

기능성지질과 유지생명공학기술

윤 석 후

바이오제론연구단

Functional Lipids and Lipid Biotechnology

Suk Hoo Yoon

Biogeron Food Technology Research Group

지질의 기능성

유지(fats and oils)는 주요 구성성분인 지질(혹은 지방질, lipids)과 비지질부분(예로써 색소, wax 등)으로 구성되어 있는데 대부분의 경우 지질이 95% 이상을 차지하고 있다. 따라서 유지의 기능성은 거의 대부분 지질의 기능성을 지칭한다.

‘지질생명공학’은 전통적으로 ‘유지생명공학(lipid biotechnology)’으로 불리는데, 유지생명공학의 바탕이 되는 ‘생명공학’이란 무엇일까? 생명공학은 ‘특별한 용도를 위하여 어떠한 제품이나 공정을 생산하거나 변형시키기 위하여 생물학적 시스템이나 생물체 혹은 그의 유도체를 이용하는 모든 기술적 적용’을 지칭한다. 따라

서 여기에는 전통적인 식품 발효, 폐수 처리, 약물 전달, 양어, 곡물 개발 등이 모두 포함된다. ‘식품생명공학’이란 ‘식품의 질, 양, 안전, 가공과 생산의 경제성을 향상시키기 위하여 곡물, 동물, 미생물에게 생물공학기술을 적용하는 것’을 지칭하며, 빵, 맥주, 치즈, 다양한 발효 유제품을 생산하는 전통적 제조공정이 포함된다. 따라서 ‘유지생명공학’이란 ‘유지의 특별한 용도를 위하여 유지 제품이나 유지 공정을 생산하거나 변형시키기 위하여 생물학적 시스템이나 생물체 혹은 그의 유도체를 이용하는 모든 기술적 적용’을 의미하게 된다.

식품의 기능성은 크게 3가지로 나눌 수 있는데 식품의 1차 기능은 체내에 영양을 공급하는 기능이며, 2차 기능은 식품의 기호성을 향상시

키는 것이며, 질병에 대한 저항성의 향상이나 생리활성의 조절기능과 같은 기능이 식품의 3차 기능에 해당된다. 지질(또는 지방질, lipids)은 유지(fats and oils)의 주성분으로써 지방산과 글리세롤의 에스터들, 즉 트리글리세리드의 혼합물인바, 용점에 따라 굳기름(fats) 또는 기름(oils)으로 불린다. 유지는 탄수화물, 단백질과 함께 3대 영양소의 하나로서 농축된 에너지원일 뿐만 아니라 세포막을 구성하고 피하조직, 장기의 보호작용 및 유수신경의 절연체역할을 하는 등 생체에 매우 중요한 성분이다. 즉 지질은 효과적인 열량원인 동시에 필수지방산으로써 체내 모든 막조직의 구성분인 인지질의 필수 요소가 되어 세포 내외의 영양소와 여러 필수성분의 투과성을 조절하는 체성분이 된다. 콜레스테롤도 세포 구성분의 필수요소로써 간장 및 부신피질 등에서 생합성되며 각종 스테로이드 호르몬의 원재료로 사용되어 영양소들의 항상성 유지에 중요한 역할을 한다. 유지는 위와 같이 영양과 직접 관련된 1차 기능 이외에도 식품에 풍미를 부여하고 향미성분의 전달체 역할을 할뿐만 아니라 식품을 가열하거나 튀길 때 이용되고 유연성, 부드러움, 부스러지기 쉬운 성질, 효과적인 공기의 혼합성 등을 가져 제빵, 제과에 필수적인 2차 기능을 가지고 있다. 그러나 최근 들어 식품의 3차 기능인 체내의 생리활성과 생체조절기능에 관심이 모아지고 있는데 기능성 식품이라 함은 일반적으로 3차 기능성 식품을 지칭한다. 지질의 주요 구성성분인 지방산(fatty acids)은 소화관내에서 더

이상 가수분해되지 않고 직접 흡수되어 그 자체가 생리활성을 갖는 경우가 많으므로 효과적인 기능성식품의 하나로써 주목을 받고 있다.

유지는 전통적으로 유량식물, 육상 동물 및 어류 등에서 채취하였는데, 쇼트닝, 마가린, 셀러드유와 조리용 기름의 주성분이다. 천연유지는 지방산의 탄소수, 지방산의 포화정도, 이성질체의 함량, 지방의 다형성(polymorphic state)에 따라 다양한 물리적, 화학적 성질을 가진다. 영양학적으로 유지는 g당 9 kcal의 열량을 내는데 이 값은 단백질이나 탄수화물에 비하여 두 배에 가까운 수치이다. 서구의 경우는 섭취하는 에너지의 35~40% 정도를 유지를 통해서 얻고 있는데, 지방의 과다섭취는 심장질환, 비만과 암의 유발 등 건강상의 문제점을 일으키게 되었다. 따라서 유지에 의한 열량함량을 낮추면서도 특유의 기능성을 살릴 필요성을 절감하게 되었다. 즉 유지 섭취로 인한 건강상의 문제점들을 줄이는 한편, 유지의 기호성 즉 유지의 풍미성과 입에서 느끼는 감촉 등은 그대로 유지하며 인체에 꼭 필요한 필수 지방산의 섭취를 유지하는 방법을 모색하게 되었으며, 나아가 생리활성물질의 섭취를 증진시키기 위하여 기능성을 지닌 필수성분만으로 이루어지는 새로운 개념의 유지의 생산과 이를 위한 연구가 필요하게 되었으며 유지 중 여러 물질들이 생리활성에 중요한 역할을 하는 것이 밝혀짐에 따라 재래유지를 변형 가공한 유지 신소재의 개발이 활발히 이루어지고 있는 실정이다.

유지 신소재는 유지생산 동식물자원의 품종

개량이나 유전자를 조작하여 중요성분의 함량을 증진시키는 방법이나, 제래유지의 단순 분리를 통하거나 유지에 화학적인 잔기를 붙이기까지 여러 가지 다양한 방법에 의하여 생산되고 있다. 그 동안 유지산업은 동식물로부터 천연의 트리글리세리드를 추출한 후 여러 가지 목적을 위해 화학적인 반응을 시키는 것에 주력해 왔다. 우선 유지공정은 유지를 고온고압하에서 물을 이용해 지방산과 글리세롤로 분해하는 가수분해공정으로 시작된다. 증류공정 후 이들 지방산의 일부는 그 자체로 바로 이용이 되거나, 화학반응으로 여러 가지 물질로 변형된다. 화학반응의 대표적인 것은 지방산내의 카르복실기를 변환시켜 fatty alcohols, amides, amines, esters 등으로 전환시키거나, 중쇄불포화 지방산을 이용한 dimers의 생산, 포화지방산, axelaic acid, epoxides 등의 생산으로 나누어진다. 그러나 유지산업은 현재 원료물질의 종류, 가격, 수급능과 같은 1차적인 이유와 화학공정의 한계에 의한 2차적인 이유로 인해 많은 제약을 가지고 있다. 즉 화학축매는 다양하지 못하고, 대개가 고온을 요구하며, 반응 특이성이 낮아서 부산물이 많아 또 다른 정제과정의 도입 등이 문제가 된다.

유지생명공학기술은 이러한 유지산업의 한계를 극복하기 위하여 (1) 원료 자원의 개량 (2) 고품질의 제품을 생산하기 위한 공정의 개선 (3) 환경오염을 줄이는 제품의 개발 (4) 에너지의 소비나 폐기물의 양을 줄이는 공정의 개발 (5) 화학공정으로는 생산 불가능한 물질의 전환

기술 개발 등으로 관심을 가지고 연구 수행되어 왔다고 볼 수 있다. 이러한 목적을 달성하기 위하여 생명공학기술은 식물 생명공학기술 (plant biotechnology; tissue culture/cloning and genetic engineering)과 단세포 유지세포(single cell oil)기술, 효소나 미생물을 이용한 생전환기술(biotransformation) 등을 이용하여 연구 개발되어 왔다고 볼 수 있다. 근래에는 지방가수분해 효소인 리파제(lipase)를 이용하는 생물공학적 방법이 중요시되고 있는데, 이는 고온, 고압이 필요한 화학적 방법에 비해 에너지를 절감할 수 있을 뿐만 아니라 생산공정의 안정성이 높으며 효소의 특이성에 의해 불필요한 부산물을 줄이고 필요물질을 주로 얻을 수 있기 때문이며, 인체 내에도 존재하는 효소이므로 식품용 유지의 생산에 있어 인체에 대한 안전성이 보장된다는 이점이 있다.

기능성 지질의 종류와 역할

기능성 지질은 식품, 의약품, 의약품첨가물, 화장품, 계면활성제, 유화제 등에 폭넓게 이용되는데, 식품에 있어서 지질의 기능성은 영양/대사/생리활성에 관련된 기능성과 분자집합체로써 식품 가공적성에 관련된 기능성으로 대별할 수 있다.

식품에의 가공적성을 개선하는 것은 가공공정 시 수반되는 지질의 산화 등 품질저하요인을 최소화하거나 다형현상을 이용하는 것을 의

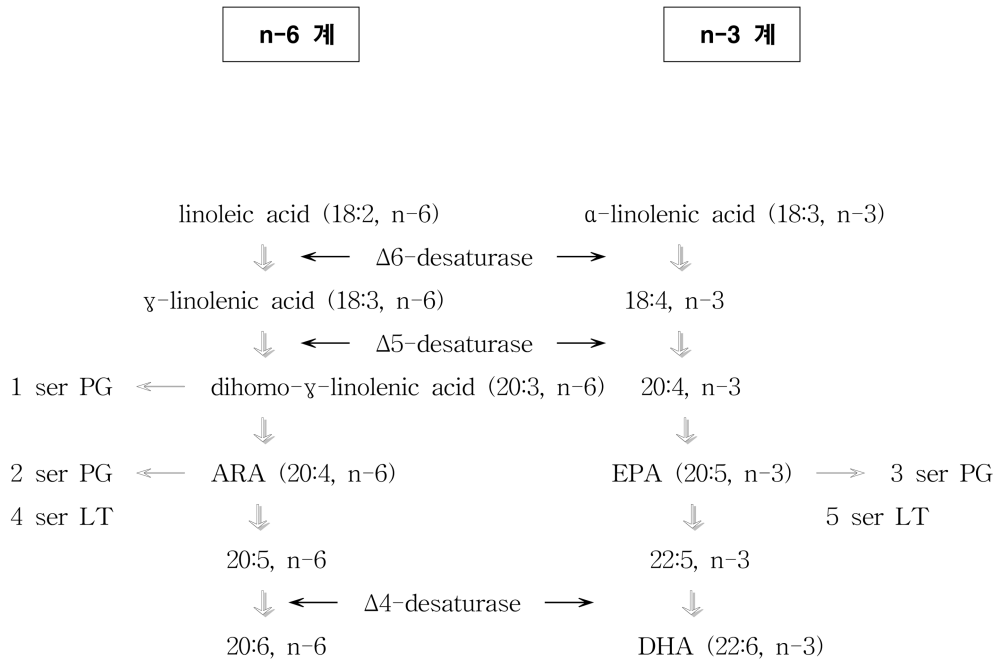


그림 1. 고도불포화지방산의 대사경로

미한다. 식물성유지 중에 들어 있는 생리기능성 지질에는 모노-, 디-, 트리글리세리드, 단일 및 고도불포화지방산, 포화지방산, 중쇄 지방산, 지방산알코올, 인지질, 당지질, 스테롤, 토코페롤, 토코트리에놀, 카로티노이드, 세사민, 감마오리자놀, 고시폴 등이 있다.

1. 고도불포화지방산(Polyunsaturated fatty acids, PUFA)

Linoleic acid와 linolenic acid를 각각의 출발 분자로 하는 n-6계 및 n-3계 고도불포화지방산은 필수지방산이 동시에 생체막 인지질의 구성

요소로 필수적이거나 인체 내에서의 대사경로는 서로 다르다(그림 1).

n-3계 지방산(α -linolenic acid, EPA, DHA)은 혈청 중성지방이나 콜레스테롤의 농도를 낮추며 관상동맥 질환, 혈전증의 유발을 억제하는 것으로 알려져 있으며, DHA는 망막 및 뇌조직의 주요 성분이 된다. 사람의 모유에는 우유보다 n-3계 장쇄 지방산의 함량이 많으므로 원활한 두뇌 성장발달을 위하여는 DHA가 풍부한 모유의 공급이 다시 한번 강조되어야 할 것이다. Linoleic acid의 주요 공급원은 식물성 유지이며, arachidonic acid는 주로 동물성 식품에서, EPA와 DHA는 등푸른 생선에서 섭취되며,

linolenic acid는 콩기름, 들깨기름, 카놀라기름에 많이 함유되어 있다. 생체 내에서 n-6 및 n-3계 지방산의 가장 근본적이고 중요한 역할의 하나는 세포막이나 세포 안의 핵막, 미토콘드리아 등의 막조직 인지질의 필수성분이 되어 세포 내외간의 운반, 효소의 활성화, 호르몬, 단백질의 수용체, 신경조직에서 메시지 전달 등에 관여하는 것이다. 혈소판의 arachidonic acid는 응고촉진제인 thromboxane A₂의 전신이 되나 동맥조직의 arachidonic acid로부터는 응고방지제인 prostacyclin이 만들어지므로 prostacyclin/thromboxane의 균형이 강조된다. 그러므로 식이 중 동물성 지방의 감소나 P/S 비율로만 식사패턴을 권장할 것이 아니라 PUFA의 질적 균형과 내용 또한 중요하다 하겠다.

PUFA는 한편으로는 체내외에서 쉽게 산패될 수 있어 동물실험에서 과량의 PUFA를 장기간 투여시 암을 유발할 수 있다는 보고가 있는데, 이는 산화로 인해 생성된 과산화물질들은 세포막조직에 손상을 초래하여, 과량 섭취의 경우 세포 파괴를 촉진시킬 수 있어 노화를 앞당길 수도 있기 때문이다. 또한 과량의 PUFA 섭취는 비타민 E의 흡수율을 감소시킨다는 보고도 있어 PUFA는 그 필수성에도 불구하고 섭취량을 총열량 섭취량의 10% 이하로 권장하고 있다.

2. 중쇄 지방질(Medium Chain Triglycerides: MCT)

중쇄 지방질이란 탄소수 8~10개의 지방산으

로 이루어진 중성지방질을 말하는데, 자연계에 널리 분포되어 있는 장쇄 지방질(long chain triglycerides: LCT)에 비하여 여러 가지 독특한 특징을 가지고 있다. 상온에서 무색 투명한 액상이며, 비교적 점도가 낮고(25~31cp at 20°C), 향과 맛이 좋으며 산화에 대해서도 상대적으로 안정하다. 또한 튀김요리 제조 후에도 점도가 상승하지 않는 점, 0에서도 액상을 유지하는 점 등이 특징이다. 성인이 하루 약 100g을 섭취해도 전혀 문제가 없는 것으로 보고되고 있으며, 나아가 전체 영양섭취량의 40% 정도까지 섭취하여도 별다른 이상이 없는 것으로 보고되고 있다. 그러나 지나친 사용에 대해서는 주의를 요하는데 그 이유는 쉽게 흡수되고 빠르게 이용되는 과정에서 필수지방산의 결핍현상이나, hyperketosis 등의 우려가 있기 때문이다. 따라서 이러한 문제를 해결하기 위해서 중쇄 지방질의 구성지방산에 linoleic acid와 같은 필수지방산을 일부 대체시킨 혼성지방질의 합성도 연구되고 있다.

중쇄 지방질은 향기와 색이 없는 특징 때문에 향료나 색소의 운반체로 많이 사용되며 지용성 비타민, 의약품 등의 운반체로도 사용되기 때문에 기존의 식물성 기름이나 polyethylene glycol, triacetin, mineral oil, benzyl alcohol 등의 대체품으로 널리 쓰이고 있으며 캔디를 제조할 때 표면의 광택을 증가시키고 서로 붙는 것을 방지하기 위한 목적 등으로 식품산업에서 사용되고 있다. 또한 샐러드 드레싱이나 제빵 산업, 아이스크림 제조 등에 식물성 유지

를 대신하여 사용되기도 한다. 중쇄 지방질은 장쇄 지방질과는 다르게 대사되는데, 소장에서 일부가 가수분해되지 않고도 그대로 흡수되기도 하며, 가수분해되어 흡수된 중쇄 지방산은 장쇄 지방산과 다른 대사경로를 거치게 된다. 즉 장쇄 지방산이 장쇄 지방질로 합성되어 chylomicron을 형성, 림프계를 타고 간으로 이송되어 사용되고, 사용되지 않은 지방은 지방세포로 저장되는 것과는 달리, 중쇄 지방질은 혈관을 타고 간으로 그대로 이송되어 ketone body로 산화되어 에너지원으로 빠르게 이용되는 특징이 있다. 따라서 중쇄 지방질은 지질의 소화 흡수능력이 저하되어 장쇄 지방을 흡수하지 못하는 환자에게 매우 우수한 영양원으로 이용되며, 유아식, 중환자나 외과 수술환자, 미숙아의 영양원으로도 이용되고 있다. 다음은 중쇄 지방산이나 지방질을 이용한 제품의 예이다.

(1) Medium Chain Monoglycerides(MCMG): MCMG는 친수성 물질은 물론 소수성 물질도 동시에 녹이는 특성이 있어, 향료, 스테로이드, 염료 및 방향제의 base로 이용되어 화장품산업, 제약산업 등에서 그 용도를 확대해 나가고 있다. 또한 체내의 콜레스테롤성 담석을 녹여내는 처방에도 이용되고 있다.

(2) Medium Chain Triglyceride Cheese: MCT는 수년간 지방대사를 제대로 못하는 환자를 위한 영양원으로 유용하게 이용되어 왔다. 그러나 이런 환자의 경우 대개 하루에 50~150g의 MCT를 섭취할 때 과일 주스와 섞어서 섭취해 왔으나 버터, 치즈, 스프레드와 같은 유제품에

는 이들이 소화할 수 없는 장쇄 지방질이 함유되어 있어 소화해내지 못하는 문제점 때문에 MCT 마가린, 치즈, 스프레드 등이 환자식의 일종으로 생산되고 있다. MCT가 다른 지방에 비해 점도는 떨어지나 일반 치즈의 발효공정과는 다른 약산을 이용한 산화 공정으로 치즈를 제조할 수 있으며 이때 가장 중요한 단계는 탈지유를 약산을 이용해 산화하는 단계이고 탈지유를 산화 후 가열함으로써 커드를 형성하고 커드를 MCT를 포함한 첨가물을 가한 후 치즈로 가공한다. 보통 MCT 치즈는 23%의 단백질과 30%의 MCT로 이루어져있다. 이러한 MCT 치즈는 지방을 제대로 소화하지 못하는 환자들에게는 유용한 식품으로 이용되고 있다.

3. 재구성 지방질(Structured Lipids)

MCT가 많은 장점을 가지고 있으나 리놀레산과 같은 체내에서 합성이 불가능한 필수지방산은 섭취해야하기 때문에 가장 쉬운 방법의 하나로 MCT와 LCT를 물리적으로 혼합한 것을 사용했다. 그러나 최근에는 위의 혼합물보다는 MCT와 LCT를 interesterification시켜 얻은 재구성 지방질을 선호하게 되었는데, 그 이유는 물리적 혼합물은 각각의 TG가 고유의 흡수속도를 가지는 반면 재구성지방질은 흡수가 빠른 MCT와 흡수가 느린 LCT의 중간 정도의 흡수속도를 가짐으로써 환자식 등에 이용할 때 에너지 흡수속도를 조절할 수 있는 장점을 가지고 있기 때문이다. 또한 재구성 지방질을 MCT와 n-

3 지방산을 이용해 제조함으로써 고유의 대사 경로를 가지는 유지를 만들 수 있다.

재구성 지방질을 사용함으로써 많은 이점을 얻을 수 있는데 그 중의 하나가 면역기능의 향상이다. 즉 중쇄 지방산, n-6, n-3 지방산의 함량을 조절함으로써 최적의 면역 기능을 유지할 수 있기 때문이다. 왜냐하면 체내의 아라키돈산의 과다는 항체나 림포카인 합성을 저해하는 반면 EPA나 리놀렌산은 이와는 반대의 작용을 함으로 각각의 지방산의 함량을 조절함으로써 면역작용의 균형을 유지할 수 있다. 또한 재구성 지방질은 암 발생 확률을 낮추고 혈전증을 예방하며 콜레스테롤의 함량을 낮추는 등의 역할을 한다고 알려져 있다.

4. 코코아 버터(Cocoa Butter)

코코아 버터는 연노랑 색의 지질로 26°C 이하에서는 단단한 물성을 보이고 30°C 근처에서 녹기 시작하여 35°C 이상에서는 급격히 용해되는 특성을 보여 입 속에서 코코아 버터가 녹을 때 부드럽고 시원한 감을 느끼게 한다. 이러한 특이한 성질은 글리세리드의 조성에 의해 나타나는데 코코아 버터는 다른 대부분의 지방질과는 달리 단지 몇 개의 트리글리세리드만을 함유하며, 그중 특히 세 종류가 전체 무게의 약 80%를 차지하고 있다. 1(3)-팔미토일-3(1)-스테아로일-2-모노올레인(POS), 1,3-디스테아로일-2-모노올레인(SOS)이 전체 트리글리세리드 중 각각 52%와 18.4%를 차지하며, 대부분의 올레인

산은 트리글리세리드의 2번 위치에 포함되어 있다.

5. 유화제(Emulsifier)

식품 유화제는 유지를 포함하는 가공식품에 필수적인 성분으로, 기름과 물을 섞어주어 에멀전을 만드는 특성이 있다. 이러한 특성 때문에 유화제는 에멀전을 형성하는 식품인 우유, 버터, 마가린, 마요네즈, 각종 소스, 케이크반죽, 첨가제로 널리 이용되고 있다. 현재 사용되고 있는 유지를 기초로 하는 것들이 많은데, 그중 mono- 및 diglyceride의 혼합물은 여러 가공식품의 유화제로 이용되고 있으며, 화장품의 계면활성제로도 사용되는 등 여러 가지 식품 및 약품가공에 널리 사용되고 있다. 순수한 위치 특이적 1,3-sn-diacylglycerols과 1(3)-rac-monoacylglycerols은 인지질과 당지질, lipoprotein 합성의 전구체로 이용되며, 항염증물질과 γ -아미노뷰티릭산(GABA) 등과 같은 여러 약품의 약리 전달물질로 이용되며 생물공정에 사용되는 효소의 중요한 활성촉진제제로서도 이용되고 있다.

6. 생체계면활성제 (Biosurfactants)

계면활성제란 친수성과 소수성을 동시에 가지고 유화액 내에서 계면의 불안정성을 줄이는 물질로서 특히 자연상태에 존재하는 것을 생체계면활성제라고 한다. 유지류에 있는 생체계면활성제에는 레시틴, monoacylglycerol, saponin,

glycolipid, lipoprotein 등이 있는데 새로운 생체 계면활성제로서 글리세롤과 콩의 포스파티딜콜린을 기질로 하여 phospholipase D를 이용, phosphatidyl glycerol을 다량 생산하는 방법이 연구되었다. 화학적으로 변성된 계면활성제를 식품에 첨가하는 것이 안전성에 있어 의문시되는 상황에서 자연상태에서는 소량만 존재하는 생체계면활성제를 효소적인 방법으로 다량 생산할 수 있다는 점이 큰 장점이나 활성이 좋은 효소의 발견과 반응기의 개발 등이 상업적 생산의 관건이 된다.

기능성 지질의 상업적 생산기술

1. Docosahexaenoic acid(DHA)의 생산

정어리, 꽁치, 멸치, 고등어 등 등푸른생선의 지질 중에 11~33% 정도 함유되어 있는 DHA는 여러 가지 방법에 의하여 상업적으로 농축되어 왔다. 그러나 저온분별결정법으로는 고농도로 농축이 불가능하며 수율이 낮은 단점이 있고, 진공증류법은 공정중 시료의 열변성이 일어나기 쉬운 단점이 있으며, 요소부가법은 고농도로 농축할 수 있으나 과정이 복잡한 단점이 있고, HPLC 방법으로는 약 85%까지 농축이 가능하나 분리에 시간이 오래 걸리는 단점이 있다. 이러한 점 이외에도 위의 방법으로는 EPA와 DHA를 분리하기가 매우 어려운 결정적인 약점을 갖고 있다. 실험실적으로는 초임계유체를 이용하여 EPA와 DHA를 개별적으로 고순도

로 분리한 예가 있으나 아직 산업화되지는 못하고 있다.

따라서 EPA가 없는 DHA만을 효율적으로 얻기 위하여, 미생물을 이용한 생산방법이 연구되었는데, 미국의 Martek사에서 microalgae (MK8805)를 배양하여 linoleic acid, γ -linolenic acid, dihomogamma-linolenic acid, arachidonic acid, EPA 등이 함유되어 있지 않으며, DHA 함량이 48%에 이르는 단세포유지(Single Cell Oil)를 "DHASCO"라는 상품명으로 생산, 판매하게 되었다. DHASCO에서 DHA를 농축하는 것은 상당히 용이하다. 즉 동결건조된 균체를 검화시킨 후 냉각하여 여과한다. 물로 희석한 후 불검화물을 hexane으로 추출하고, 수용액 층을 염산으로 산성화하여 생긴 유리지방산을 hexane으로 추출한다. 증발로 얻어진 유리지방산을 5배의 diethylether에 녹여 -78°C에서 정치 후 원심분리로 결정을 제거한다. Diethylether층에 남은 유리지방산의 약 60%는 DHA인데, 이것을 methanol (10 ml/g)에 녹여 요소(2 g/g 지방산)를 가하고 요소가 녹을 때까지 가열한 후 다시 냉각하여 포화지방산과 oleic acid를 요소부가물로 여과, 제거하면 DHA의 함량은 약 82%가 된다(표 1).

2. 미생물을 이용한 Arachidonic acid 생산

ARA는 동물조직에 널리 분포하고 있으나, 돼지의 조직이나 정어리로부터 얻을 때는 함량이 5% 밖에는 안되며, 수율은 전체기준 0.2% 미만 밖에는 안되어 새로운 자원을 찾게 되었다.

표 1. MK8805 (DHASCO)로부터 DHA의 정제

| 지방산 | 원 유 | 중간정제유 | 최종제품 |
|--------|------|-------|------|
| C 12:0 | 5.5 | 3.7 | 2.0 |
| C 14:0 | 18.1 | 6.5 | 5.3 |
| C 16:0 | 14.4 | 2.6 | 4.0 |
| C 16:1 | 2.3 | 2.7 | 1.4 |
| C 18:1 | 11.3 | 23.8 | 4.9 |
| C 22:6 | 30.2 | 60.6 | 82.3 |

Mortierella alpina(ATCC 32221)는 유지의 80% 이상을 ARA로 생산하는 것으로 보고되는데, 이 균주를 2% 소맥강, 1% peptone, 750 mg/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10% 포도당 배지에서 aeration 0.5 vvm, 20°C, 200 rpm의 조건으로 500 L 발효조에서 10~14일 배양하면, pulpy cell, 26 g DCW/L, 8.1 FAME/L, 44.2% ARA in FAME, 3.56 g ARME/L를 얻을 수 있다. 또한 교반속도를 500 rpm으로 증가시키면 grainy cell, 46.2 g DCW/L, 14.9 g FAME/L, 71.1% ARA, 10.6 g ARAME/L를 얻을 수 있다고 보고되었다. 배양 후 회수된 것은 균체를 milling과 hexane/ethanol 추출 후 methyl esterification 되어 urea adduction(FAMES/methanol/urea 1:10:4, w/w/w) 으로 정제하면 90%의 순도를 갖는 ARA를 얻을 수 있으나 프로스타글라딘의 합성에는 HPLC로 정제된 순도 99% 이상의 ARA(수율 약 25%)가 사용된다. 최근에는 식물체를 이용한 ARA의 생산도 시도되고 있다.

3. 미생물을 이용한 γ -linolenic acid의 생산

특수지방산이나 그 함유유지의 미생물에 의

한 생산기술 개발의 진보는 현저하다. 그 중에서는 사상균을 사용한 γ -리놀렌산과 그 함유유지의 생산기술은 그 공업화가 추진된 것과 함께 이들 기술의 선두 위치를 차지하고 있다.

γ -linolenic acid(cis-6,9,12-Octadecadienoic acid)는 리놀레산(n-6계)의 필수지방산이며, 프로스타그란딘의 전구물질로써 그 생리활성이 여러 가지로 검토되고 있으며 중요한 지방산으로 알려져 있다. γ -linolenic acid를 함유한 유지로서는 달맞이꽃 종자에서의 추출유가 알려져 있으며 실용단계에 있으나 1년초인 달맞이꽃의 재배에는 넓은 토지와 긴 기간을 필요로 하여 경제면적이 좁은 나라에서는 생산수단을 갖고 있지 못하기 때문에 새로운 생산수단의 개발이 요구되었다.

γ -linolenic acid 등의 n-6계의 고도불포화지방산을 공업적으로 생산하는 미생물은 *Mucor*속, *Cunninghamella*속 및 *Mortierella*속이 있다. *Mortierella*속 균은 γ -linolenic acid를 함유하며 고농도의 당질(주로 포도당)을 탄소원으로 이용하여 증식하여 지질함량이 높은 균체를 고농도로 생산한다. 30 l 발효조에서 탄소원농도 100 g/l 이상의 배지에서 배양하면 균체 20 g/l, 균체내 지

질함량 6~11%를 얻을 수 있다. 제조공정은 균체의 배양, 균체의 파쇄, 유지의 추출 및 정제 공정으로 구성되어 있다. 배양공정에서는 포도당 배지를 이용하며, 균체회수, 탈수, 건조하여 건조균체를 얻는다. 건조균체는 γ -linolenic acid 이외에도 필수 아미노산 및 비타민 B군을 함유하고 있다. 건조균체의 세포 내에 축적된 유지는 균체 세포막의 파쇄, 용매에 의한 유지의 추출, 미셀라의 감압농축 후 원유로써 얻어지며 원유는 탈산, 탈색, 탈취되어 정제유가 얻어진다.

4. 리파제를 이용한 재구성 지방질의 합성

중쇄 지방질의 상업적 합성방법은 촉매 없이 고온 고압에서 직접 에스테르화시켜 합성한 다음, 알칼리세정, steam refining, 분자증류, 한외여과 및 활성탄 흡착 등의 여러 단계의 분리정제공정을 거쳐 생산, 공급되고 있다. 그러나 고온 고압 조건에서의 중쇄 지방질의 합성은 반응이 진행되면서 여러 가지 부산물들이 생성되는 단점이 있다. 이러한 단점을 극복하기 위해 지방을 가수분해하는 효소로 알려진 리파제를 이용해 중쇄 지방질을 합성한다. 리파제는 가수분해, alcoholysis, glycerolysis 반응을 촉매하는 효소로써 미수계 (microaqueous system: 물이 효소활성을 나타내는 최저 수준으로 존재하고, 소수성의 기질이나 유기용매가 대부분을 차지하는 반응계)에서 에스테르화 반응을 수행할 수 있는 특성이 보고되었고, 이를 이용해 많은 중쇄 지방과 같은 지방합성에 대한 연구가 수행

되어 왔다.

리파제의 에스테르 교환반응을 이용하여 천연의 DHA를 중성지방이나 인지질에 도입함으로써 소화력 향상 및 영양학적으로 기능성을 향상시킨 식품을 제조할 수 있다. 또한 포스포리파제 A2를 이용하여 phosphatidylcholin의 sn-2 위치에 EPA나 DHA를 에스테르화 하여 영양학적으로나 의학적으로 가치 있는 새로운 식품을 창출할 수 있다. 따라서 이 분야의 계속된 연구가 활발히 진행되고 있다.

Caprenin은 P&G사에 의해 1992년에 시장을 나왔는데, 이는 caprylic, capric, 그리고 behenic 포화지방산이 에스테르결합을 하고 있는 재구성 트리글리세리드이다. Caprenin은 g당 5cal의 열량을 가지고 있다. 원래는 코코아버터 대용지를 만들기 위한 것이었는데, Mars사의 Milky Way II와 Hershey사의 Reduced Calorie and Fat candy bars에 사용되어 현재 시장에서 반응을 보이고있는 상태이다. 그러나 Mars사는 저칼로리 Milky Way II의 전국적 선전을 유보하고 있고, Hershey Foods Corp.사는 시험을 끝내고 그 결과를 분석하고 있다고 한다. 1993년 9월 Wall Street Journal지 리포터인 Gabriella Stern에 따르면 문제는 소비자들이 캔디바에 만족하는 것이 칼로리, 지방을 포함한 모든 것이 진짜이기를 원할지, 혹은 칼로리 뿐만 아니라, 맛까지도 부족한 것을 원할지가 문제이다라고 기고했다.

Salatrim은 short-and long-chain acid triglyceride molecules라는 내용의 약자로 명명된

Nabisco사의 대체유지이다. 이들은 글리세롤의 골격에 1,3번 위치에 포화지방산을 결합시키고, 2번 위치에 butyric, propionic, acetic acid와 같은 단쇄 지방산을 에스테르 결합으로 합성시켜 만든 재구성 대체유지이다. 이들의 제조방법은 triacetin, tripropionin 혹은 tributrin과 수소 경화된 식물성 식용유지를 에스테르 교환반응을 통하여 1, 3번 위치에 포화 지방산을 첨가하는 방법으로 이루어진다. 이들은 2번 위치에 결합된 지방산의 종류와 1, 3번 위치에 장쇄 지방산이 모두 결합된 것과 하나만 결합된 것의 상대 비율을 조절함으로써 여러 가지 물성의 대체유지를 만든다고 한다. 이들은 포화지방산이 체장 리파제에 의해 분해되어 흡수되는 속도가 느리다는 것과 2번 위치에 단분자 지방산을 결합시킴으로써 소화흡수 속도를 늦추어 칼로리를 낮춘다는 것이다. Salatrim은 1994년 6월에 GRAS status를 얻었다.

Captrin은 Stepan Food Ingredients사 제품으로 주로 C8과 C10으로 이루어진 포화지방산이 글리세롤 분자에 무작위로 결합된 재구성 중쇄 지방질(Medium Chain Triglyceride, MCT)이다. 이들은 1994년 10월에 FDA로부터 GRAS상태를 확인 신청해 놓고 있다. Stepan사는 Neobe M-5 MCT를 식품에 적용할 예정이라고 한다.

5. 코코아버터 대용지의 생산

화학적 방법은 고압 하에서 sodium alkoxide와 같은 화학촉매를 이용하여 에스테르 교환반

응을 하는 것이나, 이 경우 글리세리드 내의 지방산 분포가 무작위적이 됨에 따라 온도에 따른 원하는 물성이 나타나지 않는다. 그러나 1,3-특이성 리파제를 이용하는 경우 2번 위치의 올레인산은 유지시키면서 1, 3번 위치의 지방산을 바꿀 수 있으므로 코코아버터 대용유지를 생산할 수 있다.

6. 유지대용품의 생산

근년에는 유지의 과다섭취로 인한 건강 의학적인 문제가 심각해지고 있으며 이에 따라 저칼로리 또는 무칼로리(비흡수) 대체유지의 개발이 활발한 상태이다. 이 분야에 있어서 가장 큰 문제는 유지의 맛과 질감을 유지하면서도 무칼로리 혹은 저칼로리인 물질을 개발하는 것이며, 또한 튀김이나 제빵 등 고온에서도 안정성을 가지는 물질을 개발하는 것이다.

1993년 미국의 Calorie Control Council가 보고한 'Fat Reduction in Foods'에 따르면 단백질이나 탄수화물을 기초로 하는 대체 유지의 경우 처음 두 가지 조건은 갖추었으나 튀김과 같은 고온의 조건에서는 근본적으로 부적합하다고 한다. 또한 유화제의 경우를 제외하고 대체유지는 아직 개발단계에 있으며, 이들의 조성에 대한 특성은 여전히 개량되는 단계이다. Calorie Control Council은 식품에서 열량용 유지를 직접 대체하기 위하여 개발중인 유지성분들을 'lipid analogs'라는 용어로 정의하고 있다. 이들 물질들은 다양한 backbone을 가지고 있으

며 대개는 여기에 지방산이나 탈수화된 에테르 형태가 에스테르결합을 하여 소수성의외부 껍질을 형성케 된다. 지방산 성분의 포화도를 변화시킴으로서 점도나 경도와 같은 물성을 조절한다. 이 보고서에 따르면 지방산의 포화도는 요오드가와 지방산 조성으로 측정하며, 대체유지에서 에스테르결합을 하지 않은 유리 수산기는 히드록실가로 표현한다.

대체유지는 크게 두 가지 부류로 나누어 볼 수 있다. 첫째는 이미 식품의 일반성분으로서 존재하고 있는 것이지만 공학적으로 수식을 하여 유지와 비슷한 성질을 가지게 하는 것이다. 예를 들어 Simplex나 N-oil과 같은 단백질이 나 starch를 기초로 하는 물질로서, 대개 g당 4cal의 열량을 가진다. 이들은 이미 식품성분이므로 FDA에 식품첨가물로서 petitioning process를 거칠 필요가 없다. 그러나 대개 이들은 열안정성이 낮은 편이고, 생산자들은 그렇지 않다고 하나 보통 품질이 좋지 않은 편이다. 둘째로는 합성 대체유지로서 fat mimetic라고 하는데, 예를 들어 Olestra(P&G사), Ethoxylated TG(ARCO)와 같은 것이다. 이들은 인체에 흡수가 되지 않으므로 열량이 전혀 없고 맛과 질감이 유지와 유사하다는 것이다. 그러나 이들은 새로운 식품첨가물로서 FDA의 승인을 얻어야만 판매가 가능하며, 이를 위해서는 독성검사 등 수백만 불의 비용이 소요된다. 현재 어느 것도 식품에 사용허가가 난 것이 없는 실정이다.

대체유지로서 개발되고 있는 물질들은 sucrose polyester, esterified propoxylated glycerol, methyl

glucose polyester, alkyl glycoside polyesters (tri-and tetraesters), carboxy/carboxylated esters, dialkyl dihexadecylmalonate, trialkoxytricarballlylate, sorbitol fatty acid esters 등이 있다.

7. 유화제의 생산

현재 식품산업에서 널리 쓰이고 있는 유화제인 모노글리세리드는 고온(250°C 이상) 하에서 화학합성 반응을 통해 생산되며, 각각 약 45% 수율로 모노- 및 디-글리세리드가 얻어지며 고온으로 인한 수종류의 부산물이 생성된다. 이들 부산물들과 미반응기질을 반복적인 후속 분자 증류(molecular distillation: 감압증류) 과정을 통해 제거시킴과 동시에 모노글리세리드의 함량이 90% 이상이 되게 하는 것이 모노글리세리드의 일반적인 공업적 생산방법이다. 그런데 이러한 현재의 공업적 MG 생산과정은 다음과 같은 사항들에서 개선의 여지가 있다. 즉, 고온조건으로 인해 산물인 MG의 지방산은 상당부분이 포화 또는 산화를 겪게 되어 산물의 품질이 떨어지며 부산물이 생성되며, 위에서 언급한 순수한 위치특이성 모노- 및 디글리세리드의 생산은 불가능하다. 그러므로 효소반응을 통해 합성하려는 연구가 진행되고 있다. 여러 가지 효소들 중에서도 특히 리파제는 최근에 들어 주목받고 있는 효소이다. 리파제는 다양한 반응을 촉매할 수 있을 뿐 아니라 광범위한 반응조건에서도 효소로서의 특성을 잘 나타내기 때문에 고부가가치의 기능성 유화제 생산에 이용하기

표 2. 리파제를 이용한 유화제 생산방법의 장점

- 1) 효소반응은 상온/상압에서 일어나므로 고온유지를 위해 필요한 에너지비용을 절감하여 유화제 생산단가 저하에 기여할 수 있다.
- 2) 효소반응에서는 기질의 변성 (포화/산화에 의한 변형)과 부산물 형성이 없으므로 고품질의 생합성 유화제를 얻음과 동시에 후속 정제과정을 대폭 간소화시킨다.
- 3) 효소는 입체이성질체를 구분할 수 있으므로 광화학적 입체이성질체를 비롯한 특수산물을 합성할 수 있다.
- 4) 효소반응에서는 산물의 조성 (모노-, 디-글리세리드의 비율)을 조절할 수 있다.

에 적합하다. 표 2는 리파제를 이용한 유화제 생산에 대한 장점을 요약해 놓았다.

8. 인지질의 생산

유지식품과 불가분의 관계를 가지고 있는 지질류의 대표적인 예가 인지질(lecithin)로서 이는 생체막의 구성성분으로 생명유지에 매우 중요한 기능을 부여하고 있다. 인지질은 체내 여러 곳에서 각기 독특한 생리적, 영양학적 작용을 하고 있는 아주 중요한 물질임에도 불구하고 그의 대사에 관한 연구는 아직 초기단계에 머물고 있는 실정이다. 또한 그의 섭취량도 식품의 정제, 과도한 도정, 그리고 전통적인 식습관의 퇴조 등으로 최근 들어 급속한 감소가 되고 있는 실정이다. Cairella 등은 구미지역에서 1인당 인지질 섭취량이 100여년간 약 1/2로 감소하여 평균 1.6 g/day라고 한다. 한편, 선진국들의 식생활 현상으로는 육식의 증가로 포화지방산의 과다섭취, 인지질, 섬유질, vitamin, mineral 등의 부족이 나타나는데, 이들은 곡물의 배아에 다량 함유된 물질들이라 할 수 있다. 많은 연구결과로부터 현대인은 영양문제에 각종 결함이

있다는 것이 명백해짐에 따라 영양보조식품이 특별히 취급되고 있다. 인지질에 있어서도, 그의 섭취부족과 과다에 의한 대사부전에 기인하는 질병과의 관계(고혈중 cholesterol병, 담즙 이상과 담석, 신경근의 부전 등)가 구미지역을 중심으로 연구되고 있으며, 인지질의 투여에 의한 병상개선이 보고되고 있다. 또 인지질의 섭취량 문제가 영양학적, 병리학적으로 연구되고 있다.

현재 세계적으로 대두유는 약 1,500만 톤 정도가 착유되고 있는데, 정제과정으로부터 약 30만 톤의 대두인지질이 생산된다. 그중 약 10~13만톤 정도가 유용하게 사용되며, 나머지는 동물사료로 쓰여지고 있다. 일본의 경우에는 1.5만 톤의 대두 인지질이 생산되는데 이중 약 5,000톤(식품용 3,000톤)이 유용하게 사용되며, 이는 구미지역의 1/3~1/4 정도이다. 한국의 경우 통계가 없으나 대개 생산되는 인지질의 대부분은 동물사료로 이용되고 있는 실정이다.

현재 국내에서 사용되는 식품용 유화제중 biosurfactant는 인지질과 monoglyceride가 있고, 천연유래 물질과 차이가 많은 화학합성품이 사용되고 있다. 일반적으로 대두 lecithin은 그 사용용도가 한정되어 있고, 구미에서도 여러 가지

로 가공하여 사용하여 왔다. 특히 유럽의 경우 10여년 전부터 인지질의 반 이상이 modified lecithin으로 판매되고 있다. Modified lecithin에는 분별 등의 물리적 처리, N-amino화나 수소첨가 등의 화학처리, 효소처리를 한 것 등이 있다. 효소로는 phospholipase가 사용되고 특히 실용적으로는 돼지 췌장의 phospholipase A2를 이용한 monoacyl화가 주된 처리이다.

인지질은 중성지질에 대한 상대적인 큰 그룹을 총칭하는 말로서, 인지질의 극성부분에 따라 여러 가지가 있다. 인지질의 대표 격인 레시틴은 학술적으로는 phosphatidylcholine을 나타내지만 통상적으로는 phosphatidylcholine이 포함된 인지질 전체를 지칭하기도 한다. 난황 인지질의 경우 phosphatidylcholine과 phosphatidylethanolamine이 대부분이며 각각 60~70%와 20~30%를 이루고 있다. 특수한 임상적 가능성을 가지는 phosphatidylserine의 경우 소뇌나 양뇌로부터 추출한 기름에서 그 함량이 10% 정도로 높은 편이나, 이들의 대량생산은 원료물질의 한계로 어려움이 있다. 따라서 특정성분의 인지질을 대량 얻기 위해서는 생물공학적인 방법이 요구되기도 한다.

인지질의 생물공학적인 전환에는 phospholipase가 사용되고 있으며, 이들은 분해하는 인지질의 에스테르 결합위치에 따라 4종류로 나뉘는데 단지 포스포리파제 A2와 C, 그리고 D만이 상업적으로 구입이 가능하다. 기질로는 여러 순도의 레시틴(lecithin)이 쓰이는데 레시틴은 식품산업에서 중요한 유화제로 사용되고 있으며 또한

의학분야에서는 여러 종류의 레시틴으로 이루어진 리포솜이 약물전달시스템에 이용되기도 한다. 일본에서는 양배추 포스포리파제 D를 이용하여 유화액계와 이상계에서 transphosphatidyl-ation 반응을 통하여, phosphatidylcholine보다 수소 결합능력이 크고, 폐포의 안정성을 증대시키며, 유아의 폐발달에 필수적인 phosphatidylglycerol을 생산하는 연구를 수행하였다. 또한 미생물의 대사 연구에 사용되는 cyclopropane phosphatide의 전구체이며, thromboplastin 발달을 촉진시키며, 포스파티딜세린을 함유한 막의 procoagulant 활성을 가지게 하는 phosphatidylethanolamine을 여러 가지 효소원으로부터 얻은 포스포리파제 D를 이용하여 합성하였다.

또한 미국과 일본에서는 모델 막시스템에서 중요한 역할을 하며, 생체 내에서 뇌에너지 대사를 억제시키는 유일한 포스포리피드로서, 뇌에서 강력한 procoagulant 효과를 가지는 thromboplastin 작용을 억제하는 능력이 강력하여 anticoagulant 효과를 보이고, 최근에는 쥐에서 quinidine drug을 폐에 선택적으로 전달하는데 관여한다고 보고된 포스파티딜세린(phosphatidylserine)을 여러 효소원으로부터 얻은 포스포리파제 D를 이용하여 값싼 포스파티딜콜린으로부터 생산하고자 시도하였다. 또한 bis(phosphatidyl)inositol과 phosphatidic acid의 생산과, 생체 신호전달에 깊이 관여되어있는 dialkylglycerol을 생산하기 위해 포스포리파제 D를 이용한 연구도 보고된바 있다.

최근에는 포스포리파제 A2를 이용하여

prostaglandin과 serum lipid, cholesterol, phospholipids, triglycerides, platelet aggregation 뿐만 아니라 면역조절에도 관여하고 있으며, 건강 증진과 특히 동맥성 질병과 같은 질병 방에 작용하는 것으로 알려진 n-3 지방산을 포스파티딜콜린과 같은 인지질에 첨가시키는 transphosphatidylatation 반응에 관한 연구도 보고되고 있다. 또한 lipid/membrane 연구나 식품, 화장품의 유화제 혹은 의약품 원료로 사용하기 위한 인지질의 개질에도 포스포리파제 A2가 사용된다. 그리고 인지질보다는 유화력이 월등히 좋기 때문에 식품, 의약품 및 공업적으로 큰 잠재력을 가지는 라이소인지질(lysophospholipid)의 생산에도 관심이 모여지고 있다. 포스포리파제를 이용한 인지질의 전환 및 개질은 그 가능성이 무한히 크며, 생산되는 특수 인지질의 이용 가능성도 무한하다고 할 수 있다.

기능성 지질 및 유지생명공학의 앞으로의 전망

우리나라는 최근 20여년 동안 국민소득의 증대에 비례하여 유지소비량도 급격히 늘어났다. 이러한 시점에서 유지의 영양, 유지의 자급율, 유지의 산화와 안정성, 유지의 가공, 그리고 유지의 생물공학적인 기술의 응용 등에 관한 연구는 매우 절실하다고 볼 수 있다. 비록 우리나라의 현실이 유지자원의 확보에 어려움이 있다고 하나 생명공학기술을 이용한 여종의 육종

이나 단세포유지의 발효기술 등을 통하여 연구를 계속한다면, 현재는 경쟁력이 없을지라도 미래에는 경쟁력 있는 유지자원을 확보할 수 있으리라고 생각된다. 또한 유지소비량의 증가로 인해 발생하는 영양학적인 문제를 해결하고, 신기능성 유지를 경제적으로 생산하는 연구를 수행한다면 국민의 건강한 식생활에도 크게 기여할 수 있을 것이다.

어쨌든 다양한 지질소재는 종래의 단순한 고칼로리 식품의 개념에서 벗어나 인체의 생리활성조절에 필수 불가결한 성분으로서 알려지고 있으며 건강에 대한 관심이 높아지면서 재래지질이 갖고 있는 문제점을 극복한 새로운 지질소재의 개발이 활발히 진행되고 있는 상태이다. 이러한 지질소재는 식품, 의약품, 화장품, 유화제 이외에도 화상기록재료, 정보기록재료, 분자인식장소로써의 지질막, 바이오센서의 구성요소로써 새롭게 이용되고 있다.

앞으로 신소재 유지류에 대한 영양학적, 산업적인 요구는 더욱 거세질 것으로 전망되며 이에 부응하기 위해서는 영양학계, 의학계, 생물공학계 등 여러 학계 연구진들과 더불어 새로운 종자개발과 아울러 농업분야와 실제 산업체에 종사하는 인력간에 유기적이고 상호보완적인 협력이 반드시 필요하다고 생각된다. 더욱이 유지류의 대부분을 외국에서 수입하여 사용하는 입장에 있는 우리나라에서는 고도의 기술력을 이용한 고부가가치 신소재 유지류의 생산에 주력해야 할 것이다.

결 언

경제, 사회생활의 변천과 더불어 수반된 식생활의 변천으로 종래 개념의 지질 섭취는 계속 늘어왔는데, 성인다발형 질병이 문제되고 칼로리 섭취를 줄이려는 노력이 존재하는 한 기능성 지질의 경제성은 식생활과 밀접한 관계에 있게 된다. 특히 재구성지질의 관련성은 매우 높은 편이다. 국내 시장은 소규모로 인하여 연구 및 시설에 투자가 미비하고 따라서 필요한 기능성 지질을 대부분 외국에서 수입하여 사용하고 있다. 기능성 지질의 국내 시장 규모를 늘리고 세계 시장으로 진출하기 위해서는 독창적인 기술을 개발하여야만 하고 이를 위해서는 유지생명공학기술에의 지속적인 투자가 이루어져야만 한다. 현재 국내외에서 수행되고 있는 상업적 연구는 주로 고기능성 지질 관련 효소의 경제적인 생산에 집중되어 있으며 이를 위하여 분자유전학, 단백질공학, 효소반응기술, genomics, proteomics 등 모든 첨단 생명공학기술이 활발히 사용되어야 한다.

윤석후 이학박사

- 소속 한국식품연구원 바이오제론연구단
- 전문분야 유지화학, 유지생명공학
- E-mail shyoon@kfri.re.kr
- TEL 031-780-9124

참고문헌

1. Gardner HW, TM Kuo, "Lipid Biotechnology", CRC Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL, USA, 2002
2. Hou CT, JF Shaw, "Biocatalysis and Agricultural Biotechnology", CRC Taylor and Francis Group, BocaRaton, FL, USA, 2009
3. Yoon SH, "Potential market of functional lipids", in "Handbook of functional lipids", ed. C.C. Akoh, Chap. 22, 475-488, CRC, Taylor and Francis Group, BocaRaton, FL, USA, 2006
4. Yoon SH, "Enzymatic Synthesis of Functional Lipids in Organic Solvent Using Lipase", in "Biocatalysis and Biotechnology for Functional Foods and Industrial Products", ed. C.T. Hou & J-F Shaw, Chap. 22, 375-386, CRC, Taylor and Francis Group, BocaRaton, FL, USA, 2007