

발 간 등 록 번 호

11-1541000-001061-01

보안과제 ( ) 일반과제 (O)

109139-02-1

**한국산 잣으로부터 효소를 이용 피놀레닌산 함유  
기능성 유화제 개발**

(Development of functional emulsifier containing pinolenic acid (PLA) from Korean pine nut (*Pinus koraiensis*) using enzyme)

연 구 기 관

고 려 대 학 교

농 립 수 산 식 품 부



# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “한국산 잣으로부터 효소를 이용 피놀레닌산 함유 기능성 유화제 개발에 관한 연구”과제의 보고서로 제출합니다.

2011 년 4 월 9 일

주관연구기관명 : 고려대학교

주관연구책임자 : 김 인 환

세부연구책임자 : 김 인 환

연 구 원 : 홍 승 인

연 구 원 : 이 보 미

연 구 원 : 최 종 훈

연 구 원 : 조 정 정

연 구 원 : 표 영 길

연 구 원 : 김 민 영

연 구 원 : 최 나 경

협동연구기관명 : (주) 일신웰스 기술연구소

협동연구책임자 : 이 은 현

연 구 원 : 이 문 원

연 구 원 : 박 상 혁

연 구 원 : 김 남 숙





# 요 약 문

## I. 제 목

국산 잣으로부터 효소를 이용 피놀레닌산 함유 기능성 유화제 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

잣기름은 매우 독특한 형태의 지방산 소위  $\Delta$ -5 지방산이라 불리는 탄소수가 18 또는 20개인 지방산을 함유하고 있다. 이  $\Delta$ -5 지방산 그룹 중에 피놀레닌산 (pinolenic acid; 12,9,5-octadecatrienoic acid)이 주요  $\Delta$ -5 지방산으로 알려져 있다. 동물실험 모델을 통한 최근 연구에 의하면 생체 내 very low density lipoprotein (VLDL), cholesterol 함량을 낮추어 줄 뿐만 아니라, cholecystokinin (CCK)과 glucagon like peptide-1 (GLP-1)이라는 식욕 억제 호르몬 분비를 촉진 하는 것으로 보고되어 있다. 본 연구과제의 연구 목표는 첫째, 리파제 (lipase)를 이용하여 에타놀리시스 (ethanolysis) 반응을 시킴으로써 잣기름으로부터 피놀레닌산 농축물을 생산하는 것이다. 두 번째로는 리파제를 이용한 에스테르 (esterification) 반응을 통하여 피놀레닌산을 함유한 고순도 모노글리세라이드 (monoglyceride)를 생산하는 것이다. 세 번째는 이상의 기술로 생산된 고순도의 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드를 이용하여 실제 제품에 적용해 보고자 한다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

1. 에타놀리시스를 이용하여 잣기름으로부터 피놀레닌산 농축  
가. 에타놀리시스의 회분식 반응 시스템 최적화  
(1) 견과류 내 피놀레닌산 함량 비교

- (2) 피놀레닌산 농축을 위한 효소 스크리닝 (screening)
- (3) 피놀레닌산 농축을 위한 잣기름과 에탄올 (ethanol)의 몰비율 효과에 대한 조사
- (4) 피놀레닌산 농축을 위한 효소량 효과에 대한 조사
- (5) 피놀레닌산 농축을 위한 반응온도 효과에 대한 조사
- (6) 피놀레닌산 농축을 위한 수분함량 효과에 대한 조사

나. 에타놀리시스의 연속식 반응 시스템 최적화

- (1) 피놀레닌산 농축을 위한 반응온도 효과에 대한 조사
- (2) 피놀레닌산 농축을 위한 잣기름과 에탄올의 몰비율 효과에 대한 조사
- (3) 피놀레닌산 농축을 위한 기질 정체시간 (기질 주입속도) 효과에 대한 조사
- (4) 대용량 (Bulk scale)에서 피놀레닌산 농축의 효율평가

2. 기존의 방법을 이용한 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드 합성

가. 기존의 방법에 의한 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드 제조 및 농축

나. 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드의 일반 분석 실험

- (1) 산가 측정
- (2) 비누화가 측정
- (3) 과산화물가 측정
- (4) 지방산 분석
- (5) 모노글리세라이드 함량 분석
- (6) 표면장력 및 유화안정성 측정

3. 잣기름으로부터 효소적 공법을 이용한 고순도 모노글리세라이드 합성

가. 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드 생산을 위한 효소 스크리닝

나. 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드 생산을 위한 온도 효과에 대한 조사

다. 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드 생산을 위한 기질의 몰비율 효과에 대한 조사

라. 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드 생산을 위한 수분함량 효과에 대한 조사

마. 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드 생산을 위한 효소량 효과에 대한 조사

바. 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드 합성을 증대를 위한 진공 효과에 대한 조사

(1) 진공 적용 시점에 대한 설정

(2) 진공도에 따른 효과

사. 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드 합성을 증대를 위한 저온 저장 효과에 대한 조사

#### 4. 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드를 유화제로 이용한 시제품 생산

가. 마요네즈 시제품 생산

나. 두유 시제품 생산

### III. 연구개발결과

잣기름으로부터 피놀레닌산을 농축하기 위한 방법으로 효소를 이용한 에타놀리시스 반응을 사용하였고, 회분식 반응과 연속식 반응 두 가지 형태로 연구되었다. 먼저 잣 이외의 견과류에서 피놀레닌산을 얻을 수 가능성을 확인하여 잣을 포함하여 다섯 종류의 견과류에서 지방산 조성을 조사해 보았다. 그 결과 잣에서만 피놀레닌산이 검출되어 잣기름만이 최종 시료로 확정되었다. 에타놀리시스 반응은 효소 선정에서부터 반응 온도, 기질의 물비율, 효소량, 수분 함량 등의 다양한 변수에서 연구되었으며, 각 변수들에서 피놀레닌산을 농축하기 위한 최적 조건을 찾고자 하였다. 효소를 선정하기 위해서는 3종의 고정화 효소가 실험 대상이 되었으며, 그 중 *Candida antartica*에서 추출된 Novozym 435가 선정되었다. 회분식 반응 시스템에서 피놀레닌산을 농축하는 것은 잣기름과 에탄올을 1:80의 물비율로 사용하면서 35°C에서 기질량 대비 10%의 효소를 첨가하고 반응물의 수분함량이 250 ppm로 맞춰졌을 때가 최적 조건이었다. 연속식 반응 시스템인 Packed bed reactor (PBR)에서의 최적 조건은 잣기름과 에탄올이 1:75의 물비율이고, 반응온도 45°C, 반응기에 체류하는 시간이 3분일 때이었다. 연속식 반응의 결과와 회분식 반응의 결과가 유의적 차이를 보이지도 않고 연속식 반응 중에서도 소규모와 대규모 사이에 결과의 유의적 차이가 없었으므로 산업화 측면을 고려하였을 때 연속식 반응 시스템인 Packed bed reactor (PBR)가 보다 효과적인 것으로 판단되었다.

농축된 피놀레닌산을 이용하여 기존의 모노글리세라이드 합성방법으로 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드를 합성하였고, 대조구로는 올레산을 함유한 모노글리세라이드를 합성하였다. 분별증류기를 이용하여 각 모노글리세라이드를 농축시킨 후 분석 실험을 통하여 두 모노글리세라이드간의 특징들을 비교하였다.

그 결과 유화력은 올레산 함유 모노글리세라이드가 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드에 비하여 높게 나타났지만 유화 안정성 면에서는 차이가 없는 것으로 나타났다. 따라서 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드가 유화제로서의 기능이 인정되었다.

기존의 모노글리세라이드 합성방법은 240℃의 고온에서 이루어지는 반응이므로 효소를 이용하는 반응 시스템을 이용하여 낮은 온도에서 불포화도가 높은 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드를 합성하고자 하였다. 효소를 이용한 합성은 무용매 반응 시스템에서 이루어졌으며, 기질로서 트리글리세라이드 (triglyceride) 형태를 이용하는 것 (글리세롤리시스 (glycerolysis) 반응)과 지방산 (fatty acid)의 형태를 이용 (에스테르 (esterification) 반응)하는 두 가지가 시도되었다. 두 유형 중 글리세롤과 지방산을 기질로 사용하는 에스테르 반응이 보다 효과적인 방법인 것을 확인되었다. 효소 선정에 있어서는 두 종류의 고정화 효소와 두 종류의 파우더 형태의 효소들로 평가한 결과 *Penicillium cammembertii*에서 추출된 Lipase G로 결정되었다. 온도, 지방산과 글리세롤의 몰비율, 수분 함량 및 효소량에 대한 실험도 실시되었다. 그 결과 지방산과 글리세롤은 1:5의 몰비율에서, 20℃의 반응 온도, 600 U/g의 효소 활성, 2%의 수분함량의 조건에서 반응시켰을 때가 최적인 것으로 나타났다. 모노글리세로이드의 함량 및 순도를 높이기 위한 방법으로 진공 시스템을 이용하여 반응물로부터 수분을 조절해 보기로 했다. 총 24시간의 반응시간 중에 초기 4시간 이후부터 1 torr의 진공을 적용하는 것이 고순도 모노글리세라이드 생산을 위한 최적 조건으로 나타났다. 초 고순도 모노글리세라이드 생산을 위하여 저온 저장 실험이 실시되었다. 조사된 온도 범위는 10℃부터 -20℃까지의 범위였으며, -10℃에서 6일간 저장하는 조건이 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드가 초 고순도로 생산되는 최적 조건인 것으로 나타났다. 이 반응은 기존 모노글리세라이드 생산 공정 중 증류 공정을 생략할 수 있는 획기적인 방법이다.

효소를 이용하는 방법으로 생산된 피놀레닌산을 함유한 초 고순도의 모노글리세라이드를 실제 제품에 적용해 보았다. 대상 가공식품은 마요네즈와 두유이었으며, 유화 안정성에 있어서 기존 상용화 되어 있는 모노글리세라이드와 비교하여 차이를 나타내지 않았다. 상업화된 모노글리세라이드와 본 연구에서 생산한 모노글리세라이드를 혼합하여 사용하였을 경우 마요네즈의 점도와 안정성이 더욱 상승하는 효과를 나타내었다. 한편 두유 역시 기능적 차이뿐 만 아니라 관능적인 측면에 있어서도 우수한 것으로 나타났다. 따라서 본 연구에서 생산된 모노글리세라이드는 생리적 기능성뿐 만 아니라 유화기능 역시 우수한 것으로 나타났다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

### 1. 논문 및 학술발표 실적

구분	논문명	잡지 또는 학회명
논문 (SCI)	Enrichment of pinolenic acid from pine nut oil via lipase catalyzed ethanolysis with an immobilized <i>Candida antarctica</i> (Accepted)	Biocatal. & Biotrans.
논문 (SCI)	Lipase-catalyzed production of triacylglycerols enriched in pinolenic acid at the sn-2 position from pine nut oil (Submitted)	J. Sci Food Agri.
논문 (SCI)	Synthesis of high purity monoacylglycerol containing pinolenic acid in a solvent free system by lipase-catalyzed esterification (Preparation)	J. Agri. Food Chem.
학술대회 (국외)	Enrichment of of pinolenic acid (PLA) by selective ethanolysis reaction from pine nut oil with immobilized <i>Candida antarctica</i> lipase	100th AOCS annual meeting (2009)
학술대회 (국외)	Lipase-catalyzed synthesis of triacylglycerols enriched in pinolenic acid at sn-2 position from pine nut oil	101st AOCS annual meeting (2010)
학술대회 (국외)	Production of monoacylglycerol containing pinolenic acid using lipase-catalyzed esterification	102nd AOCS annual meeting (2011)
학술대회 (국외)	Synthesis of symmetrical triacylglycerol containing pinolenic acid at sn-2 position in packed bed reactor by lipase-catalyzed acidolysis	102nd AOCS annual meeting (2011)
학술대회 (국내)	Isolation of Pinolenic acid (PLA) by Lipase-catalyzed Ethanolysis of Pine Nut Oil with <i>Candida antarctica</i> Lipase	한국식품과학회 (2009)
학술대회 (국내)	Production of structured lipids by enzymatic acidolysis using modified pine nut oil in a packed bed reactor	한국식품영양과학회 (2010)

### 2. 특허 실적

특 허 명	실적	활용방안
초고순도 모노글리세라이드 생산방법 (특허출원번호: 10-2011-0029598, 출원일: 2011년 3월 31일)	1	기술이전 시 사용
재 순환 연속식 반응조에서 에타놀리시스 반응을 통한 피놀레닌산 농축	1	출원 준비

### 3. 인력활용 및 양성효과

지원 총인원	지원대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대 전	기 타
3		3			1	2	3		

#### 4. 연구결과 기대효과

- 잣 기름을 이용한 식품 소재 개발
- 고부가가치 유화제 소재 개발
- 에타놀리시스를 이용한 기능성 지방성분 분리공정 기술 개발
- 고 농축 피놀레닌산의 고부가가치 식품 소재화 및 가공 제품 개발로 산업적 생산가능
- 잣 기름의 고부가가치화로 인한 잣의 가공식품으로의 이용도 증대로 농가 소득 증대 및 농촌 인력 고용 창출

## SUMMARY

### I. Title

Development of functional emulsifier containing pinolenic acid (PLA) from Korean pine nut (*Pinus koraiensis*) using enzyme

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

Pine nut oil contains a very unusual series of C<sub>18</sub>- and C<sub>20</sub>-polyunsaturated fatty acids (PUFA), in which the first double bond is in the  $\Delta 5$  position and the next immediate double bond is at  $\Delta 9$  or  $\Delta 11$ , so that the first two double bonds are separated by two or four methylene (CH<sub>2</sub>) units. The  $\Delta 5$ -unsaturated polymethylene interrupted fatty acids ( $\Delta 5$ -UPIFA) are characteristic components of pine nut oil. Pinolenic acid (PLA) is a predominant  $\Delta 5$ -UPIFA of the pine nut oil. Several animal studies have shown that pine nut oil containing PLA has a substantial lipid-lowering potential as well as hypocholesterolemic activity in animals. Recent researches also reported that the pine nut oil containing PLA may work as an appetite suppressant through an increasing effect on satiety hormones, namely cholecystokinin, and glucagon like peptide-1. The first goal of this study was to develop enrichment process of PLA from pine nut oil using lipase-catalyzed ethanolysis. The second goal of this study was to produce high purity monoglyceride containing PLA with fatty acids derived from pine nut oil by lipase-catalyzed esterification. The third goal of this study was to apply production of emulsion foods using monoglyceride containing PLA.

### III. Scope and content of this study

#### 1. Enrichment of pinolenic acid from pine nut oil by lipase-catalyzed ethanolysis

(1) Enrichment of pinolenic acid from pine nut oil in a batch reaction system by lipase-catalyzed ethanolysis

- (a) Determination of pinolenic acid in some nuts
- (b) Enzyme screening on enrichment of pinolenic acid
- (c) Effect of molar ratio (pine nut oil to ethanol) on enrichment of pinolenic acid
- (d) Effect of enzyme loading on enrichment of pinolenic acid
- (e) Effect of temperature on enrichment of pinolenic acid
- (f) Effect of moisture on enrichment of pinolenic acid

(2) Enrichment of pinolenic acid from pine nut oil in a packed bed reactor (continuous reaction system) by lipase-catalyzed ethanolysis

- (a) Effect of temperature on enrichment of pinolenic acid
- (b) Effect of molar ratio (pine nut oil to ethanol) on enrichment of pinolenic acid
- (c) Effect of residence time of substrate in reactor on enrichment of pinolenic acid
- (d) Comparison between lab scale and bulk scale

#### 2. Production of monoglyceride from pine nut oil by lipase-catalyzed esterification

(1) Enzyme screening

(2) Effect of temperature on the production of monoglyceride containing pinolenic acid

(3) Effect of moisture content on the production of monoglyceride containing pinolenic acid

(4) Effect of enzyme loading on the production of monoglyceride containing pinolenic acid

(5) Effect of vacuum on the production of monoglyceride containing pinolenic acid

- (a) Selection of starting time of vacuum
- (b) Effect of degree of vacuum



(6) Effect of storage at low temperatures

## IV. Results

Pinolenic acid (PLA) was enriched via lipase-catalyzed ethanolysis from pine nut oil in a batch reaction system and a continuous reaction system (packed bed reactor: PBR) using a commercial immobilized lipase. Fatty acid composition of five edible nuts such as pine nut, walnut, casunut, almond, and pistachio was investigated. PLA in all nuts except pine nut was not detected. Three immobilized lipases were screened for their abilities to enrich pinolenic acid by ethanolysis. Novozym 435 from *Candida antarctica* was selected for enrichment of pinolenic acid from pine nut oil. Effect of several parameters such as molar ratio (pine nut oil to ethanol), temperature, enzyme loading, and moisture content in a batch reaction system was investigated. Optimal conditions for enrichment of pinolenic acid in a batch reaction system were molar ratio of 1:80 (pine nut oil: ethanol), temperature of 35°C, enzyme loading of 10 wt% (wt% on substrate weight), and moisture content of 250 ppm, respectively. The same type of experiments in a recycling packed bed reactor (PBR) as a continuous reaction system was investigated. Effect of several parameters such as molar ratio (pine nut oil to ethanol), temperature, and residence time in reactor was investigated. Optimal conditions for enrichment of pinolenic acid in PBR system were molar ratio of 1:75 (pine nut oil: ethanol), temperature of 45°C, and 3 min of residence time, respectively. Consequently, pinolenic acid was effectively enriched from pine nut oil by lipase-catalyzed ethanolysis. Moreover, PBR system was more effective than a batch reaction system when recovery yield, saving energy, and industrial aspect were considered.

High purity monoglyceride was produced in a solvent free system from pine nut oil by enzymatic reaction. To synthesize monoglyceride, two different enzymatic reactions namely glycerolysis, and esterification were tested and esterification was more suitable reaction than glycerolysis. Two immobilized lipases and two free type lipase were screened for their ability to produce monoglyceride using glycerol and fatty acids (derived from pine nut oil) as substrates. Lipase G from *Penicillium camembertii*, which is a nonspecific lipase, gave

the highest activity. Hence, in subsequent trials, Lipase G was employed to catalyze the production of monoglyceride containing PLA residues. Effect of several parameters such as temperature, molar ratio (fatty acid to glycerol), moisture, and enzyme loading was investigated. Optimal conditions for production of monoglyceride in batch reaction system were molar ratio of 1:5 (fatty acid to glycerol), temperature of 20°C, and enzyme loading of 600 U/g (by weight of total substrates), and moisture content of 2%, respectively. Vacuum was applied to control moisture content in reaction mixture. Trials for starting time of vacuum was carried out and optimal condition was after reaction time of 4 h. Effect of degree of vacuum on the esterification between fatty acid and glycerol for production of monoglyceride was investigated. Optimal degree of vacuum was 1 torr. Incubation trials for production of high purity monoglyceride were carried out at low temperatures. The temperature ranges tested was between 10 and -20°C. Optimal incubation conditions were incubation temperature of -10°C, and incubation time of 6 days. Consequently, high purity monoglyceride from pine nut oil was successfully produced by esterification of fatty acids derived from pine nut oil with glycerol using a free type lipase from *Penicillium camembertii* (Lipase G). The concentration and purity of monoglyceride produced at optimal condition was 88%, and 91%, respectively. In particular, distillation step can be omitted by utilization of technology developed in this study.

The monoglyceride containing PLA was applied to produce two processed foods namely mayonnaise, and soy milk. There was no difference in the emulsion stability between commercial monoglyceride (containing stearic acid) and monoglyceride containing PLA produced from this study. Moreover, synergistic effect in the emulsion stability of mayonnaise was showed when mixed monoglyceride of commercial monoglyceride, and monoglyceride containing PLA was used. There was no significant difference in the sensory evaluation between two soy milks prepared with commercial monoglyceride, and monoglyceride containing PLA. Consequently, monoglyceride containing PLA produced from this study was useful emulsifier to produce emulsion foods namely mayonnaise, and soy milk.

# CONTENTS

Chapter 1. Outline of Research and Development .....	23
Chapter 2. Current state of domestic and foreign technical development .....	26
Chapter 3. Procedure and results of research and development .....	28
Paragraph 1. Materials and methods .....	28
1. Enrichment of pinolenic acid from pine nut oil by lipase-catalyzed ethanolsis .....	28
가. Enrichment of pinolenic acid from pine nut oil in a batch reaction system by lipase-catalyzed ethanolsis .....	28
(1) Lipid extraction from nuts .....	28
(2) Ethanolsis in batch reaction system .....	28
(3) Ethanolsis in batch reaction system .....	29
나. Enrichment of pinolenic acid from pine nut oil in a packed bed reactor (continuous reaction system) by lipase-catalyzed ethanolsis .....	30
(1) Establishment of continuous reaction system .....	30
(2) Operation of ethanolsis in continuous packed bed reaction system .....	30
다. Analysis .....	32
(1) Analysis of fatty acid composition .....	32
(2) Analysis of pinolenic acid ethyl ester .....	33
(3) Analysis of fatty acid composition at <i>sn</i> -2 of triglyceride in pine nut oil .....	33
(4) Analysis of fatty acid composition at <i>sn</i> -1, 2, 3 of triglyceride in pine nut oil .....	34
2. Synthesis of monoglyceride .....	35
가. Synthesis of monoglyceride containing pinolenic acid by the chemical method .....	35
(1) Materials .....	35

(2) Production and enrichment of monoglyceride containing pinolenic acid	35
(가) Production of monoglyceride containing pinolenic acid	35
(나) Enrichment of monoglyceride containing pinolenic acid by short-patch distillator	36
(3) Analysis of monoglyceride containing pinolenic acid	37
(가) Acid value	37
(나) Saponification value	37
(다) Peroxide value	37
(라) Analysis of fatty acid composition	38
(마) Alaysis of monoglyceride	38
(바) Surface tension and emulsion stability	38
나. Production of monoglyceride from pine nut oil by lipase-catalyzed esterification	40
(1) Preparation of fatty acid	40
(2) Synthesis of monoglyceride using enzyme	41
(가) Synthesis of monoglyceride in lab scale	41
(나) Synthesis of monoglyceride in bulk scale	42
(3) Composition of fatty acid, monoglyceride and diglyceride	43
3. Manufacture of test products using monoglyceride containing pinolenic acid as emulsifier	43
가. Manufacture of mayonnaise	43
(1) Materials	44
(2) Mixed ratio of materials and manufacture method	44
(3) Emulsion stability	47
(가) Freezing method	47
(나) Physical property	47
나. Manufacture of soy milk	47

(1) Materials .....	47
(2) Mixed ratio of materials and manufacture method .....	48
(3) Evaluation of product .....	49
(가) Discriminative test .....	49
(나) Sensory evaluation .....	49
 Paragraph 2. Results .....	 50
1. Enrichment of pinolenic acid from pine nut oil by lipase-catalyzed ethanolysis .....	50
가. Enrichment of pinolenic acid from pine nut oil in a batch reaction system by lipase-catalyzed ethanolysis .....	50
(1) Determination of pinolenic acid in some nuts .....	50
(2) Enzyme screening for enrichment of pinolenic acid .....	52
(3) Effect of molar ratio (pine nut oil to ethanol) on enrichment of pinolenic acid .....	54
(4) Effect of enzyme loading on enrichment of pinolenic acid .....	57
(5) Effect of temperature on enrichment of pinolenic acid .....	59
(6) Effect of moisture on enrichment of pinolenic acid .....	61
나. Enrichment of pinolenic acid from pine nut oil in a packed bed reactor (continuous reaction system) by lipase-catalyzed ethanolysis .....	63
(1) Effect of temperature on enrichment of pinolenic acid .....	63
(2) Effect of molar ratio (pine nut oil to ethanol) on enrichment of pinolenic acid .....	69
(3) Effect of residence time of substrate in reactor on enrichment of pinolenic acid .....	75
(4) Comparison between lab scale and bulk scale .....	79
2. Synthesis of monoglyceride .....	80
가. Synthesis of monoglyceride containing pinolenic acid by the chemical method .....	80
(1) Production and enrichment of monoglyceride containing pinolenic acid .....	80

(가) Production of monoglyceride containing pinolenic acid .....	80
(나) Enrichment of monoglyceride containing pinolenic acid by short-patch distillator .....	80
(2) Analysis of monoglyceride containing pinolenic acid .....	83
(가) Surface tension .....	84
(나) Emulsion stability .....	85
나. Production of monoglyceride from pine nut oil by lipase-catalyzed esterification .....	89
(1) Enzyme screening .....	89
(2) Effect of temperature on the production of monoglyceride containing pinolenic acid .....	94
(3) Effect of molar ratio on the production of monoglyceride containing pinolenic acid .....	96
(4) Effect of moisture content on the production of monoglyceride containing pinolenic acid .....	98
(5) Effect of enzyme loading on the production of monoglyceride containing pinolenic acid .....	100
(6) Effect of vacuum on the production of monoglyceride containing pinolenic acid .....	102
(가) Selection of starting time of vacuum .....	102
(나) Effect of degree of vacuum .....	104
(7) Effect of storage at low temperatures .....	107
3. Manufacture of test products using monoglyceride containing pinolenic acid as emulsifier .....	112
가. Manufacture of mayonnaise .....	112
(1) Emulsion stability .....	112
나. Evaluation of soy milk .....	116
(1) Discriminative test .....	116
(2) Sensory evaluation .....	117
Chapter 4. Achivement of purpose and contribution of related field .....	118

---

Chapter 5. Application plan and results of research .....	119
Chapter 6. Information of scientific technnology corrected from other countries .....	121
Chapter 7. References .....	122

# 목 차

제 1 장 연구개발 과제의 개요	23
제 2 장 국내외 기술개발 현황	26
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	28
제1절 재료 및 방법	28
1. 에타놀리시스를 이용하여 잣기름으로부터 피놀레닌산 농축	28
가. 에타놀리시스의 회분식 반응 시스템 최적화	28
(1) 잣을 비롯한 견과류로부터 유지 추출	28
(2) 회분식 반응기에서의 에타놀리시스	28
(3) 회분식 에타놀리시스에서의 최적화 조건 조사	29
나. 에타놀리시스의 연속식 반응 시스템 최적화	30
(1) 연속식 반응 시스템 구축	30
(2) 연속식 반응 시스템 운전 및 연속식 에타놀리시스에서의 최적화 조건 조사	30
다. 분석 조건	32
(1) 지방산 분석	32
(2) 피놀레닌산 에틸에스터 분석	33
(3) 잣기름 트리글리세라이드의 $sn-2$ 위치에 있는 지방산 조성 분석	33
(4) 잣기름 트리글리세라이드의 $sn-1,2,3$ 위치에 있는 지방산 조성 분석	34
2. 모노글리세라이드 합성	35
가. 기존의 방법을 이용한 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드 합성	35
(1)재료	35



(2) 피놀레닌산을 함유 모노글리세라이드의 제조 및 농축	35
(가) 피놀레닌산을 함유 모노글리세라이드의 제조	35
(나) 분자중류기를 사용한 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드의 농축	36
(3) 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드의 일반 분석 실험	37
(가) 산가 측정	37
(나) 비누화가 (검화가) 측정	37
(다) 과산화물가 측정	37
(라) 지방산 분석	38
(마) 모노글리세라이드 함량 분석	38
(바) 표면장력과 유화안정성 측정	38
나. 잣기름으로부터 효소적 공법을 이용한 고순도 모노글리세라이드 합성	40
(1) 지방산 제조	40
(2) 효소를 이용한 모노글리세라이드 합성	41
(가) 실험실 규모에서의 모노글리세라이드 합성	41
(나) 모노글리세라이드의 대량 생산	42
(3) 지방산과 모노글리세라이드, 디글리세라이드의 조성 분석	43
3. 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드를 유화제로 이용한 시제품 생산	43
가. 마요네즈 시제품 생산	43
(1) 실험재료	44
(2) 제조 배합비 및 제조 방법	44
(3) 유화 안정성 측정	47
(가) 동결법	47
(나) 물성평가	47
나. 두유 시제품 생산	47
(1) 실험재료	47

(2) 제조 배합비 및 제조 방법 .....	48
(3) 시제품 평가 .....	49
(가) 차이식별평가 .....	49
(나) 만족도 평가 .....	49
제 2 절 연구결과 .....	50
1. 에타놀리시스를 이용하여 잣기름으로부터 피놀레닌산 농축 .....	50
가. 에타놀리시스의 회분식 반응 시스템 최적화 .....	50
(1) 견과류 내 피놀레닌산 함량 비교 .....	50
(2) 피놀레닌산 농축을 위한 효소 스크리닝 .....	52
(3) 피놀레닌산 농축을 위한 잣기름과 에탄올의 몰비율 효과에 대한 조사 .....	54
(4) 피놀레닌산 농축을 위한 효소량 효과에 대한 조사 .....	57
(5) 피놀레닌산 농축을 위한 반응온도 효과에 대한 조사 .....	59
(6) 피놀레닌산 농축을 위한 수분함량 효과에 대한 조사 .....	61
나. 에타놀리시스의 연속식 반응 시스템 최적화 .....	63
(1) 피놀레닌산 농축을 위한 반응온도 효과에 대한 조사 .....	63
(2) 피놀레닌산 농축을 위한 잣기름과 에탄올의 몰비율 효과에 대한 조사 .....	69
(3) 피놀레닌산 농축을 위한 기질 정체시간 (기질 주입속도) 효과에 대한 조사 .....	75
(4) 대용량 (Bulk scale)에서 피놀레닌산 농축의 효율 평가 .....	79
2. 모노글리세라이드 합성 .....	80
가. 기존의 방법을 이용한 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드 합성 .....	80
(1) 기존의 방법에 의한 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드 제조 및 농축 .....	80
(가) 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드의 제조 .....	80
(나) 분자증류기를 이용한 모노글리세라이드의 농축 .....	80
(2) 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드의 일반 분석 .....	83

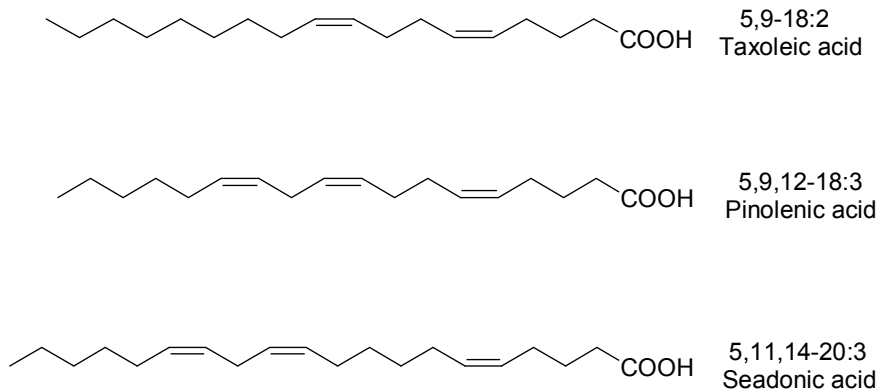
(가) 표면장력 비교 실험 .....	84
(나) 유화안정성 비교 실험 .....	85
나. 잣기름으로부터 효소적 공법을 이용한 고순도 모노글리세라이드 합성 .....	89
(1) 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드 생산을 위한 효소 스크리닝 .....	89
(2) 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드 생산을 위한 온도 효과에 대한 조사 .....	94
(3) 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드 생산을 위한 기질의 몰비율 효과에 대한 조사 .....	96
(4) 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드 생산을 위한 수분함량 효과에 대한 조사 .....	98
(5) 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드 생산을 위한 효소량 효과에 대한 조사 .....	100
(6) 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드 합성을 증대를 위한 진공 효과에 대한 조사 .....	102
(가) 진공 적용 시점에 대한 설정 .....	102
(나) 진공도에 따른 효과 .....	104
(7) 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드 합성을 증대를 위한 저온 저장 효과에 대한 조사 .....	107
3. 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드를 유화제로 이용한 시제품 생산 .....	112
가. 마요네즈 시제품 생산 .....	112
(1) 유화 안정성 .....	112
나. 두유 시제품 생산 .....	116
(1) 차이식별 평가 .....	116
(2) 만족도 평가 .....	117
 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	 118
 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....	 119

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 ..... 121

제 7 장 참고문헌 ..... 122

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

잣은 해송자(海松子)·백자(柏子)·송자(松子)·실백(實柏)이라고도 불리우며 소나무속 나무에서 나오는 식용 가능한 씨앗이다. 특히 솔방울처럼 생긴 구과(毬果)에 들어있는 것이 특징이다. 잣나무의 종류는 지역마다 다양하여 유럽에서 주로 자라는 잣나무의 종은 *Pinus pinea*, *Pinus cembra*이며, 북동아시아에서 자라는 잣나무는 *Pinus koraiensis*, 서히말라야에서는 *Pinus gerardiana*, 북아메리카에서는 *Pinus edulis*, *Pinus monophylla*, *Pinus cembroides*가 자란다. 그 밖에 *Pinus sibirica*, *Pinus pumila*, *Pinus carmandii*, *Pinus bungeana*의 잣나무에서 얻어지는 잣도 있다. 특히 우리나라, 만주, 흑룡강 유역, 일본 (북해도 제외) 등 북동아시아 지역의 대표적 잣나무는 *Pinus koraiensis*으로 전 세계 100여 종의 소나무속 수종 중 유일하게 잣나무의 학명과 영명에 'Korea'라는 이름이 붙여져 있는 조림수종이다. Wolff (1997)등은 *Pinus koraiensis* 종을 이용하여 잣에 대하여 연구한 결과, 식용 가능한 구과 식물 중  $\Delta^5$  계 불포화 지방산 함량이 가장 높은 것으로 밝혀졌다.



**Figure 1.** Structure of major  $\Delta-5$  unsaturated fatty acids in pine nut

$\Delta^5$  계 불포화 지방산, 특히 대표적인 피놀레닌산 (pinolenic acid)은 임상에서 체중조절 효과에 대한 연구가 많이 이루어져 왔다.  $\Delta^5$  계 불포화 지방산을 섭취하였을 때, 공복감을 억제하고 포만감을 유도하는 호르몬인 cholecystokinin (CCK)과 glucagon like peptide-1 (GLP-1)을 촉진하여 식욕을 억제한다는 결과가 발표되었고, 지중해 연안의 사람들을 대상으로 잣을 포함한

견과류를 섭취하도록 하였을 때 체중증가나 과체중, 비만에 대한 위험요인 등을 보정하였다는 결과도 보고되었다. 하루에 견과류 섭취가 2회 이상일 경우 체중 증가의 위험이 유의적으로 감소하였다고 보고하였다. 고혈압이 있는 대상자의 경우에도 Siberian pine nut oil을 하루에 17.5g씩 투여하였을 때, 콜레스테롤 저하효과와 체중 감소 효과를 보였다고 보고되고 있다.

최근 불규칙한 생활습관과 식사로 인하여 비만 인구가 폭발적으로 증가하고 있으며, 외모 중시 풍조까지 더해져서 다이어트 시장이 급격히 성장하고 있는 추세이다. 미국의 경우 다이어트 식품의 시장 규모가 50조원에 이르며, 중국에서도 1조 2천 억 원대의 규모를 형성하고 있는 것으로 알려져 있다. 또한 국내의 경우에도 건강기능식품 시장에서 다이어트 식품의 규모가 약 2천 억 원으로 가장 큰 성장세를 보이고 있다.

현재 체중 감량으로 주목 받고 있는 지방산은 CLA (conjugated linoleic acid)로서 많은 업체에서 다양한 형태의 건강식품으로 판매되고 있다. CLA는 LDL-cholesterol이나 VLDL-cholesterol의 감소, 항암효과 등의 기능성을 가지고 있으나, 시중에 판매되는 CLA 제품들은 과체중이거나 비만인 사람에게 체지방을 감소시켜주는 기능성 식품으로서 판매되고 있다. 실제로 CLA는 다양한 이성체들을 총칭하는 것으로서 주요 이성체 중 하나인 10*t*,12*c*-CLA가 지방 축적과 관련 호르몬인 leptin을 감소시킴으로서 체내 지방 축적을 저해하는 것으로 보고되어 있다. 따라서 식욕억제를 통하여 체중을 감소시키는 PLA는 식욕으로 고민하고 비만이 유발되는 사람들에게 더 적합한 기능성 식품일 것으로 판단된다. 또한 경제적인 측면에서 보면, CLA의 원료인 홍화씨는 잣에 비하여 10 배가량 높은 가격으로 판매되며, 홍화씨는 25-37%의 기름을 포함하고 있는데 비하여 잣은 60-65%의 기름을 포함하고 있어서 홍화씨유에 비하여 잣기름이 경제적이므로 식품에 활용할 수 있는 소재로서 더욱 효율적일 것으로 판단된다.

우리나라의 잣나무는 지난 40년 동안 최소 30만ha 이상의 면적에 식재되었으며, 현존 면적도 20만ha 이상으로 알려져 있다. 특히 잣나무는 1980년대 이후 가장 많이 심어져 평균적으로 전체 조림면적의 약 3분의 1을 점유하였으나 연간 조림면적이 2만ha 정도로 감소하고 있다. 그럼에도 불구하고 최근 2-3년 동안에도 잣나무의 조림 면적은 전체 조림 면적의 4분의 1을 넘어서고 있는 실정이다. 잣나무의 주 재배지역은 경기와 강원지역으로 총 생산량의 80% 이상을 차지하고 있다. 잣의 생산량으로 보면 2000년을 기준으로 피잣 1,829톤, 간 잣 512톤을 수확하였다. 잣나무의 조림실적과 현존면적 등을 고려할 때 잣 생산량은 앞으로도 증가추세를 보일 것으로 예상된다. 그러나 잣은 현재까지도 식혜나 수정과에 띄우거나 음식의 부수재료 또는 한과재료로 이용되는 정도로만 사용되고 있으며, 일상생활에서는 밀접하게 이용되지 못하고 있

다. 그러므로 잣의 활용 방안에 대하여 다양하게 모색할 필요가 있다.

이번 과제에서는 잣기름을 이용하여 모노글리세라이드를 생산함으로써 잣기름의 피놀레닌산을 유화제의 성분으로서 활용할 방안에 대하여 제시하고자 한다. 잣기름에서 피놀레닌산을 선택적으로 농축시킨 후, 새로운 재구성 지질 유화제 형태인 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드를 개발하여 기존 고지방 식품에 혼합 사용한다면 새로운 개념의 다이어트 식품 생산이 가능할 것이다. 또한 유화제는 최근 식품 시장에서 식품 내 지방 함량을 낮추면서 풍미를 저하시키지 않는 대안으로 점차 사용이 증가되고 있는 추세이므로 피놀레닌산 함유 유화제가 개발되어 상품화된다면 수익성이 높을 것으로 예상된다. 더불어 피놀레닌산의 농축에서 모노글리세라이드 합성까지 효소를 이용한 친환경적 방법이 활용된다면 미래형 산업으로서 농가 소득을 실질적으로 향상시킬 수 있는 발판이 될 것이라 기대된다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

현재까지 국내 시장에서 판매되고 있는 잣의 가공품은 껍질을 벗긴 잣을 포장한 정도이다. 이에 반하여 네델란드의 로더스 크로클란사 (Loders Croklaan)는 한국잣에 다량 함유되어 있는 피놀레닌산이 비만억제와 관련된 효과를 가진다는 것을 입증하여 ‘피놀레닌산을 함유하는 조성물 및 건강 성분으로서의 그의 용도’라는 제목으로 대한민국을 비롯한 유럽과 미국에 특허를 출원하였다. 리피드 뉴트리션사 (Lipid Nutrition)라는 로더스 크로클란사의 자회사에서는 잣기름을 캡슐화하여 ‘피노신 (PinnoThin)’이라는 제품명으로 미국 시장에 공급하고 있다.

최근 우리나라에서도 한국산 잣에 대한 지속적인 연구과 개발이 이루어지고 있다. 홍성군에서는 향토산업 육성방안으로서 잣을 활용한 가공식품 개발을 추진하고 있다. 이 사업은 국비 포함 지방비, 가공업체의 자부담 등 해마다 10억 원 씩 총 30억 원의 투자규모를 가지며, 단순 가공과 기능성 가공, 유통 및 마케팅까지 정책적으로 지원되고 있다. 국내 코스맥스가 운영하는 제주 바이오테크랩에서는 산업 자원부의 지원으로 제주 자생 구실잣밤나무를 이용한 화장품 제조하였고, 이 화장품이 항노화성 제품으로서 피부세포를 산화적 스트레스로부터 보호하는 기능이 매우 탁월하다는 사실을 증명하여 2007년 SCI급 저널 (J. Toxicol. Environ. Health A)에 등재한 바 있다.

잣이 함유하고 있는 피놀레닌산의 응용성을 높이기 위하여 트리글리세라이드 (triglyceride) 형태인 유지를 분해하고 분해된 지방산들 중에서 피놀레닌산이라는 특정 지방산을 농축시키는 과정이 필요하다.

기존의 공업적 규모로 유지를 가수분해할 때에는 고온 또는 고압에서 반응시켜 왔다. 이러한 공정은 단시간에 90% 이상 가수분해 시키기는 하지만, 부산물이 생성되어 생성물에 검게 착색되므로 제품의 질이 떨어지고, 지방산과 글리세롤을 정제하는 과정에서 많은 손실이 일어나게 되므로 수율도 낮아진다. 최근에는 효소를 이용하는 유지 분해 기술을 확립하고자 하는 연구들이 시도되고 있다. 수분함량이 낮은 유지와 같은 물질에서 가수분해 효율이 좋은 효소 개발이 활발히 진행된 결과, 유지 분해 기술을 확립할 수 있는 몇 가지 효소가 발견되었다. 효소적 공법에 이용되는 효소들로는 *Novozym 435 (Candida Antarctica)* 외에 *Rhizopus delmar*, *mucor miehei*, *Thermomyces lanuginosus*, *Alcaligenes sp.*, *Aspergillus niger*, *Candida cylindracea*, *Burkholderia cepacia*, 및 *Geotricum candidum*를 포함한 미생물에서 유래된 리파제들이 있다.



지방산을 농축하는 방법으로는 일반적으로 분별증류법, 결정화법, 요소부가법 등이 있다. 그러나 농축과정 또한 효소를 이용하는 방법들이 고안되고 있다. 효소를 이용하게 되면 비교적 낮은 온도에서 적은 양의 유기용매만을 이용하여 원하는 지방산을 선택적으로 농축시킬 수 있다는 점과 반응 공정과 생산물이 친환경적이라는 장점을 가지게 된다. 그 예로서 유지와 알코올간의 에스테르 교환 반응인 에타놀리시스 반응을 시키게 되면 특정 지방산을 에틸에스터 형태로 바꾸어 추출함으로써 농축의 효과를 얻을 수 있다. 이렇게 농축된 지방산은 새로운 반응을 위한 원료 물질이 될 수도 있다. 에타놀리시스에 관한 연구들로는 Haraldsson 등에 의해 어유를 *Pseudomonas fluorescens*에서 추출한 lipase를 이용하여 에타놀리시스 시킴으로서 고도 불포화 지방산의 에틸 에스테르를 고농도로 생산할 수 있었다. Haas 등도 대두 내의 중성 지방질 및 인지지방질을 에타놀리시스 반응을 통하여 재조합하여 연료로 사용될 수 있는 바이오디젤 (biodiesel)을 생산하였다.

현재 건강기능성 식품의 수요 증가로 친환경적인 기술인 효소적 공법을 이용하려는 시도가 다양하게 이루어지고 있으나, 효소의 안전성이나 높은 생산단가와 같은 문제들이 아직 남아 있는 실정이다. 또한 시설 면에서도 국내에서는 현재까지도 주로 회분식 공정으로 이루어져 왔고 그동안 연속식 공정은 식품에서 보다는 주로 바이오 디젤 원료를 만드는데 적용되어 왔다. 최근 식품산업에서도 회분식 공정에서 가격 경쟁력과 생산성을 높일 수 있는 연속식 공정으로 연구 동향이 변화되고 있는 있지만 실제적으로 대량 생산에 적용하기 위해서는 국가적인 차원의 체계적인 연구가 반드시 필요하다.

효소를 이용한 고급 기술을 개발하고 이를 실용화함으로써, 지방산과 스테로이드 (steroid) 등을 보다 저렴하게 대량으로 생산할 수 있다면 큰 경쟁력을 갖게 될 것이다. 이렇게 만들어진 물질들이 원료 물질로 이용되어 고급 지방질이나 유화제 등의 기능성 재구성 지질로 생산된다면 세계 시장에서도 고부가가치 상품으로서 가치를 인정받을 수 있을 것으로 기대된다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 재료 및 방법

#### 1. 에타놀리시스 (Ethanolysis)를 이용하여 잣기름으로부터 피놀레닌산 (Pinolenic acid) 농축

##### 가. 에타놀리시스의 회분식 반응 시스템 최적화

###### (1) 잣을 비롯한 견과류로부터 유지 추출

잣을 포함한 견과류의 지방산 조성을 조사하기 위해 원료를 믹서기로 분쇄한 후, 헥산 (*n*-hexane)을 이용하여 원료와 용매 비율을 1:10으로 하고 약 한 시간동안 충분히 교반시켜 유지를 추출하였다. 잣 시료는 국내에서 생산되는 잣으로 가평지역에서 생산되는 것을 농협에서 구매하여 시료로 사용 하였다. 추출물은 회전식 농축기 (rotary evaporator)를 이용하여 용매를 제거하고 50℃에서 격렬한 질소 기류 하에 용매와 수분(≤ 100 ppm)을 완전히 제거하였다. 이렇게 얻어진 최종 잣기름은 사용 전까지 -80℃에서 냉동 보관하였다.

###### (2) 회분식 반응기에서의 에타놀리시스

에타놀리시스 반응을 위하여 반응에 민감하게 작용할 수 있는 수분을 최대한 제거하기 위하여 추출된 잣기름은 반응 전 40분간 질소를 주입하여 수분함량을 100 ppm이하까지 건조시킨 후 사용하였다. 한편 사용된 99% 에탄올은 반응 하루 전에 분자체 (molecular sieves)를 넣어 수분을 제거한 후 사용하였다. 또한 반응에 사용되는 효소 역시 역가에 영향을 주지 않는 온도(40℃이하)에서 감압 건조기를 이용하여 하루 동안 건조시킨 후 데시케이터에 보관하면서 사용하였다.

반응은 25 ml 삼각플라스크에서 시행되었다. 일정 몰수의 잣기름과 에탄올을 합한 기질 3 g을 삼각플라스크에 넣고 무게비로 일정 기준량의 효소를 첨가하고 고무마개로 완전히 밀봉한 후 300 rpm의 회전속도로 맞추어진 water bath shaker (New Brunswick, Model Innova 3100, NJ, USA)에서 반응을 진행하였다. 반응이 끝난 후 반응물에 함유되어 있는 효소는 syringe filter를 이용하여 제거하고 여과액은 round flask로 옮긴 후 회전식 농축기 (rotary evaporator)를 이용하여 잔존한 용매를 제거하였다. 완벽한 용매 제거를 위하여 1 mmHg 이하의 고 진공 하에서

약 15분 간 완전히 용매 제거하였다. 이상의 과정을 통하여 얻어진 반응물 내 피놀레닌산 함량 및 수율을 가스크로마토그래피 (gas chromatography)를 이용하여 측정 하였다.

### (3) 회분식 에타놀리시스에서의 최적화 조건 조사

잣기름으로부터 피놀레닌산을 농축하기 위하여 회분식 공정에서 효소를 이용하여 에타놀리시스 반응을 행하였다. 최적의 반응 조건을 찾기 위하여 효소들을 스크리닝하고, 선정된 효소를 대상으로 효소량, 기질의 몰비율, 온도, 수분함량 및 반응 시간의 변수들 중에서 조사하였다. 스크리닝 대상 대상 효소는 Novozym 435 (*Candida antarctica* lipase type B), Lipozyme TL IM (*Thermomyces lanuginosa*)과 Lipozyme RM IM (*Rhizomucor miehei*) 세 가지 고정화 효소 (immobilized lipase)를 선정하였다. 효소량은 총 기질량을 기준으로 계산되었으며 2.5 - 20%의 범위에서 조사하였고, 잣기름과 에탄올의 몰비율로 1:2-1:100 (무게비로는 2.72 : 0.28 - 0.48 : 2.52) 범위로 변화 시켜 반응성을 확인해 보았다. 총 기질의 양을 3 g으로 기준했을 때, 잣기름과 에탄올의 몰비율에 따른 각각의 무게 비율은 Table 1과 같았다. 조사된 온도 범위는 15 - 45°C 이었고, 수분함량은 잣기름에서의 함량을 기준으로 하여 100 ppm 이하에서부터 1500 ppm 까지의 범위에서 조건을 설정하여 반응정도를 확인하였다. 한편 모든 변수들 대상 실험은 반응 시간에 따른 변화를 확인하였으며, 최소 5분에서 최대 360분까지로 설정하였다.

**Table 1.** Correlation of mole ratio and weight ratio for pine nut oil to ethanol.

Pine nut oil : EtOH (mole)	pine nut oil (g)	EtOH (g)
1:2	2.72	0.28
1:5	2.38	0.62
1:20	1.46	1.54
1:50	0.83	2.17
1:80	0.58	2.42
1:100	0.48	2.52

EtOH: Ethanol

## 나. 에타놀리시스의 연속식 반응 시스템 최적화

### (1) 연속식 반응 시스템 구축

본 연구에서는 recycling 형태의 연속식 반응기인 packed bed reactor (PBR) 시스템(이하 PBR 반응 시스템)이 구축되었으며, 구축과정 및 원리 그리고 부품 종류는 다음과 같다 (Figure 2와 3). PBR 반응 시스템은 크게 세 부분으로 나누어져 있다. 첫 번째는 기질조 (substrate reservoir), 두 번째는 펌프 (pump), 세 번째는 반응기 (효소관, PBR)로 이루어져 있다.

### (2) 연속식 반응 시스템 운전 및 연속식 에타놀리시스에서의 최적화 조건 조사

첫째, 기질조는 이중 자켓으로 만들어져 우측 circulator와 연결되어 있으며, circulator의 온도를 조절함으로써 기질조의 온도를 일정하게 유지시킨다. 이 장치는 효소가 채워진 PBR 반응기에서 에타놀리시스 반응이 일어나기는 하지만 기질조의 온도를 일정온도 이상으로 유지하지 않으면 기질이 PBR 반응기에 진입하였을 때 기질의 온도가 원하는 온도로 도달하기 어렵기 때문에 설치되었다. 한편 기질조에 담겨있는 에타놀과 잣기름의 분리 (초기단계)를 방지하기 위하여 400 rpm으로 강력히 교반 하여 고루 분산 하였다.

두 번째 기질조에서 고루 분산된 시료는 FMI piston pump (Fluid Metering, Inc., Syosset, NY, USA)를 이용하여 1/4 inch teflon tube를 통과하여 반응기에 공급되었다. 반응 전에 시료 공급 속도는 mass cylinder를 이용하여 정확히 측정 후 기질의 공급 속도를 일정하게 유지시켰다.

세 번째 PBR 반응기 (ID x Length = 1cm x 35 cm)에는 입구 부분에 기질의 원활한 열 교환이 이루어지도록 하기 위하여 1mm 크기의 glass bead와 sea sand를 약 5cm 높이로 채우고 본 실험에 사용된 상업용 고정화 효소 10g을 채운 후 출구 부분의 경우 효소의 탈출을 막기 위하여 sea sand를 약 3 cm 높이로 채웠다. 이상의 PBR 반응기를 통과한 기질은 1/4 inch teflon tube를 통과하여 기질조로 재순환되는 과정이 반복 되었다. 한편 대용량 (bulk scale) 실험을 위하여 주관연구기관 (고려대)에서 제공된 기술을 바탕으로 2세부 (참여기업: 주 일신 웰스)에서 10배 크기의 반응 시스템이 구축되었고, 규격은 내경(ID) 2cm, 길이 55 cm로 실험실 규모 (lab scale)의 경우와 비교하여 10배 이상의 효소가 채워졌다. Void volumn 및 기질조도 5-10 배 크기로 증가 시켰으며, 대용량 recycling PBR 은 Figure 3과 같았다.



Figure 2. Lab-scale recycling PBR system for ethanolysis reaction.



Figure 3. Bulk-scale recycling PBR system for ethanolsis reaction.

#### 다. 분석조건

##### (1) 지방산 분석

기질로 사용된 잣 및 1차년도에 평가위원이 제시한 기타 견과류의 지방산 조성 그리고 본 연구 과정 중 실시한 지방산 조성분석은 AOCS 방법 중  $\text{BF}_3$  (Boron trifluoride solution, 14% in methanol)방법에 의하여 실시하였다. 시료 유지 20 mg을 teflon 마개를 갖춘 test tube에 넣고 0.5 N methanolic NaOH 3mL를 첨가한 후 80°C에서 10분 동안 검화시켰다. 검화가 끝난 시료는 흐르는 물에서 1분간 냉각하고 여기에  $\text{BF}_3$  solution 3mL를 가한 후 다시 80°C에서 5분간 methylation 반응을 실시하였다. 반응이 끝난 시료

에 헥산 3 mL과 포화 NaCl 수용액 5mL를 가하고 vortex를 이용하여 격렬히 혼합하였다. 일정 시간 방치 후 상층부 (헥산과 지방산 메틸에스터)를 피펫으로 분리하여 수분을 제거하기 위하여 anhydrous sodium sulfate가 함유된 vial로 옮겼다. 반응이 완료된 용액 1 mL을 취하고 가스크로마토그래피를 이용하여 지방산을 분석 하였다. 사용된 column은 Supelco사 supelcowax 10이었으며, 규격은 길이 30 m, 내경 0.25 mm, film 두께는 0.25  $\mu$ m인 capillary column을 사용하였다. 분석조건은 Injector 온도 240 $^{\circ}$ C (split 50:1), 오븐온도는 180 $^{\circ}$ C에서 1분 정지 분당 1.5 $^{\circ}$ C의 속도로 240 $^{\circ}$ C까지 상승 후 5분 정지, 검출기 (FID) 온도는 250 $^{\circ}$ C, 이동상은 헬륨 (1 mL/min)을 사용하였다.

## (2) 피놀레닌산 에틸에스터 분석

에타놀리시스 반응을 통하여 생성된 에틸에스터 내에 피놀레닌산 및  $\Delta$ -5 지방산 에틸에스터 함량 및 각 지방산의 회수율은 가스크로마토그래피에 의하여 분석 하였으며, 그 과정은 다음과 같았다. 반응한 시료 약 20 mg 가량을 취하고 내부표준물질용액 (1 mg ethyl heptadecanoate in 1 mL *n*-hexane) 1mL에 녹인 후 1 uL를 GC (varian cp-3800)에 주입하여 분석 하였다. 분석에 사용된 column은 DB-1ht (15 m  $\times$  0.25 mm, 0.15  $\mu$ m, J&W) capillary column이고, carrier gas로는 헬륨을 사용하였고, 분당 1.5 mL씩 흘려주었다. Column oven 온도는 초기 150 $^{\circ}$ C에서 10분간 정지하고, 분당 10 $^{\circ}$ C씩 380 $^{\circ}$ C까지 승온 시킨 후 10분간 정지하였다. Injector는 50:1의 split mode에서 380 $^{\circ}$ C 온도로 설정되었고, detector는 flame ionization detector(FID)를 380 $^{\circ}$ C에서 사용하였다. 분석 결과에 대하여는 에틸 에스터화된 피놀레닌산의 농도 (PLA concentration)와 수율 (PLA yield)로 다음과 같이 정리하였다.

$$\text{피놀레닌산에틸에스터의 농도} = \frac{\text{피놀레닌산에틸에스터의 함량}}{\text{총 지방산에틸에스터의 함량}} \times 100$$

$$\text{피놀레닌산에틸에스터의 수율} = \frac{\text{피놀레닌산에틸에스터의 함량}}{\text{원료 잣기름에서의 피놀레닌산의 함량}} \times 100$$

## (3) 잣기름 트리글리세라이드 (triglyceride; TAG)의 sn-2 위치에 있는 지방산 조성분석

잣기름 트리글리세라이드의 sn-1,2,3 중 sn-2 위치의 지방산 조성 분석은 porcine pancreatic lipase를 이용한 방법이 사용되었다. 시료유지 10 -20 mg을 test tube에 넣고 여기에 1 M Tris-HCl buffer (pH 7.6) 2mL, 0.05% bile salts solution 0.5 mL, 2.2% CaCl<sub>2</sub> solution 0.2 mL, porcine pancreatic lipase 10 mg을 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 2 min간 방치한 후 15 mL diethyl ether

로 추출 하였다. 추출한 diethyl ether층은 추출 과정 중 이동된 수분을 제거하기 위하여 anhydrous sodium sulfate를 통과시켰다. 이 용액은 질소 기류에 의하여 적당량 농축 시킨 후 silica gel TLC plate에 주입하였다. 이때 사용된 TLC 전개용매는 hexane/diethyl ether/acetic acid (50:50:1, v/v/v)를 사용하였다. TLC 분리가 끝난 후 2,7-dichlorofluorecein 발색제로 검출하여 2-모노글리세라이드 (2-monoglyceride)를 분리하여 이 band를 분리한 후 앞에서 언급한 gas chromatography에 의한 지방산 분석 방법을 통하여 sn-2 위치에 존재하는 지방산의 조성을 분석 하였다.

#### (4) 잣기름 트리글리세라이드의 sn-1, 2, 3 위치에 있는 지방산 조성 분석

시료유지 30 mg을 건조된 2 mL diethyl ether에 녹인후 ethyl magnesium bromide (3 M in 100  $\mu$ L diethyl ether)를 가한 후 30 초간 vortex mixer로 잘 혼합하였다. 여기에 4 mL acidic buffer (mixture of 1 mL of 37% HCl and 36 mL of a 0.4 M boric acid solution in water)를 가하여 Grignard 반응을 정지 시켰다. 추출을 위해 5 ml의 diethyl ether를 첨가하고 추출된 diethyl ether층을 0.4 M boric acid 수용액으로 두 번 수세를 하였다. 수세가 끝난 diethyl ether층은 anhydrous sodium sulfate로 수분을 제거하고 질소를 이용 diethyl ether를 제거 하였다. 이 잔존물에 chloroform을 가하여 적당히 녹이고 이 용액을 3% boric acid에 침지 시켰던 silica TLC plate에 주입하였다. 이때 사용된 전개용매는 petroleum ether/diethyl ether/acetic acid (65:35:1, v/v/v)이었으며, 전개된 TLC plate에서 1,2(2,3)-DAG혼합물 층을 분리하였다. 이것 으로부터 얻어진 enantiomeric 1,2(2,3)-DAG 혼합물을 400  $\mu$ L toluene과 40  $\mu$ L dry pyridine에 섞고 이 혼합용액에 2 mg의 3,5-dinitrophenyl isocyanate를 녹인 용액을 가한 후 2시간 (30분) 동안 실온에서 방치 하였다. 이러한 반응으로부터 생성된 3,5-dinitrophenylurethane (DNPU) derivatives는 질소로 용매를 제거하고 소량의 chloroform에 녹인 후 TLC를 이용하여 유도체 층을 분리 하였다. 분리된 유도체 층은 diethyl ether로 추출한 후 enantiomeric 1,2(2,3)-DAG를 prep-LC를 이용 유도체 형태인 1,2-DAG와 2,3-DAG를 분리 하였다. 이때 사용된 HPLC column 은 chiral column (250  $\times$  4.6 mm i.d., 5  $\mu$ m, YMC-Pack A-K03, YMC Inc., Kyoto, Japan)을, 이동상은 n-hexane/1,2-dichloroethane /ethanol (40:10:1, v/v/v), column온도는 8 $^{\circ}$ C, flow rate는 0.5 mL/min, 검출기는 UV detector를 사용 254 nm에서 측정 하였다. 분획은 manual로 분획하였다. chiral column으로부터 분획된 1,2-DAG와 2,3-DAG chromatogram은 Figure 4과 같았다.



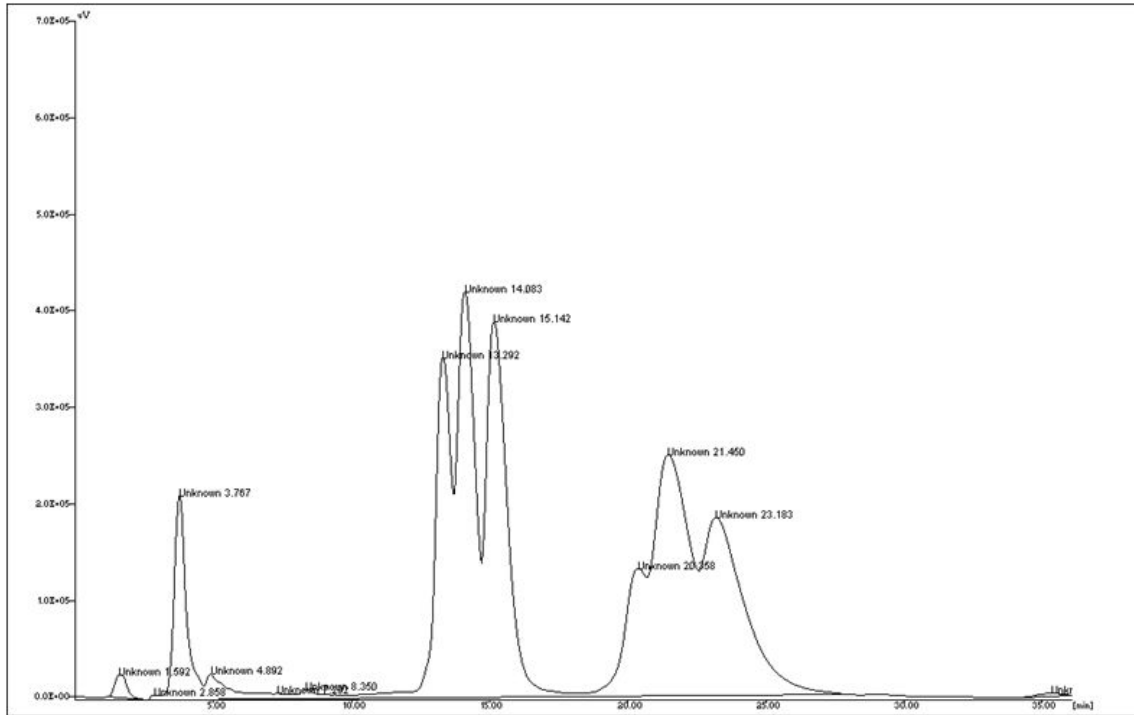


Figure 4. Chromatogram of DNPU derivatives of 1,2- and 2,3-DAG obtained by grignard reaction from pine nut oil.

## 2. 모노글리세라이드 (Monoglyceride) 합성

### 가. 기존의 방법을 이용한 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드 합성

#### (1) 재료

고려대학교에서 준비한 피놀레닌산을 이용하여 (주)일신웰스에서 기존의 방법을 사용하여 모노글리세라이드를 합성하고 그 특성을 비교분석하였다. 글리세롤은 Acidchem사로부터 구매하였고 그 외 실험 및 분석을 위한 각종 용매들이 사용되었다.

#### (2) 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드의 제조 및 농축

##### (가) 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드의 제조

1 L짜리 원형플라스크에 잣기름으로부터 얻은 피놀레닌산을 함유한 지방산 500 g과 글리세롤 160 g을 넣고 240°C의 반응온도가 될 때까지 150 rpm의 교반속도로 서로 혼합하였다. 반응온도가 240°C에 도달하면 정해진 시간 (10분과 30분, 60분) 동안 200 rpm으로 교반시키면서 반응시켰다.

(나) 분자증류기 (Short-Path Distillator)를 사용한 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드의 농축

피놀레닌산을 함유한 합성물을 여과하여 분자증류장치 (Lab-Scale Model, POPE Scientific Inc. USA, Figure 5와 6)의 feeding bottle에 넣고 1 ~ 2 torr로 감압하면서 140°C에서 1차 증류를 실시하여 반응되지 않은 글리세롤을 제거하였다. 이와 같이 1차 증류를 마친 잔류물을 2차 증류하기 위해 여과한 후 분자증류기에 투입하고 0.05 ~ 0.07 torr로 감압하면서 160°C, 180°C, 200°C의 증류 온도별로 증류물 (distillate)을 확보하여 각 증류 온도별 증류물 내의 모노글리세라이드 함량을 비교하였다. 이 결과로 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드를 증류하기에 적합한 증류 조건을 확인하였으며, 95% 이상 되는 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드를 제조하였다.

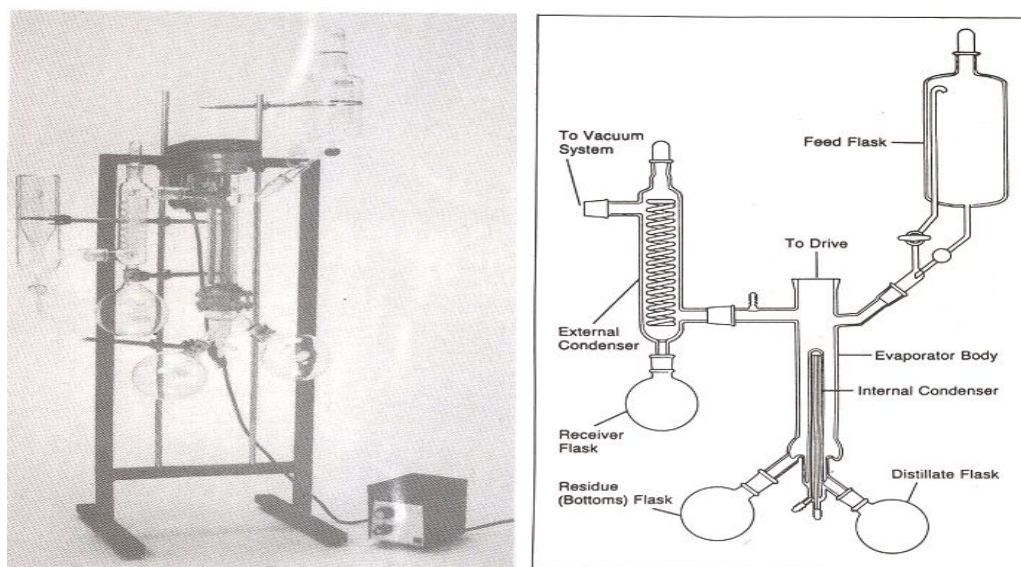


Figure 5. An apparatus of short-path distillator.

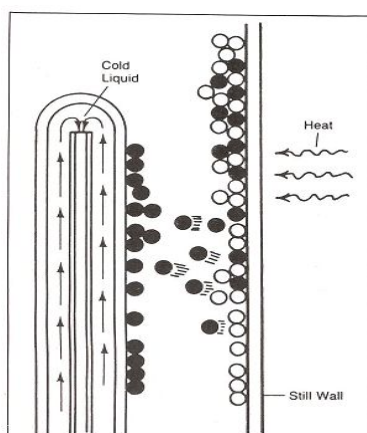


Figure 6. The movement of molecule in evaporator body (●: non-evaporated material, ○: evaporated material).

### (3) 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드의 일반 분석 실험

#### (가) 산가 측정

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

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

$S$ : 검체의 채취량(g)  
 $a$ : 0.1 N KOH 용액의 소비량 (mL)  
 $f$ : 0.1 N KOH 용액의 역가

#### (나) 비누화가 (검화가) 측정

검체 1 g을 200 mL의 플라스크에 정밀히 달아 넣고 0.5 N 수산화칼륨·에탄올 용액 50 mL을 정확하게 가하고 이에 갈아 맞춘 작은 환류냉각기를 달아 수욕 중에서 때때로 흔들어 저으면서 1시간 동안 가열하였다. 그런 다음 페놀프탈레인시액을 지시약으로 넣고 그 즉시 0.5 N 염산으로 과잉의 수산화칼륨을 적정하였다. 따로 검체를 사용하지 않고 같은 방법으로 공시험을 하여 아래의 계산식으로 비누화가를 계산하였다.

$$\text{비누화가} = 28.05 \times (b - a) \times f / S$$

$a$ : 검체를 사용하였을 때의 0.5 N 염산의 소비량 (mL)  
 $b$ : 공시험에 있어서의 0.5 N 염산의 소비량 (mL)  
 $S$ : 검체의 채취량(g)  
 $f$ : 0.5 N 염산의 역가

#### (다) 과산화물가 측정

유지시료 1 g을 칭량하여 초산·클로로포름 (3:2) 혼합용매 25 mL에 녹이고 요오드칼륨 과포화용액 1 mL을 가볍게 흔들어 섞은 다음 암소에 10분간 방치하였다. 이후, 물 75 mL을 가하여 세계 흔들어 섞은 다음 전분시액 1 mL을 지시약으로 하여 0.01 N 티오황산나트륨액으로 적정하였다.

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

$a$ : 0.01 N 티오황산나트륨액의 적정수 (mL)  
 $b$ : 공시험에서의 0.01 N 티오황산나트륨액의 소비량 (mL)  
 $f$ : 0.01 N 티오황산나트륨액의 역가

## (라) 지방산 분석

### (1) 지방산 조성 분석을 위한 전처리

100mL 둥근 플라스크에 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드 0.3 g을 넣고 여기에 0.5 N NaOH 6 mL을 첨가한 후 7분 간 검화 시킨 뒤  $\text{BF}_3$  (14% Boron trifluoride in methanol) 7 mL을 넣고 10분간 반응시켰다. 다음 heptane 5 mL을 넣고 1분 간 냉각 시킨 후, 여기에 과포화 NaCl 용액을 플라스크 목 부분까지 채웠다. 상층액을 1 ~ 2 mL 정도 취하여 0.45  $\mu\text{m}$  filter로 여과한 뒤 gas chromatography로 분석하였다.

### (2) Gas chromatography 분석조건

가스크로마토그래피 (Agilent GC 6890N, Shimadzu GC-17A)에 사용된 column은 Supelco사 SP-2560이었고, 규격은 길이 100 m, 내경 0.25 mm, film 두께는 0.20 $\mu\text{m}$ 인 capillary column을 사용하였다. 분석조건은 Injector 온도 260 $^{\circ}\text{C}$  (split 100:1), 오븐온도는 140 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분 정지 분당 4 $^{\circ}\text{C}$ 의 속도로 240 $^{\circ}\text{C}$ 까지 상승 후 15분 정지, 검출기 (FID) 온도는 260 $^{\circ}\text{C}$ , 이동상은 헬륨 (1.1 mL/min)을 사용하였다.

## (마) 모노글리세라이드 함량 분석

### (1) 시료의 전처리

Vial에 분석물질을 0.025 g을 넣고 0.5 mL의 Pyridine을 첨가하여 완전히 용해시켰다. 0.2 mL hexamethyldisilazane을 넣고 완전히 혼합한 다음 0.1 mL chlorotrimethylsilane을 넣고 완전히 섞어주었다. 이후 20분간 정지시킨 다음 상층액에서 1 mL를 취하여 0.45  $\mu\text{m}$  filter로 여과한 뒤 gas chromatography로 분석하였다.

### (2) GC 분석조건

가스크로마토그래피 (Agilent GC 6890N, Shimadzu GC-17A)에 사용된 column은 JXR silicone (1 m length $\times$  3 mm D.I.)인 capillary column을 사용하였다. 분석조건은 Injector 온도 300 $^{\circ}\text{C}$  (split 100:1), 오븐온도는 100 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15 $^{\circ}\text{C}$ 의 속도로 325 $^{\circ}\text{C}$ 까지 상승, 검출기 (FID) 온도는 340 $^{\circ}\text{C}$ , 이동상은 헬륨 (1.1 mL/min)을 사용하였다.

## (바) 표면장력과 유화안정성 측정

### (1) 올레산 함유 모노글리세라이드를 이용한 O/W 유화물 제조

올레산 (Oleic acid) 함유 모노글리세라이드와 폴리소르베이트 80 (polysorbate 80)를 6:4 비율로 충분히 혼합한 다음 물 대비 1%, 3%, 5% 그리고 7% (w/w) 비율로 투입한 다음 2000 rpm으로 교반하여 1차로 혼

합하였다. 모든 조건에 동일하게 7%의 대두유 (soybean oil)를 천천히 첨가하면서 최종 교반속도는 4000 rpm으로 유지한 채 10분 동안 homomixing을 한 후 각 조건별 샘플을 획득하였다. 획득한 시료를 각각 표면장력기 (Fisher Scientific Surface Tensiomat 21, with 6 cm ring)와 유화 안정성 시험 장치 (turbiscan)를 이용하여 유화 특성을 측정하였다.

### (2) 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드를 이용한 O/W 유화물 제조

합성된 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드와 폴리소르베이트 80 (polysorbate 80)를 6:4 비율로 충분히 혼합한 다음 물 대비 1%, 3%, 5% 그리고 7% w/w 비율로 투입한 다음 2000 rpm으로 1차 혼합하였다. 모든 조건에 동일하게 7%의 대두유를 천천히 첨가하면서 최종 교반속도는 4000 rpm으로 유지한 채 10분 동안 homomixer (T.K. Homomixer MARK II Model 2.5)로 혼합한 후 각 조건별 시료를 획득하였다. 획득한 시료를 각각 표면장력기와 turbiscan을 이용하여 유화 특성을 측정하였다.

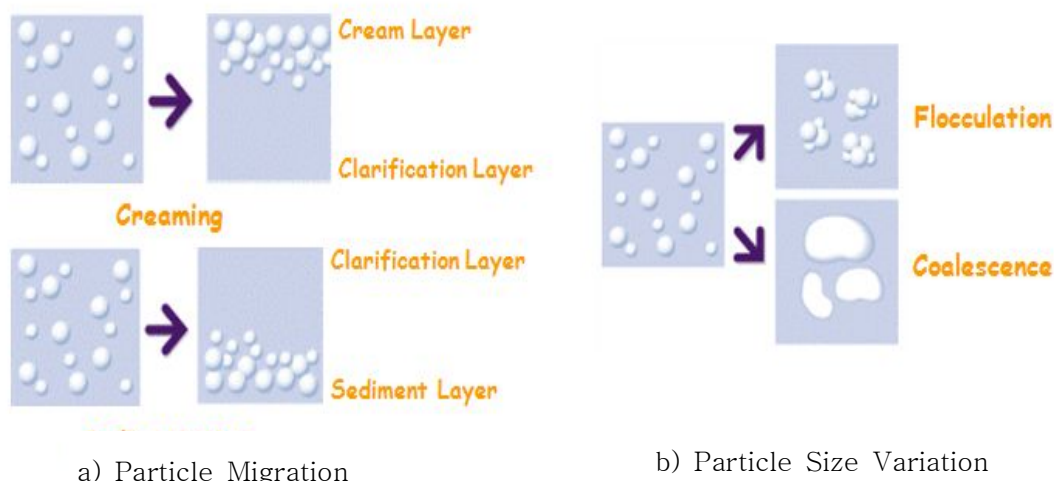
### (3) 유화안정성 평가

유화물은 서로 혼합할 수 없는 두 개의 상 (immiscible phase)인 분산상 (dispersed phase)과 연속상 (continuous phase)에 따라 Table 2과 같이 나눌 수 있다.

**Table 2.** Dispersed and continuous phase in diverse dispersed state.

Phase	Dispersion	Emulsion	Suspension	Foam
	Dispersed Phase	Liquid	Solid	Gas
Continuous Phase	Liquid	Liquid	Liquid	Liquid

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. 이러한 현상들을 살펴보면, Figure 7와 같다.



**Figure 7.** Declining process of emulsion and dispersion stability during storage period.

Particle migration 현상에 의해 분산안정성이 저하되는 경우에는 초기의 균일한 분산 상태와 마찬가지로 시료 전체의 농도는 동일하지만 시료 상층부와 하층부 간의 농도 구배가 발생하며, particle size variation 현상에 의해 분산 안정성이 저하되는 경우에는 시료 전체 높이에 대해 입자의 크기가 변화하는 것을 알 수 있다. 따라서, 본 연구에서 제조한 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드의 유효력을 확인하기 위하여 분산상태 및 분산 안정성의 변화를 확인함으로써 유효제로서의 사용 가능성을 평가하였다. 실험에 이용한 대조구는 기존에 양산되고 있는 올레산 함유 모노글리세라이드를 이용하였다. 측정기기는 turbiscan AGS (Automated Ageing Station for Characterization and Stability Study)을 사용하였다. 유효안정성 평가는 60°C에서 3일간 평가하였다.

#### 나. 잣기름으로부터 효소적 공법을 이용한 고순도 모노글리세라이드 합성

##### (1) 지방산 제조

잣기름 100 g을 2 L round flask에 넣고, 여기에 40 g의 NaOH를 100 g의 증류수에 녹여 가하고, 100 mL의 에탄올을 가하였다. 이 혼합물을 30 분간 reflux heating하여 검화하고, 검화가 끝난 반응물을 실온까지 냉각시킨 후 2 L separatory funnel로 옮겼다. 그 후 n-hexane 300 mL을 가하고 첨가된 NaOH의 몰수보다 과량의 HCl (6N)을 가한 후 비누분을 지방산으로 전환 시켰다. 하층을 버리고 상층부를 100 mL의 증류수로 2회 이상 수세하고 anhydrous sodium sulfate를 이용하여 n-hexane층 내 수분을 제거 하였다. 용매는 감압 증발기를 이용하여 제거하고 얻어진 지방산은 -80°C 냉동고에서 보관 하면서 반응 기질로 사용 하였다.

## (2) 효소를 이용한 모노글리세라이드 합성

### (가) 실험실 규모(Lab scale)에서의 모노글리세라이드 합성

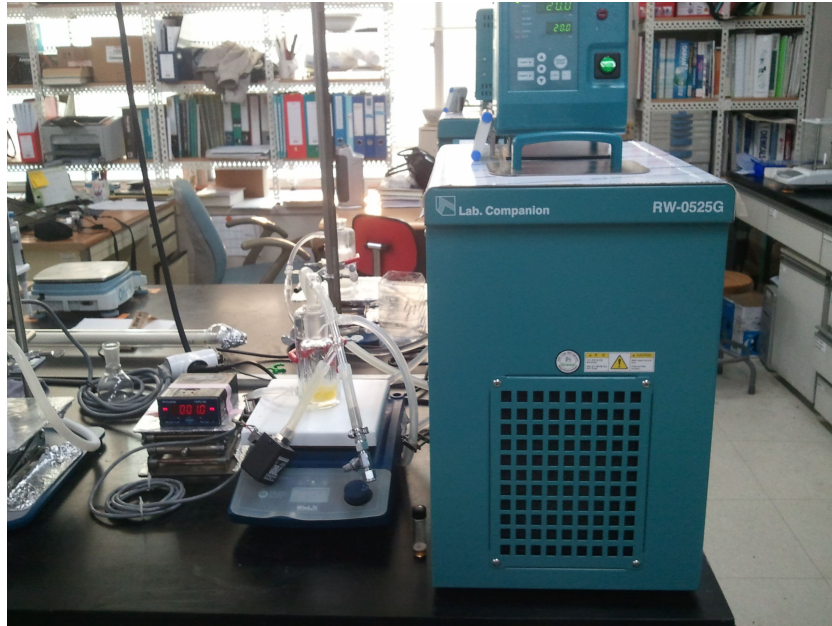
효소를 이용한 모노글리세라이드 합성은 Figure 8와 같이 circulator가 부착된 이중 자켓 반응기를 사용하였다. 반응의 기질은 글리세롤과 지방산로 총 기질의 양은 10 g으로 하고 기질간의 몰비율은 일정하게 유지시켰다. 기질을 반응기에 넣고 효소 또는 수분이 함유된 효소 용액을 첨가 한 후 300 rpm로 교반시키면서 반응을 시작하였다. 그러나 모노글리세라이드가 생성되고 그 양이 증가하면서 반응물의 점도가 증가하여 교반속도를 유지할 수 없는 상태가 되었다. 반응 조건에 따라 조금씩 차이를 보이지만 300 rpm에서 교반이 잘 이루어지지 않는 시점부터 최종 단계에서는 70 ~ 100 rpm의 속도로 교반되었다. 반응 시간마다 일정량의 시료를 취하여 지방산과 모노글리세라이드, 디글리세라이드의 조성을 분석하였고, 모노글리세라이드의 순도는 아래 식과 같이 디글리세라이드와의 조성비로부터 계산되었다. 반응물로부터 수분 제거를 위한 진공 시스템은 Figure 9과 같았다.

$$\text{모노글리세라이드 순도 (\%)} = \frac{\text{모노글리세라이드}}{\text{모노글리세라이드} + \text{디글리세라이드}} \times 100$$



Figure 8. Reaction system for production of monoglyceride by enzymatic esterification.





**Figure 9.** Reaction system for production of monoglyceride by enzymatic esterification with vacuum system.

#### (나) 모노글리세라이드의 대량 생산 (Bulk scale)

실험실 규모의 모노글리세라이드 합성은 10 g 규모의 크기에서 주관 연구기관인 고려대에서 실시하였고, 20배 크기로 증가된 대용량 반응은 주관 연구기관의 정보와 기술을 바탕으로 제2세부 (주: 일신웰스) 에서 실시하였다. 반응 시스템은 Figure 10과 같았다. 온도는 실험실 규모의 경우와 같이 circulator를 이용하여 실시하였으나, 교반은 magnetic stirrer 대신에 dynamic mixer type을 사용하였다.



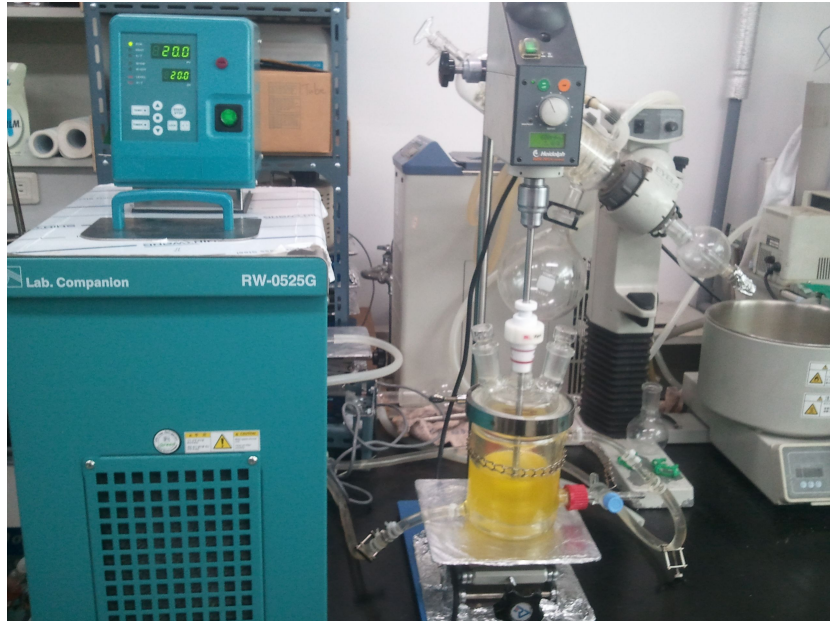


Figure 10. Bulk scale reaction system for production of monoglyceride by enzymatic esterification.

### (3) 지방산과 모노글리세라이드, 디글리세라이드의 조성 분석

에스테르 반응 (esterification)을 통하여 생성된 반응물 내 잔존 지방산 (fatty acid)과 합성된 모노글리세라이드와 디글리세라이드의 함량을 측정하기 위하여 3가지 물질의 표준물질을 이용하여 가스크로마토그래피의 분석조건에서의 response factor 구하고 실제 분석된 면적값에 적용시켜 각 물질의 무게비에 따른 조성을 구하였다. 반응물 10 mg에 chloroform 1 mL를 가한 후 가스크로마토그래피를 이용하여 분석하였으며, 분석에 사용된 column은 DB-1ht (15 m × 0.25 mm, 0.15 μm, J&W) capillary column이고, carrier gas로는 헬륨을 사용하여 분당 1.5 mL씩 흘려주었다. 오븐 온도는 초기 100°C에서 3분간 정치하고, 분당 20°C씩 360°C까지 승온 시킨 후 13분간 정치하였다. Injector 온도는 370°C, split ratio는 50:1로 설정하였고, detector는 flame ionization detector(FID)를 사용하였으며, 온도는 370°C로 하였다.

## 3. 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드를 유화제로 이용한 시제품 생산

### 가. 마요네즈 시제품 생산

### (1) 실험재료

식물유로 시판용 샐러드유를 사용하였고, 시판되는 달걀 중에 난황을 이용하였으며, 부재료로 식초, 설탕, 소금, 향신료, 안정제 및 유화제가 사용되었다. 특히 유화제에 대한 비교이므로 기존 마요네즈 제품에 사용되는 유화제와 스테아린산을 이용하여 합성된 모노글리세라이드와 피놀레닌산을 이용하여 합성된 모노글리세라이드를 사용하여 유화력을 비교하였다.

### (2) 제조 배합비 및 제조 방법

본 과제 시제품인 마요네즈는 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드와 스테아린산 함유 모노글리세라이드 (Almax-1000)을 이용하여 제조하였다. 마요네즈에 사용되는 원료의 배합비는 Table 3에서 제시한 일반적 마요네즈의 배합비를 기준으로 하여 조절하였다. 본 과제의 시제품으로 제조된 마요네즈의 배합비는 Table 5-7에 제시되었다.

마요네즈의 제조 공정도는 Figure 11과 같으며, 본 실험에서는 콜로이드 밀의 부재료 혼합공정까지만 진행하여 마요네즈의 성상을 확인하였다. 마요네즈는 난황, 조미료, 향신료와 식초의 일부를 혼합하여 균일한 상태를 만든 다음 혼합기(mixer, HOBART N50, Figure 12)에서 식물유와 나머지의 식초를 첨가하면서 계속 교반하여 유화 안정화를 진행하였다. 샐러드유의 첨가속도는 oil particle의 크기에 큰 영향을 미치는 것으로 조사되었으며, 그 경향성은 첨가속도가 늦을수록 oil particle의 크기는 작고 마요네즈의 점도는 높아지면서 유화상이 안정화되는 것으로 보고되고 있다.

Table 4. Recipe for production of mayonnaise

Source	Vegetable oil	Vinegar	Egg yolk	Sugar	Salt	Spice
Composition (%)	75	11	9	2.5	1.5	1.0

**Table 5.** Recipe for production of mayonnaise with monoglyceride containing stearic acid (Almax-1000)

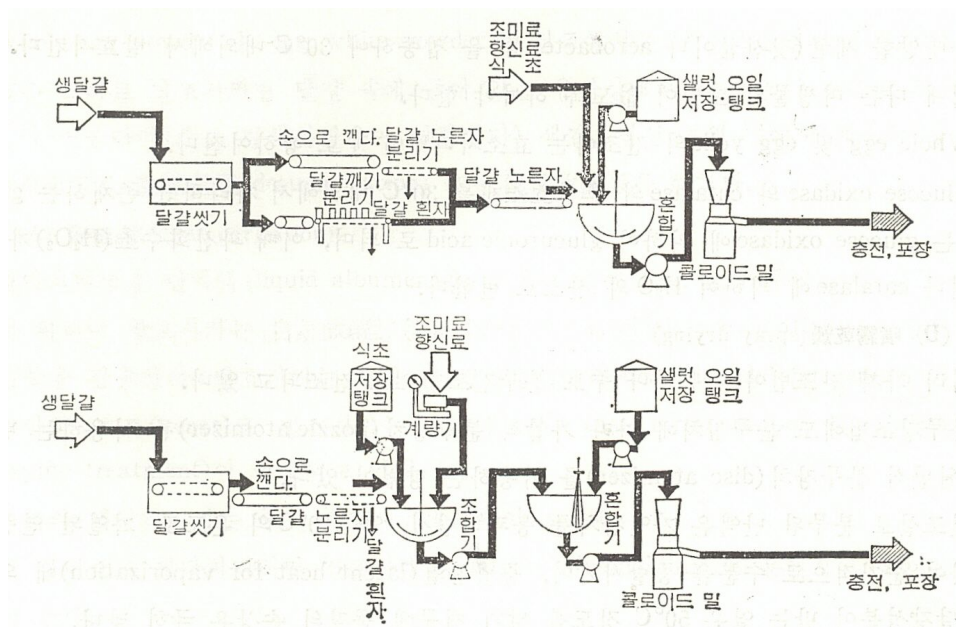
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5
Vegetable oil	75	75	75	75	75
Egg yolk	9	9	9	9	9
Vinegar	11	11	11	11	11
Sugar	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Salt	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Spice	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Stabilizer	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
<b>Almax-1000</b>	<b>0</b>	<b>0.05</b>	<b>0.1</b>	<b>0.15</b>	<b>0.2</b>
Total	100.1	100.15	100.2	100.25	100.3

**Table 6.** Recipe for production of mayonnaise with monoglyceride containing pinolenic acid (PLA-MAG, product manufactured in Korea University)

	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5
Vegetable oil	75	75	75	75	75
Egg yolk	9	9	9	9	9
Vinegar	11	11	11	11	11
Sugar	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Salt	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Spice	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Stabilizer	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
<b>PLA-MAG</b>	<b>0</b>	<b>0.05</b>	<b>0.1</b>	<b>0.15</b>	<b>0.2</b>
Total	100.1	100.15	100.2	100.25	100.3

**Table 7.** Recipe for production of mayonnaise with mixture of monoglyceride containing pinolenic acid (PLA-MAG) and monoglyceride containing stearic acid (Almax-1000)

	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5
Vegetable oil	75	75	75	75	75
Egg yolk	9	9	9	9	9
Vinegar	11	11	11	11	11
Sugar	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Salt	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Spice	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Stabilizer	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
<b>Almax-1000</b>	<b>0</b>		<b>0.05</b>		<b>0.1</b>
<b>PLA-MAG</b>	<b>0</b>	<b>0.1</b>	<b>0.05</b>	<b>0.2</b>	<b>0.1</b>
Total	100.1	100.2	100.2	100.3	100.3



**Figure 11.** Process for manufacture of mayonnaise.



Figure 12. HOBART MIXER.

### (3) 유화 안정성 측정

#### (가) 동결법

일정 용기에 시료를  $-18^{\circ}\text{C}$ 의 냉동고에 넣은 다음, 1시간 간격으로 꺼내  $30^{\circ}\text{C}$ 의 항온기에서 2시간 동안 방치하여 유분리 유무를 검사한 후, 유상과 수상의 분리 여부를 관찰하였다.

#### (나) 물성평가

제조된 마요네즈의 점도와 pH를 측정하여 결과를 비교하였다. 점도는 BROOKFIELD사의 DV-II/VISCOMETER를 이용하였으며, pH측정은 TOA Electronics사의 pH meter/HM-20S를 이용하여 측정하였다.

### 나. 두유 시제품 생산

#### (1) 실험재료

두유 제조시, 두유 제품에 침전물이 생기지 않고 제품이 잘 섞이게 해 주기 위해 유화제인 레시틴, 글리세린지방산에스테르와 안정제인 카라기난 등을 첨가해 주는데, 본 연구로 획득한 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드를 사용하여 기존 유화제를 대체 사용하여 두유를 제조하였다.

이외 제품의 보존성 향상과 발색기능 역할의 pH조정제와 제품 점성을 높여주는 증점제 (잔

탄검), 제품의 단맛을 느끼게 하는 감미료와 향을 더해 주는 합성향미료는 기존 제품과 동일하게 사용하였다.

## (2) 제조 배합비 및 제조 방법

두유 시제품의 제조 비율은 Table 8과 같다. 대두에서 이물을 제거하고 Impactor를 사용하여 대두에 충격을 가해 쪼개고 분리기(separator)를 통해 대두피 및 배아를 제거한다. 정선된 반할두는 보관탱크에 보관되다가 제품 제조시 침지공정을 거친다. 물에 불린 대두는 homogenizer (APV GAULIN, INC / 15MR-8TBA / 8,000 PSIG, 그림3)를 통해 마쇄하고 정치한 후 마쇄액은 Decanter로 분리공정을 거치며 이때 비지가 제거 된다. 비지가 제거되면 대두단백질과 기능성원료 (피놀레닌산 함유 모노글리세라이드) 및 영양강화 성분은 homomixer (T.K. HOMOMIXER MARK II/ MODEL 2.5, Figure 13)를 통하여 배합하면서 균질화 공정을 거친다. 균질화 공정 후 121℃ 온도 조건으로 멸균 처리한 후 용기에 담는다. 두유 제조 공정은 Figure 14와 같다.



Figure 13. HOMOMIXER (left) & HOMOGENIZER (right).

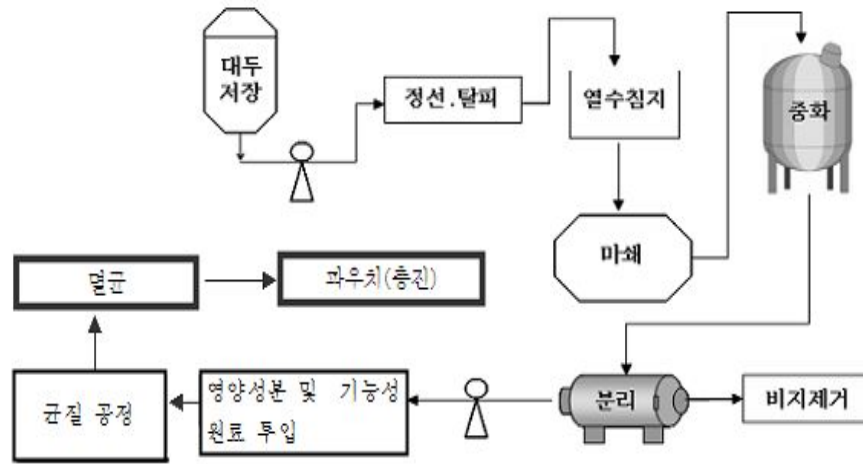


Figure 14. Process for manufacture of soy milk.

Table 8. Recipe for production of soy milk

Source	Composition (%)
Soybean juice (Brix)	92.20
Sodium hydrogen carbonate	0.04
Monoglyceride containing pinolenic acid	0.13
Corn oil	1.50
Fructose	5.77
Other	0.36
Total	100

### (3) 시제품 평가

#### (가) 차이식별평가

기존 제품과 시제품에 대한 차이식별 평가를 통하여 시제품의 상품화 가능성을 평가한다.

#### (나) 만족도평가

검사자들의 미각 및 식감 평가를 통하여 시제품의 상품화 가능성을 평가한다.

## 제 2 절 연구결과

### 1. 에타놀리시스를 이용하여 잣기름으로부터 피놀레닌산 농축

#### 가. 에타놀리시스의 회분식 반응 시스템 최적화

##### (1) 견과류 내 피놀레닌산 함량 비교

잣 이외에 다른 견과류에서도 피놀레닌산을 얻을 수 있는지를 검토해 보았다. 조사된 품목은 산지별 잣 3종 (한국산, 중국산, 북한산)과 내피를 제거하지 않은 일명 황잣 (brown pine nut) 등 총 4종의 잣과, 기타 견과류인 호두와 캐슈넛, 아몬드, 피스타쵸 등이었다. Table 9에서 보듯이 견과류에는 대체로 리놀레산 (18:2)과 올레산 (18:1)이 풍부하게 함유되어 있어 불포화 지방산이 총 지방산의 90% 이상을 차지하고 있다. 그러나 피놀레닌산 (18:3,  $\Delta$ 5)은 잣에서만 검출이 되었고 산지나 종류에 상관없이 전체 지방산의 14-15%가 함유되어 있는 것으로 확인되었다. 뿐만 아니라 잣에서는 피놀레닌산 (잣에 함유되어 있는  $\Delta$ 5에 이중결합이 있는 지방산들 중 80% 이상 함유) 이외의 소량이지만  $\Delta$ 5에 이중결합을 갖는 지방산들 (taxoleic acid: 18:2,  $\Delta$ 5; sciadonic acid: 20:3,  $\Delta$ 5)도 함유되어 있었다.



**Table 9.** Fatty acids composition of different edible nuts

	(wt %)							
지방산	Pine nut I	Pine nut II	Pine nut III	Brown pine nut	Walnut	Casunut	Amond	Pistachio
16:0	4.85	4.90	4.81	4.87	6.59	8.22	6.00	11.19
18:0	2.18	2.22	2.12	2.16	2.13	6.78	1.23	0.95
18:1(n9)	26.34	27.55	26.45	26.94	21.79	66.78	70.32	52.97
18:1(n7)	0.40	0.43	0.41	0.41	0.90	0.32	1.14	2.01
18:2( $\Delta$ 5)	2.22	2.20	2.22	2.26	0.00	0.00	0.00	0.00
18:2 (n-6)	46.66	45.34	46.11	46.30	59.82	17.68	21.31	32.44
<b>18:3(<math>\Delta</math>5)</b>	<b>14.44</b>	<b>14.27</b>	<b>15.19</b>	<b>14.12</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>
18:3 (n-3)	0.00	0.16	0.00	0.00	8.77	0.21	0.00	0.44
20:1	1.24	1.29	1.14	1.27	0.00	0.00	0.00	0.00
20:2	0.61	0.64	0.58	0.62	0.00	0.00	0.00	0.00
20:3( $\Delta$ 5)	1.06	0.99	0.96	1.06	0.00	0.00	0.00	0.00

Pine nut I: from Korea

Pine nut II: from China

Pine nut III: from North Korea

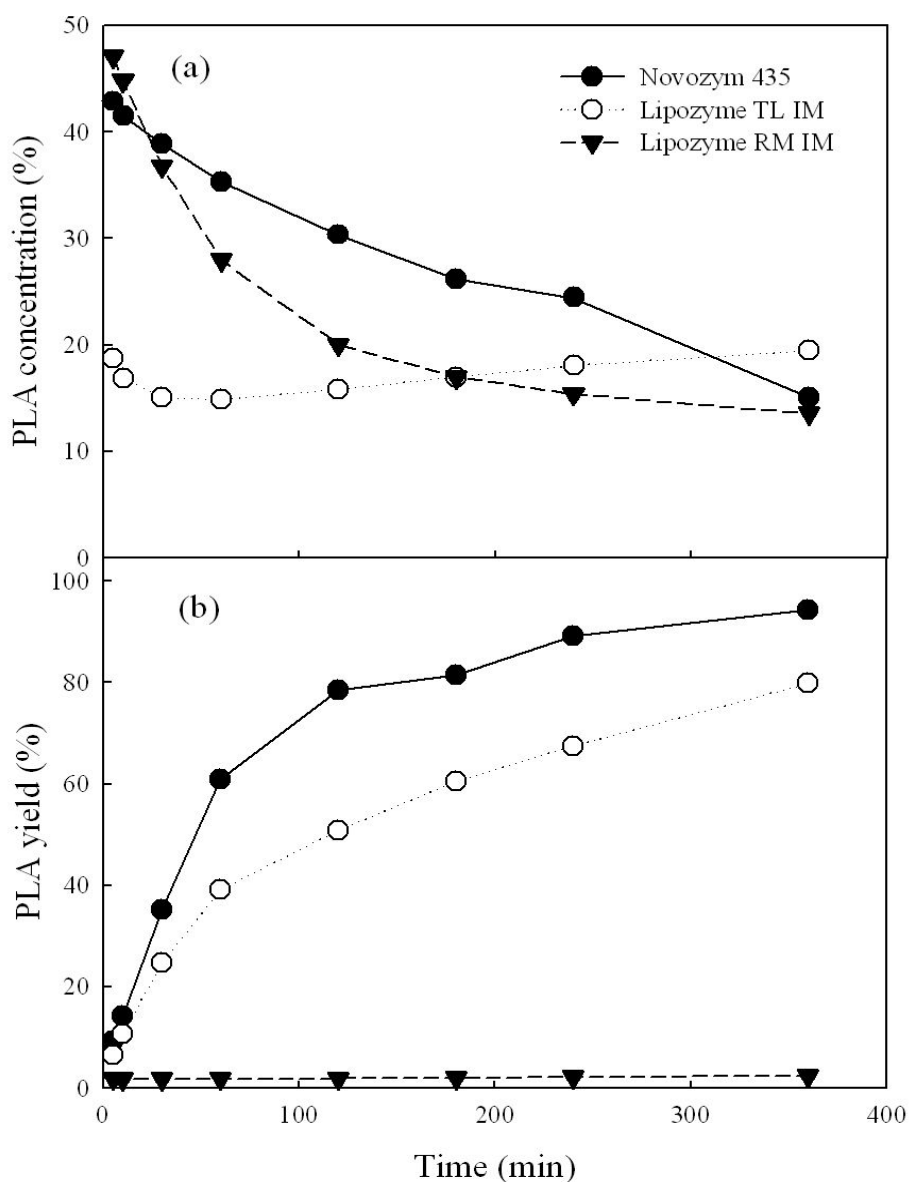
## (2) 피놀레닌산 농축을 위한 효소 스크리닝 (screening)

현재 식품에 상업적으로 이용 가능한 대표적인 리파아제들은 Lipozyme TL IM (*Thermomyces lanuginosa* lipase)과 Lipozyme RM IM (*Rhizomucor miehei* lipase), Novozym 435 (*Candida antarctica* lipase type B)로 현재 지질 관련 반응 (예로서 에스테르 반응 및 에타놀리시스 반응)에 가장 많이 사용되는 효소이다. 따라서 이번 연구에서는 이 세 가지 효소를 이용하여 잣기름에서부터 피놀레닌산을 에타놀리시스 반응을 통하여 가장 효율적으로 농축시킬 수 있는 효소를 선정하고자 하였다. 효소를 스크리닝한 결과는 Figure 15과 같이 Novozym 435와 Lipozyme RM IM의 경우 초기 반응에서는 생성된 총 지방산 에틸에스터 내 피놀레닌산 에틸에스터의 함량 (PLA concentration)이 35% 이상이었으나 360분 후에는 각각 15%와 13%까지 감소하였다. 반면 Lipozyme TL IM의 경우 반응시간이 길어지더라도 총 지방산 에틸에스터 내 피놀레닌산 에틸에스터의 함량은 20% 정도로 큰 차이 없이 유지되는 결과를 보여 주었다. 따라서 피놀레닌산 에틸에스터의 농도 변화에 의한 결과로는 Novozym 435 또는 Lipozyme RM IM을 사용하는 것이 효율적이었다.

잣기름에 함유되어 있는 피놀레닌산 중 효소반응으로 에틸에스터화되어 얻어진 피놀레닌산의 회수율은 (PLA yield)은 시간이 흐름에 따라 Novozym 435와 Lipozyme TL IM의 경우 상승하는 것을 확인할 수 있었다. 360분 동안 Novozym 435를 이용하여 반응하였을 때는 94%까지 상승하였고, Lipozyme TL IM은 80%까지 증가되었다. 그러나 Lipozyme RM IM의 경우 모든 시간대에서 피놀레닌산의 회수율은 3% 이하로 매우 낮은 값을 나타내었다.

Novozym 435는 에탄올과 같은 극성 유기용매가 존재할 경우 트리글리세라이드의 *sn*-1,3 위치의 지방산을 잘 분해하고 에틸에스터화 하며, 특히 초기 반응에는 *sn*-3 위치에 있는 지방산을 선택적으로 분해하여 에틸에스터 형태로 전환 시키는 특징을 가진 것으로 보고되어 있다. 한편 Lipozyme RM IM의 경우에 트리글리세라이드의 *sn*-1,3에 높은 위치 특이성을 가지고 있기는 하지만, 다중 불포화 지방산 (poly unsaturated fatty acid, PUFA)에 대하여서는 비선택성을 가지고 있기 때문에, 에타놀리시스나 산분해 (acidolysis) 등에 작용하는 활성이 약한 것으로 알려져 있다 (Shimada et al., 2002; Moreno et al., 2005).

결론적으로 피놀레닌산 에틸 에스터의 농도와 피놀레닌산의 회수율에 의해 세 가지 효소의 반응성을 비교해 보았을 때, 에타놀리시스 반응을 이용하여 잣기름으로부터 피놀레닌산을 효과적으로 농축하기 위하여 Novozym 435가 가장 적합한 효소인 것으로 나타났다.



**Figure 15.** Effect of various enzymes on the ethanolsis of pine nut oil in a batch reactor as a function of time. PLA concentration: pinolenic acid concentration in fatty acid ethyl ester produced by ethanolsis. PLA yield: Yield of pinolenic acid ethyl ester produced by ethanolsis. Reaction conditions – Mole ratio (pine nut oil to ethanol); 1:100 (3 g), Water content; <100ppm, Temperature; 25°C, Enzyme loading; 5% (0.15g) of weight of substrate, Shaking speed; 300rpm.

### (3) 피놀레닌산 농축을 위한 잣기름과 에탄올의 몰비율 효과에 대한 조사

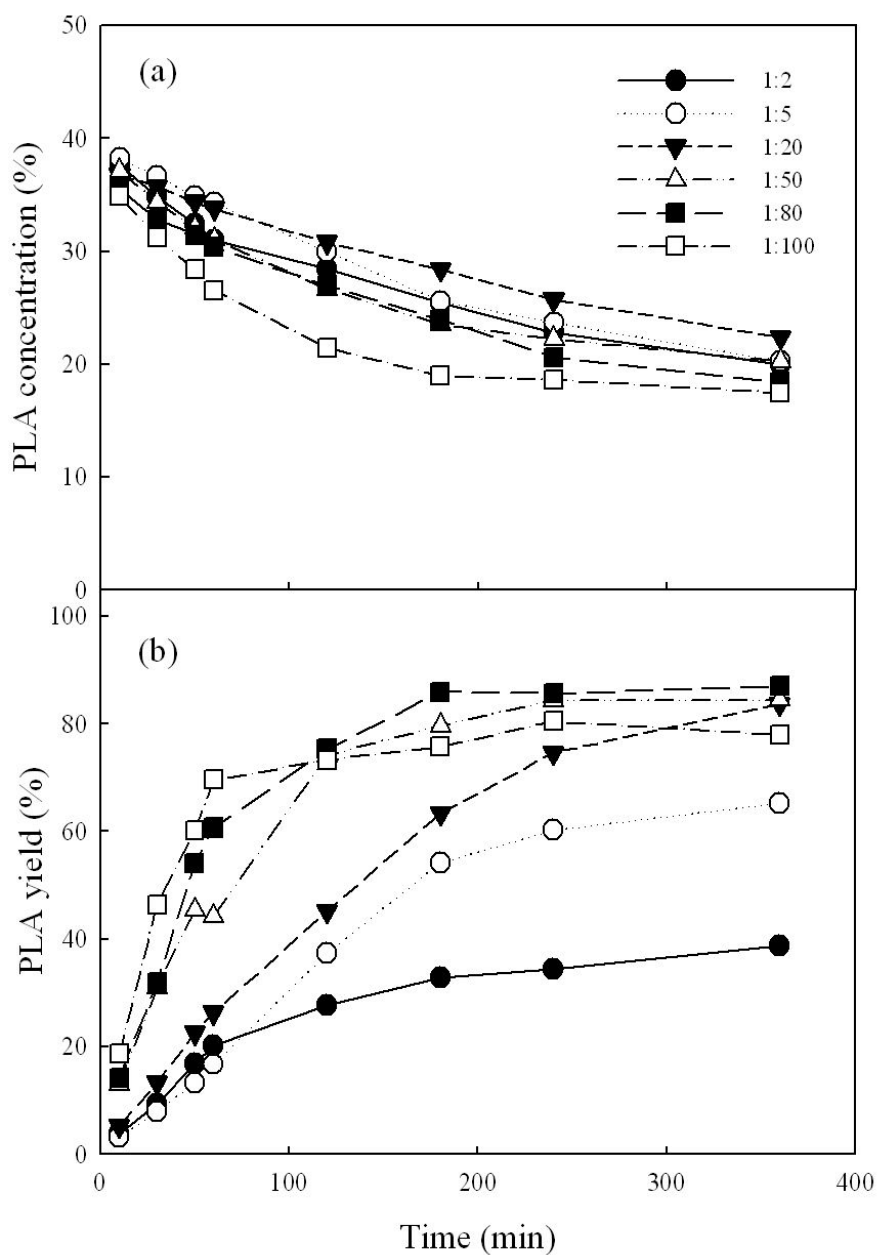
효소 스크리닝으로부터 선정된 *Novozym 435* (*Candida antarctica*로부터 유래)를 이용하여 잣기름과 에탄올의 몰비율을 변화시켜 피놀레닌산 농축 효과를 조사한 결과를 Figure 16에 제시하였다.

반응 초기에 에틸에스터 형태로 전환된 피놀레닌산 에틸에스터의 함량은 전환된 총 지방산 에틸에스터의 약 35% 이상인 것으로 나타났다. 이는 원료 잣기름의 피놀레닌산 함량이 총 지방산을 기준으로 약 14%인 것을 고려할 때 2.5에서 3배 정도의 농축 효과를 나타낸 것이다. 또한 잣기름에 존재하는 피놀레닌산은 주로 트리글리세라이드의 *sn*-3 위치에 존재 (잣기름에 존재하는 총 피놀레닌산의 95% 이상)하므로 초기 반응의 결과를 통하여 *Novozym 435*가 에타놀리시스 초기 반응에서 *sn*-3 위치의 지방산을 선택적으로 반응하는 효소임을 확인할 수 있었다. 본 연구에서 확인된 *Novozym 435*의 위치 특이성에 관한 결과는 트리글리세라이드를 대상으로한 model system 연구에서도 유사한 결과를 보여주었다. 그러나 반응시간이 길어짐에 따라 *sn*-3 위치의 지방산이 고갈되고, 피놀레닌산이 거의 함유되어 있지 않은 *sn*-1 위치의 지방산들이 에틸에스터로 전환됨에 따라 상대적으로 피놀레닌산 에틸에스터의 농도가 점점 감소되는 결과를 나타내었다. 농도의 감소율은 대체로 360분의 반응시간이 흘러도 계속적으로 감소되는 경향을 보였으며, 그 중에 특히 에탄올을 잣기름의 몰량에 비해 20배 더 추가하였을 때 피놀레닌산의 농도가 가장 느리게 감소하는 경향을 보였다. 그리고 잣기름과 에탄올의 몰 비율이 1:100에서 반응한 것은 다른 몰 비율에서 보다 빨리 감소하여 180분 만에 18.98%까지 감소하였고 그 이후로 농도가 더욱 느리게 감소하긴 하였지만 360분 후에는 가장 낮은 농도인 17.47%를 나타내었다. 이러한 결과는 에탄올 함량이 많아질수록 반응속도가 빨라지고 에타놀리시스 반응 시 잣기름에 비하여 에탄올의 양이 많을수록 *Novozym 435*의 *sn*-1,3 특이성이 강하게 작용하는 효과 (Shen and Wijesundera, 2006)도 있는 것으로 추정된다.

피놀레닌산이 에틸에스터화되어 회수되는 비율은 모든 몰비율에서 반응시간이 길어질수록 증가되었고, 반응속도에서는 잣기름과 에탄올의 몰비율이 1:20일 때까지 반응이 매우 느리게 진행되는 것을 확인할 수 있었다. 피놀레닌산 에틸에스터의 농도가 가장 빨리 감소하였던 1:100의 몰 비율은 60분부터 안정화되는 경향을 보였으나 최종 수율이 80%보다 낮았다. 그러나 1:80의 비율은 180분부터 안정화되는 경향을 보여 1:100의 비율에서보다 느린 반응성을 보이긴 하였지만 85.93%로 다른 몰 비율에서 보다 최대의 수율을 보여주었다.

에타놀리시스 반응의 경향을 보면 몰비율에 상관없이 반응시간이 증가하면서 피놀레닌산

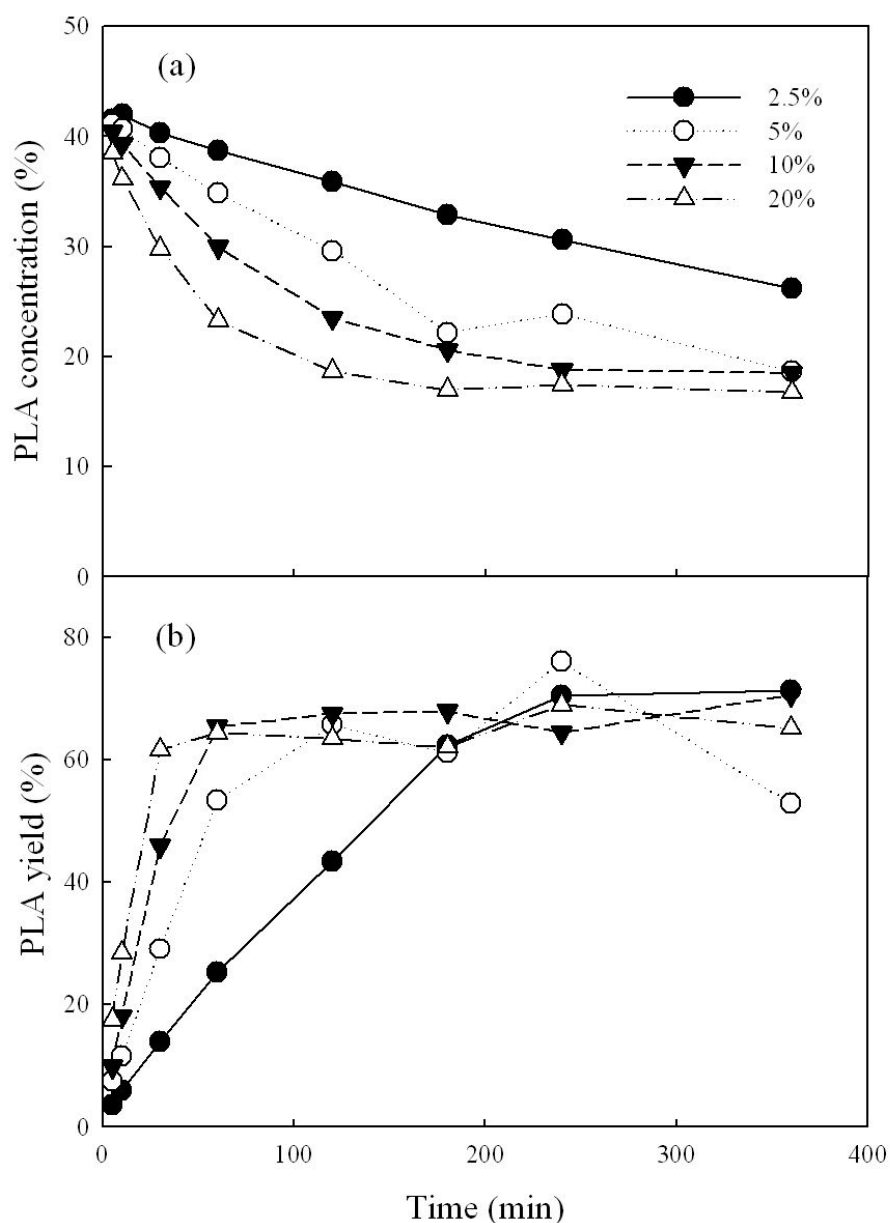
에틸에스터의 농도는 증가하지만 에틸에스터화되는 피놀레닌산의 수율은 감소되는 것을 알 수 있었다. 따라서 에틸에스터화된 지방산 중 피놀레닌산의 농도가 약 30%정도일 때 농도 측면에서는 비교적 높은 수치이면서 반응속도도 빠르고 수율 역시 높게 나타나는 1:80과 1:100의 몰비율에서는 피놀레닌산 수율의 반응속도가 변화를 보이는 시기이기도 하여 각 몰비율에서 피놀레닌산의 농도가 30%가 되는 시점에서의 수율을 비교하였다. 그 결과 잣기름과 에탄올의 몰비율이 1:80이고 반응시간 50-60분인 조건에서 31% 피놀레닌산 함량을 갖는 농축물을 얻을 수 있었고 이때 수율도 60%로 높은 수준을 유지하였다. 반면에 1:100의 경우에는 반응시간 30분에 31%의 피놀레닌산 함량을 갖는 농축물을 얻을 수 있었고 이때 수율은 46%로 1:80에 비하여 매우 낮은 수율을 보여 주었다. 몰비율이 낮은 경우 예로서 1:2 및 1:5인 경우에는 피놀레닌산 함량이 31% 이었을 경우 수율이 30% 이하로 역시 매우 낮은 것으로 나타났다. 따라서 피놀레닌산 함량 및 수율을 고려해 볼 때 잣기름과 에탄올의 최적 몰비율은 1:80 (무게비로 1:4)이 가장 효과적인 비율인 것으로 나타났다.



**Figure 16.** Effect of mole ratio of substrate on the ethanolsis of pine nut oil in a batch reactor as a function of time. PLA concentration: pinolenic acid concentration in fatty acid ethyl ester produced by ethanolsis. PLA yield: yield of pinolenic acid ethyl ester produced by ethanolsis. Reaction conditions – Water content; <100ppm, Temperature; 25°C, Novozym 435; 5% (0.15g) of weight of substrate, Shaking speed; 300rpm.

#### (4) 피놀레닌산 농축을 위한 효소량 효과에 대한 조사

잣기름과 에탄올의 몰비율은 1:80으로 하고 총 기질 (잣기름과 에탄올)을 기준으로 효소 (Novozym 435) 량의 변화에 따라 피놀레닌산 농축효과를 조사하여 보았다. 그 결과 Figure 17 에서와 같이 효소량 2.5%부터 10%까지 효소량이 많아질수록 반응속도가 빨라지면서 에틸에스터화된 피놀레닌산의 농도가 급격히 감소하고, 에틸에스터화되면서 회수되는 피놀레닌산의 양은 유의적 차이를 보이면서 증가하였다. 그러나 10%와 20%에서는 효소량 증가에 따른 반응속도가 크게 둔화 되는 경향을 보여 피놀레닌산의 농도나 수율에서 두 가지 효소량 (10%와 20%) 사이에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 초기반응에서 에틸에스테르화된 피놀레닌산의 함량이 30%인 농축물을 10%의 효소량에서는 60분의 반응시간에 얻을 수 있었으며, 이때 수율은 83%로 나타났다. 그러나 효소량 20%의 경우는 피놀레닌산 함량이 30%인 농축물을 30분 만에 얻을 수 있었으나, 수율에 있어서 77%에 불과 하였다. 이상의 결과로부터 효소량이 증가할수록 농도와 수율이 안정화되는 시간이 빨라지는 것을 확인할 수 있었으며, 반응 시간의 단축과 피놀레닌산 농축 정도 및 수율을 고려하였을 때 10% 효소량이 에타놀리시스 반응을 이용한 피놀레닌산의 농축에 적합한 것으로 나타났다.

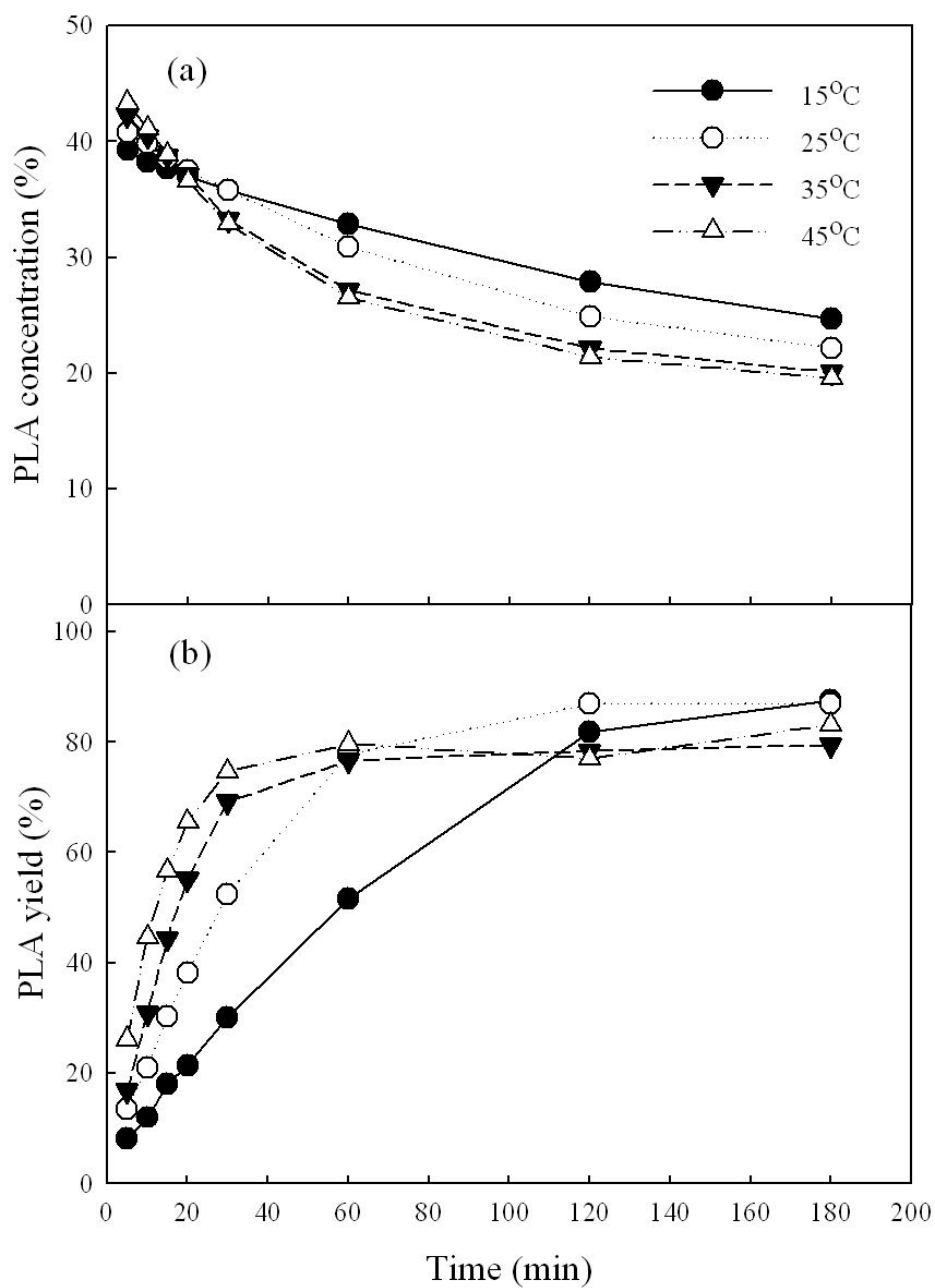


**Figure 17.** Effect of enzyme loading on the ethanolsis of pine nut oil in a batch reactor as a function of time. PLA concentration: pinolenic acid concentration in fatty acid ethyl ester produced by ethanolsis. PLA yield: yield of pinolenic acid ethyl ester produced by ethanolsis. Reaction conditions – Mole ratio (pine nut oil to ethanol); 1:80 (3 g), Water content; <100ppm, Enzyme; Novozym 435, Temperature; 25°C, Shaking speed; 300rpm.



#### (5) 피놀레닌산 농축을 위한 반응온도 효과에 대한 조사

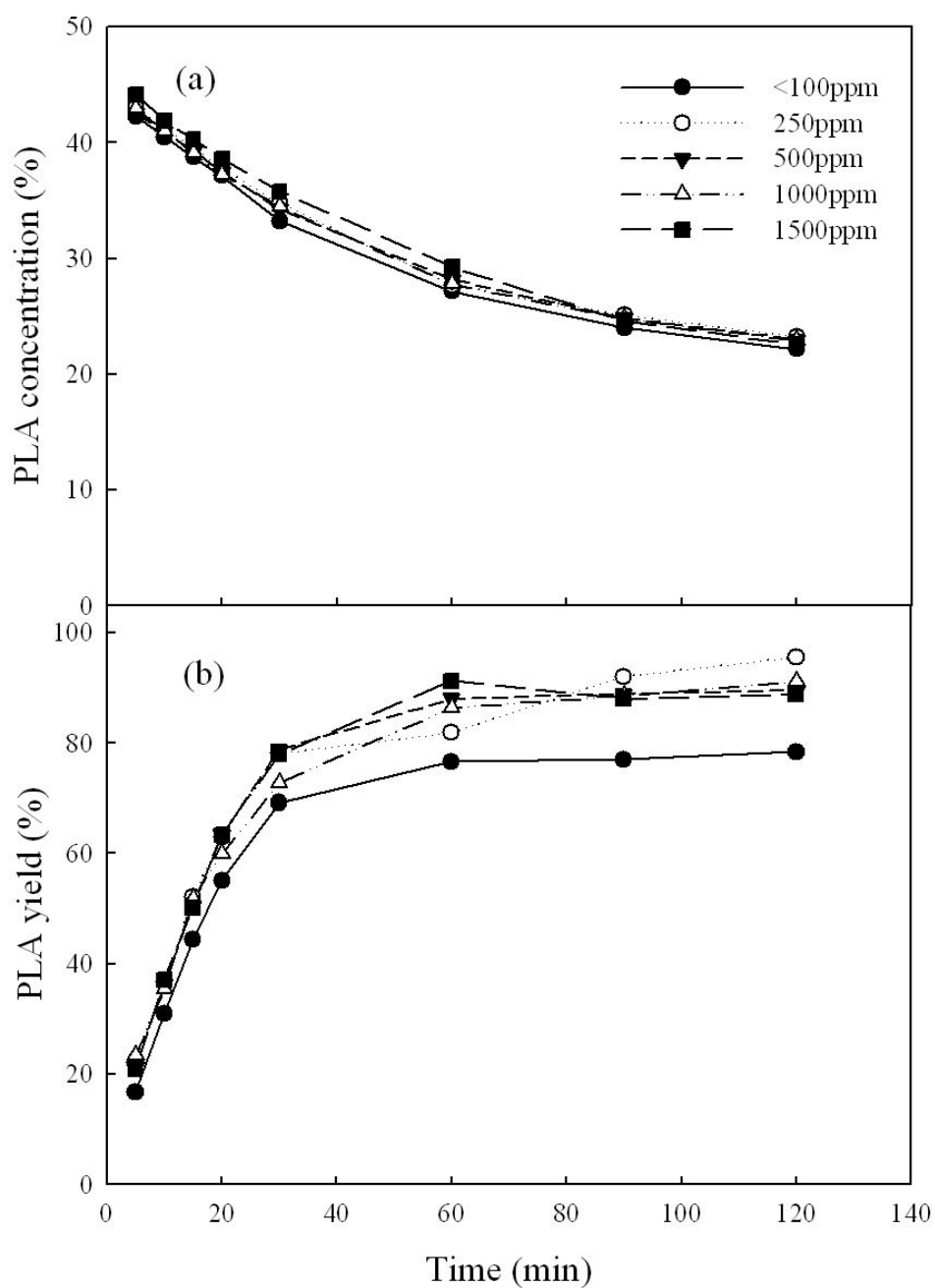
반응온도에 따른 피놀레닌산 농축 효과는 Figure 18에 나타내었다. 초기반응 20분 이내의 반응에서는 35°C와 45°C의 경우가 15°C와 25°C보다 피놀레닌산 함량이 높게 나타났다. 예를 들어 35°C와 45°C에서 매우 짧은 반응시간, 즉 5분에서 잣기름에 함유된 피놀레닌산 중 에틸에스터화되어 회수되는 피놀레닌산의 양은 낮았지만 (10% ± 3) 에틸에스터화된 지방산의 총량 중 피놀레닌산의 함량은 43%로 매우 높게 나타났다. 한편 35°C와 45°C의 경우 피놀레닌산 농도 및 수율에 있어서 유의적으로 큰 차이를 나타내지 못하였다. 이상의 결과는 초기반응단계에서 35°C까지 온도가 증가함에 따라 잣기름 트리글리세라이드에 사용된 효소 (Novozym 435)는 피놀레닌산이 주로 결합되어 있는 *sn*-3 위치에 대한 반응성이 보다 높았다는 결론을 얻을 수 있었다. 따라서 에타놀리시스 반응에서 피놀레닌산 에틸에스터의 농도와 수율 그리고 반응속도를 고려하였을 때 최적의 온도는 35°C로 나타났다.



**Figure 18.** Effect of temperature on the ethanolsis of pine nut oil in a batch reactor as a function of time. PLA concentration: pinolenic acid concentration in fatty acid ethyl ester produced by ethanolsis. PLA yield: yield of pinolenic acid ethyl ester produced by ethanolsis. Reaction conditions – Mole ratio (pine nut oil to ethanol); 1:80 (3 g), Water content; <100ppm, Novozym 435; 10% (0.30g) of weight of substrate, Shaking speed; 300rpm.

#### (6) 피놀레닌산 농축을 위한 수분함량 효과에 대한 조사

피놀레닌산 농축에 대한 수분의 효과를 확인하기 위하여 기질 중 잣기름 내 수분 함량을 100 ppm 미만에서 부터 1500 ppm까지 변화시켜 수분함량 범위에서 농도와 수율을 조사하였다 (Figure 19). 에타놀리시스 반응에서 수분함량 변화에 따라 피놀레닌산 농도의 변화는 모든 반응시간에서 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 그러나 수율의 경우 수분을 첨가하지 않은 (100 ppm 미만) 경우보다 잣기름 내의 수분함량을 250 ppm 이상 첨가한 경우 보다 높은 수율을 나타내었다. 그러나 1500 ppm까지 수분함량의 증가로 인한 수율 증가는 크지 않았다. 유지와 같이 비수계 (no water system)에서 일어나는 리파제 (lipase)를 이용한 반응에 있어서도 효소가 활성화되기 위한 최소한의 수분이 필요한 것으로 알려져 있다. 이러한 수분량을 minimal water 라고 하는데, 본 연구에서 수행된 에타놀리시스 반응에서의 minimal water 즉, 잣기름 내 최적 수분함량은 250 ppm인 것으로 나타났다.



**Figure 19.** Effect of added water on the ethanolsis of pine nut oil in a batch reactor as a function of time. PLA concentration: pinolenic acid concentration in fatty acid ethyl ester produced by ethanolsis. PLA yield: yield of pinolenic acid ethyl ester produced by ethanolsis. Reaction conditions – Mole ratio (pine nut oil to ethanol); 1:80 (3 g), Temperature; 35°C, Novozym 435; 10% (0.30g) of weight of substrate, Shaking speed; 300rpm.

## 나. 에타놀리시스의 연속식 반응 시스템 최적화

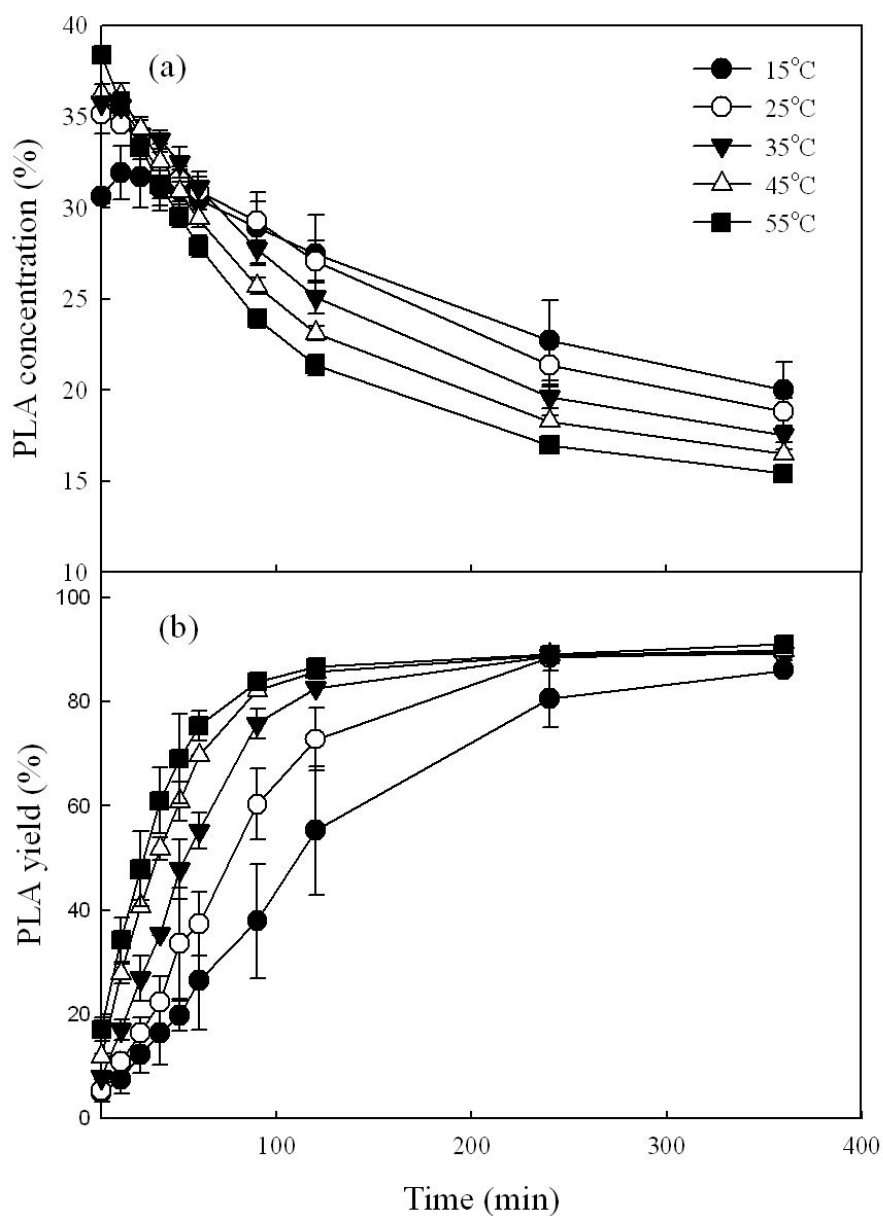
### (1) 피놀레닌산 농축을 위한 반응온도 효과에 대한 조사

순환식 연속 반응기 일명 PBR 반응기에서 반응온도에 따른 피놀레닌산 농축 효과 및 피놀레닌산 회수율의 결과를 Figure 20에 나타내었다. 이때 사용한 효소량은 기질량 (무게비)을 기준으로 10%를 첨가하였고, 잣기름과 에탄올의 몰 비율은 1:50, 그리고 반응기로 주입되는 기질 (잣기름과 에탄올)의 주입 속도는 반응기내 기질의 정치시간이 1분이 되도록 고정 하였다. 이때 주입 속도는 18 ml/min이었으며, PBR 반응기를 통과할 때 반응액의 속도는 26 cm/min이었다. 연속식의 경우도 회분식의 결과와 유사하게 각 온도에서 반응 시간이 길어짐에 따라 생성된 지방산의 에틸에스터 중에 피놀레닌산 함량이 서서히 감소되는 경향을 보여 주었다. 이러한 결과는 피놀레닌산이 잣기름의 트리글리세라이드 분자에서 주로 sn-3 위치에 결합되어 있기 때문이다. 사용된 효소인 Novozym 435의 위치 특이성 때문에 반응초기에는 과량의 에탄올에 의해 sn-3에 선택적으로 작용하였지만 시간이 지남에 따라 sn-3 위치에 결합되어 있는 지방산량이 줄어들고 따라서 피놀레닌산 함량이 매우 낮은 sn-1 위치 (sn-3 위치와 유사한 위치)에 작용하게 되어 총 지방산의 에틸에스터 중 피놀레닌산의 함량이 초기에 비하여 감소하게 된다. 따라서 고순도의 피놀레닌산을 얻기 위해서는 반응시간을 매우 짧게 하는 것이 유리하다. 그러나 반응시간이 짧으면 에틸에스터로 얻어질 수 있는 피놀레닌산의 회수율은 감소하게 되어 피놀레닌산 에틸에스터의 농도가 35% 정도일 때 피놀레닌산의 회수율은 10%에 불과한 것으로 나타났다. 따라서 연속식 반응 시스템에서도 회분식에서와 마찬가지로 에틸에스터화되면서 얻어지는 피놀레닌산의 농도와 회수율을 모두 고려하여야 한다. 각 반응온도에서 피놀레닌산 농도가  $30 \pm 0.5\%$ 일 때 빠른 시간에 높은 회수율을 얻을 수 있는 조건을 찾고자 하였다. 그 결과 Figure 21과 같이 반응온도가 증가함에 따라 45°C까지 피놀레닌산 회수율이 꾸준히 증가하는 경향을 보여주었으며, 45°C 이상의 온도에서는 수율의 차이가 유의적으로 나타내지 않았다 ( $p < 0.05$ ). 따라서 연속식 반응 시스템에서 피놀레닌산을 농축하기에 가장 적합한 온도는 45°C로 선정되었다.

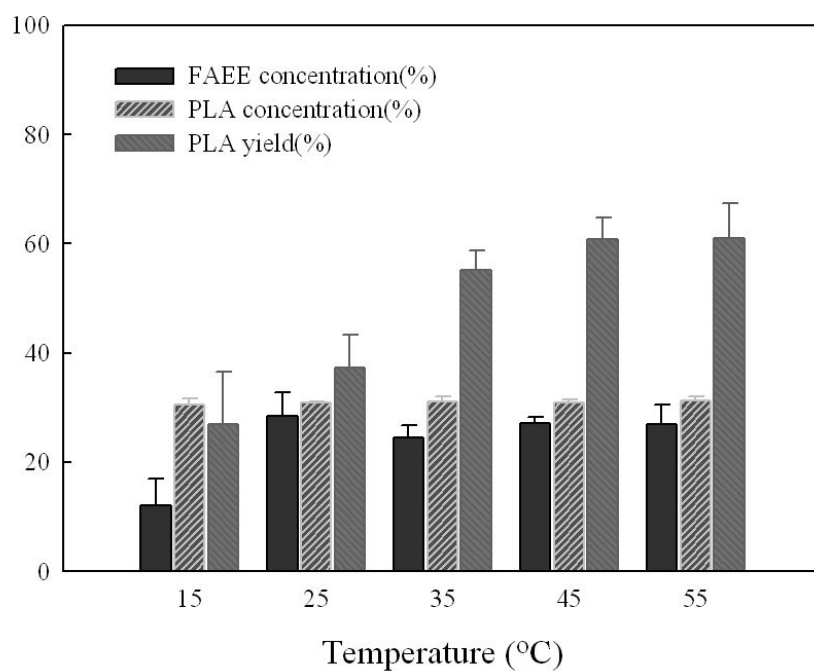
한편 잣기름 내에 존재하는  $\Delta 5$  계열의 지방산으로는 피놀레닌산 이외에 taxoleic acid (18:2, $\Delta 5$ )와 sciadonic acid (20:3, $\Delta 5$ )이 있으며, 피놀레닌산을 포함한 총  $\Delta 5$  지방산의 농축의 결과는 Figure 22와 같았다. 그 결과는 피놀레닌산의 경우와 유사한 경향을 보여 주어 반응 시간이 지나면서  $\Delta 5$  지방산 에틸에스터의 농도는 감소하고 잣기름에 존재하는  $\Delta 5$  지방산 중

에틸에스터화된  $\Delta 5$  지방산의 양은 증가하였다. 반응온도 선정에도 역시 피놀레닌산의 농축에서 얻어진 결과처럼  $45^{\circ}\text{C}$ 가 가장 적합한 것으로 판단되었다. 이외에 Figure 23은 각 온도별 반응 시간에 따른 지방산 에틸에스터 생성량의 변화를 보여준 결과이며 반응시간이 길어질수록 지방산 에틸에스터의 양이 증가하고 온도가 증가할수록 증가하는 경향을 보여주었다. 이상의 결과에서 연속식 반응 시스템에서 지방산의 에틸에스터도 증가하고 피놀레닌산은 물론  $\Delta 5$  지방산의 농축에 가장 적합한 반응 온도는  $45^{\circ}\text{C}$ 로 확인되었다.

1차년도 회분식 반응 시스템에서는 최적 반응온도가  $35^{\circ}\text{C}$ 로 선정되었던 것에 반하여 연속식 반응 시스템에서는  $45^{\circ}\text{C}$ 로 반응 최적 온도가  $10^{\circ}\text{C}$ 의 차이를 나타내었다. 이러한 결과는 반응 시스템의 변화에 따른 차이로 추정된다. 또한 본 연구의 산업화를 위하여서는 효소 활성을 증대, 생산성 증대 및 효율성 증대를 고려하였을 때 회분식 보다는 연속식 반응 시스템이 더 효과적이라는 결론을 얻을 수 있었다.

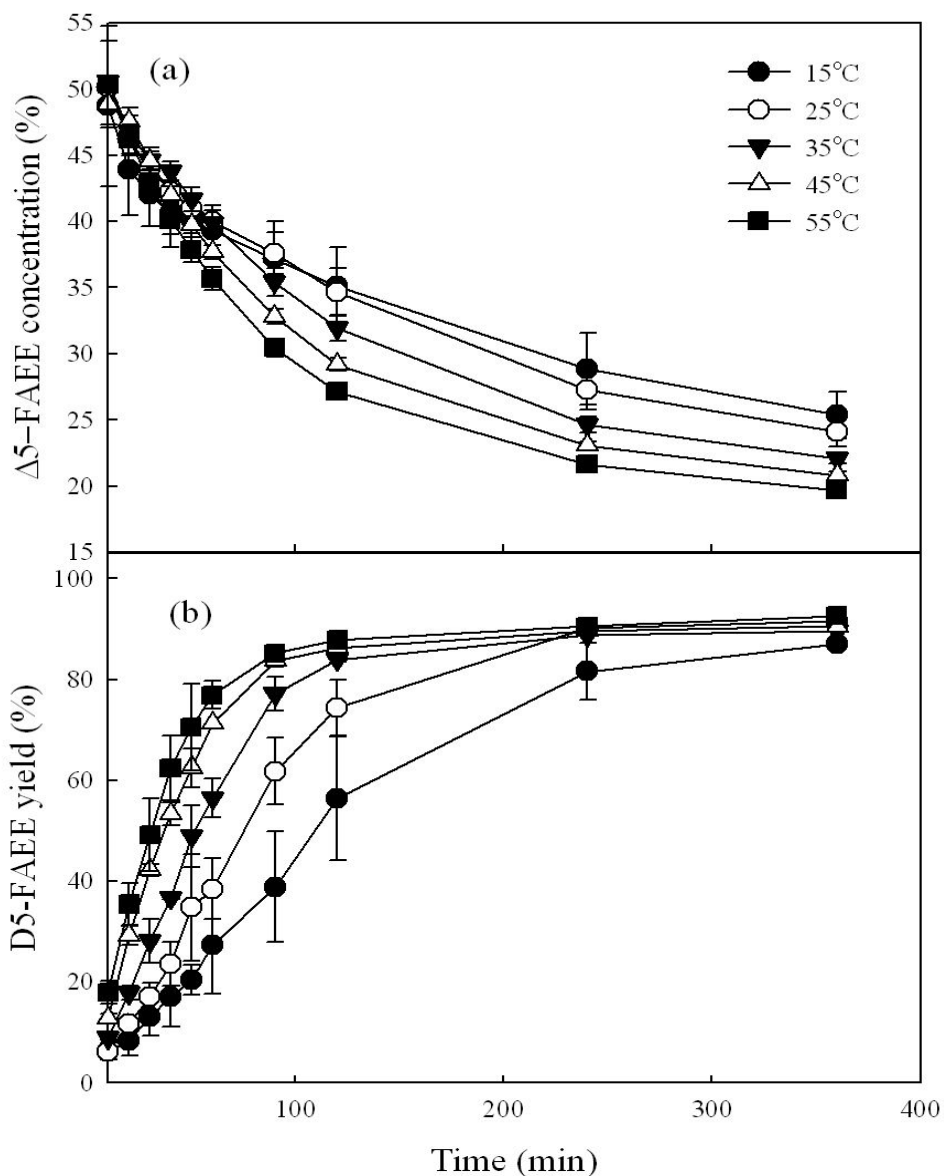


**Figure 20.** Effect of temperature on the ethanolsis of pine nut oil in a PBR system as a function of time. PLA concentration: pinolenic acid concentration in fatty acid ethyl ester produced by ethanolsis. PLA yield: Yield of pinolenic acid ethyl ester produced by ethanolsis. Reaction conditions – Mole ratio (pine nut oil to ethanol); 1:50 (100 g), Novozym 435; 10% (10g) of weight of substrate, Shaking speed; 400rpm, Residence time in reactor; 1 min.

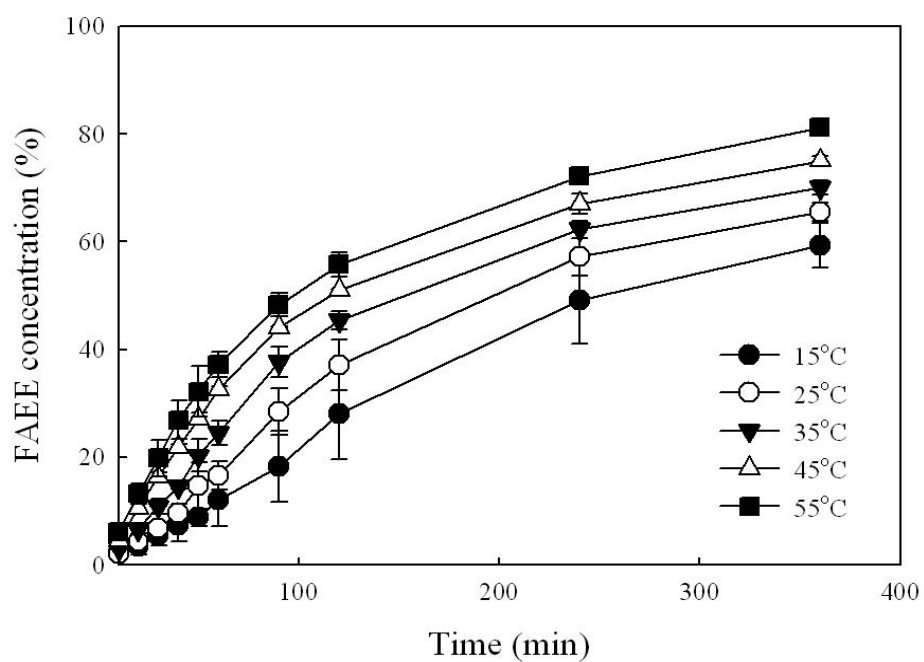


**Figure 21.** Effect of temperature on the ethanolsis of pine nut oil in a PBR when PLA concentration is 30%. PLA concentration: pinolenic acid concentration in fatty acid ethyl ester produced by ethanolsis. PLA yield: Yield of pinolenic acid ethyl ester produced by ethanolsis. Reaction conditions – Mole ratio (pine nut oil to ethanol); 1:50 (100 g), Novozym 435; 10% (10g) of weight of substrate, Shaking speed; 400rpm, Residence time in reactor; 1 min.





**Figure 22.** Effect of temperature on  $\Delta 5$ -FAEE concentration and yield produced by ethanolysis of pine nut oil in a PBR as a function of time.  $\Delta 5$ -FAEE concentration: concentration of  $\Delta 5$ -fatty acid ethyl ester in fatty acid ethyl ester produced by ethanolysis.  $\Delta 5$ -FAEE yield: yield of  $\Delta 5$ -fatty acid ethyl ester produced by ethanolysis. Reaction conditions – Mole ratio (pine nut oil to ethanol); 1:50 (100 g), Novozym 435; 10% (10g) of weight of substrate, Shaking speed; 400rpm, Residence time in reactor; 1 min.



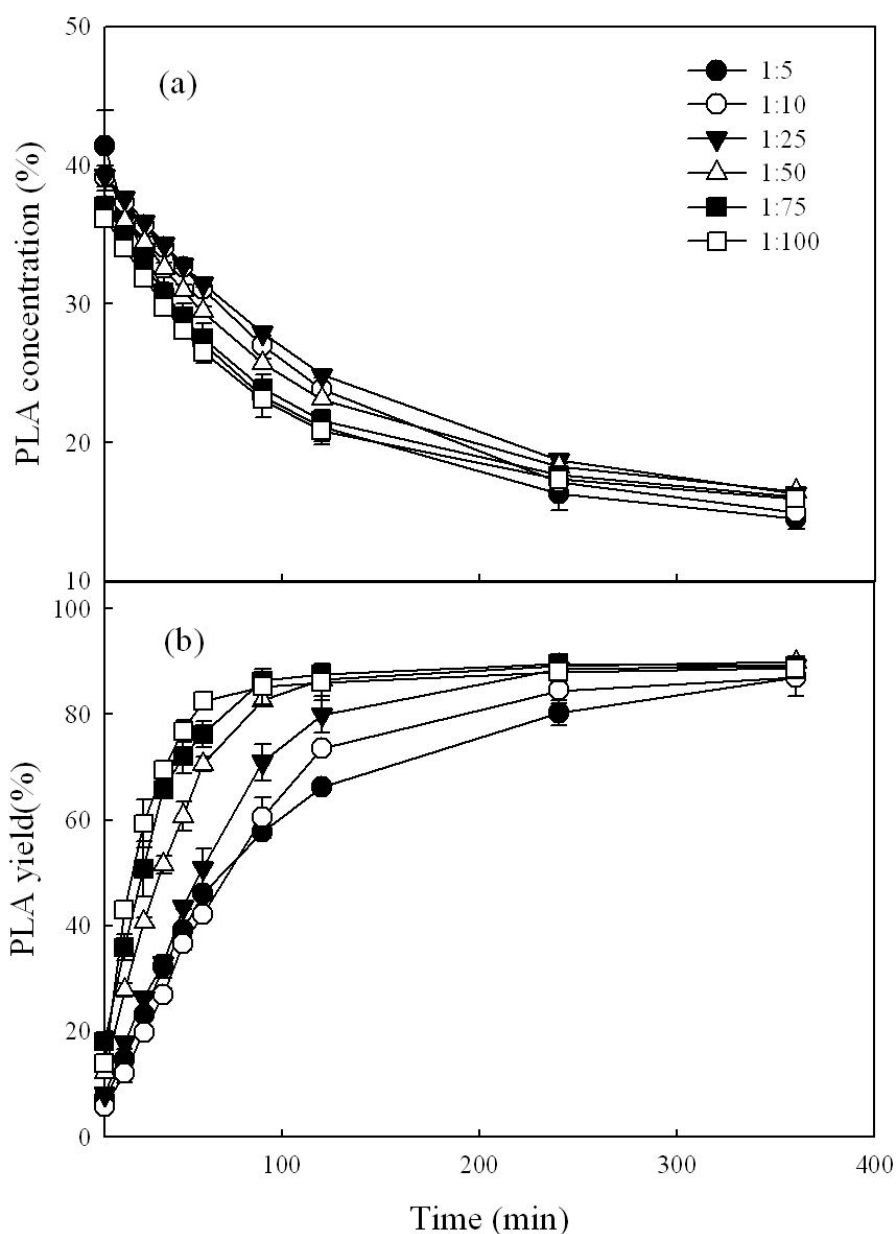
**Figure 23.** Effect of temperature on concentration of FAEE produced by the ethanolysis of pine nut oil in a PBR as a function of time. Reaction conditions – Mole ratio (pine nut oil to ethanol); 1:50 (100 g), Novozym 435; 10% (10g) of weight of substrate, Shaking speed; 400rpm, Residence time in reactor; 1 min.

## (2) 피놀레닌산 농축을 위한 잣기름과 에탄올의 몰비율 효과에 대한 조사

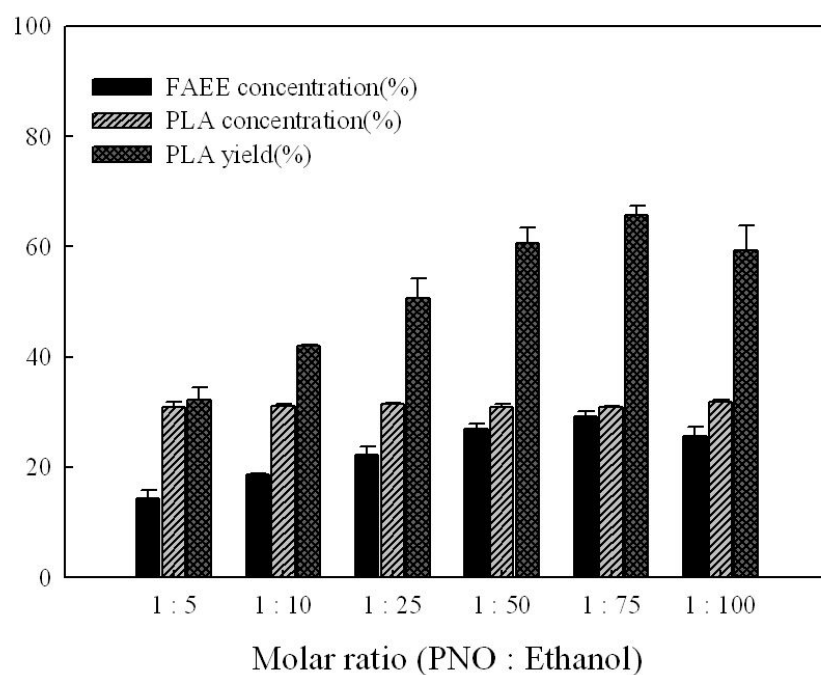
순환식 연속 반응기에서 몰비율에 따른 피놀레닌산 농축 효과 및 회수율은 Figure 24에 나타내었다. 이때 사용한 효소량은 기질량을 기준으로 5% (무게비)를 사용하였으며, 반응온도는 45°C에서 반응기로 주입되는 기질 (잣기름과 에탄올)의 속도는 18 ml/min으로 반응기내 기질의 정지시간이 1분이 되도록 고정한 값이다. 온도별 실험 결과에서와 같이 서로 다른 몰비율 시료에 대하여 반응 시간이 길어짐에 따라 생성된 총 지방산 에틸에스터내 피놀레닌산 함량이 서서히 감소되는 경향을 보여 주었다. 이러한 결과를 얻은 배경 역시 피놀레닌산이 트리글리세라이드 분자 내에 주로 sn-3 위치에 결합되어 있기 때문인 것으로 예측된다. 이상의 결과로부터 온도에서와 같이 고순도의 피놀레닌산을 얻기 위해서는 반응시간을 매우 짧게 하여야 한다는 결론을 얻을 수 있었다. 그러나 짧은 반응시간으로부터 얻어진 에틸에스터화된 피놀레닌산의 양은 피놀레닌산 농도가 35% 이상일 때를 기준으로 보면 역시 10%에 불과한 것으로 나타났다. 따라서 본 연구에서는 피놀레닌산의 순도와 수율을 고려하여 반응온도에서와 같은 방법을 이용하여 피놀레닌산 함량이  $30 \pm 0.5\%$ 의 순도를 갖는 지방산 에틸에스터가 얻어지는 반응시간에서의 피놀레닌산의 회수율을 비교해 보았다. 그 결과 Figure 25과 같이 몰비율이 증가함에 따라 1:50 까지 피놀레닌산 회수율이 꾸준히 증가하는 경향을 보여주었다. 한편 1:50에 비하여 1:75의 경우에 있어서는 평균 약 4% 정도의 차이를 나타냈으나 t-test의 결과 유의적인 차이를 보여주지 못하였다. 한편 피놀레닌산 농도에 대한 피놀레닌산 수율의 상관관계로 결과를 나타낸 Figure 26과 같이 1:50과 1:75, 1:100 사이에는 통계적으로 유의적인 차이를 나타내지 못하였다.

한편 잣기름내 피놀레닌산을 포함한 총  $\Delta 5$  계열 지방산의 농축 결과는 Figure 27에 제시되었고, 이 결과 역시 잣기름과 에탄올의 몰비율이 1:50일 때가 최적의 조건인 것으로 나타났다. 또한 Figure 28에서 보는 바와 같이 지방산 에틸에스터의 합성결과도 지방산과 에탄올의 몰비율이 1:50인 범위부터 반응속도가 높아지는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 연속식 반응 시스템에서 지방산의 에틸에스터화와 피놀레닌산을 비롯한  $\Delta 5$  계열 지방산의 농축을 위하여 잣기름과 에탄올의 몰비율이 1:50일때가 가장 적합한 것으로 확인되었다.

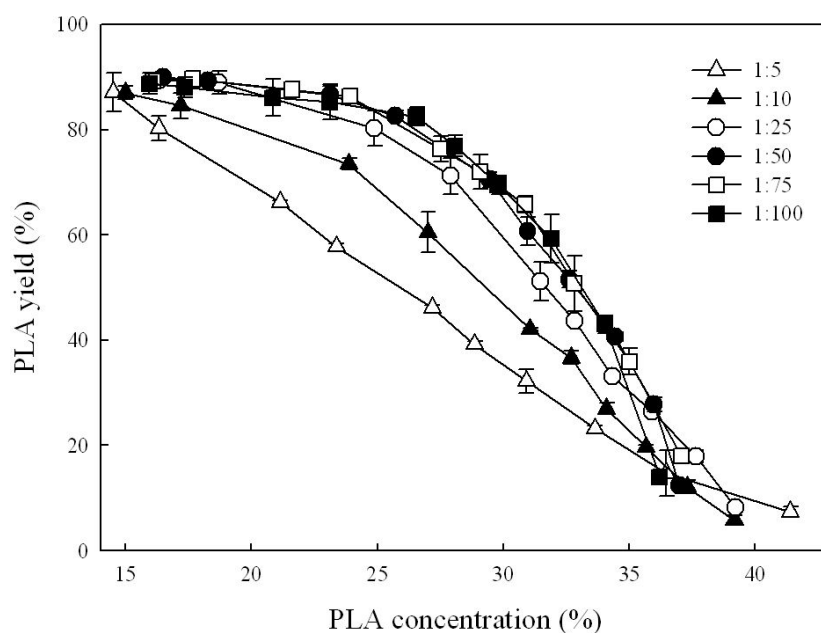
1차년도 회분식 반응 시스템에서의 최적 몰비율은 1:80이었으나 연속식에서는 에탄올 함량이 보다 적게 소요되는 1:50이 최적 몰비율로 나타났다. 이 결과에서 경제성면이나, 생산성면에서 연속식이 월등히 우수하다는 결론을 얻을 수 있었다.



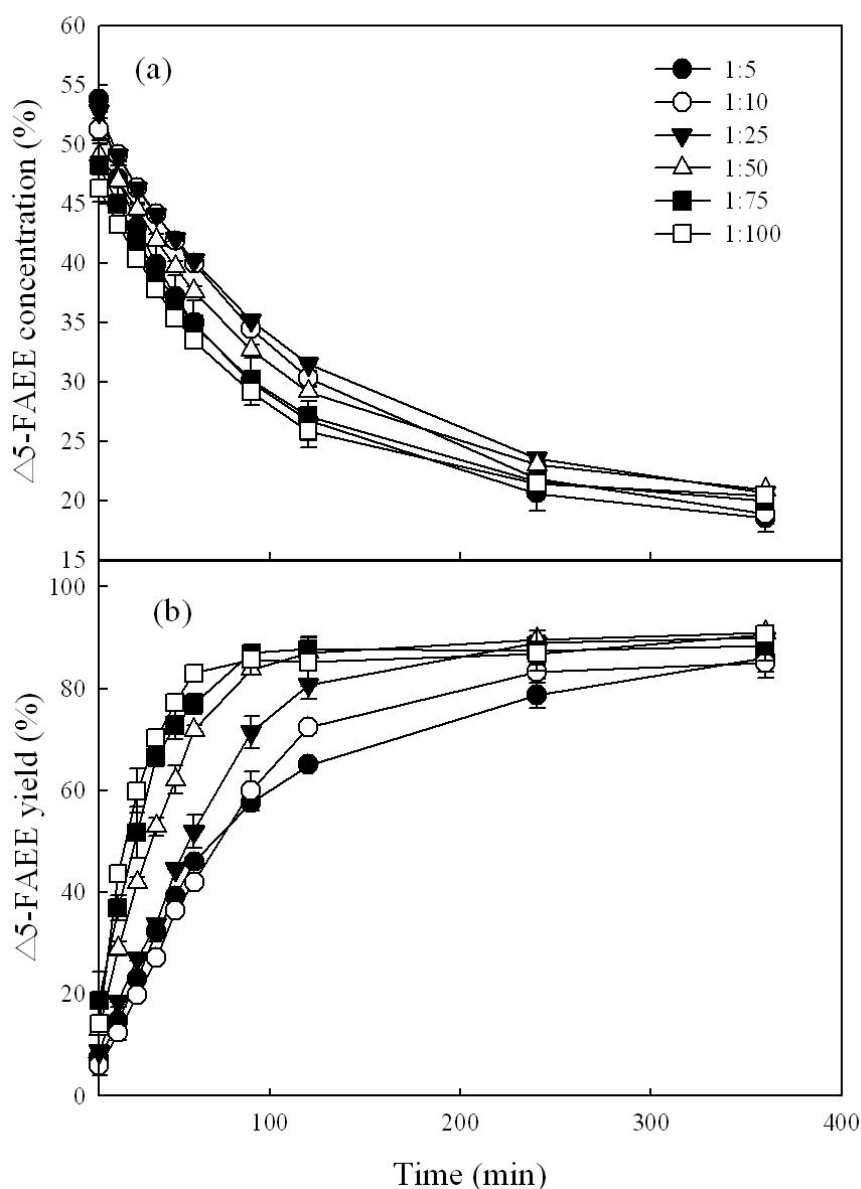
**Figure 24.** Effect of molar ratio on the ethanolsis of pine nut oil in a PBR as a function of time. PLA concentration: concentration of pinolenic acid ethyl ester produced by ethanolsis. PLA yield: yield of pinolenic acid ethyl ester produced by ethanolsis. Reaction conditions – Temperature; 45°C, Novozym 435; 10% (10g) of weight of substrate, Shaking speed; 400rpm, Residence time in reactor; 1 min.



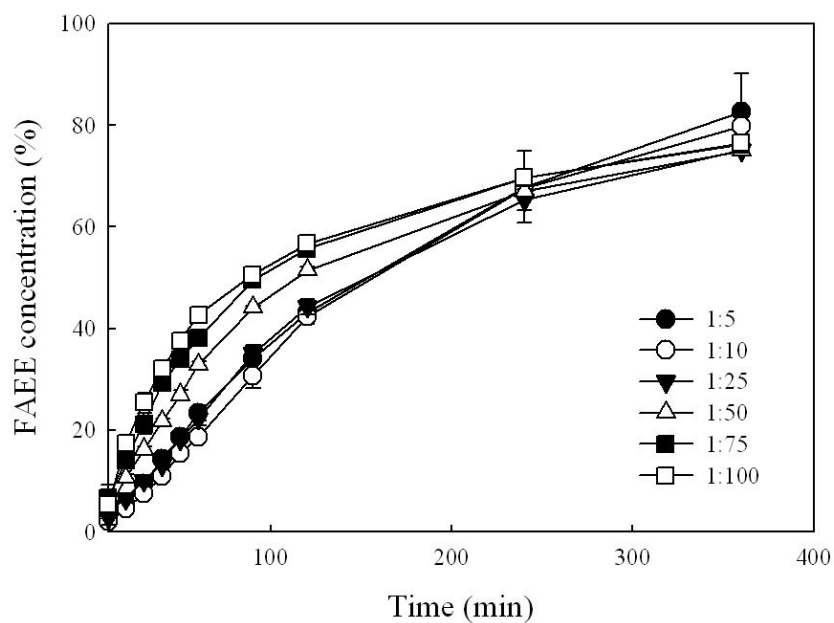
**Figure 25.** Effect of molar ratio on the ethanolsis of pine nut oil in a PBR when PLA concentration is 30%. FAEE concentration: concentration of fatty acid ethyl ester produced by ethanolsis. PLA concentration: concentration of pinolenic acid ethyl ester produced by ethanolsis. PLA yield: yield of pinolenic acid ethyl ester produced by ethanolsis. Reaction conditions – Temperature; 45°C, Novozym 435; 10% (10g) of weight of substrate, Shaking speed; 400rpm, Residence time in reactor; 1 min.



**Figure 26.** Correlation of PLA yield and PLA concentration when fatty acid ethyl esters were synthesized at the various mole ratios in a PBR. FAEE concentration: concentration of fatty acid ethyl ester produced by ethanolysis. PLA concentration: concentration of pinolenic acid ethyl ester produced by ethanolysis. PLA yield: yield of pinolenic acid ethyl ester produced by ethanolysis. Reaction conditions – Temperature; 45°C, Novozym 435; 5% (5g) of weight of substrate, Shaking speed–400rpm, Residence time in reactor; 1 min.



**Figure 27.** Effect of various mole ratios on  $\Delta 5$ -FAEE concentration and yield produced by the ethanolysis of pine nut oil in a PBR as a function of time.  $\Delta 5$ -FAEE concentration: concentration of  $\Delta 5$ -fatty acid ethyl ester in fatty acid ethyl ester produced by ethanolysis.  $\Delta 5$ -FAEE yield: yield of  $\Delta 5$ -fatty acid ethyl ester produced by ethanolysis. Reaction conditions – Temperature; 45°C, Novozym 435; 10% (10g) of weight of substrate, Shaking speed; 400rpm, Residence time in reactor; 1 min.



**Figure 28.** Effect of mole ratio on the concentration of FAEE produced by the ethanolysis of pine nut oil in a PBR as a function of time. Reaction conditions – Temperature; 45°C, Novozym 435; 10% (10g) of weight of substrate, Shaking speed; 400rpm, Residence time in reactor; 1 min.



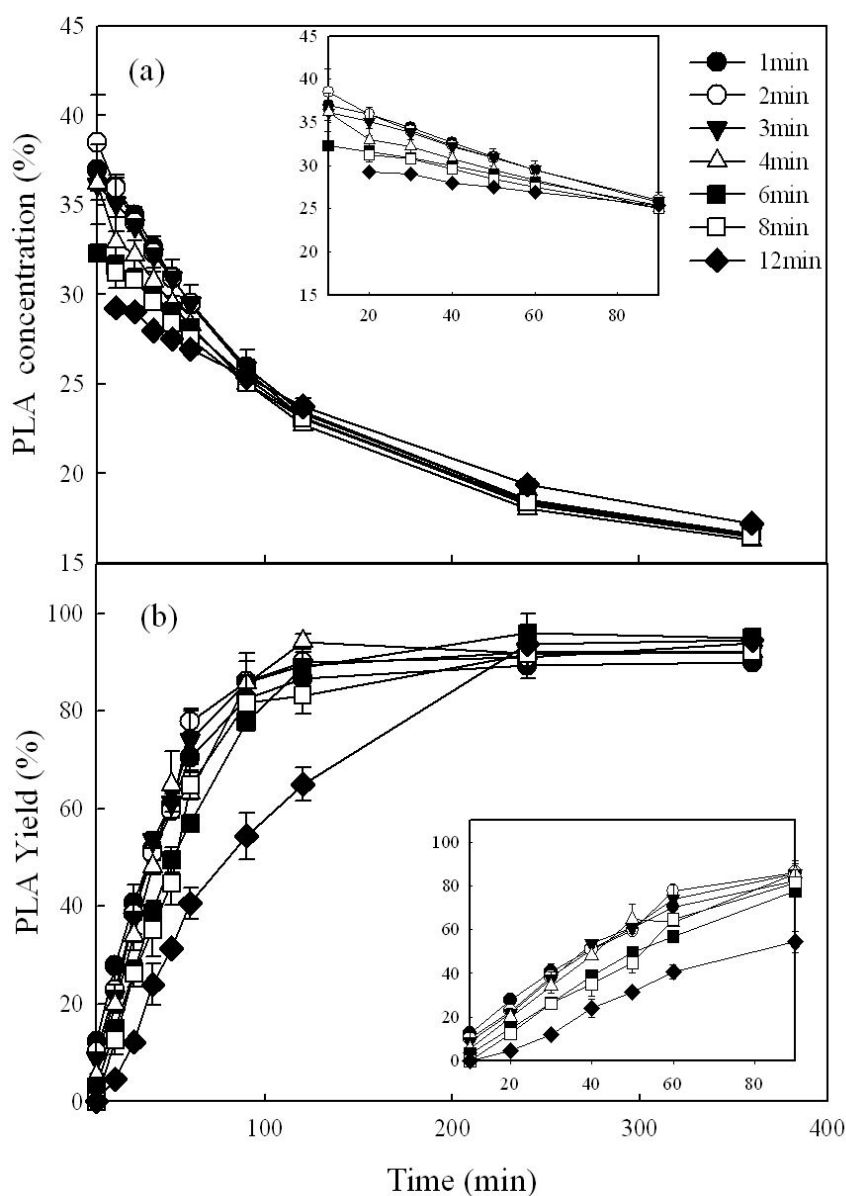
### (3) 피놀레닌산 농축을 위한 기질 정체시간 (기질 주입속도) 효과에 대한 조사

일반 연속식 효소 반응기 일명 PBR (Packed Bed Reactor)의 경우 초기 기질인 에탄올과 잣기름은 혼합이 되지 않기 때문에 이론적으로는 에타놀리시스 반응이 일어날 수가 없다. 그러나 본 연구에서는 기존의 연속식 반응기로서의 PBR 반응 시스템이 아닌 순환식 PBR 반응 시스템을 도입하여 이러한 문제점을 극복 하였다. 그 내용은 Figure 1에서 보듯이 기질 반응기 내에서 강한 교반을 실시하여 잣기름을 에탄올에 분산시켰다. PBR 반응기 (효소관)을 통과할 때까지 기질들의 분산된 상태가 유지되도록 하기 위하여 온도 및 몰비율의 효과를 알아보는 실험 동안에는 PBR 반응기에 정체 시간이 1분 (26 cm/min)이 되도록 매우 빠른 속도로 흘려주었다.

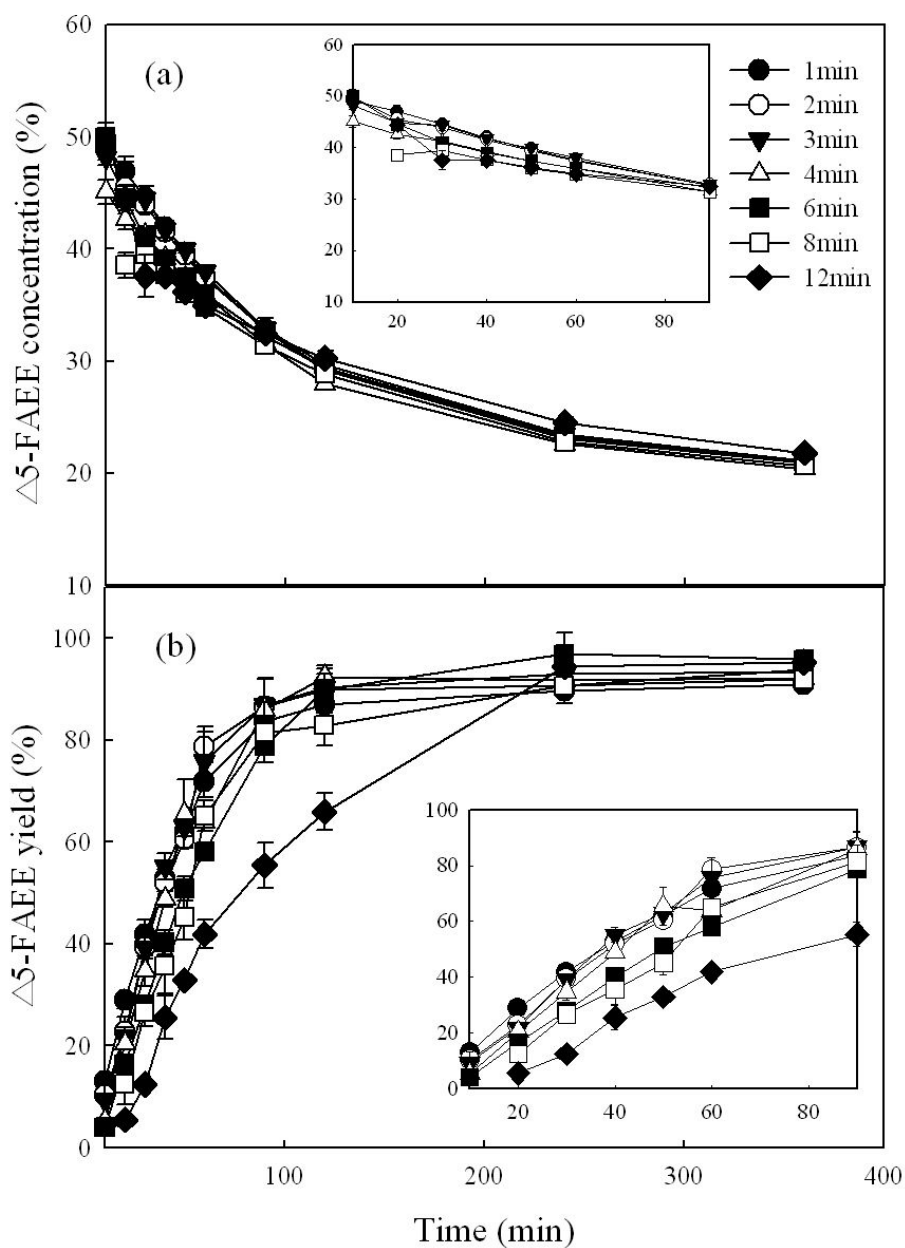
본 실험은 PBR 반응기내 정체 시간 또는 기질 통과속도에 따른 피놀레닌산 농축 효과를 Figure 29에 나타내었다. 그 결과 반응기내 정체시간 1분 (26 cm/min)과 3분 (8.6 cm/min) 사이에는 큰 차이를 나타내지 않았으며, 이러한 경향은 회수율에 있어서도 같은 결과를 보여 주었다. 그러나 정체시간이 6분 (4.3cm/min)이상으로 길어짐에 따라 반응초기에 농축정도가 낮아지고 회수율도 감소하는 경향을 보여 주었다. 이와 같은 경향은  $\Delta 5$ 에 이중결합이 있는 지방산의 결과 (Figure 30)에 있어서도 유사 하였다. 그러나 Figure 31에서 보여준 기질의 정체 시간에 따른 지방산 에스터의 합성속도는 정체 시간 9분이후에서 느려지는 것을 확인할 수 있었다. 결론적으로는 지방산 에스터의 합성과 피놀레닌산은 물론  $\Delta 5$ 에 이중결합이 있는 지방산의 농축, 모두를 고려할 때 정체 시간은 3분이 적당한 것으로 확인되었다.

한편 반응 과정을 관찰한 결과 초기 지방산 에틸에스터 생성량이 약 18% 이상 되었을 때는 교반조 내 반응물이 완전히 투명해지는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 경향은 초기에는 주로 트리글리세라이드 및 에탄올이 주성이었기 때문에 혼합되지 않은 혼탁한 상태를 보여주었고, 지방산 에틸에스터 및 모노글리세라이드가 생성되면서 모든 반응물들이 혼합되어 맑은 상태가 된 것으로 추측된다.

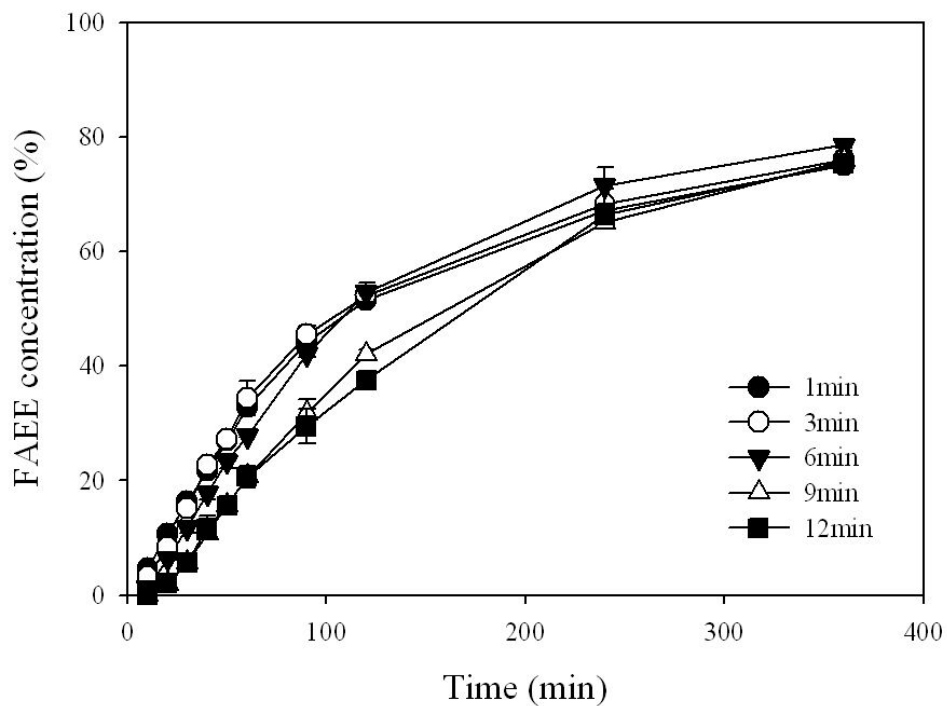
이상의 실험 결과를 종합하면, 순환식 연속반응 시스템에서 피놀레닌산 농축을 위한 최적 반응조건은 농축정도와 회수율을 고려하여 온도는 45°C, 몰비율은 1:50 (잣기름:에탄올), 그리고 반응기내 기질 정체시간 (주입속도)은 3분인 것으로 나타났다.



**Figure 29.** Effect of various residence times on the ethanolsis of pine nut oil in a PBR as a function of time. PLA concentration: concentration of pinolenic acid ethyl ester in fatty acid ethyl ester produced by ethanolsis. PLA yield: yield of pinolenic acid ethyl ester produced by ethanolsis. Reaction conditions – Mole ratio (pine nut oil to ethanol); 1:50 (100 g), Temperature; 45°C, Novozym 435; 10% (10g) of weight of substrate, Shaking speed; 400rpm.



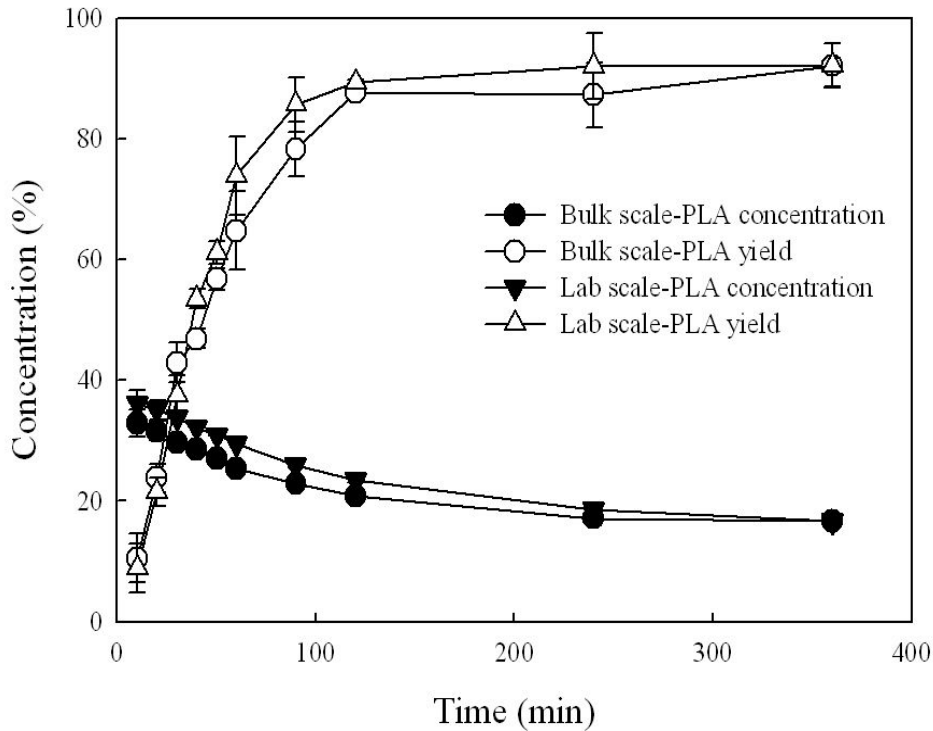
**Figure 30.** Effect of various residence times on  $\Delta 5$ -FAEE concentration and yield produced by the ethanolsis of pine nut oil in a PBR as a function of time.  $\Delta 5$ -FAEE concentration: concentration of  $\Delta 5$ -fatty acid ethyl ester in fatty acid ethyl ester produced by ethanolsis.  $\Delta 5$ -FAEE yield: yield of  $\Delta 5$ -fatty acid ethyl ester produced by ethanolsis. Reaction conditions – Mole ratio (pine nut oil to ethanol); 1:50 (100 g), Temperature; 45°C, Novozym 435; 10% (10g) of weight of substrate, Shaking speed; 400 rpm.



**Figure 31.** Effect of various residence times on concentration of FAEE produced by the ethanalysis of pine nut oil in a PBR as a function of time. Reaction conditions – Mole ratio (pine nut oil to ethanol); 1:50 (100 g), Temperature; 45°C, Novozym 435; 10% (10g) of weight of substrate, Shaking speed; 400rpm.

#### (4) 대용량 (Bulk scale)에서 피놀레닌산 농축의 효율 평가

지금까지의 실험은 연속식 반응기 내에 기질량 100 g에 효소량은 기질량의 5%에 해당하는 5g을 넣고 반응시켰다. 이 반응을 대용량으로 확대시켰을 때 반응정도를 알아보기 위하여 실험실에서 실시했던 규모보다 10배 증가된 규모로 실험을 실시하였다 (Figure 32), 그 결과 농축 정도와 회수율에 있어서 소규모와 대규모의 반응결과 사이에 유의적인 차이를 보이지 않는 것으로 나타났다. 따라서 에타놀리시스 반응을 이용하여 잣기름에서 피놀레닌산을 농축하는 방법이 대량 생산에도 적용될 수 있음이 확인되었다.



**Figure 32.** PLA concentration and PLA yield produced by ethanolsis of pine nut oil in large scale and lab scale using a PBR as a function of time. PLA concentration: concentration of pinolenic acid ethyl ester in fatty acid ethyl ester produced by ethanolsis. PLA yield: yield of pinolenic acid ethyl ester produced by ethanolsis. Reaction conditions – Mole ratio (pine nut oil to ethanol); 1:50 (lab: 100 g, bulk: 1 kg), Temperature; 45°C, Novozym 435; 10% of weight of substrate, Shaking speed; 400rpm, Residence time in reactor; 3 min.

## 2. 모노글리세라이드 합성

### 가. 기존의 방법을 이용한 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드 합성

#### (1) 기존의 방법에 의한 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드 제조 및 농축

##### (가) 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드의 제조

(주)일신웰스에서는 고려대학교에서 농축한 피놀레닌산을 이용하여 기존에 사용하던 화학적 제조 방법을 이용하여 반응 시간에 따른 모노글리세라이드 합성 정도를 확인하였다 (Table 10). 피놀레닌산과 글리세롤의 비율은 비슷한 분자량을 가지고 있는 불포화지방산을 함유한 모노글리세라이드 제조법에 근거하여 피놀레닌산 함유 지방산 100 g을 기준으로 글리세롤은 30-34 g 혼합하였다. 피놀레닌산과 글리세롤은 150-250 rpm의 속도로 교반되었고, 이 교반속도 범위는 100 rpm 미만에서는 교반력이 약하고 300 rpm을 초과하면 제품의 색상이 변하는 등 품질의 변화를 가져오는 문제로 인하여 설정하게 된 범위이다. 반응 온도가 240°C에 도달한 후에 반응 시간이 30분 미만인 경우 합성된 모노글리세라이드 함량은 32.3%였고, 반응 시간이 30분일 때 45.7%로 가장 많이 합성되었으며, 60분에서는 39.5%로 모노글리세라이드의 함량이 감소되었다. 따라서 기존의 240°C에서 교반하는 방법에 의한 합성은 30분의 반응 시간이 가장 적당한 것으로 확인되었다.

**Table 10.** The extent of conversion of monoglyceride at different reaction time.

Conversion (%)	Reaction time (min)		
	10	30	60
Monoglyceride	32.3	45.7	39.5

##### (나) 분자증류기 (short-path distillator)를 이용한 모노글리세라이드의 농축

모노글리세라이드의 함량이 높을수록 유효력이 증가하지만 기존의 합성 반응만으로는 이와 같은 조건을 만족시키기 어렵다. 지방산과 글리세롤의 합성 시 모노글리세라이드 이외에 합성에 참여하지 못한 지방산과 글리세롤 및 합성이 많이 진행된 디글리세라이드와 트리글리세라이드가 함께 존재하게 되므로 불순물 제거를 위하여 분자증류 단계를 거친다. 본 연구에서 제조한 모노글리세라이드를 정제하기 위하여 1차와 2차에 걸쳐 분자증류를 실시하였다.

1차 증류 시에는 지방산과 글리세롤이 제거되었으며, 1-2 torr의 감압 조건에서 140°C의 온도조건에서 1-2 torr로 감압하여 글리세롤의 함량이 1% 이하가 되도록 하였다. 1차 증류시 130°C의 온도조건은 지방산과 글리세롤을 충분히 제거하지 못하고 150°C 이상의 온도 조건에서는 모노글리세라이드의 손실이 발

생하는 문제가 있었다.

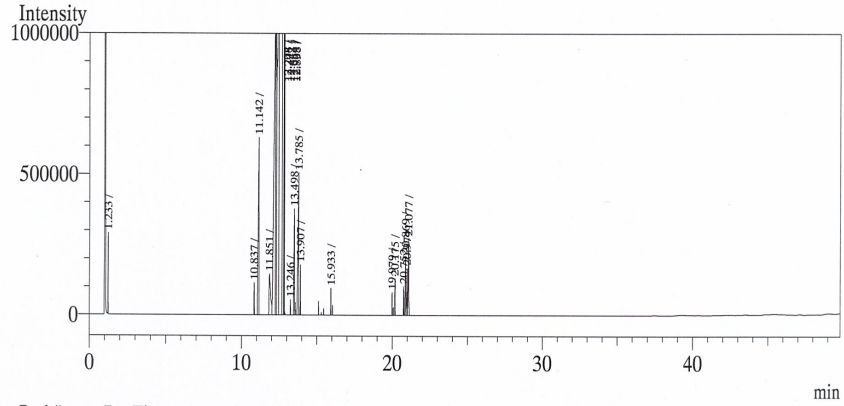
2차 증류 시에는 1차 증류를 마친 잔류물을 다시 여과하여 증류하였으며, 감압 조건은 설비 투자비와 생산수율을 고려하여 0.05 - 0.07 torr의 범위에서 이루어졌다. 증류온도는 160°C와 180°C, 200°C로 변화시키면서 온도에 따른 모노글리세라이드의 수율을 확인하였다 (Table 11). 그 결과 180°C의 증류 온도에서 95% 이상의 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드를 얻을 수 있었고 (Table 11), 모노글리세라이드의 농도는 GC에 의해 확인되었다 (Figure 33).

**Table 11.** Effect of temperature on the distillation of monoglyceride.

Contents (%)	Temperature (°C)		
	160	180	200
Monoglyceride in distillate	32.3	96.9	61.4

Analysis Date & Time : 2009-11-19 오후 2:33:51

Sample Name : PMG  
 Data Name : C:\GC Solution\Data\2009년\11월\1119-07.gcd  
 Method Name : C:\GC Solution\Data\METHOD\DB-5HT.gcm



Peak#	Ret.Time	Area	Height	Mark	Conc.
1	1.233	255598	256848		0.3095
2	10.837	213320	114352		0.2583
3	11.142	2222796	630183		2.6918
4	11.851	1011957	146047		1.2255
5	12.204	7125166	1046776	V	8.6284
6	12.248	4173211	998881	V	5.0537
7	12.442	9771714	1242780	V	11.8333
8	12.654	24328156	2704578	V	29.4608
9	12.769	20731747	3570890	V	25.1056
10	12.798	5568018	3545538	V	6.7427
11	12.838	1578144	1154973	V	1.9111
12	13.246	57076	53926		0.0691
13	13.498	1113309	378176		1.3482
14	13.785	1758056	503875		2.1290
15	13.907	253996	176610		0.3076
16	15.933	140734	95308		0.1704
17	19.979	113688	81613		0.1377
18	20.175	218562	130003		0.2647
19	20.752	181410	102247		0.2197
20	20.869	511393	210350		0.6193
21	20.974	413748	167315	V	0.5010
22	21.077	836235	272150	V	1.0127
Total		82578034	17583419		

Figure 33. Chromatogram of pinoleic acid-monglyceride analyzed by GC-FID.



## (2) 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드의 일반 분석

화학적 반응에 의해 생산되고 분자증류법으로 증류하여 제조한 고순도의 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드에 대하여 일반 분석을 진행하였다. 식품첨가물공전 상에는 글리세롤과 지방산의 에스테르류의 규격으로 산가 6.0 이하만 명시되어 있으나 자체 검증을 위하여 산가 외에 검화가, 과산화물가, 요오드가에 대한 분석을 진행하였다. 그 결과를 Table 12에 나타내었다. 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드의 구성 지방산을 분석한 결과 평균적으로 피놀레닌산 (C18:3, Δ5)이 13.8% 함유되어 있는 것으로 확인되었다 (Table 13).

**Table 12.** Chemical characteristics of monoglyceride containing pinolenic acid

	Acid value	Saponification value	Peroxide value
Limit*	6.0<	—	—
Measurement	0.5	153.1	0.4

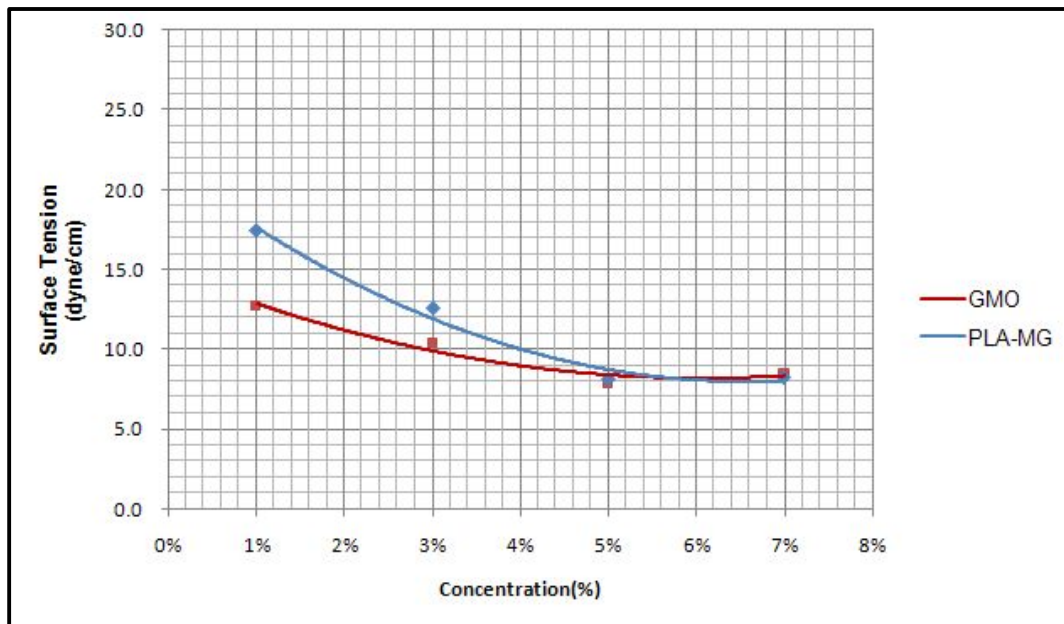
\*: The limit of glycerine fatty acid esters described in The Code of Food additives.

**Table 13.** Fatty acid composition of pinolenic acid—monoglyceride

Fatty acid	Contents (%)
C16:0	3.7
C18:0	2.4
C18:1	27.0
C18:2 (Δ-5)	2.0
C18:2	45.0
<b>C18:3 (Δ-5)</b>	<b>13.8</b>
C20:1	1.7
C20:2	0.8
C20:3 (Δ-5)	1.3
Others	2.3

### (가) 표면장력 비교 실험

올레산 함유 모노글리세라이드와 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드 함량 증가에 따른 유화력을 측정하기 위해 올레산 함유 모노글리세라이드와 폴리소르베이트 80 (polysorbate 80)를 6:4 비율로 제조된 샘플과 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드와 폴리소르베이트 80 (polysorbate 80)를 6:4 비율로 제조된 샘플을 표면장력기 (surface tensimat 21, 6 m ring)을 이용하여 유화 특성을 측정하였다. 또한 폴리소르베이트만 처방한 유화물을 제조하여 각 조건별로 측정한 표면장력 계산 시 공시험 결과로 반응하였다. O/W 유화 조건별 표면장력 결과는 Figure 34에 제시하였다. 유화물의 표면장력 및 CMC (critical micelle concentrate)를 확인한 결과, HLB (hydrophilic lipophilic balance) 값으로는 대략적으로 2 - 5 사이로 평가되었고, CMC 함량을 살펴본 결과, 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드와 올레산 함유 모노글리세라이드 모두 약 5 - 5.5 %로 확인되었다. 이는 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드가 올레산 함유 모노글리세라이드와 유사한 소수성 유화제로서의 특성을 나타낸다는 것을 보여준다. 그러나 곡선의 기울기를 평가한 결과를 살펴보면, 올레산 함유 모노글리세라이드가 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드에 비하여 유화력이 약 30% 정도 효과적인 것으로 판단되었다. 결론적으로 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드와 올레산 함유 모노글리세라이드는 유화력에서는 약간의 차이가 있지만, 동일한 유화 특성을 발휘하는 같은 종류의 유화제임을 확인하였다.



**Figure 34.** Changes of surface tension for monoglyceride containing oleic acid and monoglyceride containing pinolenic acid with different concentration. GMO; monoglyceride containing oleic acid, PLA-MG; monoglyceride containing pinolenic acid.

### (나) 유화안정성 비교 실험

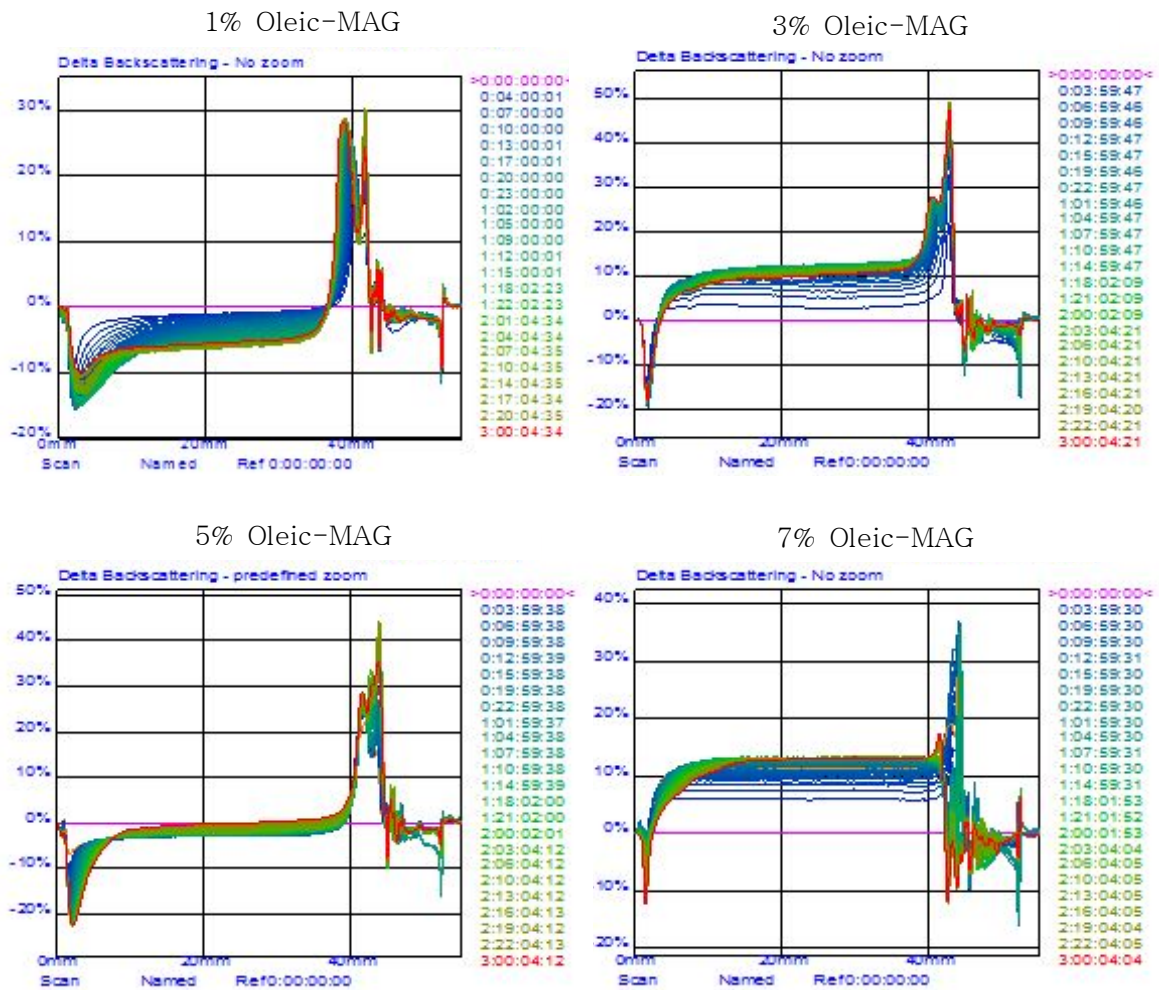
일반적으로 유화물은 일정한 온도 조건에서 시간에 따른 유화 및 분산안정성이 저하되는 현상이 발생하는데, 이러한 유화구의 이동으로 인한 올레산 함유 모노글리세라이드와 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드 함량 증가에 따른 적용특성을 비교하기 위해 올레산 함유 모노글리세라이드와 폴리소르베이트 80 (polysorbate 80)를 6:4 비율로 제조된 샘플과 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드와 폴리소르베이트 80 (polysorbate 80)를 6:4 비율로 제조된 샘플을 60°C 온도 조건에서 보관하여 응집과 침전 그리고 크리밍 현상에 대한 모니터링을 하여 Figure 35과 36에서와 같은 결과를 얻었다.

제조된 유화물을 60°C에서 3일 동안 매 1시간 간격으로 scanning하여 분산안정성의 변화를 측정된 결과이다. X 축은 시료의 높이 (mm)를, Y 축에 대한 각 scan 시간에 따른 profile의 변화 (delta backscattering flux (%) in reference mode)를 의미한다. 두 시료의 분석 결과는 2차 profile (1시간 차 샘플)을 기준으로 하였는데, 이는 설정 온도 60°C로 온도 조절 중인 기기에 상온 보관 중인 시료를 채취한 후 바로 넣었기 때문에 온도 평형으로 인한 profile의 이동을 배제하기 위함이다.

기본적으로 두 시료 모두 전형적인 creaming 현상에 의해 분산안정성이 저하되는 모습이 관찰되었다. 이 경우 시간이 지남에 따라 시료 상층부는 상대적으로 농도가 증가 (cream layer 형성)하므로 backscattering flux (%)가 증가하고, 시료 하층부는 농도가 감소 (clarification layer 형성)하므로 backscattering flux (%)가 감소한다. 또한 시료 맨 바닥에 보면 backscattering flux (%)가 증가하는 부분이 관찰되는데 이는 침전으로 인해 이 부분의 농도가 증가하였기 때문이다.

Creaming 현상으로 인한 시료 상층부와 하층부의 backscattering flux (%) 변화는 stability kinetics (Figure 37과 38)와 stability index (Table 14)를 참고하면 보다 쉽게 확인할 수 있다.

상기 실험 결과에서 알 수 있듯이 대조구로서 사용한 올레산 함유 모노글리세라이드와 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드를 비교하였을 때, 유화력은 올레산 함유 모노글리세라이드가 높게 나타난 반면, 유화 안정성은 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드로 제조된 유화물이 비교 우위를 나타내고 있음을 확인하였다. 따라서 본 연구에서 개발된 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드의 유화제로서 적용은 충분히 가능한 것으로 확인되었다.



**Figure 35.** The stability of emulsion depending on the concentration of monoglyceride containing oleic acid (Oleic-MAG) at different retention time.

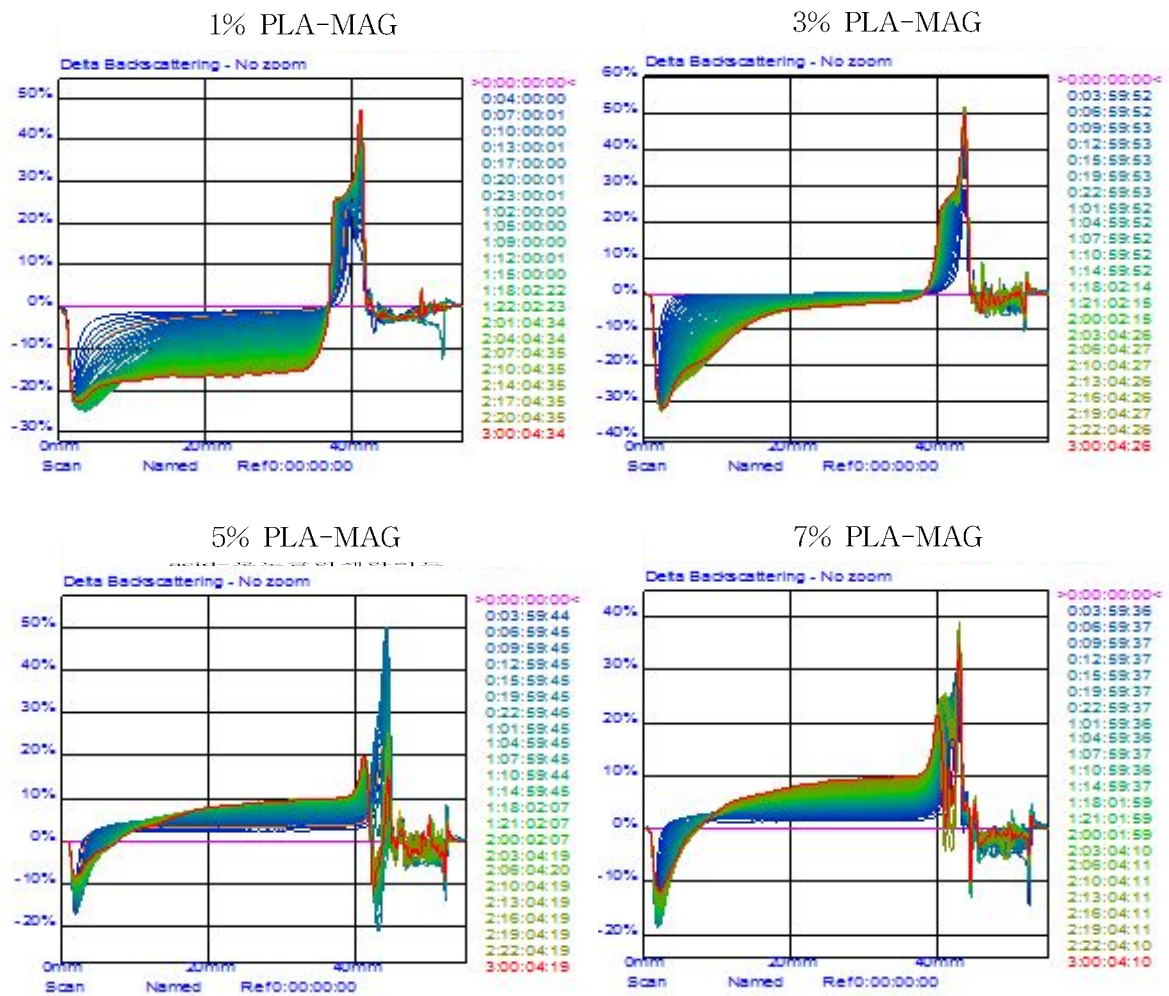


Figure 36. The stability of emulsion depending on the concentration of monoglyceride containing pinolenic acid (PLA-MAG) at different retention time.

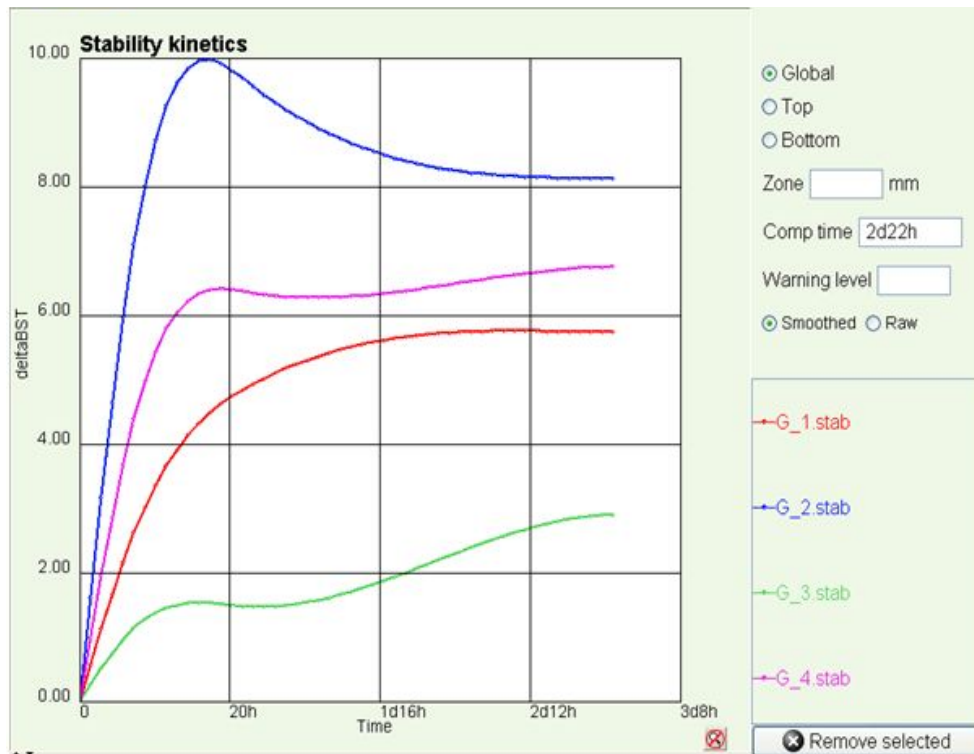


Figure 37. The stability kinetics of oleic acid-monoglyceride emulsion.

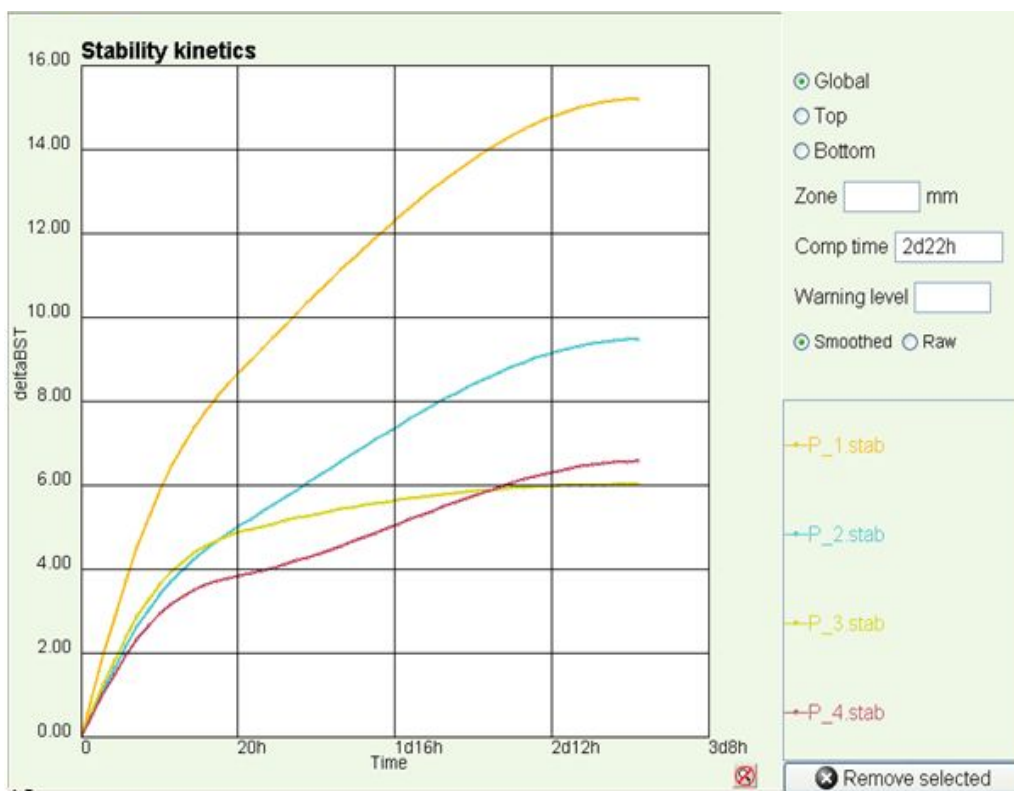


Figure 38. The stability kinetics of pinolenic acid-monoglyceride emulsion.

**Table 14.** Stability index of emulsions prepared from monoglyceride containing oleic acid and monoglyceride containing pinolenic acid

Sample Name		Turbiscan Stability Index
Oleic acid -monoglyceride	1%	4.81
	3%	8.20
	5%	1.84
	7%	5.94
Pinolenic acid -monoglyceride	1%	10.59
	3%	6.37
	5%	4.94
	7%	4.54

#### 나. 잣기름으로부터 효소적 공법을 이용한 고순도 모노글리세라이드 합성

##### (1) 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드 생산을 위한 효소 스크리닝

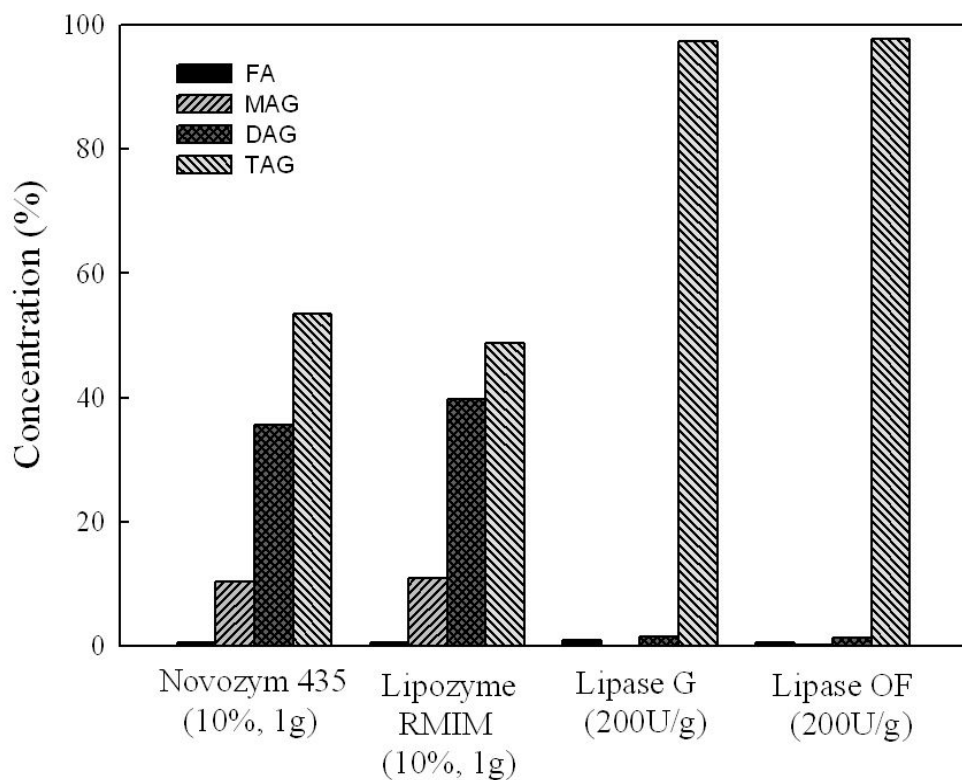
피놀레닌산 함유 모노글리세라이드가 유화제로서 가치가 있으며, 기능성 지방산을 함유하고 있어 더욱 고부가가치 상품이 될 것임을 확인하였으므로 고온에서 합성하는 기존의 방법 보다는 효소를 이용하는 친환경적인 방법으로 더 순도 높은 합성이 이루어진다면 반응 시스템 자체도 큰 의미를 갖게 될 것이다. 따라서 이번 실험에서는 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드를 효소를 이용하여 합성하기에 좋은 기질의 형태를 찾고, 반응에 적합한 효소를 스크리닝하고자 하였다. 기질의 형태에 따라 두 가지 실험방법이 행해졌다. 첫 번째는 트리글리세라이드 형태에 글리세롤을 첨가하여 에스테르 결합을 끊어내는 글리세롤리시스 (glycerolysis) 방법이고 두 번째는 지방산의 형태와 글리세롤을 합성하는 에스테르화 (esterification) 반응이었다. 여기에 사용된 효소는 식품에 사용 가능한 효소들로 고정화 효소 두 가지인 Novozym 435와 Lipozyme RM IM,과 고정화되지 않은 가루형 효소 두 가지인 Lipase G (Amano)와 Lipase OF (Meito)이었다. 이 반응들은 Figure 8과 같이 circulating water bath가 연결된 jacket type 반응기를 이용하였으며, 일정 반응 시간마다 소량 (5 mg)의 시료를 취하여 모노글리세라이드의 조성을 즉시 분석하였다.

글리세롤리시스 반응은 잣기름과 글리세롤을 1:4.5의 몰비율로 12시간 동안 용매를 사용하

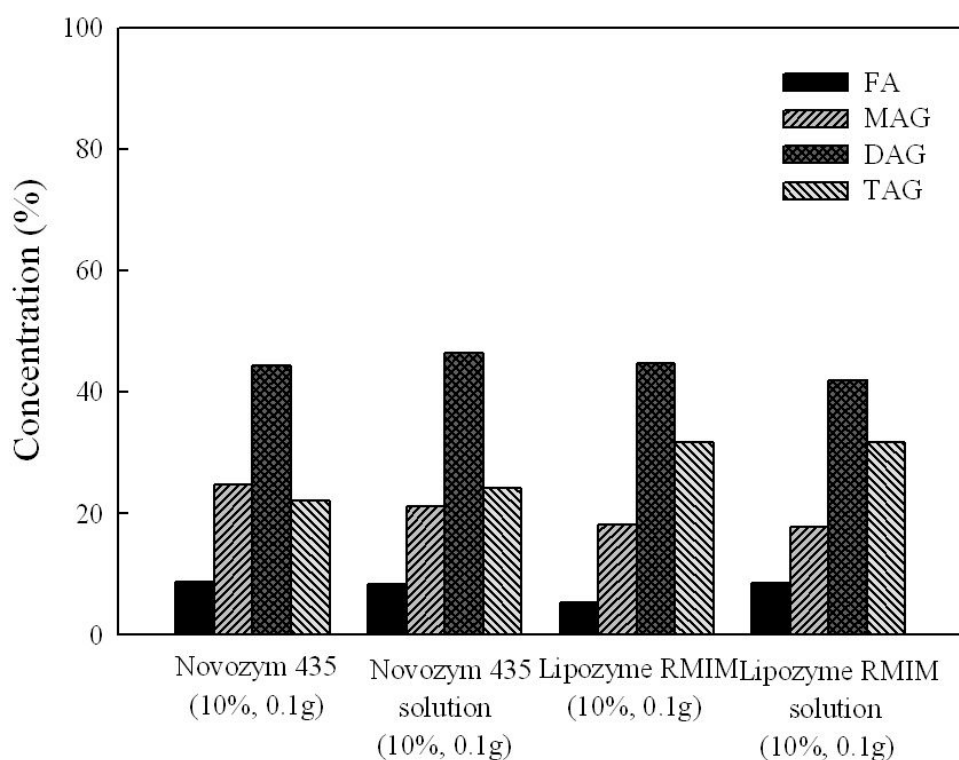
지 않고 반응을 실시하였다. 그 결과 Figure 39와 같이 고정화되지 않은 가루형태의 효소, Lipase G와 Lipase OF의 경우 전혀 반응이 일어나지 않은 반면 고정화 형태인 Novozym 435 및 Lipozyme RI IM의 경우에는 약 50% 트리글리세라이드와 약 10%의 모노글리세라이드가 생성되는 결과를 얻을 수 있었다. 그러나 이 반응 기질을 이용하면 상당량의 트리글리세라이드와 디글리세라이드로 인하여 매우 낮은 순도의 모노글리세라이드를 얻게 되므로 적합하지 않은 반응 시스템이라는 결론을 얻었다.

에스테르화 반응은 잣기름의 지방산형태와 글리세롤의 몰비율을 1:5로하고 효소량은 고정화 효소의 경우 총 기질량의 10%로 하고 가루 효소의 경우에는 200 U/g의 활성으로 조절하여 반응시켰다. 사용된 지방산은 잣기름을 검화 또는 *Candida rugosa*에서 유래된 지방 분해 효소 Lipase OF에 의해 준비되었다. 그리고 에스테르화 반응 시 필요로하는 수분량이 있으므로 건조된 상태와 수분을 첨가시킨 형태로 구분하여 실험하였다. 고정화 효소에 관한 결과는 Figure 40에 제시하였고, 가루 효소의 결과는 Figure 41에 제시하였다. 고정화 효소의 경우에는 수분의 첨가여부가 결과에 큰 영향을 미치지 않았고 디글리세라이드의 함량이 모노글리세라이드의 함량보다 월등히 높아 모노글리세라이드 합성에는 적합하지 않은 것으로 결론 내렸다. 반면 고정화되지 않은 가루 효소들의 경우에는 Lipase G는 수분의 유무가 크게 영향을 미쳤으며, 수분을 첨가하였을 때 디글리세라이드나 트리글리세라이드는 합성되지 않고 지방산의 함량이 감소하면서 모노글리세라이드의 함량이 증가하였다. Lipase OF의 경우에는 거의 반응이 일어나지 않았다. 따라서 모노글리세라이드 합성에는 지방산과 글리세롤을 반응시키는 에스테르화 반응으로 Lipase G (*Penicillium camembertii* 유래)를 사용하는 것이 적합하다는 것이 확인되었다.

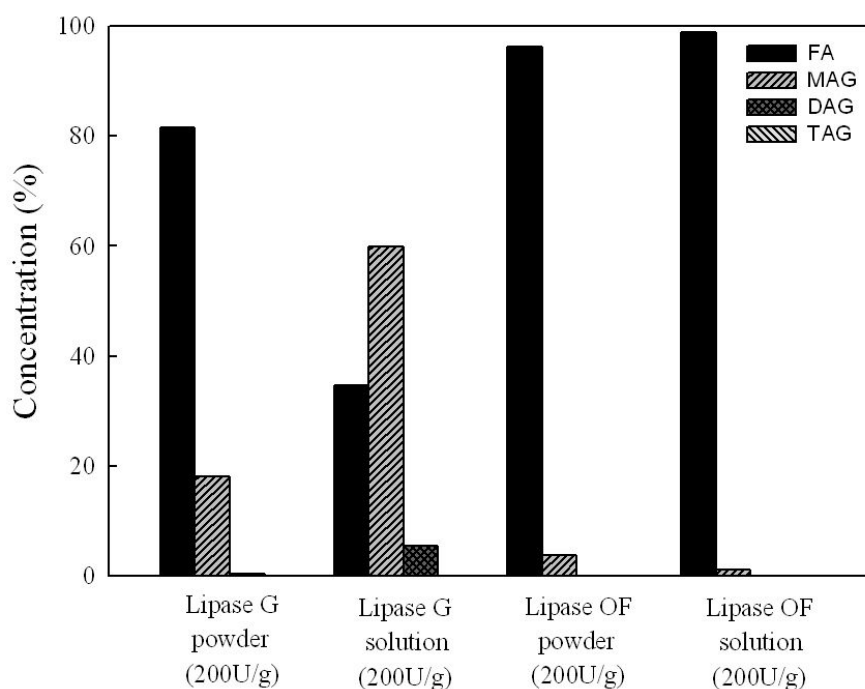




**Figure 39.** Effect of various enzymes on the glycerolysis of pine nut oil under solvent-free system. Each concentration of FA, MAG, DAG, and TAG described the each content of fatty acid, monoglyceride, diglyceride, and triglyceride based on the sum of fatty acid, monoglyceride, diglyceride, and triglyceride produced by glycerolysis of pine nut oil as weight percentage. Reaction conditions – Mole ratio (pine nut oil to glycerol); 1:4.5 (10 g), Temperature; 40°C, Shaking speed; 300rpm, Reaction time; 12 h.



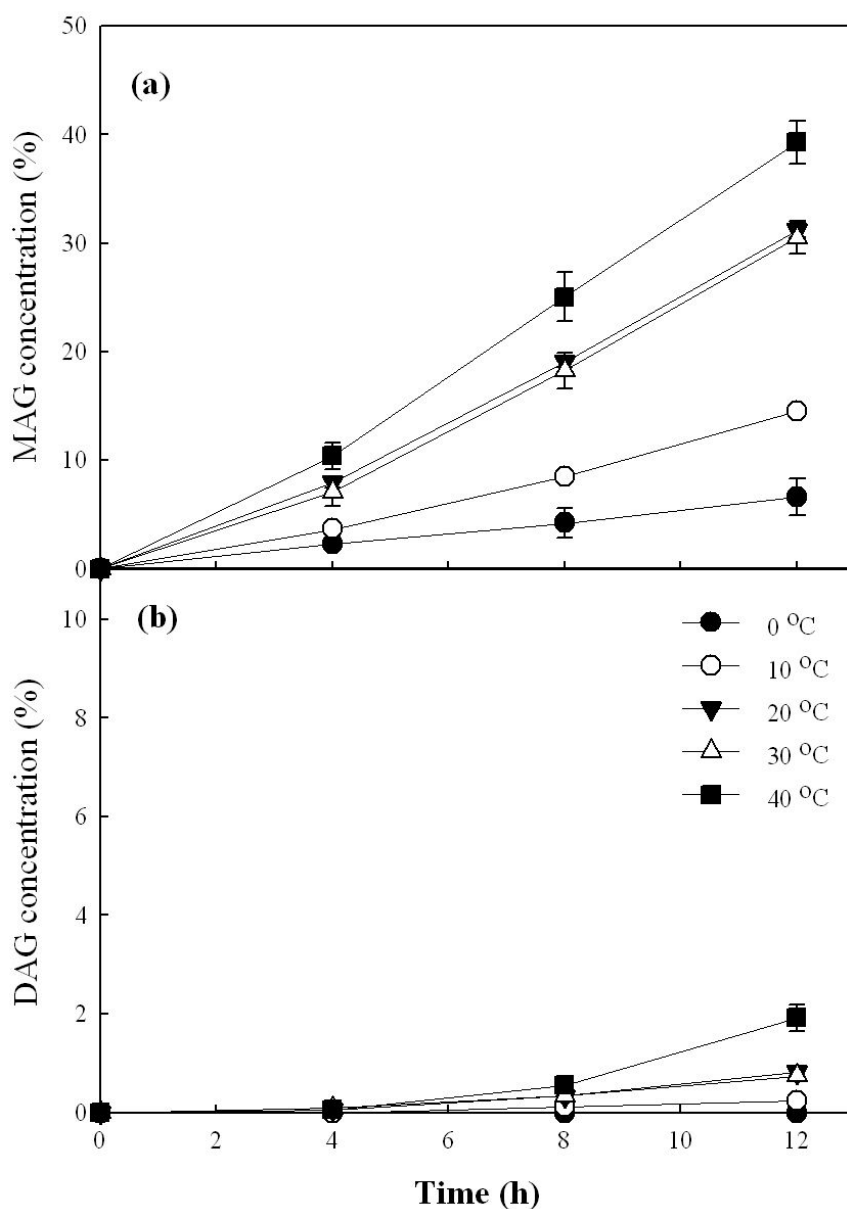
**Figure 40.** Effect of water on the esterification of pine nut oil fatty acids using Novozym 435 and Lipozyme RMIM under solvent-free system. Each concentration of FA, MAG, DAG, and TAG described the each content of fatty acid, monoglyceride, diglyceride, and triglyceride based on the sum of fatty acid, monoglyceride, diglyceride, and triglyceride produced by esterification of pine nut oil fatty acids as weight percentage. Reaction conditions – Mole ratio (pine nut oil fatty acid to glycerol); 1:5 (10 g), Temperature; 40°C, Shaking speed; 300rpm, Reaction time; 24 h.



**Figure 41.** Effect of water on the esterification of pine nut oil fatty acids using Lipase G and Lipase OF under solvent-free system. Each concentration of FA, MAG, DAG, and TAG described the each content of fatty acid, monoglyceride, diglyceride, and triglyceride based on the sum of fatty acid, monoglyceride, diglyceride, and triglyceride produced by esterification of pine nut oil fatty acids as weight percentage. Reaction conditions – Mole ratio (pine nut oil fatty acid to glycerol); 1:5 (10 g), Temperature; 40°C, Shaking speed; 300rpm, Reaction time; 24 h.

## (2) 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드 생산을 위한 온도 효과에 대한 조사

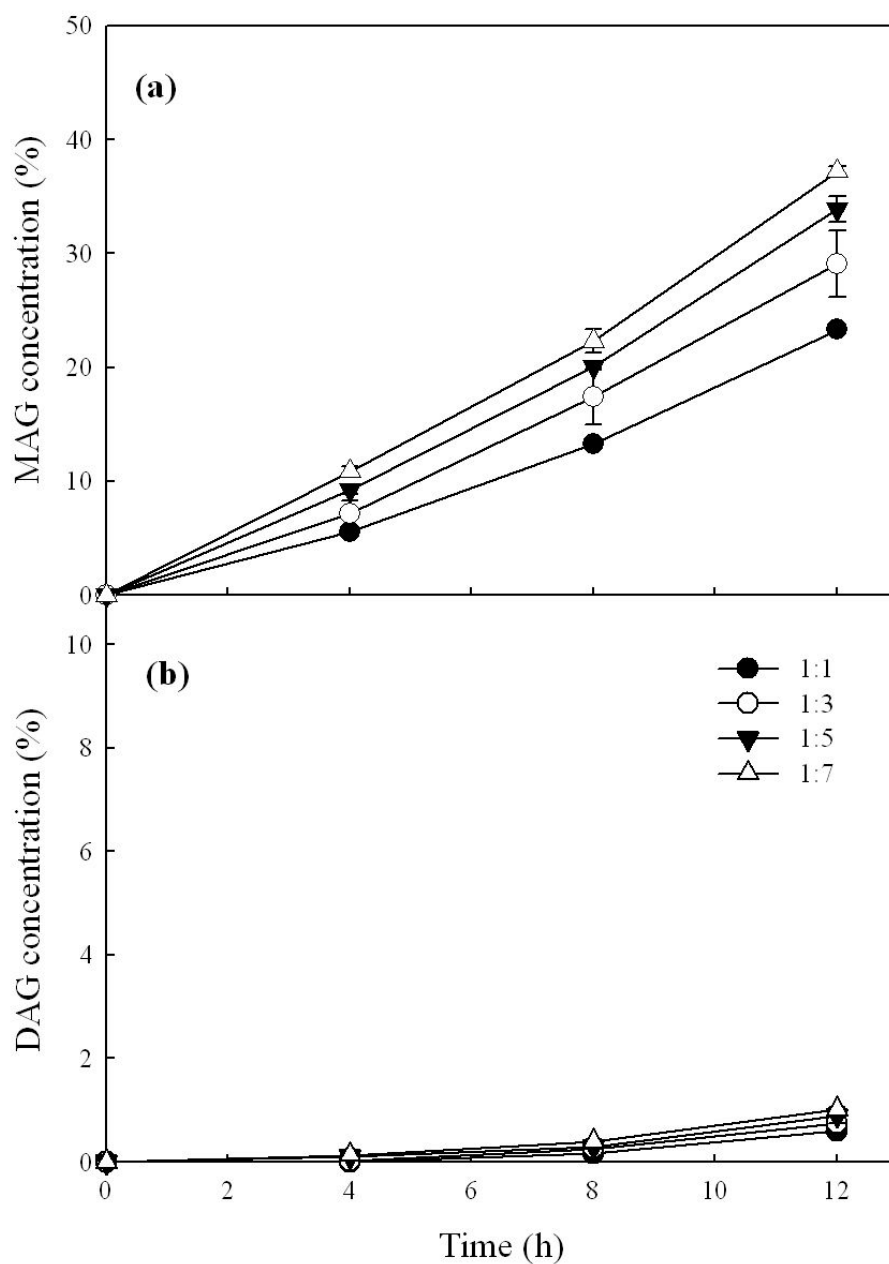
선별된 효소인 *Penicillium camembertii* 유래 Amano 사 (Japan) 상업용 lipase 일명 Lipase G를 이용하여 모노글리세라이드 합성이 시도 되었다. 모노글리세라이드 합성을 위한 기질로는 글리세롤과 잣기름으로 만들어진 지방산을 기질로 사용 하였다. 온도 효과를 확인하기 위한 실험의 반응 조건은 지방산과 글리세롤의 몰비율을 1:3으로 한 상태에서 총 기질의 양을 10 g으로 하였다. 수분 첨가량은 1%, 효소 활성은 200 U/g으로 고정 하였고 12 시간 동안 반응을 실시하였다. 반응 온도에 따른 모노글리세라이드 합성 결과를 살펴본 결과 Figure 42와 같이 0°C 부터 40°C까지 온도가 증가함에 따라 모노글리세라이드 함량도 증가하는 결과를 보여 주었으나 20°C와 30°C 사이에 큰 차이를 보여주지 않았다. 반면 반응온도가 30°C에서 40°C로 증가 하였을 때 디글리세라이드 함량도 크게 증가하는 경향을 보여주었다. 본 연구의 목적은 고순도의 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드를 생산하는 것이므로 디글리세라이드 함량이 증가하는 것은 바람직하지 않다. 따라서 모노글리세라이드 생산에 적합한 온도를 20°C로 결정하였다.



**Figure 42.** Effect of temperature on the synthesis of monoglyceride from pine nut oil fatty acids and glycerol using Lipase G under solvent-free system. Each concentration of MAG, and DAG described the each content of monoglyceride, and diglyceride based on the sum of fatty acid, monoglyceride, diglyceride, and triglyceride produced by glycerolysis of pine nut oil fatty acids as weight percentage. Reaction conditions – Mole ratio (pine nut oil fatty acid to glycerol); 1:3 (10 g), Water content; 1%, Lipase G activity; 200U/g, Shaking speed; 300rpm, Reaction time; 12 h.

### (3) 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드 생산을 위한 기질의 몰비율 효과에 대한 조사

선정된 Lipase G를 이용하여 최적온도 20°C에서 잣기름 지방산과 글리세롤의 몰비율에 따른 모노글리세라이드 합성 효과를 조사하였다. 이때 반응물의 총량, 기질에 대한 수분 첨가량, 효소량 및 반응시간은 온도 실험의 경우와 같은 조건에서 실시하였으며, 잣기름 지방산과 글리세롤의 몰비율 범위는 1:1부터 1:7의 범위에서 실시되었다. 그 결과 1:1부터 1:5까지는 모노글리세라이드의 합성이 급속히 증가하는 경향을 보여 주었다 (Figure 43). 반면 1:5부터 1:7까지의 몰비율 증가에서는 모노글리세라이드 합량의 증가폭이 크게 변화되지 않았다. 몰비율의 증가는 총 반응물 중 글리세롤의 증가를 의미하며, 너무 큰 몰비율은 글리세롤의 과다 증가를 의미 할 뿐 만 아니라 최종 모노글리세라이드 절대 생산의 감소를 의미한다. 따라서 본 연구에서는 최종 반응물로부터 모노글리세라이드 절대 생산성을 고려 최적 몰 비율을 1:5로 선정 하였다.



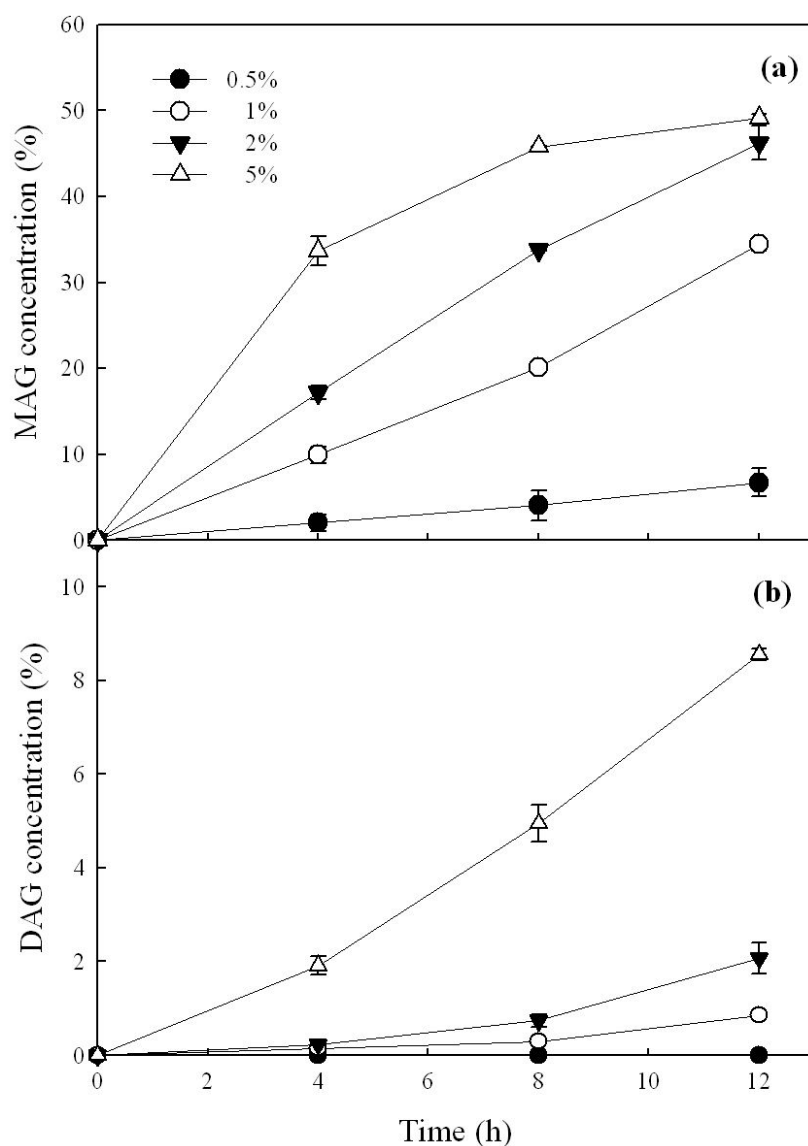
**Figure 43.** Effect of mole ratio on the synthesis of monoglyceride from pine nut oil fatty acids and glycerol using Lipase G under solvent-free system. Each concentration of MAG, and DAG described the each content of monoglyceride, and diglyceride based on the sum of fatty acid, monoglyceride, diglyceride, and triglyceride produced by glycerolysis of pine nut oil fatty acids as weight percentage. Reaction conditions – Temperature; 20°C, Water content; 1%, Lipase G activity; 200U/g, Shaking speed; 300rpm, Reaction time; 12 h.

#### (4) 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드 생산을 위한 수분함량 효과에 대한 조사

효소를 이용한 에스테르 교환 (transesterification)과 산분해 (acidolysis), 알콜리시스 (alcoholysis), 에르테르화 (esterification) 등의 반응들은 효소의 활성을 높여줄 minimal water가 필요하다. 그러나 과량의 수분이 첨가될 경우에 가수분해가 더 활발하게 일어나서 합성이 이루어지지 않을 수도 있고, acyl migration이라는 부가 반응에 의해 원치 않는 결합이 이루어질 수도 있다. 따라서 효소를 이용하는 반응에서 수분함량을 조절하는 것은 매우 중요하다. 앞의 효소 스크리닝 과정에서도 수분의 효과에 대하여 확인한 바 있다 (Figure 41).

이번 연구에서는 모노글리세라이드를 합성하기 위한 최적의 수분함량을 찾기 위한 연구이며, 그 결과는 Figure 44에 제시되었다. 실험은 앞에서 선정된 최적의 온도 20°C와 잣기름 지방산과 글리세롤의 몰비율 1:5의 조건에서 이루어졌으며, 그 이외의 반응 조건은 몰비율의 실험과 같은 조건에서 실시 하였다. 조사된 수분함량 범위는 총 기질의 무게를 기준으로 0.5% - 5%로 하였다. 수분함량이 0.5%의 경우에는 반응속도가 매우 느린 것으로 나타났다. 반면에 수분함량이 증가함에 따라 모노글리세라이드 함량이 급속히 증가하는 경향을 보여 주었다. 그러나 초기 반응에는 5%까지 수분함량 증가에 따른 모노글리세라이드 함량이 비례적으로 증가하는 경향을 보여 주었지만, 12시간의 반응 후에는 2%와 5% 간에 모노글리세라이드 함량의 차이가 유의적이지 않았다. 반면 12시간 반응 후에 디글리세라이드 함량은 2%와 5% 사이에 약 5배의 차이를 보여주었다. 따라서 최적 수분함량은 반응물에 대하여 2%의 수분함량으로 결정되었다.

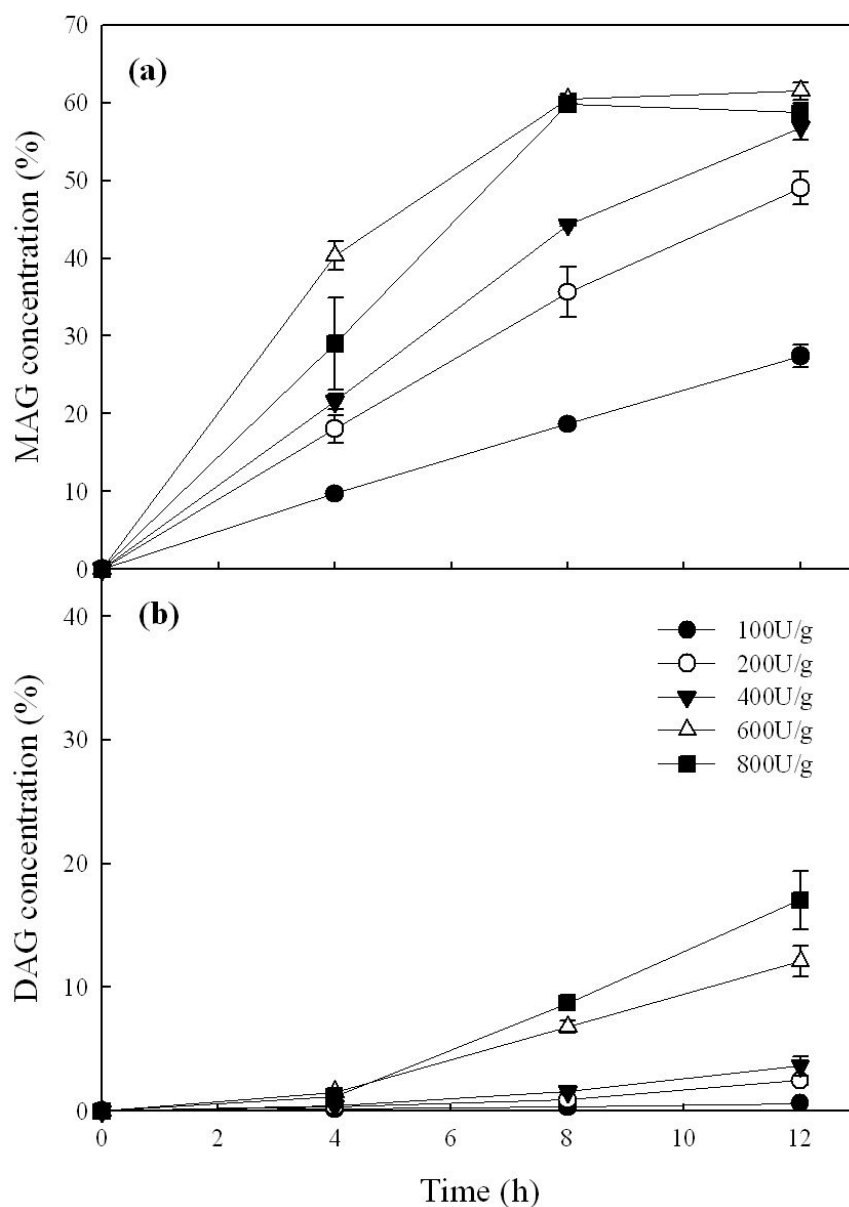




**Figure 44.** Effect of water content on the synthesis of monoglyceride from pine nut oil fatty acids and glycerol using Lipase G under solvent-free system. Each concentration of MAG, and DAG described the each content of monoglyceride, and diglyceride based on the sum of fatty acid, monoglyceride, diglyceride, and triglyceride produced by glycerolysis of pine nut oil fatty acids as weight percentage. Reaction conditions – Temperature; 20°C, Mole ratio (pine nut oil fatty acid to glycerol); 1:5, Lipase G activity; 200U/g, Shaking speed; 300rpm, Reaction time; 12 h.

#### (5) 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드 생산을 위한 효소량 효과에 대한 조사

효소량에 따른 모노글리세라이드 생성량에 대한 효과를 조사 하였다 (Figure 45). 첨가된 수분 함량은 2%로 하였고 그 이외의 반응 조건은 몰비율의 실험과 같은 조건에서 실시하였다. Lipase G의 경우에는 고정화된 효소가 아니기 때문에 효소량의 변화는 효소의 활성을 변화시키는 방법으로 조절하였다. 적용된 효소 활성의 범위는 100 U/g - 800 U/g로 하였다. 그 결과 효소활성이 600 U/g까지 증가할 때까지는 급격한 증가를 보였으나 그 이상에서는 차이를 나타내지 않았다. 600 U/g의 경우 8시간에 모노글리세라이드 함량이 약 60.5%으로 평형에 도달한 반면 400 U/g의 경우에는 12시간에 58.5%로 약 4%정도 모노글리세라이드 함량이 낮은 것으로 나타났다. 디글리세라이드의 함량이 600 U/g에서 크게 증가하였지만 400 U/g에 비하여 모노글리세라이드 합성이 많은 양 빠르게 이루어졌기 때문에 본 연구에서는 600 U/g를 최적조건으로 선정 하였다.



**Figure 45.** Effect of enzyme loading on the synthesis of monoglyceride from pine nut oil fatty acids and glycerol using Lipase G under solvent-free system. Each concentration of MAG, and DAG described the each content of monoglyceride, and diglyceride based on the sum of fatty acid, monoglyceride, diglyceride, and triglyceride produced by glycerolysis of pine nut oil fatty acids as weight percentage. Reaction conditions – Temperature; 20°C, Mole ratio (pine nut oil fatty acid to glycerol); 1:5 (10 g), Water content; 2%, Shaking speed; 300rpm, Reaction time; 12 h.

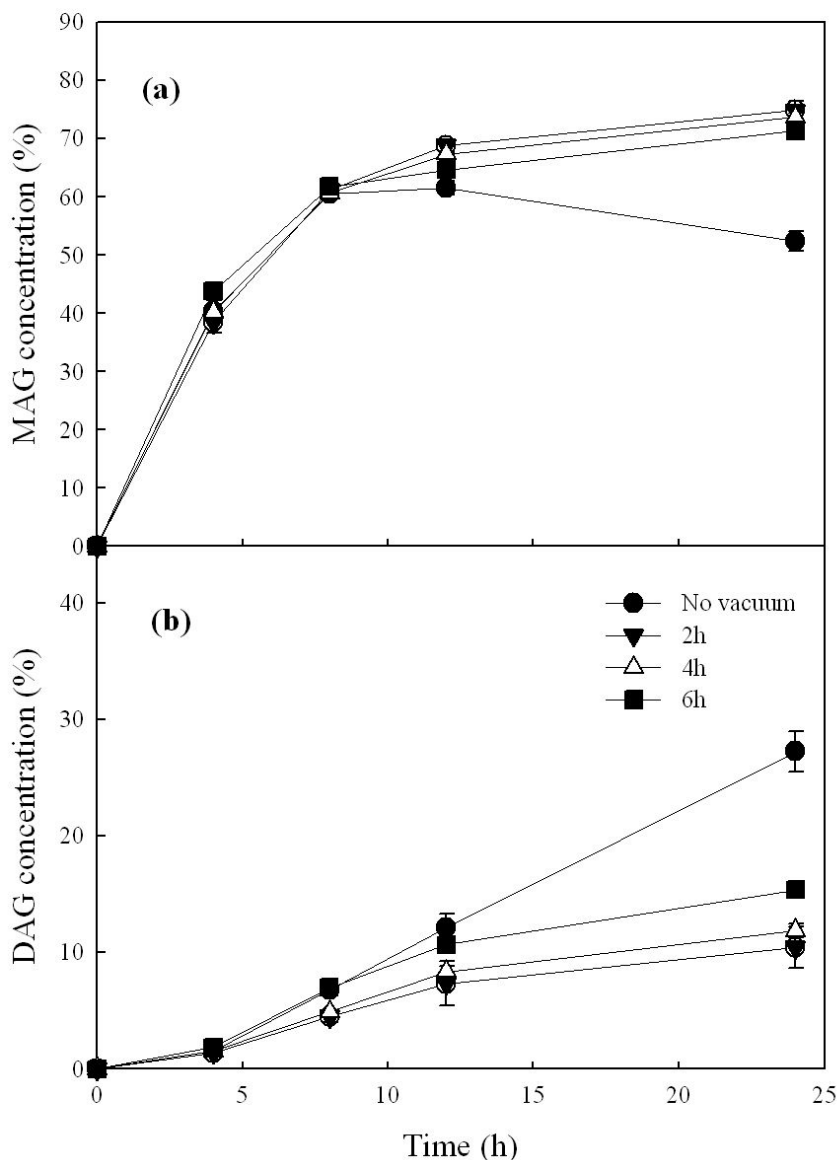
## (6) 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드 합성을 증대를 위한 진공 효과에 대한 조사

### (가) 진공 적용 시점에 대한 설정

효소량 선정 시 모노글리세라이드의 함량이 빠르게 많이 증가하는 600 U/g로 선정은 하였으나 디글리세라이드의 함량이 4시간부터 급격히 증가하여 모노글리세라이드의 함량이 평형에 도달하는 8시간이 되면 디글리세라이드 함량은 약 7%에 도달하게 된다. 따라서 이번 연구에서는 디글리세라이드의 생성량을 감소시킬 방법으로 초기 반응에서는 수분 2%에서 반응을 최대한으로 촉진시킨 후에 적절한 시점에서 진공 반응 시스템을 적용시킴으로서 반응 중에 생성되는 수분의 양을 조절해 보기로 하였다.

진공 반응 시스템을 적용시킬 적절한 시기를 정하기 위하여 초기 반응 시간을 2 시간 또는 4 시간, 6 시간까지 시킨 후에 10 torr의 진공을 적용하여 총 반응 시간을 24 시간으로 하여 진공의 효과를 조사하여 보았다 (Figure 46). 진공 반응시스템의 모형은 Figure 9와 같았다. 24 시간동안 진공을 적용하지 않은 상태에서 즉 no vacuum 상태에서 반응을 시켰을 경우 모노글리세라이드 함량이 12 시간 반응 후 최대 약 61%를 나타냈으나, 24시간에서는 디글리세라이드 함량은 증가한 반면 모노글리세라이드 함량은 52%로 급격히 감소하였다. 수분은 초기 단계에서는 에스테르화 반응 촉진을 위하여 일정량 이상이 필요하지만, 일정 수준 또는 시간이후 부터는 acyl migration이 촉진되어 디글리세라이드 함량이 급증한 것으로 예측된다.

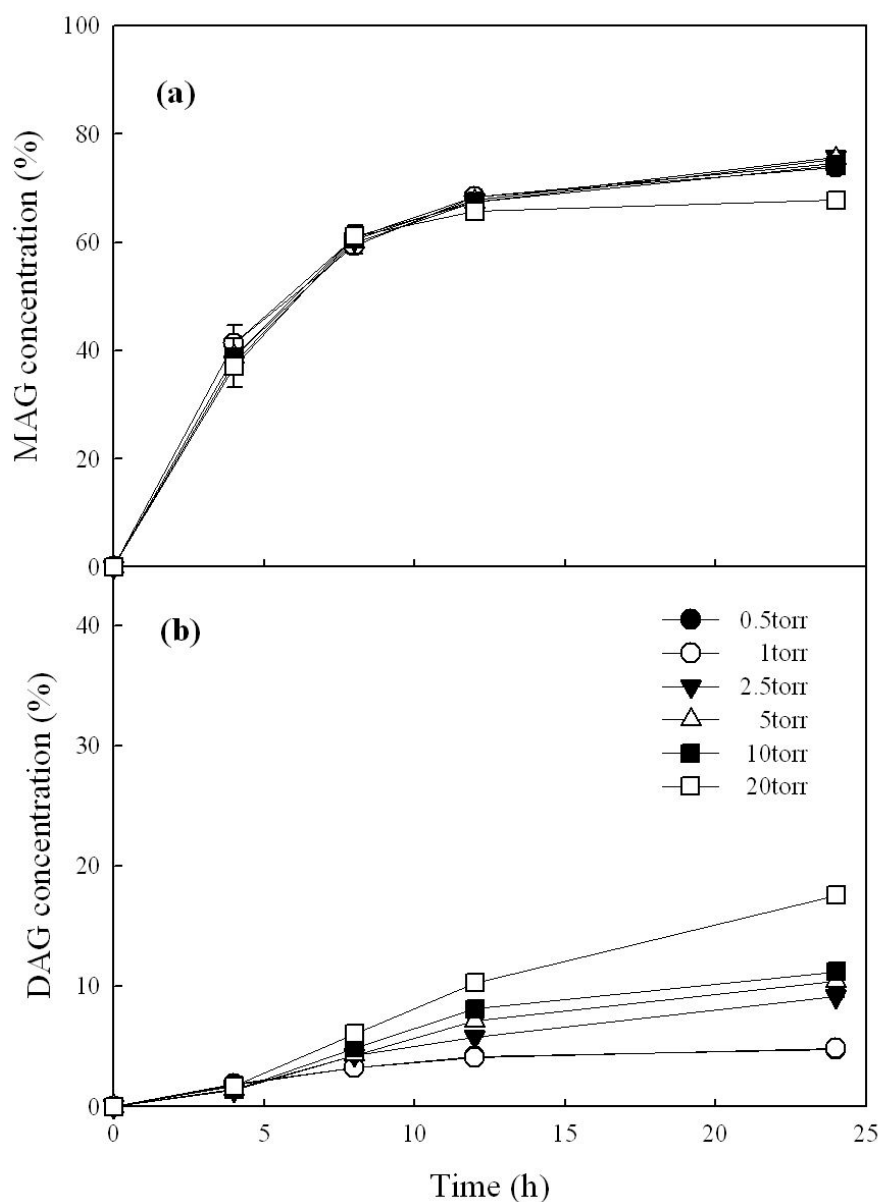
초기 반응 2시간과 4시간 이후부터 10 torr의 진공 상태에서 총 24시간 동안 반응한 결과 모노글리세라이드 함량은 약 75% 수준으로 매우 높아졌다. 초기 반응 6시간 이후 진공 반응 시스템을 적용시킨 경우에도 총 반응 시간이 24시간 동안 이루어진 후에 모노글리세라이드 함량은 71%까지 증가하였지만 초기 반응 2시간이나 4시간 후에 진공 반응 시스템을 적용시킨 결과보다 낮게 나타났으며, 디글리세라이드 함량도 4%로 높아지는 경향을 보였다. 따라서 일정 시간 이후에 진공 반응 시스템을 통하여 수분을 제거하는 방법이 매우 효과적인 방법이라는 결론을 얻을 수 있었으며, 진공을 적용하는 시간은 초기 반응 4시간 이후부터 적용하는 것이 가장 최적 진공 적용 시간인 것으로 나타났다.



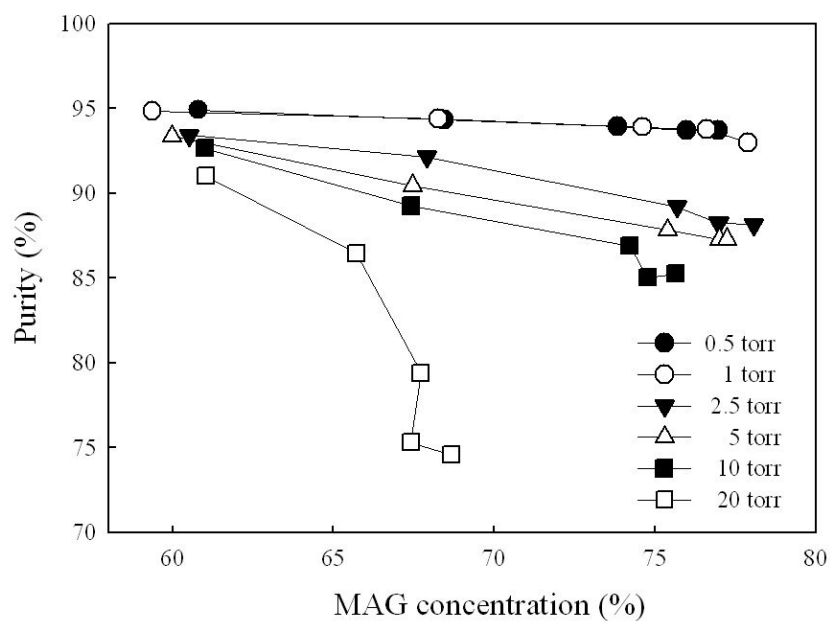
**Figure 46.** Effect of starting point of vacuum system on the synthesis of monoglyceride from pine nut oil fatty acids and glycerol using Lipase G under solvent-free system. Each concentration of MAG, and DAG described the each content of monoglyceride, and diglyceride based on the sum of fatty acid, monoglyceride, diglyceride, and triglyceride produced by glycerolysis of pine nut oil fatty acids as weight percentage. Reaction conditions – Temperature; 20°C, Mole ratio (pine nut oil fatty acid to glycerol); 1:5 (10 g), Initial water content; 2%, Shaking speed; 300rpm, Lipase G activity; 600U/g.

## (나) 진공도에 따른 효과

진공도가 높을 경우에 보다 많은 수분이 제거되고 따라서 acyl migration의 감소로 인한 디글리세라이드 생성량도 줄어들 수 있을 것이라고 예측되었다. 따라서 초기반응 4시간 이후 진공도에 따른 모노글리세라이드 생성량 및 디글리세라이드 생성량에 대한 실험을 실시 하였다 (Figure 47). 측정된 진공도는 0.5와 1, 2.5, 5, 10, 20 torr이었다. 그 결과 0.5 - 10 torr 까지 모노글리세라이드 함량은 총 24시간의 반응 시간 후에 약 75%로 유의적인 차이를 보여주지 않았다. 한편 20torr의 경우 총 반응 24시간 후 모노글리세라이드 함량이 68%로 낮게 나타났으며 디글리세라이드도 가장 많은 함량이 생성된 결과를 보여주었다. 본 연구에서 추구하는 목표는 최대 수율뿐만 아니라 얻어진 모노글리세라이드의 순도 역시 매우 중요한 요소이다. 따라서 모노글리세라이드 함량뿐 만 아니라 DAG 함량 역시 매우 중요한 요소 이다. 만약 같은 모노글리세라이드 생성량을 갖더라도 DAG 함량이 높을 경우 모노글리세라이드 순도는 감소하기 때문이다. 따라서 각 반응물의 모노글리세라이드 농도에 대한 모노글리세라이드 순도와의 관계를 그래프로 나타내었다 (Figure 48). 그 결과 순도가 증가함에 따라 2.5 torr 이상의 경우 (5 - 20 torr) 모노글리세라이드 함량의 증가에 따라 순도가 급속히 감소하는 경향을 보인 반면에 0.5 torr - 1 torr의 경우에는 75%의 모노글리세라이드 함량 수준에서 90% 이상의 순도를 유지 하였다. 따라서 초기 반응 4시간 이후 적용하는 진공의 진공도는 1 torr가 최적 진공도인 것으로 나타났으며, 이때 모노글리세라이드 함량은 75%이면서, 93%의 고순도의 모노글리세라이드를 합성 할 수 있었다.



**Figure 47.** Effect of vacuum on the synthesis of monoglyceride from pine nut oil fatty acids and glycerol using Lipase G under solvent-free system. Each concentration of MAG, and DAG described the each content of monoglyceride, and diglyceride based on the sum of fatty acid, monoglyceride, diglyceride, and triglyceride produced by glycerolysis of pine nut oil fatty acids as weight percentage. Reaction conditions – Temperature; 20°C, Mole ratio (pine nut oil fatty acid to glycerol); 1:5 (10 g), Initial water content; 2%, Shaking speed; 300rpm, Lipase G activity; 600U/g, Reaction time; 24 h.



**Figure 48.** Correlation of purity and the concentration of monoglyceride (MAG) produced from pine nut oil fatty acids and glycerol using Lipase G under solvent-free system. MAG concentration described the content of MAG based on the sum of fatty acid, MAG, diglyceride (DAG), and triglyceride produced after glycerolysis of pine nut oil fatty acids as weight percentage. Purity described the MAG concentration based on the sum of MAG and DAG. Reaction conditions – Temperature; 20°C, Mole ratio (pine nut oil fatty acid to glycerol); 1:5 (10 g), Initial water content; 2%, Shaking speed; 300rpm, Lipase G activity; 600U/g.



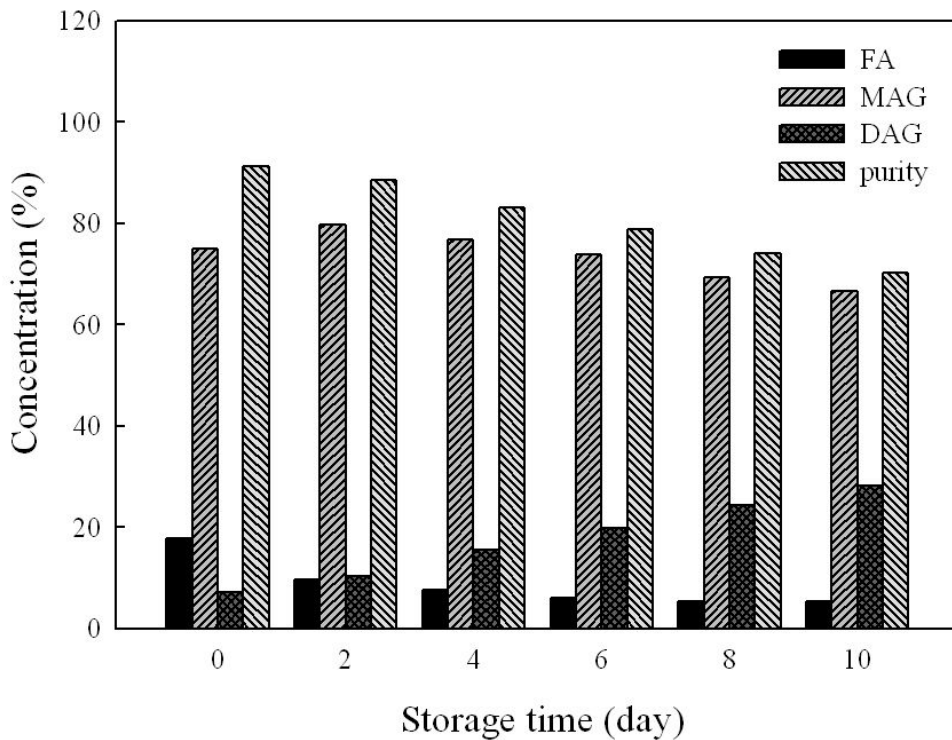
### (7) 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드 합성을 증대를 위한 저온 저장 효과에 대한 조사

몇몇 연구 논문에서는 냉장온도 (4°C) 정도의 저온에서 반응은 매우 느리지만 효과적으로 디글리세라이드 생성량을 억제하면서 모노글리세라이드 생성량을 증가 시킬 수 있다는 보고가 있어왔다 (Watanabe 등). 따라서 본 연구에서는 최적 반응조건 즉 20°C의 반응온도, 600 U/g 효소량, 지방산과 글리세롤 1:5의 몰비율, 최적 진공조건까지 적용하여 총 24시간의 반응 후에 얻어진 반응물 (모노글리세라이드 함량이 약 76%)을 10와 0, -10, -20°C에서 각각 저장 하면서 모노글리세라이드 함량 변화를 조사하였다 (Figure 49-52). 그 결과 10 °C의 경우 2일째 모노글리세라이드 함량이 최대 80%로 나타났으며, 이때 순도는 91%, 디글리세라이드 함량은 10%이었다. 그러나 저장 2일 이후부터는 저장기간이 길어짐에 따라 모노글리세라이드 함량이 서서히 감소하여 10일째 모노글리세라이드 함량과 순도가 각각 66%와 70%를 나타냈으며, 디글리세라이드 함량은 28% 수준 이었다. 한편 0°C의 경우에는 6일째 모노글리세라이드 함량이 최대 85%를 나타내었으며, 이때 순도는 89%, 디글리세라이드 함량은 11%였다. 그러나 저장 6 일 이후부터는 저장기간이 길어짐에 따라 모노글리세라이드함량이 서서히 감소하여 10일째 모노글리세라이드 함량과 순도가 각각 82%와 87%를 나타냈으며, 디글리세라이드 함량은 14%로 나타났다. 냉동온도인 -10°C의 경우에는 8일째 모노글리세라이드 함량이 최대 88 %를 나타냈으며, 이때 순도는 90 %, 디글리세라이드 함량은 9%였다. 그러나 저장 8일 이후부터는 저장기간이 길어짐에 따라 모노글리세라이드 함량뿐만 아니라 디글리세라이드 함량 및 모노글리세라이드 순도에 있어서 큰 차이를 나타내지 않았다. 한편 -20°C의 경우 -10°C와 모노글리세라이드 함량, 모노글리세라이드 순도 및 디글리세라이드 함량에 있어서 큰 차이를 나타내지 않았으며, 오히려 반응 느려지는 경향을 보였다. 따라서 최적 저장 온도 및 시간은 -10°C에서 8일로 나타났다.

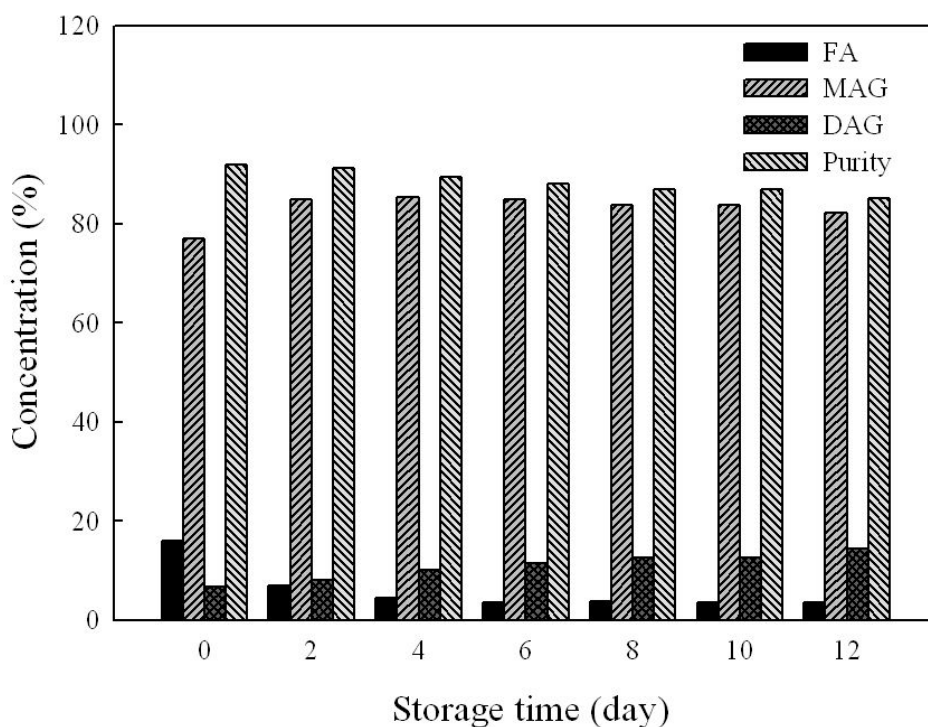
한편 85% 이상의 모노글리세라이드 함량을 갖는 반응물의 경우 지방산 함량이 3.5 % 이하인 것으로 나타났다. 일반적으로 모노글리세라이드 합성 후 지방산을 제거를 위하여 증류 공정이 필요하지만 지방산 함량이 일정량 (4%) 이하일 경우에는 증류과정을 생략 할 수 있다. 따라서 모노글리세라이드의 합성에 적용시킨 저온 저장방법으로 얻은 결과가 획기적이라 할 수 있다.

본 연구로서 확립된 모노글리세라이드 합성 방법은 효소를 이용하였다는 점에서 친환경적인 생산 공정으로서의 의미뿐만 아니라 240°C정도의 고온이 아닌 저온에서 합성할 수 있다는 점에서 공정자체가 큰 의미를 갖는다. 또한 효소의 활성이 거의 정지되었다고 생각되는 냉동온도

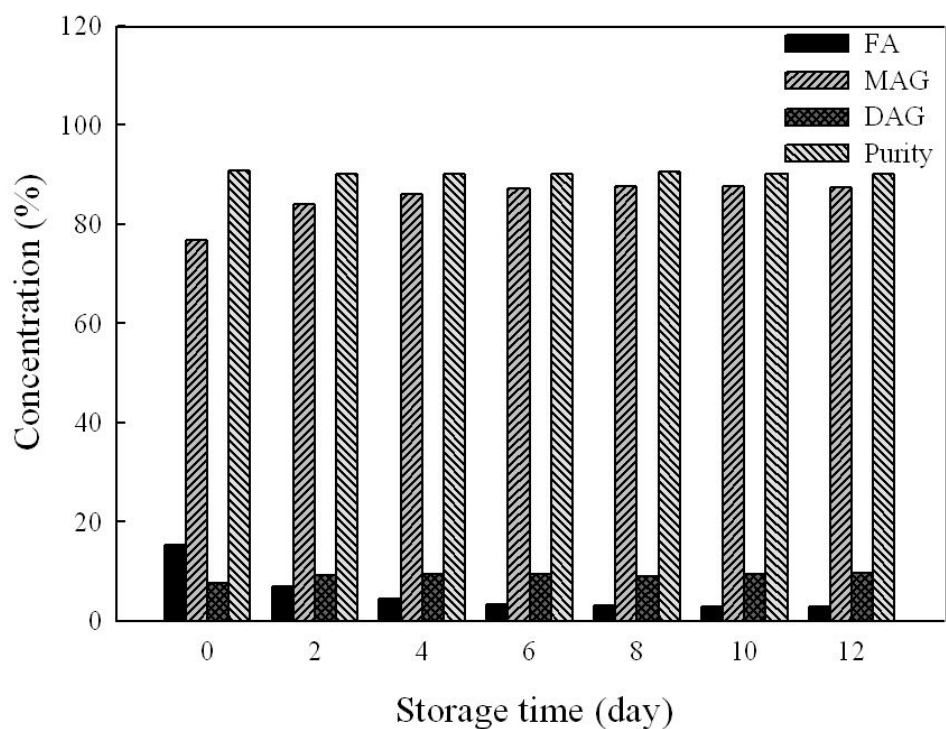
(-10°C)에서 합성이 가능하다는 학술적으로 큰 의미를 갖는 사실을 발견하게 되었다. 산업체에 적용하는 측면에서 가장 큰 장점은 모노글리세라이드 함량이 85% 이상이면서, 잔류 지방산 3% 이하인 반응물을 얻음으로서 기존의 고온에서 증류과정을 거쳐 정제하던 공정을 생략할 수 있게 되었다는 점이다. 이상의 결과로부터, 본 연구를 통하여 효소를 이용한 반응으로 90% 이상의 고순도의 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드 합성함으로써 목표한 바를 성공적으로 이루었다.



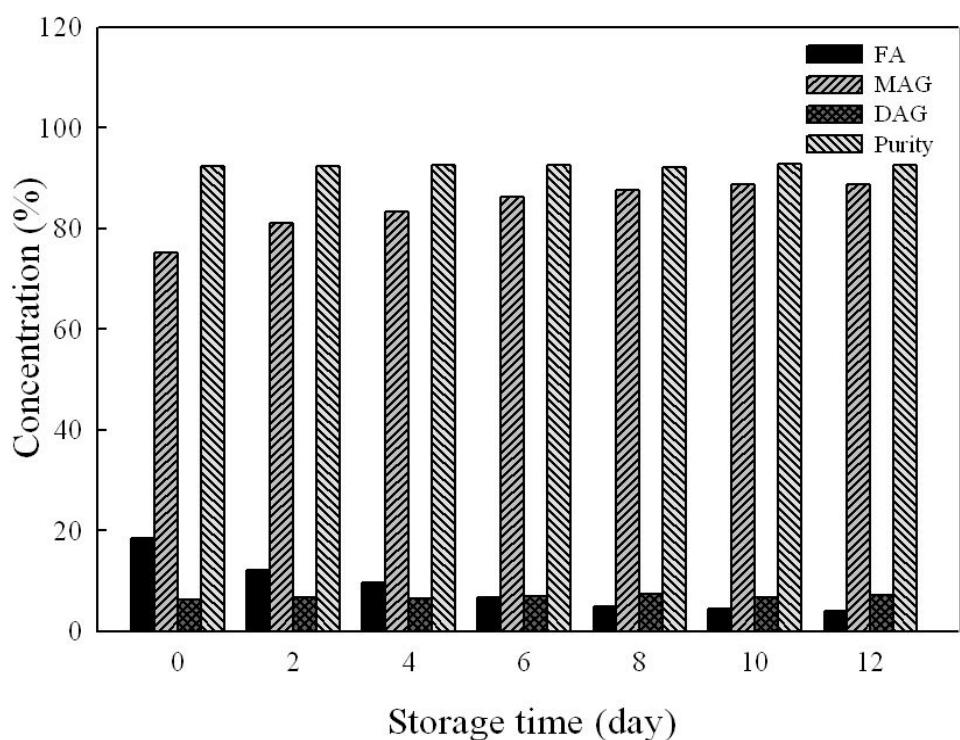
**Figure 49.** Effect of storage time at 10°C on the synthesis of monoglyceride (MAG) from pine nut oil fatty acids and glycerol using Lipase G. Each concentration of FA, MAG, and DAG described the each content of fatty acid, monoglyceride, and diglyceride based on the sum of fatty acid, monoglyceride, diglyceride, and triglyceride produced by glycerolysis of pine nut oil fatty acids as weight percentage. Purity described the MAG concentration based on the sum of MAG concentration and DAG concentration. Reaction conditions for starting material – Temperature; 20°C, Mole ratio (pine nut oil fatty acid to glycerol); 1:5 (10 g), Initial water content; 2%, Shaking speed; 300rpm, Reaction time; 24 h, Lipase G activity; 600U/g.



**Figure 50.** Effect of storage time at 0°C on the synthesis of monoglyceride from pine nut oil fatty acids and glycerol using Lipase G. Each concentration of FA, MAG, and DAG described the each content of fatty acid, monoglyceride, and diglyceride based on the sum of fatty acid, monoglyceride, diglyceride, and triglyceride produced by glycerolysis of pine nut oil fatty acids as weight percentage. Purity described the MAG concentration based on the sum of MAG concentration and DAG concentration. Reaction conditions for starting material – Temperature; 20°C, Mole ratio (pine nut oil fatty acid to glycerol); 1:5 (10 g), Initial water content; 2%, Shaking speed; 300rpm, Reaction time; 24 h, Lipase G activity; 600U/g.



**Figure 51.** Effect of storage time at  $-10^{\circ}\text{C}$  on the synthesis of monoglyceride from pine nut oil fatty acids and glycerol using Lipase G. Each concentration of FA, MAG, and DAG described the each content of fatty acid, monoglyceride, and diglyceride based on the sum of fatty acid, monoglyceride, diglyceride, and triglyceride produced by glycerolysis of pine nut oil fatty acids as weight percentage. Purity described the MAG concentration based on the sum of MAG concentration and DAG concentration. Reaction conditions for starting material – Temperature;  $20^{\circ}\text{C}$ , Mole ratio (pine nut oil fatty acid to glycerol); 1:5 (10 g), Initial water content; 2%, Shaking speed; 300rpm, Reaction time; 24 h, Lipase G activity; 600U/g.



**Figure 52.** Effect of storage time at  $-20^{\circ}\text{C}$  on the synthesis of monoglyceride from pine nut oil fatty acids and glycerol using Lipase G. Each concentration of FA, MAG, and DAG described the each content of fatty acid, monoglyceride, and diglyceride based on the sum of fatty acid, monoglyceride, diglyceride, and triglyceride produced by glycerolysis of pine nut oil fatty acids as weight percentage. Purity described the MAG concentration based on the sum of MAG concentration and DAG concentration. Reaction conditions for starting material – Temperature;  $20^{\circ}\text{C}$ , Mole ratio (pine nut oil fatty acid to glycerol); 1:5 (10 g), Initial water content; 2%, Shaking speed; 300rpm, Reaction time; 24 h, Lipase G activity; 600U/g.

### 3. 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드를 유화제로 이용한 시제품 생산

피놀레닌산 함유 모노글리세라이드를 이용하여 생산한 마요네즈와 두유의 시제품은 Figure 53과 같다.



**Figure 53.** Mayonnaise (left) and soybean milk (right) produced using monoglyceride synthesized from PLA.

#### 가. 마요네즈 시제품 생산

##### (1) 유화 안정성

제조된 시제품의 유화 안정성 및 물성 평가는 Table 15-17와 같다. Table 12.에서 제시된 제조 배합비에 따라 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드가 함유된 마요네즈를 제조한 결과, 기존의 스테아린산 모노글리세라이드(Almax-1000)를 적용한 시판용 마요네즈와 비교하여 물성 평가에서 약간의 낮은 점도를 나타내었지만 전반적으로 유사한 유화 안정성을 확인할 수 있었다. Table 13.에서 제시된 제조 배합비에 따라 PLA 함유 모노글리세라이드와 스테아린산 모노글리세라이드가 함유된 마요네즈를 제조한 결과, Table 17.에서와 같이 기존의 스테아린산 모노글리세라이드(Almax-1000) 및 PLA 함유 모노글리세라이드를 단품으로 적용한 마요네즈에 비하여 비교적 안정한 유화 안정성을 확인할 수 있었으며, 제품 점도 또한 단품을 적용할 때에 비하여 약 10%정도 상승함을 확인할 수 있었다.

**Table 15.** Fluid property of mayonnaise produced with monoglyceride containing stearic acid (Almax-1000)

		No.1	No.2	No.3	No.4	No.5
Vegetable oil		75	75	75	75	75
Egg yolk		9	9	9	9	9
Vinegar		11	11	11	11	11
Sugar		2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Salt		1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Spice		1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Stabilizer		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
<b>Almax-1000</b>		<b>0</b>	<b>0.05</b>	<b>0.1</b>	<b>0.15</b>	<b>0.2</b>
Total		100.1	100.15	100.2	100.25	100.3
Freezing method	0 h	—*	—	—	—	—
	1 h	+	—	—	—	—
	2 h	++	—	—	—	—
	3 h	++	+	+	—	—
Physical property	Viscosity (cp)	220,000	280,000	300,000	350,000	380,000
	pH	4.59	4.58	4.59	4.60	4.60

(\* : Evaluation by appearance)

— : very good, product was not changed and soft and glossy.

+ : good, the surface of product was slightly rough and oil ring was shown but separation of water was not shown.

++ : bad, oil ring was partially appeared.

+++ : very bad, separation of oil was totally appeared.

When mayonnaise was produced by Table 11, monoglyceride containing stearic acid (Almax-100) of more than 0.05% was required for increase of viscosity and confirmation of emulsion stability.

**Table 16.** Fluid property of mayonnaise produced with monoglyceride containig pinolenic acid (PLA–MAG)

		No.1	No.2	No.3	No.4	No.5
Vegetable oil		75	75	75	75	75
Egg yolk		9	9	9	9	9
Vinegar		11	11	11	11	11
Sugar		2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Salt		1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Spice		1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Stabilizer		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
<b>PLA–MAG</b>		<b>0</b>	<b>0.05</b>	<b>0.1</b>	<b>0.15</b>	<b>0.2</b>
Total		100.1	100.15	100.2	100.25	100.3
Freezing method	0 h	–*	–	–	–	–
	1 h	+	–	–	–	–
	2 h	++	+	–	–	–
	3 h	++	+	+	–	–
Physical property	Viscosity (cp)	220,000	250,000	290,000	335,000	350,000
	pH	4.58	4.57	4.59	4.59	4.58

(\* : Evaluation by appearance)

– : very good, product was not changed and soft and glossy.

+ : good, the surface of product was slightly rough and oil ring was shown but separation of water was not shown.

++ : bad, oil ring was partialy appeared.

+++ : very bad, separation of oil was totally appeared.



**Table 17.** Fluid property of mayonnaise produced with monoglyceride containig pinolenic acid (PLA–MAG) and monoglyceride containing stearic acid (Almax–1000)

		No.1	No.2	No.2–1	No.2–2	No.3	No.3–1	No.3–2
Vegetable oil		75	75	75	75	75	75	75
Egg yolk		9	9	9	9	9	9	9
Vinegar		11	11	11	11	11	11	11
Sugar		2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Salt		1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Spice		1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Stabilizer		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
<b>Almax–1000</b>		<b>0</b>	<b>0.1</b>		<b>0.05</b>	<b>0.2</b>		<b>0.1</b>
<b>PLA–MAG</b>		<b>0</b>		<b>0.1</b>	<b>0.05</b>		<b>0.2</b>	<b>0.1</b>
Total		100.1	100.2	100.2	100.2	100.3	100.3	100.3
Freezing method	0 h	–*	–	–	–	–	–	–
	1 h	+	–	–	–	–	–	–
	2 h	++	–	–	–	–	–	–
	3 h	++	+	+	–	–	–	–
Physical property	Viscosity (cp)	220,000	300,000	290,000	335,000	380,000	350,000	420,000
	pH	4.58	4.59	4.59	4.57	4.60	4.58	4.59

(\* : Evaluation by appearance)

– : very good, product was not changed and soft and glossy.

+ : good, the surface of product was slightly rough and oil ring was shown but separation of water was not shown.

++ : bad, oil ring was partialy appeared.

+++ : very bad, separation of oil was totally appeared.

## 나. 두유 시제품 생산

### (1) 차이식별 평가

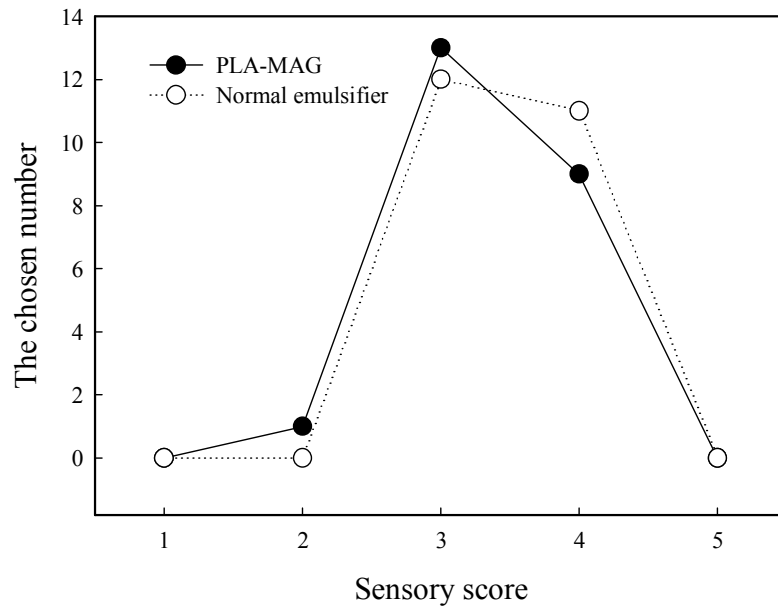
Table 18와 같이 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드를 적용한 두유에서의 차이식별 평가는 유의적 차이가 없으므로 평가되어, 차이식별이 불가능한 것으로 판단되었다. 따라서 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드를 두유의 유화 안정제로 사용함에 있어서 기존에 적용하고 있는 스테아린산 모노글리세라이드와 동일한 효능을 나타냄을 확인하였다.

**Table 18.** Discriminative test of soy milk produced with monoglyceride containing pinolenic acid

Answer	The number of people	Rate (%)
Correct	13	57
Wrong	10	43

## (2) 만족도 평가

Figure 54와 같이 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드를 적용한 두유에서 만족도 평가를 진행한 결과, 유의적 차이가 없으므로 평가되었다.



**Figure 54.** Sensory test of soy milk produced with monoglyceride containing pinolenic acid (5 score test, verification of significance by t-test).

기존 유화제의 대체품으로서 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드의 활용 가능성을 검토한 결과, 제품의 유화 안정성과 관능검사에서 기존 유화제를 사용한 제품과 큰 차이를 보이지 않는 것으로 확인되었다. 따라서 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드는 비만억제 효과를 기대할 수 있는 유화제로서 고열량 식품에 응용하여 기능성 강화식품으로 더욱 많은 제품에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

연구목표	연구개발수행내용	달성도 (%)
<p>&lt;1세부&gt; 한국산 잣 (<i>Pinus koraiensis</i>)으로 부터 피놀레닌산 (pinolenic acid: PLA)을 효소를 이용하여 선택적으로 분리·농축</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 한국산 잣으로부터 효소를 촉매로 한 에타놀리시스 반응을 이용하여 피놀레닌산 농축 조건 확립.</li> <li>2. 피놀레닌산 농축을 위하여 회분식, 연속식 공정 그리고 대량생산(bulk) 규모의 연속식 생산 공정을 최적화.</li> </ol>	100
<p>&lt;2세부&gt; 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드 (monoglyceride) 합성 최적화</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드와 시판 모노글리세라이드 (올레산 함유 모노글리세라이드)의 기능적 특성 비교 조사.</li> <li>2. 효소를 이용하여 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드 합성하기 위한 조건 확립.</li> <li>3. 피놀레닌산 함유 모노글리세라이드를 진공 반응 시스템과 저온 시스템에서 합성.</li> <li>4. 최종 생산물의 대량 생산 및 제품 소재화.</li> </ol>	100

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 1. 논문 및 학술발표 실적

구분	논문명	잡지 또는 학회명
논문 (SCI)	Enrichment of pinolenic acid from pine nut oil via lipase catalyzed ethanolysis with an immobilized <i>Candida antarctica</i> (Accepted)	Biocatal. & Biotrans.
논문 (SCI)	Lipase-catalyzed production of triacylglycerols enriched in pinolenic acid at the sn-2 position from pine nut oil (Submitted)	J. Sci Food Agri
논문 (SCI)	Synthesis of high purity monoacylglycerol containing pinolenic acid in a solvent free system by lipase-catalyzed esterification (Preparation)	J. Agri. Food Chem.
학술대회 (국외)	Enrichment of of pinolenic acid (PLA) by selective ethanolysis reaction from pine nut oil with immobilized <i>Candida antarctica</i> lipase	100th AOCS annual meeting (2009)
학술대회 (국외)	Lipase-catalyzed synthesis of triacylglycerols enriched in pinolenic acid at sn-2 position from pine nut oil	101st AOCS annual meeting (2010)
학술대회 (국외)	Production of monoacylglycerol containing pinolenic acid using lipase-catalyzed esterification	102nd AOCS annual meeting (2011)
학술대회 (국외)	Synthesis of symmetrical triacylglycerol containing pinolenic acid at sn-2 position in packed bed reactor by lipase-catalyzed acidolysis	102nd AOCS annual meeting (2011)
학술대회 (국내)	Isolation of Pinolenic acid (PLA) by Lipase-catalyzed Ethanolysis of Pine Nut Oil with <i>Candida antarctica</i> Lipase	한국식품과학회 (2009)
학술대회 (국내)	Production of structured lipids by enzymatic acidolysis using modified pine nut oil in a packed bed reactor	한국식품영양과학회 (2010)

### 2. 특허 실적

특 허 명	실적	활용방안
초고순도 모노글리세라이드 생산방법 (특허출원번호: 10-2011-0029598, 출원일: 2011년 3월 31일)	1	기술이전 시 사용
재 순환 연속식 반응조에서 에타놀리시스 반응을 통한 피놀레닌산 농축	1	출원 준비

### 3. 인력활용 및 양성효과

지원 총인원	지원대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대 전	기 타
3		3			1	2	3		

#### 4. 연구결과 기대효과

- 잣 기름을 이용한 식품 소재 개발
- 고부가가치 유화제 소재 개발
- 에타놀리시스를 이용한 기능성 지방성분 분리공정 기술 개발
- 고 농축 피놀레닌산의 고부가가치 식품 소재화 및 가공 제품 개발로 산업적 생산가능
- 잣 기름의 고부가가치화로 인한 잣의 가공식품으로의 이용도 증대로 농가 소득 증대 및 농촌 인력 고용 창출

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

네덜란드 로더스 크로클란사 (Loders Crolaan)에서는 한국갓에 함유되어 있는 피놀레닌산이 비만억제에 효과적이라는 입증하여 대한민국을 비롯한 미국과 유럽에 특허를 출원하였다. 그리고 리피드 뉴트리션사 (Lipid Nutrition)라는 자회사에서는 갓기름을 캡슐화한 것과 마이크로 캡슐화하여 가루화한 제품을 만들었다. 그 제품의 이름은 "PinnoThin"이며, 식욕억제제의 기능을 가진 건강식품으로 판매하고 있다.

리피드 뉴트리션에서는 2006-2007년 2년 동안 PinnoThin으로 “Health Ingredient Silver Award”와 “Frost & Sullivan Award for Best Product Innovation”, “Best Slimming Ingredient Award”를 수상하였다.



## 제 7 장 참고문헌

Asset, G., Staels B., Wolff R.L., Bauge E., Madj Z., Fruchart J.-C., and Kallongeville J. 1999. Effects of Pinus pinaster and Pinus koraiensis seed oil supplementation on lipoprotein metabolism in the rat. *Lipids*, 34(1), 39-44.

Byun, H-G., Eom, T-K., Jung, W-K., and Kim S-k. 2007. Lipase Catalyzed Prouduction of Monoacylglycerols by the Esterification of Fish Oil Fatty Acids with Glycerol, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 12: 491-496.

Coteron, A., Martinez, M., and Aracil, J., 1998. Reactions of Olive Oil and Glycerol over Immobilized Lipases, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75, 657-660.

Chung, B-Y., Han, K-W., and Castillo, E.M., 1999. Production of Monoacylglycerides by Enzymatic Alcoholysis of Immobilized *Rhizopus delemar* Lipase, *Food Sci. Biotechnol.* Vol. 8, No. 2, 83-87.

Holmber, K., and Osterberg, E., 1988. Enzymatic preparation of monoglycerides in microemulsion. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65: 1544-1548.

Kang S.T., Yamane T., 1994. Effect of temperature on diacylglycerol production by enzymatic solid-phase glycerolysis of hydrogenated beef tallow. *Korean J. Food Sci. Technol.* 26: 567-572.

Li, Z.Y., and Ward, O.P., 1993. Lipase-Catalyzed Esterification of Glycerol and n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Concentrate in Organic Solvent, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 70: 745-748.

Lee, J.-W., Lee, K.-W., Lee, S-W., Kim I.-H., and Rhee, C. 2004. Selective Increase in



Pinolenic Acid(all-*cis*-5,9,12-18:3) in Korean Pine Nut Oil by Crystallization and Its Effect on LDL-Receptor Activity, *Lipids* 39 : 383-387.

McNeill, G.P., Shimizu, S., and Yamane, T., 1990. Solid phase enzymatic glycerolysis of beef tallow resulting in a high yield of monoglyceride. *Ibid.* 69: 779-783.

McNeill, G.P., and Yamane, T., 1991. Further improvements in the yield of monoglycerides during enzymatic glycerolysis of fats and oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 68: 6-10.

Moreno P.A.G., Medina A.R., Rubio F.C., Páez B.C., Cerdán L.E., and Grima E.M., 2005. Production of structured triglycerides in an immobilised lipase packed-bed reactor: batch mode operation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80, 35-43.

Pasquier E., Ratnayake W.M.N., and Wolff R.L. 2001. Effects of  $\Delta^5$  polyunsaturated fatty acids of maritime pine (*Pinus pinaster*) seed oil on the fatty acid profile of the developing brain of rats. *Lipids*, 36(6), 567-574.

Pinsirodom, P., Watanabe, Y., Nagao, T., Sugihara, A., Kobayashi, T., and Shimada, Y. 2004. Critical Temperature for Production of MAG by Esterification of Different FA with Glycerol Using *Penicilliumcamembertii* Lipase, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 81, 543-547.

Pasman W.J., Heimerikx J., Rubingh, C.M., van den Berg, R., O'Shea M., Gambelli L., Hendriks H.F.J., Einerhand A.W.C., Scott C., Keizer H.G., and Mennen L.I. 2008. The effect of Korean pine nut oil on in vitro CCK release, on appetite sensations and on gut hormones in post-menopausal overweight women. *Lipids in Health and Disease*, 7, 10.

Rosu R., Uozaki Y., Iwasaki Y., Yamane T. 1997. Repeated use of immobilized lipase for monoacylglycerol production by solid-phase glycerolysis of olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc* 74: 445-450.

Shimada, Y., Watanabe, Y., Sugihara, A., and Tominaga, Y. 2002. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 17, 133–142.

Shimada Y., Ogawa J., Watanabe Y., Nagao T., Kawashima A., Kobayashi T., and Shimizu S. 2003. Regiospecific analysis by ethanolysis of oil with immobilized *Candida antarctica* lipase. *Lipids*, 38 (12), 1281–1286.

Shen Z., and Wijesundera C. 2006. Evaluation of ethanolysis with immobilized *Candida antarctica* lipase for regiospecific analysis of triacylglycerols containing highly unsaturated fatty acids. *JAOCS*, 83(11), 923–927.

Watanabe, Y., Shimada, Y., Yamauchi–Sato, Y., Kasai, M., Yamamoto, T., Tsutsumi, K., Tominaga, Y., and Sugihara, A. 2002. Synthesis of MAG of CLA with *Penicilliumcamembertii* Lipase, *Ibid.* 79:891–896.

Watanabe, Y., Yamauchi–Sato, Y., Nagao, T., Yamamoto, T., Ogita, K., Shimada, Y. 2004. Production of Monoacylglycerol of Conjugated Linoleic Acid by Esterification Followed by Dehydration at Low Temperature Using *Penicilliumcamembertii* Lipase, *J. Mol. Catal. B : Enzym.*27:249–254.

Watanabe, Y., Yamauchi–Sato, Y., Nagao, T., Negishi, S., Terai, T., Kobayashi, T., and Shimada, Y. 2005. Production of MAG of CLA by Esterification with Dehydration at Ordinary Temperature Using *Penicilliumcamembertii* Lipase, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 82,619–623.

Yamaguchi, S., and Mase, T., 1991. High–Yield Synthesis of Monoglyceride by Mono–and Diacylglycerol Lipase from *Penicilliumcamembertii* U–150, *J. Ferment. Bioeng.* 72: 162–167.

Yang B., Harper WJ., Parkin KL., Chen J. 1994. Screening of commercial lipases for production of mono- and diacylglycerols from butter oil by enzymic glycerolysis. *Int. Dairy J.* 4: 1-13.

Yang, T., Rebsdorf, M., Engelrud, U., Xu, X., 2005. Enzymatic Production of Monoacylglycerols Containing Polyunsaturated Fatty Acids through an Efficient Glycerolysis System, *J. Agric. Food Chem.* 53, 1475-1481.