

## 반응표면분석에 의한 기능성 유지의 효소적 합성 조건 최적화

조은진 · 이종호<sup>1</sup> · 이기택\*

충남대학교 식품공학과, <sup>1</sup>연세대학교 식품영양학과

### Optimization of Enzymatic Synthesis Condition of Structured Lipids by Response Surface Methodology

Eun-Jin Cho, Jong-Ho Lee<sup>1</sup>, and Ki-Taek Lee\*

Department of Food Science and Technology, Chungnam National University

<sup>1</sup>Department of Food Science and Nutrition, Yonsei University

Synthesis conditions were optimized using response surface methodology for producing structured lipids (SL) by interesterification of DHA-enriched algae oil derived from microalgae, *Schizochytrium* sp. and corn oil. Reaction was performed for 24 hr at 55°C catalyzed by immobilized lipase from *Rhizomucor miehei* (RM IM) in shaking water bath. Major fatty acids of SL were palmitic (21.70 mol%), oleic (20.20 mol%), and linoleic (27.34 mol%) acids, and DHA (15.06 mol%). To separate newly synthesized SL-triglycerides (TG) species, HPLC with evaporative light scattering detector (ELSD) was used. Production conditions were optimized using central composite design with reaction temperature (35-75°C, X<sub>1</sub>), reaction time (2-42 hr, X<sub>2</sub>), and enzyme concentration (2-14%, X<sub>3</sub>) as variables. When variables were 70.28°C (X<sub>1</sub>), 28.74 hr (X<sub>2</sub>), and 11.30% (X<sub>3</sub>), maximum content of selected three peaks of synthesized SL-TG species was predicted as 6.97 area%.

**Key words:** structured lipids, interesterification, DHA-enriched algae oil, RSM

## 서 론

일반적으로 어유에 함유된 omega-3 지방산인 eicosapentaenoic acid(EPA, C20:5)와 docosahexaenoic acid(DHA, C22:6)는 omega-6 불포화 지방산들에 비해 혈장 내 TG와 LDL-cholesterol의 함량을 낮추는 것으로 보고되고 있고(1,2), 이들 EPA와 DHA는 omega-6 지방산인 arachidonic acid(C20:4)와 cyclooxygenase에 대하여 antagonistic 관계를 가져 체내 eicosanoid류의 조성을 변화시켜서 체내의 생리 조절을 할 수 있다고 보고되어져 있다(3,4). 특히 망막 및 두뇌 인지질의 주요 구성 성분인 DHA는 두뇌조직의 기능적 발달에 중요한 영향을 미친다고도 알려져 있다(4).

한편, EPA나 DHA는 고등어, 참치 등 주로 등푸른 생선의 기름에서 추출되어 왔으나, 이는 불쾌취를 함유하고 있다는 단점을 가지고 있다. 이들을 제거하기 위해 고압 고온 증류와 탈취를 이용한 방법이 시도되었으나 크게 개선시키지 못했고, 공정 중 산화와 가수분해가 발생하여 문제시되기도 했다(5,6). 이러한 문제해결 방법 중 하나가 종래의 지방산 추출 원료인 어유보다는 새로운 원료를 선택하여 추출, 농축하는 것이다(6).

흔히 어유의 지방산은 해양미생물인 조류(microalgae)나 식물성 플랑크톤으로부터 기원하는 것으로 알려져 있으며, 일반적으로 omega-3 계열의 불포화지방산의 조성비율이 높고 다양하게 함유되어 있는 것으로 보고되고 있다(7,8). 조류에서 얻어진 지질의 경우 어유에서 비롯한 불쾌취가 적은 장점을 가지고 있으며, sn-2 위치에 EPA나 DHA 함량이 다량 분포되어 있다(9).

재구성지질(structured lipids, SL)은 TG 분자 안에서 지방산의 조성 또는 위치를 변화시켜 새로운 기능성 지방산을 결합시키는 방법 또는 기능성을 가지는 다른 TG와의 interesterification 반응에 의해 생성될 수 있다. 생성된 재구성지질은 물리적, 화학적 특성이 개선되어 기능성 식품으로의 이용이 가능하며, 질병의 치료와 예방에 유용한 medical food로서 사용될 수 있다(10,11). 효소반응에 의한 재구성지질 합성에 쓰이는 lipase는 환경 친화적이며 인체에 무해하고, 이는 TG의 에스테르 결합을 가수분해하여 글리세롤과 지방산으로 분해한 후 역으로 합성하는 특성을 가진다. 특히 미생물 유래의 lipase의 경우 동물이나 식물에서 얻어지는 lipase에 비해 생산비가 훨씬 적게 들며 대량 생산이 가능하므로 산업적 잠재성이 크다(12,13). 본 연구에 사용된 RM IM은 *Rhizomucor miehei*로부터 획득된 lipase가 macroporous anion exchange resin에 고정화된 효소로서 sn-1,3 위치에 특이적으로 작용한다(13,14). 한편, 재구성지질의 합성 최적 조건의 규명을 위한 방법으로 반응온도, 시간 및 효소농도 등의 요인변수들 중 한가지를 제외한 나머지 요인변수들을 일정하게 하고 한가지 요인에 따른 조건을 확립하는 방법을 확

\*Corresponding author: Ki-Taek Lee, Department of Food Science and Technology, Chungnam National University, Gung-dong 220, Yuseung-gu, Daejeon 305-764, Korea  
 Tel: 82-42-821-6729  
 Fax: 82-42-822-6729  
 E-mail: ktlee@cnu.ac.kr

용하고 있으나(15), 재구성지질 합성과정에서 요인변수들의 상호작용에 따른 생성량의 최적화를 위하여 도식적 방법으로 실험계획을 수립한 후 반응표면분석을 이용하여 생성량의 변화를 알 수 있는 예측모델의 개발이 요구된다.

여기서 본 연구에서는 omega-3 지방산을 함유한 고기능성 유지를 효소적 방법으로 생산하기 위하여 DHA-enriched algae oil 과 옥수수유를 기질로 사용하고, 반응조건(반응온도, 시간 및 효소농도)을 중심합성계획에 의한 반응표면분석을 이용하여 조건을 최적화한 후 대량생산 system에서의 합성을 위한 조건을 연구하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 연구의 원료인 DHA-enriched algae oil은 미세조류인 *Schizochytrium* sp.로부터 획득된 것으로서 Martek(Columbia, MD, USA)로부터 구입하였으며, 옥수수유는 시중에 유통되고 있는 J사의 제품을 사용하였다. 재구성지질의 합성에 사용된 Lipozyme RM IM은 Novo Nordisk Biochem. North American Inc.(Franklinton, NC, USA)에서 구입하였다.

### 항온교반수조에서의 재구성지질의 합성 및 pancreatic lipase 에 의한 가수분해

Test tube(25 mL)에 DHA-enriched algae oil과 옥수수유를 각각 1g씩 취한 후 전체 기질 무게의 10%에 해당하는 RM IM (0.2 g)을 넣고 *n*-hexane(3 mL)을 가하였다. 이것을 55°C, 175 rpm의 항온교반수조에서 24시간 동안 반응시킨 후 PTFE syringe filter(25 mm, 0.2 µm, Whatman, Maidstone, Kent, UK)를 사용하여 여과시키고, N<sub>2</sub> gas를 사용하여 *n*-hexane을 제거하였다.

한편, 생성된 재구성지질의 *sn*-2 위치의 지방산 조성 분석을 위하여 *sn*-1,3 위치에 특이적으로 작용하는 pancreatic lipase (from hog pancreas, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 이용, 가수분해를 실시하였다(14). Test tube(25 mL)에 DHA-enriched algae oil, 옥수수유, 재구성지질을 각각 5 mg씩 취하고 1 M Tris-HCl buffer(pH 7.6, 5 mL), 0.05% bile salts (1.25 mL), 2.2% CaCl<sub>2</sub>(0.5 mL), 그리고 pancreatic lipase(5 mg)을 가하였다. 혼합물을 37°C water bath에서 3분 동안 가운, 1분 동안 반응시키는 과정을 3회 반복 실시하고, diethyl ether(2 mL)를 가하여 추출한 후 sodium sulfate anhydrous column를 이용하여 수분 및 불순물을 제거하였다. Hexane : diethyl ether : acetic acid = 50 : 50 : 1(volume ratio)인 전개용매를 사용하고 반응물 50 µL를 취하여 TLC silica plate(10×20 cm, Merck, Columbia, MD, USA)에 전개시켰다. 옥수수유를 표준 물질로 하여 전개된 R<sub>f</sub>값을 기준으로 R<sub>f</sub>값 0.04인 2-monoglyceride(MG)을 분리하였다.

### 지방산 조성 분석

각각의 TG 또는 TLC에서 획득한 2-MG를 methylation(16)시킨 후 gas chromatography(GC)에 의해 지방산 조성 분석을 실시하였다. GC(Hewlett-Packard 6890, Avondale, PA, USA) 분석을 위한 검출기는 flame ionization detector(FID, 260°C)를 사용하였고, carrier gas는 N<sub>2</sub>(52.5 mL/min)를 사용하였다. Column은 Supelcowax<sup>TM</sup>-10(60 m×0.25 mm, 0.25 µm film thickness, Bellefonte, PA, USA)을 이용하였으며, column oven 온도는 140°C에서 1분간 유지시킨 후 1분당 10°C씩 220°C까지 증가시

키고 55분간 유지시켰다. Injector 온도는 250°C로 유지하였으며, constant flow와 split (50 : 1) mode를 사용하였고 1 µL를 주입하여 지방산 분석을 실시하였다.

### Reversed-phase HPLC를 이용한 재구성지질의 분석

생성된 재구성지질의 새로운 TG 형태의 분리 및 정량을 위하여 reversed-phase HPLC-ELSD system(Younglin Acme, Anyang, Korea)을 이용하여 분석을 실시하였다. Column은 Nova-Pak<sup>®</sup> C<sub>18</sub> 60Å 4µm(3.9×150 mm, Milford, DW, USA)을 사용하였고, 검출기는 evaporative light scattering detector(ELSD, SEDEX MODEL 75, Sedere, Alfortville, France)을 사용하였으며 질소유속 220 kPa, 온도는 40°C로 설정하였다. 용매는 acetone 과 acetonitrile을 0.5 mL/min의 유속으로 기울기용리로 하여 사용하였다(17). Reversed-phase HPLC 분석은 TG의 지방산 길이와 불포화도에 따라 분리되는 원리를 이용한 것으로 동정된 성분은 partition number로 나타낼 수 있으며, 이를 통해 TG의 지방산 조성을 예측할 수 있다(17,18).

$$\text{Partition number(PN)} = \text{total number of carbons(CN)} - 2 \times \text{total number of double bonds(ND)}$$

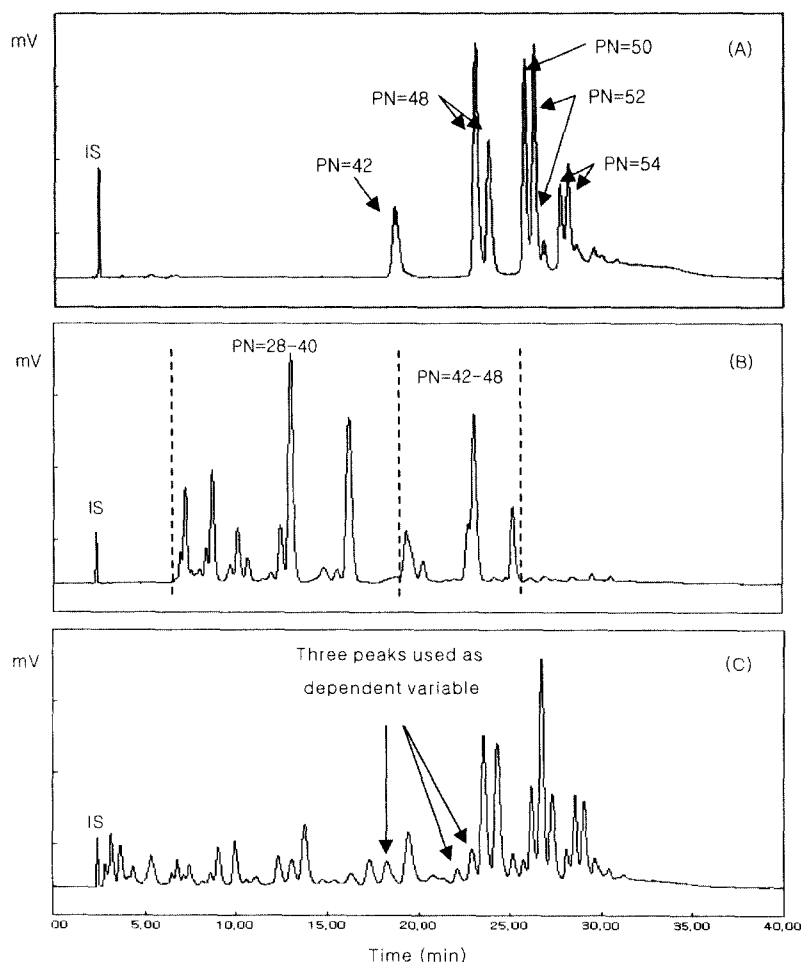
위 식에서 CN은 TG의 전체 탄소수를 나타내며, ND는 총 이중결합의 수를 나타낸다. 외부표준물질로써 Sigma(St. Louis, MO, USA)의 tributyrin(C4:0, PN = 12), tricaprillin(C8:0, PN=24), trilaurin(C12:0, PN = 36), trimyristin(C14:0, PN = 42), tripalmitin(C16:0, PN = 48), triolein(C18:1, PN = 48) 및 trilinolein(C18:2, PN = 42)을 사용하였으며, 분석 결과를 바탕으로 retention time (X)과 PN(Y)으로 이루어진 표준검정곡선을 구하였다.

### 재구성지질의 생산 최적화를 위한 실험계획

HPLC 분석을 통해 분리된 새로운 TG 생성 최적화를 위하여 중심합성계획(central composite design)에 따라 재구성지질을 합성하였으며, 반응표면분석(response surface methodology)을 위하여 SAS(statistical analysis system) 프로그램을 사용하였다(19). 반응표면분석은 여러 개의 요인변수 X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, ..., X<sub>k</sub>가 복합적인 작용을 함으로써 반응변수(Y)에 영향을 주고 있을 때 반응 변화가 이루는 반응표면에 대한 통계적인 분석방법으로써, 반응표면을 기초로 한 요인들의 최적수준을 결정할 수 있다(19). 본 실험에서의 요인변수는 반응온도(35-75°C, X<sub>1</sub>), 반응시간(2-42시간, X<sub>2</sub>) 및 기질의 무게에 대한 효소농도(2-14%, X<sub>3</sub>)이었으며, 각각의 변수를 -2, -1, 0, 1, 2 등의 5 수준으로 부호화하여 설정된 16개의 조건에 의해 2회 이상 반복 실험을 수행하였다(Table 1). 본 연구에 사용된 효소는 30-62°C 범위에서 효소 활성을 가지며 70°C 이상에서는 효소활성이 감소될 수 있으므로 요인변수 중 반응온도의 최대수치를 75°C로 설정하였고(20,21), Jennings 등(9)과 Ko 등(21)이 반응시간에 따른 효소 활성 비교 결과, 20, 24시간까지는 생성된 재구성지질의 함량이 증가하였으나 40시간 이후에는 변화율이 매우 적었으므로 반응시간의 최대수치를 42시간으로 설정하였다. 또한, Senanayake 등(15)과 Ko 등(21)의 연구 결과, 효소농도가 증가할수록 반응율도 증가하는 경향을 보였으나 10% 이상의 효소 첨가 시에는 반응에 참여하지 못한 효소가 존재하여 재구성지질 함량이 일정하거나 다소 감소하는 것으로 조사되었으므로 그 범위를 2-14%로 설정하였다. HPLC-ELSD system을 이용한 재구성지질의 분리를 통해 확인된 다수의 새로운 TG 형태 중 쉽게 식별이 가능한 세 가지 TG 형태의 면적비(area%) 총합을 반응

**Table 1. Levels of independent variables for central composite design**

Variable	Symbol	Coded variable				
		-2	-1	0	1	2
Temperature (°C)	X <sub>1</sub>	35	45	55	65	75
Time (hr)	X <sub>2</sub>	2	12	22	32	42
Enzyme (%)	X <sub>3</sub>	2	5	8	11	14



**Fig. 1. Chromatograms from the reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of: (A) corn oil (TG), (B) DHA-enriched algae oil (TG), (C) structured lipid (TG). Total area % of selected three peaks was used as a dependent variable. Partition number(PN) = total number of carbons(CN) - 2 x total number of double bonds(ND).**

변수(Y)로 하였으며(Fig. 1C), 2회 이상 실험한 결과를 평균값으로 하여 반응변수를 구하였다.

#### 반응표면분석을 위한 재구성지질 합성 및 전처리

Vial(25 mL)에 반응 기질로써 DHA-enriched algae oil(1 g)과 옥수수유(1 g)를 혼합한 후 기질의 무게에 대한 효소농도(2-14%, X<sub>3</sub>)를 실험계획에 따라 혼합하고 설정된 반응시간(2-42시간, X<sub>2</sub>)에서 재구성지질 합성 연구를 수행하였다. 각 실험조건에서 일정한 반응온도(35-75°C, X<sub>1</sub>)를 유지하기 위해 항온수조를 사용하였으며, 효율적인 합성을 위해 magnetic bar와 hot plate stirrer를 이용하여 250 rpm에서 재구성지질을 합성하였다. 실험계획에 따른 반응시간 동안 합성된 재구성지질은 PTFE syringe filter (25 mm, 0.2 µm, Whatman, Maidstone, Kent, UK)를 사용하여 여과시킨 후 위와 같은 조건의 reversed-phase HPLC에 의해 분

석을 실시하였다.

#### 결과 및 고찰

##### DHA-enriched algae oil과 옥수수유 및 재구성지질의 지방산 조성 분석

원료인 DHA-enriched algae oil과 옥수수유 및 항온교반수조에서 생성된 재구성지질의 지방산 조성을 분석한 결과는 Table 2와 같다. DHA-enriched algae oil의 TG 지방산 조성 분석 결과, DHA(35.43 mol%), palmitic acid(30.67 mol%), docosapentaenoic acid(14.06 mol%), myristic acid(11.64 mol%) 등이 주요 지방산인 것으로 나타났으며, EPA(2.40 mol%)가 소량 함유되어 있었다. 옥수수유 TG의 주요 지방산은 linoleic acid(53.54 mol%), oleic acid(32.55 mol%), palmitic acid(11.44 mol%) 등인 것으로

**Table 2. Fatty acid composition(mol%) of DHA-enriched algae oil, corn oil, and structured lipid**

Fatty acid	DHA-enriched algae oil		Corn oil		Structured lipid <sup>1)</sup>	
	TG	<i>sn</i> -2	TG	<i>sn</i> -2	TG	<i>sn</i> -2
14:0	11.64	20.81	nd <sup>2)</sup>	nd	4.96	6.27
16:0	30.67	19.90	11.44	1.03	21.70	20.35
16:1	0.38	0.44	0.16	nd	0.26	0.37
18:0	0.54	2.71	1.27	0.17	1.60	2.05
18:1	0.63	3.94	32.55	32.64	20.20	27.61
18:2	0.44	4.02	53.54	65.73	27.34	28.37
18:3	0.50	nd	1.04	0.43	0.64	0.52
20:2	0.44	nd	nd	nd	nd	nd
20:3	2.05	nd	nd	nd	0.41	nd
20:4	0.82	nd	nd	nd	0.43	nd
20:5	2.40	7.70	nd	nd	0.87	nd
22:5	14.06	8.54	nd	nd	6.53	3.46
22:6	35.43	31.94	nd	nd	15.06	11.00

<sup>1)</sup>The reaction mixture contained 1 g DHA-enriched algae oil, 1 g corn oil, and 0.2 g (10% by weight of substrates) immobilized lipase. The reaction was conducted at 55°C for 24 hr in a shaking water bath at 175 rpm.

<sup>2)</sup>Not detected

나타났다. 합성된 재구성지질의 경우, DHA의 함량은 15.06 mol%를 나타내었고 DHA-enriched algae oil에 과량 함유된 palmitic acid(30.67 mol%)의 함량은 21.70 mol%로 약 30% 감소하였으며 myristic acid(11.64 mol%)의 함량은 약 60% 감소한 4.96 mol%를 나타내었다. 또한 DHA-enriched algae oil에 소량 함유된 oleic과 linoleic acid의 함량은 interesterification 반응에 의해 급격히 증가하여 각각 20.20, 27.34 mol%를 나타내었다.

한편, TG를 섭취할 경우, 췌장에서 분비된 pancreatic lipase에 의해 2-MG와 유리지방산으로 분리되고, 이 중 2-MG와 long-chain fatty acid는 다시 TG을 재형성하여 콜레스테롤, 인지질 및 단백질과 결합한 후 chylomicron 형태로 혈액으로 이동된다. 이 때, TG의 형태 중 *sn*-1,3 위치의 지방산은 변화될 수 있으나, *sn*-2 위치의 지방산은 변화되지 않으므로 *sn*-2 위치에 기능성 지방산을 함유할 경우 체내에 그대로 흡수될 수 있다(22,23). 따라서 pancreatic lipase에 의한 가수분해를 통해 *sn*-2 위치의 지방산 조성을 알아보았다. DHA-enriched algae oil의 *sn*-2 위치의 지방산 조성 분석 결과, DHA는 31.94 mol%로 다량 함유되어 있었으며, 포화지방산인 palmitic acid는 TG에 비해 그 함량이 낮아 *sn*-1,3 위치에 대부분 함유되어 있는 것으로 예측되었다. 옥수수유는 주요 지방산인 linoleic과 oleic acid의 함량이 각각 65.73, 32.64 mol%를 나타내었고, 재구성지질은 합성을 통해 생성된 linoleic acid(28.37 mol%), oleic acid(27.61 mol%) 및 DHA (11.00 mol%)가 *sn*-2 위치에 고루 함유된 것을 확인할 수 있었다(Table 2).

#### Reversed-phase(RP) HPLC를 이용한 재구성지질의 분석

옥수수유, DHA-enriched algae oil 및 재구성지질의 RP-HPLC 크로마토그램을 Fig. 1에 나타내었다. Acetonitrile은 RP-HPLC에서 널리 쓰이는 이동상이며, acetone은 같은 PN을 가진 TG 형태의 분리가 용이하므로 주로 쓰인다(24). 대부분 TG 형태로 이루어진 옥수수유는 이중 결합을 1-2개 갖고 있고 6개의 지방산으로 이루어져 있으므로 PN이 42-54인 범위 내에 있었으며, 이들은 46:2, 54:6, 54:3, 52:2, 52:1, 54:2, 54:1, 52:0 및 54:0(CN:ND) 형태로 존재할 수 있다(Fig. 1A). DHA-enriched algae oil은 5-6개의 이중결합을 가진 지방산의 함량이 높으며

로 불포화도에 따라 PN이 28-48으로 넓게 존재하였으며, PN이 28-40, 42-48의 두 그룹으로 구별되었다. PN이 28-40 범위 내에서는 TG 형태가 62:17, 62:16, 66:18, 66:17, 66:16, 66:15, 60:12(CN:ND) 등으로 이루어져 있음을 예측하였고, 42-48 범위에서는 42:0, 44:0, 46:0, 48:0(CN:ND) 등으로 예측할 수 있었다(Fig. 1B). 한편, 합성된 재구성지질은 여러 가지 형태로 TG가 존재하는 것을 알 수 있었으며, 두 기질에 존재하지 않은 다수의 새로운 TG를 peak로 확인할 수 있었다. 합성을 통해 생성된 새로운 TG 중 3개 이상의 분리된 peak를 쉽게 식별할 수 있었으며, 이들 peak 면적비(area%) 총합의 생산 최적화를 위하여 이를 반응변수로 설정하였다(Fig. 1C).

#### 중심합성계획에 의한 재구성지질 합성 최적화

RP HPLC-ELSD system을 통해 확인된 재구성지질의 3개의 새로운 TG peak의 합성 최적화를 위해 수행된 각 조건에서의 실험 결과는 Table 3과 같다. 재구성지질 합성 최적화 연구에 있어서 세 가지 요인변수인 온도(35-75°C,  $X_1$ ), 시간(2-42시간,  $X_2$ ) 및 효소농도(2-14%,  $X_3$ )에 따른 종속변수(area%, Y)에 대한 반응표면회귀식은 다음과 같다.

$$Y = -5.766459 + 0.033168X_1 + 0.249938X_2 + 0.309492X_3 - 0.001204X_1X_2 + 0.006704X_1X_3 + 0.004546X_2X_3 + 0.000276X_1^2 - 0.002901X_2^2 - 0.028292X_3^2$$

생성된 재구성지질의 함량에 대한  $R^2$ 는 0.9813이며 유의성은 0.0002로서 1% 이내의 유의수준에서 인정되었다. 재구성지질의 생성량에 대한 합성 조건은 효소농도에 대한 F-ratio가 29.07로서 0.05%의 유의수준에서 유의성이 인정되어 효소농도의 영향을 가장 많이 받고 있었으며, 이는 효소농도의 증가에 따라 기질에 작용하는 효소량이 많아지면서 interesterification 반응이 활발히 이루어졌기 때문인 것으로 보인다. 또한 설정된 온도와 시간에서의 F-ratio는 각각 23.60, 26.49로서 세 가지 요인변수에 모두 영향을 받는 것으로 조사되었다(Table 4). 효소농도의 증가에 따라 재구성지질 함량이 증가하는 결과는 Senanayake 등(15)이 blubber oil에 capric acid를 RM IM 효소를 촉매로 하여 acidolysis 반응 시, 기질에 대한 효소 함량에 대한 연구에서 효소농도가 10%까지 증가함에 따라 생성량이 증가하는 보

**Table 3. Experimental data under different conditions based on the central composite design for response surface analysis**

Structured lipid production conditions <sup>1)</sup>			Response <sup>2)</sup>
Temperature (°C)	Time (hr)	Enzyme (%)	Area%
45 (-1)	12 (-1)	5 (-1)	1.14
65 (1)	12 (-1)	5 (-1)	2.73
45 (-1)	32 (1)	5 (-1)	2.83
65 (1)	32 (1)	5 (-1)	3.55
45 (-1)	12 (-1)	11 (1)	2.52
65 (1)	12 (-1)	11 (1)	4.53
45 (-1)	32 (1)	11 (1)	4.36
65 (1)	32 (1)	11 (1)	6.28
55 (0)	22 (0)	8 (0)	3.98
55 (0)	22 (0)	8 (0)	3.79
35 (-2)	22 (0)	8 (0)	1.93
75 (2)	22 (0)	8 (0)	6.06
55 (0)	2 (-2)	8 (0)	0.55
55 (0)	42 (2)	8 (0)	4.90
55 (0)	22 (0)	2 (-2)	0.82
55 (0)	22 (0)	14 (2)	4.91

<sup>1)</sup>The number of experimental condition by central composite design.

<sup>2)</sup>Total area% of selected three peaks on synthesized SL-TG species.

고 내용과 일치하였다. 또한 반응 시간이 증가함에 따라 생성량도 증가하는 경향을 보였으며, 이는 Jennings 등(9)이 연구한 fish oil과 capric acid의 효소적 합성 시, 반응 시간이 증가에 따라 생성되는 재구성지질의 함량이 많아지는 연구 결과와 일치하는 것을 알 수 있었다. 반응 온도에 대한 생성량의 변화를 보면 온도가 증가함에 따라 그 함량도 증가하였으며, 이는 Fornuso 등(20)이 본 연구와 같은 효소 촉매 하에 olive oil을 기질로 하여 caprylic acid 합성 시, 온도 증가에 따라 medium-chain fatty acid의 결합률이 증가하는 연구 결과와 유사한 경향을 보였다. 따라서 온도, 시간 및 효소농도의 변화에 따른 F-ratio가 모두 유사한 영향을 받는 본 실험의 결과가 인정될 수 있을 것이라 사료된다.

한편, 재구성지질 생성량에 대한 반응표면 회귀분석에서 안정점을 나타내어 최대값과 최소값을 알 수 없어서 다시 능선 분석을 실시하였다. 그 결과, 실험계획 범위 내에서 재구성지질 함량에 대한 최대치는 온도(70.28°C), 시간(28.74시간), 효소농도(11.30%)에서 6.97 area%로 나타났으며, 정상점은 안정점의 형태를 나타내었다(Table 4). 최적 합성 조건으로 예측된 온도(70.28°C)는 본 연구에 사용된 효소의 최적활성온도 범위인 30-62°C(20)보다 다소 높게 나타났으며, 최적합성시간(28.74시간)은 Jennings 등(9)과 Ko 등(21)의 연구 결과에서 나타난 재구성지질의 최대생성시간(24-40시간) 범위 내에 존재하였다. 또한, 최적효소농도(11.30%)는 Senanayake 등(15)과 Ko 등(21)의 연구와 유사한 결과를 나타내었다. 따라서 본 실험에서 예측된 최적효소농도가 interesterification 반응에 적절한 조건이 될 것으로 보인다.

이상의 최적조건에서 예측된 합성조건을 검증하기 위하여 임의의 최적점으로 반응조건을 설정하여 실제 합성연구를 실시한 결과, 측정값(8.03 area%)은 예측된 값과 유사한 함량을 나타내었다(Table 5). 본 연구에서 얻어진 최적합성조건들은 향후 기능성유지의 scale-up 생성에 대한 기초자료로 활용될 것으로 사료된다.

**Table 4. Variable for regression model of three peaks sum area of synthesized SL-TG species and predicted levels of synthesis conditions by the ridge analysis**

Processing conditions	F-Ratio	Maximum content of three peaks
Temperature (°C)	23.60	70.28
Time (hr)	26.49	28.74
Enzyme (%)	29.07 <sup>1)</sup>	11.30
Estimated response (area%)		6.97
Morphology		Saddle point

<sup>1)</sup>Significant at 0.5% level.

**Table 5. Comparison between of optimum predicted and experimental values of response variables on structured lipid synthesis**

Response variable	Predicted value	Experimental value
Total area% of three peaks on synthesized SL-TG species	6.97	8.03

## 요 약

Omega-3 지방산인 DHA가 풍부하고 이취가 적은 조류(microalgae, *Schizochytrium* sp.)로부터 지질을 획득하여 이를 옥수수유와 기질로 이용, 고정화효소인 RM IM(from *Rhizomucor miehei*)을 촉매로 하여 interesterification 반응에 의해 고기능성 유지를 효과적으로 생성하기 위하여 합성조건을 반응표면분석에 의해 최적화하였다. 항온교반수조에서 소량 합성된 재구성지질의 TG 지방산 조성 분석 결과, 재구성지질에 함유된 DHA의 함량은 15.06 mol%를 나타내었고, DHA-enriched algae oil에 과량 함유된 palmitic acid(30.67 mol%), myristic acid(11.64 mol%)의 함량은 각각 30, 60% 감소하여 21.70, 4.96 mol%를 보였으며, oleic과 linoleic acid의 함량은 급격히 증가하여 각각 20.20, 27.34 mol%를 나타내었다. RP HPLC-ELSD system을 이용하여 재구성지질의 TG 형태를 분리한 결과, 두 기질에 존재하지 않은 다수의 새로운 TG peak를 확인할 수 있었으며, 이 중 쉽게 식별이 가능한 3개의 peak를 선택, 이들 peak area% 총합을 반응변수로 하고 온도(35-75°C, X<sub>1</sub>), 시간(2-42시간, X<sub>2</sub>) 및 효소농도(2-14%, X<sub>3</sub>)를 요인변수로 하여 중심합성계획에 의해 반응조건을 최적화하였다. 그 결과, 온도(70.28°C), 시간(28.74시간), 효소농도(11.30%)의 최적합성조건에서 최대값 6.97 area%로 예측되었다.

## 감사의 글

본 연구는 보건의료기술진흥사업의 중점공동연구지원(02-PJ1-PG1-CH15-0001)에 의하여 수행된 연구결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

## 문 헌

- Iritani N, Fukuda E, Inoguchi K, Tsubosaka M, Tashiro S. Reduction of lipogenic enzymes by shellfish triglycerides in rat liver. *J. Nutr.* 110: 1664-1670 (1980)
- Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am. J. Clin. Nutr.* 54: 438-463 (1991)

3. Croft KD, Beilin LJ, Vandongen R, Mathews E. Dietary modification of fatty acid and prostaglandin synthesis in the rat. Effect of variations in the level of dietary fat. *Biophys. Acta.* 795: 196-207 (1984)
4. Uauy-Dagach R, Valenzuela A. Marine oils as a source of omega-3 fatty acids in the diet. *Prog. Food Nutr. Sci.* 16: 199-243 (1992)
5. Chung KS, Park HS. Effect of DHA-rich fish oil on brain development and learning ability in rats. *Korean J. Nutr. Soc.* 29: 267-277 (1996)
6. Bajpai P, Bajpai PK. Eicosapentaenoic acid (EPA) production from microorganisms: a review. *J. Biotechnol.* 30: 161-183 (1993)
7. Choe SN, Choi KJ. Fatty acid composition of sea algae in the southern sea coast of Korea. *Korean J. Food Nutr.* 15: 58-63 (2002)
8. Kim SK, Back HC, Byun HG, Kang OJ. Biological composition and antioxidative activity of marine microalgae. *J. Korean Fish. Soc.* 34: 260-267 (2001)
9. Jennings BH, Akoh CC. Lipase-catalyzed modification of fish oil to incorporate capric acid. *Food Chem.* 72: 273-278 (2001)
10. Akoh CC, Min DB. Food lipids. pp. 877-908. In: *Structured Lipids*. Akoh CC (ed). Marcel Dekker Inc., New York, USA (2002)
11. Lee KT, Akoh CC. Structured lipids: Synthesis and applications. *Food Rev. Int.* 14: 17-34 (1998)
12. Lee JS, Jang Y, Yang TH. Low-calorie Structured Lipids Synthesis by Enzymatic Transesterification. Ministry of Agriculture and Forestry, Kyonggi, Korea. pp. 15-17 (1999)
13. Lee KT, Akoh CC. Effects of selected substrate forms on the synthesis of structured lipids by two immobilized lipases. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74: 579-584 (1997)
14. Luddy FE, Barford RA, Herb SF, Magidman P, Riemenschneider RW. Pancreatic lipase hydrolysis of triglycerides by a semimicro technique. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 41: 693-696 (1963)
15. Senanayake SPJN, Shahidi F. Enzyme-catalyzed synthesis of structured lipids via acidolysis of seal (*Phoca groenlandica*) blubber oil with capric acid. *Food Res. Int.* 35: 745-752 (2002)
16. Cho EJ, Lee KT. Synthesis of structured lipids from corn oil and conjugated linoleic acid with immobilized lipase-catalyzed reaction. *Korean J. Food Sci. Technol.* 35: 797-802 (2003)
17. Lee KT, Jones KC, Foglia TA. Separation of structured lipids by high performance liquid chromatography. *Chromatographia* 55: 197-201 (2002)
18. Lee KT, Foglia TA. Synthesis, purification, and characterization of structured lipids produced from chicken fat. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77: 1027-1034 (2000)
19. Sung NK. SAS/STAT Regression Analysis. Freedom Academy, Seoul, Korea. pp. 237-286 (2000)
20. Fomuso LB, Akoh CC. Lipase-catalyzed acidolysis of olive oil and caprylic acid in a bench-scale packed bed bioreactor. *Food Res. Int.* 35: 15-21 (2002)
21. Ko SN, Kim H, Lee, KT, Ha TY, Chung SH, Lee SM, Kim IH. Optimization of enzymatic synthesis of structured lipid with perilla oil and medium chain fatty acid. *Food Sci. Biotechnol.* 12: 253-256 (2003)
22. Insel P, Turner RE, Ross D. Nutrition. Jones and Bartlett Publishers, London, UK. pp. 136-177 (2001)
23. Lee HS. Basic Nutrition. Kyomunsa, Seoul, Korea. pp. 86-96 (1999)
24. Ruiz-Gutierrez V, Barron LJR. Methods for the analysis of triacylglycerols. *J. Chromatogr. B* 671: 133-168 (1995)

---

(2004년 2월 16일 접수; 2004년 6월 20일 채택)