

회분식 반응기를 이용한 Glycerol Monooleate와 Conjugated Linoleic Acid로부터 효소적 반응을 통한 디글리세롤 유지의 합성

전미선 · 이기택[†]
충남대학교 식품공학과

Enzymatic Synthesis of Diacylglycerol Oil from Glycerol Mono-oleate and Conjugated Linoleic Acid Using a Stirred-Batch Type Reactor

Mi-Sun Jeon, Ki-Teak Lee[†]

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

Abstract

Diacylglycerol (DAG) was produced by enzymatic esterification of glycerol mono-oleate (GMO) and conjugated linoleic acid (CLA) in a stirred-batch type reactor. The reaction was catalyzed by lipozyme RMIM (an immobilized lipase from *Rizomucor miehei*). DAG was isolated by a short-path distillation process and decolorized. DAG oil was composed of 87.3% DAG, 11.4% triacylglycerol (TAG), and 1.5% monoacylglycerol (MAG) (all w/w). Major fatty acids in DAG oil were oleic acid (54%), CLA (31.1%), and linoleic acid (7%). DAG oil iodine, and acid values were 108.8, 2.57, and 1, respectively. The DAG oil solid fat index (SFI) and thermograms were obtained using differential scanning calorimetry.

Key words : glycerol monooleate, conjugated linoleic acid, diacylglycerol oil, lipozyme RMIM, short path distillation

서 론

최근 디글리세롤 유지(diacylglycerol oil, DAG oil)는 체중개선의 효과가 있는 기능성 유지로 알려지고 있다. 보고에 따르면 DAG oil 중 일부는 소화과정에서 1(3)-monoacylglycerol (1(3)-MAG)와 free fatty acid(FFA)로 분해된 뒤 간에서 β -oxidation 통해 바로 연소되기 때문에 혈중 지방치를 낮추어 주어 triacylglycerol(TAG) 형태로 구성되어 있는 일반 식용유지를 섭취하였을 경우 보다 체중감소 효과가 있다고 알려져 있다(1-3). 이에 따라 DAG가 주성분으로 구성되어 있는 식용유 제품으로 일본과 미국에서 Econa와 Enova라는 브랜드로 판매 되고 있다.

최근에는 효소 반응을 통한 DAG oil의 합성 연구가 진행되고 있는데 그 이유는 효소적 반응이 화학적 방법보다 낮은 온도에서 행해져 에너지 소비가 적고, 반응에 사용되는 효소가 위치 특이성 성질을 지니고 있기 때문이다(4,5).

효소를 이용하여 DAG oil을 합성하는 연구는 rapeseed oil이나 olive oil 등 TAG 형태의 유지와 glycerol을 반응시켜 합성한 연구가 보고되었으며(6,7), vinyl laurate나 oleic acid 등과 glycerol을 반응시켜 DAG oil을 합성한 연구도 보고되었다(8,9).

한편, 최근 기능성 소재로 알려진 conjugated linoleic acid(CLA)는 필수지방산인 linoleic acid의 위치 및 기하 이성체들이며, 생리적 효과가 알려지면서 이에 대한 활발한 연구가 진행되고 있다(10-15).

본 연구는 TAG 구조의 sn-1,3 position에 특이적으로 작용하는 lipozyme RMIM을 이용하여 glycerol monooleate (GMO)와 기능성 지방산인 CLA를 이용하여 DAG가 함유된 유지를 대량 합성하고자 하였다. 합성은 회분식 반응기(stirred-batch type reactor)를 이용하였으며, 합성 후 short path distillation을 통해 분리된 DAG oil의 이화학적 특성과 differential scanning calorimetry(DSC)을 이용한 고체지 함량 및 흡열/발열 특성을 알아보았다.

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

재료 및 방법

재 료

DAG 함유 유지의 합성에 사용된 효소는 TAG 분자의 sn-1과 3의 위치에 특이적으로 작용하는 특성을 가진 lipozyme RMIM(IM60)을 사용하였다. Lipozyme RMIM(IM60)은 *Rizomucor miehei*로부터 유래한 lipase를 고정화한 것으로, Novodisk Biochem. North American Inc. (Franklinton, NC, USA)로부터 구입하였다. DAG 함유 유지의 합성 원료인 glycerin monooleate(GMO)는 (주)일신웰스에서 제공받아 사용하였다. 사용된 conjugated linoleic acid(CLA) 혼합물의 지방산 조성은 37.2%의 cis 9, trans 11-CLA(CLA1), 54.4%의 trans 10, cis 12-CLA(CLA2), 3%의 cis 9, cis 11;-trans 11, trans 13-CLA(CLA3), 0.7%의 trans 8, trans 10;-trans 9, trans 11;-trans10, trans 12-CLA(CLA4) 및 그 외 3.3%의 oleic acid와 1.4%의 linoleic acid로 구성되었고, (주)라이브맥스(경기도 성남)로부터 제공받았다.

DAG 함유 유지의 효소적 합성

DAG 함유 유지를 합성하기 위해 GMO와 CLA의 몰비율을 2:1로 하여, 1700 g의 GMO와 670 g의 CLA를 혼합하고, 기질 질량의 10 wt%에 해당하는 lipozyme RMIM과 molecular sieves를 각각 237 g 씩 첨가하여 반응하였다. 반응은 회분식 반응기(stirred-batch type reactor)를 이용하였는데, 반응기의 구성은 기질을 넣을 수 있는 4 L 용량의 원통형 이중자켓 반응기와 온도를 유지시키기 위한 항온수조로 이루어져 있었다. 교반을 위해 반달 모양의 impeller를 사용하여 600 rpm을 유지하였고, 반응 온도는 55°C에서 6 hr 동안 반응시켰다.

Short path distillation과 탈색

합성된 DAG 함유 유지에서 FFA, MAG 그리고 glycerol 등을 제거하기 위하여 short path distillation 공정을 시행하였다. Short path distillation은 15 m torr로 140°C에서 증류를 시작하여 200°C까지 온도를 상승시켜 1 hr 동안 진행하였다. 이 과정을 통해 얻은 residue부분(DAG oil)의 탈색을 실시하였다. 탈색은 백토를 전체 oil 질량의 5 wt%(72 g)를 첨가한 뒤 온도는 50~60°C로 유지하고, 반달모양의 impeller를 이용하여 350 rpm으로 30분간 교반하였다. 교반이 끝난 후 백토는 filter paper(150 mm, Advantec, Japan)로 걸러내었고, 이 후 새로운 백토를 첨가하여 위의 과정을 2회 반복하여 탈색과정을 마쳤다.

Glycerol 제거 및 NP-HPLC 분석

합성한 DAG 함유 유지의 구성성분 중 FFA, TAG, DAG 및 MAG의 함량을 알아보기 위하여 normal-phase high performance liquid chromatography(NP-HPLC, Younglin,

Acme, Korea)분석을 실시하였다. 분석하기 전, 반응 과정 중 효소의 가수분해 작용으로 인해 생성된 glycerol을 제거하기 위하여 합성한 시료의 전처리 작업을 실행 하였다. 시료 200 mg을 10 mL의 hexane에 희석하여 PTFE syringe filter(0.5 µm, Advantec, Japan)에 여과시킨 후 sodium sulfate를 0.5 g 가하여 1분 간 진탕하였다. 이것을 sodium sulfate anhydrous column을 이용하여 수분 및 불순물을 제거한 뒤 10 µL의 시료를 auto sampler를 이용하여 기기에 주입하였다. 검출기는 evaporative light scattering detector (ELSD, SEDEX Model 75, France)를 사용하였고, column은 Hypersil BDS CPS 5 µ (250×4.6 mm, Thermo Hypersil Ltd., Cheshire, UK)을 사용하였다. 검출기의 분석 조건은 질소의 유속이 2.2 bar이었으며 온도는 40°C 이었다. 분석 용매는 hexane (solvent A)과 methyl t-butyl ether(solvent B)에 각각 0.4% acetic acid를 첨가하여 사용하였고, 유속은 1 mL/min 이었다. 시료 주입 후 5분 동안은 용매 A만 흘러주었고 5분부터 15분까지 용매 A와 B의 부피비 20대 80으로 변화시킨 뒤 17분부터 2분간 유지시켰다. 다시 17분부터 22분까지 A용매만 흐르게 변화시킨 후 22분부터 30분 까지 유지시키면서 분석을 마쳤다.

지방산 조성 분석

Methylation을 하기위해 시료 25 mg을 시험관에 넣고 1.5 mL의 0.5 N methanolic NaOH를 넣어 100°C에서 5분간 가열한 후 30~40°C 항온수조에서 1~2분간 방치하였다. 여기에 2 mL의 BF₃-methanol을 넣고 100°C에서 2분간 가열한 후 30~40°C 항온수조에서 1~2분간 방치하였다. 그리고 2 mL의 iso-octane과 1 mL의 포화 NaCl 용액을 넣고 30초간 진탕하여 1~2분간 방치한 뒤 상층액을 취하였다. 이 상층액을 sodium sulfate anhydrous column을 이용하여 수분과 이물질을 제거한 뒤 gas chromatography(GC)를 이용해 지방산 조성을 분석하였다. GC (Hewlett-Packard 6890 series, Avondale, PA, USA)분석을 위한 column은 SP-2560 (100 m × 0.25 mm × 0.2 µm film thickness, Bellefonte, PA, USA)으로 inject 온도는 250°C, detector 온도는 280°C로 설정하였다. Oven 온도는 180°C에서 40분간 유지 후 3°C/min으로 승온시켜 230°C까지 도달하여 230°C에서 10분간 유지하였고, split ratio는 1/50, gas flow는 1 mL/min로 유지하였다. 이러한 조건으로 분석하여 얻은 지방산 메틸에스테르들의 peak는 표준물질 Nu Check 461의 retention time과 비교하여 동정하였다. 지방산의 wt%를 구하기 위하여 다음 계산식을 사용하였으며 FID 전환계수와 지방산 메틸에스테르로부터의 지방산 전환계수는 식약청에서 고시한 방법(16)에 의해 산출 하였다.

$$FA_i \text{ (g/100g 지방산)} = \frac{P_i \times f_i}{R_i} \times \frac{100}{\sum (P_j \times f_j / R_j)}$$

P_i, P_j : 지방산 피크면적

R_i, R_j : 각 지방산 표준물질에서 구한 FID 전환계수

f_i, f_j : 각 지방산 메틸에스테르로부터 지방산으로의 전환 계수

Pancreatic lipase analysis

합성한 DAG 함유 유지 중의 sn-2 및 sn-1,3 위치의 지방산 조성 분석을 위하여 pancreatic lipase(from hog pancreas, Sigma Chemical Co., St. Lois, USA)에 의한 분석을 실행하였다. 약 7 mg의 시료에 7 mL의 1 M Tris-HCl buffer(pH 7.6)와 1.75 mL의 0.05% 담즙산염, 0.7 mL의 2.2% CaCl₂을 첨가 한 후 시료의 양과 동일한 양의 pancreatic lipase을 첨가하였다. 그 후 37°C 항온수조에서 3분간 반응 후 1분 동안 충분히 교반하였고 이와 같은 과정을 3~4회 반복하였다. 반응이 끝난 시료에 diethyl ether 2 mL 첨가한 후 진탕하여 위층만 분리하여 sodium sulfate anhydrous column을 이용하여 수분 및 불순물을 제거하였다. 이를 hexane, diethylether, acetic acid의 부피비 50:50:1 비율의 전개용매를 사용하여 thin layer chromatography(TLC, 20×20 cm, Merck, Germany)를 통해 R_f 값이 0.03인 2-MAG band를 채취하였다. 채취한 2-MAG band는 methylation 과정을 거친 후 GC 분석을 시행하여 지방산 조성을 알아보았다. Sn-1,3 position의 지방산 조성 계산식은 다음과 같다.

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

색도 분석

Hunter 체계에 근거한 색차계 JC801 colorimeter(Color Techno System corp, Tokyo, Japan)에 의해 시료의 L*(0/100, lightness/darkness)값, a*(+/-, redness/greenness)값 및 b*(+/-, yellowness/blueness)값을 3회 반복 측정하여 평균값을 구하였다(17).

산가, 과산화물가, 요오드가 측정

기능성 유지의 화학적 특성을 알아보기 위하여 산가, 과산화물가 및 요오드가를 AOCS법(18)을 이용하여 분석하였다.

Differential Scanning Calorimetry (DSC) 분석

합성한 DAG 함유 유지의 결정화 온도와 용점 및 solid fat index(SFI)를 측정하기 위하여 DSC(TA Instruments, Model DSC 2010, New Castle, USA)를 이용하여 분석하였다. 시료는 cell aluminum pan에 7 mg을 취하였으며, 분석 조건은 80°C에서 10분 동안 유지한 다음 10°C/min의 비율로 -60°C까지 냉각하여 10분 동안 유지한 후 다시 80°C 까지 5°C/min의 비율로 승온 하였다.

결과 및 고찰

DAG 함유 유지의 합성 및 NP-HPLC 분석

DAG 함유 유지를 합성하기 위해 GMO와 CLA의 몰비율을 2:1로 하였으며, lipozyme RMIM은 기질 질량의 10 wt%를 사용하였고, 수분제거를 위하여 molecular sieves를 기질 질량의 10 wt%를 첨가하여 반응하였다. 합성 후 DAG 함유 유지의 조성을 NP-HPLC 분석을 통해 알아본 결과, 총 DAG의 함량이 61 area%였고, 총 DAG 중에서도 1,3-DAG는 52 area% 그리고 1,2-DAG는 9 area%로 나타나, 1,3-DAG가 1,2-DAG 보다 5.8배 많이 생성되었음을 알 수 있었다(Table 1, Fig. 1). 합성된 DAG 함유 유지의 조성은 DAG 외에도 기질로 사용된 MAG가 30 area%, FFA는 3.4 area%, 그리고 부생성물 TAG가 5.4 area%로 나타났다.

Table 1. Free fatty acid(FFA), monoacylglycerol(MAG), triacylglycerol(TAG) and diacylglycerol(DAG) contents

	(Unit : area%)	
	Before short path distillation	After short path distillation Residue ¹⁾
FFA	3.4	-
MAG	30.0	1.5
TAG	5.4	11.4
1,3-DAG	52.0	62.3
1,2-DAG	9.0	25.0
Total DAG ²⁾	61.0	87.3

¹⁾DAG oil, residue part after short path distillation.

²⁾Sum of 1,3-DAG and 1,2-DAG.

따라서 합성한 DAG 함유 유지에는 DAG 외에도 MAG, FFA가 존재하므로 이것을 제거하기 위하여 short path distillation을 실시하였다. Short path distillation은 일정한 온도와 압력 하에서 물질의 끓는점에 따라 원하는 물질을 분획하는 분별 증류법이다. 합성한 DAG 함유 유지를 short path distillation 과정을 통해 residue부분과 distillation부분으로 분획하였고, residue(DAG oil)부분은 탈색과정을 거친 뒤 NP-HPLC를 분석하여 그 결과를 Table 1과 Fig. 1에 제시하였다. Residue부분의 총 DAG 함량은 87.3 area%로 나타나 short path distillation을 수행한 후에 DAG 함량이 증가함을 볼 수 있었다. 반면, MAG는 1.5 area%, 그리고 FFA는 검출 되지 않아서 short path distillation 공정 후 distillate(증류부산물)부분에 대부분의 FFA와 MAG가 분리 제거되었음을 알 수 있었다. 한편, residue의 조성 중 TAG는 short path distillation을 하기 전의 TAG 함량보다 높은 6 area%로 나타났고, 이로써 TAG가 distillate부분으로 제거 되지 않았음을 예측할 수 있었다.

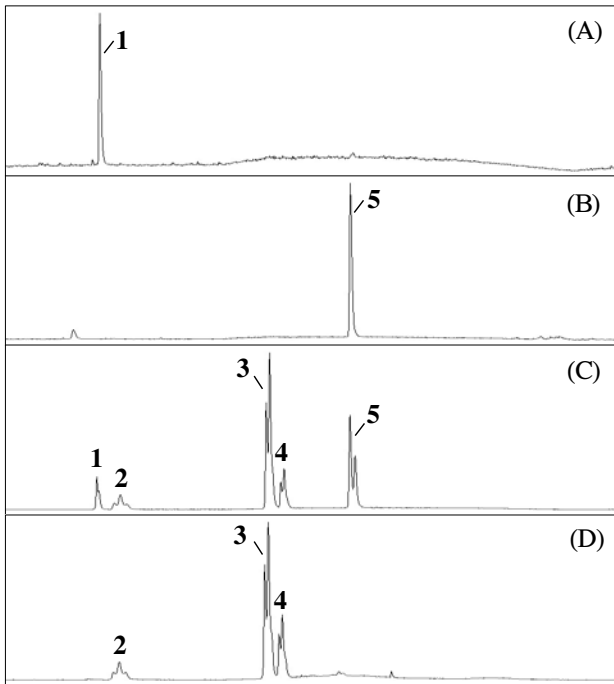


Fig. 1. Chromatogram from the normal-phase high performance liquid chromatography of (A) conjugated linoleic acid(CLA), (B) glyceryl monooleate(GMO), (C) before short path distillation (D) Residue part(diacylglycerol oil) after short path distillation.

1: free fatty acid, 2: triacylglycerol, 3: 1,3-diacylglycerol, 4: 1,2-diacylglycerol, 5: monoacylglycerol.

short path distillation을 한 후, 수율을 계산하여 Table 2에 나타내었다. short path distillation하기전의 합성된 DAG 함유 유지의 무게는 2100 g 이었으나, 이 중 660 g은 short path distillation과정 중 손실되었고 960 g의 residue부분과 480 g의 distillate부분을 얻었다. DAG 함량이 높고, 소량의 TAG와 MAG를 함유한 residue부분(DAG oil)의 수율은 46%로 나타났다(Table 2).

Table 2. The yield of diacylglycerol oil(DAG oil) after short path distillation

	Substrate		Before short path distillation	After short path distillation	
	GMO ¹⁾	CLA ²⁾		Distillate	Residue ³⁾
g	1700	670	2100	480	960
yield(%)	-	-	-	23%	46%

¹⁾Glyceryl monooleate.

²⁾Conjugated linoleic acid.

³⁾DAG oil, residue part after short path distillation.

지방산 조성 분석

반응 기질로 사용된 GMO와 CLA, 그리고 본 실험에서 합성한 DAG oil의 지방산 조성을 분석하여 Table 3에 나타내었다. 반응 기질로 사용된 GMO의 지방산 조성은 대부분 oleic acid와 linoleic acid로 구성되어 있었으며, 각각 78.8%

와 9.6%로 나타났다. 본 연구에서 합성한 DAG oil의 지방산 조성의 경우에는 oleic acid가 54%, linoleic acid가 7%로 나타났으며, 특히 GMO에서는 볼 수 없었던 CLA 함량이 31.1%이었다. 이로써 lipozyme RMIM을 이용한 합성 반응을 통해 GMO에 CLA가 결합되어 생리활성이 있는 CLA를 함유한 DAG oil이 생성되었음을 알 수 있었다. 그리고 DAG oil의 sn-2 position의 지방산 조성 중 CLA 함량은 0.7%인데 반해 sn-1,3 position의 CLA 함량은 46.3%인 것으로 보아 합성 시 대부분의 CLA는 sn-2 position 보다 1(3)-position에 결합되었고, 이는 위치 특이성이 sn-1,3 인lipozyme RMIM의 특성 때문이다.

Table 3. Positional fatty acid composition of glyceryl monooleate (GMO), conjugated linoleic acid(CLA) and diacylglycerol oil (DAG oil)

Fatty acid	GMO		CLA		DAG oil ¹⁾		
	total	sn-2	sn-1,3	total	total	sn-2	sn-1,3
C12:0	2.7	1.5	3.3	-	1.5	2.0	1.25
C14:0	1.6	1.0	1.9	-	1.0	1.6	0.7
C16:0	2.0	6.8	0.4	-	1.4	3.4	0.55
C18:0	2.2	4.5	1.1	-	1.6	3.6	0.6
C18:1	78.8	70.1	83.2	3.3	54.0	75.7	43.15
C18:2	9.6	-	14.4	1.4	7.0	8.7	6.15
C18:3	-	-	-	-	-	-	-
C22:0	-	-	-	-	-	-	-
C18:1T	1.6	1.2	1.8	-	1.1	2.1	0.6
C18:2T	1.6	2.0	1.4	-	1.3	1.6	1.15
Σ Trans Fat ²⁾	3.2	3.2	3.2	-	2.4	3.7	1.75
CLA1 ³⁾	-	-	-	37.2	12.0	-	18
CLA2 ⁴⁾	-	-	-	54.4	17.5	-	26.25
CLA3 ⁵⁾	-	-	-	3.0	1.4	0.7	1.75
CLA4 ⁶⁾	-	-	-	0.7	0.2	-	0.3
Σ CLA	-	-	-	95.3	31.1	0.7	46.3

¹⁾Residue part after short path distillation.

²⁾Sum of C18:1T(trans fatty acid) and C18:3T(trans fatty acid). Trans forms of CLA were excluded.

³⁾cis 9, trans 11-CLA.

⁴⁾trans 10, cis 12-CLA.

⁵⁾cis 9, cis 11-CLA, trans 11, trans 13-CLA.

⁶⁾trans 8, trans 10-CLA, trans 9, trans 11-CLA, trans 10, trans 12-CLA.

⁷⁾Sum of CLA1, CLA2, CLA3 and CLA4.

색도 및 산가, 요오드가, 과산화물가 분석

본 연구에서 합성한 DAG 함유 유지는 200°C까지의 높은 온도에서 distillation하는 과정으로 인하여 변색이 일어났고

이 색을 제거하기 위하여 탈색을 실행하였다. 합성한 DAG oil의 탈색 실행 전, 후의 색도를 Hunter 체계에 근거하여 분석하였고, 그 결과는 Table 4에 나타내었다. L* (백색도, lightness/darkness) 값의 경우, short path distillation을 거친 후 탈색전의 DAG oil은 70.5로 나타났고, 탈색한 후에는 91.4로 증가하였다. 그리고 b* (황색도, yellowness/ blueness) 값은 short path distillation 과정을 거치기 전은 11.8이었으나 short path distillation 과정을 거친 후에는 95.5로 증가되었고, 이후 탈색 후에는 16.2로 황색도가 다시 감소하였다.

Iodine value를 측정해 본 결과 GMO는 82.5였으나 DAG oil은 108.8이었다(Table 4). Iodine value는 불포화도를 표시하는 척도로 GMO보다 DAG oil의 값이 높게 나온 것은 효소적 합성과정을 통해 불포화 지방산인 CLA가 GMO에 결합되어 DAG로 합성되었기 때문이다. Peroxide value 값은 탈색하기 전의 DAG oil은 0이었으나 탈색 한 후 2.57로 증가하였다(Table 4). 이는 탈색이 1 시간 정도 행해지면서 특히 CLA 등의 불포화 지방산을 함유한 DAG oil의 산패가 일어났기 때문일 것으로 예측된다. 한편, acid value의 경우(Table 4), 합성한 DAG 함유 유지는 반응에 참여하지 못한 CLA가 남아 있으므로 21.8로 높게 나타났지만 short path distillation을 한 후의 DAG oil의 경우 0.3으로 낮아졌고, 이는 CLA가 short path distillation에 의하여 효과적으로 제거되었음을 의미한다. 하지만 탈색 한 뒤의 acid value는 1.0으로 증가함을 보였고 이는 탈색 과정 중의 백토의 촉매작용 및 열에 의한 유지의 가수분해 때문 일 것으로 생각된다.

Table 4. The hunter color L*, a*, b* values and chemical characteristics

	CLA	GMO	After short path distillation		
			Before short path distillation ¹⁾	Before decolorization of DAG oil ²⁾	After decolorization of DAG oil ²⁾
Hunter color					
L value	83.0±2.6 ^b	92.7±0.0 ^a	72.2±0.2 ^e	70.5±1.7 ^c	91.4±0.1 ^a
a value	-14.1±11.5 ^b	-1.3±0.04 ^d	1.5±0.0 ^d	4.5±0.0 ^d	-1.8±0.0 ^a
b value	31.2±4.5 ^b	-3.4±0.02 ^d	11.8±0.1 ^c	95.5±7.8 ^a	16.2±0.1 ^c
Chemical characteristics					
Iodine value	-	82.5±0.2	-	-	108.8±0.3
Peroxide value	-	6.19±0.3	5.91±0.04	0	2.57±0.10
Acid value	-	1.97±0.4	21.8±0.11	0.3±0.03	1.0±0.02

¹⁾DAG containing oil, after enzymatic reaction of GMO and CLA.

²⁾Residue part after short path distillation.

Solid Fat Index(SFI)와 융점 및 결정화 피크

반응기질인 GMO와 CLA, 그리고 DAG oil의 SFI(%)를 Table 5에 나타내었다. 반응 기질인 GMO는 5°C부터 고체지의 함량이 감소되기 시작하여 40°C에서 모두 용해 되었고 반면, DAG oil의 경우 GMO보다 낮은 -50°C에서 고체지의 함량이 감소되기 시작하여 15°C에서 모두 용해되었다. 이것으로 효소적 반응을 통해 GMO에 불포화지방산인 CLA가 결합되면서, 합성된 DAG oil의 융점은 GMO 보다 낮아졌고, 상온에서 액체 상태임을 알 수 있었다. 반응기질인 GMO와 DAG oil의 융점과 결정화 곡선을 Fig. 2에 나타내었다. 반응 기질인 GMO의 융점 피크는 26.7°C에서 뚜렷한 피크를 나타내었다. 반면, 합성한 DAG oil은 세 개의 융점 피크를 보였고 그 온도는 각각 -41.2°C, -25.9°C, 3.8°C로 반응 기질인 GMO 보다 낮은 온도 쪽으로 이동하였다. 결정화 피크는 반응기질인 GMO가 -9.5°C에서 하나의 피크로 나타났던 반면, 합성한 DAG oil의 결정화 피크는 -17.8°C에서 뚜렷한 피크를 보이면서 반응 기질인 GMO의 주요 피크보다 낮은 온도 쪽으로 이동하였다. 그 이유는 효소적 반응을 통해 합성된 DAG oil에 기질로 사용된 불포화 지방산인 CLA가 GMO에 결합되어 존재하기 때문일 것으로 생각된다.

Table 5. Solid fat index of glyceryl monooleate(GMO) and diacylglycerol oil(DAG oil)

Temp.(°C)	Solid fat index (%)	
	GMO	DAG oil ¹⁾
-50	-	99.9
-45	-	96.7
-40	-	89.1
-35	-	85.7
-30	-	81.7
-25	-	74.0
-20	-	67.3
-15	-	63.2
-10	-	58.5
-5	-	50.4
0	-	34.1
5	99.9	9.0
10	98.5	0.3
15	93.0	0.0
20	80.4	-
25	50.5	-
30	11.9	-
35	3.0	-
40	0.0	-

¹⁾Residue part after short path distillation.

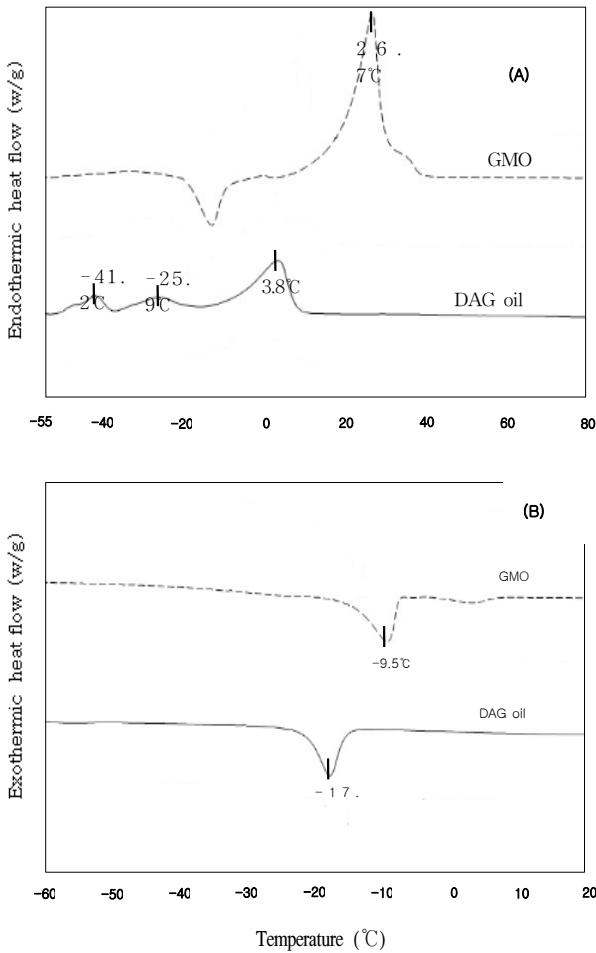


Fig. 2. Differential scanning calorimetry heating curves (A) and cooling curves (B) of glyceryl monooleate(GMO) and diacylglycerol oil(DAG oil)

요 약

회분식 반응기를 이용해 GMO와 CLA로부터 Lipozyme RMIM의 반응을 통해 DAG 함유 유지를 합성하였다. 합성된 DAG 함유 유지의 조성은 총 DAG의 함량이 61 area%로 나타났으며, MAG, FFA, 그리고 TAG가 각각 30, 3.4 그리고 5.4 area%로 나타났다. 합성된 DAG 함유 유지는 short path distillation을 이용하여 DAG를 분리하였고, DAG를 포함한 증류결과물인 residue부분(DAG oil)의 수율은 46%였다. DAG oil의 조성은 총 DAG 함량이 87.3 area%, MAG와 TAG는 각각 1.5와 6 area%로 나타났으며, FFA는 검출되지 않았다. DAG oil의 지방산 조성은 oleic acid와 linoleic acid가 각각 54%, 7%로 나타났으며, 특히 반응 기질인 GMO에서는 볼 수 없었던 CLA 함량이 31.1%로 나타났다. 또한 불포화도의 척도인 iodine value가 GMO는 82.5인데 반해 DAG oil은 108.8로 증가되었고, 이러한 결과로 효소적 반응

을 통해 GMO에 불포화도가 높은 CLA가 결합된 DAG oil이 합성되었음을 알 수 있었다.

Short path distillation을 통해 분리된 DAG oil의 황색도 값은 95.5였으나, 탈색 한 후 16.2로 감소하였다. DAG oil의 탈색 전 acid value와 peroxide value는 각각 0.3, 0이었지만, 탈색 후에는 각각 1.0, 2.57로 다소 증가함을 보였다. SFI(%) 분석 결과 합성한 DAG oil은 -50°C에서 고체지의 함량이 감소되기 시작하여 15°C에서 모두 용해되었다. DAG oil은 세 개의 융점 피크를 -41.2°C, -25.9°C, 3.8°C에서 나타내었으며, -17.8°C에서 하나의 결정화 피크를 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 2008년도 식품의약품안전청 용역연구개발사업의 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Fujii, A., Allen, T.J. and Nestel P.J. (2007) A 1,3-diacylglycerol-rich oil induces less atherosclerosis and lowers plasma cholesterol in diabetic apoE-deficient mice. *Atherosclerosis*, 193, 55-61
2. Yasukawa, T. and Yasunaga, K. (2001) Nutritional functions of dietary diacylglycerols. *J. Oleo Sci.*, 50, 427-432
3. Saito, S., Tomonobu, K., Hase, T. and Tokimitsu, I. (2006) Effects of diacylglycerol on postprandial energy expenditure and respiratory quotient in healthy subjects. *Nutrition*, 22, 30-35
4. Kwon, S.J., Han, J.J. and Phee, J.S. (1995) Production and *in situ* separation of mono- or diacylglycerol catalyzed by lipase in n-hexane. *Enz. Microb. Technol.*, 17, 700-704
5. Kim, N.S. and Lee, K.T. (2005) Synthesis of diacylglycerol-enriched functional lipid containing DHA by lipase-catalyzed in solvent-free system. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 37, 584-589
6. Sonntag, N.O.V. (1982) Glycerolysis of fats and methyl esters-status, review and critique. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 59, 795A-802A
7. Janni, B.K., Xuebing, X. and Huiling, M. (2005) Diacylglycerol synthesis by enzymatic glycerolysis screening of commercially available lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 82, 329-334
8. Blasi, F., Cossignani, L., Simonetti, M.S. and Damiani,

- P. (2007) Biocatalysed synthesis of sn-1,3-diacylglycerol oil from extra virgin olive oil. *Enz. Microb. Technol.*, 41, 727-732
9. Berger, M., Laumen, K. and Schneider, M.P. (1992) Enzymatic esterification of glycerol 1. Lipase-catalyzed synthesis of regioisomerically pure 1,3-sn-diacylglycerols. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69, 955-960
 10. Vinay, T., Ruby, T. and Singh, R.P. (2006) Lipase-catalyzed synthesis of diacylglycerol and monoacylglycerol from unsaturated fatty acid in organic solvent system. *J. Oleo Sci.*, 55, 65-69
 11. Chin, S.F., Liu, W., Storkson, J.M., Ha, Y.L. and Pariza, M.W. (1992) Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *J. Food Comp. Anal.*, 5, 185-197
 12. Ha, Y.L., Grimm, N.K. and Pariza, M.W. (1987) Anticarcinogens from fried ground beef : heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis*, 8, 1881-1887
 13. Nicolosi, R.J., Rogers, E.J., Kritchevsky, D., Scimeca, J.A. and Huth, P.J. (1997) Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. *Artery*, 22, 266-277
 14. Cook, M.E., Miller, C.C., Park, Y. and Pariza, M. (1993) Immune modulation by altered nutrient metabolism : nutritional control of immune-induced growth depression. *Poult. Sci.*, 72, 1301-1305
 15. McCarty, M.F. (2000) Activation of PPAR gamma may mediate a portion of the anticancer activity of conjugated linoleic acid. *Med. Hypotheses*, 55, 187-188
 16. Park, Y.K., Albright, K.J., Liu, W., Storkson, J.M., Cook, M.E. and Pariza, M.W. (1997) Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids*, 32, 853-858
 17. 식품의약품안전청고시 (2007) 식품등 중 기준규격미설정 물질의 시험방법, 제2007-10호
 18. 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. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 33, 1175-1179
 19. AOCS. (1990) *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society*. 4th (ed). Champaign IL, USA.

(접수 2008년 12월 16일, 채택 2009년 3월 27일)