

회분식 반응기를 이용한 DHA 함유 재구성지질의 효소적 합성 및 이화학적 특성 분석

김남숙 · 이기택[†]

충남대학교 식품공학과

Analysis and Enzymatic Production of Structured Lipids Containing DHA Using a Stirred-Batch Type Reactor

Nam-Sook Kim and Ki-Teak Lee[†]

Dept. of Food Science and Technology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Abstract

Structured lipid (SL) was synthesized by enzymatic interesterification with algae oil containing docosa-hexaenoic acid (DHA) and soybean oil in the stirred-batch type reactor. The reaction was performed for 15 hr at 65°C with 300 rpm catalyzed by *sn*-1,3 specific Lipozyme RM IM lipase from *Rhizomucor miehei* (11% by weight of total substrates) in the absent organic solvent. SL contained 87.1 area% triacylglycerol (TAG), 12.1 area% diacylglycerol (DAG), 0.6 area% monoacylglycerol (MAG), and 0.2 area% free fatty acid (FFA). Major fatty acid profiles of SL were DHA (15.7 mol%), linoleic (31.1 mol%), palmitic (20.2 mol%), oleic (13.5 mol%) and eicosapentaenoic acid (EPA, 6.6 mol%). SL contained the newly synthesized several peaks. Iodine and saponification of SL were 206.7 and 183.8. SL color showed darker and redder than soybean oil, and appeared the most yellowish color among SL, soybean, and algae oil.

Key words: structured lipids, algae oil, docosahexaenoic acid, *Rhizomucor miehei*, interesterification

서 론

Docosahexaenoic acid(DHA)는 eicosapentaenoic acid (EPA) 및 α -linolenic acid와 함께 오메가-3계 지방산에 속하며, serum triacylglycerides 및 LDL-cholesterol의 함량을 낮추고 HDL-cholesterol 수치를 높임으로써 동맥경화 및 혈전증 등과 같은 심혈관계 질환의 예방에 효과가 있는 것으로 보고되고 있다(1-3). 또한 DHA는 두뇌, 신경계 및 안구 조직에 필수적인 지방산으로 특히 유아의 시력 및 운동능력 개발 등에 중요한 요소이다(3,4). 이러한 오메가-3계 고도불포화지방산은 고등어, 콩치 등과 같은 등푸른 생선으로부터 추출하여 산업적으로 이용하고 있으나, 어유 특유의 불쾌취 및 특정 지방산의 비율조절의 어려움 등과 같은 단점을 가지고 있다(5,6). 따라서 이의 대안으로 미세조류 등으로부터의 DHA를 비롯한 오메가-3계 지방산 생산이 시도되고 있으며 생산된 조류유의 다양한 연구를 통한 안정성 입증이 이루어지고 있다(5,7,8).

또한, 최근 기능성이 강화된 식품류 개발에 대한 연구 및 소비의 활성화에 따라 오메가-3계 지방산의 기능성 응용에 대한 관심이 증가하고 있으며, 성인 사망의 우세한 원인질환인

심혈관질환의 예방과 치료에 잠재적 효과를 얻고자하는 요구에 따라 EPA나 DHA를 다양한 식물성유에 화학적 혹은 효소적으로 결합시키는 다양한 연구가 진행되고 있다(6,9,10).

위와 같은 연구는 유지를 TAG 분자 내에서 화학적 또는 효소적 촉매에 의한 반응을 통한 결합 및 교환에 의하여 지방산 조성 또는 위치를 변화시켜 유지의 물리·화학·영양학적 특성을 개선시키기 위해 합성하는 재구성지질(structured lipid)로의 합성을 통하여 주로 이루어진다(11-13). 효과적인 반응을 위한 촉매로는 대량의 에너지 소비 및 인체에 유해한 부산물의 제거가 요구되는 화학적 촉매보다 lipase의 반응 위치 특이성을 이용하여 TAG의 에스테르 결합을 가수분해 및 재결합하며 환경 친화적인 효소적 촉매의 이용이 증가하고 있는 추세이다(13-16).

본 연구에서는 미세조류(microalgae)인 *Schizochytrium* sp.로부터 유래되어 DHA를 32~45% 함유하고 있는 조류유와 linoleic 및 oleic acid가 유지 조성의 약 80%를 차지하는 식물성 유지인 대두유를 기질로 하여 효소적인 interesterification에 의해 재구성지질을 회분식 반응기에서 합성하였으며, 합성된 재구성지질의 이화학적 특성을 분석하여 반응 기질인 조류유 및 대두유의 특성분석 결과와 비교하였다. 합

[†]Corresponding author. E-mail: ktleee@cnu.ac.kr
Phone: 82-42-821-6729, Fax: 82-42-822-6729

성 시 사용된 효소적 촉매는 *Rhizomucor miehei*(EC 3.1.1.3)에서 유래한 Lipozyme RM IM이며, 이는 기질(TAG)의 sn-1,3 위치에 특이적으로 작용하는 macroporous anion exchange resin에 고정화된 효소이다(5,14).

재료 및 방법

재료

재구성지질의 합성에 사용된 조류(algae)유는 *Schizochytrium* sp.로부터 유래된 것으로 Martek Biosciences Corporation(Columbia, MD, USA)로부터 구입하였으며, 대두유(C사)는 대전시 유성구에 위치한 대형 할인점(E사)에서 구입하였다. Interesterification을 통한 재구성지질 합성에 쓰여진 고정화 효소 Lipozyme RM IM은 Novo Nordisk Biochem. North American Inc.(Franklinton, NC, USA)에서 구입하였다. 합성된 유지는 질소 충전 후 밀봉된 상태로 -15°C의 냉동고에 보관하며 본 실험에서 사용하였다.

회분식 반응기를 이용한 재구성지질의 효소적 합성

본 실험에서 재구성지질은 조류유(250 g)와 대두유(250 g)를 1:1 비율(wt/wt)로 혼합한 유지를 기질로 하고(5), 총 기질의 11%(55 g) 정도의 triacylglycerol(TAG)의 sn-1,3 위치에 작용하는 효소인 Lipozyme RM IM을 이용한 interesterification으로 용매 부재 상태에서 합성하였다(12). 반응은 Shin과 Lee(17)의 선행연구를 바탕으로 65°C, 300 rpm의 회분식 반응기에서 15시간 동안 실시하였으며, 효과적인 효소반응을 위해 반달 모양의 길이 9 cm, 폭 3 cm인 impeller를 반응기에 장착하여 수행하였다. 반응이 완료된 시료는 여과에 의한 효소 제거로 반응 시간 이외의 반응을 억제시켰으며, sodium sulfate anhydrous(Junsei Chemical Co., Ltd., Japan) column과 감압농축기(EYELA, N-1000, Japan)를 이용하여 정제 및 농축한 후, 질소 주입을 통해 정제 과정 중 사용된 n-hexane을 제거하였다.

또한, 탈산과정을 통하여 재구성지질 합성 과정 중 생성 가능한 유리지방산을 제거하였다(10,18). 분별깔대기(1 L)를 이용하여 반응물을 n-hexane(300 mL), 95% ethanol(200 mL), phenolphthalein(0.5 g/50 mL of 95% ethanol) 용액 3~4 drop과 함께 혼합한 후, 0.5 N KOH(in 20% ethanol) 용액(120 mL)로 적정하였다. 진탕을 통해 혼합액이 두층으로 분리되면 상(hexane)층만 분리하여 sodium sulfate anhydrous column를 통과시켜 잔존하는 수분 및 불순물을 제거하고 감압농축기와 증발을 수반한 질소 주입을 통해 용매(n-hexane)가 제거된 합성물을 얻었다.

지방산 조성 분석

합성된 재구성지질 및 조류유와 대두유의 지방산 조성 분석을 위하여 methylation을 수반한 GC(Hewlett-Packard 6890 series, Avondale, PA, USA)분석을 실시하였다. Meth-

ylation은 Alonso 등(19)의 방법에 따라 시료(100 mg)를 취하여 hexane(3 mL, HPLC grade) 및 2 N KOH(in methyl alcohol, 1 mL)와 혼합하였다. 혼합물에 내부표준물질인 heptadecanoic acid(1 mg/mL in hexane, 300 µL)를 가하고 1분간 충분히 진탕하여 20~30분 동안 상온에서 방치 후 상(hexane)층만 취하였다. Methylation을 통해 얻어진 methyl ester 형태의 지방산은 fused-silica capillary column인 supelcowaxTM-10(60 m×0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness, Bellefonte, PA, USA)과 flame ionized detector(FID, 260°C)를 장착한 GC로 분석하였다. Cho 등(5)이 제시한 GC 분석 방법에 의거하여 column oven 온도를 초기 140°C(1 min)에서 220°C(76 min)까지 승온(10°C/min)시켜 총 85분 동안 분석하였다. 이동상으로 N₂(52.4 mL/min)을 사용하여 시료 당 2회 분석하였고, 내부표준물질(heptadecanoic acid, Sigma, St. Louis, MO, USA)을 기준으로 계산하여 평균값(mol%)을 제시하였다.

Pancreatic lipase에 의한 위치별 지방산 조성

재구성지질과 반응기질(조류유, 대두유)의 sn-2 및 sn-1,3 위치에 따른 지방산 조성 비교를 위하여 pancreatic lipase(from hog pancreas, Sigma, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 가수분해하였다(5,17). 조류유와 대두유 및 재구성지질을 각각 7 mg 취하고 1 M Tris-HCl buffer(pH 7.6) 7 mL, 0.05% 담즙산염 용액 1.75 mL 및 2.2% CaCl₂ 용액 0.7 mL과 pancreatic lipase 7 mg를 가하였다. 혼합물을 30초 진탕 후 pancreatic lipase의 효과적인 반응을 위해 3분 가온(37°C), 30초 진탕을 3~4회 반복한 후 diethyl ether(2 mL)를 첨가하여 상(diethyl ether)층만 분리하였다. 분리된 상정액을 TLC silica plate(10×20 cm, Merck, Germany)와 부피비 전개용매(hexane : diethyl ether : acetic acid = 50:50:1)를 이용하여 TLC tank 내에서 전개시켰다(17). 표준물질 2-monoolein(Sigma, St. Louis, MO, USA)의 R_f 값과 비교하여 전개가 완료된 TLC silica plate로부터 R_f 값이 0.03(2-MAG)인 부위만 취하여 위의 지방산 조성 분석과 같은 방법으로 sn-2 위치의 지방산 조성을 분석하였다. sn-1,3 위치의 지방산 조성은 Xu 등(20)이 제시한 계산식(sn-1,3(%))=(3TAG-sn-2)/2에 준하여 구하였으며, TAG는 위에서 구한 유지 전체의 지방산 조성 각각의 함량을 의미한다.

Normal-phase HPLC 분석

재구성지질과 효소적 합성에 사용된 반응기질인 조류유 및 대두유의 중성지질(triacylglycerol, TAG; diacylglycerol, DAG; monoacylglycerol, MAG; free fatty acid, FFA) 조성을 비교하기 위하여 normal-phase HPLC 분석을 실시하였다. Vial(25 mL)에 유지를 각각 30 µL 취하여 hexane(HPLC grade) 10 mL에 희석하고 PTFE syringe filter(25 mm, 0.2 µm, Whatman, USA)를 이용하여 여과시켰다. 여과된 시료(10 µL)를 dual pump(SP930D, Younglin, Anyang,

Korea)가 장착된 HPLC(Younglin Acme, Anyang, Korea)에 주입, Hypersil BDS CPS column 5 μ (250 \times 4.6 mm, Bellefonte, PA, USA)을 사용하여 evaporative light scattering detector(ELSD, SEDEX Model 75, Sedere, Alfortvill, France)의 40°C, 2.2 bar(질소 유속) 조건 하에서 검출하였다. 1 mL/min 유속 및 기울기 용리에 사용된 이동상은 각각 0.4%의 acetic acid를 포함시킨 hexane과 methyl *t*-butyl ether(MTBE)이며, 기울기 용리 프로그램은 다음과 같다. Hexane/MTBE(100:0, v/v)로 초기 5분 동안 유지시키고 15분까지 hexane/MTBE(20:80, v/v)로 변화시켜 2분 동안 유지시켰으며, 0.1분 간 hexane/MTBE(100:0, v/v)로 변화시킨 후 9.9분 동안 유지시켜 총 27분 동안 분석하였다(18).

Reversed-phase HPLC 분석

조류유와 대두유로부터 효소적 합성에 의해 생성된 재구성지질 내 새로운 TAG 형태를 반응기질과의 비교를 통한 분리를 위하여 유지들의 reversed-phase(RP) HPLC 분석을 실시하였다. Vial(25 mL)에 유지(50 μ L)를 취하여 acetone(10 mL, HPLC grade)에 희석, 내부표준물질(Sigma, St. Louis, MO, USA)로 tributyrin(30 μ L)을 첨가 후 PTFE syringe filter를 이용하여 여과하였다. 분석은 SP930D dual pump가 장착된 Younglin HPLC와 Nova-Pak C₁₈ 60Å 4 μ m(3.9 \times 150 mm, Milford, DW, USA) column 및 ELSD(40°C, 질소 유속; 2.2 bar) 검출기를 사용하였다. Acetone과 acetonitrile을 기울기 용리의 용매로써 0.5 mL/min 유속으로 사용하였으며 다음과 같은 용리 프로그램을 수행하였다. Acetone/acetonitrile(60:40, v/v)로 초기 10분 간 유지시키고 10분 동안 acetone/acetonitrile(100:0, v/v)로 변화시켜 5분 간 유지시켰으며, 다시 5분 동안 acetone/acetonitrile(60:40, v/v)로 변화시킨 후 10분 간 유지시키는 것으로 시료(10 μ L 주입) 당 40분의 분석시간이 소요되었다. Tributyrin(C4:0), tricaprylin(C8:0), trilaurin(C12:0), trimyristin(C14:0), tri-palmitin(C16:0), triolein(C18:1) 및 trilinolein(C18:2)을 외부

표준물질(Sigma, St. Louis, MO, USA)로 사용, 분석 후, 이를 이용한 외부표준검정곡선으로부터 retention time(RT)과 partition number(PN) 사이의 관계식을 구하여 결과에 활용하였다(5,21). PN은 Lee와 Ruiz-Gutierrez 등(21,22)이 제시한 계산식(PN=CN-2ND)에 준하여 구하였으며, CN(total number of carbons)은 TAG의 총 탄소수를, ND(total number of double bonds)는 총 이중결합수를 의미한다.

요오드가, 비누화가, 산가 및 색도 분석

회분식 반응기를 이용하여 효소에 의해 합성한 재구성지질과 반응기질(조류유, 대두유)의 화학적 성질을 알아보기 위하여 요오드가, 비누화가, 산가를 측정하였으며 이는 AOCS에 제시된 방법에 준하여 각각 3회 측정하였다(23). 유지들의 색도 분석은 JC801 colorimeter(Color Techno System Corp., Tokyo, Japan)를 이용하여 Hunter 체계 L*(\pm , lightness/darkness), a*(\pm , redness/greenness) 및 b*(\pm , yellowness/blueness) 값을 각각 3회 반복하여 측정하였으며 분석치를 통계 처리하였다(18). 결과의 통계 분석은 SAS program(statistical analysis system, version 8.01)을 이용하여 Duncan's multiple range test로 95% 신뢰구간 및 p<0.05 수준에서 유의성을 검정하였다(24).

결과 및 고찰

조류유, 대두유 및 재구성지질의 지방산 조성 연구

합성한 재구성지질과 반응기질로 사용한 조류유 및 대두유의 지방산 조성과 위치에 따른 지방산 조성 분포를 분석하여 비교하였다(Table 1). 반응기질로 사용된 조류유는 고도의 불포화 지방산인 DHA(C22:6, 35.1 mol%), EPA(C22:5, 14.0 mol%) 및 palmitic acid(C16:0, 31.4 mol%)와 myristic acid(C14:0, 13.3 mol%)를 주요 지방산으로 함유하고 있으며, 대두유는 linoleic acid(C18:2, 48.1 mol%), oleic acid(C18:1, 28.1 mol%) 및 palmitic acid(15.0 mol%)가 주요 구성을 이루

Table 1. Fatty acid (FA) composition of algae oil, soybean oil, and structured lipid¹⁾ (Unit: mol%)

Fatty acid	Algae oil			Soybean oil			Structured lipid		
	Total FA	<i>sn</i> -2	<i>sn</i> -1,3	Total FA	<i>sn</i> -2	<i>sn</i> -1,3	Total FA	<i>sn</i> -2	<i>sn</i> -1,3
14:0	13.3 \pm 0.4 ²⁾	15.5 \pm 1.0	12.2 \pm 1.1	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	5.1 \pm 0.1	5.1 \pm 0.1	5.1 \pm 0.1
16:0	31.4 \pm 1.0	13.6 \pm 1.8	40.3 \pm 2.4	15.0 \pm 0.6	1.0 \pm 0.2	22.1 \pm 0.8	20.2 \pm 0.1	17.9 \pm 0.1	21.3 \pm 0.1
16:1	0.6 \pm 0.1	0.5 \pm 0.2	0.6 \pm 0.3	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1
18:0	0.6 \pm 0.1	0.7 \pm 0.4	0.6 \pm 0.2	4.9 \pm 0.3	0.4 \pm 0.1	7.2 \pm 0.4	2.5 \pm 0.1	2.2 \pm 0.1	2.6 \pm 0.1
18:1	0.7 \pm 0.1	1.0 \pm 0.4	0.6 \pm 0.2	28.1 \pm 1.0	23.4 \pm 0.1	30.4 \pm 1.4	13.5 \pm 0.1	12.7 \pm 0.1	13.9 \pm 0.1
18:2	0.4 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	48.1 \pm 1.5	70.0 \pm 0.3	37.0 \pm 2.1	31.1 \pm 0.1	29.8 \pm 0.1	31.8 \pm 0.1
18:3	0.5 \pm 0.1	nd ³⁾	0.8 \pm 0.1	3.7 \pm 0.4	5.0 \pm 0.1	3.1 \pm 0.6	3.5 \pm 0.1	2.8 \pm 0.1	3.9 \pm 0.1
20:4	0.2 \pm 0.1	nd	0.3 \pm 0.1	nd	nd	nd	0.1 \pm 0.1	nd	0.2 \pm 0.1
20:5	3.2 \pm 0.1	2.4 \pm 0.1	3.7 \pm 0.2	nd	nd	nd	1.4 \pm 0.1	1.3 \pm 0.1	1.5 \pm 0.1
22:5	14.0 \pm 0.4	15.4 \pm 1.0	13.2 \pm 0.1	nd	nd	nd	6.6 \pm 0.1	6.8 \pm 0.1	6.5 \pm 0.1
22:6	35.1 \pm 2.1	50.3 \pm 2.9	27.4 \pm 4.5	nd	nd	nd	15.7 \pm 0.1	21.1 \pm 0.1	12.9 \pm 0.1

¹⁾Structured lipid was synthesized by enzymatic interesterification of algae oil and soybean oil in a stirred-batch type reactor.

²⁾Mean \pm SD.

³⁾Not detected.

는 것으로 분석되었다. 재구성지질의 경우, 15.7 mol%의 DHA와 6.6 mol%의 EPA 및 linoleic acid 31.1 mol%와 oleic acid 13.5 mol%가 주요 지방산이었다. 또한 포화지방산인 palmitic acid와 myristic acid가 반응기질로 사용한 조류유보다 약 43% 감소된 함량을 가지는 것으로 분석되었는데, 이는 interesterification 합성과정 중 대두유 TAG분자 내 불포화 acyl group과의 선택적 교환에 기인한 것으로 사료된다(21).

한편, 기질의 sn-1,3 위치에 특이적으로 작용하는 pancreatic lipase에 의한 가수분해물의 지방산 조성분석을 통해 재구성 지질의 위치별 지방산 분포를 조사하였다(Table 1). 조류유의 지방산 중 가장 높은 함량을 나타내는 DHA는 sn-2 및 sn-1,3 위치에서 각각 50.3, 27.4 mol%로 대부분 sn-2 위치에 분포하였고, 대두유의 경우는 linoleic acid가 sn-2 위치에서 가장 높은 분포를 차지하는 것으로 조사되었다. 재구성지질의 경우, linoleic acid(29.8 mol%)와 DHA(21.1 mol%)가 sn-2 위치에서 높은 함량을 나타내는 것으로 분석되었다. 이와 같이 분포된 재구성지질 내 sn-2 위치의 필수 지방산인 linoleic acid와 DHA는 체내 흡수 시, 지방산이 보유한 기능적 역할의 체내 이용이 sn-1,3 위치에서보다 유리할 것으로 사료된다(11,25).

Normal-phase HPLC를 이용한 중성지질 조성

합성된 재구성지질과 반응기질로 사용된 조류유 및 대두유의 중성지질(TAG, DAG, MAG) 조성을 normal-phase HPLC 분석을 통하여 비교하였다(Table 2). 조류유는 99.0 area%의 TAG와 각각 0.8, 0.2 area%의 FFA 및 MAG를 나타내었고, 대두유는 대부분이 TAG(99.9 area%)로 구성되었다. 합성된 재구성지질의 경우, 87.1 area%의 TAG 함량을 가지는 것으로 분석되었으며 반응기질에 존재하지 않은 DAG(12.1 area%) 형태가 확인되었다(Fig. 1). Interesterification 과정 중 TAG 분자의 한 acyl기가 먼저 가수분해된 후 DAG를 형성하고, 다시 MAG를 형성한다. 이후 OH기에 esterification이 일어나 새로운 DAG, TAG를 형성한다. 이를 미루어보아 이론적으로 반응 중이었음을 알 수 있다. 적은 자유지방산의 함량은 재구성지질의 합성 반응 중에 생

Table 2. Contents of neutral lipids (triacylglycerol, TAG; diacylglycerol, DAG; monoacylglycerol, MAG; free fatty acid, FFA) in algae oil, soybean oil and structured lipid (SL) (Unit: area%)

	Contents of neutral lipids			
	FFA	TAG	DAG	MAG
Algae oil	0.8±0.0 ¹⁾	99.0±0.2	nd ²⁾	0.2±0.1
Soybean oil	0.1±0.0	99.9±0.0	nd	nd
SL ³⁾	0.2±0.0	87.1±2.0	12.1±2.0	0.6±0.0

¹⁾Mean±SD. ²⁾Not detected.

³⁾Structured lipid synthesized by enzymatic interesterification of algae oil and soybean oil in a stirred-batch type reactor.

성된 유리지방산이 정제 및 탈산 공정을 통하여 대부분 제거되었음을 의미하는 것으로 사료된다(17).

Reversed-phase HPLC에 의한 지질 분석

조류유와 대두유 및 생성된 재구성지질을 구성하는 지방산의 길이 및 불포화도에 의하여 분리하는 RP(reversed-phase)-HPLC로 PN(partition number)을 분석하였다(Table 3, Fig. 2). 조류유는 TAG의 75.1 area%가 PN=24~32 범위에 분포하고 24.9 area%가 PN=36~48 범위에서 분리되는 경향을 나타내었으나, 대두유의 경우는 4.9 area% 정도만 PN=24~32에 위치하고 TAG의 대부분 즉, 95.1 area%가 PN=36~48 범위에서 분리되는 것으로 나타났다. 한편, 재구성지질의 분석결과에 나타난 peaks는 Fig. 2와 같이 PN에 따라 PN=20~22(10.3 area%), PN=24~32(53.1 area%) 및 PN=36~48(36.6 area%)와 같이 세 범위로 분류되었다. 반응기질의 결과와 비교하였을 때, PN=24~32 범위에 존재하는 peaks 함량의 약 95%는 조류유로부터 기인된 것으로 여겨지며, PN=36~48 범위 내 peaks는 대두유로부터 약 80% 기인된 것으로 사료된다. 재구성 지질에는 각각 PN=20, PN=22, PN=28, PN=30, PN=34, PN=38, PN=42를 갖는 peaks와 같이 반응기질과 구별된 새로운 peaks가 존재하였으며 이러한 peaks는 재구성지질 함량의 약 50.5 area%를 차지하는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 효소적 interesterification에 의한 재구성지질 합성을 위하여 TAG분자 내 acyl

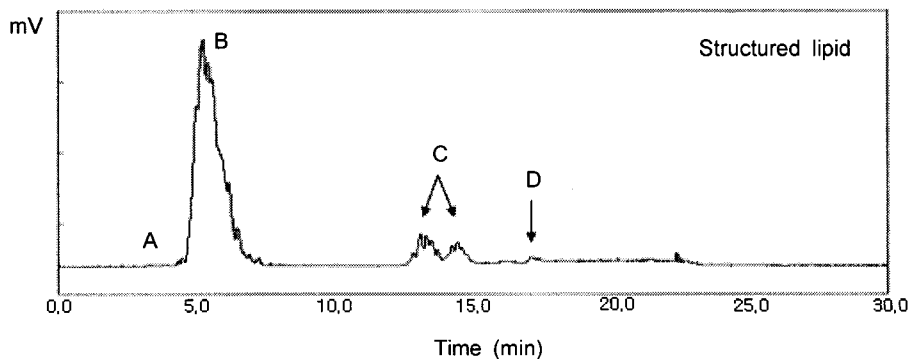


Fig. 1. The normal-phase HPLC chromatogram of the structured lipid synthesized by enzymatic interesterification. A: free fatty acid (FFA), B: triacylglycerol (TAG), C: diacylglycerol (1,3- and 1,2-DAG), D: monoacylglycerol (MAG).

Table 3. Peaks classified by partition number (PN) in algae oil, soybean oil, and structured lipid (SL) (Unit: area%)

	Algae oil	Soybean oil	SL ¹⁾	Newly observed peaks ²⁾	
PN=20~22	nd ⁴⁾	nd	10.3±0.1	a: PN=20	2.5±0.0 ³⁾
PN=24~32	75.1±0.8	4.9±0.2	53.1±0.1	b: PN=22	7.7±0.1
PN=36~48	24.9±0.8	95.1±0.2	36.6±0.2	c: PN=28	11.0±0.1
				d: PN=30	5.3±0.1
				e: PN=34	3.2±0.1
				f: PN=38	14.1±0.4
				g: PN=42	6.7±0.2

¹⁾Structured lipid synthesized by enzymatic interesterification of algae oil and soybean oil in a stirred-batch type reactor.

²⁾Peaks (a, b, c, d, e, f, g) observed from reversed-phase HPLC chromatogram (Fig. 2).

³⁾Mean±SD.

⁴⁾Not detected.

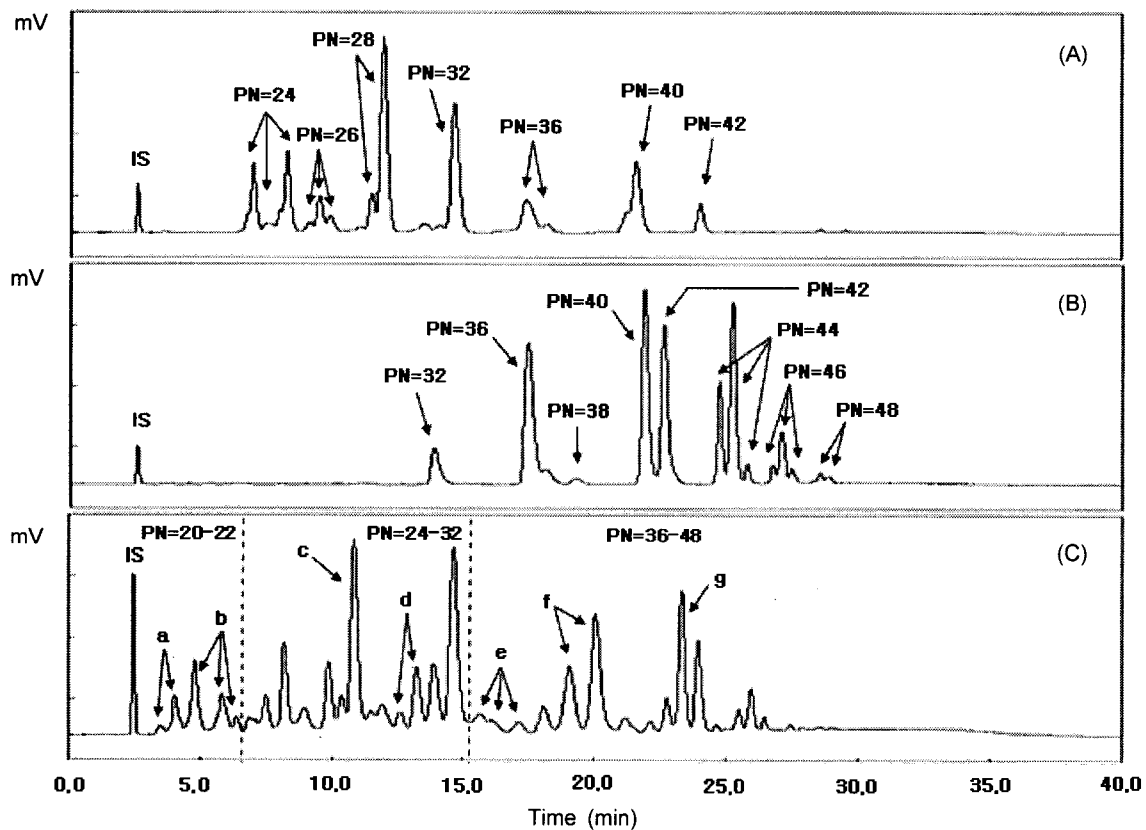


Fig. 2. Chromatograms from the reversed-phase HPLC separation of: (A) algae oil, (B) soybean oil, and (C) structured lipid. Partition number (PN)=total number of carbons (CN)-2×total number of double bonds (ND): a, PN=20; b, PN=22; c, PN=28; d, PN=30; e, PN=34; f, PN=38; g, PN=42.

group의 선택적 교환이 효과적으로 이루어졌으며, 따라서 재구성지질의 이화학적 특성이 위의 새로운 peaks와 같은 재구성된 지질형태의 영향을 받을 것으로 사료된다(5,11,21).

요오드가, 비누화가, 산가 및 색도 분석

합성된 재구성 지질의 화학적 성질을 요오드가, 비누화가 및 산가 측정을 통하여 알아보았으며, 색변화를 Hunter 체계 L^* (±, lightness/darkness), a^* (±, redness/greenness) 및 b^* (±, yellowness/blueness)값에 근거하여 살펴보았다(Table 4). 재구성지질의 요오드가는 고도의 불포화도를 가지는 조

류유(274.0)보다 약 25% 낮아진 206.7을 나타내었으며, 분자량을 설명하는 비누화가는 반응기질(조류유, 179.6; 대두유, 190.8) 값의 중간정도인 183.8로 측정되었다. 재구성지질의 산가는 반응기질과 같은 0.3 이하의 측정값을 나타내어 위의 Fig.1(FFA 함량)에 상응하는 것으로 보이며, 이는 합성과정 중 생성 가능한 자유지방산의 제거를 위한 탈산 공정이 효과적으로 이루어진 것으로 사료된다.

한편, 재구성지질의 Hunter 체계에 준한 색도 측정 결과는 반응기질과 유의적인 차이를 보였으며 측정값을 Table 4에 제시하였다($p<0.05$). 재구성지질의 L^* (±, lightness/

Table 4. Chemical characteristics and the Hunter color L*, a*, b* values of algae oil, soybean oil and structured lipid (SL)

	Algae oil	SL ¹⁾	Soybean oil
Chemical characteristics			
Iodine value	274.0±1.4 ²⁾	206.7±1.1	131.0±0.5
Saponification value	179.6±0.0	183.8±2.0	190.8±0.0
Free fatty acid value (%)	<0.3±0.0	<0.3±0.0	<0.3±0.0
Hunter color			
L* value	70.5±0.1 ³⁾	78.7±0.1 ^b	93.5±0.9 ^a
a* value	26.0±0.2 ^a	13.8±0.2 ^b	-2.5±0.1 ^c
b* value	49.4±0.0 ^b	55.1±0.1 ^a	11.3±0.3 ^c

¹⁾Structured lipid synthesized by enzymatic interesterification of algae oil and soybean oil in a stirred-batch type reactor.

²⁾Mean±SD.

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

darkness) 값은 대두유(93.5)보다 조류유(70.5)에 약 2배 가까운 78.7로, a*(±, redness/greenness) 값은 반응기질(조류유, 26.0; 대두유, -2.5) 사이의 값인 13.8로 측정되었으며, b*(±, yellowness/blueness) 값은 대두유(11.3) 및 반응기질 자체가 높은 b* 값을 갖는 조류유(49.4)보다 유의적(p<0.05)으로 높은 55.1을 나타내었다. 이러한 결과는 재구성지질이 조류유에 의하여 대두유보다 어둡고 붉으며, 반응기질보다 yellowish color를 보인다는 것을 의미한다.

유의적으로 가장 높은 55.1을 나타내었다(p<0.05).

감사의 글

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

문헌

요약

미세조류(microalgae)인 *Schizochytrium* sp.로부터 유래된 조류유(250 g)와 식물성 유지인 대두유(250 g)의 혼합유지를 기질로 하고, sn-1,3 위치에 특이적으로 작용하는 Lipozyme RM IM(*Rhizomucor miehei*, EC 3.1.1.3)을 이용한 interesterification에 의해 회분식 반응기(65°C, 300 rpm, 15 hr)에서 재구성지질을 합성하였다. 합성된 재구성지질의 주요 지방산 조성은 DHA(15.7 mol%)와 linoleic acid(31.1 mol%), palmitic acid(20.2 mol%), oleic acid(13.5 mol%) 및 EPA(6.6 mol%)로 분석되었으며, linoleic acid와 DHA가 sn-2 위치에서 높은 함량을 차지하였다. Normal-phase HPLC 분석결과 재구성지질은 87.1 area%의 TAG와 12.1 area%의 DAG 형태와 같은 중성지질로 구성되어 있었다. Reversed-phase HPLC 분석결과 재구성지질의 PN=20~22(10.3 area%), PN=24~32(53.1 area%) 및 PN=36~48(36.6 area%) peaks 내에 각각 PN=20, PN=22, PN=28, PN=30, PN=34, PN=38, PN=42를 가지고 재구성지질 함량의 약 50.5 area%를 차지하며 반응기질과 구별된 새로운 peaks가 합성에 의해 생성되었음을 확인하였다. 재구성지질의 요오드가는 고도의 불포화도를 가지는 조류유(274.0)보다 약 25% 낮아진 206.7을 나타내었으며, 분자량을 설명하는 비누화 값이 183.8, 산가는 반응기질과 같은 0.3 이하의 측정값을 나타내었다. 재구성지질의 Hunter color L*(±, lightness/darkness) 값은 78.7, a*(±, redness/greenness) 값은 13.8로 측정되었으며, b*(±, yellowness/blueness) 값은 반응기질보다

- Ohr LM. 2003. Fats for healthy living. *Food Technol* 57: 91-96.
- Lee JH, Kim HS. 2001. Effects of dietary docosahexaenoic acid levels on the brain phospholipids and serum and liver lipid compositions in rats. *Korean J Nutr* 34: 132-140.
- Horrocks LA, Yeo YK. 1999. Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). *Pharm Res* 40: 211-225.
- Lee H, Kizito SA, Weese SJ, Craig-schmidt MC, Lee Y, Wei CI, An H. 2003. Analysis of headspace volatile and oxidized volatile compounds in DHA-enriched fish oil on accelerated oxidative storage. *J Food Sci* 68: 2169-2177.
- Cho EJ, Lee JH, Lee KT. 2004. Optimization of enzymatic synthesis condition of structured lipids by response surface methodology. *Korean J Food Sci Technol* 36: 531-536.
- Lee HA, Yoo IJ, Lee BH. 1997. Research and development trends on ω-3 fatty acid fortified foodstuffs. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26: 161-174.
- Hammond BG, Mayhew DA, Naylor MW, Ruecker FA, Mast RW, Sander WJ. 2001. Safety assessment of DHA-rich microalgae from *Schizochytrium* sp., I. Subchronic rat feeding study. *Regul Toxicol Pharmacol* 33: 192-204.
- Tonon T, Harvey D, Larson TR, Graham IA. 2002. Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae. *Phytochemistry* 61: 15-24.
- Fajardo AR, Akoh CC, Lai OM. 2003. Lipase-catalyzed incorporation of n-3 PUFA into palm oil. *J Am Oil Chem Soc* 80: 1197-1200.
- Lee KT, Akoh CC. 1998. Characterization of enzymatically synthesized structured lipids containing eicosapentaenoic, docosahexaenoic acid, and caprylic acids. *J Am Oil Chem Soc* 75: 495-499.
- Lee KT, Foglia TA. 2000. Synthesis, purification, and characterization of structured lipids produced from chicken fat.

- J Am Oil Chem Soc* 77: 1027-1034.
12. Lee KT, Akoh CC. 1998. Structured lipids: synthesis and application. *Food Rev Int* 14: 17-34.
 13. Lee JS, Jang Y, Yang TH. 1999. Low-calorie structured lipids synthesis by enzymatic transesterification. Ministry of Agriculture and Forestry, Kyonggi, Korea. p 8-20.
 14. Ko SN, Kim H, Lee KT, Ha TY, Chung SH, Lee SM, Kim IH. 2003. Optimization of enzymatic synthesis of structured lipid with perilla oil and medium chain fatty acid. *Food Sci Biotechnol* 12: 253-256.
 15. Fomuso LB, Akoh CC. 2002. Lipase-catalyzed acidolysis of olive oil and caprylic acid in a bench-scale packed bed bioreactor. *Food Res Intern* 35: 15-21.
 16. Kim IH, Kim HR, Lee KT, Chung SH, Ko SN. 2002. Lipase-catalyzed acidolysis of perilla oil with caprylic acid to produce structured lipids. *J Am Oil Chem Soc* 79: 363-367.
 17. Shin JA, Lee KT. 2004. 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.
 18. Lee JH, Shin JA, Lee JH, Lee KT. 2004. Production of lipase-catalyzed structured lipids from safflower oil with conjugated linoleic acid and oxidation studies with rosemary extracts. *Food Res Intern* 37: 967-974.
 19. Alonso L, Fraga MJ, Juarez M. 2000. Determination of *trans* fatty acids and fatty acid profiles in margarines marketed in Spain. *J Am Oil Chem Soc* 77: 131-136.
 20. Xu X, Fomuso LB, Akoh CC. 2000. Synthesis of structured triacylglycerols by lipase-catalyzed acidolysis in a packed bed bioreactor. *J Agric Food Chem* 48: 3-10.
 21. Lee JH, Jones KC, Lee KT, Kim MR, Foglia TA. 2003. High-performance liquid chromatographic separation of structured lipids produced by interesterification of macadamia oil with tributyrin and tricaprilyn. *Chromatographia* 58: 653-658.
 22. Ruiz-Gutierrez V, Barron LJR. 1995. Methods for the analysis of triacylglycerols. *J Chromatogr B* 671: 133-168.
 23. AOCS. 1990. *Official methods and recommended practices*. 4th ed. American oil chemists' society, Chicago, IL, USA. Ca 5s-40, Cd 1-25, Cd 3-25.
 24. SAS Institute, Inc. 2000. *SAS/STAT user's guide*. Release 8.01, Statistical analysis systems institute, Cary, NC, USA.
 25. Insel P, Turner RE, Ross D. 2001. *Nutrition*. Jones and Bartlett Publishers, London, UK. p 135-177.

(2005년 5월 12일 접수; 2005년 7월 29일 채택)