Kor. J. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 32, No. 1, 84–90 (2004)

대두유에서 글리세롤리시스 반응을 이용한 디글리세리드의 효소적 생산

박경준 · 안은영 · 권기석 · 김강성[1] · 강성태*
서울산업대학교 식품공학과, [1]용인대학교 식품영양학과

Diacylglycerol Production by Enzymatic Glycerolysis of Soybean Oil. Park, Kyung Jun, Eun-Young Ahn, Gi-Suk Kwon, Kang-Sung Kim[1], and Sung-Tae Kang*. *Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Technology, Seoul 139-743, Korea, [1]Department of Food Science and Nutrition, Yongin University, 470 Samga-Dong, Yongin City, Kyonggi-Do 449-714, Korea* – Diglyceride (DG) was prepared by reaction of soybean oil and glycerol in the presence of lipase. The initial rate of DG production was greatly affected by the amount of lipase. However the DG content at equilibrium was hardly affected by the amount of lipase added to the reaction mixture. The initial rate of FFA formation was highly affected by the moisture content between 0.5 and 2.3%, but at higher water content (3.3~5.2%), there was a small increase in the rate. And DG content at equilibrium slowly increased with the increase of the water content in glycerol up to 4.4%. However, there was a sharp decrease in DG content at higher water content (5.2~6.4%) due to higher free fatty acid production. The highest yield of DG was obtained at the temperature ranges of 30~50°C. The final yield of DG was not dependent on the glycerol (GL) to triglyceride (TG) molar ratio. However, at the molar ratio of 0.75:1 (GL/TG), the enzyme-catalyzed reaction was highly efficient and utilized all the glycerol. In optimized conditions for glycerolysis a yield of approximately 45% DG was obtained. 66% of total DG was 1,3-DG.

Key words: *Pseudomonas* lipase, diglyceride, glycerol, triglyceride, free fatty acid

최근 기능성 건강식품이 증가하고 있다. 체내에서 분해되지 않고 칼로리가 거의 없는 당, 충치를 방지하는 당, 암과 동맥경화 예방효과가 있다는 불포화지방산, 재구성지방질 등이 대표적이다[15, 27]. 고기능식품의 흐름은 당이나 지방산에서 기름으로 확산되고 있다. 근래 식품업체들은 건강을 유지하는 부가가치를 붙인 기름 개발을 가속화시키고 있다. 프록터 앤드 갬블(P&G)사 등 미국 업체들은 칼로리가 없는 기름을 개발, 정부 인가를 얻어 시판중이며, 일본에서는 지방으로 축적되지 않는 DG를 함유한 식용유가 실용화됐다.

글리세롤 한 분자에 두 개의 지방산이 결합되어 있는 디글리세리드는 모노글리세리드와 함께 식품유화제로 그 가치를 인정받은 물질로서 화장품의 계면활성제로도 이용되는 등 여러 가지 식품 및 약품 가공에 널리 사용되어 왔다[20]. 일본의 경우에는 디글리세리드가 특정 식용유에 1%의 phosphatidic acid와 함께 10% 정도 첨가되어 트리글리세리드만 있을 때 보다 약간의 친수성을 띄게 함으로써 식품에 기름이 잘 부착되도록 하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 유지대용물로서의 디글리세리드는 소화능력이 약한 사람과 어린이를 위한 기름으로 개발되었으며, 체내에 섭취되어 혈액을 통해 운반된 후 다시 중성지방 형태로 재합성되어 체지방이나 피하지방으로 축적되는 트리글리세리드와는 달리 간장과 근육으로 운반된 후 지방산과 글리세롤로 분해되어 물과 이산화탄소로 완전히 연소되어 체내에 축적되지 않는다는 연구가 보고 된 후 많은 주목을 받게 되었다.

특히 Farzaneh 등[2]에 따르면 순수한 위치 특이성을 갖는 1,3-sn-diacylglycerols과 1(3)-rac-monoacylglycerols은 인지질과 당지질, lipoprotein 합성의 전구체로 이용되며, Yun 등[27]은 디글리세리드가 항염증물질과 γ-아미노뷰티릭산(GABA) 등과 같은 여러 약품의 약리 전달물질로 작용하고 또한 효소의 중요한 활성촉진제제로서도 이용가치가 있다고 보고하여 디글리세리드의 다양한 기능성을 시사하였다.

현재까지 이러한 디글리세리드와 같은 유지의 화학공업적인 생산은 주로 모노글리세리드 생산을 목표로 해왔으며[3, 5-7, 16, 26] 주로 무기촉매의 존재 하에서 220°C 이상의 고온에서 유지와 글리세롤이 에스테르교환반응 되는 글리세롤리시스 반응에 의해 생산되어졌다[14, 21]. 그러나 디글리세리드의 화학공업적인 생산은 과잉의 글리세롤을 사용하여야 하고 수율도 30-40%에 지나지 않으며 고온에서 반응이 진행됨으로 인하여 생산물의 색상이 짙어지게 되며 좋지 않은 냄새가 나게 되는 단점이 있다. 그리하여 근래에는 지방가수분해 효소인 리파제(lipase)를 이용하는 생물공학적 방법이 중요시되고 있으며[18], 이는 고온, 고압이 필요한 화학적 방법에 비해 에너지를 절감할 수 있을 뿐만 아니라 생산공정의 안정성이 높고, 또한 효소의 특이성에 의해 불필요

*Corresponding author
Tel: 02-970-6736, Fax: 02-976-6460
E-mail: kst@snut.ac.kr

한 부산물을 줄일 수 있으며, 인체 내에도 존재하는 효소이므로 식품용 유지의 생산에 있어 인체에 대한 안전성이 보장된다는 이점이 있다[27]. 최근 들어 이러한 리파제를 이용한 디글리세리드의 생산을 위해 다양한 연구가 수행되고 있다. *Candida rugosa*[1], *Mucor miehei*[4], *Nigella sativa*[22], *Penicillium camembertii*와 *Candida cylindracea*[8] 등의 미생물로부터 얻어진 리파제를 이용한 모노- 및 디글리세리드 생산에 관한 연구를 기초로 하여, 디글리세리드의 대량생산을 위한 회분식 반응기의 설계[28]와 같은 공업화에 관련된 연구도 진행되고 있으며, 더 나아가서 Farzaneh S. 등[2]은 1,2-디글리세리드를 이용한 새로운 입체특이성을 가진 인지질 유도체 합성에 관한 실험을 하여 결과를 발표하기도 하였다.

일반적으로 글리세롤리시스 반응의 기질로는 지방산과 글리세롤이 사용되어져 왔다[22]. Jose 등[9]은 conjugated linoleic acid와 글리세롤을 효소적으로 반응시켜 acylglycerol의 생산에 대하여 연구하였으며, 지방산과 글리세롤의 몰비율을 달리하여 에스테르 결합으로 인한 디글리세리드의 생산을 시도하였다. 그러나 최근에는 지방산과 글리세롤의 에스테르 결합이 아닌, 유지(트리글리세리드)와 글리세롤을 사용한 글리세롤리시스 반응을 시킴으로써 디글리세리드를 생산하는 기술이 개발되었으며, 그 반응기질로 상온에서 고체상태인 경화우지를 사용한 고상계에서의 반응[24]과, 액체상태인 다양한 유지들을 사용되어진 액상계에서의 반응으로 나눌 수 있다. McNeill 등[17, 23]은 반응온도조절에 의한 고상계에서의 글리세롤리시스 반응을 수행함으로써 우지로부터 약 70%의 모노글리세리드를 얻었으며, Kang 등[11]은 경화우지를 사용한 고상계에서 글리세리드 반응(Solid-Phase Glycerolysis)을 수행하여 73%의 1,3-디글리세리드와 27%의 1,2-디글리세리드로 구성된 다량의 디글리세리드를 생산해 내었다. Mert 등[22]은 해바라기유와 코코아오일에서 얻어진 지방산과 글리세롤을 이용하여 글리세리드를 생산해 내었고 옥수수유를 이용한 연구도 발표되었다[25].

따라서 본 연구는 값싼 액상의 식용유지에서 고부가가치의 디글리세리드를 생산하기 위하여 트리글리세리드와 글리세롤을 기질로 하여 효소적 글리세롤리시스 반응을 수행하고, 가장 적합한 효소와 유지를 선별한 후 다양한 조건에서 반응시켜 최적반응조건을 확립함으로써 효과적인 디글리세리드 생산을 위한 기초자료를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

재료

시판되고 있는 다양한 리파제 중 35가지를 구매하여 사용하였다. 실험에 사용된 리파제는 lipase KURITA(Kurita water industry Ltd., Japan), lipase CHR(Asahi chem. Ind. CO., Japan), lipase CES, lipase P, lipase PS, lipase CE, lipase AP, lipase AK(Amano, pharmaceutical CO. Ltd., Japan), lipopan 50 BG(Novo Nordisk, Korea)등 이었다. 리파제의 활성은 37°C에서 1분동안 1 μmol의 유리 지방산을 생산하는 효소의 양으로 정의하며 일본의 JIS K0601-1988 방법에 따라 측정하였다[29]. 유지는 시중에 유통되고 있는 대두유(해표, 대한민국)를 사용하였다. 글리세롤은 수분함량이 각각 1.3%, 2.3%, 3.3%, 4.4%, 5.2%, 6.4%가 되도록 조정한 글리세롤(Reagent-grade, Junsei Chemical Co. Japan)을 실험에 사용하였다. 글리세롤내의 수분함량은 Karl-Fischer 수분측정기(No. 701KF Titrino, Metrohm Ltd., Swiss)를 사용하여 5회 반복 측정한 후 평균값을 취하여 결정하였다.

글리세롤리시스를 위한 반응혼합물의 제조

디글리세리드 생산을 위한 유지와 글리세롤의 글리세롤리시스 반응에 있어 가장 이상적인 몰 비율인 글리세롤(GL) : 트리글리세리드(TG) = 0.5 : 1에 맞도록 유지 6.67 g과 4.4%의 수분을 함유한 글리세롤 0.37 g을 효소일정량과 함께 반응 시켰다[11]. 모든 반응은 water bath상의 반응용기 내에서 수행되었으며 반응온도는 따로 언급하지 않는한 37°C로 하였다.

반응혼합물은 자석교반기를 사용하여 500 rpm으로 고정하여 교반하였으며 일정간격을 두고 반응 시간마다 반응액을 채취하여 그 조성을 TLC/FID 분석에 사용하였다.

글리세롤리시스 반응액의 분석

글리세롤리시스 반응의 경과는 반응혼합물(150 mg)을 채취하여 클로로포름(Showa Chemical Co. Ltd., Japan)으로 추출한 후 TLC/FID(Thin Layer Chromatograph/Flame Ionization Detector)로 분석하였다. 사용기종은 Iatroscan MK-50(Iatron Laboratories, Tokyo, Japan)이었으며 실리카로 코팅된 chromarod S III quartz rods를 분석에 이용하였다. 반응혼합물은 트리글리세리드(TG), 유리지방산(FFA), 1,3-디글리세리드(1,3-DG), 1,2-디글리세리드(1,2-DG), 모노글리세리드(MG)의 peak로 분리되었다. Rod에 1 μl의 클로로포름 추출물을 spotting하고 hexane/diethylether/acetic acid(55:15:0.5, v/v/v)의 전개 용매에 전개시킨 다음 이것을 102°C에서 10분간 건조시킨 후 scanning하였으며 반응혼합물의 조성을 peak areas의 백분율(%)로 표시하였다[11, 24]. 초기반응속도(initial rates)는 시간에 따른 TDG, MG, FFA의 생성속도와 TG의 전환속도(100-TG%)로 나타내었다[24]. 반응물 중의 트리글리세리드의 전환율과 디글리세리드의 생산율의 상관관계를 나타낼 수 있는 수치로서 DG의 비율을 TG와 DG의 비율을 합친 값으로 나눠준 값을 DG purity(%)로 표시하였다[13]. DG 함량이 높을지라도 TG의 전환율이 낮을 경우에는 상대적으로 DG% 수치가 낮게 나타나며, TG의 전환율이 높을수록 DG%는 증가한다.

결과 및 고찰

효소 선정

대두유 6.67 g과 4.4% 수분을 함유한 글리세롤 0.37 g에 35종의 리파제를 각각 0.1 g씩 취하여 50°C에서 반응시켰다. 시판되는 35종의 lipase를 사용하여 반응시킨 결과 lipase KURITA, lipase CHR, lipase CES, lipase P, lipase PS, lipase CE, lipase AP, lipase AK, lipase BG 등의 9가지 효소가 높은 디글리세리드 생산 효율을 나타냈다(Table 1). 그 중 반응 72시간 후 31%의 낮은 트리글리세리드 함량을 나타내며 동시에 비교적 높은 47%의 디글리세리드 생산 효율을 나타낸 lipase P(34,000 unit/g powder)를 본 실험에 사용하였다.

효소사용량 결정

글리세롤과 대두유를 0.5:1의 몰 비율로 혼합하고 lipase P를 반응혼합물 1 g에 대하여 4.9 unit/g, 14.6 unit/g, 29.1 unit/g, 58.3 unit/g, 121.4 unit/g를 첨가하여 반응시켰다. 반응초기인 글리세롤리시스 반응 2시간의 글리세롤리시스 반응에서는 효소 량이 적을수록 디글리세리드의 생산율이 낮게 나타났으며 효소 량에 따라 현저한 차이를 나타내었다(Fig. 1).

반응 24시간 후의 조성을 보면 1,3-디글리세리드와 1,2-디글리세리드를 합한 total DG(TDG)를 비교해 볼 때 약 40% 이상이 되면 일정한 수준에 다다름을 알 수 있었으며 효소 투여량이 많을수록 TG함량은 감소하고 DG함량과 DG purity가 약간씩 증가하였다(Fig. 2).

글리세롤의 수분함량별

수분함량을 1.3%, 2.3%, 3.3%, 4.4%, 5.2%, 6.4%로 달리한 글리세롤을 사용하여 반응시켰다. 글리세롤의 수분함량에 따른 글리세롤리시스 반응의 결과 수분으로 인한 영향

Table 1. The composition of reaction mixture after 72hr enzymatic glycerolysis by several lipases.

Lipases	Triglyceride (%)	Free fatty acid(%)	Total diglyceride (%)	Monoglyceride (%)
KURITA	36.7	3.0	47.2	13.1
CHR	34.2	3.2	48.9	13.6
CES	43.3	0	46.9	9.9
P	30.8	8.9	46.7	13.5
PS	36.0	3.2	48.2	12.6
CE	59.6	4.2	30.6	5.6
AP	51.0	3.2	37.6	8.2
AK	37.3	2.5	45.1	15.2
BG	38.2	9.3	39.0	13.5

Reaction condition: 37°C, lipases: 0.1 g, water content of glycerol: 4.4%, glycerol:soybean oil = 0.5:1 (mole/mole).

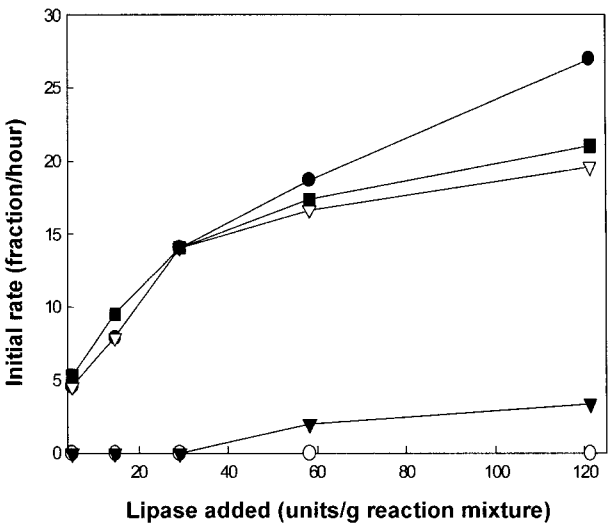

Fig. 1. The effect of lipase activity on the initial rate of disappearance of triglyceride and the initial rates of appearance of diglyceride, monoglyceride and free fatty acid. ●, 100-TG; ○, FFA; ▽, TDG; ▼, MG; ■, DG purity. Reaction condition: 50°C, water content of glycerol: 4.4%, glycerol:soybean oil = 0.5:1 (mole/mole).

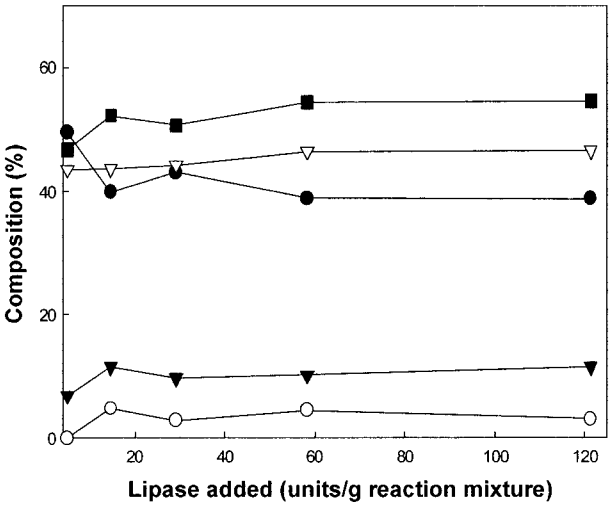

Fig. 2. The effect of lipase activity on diglyceride production after 24 hr enzymatic glycerolysis of soybean oil. ●, TG; ○, FFA; ▽, TDG; ▼, MG; ■, DG purity. Reaction condition: 50°C, water content of glycerol: 4.4%, glycerol:soybean oil = 0.5:1 (mole/mole).

은 반응초기에 크게 나타났다(Fig. 3). 글리세롤의 수분함량이 2.3% 이하에서는 DG 생성속도와 TG의 전환속도가 낮게 나타났으며 수분함량이 증가할수록 초기반응속도가 높아졌다. 수분함량이 2.3%에서 4.4%로 증가할수록 TG의 전환율은 높아졌으나 DG와 MG의 생성속도는 변함이 없었다. 수분함량이 5.2%에서 6.4%로 증가하였을 때 TG 전환속도와 DG 생성속도가 모두 감소하는 경향을 나타냈다. 한편,

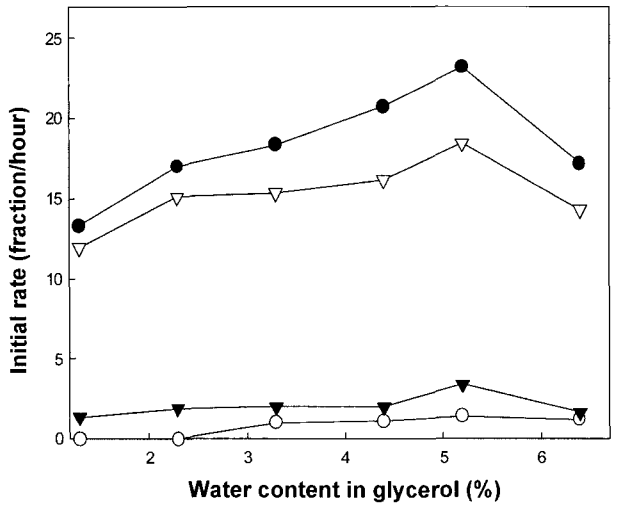

Fig. 3. The effect of initial water content on the initial rate of disappearance of triglyceride and the initial rates of appearance of diglyceride, monoglyceride and free fatty acid. ●, 100-TG; ○, FFA; ▽, TDG; ▼, MG; ■, DG purity. Reaction condition: 50°C, lipase P: 58.3 unit/g reaction mixture, water content of glycerol: 1.3%, 2.3%, 3.3%, 4.4%, 5.2%, 6.4%, glycerol:soybean oil = 0.5:1(mole/mole).

글리세롤의 수분함량을 달리하였을 때 반응 36시간 후 생산된 DG의 함량을 Fig. 4에 나타내었다.

수분함량이 1.3%~4.4%의 범위에서는 45% 이상으로 약간씩 증가하는 경향을 보여 주었으나 4.4% 이상의 수분함량에서는 오히려 DG생산이 감소하여 6.4%에서는 40.6%로 떨어졌다. 이 결과로부터 DG생산에 가장 적합한 글리세롤의 수분함량이 4.4%라는 것을 확인하였다.

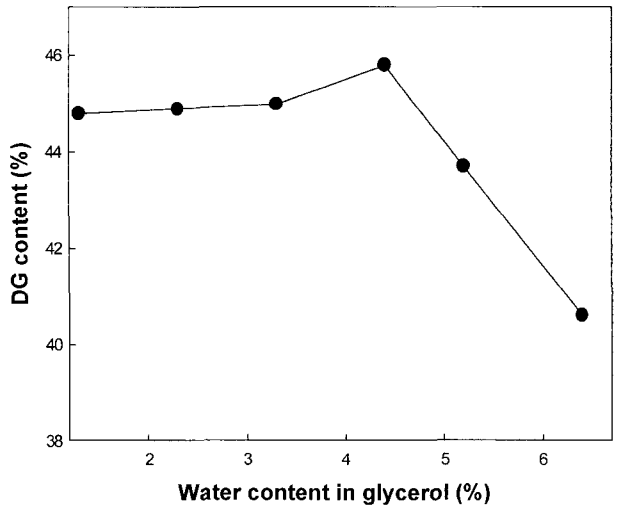

Fig. 4. The effect of initial water content on diglyceride production after 36hr enzymatic glycerolysis of soybean oil. Reaction condition: 50°C, lipase P: 58.3 unit/g reaction mixture, water content of glycerol: 1.3%, 2.3%, 3.3%, 4.4%, 5.2%, 6.4%. glycerol:soybean oil = 0.5:1 (mole/mole).

글리세롤과 트리글리세롤의 몰 비율

글리세롤(GL)과 트리글리세리드(TG)의 몰 비율을 0.5:1, 0.75:1, 2:1, 2.5:1, 3:1. 3.5:1, 4:1, 4,5:1로 달리 하여 글리세롤리시스 반응을 수행하였다.

2시간동안의 초기반응 후에 조사된 글리세롤리시스 반응액 중의 지방산 생성은 확인되지 않았으며 GL:TG 비율이 2.5:1 이상인 경우에는 초기 MG 함량이 20%로 높게 나타났다. 0.75:1에서 2:1까지의 GL:TG의 비율에서는 TG의 감소가 다른 비율보다 빨랐으며 30%의 정도의 DG가 생산되었다(Fig. 5). DG 생산을 위한 이상적인 GL:TG의 몰 비율은 글리세롤 한 분자에 지방산 두 분자가 결합하는 0.5:1이지만 초기 2시간(Fig. 5) 및 반응 24시간(Fig. 6)의 결과를 볼 때 0.5:1 보다는 0.75:1의 비율일 때 TG의 전환율과 DG의 생산이 높게 나타났으며, DG purity(%)도 0.5:1 및 0.75:1의 경우에 각각 56.9%와 65.9%로 나타나서 오히려 0.75:1의 몰 비율에서 DG 생산에 유리하였다.

한편, GL:TG 몰 비율 2.5:1 이상에서는 초기 2시간 TG의 전환율이 낮고 DG의 생산량도 적었으나 24시간 반응 후에는 0.5:1을 제외한 모든 GL:TG 비율에서 TG, DG, MG, FFA가 각각 25%, 45%, 25%, 5%의 비율을 나타내었다(Fig. 6). 그러나 글리세롤의 비율이 0.5:1보다 높은 실험군일수록 반응에 참여하지 못한 글리세롤이 반응 액에 남게 되므로, 반응 후 글리세롤 잔류 량이 적으며 DG의 생산율과 TG의 전환율이 높게 나타나는 0.75:1 비율이 가장 적합다고 판단되었다.

반응온도 변화에 따른 효과

반응온도가 글리세롤리시스 반응에 미치는 영향을 알아보

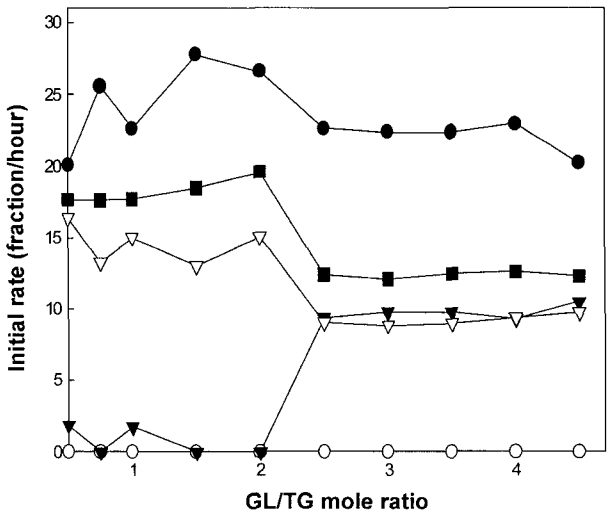

Fig. 5. The effect of glycerol (GL) : triglyceride (TG) molar ratio on the initial rate of disappearance of triglyceride and the initial rates of appearance of diglyceride, monoglyceride and free fatty acid. ●, 100-TG; ○, FFA; ▽, TDG; ▼, MG; ■, DG purity. Reaction condition: 45°C, lipase P: 58.3 unit/g reaction mixture, water content of glycerol: 4.4%, soybean oil.

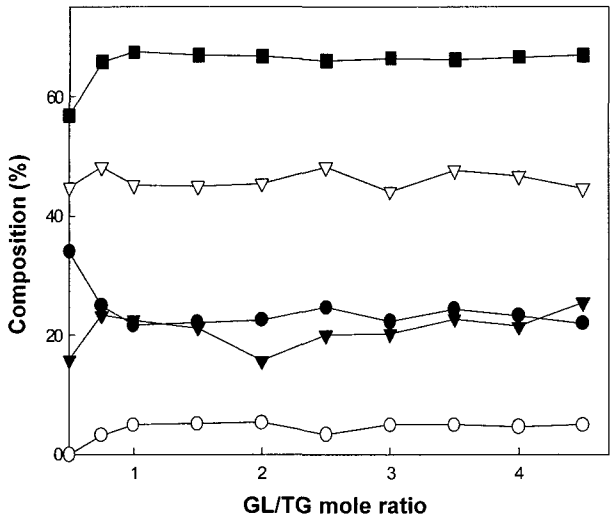

Fig. 6. The effect of glycerol (GL) : triglyceride (TG) molar ratio on diglyceride production after 24 hr enzymatic glycerolysis of soybean oil. ●, TG; ○, FFA; ▽, TDG; ▼, MG; ■, DG purity. Reaction condition: 45°C, lipase P: 58.3 unit/g reaction mixture, water content of glycerol: 4.4%, soybean oil.

기 위해 GL:TG 비율을 0.5:1로 하고 반응조의 온도를 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C로 달리하여 반응시켰으며 각 온도에서 반응 24시간 후의 반응혼합물의 조성을 살펴보았다. 반응온도 60°C에서는 TG의 함량이 45%로 나타나서 조사된 다른 온도에 비하여 5%정도 낮은 전환율을 보여주었다. 20°C에서의 글리세롤리시스 반응결과 DG 함량은 42%로 가장 낮았으며 30~50°C에서의 반응에서는 디글리세리드 함량이 45%(DG purity 57%)로 거의 유사한 결과를 보여주었다 (Fig. 7).

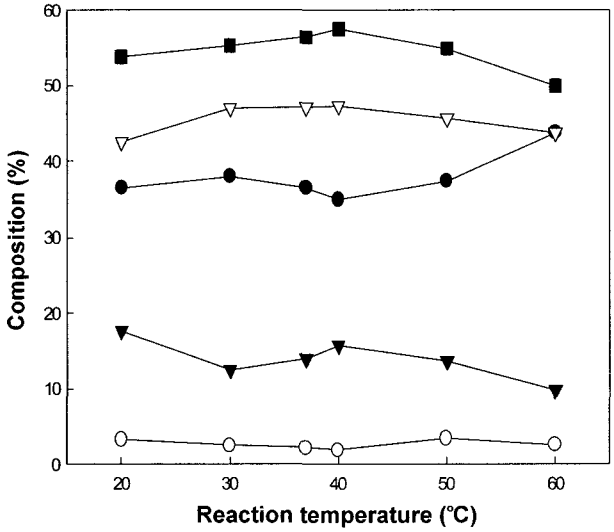

Fig. 7. The effect of temperature on diglyceride production after 24hr enzymatic glycerolysis of soybean oil. ●, TG; ○, FFA; ▽, TDG; ▼, MG; ■, DG purity. Reaction condition: 20°C, 30°C, 37°C, 40°C, 50°C, 60°C, lipase P: 58.3 unit/g reaction mixture, water content of glycerol: 4.4%, glycerol:soybean oil = 0.5:1(mole/mole).

최적조건에서의 대두유로부터 글리세롤리시스 반응에 의한 디글리세리드의 생산

최적화 된 조건에서 대두유가 글리세롤리시스 반응에 의해 모노 혹은 디글리세리드로 전환되는 과정을 Fig. 8에 나타내었다. 초기 6시간의 반응 동안에 약 58%의 TG가 전환이 되어 42%가 존재하며, DG는 43%, MG는 10%의 조성을 보여주었다. 초기의 TG는 대개 DG로 전환되어 감소하였으며 6시간 이후의 반응혼합물의 조성은 매우 완만하게 변화하여 반응 24시간 후의 DG와 MG의 생산은 44%와 10%의 함량을 보여주었다. 전체 DG중의 66%가 1,3-DG 이었으며 34%가 1,2-DG 이었다. 또한 글리세롤리시스 반응 동안 4% 내외의 유리지방산생성이 확인되었다. 이 결과는 Kang 등[11]이 경화우지를 사용하여 고상계에서 글리세리드 반응을 수행하여 1,3-DG와 1,2-DG가 혼합된 형태의 디글리세리드를 총 90% 함량으로 생산한 것에 비하면 낮은 수준이지만 값싸고 풍부한 유지원료인 대두유로부터 DG를 생산하는 시도를 하였다는데 그 의미를 부여할 수 있다. 값이 싼 유지로부터 생산된 DG는 고부가가치의 유지제품으로서 유지의 기능개선을 위한 식품산업에의 응용이 기대되며 DG 생산 수율을 높일 경우 분자증류법을 사용하지 않고 고순 도의 제품생산이 가능하게 되어 기존의 화학공업적 생산 법에 대한 효과적인 대체방법이 될 것으로 기대되며 고순도의 DG는 순수화학 물질로의 전환이 가능한 기본물질로서 이용될 경우 시장성을 높일 수 있으리라 기대된다.

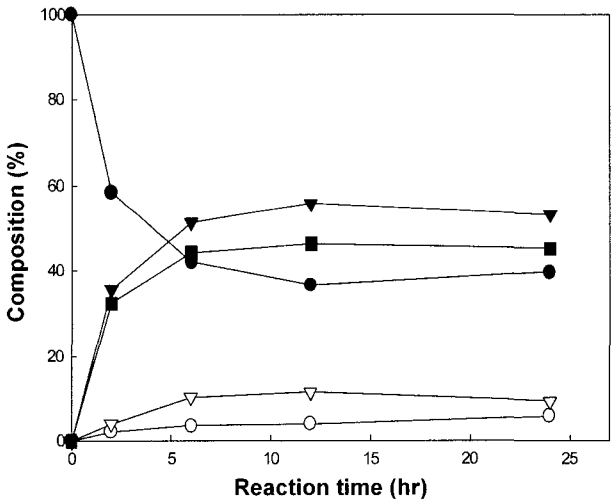

Fig. 8. The composition of the reaction mixture during enzymatic glycerolysis of soybean oil. ●, TG; ○, FFA; ▽, TDG; ▼, MG; ■, DG purity. Reaction condition: 50°C, lipase P: 58.3 unit/g reaciton mixture, water content of glycerol: 4.4%, glycerol:soybean oil = 0.75: 1(mole/mole).

요 약

Lipase를 사용하여 대두유와 글리세롤로부터 디글리세리드를 생산하였다. 디글리세리드의 초기 생산 속도는 리파제의 양에 크게 영향을 받았다. 그러나 반응혼합물에 첨가된 리파제의 양은 평형상태의 디글리세리드의 함량에는 거의 영향을 미치지 않았다. 초기 지방산 생성속도는 0.5~2.3%의 글리세롤 수분함량에서 매우 영향을 받았으며 3.3~5.2%의 수분함량에서는 느리게 증가하였다. 평형상태에서의 DG 함량은 글리세롤 수분함량 4.4%까지 서서히 증가하였으며 5.2~6.4%의 수분함량에서는 지방산함량의 증가로 인하여 오히려 감소하였다. 가장 높은 디글리세리드 생산효율을 나타내는 반응온도는 30~50°C이었으며 글리세롤과 트리글리세리드의 몰 비율은 최종적인 디글리세리드 생산율에는 영향을 미치지 않았다. 글리세롤(GL)과 트리글리세리드(TG)의 몰 비율이 0.75:1인 경우에 높은 효소촉매반응을 나타냈으며 첨가된 글리세롤이 반응에 모두 이용될 수 있는 최적조건으로 확인되었다. 최적화된 조건에서 45%의 디글리세리드를 얻을 수 있었으며 전체 디글리세리드 중 65%는 1,3-디글리세리드였다.

REFERENCES

1. Benjamin, S. and A. Pandey. 1998. *Candida rugosa* lipases. *Molecular Biology and Versatility in Biotechnology, Yeast.* **14**: 1069-1087.
2. Farzaneh, S., D. W. Roodsari, S. P. Gregory, and H. Joseph. 1999. A New approach to the stereospecific synthesis of phospholipid the use of L-glyceric acid for the preparation of diacylglycerol. *J. Org. Chem.* **64**: 7727-7737.
3. Flecher, P. D. I., R. Freedman, B. Robinson, G. Rees, and R. Schomacker. 1987. Lipase-catalyzed ester synthesis in oil-continuous microemulsions. *Biochim. Biophys. Acta.* **912**: 278-285.
4. Francoise, L. and P. Robert. 1999. Lipase-catalyzed production of short-chain acids trepenyl esters of interest to the food industry. *Appl. Biochem. and Biotechnol.* **82**: 185-198.
5. Holmberg, K., B. Lasesen, and M. Stark. 1989. Enzymatic glycerolysis of a triglyceride in aqueous and nonaqueous microemulsions. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **66**: 1796-1800.
6. Holmberg, K. and E. Ostberg. 1989. Enzymatic preparation of monoglycerides in microemulsion. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **65**: 1544-1549.
7. Hoq, M. M., T. Yamane, and S. Shimizu. 1984. Continuous synthesis of glycerides by lipase in a microporous membrane reactor. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **61**: 776-783.
8. Hirofumi, N., S. Kitahata, S. Yuji, N. Masaki, and T. Yoshio. 1995. Esterification of glycosides by a mono- and diacylglycerol lipase from *Penicillium camembertii* and comparison of the products with *Candida cylindracea* lipase, *J. Ferment. Bioeng.* **80**: 24-29.
9. Jose, A., C. O. Arcos, and G. C. Hill-Jr. 1998. Rapid enzymatic production of acylglycerols from conjugated linoleic acid and glycerol in a solvent-free system, *Biotechnol. Lett.* **20**: 617-621.
10. Jung, H. Y. 1997. Development and use of carbohydrate polyesters. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **30**: 8-17.
11. Kang, S. T. and T. Yamane. 1994. Effect of temperature on diacylglycerol production by enzymatic solid-phase glycerolysis of hydrogenated beef tallw. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **26**: 567-572.
12. Karroll, K. 1961. Separation of lipid classes by chromatography on florisil. *J. Lipid Res.* **2**: 135-141.
13. Kohori, J., Y. Kawakara, and Y. Hirota. 1989. Kao corp(JP) Preparation of diglycerides. EP0377154, A3, B1, B2.
14. Lauridsen, J. B. 1976. Food emulsifiers: Surface activity, edibility, manufacture, composition, and application. *J. Am. Chem. Soc.* **53**: 400-413.
15. Lee, Y. J. and H. Lars. 1992. Wiedermann: Nutrition and technic of edible oil, American Soybean Association
16. McNeill, G. P., S. Shimazu, and T. Yamane. 1990. Solid phase enzymatic glycerolysis of beef tallow resultion in a high yield of monoglyceride. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **67**: 779-786.
17. McNeill, G. P., S. Shimazu, and T. Yamane. 1991. High yield enzymatic glycerolysis of fats and oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **68**: 1-9.
18. Paul, D. I., F. Robert, B. Freedman, and H. Robinson. 1987. Lipase-catalysed ester synthesis in oil-continuous microemulsions, *Biochem. Biophysica. Acta.* **912**: 278-282.
19. Sin, Y. C. 1997. Production of unique microbial lipid. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **30**: 31-40.
20. Sonntag, N. O. V. 1982. In Fat splitting, esterification, and interesterification. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products* **2**: 134-147.
21. Sonntag, N. O. V. 1982. Glycerolysis of fats and methyl esters. *J. Am. Chem. Soc.* **59**: 759-766.
22. Sunna, M., L. Dandik, and H. A. Aksoy. 1995. Production of glycerides from glycerol and fatty acids by native lipase of *Nigella sativa* seed, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **50**: 333-342.
23. Tatara, T., T. Fujii, T. Kawase, and M. Minagawa. 1983. Quantitative determination of Tri-, Di-, Monooleins and Free Oleic Acid by the Thin Layer Chromatography-Flame Ionization Detector System Using Internal Standards and Boric Acid Impregnated Chromarod. *LIPIDS* **18**: 732-736.
24. Yamane, T., S. T. Kang, K. Kawahara, and Y. Koizumi. 1994. High-yield diacylglycerol formation by solid-phase enzymatic glycerolysis of hydrogenated beef tallow. *JAOCS* **71**: 339-342.
25. Yamane, T., M. M. Hoq, S. Ithoh, and S. Shimizu. 1986. Glycerolysis of fat by lipase. *J. Jpn. Oil. Chem. Soc.* **35**: 625-631.
26. Yamane, T., M. M. Hoq, S. Ithoh, and S. Shimizu. 1986. Continuousglycerolysis of fat by lipase in microporous hydrophobic membrane reactor. *J. Jpn. Oil Chem. Soc.* **35**: 632-639.

27. Yun, S. H., K. S. Kim, and S. W. Zoe. 1997. Production and use of functional lipids. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **30**: 65-77.
28. Development of enzymatic reactor for production of emulsifier and useful materials. 1992. Korea Advanced Institute of Science & Technology.
29. Determination of lipolytic activity of lipase for industrial use. 1988. 0601. pp. 1-6. Japan Industry Standard.

(Received Nov. 6, 2003/Accepted Mar. 5, 2004)