pISSN 1225-4339 eISSN 2287-4992
Korean J. Food Nutr. Vol. 36. No. 5, 354~359 (2023)
https://doi.org/10.9799/ksfan.2023.36.5.354

THE KOREAN JOURNAL OF
한국식품영양학회지
FOOD AND NUTRITION

중쇄지방산을 활용한 글리세린 지방산 에스테르의 화학 합성 및 항균 활성

†이 경 행 · 이 은 현*
한국교통대학교 식품영양학 전공 교수, *미소성 대표

Chemical Synthesis and Antibacterial Activity of Glycerine Fatty Acid Esters Using Medium-Chain Fatty Acid

†Kyung-Haeng Lee and Eun-Hyun Lee*
Professor, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea
**President, Misosung Co., Cheongju 28171, Korea*

Abstract

A mono-type glycerine fatty acid ester compound was chemically synthesized using medium-chain fatty acids with antibacterial activity, and the physicochemical quality and antibacterial activity of the synthesized glycerine medium-chain fatty acid ester compound were measured. At a reaction molar ratio of MCT(medium chain triglyceride) to glycerine of 1:2.5, 48.15% mono ester was produced. The physicochemical analysis of the synthesized glycerine fatty acid ester compound showed an acid content of 0.38~0.60%, which tended to increase slightly as the glycerine molar ratio increased. The saponification value decreased as the synthesized molar ratio of glycerine increased from 218 to 284. The number of bacteria was measured to confirm the degree of antibacterial activity of glycerine medium-chain fatty acid esters against food poisoning bacteria, *Bacillus cereus* and *Salmonella typhi*. The number of bacteria significantly decreased as the MCT:glycerine molar ratio increased. In particular, the antibacterial effect between the treatment groups was the highest when at an MCT:glycerine molar ratio of 1:2.5.

Key words: glycerine fatty acid ester, medium-chain fatty acid, chemical synthesis, antibacterial activity

서 론

최근 식품산업은 고도화, 단순화, 다양화 및 국제화 시대를 맞이하여 원료의 안정적인 공급, 효율적인 제조 가공공정, 위생적인 제품생산, 안전한 저장 및 유통기술 등이 확보된 고부가가치의 제품에 대한 국민관심이 높아지고 있다(Kwon 등 2010).

중쇄지방(medium chain fatty acid, MCT)은 코코넛 유지 등에서 유래된 것으로 MCT의 구성 지방산으로 카프릴산(caprylic acid, $C_{8:0}$), 카프릭산(capric acid, $C_{10:0}$), 라우릴산(lauric acid, $C_{12:0}$) 등이 있다(Kang 등 2015).

이들 중쇄지방산들은 항균활성을 지니고 있는 것으로 알려져 있으며 그 기작은 대개 중쇄지방산이 세포막에 작용하여 균을 사멸시키고 특히 전자전달계와 인산화 작용을 방해함으로써 에너지 생성 기능에 영향을 미치는 것으로 추정되어지고 있다(Boyaval 등 1995; Więckowski & Wojtczak 1998; Desbois & Smith 2010).

지방산 중에서도 탄소 수 10개인 capric acid, 12개인 lauric acid가 항균활성이 가장 높은 것으로 알려져 있고 탄소수가 이들보다 짧거나 길면 항균활성이 떨어지는 것으로 보고되고 있다(Sun 등 2003; Wille & Kydonieus 2003; Debrois & Smith 2010). 중쇄지방산들인 caprylic acid, capric acid, lauric acid 등은 국내 식품첨가물 공전에 등재된 식품첨가물이며, 특히 caprylic acid의 경우에는 FDA에서 식품에 직접 첨가할 수 있도록 허용한 GRAS(Generally Recognized As Safe) 인증 물질이다(Ministry of Food and Drug Safety 2011; CFR 2023).

† Corresponding author: Kyung-Haeng Lee, Professor, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Chungbuk 27909, Korea. Tel: +82-43-820-5334, Fax: +82-43-820-5850, E-mail: leekh@ut.ac.kr

Bergsson 등(2001)은 lauric acid, palmitoleic acid 및 monocaprin은 *Streptococci*에 대해 5 mM 농도에서 6 log CFU/mL 수준 이상의 감소를 보였고 지방산 에스테르 형태인 monocarpin은 더 낮은 농도에도 가장 높은 균성장 억제를 확인하였다고 하였으며 특히 *Staphylococcus aureus* 에서도 더 낮은 농도에서 monocaprin은 항균활성을 나타내는 유일한 지질이었다고 하였다. Thormar 등(2006)은 *Campylobacter jejuni*의 현탁액에 10 mM의 capric acid와 monocaprylin을 10분간 처리한 결과, 초기 균수와 비교하여 6~7 log CFU/mL 수준의 균이 ND 수준까지 감균되는 높은 항균활성을 확인하였다고 하였다. 사과주스에 접종한 *E. coli* O157:H7에는 더욱 낮은 농도인 5 mM의 monocaprylin을 장시간(24시간) 적용하여 5 log CFU/mL 이상의 높은 저감효과를 확인하여 중쇄지방산이 낮은 pH 환경에서 더 높은 저감효과를 보이는 것을 확인하였다(Nair 등 2005).

이와 같이 이들 각각의 성분들은 항균력이 입증되어 위생용품 및 주방기기의 항균세제 및 동물 사료 등의 영양 강화와 항균제 및 자돈 등의 무독성 항생제로서 이용되고 있다. 중쇄지방산들은 매우 큰 항균력을 가지고는 있으나 식품분야에의 적용이 매우 제한적이라 할 수 있는데 그 이유는 중쇄지방산 자체가 지용성의 성질을 지니고 있기 때문에 수용성 식품 즉, 대부분의 식품에서의 적용은 쉽지 않다고 할 수 있다. 이에 중쇄지방산의 항균력을 전 식품분야에 응용하기 위해서는 수상(water phase)에서의 용해력이 필요하며, 이러한 특성을 나타내기 위해서는 식품 첨가물 유화제인 '글리세린 지방산 에스테르'의 개발이 절실히 필요하다고 할 수 있다. 또한 Lee 등(2011)은 중쇄지방산보다는 중쇄지방산을 함유한 triglyceride, monoglyceride 등의 유도체가 더 높은 효과를 보였으나, 중쇄지방산 유도체의 경우 가격이 일반 중쇄지방산에 비해 훨씬 높아 산업적 적용은 어려울 것이라 하였다.

따라서 본 연구에서는 항균활성을 갖는 중쇄지방산을 활용하여 mono 형태의 글리세린 지방산 에스테르 화합물을 화학적으로 합성하고 합성된 글리세린 중쇄지방산 에스테르 화합물의 이화학적 품질 및 항균활성을 측정하였다.

재료 및 방법

1. 중쇄지방산을 활용한 글리세린 지방산 에스테르의 화학합성

중쇄지방산의 특성인 항균력을 식품에서 발현시키기 위해서는 수상에서의 용해력을 증대시켜야 함에 따라, Fig. 1과 같이 에스테르 화학 합성을 통하여 mono glyceride형 및 diglcyeride 형을 제조하고자 글리세린과 중쇄지방산의 triglyceride 형태인 MCT(medium chain triglyceride)를 활용하여 에스테르 화

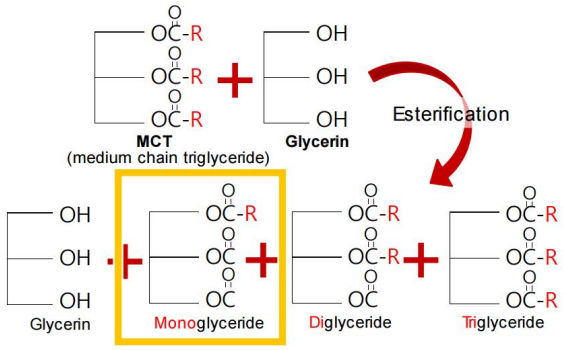

Fig. 1. Esterification of glycerine fatty acid using medium chain triglyceride.

학 반응을 진행함에 있어 MCT : 글리세린의 반응몰비는 각각 1:1.0(Sample-1), 1:1.5(Sample-2), 1:2.0(Sample-3), 1:2.5(Sample-4) 및 1:3.0(Sample-5)으로 하여 제조하였다.

이때의 반응 촉매는 calcuim stearate를 사용하였으며 반응온도는 245~255℃를 3시간 동안 유지시키면서 제조하였다.

2. 글리세린 지방산 에스테르의 합성정도 확인

MCT와 글리세린을 비율별로 에스테르 화학 합성을 통하여 제조하였고 제조된 글리세린 중쇄지방산 에스테르의 합성 정도를 확인하기 위하여 식품첨가물 공전의 일반시험법에 등재되어 있는 가스크로마토그래피 시험법의 면적백분율법에 따라 진행하였다. 즉 글리세린 중쇄지방산 에스테르의 Mono-, Di-, Tri-ester의 함량을 확인하기 위하여 Agilant 6890 GC(Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)를 사용하였고 column은 capillary DB-5(J&W7, Folsom, CA, USA, 30 m)를 사용하였으며, carrier gas는 helium을 사용하였고, 분석시료는 전처리 공정으로는 TMS(trimethylsilation)화를 진행하여 1.0 μL 주입하였다. 컬럼 온도는 150℃에서 분당 10℃씩 상승시킨 후, 320℃에서 25분간 유지한 후 냉각하였다. 샘플 주입의 split ratio는 10/1로 설정하여 분석을 진행하였고 검출기는 FID(Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)를 사용하였으며, gas chromatogram은 Fig. 2와 같다.

3. 글리세린 지방산 에스테르의 이화학적 시험

글리세린 중쇄지방산 에스테르는 식품 첨가물로서 식품첨가물 공전에 '27. 글리세린지방산에스테르'인 화학적 합성품으로 분류된다. 식품 첨가물 공전에서 관리하는 이화학적인 순도 시험은 산가를 6 이하로 관리하고 있으며, 분석 방법은 Ministry of Food and Drug Safety(2021)에 등재되어 있는 유지류 시험법에 따라 평가하였다. 즉 제조한 시료에 ethanol: ether 혼액(1:2, v/v) 100 mL를 넣어 잘 용해시키고 여기에

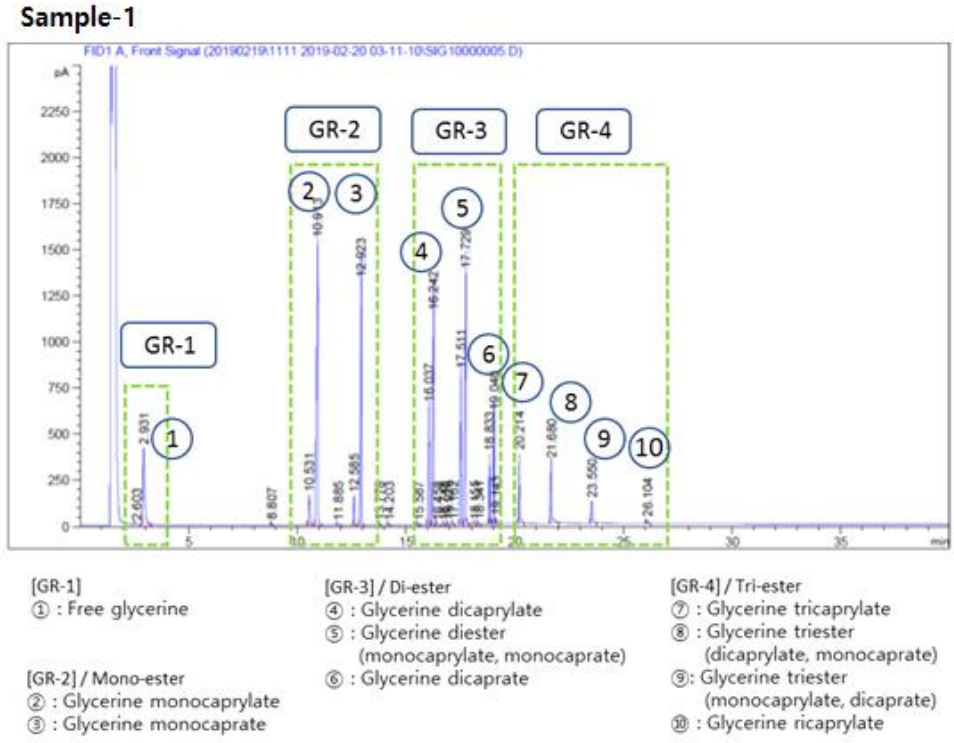

Fig. 2. Chromatogram of synthesized glycerine medium fatty acid esters.

phenolphthalein을 지시약으로 하여 0.1 N 에탄올성 NaOH 용액으로 적정하여 측정하였다.

순도 시험 이외에 일반적으로 글리세린 지방산 에스테르의 품질 평가에 사용되는 이화학 분석으로는 비누화가를 활용하고 있으므로 제조된 글리세린 중쇄지방산 에스테르의 비누화가 시험은 식품 공전(2021)에 등재되어 있는 시험법에 따라 진행하였다. 즉 제조한 시료에 0.5 N KOH-ethanol 용액 25 mL를 가하고 이에 환류냉각관을 연결한 후 30분간 가열하였다. 여기에 phenolphthalein을 지시약으로 하여 0.5 N HCl 용액으로 적정하여 측정하였다.

4. 글리세린 지방산 에스테르의 항균활성 측정

화학 합성에서 얻어진 '글리세린 중쇄지방산 에스테르'의 항균 활성을 확인하기 위하여 몰 농도별(1:1.0, 1:1.5, 1:2.0 및 1:2.5)로 합성한 에스테르 화합물을 0.005, 0.01 및 0.02%가 되도록 농도별로 1 mL씩 petri dish에 각각 분주하고 PCA 배지를 분주 후 굳혔다. 여기에 미리 배양해 놓은 *Bacillus cereus* 및 *Salmonella typhi*를 10배 희석법으로 10^4, 10^5 및 10^6으로 희석하고 희석액 0.1 mL씩 각각 접종한 후 37℃에서 배양한 후 균수를 측정하였다. 대조군은 합성한 에스테르 화합물 대신 멸균된 증류수를 첨가하여 비교하였다.

결과 및 고찰

1. 중쇄지방산을 활용한 글리세린 지방산 에스테르의 화학합성

수상에서 용해력을 가지면서도 중쇄지방산의 특성인 항균력을 식품에서 발현시키기 위하여 MCT와 글리세린을 몰비율로 합성하였으며 글리세린 중쇄지방산 구성비율을 측정한 결과는 Table 1과 같다.

MCT와 글리세린의 반응 몰비를 1:1로 에스테르 반응을 진행한 시료에서는 mono 에스테르 함량이 37.44%로 가장 낮은 함량이었고 MCT와 글리세린의 반응 몰비를 1:2.5로 하였을 때가 48.15%로 최대의 mono 에스테르가 생성되는 것으로 확인되었다. MCT와 글리세린의 에스테르 화학 합성 반응은 무작위 에스테르 교환 반응으로 글리세린의 반응 몰비가 증가할수록 mono 에스테르의 함량이 증가됨이 확인된 반면, 최종 합성품에서 di 에스테르의 함량이 감소하고 부산물인 미반응 글리세린의 함량이 증가되어 유효성이 낮아질 것으로 판단되었다. 이와 같은 결과에 따라 유추해보면, 유효한 효과를 발현하는 mono 에스테르를 합성할 수 있는 최적의 합성반응조건은 1몰의 MCT와 2몰~2.5몰의 글리세린으로 반응시켰을 때임을 확인할 수 있었다.

Table 1. Composition ratio of glycerine fatty acid according to the molar ratio of MCT and glycerine

Molar ratio (MCT:Glycerine)		1:1.0	1:1.5	1:2.0	1:2.5	1:3.0
Composition ratio (%)	Free glycerine	7.18	14.40	21.67	28.53	32.31
	Mono ester	37.44	45.26	47.95	48.15	47.27
	Di ester	46.53	35.89	27.33	20.90	19.08
	Tri ester	8.84	4.45	3.05	2.41	1.34

2. 글리세린 지방산 에스테르의 이화학적 시험

합성된 글리세린 지방산에스테르 화합물의 이화학적 분석 결과는 Table 2와 같다.

산가의 경우, 0.38~0.60으로 몰 비율별로 글리세린의 비율이 높아질수록 약간씩 증가하는 경향이었다. 식품첨가물 공전에서 규정하고 있는 글리세린 지방산 에스테르의 규격은 6 이하로 되어있어 모든 몰 농도 비율에 따른 반응에 의해 생성된 글리세린 지방산 에스테르는 적합함을 확인할 수 있었다.

비누화가의 경우, 218~284로 글리세린의 합성 몰비가 높아질수록 비누화가가 낮아짐을 알 수 있었으며, 중쇄지방산 mono 에스테르의 함량이 높게 합성된 제품의 비누화가는 232~248 정도임을 확인하였다.

3. 글리세린 지방산 에스테르의 항균활성 측정

화학 합성에서 얻어진 글리세린 중쇄지방산 에스테르가 식중독 균인 *Bacillus cereus* 및 *Salmonella typhi*에 대한 항균활성 정도를 확인하기 위하여 균수를 측정한 결과는 Table 3 및 4와 같다.

10^4으로 균을 희석한 경우에서는 대조군은 균수가 많아 셀 수 없을 정도였으며 MCT와 글리세린의 몰 비율이 높아질수록 균수가 현저하게 감소하는 것을 알 수 있었다. 특히 처리군간에 항균효과는 MCT와 글리세린의 몰비가 1:2.5이었을 때가 가장 높았으며 다음으로는 1:2.0, 1:1.5의 순이었다. 즉 MCT와 글리세린의 비율이 1:1.0의 몰 비율로 반응시킨 경우도 항균효과가 있었지만 글리세린의 몰비율이 높은 시료에 비하여 보다 낮은 항균 효과를 보여 MCT와 글리세린의 몰 비율이 1:2.5로 하였을 때가 보다 효과적인 것으로 나타났다.

균수가 10^5 및 10^6으로 희석한 경우에도 글리세린 지방산 에스테르 화합물의 첨가 농도가 높을수록 항균효과가 우수하였으며 처리군간에는 1:2.5의 비율일 때가 가장 높은 항균효과를 나타내었다.

이와 같이 1:2.0 또는 1:2.5의 비율로 제조한 글리세린 지방산 에스테르가 보다 높은 항균효과를 보이는 이유는 Table 1에서 보는 바와 같이 mono 에스테르의 함량이 높기 때문인 것으로 사료되었다.

이상의 결과로 보아 MCT와 글리세린의 비율이 1:1.0의 몰 비율로 반응시킨 경우, 항균효과가 있었지만 글리세린의 몰 비율이 높은 처리군 보다 낮은 항균 효과를 나타내었다. 즉 가장 높은 *Salmonella typhi*에 대한 항균효과를 보이는 글리세린 지방산 에스테르로는 MCT와 글리세린의 몰 비율이 1:2 또는 1:2.5로 하였을 때가 보다 효과적이었다.

Bergsson 등(2001)이 식중독세균 *S. aureus*의 현탁액에 미량(10 mM, 0.17%)의 capric acid, lauric acid와 capric acid의 monoglyceride인 monocarpin을 10분간 처리한 결과 5~6 log CFU/mL 수준의 높은 균 성장저해를 확인하였다고 하여 mono 형태의 글리세린 지방산 에스테르 함량이 가장 많았던 결과를 뒷받침해 주었다.

이상의 결과를 종합하여 보면 항균활성을 갖는 중쇄지방산을 활용하여 mono 형태의 글리세린 지방산 에스테르 화합물을 화학적으로 합성하였고 항균활성을 측정한 결과, MCT와 글리세린의 몰 비율이 1:2 또는 1:2.5로 하였을 때 항균효과가 우수하였다.

요약 및 결론

항균활성을 갖는 중쇄지방산을 활용하여 mono 형태의 글리세린 지방산 에스테르 화합물을 화학적으로 합성하고 합성된 글리세린 중쇄방산 에스테르 화합물의 이화학적 품질

Table 2. Acidity and saponification value of glycerine medium chain fatty acid ester

Molar ratio (MCT : Glycerine)	1 : 1.0	1 : 1.5	1 : 2.0	1 : 2.5	1 : 3.0
Acidity	0.38	0.43	0.44	0.51	0.60
Saponification value	284	262	248	232	218

Table 3. Antibacterial activity of glycerine medium-chain fatty acid esters against *Bacillus cereus* (unit: CFU/mL)

Dilution	Concentrate (%)	Molar ratio (MCT : glycerine)				
		Control	1 : 1.0	1 : 1.5	1 : 2.0	1 : 2.5
10^4	0.005%	∞[1)]	4.4×10^6	8.1×10^5	3.9×10^5	5.5×10^4
	0.01%		2.3×10^6	2.6×10^5	6.0×10^4	ND[2)]
	0.02%		1.4×10^6	1.0×10^4	1.0×10^4	ND
10^5	0.005%	5.3×10^7	5.4×10^6	1.5×10^5	8.5×10^5	2.0×10^5
	0.01%		5.9×10^6	ND	2.0×10^5	ND
	0.02%		1.0×10^6	ND	ND	ND
10^6	0.005%	1.3×10^8	6.8×10^7	1.0×10^6	6.5×10^6	ND
	0.01%		2.3×10^7	ND	ND	ND
	0.02%		5.0×10^5	ND	ND	ND

1) ∞: Too many to count.
2) ND: not detected.

Table 4. Antibacterial activity of glycerine medium-chain fatty acid esters against *Salmonella typhi* (unit: CFU/mL)

Dilution	Concentrate (%)	Molar ratio (MCT : glycerine)				
		Control	1 : 1.0	1 : 1.5	1 : 2.0	1 : 2.5
10^4	0.005%	∞[1)]	1.7×10^6	2.6×10^5	ND[2)]	ND
	0.01%		5.8×10^5	1.0×10^4	ND	ND
	0.02%		2.8×10^5	ND	ND	ND
10^5	0.005%	5.1×10^7	5.0×10^6	1.5×10^5	ND	ND
	0.01%		8.5×10^5	ND	ND	ND
	0.02%		ND	ND	ND	ND
10^6	0.005%	1.4×10^8	3.5×10^6	ND	ND	ND
	0.01%		ND	ND	ND	ND
	0.02%		ND	ND	ND	ND

1) ∞: Too many to count.
2) ND: not detected.

및 항균활성을 측정하였다. MCT와 글리세린의 반응 몰비를 1:2.5로 하였을 때가 48.15%로 최대의 mono 에스테르가 생성되는 것으로 확인되었다. 합성된 글리세린 지방산 에스테르 화합물의 이화학적 분석 결과, 산가의 경우, 0.38~0.60%로 몰비율별로 글리세린의 비율이 높아질수록 약간씩 증가하는 경향이었다. 비누화가의 경우, 218~284로 글리세린의 합성 몰비가 높아질수록 비누화가가 낮아지는 것으로 나타났다. 글리세린 중쇄지방산 에스테르가 식중독 균인 *Bacillus cereus* 및 *Salmonella typhi*에 대한 항균 활성 정도를 확인하기 위하여 균수를 측정한 결과MCT:글리세린의 몰 비율이 높아질수록 균수가 현저하게 감소하는 것을 알 수 있었다. 특히 처리 군간에 항균효과는 MCT:글리세린의 몰비가 1:2.5이었을 때가 가장 높았다.

감사의 글

본 논문은 2018년도 중소기업청 맞춤형 기술파트너 지원사업과 2021년 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업입니다(No. 2021R1A6A1A03046418).

References

Bergsson G, Arnfinnsson J, Steingrímsson Ó, Thormar H. 2001. Killing of Gram-positive cocci by fatty acids and monoglycerides. *J Pathol Microbiol Immunol* 109:670-678

Boyaval P, Corre C, Dupuis C, Roussel E. 1995. Effects of free

fatty acids on propionic acid bacteria. *Lait* 75:17-29

Code of Federal Regulation [CFR]. 2023. 21§184.1025 Caprylic acid. Available from https://www.ecfr.gov/current/title-21/chapter-I/subchapter-B/part-184/subpart-B/section-184.1025 [cited 20 March 2023]

Desbois AP, Smith VJ. 2010. Antibacterial free fatty acids: Activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:1629-1642

Kang IJ, Kang MH, Kim MS, Park SS, Byun EH, Yoo SH, Yook HS, Lee KH, Lee MK, Lee YT, Lee OH, Lee JS, Lim SS, Lim JY, Jeon WJ, Jung SJ, Jung YH, Jung HJ. 2015. Food Chemistry. p.66. Life Science

Kwon SC, Choi GH, Hwang JH, Lee KH. 2010. Physicochemical property and antioxidative activity of hot-water extracts from enzyme hydrolysate of *Astragalus membranaceus*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39:406-413

Lee MS, Jang SH, Yang JH. 2011. Inactivation of microorganisms in potentially hazardous non-thermal foods. *Ministry of Food and Drug Safety*. Report No. 1475006257

Ministry of Food and Drug Safety. 2011. Food Additives Code. Available from https://various.foodsafetykorea.go.kr/fsd/#/ [cited 14 August 2023]

Ministry of Food and Drug Safety. 2021. Korea Food Code. Available from https://various.foodsafetykorea.go.kr/fsd/#/ [cited 25 January 2023]

Nair MKM, Abouelezz H, Hoagland T, Venkitanarayanan K. 2005. Antibacterial effect of monocaprylin on *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. *J Food Prot* 68:1895-1899

Sun CQ, O'Connor CJ, Roberton AM. 2003. Antibacterial actions of fatty acids and monoglycerides against *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 36:9-17

Thormar H, Hilmarsson H, Bergsson G. 2006. Stable concentrated emulsions of the 1-monoglyceride of capric acid (monocaprin) with microbicidal activities against the food-borne bacteria *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 72:522-526

Więckowski MR, Wojtczak L. 1998. Fatty acid-induced uncoupling of oxidative phosphorylation is partly due to opening of the mitochondrial permeability transition pore. *FEBS Lett* 423:339-342

Wille JJ, Kydonieus A, 2003. Palmitoleic acid isomer (C16:1Δ6) in human skin sebum is effective against Gram-positive bacteria. *Skin Pharmacol Physiol* 16:176-187

Received 29 August, 2023
Revised 05 September, 2023
Accepted 19 September, 2023