

온도조절이 고상계에서 경화우지로부터 디글리세리드의 효소적생산에 미치는 영향

강상태 · 山根恒夫*

서울산업대학교 식품공학과, *일본 나고야대 응용생물과학과

Effect of Temperature on Diacylglycerol Production by Enzymatic Solid-Phase Glycerolysis of Hydrogenated Beef Tallow

Sung-Tae Kang and Tsuneo Yamane*

Department of Food Science and Engineering, Seoul National Polytechnic University

*Department of Applied Biological Sciences, Nagoya University

Abstract

Diglyceride was prepared by reaction of hydrogenated beef tallow and glycerol (GL) in the presence of a *Pseudomonas* lipase. Both substrates were mixed at the ratio of GL/Triglyceride of 0.5 which is the stoichiometric molar ratio for the complete conversion of triglyceride (TG) to diglyceride (DG). DG can be obtained by solid phase-glycerolysis of hydrogenated beef tallow without use of organic solvents or emulsifiers by careful control of reaction temperature. Optimized reaction temperature condition was as follows: An initial incubation at 60°C for 2h followed by the first temperature shift down to 55°C for 4h, and then the second shift down to 50°C for up to 3 days. There was a large decrease in the content of TG during the first 60°C incubation for 2h. Even a prolonged incubation at 60°C could not make a change of the composition of the reaction mixture at liquid state. By controlling the temperature lower than 60°C, reaction mixtures were solidified. The reaction temperature at 50°C below the melting temperature of hydrogenated beef tallow gave a 71% optimum yield of DG after 72h enzymatic glycerolysis and about 73% of total DG was 1,3-DG.

Key words: diacylglycerol, glycerolysis, hydrogenated beef tallow, lipase, temperature-shift, solid-phase

서 론

대단히 많은 양의 모노글리세리드 혹은 디글리세리드 그리고 그들의 유도체들이 식품산업에 있어서 여러가지 용도를 가진 계면활성제로서 이용되고 있다⁽¹⁾. 현재 유지의 화학공업적인 생산은 주로 모노글리세리드 생산을 목표로 해온 것이 사실이며 모노글리세리드는 무기촉매의 존재하에서 220°C 이상의 고온에서 유지와 글리세롤이 에스테르교환반응되는 글리세롤리시스 반응에 의해 만들어지고 있다^(2,3). 한편 디글리세리드는 최근 유지공업에 있어서 그 용도를 찾게된 물질로서 일반적으로 화학적으로 합성되고 있으며 일본의 경우에는 특정 식용유에 1%의 phosphatidic acid와 함께 10% 정도가 첨가되어, 트리글리세리드만이 있을 때 보다 약간의 친수성을 띄게 함으로써 식품에 기름이 잘 부착되도록 하는

기능을 가진 것으로 알려져 있다. 또한 디글리세리드는 식품제조공정 중에 식품이 주형(mold)에서 쉽게 떨어져 나가게 하는 한편 유지결정의 조절제(fat crystal adjuster)로 사용되고 있다. 화학공업적으로 유화제를 생산하기 위해서는 과잉의 글리세롤을 사용하여야 하고 수율도 30~40%에 지나지 않으며 고온에서 반응이 진행됨으로 인하여 생산물의 색상이 짙어지게 되며 좋지 않은 냄새가 나게 된다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 글리세롤리시스 반응, 혹은 트리글리세리드의 부분적 가수분해, 그리고 지방산과 글리세롤로부터 에스테르합성을 통한 리파제를 사용한 효소적 유화제생산이 시도되었고 주로 모노글리세리드 생산을 위해 연구되어 왔다⁽⁴⁻⁹⁾. 효소적 방법에 의한 유화제생산은 화학공정에 비하여 훨씬 온화한 조건에서의 반응이 가능하므로 에너지의 소모를 줄일 수가 있고, 높은 수율을 얻음으로 해서 후속적인 정제비용을 줄일 수가 있다는 장점이 있으며 맛과 향, 그리고 색상에 있어서도 우월한 제품을 얻을 수가 있으리라 기대된다. 최근에 McNeill 등은 반응온도조절에 의한 고상계에서의 글리세롤리시스 반응(Solid-Phase Glycerolysis)을 수행

Corresponding author: Sung-Tae Kang, Department of Food Science and Engineering, Seoul National Polytechnic University

함으로써 우지로부터 약 70%의 모노글리세리드를 얻을 수가 있었다^(10,11). 고상계에서의 글리세롤리시스반응을 통한 모노-, 디글리세리드 등의 유화제의 생산반응은 상온에서의 반응으로서 유기용매나 계면활성제를 사용할 필요가 없으며 상대적으로 값싼 유리지방산을 사용하는 에스테르합성법과는 달리 단순히 유지와 글리세롤을 반응기질로 사용하기 때문에 경제성이 있다고 기대된다. 또한 반응종료 후 단순한 가열 만으로 글리세롤과 유지들의 분리가 가능하며 초기에 교반을 통해 만들어지는 w/o 에멀전 형태의 반응혼합물을 제조할 때 이외에는 교반동력이 필요없다는 장점이 있다.

본 연구는 값싼 유지에서 고부가가치의 디글리세리드를 생산하기 위하여 경화우지와 글리세롤을 기질로 하여 효소적으로 고상계-글리세롤리시스 반응을 시켰을 때 반응온도 및 반응온도의 유지시간이 디글리세리드 생산에 미치는 영향을 검토함으로써 효과적인 디글리세리드 생산을 위한 기초자료를 얻기 위하여 수행하였다. 효소적으로 고순도의 디글리세리드 생산이 가능하게 되면 기존의 분자증류법을 사용하지 않고도 고순도의 제품을 얻을 수 있게 되어 기존의 화학공업적 생산에 대한 효과적인 대체방법이 될 수 있을 것이다.

재료 및 방법

재료

리파제의 활성은 37°C에서 1분 동안 1 μmole의 유리지방산을 생산하는 효소의 양으로 정의한다. 리파제(EC 3.1.1.3)는 *Pseudomonas* sp.에서 얻은 리파제(500000 units/g)를 사용하였으며 Kurita Water Industry(Tokyo, Japan)에서 구하였다. 경화우지는 Riken Vitamin Co.(Hirakata, Japan)에서 구하였으며 그 지방산조성(%)은 다음과 같았다; C₁₄, 2.3; C₁₆, 28.4; C₁₇, 1.2; C₁₈, 66.1; 기타, 2.0. 글리세롤(Reagent-grade)은 Wako Chemicals Co.(Osaka, Japan)에서 구입하였다.

방법

글리세롤리시스를 위한 반응혼합물의 제조: 경화우지 6.67 g을 60°C로 가열한 다음 리파제를 미리 섞은 글리세롤 0.37 g을 첨가한다. 글리세롤은 특별한 언급이 없는 한 3.7%의 최종 수분함량을 갖도록 첨가하였으며 5000 units/g fat의 리파제를 사용하였다. 이 때의 글리세롤과 경화우지의 몰 비율은 1:2가 된다. 반응혼합물은 초기 60°C에서 2~4시간을 반응시킨 후 55°C에서 4시간 유지시켰으며 마지막으로 50°C에서 수 일간 반응시켰다. 반응 혼합물은 일정시간을 두고 채취하여 분석하였다. 효소반응기(model MS-50, Matsumoto Manufacturing Co. Ltd., Osaka, Japan)를 사용하여 교반속도와 온도를 조절하였으며 800 rpm으로 고정하여 교반시켰다. 50°C로 전환시킨 후 3~4시간만에 고상화가 진행되었으며 이때 교반을 중단하였다.

Thin Layer Chromatograph/Flame Ionization Detector(TLC/FID)에 의한 분석: 글리세롤리시스반응의 경과를 반응혼합물(150 mg)을 채취하여 콜로로포름으로 추출한 후 분석하였다. 반응혼합물은 트리글리세리드(TG), 1,3-디글리세리드(1,3-DG), 1,2-디글리세리드(1,2-DG), 모노글리세리드(MG), 그리고 유리지방산(FFA)의 peak로 분리 되었다. 사용기종은 thin-layer chromatograph/flame ionization detector(Iatroskan TH-10, Iatron Laboratories, Tokyo, Japan) 이었으며 실리카로 코팅된 Chromarod S III quartz rods를 분석에 이용하였다. 여기에 1 μL의 크로로포름 추출물을 spotting하고 hexane/diethylether/acetic acid(55:15:0.5, v/v/v)의 전개 용매에 전개시켰다. 이것을 건조시킨 후 scanning하였다. 결과는 peak areas의 백분율(%)로 표시하였으며 Tataru 등⁽¹²⁾의 무제퍼센트와는 약간의 차이가 있다. 글리세롤 내의 수분함량은 칼 피셔수분측정기(Model 70KF Titrimo, Metrohm Ltd., Switzerland)를 사용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

반응온도에 따른 반응 혼합물 조성의 변화

Fig. 1은 60°C에서 계속 유지하였을 때의 리파제를 이용한 글리세롤리시스 반응의 경과를 보여주고 있다. 경화우지의 녹는점은 60°C로서 반응이 일어나는 중의 반응혼합물은 액상이었다. 반응 초기에 트리글리세리드가 20%로 급격히 감소하면서 다른 글리세리드로의 전환이 일어남을 알 수가 있었고 반응 4시간 후의 모노글리세리드, 디글리세리드, 트리글리세리드 및 유리지방

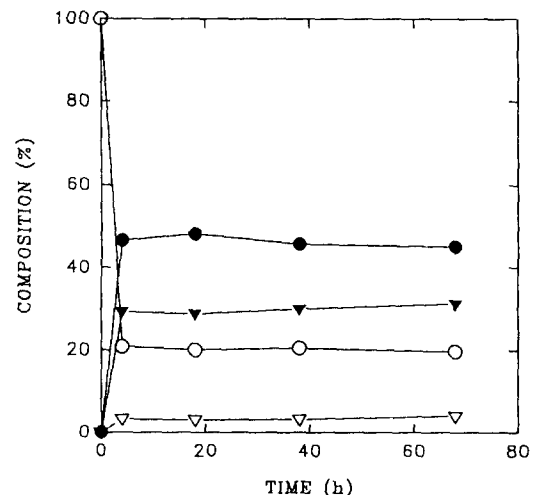


Fig. 1. The composition of the reaction mixture during the enzymatic glycerolysis of hydrogenated beef tallow at 60°C for the molar ratio glycerol/TG=0.5: TG (○), DG (●), MG (▼), FFA (▽)

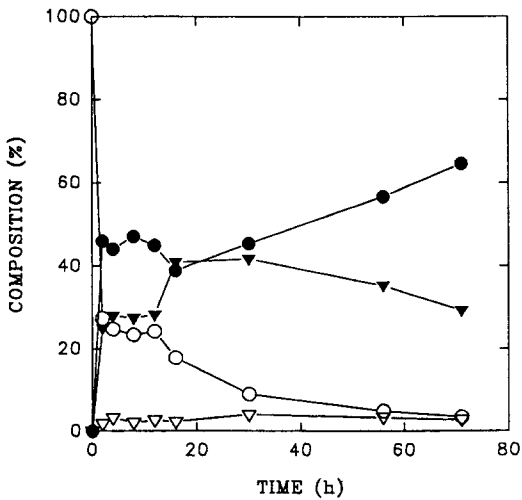


Fig. 2. The change of the composition of the reaction mixture by temperature shift. After incubation of reaction mixture for 12h at 60°C, the mixture was transferred to 55°C for 4h and finally transferred to 50°C: TG (○), DG (●), MG (▼), FFA (▽).

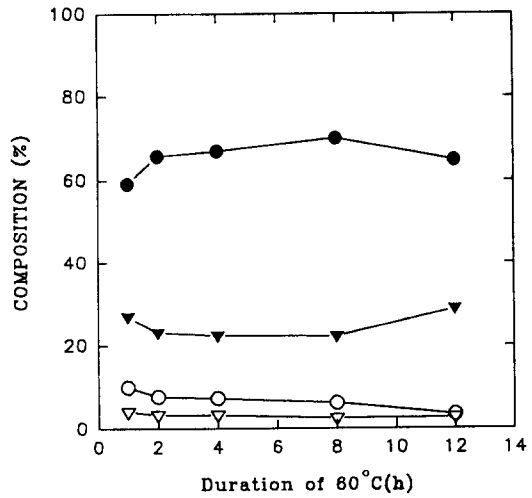


Fig. 3. The effect of incubation time at 60°C on the final composition of the reaction mixture at 72h. After varying the duration of glycerolysis reaction at 60°C within the limit of 12h, the mixture was transferred to 55°C for 4h and finally transferred to 50°C: TG (○), DG (●), MG (▼), FFA (▽)

산의 함량은 반응시간에 무관하게 거의 일정하였으며 그 함량은 각각 31%, 45%, 21% 그리고 3%였다.

Fig. 2는 60°C에서 12시간 글리세롤리시스반응을 시킨 후 55°C에서 4시간 동안 유지하고 다시 50°C로 글리세롤리시스반응을 시킨 결과이다. 초기 12시간 동안 60°C로 유지한 경우는 앞서의 결과와 같은 양상을 보여 주었으며 60°C에서 55°C로 온도를 낮추어 주면서 트리글리세리드는 감소하기 시작하였고 모노글리세리드는 약간 증가하였고 다글리세리드는 감소하여 각 글리세리드의 분포에 변화가 생기기 시작하였다. 다시 반응온도를 50°C로 조절시킨 결과 트리글리세리드와 모노글리세리드는 계속 감소하였으며 디글리세리드는 계속 증가하였다. 71시간 반응 후의 트리글리세리드, 디글리세리드, 모노글리세리드 함량은 각각 3.5%, 29.3%, 65%의 조성을 보여 주었다.

초기 60°C에서의 유지시간을 1시간, 2시간, 4시간, 8시간, 12시간으로 달리한 후에 55°C에서 4시간을 반응시키고 다시 50°C에서 계속 유지하여 글리세롤리시스반응을 시켰을 때 총 70시간 반응 후의 반응혼합물의 조성을 평가하여 초기 60°C에서의 유지시간이 디글리세리드 생산에 미치는 영향을 살펴보았다(Fig. 3). 초기 1시간을 60°C로 유지시킨 경우 트리글리세리드의 전환이 덜 되었고 디글리세리드의 생산 역시 다소 낮게 나타났다. 모노글리세리드의 생산은 다소 높아서 디글리세리드가 생산에 오히려 유리하지 못하였다. 한편 60°C에서 2~8시간 반응시킨 결과 60°C에서 1시간 유지시킨 경우 보다 트리글리세리드의 전환과 디글리세리드의 생산이 개선되었으며 모노글리세리드의 함량은 낮아져 디글리세리드의 생산에 유리한 조건으로 판단되었다. 그러나 60°C에서

12시간을 유지시킨 결과 트리글리세리드의 전환은 가장 많이 되었지만 디글리세리드의 생산은 다소 낮아졌으며 모노글리세리드의 생산은 오히려 높아져서 디글리세리드의 생산에 역시 불리하였다. 이것은 60°C라는 높은 온도에서 오랜동안 유지함으로써 효소의 활성이 감소하여 모노글리세리드에서 디글리세리드로 전환시키는 능력이 감소된 이유로 보인다. 60°C에서 2~8시간을 유지시킨 결과 반응물의 조성이 거의 유사하다는 점과 효소의 안정성을 고려할 때 60°C에서 짧은 시간을 유지하는 것이 바람직하여 60°C에서의 반응은 2시간 동안 유지하였다.

Fig. 4는 반응혼합물을 60°C에서 2시간 반응시킨 후 55°C에서 20시간 유지시키고 다시 50°C로 변경하여 반응시킨 경우의 반응혼합물조성의 변화이다. 초기 60°C에서의 2시간 동안의 급격한 트리글리세리드의 감소는 앞의 결과들과 같은 양상을 보여 주었으며 60°C에서 55°C로 온도를 낮춤에 따라 트리글리세리드는 감소하기 시작하였고 모노글리세리드는 점차로 증가하였다. 하지만 디글리세리드 생산량의 변화는 극미하였다. 55°C에서 20시간 유지 후 다시 반응온도를 50°C로 전환시킨 결과 트리글리세리드와 모노글리세리의 함량은 계속 감소하였으며 디글리세리드는 계속 증가하여 71시간 반응 후에 각각 7%, 27%, 64%의 조성을 보여 주었다.

글리세롤리시스반응을 2시간 동안 60°C에서 수행한 후 55°C에서의 유지시간이 반응혼합물의 최종조성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 유지시간을 1시간, 4시간, 12시간, 그리고 20시간으로 달리하였다. 그 후 반응은

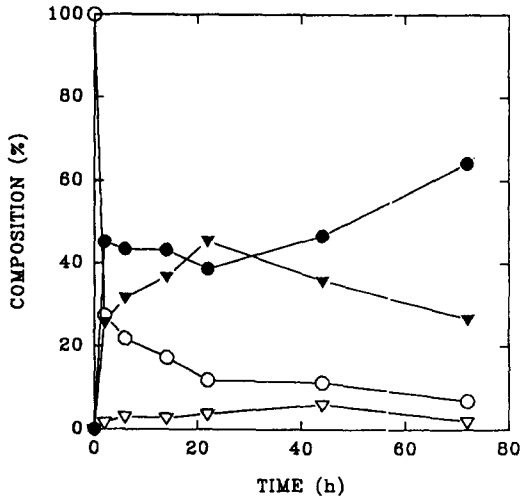


Fig. 4. The change of the composition of the reaction mixture by temperature shift. After incubation of reaction mixture for 2h at 60°C, the mixture was transferred to 55°C for 20h and finally transferred to 50°C: TG (○), DG (●), MG (▼), FFA (▽)

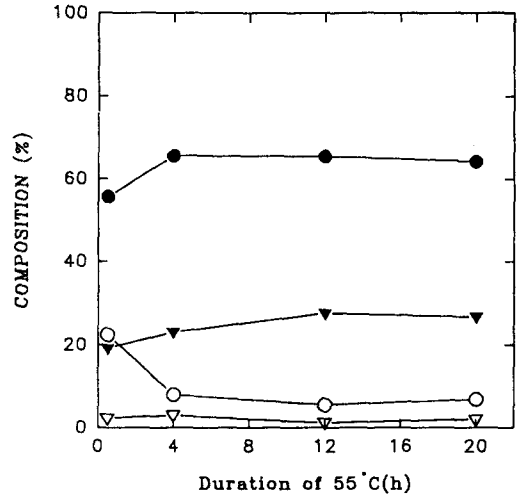


Fig. 5. The effect of incubation time at 55°C on the final composition of the reaction mixture at 72h. After incubation of reaction mixture for 2h at 60°C, the duration of glycerolysis reaction at 55°C was varied within the limit of 12h and the mixture was finally transferred to 50°C: TG (○), DG (●), MG (▼), FFA (▽)

도를 50°C로 전환시켰으며 총 70시간 후의 반응혼합물 조성을 Fig. 5에 나타내었다. 1시간 동안 55°C에서 유지시킨 반응의 경우는 유지시간을 길게한 경우보다 트리글리세리드의 전환이 덜 되었으며 디글리세리드 및 모노글리세리드의 함량도 낮아서 디글리세리드의 생산에 유리하지 못하였다. 한편 4~20시간을 유지하여 반응시킨 결과 모두 1시간 유지시킨 경우 보다 트리글리세리드의 전환이 많이 되었고 디글리세리드의 생산도 증가 되었으며 모노글리세리드의 생산이 약간 증가하였다. 이것으로 보아 55°C에서 1시간 동안을 유지시킨 반응은 주로 충분한 트리글리세리드가 전환이 이루어지기에는 짧은 기간으로 보인다. 한편 55°C의 유지시간을 4시간 보다 길게 하여도 디글리세리드 생산은 크게 증가하지 않았고 오히려 모노글리세리드의 생산은 약간 증가하였으므로 55°C에서 4시간 동안을 유지시키는 것이 디글리세리드 생산에 유리하다고 판단되었다.

Fig. 6은 60°C로 2시간 반응시킨 후 55°C로 옮겨 4시간 동안 반응시킨 다음 여러 온도로 전환시켜 반응시킨 경우의 디글리세리드 생산의 변화이다. 20°C 및 30°C에서는 초기 55°C에서 생산된 디글리세리드의 생산량과 변화가 없었으며 이것은 이들 온도에서는 효소활성이 낮아 더 이상 디글리세리드로 전환을 시키지 못하였기 때문으로 보인다. 온도를 37°C로 증가시켰을 때부터 디글리세리드는 증가하는 양상을 보여 주었고 온도증가에 따라 생산량은 증가하였다. 디글리세리드의 생산에 가장 적합한 온도는 50°C로 확인되었으며 디글리세리드 함량은 초기 55°C로 유지하였을 때의 42%에서 70.8%로 증가하였다. 60°C에서의 반응은 디글리세리드 함량에 변

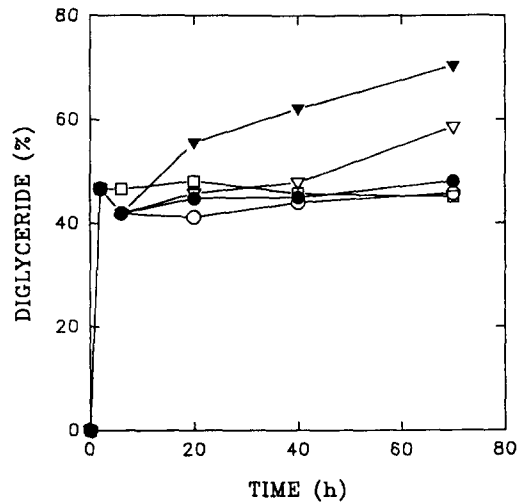


Fig. 6. The effect of temperature programming on diglyceride production during enzymatic glycerolysis of hydrogenated beef tallow. After incubation of reaction mixture for 2h at 60°C, the mixture was transferred to 55°C for 4h and finally transferred to each temperature as follows: 20°C (○), 30°C (●), 37°C (▽), 50°C (▼), and 60°C (□)

화를 주지 못하였으며 처음부터 줄곧 60°C에서 반응시킨 Fig. 1의 결과와 마찬가지로 액상반응에 의한 디글리세리드 생산반응의 유도가 불가능한 이유로 해석된다. McNeil 등은 우지를 이용한 모노글리세리드 생산에 있

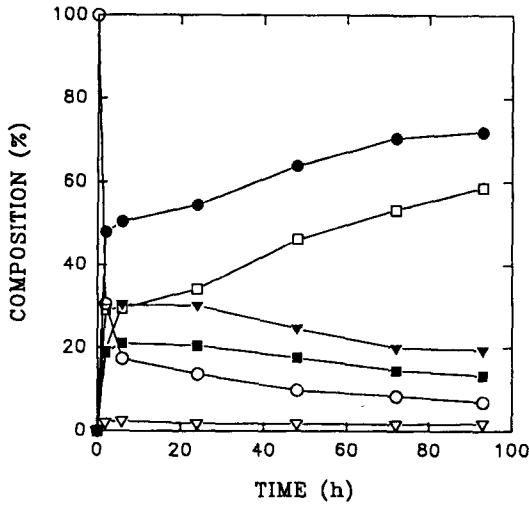


Fig. 7. The composition of the reaction mixture during enzymatic glycerolysis of hydrogenated beef tallow at 50°C for the molar ratio glycerol/TG=0.5: TG (○), total DG (●), FFA (▽), 1,3-DG (□), 1,2-DG (■)

어서 반응온도를 우지의 녹는점 이하로 낮추어 반응혼합물을 고상화시킴으로써 모노글리세리드이 생산을 촉진하였다고 보고한 바 있다¹¹⁾.

최적온도조건에서의 경화우지로부터 글리세롤리시스반응에 의한 디글리세리드 생산

최적화 된 조건에서 경화우지가 글리세롤과의 반응에 의해 모노 혹은 디글리세리드로 전환되는 과정을 Fig. 7에 나타내었다. 60°C 에서 2시간을 반응시키고 55°C 에서 4시간을 유지시킨 후 마지막으로 50°C 에서 글리세롤리시스반응을 시작했다. 초기 6시간의 반응 동안에 약 80%의 트리글리세리드가 전환이 되어 20%가 존지하며, DG는 50%, MG는 30%의 조성을 보여주었다. 초기의 트리글리세리드는 대개 디글리세리드로 전환되어 감소하였으며 6시간 이후의 반응혼합물의 조성은 완만하게 변화하여 반응 72시간 후의 디글리세리드와 모노글리세리드의 생산은 71%와 20%의 함량을 보여주었다. Fig. 8은 72시간 반응 후의 TLC/FID chromatogram을 나타낸 것이다. 전체 디글리세리드 중의 73%가 1,3-DG 였으며 27%가 1,2-DG였다. 또한 글리세롤리시스 반응동안 2% 내외의 유리지방산생성이 확인되었다.

값이 싼 유지로부터 생산된 디글리세리드는 고부가가치의 유지제품으로서 유지의 기능개선을 위하여 식품산업에 응용이 기대되며 디글리세리드의 생산 수율을 높일 경우 분자중류법을 사용하지 않고 고순도의 제품생산이 가능하게 되어 기존의 화학공업적 생산법에 대한 효과적인 대체방법이 될 것으로 기대되며 고순도의 디글리세리드는 순수화학 물질로의 전환이 가능한 기본물질로서 이용될 경우 시장성을 높일 수 있으리라 기대된다.

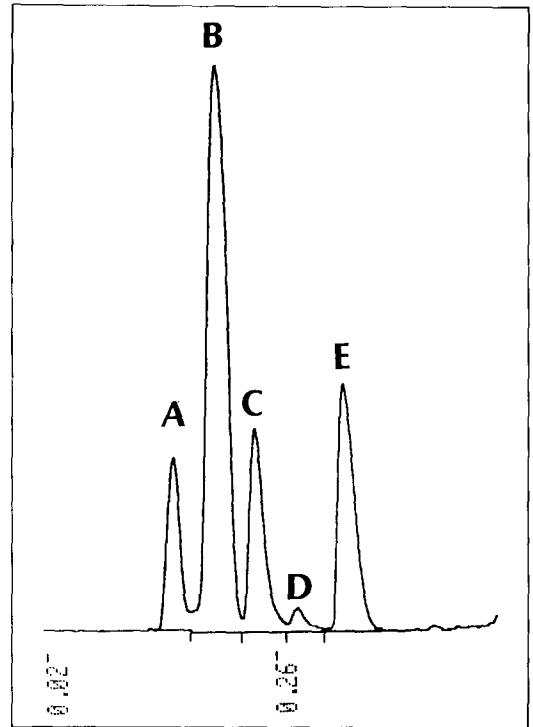


Fig. 8. Chromatogram by TLC/FID analyzer of the reaction mixture for the reaction at 50°C at molar ratio glycerol/TG=0.5. Sampling was carried out after 72h incubation: (A, TG; B, 1,3-DG; C, 1,2-DG; D, FFA; E, 1-MG)

요 약

유기용매나 계면활성제를 첨가하지 않은 효소반응계의 고상계에서 경화우지와 글리세롤(GL)로부터 디글리세리드(DG)를 생산하기 위해 리파제에 의한 글리세롤리시스 반응온도의 최적화를 수행하였다. 두 기질은 트리글리세리드(TG)인 경화우지가 완전히 디글리세리드로 전환하기에 적합한 몰비율인 GL/TG=0.5로 하여 반응시켰다. 60°C 에서의 글리세롤리시스반응은 액상에서의 평형으로 인하여 높은 함량의 디글리세리드의 생산은 불가능하였으며 반응온도를 경화우지의 녹는점 보다 낮게 조정하여 반응혼합물의 고상화를 유도함으로써 디글리세리드의 함량을 증가시킬 수가 있었다. 초기 2시간을 60°C 에서 반응시켜 트리글리세리드를 급격히 감소시킨 후 55°C 에서 4시간을 유지시키고 마지막으로 50°C 에서 계속 수일간 반응시키는 것이 디글리세리드이 생산에 가장 적합한 생산조건이었다. 글리세롤리시스반응 72시간 후 71%의 DG가 생성되었다. 전체 디글리세리드 중의 73%가 1,3-DG였고 27%가 1,2-DG 였다. 글리세롤리시스 반응 동안 2% 내외의 자유지방산 생성이 확인되었다.

감사의 글

이 논문은 1993년도 학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Sonntag, N.O.V.: In *Fat splitting, esterification, and interesterification*, Bailey's Industrial Oil and Fat Products Vol. 2, 4th ed., D.Swern ed., John Wiley and Sons, p. 134(1982)
2. Sonntag, N.O.V.: Glycerolysis of fats and methyl esters-Status, Review and Critique. *J. Am. Chem. Soc.*, **59**, 759A(1982)
3. Lauridsen, J.B.: Food emulsifiers: Surface activity, edibility, manufacture, composition, and application. *J. Am. Chem. Soc.*, **53**, 400(1976)
4. Flecher, P.D.I., Freedman, R., Robinson, B., Rees, G. and Schomacker, R.: Lipase-catalyzed ester synthesis in oil-continuous microemulsions. *Biochim. Biophys. Acta.*, **912**, 278(1987)
5. Hoq, M.M., Yamane, T. and Shimizu, S.: Continuous synthesis of Glycerides by lipase in a microporous membrane reactor. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **61**, 776 (1984)
6. Yamane, T., Hoq, M.M., Ithoh, S. and Shimizu, S.: Glycerolysis of fat by lipase. *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **35**, 625(1986)
7. Yamane, T., Hoq, M.M., Itoh, S. and Shimizu, S.: Continuous glycerolysis of fat by lipase in microporous hydrophobic membrane reactor. *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **35**, 632(1986)
8. Holmberg, K. and Ostberg, E.: Enzymatic preparation of monoglycerides in microemulsion. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **65**, 1544(1988)
9. Holmberg, K., Lasesen, B. and Stark, M.: Enzymatic glycerolysis of a triglyceride in aqueous and non-aqueous microemulsions. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **66**, 1796(1989)
10. McNeill, G.P., Shimazu, S. and Yamane, T.: Solid phase enzymatic glycerolysis of beef Tallow resulting in a high yield of monoglyceride. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **67**, 779(1990)
11. McNeill, G.P., Shimazu, S. and Yamane, T.: High yield Enzymatic glycerolysis of fats and Oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **68**, 1(1991)
12. Tatara, T., Fujii, T., Kawase, T. and Minagawa, M.: Quantitative determination of tri-, di-, monooleins and free fatty acid by the thin layer chromatography-flame ionization detector system using internal standards and boric acid impregnated chromarod. *Lipids*, **18**, 732(1983)

(1994년 5월 23일 접수)