J. of Korean Oil Chemists' Soc.,
Vol. 16, No. 1, March 1999. 83~94

메틸글리코시드에 의한 지방산의 효소적 배당화

선우환 · 김종태* · 김해성
명지대학교 화학공학과, *한국식품개발연구원 산업화연구부

Enzymatic Glycosylation of Fatty Acids by Methyl Glycosides

Hwan SunWoo, *Chong-Tai Kim and Hae-Sung Kim†

Department of Chemical Engineering, Myong Ji University, Yong in, Kyong gi 449-28, Korea
**Food Engineering & Marketing Div., Korea Food Research Institute, Songnam, Kyong gi 463-20, Korea*

ABSTRACT : Glycoside fatty acid esters were synthesized by lipase-catalyzed glycosylation of fatty acids with methyl glycoside in solvent and solvent-free process. Optimum condition of solvent process using 2-methyl-2-propanol were : molar ratio of methyl glycoside to fatty acid 1:3: initial concentration of methyl glycoside 50g/l: enzyme(immodilized lipase Novozym 435 from *Candidia antarctica*) content 1%(w/v) : desiccant content 9%(w/v): reaction temperature 60℃: reaction time 10hrs. The yield of 99% was obtained. Solvent-free process was carried out in total absence of solvent at 70℃ under reduced pressure, 5-20mmHg. To give meximum yield of 99% at the optimum condition of molar ratio of methyl glycoside to fatty acid 1:3, enzyme content 10%(w/w), and reaction time 10hrs. The glycosylation reactivity of different glycosylation agents were sequent to Methyl-β-D-fructofuranoside, Methyl-β-D-glucopyranoside, Methyl-β-D-fructopyransi de, and Methyl-α-D-glucopyranoside.

† : Corresponding author (Department of Chemical Engineering, Myong Ji University, Yong in, Kyong gi 449-728, Korea, Tel: 0335-330-6387, Fax: 0335-337-1920, e-mail: seastar@wh.myongji.ac.kr)

Ⅰ. 서 론

지질소재는 지방산 알킬기의 말단에 있는 카르복실기가 수산기와 에스테르 결합을 형성한 지방산 에스테르로 이루어져 있는데, 수산기의 공여체가 글리세롤이면 글리세린 에스테르, 당이나 당 알코올류이면 당 에스테르로 구분할 수 있으며[1] 동물성 유지나 식물성 유지와 같은 천연 지질소재는 거의 대부분이 아실화 글리세롤인 반면에 지방산의 당 에스테르는 당과 당 알콜 및 배당체의 수산기를 지방산의 알킬기로 아실화하는 에스테르화 합성반응으로 생산된다. 지방산 에스테르는 수산기의 공여체가 나타내는 친수성과 치환도, 지방산 알킬기의 탄소수와 불포화도 및 소수성에 따라서 지질소재 산업에서 필요로 하는 다양한 용도의 기능특성화가 가능하며, Karlshamns와 Stepan사는 지질대사특성이 장쇄지방질보다 수배 빠르고 고에너지원으로 이용될 수 있는 중쇄지방질을 Captex, Neobee라는 상품명으로 시판하고 있고, Mitsubish-Kasei사는 지방산 메틸에스테르와 자당의 저치환도 에스테르인 Ryoto sugar

ester를 기능성 식품유화제로서 생산하고 있다. 국내의 지질소재의 기능성 재재화 기술은 수규모의 중소기업을 중심으로 선진국 제품의 모방 내지는 배합기술 수준을 벗어나지 못하고 있고 범용성 저가품 개발에는 잠재력이 크지만 고부가가치의 첨단 지질소재 개발에는 한계를 보이고 있는 실정이고, 향후 시장 전망이 유망함에도 불구하고 세계적으로 몇 개의 회사가 생산기술과 기술특허를 독점하고 있고 핵심기술의 기술이전이 거의 불가능함으로 고유의 원천기술을 스스로 개발하지 않는 한 국내 지질소재 산업의 육성과 품질 고급화 및 용도 다양화는 물론 비교우위의 생산기술의 확보와 기능특성화는 요원하다고 판단된다.

지방산의 글리세린 에스테르인 천연유지로부터 지방산을 얻고 당분자로 배당화한 당 에스테르는 구성 성분의 종류와 특성 및 구조적인 결합방식에 따라서 다양한 기능성 생체 계면활성을 나타내므로 기능성 지질소재를 필요로 하는 식품산업의 발전과 함께 중요한 연구대상이 되고 있다. 당 에스테르는 당 분자의 수산기가 나타내는 친수성과 지방산의 알킬기가 나타내는 소수성을 함께 공유한 양쪽성 지질소개로서 당분자의 종류와 친화도 및 지방산의 알킬기 특성에 따라서 식품산업에 필요로하는 다양한 용도의 식품유화제로 연구 개발되었다[2,3]. 당에스테르는 당분자가 자당인 지방산 에스테르를 중심으로 심도 있는 연구가 이루어져서 Hass-Snell법, Nebraska-Snell법에 의하여 합성된 이래 유해한 유기 용매를 사용하지 않는 USDA법이 개발되었고, Ryoto sugar ester라는 상품명으로 대규모로 생산되고 있으며, 최근에는 sucrose octaacetate를 출발 물질로 하는 무용매 트랜스에스테르법이 최신 기술로 소개되고 있다. 이와 같이 지방산을 당 분자로 배당화하여 필요로하는 결합구조를 얻고 치환도를 조절하면 고부가가치의 기능성 지질소재를 창출할 수 있으며, 최근에는 당 에스테르의 생체 계면 활성에 많은 관심을 가진 정밀화학, 화장품 및 의약품 분야에서도 연구가 계속되어 장래에는 상업적으로 다양한 당 유도체 에스테르가 생산될 것으로 기대된다[4,5].

지방산 에스테르의 합성공정은 화학적 합성공정과 효소적 합성 공정으로 구분할 수 있는데 상용화된 지방산 에스테르의 생산 방식은 모두 화학적 합성 공정에 근거하고 있으며, 효소반응기술의 발전과 함께 우수한 반응성을 갖는 효소가 개발됨에 따라서 생체 적합성, 식품안전성 및 분리 정제 등의 관점에서 유망한 효소적 합성공정이 차세대의 지방산 에스테르의 생산기술로 발전될 것으로 기대된다. 효소적 배당화 공정이 화학적 배당화 공정에 대하여 비교우위의 경제성을 확보하기 위해서는 배당화제의 가용성과 혼화도 및 효소 활성도가 크게 향상 되어야 한다. 배당화제와 지방산이 상용용매에 의하여 균일상을 이루는 용매 배당화 공정에서는 효소 활성도와 배당화제의 용해도가 높아야 효소적 합성 공정의 생산성을 향상시킬 수 있고, 용융상태에서 반응이 이루어지는 무용매 배당화 공정에서는 식품 안전성이 의문시되는 유화제를 첨가하지 않고도 배당화제와 지방산이 효과적으로 혼화되어야 한다. 이와 같이 효소 배당화 공정의 경제성은 배당화제에 크게 의존하므로 가용성과 혼화도 및 수산기의 반응성이 우수한 것으로 알려진 메틸글리코시드를 배당화제로 하는 enzymatic glycosylation process를 제시하였다.

본 연구의 배당화제는 단당의 아노머 탄소에 결합된 수산기와 메탄올의 알킬기가 글리코시드 결합을 이루어 비환원당화된 단당계열의 메틸글리코시드로서 지방산과의 혼화성이 우수하고, 용해도와 반응성이 우수한 베타형이 75% 이며, 푸룩토시드와 글루크시드의 비가 1:1로 조절된 글리코시드 혼합물이다. 본 연구에서 제시된 효소적 배당화 공정에서는 식품 유화제로 이용되는 모노에스테르는 용매법과 무용매법으로 영양식품으로 사용될 수 있는 디에스테르는 무용매법으로 합성하였고, 효소적 배당화 공정의 최적조업조건을 제시하였으며, 연구 개발 수준에 머물러 있는 효소적 배당화기술의 화학적 배당화기술에 대한 비교우위의 기술적 잇점을 획기적으로 향상시켰다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

본 연구에 사용된 배당화제의 화학적 구조는 Fig.2와 같고 그 조성은 베타-메틸프룩토푸라노시드(methy-β-D-fructofuranoside)20%, 베타-메틸푸룩토피라노시드(methy-β-D-fructopyranoside) 30%, 알파-메틸글루코피라노시드(methyl-α-D-glucopyranoside) 25%, 베타-메틸글루코피라노시드(methyl-β-D-glucopyrano

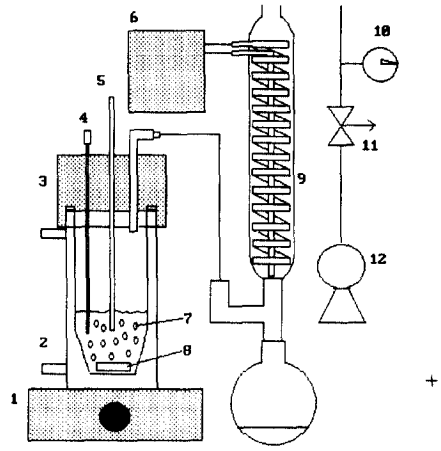
side) 25%인 메틸글루코시드와 메틸프룩토시드의 혼합로서 자당과 메탄올을 화학적으로 배당화하여 사용하였다. 지방산으로는 카프릴산(Caprylic Acid; Sigma), 카프르산(Capric Acid, Sigma), 라우르산(Lauric Acid, Sigma), 팔미트산(Palmitic Acid, Sigma), 올레산(Oleic Acid, Aldrich)을 사용하였고, 효소촉매는 *Candida antarctica* 기원의 Novozym 435(EC 3.1.1.3, 활성도 7000PLU/g, Novo Nordisk) 고정화 리파아제를 사용하였다. 반응매질로 사용된 3-부탄올과 기타 용매는 특급시약을 사용하였고, 수분 제거제는 제올라이트(Molecular Sieves, 3Å, Powder form, Sigma)를 사용하였다.

2. 메틸글리코시드에 의한 효소적 배당화

지방산을 메틸글리코시드로 배당화하여 메틸글리코시드 지방산 에스테르를 합성하기 위하여 3-부탄올을 사용하는 용매공정과 용매를 사용하지 않고 직접 당을 용융상태에서 반응시키는 무용매공정을 병행하였으며, 최적 반응조건과 각각의 공정과 매개변수에 따른 영향을 검토하였다.

용매 공정의 경우, 반응온도 60℃로 유지된 회분식 반응기에서 3-부탄올 30mL에 0.257 mol/L의 메틸글리코시드를 용해시키고 지방산과의 몰비를 1:2~1:5, Novozym 435의 함량을 0.5~2%(w/v), 수분제거제인 제올라이트(Molecular sieves, 3Å, Powder form, Sigma)의 함량을 3~9%(w/v)로 변화시키면서 배당화 반응에 미치는 몰비의 영향, 효소 함량의 영향, 수분 제거제의 영향과 그에 따른 최적 반응조건을 검토하였다. 또한 지방산의 탄소수를 C_8~C_{18}로 변화시키면서 지방산 종류에 따라 배당화 반응에 미치는 영향을 검토하였다. 그리고, 무용매 공정의 경우, 반응온도 70℃로 유지된 Fig. 1의 회분식 반응기에서 메틸글리코시드와 지방산의 몰비 1:3, Novozym 435 함량 10%(w/w)의 반응조건에서 진공도를 5~20 mmHg로 조절하면서 메틸글리코시드의 배당화 반응을 수행하였고, 메틸 글리코시드 혼합물의 각성분의 전화율에 대한 과당 배당체와 포도당 배당체의 반응성, 알파형과 베타형 구조의 반응성, 그리고 퓨란형과 피란형 구조의 반응성을 비교 검토하였다.

배당체의 총량 및 각각의 농도는 HPLC법(Carbohydrate column(4.6×250mm, waters), RI detector, acetonitrile/water(75:25,v/v), 1.4 mL/min)과 효소법을 이용하여 결정하였다.



1. Magnetic Stirrer
2. Water Jacket
3. Vacuum-tight Head
4. Sampling Needle
5. Thermometer
6. Cooling Bath
7. Enzyme
8. Magnetic Bar
9. Dimnorth Condenser
10. Vacuum Gauge
11. Needle Valve
12. Vacuum Pump

Fig. 1. Experimental reactor set-up for enzymatic glycosylation.

베타-메틸푸룩토푸라노시드의 농도는 반응후 지방산을 제거한 메틸 글리코시드 수용액 1mL를 취하여 2g/L의 전화당 효소(invertase, EC 3.2.1.26, Fluka)수용액 3mL와 50℃에서 2시간 동안 가수분해반응을 수행한 다음, 이로부터 생성된 과당을 DNS법으로 정량하였다. 베타-메틸글루코시드의 농도는 반응후 지방산을 제거한 메틸글리코시드 수용액 1mL를 취하여 농도 1g/L의 베타-글루코시다제(β-glucosidase, EC 3.2.1.20, Sigma)수용액 3mL와 50℃에서 가수분해반응을 수행한 후, 생성된 포도당을 DNS법(Dinitrosalcylic acid 1%, Phenol 0.2%, NaOH 1%, Rochelle Salt 20%, Na_2SO_3 0.05% 수용액, UV 640nm)[23]으로 정량하였다. 베타-메틸푸룩토피라노시드와 알파-메틸글루코피라노시드의 농도는 HPLC로 측정된 베타-메틸푸룩토피라노시드와 메틸글리코시드 혼합물의 총 농도를 효소법으로 분석한 베타-메틸푸룩토푸라노시드와 베타-메틸글루코푸라노시드의 농도에 대한 양론비에 의하여 결정하였다.

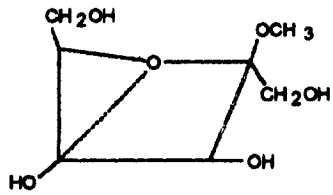
그리고, 지방산과 생성물인 메틸 글리코시드

지방산 에스테르는 HPLC법(ODS column(4.6 ×250mm, beckman), UV detector(205nm), methanol/acetonitrile/water(65:35:5, v/v), 1.0 mL/min)으로 분석하였다.

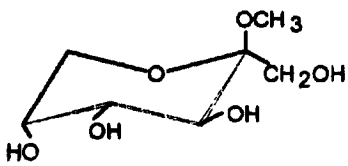
Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 배당화 반응에 대한 수분의 영향

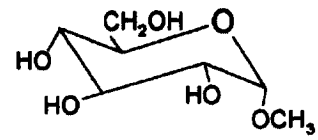
지방산과 메틸글리코시드의 효소적 배당화 반응은 아래에 나타낸 바와 같이 반응물인 메틸글리코시드 에스테르와 함께 수분이 동시에 생성된다. 생성된 물분자가 내재하면 배당화 반응의 역반응인 가수분해 반응이 일어나므로 평형전화율과 배당화 속도를 높게 유지하기 위해서는 반응계의 수분을 효과적으로 제거하여야한다. 본 연구에서는 배당화반응으로부터 생성되는 수분을 제거하기 위하여 대표적인 탈수제인 제올라이트를 이용해서 카프르산과 메틸글리코시드가 배당화될 때에 메틸글리코시드의 전화율에 대한 제올라이트 첨가량의 영향을 검토하였다. Fig. 2에 나타낸 바와 같이 수분제거제를 3~9%(w/v)로 첨가하여 배당화 반응을 수행한 결과, 수분제거제를 첨가하지 않은 경우와 비교하여 가수분해반응이 억제되므로 평형전화율이 증가하는것을 알 수 있었으며, 첨가량이 증가할수록 배당화 반응이 비가역적으로 진행되어 반응속도도 증가해 감을 알 수 있었고, 수분제거제의 첨가량 9%에서 반응시간 10시간만에 100%의 전화율을 얻을 수 있었다.



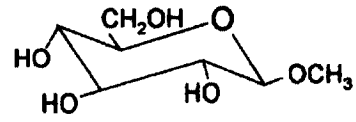
(1) Methyl-β-D-Fructofuranoside



(2) Methyl-β-D-Fructopyranoside



(3) Methyl-α-D-Glucopyranoside



(4) Methyl-β-D-Glucopyranoside

Fig. 2. Chemical structure of Methyl Glycosides

2. 배당화 반응에 대한 몰비의 영향

메틸글리코시드 지방산 에스테르의 치환도는 메틸글리코시드의 수산기와 지방산의 카르복실기가 배당화되는 수를 나타내는데 4개의 수산기를 함유한 메틸글리코시드는 치환도 1과 2인 저치환도 에스테르와 3이상인 고치환도 에스테르를 형성할 수 있으며, 효소적으로는 저치환도 에스테르 합성에 유리한 것으로 평가된다.

본 연구에서 사용한 배당화제인 메틸글리코시드는 메틸프룩토시드와 메틸글루코시드의 혼합물로 이루어져 있는데, 베타-메틸푸룩토푸라노시드의 경우에 배당화 반응성은 1급 수산기인 1번과 6번 수산기는 높지만 2급 수산기인 3번과 4번 수산기는 낮으며, 메틸글루코시드는 1급 수산기인 6번 수산기가 높고 2, 3, 4번 수산기의 순서이며 3, 4번 수산기의 반응성은 낮은 것으로 보고되어있다[6~8].

리파아제를 촉매로 사용하는 배당화 반응에서 베타-메틸푸룩토푸라노시드의 경우에는 6번 또는 1번 수산기에서 배당화 되거나(모노에스테르), 6번과 1번 수산기가 함께 배당화되고(디에스테르), 메틸글루코시드는 6번 수산기에서 먼저 배당화되어야만 2번 수산기에 배당화되므로 메틸글리코시드와 지방산의 이론적인 몰비는 1:2 이상이 되어야 할것으로 생각된다. 베타-메틸푸룩토푸라노시드는 6번 수산기와 1번 수산기의 배당화 반응성이 유사하므로 반응선택성을 조절하지 않으면 2종류 이상의 에스테르의 혼합물이 생성되고 입체광학적 관점에서 순수한 모노에스테르를 선택적으로 합성할

수 없다. 따라서 본 연구에서는 메틸글리코시드에 대하여 친화력이 강한 3-부탄올을 반응매질로 사용함으로서 메틸글리코시드가 지방산과 활성착화합물을 형성하고 있는 리파아제의 활성점에 접근할 때에 1번과 2번 수산기는 활성점보다는 용매방향으로 배향되도록 하고 6번 수산기만이 활성점에 접합되도록하는 위치선택성을 이용하여 메틸글리코시드 모노에스테르는 용매 공정으로 합성하였고, 위치선택성이 요구되지 않는 메틸글리코시드 디에스테르는 무용매 공정으로 합성하였다.

Fig. 3-a는 모노에스테르를 합성하는 용매 공정에서 메틸글리코시드와 카프르산의 몰비가 메틸글리코시드 배당화 반응에 미치는 영향을 나타낸 것으로, 몰비 1:3 이상에서 8시간에 95%이상의 전화율에 도달하였으며 몰비가 1:2 이하에서는 전화율과 배당화 속도가 낮게 나타났다. 그 이유는 몰비 1:2이하이면 반응매질에 대한 친화력때문에 메틸 글리코시드가 리파아제의 활성점 가까이 접근하기 어렵게되고, 리파아제와 카프르산이 쉽게 활성착화합물을 형성하기 위해서는 1:2이상의 과량의 몰비를 필요로 하기 때문이며, 메틸글리코시드와 지방산의 최적몰비는 1:3임을 알 수 있었다.

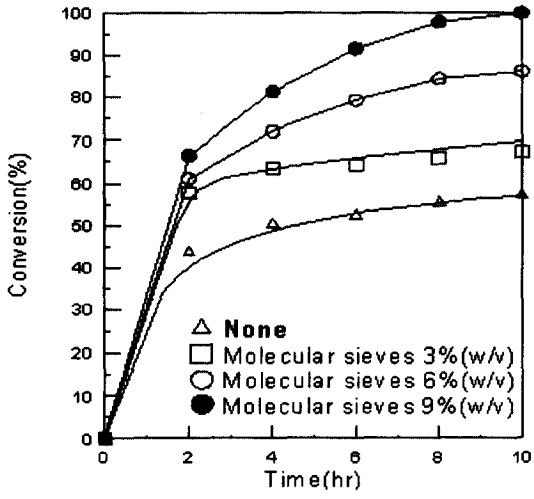


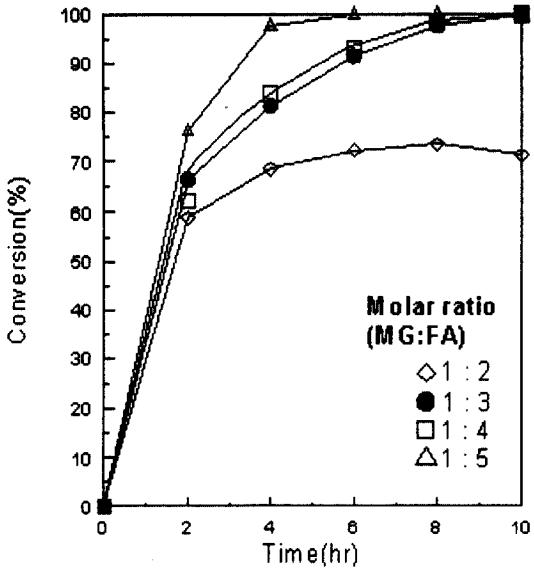
Fig. 3. Effect of desiccant content on conversion of methyl glycoside in lipase-catalysed glycosilation of capric acid.

Fig. 3-b는 무용매 공정에서 메틸글리코시드와 중쇄 지방산의 배당화 반응에 미치는 몰비의 영향을 나타내었다. 카프르산은 몰비가 1:3에서도 95%이상의 전화율을 얻을 수 있었으나, 카프릴산의 경우에는 몰비를 1:5로 증가시켜야만 80%이상의 전화율을 얻을 수 있었다. 이는 카프르산 보다 소수성이 약한 카프릴산이 리파아제와 효과적으로 활성착화합물을 형성하기 위해서는 카프르산보다 과량의 몰비를 필요로 하기 때문이며, 일반적으로 탄소수가 10이상인 지방산은 리파아제와 쉽게 활성착화합물을 형성할 수 있어서 높은 전화율을 나타내나 탄소수 8이하인 지방산의 경우에는 상대적으로 배당화하기가 어렵다는 것을 알 수 있었다.

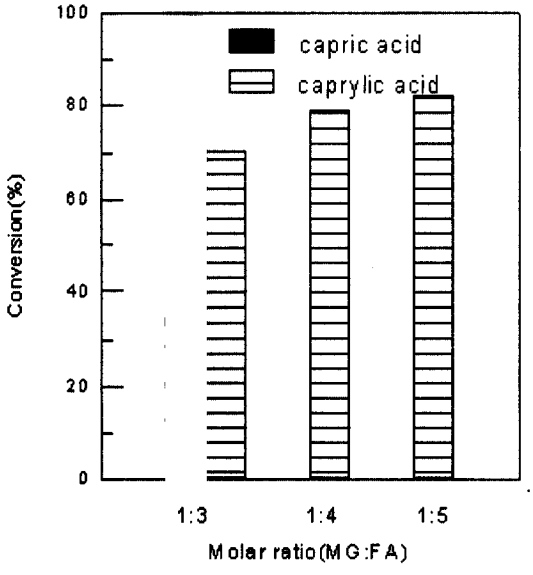
3. 최적 효소함량

효소적 합성공정은 화학적 합성공정에 비하여 온화한 조건에서 반응이 이루어지므로 에너지 비용이 적고 식품안전성이 높은 순수한 중쇄 지방질을 얻을 수 있으며, 기질특이성과 위치특이성을 활용하면 각 단계마다 문제가 되는 기존의 분리 정제 비용을 절감할 수 있어서 유망한 중쇄 지방질 생산기술로 평가되고 있다. 그러나, 효소 촉매의 활성도가 화학적 합성에 비하여 낮기 때문에 효소적 배당화공정의 생산성에서 중요한 변수가 되고있다. 따라서, 경제성있는 효소적 합성공정이 제시되기 위해서는 효소촉매의 활성도가 충분히 높고, 가능한 한 효소 함량이 최소화 되어야 한다. 허(7)의 연구 결과에 의하면 Novozym 435가 지방산과 메틸글리코시드의 배당화 효소로서 충분한 활성도를 가진 것으로 나타나 본 연구의 효소 촉매로 Novozym 435를 선정하였다.

Fig. 4는 카프르산과 메틸글리코시드의 용매 배당화 공정에서 Novozym 435의 함량에 대한 메틸 글리코시드의 전화율을 비교한 결과로서, 효소함량을 0.5~2.0%(w/v)로 변화시킴에 따라서 최적 효소함량이 존재함을 알 수 있었으며, 효소함량 1%(w/v)에서 최적임을 알 수 있었다. 반응시간 2시간 이내의 초기 배당화 속도는 효소 함량이 증가할수록 증가하였으나, 4시간 이후의 전화율과 배당화 속도는 효소 함량 1.0%(w/v)일 때 가장 높았으며, 효소 함량이 1.5%(w/v)이상부터는 전화율과 배당화 속도가 감소하였는데, 이는 리파아제가 이미 생성된 모노에스테르와 착화합물을 형성하여 또 다른 모노에스테르의 수산기로 지방산을 이동시켜 디에스테르를 생산하고, 이로부터 메틸글리코시드가 해리되어 전화율이 증가하지 않은 것으로 판단되었다.



(a)



(b)

Fig. 4. Effect of molar ratio of methyl glycosid to medium-chain fatty acid on conversion of methyl glycoside by lipase-catalyzed solvent glycosilation process(a) and solvent-free glycosilation process(b).
MG:methyl glycoside, FA : fatty acid.

4. 지방산 탄소수에 따른 배당화 반응성

메틸글리코시드의 용매 배당화공정에서 지방산의 탄소수를 C_8~C_{18}로 증가시키면서 배당화 반응에 대한 지방산 탄소수의 영향을 검토하였다. Fig. 5-a에 나타낸 바와 같이 지방산의 배당화 속도와 전화율은 탄소 사슬길이가 증가할수록 증가함을 알 수 있는데, 탄소수 8인 카프릴산의 평형 전화율은 80%에 머물렀으나 탄소수 10 이상인 지방산의 배당화 전화율은 100%에 도달하였으며, 동일 반응조건에서의 반응완결시간은 카프르산, 라우르산, 팔미트산, 그리고 올레산에 대하여 각각 10, 8, 6, 그리고 4시간 순으로 나타났다.

Fig. 5-b는 무용매 배당화 공정에서 메틸글리코시드와 중쇄 지방산의 배당화 반응을 수행하여 지방산의 탄소수의 변화에 따른 배당화 전화율을 비교한 것으로, 탄소수 10과 12의 카프르산과 라우르산의 경우에는 95%이상의 전화율을 얻었으나, 탄소수 8의 카프릴산은 용매 배당화 공정의 경우와 같이 전화율이 70% 미만으로 나타났다. 이 결과 역시Adelhorst 등[11] 및 기타연구자[12~14]들의 일치함을 알 수 있었다.

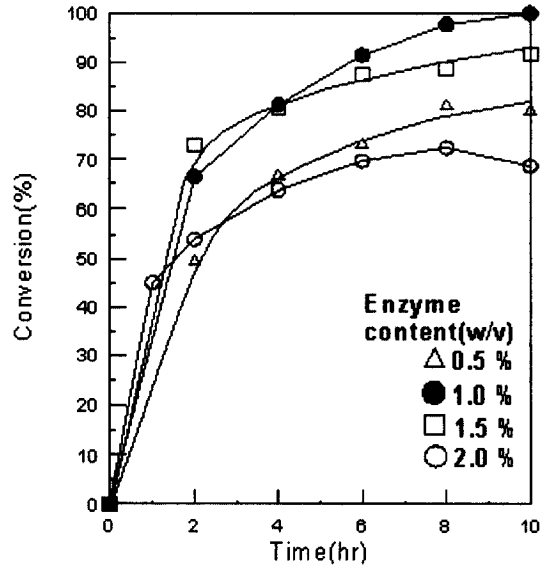


Fig. 5. Effect of enzyme content on conversion by lipase-catalyzed glycosilation of methyl glycosid and capric acid.

리파아제는 다른 효소와 달리 미량의 수분과 소수성 계면에서 활성화되는 것으로 알려져 있으며 기질과 착화합물을 형성하기 위해서는 먼

저 비활성 구조의 리파아제가 계면흡착에 의하여 구조적 변화가 이루어지는 활성화 단계를 거친 다음에 지방산과 활성 착화합물을 형성하는 것으로 보고되어 있다. 따라서, 리파아제가 촉매작용을 수행하기 위해서는 계면흡착에 의하여 열린 활성구조로 전환되어야 하는데[15], 소수성이 크고 정전기적인 인력이 약하며 유전상수가 낮은 매질에서 비교적 쉽게 활성화되며[16] 소수성 유기용매나 탄소수가 큰 지방산으로 이루어진 계면과 접촉하면 높은 활성화 상태를 유지할 수 있고, 지방산의 탄소수가 클수록 리파아제와 활성 착화합물을 형성하기 위한 활성화 에너지는 감소할 것으로 예상된다. 그러므로, 탄소수 10이상인 지방산의 배당화 반응성은 소수성이 약한 카프릴산보다 높았고 탄소수가 클수록 배당화 속도와 전화율이 증가하였는데, 카프릴산은 배당화되어도 생성물인 메틸글리코시드 지방산 에스테르의 소수성이 약하므로 물분자의 접근이 억제되지 못하여 가수분해 될 수 있으므로 배당화 반응이 완결되지 못한 것으로 판단된다.

5. 메틸 글리코시드의 입체구조에 따른 배당화 반응성

본 연구에서 사용한 배당화제는 자당의 메틸화에 의하여 합성된 메틸글리코시드 혼합물로서 베타-메틸푸룩토피라노시드 30%, 베타-메틸푸룩토푸라노시드 20%, 베타-메틸글루코피라노시드 25%, 알파-메틸글루코피라노시드 25%로 구성되어 있으며, 지방산과의 혼화성과 반응성 및 용해도가 우수한 베타형이 75%이고 알파형은 25%이며, 과당과 포도당의 몰비는 1:1로 이루어져 있다.

Fig. 6은 용매 공정과 무용매 공정에서 메틸글리코시드로 배당화할 때에 각각의 메틸 글리코시드의 배당화 반응성을 알아보기 위하여 각 성분별 전화율을 나타낸 것으로 카프릴산보다는 카프르산에 대하여, 무용매 공정보다는 용매 공정에서 더 높은 배당화 반응성을 나타내었고, 베타-메틸푸룩토푸라노시드, 베타-메틸글루코피라노시드, 베타-메틸푸룩토피라노시드, 알파-메틸글루코피라노시드의 순으로 나타났다.

베타-메틸푸룩토푸라노시드는 1급 수산기가 1번과 6번 탄소에 2개 존재하여 가장 반응성이 우수하였고, 아노머 탄소의 수산기가 축방향으로 배향된 알파형보다는 수평방향으로 배향된

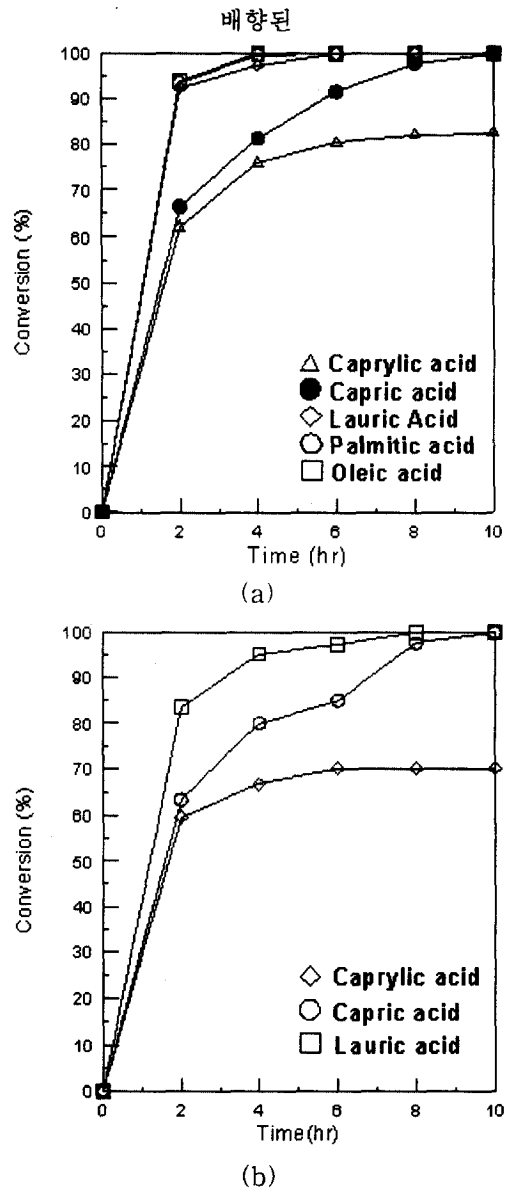
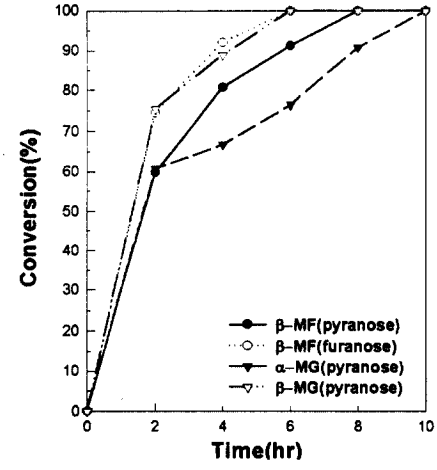


Fig. 6. Transient conversion of methyl glycoside on different fatty acid chain length by lipase-catalyzed solvent glycosilation process(a) and solvent-free glycosilation process(b).

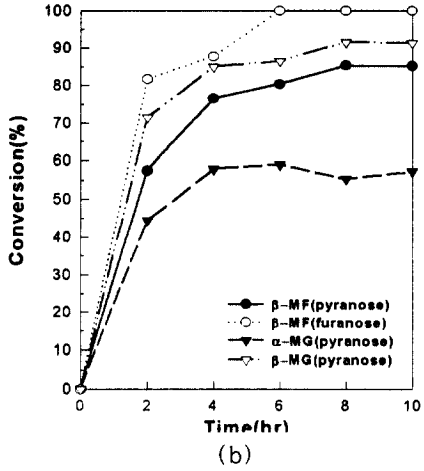
베타형의 배당화 속도가 입체장애가 적으므로 더 높게 나타남을 알 수 있었다. 베타-메틸글루코시드는 평판형 피란구조이나 베타-메틸푸룩토피라노시드는 뒤틀린 피란구조를 이루고 있어서 효소의 활성점으로 접근하기가 용이하지 않으므로 베타-메틸글루코시드의 반응성이

더 높음을 알 수 있었다. 그 결과, 혼화성과 용해도가 높은 메틸푸룩토시드와 베타형의 글리코시드는 배당화제로서 우수함을 알 수 있었고 알파-메틸 글루코피라노시드의 반응성이 가장 낮은 것으로 나타났다. 1급 수산기가 1번과 6번 탄소에 2개 존재하는 베타-메틸푸룩토푸라노시드는 연화점이 낮고 지방산과의 혼화성이 우수하며 배당화 반응성이 가장 높으므로[7] 지방산 디에스테르를 효소적 무용매공정으로 생산하기 위한 최적의 배당화제로 평가되었다.

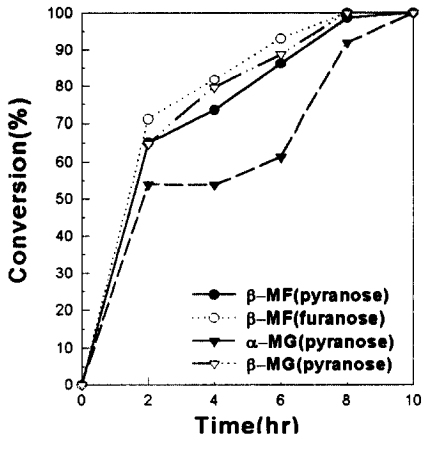
Fig. 7은 카프르산을 무용매 공정에서 베타-메틸푸룩토푸라노시드로 배당화할 때에 반응시간에 따른 베타-메틸푸룩토푸라노시드의 전화율과 생성된 디에스테르와 모노에스테르의 비를 나타낸 것으로서 반응시간 10시간이 지난후에는 거의 순수한 카프르산 디에스테르를 얻을 수 있었다.



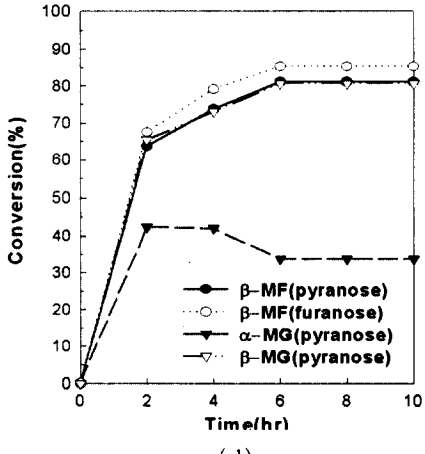
(a)



(b)



(c)



(d)

Fig. 7. Transient conversion of methyl glycoside on different methyl glycosides by lipase-catalyzed solvent glycosilation process(a and b) and solvent-free glycosilation process(c and d).

메틸글리코시드 지방산 에스테르는 지방산의 종류와 치환도에 따라서 그 용도를 다양하게 구분할 수 있는데, 모노에스테르는 지방산의 탄소수에 따라서 5~12의 다양한 친수-친유평형(hydrophile-lipophile balance, HLB)값을 가지며 HLB값이 3~8이면 w/o형 유화제, 9이상이면 o/w형의 유화제로 사용될 수 있고[10], 카프릴산과 카프르산의 디에스테르는 대사기능성이 특성화된 영양식품으로 활용될 수 있다. 본 연구의 결과를 토대로 카프르산, 라우르산, 팔미트산, 올레산을 메틸글리코시드로서 배당

화하면 각각 HLB값이 8~11인 계면활성제를 생산할 수 있고, 중쇄 지방산을 베타-메틸푸룩토푸라노시드로 무용매 공정에서 배당화하여 디에스테르를 얻음으로서 글리세롤 에스테르인 MCT보다 대사특성이 강화된 메틸글리코시드 에스테르를 생산할 수 있을 것으로 기대된다.

6. 배당화 공정의 비교 평가

효소적 합성법은 화학적 합성법에 비하여 배당화제의 분해와 탄화를 막을 수 있고 금속비누를 사용하지 않으며, 효소 특성에 따라서 위치 특이성과 입체 특이성을 자유로이 조절할 수 있어서 다양한 기능을 갖는 배당체 지방산 에스테르를 생산할 수 있고 생체친화성과 환경친화성이 높아 독성과 환경오염을 방지할 수 있으며 분리 및 정제 비용이 절감된다. 그러나, 배당화제의 가용성과 혼화도 및 반응성에 따라서 효소적 합성공정의 경제성이 좌우된다. 배당체 지방산 에스테르 합성 반응계의 수율을 높이기 위해서는 친수성이 강한 배당화제와 소수성이 강한 지방산을 완전히 혼화하여 효소와 효과적으로 기질착화합물을 형성할 수 있도록 균일상을 이루어야 하는데, 용매 공정의 경우 두성분을 충분히 높은 농도로 혼용할 수 있는 용매를 선정하기가 어려우며 대부분의 상용 용매들이 독성이 강하여 생성물의 식품 안전성 뿐만 아니라 근본적으로 효소촉매의 활성에 큰 영향을 미치고 있는 것으로 나타나 배당화제와 반응매질의 중요성이 강조되고 있다. 또한, 무용매 공정의 경우 대부분 배당화제의 용융온도가 효소 촉매의 불활성화 온도를 초과하므로 열 안정성이 우수한 효소를 개발한다고 하여도 배당화제의 용융온도를 낮추지 못한다면 효소촉매의 이용이 제한될 수 밖에 없다. 현재 지방산 에스테르의 효소적 합성에 이용되고 있는 배당화제는 주로 포도당과 과당 및 메틸 또는 에틸 글루코시드를 들수 있는 데, 대부분 배당화제의 용해도와 혼화도가 낮고 연화점이 높거나 고가의 원료라는 단점이 지적되고 있다. 이러한 관점에서 연화점과 유동점이 낮고 지방산과의 혼화성이 우수하며 그 자신이 알킬기와 수산기를 가진 양쪽성 화합물인 메틸글리코시드를 배당화제로 이용하면 기능성 식품유화제와 영양식품등의 다양한 용도로 활용할 수 있는 메틸 글리코시드 지방산 에스테르를 용매 배당화공정과 무용매 배당화공정으로 생산할 수 있을 것으로 전망된다.

Table 1.에는 지금까지 보고된 연구결과와 본 연구의 배당화 공정을 배당화제, 반응 매질, 효소비용과 반응시간, 물비, 초기 배당화제의 농도의 관점에서 비교 평가 하였다. 대부분의 연구자들은 용해도와 지방산과의 혼화성이 낮은 단당류 혹은 단쇄기 알킬글루코시드를 배당화제로 사용하였고 배당화제의 초기농도를 높게 유지할 수 없었다. 또한 아세톤, 아세토니트릴, 피리딘 등의 독성이 강한 상용 용매의 사용으로 식품 안전성 관점에서 합당치 못하고, 효소 첨가량이 많고 물비가 큼에도 불구하고 배당화 전화율과 에스테르의 생산성은 본 연구 결과에 미치지 못하였다. 그러나, 용해도가 높고 연화점이 낮으며 지방산과의 혼화성이 우수한 메틸글리코시드를 배당화제로 한 본 연구에서는 용매 공정과 무용매 공정 모두 경제성이 있는 최적 조업 조건을 설정할 수 없었고, 효소의 첨가량도 용매 공정에서는 반응체적의 1%(w/v)로, 무용매 공정에서는 10%(w/w)로 회수하여 재사용이 가능하므로 효소비용을 절감할 수 있었을 뿐만 아니라 반응시간 10시간에 95%이상의 전화율에 도달하여 높은 생산성을 나타내었다. 이와 같은 연구 결과로부터 메틸글리코시드가 에스테르 효소적 합성 공정에 유용한 배당화제로 이용될 수 있음을 알 수 있고, 이를 바탕으로 경제성있는 상업적 생산 공정으로 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

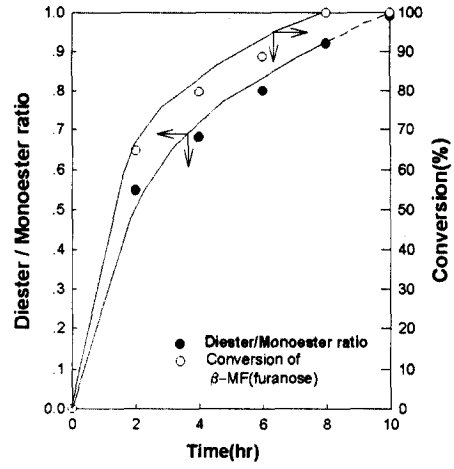


Fig. 8. Diester/monoester ratio of MCG in solvent-free, lipase-catalysed glycosilation of methyl-β-D-fructofuranoside and capric acid.

Table 1. Lipase-catalyzed glycosylation of fatty acids.

Type	Enzyme source	Reaction medium	Reaction temp.(℃)	Enzyme content (%, w/v) / Reaction time(hr)	Acyl donor	Acyl acceptor	Molar ratio[a]	Initial conc. of sugar(g/L)	conversion (%)[b]	Remark
Sugar	Novozym 435	acetone	40	10/72	C8-C18 fatty acid	Glucose	3:1	30	98	Arcos et al.[9]
	Immobilized *C. antarctica*	acetonitrile	70	5/24	C8	Glucose	1:12	8.3 (insoluble)	99	Ljunger et al.[17]
	Lipozyme/FBR[c]	*t*-amyl alcohol	55	18/16	C18:1	Fructose	1:10	10	83[d]	Khaled et al.[14]
	Lipozyme	solvent-free	60 (160mmHg)	20/24	C8	Fructose	1:5	-	26	Guillardeau et al.[18]
	Lipozyme IM 20 Lipase sp. 382	t-butanol	40	2/48	C18:0	Fructose/PBA[e]	1:1	18	10-24	Oguntimein et al.[8]
	Lipozyme	*t*-amyl alcohol n-hexane	55	1/24	C16, C18:0	Fructose/PBA	1:15	8	55	Scheckermann et al[19]
	Lipozyme IM 60	n-hexane	60	1/12	C18:0	Fructose/PBA	3:1	5.4	40	Schlotterbeck et al[20]
Glycoside	Immobilized *C. antarctica* Lipase B	solvent-free	70 (7.5mmHg)	6/24	C8-C18	α,β-ethyl glucoside	1:1.35	-	95	Björking et al.[11]
	Novozym 435	acetonitrile	45	0.83/24	C8	methyl-β-o-glucoside	1:11	8.4 (insoluble)	90	Cordova et al.[21]
	Lipase sp. 382	benzene/ pyridine(2:)	55	1/48	methyl oleate	methyl-α-o-glucoside	1:4	8	76.5	Mutua ea al.[22]
	Novozym 435	t-butanol	60	1/8	C18:1	methyl-β-o-frucoside	3:1	200	99.7	Ileo[7]
	Novozym 435	solvent-free	70 (20mmHg)	10/8-10	C18:1	methyl-β-o-frucoside	1:2	-	99.9	Ileo[7]
	Novozym 435	t-butanol	60	1/10	C8-C18:1	methyl glycoside	1:3	50	~95.0	present work
	Novozym 435	solvent-free	70 (5-20mmHg)	10/10	C8-C12	methyl glycoside	1:3	-	~95.0	present work

a: molar ratio of acyl acceptor to donor. b: based on limiting compoment. c: Fixed-bed reactor containing 200g of lipozyme
d: Conversion of 10 hour recycling with molar ratio adjusted after 50% of equlibrium conversion reaching for 6 hours.
e: complex by phenylboronic acid with molar ratio of PBA to sugar is 1.5:1

Ⅳ. 결 론

베타형 75%, 과당과 포도당의 비가 1:1로 구성된 메틸글리코시드 혼합물을 배당화제로 하는 효소적 용매 배당화공정과 효소적 무용매 배당화공정에 의하여 당과 중쇄지방산을 배당화하는 기능성 복합 지질소재를 합성한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

3-부탄올을 반응매질로하는 용매공정에서 Novozym 435 리파아제로 장쇄지방산과 중쇄지방산을 배당화하여 메틸글리코시드 지방산 에스테르를 합성한 결과, 메틸글리코시드 농도 50g/L, 메틸글리코시드와 지방산의 최적몰비 1 : 3, Novozym 435 함량 1%(w/v), 수분제거제의 함량 9%(w/v), 반응온도 60℃에서 반응시간 10시간에 95% 이상의 전화율을 얻었다. 그리고, 무용매공정에서 Novozym 435로 지방산을 배당화하여 메틸글리코시드 에스테르를 합성한 결과, 메틸글리코시드와 지방산의 최적몰비 1 : 3, Novozym 435 함량 10%(w/w), 반응온도 70℃, 진공도 5~20mmHg에서 반응시간 10시간에 95%이상의 전화율에 도달하였다.

메틸 글리코시드의 배당화 반응성은 퓨란구조의 베타형의 베타-메틸푸룩토푸라노시드가 가장 우수하였고, 수산기가 수평방향으로 배향되어있는 베타형의 글리코시드가 축방향으로 배향된 알파형의 글리코시드보다 우수하였으며 분자구조가 간결한 퓨란구조가 피란구조보다 입체장애가 작아 배당화 반응성이 우수함을 알 수 있었다. 그 결과, 메틸글리코시드 혼합물의 배당화 반응성은 베타-메틸푸룩토푸라노시드, 베타-메틸글루코피라노시드, 베타-메틸푸룩토피라노시드, 알파-메틸글루코피라노시드의 순으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부의 보건의료기술연구비로 이루어졌으며 연구비를 지원해 주신 관계기관에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Akoh, C. C. and Yee, L. N., 1997, Enzymatic Synthesis of Position-Specific Low-Calorie Structured Lipids, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **74** : 1409-1413.
2. Babayan, V. K., 1985, Medium Chain Triglycerides Their Composition, Preparation, and Application, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **45** : 23-25.
3. Akoh, C. C., 1995, Lipid-Based Fat Substitutes. *Food Sci. and Nutr.*, **35**:405-430.
4. Ljunger, G., Adlercreutz, P. and Mattiasson, B., "Lipase Catalyzed Acylation of Glucose", Biotechnol. Bioeng., 16:1167-1172 (1994).
5. Fabre, J., Betbeder, D., Paul, F., Monsan, P., and Perie, J., 1993, Regiospecific Enzymic Acylation of Butyl α-D-Glucopyranoside. *Carbohydr. Res.* **243**:407- 411.
6. Therisod, M. and Klivanov, A. M., 1987, Resioselective Acylation of Secondary Hydroxyl Groups in Sugars Catalyzed by Lipases in Organic Solvents, *J. Am. Chem. Soc.*, **109** : 3977-3981.
7. 허주형, 1997, 메틸푸룩토시드를 이용한 과당계열의 당 지방산 에스테르의 효소적 및 화학적 합성, 공학 박사학위 논문, 명지대학교 대학원.
8. Oguntimein, G. B., Erdmann, H. and Schmid, R. D., 1993, Lipase Catalysed Synthesis of Sugar Ester in Organic Solvents, *Biotechnol. Lett.*, **15** : 175-180.
9. Arcos, J. A., Bernabe, M. and Otero, C., 1998, Quantitative Enzymatic Production of 6-O-Acylglucose Esters, *Biotechnol. Bioeng.*, **57** : 505-509.
10. Ducret, A., Giroux, A., Trani, M. and Lorite, R., 1995, Enzymatic Preparation of Biosurfactants from Sugars or Sugar Alcohols and Fatty Acids in Organic Media Under Reduced Pressure, *Biotech. and Bioeng.*, **8** : 214-221.
11. Adelhorst, K., Björkling, F., Godtfredsen, S. E. and Kirk, O., 1990, Enzyme Catalysed Preparation of 6-*O*-Acylglucopyranosides, *Synthesis*, **2** : 112-115.
12. Björkling, F., Godtfredsen, S. E., and Kirk, O., 1989, A Highly Selective Enzyme-catalysed Esterification of Simple Glucosides, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 934-935.
13. Fregapane, G., Sarney, D. B., Greenberg, S. G., Knight, D. J. and Vulfson, E. N., 1994, Enzymatic Synthesis of Monosaccharide Fatty Acid Esters and Their Comparison with Conventional Products, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **71** : 87-91.
14. Khaled, M., Montet, D., Pina, M., and Graille, J., "Fructose Oleate Synthesis in a Fixed Catalyst Bed Reaction", Biotechnol. Lett., 13:167-172 (1991).
15. Hawrani, A. S., Moreton, K. M., Sessions, R. B., Clarke, A. R., and Holbrook, J. J., 1994, Engineering Surface Loops of Proteins-A Preferred Strategy for Obtaining New Enzyme Function, *TIBECH*, **12** : 207.
16. Parida, S. and Dordick, J. S., 1991, Substrate Structure and Solvent Hydrophobicity Control Lipase Catalysis and Enantioselectivity in Organic Media, *J. Am. Chem. Soc.*, **113** : 2253.
17. Gandihi, N. N., "Applications of Lipase", J. Am. Oil Chem. Soc., 74:621-634 (1997)
18. Guillardeau, L., Montet, D., Khaled, N., Pina, M., and Graille, J., "Fructose Caprylate Biosynthesis in a Solvent-free Medium", *Tenside Surf. Det.*, 29:342-344 (1992).
19. Scheckermann, C., Schlotterbeck, A., Schmidt, M., Wray, V., and Lang, S., "Enzymatic Monoacylation of Fructose by Two Procedures", Enzyme Microb. Technol., 17:157-162 (1995).
20. Schlotterbeck, A., Wray, V., Lang, S., and Wagner, F., "Lipase-catalyzed Monoacylation of Fructose", Biotechnol. Lett., 15:61-64 (1993).
21. Codova, A., Hult, K., and Iversen, T., "Esterification of Methyl Glycoside Mixtures by Lipase Catalysis, Biotechnol. Lett., 19:15-18 (1997).

22. Mutua, L. N., and Akoh, C. C., " Synthesis of Alkyl Glycoside Fatty Acid Esters in Non-aqueous Media by Candida sp. Lipase", J. Am. Oil Chem. Soc., 70:43-46 (1993).

23. Michel Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and Fred Smith, "Colori-metric Method for Determination of Sugars and Related Substances", Analytical Chemistry, 28:350-356 (1956)