 *sn*-1-LPC와 함께 잔존하고 50% 에탄올 분획물의 수율이 낮기 때문에

본 연구에서 생산한 반응산물의 정제에는 사용이 불가능한 것으로 평가되었다.

Table 24. Chemical composition and yield of fractions obtained by 50% aqueous ethanol/dichloromethane (3:1, v/v) extraction of reaction products<sup>a</sup> (w/w%)

	Before fractionation	After fractionation	
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> fraction	50% ethanol fraction
PC	12.1	16.0	2.4
<i>sn</i> -1-LPC	57.2	47.1	56.0
GPC + FFA	30.7	36.9	41.6
Yield		72.4	14.0

<sup>a</sup> Obtained by phospholipase A<sub>1</sub>-catalyzed hydrolysis of phosphatidylcholine under the optimal conditions

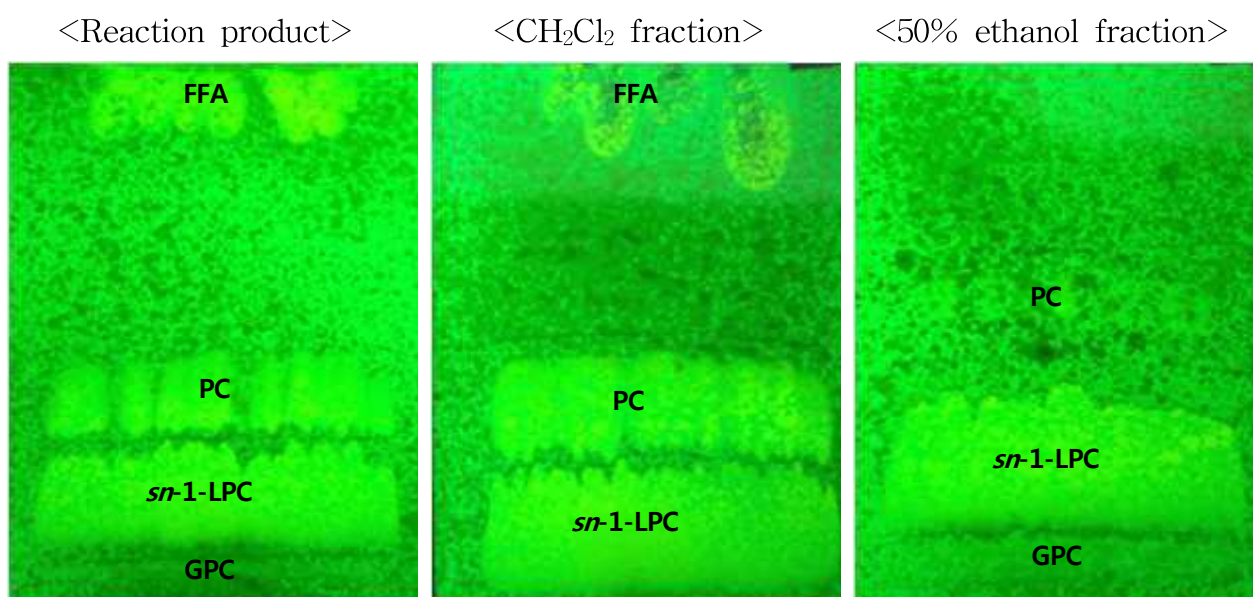


Figure 69. Thin layer chromatography of fractions obtained by 50% aqueous ethanol/dichloromethane (3:1, v/v) extraction of reaction products. The reaction products were obtained by phospholipase A<sub>1</sub>-catalyzed hydrolysis of phosphatidylcholine under the optimal conditions.

본 연구에서는 물/헥산(1:1, v/v)을 또 다른 추출용매로 사용하여 최적 반응조건에서 생산한 반응산물로부터 *sn*-1-LPC의 분리정제를 시도하였다(Table 25). 이 때 *sn*-1-LPC는 물 층으로, PC와 FFA는 헥산 층으로 분획될 것으로 예상하였다. 그 결과 물 분획물의 수율은 7.2%이었다. 대부분의 PC가 헥산 층으로 이행되어 물 분획물의 PC 함량은 4.0w/w%로 감소하였다. *sn*-1-LPC 함량은 물 분획물이 60.3w/w%로 헥산 분획물의 47.1w/w%에 비해 약 1.3배 증가하였다. 하지만 GPC와 FFA의 함량은 원 반응산물의 30.7w/w%에서 35.7 w/w%로 증가하였다. 이는 GPC가 PC, FFA, *sn*-1-LPC에 비해 물에 대한 친화성이 높기 때문에 나타난 결과로 판단되었다. 따라서 물과 헥산을 추출용매로 이용하는 *sn*-1-LPC의 분리정제는 물 분획물에 GPC가 *sn*-1-LPC와 함께 잔존하고 물 분획물의 수율이 매우 낮은 문제가 있기 때문에 50% 에탄올/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 추출법과 마찬가지로 본 연구에서 생산한 반응산물의 정제에는 사용이 불가능한 것으로 평가되었다.

Table 25. Chemical composition and yield of fractions obtained by water/hexane (1:1, v/v) extraction of reaction products<sup>a</sup> (w/w%)

	Before fractionation	After fractionation	
		Hexane fraction	Water fraction
PC	12.1	11.3	4.0
<i>sn</i> -1-LPC	57.2	47.1	60.3
GPC + FFA	30.7	41.6	35.7
Yield		65.1	7.2

<sup>a</sup> Obtained by phospholipase A<sub>1</sub>-catalyzed hydrolysis of phosphatidylcholine under the optimal conditions

(나) 초임계 추출법(supercritical fluid extraction)

본 연구에서는 반응산물로부터 *sn*-1-LPC를 선택적으로 분리하는 또 다른 방법으로 초임계 이산화탄소(supercritical carbon dioxide) 추출을 이용하였다(Table 26). 이 때 FFA는 *sn*-1-LPC 비해 상대적으로 극성도가 낮기 때문에 초임계 이산화탄소에 용해되어 반응산물로부터 제거될 것으로 예상되었다. 실험 결과 전체 반응산물 중 6.2%에 해당하는 소량의 반응산물이 초임계 추출로 제거가 되었다. 추출물의 FFA 함량은 87.8%로 초임계 이산화탄소에 의해 FFA 일부가 반응산물로부터 제거가 되는 것을 확인하였다. 하지만 추출 후 남은 반응산물의 FFA 함량은 추출 전 반응산물의 FFA 함량과 거의 차이가 없었다. 따라서 초임계 추출법 역시 용매-용매 추출법과 마찬가지로 본 연구에서 생산한 반응산물의 정제에는 사용이 불가능한 것으로 평가되었다.

Table 26. Free fatty acid content and yield (of fractions obtained by supercritical carbon dioxide extraction of reaction products<sup>a</sup> (w/w%)

	Before extraction	After extraction	
		Extracts	Residues
Free fatty acid content	28.5	87.8	27.0
Yield		6.2	93.8

<sup>a</sup> Obtained by phospholipase A<sub>1</sub>-catalyzed hydrolysis of phosphatidylcholine under the optimal conditions

#### 다. 요약

본 연구에서는 회분식 효소반응 시스템을 이용하여 원료 soy PC보다 불포화도가 더 높고 유화제, 재구성 인지질(structured phospholipids) 합성의 기질로 사용될 수 있는 *sn*-1-LPC를 효소적 방법으로 생산하고자 하였다. 이를 위해 soy PC를 PLA<sub>1</sub>을 반응촉매로 이용한 가수분해를 통하여 *sn*-1-LPC를 제조하였으며 이 때 반응산물의 *sn*-1-LPC 함량을 최대한 증가시키고 아실기 이동 등으로 생성되는 부산물인 GPC의 생성을 최대한 억제할 수 있는 반응조건을 RSM을 통하여 확립하고자 하였다. 그 결과 선정된 최적 반응시간은 3시간, 최적 반응온도는 60°C, 기질의 최적 수분함량은 10%이었으며 효소량은 경제적인 측면을 고려하여 기질량 대비 1%를 최적 조건으로 선정하였다. 확립된 최적조건에서 생산된 반응산물의 *sn*-1-LPC 함량은 약 90mol%이었으며 GPC 함량은 1mol% 이하였으며 반응을 10배 수준까지 스케일업을 했을 때도 반응산물의 조성에는 유의적인 변화가 없었다. 한편 유기용매와 초임계 유체를 이용하여 반응산물로부터 *sn*-1-LPC를 선택적으로 분리하고자 하였으나 FFA와 GPC 등의 제거가 어렵고 *sn*-1-LPC의 수율이 크게 감소하는 문제가 발생하여 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단되었다.



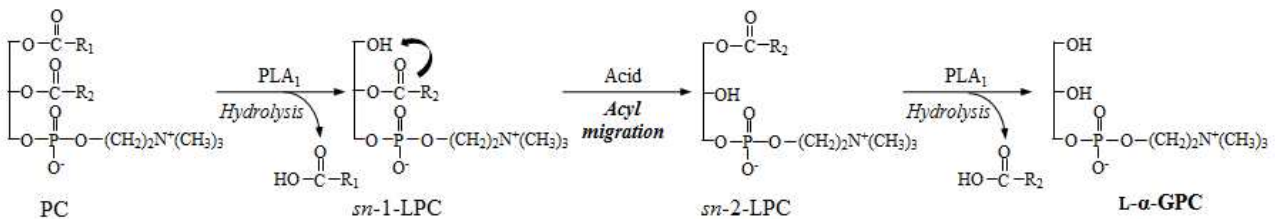
### 3 기능성 L- $\alpha$ -GPC의 합성 및 정제 방법 확립

#### 가. 재료 및 방법

##### (1) 실험의 구도

##### (가) 기능성 L- $\alpha$ -GPC의 합성 원리와 최적 반응조건 확립의 필요성(Figure 70)

Soy PC의 *sn*-1 지방산을 가수분해하여 *sn*-1-lysophosphatidylcholine (*sn*-1-LPC)을 합성한다. 가수분해 반응의 촉매제로 *sn*-1 위치 특이성을 나타내는 phospholipase A<sub>1</sub> (PLA<sub>1</sub>)을 사용한다. 반응매질로 헥산(*n*-hexane)과 물을 사용한다. PLA<sub>1</sub>(Lecitase Ultra)을 이용하여 PC를 가수분해 시 유리된 지방산에 의해 반응매질의 산성화로 부반응(side reaction)인 아실기 이동(acyl migration)이 일어난다. 아실기 이동은 *sn*-2 위치의 아실기가 *sn*-1 위치로 이동하는 현상이다. 아실기 이동현상은 *sn*-1-LPC의 합성 과정에서 *sn*-2-LPC가 함께 생성되는 원인이 된다. *sn*-2-LPC는 PLA<sub>1</sub>에 의해 가수분해되어 L- $\alpha$ -GPC를 생성한다. 결과적으로 PLA<sub>1</sub> 촉매 가수분해반응 중 아실기 이동현상이 많이 일어나면 L- $\alpha$ -GPC의 생성량이 증가한다. 아실기 이동현상은 온도, 반응시간, 기질의 수분함량, 효소량, pH 등에 의해 영향을 받



는다. 따라서 아실기 이동현상을 최대화시킬 수 있는 최적 반응조건 확립이 필요하다.

Figure 70. Phospholipase A<sub>1</sub> (PLA<sub>1</sub>)-catalyzed hydrolysis of phosphatidylcholine (PC) for producing L- $\alpha$ -glycerylphosphorylcholine (L- $\alpha$ -GPC)

##### (나) 기능성 L- $\alpha$ -GPC의 분리정제 방법 확립의 필요성

Lecitase Ultra를 반응촉매로 이용한 soy PC의 가수분해 반응산물인 L- $\alpha$ -GPC, 유리된 지방산과 포스포콜린(phosphocholine)이 혼재되어 있다. 가수분해 반응의 촉매제인 Lecitase Ultra는 주는 *sn*-1 위치 특이성을 나타내는 PLA<sub>1</sub>으로 구성되어 있다. 하지만 *sn*-3 위치 특이성을 지닌 PLC와 같은 효소들이 포함되어 있어 phosphocholine이 생성된다. 유리지방산(free fatty acids, FFA)은 반응산물의 산화안정성을 감소시키므로 L- $\alpha$ -GPC와 분리정제가 필요하다. 일반적으로 L- $\alpha$ -GPC는 PC, LPC 또는 FFA에 비해 극성도가 높다. 따라서 극성도가 낮은 용매를 이용하는 용매 추출법(solvent extraction)을 이용하여 반응산물 내의 L- $\alpha$ -GPC를 FFA로부터 분리하는 것이 가능할 것으로 예상된다. phosphocholine은 반응산물의 순도를 낮추기 때문에 L- $\alpha$ -GPC와 분리정제가 필요하다. 따라서 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography)를 이용하여 L- $\alpha$ -GPC와 phosphocholine의 분리가 가능할 것으로 예상된다.

## (2) 재료

### (가) 기질

① 본 반응의 기질로 사용된 PC (granulated phosphatidylcholine, 순도 >95%, from soybean)는 Avanti Polar-Lipids, Inc. (Alabaster, AL, USA)에서 구입하였다.

② PLA<sub>1</sub> (Lecitase<sup>®</sup> Ultra)은 *Thermomyces lanuginosus*/*Fusarium oxysporum*에서 유래된 액상효소로서 Novo Nordisk Bioindustry Ltd. (Franklinton, NC, USA)에서 구입하였으며 본 반응의 촉매제로 이용하였다.

③ 회분식 효소반응기 : 평면 바닥(flat-bottom)과 water jacket을 가진 glass vessel (8cm × 3.5cm i.d.)을 사용하였다. 반응기 내부의 온도는 water jacket을 circulator (모델명: AAA57001, Jeio Tech., Daejeon, Korea)에 연결하여 조절하였다. 효소반응의 스케일업 (scale-up) 실험에는 평면 바닥과 water jacket을 가진 glass vessel (12cm × 6.5cm i.d.)을 사용하였다.

### (3) 효소반응

PLA<sub>1</sub>을 반응촉매로 이용한 PC의 가수분해 시, *sn*-1-LPC가 먼저 생성이 되고 *sn*-1-LPC의 가수분해가 더 진행이 되었을 때 아실기 이동현상이 일어나 부산물로서 L- $\alpha$ -GPC가 만들어 지게 된다. 본 연구에서는 PC를 가수분해하여 L- $\alpha$ -GPC의 생성량을 최대화 시키는 최적 반응조건을 조사하였다. PC 4g을 반응기질로 이용한 small-scale 반응에서 최적 반응조건을 확립하였다. 확립된 최적 반응조건에서 PC 40 g을 반응기질로 이용한 large-scale 반응을 실시하여 L- $\alpha$ -GPC의 생성량을 조사하였다. 반응매질인 헥산의 양은 small-scale 반응에서 16mL, large-scale 반응에서는 160mL이었다.

### (4) 반응산물로부터 효소의 제거

반응산물의 조성분석을 위하여 small-scale 또는 large-scale로 생산한 반응산물 0.2g을 취하여 2mL methanol:chloroform (2:1, v/v)에 용해한 후 0.45 $\mu$ m GH Polypro syringe filter (13mm)로 여과하여 PLA<sub>1</sub>을 제거하였다. 본 연구에서 확립된 최적 조건에서 large-scale로 생산된 반응산물을 800mL methanol:chloroform (2:1, vol/vol)에 용해한 후 0.45 $\mu$ m GH Polypro syringe filter (47mm)로 여과하여 PLA<sub>1</sub>을 제거하였다.

### (5) 분석

#### (가) Liquid chromatography-evaporative light scattering detector (LC-ELSD) 분석

LC-ELSD 분석에 사용한 시료는 효소를 제거한 반응산물을 93% 메탄올에 1mg/mL로 용해 후 0.45 $\mu$ m GH Polypro syringe filter (13mm)로 여과하여 준비하였다. LC-ELSD의 이동상으로는 100% 메탄올과 물을 93:7(v/v)의 비율로 혼합한 용매를 기울기 용리(isocratic elution) 조건에서 사용하였다. LiChrosorb<sup>®</sup> Si 60 (5 $\mu$ m, 250 × 4.0mm) 컬럼을 이용하였으며 컬럼의 온도는 35°C로 유지하였다. 시료 주입량은 20 $\mu$ L, 이동상의 유속은 1mL/min이었다. ELSD의 drift tube 온도는 60°C였으며 spray chamber 온도는 30°C이며 질소는 55psi의 압력으로 공급하였다. 반응산물의 PC, LPC 및 L- $\alpha$ -GPC의 함량은 w/w%로 계산하였다.

(나) LC-tandem mass spectrometry (MS/MS) 분석

LC-ELSD에서 검출된 반응산물의 구성성분은 LC-MS/MS 시스템을 이용하여 확인하였다. 반응산물의 농도가 300 $\mu$ g/mL이 되도록 93% 메탄올에 용해 후 20 $\mu$ L를 주입하여 LiChrosorb<sup>®</sup> Si 60 컬럼으로 분리한 후 LTQ-Velos mass spectrometry (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA)를 이용하여 각 피크에 대한 반응산물을 정성 분석하였다. LC-MS/MS의 이동상 조건은 LC-ELSD와 동일하였다. 검출을 위한 MS분석조건은 Table 27에 나타내었으며 전기분무 이온화법 (electrospray ionization, ESI)을 이용하여 반응산물을 이온화시켰다.

Table 27. ESI conditions in LTQ-Velos mass spectrometer

Device parameters	Conditions
Polarity	negative
Scan range	50-1000 $m/z$
Source voltage	4kV
Capillary temperature	275°C
Source heater temperature	250°C
Sheath gas flow rate	35arb with nitrogen
Auxiliary gas flow rate	5arb with nitrogen
Sweep gas flow rate	5arb with nitrogen

(다) 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)

RSM은 복수의 변수(독립변수, independent variable) 작용으로 반응(종속변수, independent variable)이 복합적으로 나타나는 문제를 분석하는 방법으로 반응량이 최적화될 수 있는 독립변수의 조합을 찾는 데 유용한 통계기법이다. RSM은 회귀 분석법(regression analysis)의 일종으로 인과 관계가 있는 두 변수(즉, 독립변수와 종속변수) 사이에서 한 변수가 다른 변수에 미치는 영향력을 알아보기 위해 사용한다. 특히 1개의 종속변수와 2개 이상의 독립변수 사이의 인과 관계를 규명하는데 사용하는 다중(multiple) 회귀 분석의 일종이다. RSM은 stat-Ease사의 design expert 8.0 (Minneapolis, MN, USA)을 이용하여 실시하였다. RSM의 원리를 이용하여 L- $\alpha$ -GPC의 생성량을 최대화하는 최적 반응조건을 설정하였다. 중심합성계획법 중 축점(star point)이 중심점으로부터 1.414의 거리(star distance)에 있는 central composite circumscribed (CCC) design을 이용하여 실험을 설계하였다. L- $\alpha$ -GPC의 최적 합성조건 설정을 위한 독립변수는 온도(40-55°C), 반응시간(15-30h), 기질의 수분함량(40-80w/w%) 및 효소량(5-15w/w%)이었으며 종속변수는 반응산물의 L- $\alpha$ -GPC 함량(w/w%)이었다. 각 독립변수의 실험범위를 +1.414, +1, 0, -1, -1.414의 5단계로 부호화하고 요인점(factorial point) 16개, 축점 8개, 중심점(center point) 3개를 포함한 27개의 조건을 설정한 후 각각의 조건에서 효소반응을 실시하였다. 위의 4개의 반응조건이 L- $\alpha$ -GPC 함량에 미치는 영향을 예측하는 2차 다항 회귀모형(second-order regression model)은 아래의 식과 같

다.

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^4 b_i X_i + \sum_{i=1}^4 b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^4 b_{ij} X_i X_j$$

Y는 종속변수, 즉 L- $\alpha$ -GPC 함량이고,  $X_i$ 는 독립변수로, 온도, 반응시간, 기질의 수분함량 및 효소량이였다.

#### (6) 반응산물의 정제

PLA<sub>1</sub>을 반응촉매로 이용한 soy PC의 가수분해 시 반응산물 내에 FFA, phosphocholine과 L- $\alpha$ -GPC가 혼재되어 있다. FFA와 phosphocholine을 용매 추출법과 실리카 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 L- $\alpha$ -GPC와 분리정제하였다.

##### (가) 용매 추출법(solvent extraction)

극성도가 낮은 디에틸에테르 (40mL)을 3번 반복하여 반응산물로부터 FFA를 분리하였다. N<sub>2</sub> flushing을 하여 잔존하는 디에틸에테르를 완전히 제거하였다.

##### (나) 실리카 컬럼 크로마토그래피(silica column chromatography) (Figure 71)

250mL 비커에 실리카겔 60 (Merck, darmstadt, Germany) 50g을 넣고 충분한 양의 메탄올과 물을 85:15 (v/v) 비율로 섞은 용매를 천천히 넣어주어 실리카겔을 적셔준 뒤 스파출라를 이용하여 충분히 저어주면서 기포를 제거하였다. 약간의 용매를 미리 넣어둔 유리 컬럼(ID × Length = 3cm × 30cm)에 적신 실리카겔을 채웠다. 시료(용매 추출법을 통해 FFA가 제거된 반응산물) 0.2g을 파스퇴르피펫을 이용하여 실리카겔층 위에 로딩한 후 일정시간 용출시켜 시료를 실리카겔 상층부에 흡착시켰다. 용매를 분당 1mL의 유속으로 실리카겔 층 위로 지속적으로 흘려주면서 시료를 용출하였으며 cap tube에 40mL씩 분획하였다. 각각 cap tube에 얻은 분획물은 LC-ELSD를 이용하여 분석하였다.



Figure 71. Silica column chromatography to remove residual FFAs and phosphocholine from reaction products

#### 나. 결과 및 고찰

##### (1) LC를 이용한 반응산물의 분석

L- $\alpha$ -GPC 함량에 대한 회귀모형을 이용하여 반응산물의 L- $\alpha$ -GPC 함량을 최대화시키는 최적 조건을 확립하였고 확립된 최적 조건을 바탕으로 10배 수준까지 성공적으로 효소반응의 스케일업을 달성하였다. 최적 조건에서 10배 수준으로 스케일업하여 생산한 반응산물의 FFA 및 L- $\alpha$ -GPC 함량을 LC-ELSD를 이용하여 분석하였다. Figure 72(A)는 본 효소반응에 이용한 반응기질인 PC의 분석 결과이고 Figure 72(B)는 확립된 최적 반응조건에서의 반응산물을 분석한 결과이다. 최적 반응조건에서 기질인 PC가 완전하게 가수분해가 되어 FFA와 L- $\alpha$ -GPC가 생성됨을 확인하였다. 하지만 FFA 피크 다음에 unknown 피크가 검출되어 이 물질을 파악하기 위해 LC-MS/MS 분석을 실시하였다(Figure 73).

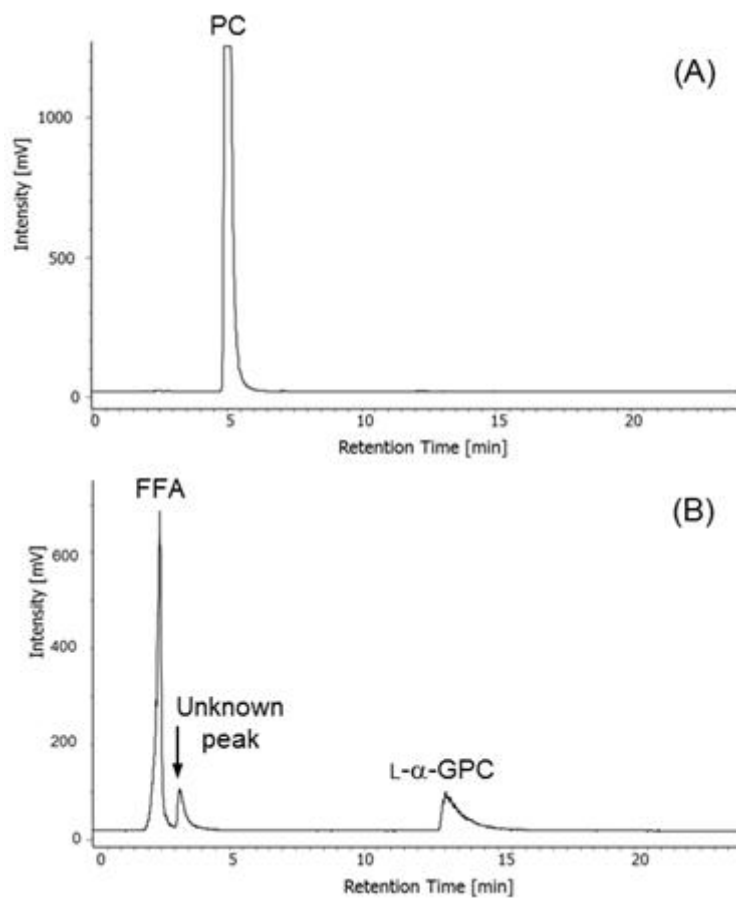


Figure 72. Liquid chromatography–evaporative light scattering detector (LC-ELSD) chromatograms of (A) soy phosphatidylcholine (PC) and (B) reaction products obtained under the optimal conditions for Lecitase Ultra-catalyzed hydrolysis of soy PC to produce L- $\alpha$ -glycerylphosphorylcholine (L- $\alpha$ -GPC).

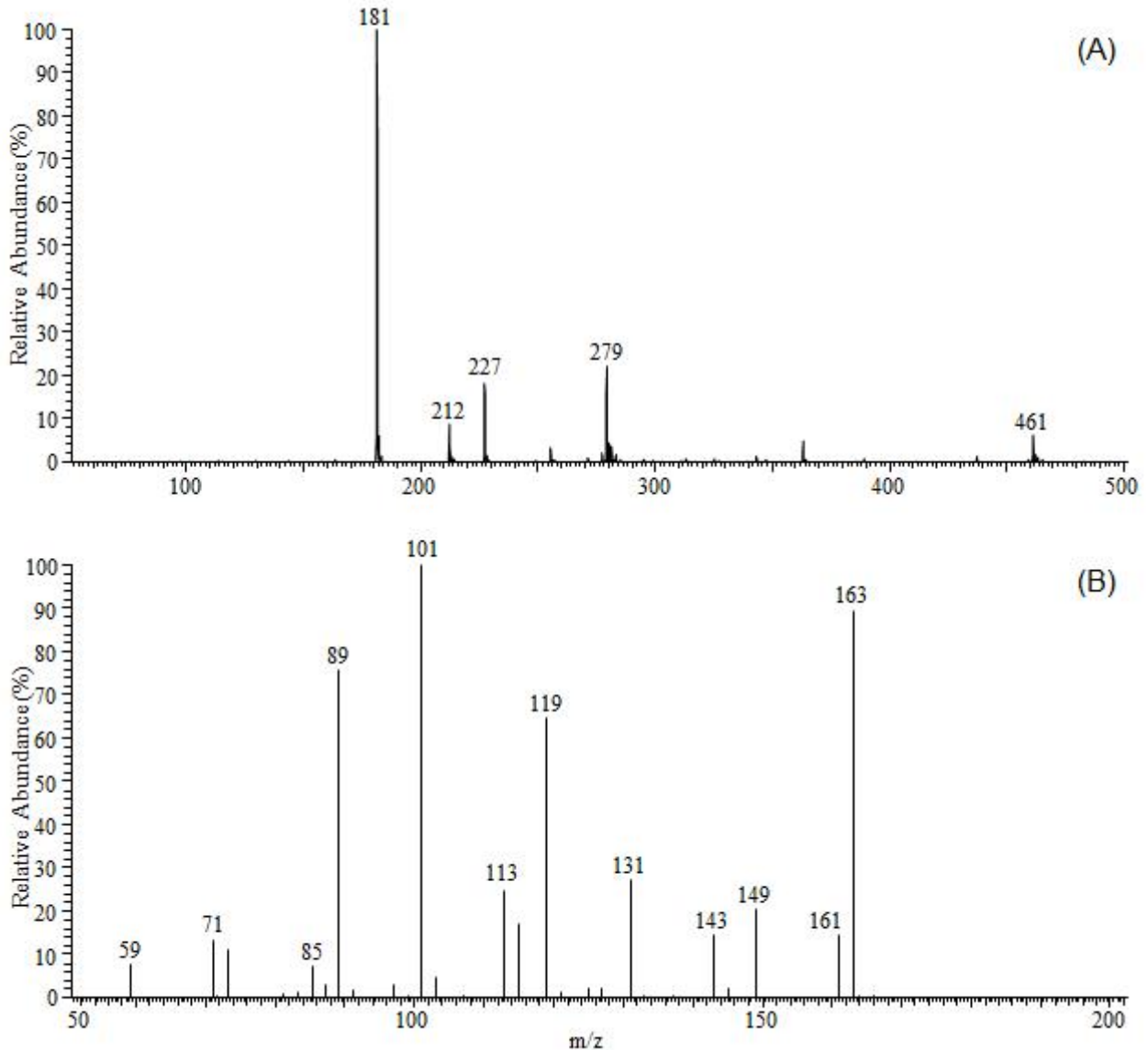


Figure 73. LC-tandem mass spectrometry (MS/MS) spectrums of (A) negative MS spectrum of unknown peak at 3.37min and (B) MS/MS spectrum at  $m/z$  181.

Figure 73(A)는 unknown 물질의 MS spectrum으로 주요 피크인 것으로 보아 이는 PC의 *sn*-3 위치에 있는 phosphocholine인 것으로 예상되었다. 더 자세한 구조분석을 위해  $m/z$  181의 MS/MS spectrum은 Figure 73(B)와 같았으며 각 fragment 이온의 구조화합식을 Table 28에 나타내었다. Phosphocholine 분자로부터 산소나 인 원자가 제거되어  $m/z$ 값이 163, 149, 101 및 85인 이온들이 생성되었으며, 이와 함께 메틸렌이나 메틸 그룹이 함께 제거되어  $m/z$ 값이 119, 89 및 71인 이온들이 생성됨을 확인하였다. 이러한 결과를 바탕으로 반응 촉매제인 Lecitase Ultra는  $PLA_1$ 으로 주로 구성되어 있지만 phospholipase C(PLC)와 같은 *sn*-3 위치 특이성을 효소가 포함되어 있어 phosphocholine이 생성되는 것이라 추측되었다.

Table 28. Fragmentation patterns for the ion at  $m/z$  181 observed in the reaction products<sup>a</sup> and possible structural formula for the fragment ion species in the mass spectra produced by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (negative ion mode)

$m/z$	Product ion species	Structural formula
MS spectrum at retention time of 3.37min		
181	$[M - H]^-$	$PO_4(CH_2)_2N(CH_3)_3 - H$
MS/MS spectrum at $m/z$ 181		
163	$[M - 16 - 3H]^-$	$PO_3(CH_2)_2N(CH_3)_3 - 3H$
149	$[M - 32 - H]^-$	$PO_2(CH_2)_2N(CH_3)_3 - H$
119	$[M - 62 - H]^-$	$PO_2(CH_2)_2NCH_3 - H$
101	$[M - 79 - 2H]^-$	$O(CH_2)_2N(CH_3)_3 - 2H$
89	$[M - 93]^-$	$PO(CH_2)_2N$
85	$[M - 95 - 2H]^-$	$(CH_2)_2N(CH_3)_3 - 2H$
71	$[M - 109 - 2H]^-$	$CH_2N(CH_3)_3 - 2H$

<sup>a</sup> Obtained under the optimal conditions to completely hydrolyze soy phosphatidylcholine (PC) into L- $\alpha$ -glycerylphosphorylcholine using Lecitase Ultra as the biocatalyst (i.e., temperature, 50°C; reaction time, 30h; water content, 69% of PC weight; and enzyme loading, 13% of PC weight).



## (2) 모델 적합성 검증 (model fitting)

PLA<sub>1</sub>을 생체축매로 이용하여 PC의 가수분해 시, 반응조건에 따른 L- $\alpha$ -GPC 생성량의 변화를 통계적으로 모델링하고 확립된 모델식을 이용하여 L- $\alpha$ -GPC의 생성량을 최대로 증가시키는 최적 반응조건을 설정하기 위하여 반응표면분석법을 이용하였다. 반응표면분석을 위한 중심합성계획법 중 central composite circumscribed (CCC) design을 이용하여 실험을 설계하였다. 반응온도(Te), 반응시간(RT), 기질의 수분함량(WC) 및 효소량(En)의 네 개의 반응조건을 독립변수로 사용하여 -1.414, -1, 0, +1, +1.414로 부호화하였고 PC를 PLA<sub>1</sub>으로 가수분해하여 생성되는 L- $\alpha$ -GPC 함량을 종속변수로 하여 생성 모델에 적용하였다. 독립변수의 범위로 반응온도는 40-55°C, 반응시간은 15-30시간, 기질의 수분함량은 40-80w/w%, 효소량은 5-15w/w%이었으며 이상의 범위는 2차년도의 연구결과를 바탕으로 결정하였다.

본 연구에서 이용한 CCC design에 따라 요인점(factorial point) 16개, 축점(star point) 8개, 중심점(center point) 3개를 포함한 27개의 조건을 설정하여 2회 반복 실험하였다. 설정된 27개의 반응조건과 각 조건에서의 반응산물인 L- $\alpha$ -GPC 함량은 Table 29에 나타내었다. 반응산물의 L- $\alpha$ -GPC 함량의 범위는 0.4-99.3w/w%이었다. L- $\alpha$ -GPC 함량은 온도가 증가함에 따라 증가하는 경향을 나타내었는데 이러한 결과는 PLA<sub>1</sub>의 활성도가 온도에 의해 직접적으로 영향을 받는다는 사실에 기인하기도 하지만 그 보다는 온도에 따른 PC의 물리적 상태가 더 직접적인 요인으로 작용한 것으로 판단되었다. 즉, 반응시간 초기에는 PC와 효소의 혼합물의 점성이 높고 서로 뭉쳐있는 상태로 존재하여 PC와 효소가 충분히 혼합이 되지 않는 현상이 나타났는데 반응이 진행됨에 따라 LPC의 생성량이 증가하면서 이러한 현상은 점차 사라졌다. PC와 효소가 충분히 혼합되지 않는 현상이 지속되는 시간은 반응계의 온도가 높을수록 PC와 효소의 혼합물의 점성이 감소하여 PC와 효소의 혼합이 보다 용이해지기 때문이다. 반응시간의 경우 길어짐에 따라 L- $\alpha$ -GPC 함량이 대체로 증가하는 경향이 나타났다. 이는 생성된 *sn*-1-LPC에서 아실기 이동이 일어나 *sn*-2-LPC가 만들어지고 *sn*-1 위치의 아실기가 PLA<sub>1</sub>에 의해 분해되기 때문인 것으로 판단되었다. 또한 효소량이 증가할수록 가수분해 반응이 많이 일어나기 때문에 효소량이 증가함에 따라 L- $\alpha$ -GPC의 함량이 증가하는 경향을 나타내었다.

Table 29. Central composite circumscribed design arrangement and responses for the Lecitase Ultra-catalyzed hydrolysis of soy phosphatidylcholine for L- $\alpha$ -glycerylphosphorylcholine (L- $\alpha$ -GPC) production

Exp. no.	Factor				Response
	Te (°C)	RT (h)	WC (w/w%)	En (w/w%)	L- $\alpha$ -GPC content (w/w%)
1	40.0	15.0	40.0	5.0	4.8 ± 2.8
2	55.0	15.0	40.0	5.0	15.6 ± 5.5
3	40.0	30.0	40.0	5.0	18.2 ± 1.6
4	55.0	30.0	40.0	5.0	71.1 ± 5.2
5	40.0	15.0	80.0	5.0	0.4 ± 0.6
6	55.0	15.0	80.0	5.0	8.1 ± 0.5
7	40.0	30.0	80.0	5.0	1.8 ± 1.2
8	55.0	30.0	80.0	5.0	17.6 ± 1.9
9	40.0	15.0	40.0	15.0	5.7 ± 0.6
10	55.0	15.0	40.0	15.0	30.9 ± 4.8
11	40.0	30.0	40.0	15.0	24.4 ± 4.2
12	55.0	30.0	40.0	15.0	93.0 ± 1.2
13	40.0	15.0	80.0	15.0	7.2 ± 1.6
14	55.0	15.0	80.0	15.0	92.7 ± 7.4
15	40.0	30.0	80.0	15.0	90.5 ± 9.1
16	55.0	30.0	80.0	15.0	99.3 ± 1.0
17	36.9	22.5	60.0	10.0	11.8 ± 1.7
18	58.1	22.5	60.0	10.0	96.9 ± 0.1
19	47.5	11.9	60.0	10.0	51.2 ± 4.1
20	47.5	33.1	60.0	10.0	88.4 ± 8.2
21	47.5	22.5	31.7	10.0	64.4 ± 5.7
22	47.5	22.5	88.3	10.0	79.8 ± 7.3
23	47.5	22.5	60.0	2.9	14.7 ± 7.3
24	47.5	22.5	60.0	17.1	95.0 ± 5.4
25	47.5	22.5	60.0	10.0	94.4 ± 3.7
26	47.5	22.5	60.0	10.0	95.5 ± 2.2
27	47.5	22.5	60.0	10.0	80.9 ± 7.2

All values represent mean ± standard deviation ( $n = 2$ ).

Abbreviations: Te, temperature; RT, reaction time; WC, water content; and En, enzyme loading.

위의 반응표면 분석 결과를 바탕으로 얻어진 반응온도(Te), 반응시간(RT), 기질의 수분함량(WC) 및 효소량(En)에 따른 반응산물인 L- $\alpha$ -GPC 함량의 2차 다항 회귀모형의 적합성(goodness-of-fit)을 평가하기 위하여 분산분석(Analysis of Variance, ANOVA)을 실시하였다(Table 30). L- $\alpha$ -GPC 함량의 회귀모형은 1% 유의수준에서 통계적으로 유의하였다. 또한 이 모델식의 적합결여(lack of fit)의  $p$ -value는 0.1676이었다. 적합결여 검정은 선형 회귀모형이 타당한지, 즉 독립변수  $X$ 와 종속변수  $Y$  사이의 함수관계를 단순 회귀모형으로 표현하는 것이 적절한지를 검정하는 통계기법이다. 따라서 상기 네 개의 반응인자와 L- $\alpha$ -GPC 함량의 관계를 나타낸 회귀모형은 5% 유의수준에서 적합한 것으로 평가되었다.

Table 30. ANOVA table

Variable	df	SS	MS	$F$ -value	$p$ -value
Corrected total	26	39326.23			
Model	8	33492.80	4186.60	12.92	<0.0001
Residual	18	5833.42	324.08		
Lack of fit	16	5701.22	356.33	5.39	0.1676
Pure error	2	132.21	66.10		

Abbreviations: df, degree of freedom; SS, sum of squares; and MS, mean square.

L- $\alpha$ -GPC 함량의 2차 다항 회귀모형의 적합성을 평가하기 위한 또 다른 지표로 모델식의 결정계수(coefficients of determination)를 산출하였다. 결정계수는 추정된 회귀모형이 주어진 자료에 적합한 정도를 나타낸다. 결정계수를 구하기 위해 Table 29의 27개의 반응조건에서 얻어진 반응산물의 L- $\alpha$ -GPC 함량과 회귀모형식을 이용하여 예측된 L- $\alpha$ -GPC 함량 간의 parity plot을 이용하였다(Figure 74). 결정계수  $R^2$ 은 총 변량 중 회귀모형으로 설명 가능한 변량의 비율을 나타내는 값으로  $R^2$ 의 값이 1에 가까울수록 회귀모형의 설명력이 높음을 의미한다. L- $\alpha$ -GPC 함량에 대한 회귀모형의  $R^2$  값은 0.8517로 나타나 회귀모형의 설명력이 높았다.  $R^2$  값은 모형에 사용되는 독립변수가 늘어날수록 증가하기 때문에 독립변수의 개수가 서로 다른 모형의 설명력을 비교할 때는 조정 결정계수(adjusted  $R^2$ )를 사용한다. Adjusted  $R^2$  값은 L- $\alpha$ -GPC 함량에 대한 회귀모형에서 0.7857로 나타났다.  $R^2$ 과 Adjusted  $R^2$ 은 회귀모형이 회귀모형의 도출에 사용된 데이터에 얼마나 잘 맞는지를 보여주는 지표로 모형의 예측력을 정확하게 평가하기에는 한계점을 갖고 있다. 이와 달리 예측 결정계수(predicted  $R^2$ )는  $Q^2$ 이라고도 표시하는데 회귀모형이 새로운 관찰에 대한 반응을 얼마나 잘 예측하는지를 나타내는 지표로 모형의 실제 적합성을 평가하는 데 보다 더 유용할 수 있는 결정계수이다. L- $\alpha$ -GPC 함량에 대한 회귀모형의  $Q^2$  값은 0.6554으로 나타나 L- $\alpha$ -GPC 함량에 대한 회귀모형의 예측력이 우수하였다. 결론적으로 세 종류의 결정계수 값 모두 L- $\alpha$ -GPC 함량에 대한 회귀모형에서 모두 높게 나타나 L- $\alpha$ -GPC 함량에 대한 회귀모형의 적합성이 우수한 것으로 평가되었다.

이상 본 연구에서 도출된 L- $\alpha$ -GPC 함량에 대한 회귀모형의 적합성을 분산분석의 적합결여 검정과 결정계수를 이용하여 평가한 결과 모형이 양호한 적합성을 보이는 것으로 판단되었다.

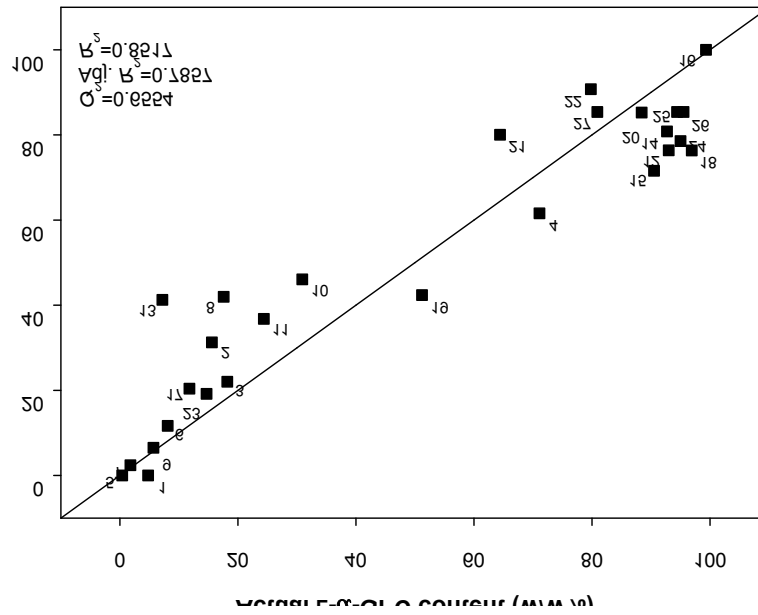


Figure 74. Parity plot showing the relationships between the observed values and the values predicted by the regression model for L- $\alpha$ -glycerylphosphorylcholine (L- $\alpha$ -GPC) content. Numbers inside the graph represent the experimental numbers shown in Table 29

### (3) 모델 타당성 검증 (model validation)

실제의 현상과 통계모델의 사이에는 “이상화, 단순화에 의한 오차”가 포함되어 있다. 이 오차를 구하기 위해서는 모형에 의해 예측되는 값과 실제의 실험결과를 비교 검토할 필요가 있다. 본 연구에서 도출된 L- $\alpha$ -GPC 함량에 대한 회귀모형의 타당성(유효성)을 검증하기 위해 독립변수의 주어진 범위에서 Table 29의 27개 반응조건을 제외한 8개의 반응조건을 추가적으로 설정하고 이들 조건에서 얻은 반응산물의 L- $\alpha$ -GPC 함량을 회귀모형식을 이용하여 예측한 L- $\alpha$ -GPC 함량과 서로 비교하였다(Table 31). L- $\alpha$ -GPC 함량에 대한 회귀모형의 예측 오차(prediction error)는 0.9-907.7%의 범위에 있었다. 그 결과 1번 조건(온도 44.9°C, 반응시간 16.1h, 기질의 수분함량 78w/w%, 효소량 5w/w%), 2번 조건(온도 40.6°C, 반응시간 15.2h, 기질의 수분함량 75.6w/w%, 효소량 9.5w/w%)에서 얻은 반응산물인 L- $\alpha$ -GPC 함량의 예측오차는 각각 393.3%, 907.7%로 다른 조건에서의 예측오차에 비해 크게 나타났다. 이들 두 가지 반응조건에서 예측오차가 비교적 컸던 이유는 예측값이 다른 조건에서의 예측값보다 상대적으로 작았으며 실측값이 예측값과의 오차에 비해 작았기 때문인 것으로 생각된다. 이들 두 가지 반응조건을 제외한 다른 조건들의 L- $\alpha$ -GPC 예측 오차는 모두 50% 이하로 비교적 작게 나타났다. 따라서 본 연구의 목표는 L- $\alpha$ -GPC의 생성량을 최대한 증가시키는 모델을 확립하는 것이므로 L- $\alpha$ -GPC 생산이 최대화되는 조건과 유사한 8번 조건(온도 49.0°C, 반응시간 29.6h, 기질의 수분함량 61.9w/w%, 효소량 12.3w/w%)에서의 L- $\alpha$ -GPC 함량의 예측오차는 0.9%로 매우 높은 정확도를 나타내었다. 따라서 본 연구에서 도출된 L- $\alpha$ -GPC 함량에 대한 회귀모형은 타당성을 가지고 있는 것으로 평가되었다.

Table 31. Observed values and values predicted by the regression model for the responses in eight additional experimental sets

Exp. no.	Factor				Response		
	Te (°C)	RT (h)	WC (w/w%)	En (w/w%)	L- $\alpha$ -GPC content (w/w%)		
					Observed	Predicted	%PE
1	44.9	16.1	78.0	5.0	1.5 $\pm$ 0.6	7.4	393.3
2	40.6	15.2	75.6	9.5	2.6 $\pm$ 0.7	26.2	907.7
3	43.7	17.0	46.4	14.0	45.3 $\pm$ 23.0	48.8	7.7
4	48.4	15.7	48.3	10.3	45.3 $\pm$ 9.4	63.4	40.0
5	53.7	18.8	68.6	9.7	93.8 $\pm$ 6.9	78.9	15.9
6	52.3	19.8	51.6	11.6	83.3 $\pm$ 1.0	85.0	2.0
7	50.0	24.0	70.0	10.0	88.1 $\pm$ 5.9	94.4	7.2
8	49.0	29.6	61.9	12.3	99.1 $\pm$ 1.3	100.0	0.9

All values represent mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 2$ ).

Abbreviations: Te, temperature; RT, reaction time; WC, water content; En, enzyme loading; L- $\alpha$ -GPC, L- $\alpha$ -glycerylphosphorylcholine; and %PE, percentage prediction error.

#### (4) 반응인자의 영향 (Effects of reaction parameters)

앞서 L- $\alpha$ -GPC 함량에 대한 회귀모형의 도출 시 사용된 독립변수들은 후진제거법(backward elimination method)을 이용하여 선택하였다(Table 32). 후진제거법은 모든 설명변수를 고려한 모형에서 유의하지 않은 설명변수를 하나씩 제거하는 방법이다. 즉 본 연구에서 PC의 가수분해 산물의 L- $\alpha$ -GPC 함량에 영향을 미치는 반응인자로 고려된 반응온도(Te), 반응시간(RT), 기질의 수분함량(WC) 및 효소량(En)의 일차항(linear term)과 이들 인자의 제곱인 이차항(quadratic term), 그리고 이들 인자간의 교차항(interaction term)을 모두 설명변수로 모형에 삽입한 후 가장 유의하지 않은 설명변수를 제외해가면서 최종적으로 모형에는 유의한 설명변수만을 남김으로써 L- $\alpha$ -GPC 함량에 대한 회귀모형을 각각 도출하였다. 각각의 회귀모형에서 최종적으로 선택된 독립변수의 계수(coefficients)의 절대값은 종속변수에 미치는 상대적인 영향력을 의미한다.

L- $\alpha$ -GPC 함량에 유의적인 영향을 미치는 반응인자는 온도(Te), 반응시간(RT), 기질의 수분함량(WC)과 효소량(En)이었다. 특히 효소량은 L- $\alpha$ -GPC 함량에 대해 가장 큰 설명력을 가지고 있는 변수로 판단되었다. 즉 효소량의 일차항(20.98)은 온도의 일차항(19.78) 및 반응시간의 일차항(15.16) 보다 큰 계수 값을 가지고 있으며 온도, 반응시간 및 효소량의 이차항은 모두 10% 수준에서 유의한 설명력을 나타내었다. 기질의 수분함량의 경우 일차항은 유의적인 영향을 나타내지 않았으나 효소량과의 교차항은 1% 수준에서 유의하였으며 13.59의 양의 계수 값을 나타내었다. 특히 온도, 반응시간 및 효소량의 일차항은 각각 19.78, 15.16, 20.98의 양의 계수 값을 가지고 있는 데 비해 온도의 이차항(-18.51), 반응시간의 이차항(-10.79) 및 효소량의 이차항(-18.26)은 음의 계수 값을 가지고 있었다. 이러한 결과는 본 연구에서 조사한 온도(40-55°C), 반응시간(15-30h), 효소량(5-15w/w%)의 범위에서는 각 변수의 값이 증가함에 따라 L- $\alpha$ -GPC 함량이 증가하다가 일정 조건에서 최대값에 도달한 후 다시 그 함량이 감소하는 경향을 나타내는 것을 의미한다. 이러한 경향은 네 개의 반응인자 중 세 개를 중심값으로 고정하고 나머지 한 개의 반응인자의 변화에 따른 L- $\alpha$ -GPC 함량을 예측한 Figure 75에서도 확인할 수 있었다.

Table 32. Significant regression coefficients of the quadratic polynomial models for the Lecitase Ultra-catalyzed hydrolysis of soy phosphatidylcholine

Effect	Coefficient	<i>p</i> -value
Intercept	85.39	<0.0001
Linear		
Te	19.78	0.0001
RT	15.16	0.0014
WC	3.78	0.3597 <sup>a</sup>
En	20.98	<0.0001
Quadratic		
Te*Te	-18.51	0.0066
RT*RT	-10.79	0.0904
En*En	-18.26	0.0072
Interaction		
WC*En	13.59	0.0074

<sup>a</sup> Not significant at  $p < 0.1$

Abbreviations: Te, temperature; RT, reaction time; WC, water content; and En, enzyme loading.

Figure 75은 온도, 반응시간, 효소량 각각의 반응인자가 L- $\alpha$ -GPC 함량에 미치는 영향을 비교하여 나타내고 있다. 온도가 증가할수록 L- $\alpha$ -GPC 함량이 증가하다가 일정해지는 경향을 나타내었는데 이는 온도가 증가할수록 가수분해와 아실기 이동현상이 많이 일어나 L- $\alpha$ -GPC의 함량을 최대로 증가시키는데 바람직한 것으로 생각되었다. 반응시간의 경우 L- $\alpha$ -GPC 함량은 반응시간이 길어질수록 증가하다 일정해지는 경향을 나타내었다. 따라서 L- $\alpha$ -GPC의 생성을 최대화시키기 위해서 반응을 길게 진행하는 것이 필요하다고 판단되었다. 효소량이 증가할수록 L- $\alpha$ -GPC 함량 또한 증가하다가 일정해지는 경향을 나타내므로 L- $\alpha$ -GPC의 생성을 최대화시키는 효소량으로 반응을 진행하는 것이 바람직하다고 생각되었다. 기질의 수분함량의 경우 L- $\alpha$ -GPC 함량 변화에 유의적인 영향을 끼치지 않았지만 효소량과 교호작용이 있었기 때문에 온도, 반응시간을 중심값으로 고정하고 기질의 수분함량과 효소량의 변화에 따른 L- $\alpha$ -GPC 함량을 예측한 3차원 반응표면도에서 확인할 수 있었다(Figure 76).

효소량의 조건에 따라 기질의 수분함량이 L- $\alpha$ -GPC 생성에 끼치는 영향을 나타내었다. 효소량이 많은 조건에서 기질의 수분함량이 증가할수록 L- $\alpha$ -GPC 함량은 계속 증가하는 경향을 나타내었고 이와 달리 효소량이 적은 조건에서 기질의 수분함량이 증가할수록 L- $\alpha$ -GPC 함량이 계속 감소하는 경향을 나타내었다. 가수분해 반응 시 물이 필요하지만 필요한 물의 양에는 적절한 범위가 있으며 L- $\alpha$ -GPC 생성을 증가시키기 위해서는 기질의 수분함량과 효소량 간의 적절한 비율이 필요한 것으로 생각되었다.

결론적으로 L- $\alpha$ -GPC의 생성량을 최대화하기 위해서는 높은 온도, 장시간의 반응, 높은 효



소량과 더불어 기질의 수분함량과 효소량의 적절한 비율에서 반응을 시켜야 하지만 경제적인 측면에서 L- $\alpha$ -GPC 함량이 최대화되는 조건의 효소량 범위 내에서 최소량을 사용하는 것이 바람직한 것으로 판단되었다.

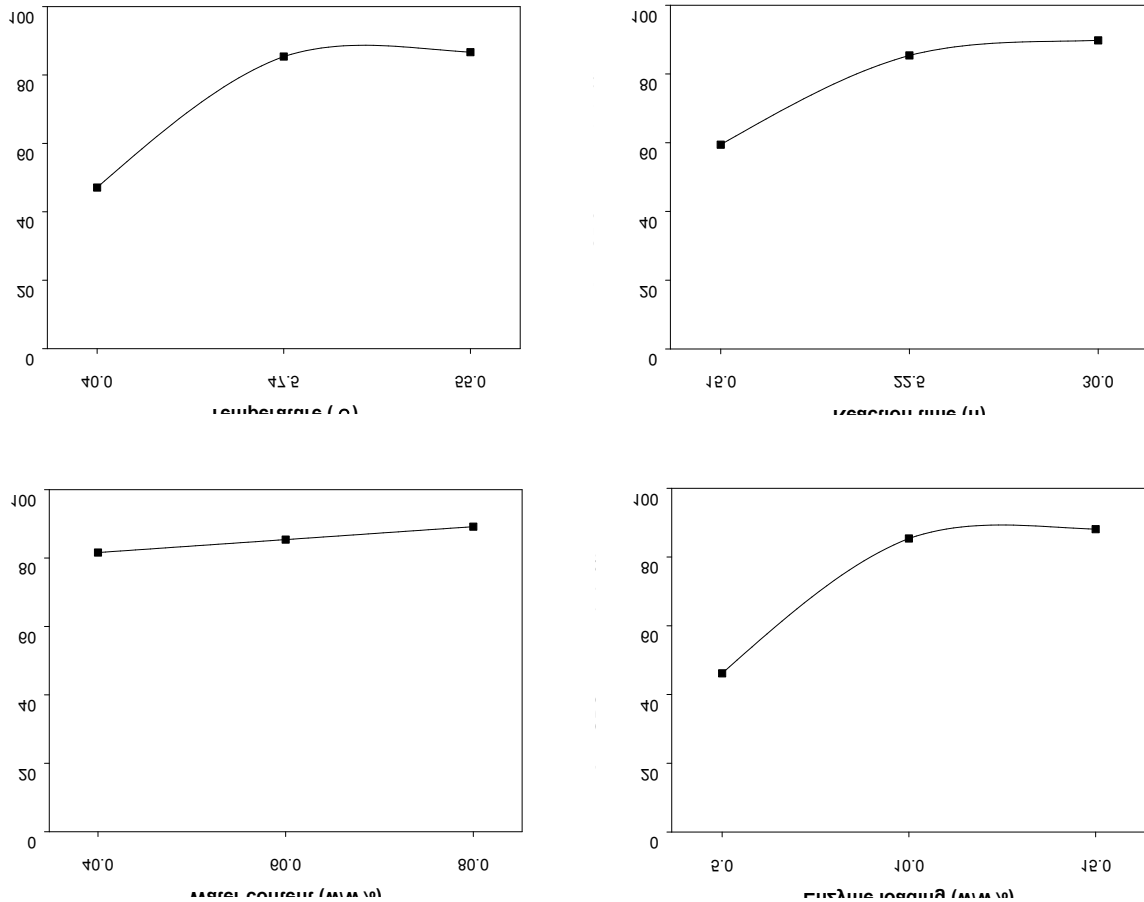


Figure 75. Prediction plots for L- $\alpha$ -glycerylphosphorylcholine (L- $\alpha$ -GPC) content according to the effects of reaction parameters. The coded values of all reaction parameters were zero (i.e., 47.5°C for temperature, 22.5h for reaction time, 60w/w% for water content, 10w/w% for enzyme loading) except those of a reaction parameter represented on the  $X$ -axis

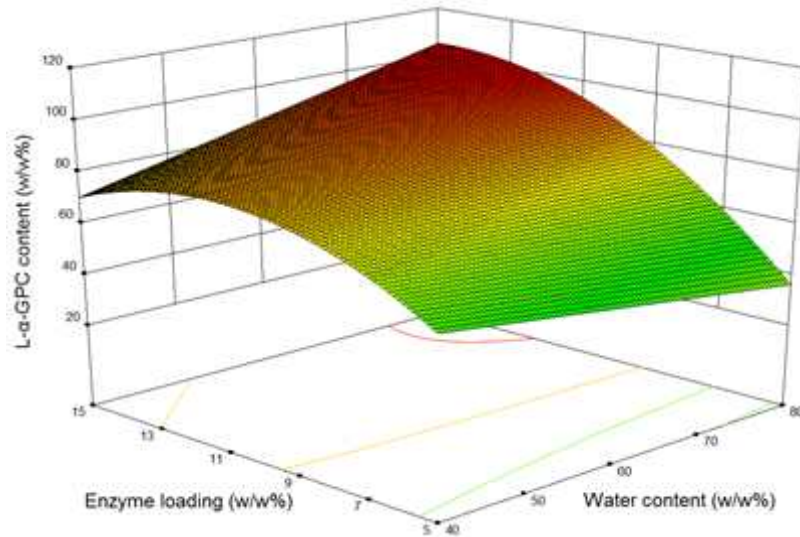


Figure 76. Response surface plot for L- $\alpha$ -glycerylphosphorylcholine (L- $\alpha$ -GPC) content as functions of the water content and enzyme loading

(5) 최적 반응조건의 확립(optimization of reaction conditions)

L- $\alpha$ -GPC 함량에 대한 회귀모형을 이용하여 반응산물의 L- $\alpha$ -GPC 함량을 최대화하는 최적 조건을 확립하였다. 최적 조건의 선정이 필요한 반응인자는 L- $\alpha$ -GPC 함량에 대한 회귀모형의 설명변수로 온도, 반응시간, 효소량이 선택되었다. L- $\alpha$ -GPC의 생성을 최대로 증가시키기 위해서는 L- $\alpha$ -GPC 함량에 대한 영향력이 높은 온도, 반응시간 및 효소량을 최대한 증가시켜 반응을 진행하는 것이 필요하다. 한편 기질의 수분함량의 경우 회귀모형의 설명변수로 선정이 되지 않았지만 효소량과의 교호작용에 의한 영향이 있으므로 L- $\alpha$ -GPC의 생산량을 극대화시키는 비율에 맞추어 선택하는 것이 바람직한 것으로 생각되었다. 이러한 측면들을 고려하여 선정된 최적 반응조건은 반응온도 50°C, 반응시간 30시간, 기질의 수분함량 69w/w%, 효소량 13w/w% 이었다(Table 33). 최적 반응조건에서의 기질의 수분함량과 효소량의 비율은 5.3:1, 반응매질인 헥산과 물의 비율은 5.8:1 그리고 기질과 매질의 비율은 매질 100mL에 PC 21.3g이었다. 그 결과, 회귀모형으로 예측된 L- $\alpha$ -GPC 함량은 100w/w%이었으며 실제 반응산물의 L- $\alpha$ -GPC 함량은 99.0w/w%이었다. 따라서 L- $\alpha$ -GPC 함량의 예측오차는 1.0%로 매우 낮은 값을 보였으며 예측값과 실측값 간의 절대오차 역시 1.0w/w%로 매우 낮았다. 본 연구에서는 glass vessel (8cm  $\times$  3.5cm i.d.)에서 PC 4g을 기질로 이용하여 효소반응의 모델링과 반응조건의 최적화 실험을 실시하였다. 효소반응 시스템의 스케일업(scale-up) 기술 개발의 일환으로 용량이 더 큰 glass vessel (12cm  $\times$  6.5cm i.d.)을 반응기로 이용하고 기질량을 10배 증가시킨 후 확립된 최적조건에서 효소반응을 실시하였다. 다음 동일한 최적 반응조건에서 small-scale (즉, PC 4g을 기질로 이용)로 제조한 반응산물과 large-scale(즉, PC 40g을 기질로 이용)로 생산한 반응산물의 L- $\alpha$ -GPC 함량을 서로 비교하였다. Large-scale로 얻은 반응산물의 L- $\alpha$ -GPC 함량은 100.0w/w%이었다. 따라서 두 반응산물의 L- $\alpha$ -GPC 함량 간의 상대표준편차(relative standard deviation)는 0.7%로 매우 높은 정밀도를 나타내었다. 따라서 본 연구에서는 10배 수준까지 성

공적으로 효소반응의 스케일업을 달성하였다.

Table 33. Selected optimal conditions and responses for maximizing L- $\alpha$ -glycerylphosphorylcholine (L- $\alpha$ -GPC) content in the Lecitase Ultra-catalyzed hydrolysis of soy phosphatidylcholine (PC)

Scale	Factor				WC-to-En ratio (w/w)	<i>n</i> -Hexane-to-water ratio in the medium (v/v)	Substrate-to-medium ratio (w/v)	Response		
	Te (°C)	RT (h)	WC (w/w%)	En (w/w%)				L- $\alpha$ -GPC content (w/w%)		
							Observed	Predicted	%PE	
Small <sup>a</sup>	50	30	69	13	5.3:1	5.8:1	PC 21.3 g/100 mL	99.0 ± 1.4	100.0	1.0
Large <sup>b</sup>								100.0 ± 0.0		
%RSD								0.7		

<sup>a</sup> Performed with 4g of soy phosphatidylcholine

<sup>b</sup> Performed with 40g of soy phosphatidylcholine

All values represent mean ± standard deviation (*n* = 2).

Abbreviations: Te, temperature; RT, reaction time; WC, water content; En, enzyme loading; %PE, percentage prediction error; and %RSD, relative standard deviation.

#### (6) 반응산물의 정제(purification of reaction products)

최적 반응조건에서 PC 가수분해에 의해 생성된 반응산물의 함량은 FFA 63.0w/w%, phosphocholine 10.8w/w%, 그리고 L- $\alpha$ -GPC 26.2w/w%이었다. 고순도의 L- $\alpha$ -GPC를 생산하기 위해 용매 추출법과 실리카 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 FFA와 phosphocholine을 L- $\alpha$ -GPC와 분리정제한 후, 정제산물을 LC-ELSD 분석하였다(Figure 77).

##### (가) 용매 추출법을 이용한 FFA 정제

PC의 가수분해에 의한 L- $\alpha$ -GPC의 생산 시 반응산물에는 FFA가 함께 잔존하게 되며 가수분해되는 PC의 양에 비례하여 FFA의 생성량도 증가하게 된다. 반응산물에 FFA이 잔존하면 산화안전성과 극성도를 감소시키므로 디에틸에테르를 이용한 용매 추출법을 통해 제거하였다. 그 결과, 반응산물의 FFA 함량이 63.0w.w%에서 2.0w/w%로 감소하였다 (Table 34).

Table 34. Change in the composition of the reaction products<sup>a</sup> according to the purification step

Step	Content (w/w%)		
	Free fatty acids	Phosphocholine	L- $\alpha$ -GPC
Reaction products <sup>a</sup>	63.0 $\pm$ 3.1	10.8 $\pm$ 0.6	26.2 $\pm$ 3.7
After diethyl ether extraction	2.0 $\pm$ 0.2	27.8 $\pm$ 0.3	70.1 $\pm$ 0.5
After silica column chromatography		0.7 $\pm$ 0.3	99.3 $\pm$ 0.3

<sup>a</sup> Obtained under the optimal conditions to completely hydrolyze soy phosphatidylcholine (PC) into L- $\alpha$ -glycerylphosphorylcholine (L- $\alpha$ -GPC) using Lecitase Ultra as the biocatalyst (i.e., temperature, 50°C; reaction time, 30h; water content, 69% of PC weight; and enzyme loading, 13% of PC weight).

All values represent mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 2$ ).

(나) 실리카 컬럼 크로마토그래피를 이용한 phosphocholine 정제

용매 추출법을 통해 정제된 반응산물에 잔존하는 FFA가 있어 이를 제거하는 공정이 필요하다. 또한 반응 효소인 Lecitase Ultra에 PLC와 같이 *sn*-3 위치의 결합을 가수분해하는 효소가 포함되어 있어 phosphocholine이 생성되므로 이를 제거하는 공정이 필요하다. 따라서 용매 추출법 실시 후 잔존하는 FFA와 phosphocholine을 제거하기 위하여 실리카 컬럼 크로마토그래피를 실시하였다. 고정상으로 극성 실리카겔의 사용시 극성도가 낮은 물질부터 용출되므로 FFA가 가장 먼저 용출되고 상대적으로 극성이 높은 phosphocholine과 L- $\alpha$ -GPC의 순으로 용출되었다. 시료를 실리카 컬럼에 로딩 후 용매의 용출량이 120mL이 되었을 때 FFA와 phosphocholine이 용출되었다. 이어 400-800mL에서 용출된 분획물은 L- $\alpha$ -GPC로 구성되어 있었다. 따라서 FFA가 완전히 제거되었고 phosphocholine의 함량이 0.7w/w%으로 감소하여 99.3w/w%의 고순도 L- $\alpha$ -GPC를 회수하였다(Table 35).

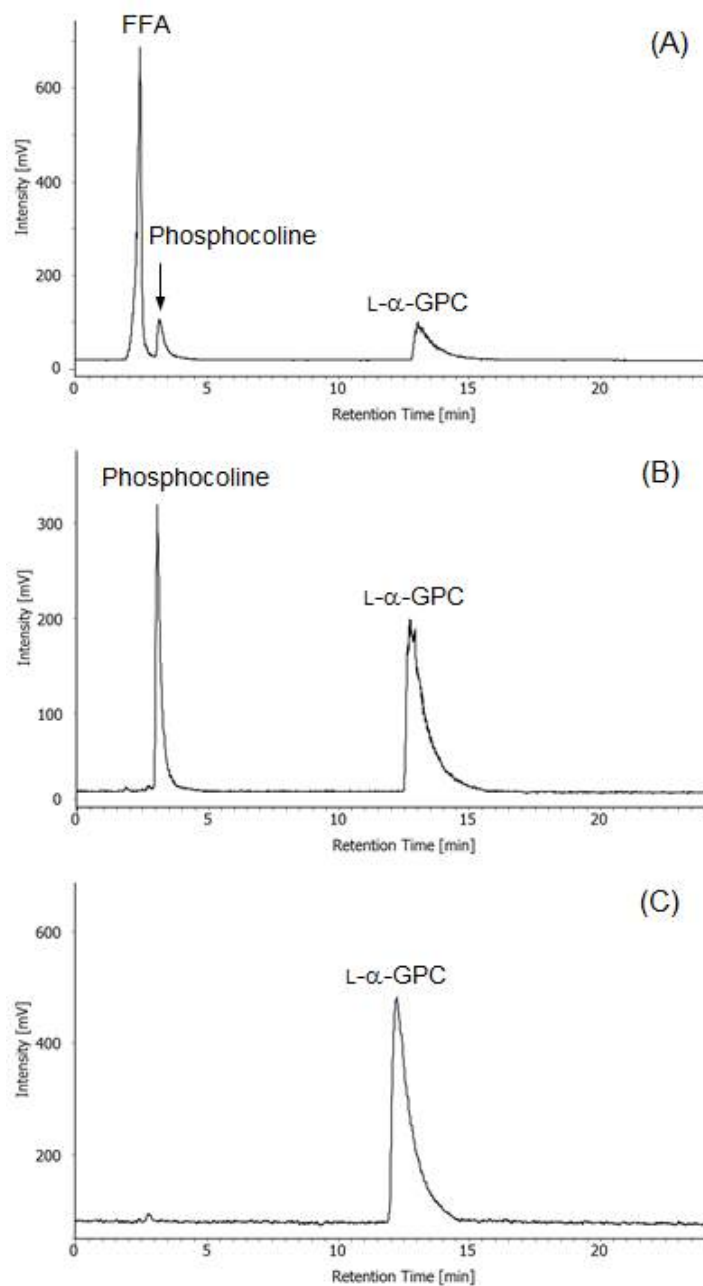


Figure 77. Liquid chromatography–evaporative light scattering detector (LC–ELSD) chromatograms of (A) reaction products obtained under the optimal conditions, (B) reaction products after the solvent extraction and (C) purified reaction products by silica column chromatography

## 다. 요약

본 연구에서는 회분식 효소반응 시스템을 이용하여 인지능 향상제, 재구성 인지질(structured phospholipids) 합성의 기질로 사용될 수 있는 L- $\alpha$ -GPC를 효소적 방법으로 생산하고자 하였다. 이를 위해 유기용매-수용액 매질에서 soy PC를 PLA<sub>1</sub>을 반응촉매로 이용한 가수분해를 통하여 L- $\alpha$ -GPC를 제조하였다. 이 때 L- $\alpha$ -GPC의 생성을 최대화할 수 있는 반응조건을 RSM을 통하여 확립하였다. 그 결과 선정된 최적 반응온도는 50°C, 반응시간은 30시간, 기질의 수분함량은 69w/w%이었으며 효소량은 기질량 대비 13%를 최적 조건으로 선정하였다. 확립된 최적조건에서 small-scale 반응한 결과 soy PC를 가수분해하여 99.0w/w%의 L- $\alpha$ -GPC를 생산하였으며 10배 스케일업 된 large-scale 반응에서는 soy PC를 완전하게 가수분해하여 100.0w/w%의 L- $\alpha$ -GPC를 생산하였다. 두 매질 하에 반응을 진행함으로 soy PC의 용해도를 증가시켜 L- $\alpha$ -GPC의 생산성을 증가시킴으로 효소적 반응 시스템을 산업적으로 적용시킬 수 있다. 또한 용매 추출법과 실리카 컬럼 크로마토그래피를 통해 반응산물의 FFA와 phosphocholine을 L- $\alpha$ -GPC와 분리정제하여 순도 99.3w/w%의 L- $\alpha$ -GPC를 생산하였다.

### 제 3절. 기능성 PC와 LPC의 최적 활용 제품 개발

#### 1 대두레시틴 관련 제품 시장 조사

##### 가. 대두레시틴 관련 제품 시장조사

레시틴은 탈검 공정의 결과 얻어진 검질을 원료로 해서, 이것을 정제한 것이다. 예전에는 레시틴은 계란의 난황에서 추출되었으며, 따라서 극히 귀한 약이었다. 그러나 현재는 레시틴을 대두에서 대량으로 제조되므로, 싼 값으로 공업용 원료로서 광범한 용도를 가지고 있다. 대두레시틴은 식품에 사용해서 우수한 유화제일 뿐 아니라 자체가 귀중한 영양소이며, 동시에 식품의 여러 가지 물성을 개선하는 점에 특징이 있다. 현재 대량으로 생산되는 레시틴은 대두에서의 것으로 한정되어 있다. 난황에서 얻어지는 인지질 제품은 “난황레시틴”으로 해서 구별하며, 옥수수 등의 Scum에도 인지질을 함유하나, 산업적으로 분리해서 시판하기에 이르지 못했으며 그 양도 매우 적다.

##### (1) 대두레시틴의 성상

대량으로 제조되는 레시틴은 일반적으로 반고상 혹은 페이스트상의 것이다. 통상 인지질이외, 대두유 33~40%를 함유하고 있다. 시판 레시틴의 색도는 탈색의 정도에 의해 다르고, 통상, 미탈색(unbleached), 탈색(single bleached), 이중탈색(Double bleached)으로 크게 분류한다. 상기 기술한 액상과 페이스트상의 것과 탈색의 정도에 의해서 6종의 제품이 있다. 용도에 따라서는 다시 대두유를 가해서 점성을 떨어뜨린 것도 시판되고 있다.

대두레시틴은 “대두인지질”로서 식품첨가물의 하나로 되어있다. 그 규격을 FCC와 FAO/WHO의 규격과 병기하여 Table 1에 나타냈다.

대두레시틴은 대두의 성분이고, 독성의 문제는 거의 고려할 필요가 없다. FAO/WHO의 전문위원회의 보고에서는 매일 22~83g의 레시틴을 2~4개월 사람에게 투여해도 아무런 영향이 없었다고 알려져 있다. 또 대량의 레시틴(1일 25~40g)을 수개월간 인체에 투여했을 때, 많은 콜레스테롤의 감소가 있었다. 이러한 자료로부터 인체에 대한 허용 1일 섭취량은 50~100mg/kg으로 정해졌다.

Table 35. Standard of soybean lecithin

	국내 식품첨가물 규격	FCC	FAO/WHO
산가	36 이하	36 이하	25 ~ 35
벤젠불용물	0.3% 이하	0.3% 이하	-
아세톤불용물	40% 이상	50% 이상	-
비소	4ppm 이하	3ppm 이하	3ppm 이하
중금속	수은 1.0ppm 이하 납 2.0ppm 이하	납 10ppm, 중금속 40ppm이하	납 10ppm, 중금속 40ppm이하
건조감량	2.0% 이하	1.5% 이하	2.0% 이하
과산화물가	10 이하	36 이하	10 이하

(2) 레시틴의 화학적 성질

레시틴은 염기의 수용액 혹은 알콜 용액, 혹은 강산의 수용액과 자비하므로 간단히 가수분해된다. 또 레시틴은 리파제에 의해 가수분해된다. 일부 리파제는 레시틴에서 불포화지방산만을 가수분해한다. 이 결과 생기는 리조레시틴은 용혈성이 강하다. 대두레시틴의 지방산은 글리세리드의 경우와 같이 수소첨가, 할로젠화레시틴이 된다.

레시틴의 성분의 하나는 Ca, Pt, Hg의 염화물과 같은 금속염과 부가화합물을 만든다. 이들의 반응은 레시틴의 분리에 이용된다.

대두레시틴을 구성하는 성분에 관해서는 그 원료 및 채취시기에 의해 상당한 차이가 있으며 소량의 배당체, 토코페롤, 착색물질 등이 대두레시틴 중에 용해 혹은 유화형으로 함유되어있다.

(3) 레시틴의 물리적 성질

대두레시틴은 탈색의 정도에 따라 황적색에서 갈색을 띤다. 첨가되는 지방의 양에 의해 견고성이 상당히 다르고, 인지질만의 경우는 고체이나, 기름을 많이 함유하면 물엿과 같은 페이스트상이 된다.

지방족 및 방향족 탄화수소에 가용이며 지방족 알콜에는 가용의 것과 불용의 성분이 있다. 아세톤과 같은 극성용제에 난용으로 이것은 유지와의 분리에 이용된다. 물과 혼합하면, 대두레시틴은 수화되고, 에멀전을 만든다. 이 경우 pH8 이상의 알카리성에서는 특히 에멀전으로 되기 쉽고, 그 에멀전이 안정하다. 대두레시틴은 Table 36에 나타난 것처럼 대체 6.6의 pH를 가지고, 물에 분산한 형에서는 미산성이다. 또 산성으로 하



면, 대두인지질은 약 pH 3.5의 등전점에 달한다.

Table 36. Physicochemical characteristics of commercial lecithin

항목	수치(%)	항목	수치(%)
요오드가	95	회분	7.0
검화가	196	Galactose	3.0
비중(25℃)	1.0305	그 외 탄수화물	5.0
pH	6.6	콜린	3.0
등전점	3.5	에타놀 아민	0.8
토코페롤	0.1	세린 등	1.5
스테린	2.0	이노시톨	3.0
		K, Na, Mg, Ca	1.0

#### (4) 대두레시틴의 용도

레시틴은 상기 성질이 기본 되어 식품공업용, 일반공업용, 사료용, 의약품용 등으로서 극히 넓은 용도를 가진다. 레시틴의 이들 용도에 관해서는 표37, 표38 및 표39과 같이 정리했다.

##### (가) 레시틴의 식품공업에의 이용

레시틴을 식품공업에 이용하는 경우의 첨가량, 사용되는 특성, 성질, 효과 등에 관해서 Table 37에 정리했다.

##### (나) 레시틴의 일반 공업용에의 이용

레시틴은 비식품공업에 있어서도 여러 가지로 이용된다. 일반 공업용에의 레시틴의 이용에 관해서, Table 38에 정리해서 나타냈다.

##### (다) 레시틴의 사료공업에의 이용

레시틴은 사료공업에도 여러 가지로 용도가 있다. 양어사료에도 이용된다. 이들의 용도에 관해서, Table 39에 정리해 나타냈다.

Table 37. Application of lecithin in food

식품	레시틴 첨가량	사용특성 및 성질	효과
초콜릿	0.3~0.5%	1.계면활성작용 2.박리작용 3.습윤성	1.카카오지의 절약 2.작업성(점도저하)의 개선 3.블루밍 방지(지방결정생성억제)

			4.광택, 촉감의 개량 5.성형성 향상 6.수분허용량의 개선 7.건조방지
마가린	0.1~0.5%	1.계면활성작용 2.산화방지작용	1.튀김 현상 방지 2.혀 감촉의 개량 3.유고형분의 프라이팬에 부착 방지 4.산화방지
쇼트닝	0.05~0.5%	1.계면활성작용	1.유화력의 향상
팬케이크	0.1~0.5%	1.계면활성작용 2.노화방지작용 3.박리작용 4.호화온도저하작용	1.점착성의 감소 2.표피의 유연화 3.감촉, 끌림 방지 개선 4.보존성향상 5.이스트 활동 촉진 6.지방의 분산개선 7.반죽시간 단축 8.소맥분품질차의조정 9.구루텐의 안정화 10.제품의 건조방지
면류	0.5%	1.계면활성작용 2.산화방지작용 3.노화방지작용	1.반죽시간 단축(반죽의 균일성촉진) 2.절단시의 낙면방지 3.촉감 및 윤기 개선 4.탄력 강화 5.노화방지 6.생지 퍼짐성 불음방지 7.생지의 흡수율향상 8.형태 변형방지
인스턴트 분말식품	0.5~3%	1.계면활성작용 2.습윤성 3.비산방지작용	1.분산성 용해성 습윤성의 개선 2.유화성,지방흡수 개선
캔디, 카라멜	0.1~1.0%	1.계면활성작용 2.박리작용 3.습윤성 4.플레이버 보류작용	1.작업성 개선 2.당분의 석출방지 3.지방의 분리, 수분의 손실방지 4.끈적거림 방지 5.광택의 향상 6.부착 방지 7.향의 보유
아이스크림	0.01~0.5%	1.계면활성작용 2.플레이버의 보류작용	1.혀감촉 개량 2.당분의 석출방지 3.난황의 사용량 절감

			4.향의 고정
수산업 제품	0.1~0.3%	1.계면활성작용 2.노화방지 3.박리작용 4.전분호화온도저하작용	1.전분의 노화방지 및 강도 증가 2.필름 박리성 향상 3.유지의 분리방지 4.보수성의 향상
비스켈 쿠키	0.3~0.5%	1.계면활성작용 2.박리작용 3.산화방지작용	1.성형시 생지부착방지 2.용적의 증가 3.제품의 내층개선 4.유지의 유화개선 5.기름 그을림 방지
인스턴트카레	1~3%(對油)	1.계면활성작용	1.유지의 유화개선
해물조림	0.5~0.7%	1.계면활성작용	1.색, 광택 개선 2.신선도 유지 3.맛의 조화
된장, 간장	0.3~2%	1.습윤성 2.향 보유작용 3.생리 활성 작용	1.점주성의 향상 2.풍미,광택의 개선 3.고지의 효소력 증강 4.고지의 수분발산 방지 5.간장효모의 내염성 증대 6.향기성분의 보유
이형유	3~10%	1.계면활성작용 2.박리작용	1.박리성의 향상
합성 크림 제과용 크림	0.2~3%	계면활성작용	1.보형성의 개량 2.가소성현상 발생방지 3.최적거품상태 시간 연장 4.보존성 향상
야채 과실	1~3%	1.피복성	1.건조방지 2.광택부여

Table 38. Application of lecithin in industry

용도	레시틴 첨가량	사용되는 특성, 성질	효과
도료 페인트 락카 에나멜 잉크 감광제	1~2%	1.계면활성작용	1.열연시간 단축 2.안료의 침전방지 3.brushing성 향상 4.sagging 방지 5.피복력 증대 6.leveling성 향상

			7.수성페인트의 에멀전 안정화 8.잉크 유동성 개선
피혁	1%(유지대비)	1.계면활성작용 2.레시틴과 피의 단백질의 복합체형성	1.유연성 부여 2.유의 침투촉진
나무유화제	0.5~3%	1.계면활성작용	1.거품꺼짐성 향상 2.부착성 향상 3.증점효과의 부여 4.耐候性 향상 5.유화 촉진
화장품 핸드크림 립스틱 헤어토닉 샴푸, 비누	1~5%	1.계면활성작용 2.향료의 保留작용 3.생리활성작용 4.습윤성	1.피부의 보호 2.피부호흡의 활성화 3.피부의 pH조정 4.화장품성분의 분산성 향상 5.에멀전의 안정화 6.거품 일으킴 촉진 7.크림등의 건조방지 8.비누의 가수분해 억제
농약	70%	1.흡습서 2.계면활성작용	1.야채의백분병 방제 2.진디물 발생 억제 3.회색곰팡이병 방제 4.균핵병 방제
발효배지		1.계면활성작용 2.생리활성작용	1.발효수율의 향상 2.배양시간의 단축
석유제품 윤활유 그리-스 절삭유 연료유 브레이크유	0.005~3%	1.계면활성작용 2.산화방지작용	1.윤활유의 수명연장 2.녹방지 윤활유에 유효 3.자동차엔진에의 석출물부착방지 4.중유 조연제 5.가소린의침강물생성억제
검		1.계면활성작용 2.산화방지 작용	1.섬유에 윤활성과 유연성의 부여.
플라스틱		1.계면활성작용 2.박리작용	1.안료의 분산개선 2.가류의 촉진 3.이형성의 향상
살충제	0.5~2%	1.계면활성작용	1.유화성개선 2.분산성 개선

Table 39. Application of lecithin for feedstuff

용도	레시틴첨가량	사용되는 특성, 성질	효과
가축, 가금		1.생리활성작용 2.계면활성작용 3.비산방지작용	1.영양적 보급 2.대사촉진 3.산란율의 증진 4.젖의 분비개선 5.지방의 흡수개선 6.인설선의 발생방지 7.성장 증진 8.비산 방지 9.출산율의 향상
가축의 대용유용 배합사료	1~5%	1.계면활성작용 2.습윤성 3.생리활성작용	1.유화성, 분산성 및 습윤성의 개선 2.지방의 흡수개선 3.성장증진 4.비산방지
애완용 사료	1~5%	1.계면활성작용 2.생리활성작용 3.박리작용	1.유화성의 개선 2.지방의 흡수개선 3.양모의 광택 및 유연성의 향상 4.정력자극 5.기질의 개선 6.펠렛트화의 개량 7.영양적 보급
생선용 사료		1.생리활성작용	1.발육증진 2.간장의 지방대사 정상화 3.사료의 부유화 향상

(라) 레시틴의 의약적 응용

인지질은 뇌 및 간장, 심장 등의 중요한 일을 하는 조직에 특히 대량으로 포함되고, 특히 뇌 및 신경조직에 많으므로, 레시틴은 신경조직의 영양물이라고 생각되어지는 시대가 있었으나, 최근에는 지질대사의 면에서 레시틴의 역할이 주목되고 있다. 혈중 콜레스테롤의 양이 동맥경화증의 하나의 지표로 인식 되었으나, 레시틴은 콜레스테롤 저하제 혹은 혈중 콜레스테롤 안정제로서 일부 시판되고 있다. 중년을 넘고, 체내의 지방 소비가 감소하여 지방과다로 되어 레시틴이 부족하게 된 경우나 음주 등에 의해 간 기능 장애를 일으켜서 레시틴의 체내합성능이 저하하는 경우에는, 레시틴을 외부에서 보급하지 않으면 안 된다고 알려져 있다.

① 레시틴의 일반적 이용

레시틴 섭취에 의해 개선될 수 있는 병으로는, 동맥경화증, 지방간, 건선 등이 알려져 있다. 지방간의 특징은 혈중 콜레스테롤의 증가와 인지질의 저하에 있으므로 지방간은 지방을 처리하는데 필요한 레시틴이 생체 내에서 합성되지 않는 결과를 낳는다고 생각되고 있다. 건선은 피부의 지질대사 장애라고 생각되고 있다. 건선의 피부는 정상피부의 3.6배의 콜레스테롤을 함유하고, 레시틴의 투여에 의해 그의 약 80%가 호전됐다고 보고되고 있다. 체중부족의 환자에 고지방식을 투여한 경우에 레시틴을 동시에 투여하면 지방의 흡수를 좋게 하여, 조기에 목적을 달성할 수가 있다. 당뇨병은 인슈린 치료법에 의해서 치료하는 것이 많으나, 이 때 레시틴을 병용하면 인슈린의 소요량을 감소할 수가 있다.

## ② 정맥주사용 Pure 레시틴

미국의 FDA가 정맥주사용 기름의 수중유적형 에멀전을 인가했다. 이 주사액은 대두유 10%에 글리세린, 영양제 등을 녹여 넣어 멸균 난황레시틴을 1.25% 첨가해서 균질화한다. 난황레시틴 대신에 순대두레시틴을 사용한 연구가 있다. 난황레시틴의 대체로서 대두레시틴은 통상의 페이스트상 레시틴을 원료로 해서 분말레시틴을 제조하고 이것을 에탄올로 (약2배량) 5회, 반복해서 17~20℃에서 추출하고, 에탄올을 저온 감압하에서 증류 제거 후, 잔사를 석유에테르로 모으고, 아세톤으로 세정 후 건조하여(수율 38%) 에탄올 가용물을 얻는다. 이것의 에탄올 10~30% 용액을 만들고 0~10℃로 냉각, 석출물과 가용물과로 분별한다. 순레시틴 수량은  $38\% \times 0.6 = 22.8\%$ , POV13.5~20.4, 콜린 7.3~9.5%이다. 난황레시틴에서 얻은 순레시틴은 POV=0, 콜린10.0%, 수율60%로 1개월 후에도 갈변하지 않는다.

정맥주사용 순레시틴을 복용 시 용혈, 혈압강하, 발열, 독성 등의 동물시험 행하였고, 이와 관련해서 정맥주사용수액의 유화제로서 수소첨가레시틴을 사용하는 방법이 특허출원되어있다.

수소첨가레시틴 사용량은 충분히 만족이 가는 지방유체를 얻기 위해 유지10에 대해서 2.75~1.5가 필요하다. 사용방법은 정제대두유 10g과 레시틴 시료(요오드가 0~39의 여러 가지의 수첨레시틴 사용)의 혼합물에 주사용 글리세린 50g과 주사용 증류수 1725g을 가해서 교반하고 얻어진 조 유화액을 가압하(500kg/cm<sup>2</sup>)에서 분사(50L/Hr)해서 호모제나이저해서 지방유액을 얻었다.

대두레시틴의 경우는 혈중에서의 유지의 소실이 빠르나, 조직 및 장기에의 축적 잔존량이 많다. 난황레시틴의 경우는 혈중에서의 유지의 소실이 늦고, 약간의 장기축적잔존이 보여진다. 수액시의 긴급한 칼로리 보급의 관점에서 생각한다면, 혈중에서 빨리 소실하여 장기에의 축적 잔존도 적고 재빨리 이용되는 것이 바람직하나, 수첨레시틴은

이 목적에 적합하다고 알려졌다. 원료로서는 대두레시틴에 한정하지 않고, 난황, 콘, 면실 등 여러 레시틴이라도 좋다.

#### (마) 레시틴의 개질

레시틴은 상기와 같이 널리 용도가 있다. 이 경우, 통상의 제품은 30-35%의 아세톤 가용물(주로 글리세리드)를 함유한 페이스트상의 것이나, 이 형에서는 사용하기 어려운 용도도 있고, 페이스트 이외의 형태가 바람직한 경우도 있다. 그러므로 페이스트 이외에 분말레시틴 또는 입상레시틴, 그 외 대두인지질에 화학적 처리를 행해서 그 성상을 개량한 것 등이 시판되고, 또 특허의 대상으로 되어있다.

##### ① 분말레시틴

레시틴을 의약용으로 하는 경우에는, 필히 순도가 높고, 취급하기 쉬운 형의 것이 바람직하다. 이 경우에는 분말상, 혹은 과립상이 적당하다. 고순도 분말레시틴을 얻기 위해 글리세리드를 녹이고, 인지질을 녹이지 않는 용제로 페이스트상 레시틴을 처리한다. 이 경우 사용되는 용제로서는 아세톤이 일반적이다. 이 방법에 있어서는 Rewald(1933)의 특허가 있다. 이후, 아세톤의 외에 여러 가지의 알콜, 예를 들면 에타놀, 이소프로파놀, 이소부타놀, 이소아밀알콜을 사용한 방법이 연구되어있다.

여러 문헌에는 용제를 사용 않고, 대두추출작업에 있어서 미셀라의 탈용제 공정을 검토하므로써 고순도의 대두레시틴을 수화물로서 분리하고 이것을 탈색정제해서 후에 분무건조하므로써 고순도 레시틴을 분말상으로 얻는 방법에 관해서 보고하고 있다. 또한 통상의 탈용제를 위해 수증기 흡입조작 또는 그 후에 유중에 수분을 존재시켜, 이것에 냉수를 불어넣어 정치해서 레시틴을 수화물로서 분리하는 것을 특징으로 하는 방법과, 이 수화물을 적당한 방법으로 탈수건조하는 것에 의해, 90-97% 순도의 레시틴을 고품, 과립상 또는 분말상으로서 얻어지는 방법이 있다.

##### ② 입상(粒狀) 레시틴

의약용으로서 레시틴을 사용하는 경우, 그것을 어떻게 “레시틴 제제”로 그대로 복용하는 형으로 시판하기 위해서는 레시틴은 입상 형태가 바람직하다.

분말의 형태의 것을 입상으로 하는 방법은 여러 가지 제안되어 있으나, 분말레시틴을 입상으로 성형하는 방법에 관해서는, 분말레시틴의 압출, 절단에 의한 성형, 입상화(粒狀化)의 검토결과를 보고하고 있다.

소량의 글리세리드를 함유한 레시틴을 압출기로 밀어내는 성형물을 절단하는데 있어서, 이 절단을 20℃ 이하의 아세톤 또는 메칠에칠케톤과 같은 인지질 난용성, 유지가용성의 용제 중에서 행할 것인가 혹은 압출하고 절단한 레시틴의 과립을 직접 용제에 투

입처리한 후 건조하여 고순도 과립상 레시틴을 제조하는 방법이 있다. 또 다른 방법은 순도 90% 이상의 레시틴을 압출기로 압출하고 절단해서 입도 2,380 ~ 350 $\mu$ m의 과립상으로 정립하는 것을 특징으로 하는 과립상 레시틴의 제조법이 있다.

레시틴을 아세톤으로 추출하고, 유분을 제거해서 얻은 분말 레시틴을 적당한 크기의 세공에서 가운, 압출, 절단, 일정한 입도의 것으로 정형한 후, 제3인산칼슘, 솔비톨, 만니톨, 전분 등을 배합 코팅하여 향과 맛을 동시에 개선하고 흡습성이 적은 과립상 레시틴을 얻는 방법도 있다.

### ③ 레시틴의 화학적 처리에 의한 개질

대두인지질은 그 분자 중에 지방산을 함유하고, 이 지방산은 글리세리드의 경우와 같이, 수소첨가 등의 화학적 반응을 이용해서 레시틴의 개질을 행할 수가 있다.

### ㉠ 수소첨가 레시틴

대두레시틴은 통상의 방법으로 수첨되어 백색의 스테아린상의 고체가 된다. 니켈 촉매를 써서, 80atm압에서 레시틴의 수첨을 수행할 수 있으며 수첨 레시틴은 가용성 및 유화성이 원래의 레시틴보다도 나쁘다고 알려져 있으나, 코코아버터의 유화력에 있어선 레시틴보다도 강하게 한다는 보고도 있다. 수소첨가레시틴 제조법은 300ml의 스텐레스 재질의 교반식 고압반응기에서 대두레시틴 30g, 에탄올 150ml, 촉매(1~10g)을 가하고, 35kg/cm<sup>2</sup>으로 수소와 접촉시키고 반응 종료 후(1 ~ 5시간) 촉매를 분리시키고 다시 용매를 첨가해서 얻어진 생성물을 건조해서, 수소첨가 레시틴을 얻는다.

### ㉡ 효소에 의한 가수분해

포스포리파제A를 작용시키면 레시틴의  $\beta$ 위치의 지방산이 가수분해 되어, 친수성이 강한 O/W형 유화성이 강화되므로, 유제품의 유화안정제로서 적당하게 된다. 산, 알칼리에 의한 가수분해도 가능하나, 이 방법은 효소에 의한 가수분해보다 좋지 못하며 제품은 암색의 레시틴이 된다.

### ㉢ 알콜 분별

콜린레시틴은 알콜에 쉽게 녹으므로, 이 성질을 이용해서 콜린농축 레시틴을 만드는 것이 가능하다. 90% 에타놀 사용의 경우, 제품의 콜린레시틴 및 케파린의 비율을 5:1이상(통상의 대두레시틴의 비율은 0:3)으로 하는 것이 가능하다. 이러한 제품은 유화성이 개량되고, 무염 마가린의 Spattering(베치베치 튀는 현상)방지제로서 사용된다.

### ㉣ 그 외 유도체

레시틴의 폴리옥시에틸렌의 유도체는 에칠렌옥시드를 레시틴에 작용시켜서 얻을



수 있다. 옥시알킬화레스티틴은 물에도 기름에도 분산된다.

#### (바) 대두 이외의 레시틴

대두레시틴 이외에도 식물성 레시틴이 소량이지만 생산되고 있다. 특히 미국에서는 옥수수 레시틴, 유럽에서는 채종레시틴이 만들어져 마가린 및 초콜렛 분야에 이용되고 있다. 면실유 및 피마자유의 레시틴의 이용에 관해서도 연구되고 있으나, 대두레시틴의 생산량이 많으며 가격도 싸므로 대두 이외 레시틴의 장래는 크다고는 할 수 없다.

#### (사) 인지질 소재의 건강기능식품 시장 현황

한국치매협회가 발표한 자료는 2000년 치매환자수가 약 28만 명에서 2007년 40만 명으로 급격히 증가했으며, 2010년에는 46만 명, 2020년에는 약 70만 명에 달할 것으로 전망했다. 향후 걱정되는 질병 역시 암에 이어 두 번째로 치매가 꼽히고 있다. 이에 대한 막연한 불안감만 있을 뿐 현재로서는 뚜렷한 대비책이 없는 것이 사실이다. 맞춤형 건강기능 식품의 활성화에 따라 뇌 건강 소재로 뇌의 혈류개선을 촉진시키는 DHA, 오메가3지방산과 인지질이 부상하고 있으며 최근 들어서는 은행잎이나 DHA에 GABA를 배합한 복합제품이 출시되고 있다. 인지질의 한 종류로서 식약청으로부터 노인의 인지능력 개선에 도움을 주는 소재로 인정을 받은 포스파티딜세린은 우리 몸에서 자연적으로 합성되나 나이가 들면서 줄어들게 된다. 이는 뇌의 신경전달물질인 세티콜린이나 도파민 등을 활성화시키는데, 이들이 기억력과 인지력을 향상시키는 작용을 한다. 현재 일본에서는 뇌건강 소재로 뇌의 혈류를 개선시키는 DHA, 은행잎 등이 시장과 인지도에서 큰 인기를 끌고 있다. 그밖에 포스파티딜세린, 아라키돈산, DHA와 결합한 인지질 등이 부상하고 있다.

이에 본 과제를 통해 도출되는 효소반응 개질 대두분말 PC 제품을 소재로 기존 화학적 합성 유화제를 배제한 유화물을 제조하여 식품가공 분야에 우선 적용하고자 한다.

이에 본 과제를 통해 도출된 효소반응 개질 기능성 PC 및 LPC 제품을 식품 소재로 기존 화학적 합성 유화제를 배제한 유화물을 제조하여 식품 분야에 우선 적용하고자 한다.

우선 기능성 PC는 DHA 함유유지와 레시틴을 각각 투입 사용하고 있었던 기존 분유 등 영유아 제품에 적용하고, 추후 안전성 실험을 거친 후 뇌기능 개선 또는 항스트레스 효과 및 콜레스테롤 저하 작용에 대한 효능 임상을 진행하고자 한다.

또한 유화 특성을 확인한 LPC는 천연 유화제로서 아이스크림, 초콜렛, 마요네즈 및 조

제분유뿐만 아니라 화장품 유화제, 영양성분 전달을 위한 리포솜 성분으로 확대 적용하고자 한다.

## 2. 기능성 PC와 LPC의 최적 활용 제품 개발

### 가. 재료 및 방법

#### (1) 실험의 구도

본 연구에서 개발한 기능성 PC와 LPC의 제품 가능성을 평가하기 위하여 기존에 시판중인 제품을 대조군으로 선정하여 일반 분석 실험, 입도 분석, 표면장력 측정, 유화안정성 평가 등을 실시하였다.

#### (2) 재료

(가) 대두분말 PC(L- $\alpha$ -phosphatidylcholine)는 Avanti Polar Lipids社 제품을 구매하여 사용하였으며, 비교군인 대두레시틴은 IMCOSOY社 제품을 구매하여 비교하였다.

(나) 기능성 PC(Phosphatidylcholine)와 LPC(Lyso-phosphatidylcholine)은 각각 고려대와 중앙대에서 제조된 샘플을 입수하여 사용하였으며, 대조구인 Enzymatically Hydrolyzed Powdered Soybean Lecithin(EMULTOP IP)은 Cargil社 제품을 구매하여 비교하였다. 그 외 실험 및 분석을 위한 각종 용제들은 시약급을 이용하였다.

#### (다) 기기

- ① Gas chromatography: Agilent GC 6890N, Shimadzu GC-17A
- ② 표면장력측정기: Fisher Scientific Surface Tensiomat 21 (with 6cm ring)
- ③ 유화안정성측정기: Turbiscan AGS(Automated Ageing Station for Characterization and Stability Study)
- ④ Homomixer: T.K Homomixer MARK II Model 2.5

#### (3) 분석

##### (가) 각 샘플의 일반 분석 실험

##### ① 산가 측정

검체 5g을 정확하게 달아 삼각플라스크에 넣고 중성의 에탄올 500ml를 넣어 녹였다. 여기에 페놀프탈레인시액을 2~3방울 가한 뒤 옅은 홍색이 30초간 지속할 때까지 0.1N KOH 용액으로 적정하였다. 산가는 아래의 공식에 의하여 도출하였다.

$$\text{산가} = \frac{5.611 \times a \times f}{S}$$

S : 검체의 채취량(g)

a : 0.1N KOH 용액의 소비량(ml)

f : 0.1N KOH 용액의 역가

##### ② 과산화물가 측정

유지시료 1g을 칭량하여 초산·클로로포름(3 : 2) 25mL 혼합용매에 녹이고 요오드칼륨 과포화 용액 1ml를 가볍게 흔들어 섞은 다음 암소에 10분간 방치하였다. 이후, 물 75mL를 가하여 세게 흔들어 섞은 다음 전분시액 1mL를 지시약으로 하여 0.01N 티오황산나트륨액으로 적정하였다.

$$\text{과산화물가(meq/kg)} = \frac{(a-b) \times f}{\text{검체의 채취량(g)}} \times 10$$

a : 0.01N 티오황산나트륨액의 적정수(ml)

b : 공시험에서의 0.01N 티오황산나트륨액의 소비량(ml)

f : 0.01N 티오황산나트륨액의 역가

### ③ Acetone Insolubles(A.I.) 측정

레시틴시료 2g을 칭량하여 45ml Cold Acetone에 분산 시킨 후 원심분리 또는 필터하여 용매에 녹지 않은 불용 부분의 무게를 기록하여 초기 시료무게 대비 분산 제거된 불용부분의 무게를 백분율로 계산한다.

### ④ 수분 측정

105℃ 온도 조건에서 2시간 동안 건조한 후 초기 무게 대비 감소한 양을 측정하거나 Karl Fisher 기기를 사용하여 약 1~2g의 레시틴 시료를 기기에 투입하여 K-F 시약으로 적정하여 측정된 값을 사용한다.

### ⑤ 입도 분포의 측정

미량의 유화물을 모세관 끝으로 취하여 slide glass 상에 놓고 cover glass를 덮은 뒤 현미경으로 관찰한 다음에 현미경 사진(Photomicrographic equipment, model BH-2, Olympus, Japan)을 촬영하였다. 입도 분포를 측정하기 위해서는 먼저 slide glass 위에 증류수 한 방울을 떨어뜨린 뒤 모세관으로 미량의 유화물을 취해 이 증류수에 희석하여 cover glass를 덮고 검정한 뒤에 현미경사진을 촬영하였다.

### ⑥ 입도 분석기

유화물 2~3g을 취하여 증류수 700g에 투입한 후 Malvern社 Mastersizer 2000 모델을 사용하여 입도를 분석한다. 증류수에 지정된 R.I.값을 확인 후 입도 분석 자료를 확인한다.

## (나) 각 샘플의 구성지방산 분석 실험

### ① 시료의 전처리

100ml 둥근 플라스크에 피놀렌산을 함유한 모노글리세라이드 0.3g을 달아 0.5N NaOH 6ml를 넣고 7분간 검화시킨 뒤 BF<sub>3</sub>(Boron trifluoride) 7ml를 넣고 2분간 검화시켰다. 다음 heptane 5ml를 넣고 1분간 검화시킨 후 냉각하고, 여기에 과포화 NaCl 용액을 플라스크 목부분까지 채운 후 윗층을 1~2ml 정도 채취하여 0.45μm filter로 여과한 뒤 GC로 분석하였다.

### ② GC 분석 조건

㉞ INLET

㉞ Mode: Split (ratio 100:1)

㉞ Initial temp: 260 °C

㉞ Carrier gas : Helium

㉞ OVEN

GC 온도 프로그램은 Table 35에 나타내었다.

Table 35. Program of GC oven temperature

	Rate(°C/min)	Temperature(°C)	Hold time(min)
Initial	-	140	5
1	4	240	15

Total Time (min) :45

㉞ COLUMN

Type/model : Capillary Column / sp-2560 (100.0 m × 250.00 um × 0.20 um)

Initial flow: 1.1 mL/min

㉞ DETECTOR

Type : FID

Temperature: 260 °C

(다) 분산안정성 측정

① 시료 전처리

각 샘플 시판 Lyso-대두레시틴, PC 및 LPC 1g을 우선 솔비톨 89g에 투입한 후 5분 동안 4,000rpm 조건으로 호모믹싱을 한 후 대두유 10g을 서서히 투입하면서 10분 동안 4,000rpm으로 혼합을 유지하여 1차 유화물을 획득한다. 이후 각 조건의 1차 유화물을 물 중량 대비 10% 희석하여 2차 유화물 샘플을 획득하였다.

② Turbiscan 측정 조건

20ml 샘플 용량에 대해 온도 조건 60도에서 3일 동안 1시간마다 분산안정성을 Turbiscan Ageing Station을 사용하여 측정하였다.

(라) 표면장력 측정, 보관안정성 및 입도 측정을 위한 유화물 제조

① 표면장력 측정을 위한 유화물 제조

대두유 20g과 솔비톨 75g 비율로 충분히 혼합한 다음 시판대두레시틴을 5g 첨가한 조건과 대두유 20g과 솔비톨 77g에 시판대두레시틴을 3g 첨가한 조건, 이상 두 조건을 각 샘플별 준비한 후 1시간 동안 1,800rpm으로 혼합을 유지하여 유화물을 획득한다. 이후 각 두 조건의 유화물을 물 중량 대비 10%와 20% 희석하여 각 조건별 샘플을 획득하였다. 획득한 샘플을 각각 표면장력기와 Turbiscan을 이용하여 유화 특성을 측정하였다.

또한, 시판 Lyso-대두레시틴, PC 및 LPC를 각각 2g을 취해 물 98g에 첨가한 다음, 60도 온도 조건에서 600rpm의 교반 제공 조건으로 완전히 용해 시켜 각 유화물을 획득한다. 획득한

유화 샘플을 각각 표면장력기를 이용하여 유화 특성을 측정하였다.

### ② 유화안정성 평가를 위한 유화물 제조

대두유 20g과 솔비톨 75g 비율로 충분히 혼합한 다음 대두분말 PC를 5g 첨가한 조건과 대두유 20g과 솔비톨 77g에 대두분말 PC를 3g 첨가한 조건, 이상 두 조건을 각 샘플별 준비한 후 1시간 동안 1,800rpm으로 혼합을 유지하여 유화물을 획득한다. 이후 각 두 조건의 유화물을 물 중량 대비 10%와 20% 희석하여 각 조건별 샘플을 획득하였다. 획득한 샘플을 각각 표면장력기와 Turbiscan을 이용하여 유화 특성을 측정하였다.

또한, 샘플 1g을 우선 솔비톨 89g에 투입한 후 5분 동안 4,000rpm 조건으로 호모믹싱을 한 후 대두유 10g을 서서히 투입하면서 10분 동안 4,000rpm으로 혼합을 유지하여 1차 유화물을 획득한다. 이후 각 조건의 1차 유화물을 물 중량 대비 10% 희석하여 2차 유화물 샘플을 획득하였다. 획득한 샘플을 각각 입도분석기와 현미경 검경법에 이용하여 유화안정성 평가를 측정하였다.

### ③ 유화안정성 평가

유화물은 서로 혼합할 수 없는 두 개의 상(Immiscible Phase)인 분산상(Dispersed Phase)과 연속상(Continuous Phase)으로 구분 지을 수 있으며, 일반적으로 유화물은 일정한 온도조건에서 시간에 따른 유화 및 분산안정성이 저하되는 현상은 크게 유화구의 이동으로 인한 Particle Migration (Creaming, Sedimentation) 현상과 유화구의 응집으로 인한 Particle Size Variation (Flocculation, Coalescence) 현상으로 나눌 수 있다.

Particle Migration 현상에 의해 분산안정성이 저하되는 경우에는 초기의 균일한 분산상태와 마찬가지로 시료 전체의 농도는 동일하지만 시료 상층부와 하층부간의 농도 구배(Gradient)가 발생하며, Particle Size Variation 현상에 의해 분산안정성이 저하되는 경우에는 시료 전체 높이에 대해 입자의 크기가 변화하는 것을 알 수 있다. 따라서 본 연구에서 시판 중인 Lyso-대두레시틴과 본 과제 세부과제 수행 기관에서 제조하여 제공된 원료인 기능성 PC 및 LPC의 유화력을 비교 확인하기 위하여 분산상태(Dispersion State) 및 분산안정성의 변화를 확인함으로써 시판 중인 Lyso-대두레시틴 대비 기능성 PC 및 LPC의 유화력 차이를 비교하여 추후 유화제로서의 사용 가능성을 평가하였다.

### (마) PC, LPC 및 GPC 함량 측정

#### ① 시료 전처리

시료는 효소를 제거한 반응산물을 96% 메탄올에 1 mg/mL로 용해 후 0.45  $\mu\text{m}$  GH Polypropylene syringe filter (47 mm)로 여과하여 준비한다.

#### ② 측정 조건

HPLC-ELSD의 이동상으로는 100% 메탄올 (A)과 water (B)의 gradient system을 사용하였고, Gradient는 A의 비율 96-93% (0-15분), 93% (15-25분), 93-96% (25-30분), 96% (30-35분)로 순차적으로 조절하였다. Lichrosorb<sup>®</sup> Si 60 (5  $\mu\text{m}$ , 250  $\times$  4.0 mm) 컬럼을 이용하였으며 컬럼의 온도는 35  $^{\circ}\text{C}$ 로 유지하였다. 시료 주입량은 20  $\mu\text{L}$ , 이동상의 유속은 1 mL/min이

었고, ELSD의 drift tube 온도는 60 °C였으며 질소는 1.5 L/min의 유속으로 공급하였다. 모든 반응산물의 PC, sn-1-LPC 및 GPC의 함량은 mol% 또는 wt%로 계산하였다.

(바) TLC를 이용한 PC 분석

반응물 50 mg을 chloroform 150 uL에 녹인 후 TLC plate (silica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck, Germany)에 loading시키고 chloroform/ methanol/ acetic acid/ water (75:40:8:3, by vol)의 용액으로 전개시켰다. Plate에 분리된 PC와 LPC를 scrap한 후에 내부표준물질 (C17:0) 1 mg을 넣고 BF<sub>3</sub> (14% Boron fluoride in methanol)를 이용하는 방법으로 methylation시켜 GC 분석용 시료를 만들었다.

나. 결과 및 고찰

(1) 시판 대두레시틴 제품별 비교

(가) 시판 대두레시틴 제품별 일반 분석 비교

시판 중인 대두레시틴과 PC를 고순도로 함유하고 있는 대두분말 PC에 대하여 일반분석을 진행하였다. 식품첨가물공전상 규격 중 산가, 아세톤불용물, 과산화물가, 구성지방산 및 수분 등에 대해 분석을 진행하였다. 그 결과는 Table 36, 37에 각각 나타내었다.

Table 36. 시판 대두레시틴의 일반 분석

항목	단위	분석결과	분석법
Acetone Insoluble	%	64	AOCS Ja 4-46
Acid Value	mgKOH/g	23.3	AOCS Ja 6-55
Toluene Insoluble	%	0.02	AOCS Ja 3-87
Moisture	%	0.48	AOCS Ja 2b-87
Peroxide Value	mEqO <sub>2</sub> /kg	2.8	AOCS 8-87
구성지방산 함량			
C16:0		16.0	
C18:0		4.0	
C18:1		17.0	
C18:2		55.0	
C18:3		7.0	
기타		1.0	

Table 37. 대두분말 PC의 일반 분석

항목	단위	분석결과	분석법
Purity (As PC)	%	97.2	AOCS Ja 4-46
Acid Value	mgKOH/g	10.0	AOCS Ja 6-55
Moisture	%	0.3	AOCS Ja 2b-87
Peroxide Value	mEqO <sub>2</sub> /kg	2.0	AOCS 8-87
구성지방산 함량			
C16:0		15.0	
C18:0		4.0	
C18:1		11.0	
C18:2		63.0	
C18:3		6.0	
기타		1.0	

(나) 시판 대두레시틴 제품별 표면장력 비교 실험

대두유 20g과 솔비톨 75g 비율로 충분히 혼합한 다음 시판대두레시틴 또는 대두분말 PC를 각 5g 첨가한 조건을 각 샘플별 준비한 후 1시간 동안 1,800rpm으로 혼합을 유지하여 유화물을 획득한다. 이후 각 두 조건의 유화물을 물 중량 대비 1%, 2.5%, 5%와 10% 첨가하여 각 조건별 샘플을 획득하였다. 획득한 샘플을 각각 표면장력기(Surface Tensiomat 21, 6cm fing)를 이용하여 유화 특성을 측정하였다.

Table 38과 Figure. 78.에서와 같이 유화물의 표면장력을 확인한 결과, 대두레시틴 유화물보다는 대두분말 PC 유화물의 계면장력이 보다 낮은 것으로 보아, HLB(Hydrophilic Lipophilic Balance)값으로 대략 3~4 정도인 대두레시틴보다는 HLB 6~7인 대두분말 PC가 본 실험과 같은 유화물의 초기 표면장력을 저감에 보다 유리한 것으로 판단되었다. 이는 물(표면장력 72.8dyne/cm)의 계면장력 저하와 투입되는 계면활성제의 농도는 비례한다는 사실과 일치한다.

결론적으로 유화물의 표면장력은 각 시판 대두레시틴 제품의 투입농도와 비례한다는 사실을 확인하였다.

Table 38. 각 조건별 Surface Tention 비교표

Content (%)	1	2.5	5	10
대두레시틴	37.8	37.5	37.0	36.5
대두분말 PC	37.9	37.1	35.9	35.0

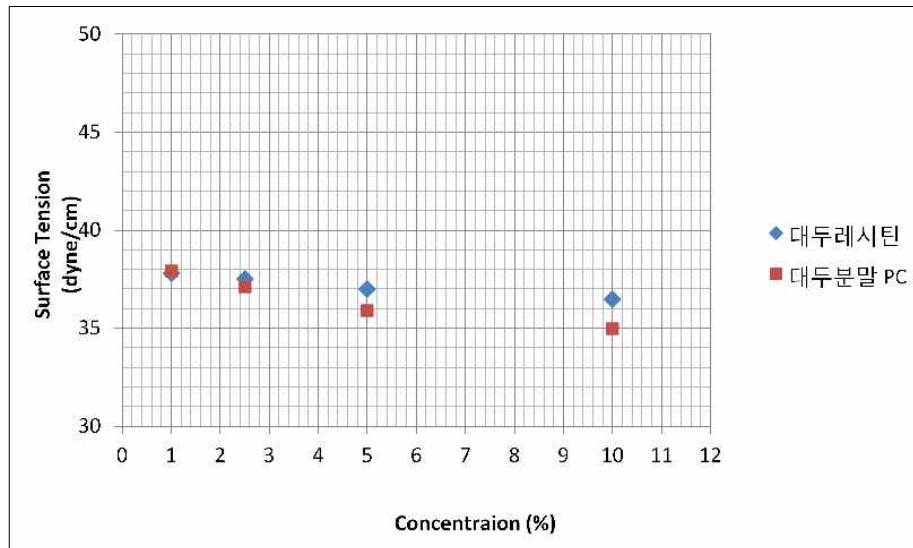


Figure. 78. 각 조건별 Surface Tention 비교 그래프

(다) 시판 대두레시틴 제품별 유화안정성 비교 실험

각 시료는 대두유 20g과 솔비톨 75g 비율로 충분히 혼합한 다음 시판대두레시틴 또는 대두분말 PC를 각 5g 첨가한 조건과 대두유 20g과 솔비톨 77g에 시판대두 레시틴 또는 대두분말 PC를 3g 첨가한 조건, 이상 두 조건을 각 샘플별 준비한 후 1시간 동안 1,800rpm으로 혼합을 유지하여 유화물을 획득한다.

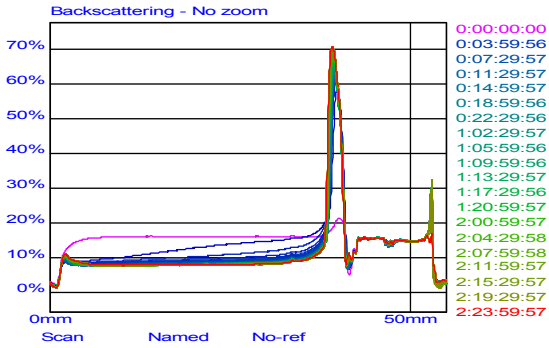
시판 레시틴을 이용하여 제조된 유화물 8종을 Turbiscan 시험기를 이용하여 상온(25도)에서 3일간 정치하면서 유화 및 분산 안정성을 확인한 결과 Figure. 79과 같은 결과를 확인하였다.

대두분말 PC 3% 유화물의 10% 희석액(A-1), 20% 희석액(A-2)과 대두분말 PC 5% 유화물의 10% 희석액(B-1), 20% 희석액(B-2) 약 5시간 정도후부터 유화 안정성이 약해지면서 크립층이 형성됨을 확인할 수 있었으며, 대두레시틴 3% 유화물의 10% 희석액(C-1), 20% 희석액(C-2)과 대두레시틴 5% 유화물의 10% 희석액(D-1), 20% 희석액(D-2)에서는 36시간 정도 안정성을 나타낸 후에 크립층이 형성되면서 서서히 유화층이 분리되는 현상이 발생하였다.

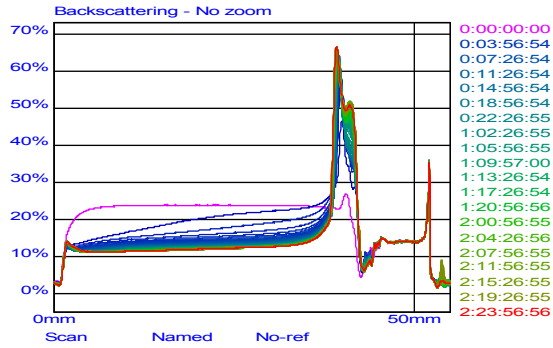
이는 대두유를 O/W형으로 유화함에 있어 계면활성제로 이용한 대두레시틴과 대두분말 PC의 분자량에 대한 영향으로 추정된다. 향후 대두 PC를 개발함에 있어 유화제로 사용할 경우에는 효소 분해 정도를 관리하여 분해산물의 분자량 분포를 조정함으로써 유화력을 증대시킬 수 있을 것으로 기대된다.



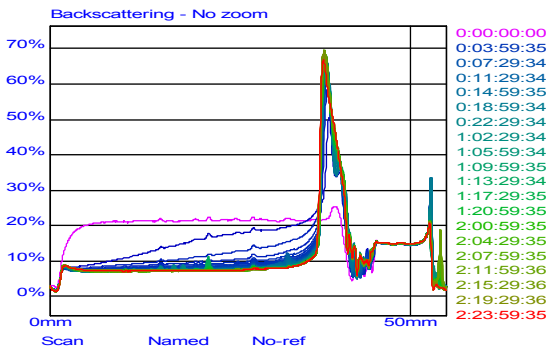
A-1 - [File created by Turbisoft-AGS Version 1.12 English]



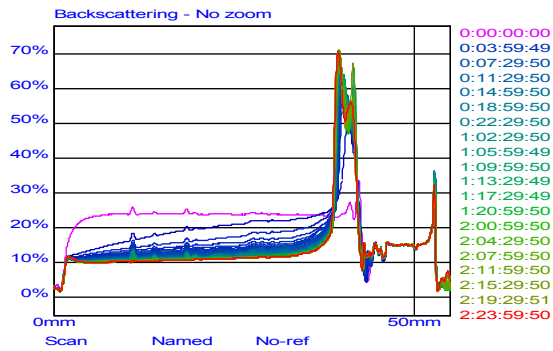
A-2\_1 - [File created by Turbisoft-AGS Version 1.12 English]



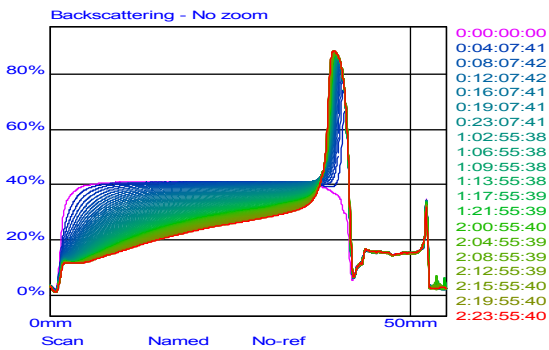
B-1\_1 - [File created by Turbisoft-AGS Version 1.12 English]



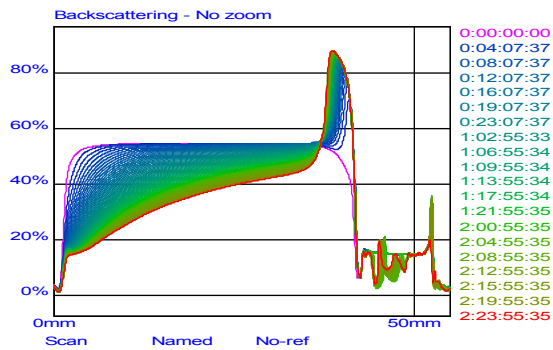
B-2\_1 - [File created by Turbisoft-AGS Version 1.12 English]



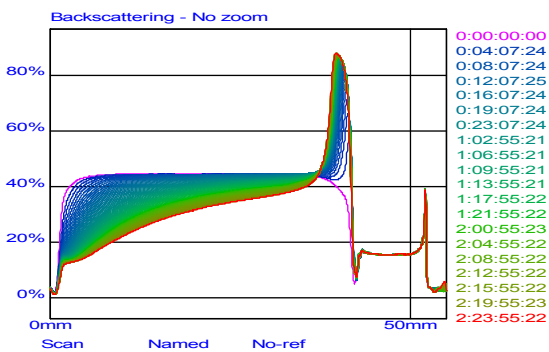
C\_1 - [File created by Turbisoft-AGS Version 1.12 English]



C\_2 - [File created by Turbisoft-AGS Version 1.12 English]



D\_1 - [File created by Turbisoft-AGS Version 1.12 English]



D\_2 - [File created by Turbisoft-AGS Version 1.12 English]

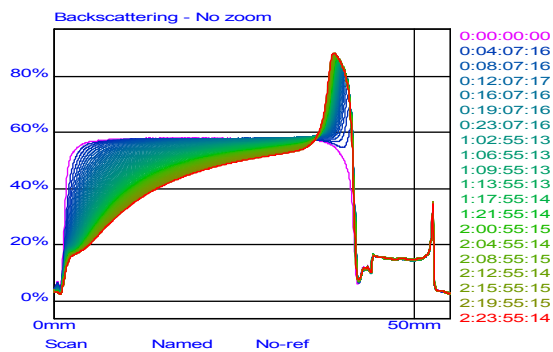


Figure. 79. 유화물의 보관 시간에 따른 유화 및 분산안정성  
 대두분말 PC 3% 유화물의 10% 희석액(A-1), 20% 희석액(A-2)  
 대두분말 PC 5% 유화물의 10% 희석액(B-1), 20% 희석액(B-2)  
 대두레시틴 3% 유화물의 10% 희석액(C-1), 20% 희석액(C-2)

대두레시틴 5% 유화물의 10% 희석액(D-1), 20% 희석액(D-2)

(라) 시판 대두레시틴 제품별 유화구 크기 비교 실험

입자의 크기가 creaming과 aggregation에 영향을 미치며, 일반적으로 유화안정성은 creaming 정도를 관찰하거나 입자의 크기를 측정함으로써 평가할 수 있다고 알려져 있다. 즉, 유화안정성은 분산상의 평균입자의 크기 또는 입자 수와 입자크기의 변화율을 측정하여 평가할 수 있다.

미량의 유화물을 모세관 끝으로 취하여 slide glass 상에 놓고 cover glass를 덮은 뒤 현미경으로 관찰한 다음에 현미경 사진(Photomicrographic equipment, model BH-2, Olympus, Japan)을 촬영하였다. 입도 분표를 측정하기 위해서는 먼저 slide glass 위에 증류수 한 방울을 떨어뜨린 뒤 모세관으로 미량의 유화물을 취해 이 증류수에 희석하여 cover glass를 덮고 검경한 뒤에 현미경사진을 촬영하였다.

아래 Figure. 80부터 Figure. 83의 결과와 같이 3%, 7%의 대두분말 PC는 유화물을 각 10% 20% 농도로 희석하였을 경우 각 유화물에서의 입도가 급격히 증가됨을 확인되었으나 대두레시틴은 동일한 조건에서도 평균입도의 증가를 크게 관찰되지 않았다.

이를 통해 볼 때, 대두레시틴이 대두분말 PC보다는 안정적인 유화형태를 형성하고 있음을 확인할 수 있었다.

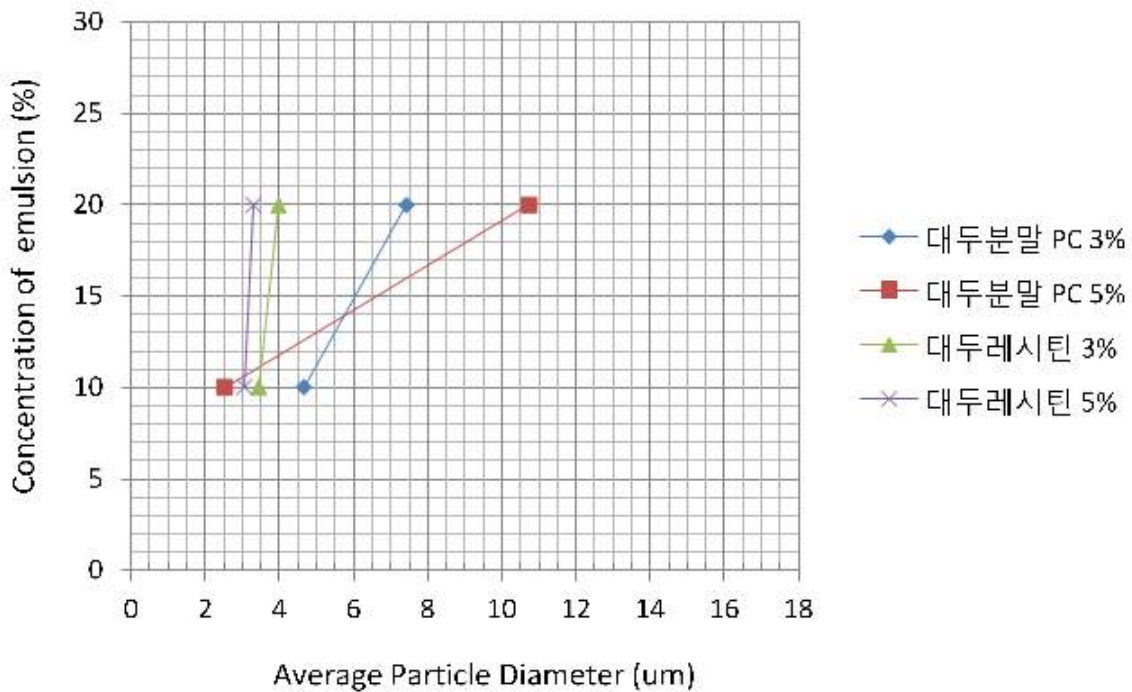


Figure. 80. 각 조건별 Average Particle Diameter 비교 그래프

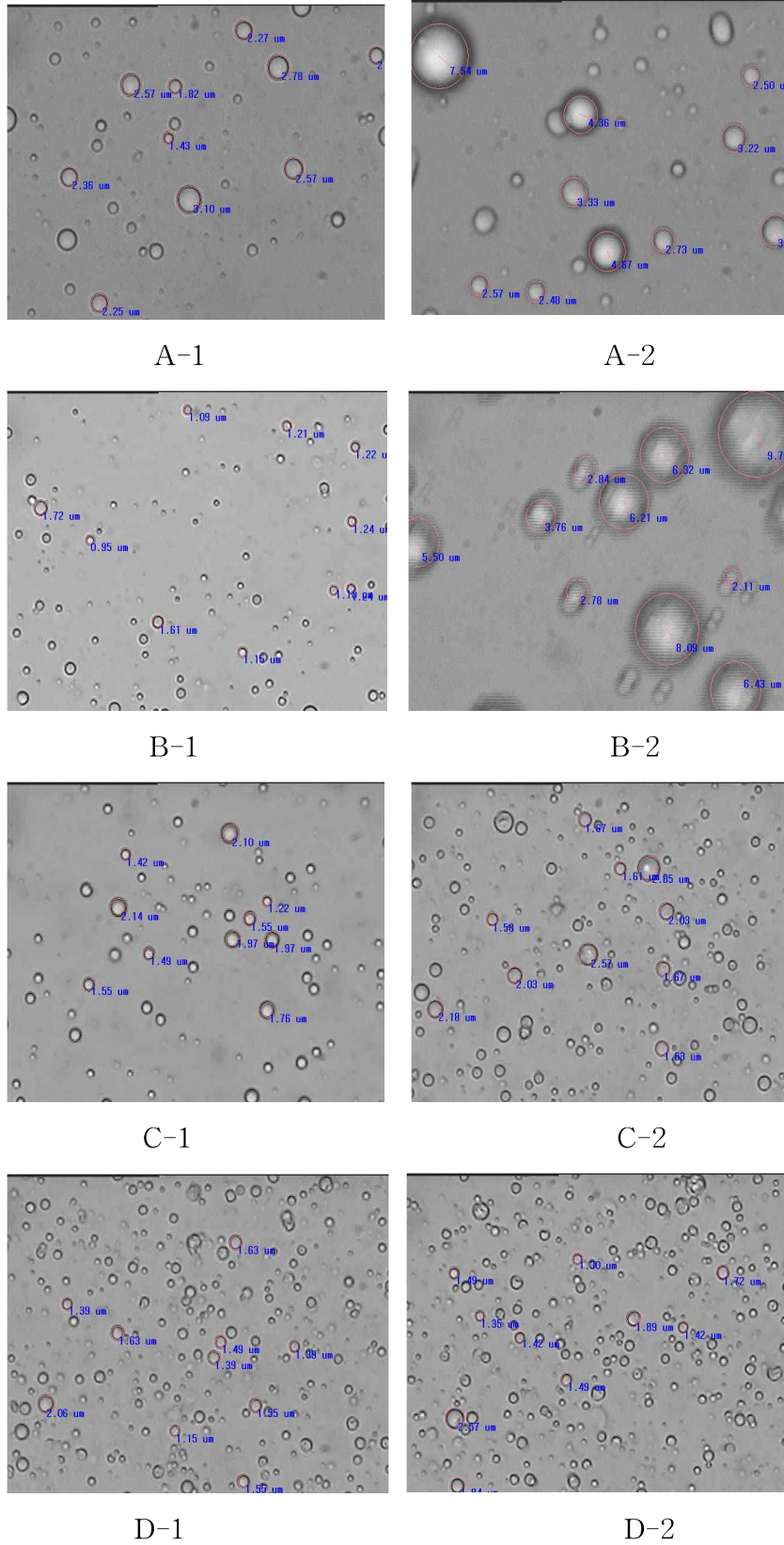
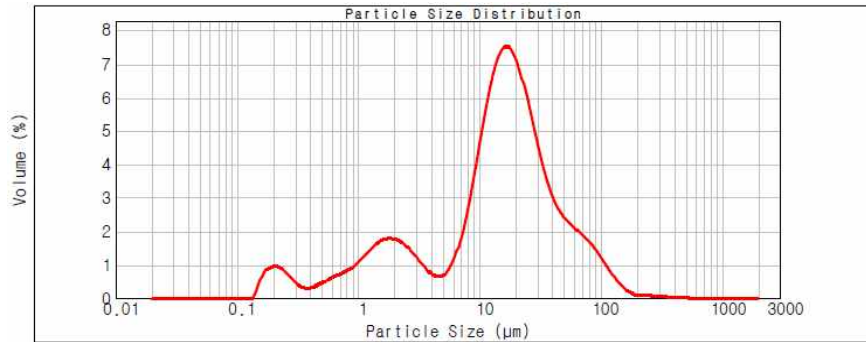


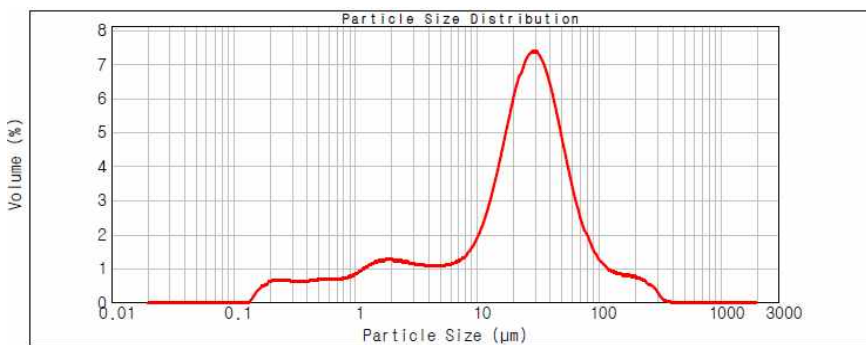
Figure. 81. 시판용 레시틴을 이용하여 제조된 유화물의 유화구 사진  
 대두분말 PC 3% 유화물의 10% 희석액(A-1), 20% 희석액(A-2) 촬영( $\times 100$ )  
 대두분말 PC 5% 유화물의 10% 희석액(B-1), 20% 희석액(B-2) 촬영( $\times 100$ )

대두레시틴 3% 유화물의 10% 희석액(C-1), 20% 희석액(C-2) 촬영(×100)

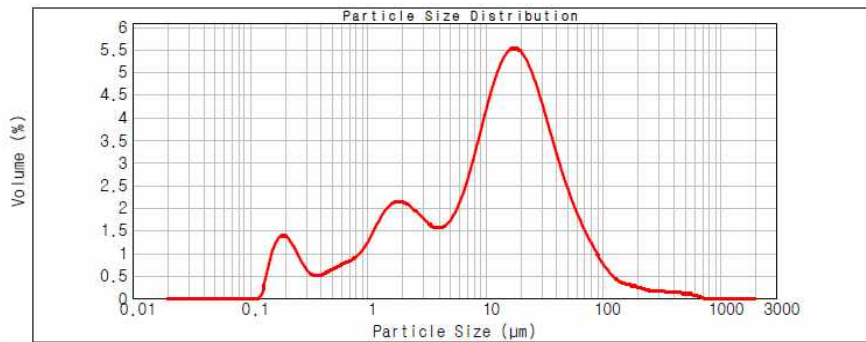
대두레시틴 5% 유화물의 10% 희석액(D-1), 20% 희석액(D-2) 촬영(×100)



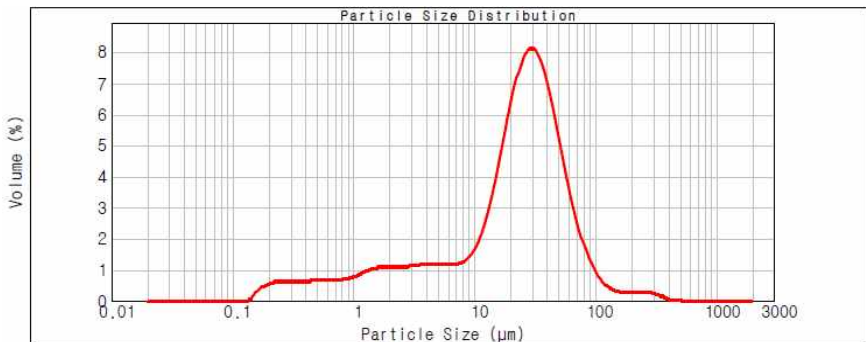
대두분말 PC 3% 유화물의 10% 희석액 (A-1)



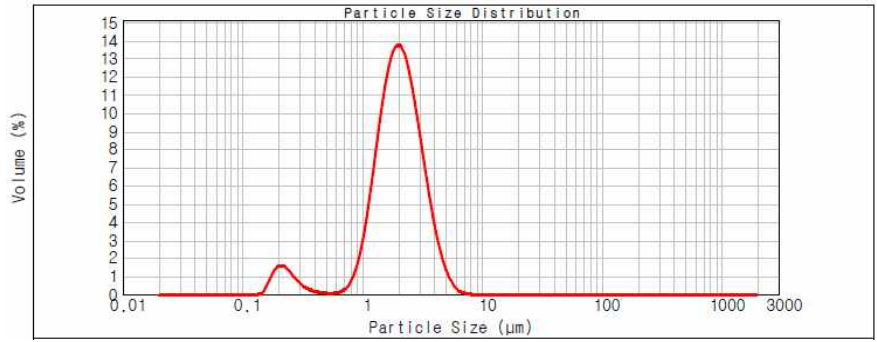
대두분말 PC 3% 유화물의 20% 희석액 (A-2)



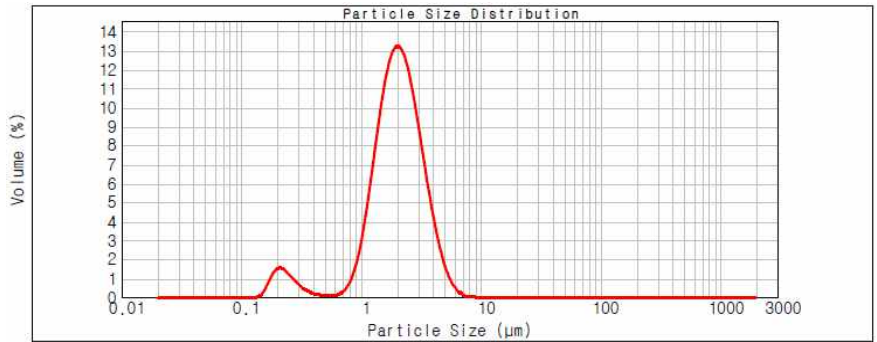
대두분말 PC 5% 유화물의 10% 희석액 (B-1)



대두분말 PC 5% 유화물의 20% 희석액 (B-2)

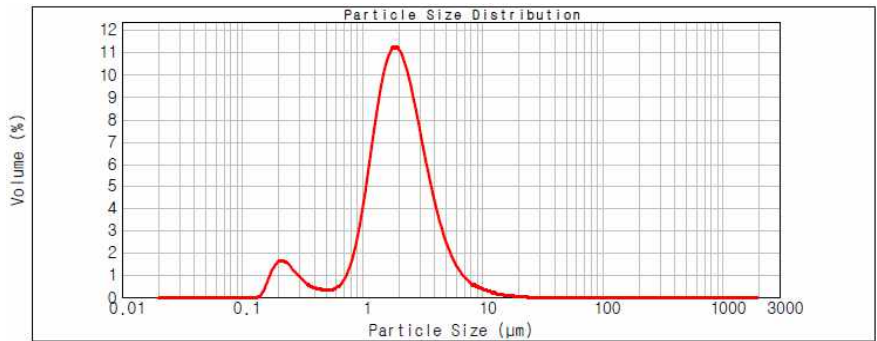


대두레시틴 3% 유화물의 10% 희석액 (C-1)

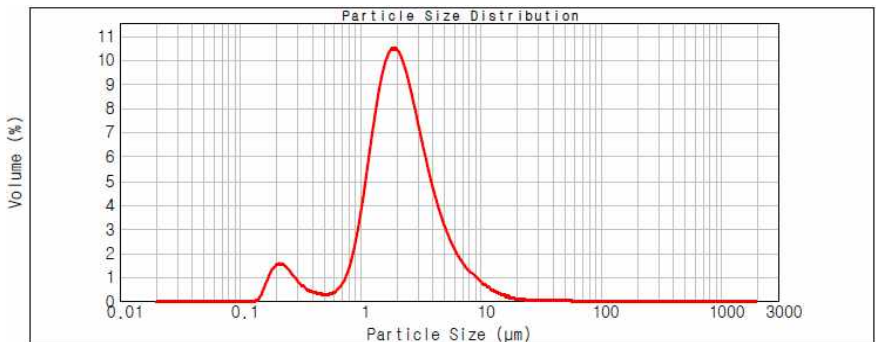


대두레시틴 3% 유화물의 20% 희석액 (C-2)

Figure. 82. 대두분말 PC를 이용하여 제조된 유화물의 입도분포



대두레시틴 5% 유화물의 10% 희석액 (D-1)



대두레시틴 5% 유화물의 20% 희석액 (D-2)



Figure. 83. 대두레시틴을 이용하여 제조된 유화물의 입도분포

(2) 시판 Lyso-대두레시틴 대비 기능성 PC 및 LPC 유화 특성 연구

(가) 일반 분석 비교 결과

Figure. 84.과 같은 시판 Lyso-대두레시틴 제품과 PC 및 LPC 제품에 대하여 일반 분석을 진행하였다. 식품첨가물 공전상 규격 중 산가, 아세톤불용물, 과산화물가, 구성지방산 및 수분 등에 대해 분석을 진행하였다. 그 결과는 Table 39,40,41에 각각 나타내었다.

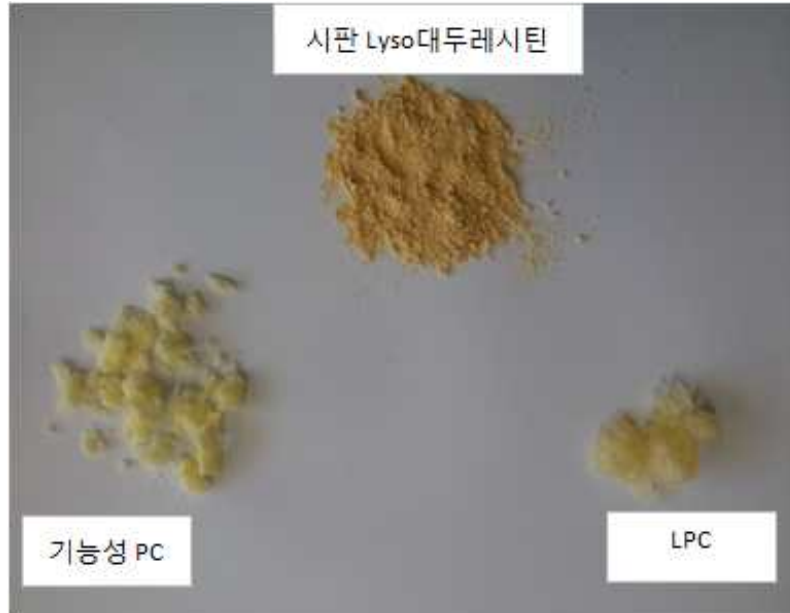


Figure. 84. 시판 Lyso-대두레시틴, 기능성 PC 및 LPC 샘플 사진

Table 39. 시판 Lyso-대두레시틴의 일반 분석

항목	단위	분석결과	분석법
Acetone Insoluble	%	95.5	AOCS Ja 4-46
Acid Value	mgKOH/g	29.8	AOCS Ja 6-55
Lyso-Form	%	30.2	In House Method
Moisture	%	0.7	AOCS Ja 2b-87
Peroxide Value	mEqO <sub>2</sub> /kg	2.5	AOCS 8-87
구성지방산 함량			
C16:0		15.5	
C18:0		3.9	
C18:1		17.3	
C18:2		55.3	
C18:3		7.2	
기타		0.8	

Table 40. 기능성 PC의 일반 분석

항목	단위	분석결과	분석법
PC	w/w%	61.7	In House Method
LPC	w/w%	4.9	In House Method
GPC	w/w%	15.0	In House Method
FFA	w/w%	18.4	AOCS Ja 6-55
구성지방산 함량	PC (mol%)		LPC (mol%)
C16:0	4.55		5.10
C16:1n-7	0.00		0.38
C18:0	1.53		1.95
C18:1n-9	9.32		8.33
C18:1n-7	0.95		1.17
C18:2n-6	47.66		36.67
C18:3n-3	4.27		3.28
C20:0	0.58		0.86
C20:1n-9	1.02		1.51
C20:2	0.00		0.39
C20:3n-6	0.69		1.08
C20:4n-6	0.00		0.54
C20:5(EPA)	7.11		10.30
C22:1	0.80		1.31
C22:5(DPA)	6.42		2.36
C22:6(DHA)	15.10		24.77

Table 41. LPC 샘플의 일반 분석

항목	단위	분석결과	분석법
PC	w/w%	13.6	In House Method
LPC	w/w%	57.7	In House Method
FFA	w/w%	28.7	AOCS Ja 6-55
구성지방산 함량	PC (mol%)	LPC (mol%)	
C14:0	0.1 <sup>a</sup>		
C16:0	15.1	2.2	
C16:1n-7	0.1	0.2	
C18:0	3.5	0.2	
C18:1n-9	11.0	12.5	
C18:1n-7	1.7	0.5	
C18:2n-6	62.6	78.0	
C18:3n-3	5.8	6.4	
C20:1	0.1		
Total SFA	18.7	2.4	
Total USFA	81.3	97.6	

<sup>a</sup> Mean ± standard deviation (n=2)

Abbreviations: PC, phosphatidylcholine *sn*-1-LPC, *sn*-1-lysophosphatidylcholine SFA, saturated fatty acids; and USFA, unsaturated fatty acids.

(나) 제품별 표면장력 비교 실험

각 샘플 시판 Lyso-대두레시틴, PC 및 LPC를 각각 2g을 취해 물 98g에 첨가한 다음, 60도 온도 조건에서 600rpm의 교반 제공 조건으로 완전히 용해 시켜 각 유화물을 획득한다. 획득한 유화 샘플을 각각 표면장력기, Fisher Scientific Surface Tensiomat 21 (with 6cm ring)를 이용하여 유화 특성을 측정하였다.

Table 42와 Figure. 85.에서와 같이 유화물의 표면장력을 확인한 결과, Lyso 함량이 높은 LPC, 시판 Lyso-대두레시틴, 기능성 PC 순으로 계면장력이 낮은 것으로 보아, HLB(Hydrophilic Lipophilic Balance)값으로 평균 6~8 정도인 기능성 PC보다는 HLB 10~12 인 LPC와 시판 Lyso-대두레시틴이 본 실험과 같은 유화물의 초기 표면장력을 저감에 보다 유리한 것으로 판단되었다. 이는 물(표면장력 72.8dyne/cm)의 계면장력 저하와 투입되는 계면활성제의 농도는 비례한다는 사실과 일치한다. 이와 같이 수상 유화물에서의 표면장력은 시판 Lyso-대두레시틴, 기능성 PC 및 LPC 제품의 투입농도와 비례한다는 사실을 확인하였다.



하지만, 임계미셀농도(Critical Micell Concentration, CMC) 즉, 희박한 농도의 용액에서는 순수한 용액으로 되나, 농도가 올라 가면 표면 배열에 계면활성제가 배치되어 표면장력이 저하되고 더욱 농도를 올리면 표면에 단분자막이 생겨 표면장력이 최저로 낮아지고, 더욱 농도를 높이면 여분의 계면활성제 분자끼리 물속에서 모여 물을 끌어 안은 상태의 미셀을 만들어 내어 표면장력이 평행에 도달하는 미셀이 생기기 시작하는 농도를 임계미셀농도라 하는데, 임계미셀농도를 경계로 계면활성제 수용액의 성질은 크게 변화된다. 임계미셀농도(CMC)를 기준으로 각 샘플의 표면장력 저하능력을 평가해 보면 시판 Lyso-대두레시틴 대비 약1/100, 기능성 PC 대비 약1/500의 적은 투입 농도에서도 LPC의 표면저하능력을 확인할 수 있었다.

Table 42. 각 조건 별 Surface Tention 비교표

Content (%)	0.0002	0.002	0.02	0.2	1.0
시판 Lyso-대두레시틴	71.8	68.2	54.4	41.0	41.7
기능성 PC	72.6	64.3	55.2	47.2	40.4
LPC	72.8	39.5	33.0	31.3	31.1

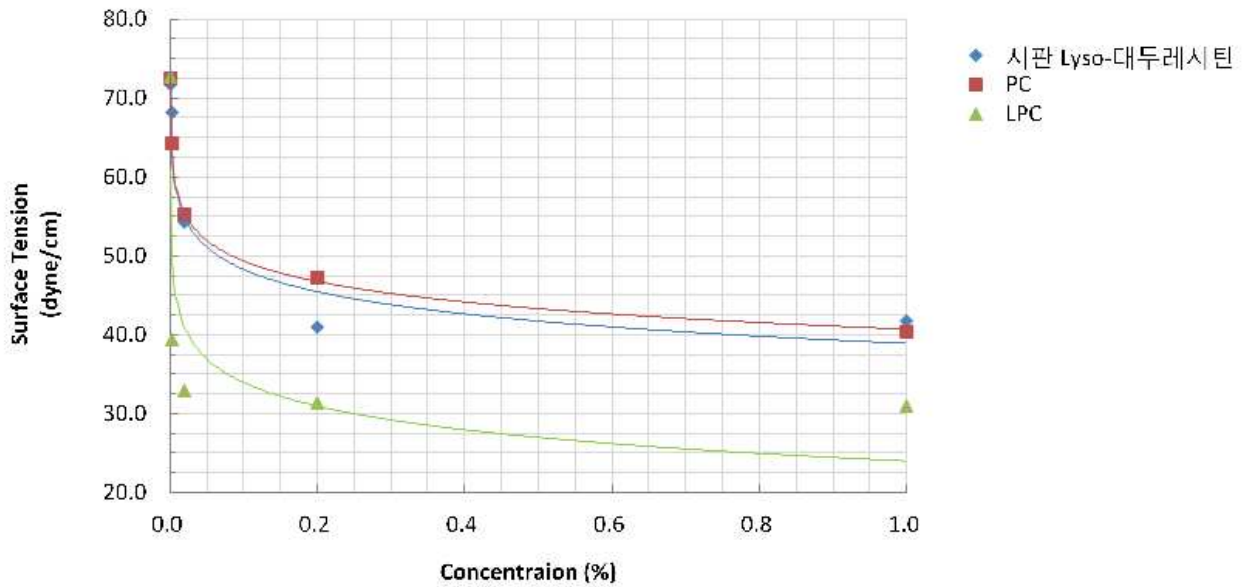


Figure. 85. 각 조건 별 Surface Tention 비교 그래프

### (3) 제품별 표면장력 유화안정성 비교 실험

각 샘플 1g을 우선 솔비톨 89g에 투입한 후 5분 동안 4,000rpm 조건으로 호모믹싱을 한 후 대두유 10g을 서서히 투입하면서 10분 동안 4,000rpm으로 혼합을 유지하여 1차 유화물을 획득한다. 이후 각 조건의 1차 유화물을 물 중량 대비 10% 희석하여 2차 유화물 샘플을 획득하였다. 획득한 샘플을 각각 입도분석기와 현미경 검정법에 이용하여 유화안정성 평가를 측정하였다.

#### ① 제품별 저장 안정성 비교 실험

Figure. 86.과 같이 샘플 3종 모두 유백색의 O/W 유화 분산물이 제조됨을 확인하였으며, 이는 개발된 기능성 PC와 LPC가 계면을 활성화시킬 수 있는 유화제로서의 효과를 발현함을 확인하였다.

이렇게 제조된 유화물을 상온(25°C)과 고온(60°C)에서 보관하면서 유화 안정성을 평가한 결과, Figure. 87.와 Figure. 88.같은 결과를 얻을 수 있었다.

상온 저장 안정성은 Figure. 87.에서와 같이 큰 차이를 보이지 않았지만, 기능성 PC유화물에서 1일 경과 후, 상층에 유막이 형성됨이 확인되었으며, 유막의 두께차이는 4일 경과후에도 크게 증가하는 현상은 확인되지 않았다. 이 결과로 판단해보면, 시판 Lyso-레시틴과 개발된 LPC는 상온에서 유사한 유화 안정성을 발현하였으며, 기능성 PC는 초기 유화 안정성은 비교 제품에 비하여 떨어지지만, 상온 유화 유지 능력은 보유하고 있음을 확인하였다.

고온 저장 안정성은 Figure. 88.에서와 같이 확인되었으며, 상온 저장 안정성에서와 같이 개발된 기능성 PC를 적용한 유화물이 시판 Lyso-레시틴과 개발된 LPC의 유화물에 비하여 초기 유화 안정성이 현저히 저하되어 상층부에 유막이 확연히 나타남을 확인하였다.

결론적으로, 개발된 기능성 PC, LPC, 시판 Lyso-레시틴의 유화물에서의 저장 안정성 실험을 진행한 결과, 효소 분해를 통해서 얻어진 LPC와 시판 Lyso-레시틴이 기능성 PC에 비하여 상온 및 고온 보관중에 초기 계면 활성화 능력이 우수함을 확인하였다.



Figure. 86. 각 샘플별 초기 유화물

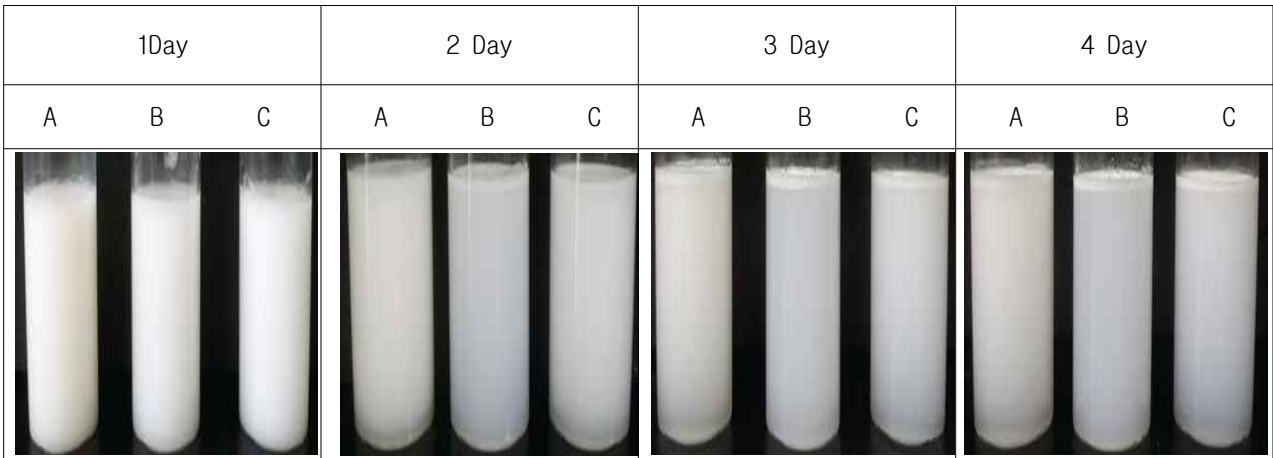


Figure. 87. 각 샘플별 유화물의 상온 노출 시간에 따른 보관성 비교 실험  
(A: 시판 Lyso-대두레시틴, B: 기능성 PC, C: LPC)

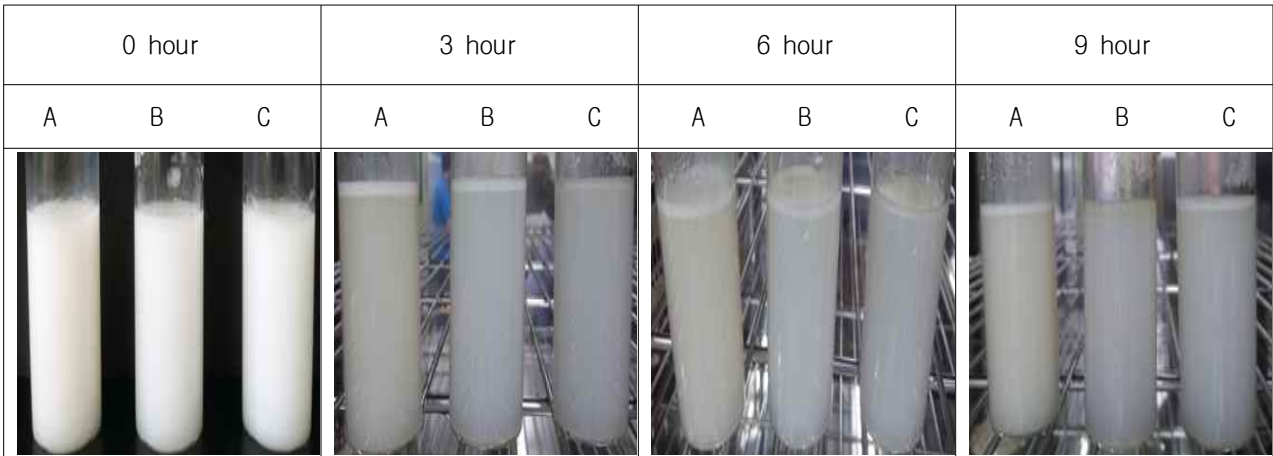


Figure. 88. 각 샘플별 유화물의 60도 온도 노출 시간에 따른 보관성 비교 실험 (A: 시판 Lyso-대두레시틴, B: 기능성 PC, C: LPC)

② 제품별 유화구 크기 비교 실험

안정된 유화는 입도가 작고 입도 분포폭이 좁을수록 좋지만, 물리적인 유화를 가한 기름과 물은 교반 직후 초기에는 유화되지만 물리력을 제거한 이후부터 유화 파괴가 일어나 결국 원래의 2상으로 분리되어지는데 이런 유화파괴 과정은 크리밍, 응집 및 합일의 3단계를 거치게 된다. 즉, 유화시 분산되었던 기름방울이 교반을 멈춘 직후 모여들어 일정 모양으로 응집이 일어나고, 비중차로 수면에 떠서 올라오거나, 기름방울이 직접 수면에 떠올라 크림상으로 되어 분리되어진다. 또한 응집된 군들이 더욱 모여 커다란 군을 형성하는 합일 과정을 거쳐 수면에 부상하는데, 이런 일련의 과정을 억제하기 위해서는 분산입자의 입경을 작게 하는 것이 효과가 있는데, 약 1.0 ~ 5.0 um 입경이 가장 안정하다고 알려져 있다.

각 제품별 유화구 크기를 비교하고자 검정법과 입도 분석기를 이용하여 비교하였다

미량의 유화물을 모세관 끝으로 취하여 slide glass 상에 놓고 cover glass를 덮은 뒤 현미경으로 관찰한 다음에 현미경 사진(Photomicrographic equipment, model BH-2, Olympus, Japan)을 촬영하였다. 입도 분포를 측정하기 위해서는 먼저 slide glass 위에 증류수 한 방울을 떨어뜨린 뒤 모세관으로 미량의 유화물을 취해 이 증류수에 희석하여 cover glass를 덮고 검경한 뒤에 현미경사진을 촬영하였다.

또한, 입도분석은 유화물 2~3g을 취하여 증류수 700g에 투입한 후 Malvern社 Mastersizer 2000 모델을 사용하여 입도를 분석하였다.

아래 Figure. 89.과 Figure. 90.의 결과와 같이 동일 농도에서의 시판 Lyso-대두레시틴, 기능성 PC 및 LPC의 입도를 비교해 보면 시판 Lyso-대두레시틴의 평균 입도 반지름은 16.98um, 기능성 PC의 평균 입도 반지름은 28.64um, LPC의 평균 입도 반지름은 14.0um로 LPC의 평균 입도 반지름이 가장 안정적이었으나, 평균 입도 분포폭은 시판 Lyso-대두레시틴이 LPC보다 양호한 것으로 확인되었다.

이를 통해 볼 때, LPC가 시판 Lyso-대두레시틴 대비 유사한 유화형태를 제공할 수 있을 것으로 예측할 수 있었다.

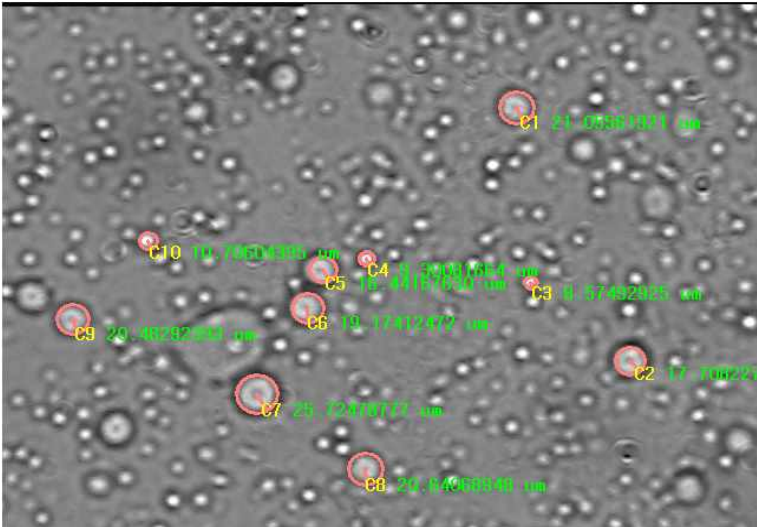
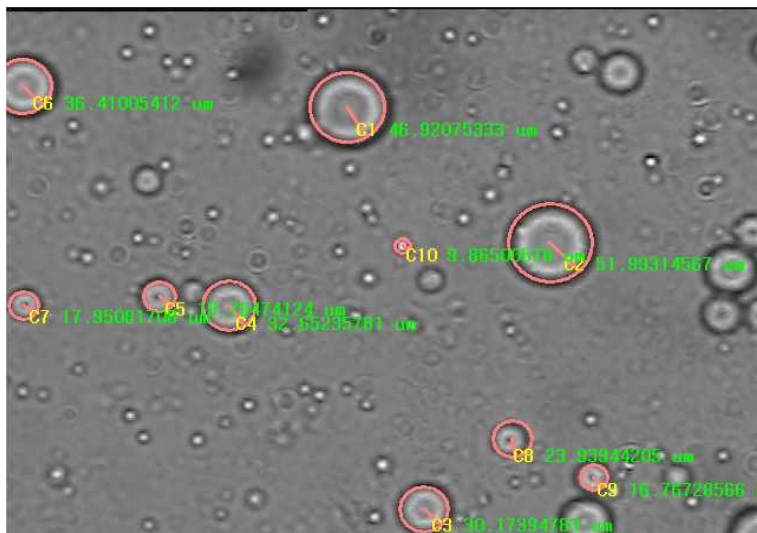
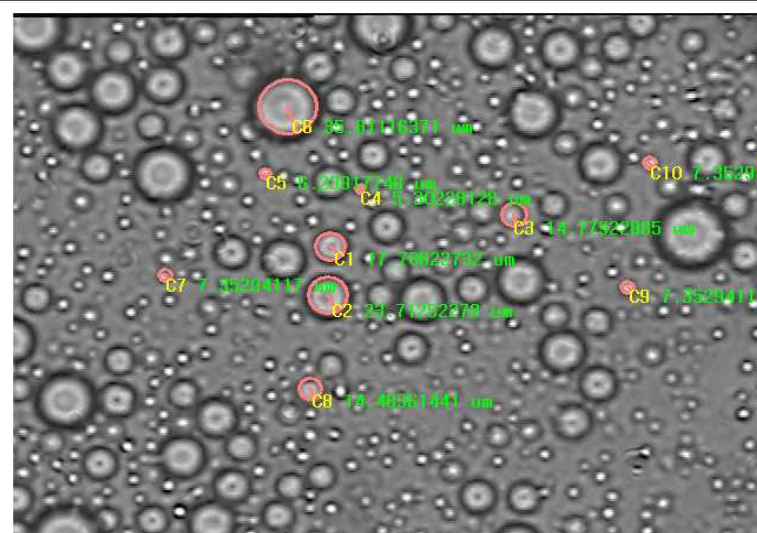
시료명	결과표
<p>시판 Lyso-대두 레시틴</p>	 <p>Micrograph showing 10 particles labeled C1 to C10 with their diameters in micrometers:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>C1: 21.05307311 um</li> <li>C2: 17.106295 um</li> <li>C3: 16.57492935 um</li> <li>C4: 21.32111354 um</li> <li>C5: 15.49115133 um</li> <li>C6: 19.11311377 um</li> <li>C7: 25.12210177 um</li> <li>C8: 24.84650546 um</li> <li>C9: 20.48242923 um</li> <li>C10: 19.11601339 um</li> </ul>
<p>기능성 PC</p>	 <p>Micrograph showing 10 particles labeled C1 to C10 with their diameters in micrometers:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>C1: 46.92305333 um</li> <li>C2: 51.98314587 um</li> <li>C3: 30.17354781 um</li> <li>C4: 32.35235781 um</li> <li>C5: 14.1114124 um</li> <li>C6: 35.4105412 um</li> <li>C7: 17.35031746 um</li> <li>C8: 23.93844205 um</li> <li>C9: 16.76723056 um</li> <li>C10: 9.86500510 um</li> </ul>
<p>LPC</p>	 <p>Micrograph showing 10 particles labeled C1 to C10 with their diameters in micrometers:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>C1: 11.70829737 um</li> <li>C2: 24.71132278 um</li> <li>C3: 14.17322085 um</li> <li>C4: 11.33220123 um</li> <li>C5: 4.21017746 um</li> <li>C6: 35.61116371 um</li> <li>C7: 7.35284117 um</li> <li>C8: 13.48381441 um</li> <li>C9: 7.35284117 um</li> <li>C10: 7.35284117 um</li> </ul>

Figure. 89. 각 샘플별 검경법을 통한 입도 분석

시료명	결과표
시판 Lyso-대두 레시틴	
기능성 PC	
LPC	

Figure. 90. 각 샘플별 입도 분석기를 통한 입도 분석



③ 제품별 분산안정성 비교 실험

아래 Figure. 91-93은 60도에서 시판 Lyso-대두레시틴, 기능성 PC 및 LPC에 대해 약 3일 동안 매 1시간 간격으로 Scanning 하여 분산안정성의 변화를 측정된 결과이며, 시료의 높이(X축)에 대해 각 Scan 시간에 따른 Transmission & Backscattering Profile의 변화(Y축)를 Reference Mode로 나타낸 그래프이다. 여기서 Reference Mode는 1<sup>st</sup> Profile을 기준으로 하였으며 이 때의 Profile을 0% Transmission & Backscattering으로 잡고 나머지 Profile들의 변화를 상대적으로 위치 이동시켜 나타낸 결과이다.

상기 3개 시료 모두 그림에서 알 수 있듯이 Creaming 현상이 일어나 분산안정성이 떨어지는 현상이 관찰되었지만, Aggregation 현상은 관찰되지 않았다.

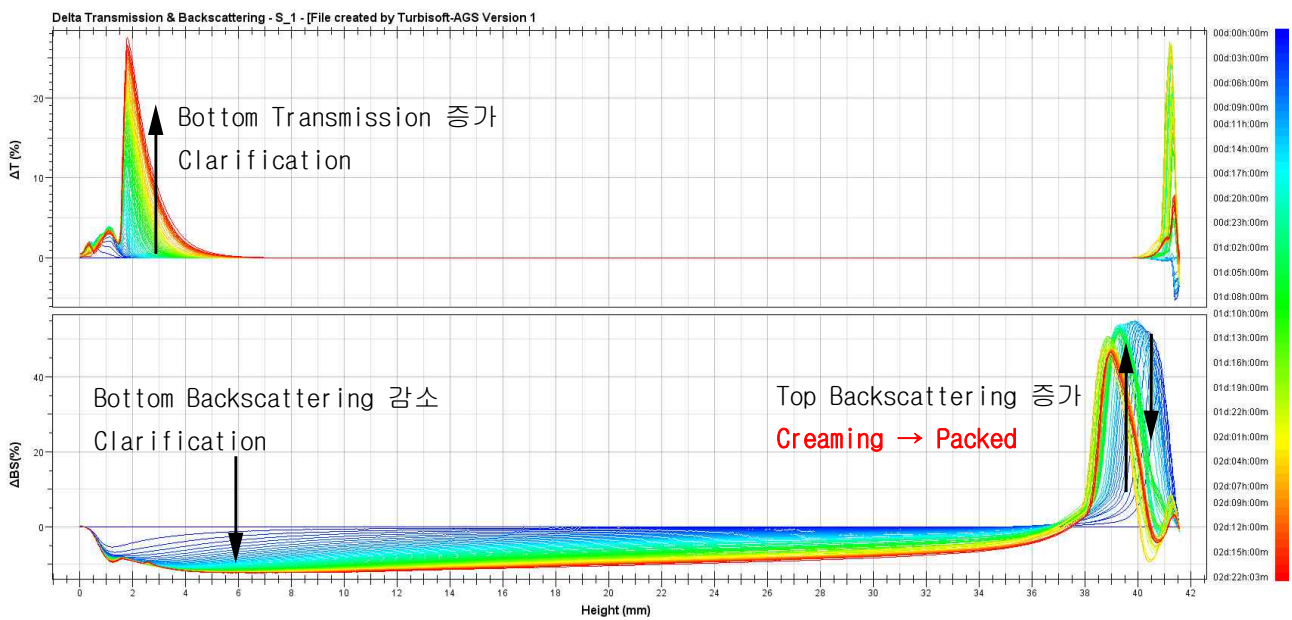


Figure. 91. 시판 Lyso-대두레시틴의 60도 온도조건에서의 Instability Phenomena

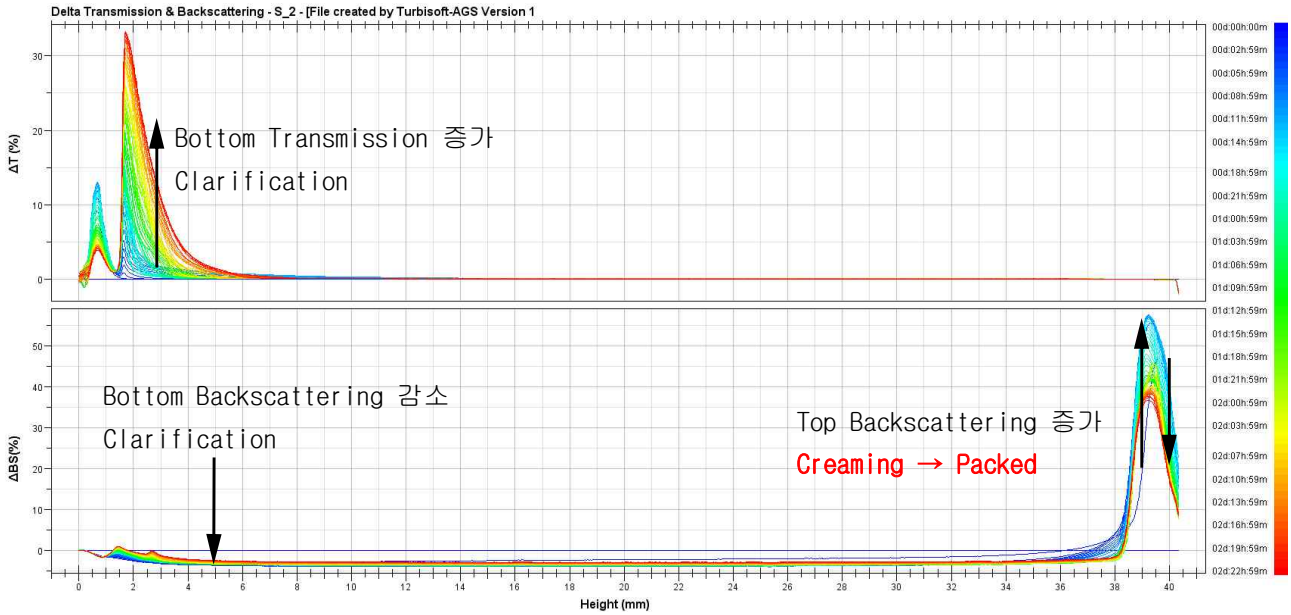


Figure. 92. 기능성 PC의 60도 온도조건에서의 Instability Phenomena

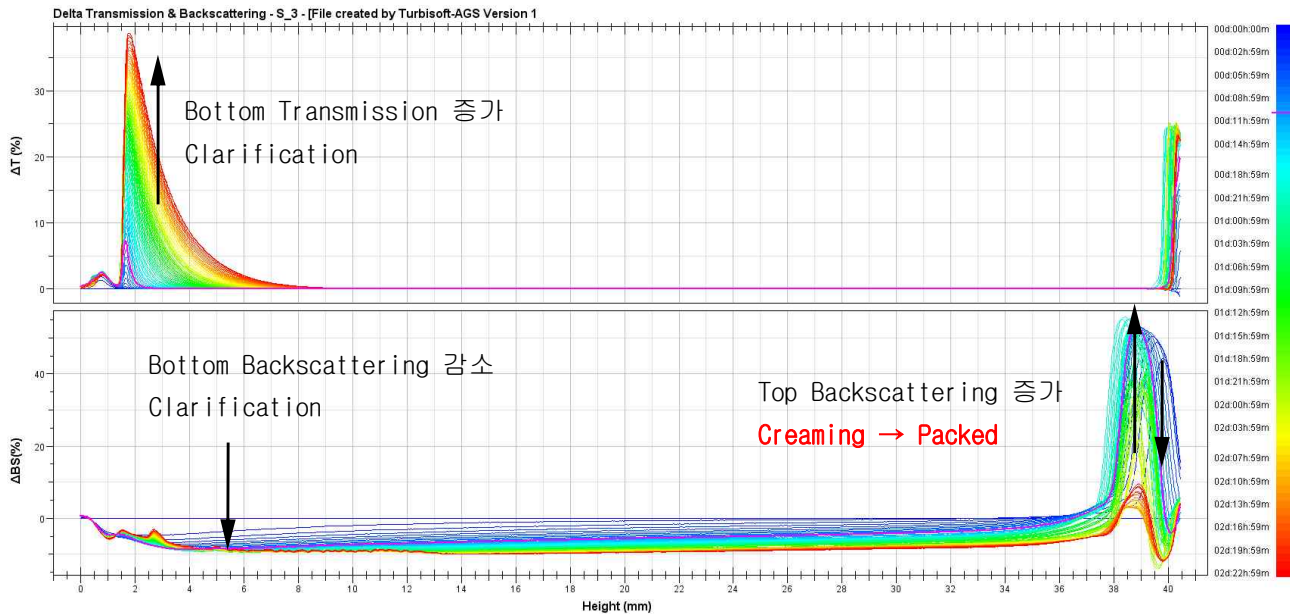


Figure. 93. LPC의 60도 온도조건에서의 Instability Phenomena

먼저 Creaming 현상에 의한 변화를 살펴보면, Backscattering Profile의 경우 시료의 Bottom 부분은 시간에 따라 초기보다 상대적으로 농도가 감소(Clarification Layer 형성)하므로 BS(%)이 감소하였고, 반면에 시료의 Top 부분은 초기보다 상대적으로 농도가 증가(Cream Layer 형성)하므로 BS(%)이 증가하였다. 시료 Top 부분에서 후반에 Backscattering Profile이 다시 감소한 것은 Cream Layer가 점차 Packed되기 때문이다.



그리고 시료 Bottom 부분에서는 Creaming 현상으로 인해 이 부분의 농도가 많이 묽어져 Transmission의 증가도 관찰되었다.

시료 Top부분에서 Backscattering이 증가하다가 감소하는 변화를 보이는 이유는 아래 Figure. 94.의 “농도 변화에 따른 BS(%)의 변화”에서 보면 주황색 네모로 표시된 Independent Diffusion 영역에서는 농도가 증가할수록 BS(%)이 증가하기 때문이며, 그러다가 점차 이 부분의 농도가 포화 농도 이상으로 증가하는 경우 파란색 네모로 표시된 것처럼 Dependent Diffusion 현상으로 인해 다시 감소하게 된다.

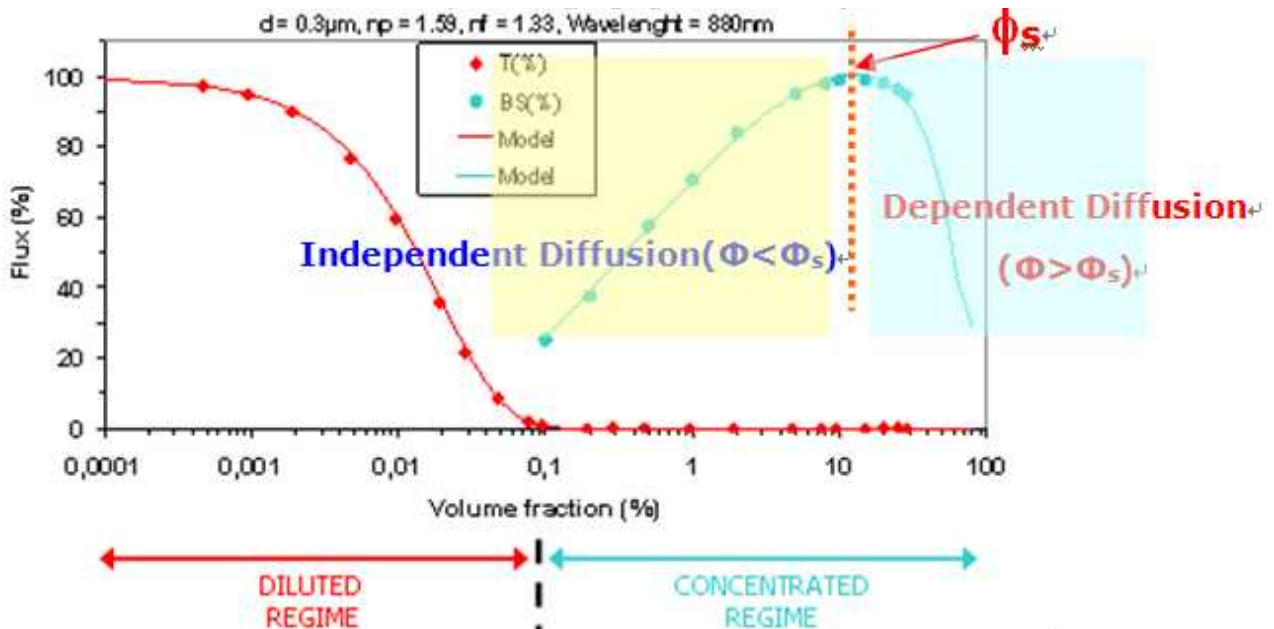


Figure. 94. Effect of the Volume Fraction (ESTAPOR Index Suspension, Polystyrene in water)

Sedimentation 현상으로 인한 변화로 이를 상세하게 설명하면, 먼저 전형적인 Independent Diffusion 영역에서는 시료의 농도가 포화농도 이하( $\Phi < \Phi_s$ )에서는 Sedimentation 현상으로 인해 시료 Bottom 부분에서 분산상의 농도가 증가할수록 BS(%)은 증가한다.

그러나 Sediment Layer 내에서 Close Packing 또는 Aggregation이 일어나게 되면 평균적인 입자간의 거리가 매우 가까워져 이 부분의 농도가 포화농도(Saturation Concentration) 이상으로 증가하게 된다.

또한 시료의 농도가 포화농도(Saturation Concentration) 이상( $\Phi > \Phi_s$ )으로 증가하는 경우 인접한 입자들간의 거리가 매우 가까워져서 각 입자에 의한 산란광이 서로 상쇄되는 상쇄간섭(Destructive Interference)이 일어나기 때문에 Scattering Efficiency가 감소한다. 이러한 현상을 Dependent Diffusion이라고 하며 Independent Diffusion 영역에서처럼 농도가 증가할수록 BS(%)이 증가하는 것과는 달리 이 영역에서는 오히려 반대로 BS(%)이 감소한다.

상기 시판 Lyso-대두레시틴, 기능성 PC 및 LPC의 Creaming 현상에 의한 분산안정성 변화를 종합하여 각 시료간의 분산 안정성 차이를 확인하기 위하여 Stability Kinetics 및 Turbiscan

Stability Index를 Figure. 95와 Table 43.에 나타내었다.

결론적으로, 초기 유화안정성은 시판 Lyso-대두레시틴 > LPC > 기능성 PC로 확인되었으며, 장기 유화 안정성은 기능성 PC에서 가장 우수함을 확인할 수 있었다. 시판 Lyso-대두레시틴과의 초기 유화 안정성을 극복하기 위한 방법으로는 LPC의 Hydrolyse 비율을 조절함으로 개선할 수 있을 것으로 판단되며, 동시에 기능성 PC와 LPC의 병행 사용함으로서 장기 유화 안정성을 보완한다면, 시판 Lyso-대두레시틴과 비교시 동등이상의 계면활성능을 보유하는 기능성 소재로서의 활용이 가능할 것으로 판단된다.

이는 W/O 유화에는 친유성 유화제를, O/W 유화에는 친수성 유화제를 이용하는 것이 원칙이나 특히, 안정성이 우수한 유화물을 제조하기 위해서는, 단일의 유화제를 사용하는 것보다 친유성 유화제와 친수성 유화제를 혼합 사용하는 것이 기대 이상의 효과를 볼 수 있기 때문이다. 따라서, 앞서 언급했던 LPC의 Hydrolyse의 비율을 조절함으로서 HLB값이 다양한 기능성 계면활성제를 개발할 수 있을 것으로 사료되며, 이를 통하여 다양한 기능성 소재를 개발함으로 인류의 건강에 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

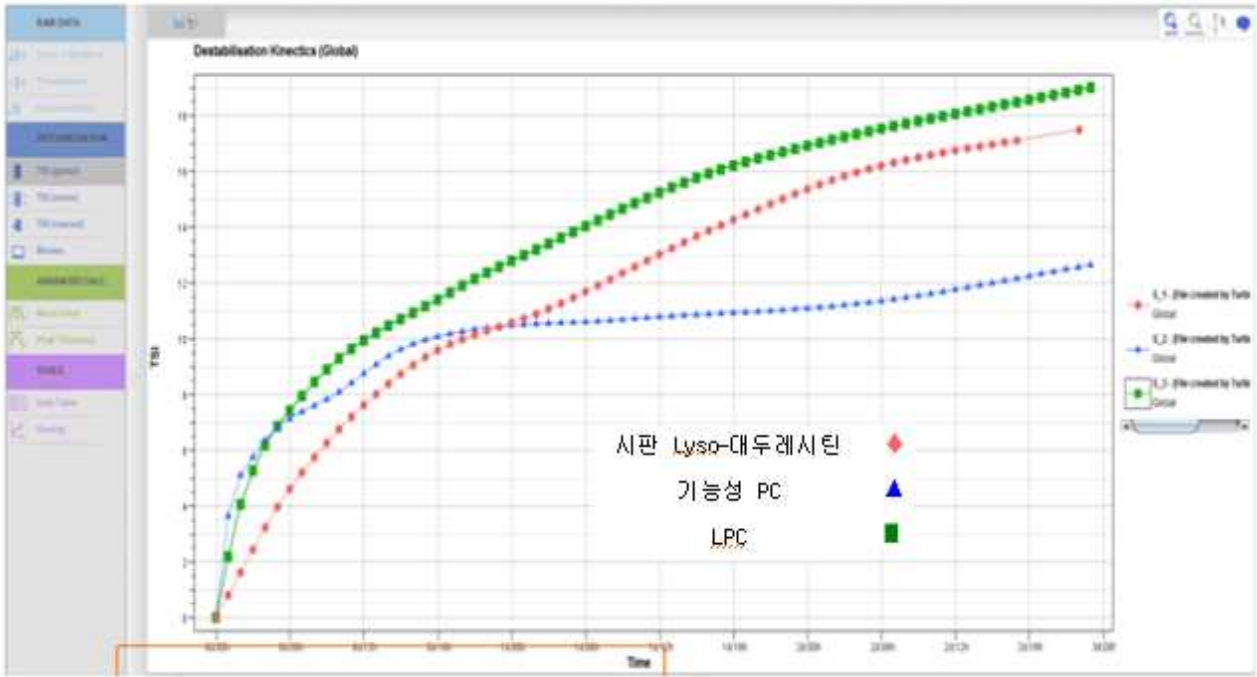


Figure. 95. Stability Kinetics and Stability Index in Delta BST

Table 43. 각 샘플별 Stability Index

샘플명	시판 Lyso-대두레시틴	기능성 PC	LPC
1 Day	10.6	10.5	12.8
2 Day	15.4	11.1	16.9
3 Day	17.5	12.6	18.9

### (3) 상용 non-GMO 레시틴과 기능성 LPC 비교 연구

#### (가) 상용 레시틴과 개발된 LPC 비교 실험

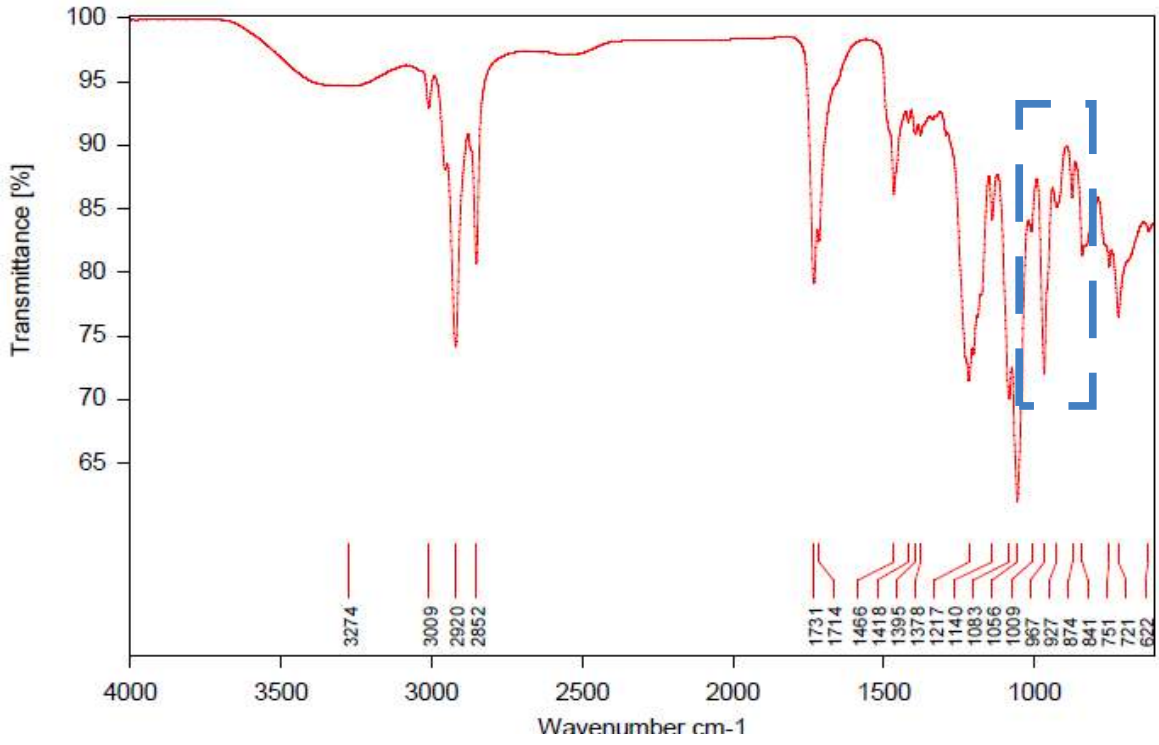
본 실험에서는 현재 시판되고 있는 인도 LASENOR사의 NON-GMO 레시틴을 입수하여 대조구로 사용하였으며, 구조 비교 분석을 위해서 H-NMR과 FT-IR 분석을 진행하였고, 함량 비교 분석을 위하여 Gas Chromatography을 이용하여 진행하였으며, 그 결과는 다음과 같다.

#### ① FT-IR 분석

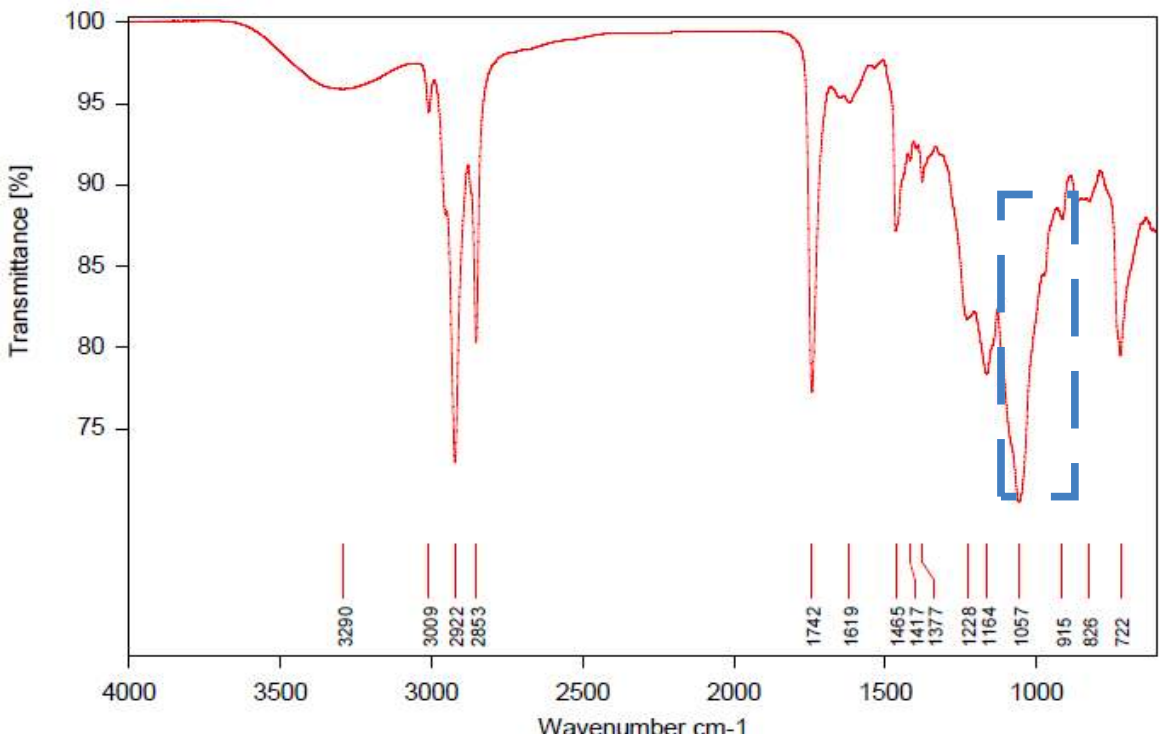
FT-IR 분석 자료의 검토는 아래 Table 44를 참고하여 진행하였으며, 그 결과, Figure 96의 파랑 박스 영역대에서 알 수 있듯이 개발 완료된 LPC에서 인지질 중 콜린에만 함유되어 있는 N-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub><sup>-</sup> 파장 영역에서 일반 상용품과 상이한 파형을 나타냄을 확인하였다.

Table 44. Reference of FT-IR bands

FT-IR-Band	Standard Egg Yolk lecithin	Iraqi wet Egg Yolk Lecithin sample
	Wavenumber (cm <sup>-1</sup> )	Wave number (cm-1)
C=O (sn-1 / sn-2) – stretching	1742 / 1725	1743
C-O – stretching	1170 + 1070	1157+1076
CH <sub>2</sub> – stretching, antisymmetric	2920	2926
CH <sub>2</sub> – stretching, symmetric	2850	2854
CH <sub>2</sub> – deformation (scissoring)	1465	1456
CH <sub>2</sub> – deformation (wagging)	1305	1313
CH <sub>2</sub> – deformation (twisting)	1180-1345	1157- 1338
CH <sub>2</sub> – deformation (rocking)	720	696
Terminal CH <sub>3</sub> – stretching, antisymmetric	2956	2960
Terminal CH <sub>3</sub> – stretching, symmetric	2870	2873
=C-H – stretching, antisymmetric	3010	2960
CH <sub>3</sub> – stretching in N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> , antisymmetric	3040	3080
N-(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> – stretching, antisymmetric	970	970
C-N – stretching, antisymmetric	945	935
PO <sub>2</sub> – stretching, symmetric	1085-1100	1076
PO <sub>2</sub> – stretching, antisymmetric	1220-1250	1238
-OH – stretching	3200-3600	3262



⊕ LPC



⊕ Non-GMO Lecithin

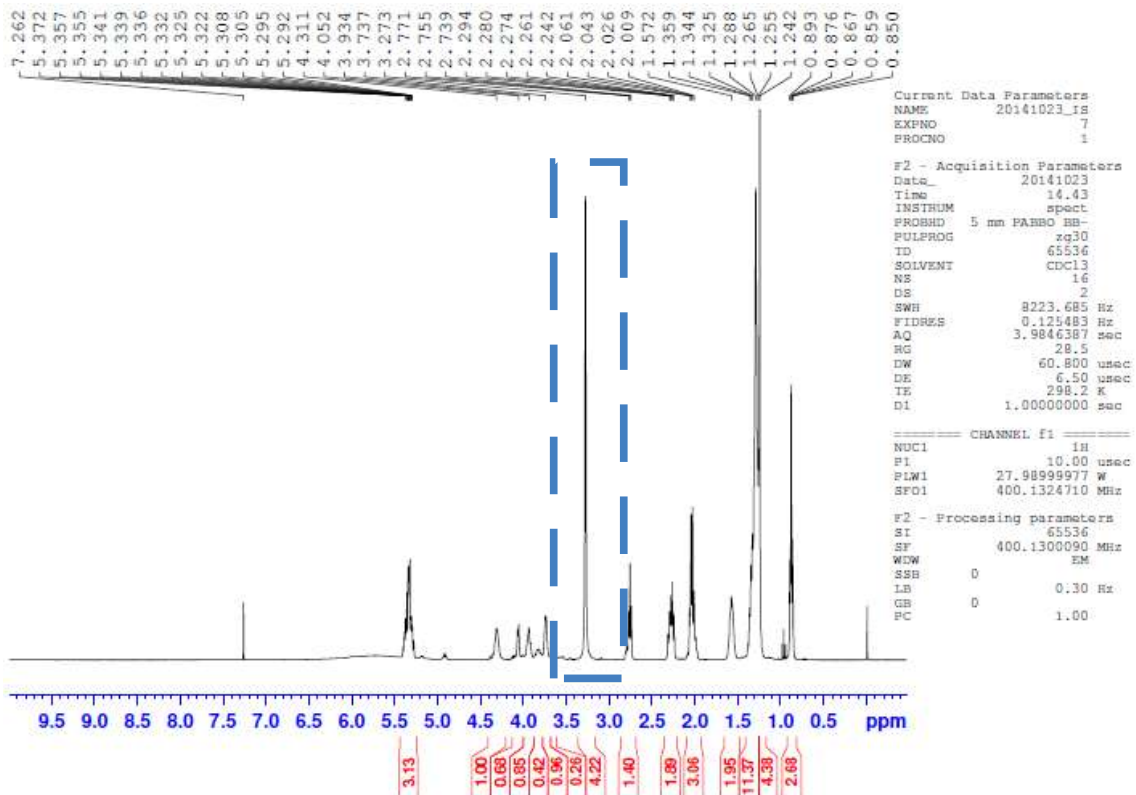
Figure. 96. FT-IR Spectrum of LPC and commercial Non-GMO Lecithin

② H-NMR 분석

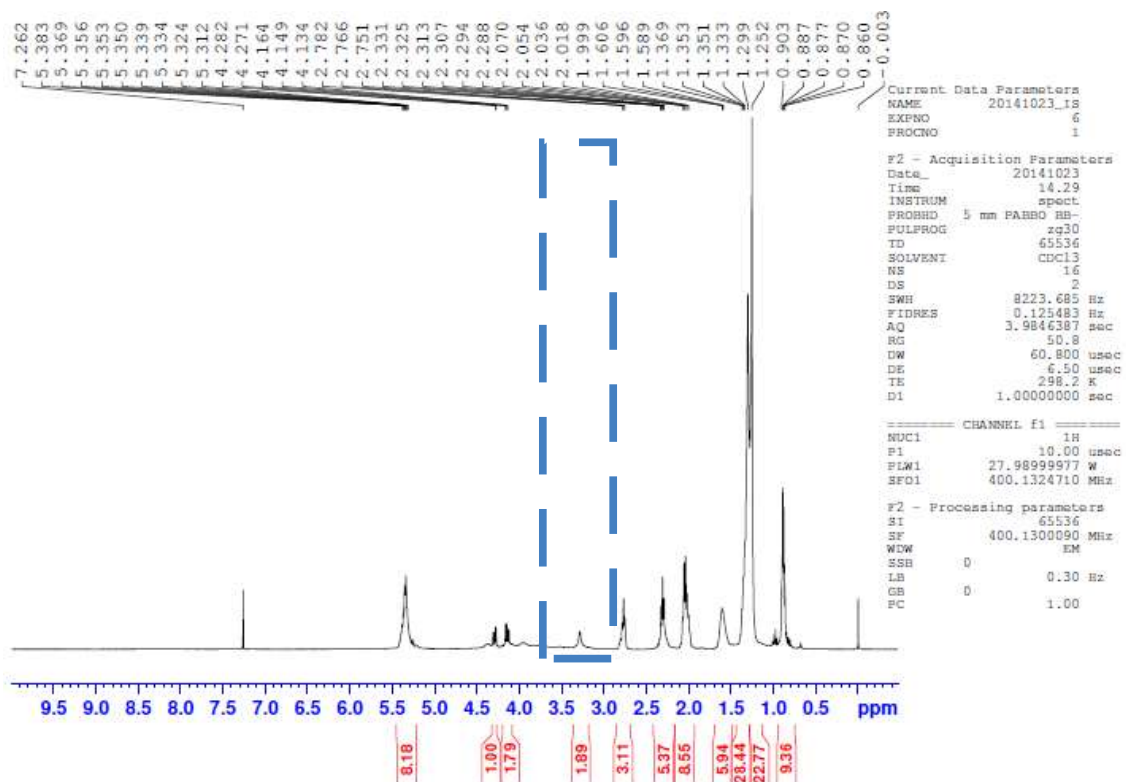
H-NMR 분석 자료의 검토는 아래 Table 45를 참고하여 진행하였으며, 그 결과 Figure. 97의 파랑 박스에서 알 수 있듯이 개발 완료된 LPC에서 인지질 중 콜린에만 함유되어 있는 N-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>- 파장 영역에서 일반 상용품과 상이한 파형을 나타냄을 확인하였다.

Table 45. Reference of <sup>1</sup>H Resonance Assignments

$\delta/\text{ppm}^a$	Integral Value <sup>b</sup>	Proton Type
0.90	5.74	$\omega\text{-CH}_3$
1.30	37.79	$(\text{CH}_2)_n$
1.60	5.76	$\beta\text{-CH}_2$
2.04	4.26	$\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2$
2.30	4.47	$\alpha\text{-CH}_2$
2.79	1.59	$=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{c}$
3.41	9.00	$\text{N}(\text{CH}_3)_3$
3.84	1.86	$\text{CH}_2\text{N}$
3.97	2.60	$\text{PO}_3\text{CH}_2$ (glycerol)
4.14	1.02	$\text{CH}_2\text{O}$ (glycerol)
4.32	1.64	$\text{CH}_2\text{O}$ (choline)
4.42	0.91	$\text{CH}_2\text{O}$ (glycerol)
5.22	1.03	CHO
5.37	2.67	HC=CH



⊕ LPC



⊕ Non-GMO Lecithin

Figure. 97. <sup>1</sup>H NMR Spectra of LPC and commercial Non-GMO Lecithin

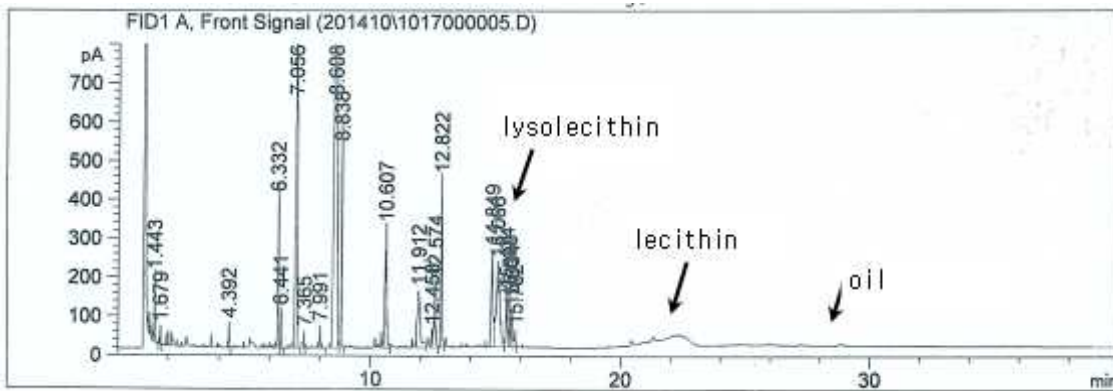


### ③ GAS CHROMATOGRAPHY 분석

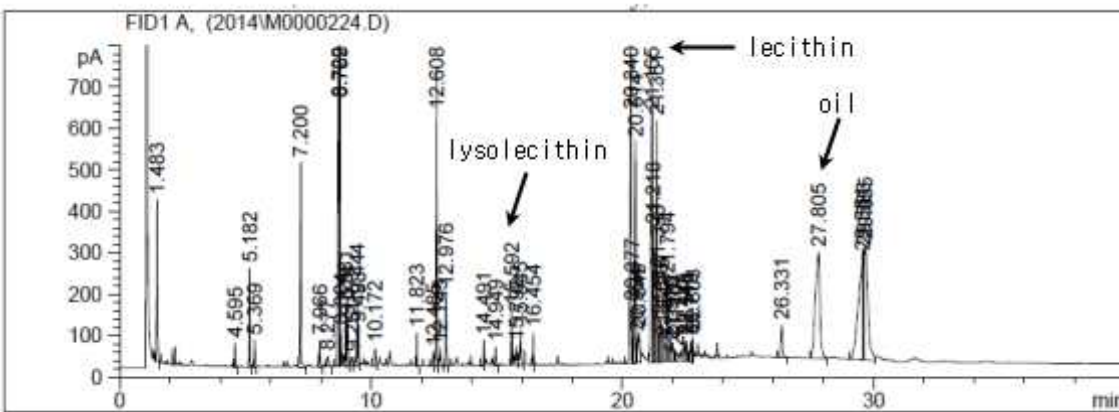
Gas Chromatography을 이용하여 함량 비교 분석을 진행한 결과, 그 성분 비교 자료는 아래 Table 46 및 Figure. 98.와 같으며, 본 연구를 통하여 제조된 LPC는 99%이상 레시틴 효소 처리가 완료된 것을 확인할 수 있었으며, 일반 상용품으로 사용되고 있는 레시틴은 Oil이 27%이상 혼합되어 있음을 확인하였다.

표 16. Compare Component of LPC and commercial Non-GMO Lecithin.

Sample	Component(%)		
	Lecithin	Lysolecithin	Oil
LPC	-	15	-
Non-GMO Lecithin	36.4	3.8	27.4



#### ㉞ LPC



#### ㉞ Non-GMO Lecithin

Figure. 98. Chromatograph of LPC and commercial Non-GMO Lecithin

(나) 기능성 PC 적용 제품의 Bulk-Scale 생산 체계 구축

① Pilot Scale에서의 기능성 PC 합성 실험



실험실 규모의 연속식 효소반응 시스템을 이용하여 acidolysis를 통한 원료 PC로부터 *n-3* PUFA가 결합된 PC를 생산하는 최적 조건을 주관 연구기관인 고려대에서 전달 받아, 아래 Figure. 99.과 같이 500배 크기로 증가된 대용량 반응을 주관 연구기관에서 고정화한 phospholipase A1 고정화 효소를 사용하여 기질내 최적 수분 함량 1.0%(w/w), 최적 반응 온도는 55°C, 최적 기질의 물 비율은 1:8(PC:지방산)로 선정하여 제2세부 (주: 일신웰스)에서 실시하였다. 반응 시스템은 Figure 100과 같았다. 사용한 원료는 인도 Lasenor Charbhujia Foods pvt ltd.의 PC를 사용하였다.



Figure. 99. Bulk scale reaction system for production of Reconstituted phospholipid by enzymatic esterification.

인지질(phosphatidylcholine, PC)과 DHA 함유 지방산을 55°C,에서 각각 녹여 물 비율은 1:8(PC:지방산)으로 반응 원료를 제조한 후 Karl Fisher를 통하여 수분 함량을 측정하여 적정 수준(1%)임을 확인한 후 phospholipase A1 고정화 효소를 투입하여 250rpm에서 교반시켜 6시간 동안 반응시킨 후 합성물을 측정하였다. 이 때 반응물 내 기능성 PC 수율 증대를 위하여 5 Torr 이하의 진공 조건을 제공하는 것이 중요하였다. 아래 Figure. 100와 같이 반응 시간에 따른 기능성PC 생성 변화에 대해 확인 하였다.

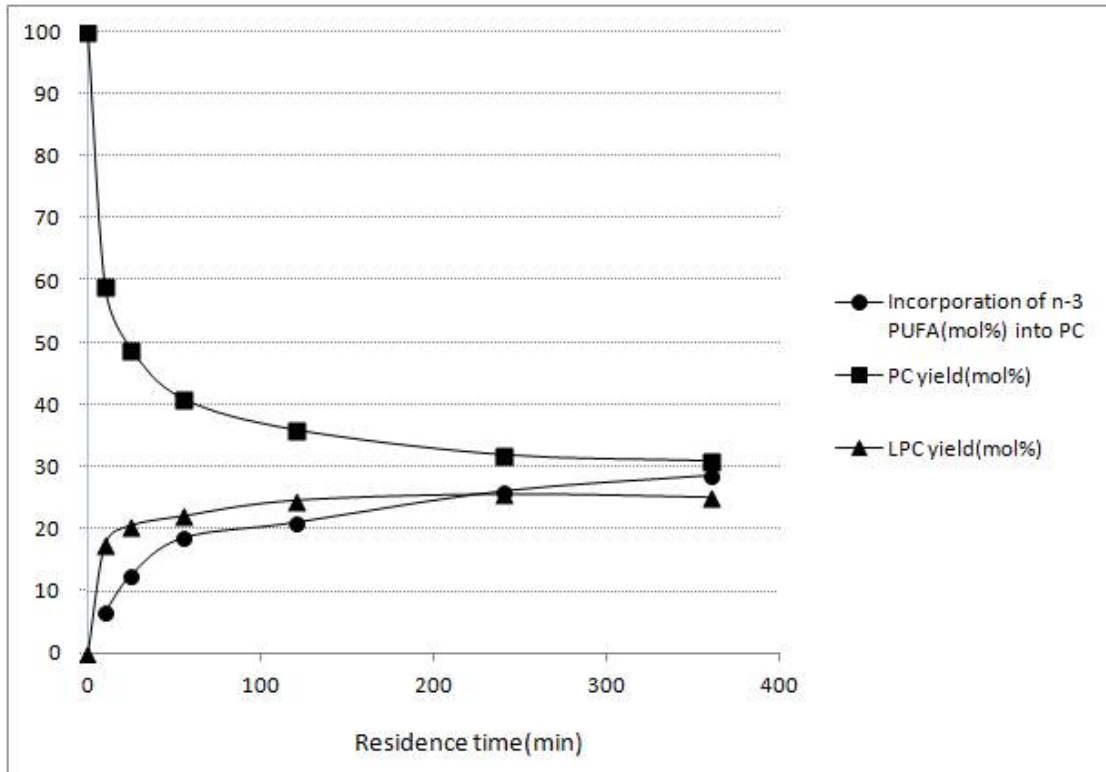


Figure. 100. Profile of PC to fatty acid on incorporation of *n-3* polyunsaturated fatty acid (PUFA) into phosphatidylcholine(PC) as a function of residence time. This experiments were conducted at 55°C and 1.0% water content using immobilized phospholipase A1 under 5 Torr Vacuum conditions.

② Pilot Scale에서의 기능성 PC 합성물의 정제 실험

위 반응산물에서 미반응 지방산 및 반응 중 분해되어 생성된 유리 지방산을 제거하기 위하여 낮은 온도에서 높은 진공도를 제공하는 증류탑 설비를 사용하여 유기용매를 사용하지 않는 조건에서 최종 기능성 PC제품의 비교적 낮은 산가(40 이하)를 얻을 수 있었다. 위 반응산물은 일반 유지 제품보다 높은 점도를 가진 액체의 표면적을 확보할 수 있도록 증류탑 내부 Packing Material을 설계된 증류탑으로 정제를 하게 될 경우 초기 산가 120~140의 높은 지방산 함량이 처리 이후에는 잔류 산가 30~40 정도로 기존 Lyso-Lecithin 정도의 품질을 나타냄을 확인하였다. 이와 같은 증류탑을 이용하여 잔류 지방산을 제거하는 방법은 초임계 이산화탄소를 사용하는 초임계 추출 방법 및 디클로로메탄 등 유기용매를 사용하는 Liquid-Liquid Fractionation 방법을 각각 단독 또는 혼용하여 정제하는 방법에 비해 좀더 간편하게 지방산을 제거할 수 있는 방법임을 확인 할 수 있었다. 아래 Figure. 101와 같이 증류탑을 사용하였는데, 증류탑 조건은 투입유량 1.4L/hr 일 때 진공도 0.1 Torr, 140°C 온도 조건에서 수행하였다.



Figure. 101. Distillation Tower within Optimized Packing Material for Purification of Medium Viscosity Lecithin

위와 같은 공정을 거쳐 아래 Table 47과 같은 품질을 가진 Bulk Scale의 시제품을 획득하였고 시제품에 대해 식품첨가물 공전상 규격 중 산가, 아세톤불용물, 과산화물가, 구성지방산 및 수분 등에 대해 분석을 진행하였다.

Table 47. Analysis of Bulk-Scale functional phosphatidylcholine

항목	단위	분석결과	분석법
Acetone Insoluble	%	95.5	AOCS Ja 4-46
Acid Value	mgKOH/g	31.8	AOCS Ja 6-55
Lyso-Form	%	24.2	In House Method
Moisture	%	0.7	AOCS Ja 2b-87
Peroxide Value	mEqO <sub>2</sub> /kg	2.5	AOCS 8-87
구성지방산 함량			
C16:0		4.5	
C18:0		1.5	
C18:1 n-9		8.4	
C18:2 n-6		45.8	
C18:3 n-3		4.7	
C20:0		0.6	
C20:1 n-9		0.9	
C20:5 (EPA)		7.1	

C22:5 (DPA)	6.5
C22:6 (DHA)	18.9
기타	1.1

최종 Bulk Scale의 시제품인 기능성 PC 제품의 제조 공정을 요약하면 다음과 같다.

공정명	조건	기타
합성	*사용 효소 : Immobilized Phospholipase A1 *반응 온도 : 55도 *기질 몰비 : PC : 지방산 = 1 : 8 *수분 함량 : 1.0%(w/w) *진공 조건 : 5.0Torr *교반 조건 : 250rpm *반응 시간 : 6시간	Cold Trap 온도 제어를 통한 적정량의 수분제거 중요
탈산	*Wiper System : High-Viscosity Type *투입 유량 : 1.4kg/hr *진공 조건 : 0.1Torr *공정 온도 : 120~140도	투입 산가 130~140에서 최종 30~40까지 탈산 진행

### ③ 기능성 PC의 응용 실험

레시틴은 체내의 정상적인 생리작용을 보조하는 움직임에 갖는 무한 가능성을 제공하는 기능성 소재로서 그 용도로는 화장품(보습, 유허제로서 피부 보호 및 흡수 촉진), 건강식품(지질대사 향상, 동맥경화 및 신경기능 개선) 및 의약품(고지혈증의 치료 및 의약품 보조제)에 대한 본 시제품의 적용 가능성은 크다고 생각되지만 아직 임상실험 등 효능에 대한 추가 투자가 이루어져야지만 달성가능한 분야이기에 본 과제에서는 기존 식품에 적용 하던 레시틴의 대체 효과에 대해 진행하였다.

초콜렛의 Viscosity Modification을 위해 기존에는 주로 화학합성 유화제인 PGPR(Polyglycerol Polyricinoleate)를 사용하고 있는데 본 시제품을 적용함으로써 Viscosity Modification 향상과 함께 DHA 기능성을 동시에 제공할 수 있는지를 확인하였다.

초콜렛 시료 200gdmf 비이커에 담아 70°C 오븐에서 1시간 정도 보관한 후 각 60°C, 50°C, 40°C에서 초기 점도를 측정하였고 기존 화학합성 PGPR과 기능성 PC 시제품을 각각 0.1%에서 0.5%까지 첨가하면서 각 해당 온도에서 변화되는 점도를 측정하여 비교하였다. 이에 대한 결과를 아래 Table 48 50에 표시하였다. 점도 감소율은 무첨가시 점도에서 첨가 후 점도의 차이를 백분율로 표시하였다.

즉, 점도 감소율은 (Blank 점도 - 첨가 후 점도)/Blank 점도 × 100이다.

Table 48. 60도 온도조건에서의 점도 감소율 비교

	0.1%첨가	0.2%첨가	0.3%첨가	0.4%첨가	0.5%첨가
화학합성 PGPR	22.9	36.2	40.5	44.2	52.3
기능성 PC	5.9	17.7	33.9	42.3	52.7

Table 49. 50도 온도조건에서의 점도 감소율 비교

	0.1%첨가	0.2%첨가	0.3%첨가	0.4%첨가	0.5%첨가
화학합성 PGPR	14.4	29.2	39.8	46.8	52.3
기능성 PC	16.5	27.8	38.8	50.4	58.1

Table 50. 40도 온도조건에서의 점도 감소율 비교

	0.1%첨가	0.2%첨가	0.3%첨가	0.4%첨가	0.5%첨가
화학합성 PGPR	20.1	31.9	43.8	49.0	56.8
기능성 PC	17.8	29.9	43.1	54.0	63.3

모든 온도 범위에서 투입 농도 의존적으로 기능성 PC를 첨가할수록 점도 저하의 효과가 기존 PGPR 대비 근소한 우위를 확인할 수 있었다. 첨가 효과는 낮은 온도에서 첨가량이 많아질수록 점도저하 효과는 더 있을 것으로 기대된다.

#### 다. 요약

- (1) 시판 대두레시틴 적용 분야에 각각의 개질된 레시틴이 사용되고 있는바 당 과제를 통해 도출되는 효소적 개질을 거친 대두분말 PC의 적용 가능한 분야에 대한 가능성을 확인하였다. 이에 기존 화학적 합성 유화제를 배제하고 레시틴 단독 유화 제품에 적용하여 식품 가공분야에 우선 적용한다.
- (2) 대두레시틴과 대두분말 PC의 순도 차이 이외 일반 분석에는 큰 차이가 없었다.
- (3) 초기 표면장력 저하는 대두레시틴에 비해 대두분말 PC가 우수하였다. 더불어 유화 후 초기 표면장력은 각 시판 대두레시틴 제품의 투입농도와 비례한다는 사실을 확인하였다.
- (4) Turbiscan 시험기를 이용하여 제조된 유화물을 상온(25도)에서 3일간 보관하면서 경과 시간에 따른 유화 및 분산안정성에 대한 실험을 진행한 결과, 대두레시틴을 이용한 유화물이 대두분말 PC에 비하여 유화 안정성이 우수함을 확인하였으며, 이는 대두유를 O/W 형으로 유화함에 있어 계면활성제로 이용한 대두레시틴과 대두분말 PC의 분자량에 대한 영향으로 추정된다.

- (5) 대두분말 PC와 대두레시틴의 각 동일 조건에서의 평균입도 변화에 있어 대두분말 PC는 입도의 평균직경이 크게 증가하였지만, 대두레시틴은 큰 변화가 없는 것으로 보아, 대두레시틴의 유화안정성이 대두분말 PC에 비해 크게 양호한 상태임을 확인하였다.
- (6) 시판중인 미국 Cargil社 Lyso-대두레시틴(EMULTOP IP)과 비교시 유사한 유화안정성과 유화특성을 확보한 LPC의 유화특성을 확인하였다. 이에 개질된 레시틴이 사용되고 있는 분야에 대한 적용 가능성을 확인한바 이에 대한 차년도 가공분야 개발에 우선 진행이 필요하다.
- (7) 특히, 표면장력 저하능력 평가에서 동일 표면장력 저하에 필요한 요구 농도가 시판 Lyso-대두레시틴 대비 1/100, 기능성 PC 대비 1/500의 매우 적은 투입 농도에서도 동일한 LPC의 표면저하능력을 확인할 수 있었다.
- (8) Turbiscan을 사용하여 60도 온도 조건에서의 분산안정성 평가에 있어서 초기 안정성은 시판 Lyso-대두레시틴이 기능성 PC 및 LPC에 비해 우수하였으나 2일 이상 분산안정성은 기능성 PC가 보다 우수하였다. 유화 안정성을 개선할 수 있는 방안은 LPC의 Hydrolysed 비율을 조절함과 동시에 기능성 PC와 LPC의 병행 사용 등의 최적화 조건을 찾아 충분히 극복할 수 있을 것으로 사료된다.
- (9) 시판 Lyso-대두레시틴의 평균 입도 반지름은 16.98um, 기능성 PC의 평균 입도 반지름은 28.64um, LPC의 평균 입도 반지름은 14.0um로 LPC의 평균 입도 반지름이 가장 안정적이었으나 평균 입도 분포폭은 시판 Lyso-대두레시틴 > LPC > 기능성 PC로 확인되었다.
- (10) Bulk-Scale에서 Acetone Insoluble 함량 95.5%이고 Lyso-Form 20% 이상이며 잔류 산가가 40 이하인 상품성 높은 시제품을 생산 확인 하였다.
- (11) 식품분야 중 초코렛 점도 저하 용도로 사용 시 기존 화학합성품인 PGPR 대비 동등 이상의 Viscosity Modification 효과를 확인 하였다.
- (12) 추가 지원 예산을 확보하게 된다면, 이와 관련된 효능을 확인하기 위하여 인간 뇌암세포인 SH-SY5Y세포주를 이용하여 In vitro상에서 유발된 치매 및 산화적 스트레스에 의한 세포사멸에 대한 기능성 인지질의 효능을 확인할 예정이다.
- (13) 더불어 치매 예방 효과를 보기 위하여 Alzheimer 원인으로 알려진 Amyloid  $\beta$ 를 투여하는 방식으로 SH-SY5Y의 독성에 대한 완화 정도를 확인하는 MTT Method를 이용하여 세포사멸 정도를 정량하는 In vitro 효능 실험을 진행하고자 한다.
- (14) 이와 동시에 In vivo 실험을 동시에 진행하여 당사에서 이미 전임상 효능 평가가 완료된 DHA농축유지 자료와 비교하여 경쟁제품과의 우위성을 확보하고자 한다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1. 목표달성도

#### 가. 연구개발 내용

연구목표	연구개발수행내용	달성도 (%)
<1세부> 기능성 PC의 합성 및 정제 방법 확립	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 회분식 효소반응 시스템에서 대두 PC를 원료로 하여 <math>\omega</math>-3 지방산 또는 중쇄 지방산이 결합된 기능성 PC 합성 최적 조건 확립</li> <li>2. 회분식 효소반응 시스템의 조건을 기초로 lab scale 연속식 (mini size PBR) 반응 시스템 구축 및 기능성 PC를 합성 최적 조건 확립</li> <li>3. 생산된 <math>\omega</math>-3 지방산 또는 중쇄 지방산 함유 기능성 PC 및 LPC의 분리공정 최적화               <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Countercurrent liquid/liquid 분리방법</li> <li>2) 초임계 이산화탄소를 이용한 방법</li> </ol> </li> <li>4. Bulk-scale 기능성 PC의 생산 최적화</li> <li>5. Bulk-scale 기능성 PC 및 LPC 분리공정 최적화               <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Countercurrent liquid/liquid 분리방법</li> <li>2) 초임계 이산화탄소를 이용한 방법</li> </ol> </li> </ol>	100
<2세부> 기능성 LPC의 합성 및 정제 방법 확립	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 회분식 효소반응 시스템에서 대두 PC로부터 LPC 생산의 최적화</li> <li>2. 효소 반응물로부터 LPC 및 GPC 분리정제 최적조건 확립               <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Countercurrent liquid/liquid 분리방법</li> <li>2) 초임계 이산화탄소를 이용한 방법</li> </ol> </li> <li>3. 분리된 GPC로부터 진공반응 시스템을 이용 <math>\omega</math>-3 지방산 또는 중쇄 지방산함유, 기능성 LPC를 합성의 최적 조건 확립</li> <li>4. Bulk-scale에서 LPC 및 GPC 분리 최적화               <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Countercurrent liquid/liquid 분리방법</li> <li>2) 초임계 이산화탄소를 이용한 방법</li> </ol> </li> <li>5. PC로부터 LPC의 bulk-scale 생산 최적화</li> <li>6. GPC로부터 기능성 LPC의 bulk-scale 생산 최적화</li> </ol>	100
<3세부> 기능성 PC와 LPC의 최적 활용 제품 개발	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 기능성 인지질의 기능성 활용에 최적인 제품 모델 방안 모색</li> <li>2. 1세부 및 2세부과제에서 생산된 기능성 인지질의 특성 평가</li> <li>3. 기능성 인지질을 이용한 시제품 제작 및 산업화 조건 확립</li> <li>4. 시판 중인 대두레시틴 대비 유화특성 비교 자료 확보</li> </ol>	100

## 2. 관련분야에의 기여도

### 가. 활용방안

- (1) 기능성 PC 또는 PC로부터 생산된 LPC 또는 GPC로부터 생산된 기능성 LPC는 기능성 식품으로서 의미가 있다.
- (2) 기능성 PC 또는 PC로부터 생산된 LPC 또는 GPC로부터 생산된 기능성 LPC는 양매성에 의하여 화장품이나 식품의 유화제로서 활용 가치가 있다.
- (3) 본 연구에서 재료로서의 PC와 LPC외에도 산업적으로 활용방안까지 모색하고자 하므로 중소기업의 산업 발전에 기여할 수 있다.

### 나. 기대성과

- (1) 유지의 탈검 과정에서 버려지는 인지질을 고부가가치 상품으로 활용할 수 있다.
- (2) 기능성 인지질의 생리적 기능성은 물론 유화제로서의 활용가치가 높다.
- (3) 자연친화적인 원료와 생산 방법을 원하는 현시대의 경향에 부합된다.
- (4) 본 연구는 효소를 이용하여 기능성 인지질을 합성하는 연구로서 고부가가치 산업으로 의미가 있다.



## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 1. 논문 및 학술발표 실적

가. 논문 : 2건

나. 학술발표 : 6건 (국외: 4건, 국내 2건)

구분	논문명	잡지 또는 학회명
논문 (SCI)	Immobilized phospholipase A1-catalyzed modification of phosphatidylcholine with <i>n</i> -3 polyunsaturated fatty acid (Published)	Food chemistry
논문 (SCI)	Modeling and Optimization of Phospholipase A1-Catalyzed Hydrolysis of Phosphatidylcholine Using Response Surface Methodology for Lysophosphatidylcholine Production (In press)	Biotechnology Progress
학술대회 (국외)	Optimization of Phospholipase A1 Catalyzed Hydrolysis of Phosphatidylcholine for Producing Lysophosphatidylcholine by Response Surface Methodology	104th AOCS annual meeting (2013)
학술대회 (국외)	Enzymatic Modification of Phosphatidylcholine with <i>n</i> -3 Polyunsaturated Fatty Acid using Immobilized Phospholipase A1	104th AOCS annual meeting (2013)
학술대회 (국외)	Immobilized phospholipase A1-catalyzed modification	1st Asian Conference on Oleo Science
학술대회 (국외)	Phospholipase A1-Catalyzed Production of Lysophosphatidylcholine and Glycerolphosphorylcholine from Soy Phosphatidylcholine	10th International Symposium on Biocatalysis and Agricultural Biotechnology
학술대회 (국내)	Modeling and Optimization of Phospholipase A1-Catalyzed Production of Soy sn-1-Lysophosphatidylcholine by Response Surface Methodology	2013년도 한국식품영양과학회
학술대회 (국내)	Modeling and Optimization of Phospholipase A1-Catalyzed Hydrolysis of Soy Phosphatidylcholine Using Response Surface Methodology for L-Alpha-Glycerolphosphorylcholine Production	2014년도 한국식품영양과학회

2. 특허 실적 : 1건

특 허 명	실적	활용방안
재구성 인지질의 합성 방법 (특허출원번호: 10-2013-0099146, 출원일: 2013년 8월 21일)	1	출원 완료

3. 연구성과 활용 : 1건 (기술이전)

기 술 명	실적	계약당사자
재구성 인지질의 합성 방법	1	고려대학교 산학협력단 (주) 일신웰스

4. 논문 및 학술발표 증빙자료  
가. 논문 증빙자료



## Immobilized phospholipase A1-catalyzed modification of phosphatidylcholine with *n*-3 polyunsaturated fatty acid



TingTing Zhao<sup>a,c,1</sup>, Da Som No<sup>a,c,1</sup>, Byung Hee Kim<sup>b</sup>, Hugo S. Garcia<sup>c</sup>, Yangha Kim<sup>d</sup>, In-Hwan Kim<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Food and Nutrition, Korea University, Seoul 136-703, Republic of Korea

<sup>b</sup>Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University, Anseong 456-756, Republic of Korea

<sup>c</sup>UNIDA, Instituto Tecnológico de Veracruz, Veracruz, Ver. 91857, Mexico

<sup>d</sup>Department of Nutritional Science and Food Management, Ewha Womans University, Seoul 120-749, Republic of Korea

<sup>\*</sup>Department of Public Health Sciences, Graduate School, Korea University, Seoul 136-703, Republic of Korea

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 19 August 2013

Received in revised form 24 December 2013

Accepted 5 February 2014

Available online 14 February 2014

#### Keywords:

Acidolysis

*n*-3 Polyunsaturated fatty acid

Phosphatidylcholine

Phospholipase A1

Vacuum

### ABSTRACT

*n*-3 Polyunsaturated fatty acids (*n*-3 PUFA)-enriched phosphatidylcholine (PC) was successfully produced with fatty acid from fish oil and PC from soybean by immobilized phospholipase A1-catalyzed acidolysis. Detailed studies of immobilization were carried out and Lewatit VP OC 1600 was selected as a carrier for preparation of immobilized phospholipase A1, which was used for modification of PC by acidolysis. For acidolysis of PC with *n*-3 PUFA, the effects of several parameters, namely, water content, temperature, and enzyme loading on the reaction time course were investigated to determine optimum conditions. The optimum water content, temperature, and enzyme loading were 1.0%, 55 °C, and 20%, respectively. The highest incorporation (57.4 mol%) of *n*-3 PUFA into PC was obtained at 24 h and the yield of PC was 16.7 mol%. The yield of PC increased significantly by application of vacuum, even though a slight decrease of *n*-3 PUFA incorporation was observed.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Phospholipids (PLs) are major constituents of cell membranes and play crucial roles in the biochemistry and physiology of the cell (Kidđ & Head, 2005). PLs have been widely used in food, pharmaceutical, and cosmetic products as highly efficient emulsifiers.

In recent decades, *n*-3 polyunsaturated fatty acid (*n*-3 PUFA), especially eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) have received significant scientific attention because of their health benefits, which include improvement of immune function and prevention of heart disease and cancer (Khandelwal et al., 2013; Kumpfka, 2012; Kromhout, Bosschieter, & de Lezenne Goulander, 1985; Larson, Kumlin, Ingelman-Sundberg, & Wolk, 2004). Consumption of *n*-3 PUFA has also been reported to provide important benefits with respect to functioning of the brain and retina, as well as accelerating the growth of preterm baby (Carlson, Werkman, Peoples, Cooke, & Tolley, 1993; Lanting, Fidler, Huisman, Touwen, & Boersma, 1994; Neuringer, Connor, Van Petten, &

Barstad, 1994). Long-chain *n*-3 PUFAs are characteristic of marine oils and occur pervasively in the PLs of fish and marine species, with EPA and DHA commonly accounting for up to 50% of their fatty acid constituents (Haraldsson & Thorarensen, 1999). The presence of long-chain and low-melting PUFA is believed to add fluidity and mobility to cell membranes and thus, they adjust membrane integrity and function properly in lower ambient temperatures (Haraldsson & Thorarensen, 1999). In addition, fatty acids are more easily absorbed in the body as PL than as the corresponding triacylglycerols (TAGs) or ethyl esters (Galli et al., 1992). Because of the positive influence of *n*-3 PUFAs on human health, there is a growing demand for them in the pharmaceutical industry in a PL form as well as their natural TAG form (Carlson, 1991). Le maitre-Delaunay et al. (1999) have provided evidence for higher bioavailability of DHA for incorporation into erythrocytes in human adults when DHA is provided in PL rather than in TAG. Wijendran et al. (2002) also reported that PL were about 2.1-fold more effective than TAG as substrates for accretion of brain arachidonic acid in the development of neonatal primate brain.

Although PLs containing *n*-3 PUFA is available in fish and marine products, refinement procedures, including laborious extraction and separation, are required for it to be used industrially. Thus, enzymatic modification using inexpensive plant lecithin

\* Corresponding author at: Department of Food and Nutrition, Korea University, Jeongneung-dong, Seongbuk-Gu, Seoul 136-703, Republic of Korea. Tel.: +82 2 940 2855; fax: +82 2 940 7825.

E-mail address: [ihkim@korea.ac.kr](mailto:ihkim@korea.ac.kr) (I.-H. Kim).

<sup>1</sup> TingTing Zhao and Da Som No contributed equally to this research.

## Modeling and Optimization of Phospholipase A<sub>1</sub>-Catalyzed Hydrolysis of Phosphatidylcholine Using Response Surface Methodology for Lysophosphatidylcholine Production

Chang Wan Lim and Byung Hee Kim

Dept. of Food Science and Technology, Chung-Ang University, Anseong 456-756, Republic of Korea

In-Hwan Kim

Dept. of Food and Nutrition, Korea University, Seoul 136-703, Republic of Korea

Moon-Won Lee

Research Center, ILSHINWELLS Co. Ltd., Cheongwon 363-890, Republic of Korea

DOI 10.1002/btpr.2009

Published online 00 Month 2014 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

*Modeling the phospholipase A<sub>1</sub> (PLA<sub>1</sub>)-catalyzed partial hydrolysis of soy phosphatidylcholine (PC) in hexane for the production of lysophosphatidylcholine (LPC) and optimizing the reaction conditions using response surface methodology were described. The reaction was performed with 4 g of PC in a stirred batch reactor using a commercial PLA<sub>1</sub> (Lecitase Ultra) as the biocatalyst. The effects of temperature, reaction time, water content, and enzyme loading on LPC and glycerylphosphorylcholine (GPC) content in the reaction products were elucidated using the models established. Optimal reaction conditions for maximizing the LPC content while suppressing acyl migration, which causes GPC formation, were as follows: temperature, 60°C; reaction time, 3 h; water content, 10% of PC; and enzyme loading, 1% of PC. When the reaction was conducted with 40 g of PC under these conditions, the reaction products contained 83.7 mol % LPC and were free of GPC. LPC had a higher total unsaturated fatty acid content than original PC had and was mainly composed of linoleic acid (78.0 mol % of the total fatty acids). © 2014 American Institute of Chemical Engineers Biotechnol. Prog., 000:000–000, 2014*

*Keywords:* lysophosphatidylcholine, phospholipase A<sub>1</sub>, hydrolysis, acyl migration, response surface methodology

### Introduction

Lysophosphatidylcholine (LPC) is a derivative of phosphatidylcholine (PC) in which one of two acyl chains is removed. *sn*-1-LPC maintains the acyl chain at the *sn*-2 position of the glycerol backbone, whereas *sn*-2-LPC is acylated only at the *sn*-1 position. Compared with PC, LPC has enhanced oil-in-water emulsifying properties and improved emulsion stability under acidic conditions and in the presence of salts.<sup>1,2</sup> LPC can also be used as a substrate for synthesizing structured PC with a desired fatty acid profile.<sup>3</sup>

LPC is prepared enzymatically in two main ways. Several studies have attempted to synthesize LPC through the partial hydrolysis of PC using triacylglycerol lipases (EC 3.1.1.3)<sup>4–6</sup> and phospholipases such as phospholipase A<sub>1</sub> (EC 3.1.1.32)<sup>5,7</sup> and A<sub>2</sub> (EC 3.1.1.4)<sup>8</sup> as biocatalysts. Another approach uses the triacylglycerol lipase-catalyzed esterification of glycerylphosphorylcholine (GPC) with acyl donors.<sup>9,10</sup> LPC is industrially prepared via phospholipase A<sub>2</sub>-catalyzed hydrolysis of soy PC.<sup>2,5</sup> The resulting *sn*-2-LPC is more saturated than the

corresponding PC because in PC, saturated fatty acids are concentrated at the *sn*-1 position and unsaturated fatty acids exist predominantly at the *sn*-2 position.<sup>3</sup>

Hydrolyzing PC with phospholipase A<sub>1</sub> yields *sn*-1-LPC with increased unsaturation compared with that in *sn*-2-LPC. Furthermore, *sn*-1-LPC acts as a more efficient substrate than the *sn*-2 positional isomer for the preparation of structured PC because its *sn*-1 position can easily be modified using commercial *sn*-1,3-specific triacylglycerol lipases.

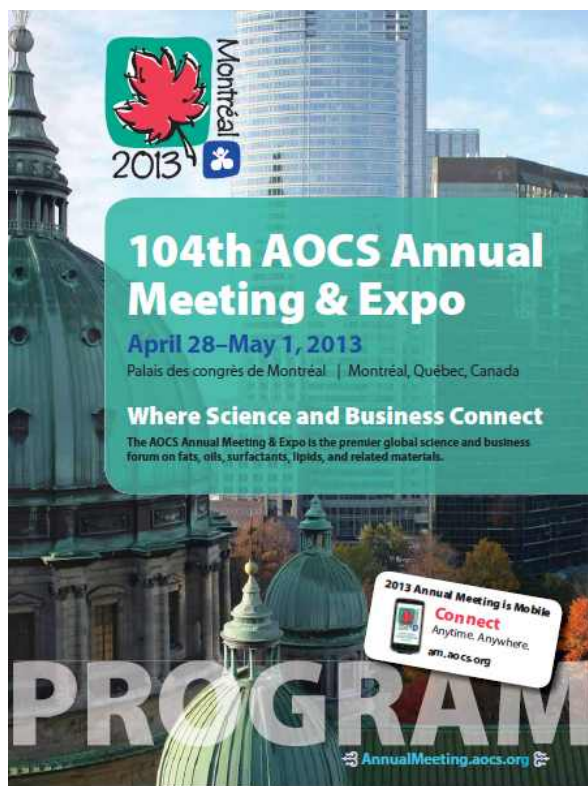
However, phospholipase A<sub>1</sub>-mediated hydrolysis of PC yields GPC as well as *sn*-1-LPC because the migration of the acyl group from the *sn*-2 position to the *sn*-1 position in LPC may occur during the reaction owing to the lower thermodynamic stability of *sn*-1-LPC compared with that of *sn*-2-LPC.<sup>11</sup> The presence of more *sn*-2-LPC results in increased formation of GPC during the reaction because the acyl group at the *sn*-1 position of LPC is hydrolyzed by phospholipase A<sub>1</sub>. Several reaction factors, such as temperature (Te), reaction time (RT), water content (WC), enzyme loading (En), and solvent polarity, are known to affect the level of acyl migration during the enzymatic hydrolysis of PC.<sup>12</sup>

In 2000, a new fungal phospholipase A<sub>1</sub> called Lecitase Ultra was developed and marketed by Novozymes

Correspondence concerning this article should be addressed to B. H. Kim at bhkim@cau.ac.kr



나. 학술발표 증빙자료



Abstracts 104<sup>th</sup> AOCs Annual Meeting & Expo April 28-May 1, 2013

activity of the enzyme systems and processes associated with these metabolic pathways.

**4. Effects of Enzymatic Interesterification on Physicochemical Properties of Blends of Palm Stearin, Palm Kernel Oil and Olive Oil to Produce Trans-Free Margarine Analogs.** Fabiana Andreia Schafer De Martini Soares<sup>1</sup>, Roberta de Silva<sup>1</sup>, Natalia Osório<sup>2</sup>, Sylvio Hares Junior<sup>3</sup>, Jessica Maruyama<sup>4</sup>, Maria Ines Gonçalves<sup>5</sup>, Suzana Ferreira-Dias<sup>6</sup>, and Luiz Gioielli<sup>1</sup>, <sup>1</sup>Instituto Superior de Alimentos, Portugal.

The consumer is becoming more aware of the relationship between diet and disease, which has driven the research on functional foods and their effects on the body. The role of fats and oils in human nutrition has been intensively studied and discussed for decades. It has been emphasized the importance of intake of omega-3, omega-6 and omega-9 fatty acids, reduction of saturated fatty acids and, more recently, control of intake of trans fatty acids. Through the blend and interesterification of oils and fats, trans-free fats can be produced. Fat blends, formulated by ternary blends of palm stearin, palm kernel oil and olive oil were modified by enzymatic interesterification. The effect of enzymatic interesterification process was determined by comparing the chemical and triacylglycerol composition and regioselective distribution of fatty acids in triacylglycerols. The enzymatic interesterification allowed obtaining fats with various degrees of plasticity, increasing the possibilities for the commercial use of palm stearin, palm kernel oil and olive oil.

**5. Enzymatic Modification of Phosphatidylcholine with n-3 Polyunsaturated Fatty Acid using Immobilized Phospholipase A1.** Ting Ting Zhao<sup>1</sup>, Min Young Kim<sup>2</sup>, Da Som No<sup>3</sup>, Byung Hee Kim<sup>4</sup>, Moon Won Lee<sup>5</sup>, In-Hwan Kim<sup>6</sup>, Korea University, Republic of Korea; <sup>2</sup>Chung-Ang University, Republic of Korea; <sup>3</sup>LDHINWELLS, Republic of Korea.

Phosphatidylcholine (PC) was successfully modified by acidolysis of PC with n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA) obtained from fish oil using an immobilized phospholipase-A1 from *Thermomyces lanuginosus*/*Plasmodium oviparum* as a biocatalyst. Effect of several parameters such as water content, temperature, and enzyme loading were studied to determine the optimum conditions for the acidolysis reaction at the molar ratio of 1:8 (PC to fatty acid). Throughout all the reactions, an inverse relationship between

incorporation of n-3 PUFA and PC recovery was observed. Optimum conditions of initial water content, temperature, and enzyme loading were 1%, 35 °C, and 20%, respectively. Under these conditions, the highest incorporation (57 mol%) of n-3 PUFA into PC was obtained and the yield of PC was 16 mol% at 24 hr of reaction time. Vacuum system was applied after 3 and 9 hr of reaction time under atmospheric pressure to enhance the yield of PC. Under vacuum, incorporation of n-3 PUFA into PC decreased slightly, but yield of PC increased significantly as the reaction time increased.

**6. Synthesis of Structured Triacylglycerols rich in n-3 PUFA by Acidolysis of Soybean Oil Using Native Lipases.** Patricia Canelho<sup>1</sup>, Maria Eliza de Araújo<sup>2</sup>, Yollanda Franco<sup>3</sup>, Debora Pazinato<sup>4</sup>, Ildeneize Cunha<sup>5</sup>, and Iara Tescanollo<sup>6</sup>, <sup>1</sup>USF São Francisco University, Brazil; <sup>2</sup>UNICAMP, Brazil.

Structured triacylglycerols (STAGs) by incorporation of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) into soybean oil for nutraceutical purposes catalyzed by native lipases (*Aspergillus niger*-AN and *Rhizopus javanicus*-RJ) were obtained by acidolysis of soybean oil with a free fatty acid mixture obtained from sardine oil (sardine-FA). First, different lipase/support ratios were tested for the immobilization of lipases, and the best results were obtained with ratios of 1:4 (w/w) for lipase AN and 1:7 (w/w) for RJ using Amberlite MB-1. Both lipases were stable for at least 3 days in the operational conditions and maintained constant activity for 2 months in the storage conditions (5 °C). A fractional experimental design was carried out to study the effect of different parameters on STAG production for each lipase. Easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry (EASIMS) was used for instantaneous characterization of STAGs. STAGs with 6.2 - 11.7 % of EPA + DHA were obtained, leading to a significant reduction in the n-6/n-3 FA ratio of soybean oil. The *Aspergillus niger* lipase was the most effective in concentrating n-3 PUFA. The best reaction conditions to achieve an adequate n-6/n-3 FA ratio were: initial water content of the enzyme of 0.8 % (w/w), sardine-FA:soybean oil mole ratio of 3:1, reaction time of 24 h, reaction temperature of 40 °C and 7 % of lipase (w/w). After the enzymatic reaction, a great variety of new STAGs were formed containing EPA, DHA or both in the same molecule.

2



O7-1

**Production of biodiesel using blended alcohol as an acyl acceptor  
via enzymatic reaction**

In-Hwan Kim<sup>1,2</sup>, TingTing Zhao<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Food & Nutrition, Korea University, Seoul 136-703, Republic of Korea,

<sup>2</sup>BK21PLUS Program in Embodiment: Health-Society Interaction, Department of  
Public Health Sciences, Graduate School, Korea University, Seoul 136-703,  
Republic of Korea

As a novel strategy, blended alcohols consisting of methanol and ethanol were used as acyl acceptors for biodiesel synthesis from soybean oil by lipase-catalyzed transesterification. Based on enzyme screening, Novozym 435 from *Candida antarctica* was selected for the reaction. The effects of the molar proportion of methanol in the blended alcohol, temperature, and enzyme loading were investigated for optimization of the reaction. In addition, the relative consumption rates of methanol and ethanol during the transesterification were studied. Among six proportions tested, 0 (100 mol% ethanol), 20, 40, and 60 mol% methanol in the blended alcohols exhibited high yields of biodiesel. For the optimum temperature, 30 °C was selected. The highest yield of biodiesel, over 95 wt%, was obtained at an enzyme loading of 5–10 wt% loading. In the lipase-catalyzed transesterification, the reactivity of methanol was significantly higher than that of ethanol.





2014 International Symposium and Annual Meeting

# Lifelong Health and Wellness from Nutrition and Food

Oct. 27 ~ Oct. 29, 2014

Daejeon Convention Center, Daejeon, Korea

Gold Sponsor **DAESANG** 대성주식회사

Sponsored by

한국지리대사(주)농업진흥청

농촌진흥청

DOJME 대한미업협회

농협

KGC인삼공사

서울대학교

JNIR 한국농업생명과학연구원

BTR Biotech

유림

신일바이오

진주대학교

신원대학교

대림대학교

GBRI

한국과학기술원

한국과학기술원

한국과학기술원

한국과학기술원

한국과학기술원

Amway

NOVAREX

BTC

한국과학기술원

한국과학기술원

한국과학기술원

한국과학기술원

순천대학교

한국과학기술원

한국과학기술원

한국과학기술원

한국과학기술원

**KFN** The Korean Society of Food Science and Nutrition

moderation of microbial lipogenesis activity and better flavor-retaining viable components such as hexenal, hexanal, and pentanal in SPI were found after the microwave heating and enzymatic treatments. The degree of hydrolysis, retention capacity and stability, DPPH radical scavenging activity, and superoxide radical scavenging activity of SPI were significantly increased, but the magnitude of apparent viscosity, osmolarity index, and dynamic moduli ( $G'$ ,  $G''$ ) for SPI were significantly decreased after combined the heating and enzymatic treatments. Based on the results, it was suggested that the enzymatic hydrolysis in combination with high temperature can promote the release of better flavor-retaining SPI hydrolysates with superior emulsifying and antioxidant functionalities.

**P01-34**  
**Improvement of quality and activity of traditional rice cake added with stabilized rice bran and resistant starch mixture by steam milling**  
Chen Zhang, Malabik Kim, Department of Food and Nutrition, Chonnam National University

This study was conducted to develop the optimum mixing ratio of a functional high fiber, low calorie rice cake added the rice bran resistant starch. The product of this study were to improve the composite recipe by mixing stabilized rice bran (SRB), resistant starch (RS4) rice cake. In preparation of rice cake (control), the three independent variables selected for the (RS) experiment were rice bran (percentage (OK)), cross-linked resistant starch (RS) percentage (CL%), sample moisture contents (X%), while the dependent variables (response variables) were color, viscosity, and sensory evaluation, preference score. Each variable was coded at three levels, -1, 0 and +1 and was optimized at three levels. The same dependent parameters. The moisture content of stabilized rice bran (SRB), white rice flour, brown rice flour, and resistant starch (RS4) were 14.3, 9.0, 11.2, and 11.1%, respectively. The amino acid and mineral composition of SRB showed the highest values of glutamic acid, aspartic acid, Mg, and K. The fatty acid was the highest in rice bran, especially linoleic acid and linoleic acid. The lightness (L) values of carbohydrates decreased with increasing SRB contents. While L value increased with increasing RS4 contents. The hardness of carbohydrates increased with increasing RS4 addition, whereas decreased with increasing SRB addition. There was increasing RS4 can extend the storage period. Increasing RS4 of carbohydrates certainly gave the effects of inhibiting total acid number, while increasing RS4 of carbohydrates increasing total acid number, because it has high molecular and water-binding capacity.

**P01-35**  
**Physicochemical Irradiation of Fresh Fruits to Replace Methyl Bromide**  
Hafiz Muhammad Shahbaz, Jae-Jun Ahn, Kazuki Akman, Jeong-Ho Kwon, School of Food Science & Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu 702-702, Korea

Physicochemical treatment is an official procedure applied to fresh agricultural produce to prevent migration of potentially damaging insect pests to new territories. The implementation of insecticides as a phytosanitary treatment in fresh fruits has emerged as an environmental reality over the past 30 years. This sector is an environmentally safe to replace methyl bromide chemical fumigants, which is an ozone-depleting substance. Latest statistics have shown that installation of phytosanitary irradiation facilities and incremental trade of irradiated fruits has significantly increased. However, it is important to determine appropriate phytosanitary irradiation doses and establish consumer accep-

tance. Physicochemical fruits have high risk of substitution with pests that exist in the international trade. The effect of different gamma-irradiation doses (0, 0.1, 1, 2 kGy) on the chemical and sensory quality of fresh persimmon fruits was investigated. In general, gamma irradiation up to 1 kGy didn't affect the chemical and sensory quality in fruit. Total soluble solids, titratable acidity, and pH values of juice from fruits treated unaffected up to 1 kGy irradiation. The juice from fruits treated with 0.1 and 1 kGy were found among the sensory quality compared that of non control and 2 kGy irradiated fruits. Results-based information about the application of specified irradiation doses would be useful to enhance the marketing and consumer acceptance of fresh fruits.

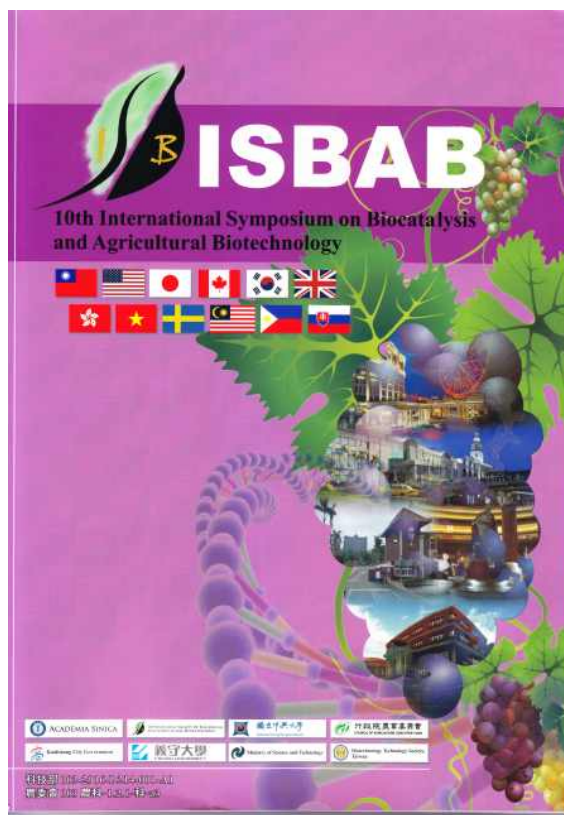
**P01-36**  
**Mixing and Optimization of Phospholipase A<sub>2</sub>-Catalyzed Hydrolysis of Soy Phosphatidylcholine Using Response Surface Methodology for L-α-Glycerolphosphorylcholine Production**  
Hyo-Jung Park, Je-Hwan Kim, Byung-Ho Kim, Department of Food Science and Technology, Chang-An University, Anseong 375-706, Korea, Department of Food and Nutrition, Korea University, Seoul 136-703, Korea

L-α-Glycerolphosphorylcholine (L-α-GPC) have isolated for the treatment of stroke and dementia. It can also be used as a substrate for synthesizing saturated phosphatidylcholine (PC) and lysophosphatidylcholine with a desired fatty acid profile. The aim of this study was to model the phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) catalyzed hydrolysis of soy PC for the production of L-α-GPC and to determine the reaction conditions using response surface methodology. The hydrolysis reaction was performed in a stirred batch reactor using a saturated PLA<sub>2</sub> (Lytase 100) as the biocatalyst. Reaction media containing lecithin and water were employed for the reaction. The effects of temperature, reaction time, water content, and enzyme loading on L-α-GPC content in the reaction products were studied using the model established. Optimal conditions for completely hydrolyze PC to L-α-GPC were: temperature, 50°C; reaction time, 30 h; water content, 10% of PC; and enzyme loading, 10% of PC. The results indicate that the use of bilobal acid (because its water ratio, 58.1% by volume) increased the productivity of L-α-GPC (0.213 g per reaction media 100 mL) compared to soybean phospholipids media used in the published studies. Our findings would help the development of possible and feasible industrial production process of L-α-GPC using *Lytase 100* as the biocatalyst.

**P01-37**  
**영양미생물과 분기미생물의 효능을 비교 사 무채류 첨가 이화학적 특성에 미치는 영향**  
김기현, 김용근, 김기수, 황재민, 박영희, 이창영, 충청남도농업기술원 사농연구소

인간이농물과 가공이농물이 많은 유통과농물 소비가능성을 위한 여러 미생물 추가사용을 평가하기 위한 실험으로 효능을 각종 배양을 측정하여 무 첨입을 평가하였다. 유통과농물은 건조물 30% 까지 광물 염분이 과부여 당도가 높을 특성을 가지고 있으며, 균의 외포자층은 건조물농도가 약 10% 가장 고인 것이 밝혀진 바가 있으며, 일부 균이농물과 달리 건조에 견디지 않고 건조된 시간이 단기간에 유통의 용이 특이한 특성을 보여준 것이었다. 균이 농의 배양방법은 온도조절이 가능하도록 전향된 평가방법을 사용 해보았으며, 수분조절 및 건조를 위하여 건조의 방법과 건조물 함량을 조사하였다. 또한 효력을 비교 사 무채류 및 미생물 첨입을 위해 평가방법의 스태인비스 균계에 무채류(밀, 콩, 대두, 제빵용)를 추가 하는 실험을 20°C에서 20일간 실시하여 효능의 차이와 이화학적 특성 및 영양학적 성분 함량을 조사하였다. 무채류 첨가는 건조수입 과정에서 곡자농도 및 수분수도 변화 되었





### Phospholipase A<sub>1</sub>-Catalyzed Production of Lysophosphatidylcholine and Glycerolphosphorylcholine from Soy Phosphatidylcholine

Byung Hee Kim\*

Chung-Ang University, Anseong, Republic of Korea.

\*Corresponding Author: Byung Hee Kim, bhkim@cau.ac.kr

Lysophosphatidylcholine (LPC) and glycerolphosphorylcholine (GPC) are derivatives of phosphatidylcholine (PC) in which either one and both of two acyl chains are removed, respectively. LPC is an effective emulsifier in oil-in-water emulsion system. GPC may have potential for the treatment of Alzheimer's disease and dementia. Both can also be used as substrates for synthesizing structured PC with a desired fatty acid profile. The aims of this study were to model the phospholipase A<sub>1</sub>-catalyzed partial and complete hydrolysis of soy PC in hexane for the production of LPC and GPC, respectively, and to optimize the reaction conditions, respectively, using response surface methodology. The reactions were performed in a stirred batch reactor using a commercial fungal phospholipase A<sub>1</sub> (Lecitase Ultra) as the biocatalyst. The effects of temperature, reaction time, water content, and enzyme loading on LPC and GPC content in the reaction products were elucidated using the models established. Optimal conditions for maximizing the LPC content while suppressing acyl migration, which causes GPC formation, were as follows: temperature, 60 °C; reaction time, 3 h; water content, 10% of PC; and enzyme loading, 1% of PC. The products obtained under these conditions contained 9.5% PC, 90.5% LPC, and no GPC. LPC had a higher total unsaturated fatty acid content than original PC had and was mainly composed of linoleic acid (78.0 mol% of the total fatty acids). While, optimal conditions to completely hydrolyze PC to GPC were: temperature, 50 °C; reaction time, 30 h; water content, 69% of PC; and enzyme loading, 13% of PC. Because a considerable amount of free fatty acids, which were released from PC by Lecitase Ultra, remained in the reaction products, further investigations on the removal of free fatty acids are required for the development of possible industrial applications of LPC and GPC.

**Keywords:** acyl migration, glycerolphosphorylcholine, hydrolysis, lysophosphatidylcholine, phospholipase A<sub>1</sub>, response surface methodology

5. 특허 증빙자료

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2013.08.21  
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)  
 출원번호 10-2013-0099146 (접수번호 1-1-2013-0759740-00)  
 출원인명칭 고려대학교 산학협력단(2-2004-017068-0)  
 대리인성명 한양특허법인(9-2000-100005-4)  
 발명자성명 김인환 조정정 홍승인 노다승  
 발명의명칭 재구성 인지질의 합성 방법

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
 \* 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
 \* 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.  
 \* 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드  
 \* 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내  
 \* 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자격교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.  
 \* 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

6. 연구성과 활용 증빙자료

127

### 전 용 실 시 계 약 서

계약기술명 : 재구성 인지질의 합성 방법

계약당사자 : 고려대학교 산학협력단 (이하 "갑"이라 한다)  
                  (주) 일신웰스 (이하 "을"이라 한다)

계약기간 : 2014년 4월 7일 ~ 2033년 8월 21일 (특허존속만료일)

실시료 : 일금 이천팔백만원 (₩ 28,000,000)

상기 계약기술에 관하여 "갑"과 "을"은 원활한 기술이전을 수행하는데 필요한 사항에 관하여 기술실시계약(이하 "본 계약"이라 한다)을 체결한다.

2014년 4월 7일

【갑】 서울시 성북구 안암로 145 산학관  
고려대학교 산학협력단

단 장 김 상 식 (인)

발 명 자 김 인 환 (인)

담당자 : 기술사업부 이정진  
연락처 : 02-3290-5838

【을】 충청북도 청원군 강내면  
부용남이길 111-30 (주) 일신웰스

대 표 이 사 윤동훈, 한기영 (인)

담당자 : 이문원  
연락처 : 010-5509-4805

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

국의 제품생산 및 시장 현황

<출처: Enzymotec Ltd. (이스라엘)>

### 1. Soy derived phosphatidylcholine (PC): PC 80S, PC 100S

API (의약품계열) with hepato protective characteristics, Part of mixed micellar formulations, Building block of parenteral liposomes, Solubilizer for parenteral administration, Emulsifying agent, Penetration enhancer in topical formulations.

### 2. Egg phospholipids (PC 80E, PC 80E type II)

Emulsifier in parental lipid emulsion, Drug carrier system (lipophilic drug), Building block of parenteral liposomes

### 3. GPC(Glycerolphosphorylcholine; GPC 50 (powder), GPC 85 (Fluid), GPC 100 (powder))

API for treating dementia such as Alzheimer's disease and recovery after stroke

### 4. Functional Food

가. Sharp-PS®: 순도 높은 phosphatidylserine: 임상실험 결과 100-300 mg/day를 섭취하는 것이 노화에 의한 기억력 감퇴를 완화시키는데 효과가 있다 (soft gel, tablet, capsule).

나. Sharp-PS® Silver: PS와 DHA를 함께 섭취할 수 있도록 한 제품으로 인지능력 향상에 도움을 준다. 18% PS와 18% DHA의 혼합액

다. Sharp-PS® Gold: conjugated Phosphatidylserine-DHA의 형태로서 인체의 PS 구조와 유사하며, 뇌에서 DHA의 효율을 높여준다. 45% 분말과 20% 액상

라. Sharp-PS® Green: 콩에 의한 알레르기를 유발하지 않는 PS 식품이다. 60% 분말과 18% 액상

마. Sharp-GPC™ : 콩에서 제조된 순도 높은 GPC로서 인지능력 개선을 위한 기능을 가지고 있다. 미국에서는 건강보조제로서, 유럽과 남미에서는 약품으로서 Alpha-GPC가 판매되고 있다.

바. Sharp-GPC™ active: lecithin으로부터 제조된 화합물이고, 식품에 응용될 수 있다. GPE (phosphatidylethanolamine 유도체)를 함유하고 있고, 자연적인 단맛을 가지고 있으며, 수용성이다.

사. Krill Oil+: Antarctic Krill에서 추출하였고, Krill oil의 선두주자이다. Krill oil의 경우에는  $\omega$ -3 지방산이 인지질과 중성지질에 많이 결합되어 있으며, anstaxanthin과 다른 carotenoid와 같은 항산화제도 함께 존재한다.

아. Omega choline: 생선의 기름과 인지질이 포함되어있는 생물에서 추출하는 것으로  $\omega$ -3 지방산을 운반해 주는 기반이 되며, phosphatidylcholine이 풍부하다. 간과 뇌의 기능을 도와 줄 수 있다.

자. Omega sterols: EPA와 DHA의 sterol esters이다.

5. Sharp-PS®이 유럽에서 새로운 식품으로 허가

6. “2011 Global Phosphatidylserine Customer Value Enhancement Award” 수상: 매년 Frost & Sullivan에서 업체에 우수성을 인정하여 수여하는 상

## 제 7 장 연구시설·장비 현황

### 1. 회분식 반응 장치

#### 가. Water jacketed batch reactor for enzymatic reaction



#### 나. Bulk-scale batch mode reactor used for acidolysis reaction



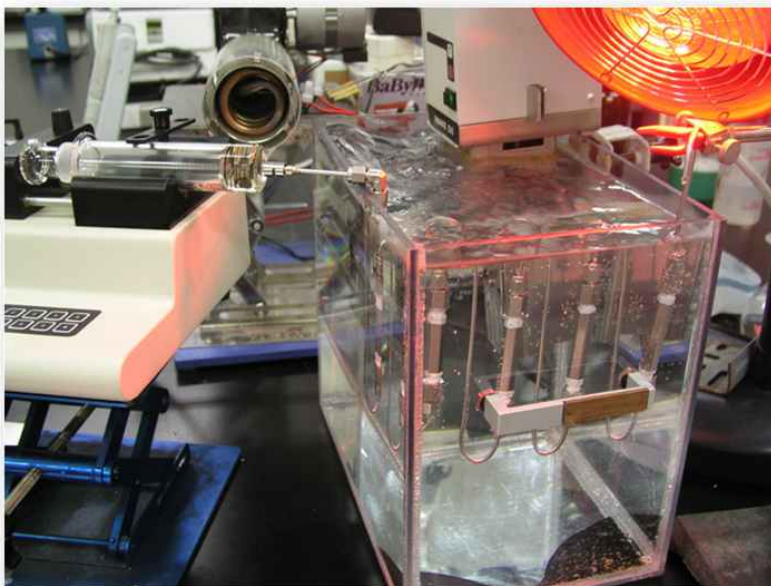


다. Pilot scale reaction system for production of Reconstituted phospholipid by enzymatic esterification

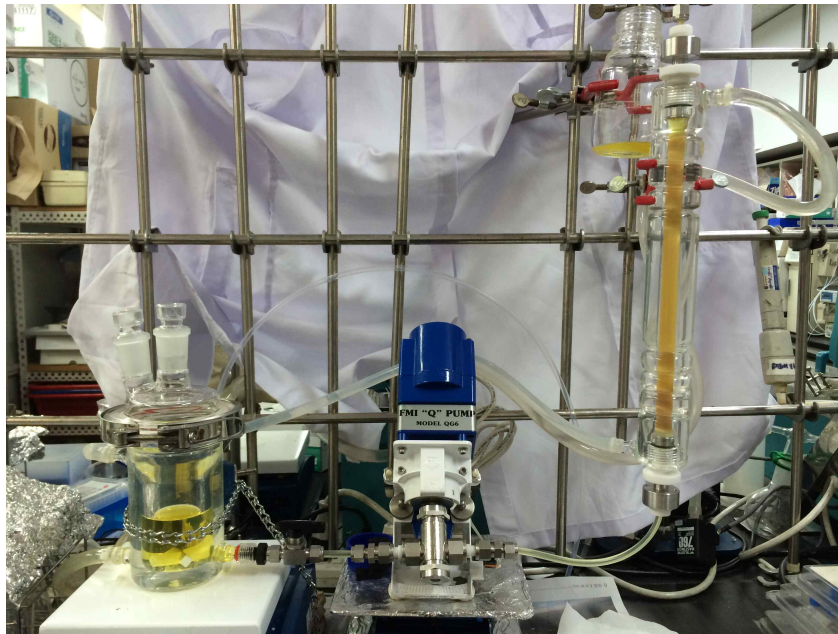


## 2. 연속식 반응 장치

가. Packed bed reactor used for acidolysis



나. Packed bed reactor used for acidolysis reaction



3. 진공장치

가. Water jacketed batch reactor for enzymatic reaction under vacuum.





- 나. Distillation tower within optimized packing material for purification of medium viscosity lecithin



#### 4. 초임계 장치

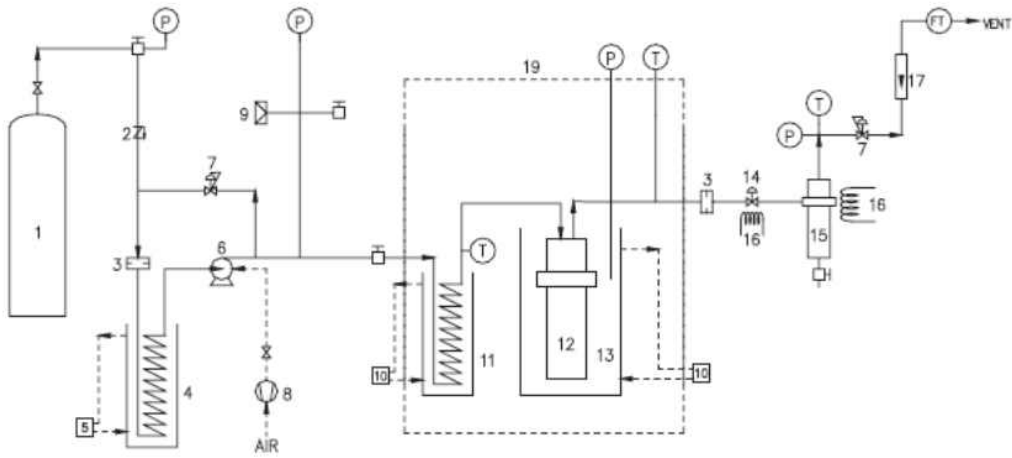
- 가. Supercritical carbon dioxide system for fatty acid extraction



나. Supercritical carbon dioxide system for fatty acid extraction II



다. Diagram for supercritical carbon dioxide extraction



1-CO<sub>2</sub> cylinder

2-check valve

3-filter

4-subcooler

5-refrigerated circulator

6-liquid pump

7-back pressure regulator

8-air compressor

9-rupture

10-heating circulator

11-preheater

12-liquid extractor

13-heating jacket

14-metering valve

15-separator

16-electric heater

17-flow meter

18-flow totalizer

19-air bath

P-pressure gauge

T-thermocouple

## 제 8 장 참고문헌

Doig, S. D., & Diks, R. M. (2003). Toolbox for exchanging constituent fatty acids in lecithins. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105(7), 359.367.

Galli, C., Sirtori, C. R., Mosconi, C., Medini, L., Gianfranceschi, G., Vaccarino, V., et al. (1992). Prolonged retention of doubly labeled phosphatidylcholine in human plasma and erythrocytes after oral administration. *Lipids*, 27(12), 1005.1012.

Garcia, H. S., Lopez-Hernandez, A., Hill, C. G., Jr., & Kim, I. H. (2008). Enrichment of lecithin with *n*-3 fatty acids by acidolysis using immobilized phospholipase A1. *Grasas y Aceites*, 59(4), 368.374.

Haraldsson, G. G., & Thorarensen, A. (1999). Preparation of phospholipids highly enriched with *n*-3 polyunsaturated fatty acids by lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(10), 1143.1149.

Hossen, M., & Hernandez, E. (2005). Enzyme-catalyzed synthesis of structured phospholipids with conjugated linoleic acid. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 107(10), 730.736.

Karabulut, I., Durmaz, G., & Hayaloglu, A. A. (2009). Fatty acid selectivity of lipases during acidolysis reaction between oleic acid and monoacid triacylglycerols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(21), 10466.10470.

Khandelwal, S., Shidhaye, R., Demonty, I., Lakshmy, R., Gupta, R., Prabhakaran, D., et al. (2013). Impact of omega-3 fatty acids and/or plant sterol supplementation on non-HDL cholesterol levels of dyslipidemic Indian adults. *Journal of Functional Foods*, 5(1), 36.43.

Kim, I. H., Garcia, H. S., & Hill, C. G. Jr., (2007). Phospholipase A1-catalyzed synthesis of phospholipids enriched in *n*-3 polyunsaturated fatty acid residues. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(5), 1130.1135.

Kim, I. H., Garcia, H. S., & Hill, C. G. Jr., (2010). Synthesis of structured phosphatidylcholine containing *n*-3 PUFA residues via acidolysis mediated by immobilized phospholipase A1. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87(11), 1293.1299.

Kim, J., & Kim, B. G. (2000). Lipase-catalyzed synthesis of lysophosphatidylcholine using organic cosolvent for in situ water activity control. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(7), 791.797.

Kim, J., Lee, C. S., Oh, J., & Kim, B. G. (2001). Production of egg yolk lysolecithin with

immobilized phospholipase A2. *Enzyme and Microbial Technology*, 29(10), 587.592.

Komprda, T. (2012). Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids as inflammationmodulating and lipid homeostasis influencing nutraceuticals: A review. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 25.38.

Larsson, S. C., Kumlin, M., Ingelman-Sundberg, M., & Wolk, A. (2004). Dietary long chain *n*-3 fatty acids for the prevention of cancer: A review of potential mechanisms. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79(6), 935.945.

Peng, L., Xu, X., Mu, H., Høy, C.-E., & Adler-Nissen, J. (2002). Production of structured phospholipids by lipase-catalyzed acidolysis: Optimization using response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(4), 523.532.

Rosu, R., Iwasaki, Y., Shimidzu, N., Doisaki, N., & Yamane, T. (1998). Enzymatic synthesis of glycerides from DHA-enriched PUFA ethyl ester by glycerolysis under vacuum. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 4(4), 191.198.

Vikbjerg, A. F., Mu, H., & Xu, X. (2005). Parameters affecting incorporation and byproduct formation during the production of structured phospholipids by lipasecatalyzed acidolysis in solvent-free system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 36(1), 14.21.

Vikbjerg, A. F., Mu, H., & Xu, X. (2007). Synthesis of structured phospholipids by immobilized phospholipase A2 catalyzed acidolysis. *Journal of Biotechnology*, 128(3), 545.554.

Virto, C., Svensson, I., & Adlercreutz, P. (1999). Enzymatic synthesis of lysophosphatidic acid and phosphatidic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, 24(10), 651.658.

Zhao, H., Lu, Z., Bie, X., Lu, F., & Liu, Z. (2007). Lipase catalyzed acidolysis of lard with capric acid in organic solvent. *Journal of Food Engineering*, 78(1), 41.46.

Van Nieuwenhuyzen W. The industrial uses of special lecithins: a review. *J Am Oil Chem Soc.* 1981;58:886-888.

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.