

Lipozyme TLIM을 효소적 반응촉매로 이용한 glyceryl monooleate로부터의 diacylglycerol의 합성

전미선 · 이초룡 · 이기택*

충남대학교 식품공학과

Production of Diacylglycerol from Lipase by the Catalyzed Reaction of Soybean Oil and Glycerol Monooleate

Mi-Sun Jeon, Cho-Rong Lee, and Ki-Teak Lee*

Department of Food Science and Technology, Chungnam National University

Abstract Diacylglycerol (DAG) was produced from lipase by the catalyzed synthesis of soybean oil (SBO) and glycerol monooleate (GMO) with Lipozyme TLIM (*Thermomyces lanuginosa*). Effects of reaction time, molar ratio and enzyme road were studied. When 2:1, 1:1 and 1:2 (SBO:GMO) molar ratios with 20% Lipozyme TLIM were applied in a 1-hr reaction, the concentrations of DAG produced were 17.8, 20.0 and 20.4 g/100 g oil, respectively. Different amounts (2, 5, 10 and 20%) of Lipozyme TLIM were used at a 1:2 (SBO:GMO) molar ratio, and the concentrations of DAG produced in a 1-hr reaction were 10.8, 14.0, 16.9 and 20.4 g/100 g oil, respectively. During a 72-hr reaction, 10.8-22.7 g/100 g oil of DAG were produced under the reaction conditions in this study.

Key words: Lipozyme TLIM, synthesis of diacylglycerol, soybean oil, glycerol monooleate

서 론

Diacylglycerol(DAG) 형태의 식용유지는 장기간 섭취할 경우, 현재 보편적으로 사용되는 triacylglycerol(TAG) 형태의 유지를 섭취하였을 경우보다 체내 지방축적을 감소화 시키는 효과가 있는 것으로 보고되고 있다(1-3). DAG 유지는 화학적 또는 효소적 방법으로 생산될 수 있는데, 화학적 방법은 에너지의 소비가 크고 부산물이 많이 생기는 단점이 있어 근래에는 효소적 방법에서의 전환이 추세인 것으로 알려져 있다. 효소적 방법은 반응온도가 비교적 낮고, TAG 분자에 대해 위치특이성을 가지고 있어 원하는 형태의 유지를 효율적으로 생산할 수 있으며, 고정화 효소를 사용할 경우 반응 후 재 수거 할 수 있는 장점을 가지고 있다. 효소를 이용하여 DAG 유지를 합성하는 방법에는 TAG를 hydrolysis시키는 반응(4)과 free fatty acid(FFA)와 glycerol 간의 반응(5,6), 그리고 TAG와 glycerol과의 반응(7,8)을 이용한 방법들이 보고되고 있다. 그러나 TAG를 hydrolysis시키는 반응은 MAG 등 부산물이 다량 생성되어 DAG의 수율이 낮다고 알려져 있다(4). 또한 glycerol은 high-polar 물질로써, 반응 시 고정화된 효소에 흡착되어 에스테르교환 반응을 제한하는 단점이 있기 때문에, 이를 해결하기 위하여 기질에 silica gel을 첨가하여 반응 하는 연

구 등이 보고되고 있다(5,6). 첨가된 silica gel은 glycerol을 흡착하여 효소의 활성부위를 보호하기 때문에 에스테르교환 반응이 효율적으로 이루어지도록 하는 것으로 알려져 있다. 특히 본 연구에서 사용하고자 하는 효소는 Lipozyme TLIM(from *Thermomyces lanuginosa*)으로 silica gel에 고정화되어 있으므로, glycerol을 기질로 사용할 경우 glycerol이 Lipozyme TLIM에 흡착하여 반응이 제한될 수 있다. 따라서 이러한 문제점을 보완하기 위하여 본 연구에서는 기질로써 글리세린 1분자에 지방산이 1개 결합한 형태인 glyceryl monooleate(GMO)를 사용하였다. GMO는 glycerol보다 친유성이기 때문에 Lipozyme TLIM에 흡착될 가능성이 감소하므로 silica gel을 사용하지 않고서도 DAG 생성율의 증가를 기대할 수 있다고 여겨진다.

본 연구는 기질로써 대두유(soybean oil, SBO)와 glycerin monooleate(GMO)를 사용하여 TAG의 sn-1과 3 위치에 위치특이성을 갖는 Lipozyme TLIM과의 반응을 통하여 72시간 동안 반응하면서 normal phase high performance liquid chromatography(NP-HPLC)분석을 통하여 생성된 DAG의 양을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에서 기질로 사용된 SBO는 시중에 유통되고 있는 C사(Incheon, Korea)의 제품을 구입하였으며, GMO는 (주)일신웰스(Seoul, Korea), oleic ethyl ester는 (주)네오메가(Daejeon, Korea)에서 제공받아 사용하였다. Oleic acid는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. DAG를 합성을 위해 사용된 고정화 효소는 Lipozyme TLIM(from *Thermomyces lanuginosa*)으로 Novo Nordisk Biochem. North America Inc.(Franklinton, NC,

*Corresponding author: Ki-Teak Lee, Department of Food Science and Technology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Tel: 82-42-821-6729

Fax: 82-42-822-6729

E-mail: ktleee@cnu.ac.kr

Received July 29, 2009; revised December 18, 2009;

accepted December 18, 2009

USA)의 제품을 사용하였다. 표준시약으로 사용된 1,3-dioleoyl-rac-glycerol와 1,2-dioleoyl-rac-glycerol은 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

DAG의 효소적 합성

기질인 glycerol이 Lipozyme TLIM에 미치는 영향을 확인하기 위하여 기질의 종류를 다음과 같이 달리하여 실험하였다. Glycerol과 oleic ethyl ester의 몰비율 1:2(30:202 g), glycerol과 oleic acid의 몰비율 1:2(30:184 g) 그리고 SBO와 GMO의 몰비율 1:2(50:40.8 g)가 되도록 하였으며, Lipozyme TLIM은 기질 질량의 2%를 사용하여 6 hr 동안 반응 후 시료를 채취하였다. 한편, 합성기질인 SBO와 GMO의 몰비율에 따른 DAG 생성율을 비교하기 위하여 각각의 몰비율이 2:1(50:10.2 g), 1:1(50:20.4 g), 1:2(50:40.8 g)가 되도록 하였으며, 이때의 효소는 Lipozyme TLIM으로 총 기질 질량의 20%에 해당하는 양을 첨가하여 반응하였다. 그리고 효소 양에 따른 DAG 생성율을 알아보기 위하여 기질의 질량에 대한 효소의 양을 2, 5, 10, 20%로 하여 실험하였으며, 이때의 기질은 SBO와 GMO의 몰비율이 1:2가 되게 하였다. 반응 시작 후 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 hr 마다 시료를 취하여 syringe filter(25 mm, 0.5 µm, Whatman, Maidstone, Kent, UK)를 이용하여 여과한 뒤, 분석에 사용하였다. 모든 반응은 250 mL 삼각 플라스크를 이용하여 항온 교반 수조에서 이루어졌으며 55°C와 200 rpm의 조건으로 실험하였다.

Normal phase HPLC 분석 및 정량

합성한 유지의 DAG와 TAG의 함량을 알아보기 위하여 NP-HPLC 분석을 실행하였다. HPLC(Younglin Acme, Anyang, Korea)는 Dual pump(SP930D, Younglin, Anyang, Korea)가 장착된 것을 사용하였으며, 검출기는 evaporative light scattering detector (SEDEX Model 75, SEDERE, Alfortville, France)를, column은

Hypersil BDS CPS 5 µm(250×4.6 mm, Thermo Hypersil Ltd., Cheshire, UK)를 사용하였다. 시료는 각각 일정한 농도로 hexane에 녹인 후, PTFE syringe filter(0.5 µm, Advantec, Tokyo, Japan)로 여과하였다. 이 후 glycerol을 제거하기 위하여 sodium sulfate를 넣어 교반 한 후 sodium sulfate anhydrous column을 이용하여 수분 및 불순물을 제거한 뒤 20 µL의 시료를 auto sampler를 이용하여 기기에 주입하였다. 이동상으로는 A(tert-butyl methyl ether:acetic acid=100:0.4, v/v)용매 B(hexane:acetic acid=100:0.4, v/v)용매를 유속 1 mL/min으로 하여 B용매로 5분간 유지하고, 10분간 용매 A와 B의 부피비 80대 20으로 변화시킨 후 2분간 유지하고 다시 5분간 B용매로 변화시킨 후 8분간 유지하여 분석을 마쳤다. 각 피크는 SBO, GMO, 1,3-dioleoyl-rac-glycerol 및 1,2-dioleoyl-rac-glycerol를 표준물질로 하여 retention time을 비교하여 분석하였다. 또한 SBO, 1,3-dioleoyl-rac-glycerol와 1,2-dioleoyl-rac-glycerol를 표준물질로 하여, 농도에 따른 면적값을 통해 정량곡선을 얻었으며, TAG와 DAG를 정량하였다.

결과 및 고찰

DAG의 합성과 NP-HPLC 분석 및 정량

Lipozyme TLIM을 이용하여 합성한 DAG의 함량을 NP-HPLC 분석을 통하여 정량하였다. 기질인 glycerol이 반응 효소인 Lipozyme TLIM에 미치는 영향을 알아보기 위하여 기질의 종류를 세 가지로 하여 실험하였다(Table 1). 그 결과 glycerol을 기질로 사용한 반응, 즉 glycerol과 oleic ethyl ester와의 반응 그리고 glycerol과 oleic acid와의 반응에서는 DAG가 생성되지 않음을 알 수 있었다. 반면 glycerol을 기질로 사용하지 않은 반응, 즉 GMO와 SBO를 기질로 사용한 반응에서는 DAG가 14.2 g/100 g 생성됨을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 glycerol이 Lipozyme TLIM의 활성을 제한하고 있음을 알 수 있었고, glycerol 대신 GMO를

Table 1. Produced diacylglycerol (DAG) content at the different substrate mixture

Substrate	Molar ratio	Reaction time (hr)	Enzyme	DAG (g/100 g)
Glycerol : Oleic ethyl ester	1:2	6	Lipozyme TLIM 2% ¹⁾	-
Glycerol : Oleic acid	1:2	6	Lipozyme TLIM 2%	-
Glyceryl monooleate : soybean oil	2:1	6	Lipozyme TLIM 2%	14.2

¹⁾Lipozyme TLIM wt% based on the substrates amount.

Table 2. Triacylglycerol (TAG) and diacylglycerol (DAG) contents at the different substrate ratios during the 72-hr reaction

(Unit: g/100 g oil)

Time (hr)	Lipozyme TLIM 20% ¹⁾					
	SBO ²⁾ :GMO ³⁾ =2:1 ⁴⁾		SBO:GMO=1:1		SBO:GMO=1:2	
	TAG	DAG	TAG	DAG	TAG	DAG
0	83	0	71.0	0	55	0
1	74.7	17.8	51.5	20.0	33.8	20.4
3	46.3	16.0	35.9	17.9	25.5	18.9
6	47.1	16.8	28.7	16.9	23.9	18.4
12	50.8	17.5	31.0	16.5	25.4	19.6
24	47.0	15.6	34.4	17.3	33.7	21.6
48	53.2	16.2	37.8	17.7	34.3	22.0
72	57.8	16.7	43.2	19.1	31.6	20.6

¹⁾Lipozyme TLIM wt% based on the substrates amounts.

²⁾Soybean oil.

³⁾Glyceryl monooleate.

⁴⁾Molar ratio.

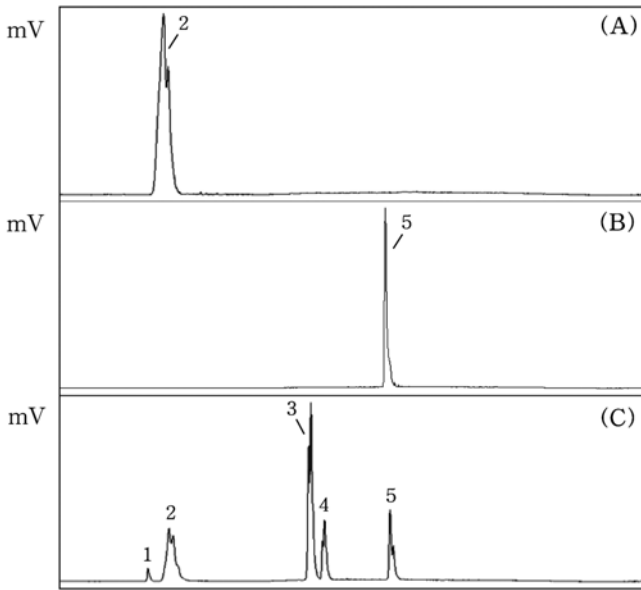


Fig. 1. Chromatogram from the normal-phase high performance liquid chromatography of (A) soybean oil (SBO), (B) glyceryl monooleate (GMO), (C) reactant 1: free fatty acid, 2: triacylglycerol, 3: 1,3-diacylglycerol, 4: 1,2-diacylglycerol, 5: monoacylglycerol

사용 할 경우 DAG가 생성될 수 있음을 확인하였다. 기질인 GMO와 SBO에 Lipozyme TLIM을 이용하여 DAG를 합성하는 최적 반응 조건을 알아보기 위하여 반응시간과 기질의 물 비율 그리고 Lipozyme TLIM의 사용량 등을 변수로 하여 실험하였다. 이 반응에서 TAG로 사용된 SBO와 MAG인 GMO가 TAG의 sn-1,3위치에 특이성을 갖는 고정화 효소의 합성에 의하여 새로운 1,3-DAG와 1,2-DAG로 변환되었다. 이것은 TAG에서 가수분해 되어 분리된 지방산이 GMO에 에스테르 결합을 하면서 TAG는 1,2-DAG 혹은 2-MAG가 되고, GMO는 1,3-DAG를 생성하였기 때문이다.

기질의 물 비율에 따른 DAG 생성율을 비교하기 위하여 효소량을 기질 질량의 20%로 동일하게 설정하고 SBO와 GMO의 물 비율을 각각 2:1, 1:1과 1:2로 하여 반응하였으며 그 결과를 Table

2에 나타내었다. Fig. 1은 SBO와 GMO의 물비율 1:2로 혼합한 기질에 효소를 20% 사용하여 1 hr 반응한 DAG 함유 유지의 NP-HPLC chromatogram을 나타낸 것으로 DAG가 생성되고 있음을 보여준다. 반응 1 hr 후 DAG의 함량은 SBO와 GMO의 물비율이 2:1, 1:1, 1:2일 때 각각 17.8, 20.0, 20.4 g/100 g oil로 나타났으며, 반응 72 hr 후에는 각각 16.7, 19.1, 20.6 g/100 g oil로 나타나, 1 hr와 72 hr 반응 사이의 DAG함량은 큰 차이를 보이지 않았다. 따라서 반응 시작 후 1 hr 안에 DAG의 대부분이 합성되었음을 알 수 있었고 이는 비교적 많은 효소량(기질질량의 20%)을 사용하여 반응하였기 때문으로 생각된다. 반응 1 hr에서 SBO와 GMO가 1:1과 1:2의 물비율 이었을 때 각각 20.0와 20.4 g/100 g의 DAG가 합성되었다. 그러나 SBO와 GMO의 물비율이 1:1과 1:2 일 때의 TAG함량은 각각 51.5와 33.8 g/100 g oil이었기 때문에, 낮은 TAG함량을 보인 1:2(SBO:GMO)의 물비율을 이용하여 DAG를 합성하였다.

한편, Lipozyme TLIM의 사용량에 따른 DAG 생성율을 비교하기 위하여 SBO와 GMO의 물비율을 1:2로 동일하게 설정하고 효소량을 기질 질량의 2, 5, 10, 20%로 하여 반응하였으며 그 결과를 Table 3에 나타내었다. 반응 1 hr의 DAG 함량은 효소량을 기질 질량의 2, 5, 10, 20%를 사용하였을 경우, 각각 10.8, 14.0, 16.9, 및 20.4 g/100 g oil로 나타났다. 이를 통하여 1 hr 반응 하였을 경우, 반응에 사용된 효소량이 증가 할수록 DAG의 생성량이 증가함을 알 수 있었다. 한편, 효소량을 20% 사용하여 72 hr 동안 반응하였을 때의 DAG 생성량은 18.9-22.0 g/100 g oil 함량을 나타내었으나, 효소량을 기질 질량의 2%를 사용하였을 경우에는 1 hr에서 10.8 g/100 g oil의 DAG가 생성된 후 72 hr 반응후 17.3 g/100 g oil까지 증가하였다. 이로써 효소량을 2% 사용하여 72 hr 반응하여도 효소량을 20% 사용하여 1 hr 반응하였을 때보다 낮은 DAG가 생성됨을 알 수 있었다. 또한, 효소량을 10% 사용하였을 경우에는 반응 3 hr 안에 DAG의 함량은 19.5 g/100 g oil로 증가하였으며, 이후 72 hr동안 DAG함량 변화의 차이는 크지 않았고, 효소량을 5% 사용하였을 경우에는 반응 24 hr에 20.2 g/100 g oil 나타났으며, 이후 72 hr까지 DAG함량의 증가가 크게 보이지 않았다. 이처럼 DAG의 함량은 어느 정도의 일정량이 생성된 후에는 반응 시간이 증가하여도 더 이상의 DAG 함량 증가는 이루어 지지 않았으며, 사용된 효소의 양이 적을수록 DAG 함량이 최대에 도달하는데 요구되는 시간은 길어짐을 알 수 있었다.

Table 3. Triacylglycerol (TAG) and diacylglycerol (DAG) contents at the different amounts of Lipozyme TLIM during the 72-hr reaction (Unit: g/100 g oil)

Time (hr)	SBO ¹⁾ :GMO ²⁾ =1:2 ³⁾							
	2% ⁴⁾		5%		10%		20%	
	TAG	DAG	TAG	DAG	TAG	DAG	TAG	DAG
0	55	0	55	0	55	0	55	0
1	46.4	10.8	40.4	14.0	33.9	16.9	33.8	20.4
3	55.4	13.3	33.7	15.5	29.9	19.5	25.5	18.9
6	39.0	14.2	32.9	17.4	27.3	19.3	23.9	18.4
12	43.5	16.0	26.6	17.2	25.4	19.7	25.4	19.6
24	39.3	16.6	27.2	20.2	26.0	20.8	28.7	21.6
48	43.8	17.3	28.0	22.0	28.3	22.7	34.3	22.0
72	41.4	16.3	26.5	21.1	27.6	22.5	31.6	20.6

¹⁾Soybean oil.
²⁾Glyceryl monooleate.
³⁾Molar ratio.
⁴⁾Lipozyme TLIM wt% based on the substrates amounts.

요 약

Glycerol과 oleic ethyl ester와의 반응, 그리고 glycerol과 oleic acid와의 반응에서는 DAG가 생성되지 않았었지만 GMO와 SBO를 기질로 사용한 반응에서는 DAG가 생성됨을 확인하였다. 기질의 몰 비율에 따른 DAG 생성율을 비교하기 위하여 효소량을 기질 질량의 20%로 동일하게 설정하고 SBO와 GMO의 몰비율을 각각 2:1, 1:1과 1:2로 하여 반응한 결과, 1 hr 후 DAG의 함량이 최대로 도달 하였고 그 후에는 큰 차이를 보이지 않았다. 1 hr에서 가장 큰 DAG 함량을 보인 몰비율은 1:1과 1:2(SBO:GMO)일 때로 각각 20.0, 20.4 g/100 g oil로 나타났고, 이 두 몰비율 중 TAG 함량이 낮았던 1:2 몰비율을 이용하여 DAG를 합성 하였다. 한편, 효소의 사용량에 따른 DAG 생성율을 비교하기 위하여 SBO와 GMO의 몰비율을 1:2로 동일하게 설정하고 효소량을 기질 질량의 2, 5, 10, 20%로 하여 반응한 결과, 1 hr의 DAG 함량은 각각 10.8, 14.0, 16.9, 20.4 g/100 g oil로 나타났다. 1 hr 이후의 DAG 생성량을 보면 효소량을 20% 사용한 경우, 72 hr까지 18.9-22.0 g/100 g oil로 비슷한 함량을 나타내었으나 효소량을 기질 질량의 2, 5, 10%를 사용하였을 경우, 1 hr 이후에도 DAG 함량이 증가하는 경향을 보였다.

문 헌

1. Maki KC, Davidson MH, Tsushima R, Matsuo N, Tokimitsu I, Umporowicz DM, Dicklin MR, Foster GS, Ingram KA, Anderson

- BD, Frost SD, Bell M. Consumption of diacylglycerol oil as part of a reduced-energy diet enhances loss of body weight and fat in comparison with consumption of a triacylglycerol control oil. *Am. J. Clin. Nutr.* 76: 1230-1236 (2002)
2. Nagao T, Watanabe H, Goto N, Onizawa K, Taguchi H, Matsuo N, Yasukawa T, Tsushima R, Shimasaki H, Itakura H. Dietary diacylglycerol suppresses accumulation of body fat compared to triacylglycerol in men in a double-blind controlled trial. *J. Nutr.* 130: 792-797 (2000)
3. Saito S, Tomonobu K, Hase T, Tokimitsu I. Effects of diacylglycerol on postprandial energy expenditure and respiratory quotient in healthy subjects. *Nutrition* 22: 30-35 (2006)
4. Plou FJ, Barandiaran M, Calvo MV, Ballesteros A, Pastor E. High-yield production of mono- and di-oleylglycerol by lipase-catalyzed hydrolysis of triolein. *Enzyme Microb. Technol.* 18: 66-71 (1996)
5. Castillo E, Dossat V, Marty A, Condoret JS, Combes D. The role of silica gel in lipase-catalyzed esterification reactions of high-polar substrates. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74: 77-85 (1997)
6. Kwon SJ, Han JJ, Rhee JS. Production and in situ separation of mono- or diacylglycerol catalyzed by lipases in *n*-hexane. *Enzyme Microb. Technol.* 17: 700-704 (1995)
7. Kristensen JB, Xu X, Mu H. Diacylglycerol synthesis by enzymatic glycerolysis: Screening of commercially available lipases. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 82: 329-334 (2005)
8. Park RK, Lee KT. Synthesis and characterization of mono- and diacylglycerol enriched functional oil by enzymatic glycerolysis of corn oil. *Korean J. Food Sci. Technol.* 36: 211-216 (2004)