

## 현미유를 이용한 기능성 유지의 효소적 합성 및 고 콜레스테롤, 고 지방 식이가 생쥐의 간 ACAT활성에 미치는 영향

김성현 · 부우평란 · 이기택\*

충남대학교 식품공학과

### Enzymatic Synthesis of Functional Oil from Rice Bran Oil and Dietary Effects on Hepatic ACAT Activities of High Cholesterol and High Fat Fed Mice

Song-Hyun Kim, Phuong-Lan Vu and Ki-Teak Lee<sup>†</sup>

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

#### Abstract

Monoacylglycerol (MG) and diacylglycerol (DG), as the components of enzymatically synthesized functional oil, were produced by glycerolysis of rice bran oil and glycerol using IM60 (immobilized lipase) in a stirred-batch reactor at 60°C for 72 hours. After glycerolysis, the contents of triacylglycerol (TG), DG and MG in the produced functional oil were 41.71%, 46.19%, and 11.15%, respectively. The functional oil also contained phytosterols ( $2.04 \pm 0.17$  mg/g),  $\gamma$ -oryzanol ( $1.06 \pm 0.04$  mg/g) and  $\alpha$ -tocopherol ( $0.13 \pm 0.04$  mg/g). In animal experiment the dietary effects of functional oil on hepatic acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT) activities of the high cholesterol and high fat (HCHF)-fed mice were investigated. In functional oil-fed group, the liver ACAT activity was significantly lowered than in HCHF and corn oil-fed groups ( $p < 0.05$ ). This results suggested that the synthesized functional oil may have an atheroprotective effect by inhibiting ACAT activity.

**Key words:** functional oil, glycerolysis, diacylglycerol, monoacylglycerol, acyl-CoA:cholesterol acyltransferase

#### 서 론

현미유는 다른 식용유에 비해 한국인에게 익숙한 구수한 맛과 향을 지니고 있고  $\gamma$ -oryzanol, tocotrienol, phytosterol 과 같은 생리활성을 띤 비검화 물질을 일부 함유하고 있어 healthy 유지로써 알려져 있다. 특히 현미유의 혈액내 cholesterol 저하 능력은 다른 식용유보다 뛰어난 것으로 보고 되었고, 이는 현미유의 균형적인 불포화 지방산 조성 과 식물성 스테롤을 포함한 비검화 물질의 영향 때문인 것으로 알려졌다(1-3). 현미유에 다량 함유되어 있는  $\gamma$ -oryzanol은 불포화 triterpenoid alcohol계와 ferulic acid가 ester 결합한 물질로써 항산화 효과뿐만 아니라 혈액내 LDL cholesterol 을 저하시키는 역할을 하여 기능성 물질로써 연구되고 있다(2,4-6). 그러나 현미유의 풍미·영양학적 우수성에도 불구하고 국내 생산 및 소비 실태는 지속적인 감소 추세를 보이고 있다. 국립 농산물 품질 관리원에 따르면 최근 5년간(1998~2002)의 국내 쌀 생산량은 평균 552만톤으로, 도정 중 41만톤의 쌀겨가 부산물로 발생되었다(7). 이는 이론적으로 8만톤에 해당하는 식용류를 자체 생산할 수 있는 원료

수급의 유리함에도 불구하고 현재 국내 현미유의 생산량과 소비량은 1,086톤과 5,000톤으로 1995년과 비교하여 각각 8%, 26% 수준에 지나지 않는 실정이다(8). 이처럼 현미유 산업이 다른 식용유 산업규모보다 작은 이유는 알려진 바와 같이 도정중의 lipase 활성화에 따른 가공의 어려움과 이에 따른 생산 기피 및 관련 연구 부재에도 그 원인이 있다(1,5).

지방 섭취 증가로 인한 비만과 지방간, 간경화 등이 소비자의 건강, 복지, 수명 등 사회전반에 부정적 영향을 끼치는 주요원인으로 인식되면서, 저칼로리 저지방 식품은 식품산업의 주요 연구대상이 되고 있다. 그 중 기능성 유지는 저칼로리 저지방 식품에 대한 소비자들의 욕구를 충족시킬 식품 분야로, 유지의 구조 변형을 통해 이화학적 특성을 개선시킨 기능성 대체 유지류가 연구되고 있다(9,10). 특히 diacylglycerol(DG)와 monoacylglycerol(MG)은 일반적으로 식품, 의약 및 화장품 산업에서 유효제와 같은 첨가제 등으로 사용되었으나, 최근 triacylglycerol(TG)에 비해 낮은 칼로리 value 를 가지며 인체내 체지방으로 축적되지 않고 에너지로 전환되려는 경향이 밝혀짐에 따라 기능성 식품으로 응용되고 있다(11,12). 그러나, 동맥경화를 비롯한 관상동맥질환에 대한

\*Corresponding author. E-mail: ktleee@cnu.ac.kr  
Phone: 82-42-821-6729, Fax: 82-42-822-6729

dietary DG, MG의 역할에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 한편 효소적 glycerolysis 반응을 이용한 DG, MG 합성은 위치 특이성 뿐만 아니라 제조과정중의 부작용이 적기 때문에 식품의 기능성과 안정성을 고려할 때 화학적 합성 방법보다 이상적이다(13).

따라서 본 실험에서는 현미유로부터 DG, MG를 함유한 기능성 유지를 합성하고, 이 기능성 유지의 이화학적 특성을 현미유 및 옥수수유와 비교 분석하였으며, 기능성 유지가 고 콜레스테롤 고 지방 식이를 섭취한 생쥐의 lipoprotein-associated phospholipase A<sub>2</sub>(Lp-PLA<sub>2</sub>)와 acyl-CoA: cholesterol acyltransferase(ACAT)의 activity에 미치는 영향을 연구하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에서 이용된 현미유는 주식회사 세림(Searim Co., Daejeon, Korea)에서 제공한 것을 사용하였으며, 옥수수유와 대두유는 유성인근의 할인마트(E사)에서 구입하였다. DG, MG 합성에 사용한 IM60 효소는 *Rhizomucor miehei*로부터 획득한 lipase(EC 3.1.1.3)를 macroporous anion exchange resin에 고정화시킨 효소로서 Novo Nordisk Biochemistry (Danbury, USA)에서 구입하였다.

### 기능성 유지의 합성 및 분석

현미유와 글리세롤을 2:1(mol)로 혼합한 후 총 기질의 5%에 해당하는 효소를 첨가한 다음 회분식 교반기에서 온도 60°C, 교반속도 300 rpm 조건으로 72시간동안 반응시켜 DG, MG를 합성시켰다. 합성된 기능성 유지는 sodium sulfate column, 원심분리, 진공 감압농축 및 질소주입 과정을 통해 정제하였다. 기능성 유지의 TG, DG 및 MG 조성비율은 normal phase-HPLC를 이용하여 분석하였다. 기능성 유지 30 µL를 10 mL의 hexane으로 희석시킨 후 PTFE syringe filter(25 mm, 0.2 µm, whatman, USA)를 이용 여과시켜 분석기에 주입하였다. 기기는 HPLC(Yonglin SP930D, Anyang, Korea)를 사용하였으며, 검출기로는 evaporative light scattering detector(ELSD; Sedex 75, Alfortville, France)를 질소압력 2.2 bar, 온도 40°C 조건으로 설정한 뒤 사용하였다. 컬럼은 Hypersil BDS CPS 5 µm(250×4.6 mm, Bellefonte, PA, USA)을 이용하였고 이동상은 acetic acid(0.1%)를 각각 첨가한 hexane과 methyl t-butyl ether를 기울기 용리로 설정한 뒤 분당 1 mL로 흘려주었다(14).

### 지방산 조성 분석

6% 황산이 희석된 메탄올 3 mL와 시료 100 mg을 25 mL 시험관에 혼합한 후 내부표준물질인 heptadecanoic acid(1 mg/mL hexane)를 50 µL 첨가한 다음, 70°C oven에서 60분간 반응시켰다. 반응 후 hexane층만을 취하여 자동주입기가

장착된 gas chromatograph(Hewlett-Packard 6890 series, Avondale, PA, USA)를 사용하여 지방산 분석을 실시하였다. 분석에 사용된 fused-silica capillary column(Supelco-wax<sup>TM</sup>-10, 60 m×0.25 mm×0.25 µm film thickness, Bellefonte, PA, USA)은 시간에 따라 온도변화(100°C 5 min → 4°C/min → 220°C 20 min)를 주어 peak의 분리 효율을 높였으며, flame ionized detector(FID)를 통하여 검출하였다. 이동상은 질소가스를 이용하였고, injector와 detector 온도는 각각 250°C, 260°C로 설정하였다. 또한, 현미유와 기능성 유지의 TG 분자 내 sn-2 위치의 지방산 분석을 위해 pancreatic lipase(extracted from hog pancreas, Sigma Chemical Co., USA)를 이용하여 가수분해하였다(14).

### Phytosterol, tocopherol과 $\gamma$ -oryzanol의 함량 측정

Phytosterol 함량 분석은 유지로부터 비검화 물질을 추출한 후 GC(Yonglin, M600D, Anyang, Korea)를 이용하여 검출 및 함량을 측정하였다(15). Tocopherol은 외부표준물질( $\alpha$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tocopherol)을 이용하여 external standard curve로 함량을 측정하였다. 분석에 사용된 시료(60 mg)는 hexane 10 mL로 희석시킨 후 여과시켜 기기에 주입하였다. 기기는 Chromsep Catridge LiChrosorb Diol column(5 µm×3×100 mm, Chrompack, Raritan, NJ, USA)이 장착된 HPLC(SP930D dual pump, UV830 detector, Yonglin, Anyang, Korea)를 이용하였으며 파장 295 nm에서 검출하였다. 이동상은 hexane과 acetic acid를 1000:1로 혼합하여 이용하였다(16).  $\gamma$ -Oryzanol 함량 또한 external standard curve를 이용하여 구하였으며 분석에 사용된 기기와 컬럼은 위의 tocopherol 함량분석 시 이용했던 것과 동일한 것으로 ELSD를 장착하여 분석하였다. 기울기 용리는 처음 8분간은 A line(hexane with 0.1% acetic acid)과 B line(2-propanol)을 100:0(v:v)으로 흘려준 후 2분, 3분 간격으로 각각 95:5, 100:0으로 변환시킨 다음 5분간 기울기 용리를 유지시켰다. 기울기 설정은 flow rate 1.0 mL/min 조건에서 Autochro-2000 software(Yonglin, Anyang, Korea)를 이용하여 제어하였다.

### 동물 실험

실험 동물은 생후 6주된 mice(C57BL/6J) 35마리를 normal chow(powder diet)로 1주일간 적응시킨 후, 5그룹으로 나누어 4주간 *ad libitum*으로 사육하였다. 사육실의 온도는 22±1°C로, 명암은 12시간 주기로 조절하였다. Mice는 5g의 diet/day로 사육되었고, 체중은 1주일에 한번씩 측정하였다. 실험식이 중 고 콜레스테롤, 고 지방식이(HCHF)는 1.25% 콜레스테롤과 15% 지방(7.5% cacao butter+7.5% lard+0.5% Na-choleate)를 포함하게끔 제조되었고, 비교군들은 이 식이에 5%의 현미유(palmitic acid: 20.4, stearic acid: 1.9, oleic acid: 46.6, linoleic acid: 31.4 mol%), 5%의 기능성 유지(palmitic acid: 19.6, stearic acid: 2.0, oleic acid: 48.2, lino-

leic acid: 30.0 mol%) 및 5% 옥수수유(palmitic acid: 11.4, stearic acid: 1.3, oleic acid: 32.6, linoleic acid: 53.5, linolenic acid: 1.2 mol%)를 각각 첨가시켜 조제하였다(Table 1).

**ACAT와 Lp-PLA2 분석**

4주의 실험기간 종료일에 capillary tube(Sigma 02-668-66)를 이용하여 mouse의 retro-orbital sinus에서 혈액 샘플을 채취한 후, lipoprotein-associated phospholipase A<sub>2</sub>(Lp-PLA<sub>2</sub>)의 activity를 측정하였다(17). Mice의 liver microsomal fraction을 ultracentrifuge를 이용하여 분리한 후, ACAT activity를 분석하였다(18).

**간과 지방 조직의 지방산 조성 분석**

간을 Folch용액(CH<sub>3</sub>Cl : MeOH, 2 : 1)에 침지시킨 후 초음파 sonicator(5 min)와 항온교반수조(2 hr, 175 rpm)를 이용하여 조지방을 추출하였다. 추출 완료 후 10% NaCl를 가하여 CH<sub>3</sub>Cl층과 MeOH층을 분리시켜 CH<sub>3</sub>Cl층으로부터 조지방을 획득하였다. 간에서 분리시킨 조지방을 BF<sub>3</sub>-methanol (3 mL)과 내부표준물질(heptadecanoic acid, 50 µL)로 혼합시킨 후 90°C oven에서 100분간 반응시켰다. 그 후 혼합용액(water 1 mL, pentane 2 mL)을 첨가하여 methylation화된 지방산(pentane layer)을 분리시킨 다음 질소를 이용하여 농축하였다. 이후 시료를 hexane(150 mL)으로 다시 용해시킨 후 지방산 분석을 실시하였다. GC기기와 컬럼은 기능성 유지의 지방산 분석 시 사용했던 것과 동일하며 컬럼 온도(140°C 1 min, 10°C/min, 220°C 55 min)를 시간에 따라 변화시켰다. 지방 조직(adipose tissue)의 조지방 추출도 위와 동일한 방법으로 실시하였으며 methylation과 지방산 조성 분석은 기능성 유지의 지방산 조성 분석 방법과 동일하게 실시하였다.

**간조직의 인지질 분리 및 지방산 조성 분석**

간에서 추출한 조지방의 phosphatidyl ethanolamine(PE)와 phosphatidyl choline(PC)를 분리하기 위해 아세톤으로 조지방을 희석시킨 후, 얼음에 1시간 동안 방치시켜 원심분리(1,500 rpm, 10 min)하였다. 이와 같은 방법을 2회 반복한 후 질소를 이용하여 아세톤을 완전히 제거한 다음, folch 용액으로 희석하여 TLC silica gel plate(10×20 cm Merck,

Germany)와 전개용액(CH<sub>3</sub>Cl : MeOH : acetic acid : water = 100 : 75 : 7 : 4)을 이용하여 PC와 PE를 각각 분리하였다. PE와 PC의 methylation과 지방산 조성 분석 방법은 간 조지방 분석과 동일한 방법으로 실시하였다.

**통계처리**

실험결과는 평균±표준편차로 나타내었고 각 군 간의 유의성은 SAS(statistical analysis system, version 8.01) program의 Duncan's multiple range test를 실시하여 p<0.05 수준에서 검정하였다.

**결과 및 고찰**

**기능성 유지의 DG, MG, TG 조성**

HPLC를 이용하여 현미유와 이를 원료로 합성한 기능성 유지(합성된 현미유 TG, DG 및 MG의 혼합유)의 중성지질 조성 분석 결과를 Table 2에 나타내었다. 현미유는 대부분 TG(94.69%)로 구성되어 있었고 미량의 유리 지방산과 DG, MG를 함유하고 있었다. 중성지질 중 99.5%의 TG를 함유하는 옥수수유에서는 DG, MG가 사용된 분석조건하에서 검출되지 않았다. 합성된 기능성 유지는 DG(46.19%)와 MG(11.15%)의 함량이 총 57.34%로 TG함량(41.71%)보다 높게 나타났고, 그 외 미량의 지방산이 분석되었다.

**지방산 조성 분석**

옥수수유, 현미유, 기능성 유지의 지방산 조성 분석 결과 현미유와 기능성 유지는 매우 흡사한 지방산 조성을 보였으며(Table 2), 분석된 현미유의 지방산 조성결과는 다른 연구에서의 조성비와 유사하였다(1). 현미유와 기능성 유지의 전체 포화 지방산 조성은 각각 22.2 mol%, 21.5 mol%로 분석되었고 특히 palmitic acid의 조성비(rice bran oil 20.4 mol%, functional oil 19.6 mol%)가 비교적 높았다. 불포화 지방산은 현미유와 기능성 유지 모두 oleic acid와 linoleic acid가 대부분을 차지하였고, 이외 palmitoleic acid와 linolenic acid가 미량 분석되었다. 옥수수유의 total linoleic acid 함량은 현미유와 기능성유지보다 각각 72%와 80%가 더 높은 것으로 분석되었다. Pancreatic lipase를 통한 중성지질의 위치에 따른 지방산 조성 분석결과, 현미유는 sn-2 위치에서 높은

**Table 1. Experimental design of diet**

Group	n	Diet description
Control	7	Normal powder CRF-1 <sup>1)</sup>
HCHF <sup>2)</sup>	7	High cholesterol and high fat (HCHF)-diet based on CRF-1
RBO	7	5% of rice bran oil in the HCHF-diet (wt/wt)
Functional oil <sup>3)</sup>	7	5% of functional oil in the HCHF-diet (wt/wt)
Corn oil	7	5% of corn oil in the HCHF-diet (wt/wt)

<sup>1)</sup>The CRF-1 was purchased from Oriental Yeast Co. (Tokyo, Japan), and its fatty acid composition is palmitic acid, 26.6; stearic acid, 23.1; oleic acid, 35.1; linoleic acid, 15.2 mol%.

<sup>2)</sup>HCHF diet was supplemented with 1.25% cholesterol, 15% fat (7.5% cacao butter and 7.5% lard) and 0.5% sodium-cholate based on CRF-1.

<sup>3)</sup>Enzymatically synthesized rice bran oil including DG and MG.

Table 2. Neutral lipid and fatty acid compositions of rice bran oil, functional oil, and corn oil

Neutral lipid composition (area%)	Rice bran oil				Functional oil <sup>1)</sup>				Corn oil						
	TG	DG	MG	FFA	TG	DG	MG	FFA	TG	DG	MG	FFA			
	<i>Sn</i> -1,3		<i>Sn</i> -1,2		<i>Sn</i> -1,3		<i>Sn</i> -1,2		<i>Sn</i> -1,3		<i>Sn</i> -1,2				
	94.69	1.16	2.37	0.25	0.63	41.71	24.16	22.03	11.15	0.95	99.5	nd	nd	nd	0.50
Fatty acid composition (mol%)	<i>Sn</i> -1,3 <sup>2)</sup>		<i>Sn</i> -2		Total fatty acids		<i>Sn</i> -1,3		<i>Sn</i> -2		Total fatty acids				
Carbon No.															
C <sub>16:0</sub> Palmitic acid	24.61	11.95	20.39		19.51	19.73	19.58		16.64	1.03	11.44				
C <sub>16:1</sub> Palmitoleic acid	0.38	nd <sup>3)</sup>	0.25		0.36	nd	0.24		0.24	nd	0.16				
C <sub>18:0</sub> Stearic acid	1.98	1.63	1.86		1.48	2.92	1.96		1.82	0.17	1.27				
C <sub>18:1</sub> Oleic acid	42.66	52.78	46.04		47.86	48.93	48.22		32.51	32.64	32.55				
C <sub>18:2</sub> Linoleic acid	29.89	33.64	31.14		30.43	28.19	29.68		47.45	65.73	53.54				
C <sub>18:3</sub> Linolenic acid	0.48	nd	0.32		0.36	0.23	0.32		1.34	0.43	1.04				

<sup>1)</sup>Enzymatically synthesized rice bran oil including DG and MG.

<sup>2)</sup> $Sn-1,3$  (%) =  $(3TG - sn-2)/2$ .

<sup>3)</sup>nd stands for the content that is less than the limit of detection.

비율의 불포화 지방산(oleic acid, 52.78 mol%; linoleic acid, 33.64 mol%)이 검출된 반면, 기능성 유지는 포화지방산인 palmitic acid의 비율(19.73 mol%)이 현미유(11.95 mol%)보다 높았다. 옥수수유의 *sn*-2에서는 대부분 불포화 지방산(99 mol%)이 검출되었다(Table 2).

#### Phytosterol, tocopherol, oryzanol의 함량

정제 현미유와 기능성 유지에 함유된 생리활성 물질을 측정하여 Table 3에 나타내었다. Phytosterol 함량분석 결과 세 유지 모두  $\beta$ -sitosterol 함량(rice bran oil,  $1.19 \pm 0.04$ ; functional oil,  $1.25 \pm 0.15$ ; corn oil,  $2.52 \pm 0.13$  mg/g oil)이 가장 높았으며 campesterol(rice bran oil,  $0.48 \pm 0.06$ ; functional oil,  $0.44 \pm 0.10$ ; corn oil,  $0.68 \pm 0.06$  mg/g), stigmasterol(rice bran oil,  $0.34 \pm 0.06$ ; functional oil,  $0.35 \pm 0.09$ ; corn oil,  $0.30 \pm 0.08$  mg/g) 순으로 높은 함량을 보였다. 총 phytosterol 함량에 있어서는 현미유와 기능성 유지 각각  $2.02 \pm 0.08$  mg/g,  $2.04 \pm 0.17$  mg/g 함량을 보여 두 유지간의 유의적 차이는 없었지만, 옥수수유( $3.50 \pm 0.11$  mg/g)보다는 유의적으로 낮은 것으로 조사되었다( $p < 0.05$ ). Tocopherol은 현미유, 기능성

유지 모두  $\alpha$ -tocopherol만이 미량 검출되었으며 각각  $0.13 \pm 0.01$  mg/g,  $0.13 \pm 0.04$  mg/g 함유하고 있었고, 옥수수유에 포함된 total tocopherols는 이보다 높은  $1.26 \pm 0.11$  mg/g로 나타났다. 현미유의 대표적인 생리활성 물질인  $\gamma$ -oryzanol의 함량은 현미유와 기능성 유지(rice bran oil,  $1.38 \pm 0.05$ ; functional oil,  $1.06 \pm 0.04$  mg/g)에서 유의적 차이는 없었으며( $p < 0.05$ ), 옥수수유에서는 검출되지 않았다. 일반적으로 정제과정을 거치지 않은 현미유는 생리활성을 띤 비검화 물질을 4.5% 정도 함유하고 있으나, 실제로 시판되는 정제유에는 탈산과 같은 정제 공정 중에 대부분 손실되어 그 함량이 매우 적다(1,19,20).

#### 동물 실험 결과

4주의 식이기간 후, 간의 ACAT의 활성은 대조군에서 가장 유의적으로 낮게 나타났으며, 고 콜레스테롤 고 지방식이(HCHF)를 한 네 군 중에서 기능성 유지 식이군( $349.6$  pmol/min/mg)과 현미유 식이군( $316$  pmol/min/mg)이 옥수수유 식이군과 HCHF 식이군보다 유의적으로 낮은 activity를 보였다( $p < 0.05$ )(Fig. 1). Serum의 lipoprotein-associated phos-

Table 3. Content of phytosterols, tocopherols and  $\gamma$ -oryzanol in rice bran oil, functional oil, and corn oil

		Rice bran oil	Functional oil <sup>1)</sup>	Corn oil
		mg/g oil		
Phytosterol	Total	$2.02 \pm 0.08^{2) b3)}$	$2.04 \pm 0.17^b$	$3.50 \pm 0.11^a$
	Campesterol	$0.48 \pm 0.06^a$	$0.44 \pm 0.10^a$	$0.68 \pm 0.06^a$
	Stigmasterol	$0.34 \pm 0.06^a$	$0.35 \pm 0.09^a$	$0.30 \pm 0.08^a$
	$\beta$ -sitosterol	$1.19 \pm 0.04^b$	$1.25 \pm 0.15^b$	$2.52 \pm 0.13^a$
Tocopherol	Total	$0.13 \pm 0.01^b$	$0.13 \pm 0.04^b$	$1.26 \pm 0.11^a$
	$\alpha$ -tocopherol	$0.13 \pm 0.01^b$	$0.13 \pm 0.04^b$	$0.20 \pm 0.01^a$
	$\gamma$ -tocopherol	nd <sup>4)</sup>	nd	$0.39 \pm 0.03$
	$\delta$ -tocopherol	nd	nd	$0.67 \pm 0.10$
$\gamma$ -oryzanol		$1.38 \pm 0.05^a$	$1.06 \pm 0.04^a$	nd

<sup>1)</sup>Enzymatically synthesized oil including DG and MG.

<sup>2)</sup>Mean  $\pm$  SD.

<sup>3)</sup>Means with the different letter in a same row are significantly different ( $p < 0.05$ ).

<sup>4)</sup>nd stands for the content that is less than the limit of detection.

pholipase A<sub>2</sub>(Lp-PLA<sub>2</sub>)의 activity는 기능성 유지 식이군(7204.5 pmol/min/mg)에서 가장 낮게, HCHF 군(7716 pmol/min/mg)에서는 가장 높게 나타났으며, 현미유 식이군(7578.2 pmol/min/mg)과 옥수수유 식이군(7517.5 pmol/min/mg)의 Lp-PLA<sub>2</sub> activity는 HCHF 군보다는 낮았으나, 식이군 간의 유의적인 차이는 보이지 않았다(Fig. 1). ACAT은 free cholesterol로부터 cholesteryl ester(CE) 합성에 필요한 효소로서, ACAT 유전자가 적중된 생쥐(knockout mice)가 대조군에 비해 동맥경화의 형성이 감소된 것으로 밝혀지면서, 심혈관 질환 유발인자 중 하나로 인식되고 있다(21). 또한, Lp-PLA<sub>2</sub>는 산화된 LDL에서 phospholipid를 분해하여, ly-sophosphatidylcholine(lyso-PC)와 free oxidized fatty acids를 생성하고, 이들 분해 산물은 다시 macrophage 축적과 관련된 만성 염증 반응을 촉진, 혈관질환을 가속화시키는 것으로 알려지면서, Lp-PLA<sub>2</sub>는 관상동맥질환의 독립적인 위험요인으로 제시되고 있다(22). 이에, 동맥경화의 치료 혹은 예방의 목적으로 다양한 ACAT 또는 Lp-PLA<sub>2</sub> 저해제들이 조사

되고 개발되어 왔다. 본 동물실험 결과, 고 콜레스테롤 고 지방 식이를 한 C57BL/6J mice에서, DG, MG를 포함한 기능성 유지는 특히 ACAT를 저해하는 것으로 보여진다.

Mice의 간과 지방조직의 지방산 조성 분석 결과, 고 콜레스테롤 고 지방 식이를 한 네 군에서는 간과 지방조직의 지방산 조성이 유사한 경향을 보였다. 즉, oleic acid의 함량이 가장 높고(40~47 mol%), palmitic acid, linoleic acid의 순으로 조사되었다(Table 4). 반면, mice의 간에서 PC와 PE를 분리한 후 이의 지방산 조성을 비교해 본 결과, PC와 PE의 조성이 다르게 나타났다(Table 5). 즉 PC는 모든 식이군에서 palmitic acid가 가장 높았으나, PE에서는 oleic acid가 control과 HCHF 식이군에서 주된 지방산 성분이었으며, 현미유, 기능성 유지, 옥수수유 식이군에서는 stearic acid가 가장 높은 분포를 하고 있었다. 기능성 유지와 현미유 식이군에서는 간의 PC와 PE 지방산 조성이 유사하였으나, 이들 두 그룹과 옥수수유 식이군과 비교하였을 때는, 간의 PC 지방산 조성에서 옥수수유 식이군이 높은 palmitic acid 함량을

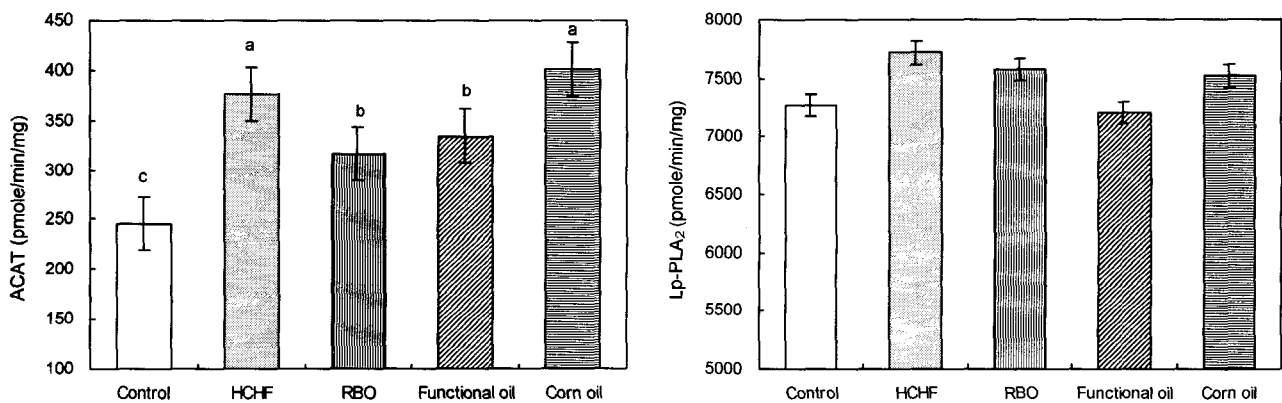


Fig. 1. Effects of rice bran oil, functional oil and corn oil on liver acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT) and serum lipoprotein-associated phospholipase A<sub>2</sub> (Lp-PLA<sub>2</sub>) activities in high cholesterol high fat fed C57BL/6J mice. HCHF, high cholesterol high fat; RBO, refined rice bran oil; Functional oil, enzymatically synthesized oil including DG and MG.

Table 4. Fatty acid composition of liver and adipose tissues in experimental groups

Fatty acid	Liver (mol%)					Adipose tissue (mol%)				
	Control <sup>1)</sup>	HCHF <sup>2)</sup>	RBO <sup>3)</sup>	Functional oil <sup>4)</sup>	Corn oil <sup>5)</sup>	Control <sup>1)</sup>	HCHF <sup>2)</sup>	RBO <sup>3)</sup>	Functional oil <sup>4)</sup>	Corn oil <sup>5)</sup>
C14:0	0.93	1.14	1.25	nd <sup>6)</sup>	1.21	0.56	0.24	nd	1.51	0.33
C16:0	22.88	21.11	22.79	22.42	21.15	31.81	21.70	25.94	24.28	22.72
C16:1	4.71	4.18	5.32	2.28	4.51	2.81	2.66	1.37	6.08	2.51
C18:0	2.52	7.14	5.52	10.39	5.17	12.66	9.22	11.54	5.95	11.69
C18:1	33.81	47.03	43.76	43.57	41.41	20.27	45.12	39.53	43.61	41.85
C18:2	34.61	19.14	21.05	16.69	26.55	22.73	15.99	18.54	17.93	18.15
C20:4	0.54	0.26	0.31	4.65	nd	9.16	5.07	3.08	0.64	2.75

<sup>1)</sup> Control (normal mice chow).

<sup>2)</sup> High cholesterol and high fat diet (7.5% cacao butter+7.5% lard+0.5% Na-cholate) feeding group.

<sup>3)</sup> High cholesterol and high fat diet (7.5% cacao butter+7.5% lard+0.5% Na-cholate) with 5% rice bran oil feeding group.

<sup>4)</sup> High cholesterol and high fat diet (7.5% cacao butter+7.5% lard+0.5% Na-cholate) with 5% synthesized rice bran oil feeding group.

<sup>5)</sup> High cholesterol and high fat diet (7.5% cacao butter+7.5% lard+0.5% Na-cholate) with 5% corn oil feeding group.

<sup>6)</sup> nd stands for the content that is less than the limit of detection.

Table 5. Fatty acid composition of phopphatidyl choline and phosphatidyl ethanolamine in liver

Fatty acid	Phopphatidyl choline (mol%)					Phosphatidyl ethanolamine (mol%)				
	Control <sup>1)</sup>	HCHF <sup>2)</sup>	RBO <sup>3)</sup>	Functional <sup>4)</sup> oil	Corn oil <sup>5)</sup>	Control <sup>1)</sup>	HCHF <sup>2)</sup>	RBO <sup>3)</sup>	Functional <sup>4)</sup> oil	Corn oil <sup>5)</sup>
C14:0	0.36	0.51	nd <sup>6)</sup>	0.52	nd	0.85	1.17	nd	nd	nd
C16:0	37.14	38.07	46.90	44.59	53.68	17.05	20.44	32.58	30.89	34.65
C16:1	1.43	1.35	1.62	1.44	0.48	1.61	1.41	nd	nd	nd
C18:0	13.58	10.94	12.55	13.28	16.47	18.19	22.75	33.51	35.26	43.93
C18:1	17.09	29.62	34.06	33.03	17.91	30.21	37.91	26.21	23.84	11.28
C18:2	24.13	16.76	4.85	7.14	11.46	15.95	10.39	7.70	10.02	10.14
C20:4	6.16	2.19	nd	nd	nd	12.68	5.58	nd	nd	nd

<sup>1)</sup>Control (normal mice chow).

<sup>2)</sup>High cholesterol and high fat diet (7.5% cacao butter+7.5% lard+0.5% Na-choleate) feeding group.

<sup>3)</sup>High cholesterol and high fat diet (7.5% cacao butter+7.5% lard+0.5% Na-choleate) with 5% rice bran oil feeding group.

<sup>4)</sup>High cholesterol and high fat diet (7.5% cacao butter+7.5% lard+0.5% Na-choleate) with 5% synthesized rice bran oil feeding group.

<sup>5)</sup>High cholesterol and high fat diet (7.5% cacao butter+7.5% lard+0.5% Na-choleate) with 5% corn oil feeding group.

<sup>6)</sup>nd stands for the content that is less than the limit of detection.

나타내었고, 상대적으로 oleic acid의 함량은 낮았다.

## 요 약

본 실험에서는 DG, MG를 함유한 기능성 유지를 합성하기 위해 lipase(IM 60)를 이용하여 현미유와 글라이세롤을 회분식 교반기에서 glycerolysis화 반응을 하였다. 합성한 기능성 유지와 현미유의 이화학적, 영양학적 특성을 비교하기 위해 지방산 조성, 기능성 물질 함량 및 동물식이 실험을 실시하였다. 실험 결과 기능성 유지는 DG(46.19%), MG(11.15%)와 TG(41.71%) 그리고 미량의 자유 지방산으로 구성되어 있었으며, 지방산 조성은 현미유와 흡사하였다. 비경화 물질 함량 또한 현미유와 유의적 차이를 보이지 않았으며, 주요 물질로써 phytosterol( $2.04 \pm 0.17$  mg/g),  $\gamma$ -oryzanol( $1.06 \pm 0.04$  mg/g),  $\alpha$ -tocopherol( $0.13 \pm 0.04$  mg/g)이 검출되었다. 동물식이실험에서는 기능성 유지와 현미유 식이군이 ACAT activity를 저해하였으며, HCHF 식이군과 옥수수유 식이군보다 유의적으로 낮게 나타났다( $p < 0.05$ ). 간과 지방 조직의 지방산 조성은 기능성 유지를 비롯한 모든 식이군에서 oleic acid의 함량이 가장 높았다.

## 감사의 글

본 연구는 한국 채유공업 협동조합의 지원(2003-2004)에 의해 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

## 문 헌

- Lee JH. 1987. Characteristics and utilization of rice bran oil. *The Kor Oil Chem Soc* 4: 1-6.
- EAM D, Korver O. 1996. Minor constituents of rice bran oil as functional foods. *Cereal Chem* 73: 69-74.
- Mattson FH, Grundy SM, Crouse JE. 1982. Optimizing the effect of plant sterols on cholesterol absorption in man. *Am J Clin Nutr* 35: 697-700.
- Sharma RD. 1980. Effects of hydroxy acids on hypercholesterolemia in rats. *Atherosclerosis* 37: 463-468.
- Seetharamaiah GS, Chandrasekhara N. 1993. Comparative hypocholesterolemic activities of oryzanol, curcumin and ferulic acid in rats. *J Food Sci Technol* 30: 249-252.
- Rukmini C, Raghuram TC. 1991. Nutritional and biochemical aspects of the hypolipidemic action of rice bran oil: a review. *J Am Coll Nutr* 10: 593-601.
- National agricultural products quality management service. 2002. *Application of corps statistics*. NAQS, Anyang, Korea.
- Korea Rural Economic Institute. 2001. *Food balance sheet*. KREI, Seoul, Korea. p 158-159.
- Akoh CC. 1995. Lipid-based fat substitutes. *Crit Rev Food Sci Nutr* 35: 405-430.
- Harrigan KA, Breene WM. 1989. Fat substitutes: Sucrose esters and simplers. *Cereal Foods World* 34: 261-267.
- Kotting J, Eibl H. 1994. Lipases and phospholipases in organic synthesis. In *Lipases, their structure, biochemistry and application*. Petersen SB and Woolley P, eds. Cambridge University Press, Cambridge, UK. p 289-313.
- Kevin CM, Michael HD, Rikio T, Noboru M. 2002. 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* 1230-1236.
- Uwe TB. 1995. Lipase-catalyzed syntheses of monoacylglycerols: review. *Enzyme Microb Technol* 17: 578-585.
- Cho EJ, Lee KT. 2003. Synthesis of structured lipids from corn oil and conjugated linoleic acid with immobilized lipase-catalyzed reaction. *Korean J Food Sci Technol* 35: 797-802.
- Park RK, Lee KT. 2003. Optimization for the phytosterol extraction and production of structured lipids from safflower seed. *Korean J Food Preservation* 10: 219-223.
- Cho EJ, Lee KT. 2003. Analysis of phytosterols and tocopherols, and production of structured lipids from the extracted plant oils. *Korean J Food Preservation* 10: 370-375.
- Leach CC, Hickey DMB, Ife RJ, Macphee CH, Smith SA, Tew DG. 2001. Lipoprotein-associated PLA<sub>2</sub> inhibition - a novel, non-lipid lowering strategy for atherosclerosis therapy. *Farmaco Il* 56: 45-50.

18. Cho KH, An S, Lee WS, Paik YK, Kim YK, Jeong TS. 2003. Mass-production of human ACAT-1 and ACAT-2 to screen isoform-specific inhibitor: a different substrate specificity and inhibitory regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 309: 864-872.
19. Sayre B, Saunders R. 1990. Rice bran and rice bran oil. *Lipid Technol* 2: 72-76.
20. Norton RA. 1995. Quantitation of steryl ferulate and *p*-coumarate esters from corn and rice. *Lipids* 30: 269-274.
21. Saxena U, Ferguson E, Newton RS. 1995. Acyl-coenzyme A:cholesterol-acyltransferase (ACAT) inhibitors modulate monocyte adhesion to aortic endothelial cells. *Atherosclerosis* 112: 7-17.
22. McCall MR, Belle ML, Forte TM, Krauss RM, Takanami Y, Tribble DL. 1999. Dissociable and nondissociable forms of platelet-activating factor acetylhydrolase in human plasma LDL: implications for LDL oxidative susceptibility. *Biochim Biophys Acta* 1437: 23-26.

(2004년 2월 17일 접수; 2004년 4월 29일 채택)