

어유와 대두유로부터 기능성 유지의 효소적 합성

김유미 · 전미선 · 이정희 · 이기택[†]
충남대학교 식품공학과

Enzymatic Synthesis and Characterization of Structured Lipids from Docosahexaenoic Acid - Enriched Fish oil and Soybean oil

Yu-Mi Kim, Mi-Sun Jeon, Jeung-Hee Lee and Ki-Teak Lee[†]
Department of Food Science and Technology, Chungnam National University, Deajeon 305-764, Korea

Abstract

Structured lipids(SLs) were synthesized by enzymatic interesterification with DHA-enriched fish oil(containing 27% docosahexaenoic acid) and soybean oil in the batch-type reactor. The interesterification was performed for 24 hr at 55 °C and TLIM(immobilized lipase from *Thermonyces lanuginosa*, 10% by weight of total substrates) was mixed with 180 rpm of shaking. The fish oil and soybean oil were interesterified with several weight ratio(fish oil : soybean oil, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, w:w). Reverse-phase high performance liquid chromatography with an evaporative light-scattering detector separated the triglyceride species of SLs. The products contained the newly synthesized peaks. Especially, one of peaks was distinctively increased with the increasing weight ratio from 2:8 to 5:5 while the peak of trilinolein (LLL) decreased vice versa. The effect of antioxidants such as catechin, BHT(Butylated hydroxytoluene), and their combinations on the oxidative stability in SL were investigated. Oxidative stability was carried out under oven test at 60 °C over 72 hr thereafter SLs were analyzed for total fatty acid content, rancimat, peroxide value, electronic nose and TBARS value. Among all combinations of antioxidant, the highest stability was obtained from 200 ppm of catechin. Besides, total tocopherol (α , γ , and δ -tocopherol), iodine and saponification value were analyzed in which iodine and saponification value of SLs were 151.19 and 182.35.

Key words : Structured lipids(SLs), Functional lipids, Fish oil

서 론

어유(fish oil)는 eicosapentaenoic acid(EPA)와 docosahexaenoic acid(DHA)와 같은 long-chain polyunsaturated fatty acid인 omega-3 지방산의 함량이 높은 식품으로 알려져 있다(1). Greenland의 에스키모가 높은 지방 섭취량에 비하여 심혈관계 질환으로 인한 사망률이 낮은 이유를 관찰한 결과 등푸른 생선에 많이 함유되어 있는 omega-3 지방산에 의한 것으로 알려져 그 기능성이 인정된 바 있다(2). 또한 EPA와 DHA는 LDL-cholesterol의 함량을 낮추는 등의 고지혈증 및 심혈관계 질환에 대한 효능뿐만 아니라 망막, 두뇌의 인지질의 주요 구성 성분이며 성장에 필수 지방산으로 알려

져 있다(3,4). 그러나 어유는 다가 불포화 지방산의 함량이 높아 공기 중에서 쉽게 산패된다(5). 따라서 어유를 이용한 제품을 상품화하기 위해서는 산화를 억제해야만 한다.

재구성 지질이란 유지의 물리, 화학적 특성을 변화시키기 위하여 효소적 또는 화학적 방법을 이용하여 triglyceride (TAG)의 지방산 조성 또는 지방산의 위치(regiospecific position) 변화시킨 합성 유지이다. 재구성 지질을 합성하는 방법 중 효소를 이용한 방법은 재사용이 가능하고, 환경 친화적인 장점을 가지고 있다. 또한 지방산의 위치에 특이적으로 작용하여 원하는 물질을 선택적, 효율적으로 생산할 수 있다(6,7).

이에 본 연구에서는 omega-3 지방산을 고농도로 함유한 기능성 유지를 효소적 방법으로 생산하기 위하여 DHA-enriched fish oil과 대두유를 기질로 사용하여 반응하였다.

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

또한 산화안정성이 낮은 어유를 기질로 사용하였으므로 천연항산화제와 합성 항산화제를 첨가하여 항산화력을 비교 측정하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에서 기질로 사용된 어유는 (주)네오메가(대전, Korea)에서 제공 받은 정제어유 제품으로 Nutrin DHA 27(DHA 27% 함유, 토크페롤 0.5% 함유)이며, 대두유는 C사 제품을 사용하였다. 본 연구에서 재구성 지질 합성을 위해 사용된 lipase는 *Thermomyces lanuginosa*로부터 유래한 TLIM으로 lipase가 silica gel에 고정화 된 효소이다. 이 효소는 triglyceride 분자의 sn-1과 3의 위치에 특이적으로 작용하는 특성을 가지고 있다. 천연 항산화제로 사용된 catechin은 서도 BNI(안산, Korea)에서 구입하였으며, 합성 항산화제인 butylated hydroxyl toluene(BHT)와 α -tocopherol은 Sigma에서 구입하여 사용하였다. 수용성 항산화제인 catechin을 emulsion화시키기 위해 사용된 glycerin mono-olate(GMO)는 (주)일신웰스에서 제공받아 사용하였다.

재구성 지질 합성 및 정제

재구성 지질을 합성하기 위해 대두유와 정제된 어유를 비율(w/w)을 달리하여 (어유 : 대두유 = 2:8, 3:7, 4:6, 5:5) 취한 후 전체 기질 무게의 10%에 해당하는 Lipase TLIM (immobilized lipase from *Thermomyces lanuginosa*)을 넣고 55°C, 180 rpm의 항온 교반 수조에서 24시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝나고 여과를 통해 lipase를 제거시킨 후 획득한 반응물은 0.5 N KOH의 ethanol 용액을 이용하여 재구성 지질 합성 중 생성될 수 있는 유리지방산을 제거하였다. 이러한 탈산 공정을 거친 후 얻은 생성물을 anhydrous sodium sulfate column, 진공 감압농축기(EYELA, N-1000, Japan)와 N₂를 이용하여 수분과 hexane을 제거, 농축하였다. 그리고 비율을 달리하여 반응시킨 생성물들의 예비 분석을 마친 후 비율 중 어유와 대두유 각각 150 g(5 : 5, w : w)로 scale-up하여 다시 합성하였고 위와 같은 방법으로 정제과정을 거쳤다.

Reversed-phase HPLC를 이용한 재구성지질의 triglyceride 분석

비율을 달리하여 생성한 재구성 지질의 triglyceride의 형태를 분석하기 위하여 reversed-phase HPLC(RP-HPLC)를 이용하였다. 분석한 HPLC는 영린 SP930D 듀얼 펌프와 Sedex 75 evaporative light scattering detector(ELSD, Sedere, Alfortville, France)가 장착되어 있다. 이동상은 acetonitrile과 dichloromethane을 이용하였으며, column은 Nova-Pak C18

column(4 μ m, 150 \times 3.9 mm i.d., Waters, Milford, MA)이었다. 이동상의 기울기 용리 조건은 Table 1과 같으며, 유속은 0.72 mL/min이었다. 시료는 10 μ g 을 취한 후 acetonitrile : dichloromethane(7 : 3, v : v)로 혼합한 용매 10 mL에 녹여 20 μ L 주입하였다.

Gas chromatography에 의한 총 지방산 조성 및 sn-2 position 분석

각각의 시료의 총 지방산을 분석하기 위해 saponification과 methylation을 실시하였다. Test tube에 시료를 넣고 0.5 N KOH의 ethanol 용액을 1.5 mL 가하여 100°C water bath에서 5분간 중탕시킨 후 냉각하였다. 냉각 후 BF₃ 2 mL과 heptadecanoic acid(1 mg/1 mL in hexane) 100 μ L를 가한 후 다시 2분간 중탕시켜 냉각하였다. 실온 상태의 test tube에 hexane 2 mL과 포화 NaCl 1 mL을 넣고 vortex한 후 정지시켰다. 두 층으로 분리되면 hexane층을 분리하여 anhydrous sodium sulfate column을 이용하여 수분 및 불순물을 제거하여 GC vial에 넣고 분석하였다.

재구성 지질을 합성하기 위한 기질과 반응물의 sn-2 position의 지방산 조성분석을 위해 시료 7~8 mg, 7 mL의 1 M Tri-HCl buffer(pH 7.6)와 1.75 mL의 0.05% bile salt 용액, 0.7 mL의 2.2% CaCl₂ 용액, 그리고 시료와 동량의 pancreatic lipase를 넣고 37°C water bath에서 3분 동안 가온, 냉각을 3회 반복 실시하였다. 이후 diethyl ether를 가하여 추출한 후 anhydrous sodium sulfate column을 이용하여 수분 및 불순물을 제거하였다. 전개용매 hexane : diethyl ether : acetic acid (50 : 50 : 1, v : v : v)을 이용하여 TLC silica plate(20 \times 20 cm, Merck, Columbia MD, USA)에 전개시켜 R_f 값이 0.03인 2-MAG를 분리하고 6% H₂SO₄로 methylation하였다. Sn-1,3 position의 지방산 조성 계산식은 다음과 같다.

$$\text{Sn-1,3(\%)} = (\text{3TAG} - \text{sn-2})/2$$

화학적 성질 및 tocopherol 분석

대두유와 어유, 재구성 지질의 산가, 요오드가, 비누화가는 AOCS에 제시된 방법으로 측정하였다(8). 유지의 α -, γ -, δ -tocopherol 분석은 UV detector가 장착되어 있는 HPLC를 이용하여 normal-phase로 분석하였다. 각각 tocopherol의 정량은 표준물질을 50~125 μ g/mL로 hexane에 희석하여 분석한 그래프를 이용해 함량을 구하였다. 분석에 사용된 column은 LiChrosorb Diol 5 μ m(3 \times 100 mm, Chrompack, Raritan, NJ, USA)이었으며, mobile phase는 hexane : acetic acid (100 : 0.1, v : v)로 유속 1 mL/min의 등용리로 용출시켰고 295 nm에서 검출하였다. 시료 1 g에 5 mL의 6% pyrogallol ethanol 용액과 1.25 mL의 60% KOH 용액을 가하여 충분히 vortex 시킨 후 산화 방지를 위해 N₂를 충전시킨 후 70°C 항온기에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후

냉각시키고 2% NaCl 용액을 5 mL 가하여 다시 한 번 충분히 vortex 시켰다. 그리고 0.05% BHT를 포함한 hexane : ethyl acetate (85 : 15, v : v)로 혼합된 용액을 2.5 mL씩 3번 넣고 추출하였다. 질소 가스를 이용해 농축시켜 5 mL hexane을 넣어 membrane filtration 시키고 HPLC에 주입하여 분석하였다.

항산화제 조성물 제조

산화 안정성이 낮은 어유와 재구성 지질(대두유 : 어유 = 5 : 5, v : v)의 항산화력 향상을 위해 천연 항산화제인 catechin과 합성 항산화제인 butylated hydroxyl toluene (BHT)를 200 ppm씩 첨가하였다. 또한 α -tocopherol 100 ppm과 catechin 100 ppm, α -tocopherol 100 ppm과 butylated hydroxyl toluene(BHT) 100 ppm을 각각 혼합하여 첨가하였다. 그러나 수용성 물질인 catechin은 유지에 녹지 않기 때문에 emulsion화를 위하여 전체 유지의 2% 농도의 glycerin mono olate(GMO)와 60°C로 가온 된 유지에 넣고 약 30분간 sonication하였다. Butylated hydroxyl toluene (BHT)와 α -tocopherol은 60°C로 가온 된 유지에 직접 넣고 sonicator로 균질화 시켰다.

산화 속도 측정

자동 산화 측정 기계인 Rancimat(Rancimat 743, Metrohm, Switzerland)을 사용하여 항산화제 종류에 따른 어유와 재구성 지질의 산화 속도를 측정하였다. 가속 실험(acceleration test)을 위하여 시료의 온도는 100°C, gas flow rate 20 L/hr의 조건에서 실시하였다. 측정 온도는 정제 어유의 induction period를 결정할 수 있는 온도인 100°C로 설정하였다.

전자코에 의한 향기 패턴 분석

어유와 재구성 지질에 항산화제 첨가에 따른 향 패턴 변화 정도를 알아보기 위해 사용된 전자코(α -FOX 3000 electronic Nose system, alpha M.O.S., Toulouse, France)는 10개의 metal oxide sensor(MOS)를 가지고 있다. 즉 SY/G, SY/AA, SY/Gh, SY/gCTI, T30/1, P10/1, P10/2, P40/1, T70/2, PA2로 구성되어 있다. 각 향기패턴 구별을 위한 센서들 중 SY/AA, P10/1, P10/2는 비극성 휘발물질을 PA2, T30/1, SY/gCTI 센서들은 유기용매를 감지한다. SY/G 센서는 암모니아 및 황 화합물을 감지하고, T70/2는 식품 향기와 휘발 성분들을 감지, P40/1 센서는 fluoride 및 chloride를 감지하였다(9). 분석 조건은 dry/humid air의 비율이 20%가 되도록 온도는 36°C, 압력은 5 psi, 공기 흐름은 150 mL/min으로 공기조절시스템을 활용하여 설정하였다. 향기 성분은 20 mL vial에 시료 1 mL을 취해서 각각 3반복씩 분석하였다. Incubation 시간은 5분, 온도는 35°C, 진탕은 500 rpm으로 하여 headspace로부터 획득 하였다. 여기서 얻은 향기성분은 2 mL의 용량을 자동 시료 채취기 및 주입기를 이용하여

40°C로 유지되는 주사기에 취해서 0.5 mL/sec의 속도로 injection port에 주입하였다.

Peroxide value(POV) 및 thiobarbituric acid reactive substance(TBARS) 측정

항산화제 첨가에 따른 어유와 재구성 지질의 보관 기간의 산패 정도를 측정하기 위해 각각 항산화제를 첨가한 4개의 그룹과 아무것도 첨가하지 않은 어유와 재구성 지질 2개의 그룹을 60°C 항온기에 72시간 동안 보관하였다. 초기(0시간)부터 24시간 간격으로 peroxide value(POV) 및 thiobarbituric acid reactive substance(TBARS)값을 AOCS법에 의하여 각각 2회 이상 반복하여 측정하여 평균값을 구하였다(10).

통계 처리

실험 결과는 평균±표준편차로 나타내었고, 각 그룹간의 유의성은 SAS(statistical analysis system, version 8.01) program의 duncan's multiple range test를 실시하여 p<0.05 수준에서 유의성을 검정하였다(11).

결과 및 고찰

Reversed-phase HPLC를 이용한 재구성지질의 TAG 분석

Fig. 1, 2는 대두유와 어유의 비율을 달리하여 합성한 재구성 지질을 reversed-phase HPLC의 결과에 따른 그림이다. 반응이 진행되는 동안 여러 peak들이 증가, 감소, 생성됨을 확인할 수 있었으며 이로 인해 반응의 진행 정도를 알 수 있었다. 각 비율에 따라 반응시켰을 경우 대두유에서 높은 함량을 차지하고 있는 TAG 인 trilinolein(LL) peak와 두 기질이 반응하였을 때 새로 합성된 peak하나를 선택하여 그 변화 정도를 살펴보았다. 반응 중 어유의 비율을 증가시키수록 새롭게 생성된 peak는 약 3배정도 증가하였으며, trilinolein은 약 2.3배 감소하였다. 새롭게 형성된 peak는 어유와 대두유를 4:6으로 반응시켰을 경우 최대 생성되었고 5:5 비율의 경우 큰 변화를 보이지 않았다. Fig. 1은 반응 기질인 어유와 대두유 그리고 두 기질을 5:5로 반응시킨 재구성 지질의 HPLC chromatogram을 나타낸 것으로 trilinolein의 감소와 새로운 peak의 증감의 경향을 볼 수 있다.

총 지방산 조성 및 sn-2 position 분석

기질로 사용된 대두유와 DHA-enriched fish oil 그리고 합성된 재구성 지질의 총 지방산 및 위치별 지방산 조성을 분석한 결과는 Table 2와 같았다. 대두유의 주요 지방산은 linoleic acid 54.06%, oleic acid 24.69%, palmitic acid 11.54%

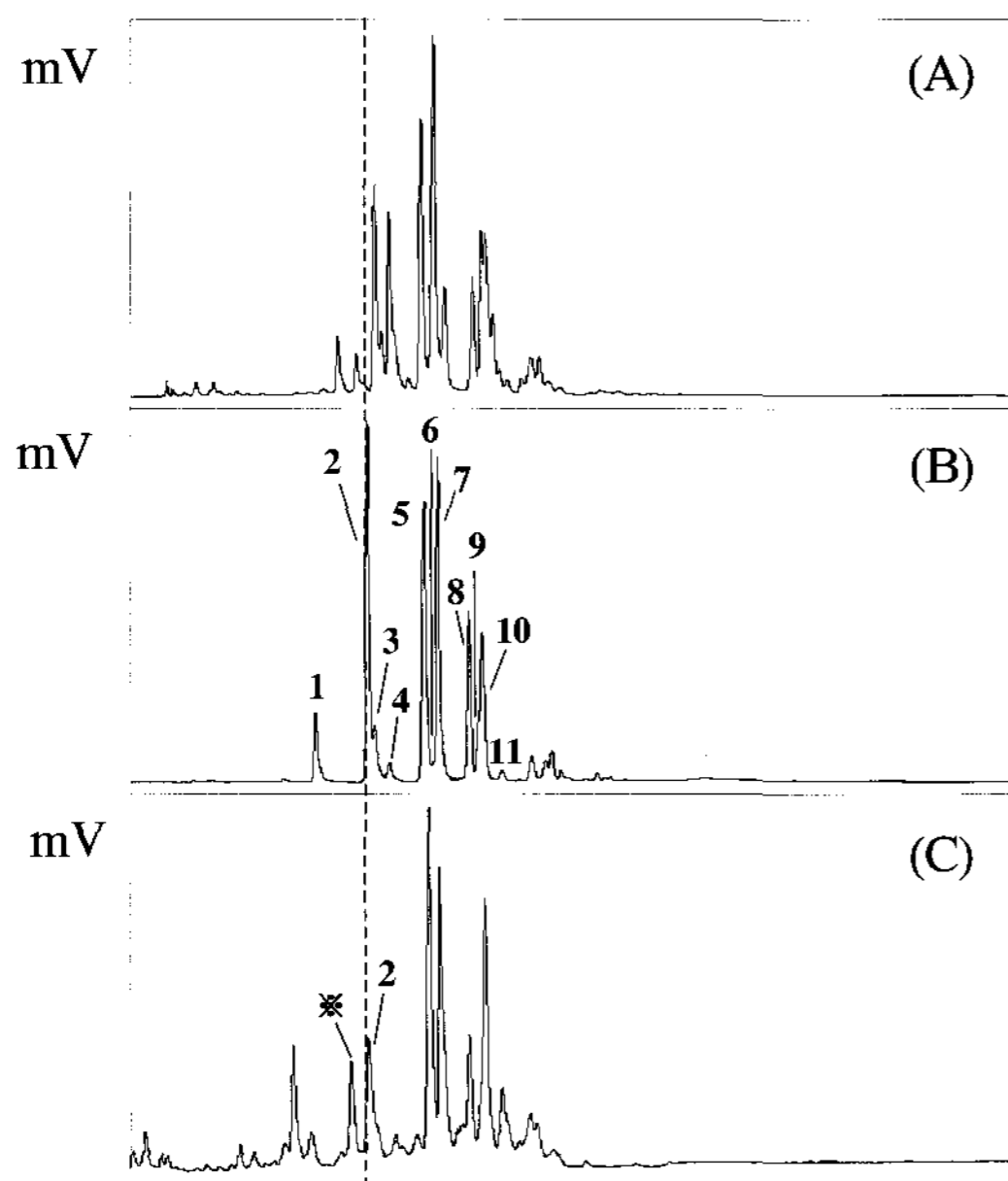


Fig. 1. Chromatogram from the reversed-phase high performance liquid chromatography separation of (A) DHA-enriched fish oil, (B) Soybean oil, (C) Structured lipid(Soybean oil).

DHA-enriched fish oil = 5:5 were synthesized by 10% TLIM, for 24hr, at 55°C) 1: LLLn, 2: LLL, 3: OLnL, 4: PLLn, 5: LLO, 6: OOLn, 7: PLL, 8: LOO, 9: LLS, 10: PLO, 11: PLP ※: newly synthesized peak

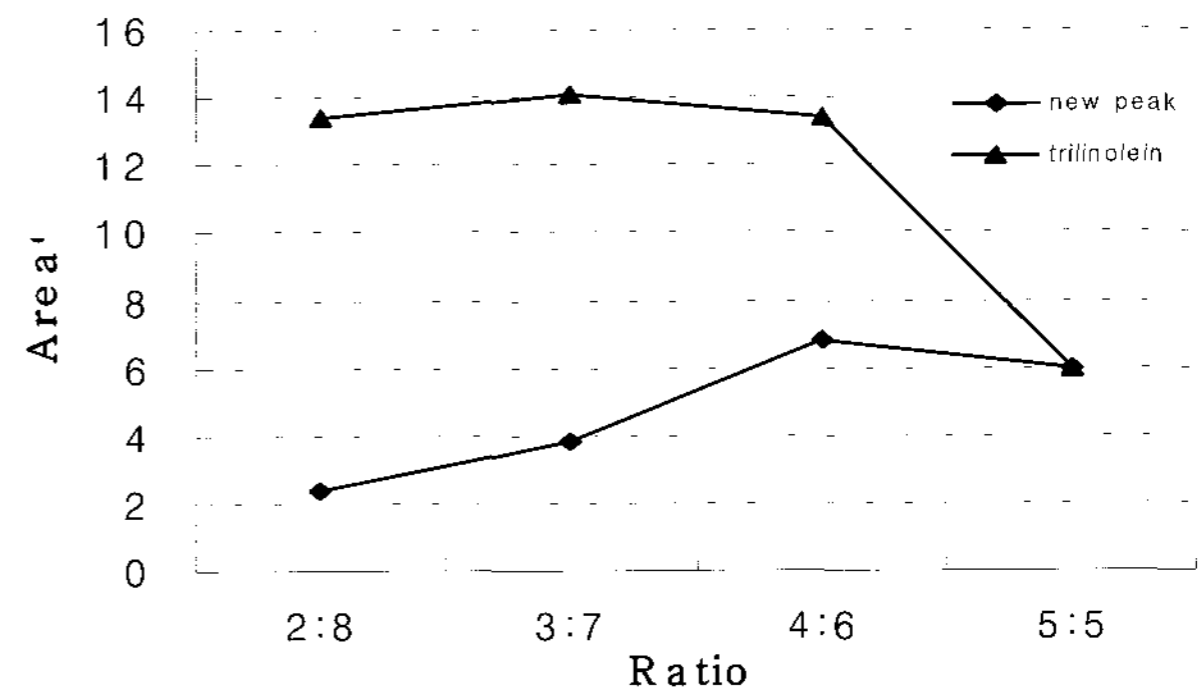


Fig. 2. The change of new peak and trilinolein in structured lipids according to different substrate ratios(Soybean oil: DHA-enriched fish oil).

Table 1. The gradient condition of RP-HPLC(Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography)

M.P. ¹⁾	Min.				
	0	25	26	27	48
Acetonitrile(%)	70	49	30	30	70
Dichloromethane(%)	30	51	70	70	30

¹⁾Mobile phase.

Table 2. Fatty acid composition(area %) of Soybean oil, DHA-enriched fish oil and Structured lipid

(Unit: area%)

FA ¹⁾	Soybean oil			DHA-enriched Fish oil			SL ²⁾		
	sn-2	sn-1,3	Total ³⁾	sn-2	sn-1,3	Total ³⁾	sn-2	sn-1,3	Total ³⁾
14:0	-	-	-	6.19±0.01	2.65±0.02	3.83±0.02	1.75±0.02	1.72±0.01	1.73±0.00
16:0	1.28±0.09 ⁴⁾	16.67±0.05	11.54±0.00	23.38±0.03	23.89±0.06	23.72±0.06	16.72±0.42	16.32±0.35	16.45±0.19
16:1	-	-	-	2.26±1.97	7.54±0.95	5.78±0.04	2.29±0.02	2.7±0.08	2.56±0.08
18:0	0.69±0.06	5.69±0.03	4.02±0.00	2.41±0.11	7.56±0.33	5.84±0.03	5.61±0.18	4.67±0.08	4.98±0.01
18:1	25.83±0.64	24.12±0.37	24.69±0.03	8.69±0.52	19.51±0.35	15.90±0.11	21.50±0.45	22.46±0.12	22.14±0.15
18:2	67.62±0.54	47.28±0.33	54.06±0.04	1.95±0.51	1.29±0.27	1.51±0.02	27.84±0.60	30.92±0.20	29.89±0.14
18:3	4.58±0.13	6.25±0.05	5.69±0.01	-	0.72±0.00	0.48±0.00	0.72±0.20	4.79±0.11	3.43±0.01
20:4	-	-	-	3.00±0.07	3.50±0.05	3.33±0.02	1.39±0.22	1.48±0.11	1.45±0.00
20:5	-	-	-	6.65±0.05	6.94±0.00	6.84±0.03	2.56±0.04	3.15±0.03	2.95±0.01
22:5	-	-	-	2.88±0.15	1.89±0.06	2.22±0.01	1.27±0.03	0.85±0.01	0.99±0.01
22:6	-	-	-	42.59±1.10	24.53±0.42	30.55±0.17	18.35±0.01	10.97±0.04	13.43±0.06
SFA ⁵⁾	1.97	22.36	15.56	31.98	34.1	33.39	24.08	22.71	23.16
USFA ⁶⁾	98.03	77.65	84.44	68.02	65.92	66.61	75.92	77.32	76.84

¹⁾Fatty acid composition.

²⁾Structured lipid obtained from soybean oil with DHA-enriched fish oil (5:5) by TL IM lipase in stirred-batch type reactor.

³⁾Total fatty acid.

⁴⁾Values are the means of two determinations with standard deviations.

⁵⁾Saturated fatty acids.

⁶⁾Unsaturated fatty acids.

로 분석되었다. 또한 포화 지방산은 약 16%, 불포화 지방산은 약 84%로 높은 불포화 지방산 함량을 나타내었다. DHA-enriched fish oil의 지방산은 다양하게 존재하였는데 그 중 docosahexaenoic acid(DHA)는 30.55%, palmitic acid 23.72%, oleic acid 15.9%, eicosapentaenoic acid(EPA) 6.84%의 함량을 나타내었다. 이 중 불포화 지방산은 약 67%, 포화 지방산은 약 33%로 비교적 높은 불포화 지방산 함량을 나타내었다. 위의 두 기질을 5:5로 반응시킨 재구성 지질의 지방산은 linoleic acid가 29.89%로 대두유와 비교하여 약 45% 감소하였다. DHA는 13.43%로 DHA-enriched fish oil과 비교하여 약 56% 감소하였다. Fish oil에 과량 함유되어 있던 포화 지방산 palmitic acid는 16.45%로 반응하기 전과 비교하여 약 31% 가량 감소하였다.

기질의 sn-1,3에 특이적으로 작용하는 pancreatic lipase 가수분해에 의해 sn-2 position의 지방산 조성을 분석하였다. 그 결과 대두유에는 linoleic acid가 67.62%, DHA-enriched fish oil은 DHA가 42.59% 차지하고 있었다. 재구성 지질의 sn-2 position은 DHA-enriched fish oil에 미량으로 함유되어 있던 linoleic acid가 27.84%로 증가되었고, oleic acid 21.5%, DHA 18.35%, palmitic acid 16.72%로 분석되었다. 유지가 체내로 흡수 될 경우 lipase가 분비되어 2-MAG와 free fatty acid로 나뉘고, 이 중 2-MAG는 다시 TG로 변환되어 단백질 등과 결합하여 chylomicron 형태로 혈액으로 이동된다. 이렇게 TG의 형태가 변환되는 과정 중 sn-1,3은 바뀔 수 있으나 sn-2의 위치 지방산은 변하지 않고 그대로 흡수될 수 있다. 그러므로 체내 대사 과정에서 sn-2 위치는 기능성으로 중요한 부분을 차지하고 있다(12). 본 실험에서 합성한 재구성 지질의 sn-2 position 위치는 불포화 지방산이 약 76% 가량 위치해 있어 체내 대사과정에서 유용할 것으로 여겨진다.

화학적 성질 및 tocopherol 분석

기질로 사용된 대두유와 DHA-enriched fish oil과 두 가지 기질을 이용해 합성한 재구성 지질의 이화학적인 특징을 살펴보기 위하여 요오드가, 비누화가, 산가를 측정하였고 α -, γ -, δ -tocopherol의 함량을 구하여 Table 3에 나타내었다.

각 기질의 산가는 0.5 이하였으며 합성한 반응물의 산가는 7~8 이었다. 따라서 탈산 공정을 거친 후 TAG만을 취한 유지의 산가는 0.5 이하였다. 불포화도를 나타내는 요오드가는 EPA나 DHA와 같은 고도 불포화지방산의 함량이 높은 어유는 191, 대두유는 131, 재구성 지질은 151이었다. 구성 지방산의 분자량의 크기와 반비례의 값을 나타내는 비누화가는 어유 166, 대두유 193, 재구성 지질 182를 나타내었다. 이는 대두유와 다가 불포화지방산 함량이 높은 어유가 결합하여 나타난 결과라 할 수 있다.

대두유의 α -, γ -, δ -tocopherol의 함량은 각각 11.27 mg/100 g, 52.89 mg/100 g, 20.53 mg/100 g로 γ -tocopherol이 가장

높게 나타났으며, 이와 같은 결과는 Shin (13)과 유사하였다. DHA-enriched fish oil의 α -, γ -, δ -tocopherol의 함량은 37.4 mg/100 g, 12.79 mg/100 g, 9.08 mg/100 g로 α -tocopherol의 함량이 가장 높게 나타났으며, 재구성 지질의 tocopherol 함량은 각각 23.58 mg/100 g, 32.28 mg/100 g, 17.94 mg/100 g이었다.

Table 3. Chemical characteristics of Soybean oil, DHA-enriched fish oil and Structured lipid (SL)

	Soybean oil	DHA-enriched Fish oil	Structured Lipid
α -tocopherol	11.27±0.01	37.40±4.57	23.58±1.03
γ -tocopherol	52.89±0.01	12.79±0.89	32.28±0.38
δ -tocopherol	20.53±0.01	9.08±1.01	17.94±0.07
Total(mg/100 g)	84.69±0.01	59.26±6.47	73.06±0.72
Iodine value	131.50±1.59	191.11±4.32	151.19±4.97
Saponification value	192.61±1.4	165.51±4.0	182.35±11.90
Acid value	<0.5±0.1	<0.5±0.1	<0.5±0.1

산화 속도 측정

유지의 산소 흡수 속도가 매우 적은 일정한 기간을 유도 기간(induction period)이라 한다. 이 유도 기간이 지나면 유지의 산소흡수속도가 급증하여 peroxides, aldehyde와 같은 산화 생성물의 양이 급격히 증가된다(14). 즉 유지가 산패될 때까지의 기간으로 유지의 불포화도에 의해 좌우된다. 유도기간은 rancimat을 이용하여 간단히 측정할 수 있다. 본 실험에서는 합성 시 기질로 이용된 어유와 재구성 지질 그리고 재구성 지질과 항산화제 종류에 따라 첨가를 달리한 4개의 그룹의 유도기간을 측정하였다. 그 결과는 Table 4에 나타내었다. 각각의 유지를 100°C 공기의 흐름에 노출시켜 산화시켰을 경우 catechin 200 ppm(SL2)을 첨가시킨 군은 아무것도 첨가하지 않은 어유보다 유도기간이 약 9배, BHT 200 ppm(SL3)을 첨가하였을 경우 약 4.7배 연장되었다. 그리고 어유와 아무것도 첨가하지 않은 재구

Table 4. Induction periods depending on the various antioxidants of catechin, BHT and α -tocopherol in structured lipid

Sample	Temp	Induction period time (hr)
FO (Fish oil)	100°C	0.72 h
SL1(Fish oil : Soybean oil =5:5)	100°C	2.56 h
SL2(SL1+Catechin 200 ppm)	100°C	6.44 h
SL3(SL1+BHT 200 ppm)	100°C	3.35 h
SL4(SL1+Catechin 100 ppm+tocopherol 100 ppm)	100°C	4.13 h
SL5(SL1+BHT 100 ppm+tocopherol 100 ppm)	100°C	3.04 h

결과에 편차표시와 통계처리 결과의 표현을 첨가할 것

Table 5. Response of each sensor by electronic nose on fish oil and structured lipids containing antioxidant

Sensor Model	Response of each sensor ^{1,2)}					
	Fish oil	SL1 ³⁾	SL2 ⁴⁾	SL3 ⁵⁾	SL4 ⁶⁾	SL5 ⁷⁾
SY/G	-0.002±0.000 ^{a8)}	0.000±0.002 ^a	-0.007±0.001 ^b	-0.008±0.000 ^b	-0.008±0.001 ^b	-0.006±0.000 ^b
SY/AA	0.000±0.002 ^a	0.002±0.000 ^a	-0.002±0.000 ^a	0.000±0.002 ^a	0.000±0.002 ^a	0.000±0.002 ^a
SY/Gh	-0.001±0.000 ^a	-0.001±0.001 ^a	-0.009±0.001 ^{bc}	-0.011±0.000 ^c	-0.010±0.000 ^{bc}	-0.008±0.001 ^b
SY/gCTI	0.000±0.003 ^a	-0.001±0.002 ^a	-0.007±0.001 ^b	-0.007±0.000 ^b	-0.007±0.000 ^b	-0.005±0.000 ^b
T30/1	-0.004±0.009 ^c	-0.003±0.009 ^c	0.154±0.002 ^b	0.173±0.001 ^a	0.164±0.003 ^{ab}	0.164±0.002 ^{ab}
P10/1	0.005±0.013 ^b	0.016±0.000 ^b	0.038±0.001 ^a	0.044±0.000 ^a	0.041±0.001 ^a	0.044±0.001 ^a
P10/2	0.016±0.001 ^c	0.018±0.000 ^d	0.051±0.000 ^c	0.057±0.001 ^a	0.053±0.001 ^b	0.053±0.001 ^b
P40/1	0.014±0.001 ^c	0.016±0.000 ^d	0.033±0.000 ^c	0.038±0.001 ^a	0.035±0.000 ^b	0.038±0.001 ^a
T70/2	-0.014±0.001 ^d	-0.013±0.001 ^d	0.151±0.002 ^c	0.170±0.002 ^a	0.160±0.003 ^b	0.157±0.001 ^b
PA2	-0.029±0.003 ^d	-0.026±0.002 ^d	0.217±0.003 ^c	0.245±0.002 ^a	0.234±0.005 ^b	0.252±0.003 ^a

¹⁾Response of each sensor is expressed by delta Rgas/Rair, R is resistance values of the sensors.

^{2)a-c}Means within the same row with different superscripts are significantly different at $p \leq 0.05$ by MANOVA.

³⁾SL 1(Fish oil: Soybean oil = 5:5 were synthesized by TLIM lipase for 24 hours at 55°C).

⁴⁾SL1 + catechin 200 ppm.

⁵⁾SL1 + BHT 200 ppm.

⁶⁾SL1 + catechin 100 ppm + α -tocopherol 100 ppm.

⁷⁾SL1 + BHT 100 ppm + α -tocopherol 100 ppm.

⁸⁾Mean \pm SD. Based on triplication.

성 지질(SL1)의 유도기간을 비교하였을 경우 재구성 지질이 약 3.5배 연장되었다. 이는 대두유 자체에 포함되어 있는 tocopherol이 항산화제 역할을 하여 유지의 산패가 방지된 것으로 여겨진다. 각각의 항산화제 100 ppm과 α -tocopherol 100 ppm씩 첨가한 (SL4, SL5) 경우 어유나 SL1 보다는 유도기간이 길게 측정되었으나, 단일 항산화제 첨가보다는 짧은 유도기간이 측정되었다.

전자코에 의한 향기 패턴 분석

본 연구에서는 기질로 사용된 DHA-enriched fish oil, 대두유, 이 두가지 기질을 5:5 비율로 반응시킨 재구성 지질 그리고 재구성 지질에 각각의 항산화제를 첨가한 군들 간에 향기 패턴을 비교, 분석하고자 하였다. 분석을 위한 기기로는 10개의 metal oxide sensor(MOS)를 가진 electronic nose를 사용하였다. 각각의 센서들은 서로 다른 향기 패턴을 감지할 수 있으며 이들 센서별 감응도로 항산화제 첨가에 따른 향기패턴에 대한 기여율(proportion)을 구하였다. Fig. 3는 principal component analysis(PCA)를 이용해 나타내었다. 제 1 주성분 값의 기여율은 99.66% 이었으며 제 2 주성분 값의 기여율은 0.14% 이었다. 이것은 제 1 주성분의 값만으로도 항산화제 첨가에 따른 향기 패턴을 구분할 수 있음을 나타낸다. 항산화제를 첨가하지 않은 어유와 재구성 지질 그룹은 각기 다른 항산화제를 첨가한 그룹과 제 1 주성분의 값이 -0.25에서 0.2로 큰 차이를 보였으며 negative 에서 positive로 변화하는 것으로 보아 향기 패턴에 차이가 있음을 알 수 있었다. 그러나 서로 다른 항산화제를 첨가한 그룹 간의 큰 차이는 나타내지 않았다. 이를 검증하

기 위해 각 센서가 보인 감응도를 MANOVA 통계 처리하여 (Table 5) 센서들 간에 유의적인 차이를 보임을 확인할 수 있었다($p \leq 0.05$).

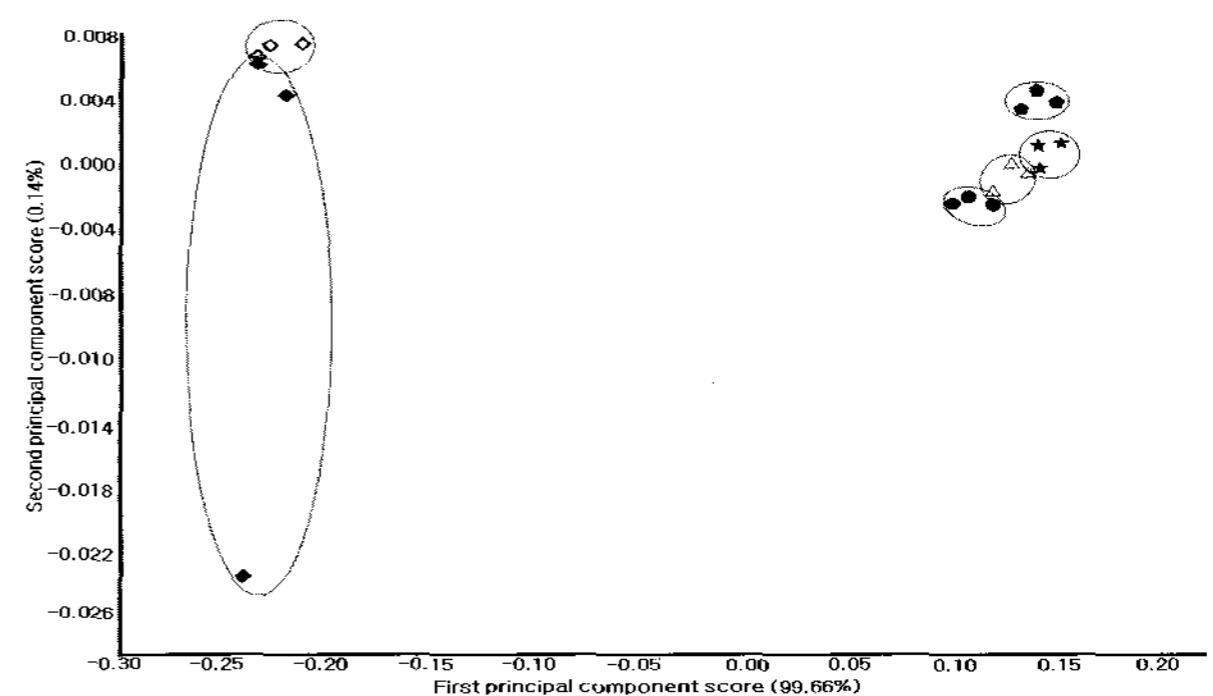


Fig. 3. Principal component analysis (PCA) plot from the obtained data using electronic nose on fish oil structured lipids containing antioxidant.

◆: Fish oil, ◇: SL1(Fish oil : Soybean oil = 5:5 reaction), ●: SL2 (SL1 + catechin 200 ppm), ★: SL3(SL1 + BHT 200 ppm), △: SL4(SL1 + catechin 100 ppm + α -tocopherol 100 ppm), ⬤: SL5(SL1 + BHT 100 ppm + α -tocopherol 100 ppm).

항산화제 첨가에 따른 POV 및 TBARS

기질로 사용한 DHA-enriched fish oil 과 대두유와 이것을 합성한 재구성 지질의 산화 안정성을 알아보기 위해 반응물에 각각의 항산화제를 첨가한 시료를 준비하여 60°C 항온기에서 72시간 저장하여 24시간 마다 POV 및 TBARS가를 비교하였다(Fig. 4). POV 실험 결과는 rancimat을 이용한 유도기간 측정 결과와 유사하게 도출되었다. 0시간 저장하였을 경우 POV는 모든 시료들이 유사한 값을 보였으며,

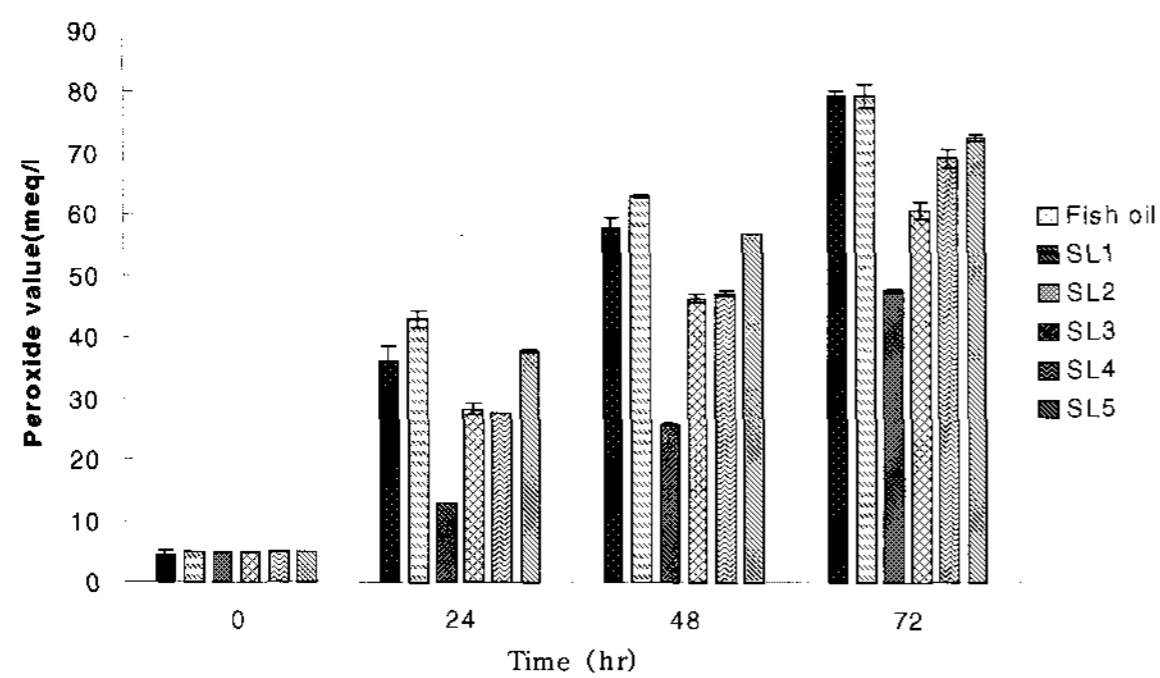


Fig. 4. Peroxide value of fish oil and structured lipids without and with antioxidant.

SL1(Fish oil : Soybean oil = 5:5) were synthesized by TLIM lipase for 24 hours at 55°C) SL2: SL1 + catechin 200 ppm, SL3: SL1 + BHT 200 ppm, SL4: SL1+ catechin 100 ppm + α -tocopherol 100 ppm, SL5: SL1 + BHT 100 ppm + α -tocopherol 100 ppm.

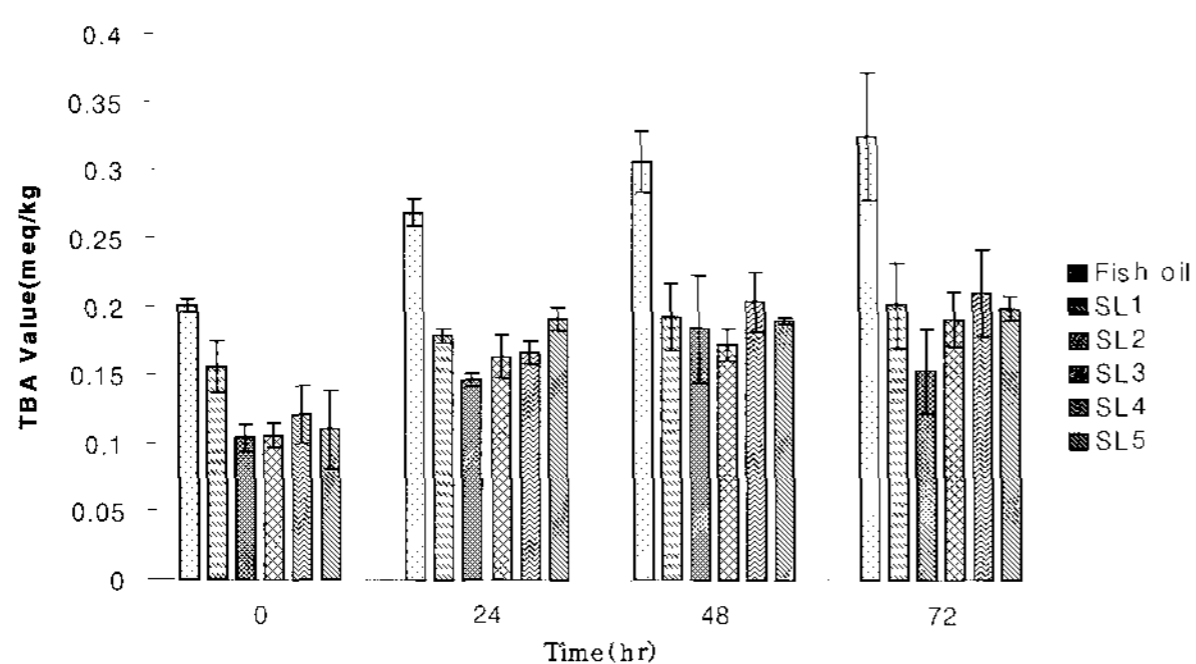


Fig. 5. TBA values of fish oil and structured lipids without and with antioxidant.

SL1(Fish oil: Soybean oil = 5:5) were synthesized by TLIM lipase for 24 hours at 55°C) SL2: SL1 + catechin 200 ppm, SL3: SL1 + BHT 200 ppm, SL4: SL1+ catechin 100 ppm + α -tocopherol 100 ppm, SL5: SL1 + BHT 100 ppm + α -tocopherol 100 ppm.

24시간 저장 이후부터는 어유의 POV값이 급격히 증가함을 보였다. 그 중 유도기간이 가장 길었던 catechin을 200 ppm 첨가한 SL2는 항산화제를 첨가하지 않은 어유와 재구성 지질 보다 약 67% 낮은 POV값을 나타내었다. 항산화제를 첨가한 그룹 중에서 SL2 > SL3 > SL4 > SL5 순으로 산화 안정성 패턴을 보였다. 따라서 단일 항산화제 첨가가 항산화제 혼합 첨가와 비교하여 높은 항산화력을 보임을 확인할 수 있었다.

POV값은 초기 산화 생성물인 peroxide를 측정하는데 자동 산화가 진행됨에 따라 최고 값을 지나면 감소하여 정확한 산패 정도를 알 수 없다(15). 따라서 후기 산화 생성물을 측정할 수 있는 TBARS를 동시에 측정하였다(Fig. 5). 대조구로 사용한 어유는 0시간보다 72시간의 TBARS 측정값이 약 60% 증가하였고, 높은 산화 안정성을 보이는 SL2는 어유와 비교하여 56% 낮은 값을 보였다. 최종 저장 시간인 72시간이 지남에 따라 처리구들은(SL2, SL3, SL4, SL5) 대조구(FO, SL1)와 비교하여 낮거나 비슷한 측정값을 보였다.

요 약

본 연구에서는 DHA-enriched fish oil 과 대두유를 비율 (w/w)을 달리하여 반응시키고 그 특성을 알아보았다. 어유의 비율이 증가할수록 trilinolein(LLL) peak는 감소하였고, 새로운 피크의 형성은 점차 증가하였다. 재구성 지질(어유 : 대두유 = 5 : 5, w/w, 55°C, 24 hr, 180 rpm)의 지방산 조성 분석 결과 대두유에서 볼 수 없었던 DHA가 약 13% 증가한 반면, linoleic acid는 24.17% 감소하였으며 포화 지방산의 함량은 약 23%, 불포화 지방산의 함량은 약 77% 이었다. 위치별 지방산 함량으로 sn-2 position은 약 linoleic acid 28%, oleic acid 22%, DHA 18% 그리고 palmitic acid 17% 이었다. 재구성 지질의 tocopherol 분석 결과 α -, γ -, δ -tocopherol 함량은 각각 23.58 mg/100 g, 32.28 mg/100 g, 17.94 mg/100 g이었다. 대두유와 비교하여 재구성 지질의 α -tocopherol은 2.1배 증가하였으며, γ -tocopherol은 1.6배 감소하였다. 유지의 산패 정도를 알아보기 위하여 유도기간 (induction period)을 측정된 결과 기질로 사용한 어유 보다 는 대두유와 어유를 반응시킨 재구성 지질의 유도기간이 길었으며, 재구성 지질에 항산화제를 첨가한 군 간의 유도 기간은 단일 항산화제를 첨가한 군이 최대 2.1배 길었다. 그리고 항산화제 첨가에 따른 향기 패턴을 알아본 결과 항산화제를 첨가하지 않은 그룹과 항산화제를 첨가한 그룹 간에 향기 패턴에 차이가 있음을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 현장협력기술개발사업(200704 01080019)의 지원에 의하여 수행된 연구 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Din, J.N., Newby, D.E., Flapan, A.D. (2004) Omega 3 fatty acids and cardiovascular disease-fishing for a natural treatment. *BMJ*, 328, 30-35
- Dyerberg, J., Bang, H.O., Hjorne, N. (1975) Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos. *Am. J. Clin. Nutr.*, 28, 958 - 966
- Simopoulos, A.P. (1991) Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am. J. Clin. Nutr.*, 54, 438-463
- Castillo, M., Amalik, F., Linares, A., García-Peregrín, E. (2000) Fish oil reduces cholesterol and arachidonic acid levels in plasma and lipoproteins from

- hypercholesterolemic chicks. *Mol. Cell. Biochem.*, 210, 121-130
5. 김봉현 역 (2001) 식용유지 그 이용과 유지 식품. 내하출판사, 서울, p24-32
 6. Lee, K.T. and Akoh, C.C. (1998) Structured lipids: synthesis and application. *Food Rev. Int.*, 14, 17-34
 7. Lee, K.T. and Akoh, C.C. (1997) Effects of selected substrate forms on the synthesis of structured lipids by two immobilized lipases. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74, 579-584
 8. AOCS (1990) 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.
 9. Intelligent Electronic Nose. (1998) FOX user manual. 2nd ed. Alpha M.O.S., Toubuse, France
 10. AOCS (1990) Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. 4th ed. American Oil Chemists' Society, Chicago, IL, USA. Cd 8-53, Cd 19-90.
 11. SAS Institute, Inc. (2000) SAS User's Guide. Statistical Analysis Systems Institute, Cary, NC, USA.
 12. Insel, P., Turner, R.E., Ross, D. (2001) Nutrition. Jones and Bartlett Publishers, London, UK, PP, 136-177
 13. Shin, J.A. and Lee, K.T. (2004) Lipase-catalyzed synthesis of structured lipids with capric and conjugated linoleic acid in a stirred-batch type reactor. *Korean J. Soc. Food Sci. Nutr.*, 33, 1175-1179
 14. Belitz, H.D. and Grosch, W. (1999) Food Chemistry, 4th., Springer Publishing Co., Berlin, New York, 184-185
 15. Richard, D. and O'Brien. (2004) Fats and Oils: formulating and processing for application, 2nd ed., CRC Press Publishing Co., Boca Raton, U.S.A., 192-199

(접수 2008년 3월 2일, 채택 2008년 5월 9일)