

지방산 종류에 따른 Diacylglycerol의 효소적 개질 연구

이미영¹ · 홍순택² · 이기택^{2*}

¹충청남도 보건환경연구원, ²충남대학교 식품공학과

Enzymatic modification of diacylglycerol with different type of fatty acids

Mi-Young Lee¹, Soon-Taek Hong², Ki-Teak Lee^{2*}

¹Chungcheongnam-do Health and Environmental Research Institute, Deajeon 300-801, Korea

²Department of Food Science and Technology, Chungnam National University, Deajeon 305-764, Korea

Received on 26 May 2014, revised on 17 June 2014, accepted on 23 June 2014

Abstract : Diacylglycerol-oil (DAG oil) and four kinds of fatty acids [C16:0, C18:0, perillar oil-hydrolyzate(C18:3, 59.7%) and docosahexaenoic acid(DHA, C22:6, 63.7%)] were enzymatically esterified with 1:0.5, 1:1 and 1:1.5 molar ratio (DAG oil: fatty acids) to produce structured DAG. The reaction mixture were catalyzed by addition of sn-1,3 specific Lipozyme RMIM with 10 wt% of total substrates, and reacted for 1, 3, 6 and 24 hr at 62°C with 220 rpm on the shaking water bath. The produced DAG were analyzed by TLC. In the result, the proportion of each fatty acid [(C16:0, C18:0, perilla oil-hydrolysate(C18:3, 59.7%) and DHA(C22:6, 63.7%)] on DAG products were increased as molar ratios of substrate increased. Among them, DHA showed the least reaction rate in which 24.2 % of DHA was found in the structured DAG molecules after 24 hr reaction with 1:1.5 molar substrate amount ratio.

Key words : Enzymatic modification, Diacylglycerol, Fatty acids

I. 서론

Diacylglycerol(DAG)은 glycerol 1분자에 2개의 fatty acid가 ester 결합된 형태로써 monoacylglycerol(MAG)과 함께 식품제조 시에 유허제로 널리 사용되고 있다. DAG는 천연적으로 식용유지에 존재하기도 하는데 정제정도 및 정제유의 품질 등에 따라 일정량이 존재하고 있다(Kristensen et al., 2005; Cho et al., 2005). 한편, 지방산과 글리세롤의 화합물인 중성지방(neutral fats, triacylglycerol)중 식품으로 섭취하는 대부분의 형태인 triacylglycerol(TAG)은 sn-1, 3위치에 특이적으로 작용하는 pancreatic lipase에 의해 2-MAG로 분해되어 소장에서 흡수되지만 1,3-DAG는 TAG처럼 2-MAG로 분해되지 않고 유리지방산의 형태로 가수분해 되어 지단백질 형태로써 간으로 이송후 β-산화되어 탄산가스와 물로 분해되기 때문에 체지방으로의 축적이 많지 않은 것으로 보고되고 있다(Yamamoto et al.,

2001; Kristensen et al., 2006; Fujii et al., 2007).

이와 같이 체지방 축적 억제와 유허기능을 갖는 DAG는 고온에서 무기촉매로 생산하는 화학적 방법과 보다 낮은 온도에서 효소를 촉매로 생산하는 효소적 방법에 의해 생산할 수 있는데, 최근에는 에너지 절감과 부가반응을 줄이고 기질 및 위치특이성을 이용하는 효소를 이용한 방법이 많이 이용되고 있다. 특히, 효소 반응에 의한 제조 시에 고정화 효소(Immobilized Lipase)의 사용은 효소를 계속 재사용할 수 있어 경비를 절감할 수 있고, 반응정지가 쉬운 장점이 있다(Park and Lee, 2004; Shin and Lee, 2010). 그러나 효소를 촉매로 하여 esterification을 할 경우 지방산이 TAG의 sn-1,3 위치에서 sn-2 또는 sn-2에서 sn-1,3 위치로 acylmigration이 일어나게 되는데 acylmigration은 여러요인 즉, 온도, 수분, 효소량, 반응기의 종류 등의 영향을 받는다고 보고되고 있는데 특히 온도요인의 영향을 많이 받는것으로 알려져 있다. 또한 반응시간이 단축될수록 acylmigration 현상이 감소하는 것으로 보고된 바도 있다(Xu et al., 1998; Mu et al., 1998; Poisson et al.,

*Corresponding author: Tel: +82-42-821-6729

E-mail address: klee@cnu.ac.kr

2009). 이에 따라 효소적 합성과정 중의 반응 요소들을 조절하여 이를 최소화 하려는 연구가 진행되고 있다.

본 연구는 시판된 DAG oil과 탄소길이와 불포화도가 다른 지방산 4종 [C16:0, C18:0, perilla oil hydrolysate(C18:3, 59.7%), DHA(C22:6, 63.7%)] 을 기질로 하여 esterification 반응 후 이들 지방산이 DAG 분자에 결합된 재구성 DAG를 합성하였다. 각 기질의 사용량과 반응시간을 달리하면서 얻어진 재구성 DAG의 fatty acid 조성을 분석하고, HPLC를 이용하여 acylglycerol 조성을 분석하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

본 실험에서 기질로 사용한 DAG oil(87% DAG 함유)은 C사로부터 제공 받았으며, perilla oil hydrolysate는 대전 유성 하나로 마트에서 구입한 O사의 들기름으로 제조하여 사용하였다. 고DHA 지방산은 네오메가(대전)에서 공급받았다. 새로운 지방산 조성의 지질을 합성하기 위해 사용한 효소는 *Rhizomucor miehei*로부터 얻은 TAG의 sn-1,3 위치특이성이 있는 lipase를 macroporous anion exchange resin에 고정시킨 Lipozyme RMIM을 Novo Nordisk Biochem, North American Inc. (Franklinton, NC, USA)로부터 구입하였다. 지방산 분석 시 지방산의 methyl ester를 위해 사용한 10% BF₃-methanol은 Supelco(Belle fonte, PA, USA)에서 구입하였고, 그 외 기기분석에 사용된 용매는 모두 high performance liquid chromatography(HPLC) grade를 사용하였다.

2. Perilla oil(PO) 가수분해물 제조

들기름 100 g과 1 N potassium hydroxide(in ethanol) 200 mL를 가지달린 round flask에 넣고 환류냉각기에 연결하여 80°C에서 1시간 동안 교반기를 이용하여 반응한 후, 실온으로 냉각한 다음 반응물을 분액여두로 옮기고 증류수 500 mL와 diethyl ether 300 mL를 넣고 혼합한 후 diethyl ether로 불검화물을 분리하였다. 하층(물층)을 취하여 6 M hydrochloric acid 용액으로 pH 3으로 맞추고 hexane 300 mL를 가하여 흔들고 정치한 후, 층 분리를 하여 상층(hexane 층)을 취하였는데 위와 같은 조작을 3회 반복한 후 모아진

hexane층은 sodium sulfate anhydrous column을 통과하여 수분과 불순물을 제거한 뒤 감압농축하고, N₂ gas로 잔여 hexane을 제거하여 들기름 가수분해물(perilla oil hydrolysate, C18:3 59.7%) 80 g을 얻었다.

3. DAG oil과 지방산의 효소적 acidolysis에 의한 재구성 DAG의 합성

DAG oil(C18:2 53.7%, DAG 87%)과 C16:0, C18:0, perilla oil hydrolysate (C18:3 59.7%)와 고DHA(C22:6, 63.7%)의 지방산 4종을 1:0.5, 1:1, 1:1.5 몰 비율로 혼합하고 TAG의 sn-1,3 위치특이성을 갖는 고정화 효소 Lipozyme RMIM을 혼합한 총 기질 질량의 10% 해당하는 양을 첨가하여 shaking water bath에서 반응하였다. 반응기는 screw 마개가 달린 200 mL 유리 삼각플라스크를 사용하였으며 62°C를 유지하면서 220 rpm으로 교반하면서 1, 2, 3, 6, 24 hr 반응하였고, 각 반응 시간마다 시료 2 mL씩 취하여 PTFE syringe filter(25 mm, 0.45 μm)를 사용하여 lipase와 불순물을 제거하여 재구성 DAG를 얻었다. 이렇게 얻은 재구성 DAG를 대상으로 gas chromatography(GC)와 HPLC를 이용하여 지방산 및 acylglycerol의 조성을 분석하였다.

4. 지방산 조성분석

DAG oil과 4종 지방산의 합성으로 얻어진 재구성 DAG의 지방산 조성을 분석하기 위하여 유지 혼합물의 효소반응 1, 2, 3, 6, 24 hr 마다 반응물을 취하여 여과한 후, 20 μL를 취하여 n-hexane 40 μL에 녹여 hexane : diethylether : acetic acid (50:50:1, v:v:v) 혼합용액을 전개용매로 하여 thin-layer chromatography (TLC, silica gel 60F₂₅₄, 20×20 cm, Merck, Germany)를 실시한 후, 0.2% 2,7-dichlorofluorescein (in methanol)을 분무하여 254 nm UV lamp에서 구분되어지는 각 band 부분(MAG, 1,2-DAG, 1,3-DAG, TAG)을 긁어 test tube에 취하여 methylation 한 후 지방산을 분석하였다. 0.5 N 메탄올성 NaOH 용액 1.5 mL를 시료가 담긴 test tube에 첨가하여 vortex 한 후 boiling water bath에서 5 min 동안 가열한 다음 1~2 min 동안 냉각하여 다시 10% BF₃(Boron trifluoride)용액을 2 mL 첨가하여 vortex한 후 boiling water bath에서 3 min 동안 가열 한 후 1~2 min 동안 냉각하였다. 그리고

isooctane 2 mL와 포화 NaCl용액 1 mL를 가하여 충분히 vortex한 후 층의 분리가 용이하도록 원심분리(2000 rpm, 5 min) 하였다. 유기용매 층인 상층을 취하여 sodium sulfate anhydrous column을 통과시켜 수분과 불순물을 제거한 후 gas chromatography(Hewlett-Packard 6890 series, Avondale, PA, USA)를 이용하여 지방산 조성을 분석하였다. Column은 SFTM-2560(100 m×0.25 mm, ID 0.2 μm film thickness, Bellefonte, PA, USA)를 이용하였으며, detector는 fame ionized detector(FID), column 온도는 150°C에서 5 min 동안 유지시키고 4°C/min씩 220°C까지 증가시킨 후 45 min 동안 유지하였다. Carrier gas는 1 mL/min유속으로 헬륨가스를 사용하였고 injector 온도와 detector 온도는 각각 250°C와 260°C에서 분석하였다. Split ratio는 50:1로 하고 시료는 1 μL를 injector에 주입하여 실시하였다. 지방산 조성은 peak area의 상대적인 비로 나타내었으며(Korea Food and Drug Administration, 2011), 2반복 분석하여 평균값을 구하였다.

5. Acylglycerol 조성분석

재구성 DAG의 acylglycerol(MAG, DAG, TAG)의 조성을 알아보기 위해 normal phase HPLC를 실시하였다(Jeon et al., 2010). HPLC(Younglin Acme, Anyang, Korea)는 dual pump(SP 930D, Younglin, Anyang, Korea)가 장착된 것을 사용하였으며, detector는 evaporate light scattering detector(ELSD, SEDEX Model 75, SEDERE, Alfortville, France)를 column은 Hypersil BDS CPS 5 μL(250×4.6 mm, Thermo Hypersil LTD., Cheshire, UK)를 사용하였다. 반응물을 hexane으로 각각 0.25 μg/μL의 농도로 조제하여 20 μL씩 injector에 주입하여 실시하였다. 이동상으로는 hexane(solvent A)과 tert-butyl methyl ether(solvent B)에 각각 0.4% acetic acid를 첨가하여 사용하였고, 유속은 1 mL/min으로 하였다. 시료를 주입한 후 5 min 동안 이동상 A를 흘려주었고 10 min 동안 이동상 A와 B의 부피비를 80:20으로 변화시킨 후 2 min 동안 유지한 후 다시 5 min 동안 이동상 A로 변화시킨 후 8 min 동안 유지하며 분석하였다. 검출기의 온도는 40°C로 하였고 질소가스의 유속은 2.2 bar로 하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 재구성 DAG의 지방산 조성

재구성 DAG를 합성하기 위하여 사용한 기질의 경우 C16:0, C18:0은 각각 99% 이상의 지방산을 사용하였고, 그 외 기질로 사용된 DAG oil, perilla oil hydrolysate, ɔDHA에 대한 지방산 조성은 Table 1에 나타내었다. 기질로 사용된 DAG oil의 acylglycerol 조성을 Table 2에 나타내었는데 지방산은 검출되지 않았고 24.3%와 63.0%의 1,2와 1,3-DAG로 구성되어 있었다. 이 기질의 주요 구성 지방산은 C18:2(53.6%)이었다. 또한 DAG oil과 각각의 기질로 사용된 지방산 [C16:0, C18:0, perillar oil hydrolysate(C18:3, 59.7%), ɔDHA(C22:6, 63.7%)] 을 혼합하여 합성한 재구성 DAG의 지방산 조성 분석결과를 Table 3에 나타내었다.

반응기질로 사용한 지방산 모두 [C16:0, C18:0, perillar oil hydrolysate(C18:3, 59.7%), ɔDHA(C22:6, 63.7%)] mole 비율이 증가 할수록 재구성 DAG 중 각각의 지방산 (C16:0, C18:0, C18:3, C22:6) 조성 비율이 증가하였고 이는 Fomuso와 Akoh(2002)의 연구 결과와 유사한 경향을 나타내었다.

기질로 사용된 DAG oil과 C16:0과의 반응 시에 mole 비율이 0.5 mole일 경우 반응 1시간 후에는 1,2-DAG와 1,3-DAG의 C16:0의 함량이 각각 19.7과 28.8 area%이었고, 총 24시간 반응 후에는 22.4와 21.3 area%이었다. 한편, 1 mole의 C16:0을 사용하여 반응 하였을 경우에서는 3시간 후에 1,2-DAG와 1,3-DAG의 C16:0 함량은 39.1, 35.3 area%의 조성을 보였고, 이후 반응 시간을 24 시간동안 진행하였을 경우 각각 33.6와 35.4 area%의 조성을 보였다. C16:0의 몰비율을 1.5 mole로 증가하였을 경우 1시간 반응 후에는 1,2-DAG와 1,3-DAG의 C16:0 함량은 43.1과 39.1 area%이었으나 반응시간이 6시간으로 증가하면서 51.4와 39.2 area%를 보였다. 한편, C18:0을 기질로 사용하여 반응하였을 때 0.5 mole 비율로 반응하였을 경우 24시간 후에는 1,2-DAG와 1,3-DAG의 C18:0 함량은 18.3, 24.1 area%의 조성을 보였고 1 mole 비율로 24시간 반응 후 1,2-DAG와 1,3-DAG의 C18:0 함량은 32.3과 35.8 area%의 조성을 보였는데 1.5 mole에서는 각각 39.3과 45.6 area%를 보였다. 위의 결과에 지시된 바와 같이 포화 지방산인 C16:0과 C18:0를 비교하였을 때, 사용된 지

Table 1. Fatty acid composition(area%) of substrates.

Fatty acid	DAG oil	Perilla oil hydrolysate	High DHA
C10:0	nd ¹⁾	nd	nd
C12:0	0.1±0.00	nd	nd
C14:0	0.1±0.00	nd	nd
C16:0	5.3±0.01	6.4±0.06	0.8±0.03
C16:1	0.1±0.00	0.1±0.01	0.3±0.02
C18:0	1.8±0.02	2.2±0.05	0.2±0.03
C18:1T	nd	nd	nd
C18:1	26.8±0.01	16.2±0.32	0.9±0.06
C18:1n7	3.1±0.00	nd	nd
C18:2T	0.3±0.00	nd	nd
C18:2	53.6±0.03	15.1±0.24	0.1±0.00
C20:0	0.5±0.01	0.1±0.00	0.3±0.00
C18:3T	0.4±0.01	nd	nd
C18:3n6	0.4±0.01	nd	nd
C20:1	0.4±0.00	0.2±0.01	0.8±0.02
C18:3n3	6.8±0.00	59.7±0.27	nd
C20:0	0.3±0.00	nd	0.2±0.00
C22:0	nd	nd	4.9±0.06
C22:1n9	nd	nd	1.3±0.02
C20:3nc	nd	nd	0.1±0.00
C20:4n6	nd	nd	0.4±0.00
C22:2	nd	nd	0.5±0.00
C24:0	nd	nd	0.3±0.00
C20:5(EPA)	nd	nd	1.8±0.03
C24:1	nd	nd	2.5±0.04
C22:5(DPA)	nd	nd	5.0±0.11
C22:6(DHA)	nd	nd	63.7±0.87
unknown	nd	nd	15.9±0.11

¹⁾ not detected.

※ Values are the means of duplicate determination ± SD.

Table 2. Acylglycerol composition of DAG oil used as substrate.

(unit : area%)

Acylglycerol composition ¹⁾	MAG	1,2-DAG	1,3-DAG	FFA	TAG
	1.9	24.3	63.0	nd ²⁾	10.8

¹⁾MAG, monoacylglycerol; 1,2-DAG, 1,2 diacylglycerol; 1,3-DAG, 1,3 diacylglycerol; FFA, free fatty acid; TAG, triacylglycerol.

²⁾nd : not detected.

방산의 몰 비율이 높아지면 각각의 합성된 DAG 분자 안에 결합된 지방산들의 함량도 높아졌다. 한편, perilla oil hydrolysate (C18:3)를 반응기질로 사용하였을 경우, 0.5 mole 비율로 3시간 반응 후 1,2-DAG와 1,3-DAG의 C18:3 함량은 22.7과 16.2 area%의 조성을 보였는데 1 mole의 비율에서는 25.5 와 24.9 area%, 그리고 1.5 mole에서는

각각 26.5과 31.2 area%를 보이면서 증가하였다. Table에서 보듯이 모든 결과에서는 보이지 않았지만 대부분의 경우 반응시간이 길어지거나 사용된 기질의 mole 비율이 커지면 DAG분자에 결합되는 지방산의 함량이 높아지는 경향을 보였다. 특히 고DHA를 반응기질로 사용하였을 경우, 0.5 mole 비율로 3시간 반응 후 1,2-DAG와 1,3-DAG의

Table 3. Fatty acid composition (area%) of each acylglycerol in structured DAG¹⁾ at different molar ratios and reaction times.

Fatty acid (C16:0)	DAG oil ²⁾ : C16;0											
	1:0.5 ³⁾				1:1				1:1.5			
	Reaction Time (h)				Reaction Time (h)				Reaction Time (h)			
	1	3	6	24	1	3	6	24	1	3	6	24
MAG ⁴⁾	29.7±3.9 ⁵⁾	26.2±4.2	22.8±2.3	21.7±1.0	36.6±3.3	36.4±2.4	36.9±2.5	36.9±4.3	41.2±2.0	43.6±1.1	44.5±0.9	37.7±0.9
1,2-DAG	19.7±3.3	22.3±4.3	20.9±1.9	22.4±0.1	23.6±0.7	39.1±5.7	32.8±2.3	33.6±1.6	43.1±1.9	53.3±0.5	51.4±0.1	36.0±0.0
1,3-DAG	28.8±1.0	25.2±1.4	23.3±1.0	21.3±0.6	39.5±2.8	35.3±1.4	36.1±1.0	35.4±1.0	39.1±1.6	41.0±1.4	39.2±0.7	41.7±1.1
TAG	19.2±2.5	21.3±2.5	18.9±0.9	22.3±1.6	18.9±0.9	27.7±1.3	29.9±1.1	32.6±1.3	20.3±0.8	36.9±2.5	36.3±1.4	39.7±0.9

Fatty acid (C18:0)	DAG oil : C18;0											
	1:0.5				1:1				1:1.5			
	Reaction Time (h)				Reaction Time (h)				Reaction Time (h)			
	1	3	6	24	1	3	6	24	1	3	6	24
MAG	31.9±6.2	23.5±0.3	22.3±2.1	22.9±0.3	38.4±0.3	39.1±0.8	38.2±0.5	36.0±0.7	49.2±3.0	51.0±6.8	46.6±0.3	48.3±0.3
1,2-DAG	19.2±5.5	14.1±0.8	15.4±0.3	18.3±0.1	26.2±1.4	25.7±2.9	27.6±2.8	32.3±1.4	30.8±4.6	33.9±5.8	32.0±0.3	39.3±0.4
1,3-DAG	32.6±6.5	25.1±0.4	25.0±0.4	24.1±0.5	38.8±0.3	37.1±3.5	35.7±3.5	35.8±1.7	44.5±5.8	44.3±2.2	45.0±0.4	45.6±0.3
TAG	18.5±3.7	18.4±0.0	19.5±0.1	21.2±0.5	22.2±0.0	28.9±0.2	31.4±0.1	34.0±0.4	25.0±0.1	33.1±1.0	36.9±0.1	42.4±0.6

Fatty acid (C18:3)	DAG oil : perilla oil hydrolysate											
	1:0.5				1:1				1:1.5			
	Reaction Time (h)				Reaction Time (h)				Reaction Time (h)			
	1	3	6	24	1	3	6	24	1	3	6	24
MAG	19.6±0.2	19.2±0.2	19.0±0.1	17.6±0.2	28.2±0.4	26.7±0.0	26.5±0.1	24.3±0.8	32.0±0.2	32.3±0.2	31.8±0.5	30.8±0.4
1,2-DAG	21.2±4.0	22.7±1.6	18.6±0.9	19.2±2.5	23.8±0.0	25.5±0.5	24.3±0.8	23.4±1.3	25.8±0.2	26.5±0.8	29.9±0.4	34.9±0.4
1,3-DAG	14.2±1.5	16.2±0.7	18.8±2.6	17.1±0.0	27.4±0.3	24.9±0.6	24.3±0.9	22.0±3.4	32.8±0.2	31.2±1.1	30.8±3.4	31.2±1.2
TAG	13.3±0.2	15.9±0.1	16.4±0.1	17.5±0.4	17.7±0.1	20.9±0.6	22.6±0.2	22.1±1.7	18.7±0.0	25.2±0.1	26.2±0.7	29.2±0.4

Fatty acid (C22:6)	DAG oil : High DHA											
	1:0.5				1:1				1:1.5			
	Reaction Time (h)				Reaction Time (h)				Reaction Time (h)			
	1	3	6	24	1	3	6	24	1	3	6	24
MAG	2.4±0.2	5.8±2.8	9.1±1.0	7.9±0.6	4.5±0.6	4.2±3.7	8.5±8.0	23.2±1.8	3.0±0.4	8.6±1.0	14.7±1.6	24.4±0.8
1,2-DAG	2.3±0.9	2.6±0.8	5.1±0.4	7.6±0.2	3.0±0.2	7.3±1.1	11.6±1.6	21.6±2.5	2.9±0.2	6.5±0.6	10.9±0.9	23.0±0.7
1,3-DAG	2.0±0.3	4.3±0.3	8.0±0.5	19.3±0.5	4.1±0.5	7.1±0.8	12.5±1.1	22.5±2.1	3.3±0.2	9.5±0.8	16.4±1.0	24.2±2.0
TAG	1.9±0.0	7.1±5.4	17.8±14.6	11.2±0.7	4.0±0.2	3.3±0.3	5.7±1.4	19.1±0.9	3.6±0.3	5.5±0.5	8.7±0.8	21.4±1.0

¹⁾ Structured DAG was synthesized by enzymatic acidolysis with Lipozyme RMIM (10 wt%) at 62°C and 220 rpm.

²⁾ DAG oil used as a substrate

³⁾ Molar ratio of substrates

⁴⁾ MAG, monoacylglycerol; 1,2-DAG, 1,2 diacylglycerol; 1,3-DAG, 1,3 diacylglycerol; FFA, free fatty acid; TAG, triacylglycerol.

⁵⁾ Mean ± SD(n=2).

C22:6 함량은 2.6과 4.3 area%의 조성을 보였는데 같은 반응시간에서의 1 mole의 비율에서는 7.3 와 7.1 area%를, 그리고 1.5 mole에서는 각각 6.5과 9.5 area%를 보이면서 증가하였다. 다른 mole비율로 고DHA를 기질로 사용하였

을 경우에는 가장 긴 24시간 반응에서도 최대 24.2 area%를 보여 다른 지방산 기질로 사용된 C16:0, C18:0, C18:3 보다 낮은 반응율을 보였다.

한편, 기질로 사용된 perilla oil hydrolysate와 고DHA

의 C18:3과 C22:6의 함량은 각각 59.7와 63.7 area%로써, 99%이상의 palmitic acid와 stearic acid로 이루어진 다른 지방산 기질(C16:0과 C18:0)보다는 순도가 낮았다. 따라서 실험된 모든 조건에서 이들을 이용하여 합성한 재구성 DAG중 1,2-DAG와 1,3-DAG에 존재하는 C16:0은 반응 몰비율에 따라 C16:0은 19.3~53.3 area%이었으며, C18:0은 19.2~51.0 area%이었는데 반하여 C18:3은 8.5~20.8 area% (14.2~34.9 area% x 0.597)이었으며 C22:6는 1.3~15.4 area% (2.0~24.2 area% x 0.637)로 나타났다. 기질로 사용된 DAG oil의 C16:0과 C18:0은 각각 5.3과 1.8 area% 이었기 때문에 합성된 재구성 DAG의 지방산 조성 중 원래 기질이 함유한 각 C16:0과 C18:0의 양을 고려하더라도 C18:3과 C22:6의 결합율은 C16:0과 C18:0보다 낮았다. 특히 고DHA를 지방산의 기질로 사용한 경우 사용된 기질의 mole 비율보다는 반응시간이 DAG분자에 대한 지방산 결합율에 더 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다. 따라서 지방산을 구성하고 있는 탄소의 수와 이중결합의 수에

따라 esterification 반응 정도가 달라지는 것으로 생각되며, 이는 지방산 중 cis 이중결합이 굽어있는 3차 구조를 형성하고 이로 인한 steric hindrance(입체장애)로 인하여 효소와의 반응이 어려워지기 때문인 것으로 생각된다.

한편, 위의 반응 중에 1,2-DAG 및 1,3-DAG의 합성 이외에 MAG 및 TAG 분자들의 합성도 이루어 졌고 이에 합성된 DAG이외의 acylglycerol 조성에 대하여 알아보았다.

2. 재구성 DAG의 acylglycerol 조성

NP-HPLC를 이용하여 24 h 반응 후 재구성 DAG의 acylglycerol(TAG, DAG, MAG)조성을 분석한 결과는 Table 4와 같다.

반응기질 [C16:0, C18:0, perillar oil hydrolysate(C18:3, 59.7%), 고DHA(C22:6, 63.7%)] 모두 반응 몰 비율이 증가할수록 반응물인 재구성 DAG에 존재하는 TAG의 비율이 증가하였는데 C16:0을 0.5 mole 비율의 기질로 사용한 경

Table 4. Acylglycerol composition of structured DAG from 24-h reaction. (unit : area%)

Molar ratio	DAG oil : C16:0			
	TAG	1,3-DAG	1,2-DAG	MAG
1:0.5	43.2±0.63	37.3±0.74	13.8±0.26	5.7±0.15
1:1.0	46.6±0.00	35.9±0.25	12.0±0.20	5.5±0.05
1:1.5	46.4±5.49	35.8±1.34	11.2±1.01	6.6±3.14
Molar ratio	DAG oil : C18:0			
	TAG	1,3-DAG	1,2-DAG	MAG
1:0.5	36.8±1.74	45.9±1.12	11.4±0.16	5.9±0.46
1:1.0	51.3±0.63	35.9±1.39	8.4±0.15	4.4±0.61
1:1.5	59.0±2.09	32.2±1.67	6.8±0.62	2.0±0.19
Molar ratio	DAG oil : perilla oil hydrolysate			
	TAG	1,3-DAG	1,2-DAG	MAG
1:0.5	38.0±0.92	39.7±0.27	15.1±0.02	7.2±0.63
1:1.0	45.5±2.25	36.0±1.88	13.3±0.05	5.1±0.41
1:1.5	49.9±2.50	34.5±0.92	12.0±0.89	3.6±0.69
Molar ratio	DAG oil : High DHA			
	TAG	1,3-DAG	1,2-DAG	MAG
1:0.5	39.5±2.27	36.3±0.10	16.4±0.47	7.9±1.90
1:1.0	48.1±1.11	30.1±0.55	15.8±1.30	6.0±0.36
1:1.5	57.6±0.36	24.7±0.07	13.6±0.31	4.1±0.13

Values are the means of duplicate determination ± SD.

우 43.2에서 1.5 mole 비율의 기질로 사용한 경우 46.4 area%로 증가하였다. C18:0의 경우에는 36.8에서 59.0 area%로, C18:3의 경우에는 38.0에서 49.9 area%로 그리고 C22:6의 경우에는 39.5에서 57.6 area%로 각각 증가하였다. 위의 반응기질들을 0.5에서 1.5 mole 비율로 반응하였을 경우 반응물인 재구성 DAG에 존재하는 DAG의 구성 비율은 전체적으로 1,3-DAG가 1,2-DAG보다 많이 존재하면서 각각 24.7~45.9 area%과 6.8~16.4 area%를 보였다. 기질로 사용된 DAG oil의 구성비는 Table 2에 나타난 바와 같이 63%의 1,3-DAG와 24.3%의 1,2-DAG이었기 때문에 반응중에 일부 DAG분자들은 TAG분자들로 전환되었다고 볼 수 있다. 또한 기질의 양을 달리하였을 때 사용된 지방산의 종류에 따른 acylglycerol의 양은 TAG, 1,3-DAG, 1,2-DAG, 그리고 MAG에서 두드러진 큰 차이는 보이지 않았다.

IV. 결론

DAG oil과 지방산 4종 [C16:0, C18:0, perillar oil 가수 분해물(C18:3 59.7%), DHA(C22:6 63.7%)] 을 기질로 하여 혼합 비율을 각각 1:0.5, 1:1, 1:1.5 몰로 달리하고, sn-1,3 위치 특이성이 있는 고정화 효소 Lipozyme RMM(Rhizomucor miehei)을 총 기질의 10 wt%를 가하여 62°C, 220 rpm을 유지하면서 1, 3, 6, 24 h 반응시켜 시간별로 재구성 DAG를 합성하였다. 지방산 조성을 분석한 결과 반응기질로 사용한 지방산 모두 [C16:0, C18:0, perillar oil hydrolysate (C18:3, 59.7%), DHA(C22:6, 63.7%)] 몰 비율이 증가할수록 DAG 중 기질로 사용된 각 지방산(C16:0, C18:0, C18:3, C22:6)의 조성이 증가하였다. 특히 α -DHA를 기질로 사용하였을 경우 24시간 반응에서도 최대 24.2 area%를 보여 다른 지방산 기질로 사용된 C16:0, C18:0, C18:3보다 매우 낮은 반응율을 보였다. 또한 기질의 양을 달리하였을 때 사용된 지방산의 종류에 따른 재구성 DAG에 존재하는 acylglycerol의 양은 TAG, 1,3-DAG, 1,2-DAG, 그리고 MAG에서 두드러진 큰 차이는 보이지 않았다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ009162014)의 지원에 의해 이루어진 연구입니다.

참고 문헌

- Cho EJ, Cho KH, Lee KT. 2005. Compositional changes of functional oil from algae oil during the lipase-catalyzed production. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition* 34(7):1059-1063. [in Korean]
- Fomuso LB, Akoh CC. 2002. Lipase-catalyzed acidolysis of olive oil and caprylic acid in a bench-scale packed bed bioreactor. *Food Research International* 35(1):15-21.
- Fujii A, Allen TJ, Nestel PJ. 2007. A 1,3-diacylglycerol-rich oil induces less atherosclerosis and lowers plasma cholesterol in diabetic apoE-deficient mice. *Atherosclerosis* 193:55-61.
- Jeon MS, Lee CR, Lee KT. 2010. Production of diacylglycerol from lipase by the catalyzed reaction of soybean oil and glyceryl monoleate. *Korean Journal of Food Science and Technology* 42(2):246-249. [in Korean]
- Kristensen JB, Xu X, Mu H. 2005. Diacylglycerol synthesis by enzymatic glycerolysis: Screening of commercially available lipases. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 82(5): 329-334.
- Kristensen JB, Nielsen NS, Jacobsen C, Mu H. 2006. Oxidative stability of diacylglycerol oil and butter blends containing diacylglycerols. *European Journal of Lipid Science and Technology* 108:336-350.
- Korea Food and Drug Administration. 2011. NLS Standard Operating Procedure Analytical Methods. Osong, Korea.
- Mu H, Xu X, Hoy CE. 1998. Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed interesterification in a laboratory scale continuous reactor. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 75(9):1187-1193.
- Park RK, Lee KT. 2004. Synthesis and characterization of mono- and diacylglycerol enriched functional oil by enzymatic glycerolysis of corn oil. *Korean Journal of Food Science and Technology* 36(2):211-216. [in Korean]
- Poisson L, Devos M, Godet S, Ergon F, Pencreac'h G. 2009. Acyl migration during deacylation of phospholipids rich in docosahexaenoic acid (DHA): An enzymatic approach for evidence and study. *Biotechnology Letters* 31:743-749.
- Shin JA, Lee KT. 2010. Production and application of structured lipids. *Food Science and Industry* 43(4):14-23. [in Korean]
- Xu X, Skands ARH, Hoy CE, Mu H, Balchen S, Nissen JA. 1998. Production of specific-structured lipids by enzymatic interesterification: Elucidation of acyl migration by response surface design. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 75(9):1179-1186.
- Yamamoto K, Asakawa H, Tokunaga K, Watanabe H, Matsuo N, Tokimitsu I, Yagi N. 2001. Long-term ingestion of dietary diacylglycerol lowers serum triacylglycerol in type II diabetic patients with hypertriglyceridemia. *Journal of Nutrition* 131:3204-3207.