

비 용매계에서 DHA가 함유된 Diacylglycerol의 효소적 반응에 의한 합성연구

김남숙 · 이기택*
충남대학교 식품공학과

Synthesis of Diacylglycerol-Enriched Functional Lipid Containing DHA by Lipase-Catalyzed in Solvent-Free System

Nam-Sook Kim and Ki-Teak Lee*

Department of Food Science and Technology, Chungnam National University

Structured triacylglycerol (SL-TAG) was synthesized by enzymatic interesterification with algae oil and soybean oil in solvent-free system. Structured di- and monoacylglycerol (SL-DAG/MAG) were produced by glycerolysis with SL-TAG and glycerol catalyzed by lipase. Reactions were performed by *sn*-1,3 specific Lipozyme RM IM lipase from *Rhizomucor miehei* (interesterification, 11%; glycerolysis, 5% by weight of total substrates) in solvent-free system using stirred-batch type reactor. SL-DAG/MAG contained TAG (42.3 area%), 1,3-DAG (19.2 area%), 1,2-DAG (22.2 area%), MAG (16.0 area%), and free fatty acid (0.2 area%). Iodine and saponification values of SL-DAG/MAG were 208.8 and 179.6, respectively. SL-DAG/MAG appeared yellowish in color.

Key words: structured lipids, interesterification, glycerolysis, algae oil

서 론

Diacylglycerol(DAG)와 monoacylglycerol(MAG)은 글리세롤 한 분자에 각각 2와 1개의 지방산이 결합되어 있는 형태로 triacylglycerol(TAG)보다 친수성을 가지고 있어 식품의 유화제 및 계면활성제 등으로 사용되고 있다(1). 뿐만 아니라, 특히 DAG는 TAG와 다른 대사 경로를 통하여 간에서 TAG보다 빠르게 β -산화 과정을 거쳐 에너지원으로 사용됨에 따라, 혈중 지질의 수치를 높이지 않으며 체중 개선 및 비만 예방 등과 같은 생리효과가 있는 것으로 보고되고 있으며(2,3), 이러한 DAG 및 MAG 함유 유지를 생성하기 위해서 다양한 화학적 및 생물학적 에스테르교환반응이 시도되고 있다(2-4).

식품 산업에서 일반적으로 고온(220-260°C), 고압 및 무기 촉매(Na, K 등)에 의한 화학적 에스테르교환반응이 사용되어왔으나 합성 및 정제 과정에 따른 변색, 이취 및 불포화 지방산의 바람직하지 않은 중합체 형성 등의 부반응을 일으킴에 따라, 대체 방법을 통한 기능성 유지의 합성을 위한 시도가 이루어지고 있다(3,5). 효소적 glycerolysis는 반응 위치 특이성을 가지는 lipase의 가수분해 및 에스테르반응에 의하여 유지 내 glycerol

backbone의 특정 위치에, 목적하는 지방산의 결합이 가능하며(3-5), 화학적 방법에 비해 낮은 온도와 압력에서의 반응에 따른 에너지 절감, 환경 친화적인 효소 촉매의 이용에 따른 부반응 저하 및 인체에 대한 안전성 확보 등의 이점을 가지고 있다(2,3,5).

건강에 대한 관심 증가 및 소비 경향의 변화에 따라, 오메가-3계 지방산 중 하나이며 혈액 내 중성지방 저하 및 cholesterol 수치 조절(HDL 증가) 등과 같이 유익한 생리적 영향을 주는 docosahexaenoic acid(DHA)의 이용을 통하여 기능성이 강화된 식품류가 주목을 받고 있는 추세이다(6,7). 이러한 DHA를 대부분 어류로부터 추출, 이용하였던 과거와 다르게 근래에는 조류로부터 획득하여 사용하는 경우가 증가하고 있는데, 본 연구에서 사용한 조류유(algae oil) 역시 다양한 연구를 통해 안전성이 입증된 미세조류(microalgae)인 *Schizochytrium* sp.로부터 유래된 것으로 DHA를 약 32-45% 함유하고 있다(8-10).

본 연구는 위의 조류유와 가정용 시장(식용유 소비)에서 70% 이상의 구성비를 차지하고 있는 대두유로부터 TAG의 *sn*-1,3 위치에서 특이적으로 작용하는 고정화 효소 Lipozyme RM IM (from *Rhizomucor miehei*, EC 3.1.1.3)을 이용한 glycerolysis 반응을 통하여 DHA와 DAG 및 MAG 함유 기능성 유지를 생성하였다(5,10,11). 유지 합성은 가연성, 독성 및 합성물로부터의 분리 등의 단점을 가지는 유기 용매에 비하여 공정의 간소화 및 식품의 안전성 문제 등에 장점이 있는 비 용매계(solvent-free system) 조건에서 수행하였으며(2,4,12), 재구성된 기능성 유지에 함유된 DAG와 MAG 수율 및 유지의 화학적 성질을 분석하였다.

*Corresponding author: Ki-Teak Lee, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture and Life Science, Chungnam National University, 220 Yusung-gu, Gung-dong, Daejeon 305-764, Korea
Tel: 82-42-821-6729
Fax: 82-42-822-6729
E-mail: ktleee@cnu.ac.kr

재료 및 방법

재료

본 연구에서는 Martek(Columbia, MD, USA)로부터 구입한 미세조류 *Schizochytrium* sp. 유래의 조류유(algae oil)와 시중(할인점, 대전, 유성)에 유통되고 있는 C사의 대두유를 사용하였다. 재구성지질 합성의 효소 촉매로 *Rhizomucor miehei*로부터 유래된 Lipozyme RM IM을 Novo Nordisk Biochem. North American Inc.(Franklinton, NC, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 분석 시 HPLC grade 용매를 사용하였다.

기능성 유지의 합성

기능성 유지의 합성을 위하여 Park 등(3)의 선행연구를 바탕으로 조류유와 대두유를 반응기질(각각 250 g)로 하고 Lipozyme RM IM(55 g, 11% by weight of total substrates)을 촉매로 한 interesterification을 통하여 회분식 반응기(65°C, 300 rpm, 15 hr)에서 재구성지질(SL-TAG)를 합성하였다(13). 탈산 과정을 거치지 않은 SL-TAG(250 g)와 glycerol(13 g; DC Chemical CO., Ltd. Korea)을 2 : 1(SL-TAG : glycerol) molar ratio(5)로 혼합하였으며, 다시 이를 반응기질로 이용, Lipozyme RM IM(12.5 g; SL-TAG의 5% 중량)에 의한 효소적 glycerolysis를 실시하였다(10). 반응은 impeller(길이, 9 cm; 폭, 3 cm)를 사용한 회분식 반응기(60°C, 300 rpm)의 비 용매계(solvent-free system) 조건하에서 총 48시간 동안 수행하였다(14). 반응 과정의 중성 지질 함량 및 지방산 조성의 변화를 알아보기 위하여 반응 시간(2, 6, 12, 24, 30, 48 hr) 별로 약 4 mL의 반응물을 vial(25 mL)에 취한 후 반응 억제제를 위해 PTFE syringe filter(25 mm, 0.2 µm, Whatman, USA)를 이용하여 효소를 제거하였으며, 소량의 반응물을 취한 후 반응기에 약 30분간 질소 충전하였다. 반응이 완료(48 hr)된 반응물은 Park 등(3)의 선행 연구를 따라 효소와 수분, 이물질 및 정제를 위해 사용한 hexane을 제거하여 기능성 유지를 획득하였다. 본 연구에서 얻어진 기능성 유지 및 각 반응물은 질소 충전 후 밀봉하여 -15°C 냉동고에 보관하면서 분석에 사용하였다.

지방산 조성 분석

조류유와 대두유 및 합성한 기능성 유지를 각각 100 mg씩 취하여 25 mL 시환관에 넣고 3 mL의 hexane(HPLC grade)과 혼합 후, 1 mL의 2N KOH(in methyl alcohol) 및 300 µL의 내부표준물질(heptadecanoic acid, 1 mg/mL in hexane)을 첨가하여 1분간 진탕하고 층 분리를 위하여 상온에서 약 25분간 방치하였다(15). Methylation 반응이 완료된 혼합물의 hexane층만 취하여 sodium sulfate anhydrous column(Junsei Chemical Co., Ltd. Japan)을 이용하여 수분과 이물질을 제거하였다. 이와 같은 전처리 후 얻어진 혼합물을 이용하여 GC(Hewlett-Packard 6890 series, Avondale, PA, USA)를 통한 지방산 조성 분석을 실시하였다(10). 분석은 FID(flame ionized detector, 260°C) 검출기와 supelcowaxTM-10(60 m×0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness, Bellefonte, PA, USA) column을 사용한 승온 분석(140°C: 1 min → 10°C/min → 220°C: 76 min)을 통하여 총 85분 동안 수행하였다. Carrier gas는 N₂(52.5 mL/min)를 사용하였고, injector 온도는 250°C로 유지시켰으며, 1 µL를 주입하여 지방산 분석을 실시하였다. Constant flow와 split(50 : 1)mode로 사용하였다.

한편, 반응 시간(2, 6, 12, 24, 30, 48 hr) 별로 취한 반응물에 함유된 DAG와 MAG의 지방산 조성을 알아보기 위해 반응물

(50 µL)을 hexane(1 mL)로 희석 후 TLC(thin-layer chromatography)를 실시하였다(14). 전개 용매(hexane: diethyl ether: acetic acid = 50 : 50 : 1, v/v)를 이용하여 전개가 완료된 TLC plate로부터 표준물질(1,2-diolein; 2-monoolein; Sigma, St. Louis, MO, USA)과 비교하여 R_f 값이 각각 0.25(DAG)와 0.03(MAG)인 부위를 취하였다. 얻어진 시료를 이용, 위와 같은 방법을 통하여 지방산 조성 분석을 수행하였다(16). 분석은 각각 2회 수행하였으며 분석치의 평균값을 결과에 제시하였다.

Pancreatic lipase analysis

조류유, 대두유 및 효소적 합성 반응(interesterification, glycerolysis)에 의하여 생성한 DAG, MAG 함유 기능성 유지의 triacylglycerol(TAG) 내 지방산의 위치(*sn*-2, *sn*-1,3) 별 분포를 알아보기 위하여 pancreatic lipase analysis를 실시하였다. 유지를 각각 7 mg씩 취하고 Cho와 Shin 등(10,14)이 이용한 방법을 따라 기질(TAG)의 *sn*-1,3에 특이적으로 작용하는 pancreatic lipase(from hog pancreas, Sigma, St. Louis, MO, USA)를 이용한 가수분해 반응을 시료당 2회 반복 실시하였다. 가수분해 반응 과정을 거친 시료를 위와 같은 TLC에 의하여 R_f 값이 0.03 (2-MAG)인 부위만을 취하고 methylation한 후 GC에 의하여 지방산 조성 분석을 실시하였으며, 결과의 평균값을 제시하였다.

Normal-phase HPLC

반응기질(조류유, 대두유)의 효소적 합성에 의하여 생성한 DAG 및 MAG 함유 기능성 유지와 반응 시간(2, 6, 12, 24, 30, 48 hr) 별로 취한 반응물의 중성 지질 함량 분석을 실시하였다(17). 분석에는 dual pump(SP930D, Younglin, Anyang, Korea)가 장착된 HPLC(Younglin Acme, Anyang, Korea)와 column으로 Hypersil BDS CPS column 5 µm(250×4.6 mm, Bellefonte, PA, USA)를 사용하였으며 검출기는 evaporative light scattering detector(ELSD, SEDEX Model 75, Sedere, Alfortville, France)를 사용하였다. 시료를 각각 30 µL씩 취하여 10 mL의 hexane에 희석, PTFE syringe filter(25 mm, 0.2 µm, Whatman, USA)로 여과하여 HPLC에 10 µL 주입하였다. 주입된 시료는 A(hexane : acetic acid = 100 : 0.4, v/v)용매와 B(methyl-t-butyl ether : acetic acid = 100 : 0.4, v/v)용매를 이동상으로 하여 유속 1 mL/min을 유지시킨 다음과 같은 기울기 용리를 통하여 분석되었다. 초기 5분간 100 : 0(A : B)으로 유지하다가 20 : 80(A : B)으로 15분까지 변화시킨 후 2분간 유지하다가 다시 100 : 0(A : B)으로 17.1분까지 변화시켜 27분까지 용매의 용리 상태를 유지하는 것으로 총 27분 동안 분석을 수행하였다. 분석된 시료는 40°C 및 2.2 bar(질소 유속)와 같은 ELSD의 검출 조건에서 검출되었으며, 결과로 크로마토그램과 시료당 2회씩 반복하여 실시함으로써 얻은 분석치의 평균값을 제시하였다.

화학적 성질과 색도 측정 및 통계분석

조류유 및 대두유와 이들을 원료로 하여 효소적 interesterification 및 glycerolysis 반응을 통하여 재구성된 DAG, MAG 함유 기능성 유지 사이의 화학적 성질 및 색도 차이를 알아보기 위하여 다음과 같은 분석을 각각 3회 반복하여 실시하였다. AOCS에 제시된 방법을 이용하여 각 유지의 불포화도를 나타내는 요오드가(iodine value)와 분자량을 설명하는 비누화값(saponification value) 및 유지 내 유리지방산의 함유 정도를 나타내는 산가(free fatty acid value)를 측정하였다(18). 또한, 유지들의 색도 분석을 통하여 Hunter L*(+/-, lightness/darkness) 값,

a*(+/-, redness/greenness) 값 및 b*(+/-, yellowness/blueness) 값을 측정하였으며, 측정에는 JC801 colorimeter(Color Techno System Corp. Tokyo, Japan)를 사용하였다(17). 색도 분석 결과의 평균값을 SAS program(statistical analysis system, version 8.01)의 Duncan's multiple range test를 이용하여 95% 신뢰구간 ($p < 0.05$)에서 통계분석을 통한 유의성 검정을 실시하여 결과에 제시하였다(19).

결과 및 고찰

지방산 조성 및 분포

효소적 합성에 의하여 생성한 DAG, MAG 함유 기능성 유지 및 반응기질로 사용한 조류유와 대두유의 지방산 조성 및 각 유지의 sn-2, sn-1,3 위치별 지방산 조성을 methylation을 수반한 GC 분석을 통하여 알아보았다(Table 1). 기능성 유지는 DHA(16.0 mol%)와 linoleic acid(32.4 mol%), palmitic acid(18.2 mol%), oleic acid(14.0 mol%), EPA(6.7 mol%) 및 myristic acid(4.9 mol%) 등을 함유하고 있었다. 이러한 함량을 반응기질과 비교한 결과, 기능성 유지의 myristic acid와 palmitic acid 각각의 함량이 조류유의 함량보다 약 21.6 mol% 감소한 약 23.1 mol%로 약 48%의 감소율을 나타내었으며, 반응기질로 사용된 대두유에는 함유되지 않은 DHA가 합성된 기능성 유지에서 확인되었다.

한편, triacylglycerol(TAG) 분자 내 위치에 따른 지방산 조성의 분포를 알아보기 위해서 실시한 pancreatic lipase analysis는 TAG 분자의 1,3-position에서 선택적으로 지방산을 가수분해시키고 sn-2 MAG는 남기는 pancreatic lipase를 이용한 가수분해 반응을 통하여 이루어졌다(20). 그 결과, TAG 분자의 sn-2 위치에서 효소적 합성 반응의 기질로 사용한 유지들의 경우 각각 DHA(조류유, 50.3 mol%), linoleic acid(대두유, 70.0 mol%)가 높은 함량으로 분포되어 있었으며, 재구성된 기능성 유지에서는 DHA(21.0 mol%)와 linoleic acid(29.2 mol%)가 높은 분포로 함유되어 있었다. 또한, pancreatic lipase에 의하여 가수분해된 TAG 분자 내 1,3-position의 지방산 조성을 알아보기 위하여 위의 결과(sn-2)값 및 Xu 등(21)이 제시한 계산식($sn-1,3(\%) = (3 \times \text{total fatty acid} - sn-2)/2$)을 이용, 계산하여 구하였다. 따라서 효소적 합성에 의하여 생성된 DAG, MAG 함유 기능성 유지의 TAG 분자 내 1,3-position에 위치한 지방산의 분포는 DHA(13.5

mol%), linoleic acid(33.9 mol%) 등과 같을 것으로 여겨진다. 이러한 결과는 일반적으로 TAG 분자의 sn-2 position에 위치한 fatty acyl groups이 TAG 분자의 sn-1,3 position에 위치하고 있는 유사한 fatty acyl groups보다 흡수 및 영양적·생리적 이용의 효율성이 높다는 Lee 등(16,20)의 연구 보고를 따를 것으로 사료된다.

반응 시간의 DAG 및 MAG의 지방산 조성

미세조류 *Schizochytrium* sp.로부터 유래된 조류유(algae oil)와 대두유를 Lipozyme RM IM(from *Rhizomucor meihe*)을 촉매로 이용한 glycerolysis를 통하여 생성된 기능성 유지에 함유된 DAG와 MAG 각각의 지방산 조성을 TLC를 선행한 GC 분석에 의하여 알아보았다(Table 2, 3). 합성 과정 중 반응 시간(2, 6, 12, 24, 30, 48 hr) 별로 취한 반응물에 함유된 DAG조성의 변화를 살펴보면, 포화 지방산인 myristic acid와 palmitic acid 함량이 2시간 반응 시 각각 7.0과 26.0 mol% 함량을 나타내다가 48시간 반응 완료 후 함량이 약 20-25%까지 감소된 각각 5.8, 20.0 mol%와 같이 반응 시간에 따라 감소하는 경향을 보였다. 반면, 고도의 불포화 지방산인 DHA와 EPA 함량은 각각 5.9와 3.2 mol%(2 hr)에서 함량이 약 2배 이상 증가된 13.3 및 5.5 mol%(48 hr)와 같이 반응 시간에 따라 증가하는 경향을 나타내었으며, 이외의 지방산 조성은 각 반응 시간에서 유사한 함량(48 hr-linoleic acid, 34.3; oleic acid, 13.2 mol%)을 보였다(Table 2).

한편, 효소적 합성 반응 동안 MAG의 지방산 조성 내 palmitic acid와 stearic acid의 함량은 반응 시간에 따라 다소 감소하는 경향을 보였으나, DHA와 EPA의 경우 반응 시간에 따라 다소 증가하는 경향을 나타내었다(Table 3). 따라서 48시간 반응 후 기능성 유지 내 MAG의 주요 지방산 조성은 DHA(8.6 mol%)와 linoleic acid(34.0 mol%), palmitic acid(23.9 mol%), oleic acid(15.1 mol%) 및 EPA(4.1 mol%) 등으로 조사되었다. 이와 같은 대부분의 지방산 조성 변화는 반응 후 6시간 동안 이루어진 것으로 보이나, 반응 완료 후 DHA와 EPA 함량의 경우 반응 후 24시간의 조성 및 유사한 결과를 나타내었다.

반응 시간에 따른 DAG 및 MAG 함량 변화

효소적으로 합성한 DAG, MAG 함유 기능성 유지의 중성 지질(free fatty acid, FFA; TAG; DAG; MAG) 함량과 합성 과정

Table 1. Fatty acid (FA) composition and distribution of algae oil, soybean oil and functional lipid¹⁾

(Unit: mol%)

Fatty acid	Algae oil			Soybean oil			Functional lipid		
	Total FA	sn-2	sn-1,3	Total FA	sn-2	sn-1,3	Total FA	sn-2	sn-1,3
14:0	13.3 ± 0.4 ²⁾	15.5 ± 1.0	12.2 ± 1.1	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.0	4.9 ± 0.0	4.7 ± 0.3	5.0 ± 0.1
16:0	31.4 ± 1.0	13.6 ± 1.8	40.3 ± 2.4	15.0 ± 0.6	1.0 ± 0.2	22.1 ± 0.8	18.2 ± 0.0	17.7 ± 0.3	18.4 ± 0.1
16:1	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.6 ± 0.3	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.1
18:0	0.6 ± 0.0	0.7 ± 0.4	0.6 ± 0.2	4.9 ± 0.3	0.4 ± 0.1	7.2 ± 0.4	2.2 ± 0.0	2.3 ± 0.1	2.2 ± 0.1
18:1	0.7 ± 0.0	1.0 ± 0.4	0.6 ± 0.2	28.1 ± 1.0	23.4 ± 0.1	30.4 ± 1.4	14.0 ± 0.0	13.4 ± 0.1	14.3 ± 0.0
18:2	0.4 ± 0.0	0.6 ± 0.1	0.3 ± 0.0	48.1 ± 1.5	70.0 ± 0.3	37.0 ± 2.1	32.4 ± 0.0	29.2 ± 0.6	33.9 ± 0.3
18:3	0.5 ± 0.1	nd ³⁾	0.8 ± 0.1	3.7 ± 0.4	5.0 ± 0.0	3.1 ± 0.6	3.7 ± 0.0	2.6 ± 0.0	4.2 ± 0.0
20:4	0.2 ± 0.0	nd	0.3 ± 0.01	nd	nd	nd	0.1 ± 0.0	nd	0.2 ± 0.0
20:5	3.2 ± 0.1	2.4 ± 0.1	3.7 ± 0.2	nd	nd	nd	1.4 ± 0.0	1.9 ± 0.0	1.2 ± 0.0
22:5	14.0 ± 0.4	15.4 ± 1.0	13.2 ± 0.0	nd	nd	nd	6.7 ± 0.0	6.8 ± 0.2	6.7 ± 0.1
22:6	35.1 ± 2.1	50.3 ± 2.9	27.4 ± 4.5	nd	nd	nd	16.0 ± 0.0	21.0 ± 0.4	13.5 ± 0.1

¹⁾DAG and MAG enriched oil synthesized by enzymatic glycerolysis for 48 hr. Other reaction conditions are in materials and methods.

²⁾Mean ± SD.

³⁾Not detected.

Table 2. Change in fatty acid composition of diacylglycerol (DAG)¹⁾ in functional lipid²⁾

(Unit: mol%)

Fatty acid	Reaction time (hr)					
	2	6	12	24	30	48
14:0	7.0 ± 0.1 ³⁾	6.5 ± 0.1	6.5 ± 0.1	5.9 ± 0.1	6.1 ± 0.5	5.8 ± 0.2
16:0	26.0 ± 0.1	25.2 ± 0.8	24.5 ± 0.6	22.5 ± 0.4	21.9 ± 1.0	20.0 ± 0.8
16:1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1
18:0	2.9 ± 0.1	3.0 ± 0.4	2.9 ± 0.2	2.5 ± 0.1	2.5 ± 0.5	2.2 ± 0.1
18:1	15.9 ± 0.1	15.7 ± 1.1	15.3 ± 0.8	14.3 ± 0.4	13.6 ± 1.5	13.2 ± 1.2
18:2	34.4 ± 0.1	33.9 ± 0.6	33.9 ± 0.5	33.2 ± 0.1	33.6 ± 0.7	34.3 ± 0.1
18:3	3.3 ± 0.1	3.4 ± 0.2	3.3 ± 0.2	3.5 ± 0.1	3.7 ± 0.4	3.7 ± 0.4
20:4	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.0
20:5	0.9 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.5 ± 0.2
22:5	3.2 ± 0.1	3.5 ± 0.3	3.8 ± 0.1	5.0 ± 0.1	5.0 ± 0.1	5.5 ± 0.1
22:6	5.9 ± 0.1	7.3 ± 1.1	8.2 ± 0.6	11.4 ± 0.4	11.8 ± 1.1	13.3 ± 1.1

¹⁾After TLC analysis, DAG was scraped, methylated, and analyzed by GC.²⁾DAG and MAG enriched oil synthesized by enzymatic glycerolysis. The reaction was performed for various reaction time (2, 6, 12, 24, 30, and 48 hr) with Lipozyme RM IM.³⁾Mean ± SD.**Table 3. Change in fatty acid composition of monoacylglycerol (MAG)¹⁾ in functional lipid²⁾**

(Unit: mol%)

Fatty acid	Reaction time (hr)					
	2	6	12	24	30	48
14:0	6.2 ± 0.4 ³⁾	6.2 ± 0.1	7.5 ± 2.1	6.0 ± 0.1	6.0 ± 0.1	6.0 ± 0.1
16:0	25.1 ± 0.2	24.7 ± 0.4	26.0 ± 2.1	24.0 ± 0.1	24.0 ± 0.3	23.9 ± 0.1
16:1	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1
18:0	3.4 ± 0.1	3.2 ± 0.1	2.9 ± 0.4	3.0 ± 0.1	2.9 ± 0.1	2.9 ± 0.0
18:1	15.9 ± 0.1	16.3 ± 0.1	15.2 ± 0.9	15.2 ± 0.1	15.1 ± 0.2	15.1 ± 0.1
18:2	34.2 ± 0.1	34.8 ± 0.3	32.3 ± 3.0	34.0 ± 0.1	34.0 ± 0.1	34.0 ± 0.1
18:3	3.5 ± 0.1	3.5 ± 0.1	3.1 ± 0.6	3.6 ± 0.1	3.6 ± 0.1	3.6 ± 0.1
20:4	nd ⁴⁾	nd	nd	nd	nd	nd
20:5	1.5 ± 0.2	1.2 ± 0.1	1.9 ± 0.7	1.4 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.5 ± 0.1
22:5	3.4 ± 0.1	3.0 ± 0.1	3.6 ± 0.5	3.9 ± 0.1	4.0 ± 0.3	4.1 ± 0.1
22:6	6.4 ± 0.1	6.8 ± 0.1	7.2 ± 0.4	8.6 ± 0.1	8.6 ± 0.0	8.6 ± 0.1

¹⁾After TLC analysis, MAG was scraped, methylated, and analyzed by GC.²⁾DAG and MAG enriched oil synthesized by enzymatic glycerolysis. The reaction was performed for various reaction time (2, 6, 12, 24, 30, and 48 hr) with Lipozyme RM IM.³⁾Mean ± SD.⁴⁾Not detected.

중(2, 6, 12, 24, 30, 48 hr) 취한 반응물 내의 DAG 및 MAG 함량 변화를 살펴보았다(Fig. 1, 2). 효소적 glycerolysis 반응을 완료(48 hr) 후 총 지질 내 약 60%의 DAG 및 MAG를 함유하는 기능성 유지는 19.2 area%의 1,3-DAG와 22.2 area%의 1,2-DAG, 16.0 area%의 MAG 및 TAG(42.3 area%), FFA(0.2 area%)와 같은 중성 지질로 구성되어 있었으며(Fig. 1), 이는 Park 등(3)의 연구 결과와 유사하였다. 한편, 반응 시간에 따른 중성 지질 함량의 변화를 살펴본 결과, 효소 반응 6시간에서 TAG의 함량이 44.3 area%로 반응 후 약 50% 감소함에 따라 1,3-DAG와 1,2-DAG 및 MAG 함량은 이외의 반응 시간에서 보다 크게 증가하는 경향을 나타내었다. 또한 반응 후 약 12시간 이후 TAG나 MAG 함량의 변화가 안정화된 반면, 1,3-DAG의 함량은 다소 증가함에 따라 반응 24시간 이후 1,2-DAG 함량이 다소 감소하는 경향을 보였으며 이러한 함량 변화는 반응 30시간 후 안정화되었다(Fig. 2). 이와 같은 변화는 기능성 유지 합성 반응 중 글리세롤 분자와 TAG 형태 유지 사이의 효소 작용에 의한 acyl groups의 상호 교환에 기인된 것으로 사료된다

(22). 일반적으로 DAG는 흡수 후 체내에서 소장 상피 세포에서 TAG(chylomicron)로의 재합성이 일어나지 않고 혈액에 의해 간문맥을 거쳐 간으로 이송되고 β-산화통하여 빠른 에너지원으로 사용되며 체내에 축적되지 않는 것과 같이 TAG와는 다른 대사 과정을 거친다(23,24). 따라서 본 연구에서 생성된 DAG 역시 위와 같은 대사 과정을 통하여 체중 조절 및 개선 등과 같은 생리 효과를 보일 것으로 사료된다(1,3).

화학적 성질 및 색도 분석

효소적 glycerolysis 반응에 의하여 합성한 DAG 및 MAG 함유 기능성 유지와 반응기질(조류유, 대두유)의 화학적 성질(iodine, saponification and free fatty acid values)과 Hunter color 체계에 근거한 색도 분석을 수행하였다(Table 4). 합성된 기능성 유지의 불포화도를 나타내는 요오드기는 반응기질인 조류유(274.0)의 값보다 약 24% 낮지만 대두유(131.0)보다는 약 60% 높은 값인 208.8로 측정되었다. 반면에 유지의 분자량을 설명하는 비누화가는 179.6으로 조류유와 유사한 값을 가지는 것으로 측정되었

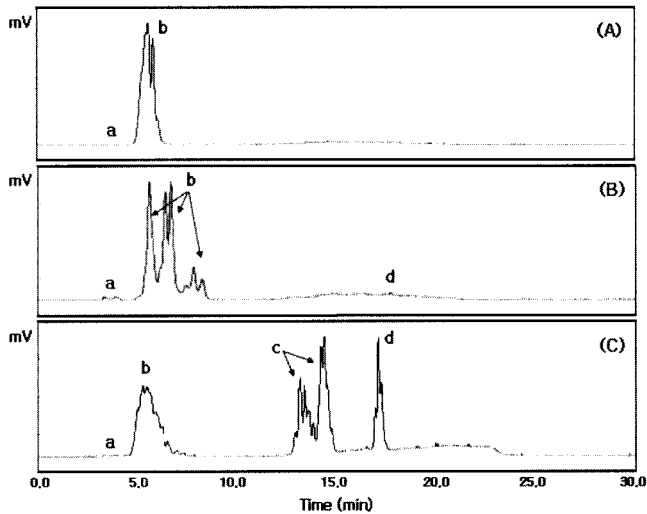


Fig. 1. Chromatograms from the normal-phase HPLC separation of (A) algae oil, (B) soybean oil, and (C) functional lipid (DAG and MAG enriched oil synthesized by enzymatic glycerolysis) after Hypersil BDS CPS column chromatography.

(C) functional lipid: a-free fatty acid (FFA; 0.2 area%), b-triacylglycerol (TAG; 42.3 area%), c-diacylglycerol (1,3-DAG; 19.2 area% and 1,2-DAG; 22.2 area%), d-monoacylglycerol (MAG; 16.0 area%).

다. 이러한 결과는 TAG 분자 내 *sn*-1,3 반응 위치 특이성을 갖는 Lipozyme RM IM을 이용한 합성 반응 과정에서 고도의 불포화 지방산인 DHA를 32-45% 정도 함유하고 있는 조류유와 대두유 내 글리세롤 분자에 결합된 지방산들의 효소 작용을 통한 선택적 교환에 기인된 것으로 사료된다(10,25). 합성된 기능성 유지의 산가는 3.4이하로 반응기질(<0.3)의 값보다 높게 측정되었는데, 이는 합성 및 정제 과정에서 DAG, MAG의 수율을 높이기 위한 탈산 공정의 생략으로 효소 반응 시 생성 가능한 유리 지방산의 잔존에 의한 것으로 여겨진다. 따라서 본 연구의 최종 생성물인 DAG, MAG 함유 기능성 유지 내 잔류하는 유리 지방산을 제거함으로써 산가를 낮출 수 있는 정제 과정이 필요할 것으로 사료된다(3). 한편, 색도 분석을 통한 기능성 유지의 Hunter L*(+/-, lightness/darkness) 및 a*(+/-, redness/ greenness) 값이 각각 77.9(조류유, 70.5; 대두유, 93.5)와 15.9(조류유, 26.0; 대두유, -2.5)로 측정되었으며, b*(+/-, yellowness/blueness) 값은 54.6으로 비교된 유지(조류유, 49.4; 대두유, 11.3) 중 유의적으로 가장 높은 값을 가지는 것으로 조사되었다($p < 0.05$).

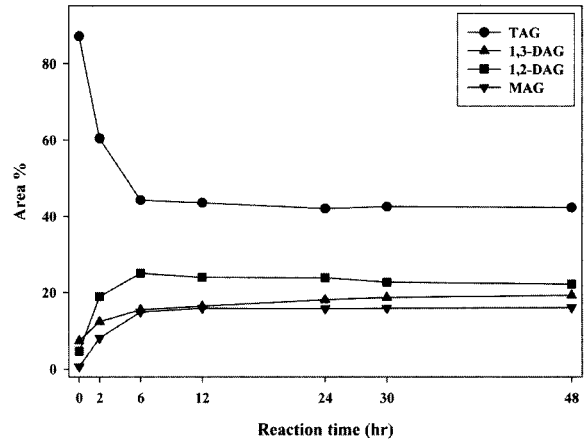


Fig. 2. Change in contents of triacylglycerol (TAG), diacylglycerol (1,3- and 1,2-DAG), and monoacylglycerol (MAG) in functional lipid at different reaction times.

Bars represent standard error.

요 약

지방산 TAG 분자의 *sn*-1,3 위치에서 특이적으로 반응하는 Lipozyme RM IM(from *Rhizomucor meihei*)을 촉매로 이용, 비용매계(solvent-free system) 조건에서 glycerolysis를 통하여 조류유(from *Schizochytrium* sp.)와 대두유로부터 DAG, MAG 함유 기능성 유지를 합성하였다. 합성된 유지는 DHA(16.0 mol%)와 linoleic acid(32.4 mol%), palmitic acid(18.2 mol%), oleic acid(14.0 mol%), EPA(6.7 mol%) 및 myristic acid(4.9 mol%) 등을 함유하고 있었으며, 유지 내 TAG 분자의 *sn*-2 위치에는 DHA(21.0 mol%)와 linoleic acid(29.2 mol%)가 높은 분포로 함유되어 있었다. 48시간의 효소 반응 후 DAG의 지방산 조성은 DHA(13.3 mol%)와 linoleic acid(34.3 mol%), palmitic acid(20.0 mol%), oleic acid(13.2 mol%), myristic acid(5.8 mol%) 및 EPA(5.5 mol%) 등으로 조사되었고, MAG의 경우는 DHA(8.6 mol%)와 linoleic acid(34.0 mol%), palmitic acid(23.9 mol%), oleic acid(15.1 mol%) 및 EPA(4.1 mol%) 등으로 분석되었다. 효소적 glycerolysis 반응 완료(48 hr) 후 총 지질 내 약 60%의 DAG 및 MAG를 함유하는 기능성 유지는 19.2 area%의 1,3-DAG와 22.2 area%의 1,2-DAG, 16.0 area%의 MAG 및 TAG(42.3 area%), FFA(0.2 area%)와 같은 중성 지질로 구성되어 있었다. 이러한 기능성 유지의 요오드가는 208.8, 비누화가는 179.6으로 측정되

Table 4. Chemical characteristics and the Hunter color L*, a*, b* values of algae oil, soybean oil and functional lipid¹⁾

	Algae oil	Functional lipid	Soybean oil
Chemical characteristics			
Iodine value	274.0 ± 1.4 ²⁾	208.8 ± 4.5	131.0 ± 0.5
Saponification value	179.6 ± 0.0	179.6 ± 0.0	190.8 ± 0.0
Free fatty acid value (%)	<0.3 ± 0.0	<3.4 ± 0.0	<0.3 ± 0.0
Hunter color			
L* value	70.5 ± 0.1 ³⁾	77.9 ± 0.2 ^b	93.5 ± 0.9 ^a
a* value	26.0 ± 0.2 ^a	15.9 ± 0.0 ^b	-2.5 ± 0.1 ^c
b* value	49.4 ± 0.0 ^b	54.6 ± 0.1 ^a	11.3 ± 0.3 ^c

¹⁾DAG and MAG enriched oil synthesized by enzymatic glycerolysis. Other reaction conditions are in materials and methods.

²⁾Mean ± SD.

³⁾Values within a row with different superscript alphabet are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

었으며, 산가(조류유, 대두유; <0.3)는 3.4이하를 나타내어 합성 중 생성, 잔류 가능한 유리 지방산 제거(산가 저하)를 위한 정제 과정이 필요할 것으로 사료된다. 또한, 기능성 유지는 Hunter L*(+/-, lightness/darkness; 77.9), a*(+/-, redness/greenness; 15.9) 및 b*(+/-, yellowness/blueness; 54.6)와 같은 색도를 나타내었다.

감사의 글

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

문 헌

- Maki KC, Davidson MH, Tsushima R, Matsuo N, Tokimitsu I, Umporowicz DN, Dicklin MR, Foster GS, Ingram KA, Anderson BD, Frost SD, Bell M. Consumption of diacylglycerol oil as part of a reduced-energy diet enhances loss of body weight and fat in comparison with consumption of a triacylglycerol control oil. *Am. J. Clin. Nutr.* 76: 1230-1236 (2002)
- Watanabe T, Sugiura M, Sato M, Yamada N, Nakanishi K. Diacylglycerol production in a packed bed bioreactor. *Process Biochem.* 40: 637-643 (2005)
- Park RK, Lee KT. Synthesis and characterization of mono- and diacylglycerol enriched functional oil by enzymatic glycerolysis of corn oil. *Korean J. Food Sci. Technol.* 36: 211-216 (2004)
- Rosu R, Yasui M, Iwasaki Y, Yamane T. Enzymatic synthesis of symmetrical 1,3-diacylglycerols by direct esterification of glycerol in solvent-free system. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76: 839-843 (1999)
- Noureddini H, Harmeier SE. Enzymatic glycerolysis of soybean oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75: 1359-1365 (1998)
- Lee HA, Yoo IJ, Lee BH. Research and development trends on omega-3 fatty acid fortified foodstuffs. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 26: 161-174 (1997)
- Horrocks LA, Yeo YK. Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). *Pharmacol. Res.* 40: 211-225 (1999)
- 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)
- Tonon T, Harvey D, Larson TR, Graham IA. Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae. *Phytochemistry* 61: 15-24 (2002)
- Cho EJ, Lee JH, Lee KT. Optimization of enzymatic synthesis condition of structured lipids by response surface methodology. *Korean J. Food Sci. Technol.* 36: 531-536 (2004)
- A Food Distribution Yearbook. *Food Journal*, Seoul, Korea. pp. 292-299 (2002)
- Yesiloglu Y. Immobilized lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 81: 157-160 (2004)
- Akoh CC, Min DB. Structured Lipids, pp. 877-908. In: *Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology*. Akoh CC, Min DB. (eds). Marcel Dekker Inc., New York, USA (2002)
- Shin JA, Lee KT. Lipase-catalyzed synthesis of structured lipids with capric and conjugated linoleic acid in a stirred-batch type reactor. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 33: 1175-1179 (2004)
- Alonso L, Fraga MJ, Juarez M. Determination of *trans* fatty acids and fatty acid profiles in margarines marketed in Spain. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77: 131-136 (2000)
- Lee KT, Foglia TA. Synthesis, purification, and characterization of structured lipids produced from chicken fat. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77: 1027-1034 (2000)
- Lee JH, Shin JA, Lee JH, Lee KT. Production of lipase-catalyzed structured lipids from safflower oil with conjugated linoleic acid and oxidation studies with rosemary extracts. *Food Res. Int.* 37: 967-974 (2004)
- AOCS. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society. 4th ed. American Oil Chemists' society, Chicago, IL, USA. Ca 5s-40, Cd 1-25, Cd 3-25 (1990)
- SAS Institute, Inc. SAS/STAT User's guide. Release 8.01, Statistical Analysis Systems Institute, Cary, NC, USA (2000)
- Lee KT, Akoh CC. Immobilized lipase-catalyzed production of structured lipids with eicosapentaenoic acid at specific positions. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73: 611-615 (1996)
- Xu X, Fomuso LB, Akoh CC. Synthesis of structured triacylglycerols by lipase-catalyzed acidolysis in a packed bed bioreactor. *J. Agric. Food Chem.* 48: 3-10 (2000)
- Willis WM, Marangoni AG. Enzymatic interesterification, pp. 839-875. In: *Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology*. Akoh CC, Min DB. (eds). Marcel Dekker Inc., NY, USA (2002)
- Yamamoto K, Asakawa H, Tokunaga K, Meguro S, Watanabe H, Tokimitsu I, Yagi N. Effects of diacylglycerol administration on serum triacylglycerol in a patient homozygous for complete lipoprotein lipase deletion. *Metab. Clin. Exp.* 54: 67-71 (2005)
- Insel P, Turner RE, Ross D. Nutrition. Jones and Bartlett Publishers, London, UK. pp. 136-177 (2001)
- Lee JH, Jones KC, Lee KT, Kim MR, Foglia TA. High-performance liquid chromatographic separation of structured lipids produced by interesterification of macadamia oil with tributyrin and tricaprylin. *Chromatographia* 58: 653-658 (2003)

(2005년 5월 12일 접수; 2005년 6월 24일 채택)