

Pancreatic lipase 에 의한 銀杏 glycerides 의 分析

韓在淑 · 朴正隆

家政學科 · 食品營養學科

嶺南大學校 家政大學

Analyses of glycerides in *Gingko biloba* by pancreatic lipase

Jae-Sook Han and Jyung-Rewng Park

College of Home Economics.

Yeung nam University

ABSTRACT

Fatty acids of *Gingko biloba* lipid and its binding position were determined by using pancreatic lipase.

Optimum conditions for hydrolysis of glyceride were found as 9 mg of lipase and 5 min reaction time for 50 mg of TG.

The results showed that oleic acid and linoleic acid were presented about 40% and 29.7%, respectively, but linoleic acid was very small comparing with other seeds.

It was found that both saturated and unsaturated fatty acids were almost equally distributed at β and $\alpha \cdot \alpha'$ -position of TG.

緒 論

Pancreatic lipase 를 사용하여 天然油脂 triglycerides (TG) 의 1位及 3位 (α 位及 α' 位) 의 ester 結合을 選擇적으로 加水分解하여 glyceride 內的 脂肪酸 분포를 조사한 研究結果는 Mattson 等⁽⁹⁾ 以來 수 많은 사람에 의하여 報告되고 있다.⁽⁷⁾

이들 報告의 대부분은 加水分解條件으로서 Mattson 等⁽⁹⁾ 의 方法을 適用하고 있으나 試料에 따라서는 pH-bile salt · calcium 과 pancreatic lipase 의 活性的 相互作用에 의해 酵素分解가 容易하지 않았다.

이에 筆者는 銀杏의 脂質을 加水分解할 때의 反應條件을 檢討하는 同時에, 銀杏 TG 의 脂肪酸의 種類와 ester 結合 位置를 thin-layer chromatography (TLC) 와 gas-liquid chromatography (GLC) 를 사용하여 조사하였기에 여기에 報告하고자 한다.

實驗方法

1. Monoglyceride (MG) 와 Diglyceride (DG) 의 分離方法

TLC 에 의하여 分離한 TG 部分을 pet. ether-Et₂O (1:1) 로서 溶出 · N₂ gas 氣流中에서 농축하여 얻은 試料 50 mg 에 lipase 約 9 mg · 1 M-tris buffer (tris hydroxy methyl amino methane) 용액 1 ml · 0.1 % bile salt 0.25 ml 를 加하여, 40°C 의 water bath 上에서 유화시킨 後 magnetic stirrer 를 使用하여 5分間 (3,000 strokes/min) 흔들어 섞으면서 反應시켰다.

反應 後 6N-HCl 으로서 反應을 停止시키고, ether 로서 3回 抽出하여 抽出液을 蒸溜水로서 litmus paper 가 酸性을 나타내지 않을 때까지 세척하였다.

Ether層에 Na₂SO₄ 를 加하여 脫水한 後 TLC 로서 DG 와 MG 를 分離하고, 各各을 methyl ester 化하여

GLC 裝置에 注入하였다.

들을 合하여 全體에 대한 各各의 面積의 比를 百分率로서 나타내었다.

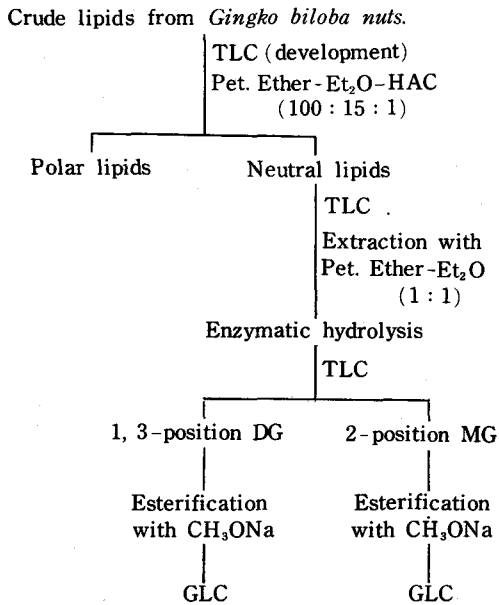


Fig. 1. Separation and Fractionation of lipids

2. Methyl ester 化

TLC에서 分離한 試料 10mg을 ester 化 試驗管에 取하고, 黃酸-Benzene-MeOH (1:30:90) 용액 1.5 ml를 加하여 溶解하고 試驗管에 冷却器를 붙여서 加熱하고 2時間 비등시킨 後 冷却하여 蒸溜水를 加한다.

3~4回 石油 ether 로서 抽出하여 洗液이 litmus paper 에 酸性을 나타내지 않을 때까지 세척을 反復하고 石油 ether層을 分離하여 이것을 Na₂SO₄ 로서 脫水한 後 40°C 以下의 water bath 中 N₂ gas 氣流上에서 농축한 것을 hexane 용액으로 하여 GLC 分析 試料로 삼았다.

3. 脂肪酸의 同定 및 定量方法

GLC 로서 分析한 試料의 脂肪酸의 炭素數를 알고 있는 既知試料를 分析하고 거기서 나온 保持時間(Rt) 과를 比較해서 同定을 行했다.

또한 數種의 飽和脂肪酸의 Rt 으로부터 equivalent chain length (ECL) 를 求하였으며 保持時間은 試料 注入時 (通常 溶媒의 peak의 始點에서부터) 부터 그 試料가 나타낸 peak의 頂點까지의 거리로 나타내었다.

그리고 GLC 로서 分析한 試料의 脂肪酸의 比率를 구하기 위하여서는 半值巾法으로 面積을 구하고 이것

實驗結果 및 考察

1. 標準試料

GLC 에 使用한 標準試料는 다음과 같으며 各各에 대한 ECL 과 log Rt 로서 算出한 結果는 Table 1 및 Fig. 2 에서 나타낸 바와 같다.

標準試料

The Hormel Institute 製品

No. 13 : C_{14:0}, C_{16:0}, C_{16:1}, C_{18:0}, C_{18:1}, C_{18:2},

C_{18:3}, C_{20:0}, C_{22:0}, C_{22:1}, C_{24:0}

No. 9 : C_{13:0}, C_{15:0}, C_{17:0}, C_{19:0}, C_{21:0}

C_{17:0}

C_{20:4}

rapeseed oil (Canada 産) :

C_{14:0}, C_{16:0}, C_{16:1}, C_{18:0}, C_{18:2}, C_{18:3}, C_{20:1},

C_{22:1}

Table 1. ECL and log Rt of standard sample

standard	Rt (cm)	log Rt	ECL
C _{n:0}			
14:0	1.37	0.1367	14.0
16:0	2.7	0.4314	16.06
18:0	5.1	0.7076	17.91
20:0	9.6	0.9823	19.92
22:0	19.5	1.2900	21.95
24:0	38.9	1.5899	24.0
C _{n-1:0}			
13:0	1.46	0.1644	13.0
15:0	2.38	0.3766	14.87
17:0	4.16	0.6191	17.04
19:0	7.69	0.8859	19.40
21:0	14.75	1.1688	20.98
C _{n:1}			
16:1	3.1	0.4914	16.03
18:1	5.7	0.7559	17.90
20:1	11.1	1.0453	19.95
22:1	21.6	1.3345	22.0

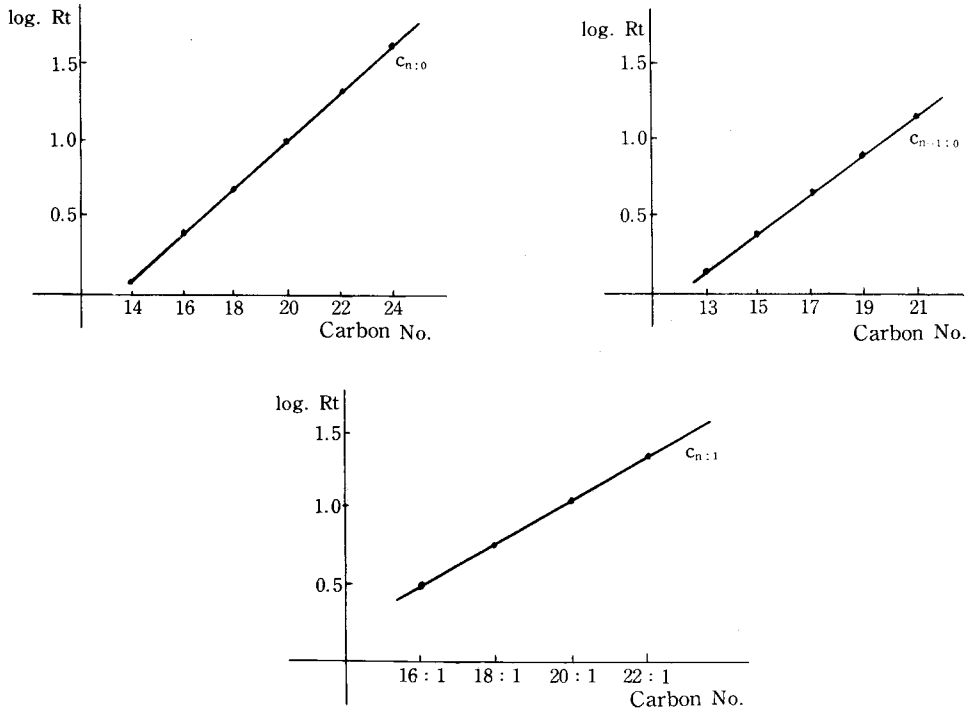


Fig. 2. Relationship between log. Rt and Carbon numbers

2. 酵素에 의한加水分解

文獻들의 方法에서는^{(5)·(7)·(9)} 反應時間이 1~30分까지 여러 가지 條件이 있었으나, 되도록이 짧은 反應時間으로 未反應의 TG를 적게 하고 MG의 生成量도 어느 程度 얻을 수 있도록 하기 위하여 酵素의 量과 反應時間에 關하여 豫備實驗을 行하였다.

또한 Borgström^{(7)·(11)}에 의하면 反應時間은 길게 하면 逆反應을 일으킬 염려가 있다고 말하고 있으므로 여기서는 反應時間을 2·4·5分으로 나누어 試驗하였다.

Fig. 3에서 보는 바와 같이 TG 50mg當 lipase 9mg·反應時間 5分이 最適加水分解條件임을 알 수 있었다.

3. Triglycerides

TLC로부터 單離한 TG를 methyl ester化 한 후 다시 TLC에 의하여 ester化 된 것을 確認하여 얻은 試料 중 2mg을 取하여 內部標準으로서 C_{17:0} 0.5mg을 넣고 0.2ml의 hexane에 녹인 後 0.2μl (2.5μg)을 GLC分析에 使用하였는데, 그 結果는 Table 2와 Fig. 4에 나타난 結果와 같다.

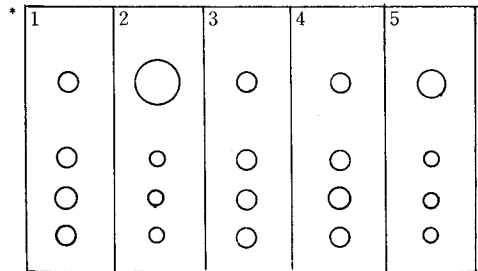


Fig. 3. Enzymatic reaction affected by time and amount of enzyme*

1.	酵素反應時間 5 min	TG 50 mg 當 lipase 9 mg
2.	" 2 min	" 18 mg
3.	" 4 min	" 18 mg
4.	" 5 min	" 18 mg
5.	" 5 min	" 5 mg

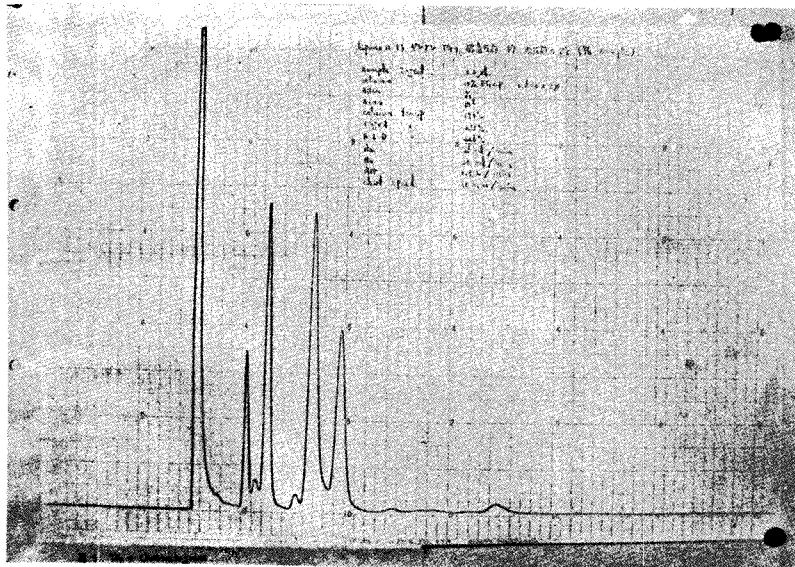


Fig. 4. Gas-liquid chromatogram of Triglycerides

※ GLC 條件

器機 AGIMOTO GCG-550 FP
 column packing 10% EGSP (ethylene glycol succinate polyester) (gas-chrom p. 100 ϕ -120 mesh)
 3mm \times 1.5m stainless steel column
 column temp. 170°C (Isothermally)
 inject temp. 255°C
 F. I. D. 246°C
 carrier gas N₂ 25 ml/min
 H₂ 30 ml/min
 air 800~900 ml/min
 sens. 10⁹
 atten. 1/1
 chart speed 10 mm/min

Table 2에서 보는 바와 같이 TG의 構成脂肪酸으로서 oleic acid가 가장 많고 다음으로 linoleic acid가 많음을 알 수 있었다.

일반으로 大豆와 같은 油種子에서는 oleic acid에 比하여 linoleic acid가 많고 linolenic acid도 制限 있는 것으로 알려져 있으나, 果木種子의 例를 들면, olive·pecan 등은 TG 중 oleic acid가 가장 많고 다음으로 linoleic acid·palmitic acid가 많다고 報告 되고 있어, 銀杏도 다른 果木과 그 脂肪酸結合의 pattern이 비슷함을 나타내고 있다고 하겠다.

4. 酵素分解에 의한 TG中的 脂肪酸分布

TG를 酵素分解한 後 生成된 FFA·MG를 methyl ester化하여 얻은 FFA 3.6 mg에 內部標準 C_{17:0} 1.0 mg을 加하여 0.4 ml의 hexane에 녹인 것을 0.2 μ l (2.3 μ g) GLC에 注入하였다. 또한 MG의 부분도 같은 방법으로 MG 9.8 mg에 內部標準 C_{17:0} 1.5 mg을 加하여 0.6 ml의 hexane에 녹인 것을 0.2 μ l (3.767

Table 2. Fatty acid composition of TG

fatty acids	16:0	16:1	18:0	18:1		18:2	18:3	20:1			
Rt	2.7	3.1	5.1	5.7	6.4	7.1	9.6	11.1	13.3	14.7	16.7
Percent	9.3	4.0	3.2	40.0	5.3	29.7	trace	1.5	0.9	1.4	3.3

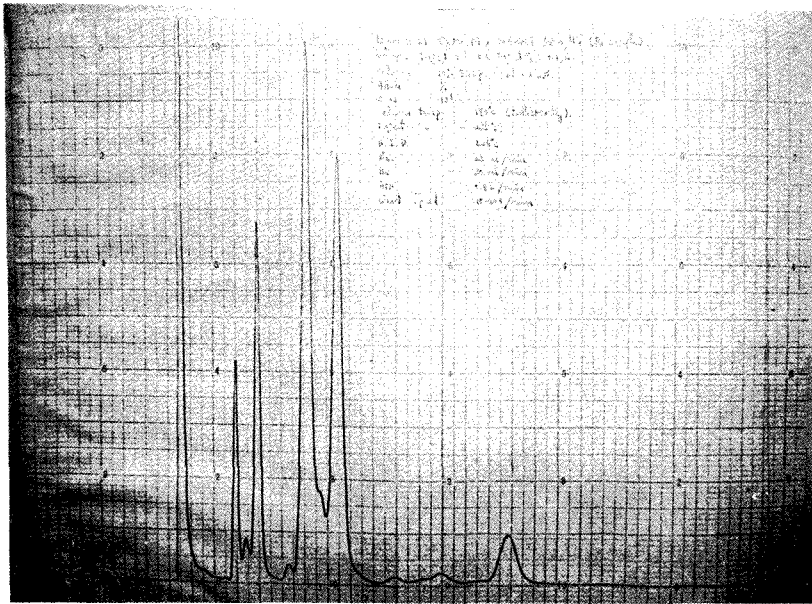


Fig. 5. Chromatogram of fatty acids at β -position of TG produced by enzymatic hydrolysis

μ g) GLC에 注入하여 分析한 結果는 Fig. 5·6 과 같
다.

그리고 이들 各 脂肪酸의 結合位置를 表示한 結果는
Table 3과 같다.

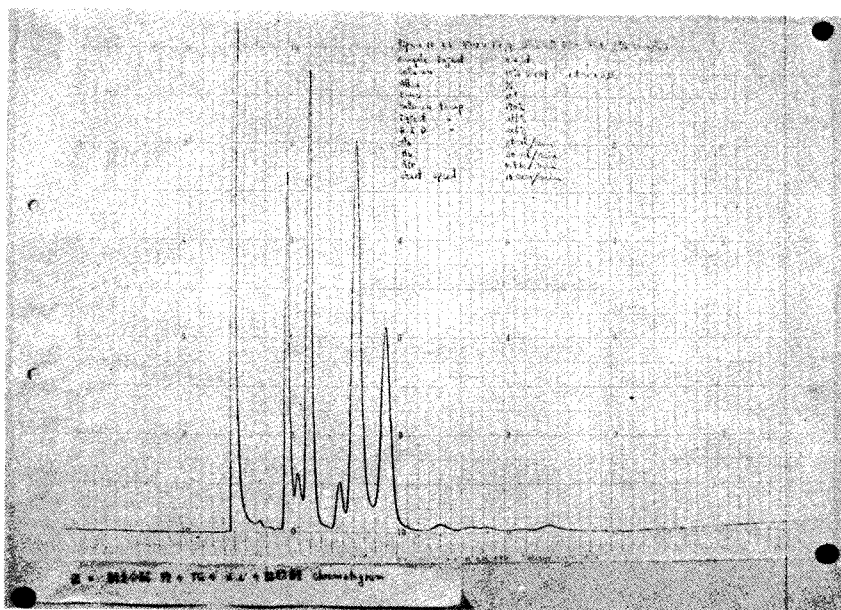


Fig. 6. Chromatogram of fatty acids at $\alpha \cdot \alpha'$ -position of TG produced by enzymatic hydrolysis

Table 3. Distribution of Fatty acids in TG

fatty acids	Rt	β	$\alpha\alpha'$	TG ^(a)
16:0	2.7	7.7	17.2	9.3
16:1	3.1	3.3	4.8	4.0
18:0	5.1	1.3	4.7	3.2
18:1	5.7	34.6	40.9	40.0
	6.4	9.4	—	5.3
18:2	7.1	30.6	24.9	29.7
18:3	9.6	trace	—	trace
20:1	11.1	1.1	1.4	1.5
	13.3	trace	1.1	0.9
	14.7	1.5	0.9	1.4
	16.7	6.9	1.4	3.3

a) unreacted TG is the same as reacted TG.

Table 3에서 보는 것처럼 oleic acid · linoleic acid 등 不飽和脂肪酸은 $\alpha \cdot \alpha'$ 位 및 β 位の 比率이 비슷하고, 飽和脂肪酸인 palmitic acid · stearic acid 등은 $\alpha \cdot \alpha'$ 位가 β 位보다 많음이 특히 注目되었다.

結 論

銀杏脂質의 加水分解條件과, 構成脂肪酸의 種類와, 結合位置를 조사한 結果는 다음과 같다.

1) glycerides 의 加水分解는 TG 50mg 當 lipase 9 mg, 反應時間 5 分이 最適條件임을 알았다.

2) glycerides 의 構成脂肪酸으로서 oleic acid 가 가장 많고, 다음은 linoleic acid 가 많았다.

3) 不飽和脂肪酸인 oleic acid · linoleic acid 는 $\alpha \cdot \alpha'$ 位와 β 位の 比率이 비슷하고, 飽和脂肪酸인 palmitic acid · stearic acid 는 $\alpha \cdot \alpha'$ 位가 β 位보다 많았다.

References

- 1) 高木 徹: 가스 크로마토그래피의 油脂工業への應用 — 油脂成分分析法 —
- 2) 油脂 및 油脂製品試驗法部會, 油化學 19, 337 (1970)
- 3) H. H. Hobstetter, N. Sen: J. Am. Oil. Chem. Soc., 42, 537 (1965)
- 4) F. P. Woodford, C. M. Vaugent: J. Lipid. Res., 1(2), 188 (1960)
- 5) F. E. Luddy, R. A. Barford, S. F. Herb, P. Magidman, R. W. Riemenschneider: J. Am. Oil. Chem. Soc., 41 (10), 693—696 (1964)
- 6) C. N. Ansted, I. A. Hansen: Chem. Phys. Lipids, 2, 343—360 (1968)
- 7) B. Borgström: J. Lipid. Res., 5 (4), 522 (1964)
- 8) F. H. Mattson, R. A. Volpenhein: J. Biol. Chem., 236, 1891 (1961)
- 9) F. H. Mattson, R. A. Volpenhein: J. Lipid. Res., 4(10), 392—396 (1963)
- 10) C. Litchfield: Chem. Phys. Lipids, 4, 96—103 (1970)
- 11) B. Borgström: Biochem. Biophys. Acta., 84, 228 (1964)