

고정화 효소를 이용한 1,3-디글리세리드의 선택적 합성에 관한 연구

정대원[†] · 조미혜

수원대학교 공과대학 신소재공학과
(2009년 6월 19일 접수, 2009년 7월 5일 채택)

Study on the Immobilized Lipase-Mediated Selective Synthesis of 1,3-Diglyceride

Dae-won Chung[†] and Mi Hye Cho

Department of Polymer Engineering, College of Engineering, Suwon University, Suwon 400-600, Korea
(Received June 19, 2009; accepted July 5, 2009)

최근 1,3-디글리세리드(1,3-DG)는 트리글리세리드(TG)와 대사 기구가 달라, 체지방으로 체내에 축적되지 않는 것으로 알려져 주목을 받고 있다. 본 논문에서는 고정화 리파제를 사용한 1,3-DG의 선택적 합성에 관하여 연구하였다. 글리세린과 올레인산(OA)의 몰비를 1 : 2로 고정화 한 후 진공 하에서 수행한 에스테르 합성 반응에서 있어서, 반응 온도 및 리파제의 양에 따른 모노글리세리드(MG), DG, TG 및 DG 중의 1,3-DG의 함량 변화를 분석하였다. 온도가 높아질수록 또한 리파제의 사용량이 늘어날수록 OA의 감소 속도로 측정된 반응 속도는 빨랐으며, DG 함량이 최대치에 도달한 이후에는 MG, DG 및 TG의 함량에는 많은 변화가 발생하는 것을 확인할 수 있었다. 반응 온도가 높을수록 또는 고정화 리파제를 10 wt% 사용하였을 때는 DG 및 1,3-DG의 함량이 현저하게 저하되면서 TG가 주생성물이 되었다.

It is known that 1,3-diglyceride (1,3-DG) hardly accumulates inside human body because the metabolism of 1,3-DG is entirely different from that of general fats such as triglycerides (TG). This research focuses on the selective synthesis of 1,3-DG by the esterification reaction using an immobilized lipase. For a reaction between glycerin and oleic acid (OA) with a mole ratio of 1 : 2 under vacuum, changes in the compositions of monoglyceride (MG), TG and DG and the contents of 1,3-isomers in DG were investigated, as a function of reaction temperature and the amount of lipase. The reactivities determined by the rate of the consumption of OA became higher with increased in temperature and the amount of lipase. Changes in the compositions of MG, DG and TG, however, occurred after the DG content reached maximum, which were found to be dependent on various factors. TG was a main product, and significant decrease in the amount of both 1,3-DG and DG were observed, when reactions were carried out at high temperatures or when 10 wt% of lipase was used.

Keywords: 1,3-diglyceride, lipase, esterification, oleic acid, selective synthesis

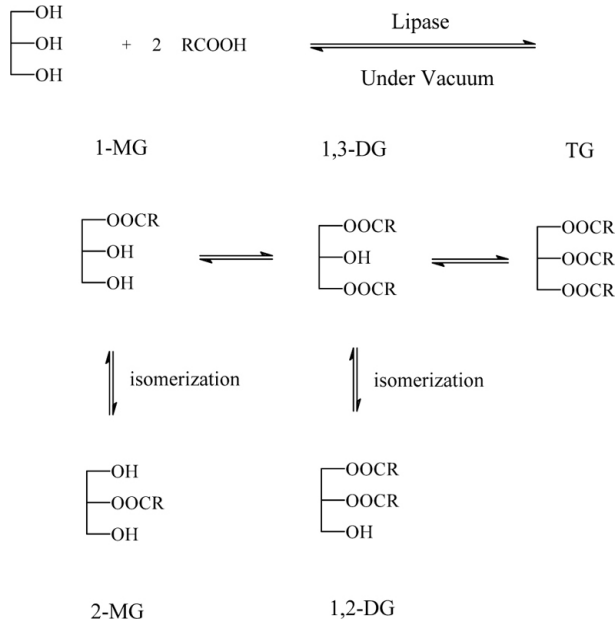
1. 서 론

지방(Fats) 또는 유지(oils)는 에너지원으로 작용하는 트리글리세리드(TG)를 주성분으로 하는 혼합물을 통칭한다. TG는 glycerol의 3개의 -OH 모두에 지방산이 에스테르 결합으로 연결되어 있는 물질이며, 디글리세리드(DG)는 2개, 모노글리세리드(MG)는 1개가 붙어 있는 물질이며, 이들 물질을 통칭하여 글리세리드(glyceride)라고 부른다. 일반적으로 MG는 비이온성 계면활성제로서의 특징을 지니고 있으며, 다양한 형태의 지방산을 포함하는 유도체가 개발되어 식품, 화장품 및 의약품 공업에서 유화제로 널리 사용되고 있다[1-3]. 반면에 DG는 MG와의 혼합물 형태로 유화제로 사용되는 것[4] 이외에는 특별한 용도가 없는 이유로 많은 연구가 수행되어 오지 않았으나, 최근 위치 이성질체에 따라 DG의 대사 기구가 변화하는 것으로 알려져 주목을 받고 있다[5].

일반적으로 섭취된 TG는 췌장 리파제(pancreatic lipase)에 의해 1- 및 3- 위치가 가수분해되어 2-MG로 변환되어 소장에서 흡수된 후에, TG로 재구성되어 체내에 축적되게 된다. 반면에 DG에는 지방산의 결합 위치에 따라 1,2-DG와 1,3-DG, 2종류의 구조가 존재하는데, 1,2-DG의 소화 및 흡수 기구는 TG와 동일하나, 원래 2위치에 지방산이 결합되어 있지 않은 1,3-DG는 TG처럼 2-MG로 가수분해될 수 없으므로, 유리 지방산 형태로 완전하게 가수분해되는 것으로 알려져 있다. 즉, 1,3-DG는 유리 지방산의 형태로 간으로 수송되어 β -산화되는 형태로 에너지 대사가 일어나, 탄산가스와 물로 분해된다. 따라서, 1,3-DG는 체지방으로 축적되기 어려운 것으로 판단되고 있으며, 실제적으로 1,3-DG를 다량 포함하는 식용유의 경우, 기존의 식용유(TG)에 비해 체지방 감소 효과가 있는 것으로 임상실험을 통하여 확인되었으며 [6,7] 일본의 Kao에서는 세계에서 최초로 약 70%의 1,3-DG 및 30%의 1,2-DG로 구성된 식용유를 제품화하였다.

DG를 합성하는 화학적 방법은 무척이나 다양하나, 최근에는 리파제를 이용한 1,3-DG의 선택적 합성에 관하여 많은 연구가 수행되고

[†] 교신저자 (e-mail: dwchung@suwon.ac.kr)



Scheme 1. Lipase-catalyzed esterification reaction of oleic acid and glycerin.

있다. 기본적으로 DG를 합성하는 방법에는 TG의 부분가수분해, TG와 글리세린과의 에스테르교환 반응(glycerolsis) 및 글리세린과 지방산의 에스테르화 반응 등이 있다. 상기 3가지 방법 중에서, 화학적인 방법에 의해서는 TG의 부분가수분해 방법이 예전부터 주로 연구되어 왔으나 선택적 합성을 위해서 리파제를 사용할 경우에는 대부분의 리파제가 1,3-선택성을 지니고 있는 탓에 생성되는 DG는 대부분 1,2-이성질체이었다[8]. 따라서, 1,3-DG를 선택적으로 합성하기 위해서는 나머지 2방법이 주로 연구되고 있으며[9-13], 상업적으로는 지방 또는 유지를 부분 가수분해하여 유리 지방산의 함량을 높인 후 1,3-특이성의 리파제를 사용하여 글리세린과 직접 에스테르화 하는 방법이 사용되는 것으로 알려져 있다[14].

리파제를 사용한 지방산과 글리세린의 에스테르화 반응은 Scheme 1에서 볼 수 있듯이 생성물의 종류가 다양하고, 또한 acyl migration에 의하여 이성질체가 생성될 뿐만 아니라, 생성물 사이에서 alcoholysis 반응까지 일어나므로, 반응 기구를 구체적으로 규명하는 것은 불가능하다. 그러나 2-MG는 극미량만이 생기므로 무시 가능한 것으로 알려져 있으며[15], 1,3-DG와 1,2-DG의 천연에서의 비는 약 7:3 정도인 것으로 알려져 있다[16]. 그러나, 에스테르 반응이 종료된 시점(즉, 지방산이 전부 반응한 후) 이후에 발생하는 글리세리드의 함량 변화에 대해서는 연구되어 있지 않다.

본 논문에서는 상용화되어 있는 고정화 리파제 중에서 적용할 수 있는 온도 범위가 가장 넓은 것[16]으로 알려져 있는 Novozym 435를 사용하여, 반응 온도 변화에 따른 생성물 중의 글리세리드의 조성변화에 관하여 중점적으로 연구하였다. 기본적으로는, 천연에 가장 많이 존재하는 불포화 지방산인 올레인산(OA)을 지방산으로 사용하여 글리세린과 OA의 반응 몰비를 1:2로 고정하고, 에스테르화 반응에서 생성되는 수분을 제거하기 위해서 진공을 걸어준 상태에서, 무용매 조건에서 에스테르화 반응을 수행하였다. 구체적으로는, 반응 온도 및 리파제의 사용량의 변화에 따른 각각의 생성물의 함량비와의 상관관계를 규명하고, 글리세린과 OA의 에스테르화 반응의 최적화에 관한 연구를 하였다.

2. 실험

2.1. 시약 및 기기

합성에 사용한 글리세린과 OA는 Shinyo Pure Chemical사의 제품을 사용하였고, 고정화 리파제는 Novozyme A/S (Bagsvaerd, Denmark)사의 Novozym 435 (activity:10000 PLU/g)을 사용하였다. 지방산 적정에 필요한 0.1 N-ethanolic KOH 용액은 대정화금주식회사의 제품을 사용하였고, 그 외의 시약은 알드리치 제품을 사용하였다. 글리세리드의 정량 분석을 위한 표준 물질로 사용한 monoolein (1-oleoyl-rac-glycerol, 99%), 1,3-diolein (99%), 및 triolein (glycerol trioleate, 99%)은 Sigma에서 구입하였다.

고속액체크로마토그래피(HPLC) 측정은 Supelcosil LC-Si를 칼럼으로, Evaporative Light Scattering Detector (ELSD)를 detector로 사용하였다. 용출 용매로는 benzene: chloroform: acetic acid (부피비로 70 : 30 : 2)를, 용출 속도는 1 mL/min의 조건으로 하였다.

2.2. 에스테르화 반응

500 mL 둥근 바닥 플라스크에 글리세린(10 g)과 OA (61.2 g)를 몰비로 1:2가 되도록 넣고 무용매 조건에서 일정량의 Novozym을 첨가하여 200 rpm의 교반속도 하에서 반응을 진행하였다. 또한, 에스테르화 반응에서 발생하는 수분을 효과적으로 제거하기 위해서, vacuum controller가 부착된 peristaltic pump (NSE 800, KNF사 제조)를 사용하여 1 Torr 이하의 압력에서 반응하였다. 온도에 따른 글리세리드의 함량 변화를 알아보기 위해 리파제 양은 OA 대비 6 wt%를 첨가하고 40 °C에서 80 °C까지 10 °C의 차이를 두어 온도를 바꾸어 가면서 반응을 하였다. Novozym의 양에 따른 글리세리드의 함량 변화를 알아보기 위해서 50 °C에서 2 wt%, 6 wt%, 10 wt%를 넣어 반응을 하였다.

반응개시 후, 일정시간 간격으로 샘플 약 0.2 g을 채취하여 4 mL의 클로로포름을 첨가하여 여과를 함으로써 고정화 리파제인 Novozym을 제거하였다. Thin layer chromatography (TLC)를 통하여 반응의 진행상황을 정성적으로 확인하였으며, HPLC를 통하여 생성된 DG, TG, MG의 함량 변화 분석 및 1,3-DG와 1,2-DG의 상대비를 측정하였다. 반응물 중의 글리세리드의 정량분석을 위하여 1,3-diolein, monoolein 및 triolein을 사용하여 검량선을 작성한 후에, 각각의 글리세리드의 몰%로 변환하였다.

OA의 함량변화를 알아보기 위해 일정시간 간격으로 약 0.1 g의 샘플을 채취하여 원심분리기(4000 rpm에서 4 min)를 통해 Novozym을 분리한 후, 위층의 생성물을 정확하게 0.5 g 취하였다. 여기에 ethanol : ether (1 : 1) 용액 20 mL을 넣고 1% phenolphthalein 용액을 한 방울 떨어뜨린 후 0.1 N-ethanolic KOH 용액으로 적정하여, 반응 전의 샘플과 비교한 OA의 잔류량을 mol%로 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 글리세리드의 분석

일반적으로 여러 종류의 글리세리드가 혼합된 물질의 정량분석을 위해서는 thin layer chromatography-flame ionization detector (TLC-FID) 또는 HPLC가 사용되어진다. TLC-FID는 보다 간편하게 분석할 수 있다는 장점이 있으나, 상대적으로 정량성이 떨어진다 단점이 있다[12]. 따라서 본 논문에서는 기존의 방법[17]을 약간 수정하여 HPLC에 의해 분석하였으며, 글리세리드와 같이 점성이 있는 물질의 분석에서는 refractive index (RI) 검출기보다 정량성이 뛰어난 것으로

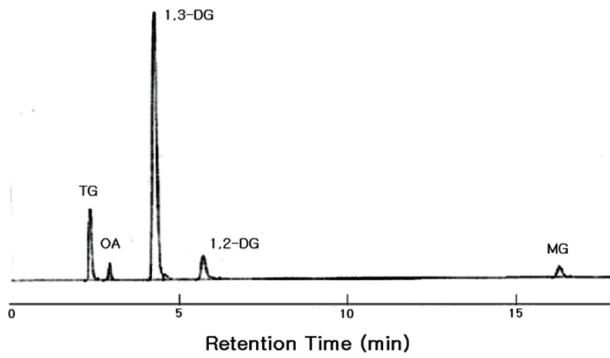


Figure 1. HPLC chromatogram of the reaction mixture.

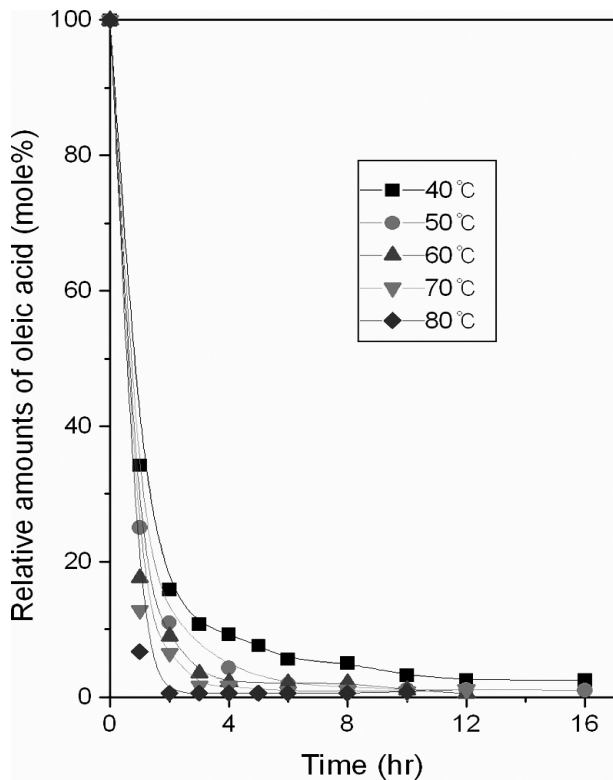


Figure 2. Relative amount of oleic acid (mole%) in esterification reactions at various temperatures at 40 °C (■), 50 °C (●), 60 °C (▲), 70 °C (▼), and 80 °C (◆).

알려져 있는[18] ELSD를 검출기로 사용하였다. 반응 중인 샘플의 분석 결과를 Figure 1에 나타난 바와 같이 순상 컬럼을 사용하였을 때 나올 수 있는 순서로 분석되었으며, 기존의 결과[16,17]와 동일한 것을 알 수 있다. 본 연구에서는 지방산으로 올레인산을 사용하였으므로, 각각의 글리세리드의 표준물질들을 구입할 수 있었다. 즉, monoolein, 1,3-diolein 및 triolein은 MG, 1,3-DG 및 TG에 해당하는 물질이므로 용이하게 정성분석을 할 수 있었으며, 표준물질들을 사용하여 검량선을 작성한 후, HPLC 상에서 나타나는 글리세리드 각각의 피크의 면적으로부터 정량 분석을 수행하였다. 단, 1,2-DG는 1,3-DG와 동일한 검량선을 사용하여 정량 분석하였다.

3.2. 온도에 의한 영향

Novozym양을 지방산 대비 6 wt%로 고정하고, 200 rpm, 1 Torr 이

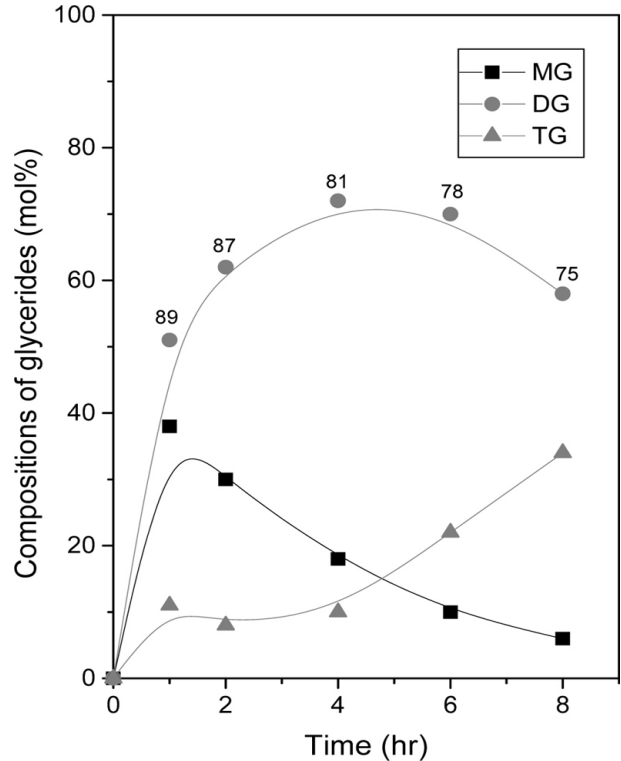


Figure 3. Compositions of MG (■), DG (●), and TG (▲) in esterification reactions at 50 °C. The values inserted mean 1,3-DG content (%) in total DG.

하의 감압 하에서 40 °C에서부터 Novozym이 활성을 나타내는 최대온도로 알려져 있는 80 °C까지 10 °C 간격으로 온도를 바꾸어 가면서 에스테르화 반응을 수행하였다. 본 반응을 단순하게 지방산인 OA와 글리세린과의 에스테르화 반응이라는 관점에서 보면, OA의 소모 속도만으로 반응속도를 평가할 수 있다. 각각의 온도에서의 시간에 따른 OA의 함량 변화를 측정된 결과를 Figure 2에 나타내었다. 온도가 높을수록 반응속도가 빨라지는 일반적인 양상을 보였으며, 40 °C에서는 16 h이 경과하여도 약 3 mol% 정도의 OA가 남아있는 것으로 나타났다. 나머지 온도에서도 반응을 계속하여도 지방산은 완전하게 소모되지 않고 1 mol% 이내로 계속 존재하는 것으로 나타났다. 일반적으로 글리세린 대비 지방산을 몰기준으로 2배에서 2.5배 사용한 경우에는 미량의 지방산이 잔류한다는 기존의 연구 결과[17]와 일치하는 경향을 보였다. 따라서 본 연구에서도 1 mol%의 OA가 잔류하는 시점을 반응의 종료점으로 표현하기로 한다.

동일한 반응에 있어서의 반응 혼합물 중의 글리세리드(MG, DG 및 TG)의 상대적인 함량을 나타낸 결과를 Figure 3 (50 °C)에서 Figure 6 (80 °C)까지 나타내었다. 40 °C에서는 Figure 2에 나타난 것과 같이 반응이 종료되지 않았으므로 제외하였으며, 각각의 Figure에서 DG의 함량을 나타내는 표시(●) 위에 표기되어 있는 숫자는 DG 중의 1,3-DG의 함량%를 의미한다.

모든 온도에서 반응이 진행됨에 따라 DG의 함량이 늘어나며 OA가 전부 소모되는 시점에서 DG의 함량이 최대가 된다는 것을 알 수 있다. 즉, 50 °C에서는 Figure 2에 나타난 바와 같이 6 h 경과 후에 OA가 전부 소모되며, Figure 3에 나타난 바와 같이 4 h에서 6 h 사이에 DG의 함량은 최대가 된다. 마찬가지로, 80 °C에서는 2 h에 OA가 전부 소모되며 Figure 6에 나타난 바와 같이 1 h에서 2 h 사이에 DG의

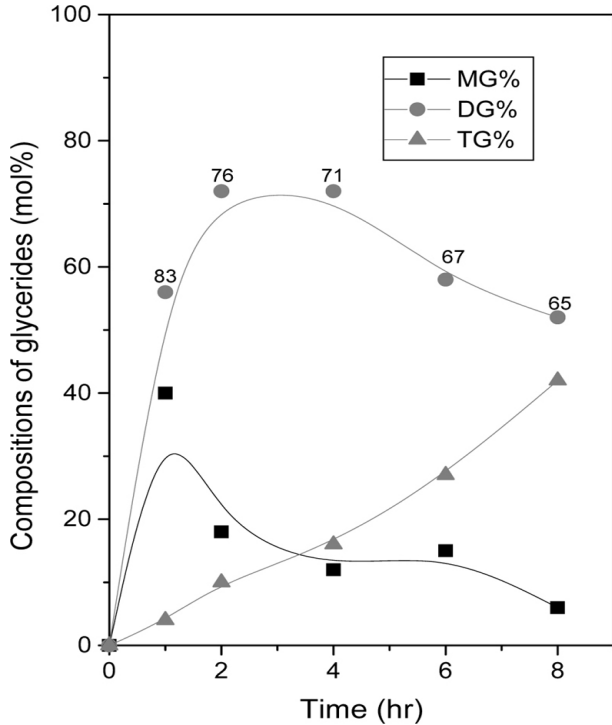


Figure 4. Compositions of MG (■), DG (●), and TG (▲) in esterification reactions at 60 °C. The values inserted mean 1,3-DG content (%) in total DG.

함량이 최대가 되는 것을 알 수 있으며, 나머지 온도에서도 비슷한 경향이 나타나는 것을 알 수 있다. 또한, DG 중의 1,3-DG의 함량은 에스테르화 반응 초기에 최대치를 나타내고 그 후에는 감소하는 경향을 나타냈으며, 이 현상은 모든 온도에서 동일하게 나타났다. 이는 Novozym이 지니고 있는 1,3-선택성이 반응 초기에 더 발현되기 용이하기 때문으로 판단된다.

최대 DG 함량에 도달한 이후에도 각각의 생성물의 함량에는 변화가 일어나며, 이는 생성되는 글리세리드 사이에 glycerolysis (acylation, 화학적으로는 에스테르 교환반응)이 일어나서 각각의 함량에 변화가 생기는 것으로 판단된다. Figures 3~6에서 알 수 있듯이, 전체적으로 최대 DG 함량에 도달할 때까지는 MG도 함께 증가하지만 그 후로는 DG 및 MG의 함량이 줄고 TG가 상대적으로 늘어나는 것을 알 수 있다. 또한, 온도가 높을수록 최대 DG 함량에 도달하는 시간은 빠르지만 DG의 최대 함량치는 오히려 낮아지는 경향을 나타내었다. 이는, 온도가 높을수록 전체적인 반응속도가 높아져서 일단 생성된 DG가 TG로 빠르게 전환되기 때문에, Novozym이 지닌 DG 선택성(DG를 우선적으로 생성하는 특성)이 발휘되기 어렵기 때문으로 판단된다. 또한, DG 함량이 최대에 도달한 이후에도 역시 온도가 높을수록 DG의 함량이 급격하게 저하됨과 동시에 TG의 함량은 상대적으로 증가하는 것을 알 수 있으며, 이에 따라 MG의 함량은 저하된다. 이와 같은 현상 역시 온도가 높을수록 DG에서 TG로의 반응속도가 증가할 뿐만 아니라 에스테르화 반응의 부산물로 생성되는 물을 효율적으로 제거할 수 있으므로 역반응을 억제할 수 있기 때문으로 판단된다. 따라서 DG의 상대적 생성량을 극대화하기 위해서는 반응온도가 낮을수록 유리하다고 판단할 수 있다.

상기의 해석은, DG 생성량이 최대에 도달한 이후에 발생하는 글리세리드 사이의 반응(glycerolysis) 역시 Novozym에 의해 기인한다는

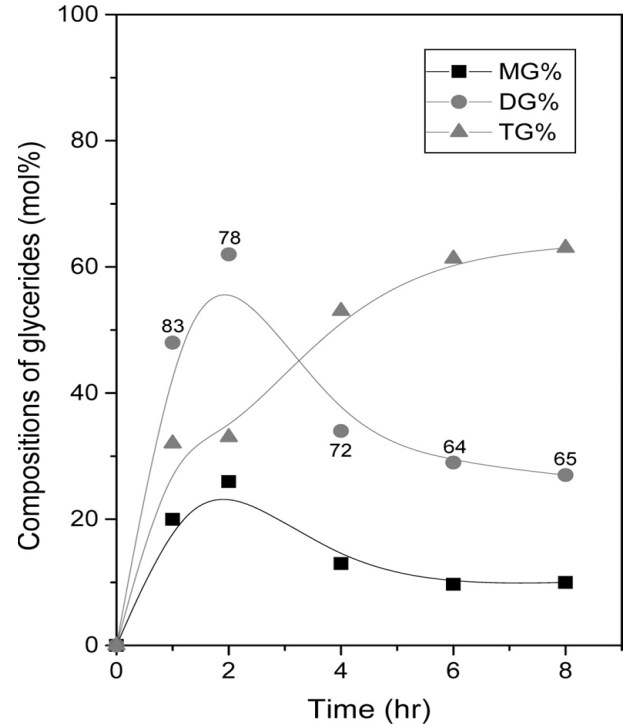


Figure 5. Compositions of MG (■), DG (●), and TG (▲) in esterification reactions at 70 °C. The values inserted mean 1,3-DG content (%) in total DG.

가설 하에 성립되는 것으로, 이를 확인하기 위해서 다음과 같은 실험을 진행하였다. 50 °C에서 6 wt%의 Novozym을 사용하여 반응을 시작하고 Figure 3에서부터 지방산은 거의 없으며 DG 함량이 최대일 것으로 예측할 수 있는 시점(4 h 후)에 도달하면, 반응물을 반으로 나누어 한쪽은 리파제가 존재하는 그대로 반응을 진행하고, 나머지 한쪽은 신속하게 여과를 통하여 리파제를 제거한 뒤에 반응을 계속한 결과, Figure 7에 나타내는 것과 같이 리파제를 제거한 후에는 장시간 반응을 계속 진행하여도 글리세리드의 함량에는 변화가 거의 없는 것을 알 수 있다. 즉, 지방산과 글리세린의 에스테르화 반응은 물론이고, DG 생성량이 최대에 도달한 이후에 발생하는 글리세리드 사이의 반응 역시 Novozym에 의해 촉진되는 것을 확인할 수 있었다.

생성되는 DG 중의 1,3-DG 함량은 전체적으로 반응시간의 경과에 따라서 저하되며, 전체 DG 함량이 저하할수록(즉, 반응온도가 높을수록) 급격하게 저하되는 것을 알 수 있다. 이와 같은 현상의 발생 요인으로는 다음과 같은 2가지 가능성이 있다.

① 일단 생성된 DG가 TG로 변화하는 과정에서, 1,2-DG와 1,3-DG의 반응성의 차이에 의해서 발생

이 경우라면, 각각의 이성체의 입체적 장애요인(즉, steric hindrance) 및 Novozym의 1,3-위치 선택성(1,3-position specificity)을 고려하여도 1,3-DG의 함량이 증가하여야 된다. 즉, 1,3-DG의 2-position 보다는 1,2-DG의 3-position이 반응할 가능성이 절대적으로 높으므로, 남아있는 DG 중에서 1,3-DG의 상대적 함량이 증가하여야 되므로 본 실험결과와는 모순된다.

② 1,3-DG와 1,2-DG의 이성화 반응에 의해서 발생

일반적으로, 1,3-DG와 1,2-DG의 이성화 반응은 온도에 매우 민감하며, 열역학적 평형에서는 1,3-DG의 함량이 약 65%인 것으로 알려져 있다. 실제적으로 리파제가 존재하지 않는 조건에서 1,3-이성체가

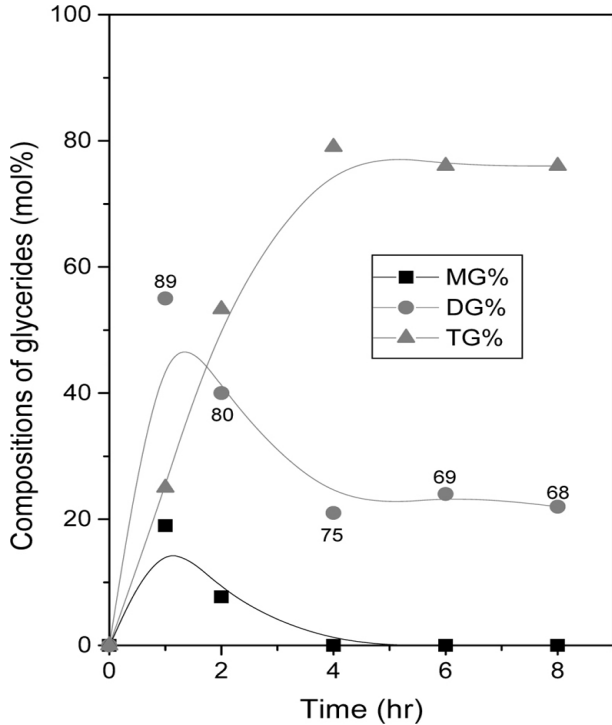


Figure 6. Compositions of MG (■), DG (●), and TG (▲) in esterification reactions at 80 °C. The values inserted mean 1,3-DG content (%) in total DG.

87%인 DG를 50 °C에서 10 h 보관하여도 변화가 없는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 온도가 높을수록 생성된 DG 중의 1,3-이성체 함량이 저하되는 것은 이성화 반응에 의한 것으로 판단된다. 일반적으로 acyl migration로 통칭되는 이성화 반응[15]은 분자 내에서 발생하는 에스테르 교환반응에 의한 것으로 사료되나, 구체적인 반응 기구는 밝혀져 있지 않다.

결론적으로 반응온도가 높아지면 반응 속도는 빨라지나 DG 함량이 저하되며, 특히 1,3-DG 함량은 현저하게 저하되었다.

3.3. Novozym 양에 의한 영향

상기 결과에서 최적온도로 판단된 50 °C로 반응온도를 고정하고, Novozym양을 지방산 대비 2, 6, 10 wt%로 바꾸어가면서 동일한 조건 하에서 에스테르화 반응을 수행하였으며, 각각의 반응 결과를 2 wt% (Figure 7) 및 10 wt% (Figure 8)에, 6 wt%의 data는 Figure 3에 이미 나타내었다. 먼저, Novozym을 OA 대비 2 wt%를 사용한 경우에는 약 8 h이 지난 후에 OA가 소멸되었으며, 10 wt%를 사용한 경우에는 2 h 이내에 OA가 완전하게 소멸되는 것으로 나타나, 효소 사용량이 높아질수록 지방산의 소모가 더 빠르다는 것을 알 수 있었다. 반면에 Novozym 양이 많아질수록 최대 DG 함량에 도달하는 시간은 빠르지만 DG의 최대 함량은 오히려 낮아지는 경향을 나타내었다. 즉, 2 wt% (Figure 8)에서는 약 75%, 6 wt% (Figure 3)에서는 약 70%이나, 10 wt% (Figure 9)에서는 약 50%로 현저하게 낮아지는 것을 확인할 수 있다. 이와 같은 현상은, Novozym 양을 6 wt%로 고정하고 반응온도를 높일수록 나타내는 변화와 매우 유사하다. 즉, Novozym 양이 늘어날수록 전체적인 반응속도가 높아져서 일단 생성된 DG가 TG로 빠르게 전환되기 때문에, Novozym이 지닌 DG 선택성(DG를 우선적으로 생성하는 특성)이 발휘되기 어렵기 때문으로 판단된다. 실제적으로

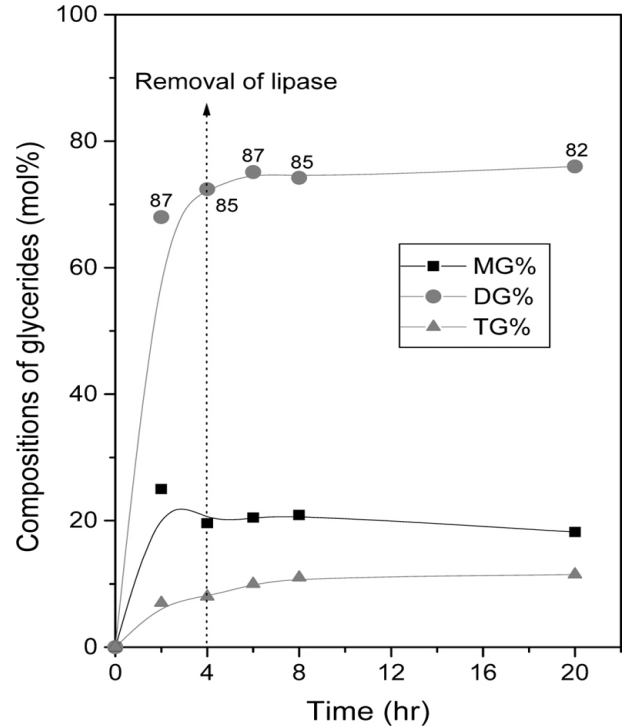


Figure 7. Compositions of MG (■), DG (●), and TG (▲) in the esterification reactions at 50 °C when the lipase was removed at 4 hr.

로 TG의 생성은 Novozym 양이 늘어날수록 증가하는 것을 알 수 있다. 예를 들어, 8 h에서 TG의 함량은 2 wt%에서 약 20%, 6 wt%에서 약 35%, 10 wt%에서는 약 60%로 급격하게 증가하는 것을 알 수 있다.

생성되는 DG 중의 1,3-DG 함량은 매우 흥미로운 현상을 나타내고 있다. 먼저, 반응시간은 서로 다르더라도 최대 DG 함량까지 도달한 경우의 1,3-DG 함량은 Novozym 양이 증가할수록 낮게 나타났다. 이는 양이 증가할수록 Novozym이 지닌 고유의 1,3-position 특이성(즉, 1,3-DG를 우선적으로 생성하는 특성)이 발휘되기 어렵기 때문으로 판단된다. 반면에, 최대 DG 함량 이후에 반응을 계속할 경우, 1,3-DG의 상대적 양이 저하되는 것을 알 수 있다. 단, 10 wt%의 경우에는 최대 DG 함량에서 이미 1,3-DG가 73%로 열역학적 평형(66%)에 근접해 있으므로 급격하게 1,3-DG 함량이 저하되지 않은 것으로 판단되며, 2 wt%의 경우에는 반응이 워낙 느려서 충분한 데이터를 얻지는 못했지만, 10 h에 83%, Figure 8 상에는 나타내지 않았으나 24 h 후에는 78%를 나타내, 매우 느린 속도이기는 하지만 1,3-DG의 함량이 역시 저하되는 것을 알 수 있다. 따라서 반응 중에 발생하는 1,3-DG 함량의 저하를 고찰하면, 상기에서 설명한 바와 같이 1,2-DG와 1,3-DG가 TG로 변환할 때의 반응성 차이에 의해서 발생하는 것은 아니며, 또한 Novozym이 존재하지 않는 경우에는 50 °C에서 10 h 이상 이성화반응이 일어나지 않았다는 실험 결과를 고려하면, 1,3-DG가 1,2-DG로 변화하는 이성화반응에 효소가 관여한다는 사실을 나타내고 있다.

이상의 결과를 종합하면, Novozym을 과량 사용하였을 경우에는 반응 자체는 빠르지만 오히려 DG 및 1,3-DG의 상대적 함량을 저하시킨다. 따라서 Novozym을 적당량 사용하였을 때, 높은 DG함량과 1,3-DG이성체 함량을 얻을 수 있으며, 반응속도를 고려하였을 때 본 실험 조건에서는 지방산 대비 6 wt%의 Novozym을 사용하는 것이 최적인 것으로 판단된다.

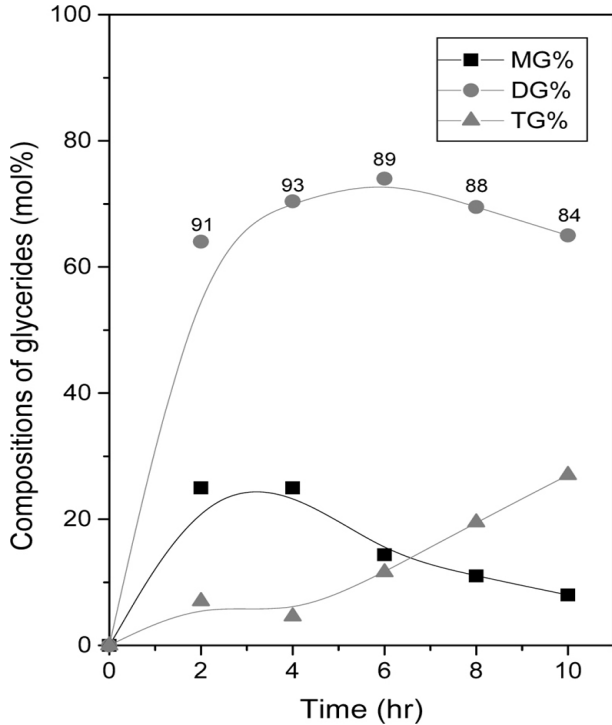


Figure 8. Compositions of MG (■), DG (●), and TG (▲) in the esterification reactions at 50 °C with lipase content of 2 wt%.

4. 결 론

본 연구에서는 상용화된 고정화 리파제인 Novozym의 존재 하에서, 글리세린과 OA의 에스테르화 반응을 수행하여, DG 및 1,3-DG의 선택적 합성에 관하여 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 반응온도가 높을수록 반응속도는 빨라지나, DG 및 1,3-DG의 함량을 최대로 하기 위해서는 반응 온도가 낮을수록 유리하다. 그러나 반응속도를 고려하였을 때는 50 °C가 최적인 것으로 판단된다.

2) 반응 초반에는 리파제에 의한 에스테르화 반응이 일어나나, DG 함량이 최대가 된 시점(지방산이 전부 소모된 시점과 동일) 이후에 발생하는 MG, DG 및 TG 함량의 변화는 리파제에 의한 생성물간의 반응(glycerolysis)에 의한 것으로 판단된다.

3) 리파제를 과량 사용하였을 경우에는 오히려 DG 및 1,3-DG의 상대적 함량이 저하되었다. 반응속도를 고려하였을 때, 본 실험 조건에서는 지방산 대비 6 wt%의 리파제를 사용하는 것이 최적인 것으로 판단된다.

감 사

본 연구는 보건복지부의 보건의료기술연구개발사업(01-PJ4-PG4-01VN01-0030)의 지원을 받았으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Y. C. Ro, K. D. Nam, J. T. Kim, and K. H. Jo, *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **5**, 209 (1994).
2. T. N. Kumar, Y. S. R. Sastry, and G. Laksh, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **66**, 153 (1989).
3. K. H. Jo, T. Y. Kim, S. U. Kim, N. H. Jeong, and K. D. Nam,

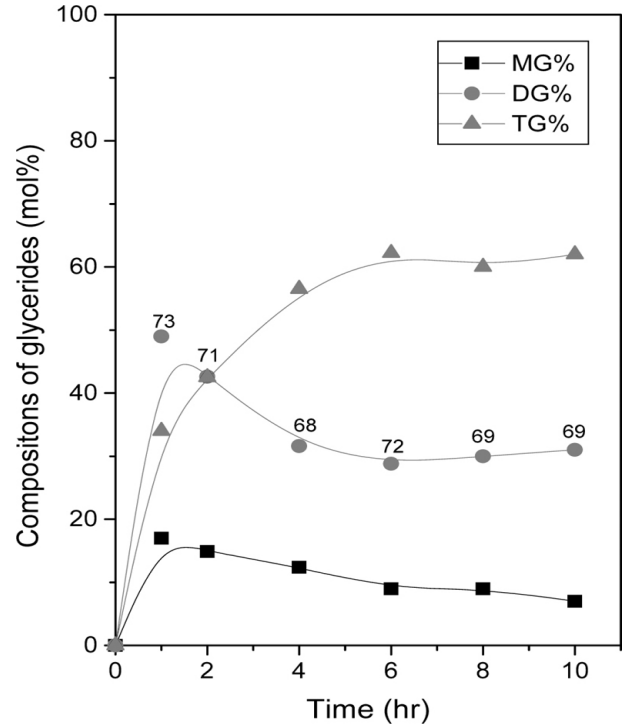


Figure 9. Compositions of MG (■), DG (●), and TG (▲) in the esterification reactions at 50 °C with lipase content of 10 wt%.

- J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **5**, 99 (1994).
4. F. J. Plou, M. Barandiaran, M. V. Calvo, A. Ballesteros, and E. Pastor, *Enzyme Microb. Technol.*, **18**, 66 (1996).
5. X. H. Meng, D. Y. Zou, Z. P. Shi, Z. Y. Duan, and Z. G. Mao, *Lipids*, **39**, 37 (2004).
6. K. C. Maki, M. H. Davidson, R. Tsushima, N. Matsuo, I. Tokimitsu, and D. M. Umporowicz, *Am. J. Clin. Nutr.*, **76**, 1230 (2002).
7. X. H. Meng, D. Y. Zou, Z. P. Shi, Z. Y. Duan, and Z. G. Mao, *Lipids*, **39**, 37 (2004).
8. T. Nagao, H. Watanabe, N. Goto, K. Onizawa, H. Taguchi, N. Matsuo, T. Yasukawa, R. Tsushima, H. Shimasaki, and H. Itakura, *J. Nutr.*, **130**, 792 (2000).
9. M. Berger, K. Laumen, and M. P. Scheider, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **69**, 955 (1992).
10. Y. Isono, H. Nabetani, and M. Nakajima, *J. Ferment. and Bioeng.*, **80**, 170 (1995).
11. M. Mohamed, T. Uwe, and D. Rolf, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **75**, 703 (1998).
12. R. Rosu, M. Yasui, Y. Iwasaki, and T. Yamane, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **76**, 839 (1999).
13. D-w. Chung, J. H. Song, and M. J. Baek, *J. Ind. Eng. Chem.*, **16**, 731 (2005).
14. M. Sugiura, M. Shimizu, N. Yamada, and Y. Yamada, W.O. Patent 9,909,119 (1999).
15. T. Watanabe, M. Shimizu, M. Sugiura, M. Sato, J. Kohori, N. Yamada, and K. Nakanishi, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **80**, 1201 (2003).
16. J. B. Kristensen, X. Xu, and H. Mu, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **82**, 329 (2005).
17. Z. Guo and Y. Sun, *Food Chem.*, **100**, 1076 (2007).
18. B. Marcato and G. Cecchin, *J. Chromatogr., A*, **730**, 83 (1996).