

Docosahexaenoic acid 함유 재구성지질의 효소적 합성 연구

조은진 · 조경현¹ · 이기택*

충남대학교 식품공학과, ¹영남대학교 생명공학부

Lipase-Catalyzed Synthesis of DHA-Enriched Structured Lipid

Eun-Jin Cho, Kyung-Hyun Cho¹, and Ki-Teak Lee*

Department of Food Science and Technology, Chungnam National University

¹School of Biotechnology, Yeungnam University

Structured lipid (SL) was synthesized by enzymatic interesterification of algae oil and corn oil in stirred tank batch reactor. The reaction, performed for 15 hr at 65°C, was catalyzed by *sn*-1,3-specific lipase RM IM from *Rhizomucor miehei* without organic solvent. DHA, oleic acid, and linoleic acid contents of SL were 14.9, 17.3, and 31.8 mol%, respectively. α -, γ -, and δ -tocopherol contents and physicochemical property of SL were evaluated. During 15 hr reaction, most reaction occurred within 6 hr, and highest relative production rate was observed between 3 to 6 hr.

Key words: structured lipid, interesterification, algae oil, corn oil

서 론

고도 불포화 지방산인 docosahexaenoic acid(DHA, 22:6 n-3)는 동맥경화, 심근경색 등의 심혈관 질환 예방에 효과가 있으며(1), 체내 지방이 축적되는 것을 감소시키고(2), 유아의 두뇌 조직 및 시신경 발달에 중요한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(3). 현재 DHA의 주요 식이 급원은 등푸른 생선 등 어류이나, 최근에 새로운 DHA 급원으로 미세조류(microalgae)가 주목 받고 있다. 이는 어유에 비해 DHA 함유 비율이 높고, 불쾌취가 적은 장점을 가지고 있으므로 미세조류에 의한 오메가 3 지방산, 특히 DHA의 생산에 관한 연구가 활발히 이루어질 것으로 예상되어 지고 있다(4). 본 연구에 사용된 algae oil은 미세조류인 *Schizochytrium* sp.로부터 획득된 것으로서 고농도의 DHA가 함유되어 있으며, 주로 *sn*-2 위치에 분포되어 있다(5). 또한 여러 동물 실험을 통해 DHA의 안정성이 입증되어 그 이용성이 증가하고 있다(6). 그러나, algae oil은 포화지방산인 myristic 및 palmitic acid와 다가불포화지방산인 docosapentaenoic acid 및 DHA로 대부분 구성되어져 있어서 algae oil만으로는 체내에 공급되어야 하는 필수 지방산을 제공할 수 없다(5,7).

한편, 재구성지질(Structured lipids, SL)은 화학적, 효소적 방법에 의해 triacylglyceride(TAG) 분자 안에서 지방산의 조성, 위

치를 변화시키거나 새로운 기능성 지방산의 결합에 의해 생성될 수 있다(8). 화학적 합성의 경우 에너지의 소비가 크고 부반응이 생기는 단점이 있으나, 효소 반응은 효소의 기질 및 반응 특이성을 이용하여 반응을 선택적, 효율적으로 할 수 있고, 재구성지질에 관한 review 논문들에 이들의 개발 목적과 특성이 자세히 논술되어 있다(8,9). 특히, 유사한 지방산의 조성을 가지고 있다 하더라도 합성되어진 재구성지질과 반응 기질들의 단순혼합유(physically blended lipid)와는 구성TAG 분자들의 입체화학적 구조(stereochemistic structure)의 차이로 서로 다른 영양대사를 보였다(10).

본 연구에서 algae oil과 옥수수수유를 기질로 사용하고 *sn*-1,3 위치에 특이적으로 작용하는 고정화효소를 이용한 interesterification 반응에 의해 DHA를 함유한 재구성지질을 생성하였고, 이때의 합성 특성 및 반응물의 지방산 위치 구성, tocopherol 함량의 변화, 요오드가, 검화가 및 산가의 변화를 연구하였다.

재료 및 방법

재료

본 연구의 원료인 옥수수유는 시중에 유통되고 있는 C사의 제품을 사용하였으며, 미세조류인 *Schizochytrium* sp.로부터 획득된 algae oil은 Martek(Columbia, MD, USA)로부터 구입, 사용하였다. 고정화 효소인 Lipozyme RM IM은 Novo Nordisk Biochem. North American Inc.(Franklinton, NC, USA)에서 구입하여 재구성지질 합성에 사용되었다.

재구성지질의 합성 및 탈산

실험에 필요한 kg양의 재구성지질을 합성하기 위하여 impeller

*Corresponding author: Ki-Teak 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: ktleee@cnu.ac.kr

가 장착된 stirred tank batch type reactor가 사용되었다. 반응기에 algae oil(250 g)과 옥수수유(250 g)를 혼합한 후 전체 기질 무게의 11%에 해당하는 RM IM(55 g)을 넣고 stirred tank batch reactor에 연결하였다. 길이, 폭이 각각 9 cm, 3 cm인 반달 모양의 impeller가 기질과 효소가 잘 반응할 수 있도록 사용되었으며, impeller는 반응기 바닥에서 1 cm 정도 떨어져서 stirrer motor에 의해 300 rpm의 속도로 회전시켰다. Tank의 길이와 내경은 각각 10.5과 15.0 cm이었으며, 65°C의 항온수조와 연결되어 일정한 반응 온도를 유지하였다. 지정된 시간에 시료를 채취하면서 15시간 동안 재구성지질을 합성한 후 감압기를 이용하여 효소를 여과시켰다. 채취된 시료의 탈산을 실시하였고, sodium sulfate anhydrous column를 이용, 수분 및 불순물을 제거하였다(7). Rotary vacuum evaporator(EYELA, N-1000, Japan)와 N₂를 사용하여 n-hexane을 제거하고 -14°C 냉동고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

Reversed-phase HPLC를 이용한 재구성지질의 분석

생성된 재구성지질의 새로운 TAG 형태의 분리를 위하여 reversed-phase HPLC-ELSD system(Younglin Acme, Anyang, Korea)을 이용하였다. Nova-Pak[®] C18 60Å 4 µm(3.9×150 mm, Milford, DW, USA) column과 evaporative light scattering detector(ELSD, SEDEX MODEL 75, Sedere, Alfortville, France)을 사용하였으며, 이때 검출기의 질소유속 220 kPa, 온도는 40°C로 설정하였다. 용매는 acetone과 acetonitrile을 0.5 mL/min의 유속으로 기울기용리로 하여 사용하였다. 반응시간 별(1, 2, 3, 6, 9, 12, 15 hr)로 생성된 재구성지질을 채취하고 HPLC chromatogram들을 비교하여, 각각의 peak area를 비교하였다. 각 peak들 중에서 15시간 후에 가장 크게 area가 증가한 peak를 선택하고, 이때의 peak area를 상대적 반응을 100으로 하여서 반응시간동안의 반응 정도를 알아 보았다.

지방산 조성 분석

Sn-2 위치의 지방산 조성 분석을 위하여 pancreatic lipase(from hog pancreas, Sigma, St. Louis, MO, USA)를 이용, 가수분해를 실시하였다(11). Test tube(25 mL)에 5 mg의 시료를 취하고 1 M Tris-HCl buffer(pH 7.6, 5 mL), 2.2% CaCl₂(0.5 mL) 용액, 0.05% bile salt(1.25 mL) 용액을 넣은 후 pancreatic lipase(5 mg)을 가하였다. 혼합물을 항온수조(37°C)에서 3분 동안 가운, 1분 동안 vortex 과정을 3~4회 실시하고, diethyl ether(2 mL)을 가하여 상층액만 추출한 후 sodium sulfate anhydrous column를 이용, 수분 및 불순물을 제거하였다. 반응물(50 µL)을 취하여 TLC silica plate(10×20 cm, Merck, Germany)에 전개 시키고, hexane : diethyl ether : acetic acid가 50 : 50 : 1(v/v/v)인 용매가 담긴 TLC tank를 사용하였다. 표준물질인 2-monoolein(Sigma, St. Louis, MO, USA)을 전개하여 얻어진 R_f 값을 기준으로 R_f 값 0.03인 2-monoacylglyceride(2-MAG)를 분리하였다.

한편, 각각의 TAG(50 mg)와 TLC에서 얻어진 2-MAG를 methylation(12) 후 GC에 의해 지방산 조성을 분석하였다. Flame ionized detector(FID, 260°C)가 장착되고 자동 시료 주입이 가능한 GC(Hewlett-Packard 6890 series, Avondale, PA, USA)를 사용하였으며, column은 Supelcowax[™]-10(60 m×0.25 mm, 0.25 µm film thickness, Bellefonte, PA, USA)을 이용하였다. 승온분석을 위한 column oven 온도는 초기에 140°C에서 1분간 유지시키고 1분당 10°C씩 220°C까지 증가시킨 후 55분간 유지시켰으며, 총 분석시간은 64분이었다. Injector 온도는 250°C로

설정하였으며, 시료를 1 µL 주입하였고 split(50 : 1) mode를 사용하였다. 이동상은 N₂(52.5 mL/min)이었으며, 일정 유속으로 이동하였다. 분석 후 얻어진 chromatogram 중의 내부표준물질(heptadecanoic acid, Sigma, St. Louis, MO, USA) 함량을 기준으로 지방산 함량을 계산하여 mol%로 나타내었다. 한편 *sn-1,3* 조성 계산식(12)은 다음과 같다. $Sn-1,3(\%) = (3TAG - sn-2)/2$

α-, γ-, 및 δ-Tocopherol 함량 분석

Vial(25 mL)에 시료(60 mg)와 hexane(10 mL)을 가하고 syringe filter를 이용하여 여과시킨 후 10 µL를 주입하여 흡광검출기(Younglin Acme absorbance detector, UV730D, Anyang, Korea)가 장착된 HPLC에 의해 분석하였다. 검출기의 파장은 295 nm로 설정하였으며, column은 LiChrosorb DIOL 5 µm(100×3.0 mm, Varian, CA, USA)을 사용하였다. Hexane:acetic acid, 1000 : 1 혼합용액을 용매로 하였으며, 유속은 1 mL/min이었다. Tocopherol 동족체의 정량을 위해서 α-, γ- 및 δ-tocopherol 표준품(Sigma, St. Louis, MO, USA)을 각각 50, 100, 125 µg/mL의 농도로 hexane에 희석한 후 HPLC 분석을 통해 얻어진 chromatogram의 peak 면적비를 기준으로 시료 중의 α-, γ-, 및 δ-tocopherol 등의 함량을 구하였다.

산가, 비누화가 및 요오드가 측정

효소적 합성에 의해 생성된 재구성지질의 이화학적 특성을 알아보기 위하여 산가(13), 비누화가(14) 및 요오드가(15)를 AOCs법에 의해 측정하였다.

결과 및 고찰

재구성지질의 지방산 합성

Fig. 1은 24시간 반응 후에 합성된 재구성지질의 reverse-phase chromatogram이다. 시간별(1, 2, 3, 6, 9, 12, 15 hr)로 채취된 재구성지질 시료들의 chromatogram를 비교하여, 각 peak area를 비교하였다. 반응이 진행되는 동안 여러 peak들의 area변화가 확인되었고, 이로써 간접적으로 반응의 진행이 이루어 짐을 알 수 있었다. 이 중에 15시간 후에 가장 크게 증가한 peak를 선택하고(Fig. 1, * 표시), 이때의 area를 상대적 반응을 100으로 하여, 반응시간 동안의 반응 정도를 알아 보았다. 시료가 채취

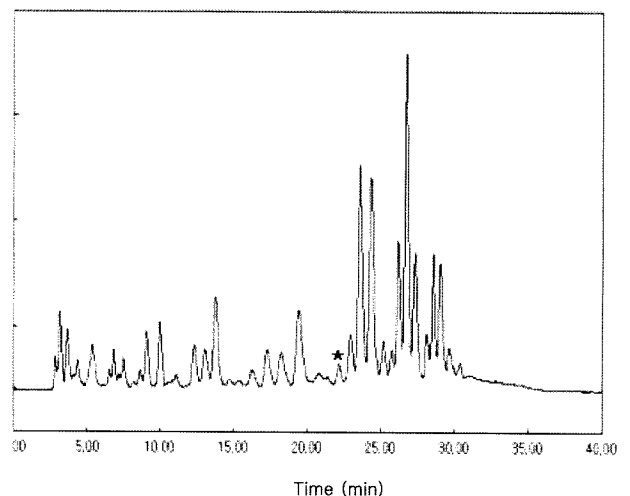


Fig. 1. Reverse-phase HPLC chromatogram of produced structured lipids after 15 hr reaction.

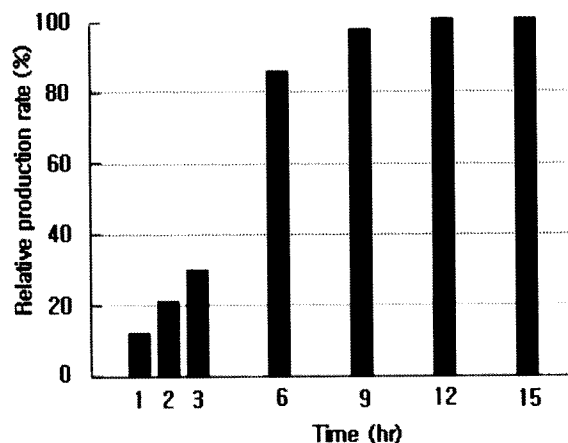


Fig. 2. Relative production rate (%) of structured lipids during 15 hr reaction.

Table 1. Positional fatty acid composition of structured lipid (SL) (Unit: mol%)

Fatty acid	Structured lipid ¹⁾		
	Total	<i>sn</i> -2	<i>sn</i> -1,3
14:0	5.0±0.4	4.6±0.1	5.2±0.2
16:0	22.0±0.5	16.4±0.3	24.8±0.3
16:1	0.2±0.1	0.2±0.1	0.2±0.1
18:0	1.2±0.3	1.2±0.1	1.2±0.1
18:1	17.3±0.5	15.7±0.1	18.1±0.3
18:2	31.8±1.1	28.4±0.6	33.5±0.6
18:3	0.2±0.1	nd ²⁾	0.2±0.1
20:4	0.4±0.1	0.6±0.1	0.4±0.1
20:5	1.3±0.1	1.7±0.2	1.1±0.1
22:5	5.7±0.5	7.9±0.4	4.6±0.4
22:6	14.9±0.1	23.3±0.2	10.7±0.2

¹⁾SL was synthesized by interesterification of algae oil and corn oil with RM IM (11% w/w substrates) in a stirred tank batch reactor at 300 rpm. The reaction performed at 65°C for 15 hr.

²⁾not detected.

된 반응시간 때의 chromatogram을 비교하였을 때 6 hr까지는 각 peak area의 변화가 있었으나, 이후에는 큰 차이를 보이지 않으면서 유사한 경향을 보였다. 즉, 진행된 반응조건 및 시간 (15 hr)동안 대부분의 반응은 6시간 내에 이루어졌고, 그 상승 폭은 3-6시간 사이에서 약 2.3배의 증가를 보이며 가장 크게 나타났고 이후에는 반응 평형을 보였다(Fig. 2).

재구성지질의 지방산 조성 분석

합성된 재구성지질의 지방산 조성을 분석한 결과는 Table 1 과 같다. Algae oil의 주요 지방산 조성은 14:0(13%), 16:0 (31%), 20:5(3%), 22:5(14%), 22:6(35%)이었고, 옥수수유의 지방산 조성은 16:0(12%), 18:1(32%), 18:2(53%)이었다(7). 본 실험 반응조건에서 합성된 재구성지질은 interesterification 반응에 의해 palmitic(16:0, 22 mol%), oleic(18:1, 17.3 mol%)와 linoleic acid(18:2, 31.8 mol%)가 많이 함유되어 있었으며, DHA (22:6) 함량은 14.9 mol%를 나타내었다. *Sn*-2 위치에 DHA가 23.3 mol%가 존재하고 있었으며, oleic과 linoleic acid도 각각 15.7과 28.4 mol%로 존재하고 있었다. *Sn*-1,3 위치에서는 DHA가 10.7 mol%가 존재 하였고, 구성하고 있는 주 지방산은

Table 2. α , γ , and δ -tocopherol contents in algae oil, corn oil and structured lipid (SL) (Unit: % weight)

	Tocopherol			Total tocopherol
	α	γ	δ	
Algae oil	0.016	0.08	0.04	0.136
Corn oil	0.026	0.034	0.02	0.08
Structured lipid ¹⁾	0.011	0.036	0.012	0.059

¹⁾SL was synthesized by interesterification of algae oil and corn oil in a stirred tank batch reactor for 15 hr.

Table 3. Acid, saponification and iodine value of the produced structured lipid (SL)

	Acid value	Saponification value	Iodine value
Algae oil	<0.56±0.1	179.5±0.2	277.9±0.9
Corn oil	<0.56±0.1	185.2±0.2	127.2±1.2
Structured lipid ¹⁾	<0.56±0.1	183.8±0.3	201.8±0.8

¹⁾SL was synthesized by interesterification of algae oil and corn oil in a stirred tank batch reactor for 15 hr.

palmitic, oleic과 linoleic acid로써 각각 24.8, 18.1 그리고 33.5 mol% 함유되어 있었다.

α , γ , 및 δ -Tocopherol 함량 측정

사용된 반응기질과 생성된 재구성지질의 α , γ , 및 δ -tocopherol 함량을 분석하였다(Table 2). Algae oil의 총 tocopherol 함량은 0.136%였으며, γ -tocopherol(0.08%)이 약 60%로 이성체 중 가장 많이 존재하였다. 옥수수유는 총 tocopherol 함량이 0.08%이었 으며, γ -tocopherol(0.034%)은 전체 함량의 45%를 나타내었다. 합성에 의해 생성된 재구성지질의 총 tocopherol 함량은 algae oil에 비해 약 2.3배 감소하고, 옥수수유에 비해 약 1.5배 감소한 0.059%를 나타내었다. 재구성지질의 tocopherol 함량 감소 이유는 효소 반응 및 탈산 과정 중에 tocopherol류의 손실에 의한 것으로 사료된다.

산가, 비누화가 및 요오드가 측정

생성된 재구성지질의 산가, 비누화가 및 요오드가를 측정한 결과는 Table 3과 같다. 산가 측정 결과, 반응에 사용된 algae oil과 옥수수유의 산가는 0.56 이하를 나타내어 유지의 산가가 매우 낮았었고, 효소적 합성 후 탈산된 재구성지질도 그 값이 0.56 이하였으며, 이는 효소 반응 중 생성된 유리지방산들이 탈산 공정을 통해 효과적으로 제거된 것으로 사료된다. 비누화가 측정된 결과, 옥수수유는 185.2 이었으며, 일반 식물 유지에 비해 분자량이 큰 지방산들의 함유량이 많은 algae oil은 그 값이 179.5 이었고, 재구성지질은 algae oil과 옥수수유의 중간 값인 183.8을 나타내었다.

한편, 요오드가를 측정된 결과, 일반 식물 유지에 비해 불포 화도가 큰 지방산들의 함유량이 많은 algae oil은 그 값이 277.9 를 나타내었고, 옥수수유는 127.2였으며, 재구성 지질은 201.8 을 나타내어, algae oil보다 불포화도가 다소 감소된 것을 알 수 있었다. 이는 *sn*-1,3 위치 반응 특이성을 가진 RM IM 효소에 의해 algae oil의 *sn*-1,3 위치에 존재하는 DHA, docosapentaenoic acid 등과 옥수수유의 주요 지방산인 oleic, linoleic acid 의 지방산 교환에 의한 것으로 사료된다.

요 약

조류(microalgae, from *Schizochytrium* sp.)로부터 DHA가 풍부하고 이취가 적은 지질을 획득하고 이를 옥수수유와 함께 반응기질로 이용하여 재구성지질을 합성하였다. 본 실험에 사용된 합성조건으로 oleic(17.3 mol%), linoleic(31.8 mol%), 그리고 docosahexaenoic acid(14.9 mol%)가 함유된 재구성지질을 합성하였다. α -, γ -, 및 δ -tocopherol의 총 함량은 0.059%로 분석되었고, 비누화 가(183.8) 및 요오드 가(201.8)를 측정하였다. 한편, 수행된 반응조건 및 반응시간동안 대부분의 반응은 6시간 내에 이루어 졌고, 그 상승폭은 3-6시간 사이에서 약 2.3배의 증가를 보이며 가장 크게 나타났다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것입니다 (02-PJ1-PG11-VN02-SV04-0009).

문 헌

- Sardesai VM. Nutritional role of polyunsaturated fatty acids. *J. Nutr. Biochem.* 3: 154-166 (1992)
- Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am. J. Clin. Nutr.* 54: 438-463 (1991)
- Horrocks LA, Yeo YK. Health benefits of docosahexaenoic acid(DHA). *Pharm. Res.* 40: 211-225 (1999)
- Tanon T, Harvey D, Larson TR, Graham IA. Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerol in four microalgae. *Phytochemistry* 61: 15-24 (2002)
- Hammond BG, Mayhew DA, Naylor MW, Ruecker FA, Mast RW, Sander WJ. Safety assessment of DHA-rich microalgae from *Schizochytrium* sp., I. Subchronic rat feeding study. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 33: 192-204 (2001)
- Abril R, Garrett J, Zeller SG, Sander WJ, Mast RW. Safety assessment of DHA-rich microalgae from *Schizochytrium* sp., V. Target animal safety/toxicity study in growing swine. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 37: 73-82 (2003)
- Cho EJ, Lee JH, Lee KT. Optimization of enzymatic condition of structured lipids by response surface methodology. *Korean J. Food Sci. Technol.* 36: 531-536 (2004)
- Lee KT, Akoh CC. Structured lipids: synthesis and applications. *Food Rev. Int.* 14: 17-34 (1998)
- Akoh CC. Structured lipid: enzymatic approach. *Inform* 6: 1055-1061 (1995)
- Small DM. The effects of glyceride structure on absorption and metabolism. *Ann. Res. Nutr.* 11: 413-419 (1991)
- Lee KT, Akoh CC. Immobilized lipase-catalyzed production of structured lipids with eicosapentaenoic acid at specific position. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73: 611-615 (1996)
- 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)
- AOCS. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society. 4th ed. Cd 3a-63. American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, USA (1990)
- AOCS. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society. 4th ed. Cd 3-25. American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, USA (1990)
- AOCS. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society. 4th ed. Cd 1-25. American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, USA (1990)

(2005년 5월 12일 접수; 2005년 8월 17일 채택)